

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890134

研究課題名（和文） 多相性リン酸カルシウムの象牙質形成促進能の解析

研究課題名（英文） Application of Polyphasic Calcium Phosphates to Direct Pulp Capping

研究代表者

騎馬 和歌子 (KIBA WAKAKO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10523087

研究成果の概要（和文）：Poly-CaP を露髄面に適用した場合、表層の SCaP 部からの Ca 溶出により、不活性な HAp と比較して、歯髄の炎症が早期に減退し、dentin bridge の形成が促進されることが分かった。また、Poly-CaP は、象牙芽細胞様細胞の分化に促進的に働き、硬組織誘導の点で有利であること、および、HAp と接着システムとの良好な接合が得られることが確認された。以上の結果より、Poly-CaP は、直接覆髄に応用するうえで有用な材料であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Poly-CaP is effective to induce hard tissue formation because of its Ca-releasing property from the soluble calcium phosphates phase on the surface. Poly-CaP was also found to support proliferation and to promote differentiation of odontoblast-like cells on its surface. Activation of odontoblastic function is suggested to be involved in the effectiveness of Poly-CaP to induce hard tissue formation. Impregnation of resin into etched HAp surface, with production of no gap at the bonding interface, was seen for all adhesives. These results suggest that its usefulness for direct pulp capping.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	930,000	279,000	1,209,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,930,000	579,000	2,509,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：歯学、覆髄、リン酸カルシウム、dentin bridge、象牙芽細胞

## 1. 研究開始当初の背景

深い蝕や外傷などにより歯髄が露出した場合、しばしば直接覆髄処置が行われる。直接覆髄処置では、薬剤や材料で露髄した歯髄を被覆することによって、歯髄組織への障害を最小限にとどめ、露髄部を被蓋硬組織で修復することが目的とされ、硬組織誘導能を有する水酸化カルシウム製剤が古くから第一選択として用いられてきた。

しかし、水酸化カルシウム製剤にもいくつかの欠点があり、特に露髄面の封鎖能がなく、レジンと接着しないこと (Kitasako et al., Dental Traumatology 2008) や、機械的強度が弱く、経時的に劣化すること (Cox et al., JADA vol.125, 1994)、ならびに、露髄面が大きい場合は適用しにくいことなどが問題として残されている。

これに対し、優れた象牙質封鎖能を有する

接着性レジンの直接覆髄材としての可能性が提唱され、臨床でも使用されるようになったが、接着性レジンには、慢性炎症が残存しやすく、硬組織形成が遅れる傾向にあること (Accorinte et al., Dent Mater 2005) や、酸性モノマーの刺激で露髄部から再出血を引き起こしやすいことなどの問題点が指摘されている。したがって、硬組織誘導能に優れ、かつ高い封鎖能を示す理想的な直接覆髄材は現在のところ存在しないといえる。

ところで、申請者らのグループは、大阪大学大学院工学研究科との共同研究にもとづき、ハイドロキシアパタイト (HAp) を真空環境下で熱処理する方法により、HAp の表層および粒界に可溶性リン酸カルシウム系化合物である  $\alpha$ -TCP や TTCP が析出した多相性リン酸カルシウム (Poly-CaP) を開発した (Nakano et al., Mater Trans 2002)。そして、本材料からのカルシウムの溶出により、骨芽細胞の石灰化が促進されることを明らかにし、強度と骨誘導能を兼ね備えた骨欠損補填材としての Poly-CaP の有用性を報告してきた (Ehara et al., Biomaterials 2003, Ogata, Imazato et al., J Biomed Mater Res 2005)。

この成果にもとづき、申請者は、Poly-CaP を直接覆髄処置に応用することを発案した。すなわち、Poly-CaP 体を露出した歯髄面に適用することにより、象牙質 (dentin bridge) 形成が促進されると同時に、Poly-CaP 体の HAp 部分と接着性レジンが緊密に接合することで、露髄部の良好な封鎖を図ることが可能となると考えられる。また、ブロックとしての Poly-CaP を用いることにより、その上部に積層される接着性レジンからのレジンモノマー成分による刺激を阻止することができ、現状の覆髄材が有する問題点を解消できるとの着想である。

