

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592813

研究課題名(和文)石灰化誘導能を有するTTCP/DCPA配合4-META/MMAレジンの開発

研究課題名(英文)Development of 4-META/MMA resin containing TTCP/DCPA with calcification ability

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的は、齲蝕や歯科治療時のトラブルが原因で生じる露髄や歯根穿孔を修復するための封鎖材料を開発することにある。つまり、象牙質やセメント質に対して優れた接着性を有する4-META/MMAレジンに高い生体親和性と硬組織形成能を有するリン酸カルシウムであるTTCP/DCPAを配合したハイブリッドレジンを作製し、この試作レジンによる象牙質接着性などの材料的特性と石灰化誘導能を検討した。その結果、直接覆髄や穿孔部封鎖材料として、臨床使用が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 develop of selling material for the repair of dental pulp exposure and endodontic perforation because of dental caries and the trouble at the dental treatment. The newly resin material which containing TTCP/DCPA as known two calcium phosphates, with 4-META/MMA resin was produced, and the mechanical properties, the adhesive strength to dentin, the calcification ability using human dental pulp cell were investigated. The results of this study suggested that 4-META/MMA resin containing TTCP/DCPA had a possibility of clinical application of repair material for dental pulp exposure endodontic perforation.

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：4-META/MMA レジン リン酸カルシウム TTCP DCPA 石灰化誘導能

1. 研究開始当初の背景

(1)近年、急速な高齢化社会を迎えた我が国にあって、「8020」運動の啓蒙・普及と歯科医療の発展により、その達成率が25%を超えるまでに至っている。しかし、「8020」達成率を向上させるためには、歯科保存領域における齲蝕初期での的確で確実な修復処置が必要であることは言うまでもないが、齲蝕や外傷により傷害を受けて露髄を生じた歯に対する歯髄保存の可否や歯内療法処置中に偶発的に生じてしまった根管穿孔に対するの根管象牙質封鎖の可否が、その歯の寿命に大きく影響を与える。従って、このような露髄や根管穿孔に対して、抜髄や抜歯を回避することができる適切な覆髄剤や根管封鎖材の開発が望まれてきた。現在、臨床において様々な薬物や薬液を使用した歯髄覆髄剤や充填材料による根管封鎖材料が用いられてきたが、長期経過症例では成功率が低く、安全な治療法の確立には至っていない。その理由として、口腔内に露出した歯髄や歯周組織と交通した根管は、細菌や咬合圧などの刺激に対抗しなければならず、露髄面や穿孔部の確実な被覆が必要である。よって露髄や穿孔により歯を保存するためには、受傷部の炎症消失後、露髄面や穿孔部の確実な封鎖と硬組織形成をスムーズに誘導するような生体材料の開発が重要であると考えられる。

(2)一方で、Mineral Trioxide Aggregate (ProRoot MTA[®])が臨床に登場し、覆髄剤および根管系封鎖材として良好な臨床成績が報告されている。しかし、象牙質成分以外のリン酸カルシウムを含む事や硬化までに時間がかかること、体液が流入しやすい部位では材料が流失してしまう可能性があること、象牙質に接着しないことなど改良すべき点も少なくない。生体親和性が良好である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、 β -型三リン酸カルシウム(β -TCP)のように自己硬化せず、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。

(3)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、我々は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)が、歯槽骨欠損部に補填することにより新生骨に1~3カ月で置換する事を報告してきた。更にCPCが覆髄剤や穿孔部封鎖材として十分な材料学的特性を有することや、生体親和性に関して、ラットの皮内反応による病理組織学的検討の結果、CPC硬化体周囲には炎症性の反応はほとんど認められなかった事も報告されている。我々は、このCPCを直接覆髄剤として用いた場合を想定し、ヒト歯髄培養細胞の硬組織形成能に及ぼす影響をMTAと比較検討したところ、オステオカルシン産生量の増加がMTAよりも

有に高いことから歯槽骨のみならず歯硬組織を誘導する可能性が明らかとなり、直接覆髄剤としての有用性が示唆されている。

(4)現在臨床では高い象牙質接着性を有し、生体親和性も良好な歯科充填用接着材料として4-META/MMAレジン(スーパーボンド[®]、サンメディカル)が知られている。しかし、露髄面や穿孔部の封鎖性良好であるが、石灰化誘導能や硬組織形成能はない。そこで、この4-META/MMAレジンにCPCを含有させることにより歯硬組織形成能を有する接着修復用ハイブリッド材料の開発が必要であると考えた。

2. 研究の目的

(1)歯科保存領域において臨床で遭遇する、齲蝕や外傷によって露髄を生じた歯、根管治療中に偶発的に穿孔が生じた歯根など、その処置の如何によって大きく歯の保存の可否に関わるような症例に対して、象牙質への長期間にわたる良好な接着性を有し、新生硬組織の添加を伴う治癒を積極的に誘導する臨床応用可能な接着性充填封鎖材料を開発することを目的に以下の検討を行った。

