

機関番号：32665

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592241

研究課題名 (和文) 直接覆髄剤に関する基礎的研究

研究課題名 (英文) Basic Study of Direct Pulp Capping Materials

研究代表者

林 誠 (HAYASHI MAKOTO)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：00301557

研究成果の概要 (和文)：歯の神経には多くの役割があり、神経を取ったときの最大の問題は歯が折れやすくなることである。そのため、できるだけ神経を取らないように治療することは非常に重要である。本研究は齶蝕や外傷によって露出した神経を保護する新規材料の開発に関するものである。今回、5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -4-ribofuranoside、Titanium Medical Apatite、Calcium Phosphate Cement などの各種材料が、歯髄保護材として使用できるかどうかを細胞や実験動物を使用して基礎的に評価したところ、条件によっては高い生体親和性と分化の促進が認められた。

研究成果の概要 (英文)：Dental pulp has many important roles, and the most severe problem of removing it would be tooth fracture. Therefore, dental treatment to preserve dental pulp is very important for dentists. The aim of this study is to develop new materials for direct pulp capping (i.e., treatment for protection of dental pulp). Five-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -4-ribofuranoside (AICAR), Titanium Medical Apatite (TMA), Calcium Phosphate Cement (CPC) were used to evaluate the possibility of being direct pulp capping materials in this study. Results indicated high biocompatibility and promotion of differentiation in some experimental conditions.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：直接覆髄剤、歯髄細胞、硬組織形成、細胞増殖、アルカリフォスファターゼ

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 齶蝕や外傷が原因で歯髄組織を除去する治療法は、歯科臨床において一般的に行われている。しかしながら、歯髄保存の直接的意義としては感覚の保持、持続的な象牙質形成ならびに外来刺激に対する防御・免疫機能

の発現があり、間接的意義には破折防止歯や歯冠修復物の軽減化などが上げられ、歯科医療従事者はできるだけ歯髄の保存に努力をし、その意義を常に認識して治療を行うことは重要である。

(2) 歯髄保存療法の一つである直接覆髄法

は、非感染性で露出した歯髄（露髄）を薬剤で創面を保護することにより治癒を図る方法である。従来から水酸化カルシウム製剤が第一選択として臨床応用されてきたが、硬組織形成が認められる反面、辺縁漏洩性、溶解性、修復象牙質内のトンネル状欠損など、その有用性に対してはいくつかの問題点が報告されている。そのため上記の具備条件を満たした理想的な直接覆髄剤の開発が望まれている。

(3) そこで申請者は1990年代に米国ロマリンダ大学歯学部の特ラbinejadらにより開発された根管用セメント Mineral Trioxide Aggregate (MTA) が高い生体親和性と辺縁封鎖性を持つことから、直接覆髄剤としての有用性についてヒト歯髄細胞や実験動物を使用した基礎的研究を行ってきた。その結果、MTAは水酸化カルシウム製材と比較し、優れた硬組織形成作用と高い細胞遊走能ならびに細胞増殖能があることを報告してきた。

## 2. 研究の目的

今回、申請者はこれらの研究成果と手技を踏まえ、硬組織形成に深く関与すると知られている各種剤（材）料に着目し、歯髄細胞の硬組織形成にも作用すると考え、直接覆髄剤としての有用性を検討するために基礎的研究を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用した細胞と実験動物

#### ① 歯髄細胞

日本大学歯学部附属歯科病院にて治療を目的として抜去された齶蝕の認められない第三大臼歯3本より採取した。なお、本研究は本学歯学部倫理委員会の承認下で実施され、患者には抜去歯の歯髄組織が本研究に用いられることをあらかじめ説明し、同意を得ている。抜去歯はただちに分割し、無菌条件下で歯髄を取りだして外科用メスで約1 mm<sup>3</sup>片に細断した。その歯髄組織片を6穴プレートの底面に置き、カバースリップで固定後、10%ウシ胎児血清、1%PSN（ペニシリン/ストレプトマイシン/ネオマイシン溶液）を含む $\alpha$ -minimum essential mediumで37℃、5%CO<sub>2</sub>、95% airの条件下で培養を行った。約2週間培養を継続し、細胞がコンフルエントに達したことを確認した後、トリプシン/EDTAにて細胞を分散し、継代培養を行った。なお本研究には4~8継代目の細胞を実験に供した。

