

令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09961

研究課題名(和文) Bioactive Glass配合覆髄材および局所的歯髄再生医用材料の同時開発

研究課題名(英文) Simultaneous development of bioactive glass contained pulp capping material and localized pulp regenerative biomaterial

研究代表者

鷲尾 絢子 (Washio, Ayako)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：10582786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質・歯髄複合体の創傷治癒を誘導するBioactive glass (BG) 配合覆髄材の開発を目標として、良好な物理化学的特性であること、および細胞適合性と生体親和性を有することを明らかにし、BG配合覆髄材の商品化に至り、さらに逆根管充填材としても応用可能であることがわかった。また、覆髄による歯髄創傷治癒の誘導が困難な露髄に対して局所的な象牙質・歯髄複合体の再生を促すBG/FGF2-Gel複合スポンジを用いた統合的開発を目標として、本スポンジは、生体親和性が高い材料であること、および象牙質・歯髄複合体の創傷治癒と組織再生の点から炎症反応は軽度であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

象牙質・歯髄複合体の創傷治癒の創傷治癒と再生を誘導する生体親和性・生体活性のコンセプトを取り入れたバイオマテリアルとして新たな覆髄材、およびスキャフォールドの設計・開発を進めた。それにより、象牙質・歯髄の保存と歯髄の喪失による歯の機能低下の阻止を行うために確実な歯内治療・再生誘導治療を行うことが可能になり、これまで以上に歯の保存・維持、および健全な口腔環境の維持が実現となる。

研究成果の概要(英文)： We aimed the development of a pulp capping material containing bioactive glass (BG), which induces wound healing of the dentin-pulp complex. It was found to have good physicochemical properties, cytocompatibility and biocompatibility, leading to the commercialization of BG pulp capping material and its possible application as a retrograde filling material. In addition, we aimed the developing a BG/FGF2-Gel composite sponge that promotes localized dentin/pulp complex regeneration for exposed pulp where pulp wound healing is difficult to induce by pulp capping. This sponge was found to be a material with high biocompatibility and a mild inflammatory response in terms of dentin/pulp complex wound healing and tissue regeneration.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：Bioactive glass, FGF-2, Gelatin, 象牙質・歯髄複合体, 覆髄材, 逆根管充填材, バイオマテリアル, スキャフォールド

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

健康寿命の延長に「健全な口腔環境の維持」が大きな影響を与えることから、全ての年齢層で歯・歯髄を保存することがこれからの超高齢社会にとって極めて重要であることが示されている。歯髄の喪失による歯の機能低下の阻止を行うために、象牙質・歯髄複合体の保存治療から再生療法、そして再生後の機能維持まで考慮された連続的で予知性の高い治療法を確立する必要がある。しかしながら「組織再生から機能維持までの連続性」というコンセプトのもとに設計・開発された、象牙質・歯髄複合体の創傷治療・再生を誘導する生体材料はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、企業と共同開発し臨床応用されているバイオセラミックス系根管充填用シーラーに配合されている Bioactive glass (BG) を用い、(1)象牙質・歯髄複合体の最適な創傷治療を誘導する BG 配合覆髄材の短中期的開発と、覆髄による歯髄創傷治療の誘導が困難な露髄に対し、(2)局所的な象牙質・歯髄複合体の再生を促す BG 配合スキャフォールドの中長期的開発を同時進行し、組織に対する高い親和性と生体材料間の結合性を有する覆髄材および象牙質・歯髄複合体再生用スキャフォールドを統合的に開発することである。

3. 研究の方法

(1) Bioactive Glass (BG) 配合覆髄材の開発

露髄範囲が小さい症例に対する覆髄に BG 配合根管充填用シーラー (CS-BG) を応用するため、CS-BG の粘稠性・硬化速度を任意に調整できる BG 配合粉末 (NSY-224) を開発・作製した。本研究では、NSY-224 の CS-BG に配合する適正な割合を材料学的および生体親和性の点から検討した。また、既存のセメント (MTA セメント、酸化亜鉛ユージノールセメント) と比較した。

