

オーラル・フレイル（歯や口の機能の虚弱）防止のための歯科用ナノバブル発生装置開発  
(28-20)

主任研究者 庵原 耕一郎

国立長寿医療研究センター 研究所 幹細胞再生医療研究部（室長）

研究要旨

2年間全体

虫歯や歯周病を放置すると、歯を喪失することが少なくない。すなわち、噛む力や舌の動きが低下し、食べられるものが限られるためバランスの良い食事を摂れなくなり、食欲低下となることがある。このような歯や口の機能が低下して虚弱になることを「オーラル・フレイル」という。オーラル・フレイルは低筋力や低身体機能などのサルコペニアや低栄養などによる生活機能の低下を招き、ひいては要介護状態に陥ることが懸念されている。日本歯科医師会は健康長寿をサポートすべく「オーラル・フレイル予防」を啓発している。一方、中高年では、歯と歯の隙間が大きくなり、歯肉が下がるため、通常の歯磨きでは歯垢の除去が難しくなる。また、喪失した歯を補うブリッジ、インプラント、義歯の周囲に歯垢が溜まりやすく、残った歯が咬合力を過重に負担することとあいまって、インプラント周囲炎や歯周炎によりなりやすくなる。私達はこれまで、歯をできるだけ残存させるべく、ナノバブル薬剤導入法による感染制御の研究を行ってきた。ナノバブルは薬剤の浸透度を高める効果が非常にあるため、通常治療できない部位まで殺菌できる。これまでのナノバブル発生装置は作製時に外気に触れるため、医療機器としては使用できない。よって本研究ではさらに、ナノバブル発生装置を、臨床で根管治療や歯周疾患治療等に用いることができる閉鎖系の歯科用医療機器として完成させ、この効果をう蝕・感染根管・歯周疾患モデルを用いて検討した。この結果、以下のことが判明した。

- 1) 最適なナノバブル発生条件として、循環時間1分で粒径が安定し、10分でぬれ角度が最小となり、1分以上で薬剤浸透効果が現れたことから、循環時間を10分に設定した。
- 2) ナノバブル中の気体として、空気、二酸化炭素、窒素、酸素を用いて作製したところ、粒径は二酸化炭素が空気に比べて小さく、ぬれ角度は二酸化炭素がやや小さいがほぼ同等であり、薬剤浸透は二酸化炭素および酸素がやや強い傾向がみられた。
- 3) ナノバブルの安定性に関して、作製後7か月経過した各気体のサンプルでも粒径はほぼ変わらず、濃度は1/3ぐらいに減少した。7か月目の各気体での薬剤浸透性は1.5か月目とほぼ変わらなかった。7か月目の各気体での薬剤浸透性は作製直後と同等の

浸透性がみられた（図8）。

- 4) ブタ抜去歯に、*Enterococcus Faecalis* を感染させ、二酸化炭素あるいは空気ともに、ナノバブル含有ドキシサイクリンを10分間適用させると、細菌の死滅がみられた。ナノバブルのみでは除菌できなかった。
- 5) イヌ感染根管モデルを作製し、ナノバブル含有ビブラマイシンを数回洗浄・貼薬することにより根管内細菌が検出限界以下になった。ビブラマイシンのみを適応した根管は6回以上貼薬を行っても菌が検出され続けた。
- 6) *in vitro* 根管モデルにおいて、ナノバブル単味で5分洗浄すると、17%EDTAに匹敵する程度にスメア層を除去できた。ビッカース硬さを測定すると、ナノバブル洗浄では、17%EDTAの洗浄の場合のような象牙質深さ100 $\mu\text{m}$ での硬さの減少はみられなかった。
- 7) EDTAをナノバブルと混合して、歯の根管へ適応し、脱灰促進を検討したところ、ナノバブルのみでは、蒸留水と同様に、ビッカース硬さはほとんど変化がみられなかった。17%EDTAおよび8.5%EDTAでは、根管壁から100 $\mu\text{m}$ の深さでの硬さの減少がみられた。8.5%EDTA+50%ナノバブルでは500 $\mu\text{m}$ までの深さでの硬さの減少がみられた。
- 8) ハイドロキシアパタイト表面に形成した *Streptococcus mutans* あるいは *Enterococcus faecalis* のバイオフィルムをナノバブル単味で洗浄することで除去できた。
- 9) ベンザルコニウムとナノバブル併用により、さらにバイオフィルム除去効果は高まった。
- 10) ナノバブルにて根管内を洗浄すると、象牙細管内に深く浸透した抗生剤を除去できた。
- 11) ハイドロキシアパタイト表面に形成した *Streptococcus mutans* のバイオフィルムをゲルとナノバブルを混合したもので洗浄することで除去できた。
- 12) *in vitro* 根管モデルにおいて、ゲルとナノバブルを混合したもので5分洗浄すると、スメア層を除去できた。
- 13) ナノバブル水の根管内薬剤浸透促進メカニズムを検討した。その結果、濃度0.5~1.0 $\times 10^8$ 個/mL、ゼータ電位-11mV以下のナノバブル水がスメア層除去に対して有効であった。また、pHの影響はみられなかったが、内圧を変化させることによる影響はみられた。よって、薬剤浸透促進メカニズムに、ナノバブル水の濃度、ゼータ電位、および内圧が関与する可能性が示唆された。
- 14) *in vitro* において、歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に対してコンクールは、除菌効果はあったがナノバブルによりその効果は促進されなかった。一方、塩化ベンザルコニウムはナノバブルによる除菌促進効果が見られた。
- 15) *in vivo* イヌ歯周病モデルにおいて塩化ベンザルコニウム含有ゲルおよび塩化ベンザルコニウム含有ゲルナノバブルを歯周ポケットに注入するとゲルナノバブルを含有させた方がより細菌数の減少がみられた。

- 16) 種々の気体にて作成したナノバブル水の殺菌効果を、大腸菌を用いて検討したところ、特に閉鎖系で空気にて作成したナノバブル水に殺菌効果が認められた。

2年間で、英文論文 11 論文、日本語論文 2 論文、著書 1 報、学会発表および講演 29 件、受賞 2 件、国内特許取得 3 件、海外特許取得 3 件、国内出願 2 件の研究成果を得た。

