

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26870173

研究課題名(和文)脱落・再植した歯と歯髄の保存的治療における酸素ナノバブル投与の有効性の検討

研究課題名(英文)Effect of oxygen nanobubbles water on avulsed and replanted teeth for conservative therapy

研究代表者

大石 敦之(OISHI, Atsushi)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50645166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題は、外傷歯の治療を促す治療法の開発のため、生理活性作用が報告されていた酸素ナノバブル水の応用可能性を探索した。調査開始時の先行研究は、生物の生存率等による調査が多く、ナノバブルの作用機序には不明な点が多かった。また、実験施設の改修延期により、計画していた実験計画の変更を余儀なくされた。そこで、外傷歯治療にナノバブル水を応用する前段階としてナノバブル水が口腔組織に与える作用の検証を行った。ヒト歯小嚢由来の細胞の培養実験において空気や酸素のナノバブルによる増殖抑制効果を認めた。ナノバブルが培養細胞と生体個体に与える影響の包括的な理解には、双方において研究の進展が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the efficacy of oxygen nanobubble water to encourage proper healing of traumatized teeth. In the beginning of this study, previous studies about nanobubble water reported its bioactive effect by the increase of survival rate etc, and the mechanism to living organisms was not fully elucidated. Additionally, renovation of our animal laboratory building was postponed. Therefore, our initial experiment plan required significant change, and we inspected the effect of nanobubble water on human oral tissue as a previous step of therapeutic application of nanobubble water to traumatized teeth. Oxygen and air nanobubble water inhibited the proliferation of human dental follicle stem cells in vitro. However, comprehensive elucidation of the effects of air and oxygen nanobubble water on oral tissue and living organisms will require further investigation both in vitro and in vivo.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ナノバブル マイクロバブル ウルトラファインバブル 歯の外傷 歯小嚢 細胞培養

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 「外傷を受けた歯髓の生存を促す治療法を求めて」

歯の外傷は特に小児に多く、若年者が早期に歯を喪失する主な原因である。外傷による歯の脱臼や脱落、歯根破折が生じた場合、治療法の第一選択は速やかな整復固定である。これは受傷した歯牙と歯周組織を可及的速やかに元の位置に固定することで損傷部位の修復と、除痛、食事が摂れるようになることを促すものである。整復固定の期間は脱臼、脱落、歯根破折などの病態により異なるが、文献的には2,3週間から2~3か月とされている J.O.Andreasen, et al. Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth Third Edition, 1993. )

しかし、歯の外傷は受傷から速やかに適切な処置がなされたとしても、数か月後以降になって受傷歯の歯髓壊死、歯髓の石灰化、歯根の外部吸収、内部吸収、歯根の骨性癒着などの不良所見が生じること多い。これらの合併症の中でも歯髓壊死は、種々の報告より歯髓根尖部の脈管系の損傷による歯髓の循環障害等によって生じると考えられ、受傷歯の保存の可否を左右するような進行性の歯根吸収や骨性癒着の誘因になるとも考えられている。よって、外傷を受けた歯の歯髓の生存は受傷歯の長期保存に重要な要素となるのだが、現状では脱臼、脱落、歯根破折を生じた歯の歯髓の生存を促す治療法の研究報告は非常に乏しく、整復固定後の臨床的な対応は主に受傷歯の歯内療法の実施を見越しての経過観察のみである。

なお、歯髓壊死に陥った歯髓の保存的療法としては、歯根未完成歯の歯髓に抗菌薬等を用いて歯髓の revascularization を誘導した報告 (M.Trope. J Endod,2008;34: S13-S17) や、幹細胞を用いた歯髓の再生療法 (K.Iohara, et al. Stem Cells Trans Med,2013; 2(7): 521-33) などの報告はあるが、いずれも研究段階で本格的な実用化には至っていない。そこで、本研究は外傷を受けた歯と歯髓の生存を促す治療法の確立を目的とした。