## 2. 研究の目的

本研究期間内に、直接覆髄用 Poly-CaP を試作し、その Ca 溶出特性を調べた後、象牙芽細胞様細胞を用いた *in vitro* 実験およびラットを用いた *in vivo* 実験を行い、Poly-CaP の象牙質形成誘導能について検討を行う。さらに、接着性レジンと HAp との接合性と封鎖能について評価することにより、Poly-CaP を用いた直接覆髄法の有用性について検討する。

## 3. 研究の方法

### I. 直接覆髄用 Poly-CaP 体の作製と Ca 溶出特性の分析

1. Poly-CaP 試料の作製と相構成の解析  
直径 9 mm、厚さ 2 mm のディスク状または、

一辺 0.5 mm の立方体の緻密性 HAp ブロック (オリンパスステルモバイオマテリアルズ) を、モリブデンファーネスを用いて 1350°C・真空環境下で 10 時間熱処理して Poly-CaP を作製した。

作製した Poly-CaP 試料を、耐水研磨紙を用いて表層から研磨し、表層および表層より 5 ~ 1000  $\mu$ m の深さでの組成を X 線回折法にて分析した。

### 2. Ca 溶出挙動の検討

Poly-CaP の可溶性リン酸カルシウム相からの Ca 溶出挙動を評価するため、ディスク状 Poly-CaP 試料の側面と底面をネイルバーニッシュで被覆したのち、pH7.4 のリン酸緩衝溶液または pH4.0 の酢酸緩衝溶液 5ml に浸漬し、37°C にて保管した。1 時間から 15 日後に試料を新たな溶出媒に移し変え、回収した溶液中の Ca 濃度を ICP 発光分光分析法にて測定した。

## II. 象牙質形成促進能の検討

### 1. 象牙芽細胞様細胞を用いた評価

Poly-CaP の細胞レベルでの象牙質誘導能を検討するために、象牙芽細胞様細胞を用いた評価を行った。細胞にはマウス象牙芽細胞様細胞 (MDPC-23) を用いた。

48 ウェルプレートの各ウェルに Poly-CaP ディスク試料を置き、分化誘導培地を用いて  $1 \times 10^4$  cells/ウェルとなるように調整した MDPC-23 細胞を試料上に播種して、培養を行う。コントロールには、非焼成の HAp 試料を用いた。

#### 1) MTT アッセイ

1 または 3 日間培養を行った後、培地に MTT 含有 PBS を添加し、4 時間培養後、20% SDS-0.01 N HCL 含有 PBS を添加して 8 時間反応させ、570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定して試料上での細胞増殖を評価した。

#### 2) ALP 活性測定

1, 3, 7, 14 日間培養後、0.02% Triton X 含有 PBS を添加して凍結・融解を二回繰り返して細胞を破碎後、Alkaline Phosphatase Substrate Kit および BCA Protein Assay Kit を用いて測定を行い、ALP 活性を算出した。

#### 3) 象牙質分化マーカーの発現の検索

7 日間培養後、total RNA を抽出し、逆転写を行って cDNA を得たのち、TaqMan Gene Expression Master Mix を用いて DSPP および ALP の mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法 (現有設備) にて測定した。

### 2. 動物実験による評価

ラットを用いた覆髄試験を行い、Poly-CaP による象牙質形成誘導能を評価する。9 週齢雄

性 Wistar rat の上顎第一臼歯咬合面に窩洞を形成し、1/2 のラウンドバーで露髄させた後、立方体の Poly-CaP で露髄面を被覆し、ガラスイオンセメントにて封鎖した。2 または 4 週間後に灌流固定を行い、顎骨を摘出、脱灰、パラフィン包埋後マイクローム（現有設備）を用いて薄切し、HE 染色を施して dentin bridge の形成と歯髄の炎症状態を病理組織学的に評価した。コントロールには、立方体の HAp および水酸化カルシウム製剤を使用した。