平成 29 年度について

本年度は、加齢などの原因により歯の根管の入り口が硬く閉じてしまい、根尖性歯周炎の治療の器具が根管の先端まで届かないことがある。根管拡大補助剤として用いられる EDTA をナノバブルと混合して、歯の根管へ適応し、歯の脱灰を促進できるかを検討した。また、必要な局所に長くとどまり、効果を持続させることができるゲルナノバブルを開発し、スメア層除去や虫歯細菌のバイオフィルムに対する効果を検討した。ナノバブル水の根管内薬剤浸透促進メカニズムを検討した。さらにう蝕や根尖性歯周炎だけではなく歯を失う大きな原因となる歯周病へのナノバブルの効果を検討した。その結果、以下のことが判明した。

- 1) EDTA をナノバブルと混合して、歯の根管へ適応し、脱灰促進を検討したところ、ナノバブルのみでは、蒸留水と同様に、ビッカース硬さはほとんど変化がみられなかった。17%EDTA および 8.5% EDTA では、根管壁から 100  $\mu\text{m}$  の深さでの硬さの減少がみられた。8.5%EDTA +50%ナノバブルでは 500  $\mu\text{m}$  までの深さでの硬さの減少がみられた。
- 2) ハイドロキシアパタイト表面に形成した *Streptococcus mutans* のバイオフィルムをゲルとナノバブルを混合したもので洗浄することで除去できた。
- 3) *in vitro* 根管モデルにおいて、ゲルとナノバブルを混合したもので 5 分洗浄すると、スメア層を除去できた。
- 4) ナノバブル水の根管内薬剤浸透促進メカニズムを検討した。その結果、濃度 0.5~1.0  $\times 10^8$ 個/mL、ゼータ電位 -11mV 以下のナノバブル水がスメア層除去に対して有効であった。また、pH の影響はみられなかったが、内圧を変化させることによる影響はみられた。よって、薬剤浸透促進メカニズムに、ナノバブル水の濃度、ゼータ電位、および内圧が関与する可能性が示唆された。
- 5) *in vitro* において、歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に対してコンクールは、除菌効果はあったがナノバブルによりその効果は促進されなかった。一方、塩化ベンザルコニウムはナノバブルによる除菌促進効果が見られた。
- 6) *in vivo* イヌ歯周病モデルにおいて塩化ベンザルコニウム含有ゲルおよび塩化ベンザルコニウム含有ゲルナノバブルを歯周ポケットに注入するとナノバブルを含有させた方がより細菌数の減少がみられた。

平成29年度で、英文論文6論文、日本語論文0論文、著書1報、学会発表および講演8件、受賞2件、国内特許取得0件、海外特許取得2件、国内出願1件の研究成果を得た。

#### 主任研究者

庵原 耕一郎 国立長寿医療研究センター 幹細胞再生医療研究部 (室長)

#### 分担研究者

松下 健二 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部 (部長)

川島 伸之 東京医科歯科大学大学院医歯薬学総合研究科 歯髄生物学講座 (助教)

#### 研究協力者

中島 美砂子 国立長寿医療研究センター 幹細胞再生医療研究部 (部長)

研究期間 平成28年4月～平成30年3月

#### A. 研究目的

これまで、主任研究者らは、超音波とナノバブルを併用して、薬剤を象牙細管内に深く浸透させる「超音波ナノバブル薬剤導入法」を開発し、根管を短時間に無菌化できる可能性を明らかにした。さらに、超音波を必要としない新規ナノバブルを用いて薬剤導入法を行い、超音波を使用した時と同等の薬剤浸透性を有することを確認した。一方この新規ナノバブルは外気に直接接触れる状態で作製されるため、細菌等が混入する恐れがあり、医療機器としては用いることができない欠点がある。そこで本年度は、歯科用に開発された閉鎖系の歯科用ナノバブル発生装置を用いて、最適なナノバブル発生条件を決定する。また、そのナノバブルを用いて薬剤浸透による管内無菌化を *in vitro* および *in vivo* で検討する。さらに、スメア層除去効果、歯垢・バイオフィーム除去効果および象牙質内浸透薬剤除去効果、根管拡大補助効果を検討する。また、管内だけでなく、ナノバブルの有用性を歯周疾患モデルにおいても確認し、高齢者において歯を喪失する原因となる歯周病への効果を検討する。さらに、ナノバブルのメカニズムについて検討することも目的とする。

本研究成果は、高齢者の歯の延命化、口腔機能維持による QOL 向上、全身の恒常性維持および認知症の予防につながる。さらには将来的に 8020 運動を達成し、医療・福祉経済の安定化にも貢献できる。また、管内を無菌化することで歯髄再生療法の適応が拡大し、歯髄再生治療による根治療法につながる可能性がある。これにより長寿医療のミッションを達成できると考えられる。

## B. 研究方法

### 2年間全体について

- 1) 閉鎖系歯科用ナノバブル発生装置（株式会社ナック、FOAMEST 8®）を用いて、ナノバブルを安定に作製できる循環時間を決定するため、10秒、30秒、60秒、5分、10分循環させたナノバブルの粒径をナノサイトにて測定した。また、ぬれ角度の違いを検討した。さらに、イヌ抜去歯を用いて象牙細管への薬剤浸透の比較検討を行った（庵原）。
- 2) 気体の種類（空気、二酸化炭素、窒素、酸素）によるナノバブルの性質を粒径、濃度、ぬれ角度および薬剤浸透性により比較した（庵原）。
- 3) 各気体でのナノバブルの安定性を検討するため、濃度、粒径およびぬれ角度の経時的变化を7か月目まで測定した。また、ブタ抜去歯を用いて薬剤浸透性の経時的变化を検討した（庵原）。
- 4) ブタ抜去歯に、GFPラベルの *Enterococcus Faecalis* を感染させ、ナノバブル含有ドキシサイクリンを5分間適用させ、48時間後、共焦点レーザー顕微鏡にて細菌の有無を観察した（庵原）。
- 5) イヌ感染根管モデルを作製し、ナノバブル含有ビブラマイシンを洗浄・貼薬し、1週間後に釣菌による根管内細菌培養試験を行った。同様の操作を毎週計6回連続的に行い、5日間嫌気培養後の菌の有無を観察した（庵原・中島）。
- 6) *in vitro* 根管モデルを作製し、スメア層に対して、ナノバブルで2分洗浄し、走査電子顕微鏡にて観察した。（庵原・中島）。
- 7) *in vitro* 根管モデルを作製し、8.5%EDTA製剤+50%ナノバブル水、8.5%EDTA製剤、17%EDTA製剤の4種類の根管拡大清掃剤を用い、5分根管に作用させ、走査電子顕微鏡にて観察した。さらに、根管壁からそれぞれ100, 300, 500  $\mu\text{m}$ でのピッカース硬さを測定した（庵原・中島）。
- 8) う蝕モデルとして、*Streptococcus mutans* の培養液にハイドロキシアパタイトディスクを浸漬し、48時間培養して歯垢・バイオフィルムを形成した。その後、ナノバブルを10分あるいは24時間作用させ、その除去効果を走査電子顕微鏡にて観察した。また、ナノバブルに薬剤（塩化ベンザルコニウムあるいはグリチルリチン酸モノアンモニウム）を併用した場合の除去効果も観察した（庵原・松下）。
- 9) 高濃度10mg/mlテトラサイクリンをナノバブルにて象牙細管内に1mm深く浸透させた後、根管内をナノバブルにて1分洗浄し、除去効果を観察した。さらに複数回洗浄した場合の効果を検討した（庵原・中島）。
- 10) 各種ゲルナノバブル（アルコックス E-240、セロゲン BSH-12、ヒドロキシプロピルセルロース HPC-M 2.5%、あるいはポリエチレングリコール PEG20k 5%）を作製し、う蝕モデル（*Streptococcus mutans*）での除去効果を走査電子顕微鏡にて観察した（庵原・中島）。

