

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：83903  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K09968  
研究課題名（和文）歯髄再生誘導象牙質コーティング剤による感染根管治療における歯髄再生治療法の開発  
  
研究課題名（英文）Development of pulp regeneration for root canal treatment with dentin coating agent  
  
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・研究所 ジェロサイエンス研究センター・室長  
  
研究者番号：60435865  
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）：感染根管治療における薬剤が象牙質の微小環境に与える影響を明らかにし、歯髄再生に適した象牙質コーティング剤を開発した。毒性試験の結果、水酸化カルシウム製剤とフェノール製剤は表面のみの毒性が確認されたが、ホルマリン製剤は象牙質全体に浸透し高い毒性を持っていた。接着試験も同様の結果となった。脂肪細胞の歯髄細胞分化誘導試験では、象牙質EDTA抽出蛋白が歯髄再生誘導に有効であった。これらの結果から、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、またはEDTA抽出象牙質タンパク質を使用したコーティング剤が有望とされた。しかし、in vivo試験では再感染による影響で統計的に有意な結果は得られなかった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちはこれまで不可逆性歯髄炎に対する歯髄再生治療を開発し、臨床研究を行った。現在、この治療は特定再生医療等委員会の承認を得ることで開業医でも実施可能である。感染根管治療への適用を広げるために、根管の無菌化が必要で、水酸化カルシウム製剤を使用した治療では歯髄の再生が難しいことをあきらかにしていた。今回の結果より、水酸化カルシウム製剤とフェノール製剤は象牙質を一層削除することで歯髄再生に適した環境にできると考えられた。ホルマリン製剤は歯髄再生治療の際には使用しない方が良いと考えられた。

研究成果の概要（英文）：The effects of chemicals on the dentin microenvironment in infected root canal therapy were clarified, and dentin coating materials suitable for pulp regeneration were developed. Toxicity tests showed that the calcium hydroxide and phenol formulations were toxic only on the surface, while the formalin formulation penetrated the entire dentin and was highly toxic. Cell attachment tests showed similar results. In the adipocyte induced pulp cell differentiation test, dentin EDTA-extracted protein was effective for inducing pulp regeneration. These results suggest that coatings with fibronectin, collagen, laminin, or EDTA-extracted dentin protein are highly recommended. However, in vivo studies did not show statistically significant results due to the effects of reinfection.

研究分野：歯内治療

キーワード：歯髄再生 象牙質処理

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私共はこれまで不可逆性歯髄炎における歯髄再生治療の開発に成功し、臨床研究を行った。現在、一般の開業医においてもこの治療は特定再生医療等委員会の承認を得ることで行えるようになってきている。この歯髄再生治療をより患者数の多い感染根管治療にも適応させるためには、感染の制御(根管の無菌化)が必要である。感染制御についてはナノバブルを用いた治療法を確立<sup>5,7</sup>したが、一般的な感染根管治療に用いられている水酸化カルシウム製剤をイヌ根管内に適応後、不可逆性歯髄炎の場合と同様に歯髄幹細胞を移植したところ、抜髄根管と比べて歯髄が再生されにくいという結果を得た。また、in vitro においても、水酸化カルシウム製剤を歯の根管に適応後、根管に歯髄細胞を播種し接着性を確認した所、細胞の接着がみられなかった。これは水酸化カルシウム製剤により象牙質が変性したため、細胞が接着できる微小環境がなくなったためではないかと推察された。これらのことより、歯髄再生を行うためには象牙質が再生に適した微小環境を整えることが必要であると考えられた。

### 2. 研究の目的

今回、まず感染根管治療における薬剤において象牙質の微小環境がどのように変化し、細胞の接着性や分化誘導性にどのように影響するかを明らかにすることを目的とした。また、この象牙質微小環境を再生に適した状態に誘導する因子、再生に適した歯髄再生誘導象牙質コーティング剤を開発し、最終的には in vivo で感染根管治療におけるイヌ歯髄再生モデルに応用して歯髄再生促進効果の有効性を検討することを目的とした。これまで、根未完成歯において EDTA を適応して歯髄の再生を促進するという報告はあるが、根完成歯および感染根管歯において歯髄を再生したという報告はない。

