

松永常典 論文内容の要旨

主 論 文

Chitosan monomer promotes tissue regeneration on dental pulp wounds

キトサンモノマーによる歯髄創傷における組織再生の促進

松永常典, 柳口嘉治郎, 山田志津香, 大原直子, 池田 毅, 林 善彦

Journal of Biomedical Materials Research, 76(4):711-720, 2006

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻
(主任指導教員: 林 善彦 教授)

緒 言

キチンは、カニやエビの外骨格に主に存在し、N-アセチル-D-グルコサミンを基本構成単位とする高分子である。キトサンは、キチンを脱アセチル化処理して得られる。

キトサンは医学および歯学領域において効果的な薬剤として使用されている。組織学的所見から、キトサンは多核白血球やマクロファージの遊走を誘発し、脈管形成、細胞外基質と肉芽組織形成を促進することが示されている。

今回、直接覆髄剤としてのキトサンモノマーの有効性を検討した。

対象と方法

はじめに、ヒト骨肉腫由来の培養骨芽細胞 (NOS-1) を、直径 100mm 培養皿に 1×10^6 cells 播種し、濃度の異なるキトサンモノマー添加培地と無添加の培地で 3 日間培養後、*p*-ニトロフェニルリン酸を基質として ALP 活性を測定した。

また、ALP mRNA の発現を検討するため、上述したように NOS-1 細胞を播種し、0.005%キトサンモノマー添加培地と無添加の培地で NOS-1 細胞を 3 日間培養後、通常に従い RNA を分離し、PCR を行った。

次に、BMP-2 mRNA の発現を検討するため、NOS-1 細胞を播種し、0.005%キトサンモノマー添加培地と無添加の培地で NOS-1 細胞を 1 週間培養後、RNA を分離し、RT-PCR ののち電気泳動を行った。

さらに、ヒト歯髄細胞を 24 穴培養皿に 5×10^4 cells 播種し、3 日間培養後、濃度 $500 \mu\text{g/ml}$ のキトサンモノマー、ポリマー添加溶液および無添加の溶液で 1 日反応させ、細胞を回収ののち cell lysate とし、細胞溶解質中のサイトカインの検出を行った。

In vivo での実験として、6 週齢のウイスター系雄性ラットに、腹腔内麻酔下を施し、皮膚骨膜弁を開き下顎骨を一部露出させ、スチールラウンドバーを用いて窩洞を形成し(Fig.1)、切歯に到達後、歯髄近くまで象牙質を削合したのち、鋭利な探針で小さな露髄部を形成した。露髄部を十分に洗浄・止血後、キトサンモノマー粉末を、滅菌生食水を用い筆ずみ法で露髄部に貼付し、窩洞をガラスアイオノマーセメントで仮封し、骨膜弁を元の位置に戻し皮膚縫合を行った。術後 0, 1, 3, 5 および 7 日後、腹腔内麻酔下で灌流固定を行い、窩洞部を含む下顎切歯を摘出し、歯髄創傷治癒過程を観察した。

結 果

ALP 活性測定より、0.005%キトサンモノマー添加群と無添加群との間に統計学的有意差が認められた。

また、PCR の結果、キトサンモノマー添加群において ALP mRNA の発現増加が見られた。

RT-PCR ののち電気泳動を行った結果、キトサンモノマー添加群において BMP-2 mRNA の発現増加が見られた(Fig.2)。

ヒト歯髄細胞におけるサイトカイン検出より、IL-8 および TNF- α , interferon- γ , inducible protein 10, IL-6 soluble receptor, macrophage inflammatory protein 1 β が検出された(Fig.3)。IL-8 に関して、キトサンモノマーの反応はキトサンポリマーおよびコントロールと比較して弱く、キトサンモノマーにおけるその産生の抑制が認められた。

ラットの切歯へのキトサンモノマー直接覆髄直後、窩洞内は貼付したキトサンモノマーによって満たされ、それに接した露髄部に少量の変性した組織が観察された。術後 1 日目、露髄部表層に好中球がわずかに散在しており、術直後と比較し、変性した組織の拡大は認めなかった。術後 3 日目、貼付したキトサンモノマーはほぼ消失し、窩洞内は結合組織で満たされ、炎症性細胞の浸潤も見られなかった(Fig.4)。術後 5 日目、線維芽細胞の顕著な増殖が見られ、結合組織内に石灰化物の形成も観察された(Fig.5)。術後 7 日目、線維芽細胞の増殖が進行し石灰化物も増大していた。

考 察

キトサンモノマーを直接覆髄に応用した場合、IL-8 の産生を抑制し、線維芽細胞の増殖を伴う迅速な創傷治癒を誘発することが明らかとなった。従って、キトサンモノマーは、初期の炎症反応を最小限に抑え、理想的な組織再生を生ずる素材であることが考えられる。