- 11) 各種ゲルナノバブル（アルコックス E-240、セロゲン BSH-12、ヒドロキシプロピルセルロース HPC-M 2.5%、あるいはポリエチレングリコール PEG20k 5%）を作製後、*in vitro* 根管モデルを作製し、スメア層に対して、ゲルナノバブルで2分洗浄し、走査電子顕微鏡にて観察した（庵原・中島）。
- 12) ナノバブル水の濃度、ゼータ電位、pH および内圧の違いによるスメア層の除去効果を比較し、ナノバブル水の薬剤浸透メカニズムを検討した（中島・庵原）。
- 13) 歯周病モデルとして、*Porphyromonas gingivalis* の培養液にハイドロキシアパタイトディスクを浸漬し、48時間培養して歯垢・バイオフィルムを形成した。その後、ナノバブルを10分あるいは6日間作用させ、その除去効果を走査電子顕微鏡にて観察した。また、ナノバブルに薬剤（コンクールあるいは塩化ベンザルコニウム）を併用した場合の除去効果も観察した（庵原・松下）。
- 14) ビーグル犬の歯のポケット深部3か所のプラークをペーパーポイントで採取し、その細菌数を測定した。次に0.025%塩化ベンザルコニウム入り Hydroxypropyl Cellulose (HPC) ゲル、0.025%塩化ベンザルコニウム HPC ゲル（ナノバブル希釈）を歯周ポケットに注入し、24時間後に細菌数を測定した。（庵原・中島）。
- 15) 大腸菌を各種ナノバブル（空気、二酸化炭素、窒素、酸素）と懸濁し、5分間放置後、菌数をATP活性より測定した。また、作製後7か月目の各種ナノバブルを用いて同様の実験を行った（川島）。

#### 平成29年度について

- 1) *in vitro* 根管モデルを作製し、8.5%EDTA 製剤+50%ナノバブル水、8.5%EDTA 製剤、17%EDTA 製剤の4種類の根管拡大清掃剤を用い、5分根管に作用させ、走査電子顕微鏡にて観察した。さらに、根管壁からそれぞれ100, 300, 500  $\mu\text{m}$ でのビッカーズ硬さを測定した（庵原・中島）。
- 2) 各種ゲルナノバブル（アルコックス E-240、セロゲン BSH-12、ヒドロキシプロピルセルロース HPC-M 2.5%、あるいはポリエチレングリコール PEG20k 5%）を作製し、う蝕モデル（*Streptococcus mutans*）その除去効果を走査電子顕微鏡にて観察した（庵原・中島）。
- 3) 各種ゲルナノバブル（アルコックス E-240、セロゲン BSH-12、ヒドロキシプロピルセルロース HPC-M 2.5%、あるいはポリエチレングリコール PEG20k 5%）を作製後、*in vitro* 根管モデルを作製し、スメア層に対して、ゲルナノバブルで2分洗浄し、走査電子顕微鏡にて観察した（庵原・中島）。
- 4) ナノバブル水の濃度、ゼータ電位、pH および内圧の違いによるスメア層の除去効果を比較してナノバブル水の根管内薬剤浸透促進メカニズムを検討した（中島・庵原）。
- 5) 歯周病モデルとして、*Porphyromonas gingivalis* の培養液にハイドロキシアパタイトディスクを浸漬し、48時間培養して歯垢・バイオフィルムを形成した。その後、ナノ

バブルを 10 分あるいは 6 日間作用させ、その除去効果を走査電子顕微鏡にて観察した。また、ナノバブルに薬剤（コンクールあるいは塩化ベンザルコニウム）を併用した場合の除去効果も観察した（庵原・松下）。

- 6) ビーグル犬の歯のポケット深部 3 か所のプラークをペーパーポイントで採取し、その細菌数を測定した。次に 0.025% 塩化ベンザルコニウム入り Hydroxypropyl Cellulose (HPC) ゲル、0.025% 塩化ベンザルコニウム HPC ゲル（ナノバブル希釈）を歯周ポケットに注入し、24 時間後に細菌数を測定した。（庵原・中島）。

（倫理面への配慮）

実験動物に対する動物愛護上の配慮

動物愛護上の配慮を徹底し、国立長寿色由研究センターの動物実験倫理委員会の承認（承認番号 動 28-23, 29-9）および、愛知医科大学の動物実験倫理委員会の承認（承認番号 2016-4, 2017-24）を得てその定める規則に基づき実験を行った。