(2)象牙質やセメント質に対して優れた接着性と生体親和性を有する4-META/MMA-レジンにTTCP/DCPA(CPC)の配合量を変えた試作レジンを作製し、以下の材料学的特性について検討を行った。

硬化時間の測定

ウシ象牙質に対する引っ張り接着強さの測定。

曲げ強さの測定。

試料表面のSEM観察。

(3)CPCと同様に石灰化誘導能を有する炭酸カルシウム(CaCO_3)のヒト培養歯髄細胞(hDPC)に対する硬組織誘導能を以下の指標により検討した。

細胞生存率

アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定

BMP-2量の測定

オステオカルシン(OCT)量の測定

(4)CPC配合4-META/MMAレジンに露髄面や穿孔部に応用する際、インジェクティブな性状とするため、フロアブルタイプのレジンに動的硬さと弾性率について検討した。

以上による本研究の結果から、直接覆髄や穿孔部封鎖材料として、臨床使用可能なCPC含有4-META/MMA-レジン接着封鎖材料開発の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1)TTCP/DCPA(CPC)の配合4-META/MMA-レジン試料の作製

CPCの作製：TTCPの作製はBrownらの方法

によって行い、TTCP/DCPA は等モル混和物を CPC として実験に供した。

4-META/MMA-レジン粉材と TTCP/DCPA の調整：4-META/MMA-レジン粉材はスーパーボンドの紛体（クリアー）を使用し、CPC 含有量を 0%、10%、20%、30%、50%、60%、100% に調整し、実験紛体とした。

混和液はスーパーボンド付属のモノマー液とキャタリストを使用し、実験試料の粉液比は、粉：0.08 g に対してモノマー液：110 μ l とキャタリスト 1 滴とした。

(2) 硬化時間の測定：各試料を 10 秒間練和し、その 25 μ l を採取して DSC 測定用アルミパン上に設置し重合熱量を測定した。

(3) ウシ象牙質に対する接着強さの測定：ウシ抜去象牙質を #600 耐水研磨紙にて研磨後、スーパーボンド付属象牙質歯面処理材（グリーン）で 10 秒間処理後、水洗・乾燥を行った。その表面に厚さ 1.0mm、直径 4.8mm の両面テープを塗布して接着面積を規定し、各 CPC/SB 試料を塗布し、アクリル棒を圧接した。この接着試料を 37 生理食塩水中に 24 時間、1 週間および 1 か月浸漬後、万能試験機を用いてクロスヘッドスピード 2mm/分にて引っ張り接着強さを測定した。

(4) 曲げ強さの測定：2×2×25mm のモールドに各 CPC/SB 試料を充填後、両面をスライドガラスにて圧接し、37 生理食塩水中に 24 時間、1 週間および 1 か月浸漬した。その後モールドから取り出し、万能試験機を用いてクロスヘッドスピード 1mm/分にて 3 点曲げ強さを測定した。

(5) CPC/SB 試料表面の走査型電子顕微鏡観察：#600 耐水研磨紙でウシ象牙質表面を研磨試料に、各 CPC/SB 試料を塗布し、アクリル板で圧接後、24 時間および 1 週間生理食塩水中に浸漬した。この試料をアイソメットにて切断し、ダイヤモンドペーストを塗布し #2000 耐水研磨紙にて鏡面研磨後、6N 塩酸および 1% 次亜塩素酸で処理後、乾燥し金蒸着した試料を走査型電子顕微鏡観察用試料とした。

(6) CaCO₃ のヒト歯髄培養細胞に対する硬組織誘導能の測定

細胞培養：日本大学松戸歯学部付属病院に来院した 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（hDPC）として用いた。

実験試料の調整：実験に使用した CaCO₃ の濃度は 0、1、10 μ g/ml に調整して実験に使用した。

細胞生存率の測定：hDPC を 96 穴プレートに 1% FCS 添加 -MEM 培地を用いて 1.0×10

⁴個/well 播種し、24 時間培養を行った。その後、各濃度の CaCO₃ 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。

ALP 活性の測定： 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 hDPC を 10% FCS 添加 -MEM 培地を用いて 1.0×10⁵ 個/well 播種し、5 日目から 25 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 8 μ mol/p-nitrophenylphosphate を加え、37 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。

BMP-2 量の測定： と同様にして調整した細胞に対して、Quantikine BMP-2 ELISA kit（R&B Systems 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。

OCT 産生量の測定： と同様にして調整した細胞に対して、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 570nm 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。