材料学的評価

CS-BG の重量比 1 に対して任意の重量の NSY-224 を練和した複数の試作 BG 配合セメントを作製し、各試作セメントの電界放出形走査電子顕微鏡 (FE-SEM) による表面性状観察、エックス線回折 (XRD) による結晶分析、経時的な pH 変化、イオン溶出量の測定、ちよう度、硬化時間、溶解率、およびエックス線造影性を検証した。

in vitro 評価

培養細胞株と試作 BG 配合セメントをトランズウェルで共培養し、細胞形態分析、生存細胞数計測、Wound healing assay による細胞遊走能評価、免疫細胞染色、ALP 活性測定と Alizarin red 染色による石灰化能分析、RT-PCR による細胞マーカーの発現分析を行った。

in vivo 評価

マウス背部皮下に試作 BG 配合セメントを埋入し、組織学的・免疫組織学的手法を用い炎症反応を評価した。

(2) Bioactive Glass (BG) 配合スキャフォールドの開発

BG 配合 FGF-2 徐放性ゼラチンスポンジ (BG/FGF2-Gel) の細胞適合性と生体親和性を検証した。

in vitro 評価

BG と FGF-2 で刺激した培養細胞株を 48 時間培養後に CCK-8 アッセイを行った。

in vivo 評価 (マウス背部皮下モデル)

マウス背部皮下に BG/FGF2-Gel を埋入し異所性硬組織形成と炎症反応を評価した。

in vivo 評価 (ラット臼歯断髄モデル)

ラット臼歯断髄モデルに BG/FGF2-Gel を埋入し、その上部に試作 BG 配合セメントを適用する。断髄部における炎症応答と歯髄および硬組織の再生誘導、そして覆髄材との界面を評価した。

4. 研究成果

(1) Bioactive Glass (BG) 配合覆髄材の開発

材料学的評価

試作 BG 配合セメントと MTA セメント表面には、花弁様の析出物からなる典型的な球状構造が観察された。酸化亜鉛ユージノールセメント (EBA セメント) 表面には同様の構造はみられなかった。セメント表面の結晶性を評価したところ、花弁様の結晶はハイドロキシアパタイトで構成されており、結晶性は NSY-224 の混合割合が大きいほど高くなる傾向にあった。

次に、精製水に様々な期間浸漬したセメント試料の pH 変化とイオン溶出量を測定した。すべてのセメント試料において、浸漬から 2 時間で pH の急激な上昇が観察された。48 時間では、試作 BG 配合セメント、MTA セメント、および EBA セメントの pH は、各々 10.5、12.1、7.9 で安定した。NSY-224 の混合割合による溶出速度に差はなかった。溶出したカルシウムイオンの濃度は、MTA セメントが最も高く、溶出したケイ酸イオンの濃度は、試作 BG 配合セメントが MTA セメントよりも高かった。EBA セメントのイオン溶出は少なかった。

ISO 規格を用いて評価したちよう度、硬化時間、溶解率、およびエックス線造影性は下記の

通りであった (Table 1).

Table.1 各セメントのちよう度, 硬化時間, 溶解率, およびエックス線造影性

試料	試作BG配合セメント	MTAセメント	EBAセメント
ちよう度	16.5 mm	10.6 mm	33.1 mm
硬化時間	8 min	10 min	1 min
溶解率	0.5% 崩壊なし	2.4% 崩壊なし	0.1% 崩壊なし
エックス線造影性	4 mm Al	5 mm Al	5 mm Al

in vitro 評価

材料学的評価により, 試作 BG 配合セメントは覆髄材および逆根管充填材としての有用性が得られたため, in vitro 評価では, 象牙芽細胞様細胞とセメント芽細胞様細胞 (HCEMs) を用いて細胞形態評価と生存細胞数を測定した. またそれ以外の評価は, HCEMs を用いて評価した.

セメントによる刺激をしない Control では, 象牙芽細胞様細胞および HCEMs は紡錘形をしていた. 試作 BG 配合セメントおよび MTA セメントとともに, Control と比較して細胞形態に影響を与えなかった. その一方で, EBA セメントへの刺激により, 細胞内に液胞を誘発した. 生細胞数のカウントでは, 試作 BG 配合セメントでは Control と比較して生細胞数に有意な差は見られず, MTA セメントでは試作 BG 配合セメントに比べて生細胞数が少ない傾向にあった. さらに, EBA セメントでは他群と比較して生細胞数が有意に少なかった. 免疫細胞染色では, 試作 BG 配合セメントと MTA セメントの Ki-67 陽性細胞および Caspase3 陽性細胞の数は Control と同程度であったが, Caspase3 陽性細胞の数は実験群の中で EBA セメントが最も多かった. 半定量的分析において, DAPI 陽性細胞に対する Caspase3 陽性細胞の割合は, Control, 試作 BG 配合セメント, MTA セメント, EBA セメントで各々12%, 13%, 15%, 74%であった.