#### ② 骨芽細胞

上記条件下でラット骨肉腫由来の株化骨芽細胞（ROS17/2.8）を培養した。

### ③ 実験動物

Wistar系雄性ラットと日本白色種ウサギ（日本大学歯学部動物実験委員会の承認下にて実施）

#### (2) 供試材料

硬組織形成に関与すると思われる下記の材料を使用した。

#### ① 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- $\beta$ -D-ribofuranoside (AICAR) :

Adenosine monophosphate-activated protein kinaseの活性化を誘導し、骨芽細胞の分化に関与すると知られている。

#### ② Titanium Medical Apatite (TMA) :

機械的強度が高く、容易に切削加工ができる新規合成アパタイトの真空焼結体である。

#### ③ Calcium Phosphate Cement (CPC) :

整形外科領域で骨補填材として使用されている自己硬化性リン酸カルシウムセメントである。

### (3) 実験方法

#### ① 細胞増殖測定

供試材料の歯髄細胞と骨芽細胞の増殖に及ぼす影響についてはCell Counting Kit-8を用いて測定した。供試材料を添加して培養5、9、13および17日後にテトラゾリウム塩であるWST-8を各ウェルに10 $\mu$ l添加し、60分間培養後、細胞内脱水素酵素によってWST-8が還元されることにより生成する水溶性ホルマザンの450nmにおける吸光度をマルチプレートリーダーで測定した。その後、あらかじめ作製した検量線をもとに、測定された吸光度から細胞数を決定した。なお、検量線は歯髄細胞を血球計算板であらかじめ計数した細胞浮遊液を段階希釈し、96ウェルプレートの各ウェル内に分注してCell Counting Kit-8にて発色後、450nmにおける吸光度を測定することにより作製した。

#### ② アルカリフォスファターゼ活性測定

供試材料の歯髄細胞と骨芽細胞の分化に及ぼす影響については、ALP活性値を測定した。*p*-ニトロフェニルリン酸を基質とした時に酵素反応の結果生じる*p*-ニトロフェノールを測定することによりALP活性値を決定した。すなわち細胞増殖の測定と同様な培養期間において、PBSで洗浄後8mM *p*-ニトロフェニルリン酸、10mM MgCl<sub>2</sub>および

0.1mM ZnSO<sub>4</sub> 含有の 50mM glycine-NaOH buffer を 100μl 添加し, 30 分間インキュベートした。生成された *p*-ニトロフェノールの 405nm における吸光度をマルチプレートリーダーで測定し, あらかじめ作製した検量線をもとに 10<sup>6</sup> 細胞あたりの ALP 活性値を算出した。

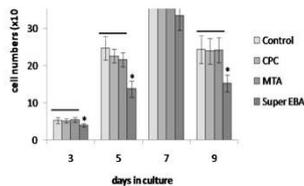
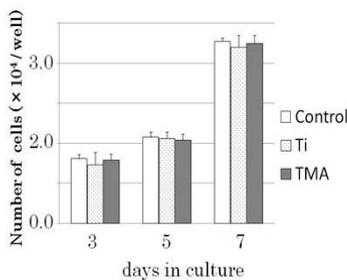
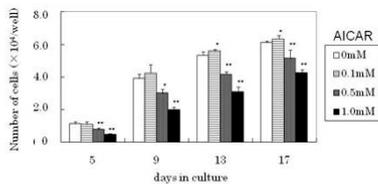
### ③ 実験動物への埋入実験

ペントバルビタールによる全身麻酔を施した Wistar 系雄性ラットの背骨を中心として左右の皮下組織にポケットを形成し, CPC を填塞した。ウサギでは下顎骨の骨膜まで達する切開を行い, 骨バーにて窩洞を形成して TMA を充填した。各期間飼育後, 麻酔薬過剰投与により安楽死させ, 充填部位を含んだ周囲組織を摘出し, 通法に従って HE 染色を行い組織形態学的解析を行った。

