

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者	藤田将典
論文題目	イヌ感染根管モデルにおける超音波ナノバブル薬剤 導入法を用いた根管内無菌化と歯髄再生

I. 緒言

近年、イヌ前歯を抜髄後に無貼薬の状態の数週間経過した根管内に、コラーゲンを足場として、自己由来歯髄幹細胞と遊走因子を移植することによって、歯髄が再生されることが明らかになった。また、歯髄幹細胞は他の間葉系幹細胞と比べて免疫調整能が高いと報告されている。そこで、申請者らはこれまでに感染根管における歯髄再生について検討するため、イヌ抜髄根管を開放状態にして数週間放置し、口腔内細菌による感染根管を作製した。この感染根管に対し、根管洗浄以外の処置を行わず、自己由来歯髄幹細胞を遊走因子とともに移植しても歯髄組織の再生はみられなかった。一方、FC 貼薬 1 週間後、上記と同様に歯髄幹細胞を移植すると歯髄組織が再生されたが、その再生歯髄には多くの炎症性細胞の浸潤を伴っていた。FC は根管象牙質内に広く浸透するとともに、強力な殺菌作用を有するが、同時に生体に対し組織刺激性、毒性および発がん性が報告されている。したがって、生体に為害性の少ない方法による根管内の無菌化が感染根管における歯髄再生には必須であるといえる。

感染根管では、象牙細管内に最大 1,450 μm の深部まで細菌が侵入すると報告されている。その細菌を除去するため、通法の根管処置では、根管拡大形成、根管清掃・洗浄および根管貼薬が行われている。しかし、通法の感染根管処置のみによる根管の完全な無菌化は非常に困難である。

そこで、申請者らは、ナノバブルと超音波を併用することにより象牙細

管内に薬剤を深く浸透させ、根管内を無菌化できる超音波ナノバブル薬剤導入法を開発した。本研究では安全性が向上した改良ナノバブルを用いて、前回のナノバブルと同等の機能を有することを確認した後、*in vivo* においてイヌ感染根管モデルの無菌化を検討した。そして、超音波ナノバブル薬剤導入法を用いて無菌化した感染根管に、自家の歯髄幹細胞を移植した場合の歯髄再生について検討した。

II. 材料および方法

1. ナノバブルの崩壊試験

水素化大豆レシチンに気体を封入したナノバブルを、使用直前に振盪型ホモジナイザーにて振盪し、開封して得られたナノバブルを使用した。

ナノバブルを5%、10%および20%に希釈し、それぞれの濃度のナノバブルに超音波を照射した。超音波の照射条件は、電圧32Vあるいは60Vで120秒間とした。その後、Dark-light illuminatorを用いてバブルの崩壊の程度を観察した。

2. 超音波およびナノバブルを用いた *in vitro* における根管薬剤浸透試験

抜去したイヌ前歯を#60まで根管拡大形成を行った。次いで、ナノバブルの最終濃度が10%および20%で、かつ、テトラサイクリンの最終濃度が5.0 mg/mlになるように調整した。調整した薬液を根管内に注入し超音波を照射した。照射条件は32Vあるいは60Vで120秒間とした。その後、イヌ

抜去歯を約 300 μm に薄切し、UV 照射下の実体顕微鏡にて観察した。

3. *in vivo* におけるイヌ感染根管モデルの作製

メス 2 歳齢のイヌ前歯を通法どおりに #60 まで根管拡大形成を行い開放状態で 14 日間放置した。その後、釣菌を行い細菌培養検査用培地に浸漬し感染の有無の確認を行うとともに、この細菌培養検査用培地を段階希釈法にてコロニーの数を測定した。釣菌後イヌを屠殺し、歯を含む根尖部歯周組織を一塊として回収後、エックス線撮影を行った。次いで、通法どおりに縦断面の厚さ約 5 μm のパラフィン切片を作製し H-E 染色後、組織病理学的観察を行った。

4. 超音波ナノバブル薬剤導入法を用いた *in vivo* での感染根管無菌化

メス 1 歳齢のイヌを用いて、上顎前歯において前記と同様に感染根管モデルを作製し、術前の釣菌を行った。根管を洗浄後、10% ナノバブルおよび抗菌薬として最終濃度 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ビブラマイシン溶液を根管内に注入し、32V で 120 秒間超音波を照射した。生理食塩水で洗浄後、35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ビブラマイシン溶液を滅菌ペーパーポイントにて根管貼薬し、仮封した。1 週間おきに同様の操作を 4 回目まで行った。1 週間後に自家歯髄細胞移植前の釣菌を行った。釣菌サンプルは段階希釈法にてコロニー数を測定した。

5. イヌ感染根管モデルにおける歯髄再生

前記のメス 1 歳齢のイヌに対して自家移植用の歯髄幹細胞を採取するために、感染根管モデルに用いない上顎犬歯の抜歯を行った。バイオクリー

ンベンチ内で歯髄組織を採取し培養した。70%コンフルエントに達した後に膜遊走分取法にて歯髄幹細胞を分取し、6代目まで継代し凍結保存した。

前記の方法にて処置した感染根管内に前記の自家歯髄幹細胞 5×10^5 個にスキヤホールドのコラーゲン溶液 20 μl と遊走因子 G-CSF 100 $\mu\text{g/ml}$ 1.5 μl を加え根管内に移植した。移植 14 日後にイヌを屠殺し、歯を含む根尖部歯周組織を一塊で回収した後、通法どおり縦断面の厚さ約 5 μm のパラフィン切片を作製し、H-E 染色後に組織病理学的観察を行った。血管新生は血管内皮細胞のレクチンを選択的に免疫染色することにより評価を行った。神経再生は神経細胞突起のマーカーである PGP9.5 を用いた免疫染色にて評価した。また、象牙芽細胞様細胞を評価するために、象牙芽細胞のマーカーである *Dspp* および *Enamelysin* を *in situ hybridization* にて確認した。

