

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670777

研究課題名(和文) 歯髄再生過程における抗菌性薬剤の新たな役割：樹状細胞と歯髄幹細胞との関連

研究課題名(英文) Novel roles of antimicrobials in the process of pulpal regeneration: its relationship with dendritic cells and dental pulp stem cells

研究代表者

大島 勇人(OHSHIMA, Hayato)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：70251824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、水酸化カルシウム製剤と比較した三種混合薬剤(3Mix)による覆髄に対する感染歯髄の反応を明らかにすることを目的とした。6週齢マウス上顎第1臼歯に1級窩洞を形成して、露髄させ24時間放置した。その後、露髄面に3Mix(3Mix群)、水酸化カルシウム製剤(CH群)、マクロゴール・プロピレン・グリコール(MP; 対照群)を貼付しグラスアイオノマーで覆髄した。術後1～3週に動物を固定し、ネスチン・Ki67免疫組織化学、TUNEL評価を行った。3Mix-MPを覆髄剤として使用することは、水酸化カルシウム製剤と比し、感染歯髄の治癒に促進的に働くことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate responses of the infected dental pulp to capping with 3Mix in mouse molars, compared with those to calcium hydroxide cement. A class I cavity was prepared on the maxillary first molars of 6-week-old mice to expose the dental pulp and maintained for 24 hours. Subsequently, the exposed pulp was capped with 3Mix in ointment (macrogol mixed with propylene glycol: MP; 3Mix group) or calcium hydroxide cement (CH group), in addition to MP alone (control group), followed by a glass ionomer cement filling. The samples were collected at intervals of 1, 2, and 3 weeks. Immunohistochemistry for nestin and Ki-67 and TUNEL assay were performed. The use of 3Mix-MP paste as a pulp-capping agent, compared with calcium hydroxide cement, positively affects the healing of infected dental pulp in mouse molars. Further studies are necessary to clarify the mechanisms eliciting pulpal responses to 3Mix-MP paste following tooth injuries and pulpal infection.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：抗菌性薬剤 歯髄 露髄 プラーク アポトーシス 細胞増殖 象牙芽細胞様細胞 水酸化カルシウム製剤

1. 研究開始当初の背景

歯の再植や移植後に、歯髄内には象牙質に加え、骨組織が形成される場合がある。この過程において、申請者は破骨細胞が歯髄腔内に出現すると骨芽細胞分化が誘導される(Cell Tissue Res 325: 219-229, 2006)のに対し、歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現すると象牙芽細胞分化が誘導されることを発見し(Cell Tissue Res 302: 221-233, 2000)、歯の損傷後に歯髄内に現れる細胞の種類が、歯髄治癒パターンの決定に重要な鍵を握っていることを明らかにした。さらに、申請者は歯の移植後に樹状細胞が歯髄・象牙質界面にオステオポンチン(OPN)を沈着することを明らかにしている(図1: J Histochem Cytochem 59: 518-529, 2011)。

また、抗菌性薬剤であるCiprofloxacin、Metronidazole、Minocycline (またはCefaclor)の三種混合薬剤(3Mix)は、う蝕病巣を無菌化することで再石灰化を促すことから臨床応用されているが、申請者の最近の研究でこの抗菌性薬剤が樹状細胞を活性化することも明らかにしている(図2: Arch Histol Cytol 2015 in press)。さらに、最近の*in vitro*研究により、低濃度の抗菌性薬剤がヒト歯髄幹細胞の生存と増殖を活性化すると報告がある(J Endod 38: 1372-1375, 2012)。しかしながら、抗菌性薬剤の歯髄幹細胞の活性化を*in vivo*実験で検証した報告はないばかりか、実験動物

