

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 幹細胞再生医療研究部（室長）

研究要旨

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する。この機器を医療機器として使用し、歯・口腔の感染を制御することによりオーラル・フレイルを防止することに貢献できると考えられる。平成28年度はう蝕・感染根管モデルにおける、ナノバブルの薬剤浸透効果、スミア除去効果を検討し、以下のことが判明した。

- 1) 最適なナノバブル発生条件を薬剤浸透効果より決定した。
- 2) ナノバブルの安定性は、7か月目で薬剤浸透性は作製直後と同等であり安定していた。
- 3) ブタ抜去歯に、*Enterococcus faecalis* を感染させ、ナノバブル含有抗生剤を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。
- 4) イヌ感染根管モデルを作製し、ナノバブル含有抗生剤を数回洗浄・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。抗生剤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。

- 5) *in vitro* 根管モデルにおいて、ナノバブル単味で洗浄すると、17%EDTA に匹敵するあるいはそれ以上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 μm での硬さの減少はみられなかった。
- 6) 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。
- 7) 種々の気体にて作成したナノバブルの殺菌効果を、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に殺菌効果が認められた。

1年間で、英文論文4論文、日本語論文2論文、著書0報、学会発表及び講演21件、受賞1件、国内特許取得3件、海外特許取得1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29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、スメア層除去効果および歯垢・バイオフィルム除去効果を検討することを目的とする。次年度には、根管だけでなく、ナノバブルの有用性を歯周疾患モデルにおいても確認する予定である

B. 研究方法

- 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) 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変化を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変化を検討した（庵原）。
- 3) ブタ抜去歯に、GFP ラベルの *Enterococcus faecalis* を感染させ、ナノバブル含有抗生剤を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）。
- 4) イヌ感染根管モデルを作製し、ナノバブル含有抗生剤を洗浄・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）。
- 5) *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5分洗浄し、走査電子顕微鏡にて観察した。コントロールとして、17%EDTAを用いて洗浄した。さらに、根管壁から100 μm でのビッカース硬さを測定した（庵原・中島）。
- 6) 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（庵原・松下）。
- 7) 大腸菌を閉鎖型と開放型ナノバブルと懸濁し、5分間放置後、菌数をATP活性より測定した。また、作製後7か月目のナノバブルを用いて同様の実験を行った（川島）。

（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）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）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

- 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 100 nm 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的変化を 7 か月目まで測定したところ、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、ナノバブル含有抗生剤を 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抗生剤を数回洗浄・貼薬することにより根管内容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 μm での硬さの減少はみられなかった (庵原・中島)。
- 6) う蝕モデルとして、*Streptococcus mutans* の歯垢・バイオフィルムに対して、ナノバブルを 24 時間作用させると完全に除去された (庵原・松下)。
- 7) 種々の気体にて作成したナノバブルの殺菌効果は、特に閉鎖系で作成したナノバブルに殺菌効果が認められた (川島)。

D. 考察

最適なナノバブル発生条件

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、粒径および薬剤浸透性が得られ、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。

根管内容無菌化の検討

イヌ感染根管モデルにおいて、ナノバブルと抗生剤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ることが明らかとなった。

スメア層の除去

抜髄・感染根管治療時の拡大形成時に生じるスメア層は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。また特に感染根管菌では、根管壁象牙細管から内部に深く侵入した細菌の完全除去を妨げる原因になる。一般的には機械的拡大形成後、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。本研究により、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。

歯垢・バイオフィルムの除去

本研究では、根管内細菌、*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、崩壊する結果が得られた。

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) 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。
- 3) ナノバブル含有抗生剤を *Enterococcus faecalis* の感染菌に 5 分間適用すると除菌できた。
- 4) ナノバブル含有抗生剤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。
- 5) 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。
- 6) 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。
- 7) 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)

- 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, Arijji 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

3. 学会発表

- 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: 「マウス歯髓細胞/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: 「ヒト歯髓細胞における 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: 「歯髓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

4. その他

(1) シンポジウム、特別講演

- 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

(2) 受賞

- 1) Iohara K, Fujita M, Arijji 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.

H. 知的財産権の出願・登録状況

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: 歯科用前処理材及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及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：非抜歯根管充填材及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

3. 実用新案登録

なし

4. その他

なし