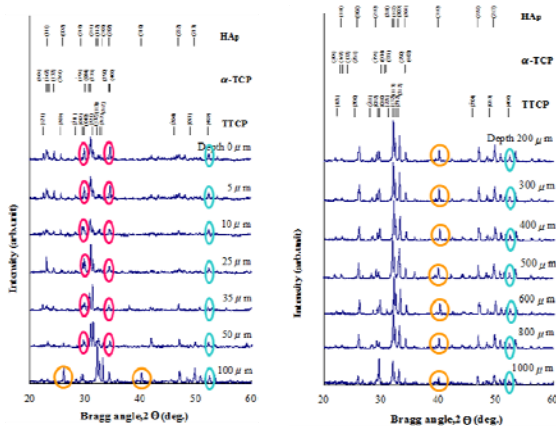
### III. 封鎖能の検討

・接着性レジンとの接合性の形態的評価  
まず、接着性レジン適用の前処置としての酸処理による HAp の脱灰状態を SEM により形態的に評価した。ディスク状 HAp 試料を 40% リン酸 (K-etchant) で 20 秒間処理、またはセルフエッチングプライマー (Clearfil Mega Bond FA プライマー, Adper Prompt L-pop) で処理後、レジン成分を取り除くためにアセトンにて 2 時間洗浄を行い、通法に従って、乾燥、蒸着後、表面の SEM 観察を行った。さらに、ディスク状 HAp 試料に、Adper Single Bond Plus、Clearfil Mega Bond FA、あるいは Adper Prompt L-pop をメーカー指示通り適用し、コンポジットレジン を築盛して半切し、切断面にアルミナ研磨を施した後、SEM 観察を行い、HAp とレジンとの接合状態を評価した。

### 4. 研究成果

#### I. 直接覆髄用 Poly-CaP 体の作製と Ca 溶出特性の分析

##### 1. 相構成の解析

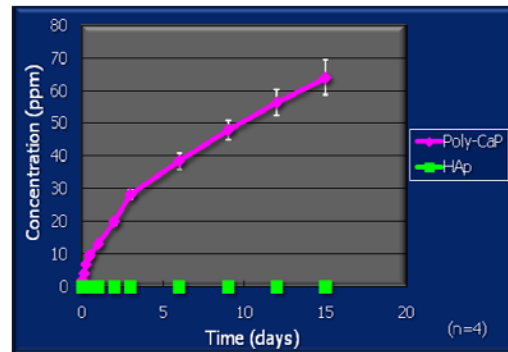


$\alpha$ -TCP 特有のピークは表層から 50  $\mu$ m の深さまで認められ、100  $\mu$ m から HAp 特有のピークが出現した。粒界にも形成される TTCP については、表層から 1000  $\mu$ m の深さまでピークが確認された。したがって、今回用いた Poly-CaP では、表層 50  $\mu$ m の深さまでは可溶性リン酸カルシウム相のみで占められてい

ることが確認された。

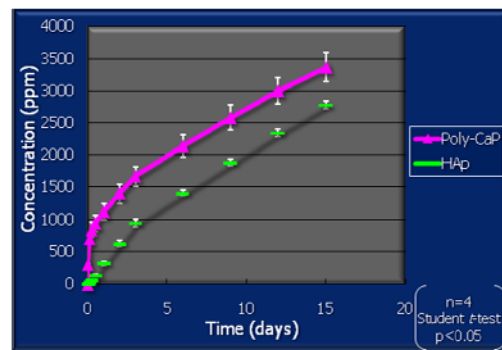
### 2. Ca 溶出挙動の検討

#### Concentration of Ca (PBS, pH7.4)



pH7.4 のリン酸緩衝溶液へ浸漬した場合 HAp ではカルシウムの溶出は検出されなかったが、Poly-CaP からは持続的なカルシウム溶出が認められ、15 日間で約 64ppm の溶出が認められた。

