

長寿医療研究開発費 2021年度 総括研究報告

再生歯髄および再生歯根膜を伴うインプラント体の開発に関する研究（21-7）

主任研究者 庵原 耕一郎 国立長寿医療研究センター 再生歯科医療研究室（室長）

研究要旨

歯科治療において歯が欠損した場合、入れ歯、ブリッジの治療を行うことが一般的であるが、インプラントは保険治療する場合は様々な条件があるものの、入れ歯よりも咀嚼能力に優れており、健康な歯を削る必要がない、骨が痩せるのを防げるなど様々な利点があるため、一般に治療するようになってきた。インプラント治療は咀嚼を向上させることで低栄養になる事を防ぎ、オーラルフレイルの予防に有効である。一方、歯根膜なしで骨と直接癒着するため、天然歯と違いクッション性がないため対合歯へ負担がかかること、歯根膜の免疫防御機構が働かないため感染に弱いなどの欠点がある。特にインプラント周囲炎が生じた場合、インプラントの脱落だけでなく、骨の吸収がおきることで入れ歯を入れることが出来なくなる可能性もあり、社会問題となりつつある。

これまで私共は、歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療法の開発を行ってきた。この開発を行う中で、抜去歯に歯髄幹細胞を移植した後、顎骨に再植すると、歯髄と共に歯根膜が再生できることを明らかにした。これより今回、この知見を応用して歯根膜を伴うインプラント体を開発し、最終的に臨床応用できるように前臨床研究にて検討する。これにより、通常のインプラント治療で得られる咀嚼能力の向上の効果が長期間維持できると考えられ、最終的に口腔機能崩壊の引き金となるオーラル・フレイルの予防につながることを期待できる。動物実験においては使用動物および使用法に関して動物実験施設のガイドラインに則り、動物実験倫理委員会の承認を得て、動物愛護精神をふまえ、その定める規則に基づき実験を行う。

主任研究者

庵原 耕一郎 国立長寿医療研究センター 再生歯科医療研究室（室長）

分担研究者

Ziauddin SM 国立長寿医療研究センター 再生歯科医療研究室（研究員）

A. 研究目的

一般歯科治療において、歯周病、う蝕および破折等により、歯が欠損した場合、治療選択肢として、入れ歯、ブリッジが挙げられる。インプラントは保険で治療する場合は病院で施術する必要があるなどの様々な条件があるものの、入れ歯よりも咀嚼能力に優れており、健康な歯を削る必要がない、骨が痩せるのを防げるなど様々な利点があるため、一般的に治療するようになってきた。現在国内では 2,500 万人以上が入れ歯を使用し、年間 47 万件的インプラント治療が施されている。インプラント治療は咀嚼を向上させることで低栄養になる事を防ぎ、オーラルフレイルの予防に有効である一面がある。一方、歯根膜なしで骨と直接癒着するため、天然歯と違いクッション性がなく、対合歯へ負担がかかること、天然歯と違い歯根膜の免疫防御機構が働かないため感染に弱いなどの欠点もある。特にインプラント周囲炎が生じた場合インプラントの脱落だけでなく、骨の吸収がおきることを入れ歯を入れることが出来なくなる可能性もあり、社会問題となりつつある。

これまで私共は、深いう蝕や歯髄炎で歯髄を完全に除去した抜髄歯あるいは感染根管歯において、根管内の無菌化技術を併用しつつ、歯髄幹細胞と遊走因子を歯（根管）内に移植することにより、血管新生や神経伸長を促進させ、歯髄・象牙質を再生させ、最終的に歯の機能を蘇らせるという歯髄再生治療法の開発を行ってきた。この中で、イヌ抜去歯をオートクレーブにて不活化し、この歯の内部に歯髄幹細胞を移植した後、イヌの顎骨に再植すると、歯髄が再生されるとともに歯根膜も再生できることを明らかにした（特許番号 6338214 号）。この知見を基に今回、歯根膜を伴うインプラント体の開発を目的として、まずインプラント体に歯根膜細胞および歯髄幹細胞が定着できる最適条件を検討後、インプラント内部に歯髄幹細胞を注入し、これを顎骨に移植することで歯根膜が再生できる「細胞と金属のハイブリッド型インプラント」を開発し、最終的に臨床応用できるかを前臨床研究にて検討する。これまでに、歯根膜が付着したインプラント体は開発されておらず、独創的である。