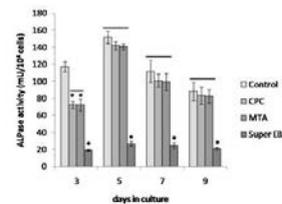
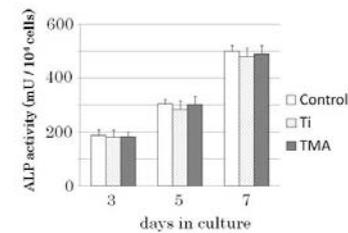
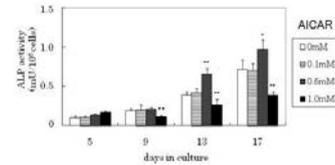
## 4. 研究成果

### ① 細胞増殖測定

歯髄細胞と骨芽細胞はセルカルチャーインサートを使用して供試材料と共培養を行うと, 経時的に細胞数を増加させ, 何も設置しなかったコントロールと同様な傾向が認められた。

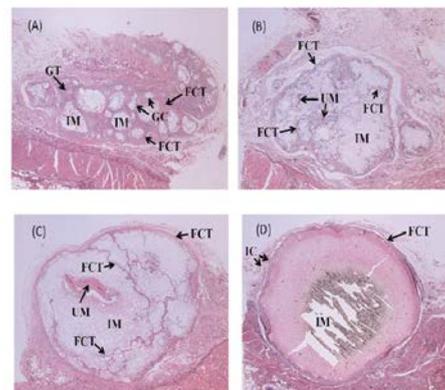


② アルカリフォスファターゼ活性測定  
細胞増殖測定と同様な培養条件下で, アルカリフォスファターゼ活性値は供試材料群とコントロール群とに大きな差はなかったが, AICAR に関しては濃度によってコントロール群より有意に高かった。



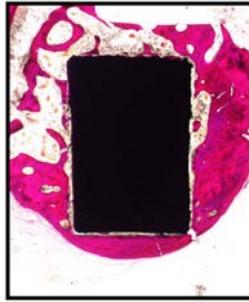
### ③ 実験動物への埋入実験

CPC の皮下組織への埋入によって下図のように明らかな炎症像は認められなかった。また, CPC の構成材料の比率を変化させることによって, 吸収程度に変化が認められた。



Histopathological features of CPC and FA-CPCs. (A) CPC, (B) FA-CPC1, (C) FA-CPC2, and (D) FA-CPC3. Implanted material (IM), Fibrous Connective Tissue (FCT), Giant Cell (GC), Granulation Cell (GT), Undecalcified Material (UM), and Infiltrated Cell (IC).

TMA の顎骨への埋入によって下図のように明らかな炎症像は認められなかった。



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① S. Takagi, S. Frukhtbeyn, L.C. Chow, A. Sugawara, K. Fujikawa, H. Ogata, M. Hayashi and B. Ogiso : In vitro and in vivo characteristics of fluorapatite-forming calcium phosphate cements, *J Res Natl Inst Stand Technol*, 査読有, 115 (4), 267-276, 2010.
- ② M. Hayashi, C. Kobayashi, H. Ogata, M. Yamaoka and B. Ogiso : A no-contact vibration device for measuring implant stability, *Clin Oral Implants Res*, 査読有, 21 (9), 931-936, 2010.
- ③ 林 誠、田村賢一、小森規雄、小木曾文内、藤田龍之、森崎百合子 : Titanium Medical Apatite (TMA) 真空焼結体が骨芽細胞に及ぼす影響、日大歯学、査読有、第 8 4 卷 3 号、9 3 - 9 6、2 0 1 0 .
- ④ 尾形英大、林 誠、津田啓方、鈴木直人、小木曾文内 : 5-Aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-4-ribofuranoside (AICAR) が培養ヒト歯髓由来細胞に及ぼす影響、日大歯学、査読有、第 8 4 卷 3 号、8 1 - 8 4、2 0 1 0 .