### 3. 研究の方法

#### (1) 歯髄再生阻害因子の究明

毒性試験：感染根管治療に用いられる根管貼薬剤(水酸化カルシウム製剤:カルシウムペックス、フェノール製剤:フェノールカンフル、ホルマリン製剤:ホルマリリングリコール)の毒性を調べるため、ろ紙もしくは象牙質削片に各薬剤を吸着させ培養歯髄細胞に適応した。

ラマンスペクトル解析：根管貼薬剤(水酸化カルシウム製剤、ホルマリン製剤、フェノール製剤)を歯の根管に適応後、24 時間後に除去してラマンスペクトル解析を行い、薬剤がどの程度象牙質の内部に浸透しているかを解析した。

走査電子顕微鏡解析：根管貼薬剤(水酸化カルシウム製剤、ホルマリン製剤、フェノール製剤)を根管に適応後、走査電子顕微鏡にて観察を行い、薬剤が象牙質表面への影響を観察した。

#### (2) 歯髄再生誘導象牙質コーティング剤の開発

歯髄幹細胞の分取：12 か月齢ビーグル犬の雌に全身麻酔を施した後、上顎右側 4 番の犬歯を抜歯した。抜歯した歯を Hanks 液中に入れて 4℃ で輸送した。この歯より歯髄を摘出し細切後、37℃ 1 時間、0.04 mg/ml リベラーゼ溶液 (Roche diagnostics, Pleasanton, CA, USA) にて酵素消化して歯髄細胞を分離し、10%FBS 含有 DMEM (D6429) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に、 $2 \times 10^4$  cells/ml の細胞濃度で 92%の N<sub>2</sub>、5%の CO<sub>2</sub> および 3%の O<sub>2</sub> の低酸素濃度で培養した。また抜歯した歯より歯根膜を採取し、同様に酵素処理をして歯根膜幹細胞を分離・培養後凍結保存した。

象牙質タンパク質の抽出：イヌの抜歯した歯より象牙質を採取し、粉碎後 10%EDTA に浸し 6~20 日間、4 にてタンパク質抽出処理を行い、抽出液を得た。0.22 $\mu$ m フィルター滅菌( Merck Millipore )後 Amicon Ultra-15 3kDa( Merck, Darmstadt, Germany )にて濃縮・脱塩を行った。濃縮後、タンパク質の濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit ( Thermo Scientific )を用いて測定した。

象牙質の前処理及びコーティング：抜歯したイヌ歯を輪切りにし、さらに半分に分割、耐水研磨紙( #100、マルトー )を用いて台形に整形した。歯髄腔にそれぞれ水酸化カルシウム( カルシベックス 、NISHIKA )、フェノール( フェノール・カンフル、NISHIKA )を貼薬し 24 時間乾燥。乾燥後、FGK K ファイルを用いて歯髄腔を一層拡大し、70%エタノールに 10 分浸し 30 分以上乾燥させた。エタノール処理後の象牙質は 0.5%Collagen( 1% Atelocollagen, KOKEN )、0.5 mg/ml Fibronectin( Sigma )、0.25mg/ml Laminin( Roche )、100  $\mu$ g/ml 10%EDTA 抽出象牙質タンパク質溶液に氷上で 30 分浸漬後、1 時間乾燥させた。乾燥後、48 ウェルプレートに処理した象牙質の底面と瞬間接着剤で接着させ、24 時間乾燥させた。

接着試験：1で採取した歯髄幹細胞を、3で作製した象牙質に  $4 \times 10^5$  cells/ml になるよう象牙質誘導培地( 10%FBS 含有 DMEM (D6429)、50 $\mu$ g/ml L-ascorbic-2-phosphate(sigma)、100nM Dexamethasone(sigma) )に懸濁し加えた。3日間培養後、象牙質をプレートから外し、Collagen コートについては 0.04 mg/ml リペラーゼ溶液( Roche diagnostics, Pleasanton, CA, USA)、37、5分浸漬し剥離させたのち細胞数を計測した。上記以外のコーティング処理に関しては TrypLE™ Select (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)、37、5分浸漬し剥離させたのち細胞数を計測した。表面積は象牙質の側面を除いた面積を計測し、表面積における細胞数を計算した。