B. 研究方法

まず、歯根膜細胞および歯髄細胞が定着できるインプラント体の条件を *in vitro* において検討する。次にマウスの皮下に歯髄幹細胞を注入した最適なインプラント体を移植し歯根膜が再生できるかを形態学的、および分子生物学的に検討する。最終的にイヌの顎骨へ歯髄幹細胞を注入したインプラント体を移植し、歯根膜再生の有無とヒトへの応用の可能性を検討する。

2021 度

1. イヌを全身麻酔後、抜歯し、歯を割って歯髄を採取した。採取した歯髄を酵素処理して歯髄幹細胞を分離・培養した。4 代目まで培養後、凍結保存した。また抜歯した歯より歯根膜を採取し、歯髄と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（庵原）。

2. インプラント体にコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンをコーティングし、インプラント外部に歯根膜細胞およびインプラント内部に歯髄細胞が定着できる最もよいそれぞれの条件を走査電子顕微鏡にて検討した。また、各コーティング材の歯根膜細胞、歯髄細胞の増殖能、分化能、遊走能を促進するかを検討した（庵原、Ziauddin）。
3. 現段階での各素材での最適条件でインプラント体をコーティングし、このインプラント体にイヌ歯髄幹細胞を注入後、全身麻酔した SCID マウスの皮下に移植する異所性移植を行った。14 日後にインプラント体を採取し、形態学的解析（Gram 染色および歯根膜の厚み測定）、分子科学的解析（Real-time PCR）を行い、歯根膜が再生できるかを検討した（庵原・Ziauddin）。

（倫理面への配慮）

実験動物に対する動物愛護上の配慮

動物実験においては使用動物および使用法に関して動物実験施設のガイドラインに則り、動物実験倫理委員会の承認を得て、動物愛護精神をふまえ、その定める規則に基づき実験を行う。

C. 研究結果

1. ヒト歯根膜細胞を用いて、サンドブラスト処理をしたインプラントとサンドブラスト処理をしていないインプラントの細胞の接着性を比較したところ、両者に差はほとんど見られなかった。（庵原、Ziauddin）
2. イヌ歯根膜細胞を用いて、最適なコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンコーティングの濃度を検討し、最適な条件が明らかになった。（Ziauddin、庵原）
3. イヌ歯根膜細胞を用いて、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンの増殖能を計測したところ、フィブロネクチンがポジティブコントロールと同程度に歯根膜細胞を増殖させた。コラーゲンもやや細胞を増殖させた。（Ziauddin、庵原）
4. イヌ歯髄細胞を用いて、同様に増殖能を計測したところ、ラミニンが歯髄細胞を増殖させた。また、コラーゲンとフィブロネクチンもポジティブコントロールと同程度に細胞を増殖させた。（Ziauddin、庵原）
5. コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンによるイヌ歯髄細胞の ALPase activity を計測したところコラーゲンとフィブロネクチンは ALPase activity を促進した（Ziauddin、庵原）
6. コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンによるイヌ歯根膜細胞の遊走促進効果を改変 Boyden chamber assay を用いて計測したところ、フィブロネクチンが強く、コラーゲンとラミニンも遊走を促進させた。（Ziauddin、庵原）
7. 2 の条件でインプラント体をコーティングし、このインプラント体にイヌ歯髄幹細胞

を注入後、全身麻酔した SCID マウスの皮下に移植する異所性移植を行い、インプラント周囲に形成された膜状の組織を採取した。この組織を Real-time RT-PCR により解析したところ、歯根膜マーカーの Periostin、PLAP-1 はフィブロネクチンで高い発現がみられた。(庵原、Ziauddin)

8. コーティングしたインプラントおよびコーティングなしのインプラントに歯髄幹細胞を注入したものを SCID マウスに移植したところ、コーティングしたインプラントはコーティングなしのインプラントにくらべて、厚い歯根膜様の組織が形成された。(庵原、Ziauddin)

D. 考察と結論

今回の結果により、通常のインプラントとは違って、歯根膜を誘導する本インプラントでは外部表面にサンドブラストなどの特別な処理を行って、粗面を形成する必要がないと考えられた。また、歯根膜細胞に最適なコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンコーティングの濃度を検討した。今後はこれらの因子の組み合わせを検討していく。