(7) フロアブルタイプレジンの動的硬さと弾性率の測定：市販 5 製品を直径 5mm×高さ 2mm のモールドに充填し、光照射器で 90 秒間重合させたのち、24 時間 37 水中に浸漬した試料をダイナミック硬さと弾性率の測定試料とした。測定には、ダイナミック超微小硬度計（DUH-211、島津）を用いた。

4. 研究成果

(1) 硬化時間の測定：CPC の含有率が 20% まではコントロールと比べ硬化時間に有意差は無かった。しかし、CPC 含有率が 50% 以上になると硬化時間は 10 分を越え有意に高くなることが分かった（図 1）。

CPC/SB の硬化時間

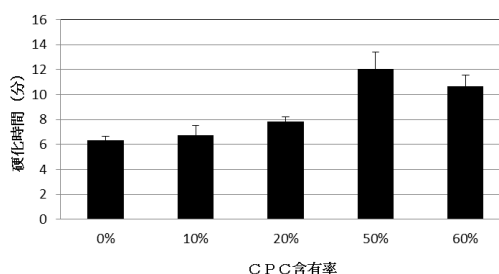


図 1

(2) ウシ象牙質に対する接着強さの測定: CPC 20%試料までは水中浸漬時間に関わらずコントロールに比べ接着強さの低下が認められなかった。CPC 30%~60%試料間での接着強さは同等レベルで、著しい接着強さの低下は認められなかった(図2)。

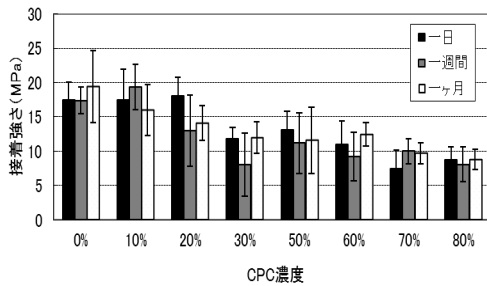


図2

(3) 曲げ強さの測定: CPC10%~50%含有試料およびコントロール試料において、曲げ強度の大きな低下は認められなかったが CPC50%含有試料ではコントロールと比較して約20%強度の低下が認められた。また、同一試料においては、水中浸漬期間延長による曲げ強度の有意な低下は認められなかった(図3)。全てCPC含有試料では、曲げ試験後の試験体が破断した。

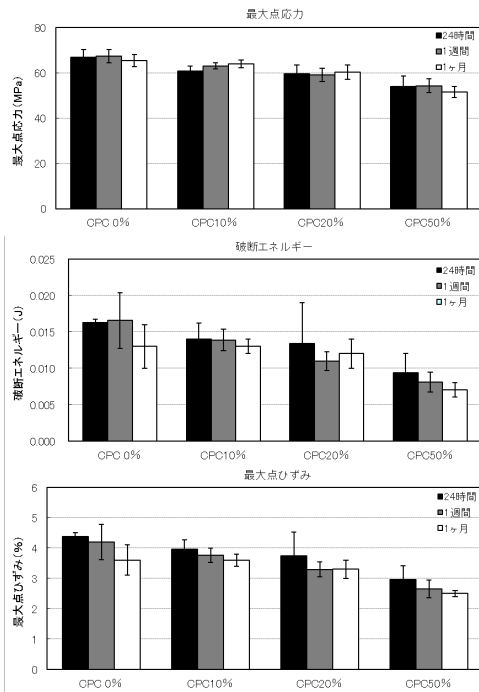


図3

(4) 走査型電子顕微鏡観察: CPC10%~90%含有試料およびコントロール試料において、CPC60%含有試料までコントロール試料の接合界面と比較して相違ないレジクタゲおよび樹脂含浸層の形成が認められた。CPC含有量が高い試料ほどセメント体部に空胞形成が認められた。これは、試料作製過程でHCl処理によるCPCの溶解によるものと考えられた。CPC90%含有試料では1週間浸漬で表面に