象牙芽細胞分化誘導：1で採取した歯髄幹細胞を、3で作製した象牙質に  $4 \times 10^5$  cells/ml になるよう象牙質誘導培地( 10%FBS 含有 DMEM (D6429)、50 $\mu$ g/ml L-ascorbic-2-phosphate(sigma)、100nM Dexamethasone(sigma) )に懸濁し加えた。28日間、培地交換後、miRNeasy Micro Kit ( Quiagen )を用いて totalRNA を抽出した。

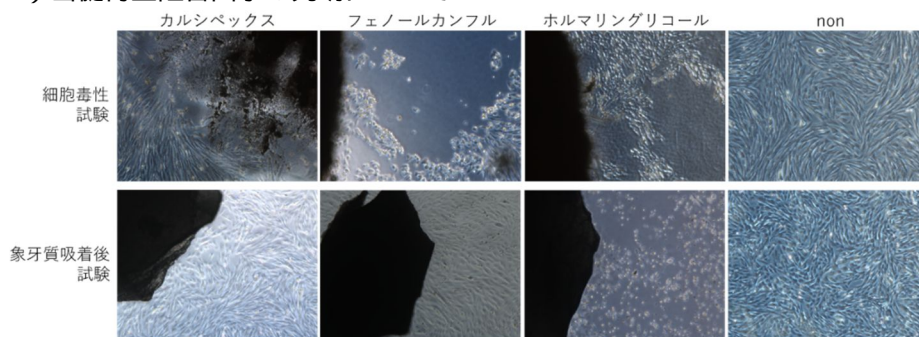
脂肪細胞の歯髄細胞分化誘導能：抜歯した歯を粉碎後、RIPA Buffer(Thermo Scientific)に入れ、4で1週間振盪させ抽出した。濃縮後、タンパク質の濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit ( Thermo Scientific )を用いて測定した。この象牙質抽出液をヒト脂肪幹細胞(h-ADSCs, Lonza)に添加した。1,3,7 及び 14 日目に totalRNA を抽出した。totalRNA の逆転写を行った後、Real-Time PCR にて歯髄分化マーカー(Syndecan 3、Tenascin C、TRHDE)の mRNA 発現量を解析した。

### (3) In Vivo における歯髄再生誘導象牙質コーティングの効果の確認

イヌ感染根管モデルによる歯髄再生促進の確認：ビーグル犬を用いて感染根管モデルを作製し、水酸化カルシウムを用いて根管治療をおこなった。根管治療後根充をガッタパーチャにて仮封した。仮封して 6 ヶ月経過後、根管充填物を除去し、象牙質への細胞接着、象牙芽細胞への分化に有効であることが示された 0.5 mg/ml Fibronectin、0.5% Collagen、0.25mg/ml Laminin の混合物、または歯髄細胞への分化に有効な 100  $\mu$ g/ml 10%EDTA 抽出象牙質タンパク質を根管に適用し、再度仮封した。仮封後 1 週間後に仮封を除去し、根管内を生理食塩水で洗浄した後、歯髄幹細胞を移植した。移植 1 か月後に抜歯して、形態学的解析を行った。