HCEMs のセメント芽細胞分化マーカー遺伝子, ALP 活性および石灰化結節沈着に及ぼす各セメントの影響を検討した. CEMP-1 および F-SPONDIN の mRNA 発現量は, Control と比較して, 試作 BG 配合セメントおよび EBA セメントによる有意な影響はなかった. MTA セメントでは, 他群と比較して, F-SPONDIN の mRNA 発現量は有意に減少し, CEMP-1 の mRNA 発現量は有意に増加した. 試作 BG 配合セメントと MTA セメントは ALP の mRNA 発現量を有意に増加させたが, いずれの群も Control 群と比較して ALP 活性に有意な差は認めなかった. 一方で, ALP 染色の結果, 試作 BG 配合セメントの染色強度は MTA セメントや EBA セメントと比較して有意に高いことが示された. さらに, アリザリンレッド S 染色により, 試作 BG 配合セメントおよび MTA セメントの染色強度は, Control 群の染色強度よりも高く, EBA セメントの染色強度は試作 BG 配合セメントおよび MTA セメントの染色強度よりも低いことが示された.

in vivo 評価

マウス背部皮下埋入試験で, 術後7日目では, 3つのセメント刺激群で炎症性細胞の浸潤が観察された. しかし, 試作 BG 配合セメントおよび MTA セメントでは, EBA セメントよりも炎症性細胞の浸潤が軽度であった. 特に, EBA セメントは他群と比較して炎症性細胞が多く集積する傾向があった. さらに, ほとんどの標本で線維性被膜の形成が認められた. 免疫組織化学染色により, EBA セメントは他群と比較して CD11b および CD45 陽性細胞の浸潤が多いことが示された.

今回開発した新規 BG 配合覆髄材は, 逆根管充填材としての特性も有すること, さらに既存のセメントと同等あるいはそれ以上の物理化学的特性, 細胞適合性, および生体適合性を有していることを実証した.

(2) Bioactive Glass (BG) 配合スキャフォールドの開発

in vitro 評価

Gelatin コーティングした dish 上での象牙芽細胞様細胞の2次元培養により, 任意の濃度の BG 溶出溶媒では細胞毒性を示さないこと, FGF-2 の刺激により細胞増殖することが明らかとなった.

in vivo 評価 (マウス背部皮下モデル)

任意のサイズの BG 配合 FGF-2 徐放性ゼラチンスポンジ (BG/FGF2-Gel) をマウス背部皮下に2週間埋入したところ, ゼラチンスポンジと比較して, BG/FGF2-Gel は BG が配合されていることによりスポンジの細孔が維持されており, スポンジ内部に血管形成が認められた. その一方で, 炎症性細胞の浸潤は少なかった. さらに6週間埋入 BG/FGF2-Gel は軟組織部位である背部において異所性骨化はされておらず, 吸収されていた.

in vivo 評価（ラット臼歯断髄モデル）

まず断髄モデルを作製するにあたって、窩洞形成量が少なくなる傾向があり、露髄モデル程度の窩洞形成しか行うことができなかった。したがって、窩洞に BG/FGF2-Gel と BG 配合セメントを充填したが、サンプル回収の際にはセメントは脱離しており、適正な評価を行うことができなかった。