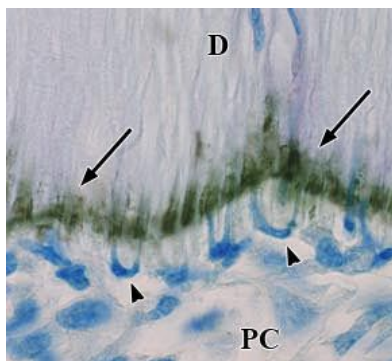


図1 歯の移植後3日の歯髄・象牙質界面のOPN免疫組織化学標本

OPNが石灰化前線に沈着し(矢印)、樹状細胞(矢じり)が象牙細管内に突起を入れている。D:象牙質、PC:歯髄

の口腔内プラーク常在菌叢に関する知見は殆どなく、抗菌性薬剤が直接歯髄幹細胞を活性化するのが、無菌化が間接的に作用するのかが未解決の問題である。

以上の結果を統合すると、歯の損傷後の歯髄治癒過程において、抗菌性薬剤により樹状細胞及び歯髄幹細胞の活性化を引き起こすことができれば、象牙芽細胞分化を促進することが可能になると推測されたため、本研究計画の立案に至った。

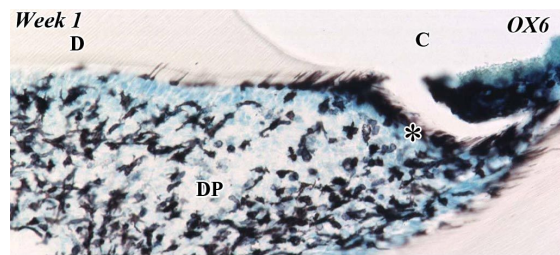


図2 ラット臼歯感染歯髄にαTCP+抗菌性薬剤を貼付1週間後のOX6免疫組織化学標本

露髄後歯髄感染を起こし、αTCPまたはαTCP+抗菌性薬剤を貼付すると、1週間後にαTCP単独だと膿瘍形成が惹起されるのに対し、抗菌剤の添加でOX6陽性樹状細胞が露髄面(*)に凝集し、その後象牙質形成が起こる。C:窩洞、D:象牙質、DP:歯髄

2. 研究の目的

申請者は、歯の損傷後の歯髄治癒過程において、(1) 歯髄・象牙質界面に樹状細胞が出現すると象牙芽細胞分化が誘導されること、樹状細胞が同部位にオステオポンチン(OPN)を沈着することを明らかにした。さらに、(2) 歯の再植の際に抜去歯を抗菌性薬剤の溶液に浸してから抜歯窩へ戻すと歯髄再生が促進されることを見出した。抗菌性薬剤は樹状細胞と歯髄幹細胞を活性化するという実験結果または報告があることから、本研究では、象牙芽細胞分化への樹状細胞の関与と抗菌性薬剤の新たな役割、すなわち歯の損傷後の樹状細胞と歯髄幹細胞の活性化による歯髄再生促進効果を検証し、そのメカニズム解明を目的とする。本研究は歯髄再生を免疫学的・細菌学的な側面から捉える独創的な試みであり、その成果は外傷歯の歯髄再生を促す新規治療法の開発に繋がることが予想される。

3. 研究の方法

(1) マウス口腔内プラーク常在菌叢と露髄感染巣の菌叢の網羅的解析と抗菌性薬剤の効果



図3. 歯の露髄感染実験

6週齢マウス上顎第一臼歯咬合面に深皿状の窩洞(矢印)を形成し、露髄後24時間放置し、歯髄感染モデルを作製する。

生後3、6週齢および9ヶ月齢ICRマウスを用いて、深麻酔下にて口腔内・歯面を滅菌綿棒で擦過し、細菌カウンタ(Panasonic社)用の試料とする。次いで、上顎第一臼歯を抜去し、40mMリン酸カリウム液1.0mLに浸漬し、健全な歯面上に付着している細菌を浮遊させ、培養用の試料とする。試料を嫌気ボックス内に搬入し、テフロンホモジナイザーによって分散均一化後、緩衝液によって 10^{-4} まで希釈し、CDC血液寒天平板に接種する。嫌気(7日間)および好気(1~3日間)培養し、細菌量(CFU)を求める。各コロニーからInstaGeneマトリックスを用いてgenomic DNAを抽出後、16SrRNAのユニバーサルプライマー(27F&1492R)でPCR増幅する。得られたPCR産物を精製し、シーケンス解析後、NCBIのBLAST search programを用いて細菌種を同定する。