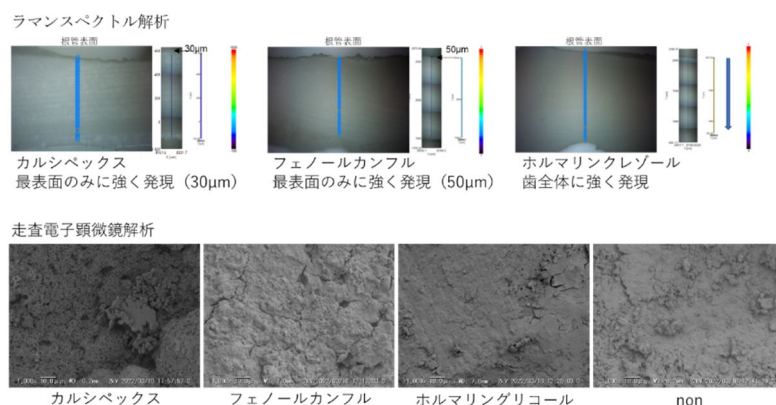
## 4. 研究成果

### (1) 歯髄再生阻害因子の究明について



感染根管治療に用いられる代表的な根管貼薬剤(水酸化カルシウム製剤、フェノール製剤、ホルマリン製剤)の毒性を調べるため、ろ紙に各薬剤を吸着させ培養歯髄細胞に適応した。この結果、水酸化カルシウム製剤はろ紙に接した部分に培養細胞の壊死がみられた。一方、フェノール製剤、ホルマリン製剤は適応後1時間で培養細胞のほとんどが壊死した。またろ紙ではなく象牙質削片を各薬剤に24時間浸した後、1時間乾燥させたものを適応したところ、水酸化カルシウム、フェノール製剤を適応した象牙質に接した部分のみに培養細胞の壊死がみられた。一方、ホルマリン製剤を適応した象牙質は全体的に培養細胞の壊死がみられた。また、ラマンスペクトル解析の結果、水酸化カルシウム製剤、フェノール製剤はほとんど象牙質内部に浸透せず、表面から50 $\mu$ m以内のみ発現が見られた。一方、ホルマリン製剤は根管内部から歯全体に浸透していることが明らかになった。走査電子顕微鏡解析の結果、各製剤においてほとんど差が歯の表面にはみられなかった。今回の結果により、根管貼薬は、表面には細胞傷害があるため水酸化カルシウムを適応する際には50 $\mu$ m以上象牙質を除去することがよいと考えられた。フェノール製剤も象牙質削片に適応したのち歯髄細胞に応用しても、影響を与えなかったことから、50 $\mu$ m以上象牙質を除去することで歯髄再生はできる可能性が高まると考えられた。一方、ホルマリン製剤は細胞への毒性が強く、象牙質に適応して乾燥後も強い毒性を保っていたことから、歯髄再生治療を行う際には用いないほうが良いと考えられた。ホルマリン製剤を使用していた根管に対しては象牙質をコーティング処置するなどの方法が必要であると考えられた。

### (2) 歯髄再生誘導象牙質コーティング剤の開発について

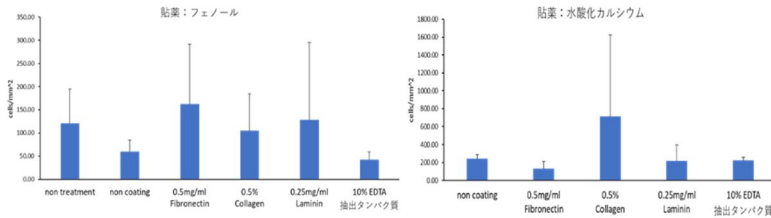


接着試験の結果、フェノール製剤や水酸化カルシウム製剤を塗布した後、象牙質を50 $\mu$ m以上一層削除した後コーティングをしたものについて、象牙質の形状にばらつきがあり、正確な細胞数の計測には限界があったためか有意な差はでなかったが、