## C. 研究結果

2 年間全体について

- 1) 閉鎖系歯科用ナノバブル発生装置は循環時間 60 秒で粒径のピークが約 100nm で安定的に存在していた。また、循環時間 30 秒から 5 分でぬれ角度の減少傾向がみられ、10 分循環すると有意にぬれ角度が減少した。これより、ぬれ角度の低いナノバブルを作製するには少なくとも 10 分循環する必要があることが明らかになった。さらに、イヌ抜去歯を用いた薬剤浸透実験を行い、循環時間 60 秒で薬剤浸透が確認でき、循環時間 5 分、10 分で、より浸透がみられた。よって、象牙質へナノバブルを浸透させるには 5 分以上循環する必要があることが明らかになった（庵原）。
- 2) 濃度、粒径およびぬれ角度の経時変化を 7 か月目まで測定したところ、各気体のサンプルでも粒径はほぼ変わらず、濃度は 1/3 ぐらいに減少した。7 か月目の各気体での薬剤浸透性は 1.5 か月目とほぼ変わらなかった（庵原）。
- 3) *Enterococcus Faecalis* を感染させたブタ抜去歯に、二酸化炭素あるいは空気のナノバブルを含有したドキシサイクリンを 10 分間適用させると、細菌の死滅がみられた。ナノバブルのみでは除菌できなかった（庵原）。
- 4) イヌ感染根管モデルにナノバブル含有ビブライマイシンを数回洗浄・貼薬することにより根管内細菌が検出限界以下になった（庵原・中島）。
- 5) *in vitro* 根管モデルにおいて、ナノバブルで 5 分洗浄すると、17%EDTA 洗浄と同程度にスメア層を除去できた。ビッカース硬さを測定すると、ナノバブル洗浄では、17%EDTA の洗浄の場合のような象牙質深さ 100  $\mu\text{m}$  での硬さの減少はみられなかった。（庵原・中島）。
- 6) *in vitro* 根管モデルにおいて、EDTA をナノバブルと混合して、歯の根管へ適応し、

歯の脱灰を促進できるかを検討したところ、ナノバブルのみでは、ビッカース硬さはほとんど変化がみられなかった。一方、ナノバブルや蒸留水と比較して、17%EDTA および 8.5% EDTA では、100  $\mu\text{m}$  の地点のみ有意にビッカース硬さの減少がみられた。さらに 8.5%EDTA +50%ナノバブル水では、17%EDTA と比較して、100、300 および 500  $\mu\text{m}$  とも有意にビッカース硬さの減少がみられ、8.5% EDTA と比較して、300 および 500  $\mu\text{m}$  に有意にビッカース硬さの減少がみられた。(庵原・中島)。

- 7) う蝕モデルとして、*Streptococcus mutans* の歯垢・バイオフィームに対して、ナノバブルを 24 時間作用させると完全に除去された。ナノバブルに塩化ベンザルコニウムを併用すると除去効果が増加した(庵原・松下)。
- 8) ナノバブルにて 1 分洗浄すると、1mm 以上深く浸透したテトラサイクリンは大部分除去され、さらに複数回洗浄するとより除去できた(庵原・中島)。
- 9) ハイドロキシアパタイト表面に形成した *Streptococcus mutans* のバイオフィームをゲルナノバブルで洗浄することで除去できた(庵原・中島)。
- 10) *in vitro* 根管モデルにおいて、ゲルナノバブルで 5 分洗浄すると、スメア層を除去できた(庵原・中島)。
- 11) メカニズムについて濃度 0.5~1.0 $\times 10^8$ 個/mL、ゼータ電位 -11mV 以下のナノバブル水がスメア層除去に対して有効であった。また、pH の影響はみられなかったが、内圧を変化させることによる影響はみられた。(中島・庵原)
- 12) ナノバブルの歯周病治療への応用を検討したところ、*in vitro* において、歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に対してコンクールは歯周病菌に対して除菌する効果はあったがナノバブルによりその効果は促進されなかった。一方、塩化ベンザルコニウムは歯周病菌に対してナノバブルの除菌促進効果が見られた(庵原・松下・中島)。
- 13) *in vivo* イヌ歯周病モデルにおいて塩化ベンザルコニウム含有ゲルおよび塩化ベンザルコニウム含有ゲルナノバブルを歯周ポケットに注入するとゲルナノバブルを含有させた方がより細菌数の減少がみられた。(庵原・中島)。
- 14) 種々の気体にて作成したナノバブル水の殺菌効果は、特に閉鎖系で空気にて作成したナノバブル水に殺菌効果が認められた(川島)。

平成 29 年度について

- 1) *in vitro* 根管モデルにおいて、EDTA をナノバブルと混合して、歯の根管へ適応し、脱灰促進を検討したところ、ナノバブルのみでは、蒸留水と同様に、ビッカース硬さはほとんど変化がみられなかった。17%EDTA および 8.5% EDTA では、根管壁から 100  $\mu\text{m}$  の深さでの硬さの減少がみられた。8.5%EDTA +50%ナノバブルでは 500  $\mu\text{m}$  までの深さでの硬さの減少がみられた。
- 2) ハイドロキシアパタイト表面に形成した *Streptococcus mutans* のバイオフィームをゲ



ルナノバブルで洗浄することで除去できた(庵原・中島)。

- 3) *in vitro* 根管モデルにおいて、ゲルナノバブルで5分洗浄すると、スメア層を除去できた(庵原・中島)。
- 4) メカニズムについて濃度  $0.5\sim 1.0\times 10^8$ 個/mL、ゼータ電位  $-11\text{mV}$  以下のナノバブル水がスメア層除去に対して有効であった。また、pHの影響はみられなかったが、内圧を変化させることによる影響はみられた。(中島・庵原)
- 5) ナノバブルの歯周病治療への応用を検討したところ、*in vitro* において、歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に対してコンクールは歯周病菌に対して除菌する効果はあったがナノバブルによりその効果は促進されなかった。一方、塩化ベンザルコニウムは歯周病菌に対してナノバブルの除菌促進効果が見られた(庵原・松下・中島)。
- 6) *in vivo* イヌ歯周病モデルにおいて塩化ベンザルコニウム含有ゲルおよび塩化ベンザルコニウム含有ゲルナノバブルを歯周ポケットに注入するとゲルナノバブルを含有させた方がより細菌数の減少がみられた。

#### D. 考察

最適なナノバブル発生条件に関する研究

ナノバブル(ウルトラファインバブル)の特徴は、ナノ多孔性高分子樹脂フィルム(モノトラン)に加圧気体を通過させることにより  $10^7\sim 10^9$ 個/mLのナノサイズ(約100 nmの径)の水の泡、ナノバブルを生じている。本閉鎖系歯科用ナノバブル発生装置において、10分循環させると、安定した濃度( $2\times 10^8$ 個/ml)、粒径(約100 nm)および薬剤浸透性(約1 mm)が得られ、安定したナノバブル製造のための最適条件が決定できたと考えられる。内包する気体に関しては、安定性はほぼ同一で、粒径、ぬれ角度および薬剤浸透性の観点から二酸化炭素ナノバブルが最も優れている可能性が示唆された。一方、根管には嫌気性菌が象牙細管内に深く侵入していることから、酸素ナノバブルは根管内部を好気条件に変化させることができるため、根管洗浄には有利である可能性が示唆された。