今回の in vitro 評価により、BG と FGF-2 は象牙芽細胞様細胞の細胞増殖を維持あるいは上昇させることから、BG と FGF-2 が象牙質・歯髄複合体再生用スキャフォールドとして有効であることが示唆された。また、マウス背部皮下埋入試験により BG 配合 FGF-2 徐放性ゼラチンスポンジは、生体親和性が高いスキャフォールドであることが示唆された。その一方で、今後、実際の臨床を想定した断髄モデルにおける評価を行うことで、本スキャフォールドの創傷治癒と組織再生に対する有効性を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murata Kazumasa, Washio Ayako, Morotomi Takahiko, Rojasawasthien Thira, Kokabu Shoichiro, Kitamura Chiaki	4. 巻 11
2. 論文標題 Physicochemical Properties, Cytocompatibility, and Biocompatibility of a Bioactive Glass Based Retrograde Filling Material	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 1828 ~ 1828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano11071828	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miura Hiroki, Yoshii Shinji, Fujimoto Masataka, Washio Ayako, Morotomi Takahiko, Ikeda Hiroshi, Kitamura Chiaki	4. 巻 14
2. 論文標題 Effects of Both Fiber Post/Core Resin Construction System and Root Canal Sealer on the Material Interface in Deep Areas of Root Canal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 982 ~ 982
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma14040982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 鷲尾 絢子、村田 一将、諸富 孝彦、北村 知昭	4. 巻 43
2. 論文標題 ペースト/粉末比が異なるBioactive Glass配合セメント間の界面	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本歯内療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 11 ~ 15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20817/jeajournal.43.1_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Gelatin-coated Well上で培養した象牙芽細胞様細胞株に対する Bioactive glassおよびFGF-2の影響
2. 発表標題 鷲尾絢子, 古株彰一郎, 北村知昭
3. 学会等名 第154回日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	Bioactive glassを配合した新規逆根管充填用バイオマテリアルの 物理化学的特性と生体適合性の評価
2. 発表標題	村田一将, 鷺尾絢子, 古株彰一郎, Thira Rojasawasthien, 諸富孝彦, 北村知昭
3. 学会等名	第154回日本歯科保存学会春季学術大会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	鷺尾絢子, 北村知昭
2. 発表標題	象牙芽細胞様細胞株に対するFGF-2およびBioactive glassの影響
3. 学会等名	第42回日本歯内療法学会学術大会, 第24回日本歯科医学会学術大会併催
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	村田一将, 鷺尾絢子, 諸富孝彦, 北村知昭
2. 発表標題	Bioactive glassを配合した新規逆根管充填材の物理化学的特性と生体親和性
3. 学会等名	第42回日本歯内療法学会学術大会, 第24回日本歯科医学会学術大会併催
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	諸富孝彦, 村田一将, 鷺尾絢子, 北村知昭
2. 発表標題	Bioactive glass 配合粉末を 220-K 応用した新規直接覆髄材の評価
3. 学会等名	第42回日本歯内療法学会学術大会, 第24回日本歯科医学会学術大会併催
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 Bioactive glassを配合した逆根管充填材の 物理化学的特性、細胞適合性および生体適合性
2. 発表標題 村田一将, 鷺尾絢子, 古株彰一郎, 諸富孝彦, 北村知昭
3. 学会等名 第155回日本歯科保存学会秋季学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村田一将, 鷺尾絢子, 諸富孝彦, 北村知昭
2. 発表標題 新規Bioactive glass配合逆根管充填材の in vitroにおける物理化学的特性と生体親和性の評価
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鷺尾絢子
2. 発表標題 Bioactive Glass配合バイオマテリアル開発による再生歯内療法へのアプローチ
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度春季学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田一将, 鷺尾絢子, 諸富孝彦, 北村知昭
2. 発表標題 新規Bioactive glass配合逆根管充填材の物理化学的特性と ヒトセメント芽細胞を用いた生体親和性の評価
3. 学会等名 第41回日本歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鷺尾絢子, 三浦弘喜, 諸富孝彦, 村田一将、吉居慎二, 藤元政考, 北村知昭
2. 発表標題 Bioactive glass配合根管用シーラーを用いた根管充填後の術後疼痛に関する調査
3. 学会等名 第41回日本歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田一将, 鷺尾絢子, 古株彰一郎, Thira Rojasawasthien, 諸富孝彦, 北村知昭
2. 発表標題 新規Bioactive glass配合セメントと既存の逆根管充填材との比較
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度秋季学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鷺尾絢子, 三浦弘喜, 諸富孝彦, 市丸-末松美希, 宮原宏武, 花田-宮原可緒理, 吉居慎二, 村田一将, 高倉那奈, 赤尾瑛一, 藤元政考, 松山篤史, 北村知昭
2. 発表標題 根管充填時の術後疼痛発症に対するBioactive glass配合根管用シーラーの影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会2020年度秋季学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鷺尾絢子, 田畑泰彦, 古株彰一郎, 池田 弘, 北村知昭
2. 発表標題 象牙質・歯髄複合体の局所的再生誘導治療におけるFGF-2およびBioactive glassの影響
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------