深麻酔下で6週齢マウス上顎第一臼咬合面に窩洞を形成し、露髄させ24時間口腔内環境に露出させ、歯髄感染モデルを作製する(図3)。引き続き窩洞内のプラークを採取し、上記と同様に露髄感染巣の菌叢の網羅的解析を行う。次に窩洞をMP(ソルベース「マクロゴール軟膏」+プロピレングリコール)とグラスアイオノマーセメントで仮封した群(対照群)と3Mix-MP(Metronidazole:

Ciprofloxacin : Minocycline = 3 : 1 : 1 in MP[等量])とグラスアイオノマーセメントで仮封した群(3Mix群)、水酸化カルシウム薬剤とグラスアイオノマーで仮封した群(CH群)を作製し、術後1日から3週間後にマウスを麻酔下で固定し、歯髄治癒過程を解析、抗菌性薬剤に対する樹状細胞の反応と歯髄治癒促進効果を検証する。試料は脱灰後通法に従いパラフィン切片を作製し、象牙芽細胞の分化マーカーとしてはネスチン免疫組織化学にて解析する。細胞増殖活性、アポトーシスの評価も行う。

(2) 抗菌性薬剤(3Mix)を用いた外傷歯の歯髄再生療法の基盤研究

予備実験で、3週齢マウス上顎第一臼歯を抜去し、抜去歯を生食に浸した後に再植を行うと、象牙質形成を誘導できなかったのに対し、3Mix溶液(Metronidazole 0.2 mg + Ciprofloxacin 0.1 mg + Minocycline 0.1 mg in DW 10 ml)に1時間浸した場合、歯髄内に効率良く象牙質形成を(2週間で)誘導することに成功した。同実験系を実施し、術後1~3週間後にマウスを固定し、試料は脱灰後通法に従いパラフィン切片を作製し、(1)と同じマーカーを用いて解析する。

4. 研究成果

(1) マウス口腔内プラーク常在菌叢の網羅的解析

3週齢、6週齢および9ヶ月齢マウスプラーク試料のCFUは、それぞれ平均 $(8.9 \pm 11.4) \times 10^{-5}$ 、 $(1.7 \pm 3.2) \times 10^{-5}$ および $(4.7 \pm 4.7) \times 10^{-3}$ であった。3週齢および6週齢の優勢菌は、それぞれEnterococcus (53%, 31%), Escherichia (19%, 26%), Lactobacillus (17%, 21%), Lactococcus (8.5%, 8.3%)であった。一方、9ヶ月齢では、Lactobacillus (83%), Lactococcus (8.6%)が優勢であった。本研究で離乳前後および成熟したマウスプラークの細菌構成が、培養とシーケンス解析を組み合わせた分子生物学的手法によって、明らかになった。また、ヒトでは小児、成人とも、Streptococcus, Actinomyces,

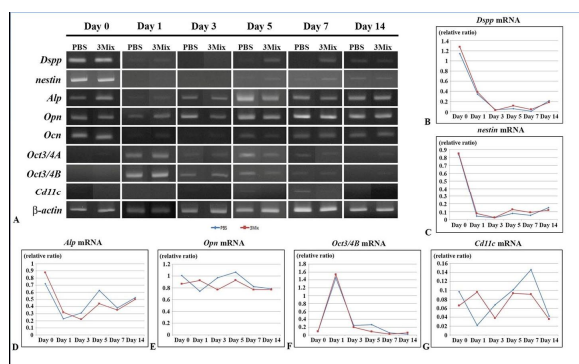
Veillonella が優勢菌と報告されており、マウスは食性が異なり、プラーク細菌構成が大きく異なることが判明した(下記表参照)。