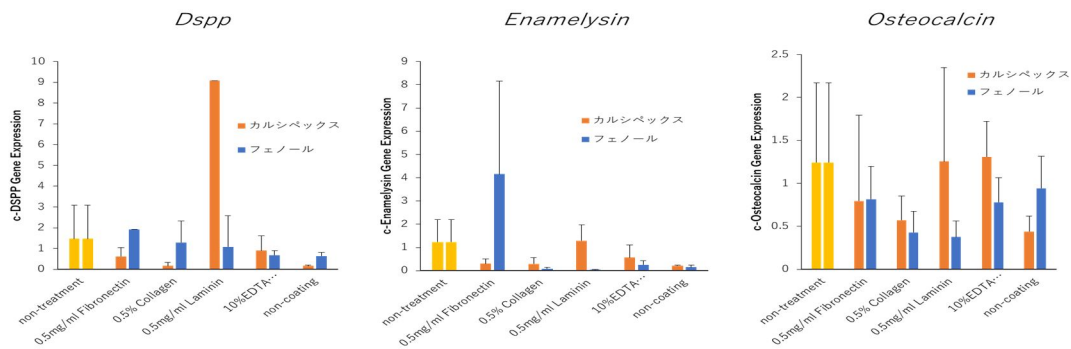
コラーゲンコートをしたものはやや高い傾向がみられた。ホルマリン製剤については象牙質を削除しても細胞の接着がみられなかった。これより、ホルマリン製剤を用いた場合はコーティング処置をしても歯髄再生を誘導難しいと推測される。

## 象牙芽細胞分化誘導

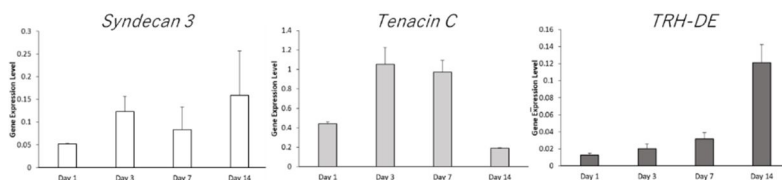
については  
Fibronectin、Laminin を  
コーティングすること  
で一部象牙芽細胞への  
分化が促進されてい



た。ただし、いずれの処理においてもその一部を除いて象牙芽細胞への分化が抑制される傾向がみられた。

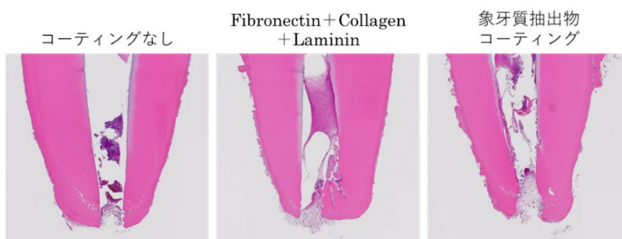


象牙質抽出成分による脂肪細胞の歯髄細胞分化誘導について、脂肪細胞は歯髄細胞マーカーの Syndecan 3 について発現が経時的に高くなった。歯髄細胞に高い発現がある Tenascin C については 3, 7 日目に発現が高くなり 14 日目には減少した。TRHDE については 14 日目に発現が強くなった。一方、脂肪細胞マーカーの AP2 は有意に発現が減少した。PPAR- $\gamma$  は有意な差はみられなかった。これより脂肪細胞は歯髄細胞に誘導されつつあると考えられた。これより象牙質 EDTA 抽出蛋白は歯髄再生誘導象牙質コーティング剤として有用であると考えられた。



これらの結果から、イヌを用いた歯髄再生促進剤として、0.5 mg/ml Fibronectin、0.5 % Collagen、0.25mg/ml

Laminin を混合したものと、EDTA 抽出象牙質タンパク質の二つを用いることとした。



in vivo において、イヌを用いた象牙歯質が変性した根管における象牙質コーティングによる歯髄再生促進治療法の開発を行った。この結果、Fibronectin、Collagen、Laminin の混合物もしくは EDTA による象牙質

抽出物を根管に適応した根管、コントロールの何も適応してない根管の間に歯髄再生量に差はみられなかった。これまで私共は根管外に炎症が起きている場合は、この炎症部位から出されるケミカルメディエーターにより移植細胞が根管外に流出してしまうことを明らかにしている。今回の試験においても、根管外に炎症がみられたことから、半年間の根管充填期間中に再度根管が感染し、根尖病変を形成してしまったため同様の事象がおきたと考えられた。これより、本試験においては歯髄再生促進するためのコーティング剤の有用性を統計的に確認することができなかった。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zayed Mohammed, Iohara Koichiro	4. 巻 22
2. 論文標題 Age Related Senescence, Apoptosis, and Inflammation Profiles in Periodontal Ligament Cells from Canine Teeth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1566524022666220520124630	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 -