III. 結果

1. ナノバブルの崩壊度

20%のナノバブルにおいて、32V ではほとんど崩壊は認められなかったが、60V では、約 95%の崩壊が認められた。5%および 10%ナノバブルにおいて、32V および 60V ではともに約 95%の崩壊が認められた。

2. ナノバブルおよび超音波による根管内薬剤浸透度

ナノバブルを使用しない群では、テトラサイクリンの浸透は象牙質表層のみであった。ナノバブルのみを使用した群では、10%および 20%ともに約 750 μm の深部まで薬剤が浸透していた。ナノバブルと超音波併用群では、

約 1,000 μm まで薬剤が浸透していた。最も薬剤の浸透が良好だった条件は、ナノバブル濃度が 10%で、かつ超音波の電圧が 32V のときで、約 1,200 μm まで浸透した。

3. 作製した感染根管モデルの特徴

イヌの前歯を抜髄後 14 日間根管開放することにより作製した感染根管モデルでは、エックス線検査において根尖部に透過像が認められた。H-E 染色像においては、歯槽骨の吸収、根尖部歯周組織の破壊および炎症性細胞の浸潤が観察された。根管内細菌を細菌培養検査用培地で観察すると 14 日間根管開放後では培地が陽性を示し、細菌数は 10^6 cfu/ml であった。

4. 超音波ナノバブル薬剤導入法を用いた *in vivo* での感染根管無菌化

イヌ感染根管モデルにおいて、超音波ナノバブル薬剤導入法を 1 週間ごとに行ったところ、1 回目の適用前の細菌数は 10^7 cfu/ml であったが、2 回目の適用前には 10^3 cfu/ml に減少し、3 回目の適用前には 10 cfu/ml にまで減少した。4 回目以降の適用前の細菌数は検出限界以下に達した。一方、コントロール群では、検出限界以下には達しなかった。併用群とコントロール群の細菌数を比較すると 3 回目の適用前以降において、有意差を認めた。

5. 超音波ナノバブル薬剤導入法によるイヌ感染根管無菌化後の歯髄再生

イヌ感染根管モデルを用いて、超音波ナノバブル導入法にて無菌化した後、根管内に自家歯髄幹細胞を遊走因子とともに移植すると、2 週間後に

において歯髄組織の再生および根尖部歯周組織の治癒が観察された。根管壁には象牙芽細胞様細胞が観察され、象牙芽細胞マーカーの発現が認められた。また、再生歯髄組織内には、神経細胞突起の伸長および血管の新生が観察された。一方、貼薬のみで処理し細菌が検出された感染根管内に、超音波ナノバブル併用群と同様の移植条件で移植した場合には、歯髄組織の再生はほとんど認められなかった。

IV. 考察

感染根管治療の予後不良の原因の多くは、根管内に残存した細菌であるが、根管内の無菌化は歯髄再生にも影響すると考えられる。申請者らは、これまでにスフィンゴミエリンを材料とするナノバブルを用いて、*in vitro*で根管細菌が有意に減少することを明らかにした。しかし、本法を臨床応用する際には、安全性と安定性に優れたナノバブルが必要である。したがって、より安全性の高い水素化大豆レシチンを材料にした新規ナノバブルを作製して実験に使用した。

ナノバブルの崩壊実験において、ナノバブル濃度 20%では 60V、5%および 10%では 32V あるいは 60V にて、90%以上のナノバブルが崩壊した。この結果はナノバブル濃度が 10%を超えるとバブルの密度が高まり、崩壊に多くのエネルギーが必要になるためと考えられる。また、薬剤の浸透実験では、10%、32V において象牙質壁から約 1,200 μm の深部までテトラサイクリンの浸透がみられ、20%で 32V あるいは 60V、10%で 60V においては

約 1,000 μm の薬剤浸透が認められた。これはナノバブル濃度が 10% より高いとナノバブルの崩壊が起こりにくくなり、一方、それよりも低いとキャビテーション効果が低下するため薬剤の浸透性が低下すると考えられる。

次に、感染根管モデルを用いて超音波ナノバブル薬剤導入法による無菌化を検討した。超音波とナノバブルを併用して薬剤を 3 回導入後 1 週間後では、細菌数は検出限界以下になった。よって、本実験で用いた超音波ナノバブル薬剤導入法は、感染根管の無菌化に有効であると考えられる。

また、歯髄幹細胞移植の実験において、超音波ナノバブル薬剤導入法により細菌数が検出限界以下に達した根管では、再生歯髄組織がみられ、貼薬のみの根管では歯髄様組織は確認できず、根尖部歯周組織に炎症像を認めた。したがって、感染根管内で歯髄再生を成功させるには、超音波ナノバブル薬剤導入法により根管内が無菌化・無毒化され、根尖部歯周組織の炎症が消退することが重要であると考えられる。

V. 結論

以上のことより、超音波ナノバブル薬剤導入法は、感染根管を確実に無菌化できることから、根尖性歯周炎の治療のみならず感染根管に対する歯髄幹細胞の自家移植による歯髄再生治療法にも有用となる可能性が示唆された。