針状結晶化物が認められた。形状から析出したハイドロキシアパタイト様リン酸カルシウムであると考えられた(図4)。

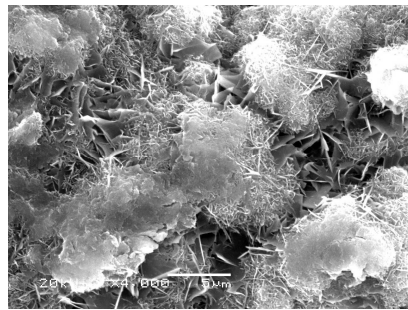


図4

(5) 細胞生存率の測定: 各培養時間に置いてCaCO₃ 0, 1 および 10g/mlでは濃度依存的に生存率が上昇する傾向が認められた(図5)。

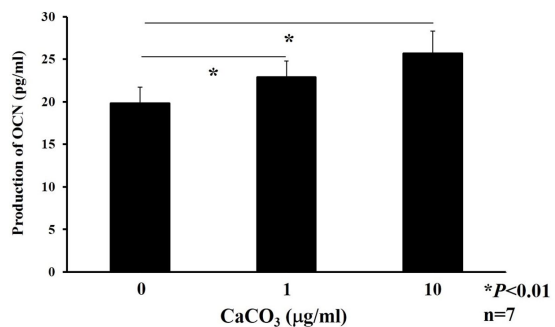


図5

(6) ALP活性の測定: 培養10日目からALP活性はCaCO₃の濃度依存的に上昇し、培養15日目でピークとなりその後低下することが分かった(図6)。

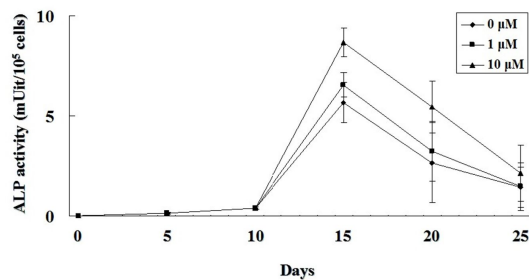


図6

(7) BMP-2量の測定: コントロールに比べCaCO₃10g/mlにおいて有意に高い値を示した(図7)。

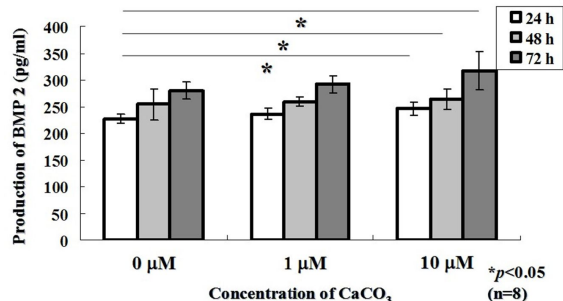


図7

(8) OCT 量の測定：コントロールに比べ CaCO_3 10g/mlにおいて有意に高い値を示した (図8)。

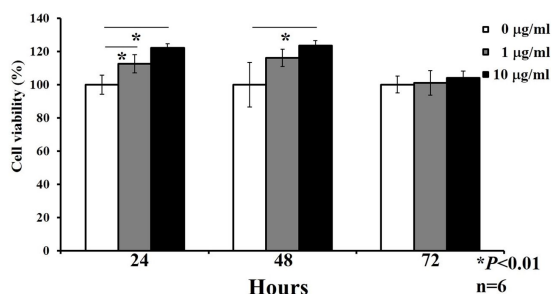


図8

(9) フロアブルタイプレジンの動的硬さと弾性率の測定：市販5種製品のダイナミック硬さと弾性率との関係にはフィラー含有率と正の相関がみられた (図9)。

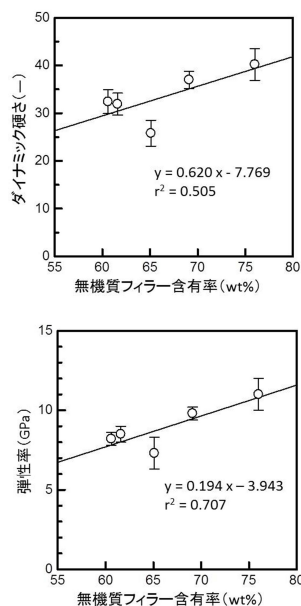


図9

(10) 研究成果のまとめ：以上の研究成果から、TTCP/DCPA から成るリン酸カルシウム(CPC)を4-META/MMA レジンに配合することにより、象牙質との接着性が良好で生体親和性に優れ、石灰化誘導能も有する直接覆髄や穿孔部封鎖材料として、臨床使用可能な材料となることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

(1) Satoshi Hirayama, Hirotoishi Iwai, Yasuhiro Tanimoto, Mechanical evaluation of five flowable resin composites by the dynamic micro-indentation method, Journal of Dental Biomechanics, 5, 2014,1-8. 査読有

(2) Satoshi Hirayama, Chiaki Komine, Chikata Takahashi, Satoshi Matsui,

Kiyoshi Matsushima, Effects of Calcium Carbonate on Odontoblast Differentiation and Calcification Ability of Human Dental Pulp Cells, Journal of Oral Tissue Engineering, 11(2),2013, 123-134. 査読有

〔学会発表〕(計1件)

Satoshi Hirayama, Chiaki Komine, Hiroyuki Gomi, Kiyoshi Matsushima, Takuji Ikemi, Effects of Calcium Carbonate on Odontoblast Differentiation and Calcification Ability of Human Dental Pulp Cells, The 9th World Endodontic Congress International Federation of Endodontics Associations, May 23rd ~ 26th, Tokyo, JAPAN

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

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) 研究分担者

松島 潔 (MATSUSHIMA Kiyoshi)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：00157306

(4) 研究分担者

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

(5) 連携研究者

なし