1. 著者名 Nakashima Misako, Fukuyama Fusanosuke, Iohara Koichiro	4. 巻 48
2. 論文標題 Pulp Regenerative Cell Therapy for Mature Molars: A Report of 2 Cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Endodontics	6. 最初と最後の頁 1334 ~ 1340.e1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.joen.2022.07.010	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 -

1. 著者名 Ziauddin S. M., Nakashima Misako, Watanabe Hideto, Tominaga Michiyo, Iohara Koichiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Biological characteristics and pulp regeneration potential of stem cells from canine deciduous teeth compared with those of permanent teeth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-022-03124-3	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 Iohara Koichiro, Tominaga Michiyo, Watanabe Hideto, Nakashima Misako	4. 巻 15
2. 論文標題 Periapical bacterial disinfection is critical for dental pulp regenerative cell therapy in apical periodontitis in dogs	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cell Research & Therapy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13287-023-03628-6	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 Sakatoku Shintarou, Hayashi Yuki, Futenma Taku, Sugita Yoshihiko, Ishizaka Ryo, Nawa Hiroyuki, Iohara Koichiro	4. 巻 2024
2. 論文標題 Periostin Is a Candidate Regulator of the Host Microenvironment in Regeneration of Pulp and Dentin Complex and Periodontal Ligament in Transplantation with Stem Cell-Conditioned Medium	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2024/7685280	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 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Iohara K, Ziauddin SM, Tominaga M, Nakashima M.
2. 発表標題 Periradicular disinfection is essential for pulp regeneration in the apical periodontitis.
3. 学会等名 2022 IADR GENERAL SESSION and Exhibition Virtual Experience. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ziauddin SM, Iohara K, Tominaga M, Nakashima M.
2. 発表標題 Regenerative Potential of Stem Cells from Deciduous and Permanent Teeth.
3. 学会等名 2022 IADR GENERAL SESSION and Exhibition Virtual Experience. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 庵原耕一郎、大平猛、富永三千代、中島美砂子
2. 発表標題 感染根管治療において除菌が困難な副根管へのプラス帯電性ナノバブルの効果      プラス帯電性ナノバブルの難治性感染根管治療への応用
3. 学会等名 日本マイクロ・ナノバブル学会 第10回学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中島美砂子、庵原耕一郎
2. 発表標題 歯髄幹細胞を用いた根管治療後の歯髄再生治療の実用化のための共同研究
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 庵原耕一郎、中島美砂子、富永三千代
2. 発表標題 乳歯歯髄幹細胞を用いた同種移植による歯髄再生
3. 学会等名 第22回日本再生医療学会総会 ポスター発表
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koichiro Iohara
2. 発表標題 Recent Progress of Pulp Regenerative Therapy with Dental Pulp Stem Cells for the Application to the Periapical Disease in the Aged.
3. 学会等名 第69回国際歯科研究学会（JADR）日本部会総会・学術大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 庵原耕一郎、大平猛、Ziauddin SM、富永三千代、中島美砂子
2. 発表標題 「高齢者および根尖性歯周炎への歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療の最近の進歩 プラス帯電性ナノバブルの治療への応用」
3. 学会等名 日本マイクロ・ナノバブル学会 第9回学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 庵原 耕一郎
2. 発表標題 虫歯から歯を蘇らせる歯髄細胞 Pad による新規象牙質再生
3. 学会等名 第 21 回日本再生医療学会総会 共催学術セミナー（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 庵原耕一郎、富永三千代、中島美砂子
2. 発表標題 根尖性歯周炎における歯髄再生治療を成功へ導く細菌検出法および移植時基準の検討
3. 学会等名 第 159 回日本歯科保存学会
4. 発表年 2023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