根管無菌化の検討に関する研究

現在、感染根管歯は年間600万件生じており、このうち25%ぐらいは難治性に陥り、抜歯を余儀なくされる。この原因のひとつとして、歯の根管の構造の複雑性があげられる。すなわち、根管は湾曲、狭窄、側枝や副根管が多々存在することから完全に除菌することは困難である。また、通常貼薬に用いられている水酸化カルシウム製剤に対して、*Enterococcus faecalis* は耐性があり、しかも象牙細管の奥深くにまで侵入できる。したがって、ナノバブルを用いた薬剤導入法により、薬剤が象牙細管の奥深くおよび根管の細部に浸透し、機械的拡大・清掃を行わなくても除菌できる可能性が示唆された。一方、ビブラマイシンは *Enterococcus faecalis* に有効な抗生剤である。本研究の細菌培養試験で示された

ように、イヌ感染根管モデルにて、ナノバブルとビブラマイシンを併用して数回根管治療・貼薬処置することにより除菌できた。これよりヒトにおいてもビブラマイシンとナノバブル併用により感染根管治療に有効である可能性が示唆された。

#### スメア層の除去

一般に歯を切削すると切削片が象牙質の象牙細管に詰まり、象牙質表面にスメア層が形成される。スメア層が存在するとレジンやセメントなどの接着性が低下し、さらにスメア層自体に細菌が存在する場合もある。スメア層は、象牙質表面に粘着しており、スリーウェイシリンジによる強水洗や3%過酸化水素水などによる発泡洗浄でも除去することはできない。よって、修復処置あるいは補綴物装着を行なう前にはリン酸やプライマー（クエン酸等）などでスメア層の処理を行なう。また、抜髄・感染根管治療あるいは根管治療で根管の拡大形成時にもスメア層は生じる。このスメア層もまた根管充填剤の接着性を低下させ、密な根管充填を妨げ微小漏洩を引き起こす原因となる。また特に感染根管歯では、根管壁象牙細管から内部に深く侵入した細菌を完全に除去する必要がある。この際、一般的には機械的に根管を拡大後、根管壁象牙細管に詰まったスメア層をEDTA製剤にて除去洗浄し、さらに根管内に抗生剤や水酸化カルシウムなどを貼薬する。しかしながら、EDTA製剤はスメア層除去に効果があるが、根管壁象牙質を脱灰するため機械的強度が減少し、破折を招く可能性がある。他のクエン酸含有製剤（MTAD）の洗浄でも同様の機械的強度の問題があり、さらに修復時の接着剤の接着強度が弱くなる欠点がある。本研究では、ナノバブル洗浄によりスメア層が17%と同程度に除去でき、さらにEDTAのように硬さに影響を与えないことが示された。

#### 根管拡大清掃剤の作用促進

加齢などの原因により歯の根管の入り口が硬く閉じてしまい、根尖性歯周炎の治療の器具が根管の先端（根尖）まで届かないことがある。この場合、外科的手術として根の下の骨から根尖病巣を除去する観血的治療あるいは抜歯となる。一方、これまでナノバブルは歯への薬剤浸透効果があることが明らかになっている。本研究において一般の歯科治療に用いられているEDTAをナノバブルと混合して、歯の根管へ適応すると、歯の脱灰を促進できた。これより、ナノバブルは根管拡大清掃剤として有効であると考えられる。一方、脱灰を促進させすぎると歯を脆くする危険性があるため、使用部位を根尖の一部に限定する必要があると考えられる。

#### 薬剤除去

根管治療を行う際、高濃度10mg/mLの抗生剤等で除菌が可能とされるが、この濃度では、通法では洗浄できず、象牙質側壁に残存した薬剤は細胞毒性があり、例えば根未完成歯で血餅を根管内に注入して血管再疎通させる際、細胞の付着・増殖・分化に影響を

与えるともいわれる。そのような問題点に対し当技術は、マイナス電荷を有するナノサイズの水の泡であり圧壊現象を引き起こす「ナノバブル」を用いて洗浄する。

#### 歯垢・バイオフィルムの除去

口腔清掃指導は、歯ブラシでの物理的歯垢除去のみを主としている。しかし実際、高齢者や介護者が長時間、物理的ブラッシングを行うことは難しい。年齢とともに、歯周ポケットが深くなり、歯と歯の隙間が大きくなり、また歯頸部にも虫歯ができるため、通常のブラッシングやうがいでは除去できない歯垢・バイオフィルムが堆積し、強固で慢性的な細菌の棲み処から全身へ細菌や毒素が排出され、全身各組織で慢性炎症を引き起こす原因となりうる。高齢者では頻繁にプロフェッショナルケアを受けることは難しくなるため、自発的なセルフケアをより促進させ、歯垢・バイオフィルムを堆積させない簡便な方法の新規開発が必須と考えられる。本研究では、根管細菌、*Enterococcus faecalis* をハイドロキシアパタイトディスク上に2日間培養し、48時間で形成したバイオフィルムに対して、ナノバブルを48時間作用させるとバイオフィルムは解離、崩壊した。よって、さらに、バイオフィルム中の細菌の生存率、およびバイオフィルム形成を2週間行った場合のナノバブルの効果を今後検討する予定である。また、ドキシサイクリン（商品名：ビブラマイシン（ファイザー））のナノバブルとの併用効果も今後検討する予定である。

#### ゲルナノバブルの効果に関する研究

ナノバブルは密閉性を維持や温度管理が必要であるなど保存・安定性に問題がある。また、高齢者や介護者も使える歯磨剤としては飲み込んで安全であり、必要な局所（ポケット、歯面、歯の隙間など）に長くとどまり、効果を持続させることができるゲル状の方が液状よりも有利と考え、新たにゲルナノバブルを開発した。ゲルナノバブルは、ナノバブル水と同様に浸透、洗浄効果が維持されることが明らかになった。今後、このゲルナノバブルのナノバブル濃度などの安定性を検討することで、歯周病用治療薬や歯磨剤、口腔ケア用製品に応用することができると期待される。