今回の SCID マウスの異所性移植の結果により、再生歯根膜組織の PCR による分子科学的解析や川本法によるインプラント体を含めた凍結切片の作成が可能であることが明らかになった。今後も *in vitro* の検討をもって SCID マウスを使用した *in vivo* での確認を継続していく。さらにより長期にインプラントを移植し観察していく。

条件確定後、このインプラント体にイヌ歯髄幹細胞を注入し、鎮痛後、全身麻酔した犬の顎骨に移植する。28 日後にインプラント体を採取し、形態学的解析（歯根膜の厚み測定、歯髄再生の有無の確認等）、免疫組織学的解析（Periostin）および分子科学的解析（Real-time PCR）を行い、実際に歯根膜が再生できるかを検討する。また、コントロールとして、抜去歯に歯髄幹細胞を注入したものを移植し、同様の解析を行っていく。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Mohammed Zayed, Koichiro Iohara, Hideto Watanabe, Mami Ishikawa, Michiyo Tominaga, Misako Nakashima. Characterization of stable hypoxia-preconditioned dental pulp stem cells compared with mobilized dental pulp stem cells for application for pulp regenerative therapy. Stem Cell Res Ther. 2021 May 29;12(1):302. doi: 10.1186/s13287-021-02240-w

2. 学会発表

1. 国内講演

庵原耕一郎 「歯髄再生治療の最近の進歩」 ITDNインプラントフォーラム
コロナ禍の骨免疫と歯髄幹細胞 2021年12月26日 ハイブリッド開催（東京
&WEB）

2. 国内シンポジウム

- 1) Koichiro Iohara 「Recent Progress of Pulp Regenerative Therapy with Dental Pulp Stem Cells for the Application to the Periapical Disease in the Aged.」
第69回国際歯科研究学会（JADR）日本部会総会・学術大会 シンポジウム
2021年10月25日 ハイブリッド開催（福岡&WEB）
- 2) 庵原耕一郎、大平猛、Ziauddin SM、富永三千代、中島美砂子「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―」 日本マイクロ・ナノバブル学会 第9回学会総会 シンポジウム 2021年12月12日 WEB開催
- 3) 庵原 耕一郎「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」
第21回日本再生医療学会総会 共催学術セミナー WEB開催 2022年3月18日

3. 国際シンポジウム

Koichiro Iohara 「Recent Progress of Pulp Regenerative Therapy with Dental Pulp Stem Cells for the Application to the Periapical Disease in the Aged.」 NCGG—ITRI Joint Symposium 2022 WEB開催 2022年2月14日

4. 国内学会発表

- 1) 庵原耕一郎、Ziauddin SM、富永三千代、中島美砂子「感染根管歯の歯髄再生における根尖孔外除菌の重要性」日本歯科保存学会 2021年度秋季学術大会（第155回）ポスター発表 2021年10月28日 WEB開催
- 2) Ziauddin SM、中島美砂子、富永三千代、庵原耕一郎「イヌ同一個体における乳歯および永久歯歯髄幹細胞自家移植による歯髄再生能の比較」日本歯科保存学会 2021年度秋季学術大会（第155回）ポスター発表 2021年10月28日 WEB開催

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 発明者：庵原耕一郎、中島美砂子
発明の名称：歯科用前処理材及び歯組織再生キット
出願番号：PCT/JP2017/13572

登録日：2020/6/2

登録国：米国

登録番号：10668134

2) 発明者：庵原耕一郎、中島美砂子、渡辺秀人

発明の名称：歯科用前処理材及び歯組織再生キット

出願番号：201780021649.3

国際出願番号：PCT/JP2017/013572

登録日：2021/10/15

登録国：中国

登録番号：ZL201780021649.3

2. 特許申請

発明者：庵原耕一郎、中島美砂子、森川直樹

発明の名称：根管内の微生物の検出キット

出願番号：特願 2022-030106

出願日：2022/2/28

3. 特許申請予定

発明者：庵原耕一郎、Ziauddin SM

発明の名称：再生歯髄・歯根膜を誘導する細胞と金属のハイブリッド型インプラント

3. その他

日本歯科保存学会 優秀論文賞 受賞

歯内療法学分野（松風優秀論文賞）

庵原耕一郎、中島美砂子

「難治性根尖性歯周炎における抗菌ナノパーティクル含有ナノバブル水による根管内除菌効果の検討」

日本歯科保存学雑誌 2020年 第63巻 第1号 p. 73-82