[学会発表] (計 11 件)

- ① H. Ogata, S. Takagi, M. Hayashi, B. Ogiso and L.C. Chow: Properties of Fluorapatite-forming Calcium Phosphate Cements, 89<sup>th</sup> General session & Exhibition of the IADR, March 16-19, San Diego, CA, USA, 2011.
- ② A. Sugawara, K. Fujikawa, M. Hayashi, H. Ogata, S. Iwata, B. Ogiso, S. Takagi, and L.C. Chow: In vivo characteristics of fluorapatite-forming CPCs for bone defect repair, 89<sup>th</sup> General session & Exhibition of the

IADR, March 16-19, San Diego, CA, USA, 2011.

- ③ K. Fujikawa, A. Sugawara, M. Hayashi, H. Ogata, B. Ogiso, M. Oki, S. Takagi, and L.C. Chow: In-vivo characteristics of fluorapatite-forming CPC when implanted in subcutaneous tissues, 89<sup>th</sup> General session & Exhibition of the IADR, March 16-19, San Diego, CA, USA, 2011.
- ④ M. Hayashi, C. Kobayashi, M. Yamaoka, T. Saito and B. Ogiso: Effect of implant's mass on measurement of mechanical parameters analyzed by a no-contact electromagnetic vibration device, World Congress for Oral Implantology 8, November 20-22, New Delhi, India, 2010.
- ⑤ C. Kobayashi, M. Hayashi, M. Yamaoka and B. Ogiso : Assessing qualitative changes in periodontal ligament using no-contact vibration device, 88<sup>th</sup> General session & Exhibition of the IADR, July 14-17, Barcelona, Spain, 2010.
- ⑥ H. Ogata, M. Hayashi, H. Tsuda, N. Suzuki, A. Sugawara, S. Takagi, L.C. Chow, M. Maeno and B. Ogiso: Comparative studies of P-CPC and conventional endodontic cements on mineralization, 39<sup>th</sup> Meeting of the AADR, March 3-6, Washington DC, USA, 2010.
- ⑦ K. Fujikawa, A. Sugawara, H. Ogata, M. Hayashi, S. Hirayama, K. Sakai, K. Inoue, S. Takagi, L.C. Chow: Histopathological study of dual-paste premixed CPC used for bone defect, 39<sup>th</sup> Meeting of the AADR, March 3-6, Washington DC, USA, 2010.
- ⑧ A. Sugawara, K. Fujikawa, M. Hayashi, H. Ogata, M. Oki, B. Ogiso, S. Takagi, L.C. Chow: Histopathological and x-ray micro-CT studies of premixed CPC for bone-graft, The 39<sup>th</sup> Meeting of the AADR, March 3-6, Washington DC, USA, 2010.
- ⑨ 尾形英大、林 誠、津田啓方、鈴木直人、菅原明喜、高木章三、Laurence C. CHOW、小木曾文内 : リン酸カルシウムセメントは骨芽細胞に対して生体親和性を有する、日本歯科保存学会、第 1 3 0 回春季学術大会、2 0 0 9 年 6 月 1 2 日、札幌コンベンションセンター(札幌).
- ⑩ 尾形英大、林 誠、津田啓方、鈴木直人、菅原明喜、高木章三、Laurence C. CHOW、小木曾文内 : 自己硬化性リン酸

カルシウムの骨芽細胞に対する生体親和性について、第61回日本大学歯学会総会・学術大会、2009年5月16日、日本大学歯学部・大講堂（東京）。

- ⑪ M. Hayashi, H. Ogata, N. Suzuki, N. Komori, O. Takeichi, K. Tamura, Y. Morisaki, B. Ogiso and T. Fujita: Biocompatibility of novel vacuum sintered bodies of titanium medical apatite, 86<sup>th</sup> General session & Exhibition of the IADR, July 2-5, Toronto, Canada, 2008.

〔図書〕（計1件）

- ① M. Hayashi, K. Tamura, N. Komori, B. Ogiso, T. Fujita and Y. Morisaki : The biocompatibility of novel apatite chemically bonded with titanium dioxide as potential bone substitute, WCOI Year Book 2010, Edited by World Congress for Oral Implantology, Editorial Committee, 35-39, 2010.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 誠 (HAYASHI MAKOTO)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：00301557

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし