

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592242

研究課題名（和文）自己硬化型リン酸カルシウムセメントの根管封鎖材料への応用

研究課題名（英文）Application of Self-hardening Calcium Phosphate Cement for Repair of Endodontic Perforation.

研究代表者

平山 聡司（HIRAYAMA SATOSHI）

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号：70189869

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、歯内療法処置中に生じるトラブルの一つである根管穿孔の封鎖材料として自己硬化型リン酸カルシウムセメント（CPC）が臨床使用可能な材料であることを評価することにある。穿孔部封鎖材として有用なMTAと比較したCPCの工学的特性と、ヒト歯髄培養細胞を用いて各種封鎖材における細胞増殖能や石灰化誘導能について実験を行った。その結果、MTAに比べ工学的特性はやや劣るものの根管穿孔部封鎖材として臨床応用可能であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to evaluate the properties of self-hardening calcium phosphate cement (CPC) for the repair of endodontic perforation. As comparison between CPC and mineral trioxide aggregate (MTA), the mechanical properties, the cell viability and induction of remineralization using human dental pulp cell were investigated. The results of this study suggested that CPC had a possibility of clinical application of repair material for endodontic perforation, though less mechanical properties compared with MTA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：自己硬化型リン酸カルシウムセメント・根管穿孔・封鎖材料

1. 研究開始当初の背景

歯科保存領域の中でも根管治療の成否は、歯の保存に大きな影響を与える。特に根管の湾曲や狭搾により根管拡大が困難を極める部位においては、しばしば偶発的に根管穿孔を認め、歯根あるいは歯の抜去に至ることがある。このような穿孔部の修復には、根管と根

周囲組織とを封鎖・遮断するために古くからアマルガムが用いられてきた。しかし、アマルガムは象牙質と接着しないため、周囲歯周組織からの組織液の侵入があり、またアマルガムから溶出する水銀などによる組織刺激性が懸念され、良好な封鎖を長期間得ること

は困難であった。その他、強化型酸化亜鉛ユー
ージノールセメント、グラスアイオノマーセ
メントおよび接着性レジンなどの充填材料
で封鎖を試みた場合、穿孔部の止血や乾燥が
十分に出来ないケースが多く、そのために強
固な接着が得られないことによる脱落や歯
周組織に対する強度の炎症性反応が生じる
ことが多かった。そのため、処置直後では予
後良好でも長期間経過すると再度同様のト
ラブルを生じるため、これらの材料も永久的
な封鎖材とはなり得ないのが現状であった。

一方で近年、Mineral Trioxide Aggregate
(MTA, ProRoot®)のような三シリケートカ
ルシウムなどを主成分とする根管系封鎖材
料が話題になっており、良好な臨床成績が報
告されている。しかし、MTAは硬化時間が長
く、血液や体液に富む部位では材料の溶解や
流失が懸念される。さらに、歯牙硬組織と同
様の組成を持ち、生体親和性という観点から
各種リン酸カルシウムも応用されてきたが、
良好な生体親和性を有する一方で、硬化に長
時間を要し、生体内で不飽和なため溶解によ
る体積の損失が生じ象牙質との封鎖能に劣る
ものが多い。しかし、数多くあるリン酸カル
シウムの組み合わせの中でも、四リン酸カル
シウム (TTCP) と二リン酸カルシウム (DCPA)
の等モル比混和物であるリン酸カルシウム
セメント (CPC) は、水との練和により短時
間のうちにハイドロキシアパタイト (HA) に
転化して硬化し、最終的に骨硬組織に置換す
ることが報告されている骨補填材である。さ
らに近年、CPCに改良が加えられ、パテ状や
ペースト状にすることができ、細部への充填
も可能となり、血液等の流入に対して抗溶出
性を示すなど応用範囲が拡大された。これに
よって簡単な臨床術式で使用ができるよう
になった。しかし、CPCの最大の特徴は、TTC
PとDCPAが生体内で反応することによって生

成されるHA結晶の析出が起こり、経時的に歯
に含まれるHAと連続して結晶成長すること
によって結合するため、HAを主要構成成分と
する歯質の再生や再石灰化等など、多くの分
野に応用が可能であることである。したがっ
て、CPCを応用することにより、今まで解決
し得なかった歯科臨床上のトラブルが解決
し得る可能性があると考えられる。すなわち、
根管穿孔部封鎖材としての所要条件のうち、
CPC硬化体は根管内の象牙質と結合した状態
でHA結晶が成長するため、緊密な封鎖性が可
能であり、歯周組織に対しても極めて良好な
生体親和性を示すと考えられる。さらに分散
媒の組合せを変えることにより、組織液に対
する抗溶出性を持つペースト状を呈するよ
うにできるため、細部への充填が容易になる
ことも根管穿孔部封鎖材としての利点にあ
げられる。したがって、本研究の結果からCP
Cが根管穿孔部の封鎖材料として永久的な治
療材料として有用であることが明らかになる
ことが予想され、臨床で使用できることが
期待される。

2. 研究の目的

歯科保存領域で临床上遭遇する根管穿孔
部の封鎖材料として臨床使用に当たっての
CPCの有用性を明らかにすることを目的に従
来使用されてきた他の封鎖材と比較して以
下の検討を行った。

- (1) 各種根管穿孔部封鎖材の硬化時間、圧縮強
さなどの理工学的諸特性の測定を行った。
- (2) 各種穿孔封鎖材料の生体親和性と石灰化
誘導能について、ヒト歯髓由来培養細胞を用
いて細胞増殖能、ALP活性およびオステオカ
ルシン産生量の測定について実験を行った。
- (3) 根管穿孔部に対する各種封鎖材を応用し
た場合の歯根周囲組織の反応を病理組織学的
に検討した。

3. 研究の方法

(1) 穿孔部封鎖材料の機械的特性に関する研究

①TTCPの作製はBrownらの方法によって行った。

②機械的特性に関する実験においては、CPCとポルトランドセメントの練和液として蒸留水を使用した。対照としてMineral Trioxide Aggregate (以下MTA, ProROOT®, Dentsply)を使用した。

③実験試料の作製：実験試料としてCPC (C10)、CPCにポルトランドセメント (以下P)を10wt%、20wt%混和したもの(それぞれC90/P10およびC80/P20と略す)およびMTAを用いた。

④硬化時間の測定：各試料を粉液比4.0で練和した後、ステンレ製スモールド (直径6mm、高さ3mm)に充填、上下をガラス板で圧接し、37°C相対湿度100%湿箱中に保管した。保管後、3～5分毎に取り出してギルモア針法により硬化時間を測定した。

⑤ダイヤモンド圧縮強さ(DTS)の測定：DTS試料の作製はChowらの方法に準じて行い、練和開始24時間のDTSは万能試験機を用いてクロスヘッドスピード10mm/分で測定した。

(2) 各種穿孔部封鎖材がヒト歯髄培養細胞の硬組織形成能に及ぼす影響に関する研究

①細胞培養：日本大学松戸歯学部附属病院に来院した20歳の患者から理解と同意を得た後、矯正学的理由で抜去された下顎第三大臼歯の歯髄 (日本大学松戸歯学部倫理委員会承認番号：EC03-025号)をSomermanらの方法に従ってout growthさせ、3～6代継代させた細胞をヒト歯髄培養細胞として用いた。

②封鎖材料の調整：実験には、HY Bond グラスアイオノマーCX(GI群、松風)、Super-Bond C&B (SB群、サンメディカル)、MTA (MTA群、デンツプライ三金) およびCPC (CPC群、Stry

ker)も用いた。GI群とSB群はメーカー指示通りに練和し、MTA群とCPC群は滅菌精製水にて練和後、約1mgを35mm培養ディッシュの中央に静地させ、37°CのCO₂インキュベーター中に24時間硬化後、ヒト歯髄培養細胞を1×10⁵個/dishになるよう播種した。封鎖材料を作用させず培養を行った細胞をコントロール群とした。3日ごとに培養液の交換を行い、最大24日間培養を行った。

③細胞増殖試験：ヒト歯髄培養細胞を96穴プレートに1%FCS添加α-MEM培地を用いて1.0×10⁴個/well播種し、24時間培養を行った。その後、②で行った各種封鎖材料に1%FCS添加α-MEM培地のみを1.0ml、24時間作用させ、その培地を原液(1mg/ml)とし、10(0.1mg/ml)、100(0.01mg/ml)および、1000(0.001mg/ml)倍希釈させたものをヒト歯髄培養細胞に作用させ、24、48および72時間後の細胞数の変動をCell counter kit (同人化学社製)を用いてメーカー指示通りに実験を行い、マイクロプレートリーダー(MTP-30, CORONA ELECTRIC社製)にて波長450nmにおける吸光度の測定を行った。各測定におけるコントロール群の吸光度を100%とし、各試料の細胞増殖について比較検討を行った。

④アルカリフォファターゼ(ALP)活性の測定：②で設定した条件の各試料を静地させた35mm細胞培養ディッシュにヒト歯髄培養細胞を10%FCS添加α-MEM培地を用いて1.0×10⁵個/well播種し、6日目から24日目の細胞に対してALP活性の測定を行った。100mmol/lのglycine-NaOH buffer(pH 10.5)を基質として8μmol/p-nitrophenylphosphateを加え、37°Cで30分インキュベーションし、100mmol/l水酸化ナトリウムを加え反応を停止させ、波長415nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定を行った。

⑤オステオカルシン産生量の測定：④と同様

にして調整した18日目の細胞に対して、Instant OCN ELISA kit (Bender MedSystems社製)にてメーカー指示通りに測定を行い、波長450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定を行った。

⑥統計処理：得られた結果は、Studentのt検定($p < 0.01$)により統計学的に検定を行った。

(3)根管穿孔部に対する各種封鎖材を応用した場合の歯根周囲組織の病理組織学的検討：

①ビーグル成犬を3匹使用し、下顎の前臼歯および後臼歯を用いた。ネンプタールによる全身麻酔を施し、エアータービンおよびラウンドバーにて抜髄を施した後、通報に従って手用K型ファイルで#30～#80まで拡大し、拡大サイズと同じサイズのガッタパーチャーポイントとキャナルスを併用して根管充填を行った。

②髓床底部をエアータービンに付けたラウンド型ダイヤモンドポイントで穿孔させ、右側は、穿孔部を生理食塩水で洗浄し、止血して直ちに各種封鎖材を塗布した。その後、テンポラリーストッピングで裏層したのちグラスアイオノマーセメントで仮封を行った。左側は、穿孔部をそのままにしてテンポラリーストッピングで裏層したのちグラスアイオノマーセメントで仮封を行い、1ヵ月経過後に穿孔部を生理食塩水で洗浄し、各種封鎖材を塗布した。その後、テンポラリーストッピングで裏層したのちグラスアイオノマーセメントで仮封を行った。

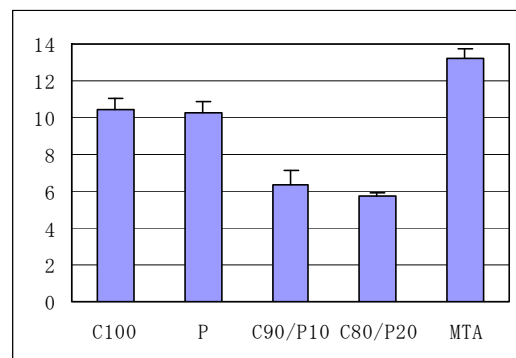
③封鎖材塗布後、1、3および6ヵ月後にネンプタールの過剰投与によって安楽死させ、歯牙を含む顎骨を切り出して各封鎖材を半切して脱灰および未脱灰標本をそれぞれ作製し、根管穿孔部の封鎖性と封鎖材料の生体親和性について病理組織学的に検討する。

4. 研究成果

(1)穿孔部封鎖材料の機械的特性に関する研究結果

①硬化時間の測定結果：ギルモア針法による硬化時間は、CPC (C100)で 61 ± 3 分、C90-P10で 45 ± 2 分、C80-P20で 57 ± 4 分でポルトランドセメントの含有量が増加すると硬化時間が延長することが明らかとなった。

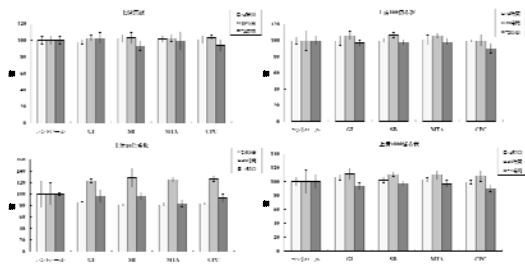
②ダイアメトラル圧縮強さ(DTS)の測定結果(下図、単位はMPa)：練和開始24時間後の各種封鎖材料のDTSの測定結果はMTAが 13.2 ± 0.6 MPaで最も高く、次いでCPCが 10.4 ± 0.6 MPa、Pが 10.3 ± 0.6 MPaで、MTAが有意に高い値を示したがCPCとPでは有意差は無かった。CPCにPを添加した群におけるDTS値は、C90/P10、C80/P20の順に減少し、CPCにポルトランドセメントを添加することにより機械的強さは低下することが明らかになった。



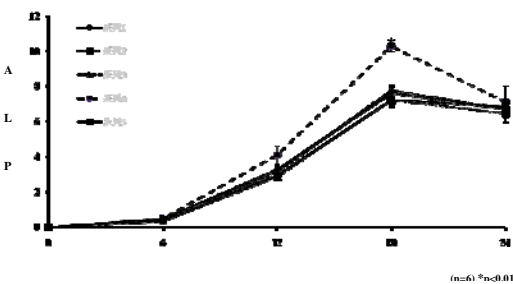
(2)各種穿孔部封鎖材がヒト歯髓培養細胞の硬組織形成能に及ぼす影響に関する研究結果

①ヒト歯髓培養細胞に対する各種封鎖材料の細胞増殖試験結果：無希釈では、すべての群においてコントロール群と比較して細胞数に変動は認められなかった。10倍希釈させた48時間後の細胞増殖試験において、すべての群で有意な細胞増殖が認められた。100倍希釈では、48時間後の細胞増殖試験において、GI群、SB群およびMTA群において有意な細胞増殖が認められた。1000倍希釈では、48時間

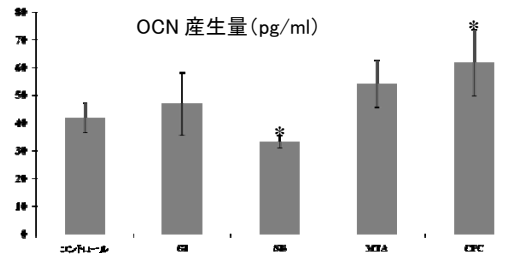
後の細胞増殖試験において、すべての群で有意な細胞増殖が認められた（下図参照）。



②ヒト歯髄培養細胞に対する各種封鎖材料のALP活性値の結果：すべての実験群において12日目から16日目をピークとしてALP活性の上昇が認められた。また、16日目においてMTA群においてコントロール群と比較して有意なALP活性の増加が認められた。一方で、コントロール群と比較してGI群、SB群およびCPC群との間にはALP活性の変化は認められなかった（下図参照）。



③ヒト歯髄培養細胞に対する各種封鎖材料のオステオカルシン産生量の測定結果：培養18日目の培養上清におけるオステオカルシンの産生量は、コントロール群と比較しCPC群において有意な増加が認められた。一方、SB群においてはオステオカルシン産生量のコントロール群に比較して有意な低下が認められた。また、コントロール群とGI群およびMTA群の間に有意なオステオカルシン産生量の変化は認められなかった（下図参照）。



(3)根管穿孔部に対する各種封鎖材を応用した場合の歯根周囲組織の病理組織学的検討：現在研究継続中であるため、研究結果報告の段階にはない。

(4)研究成果のまとめ：以上の結果より、自己硬化型リン酸カルシウムセメントは、MTAに比べ理工学的特性はやや劣るものの根管穿孔部封鎖材として臨床応用可能であることが示唆された。今後は、病理組織検査の結果と合わせて、自己硬化型リン酸カルシウムセメントの機械的物性の向上と操作性の改善を図って良好な穿孔部封鎖材の作製を目指して行く。

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）

〔学会発表〕（計1件）

Satoshi Hirayama (Kenji Fujikawa),
Histopathological Study of Dual-Paste
Premixed CPC Used for Bone Defect,
AADR/CADR Annual Meeting, 2010.3.5,
Walter E. Washington Convention
Center (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平山 聡司 (HIRAYAMA SATOSHI)
日本大学・松戸歯学部・准教授
研究者番号：70189869

(2) 研究分担者

谷本 安浩 (TANIMOTO YASUHIRO)
日本大学・松戸歯学部・准教授
研究者番号：40312045

(3) 連携研究者

宇都宮 忠彦 (UTSUNOMIYA TADAHIKO)
日本大学・松戸歯学部・准教授
研究者番号：50297850