#### ナノバブルの浸透促進メカニズムに関する研究

本研究で使用したナノバブルは表面がマイナス電荷を有し、圧壊現象を生じ、濃度  $10^6 \sim 10^9$  個/mL、粒径 10 nm～300 nm の水の泡である。気相と液相、液相と液相の界面間で界面張力により加圧が生じ、気泡径が小さくなると表面張力による内圧が高くなる。ゼータ電位は、溶液中の微粒子の周りに形成する電気二重層中の、液体流動が起こり始める「すべり面」の電位をいう。ゼータ電位は微粒子の流動性、凝集性、保存性などに関係すると考えられている。本研究により、スミア層除去に対して、濃度  $0.5 \sim 1.0 \times 10^8$  個/mL、ゼータ電位  $-11\text{mV}$  以下のナノバブル水が有効であった。また、pH の影響はみられなかったが、内圧を変化させることによる影響はみられた。よって、薬剤浸透促進メカニズムに、ナノバ

ブル水の濃度、ゼータ電位、および内圧が関与する可能性が示唆された。

#### ナノバブルの歯周病への効果検討

近年、歯周病は糖尿病と密接な関係があることが判明している。また、*Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原菌が血管内に入ると心臓や大動脈、静脈などで血栓ができやすくなり、心臓病や脳梗塞のリスクが高まる。口腔ケアは虫歯や歯周病の予防による歯の健康維持のみならず、口腔内細菌や毒素による誤嚥性肺炎、認知症、心筋梗塞、脳梗塞等の予防など、全身に及ぶ様々な感染症の予防に重要と考えられている。今回、ナノバブルの歯周病治療への応用を検討したところ、まず *in vitro* において、歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に対してコンクールは歯周病菌に対して除菌効果はあったが、ナノバブルによりその効果が促進されなかった。一方、塩化ベンザルコニウムはナノバブルによる除菌の促進効果が見られた。また、*in vivo* イヌ歯周病モデルにおいて塩化ベンザルコニウム含有ゲルおよび塩化ベンザルコニウム含有ゲルナノバブルを歯周ポケット注入すると細菌数の減少効果が見られた。また、塩化ベンザルコニウム含有ゲルおよび塩化ベンザルコニウム含有ゲルナノバブルを比較するとナノバブルを含有させた方がより細菌数の減少がみられた。これらの結果により、薬剤含有ナノバブルは歯周病に応用できる可能性が示唆された。

#### E. 結論

- 1) 最適なナノバブル発生条件は循環時間 10 分である。
- 2) 二酸化炭素ナノバブルは空気ナノバブルに比べて粒径は小さく、ぬれ角度もやや小さかった。二酸化炭素および酸素ナノバブルは薬剤浸透性がやや強かった。
- 3) ナノバブル作製 7 か月後、粒径や薬剤浸透性はほぼ変わらなかったが、濃度は 1/3 ぐらいに減少した。
- 4) 二酸化炭素あるいは空気ナノバブルを含有したドキシサイクリンを *Enterococcus Faecalis* の感染歯に 5 分間適用すると除菌できた。
- 5) ナノバブル含有ドキシサイクリンはイヌ感染根管モデルにおいて、数回洗浄・貼薬で除菌できる。
- 6) ナノバブル 2 分洗浄によりスメア層が除去でき、17%EDTA の洗浄のような硬さの減少はみられなかった。
- 7) EDTA をナノバブルと混合して、歯の根管へ適応すると歯の深部まで硬さの減少がみられた。
- 8) ナノバブルは、*Streptococcus mutans* あるいは *Enterococcus faecalis* によるバイオフィルムを除去できた。
- 9) ベンザルコニウムとナノバブル併用は、バイオフィルム除去効果を高めた。

- 10) ナノバブル洗浄により、象牙細管内に深く浸透した抗生剤を除去できた。
- 11) 薬剤浸透促進メカニズムに、ナノバブル水の濃度、ゼータ電位、および内圧が関与する可能性が示唆された。
- 12) 歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に対して塩化ベンザルコニウムは歯周病菌に対してナノバブルの除菌促進効果が見られた。
- 13) *in vivo* イヌ歯周病モデルにおいて塩化ベンザルコニウム含有ゲルナノバブルを適応するとゲルナノバブルを含有させた方がより細菌数の減少がみられた。
- 14) ナノバブル単体で、大腸菌を殺菌できた。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表（原著、総説）

平成28年度

- 1) Miyashita S, Ahmed NE, Murakami M, Iohara K, Yamamoto T, Horibe H, Kurita K, Takano-Yamamoto T, Nakashima M.: Mechanical forces induce odontoblastic differentiation of mesenchymal stem cells on three-dimensional biomimetic scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 11(2): 434-446, 2017.
- 2) Nakayama H, Iohara K, Hayashi Y, Okuwa Y, Kurita K, Nakashima M.: Enhanced regeneration potential of mobilized dental pulp stem cells from immature teeth. *Oral Dis.* 2016, Dec 14. DOI 10.1111/odi.12619. in press.
- 3) Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Ariji Y, Matsushita K.: Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: A pilot clinical study. *Stem Cell Res Therapy* Mar 9; 8(1):61, 2017.
- 4) Kawashima N and Okiji T, Odontoblasts: specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex, *Congenit Anom (Kyoto)*, 56, 144-153, 2016.
- 5) 川島伸之、齋藤 正寛、興地隆史: Osr2 (odd-skipped related 2)はマウス歯乳頭細胞の硬組織形成細胞への分化を促進する *歯内療法学会誌* 第37巻 第1号 38-44 ページ 2016年
- 6) 川島伸之、戸村淳嗣、横田兼欣、興地隆史: 低濃度 EDTA 溶液のスミヤー層除去効果と象牙質脱灰に対する影響 *日本歯科保存学雑誌* 第60巻 第1号 2017年

平成29年度

- 1) 中島美砂子: 歯髄・象牙質再生治療の現状と未来 *歯界展望特別号—歯科医療 未来と夢—* 医歯薬出版 pp. 257-259.