| Comparison of bacterial composition of dental plaque biofilm and feces of mice | | | | |
|--|---------------|----------|---------------|----------|
| | 6-week-old | | 9-month-old | |
| | Dental plaque | Feces | Dental plaque | Feces |
| Total isolates | 121 | 73 | 35 | 73 |
| <i>Enterococcus</i> | 38 (31%) | | | |
| <i>Escherichia</i> | 31 (26%) | | | |
| <i>Lactobacillus</i> | 24 (20%) | 66 (90%) | 29 (83%) | 29 (83%) |
| <i>Lactococcus</i> | 10 (8.3%) | | 3 (8.6%) | |
| <i>Clostridium</i> | 4 (3.3%) | | | |
| <i>Staphylococcus</i> | 2 (1.7%) | | | |
| <i>Ruminococcus</i> | 2 (1.7%) | | | |
| <i>Parabacteroides</i> | 2 (1.7%) | | 1 (2.9%) | 7 (9.6%) |
| <i>Microbacterium</i> | 2 (1.7%) | | | |
| <i>Alistipes</i> | 1 (0.8%) | | | 2 (2.7%) |
| <i>Eggerthella</i> | 1 (0.8%) | | | |
| <i>Propionibacterium</i> | 1 (0.8%) | | 2 (5.7%) | 1 (1.4%) |
| <i>Muscipirillum</i> | | | | 1 (1.4%) |
| Unknown | 3 (2.5%) | 7 (9.6%) | | 11 (15%) |

(2) 抗菌性薬剤(3Mix)を用いた外傷歯の歯髄再生療法の基盤研究

マウスを用いた意図的歯の遅延再植への3Mixの応用実験を確立し、歯髄と歯根膜の治癒過程への3Mixの効果を検索した。3週齢ICRマウスの上顎第1臼歯を抜去後、異なる濃度の3Mix溶液またはPBSに浸漬した後5~60分後に抜歯窩に再植し、術後1~3週後の歯髄・歯根膜治癒過程を検索した。PBS群では、術後1週にアポトーシスが亢進し、2週で細胞増殖が亢進し、3週で第三象牙質または骨様組織形成が起こった。一方、3Mix群では、Ki67陽性及びTUNEL陽性細胞の出現に引き続き術後1~2週でネスチン陽性の新たに分化した象牙芽細胞様細胞が歯髄・象牙質界面に並び始め、歯髄治癒が促進されることが示唆された。しかしながら、3Mix群では重篤なアンキローシスが惹起され、再植前にPBSで洗浄することで歯根膜の生存を回復することが示されたが、歯髄治癒効果は減弱した。以上、3Mixの応用は意図的歯の再植後の歯髄治癒を促進するが、その使用は歯根膜組織に重篤なダメージを与える可能性が示唆された。

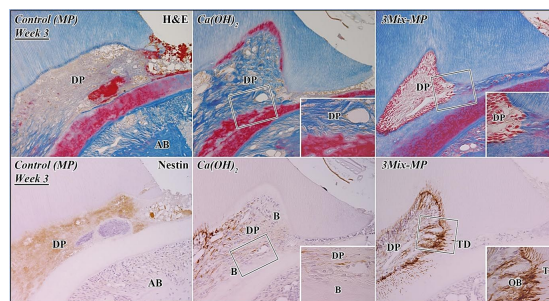
また、上記歯髄治癒過程におけるシグナル変化をRT-PCTで解析した結果は下記の通りである。



(3) マウス口腔内プラーク常在菌叢と露髄感染叢の網羅的解析と抗菌性薬剤の効果

術後1週では、3Mix群およびCH群で生存および(または)新たに分化した象牙芽細胞が歯髄に観察されたのに対し、対照群の歯髄は変性を開始した。術後2週では、3Mix群で歯冠部歯髄に硬組織形成が観察されたが、CH群では治癒過程が進行中であった。一方、対照群では、歯冠部歯髄が完全に失活していた。術後3週では、3Mix群の露髄近くで象牙質形成が観察されたが、CH群では歯冠部歯髄に象牙質と骨が混在していた。3Mix群では、象牙芽細胞様細胞分化が促進されていた。また、3Mixでは、硬組織形成量が有意に高かった。さらに、3Mix群で、細胞増殖活性が高く、アポトーシス細胞の数が有意に少なかった。下記に3週後の歯髄変化の違いを下図に示す。3Mix群では、歯髄・象牙質界面にネスチン陽性の象牙芽細胞様細胞分化が観察され、第三象牙質が形成されている。