#### Concentration of Ca (Acetate buffer, pH4.0)

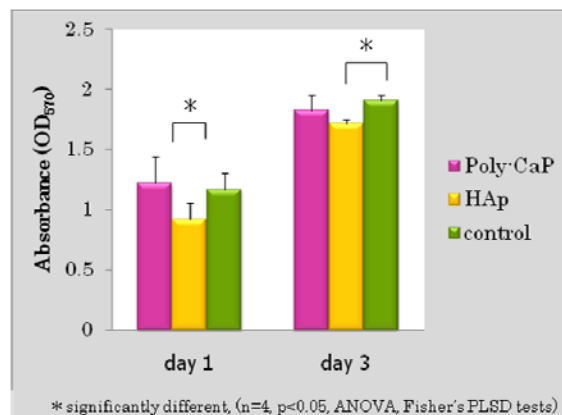


pH4.0 の酢酸緩衝溶液へ浸漬した場合、HAp からもカルシウムの溶出がみられたが、Poly-CaP からは有意に高い濃度のカルシウム溶出が認められ、15 日後には約 3300ppm の溶出濃度を示した。

### II. 象牙質形成促進能の検討

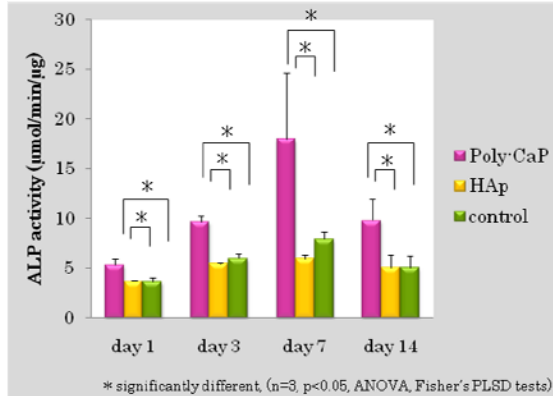
#### 1. 象牙芽細胞様細胞を用いた評価

##### 1) MTT アッセイ



1, 3 日間のいずれの培養時間でも、Poly-CaP とコントロールとの間には有意差はなく、Poly-CaP では良好な細胞増殖が認められた。また、HAp と比較した場合、Poly-CaP では1日後に有意に高い吸光度が得られ、より良好な増殖がみられた。

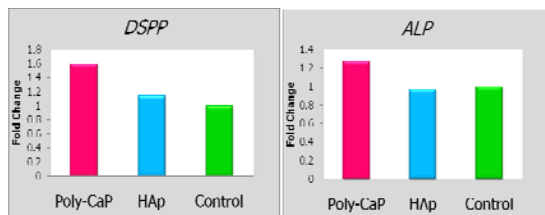
2) ALP 活性測定



全ての材料において、7日目までALP活性は増加し、14日目で減少しました。

1日目から14日目までを通して、Poly-CaPでは、HApおよびコントロールと比較して有意に高い値を示した。

3) 象牙質分化マーカーの発現の検索



DSPP mRNA の発現量は、Poly-CaP ではコントロールの1.60倍、HApでは1.14倍、また、ALPについてはPoly-CaPではコントロールの1.28倍、HApでは0.97倍の結果が得られ、DSPP, ALPともPoly-CaPにおいて発現の増強が認められた。