- 2) Nakashima M, Iohara K: Dental Pulp Regeneration: from Bench to Clinic. (REVIEW) J. Endodontics. 2017. in press.
- 3) Nakayama H, Iohara K, Hayashi Y, Okuwa Y, Kurita K, Nakashima M.: Enhanced regeneration potential of mobilized dental pulp stem cells from immature teeth. Oral Dis. Jul; 23(5):620-628, 2017.
- 4) Iohara K, Utsunomiya S, Kohara S, Nakashima M.: Allogeneic transplantation of mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) with the mismatched dog leucocyte antigen (DLA) type is safe and efficacious for total pulp regeneration. Stem Cell Res Therapy. 2018, in press.
- 5) Okuwa Y, Toriumi T, Nakayama H, Ito T, Otake K, Kurita K, Nakashima M, Honda M.: Transplanting effect of dental pulp-derived cells on peripheral nerve regeneration in crushed sciatic nerve injury. J Oral Science. Submitted
- 6) Hayashi Y, Kawamura R, Nishimatu S, Fukuta O, Nakashima M.: Stem cell induced pulp regeneration can be enhanced by administration of CCL11 neutralizing antibody in the ectopic tooth transplantation model in the aged mice. Rejuvenation Research. Submitted
- 7) Arijji Y, Arijji E, Nakashima M, Iohara K.: Magnetic resonance imaging in endodontics: a literature review. (REVIEW) Oral Radiol. 2017. 34: 10-16. DOI 10.1007/s 11282-017 -0301-0

### 3. 学会発表

平成28年度

- 1) Fujita M, Iohara K, Horiba N, Nakata K, Nakashima M.: 「Pulp regeneration after complete disinfection of root canal system by enhanced delivery of medicaments using nanobubbles in a canine periapical disease model」 International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016. Nagoya, June 27-28, 2016.
- 2) Iohara K, Nakashima M.: 「The safety and efficacy of autologous transplantation of mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) into the pulpectomized tooth: A preclinical study in dog」 International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016. Nagoya, June 27-28, 2016.
- 3) Yamada K, Iwam Y, Iohara K, Nakashima M.: 「Three-dimensional modeling and qualitative identification of enamel, periodontal ligament, dentin and newly formed dentin by using commercial dental CBCT and engineering CT images」 International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016. Nagoya, June 27-28, 2016.
- 4) Hayashi Y, Yamamoto K, Yanagiguchi K, Yamada S, Iohara K, Nakashima M.: 「Pulp regeneration using fish collagen as scaffold in dog teeth」 2017 International Association for

- Dental Research (IADR) /AADR/CADR General Session & Exhibition. San Francisco, USA, March 25, 2017.
- 5) Tazawa K, Ikeda H, Kawashima N, Ozawa M, Suda H, Okiji T.: 「Expression of TRPM8 in Freshly Isolated Human Odontoblasts」 94th General session & exhibition of the IADR Seoul, South Korea, June 22-25, 2016.
  - 6) Aramaki O, Kawashima N, Shimada Y, Okiji T, Tagami J.: 「Three-dimensional analysis of Iba1+ macrophages in human dental pulp using whole mount immunostaining」 94th General session & exhibition of the IADR Seoul, South Korea, June 22-25, 2016.
  - 7) Nara K, Kawashima N, Noda S, Hashimoto K, Bakhit A, Okiji T.: 「Increase of miR21 expression in dental pulp cells and tissues in response to LPS stimulation」 IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, Nagoya, June 26-28, 2016.
  - 8) Noda S, Kawashima N, Hashimoto K, Aramaki O, Yamamoto M, Okiji T.: 「Effects of confluent culture condition on dental pulp stem cell surface markers, proliferation, gene expression」 IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, Nagoya, June 26-28, 2016.
  - 9) Hashimoto K, Kawashima N, Nara K, Noda S, Saito S, Okiji T.: 「Recovery effects of EDTA treatment on attachment and differentiation of mouse dental pulp cultured on NaOCl-treated dentin」 IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, Nagoya, June 26-28, 2016.
  - 10) Bakhit A, Kawashima N, Yamamoto M, Hashimoto K, Noda S, Nara K, Okiji T.: 「Action of Strontium Ranelate on the Dental-Pulp Complex」 IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, Nagoya, June 26-28, 2016.
  - 11) 川島伸之、齋藤正寛、興地隆史: 「マウス歯髄細胞/組織および骨芽細胞/組織における Meis2 発現」 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 札幌 平成 28 年 8 月 24—26 日
  - 12) 藤井真由子、川島伸之、興地隆史: 「ヒト歯髄細胞における lipopolysaccharide による HIF1a 発現の誘導」 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 札幌 平成 28 年 8 月 24—26 日
  - 13) 川島伸之、山本弥生子、野田園子、橋本健太郎、興地隆史: 「歯髄幹細胞の三次元培養における幹細胞マーカーの発現動態」 第 23 回日本歯科医学会総会 福岡 平成 28 年 10 月 21~23 日
  - 14) 倉本将司、川島伸之、Alamuddin Bakhit、奈良圭介、藤井真由子、野田園子、橋本健太郎、齋藤正寛、興地隆史: 「Lipopolysaccharide 存在下におけるマウス歯乳頭細胞の mineral trioxide aggregate に対する反応性」 第 145 回日本歯科保存学会 2016 年秋季学術大会 松本 平成 28 年 10 月 27~28 日
  - 15) 若林安見子、川島伸之、Alamuddin Yassin Bakhit、橋本健太郎、野田園子、奈良圭介、興地隆史: 「S-PRG フィラー含有試作根管充填用シーラーの細胞毒性および骨

芽細胞分化誘導能の検討」第145回日本歯科保存学会2016年秋季学術大会 松本 平成28年10月27~28日

- 16) Nara K, Kawashima N, Noda S, Hashimoto K, Okiji T.: 「microRNA21 down-regulates the expression of inflammatory mediators in LPS-stimulated human dental pulp cells via an NF-κB dependent mechanism」 2016 Autumn Scientific Meeting (the 146th) and Joint Scientific Meeting of KACD-JACD (the 18th), Seoul, Korea, Oct. 21-23, 2016.
- 17) Kawashima N, Hashimoto K, Okiji T.: 「Rescue of mouse dental papillae cell-attachment to sodium hypochlorite-treated dentin disks by EDTA treatment」 The 49th Scientific meeting of Korean Academy of Endodontics & The 14th JAE-KAE Joint Scientific Meeting Seoul, Korea, November 19th and 20th 2016.
- 18) 川島伸之、若林安見子、橋本健太郎、興地隆史: 「S-PRG フィラー含有ルートキャナルシーラーによる骨芽細胞分化誘導」第2回生体機能性材料#S-PRG フィラー研究会 京都 平成28年12月9日