(2) 「酸素ナノバブルの生理活性作用を歯の外傷治療に応用させたい」

前述のように、外傷後の歯髓壊死は主に根尖部歯髓の損傷による歯髓の循環障害に起因すると考えられている。循環障害、とくに低酸素状態に対して医科領域では、低酸素下のウサギを使った動物実験において、酸素を含有した微粒子の静脈内注射により血中の酸素濃度が改善したという報告がなされている (J.Kheir, et al. Sci Transl Med 2012; 4: issue140) 。また、新しい技術で関連の報告も少ないが、酸素を直径 200nm 以下のナノバブル状にして溶解させた水溶液 (酸素ナノバブル) は生体に高い生理活性作用をもつことが知られている (バイオ分野におけるナノ

バブル水の産業利用に関する調査:平成17年度(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構委託調査研究)。申請者はこれらの技術を応用し、外傷を受けた歯と周囲の歯周組織に対する酸素ナノバブルの局所投与を試みたいと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の当初の目的は、脱臼・脱落などの外傷を受けた歯と歯髓の生存を促す治療法の確立としていた。外傷により歯の脱臼や脱落が起きると、受傷歯の歯髓は数週から数か月の後に歯髓壊死に陥ることが多い。外傷後の歯髓壊死は進行性の歯根吸収や骨性癒着など更なる合併症の誘因になるとも考えられているため、外傷歯の良好な経過のためには歯髓が生存していることが望ましい。しかし、歯髓の生存を促す治療法は報告も乏しく、現在確立されていない。そこで、本研究はナノバブル化した酸素水溶液が生体に高い生理活性をもたらす点に着目し、実験動物を用いた脱臼・脱落により損傷した歯髓と歯牙、歯周組織に対する、ナノバブル化した酸素水溶液の局所投与の治療効果の検討を計画した。

しかし、当初の先行研究では、ナノバブルの生体への効果の評価について、主に魚や農作物の一個体単位の成長に伴う体重増加や生存率による調査が多く、その作用メカニズムは殆ど明らかにされていなかった。また、大学の研究室・実験施設の大規模改修工事の大幅な延期のため、動物を用いた歯の外傷モデルを用いた実験の実施は困難になった。以上の事情により、本研究期間においては、ナノバブル技術の歯科医療応用の前段階の課題として、ナノバブルの生体への作用を細胞レベルで評価する課題が必要と考えた。そこで、臨床的に得られたヒト口腔由来細胞へのナノバブルの作用の評価を本研究の新たな目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究には、臨床から得られたヒト歯小嚢由来の細胞を用いたため、本研究課題の実験は全て東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認の下実施した。(認証番号: D2016-38)

「ナノバブル培地によるヒト由来・歯小嚢幹細胞の増殖に与える影響の調査」

### (1) 歯小嚢幹細胞の作製

東京医科歯科大学歯学部附属病院・小児歯科外来において、埋伏過剰歯の抜歯の際に摘出された歯小嚢の細胞を outgrowth 法に基づき細切・培養し、継代を経てヒト由来の歯小嚢幹細胞を作製した。

## (2) ナノバブル培地の作製

ナノバブル水を含んだ培地(ナノバブル培地)は、粉末培地に超純水の代わりに酸素、オゾン、空気のナノバブル水を混合・溶解させ、通常に基づき血清、抗菌薬を添加して作製した。なお、それぞれのナノバブル水は産業総合研究所の高橋正好主任研究員より提供された。

## (3) ナノバブル培地を用いた細胞培養

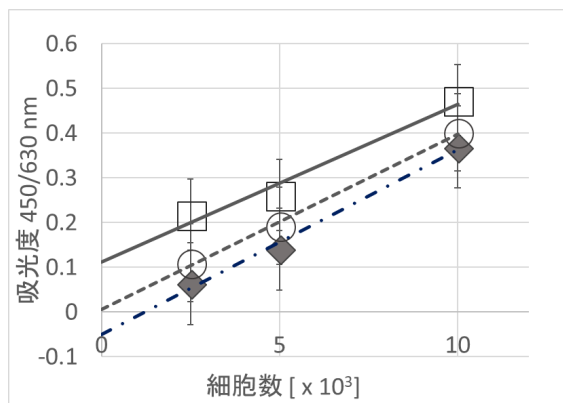
細胞実験用のプレートに細胞数を調整した歯小囊幹細胞を播種し、定着後、培地をナノバブル培地に交換して培養した。ナノバブル培地へ交換後、2, 4, 6日後の細胞数をCCK-8アッセイにより、プレートリーダーで吸光度を測定し、細胞数を算出した。実験期間における細胞の増殖の程度をまとめ、考察し下記学会発表、論文報告(査読中)を行った。