以上より、3Mix-MPの覆髄剤としての使用は、水酸化カルシウム製剤と比較して、感染歯髄の治癒に促進的に働くことが明らかとなった。露髄感染叢の網羅的解析については、細菌採取方法に検討を加えているところである。



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 16 件)

Nakaki T, Saito K, Ida-Yonemochi H, Nakagawa E, Kenmotsu S, Ohshima H: Contribution of Donor and Host Mesenchyme to the Transplanted Tooth Germs. *J Dent Res* 94(1): 112-120, 2015. (査読有)

Sato T, Kenmotsu S, Nakakura-Ohshima K, Takahashi N, Ohshima H: Pulpal responses to antimicrobials in the infected dental pulp of rat molars. *Arch Histol Cytol* 2015 in press. (査読有)

Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: The effects of enzymatically synthesized glycogen on the pulpal healing process of teeth with intentionally delayed replantation in mice. *J Oral Biosci* 57(2): 124-130, 2015. (査読有)

Saito K, Ida-Yonemochi H, Ushiki T, Ohshima H: Responses of pulp vasculature to cavity preparation in rat molars. *J Oral Biosci* 2015 in press. (査読有)

Nakatomi C, Nakatomi M, Saito K, Harada H, Ohshima H: Enamel knot-like structure is eternally maintained in the apical bud of postnatal mouse incisors. *Arch Oral Biol* 60(8): 1122-1130, 2015. (査読有)

Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Sakaue Y, Ohshima H, Terao Y, Okiji T: Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. *PLoS One* 10(1): e0116647, 2015. (査読有)

Shigetani Y, Yoshiba K, Takei E, Yoshiba N, Yamanaka Y, Ohshima H, Okiji T: Temporospatial localisation of dentine matrix protein 1 following direct pulp capping with calcium hydroxide in rat molars. *Int Endod J* 48(6): 573-581, 2014. (査読有)

Morita W, Yano W, Nagaoka T, Abe M, Ohshima H, Nakatsukasa M: Patterns of morphological variation in enamel-dentin junction and outer-enamel surface of human molars. *J Anat* 224(6): 669-680, 2014. (査読有)

Saito K, Kenmotsu S, Nakatomi M, Ohshima H: Allogenic tooth transplantation inhibits the

maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in mice. *Cell Tissue Res* 356(2): 357-367, 2014. (査読有)

Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Ohshima H: Establishment of in vitro culture system for evaluating dentin-pulp complex regeneration with special reference to the differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells. *Histochem Cell Biol* 142(3): 323-333, 2014. (査読有)

Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Effects of a triple antibiotic solution on pulpal dynamics following intentionally delayed tooth replantation in mice. *J Endod* 40(10): 1566-1572, 2014. (査読有)

Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Use of a triple antibiotic solution affects the healing process of intentionally delayed replanted teeth in mice. *J Oral Biosci* 55(2): 91-100, 2013. (査読有)

Saito K, Nakatomi M, Ohshima H: Dynamics of BrdU label-retaining dental pulp cells during pulpal healing following cavity preparation in mice. *J Endod* 39(10): 1250-1255, 2013. (査読有)

Shigetani Y, Suzuki H, Ohshima H, Yoshiba K, Yoshiba N, Okiji T: Odontoblast response to cavity preparation with Er:YAG laser in rat molars: an immunohistochemical study. *Odontology* 101(2): 186-192, 2013. (査読有)

Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Lymphoid enhancer-binding factor 1 expression precedes dentin sialophosphoprotein expression during rat odontoblast differentiation and regeneration. *J Endod* 39(5): 621-62-18, 2013. (査読有)

Ida-Yonemochi H, Harada H, Ohshima H, Saku T: Reciprocal expressions between α 1, perlecan receptors, in the murine enamel organ development. *Gene Expr Patterns* 13(8): 293-302, 2013. (査読有)

[学会発表](計 13 件)

Quispe-Salcedo A, 大島勇人, 武藤徳子, 石井信之: 三種混合抗菌性薬剤と水酸化カルシウムセメント覆髄に対する感染歯髄の反応, 神奈川歯科大学学会第 146 回例会, 神奈川歯科大学(神奈川県・横