2. 動物実験による評価

< dentin bridge の形成 >

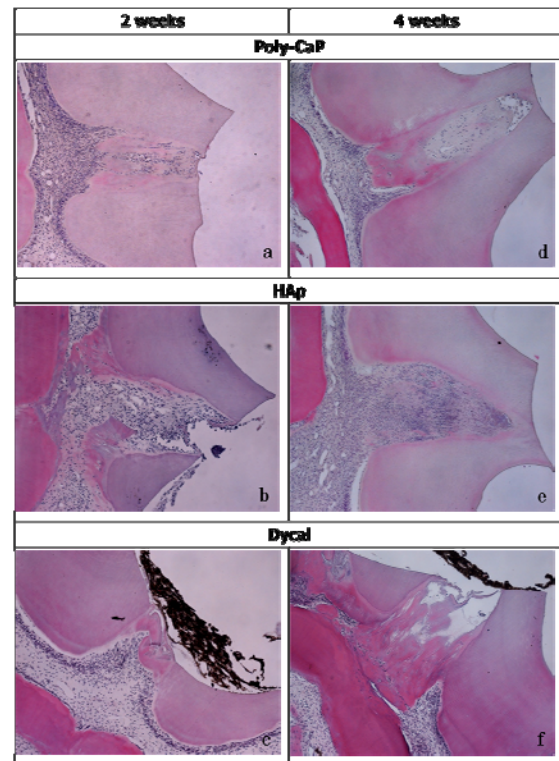
2w	Poly-CaP	HAp	Dycal
none	0/7 (0%)	1/7 (14%)	0/7 (0%)
partial	7/7 (100%)	5/7 (71%)	3/7 (43%)
complete	0/7 (0%)	1/7 (14%)	4/7 (57%)

4w	Poly-CaP	HAp	Dycal
none	0/6 (0%)	1/6 (17%)	0/6 (0%)
partial	2/6 (33%)	5/6 (83%)	2/6 (33%)
complete	4/6 (67%)	0/6 (0%)	4/6 (67%)

< 歯髄の炎症状態 >

2w	Poly-CaP	HAp	Dycal
none	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1/7 (14%)
mild	3/7 (43%)	1/7 (14%)	4/7 (57%)
moderate	4/7 (57%)	5/7 (71%)	2/7 (29%)
severe	0/7 (0%)	1/7 (14%)	0/7 (0%)

4w	Poly-CaP	HAp	Dycal
none	1/6 (17%)	0/6 (0%)	1/6 (17%)
mild	3/6 (50%)	0/6 (0%)	2/6 (33%)
moderate	1/6 (17%)	3/6 (50%)	2/6 (33%)
severe	1/6 (17%)	3/6 (50%)	1/6 (17%)



2週間後では、dentin bridge の形成、歯髄の炎症状態ともに両者に差は認められなかったが、4週間後では、Poly-CaP による覆髄後の dentin bridge 形成はポジティブコントロールとして用いた Dycal の場合と同様で、HAp と比較して有意に多くの例で complete bridge の形成が認められた。歯髄の炎症については、HAp では主に中等度から重度であったのに対し、Poly-CaP では軽度な炎症にとどまっている傾向がみられた。

III. 封鎖能の検討

すべての接着システムにおいて、ボンディングレジジンと HAp が隙間なく接合し、HAp 表面の空孔部をボンディングレジジンが満たしている様子が観察された。すなわち、脱灰された HAp の表面にボンディングレジジンが十分に浸透して硬化し、良好な接合性を示すものと考えられる。

## 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2件)

- ① Kiba W, Imazato S, Takahashi Y, Yoshioka S, Ebisu S, Nakano T. Efficacy of polyphasic calcium phosphates as a direct pulp capping material. J Dent. 2010; 38: 828-37. 査読有
- ② Imazato S, Horikawa D, Takeda K, Kiba W, Izutani N, Yoshikawa R, Hayashi M, Ebisu S, Nakano T. Proliferation and differentiation potential of pluripotent mesenchymal precursor C2C12 cells on resin-based restorative materials. Dent Mater J. 2010; 29: 341-6. 査読有

[学会発表] (計2件)

- ① 多相性リン酸カルシウムの直接覆髄法への応用－象牙芽細胞様細胞を用いた評価－騎馬 和歌子, 今里 聡, 恵比須 繁之, 中野 貴由, 斎藤 隆史, 日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会(第133回), 岐阜市長良川国際会議場, 2010年10月29日
- ② Kiba W, Imazato S, Takeda K, Takahashi Y, Ebisu S, Nakano T. Evaluation of effects of poly-phasic calcium phosphates on odontoblast-like cells, IADR 2010, July16, Barcelona, Spain.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

騎馬 和歌子 (KIBA WAKAKO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：10523087