## 4. 研究成果

酸素とオゾンのナノバブル水を用いたナノバブル培地を用いた上記手法の実験結果について、2016年アジア小児歯科学会で発表を行った。この発表では、実験期間において、酸素・オゾンそれぞれのナノバブル培地が細胞数の増加に影響を及ぼすデータが得られなかったことを報告した。

その後、ナノバブル水の改良と実験系の改善を重ねた結果、酸素と空気のナノバブル培地の吸光度は、通常の液体培地の吸光度と異なることが分かった(図1)。

図1. 細胞数と吸光度の関係



□ : コントロール (DMEM)

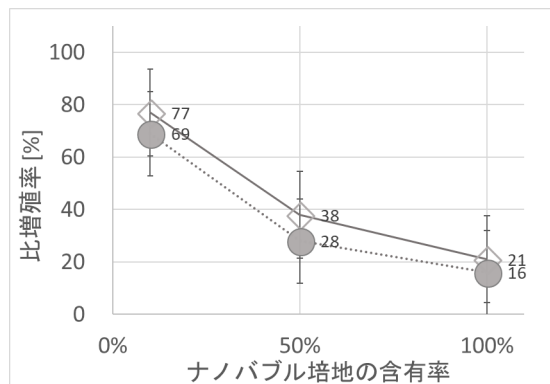
○ ... : 空気ナノバブル培地

◇ ... : 酸素ナノバブル培地

\* 酸素、空気のナノバブル培地は通常の培地より低い吸光度を示した。

また、通常の液体培地とナノバブル培地を混合し、その割合に勾配をかけた培地を複数比較することで、酸素と空気のナノバブル培地において、酸素ナノバブルの割合が高いほど、細胞増殖が抑制される結果が得られた(図2)。

図2. 歯小囊幹細胞における培養6日目のナノバブル培地による増殖の抑制効果



○ : 空気ナノバブル培地/液体培地

◇ : 酸素ナノバブル培地/液体培地

\* 空気、酸素ともにナノバブル水の含有率に依存して、細胞抑制効果を示した。

空気と酸素のナノバブルでは酸素の方が、細胞数が抑制される傾向を示したが、これらの間に有意差は認めなかった。

以上より、細胞培養系における細胞の増殖にはナノバブルは抑制的に働くことが示され、ナノバブル培地中の酸素分圧の高さに依存していることが示唆された。また、本研究成果と先行報告における生物一単位での成長促進などとの関係性については、不明な点が多く、双方のテーマにおいて研究の進展を要することが推察された。

以上の成果について論文作成・投稿を行った。2018年5月末現在、査読中である。

## 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 0件)

[学会発表](計 1件)

Atsushi Oishi, Hitoyata Shimokawa, Wit Yee Wint, Shinichi Arakawa, Michiyo Miyashin. Effects of Nanobubble water on human cells derived from impacted supernumerary teeth. 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia in conjunction with 54th Annual Conference of the Japanese Society of Pediatric Dentistry. 2016年5月26 - 28日. 東京都文京区, 東京ドームホ

テル.

〔図書〕(計 0件)

〔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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

大石 敦之 (OISHI Atsushi)  
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：50645166

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

高橋 正好 (TAKAHASHI Masayoshi)  
産業総合研究所・主任研究員  
荒川 真一 (ARAKAWA Shinichi)  
東京医科歯科大学・生涯口腔保健衛生学分  
野・教授  
下川 仁弥太 (SHIMOKAWA Hitoyata)  
東京医科歯科大学・小児歯科学分野・非常勤  
講師