須賀市), 2015年1月8日。
Quispe-Salcedo A, 佐藤拓一, 松山順子, 大島勇人: マウス臼歯における三種混合抗菌性薬剤と水酸化カルシウムセメント覆髄に対する感染歯髄の反応。第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市), 2014年9月25-27日。J Oral Biosci Suppl 2014, p.133, 2014。
Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Osteopontin is essential for reparative dentinogenesis. 2014 Tripartite Conference on Tooth and Bone, Fujian Normal University (Fuzhou, Fujian Province, China), 2014, 6. 13-15. Abstract p.7-8, 2014。
大島勇人, Angela Quispe-Salcedo, 高田洋樹, 依田浩子: 酵素合成グリコゲンによる歯の再植後の歯髄治癒促進効果について。第13回日本再生医療学会総会, 国立京都国際会館(京都府・京都市), 2014年3月4-6日, 再生医療 13(Suppl), 2014。
Matsuyama J, Sato T, Quispe-Salcedo A, Mayanagi G, Takahashi N, Ohshima H: Comprehensive analysis of indigenous plaque microbiota of pre- and post-weanling, and grown-up mice. The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science, Tohoku University (Sendai, Miyagi, Japan), 2014. 1. 20-21。
Ohshima H: Cell dynamics and stem cell niches in the dental pulp in the regenerative process of dentin-pulp complex. 12th annual meeting of the Korean Basic Dental Science Societies Association, Kyung Hee University (Seoul, Korea), 2013, 11. 28-29。
Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Effectiveness of a triple antibiotic mixture in the pulpal regeneration process following intentionally-delayed tooth replantation in mice. 平成25年度新潟歯学会第2回例会, 新潟大学(新潟県・新潟市), 2013年11月9日, 新潟歯学会雑誌 43(2): 2013。
Quispe-Salcedo A, 依田浩子, 大島勇人: Effectiveness of enzymatically synthesized glycogen (ESG) on the healing process following intentionally-delayed tooth replantation in mice. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市), 2013年9月20-22日, J Oral Biosci Suppl 2013, p.123, 2013。
松山順子, 佐藤拓一, Quispe-Salcedo A, 高橋信博, 大島勇人: 離乳前後および成

熟マウスの口腔内プラーク常在菌叢の網羅的解析。第55回歯科基礎医学会学術大会・総会, 岡山コンベンションセンター(岡山県・岡山市), 2013年9月20-22日, J Oral Biosci Suppl 2013, p.223, 2013。

Ohshima H: Responses of dental pulp stem/progenitor cells to tooth replantation/transplantation and the effect of a triple antibiotic solution on traumatized teeth. The 24th IAPD 2013 Seoul, Coex (Seoul, Korea), 2013. 6. 12-15。

Ohshima H: Recipient-donor interaction affects dental pulp regeneration after exogenous stimuli. The 9th World Endodontic Congress IFEA, Tokyo International Forum (Tokyo, Japan), 2013. 5. 23-26。

Nakaki T, Saito K, Ida-Yonemochi H, Nakagawa E, Kenmotsu S, Ohshima H: Postnatal changes of pulp cell population demonstrated by allogenic tooth germ transplantation in mice. 11th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation, Odalys Club (La Londe les Maures, France), 2013. 5. 26-31。

Ohshima H: Postnatal changes of pulp cell population in transplanted tooth germs. International Symposium Frontier Meeting, Seoul/Jeonju 2013 Development, Evolution, Taxonomy, and Genetics of Tooth Structure "Tooth Voyage, Up To Date", Chonbuk National University (Jeonju-si, Jeollabuk-do, Korea), 2013. 2. 12-15。

〔図書〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大島 勇人 (OHSHIMA, Hayato)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 70251824

(2) 研究分担者

佐藤 拓一 (SATO, Takuichi)

東北大学・歯学研究科(研究院)・講師

研究者番号: 10303132

松山 順子 (MATSUYAMA, Junko)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 30293236