平成29年度

- 1) Nakashima M.: Induction of pulp regeneration by mobilized dental pulp stem cells: a pilot clinical study. Symposium “Saving the Natural Tooth by Pulp and Dentin Regeneration”. American Association of Endodontics (AAE) 2017. New Orleans, USA. April 27, 2017.
- 2) 山田志津香、山本耕平、榎田嘉治郎、林善彦、庵原耕一郎、中島美砂子: 魚コラーゲンを足場材としたイヌにおける歯髄再生療法 第146回日本歯科保存学会春季学術大会 青森 2017年6月9日
- 3) 中島美砂子、庵原耕一郎: ナノバブルを用いた新しい根管拡大剤の開発 第147回日本歯科保存学会秋季学術大会 盛岡 2017年10月26日
- 4) 庵原耕一郎、中島美砂子: 「Trypsin 前処理による高齢の歯髄再生促進治療法の開発」第147回日本歯科保存学会秋季学術大会 盛岡 2017年10月26日
- 5) 中島美砂子、庵原耕一郎: 高齢イヌにおける CCR3 拮抗剤を併用した歯髄幹細胞治療法による歯髄再生促進 第17回日本再生医療学会総会 ポスター発表 横浜 2018年3月22日
- 6) 庵原耕一郎、中島美砂子: 高齢イヌにおける Trypsin を用いた歯髄再生促進法の開発 第17回日本再生医療学会総会 ポスター発表 横浜 2018年3月22日

#### 4. その他

- (1) シンポジウム、特別講演  
平成28年度

- 1) Nakashima M, Iohara K.: Session V: Clinical Application. 「Clinical study on pulp



regeneration by transplantation of mobilized dental pulp stem cells in patients with irreversible pulpitis」. International Association for Dental Research (IADR) Pulp Biology and Regeneration Group (PBRG) Symposium 2016. Nagoya. June 28, 2016.

- 2) Kawashima N, Noda S, Hashimoto K, Yamamoto M, Okiji T.: 「Properties of dental pulp derived-mesenchymal stem cells and effects of culture conditions」 IADR Pulp Biology and Regeneration Group Satellite Symposium, Nagoya, June 26-28, 2016.
- 3) 庵原耕一郎、中島美砂子 : 歯内療法領域における再生医療 「歯髄幹細胞を用いた抜髄後歯髄再生治療臨床研究の報告」 日本歯内療法学会 シンポジウム 名古屋 2016年7月24日

#### 平成29年度

- 1) Nakashima M.: Dental pulp regeneration from bench to clinic. Congreso Internacional de Endodoncia. 5th Encuentro Latinoamericano de Investigacion. 2017. Bucaramanga, Columbia. Sept. 2, 2017.
- 2) Nakashima M.: Nerve tissue regeneration by dental pulp stem cells (DPSCs). 10th Conference of African Society of Human Genetics. Cairo, Egypt, Nov. 16, 2017.

#### (2) 受賞

平成28年度

なし

平成29年度

- 1) Iohara K, Fujita M, Ariji Y, Yoshikawa M, Watanabe H, Takashima A, Nakashima M. Assessment of pulp regeneration induced by stem cell therapy by Magnetic Resonance Imaging (MRI). The 2017 Journal of Endodontics Awards Apr. 26, 2017.
- 2) 庵原耕一郎、中島美砂子 : 「Trypsin 前処理による高齢の歯髄再生促進治療法の開発」 第147回日本歯科保存学会秋季学術大会 優秀ポスター賞 2018年6月15日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

平成28年度

##### 1. 特許出願

- 1) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎、渡辺秀人  
発明の名称：歯科用前処理材および歯組織再生キット  
出願日：2016年3月31日  
出願番号：特願 2016-072306

国際出願日：2017年3月31日

国際出願番号：PCT/JP2017/13572

出願人：国立長寿医療研究センター、学校法人愛知医科大学

## 2. 特許取得

### 1) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

発明の名称：間葉系幹細胞を含んでなる根管充填材およびこれを用いた歯組織再生方法

出願日：2011年2月28日

出願番号：特願 2011-042862

登録日：2016年5月27日（国内）

特許証：特許第 5939559 号権利者：国立長寿医療研究センター

### 2) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎、山田和正、島垣昌明、長部真博

発明の名称：膜分取培養器、膜分取培養キット、およびこれを用いた幹細胞分取方法、ならびに分離膜

出願番号：特願 2013-507806

出願日：2012年3月30日

特許取得：2016年10月7日（国内）

特許証：特許第 6016785 号

権利者：国立長寿医療研究センター、東レ株式会社

### 3) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

発明の名称：根管充填材

出願日：2014年6月12日

PCT 出願日：2009年3月12日

出願番号：特願 2014-121165

特許取得：2016年11月4日（国内）

特許証：特許第 6031658 号

権利者：公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

### 4) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎

発明の名称：非抜歯根管充填材および非抜歯による歯組織再生方法

出願日：2010年9月10日

PCT 出願番号：201080040308.9

特許取得：2016年10月12日（中国）

特許証：特許 ZL201080040308.9

権利者：国立長寿医療研究センター

平成29年度

- 1) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎、篠田昌孝  
発明の名称：歯および口腔内付着物の除去促進剤  
出願日：2017年8月7日
- 2) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎  
発明の名称：非抜歯根管充填材および非抜歯による歯組織再生方法  
出願日：2010年9月10日  
CT出願番号：201080040308.9 14/102295  
特許取得：2017年8月8日（米国）  
特許証：特許US 9,724,368
- 3) 発明者：中島美砂子、庵原耕一郎、山田和正、島垣昌明、長部真博  
名称：膜分取培養器、膜分取培養キット、およびこれを用いた幹細胞分取方法、  
ならびに分離膜  
出願日：2011年3月30日  
出願番号：特願2011-075861  
国際出願日：2012年3月30日  
出願番号：PCT/JP2012/058637（WO2012/133803 A1）  
韓国出願移行日：2013年9月17日  
韓国出願番号：2013-7024722  
特許取得日：2017年11月23日（韓国）  
特許登録番号：1802908  
権利者：国立長寿医療研究センター、ネッパジーン株式会社

### 3. 実用新案登録

なし

### 4. その他

なし