

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 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：23592814  
研究課題名(和文)新規歯内治療用セメントの開発に関する基礎的研究

研究課題名(英文)Basic study of novel endodontic cement

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯内治療の代表的なセメントであるMineral Trioxide Aggregate (MTA)は、硬化時間の短縮や操作性の改善などの問題点が指摘されている。本研究の目的は、これらを改善したセメントを開発し基礎的解析を行うことである。

リン酸カルシウムセメント(CPC)を改良し、MTAの欠点である硬化時間や操作性を向上させたPremixed CPCやフルオロアパタイト形成CPCを試作し、骨芽細胞や実験動物を使用して解析を実施した。その結果、本セメントは細胞増殖、アルカリフォスファターゼ活性、石灰化に及ぼす影響および組織内での炎症反応などはMTAと同程度であり、本材料の有用性が確認された。

研究成果の概要(英文)：Mineral Trioxide Aggregate (MTA) has been in widespread use as endodontic cements. However, MTA has disadvantages: it does not have good handling property, and the setting time is relatively long. The aim of this study is to develop new endodontic cements.

Calcium phosphate cements (CPCs) has been improved for good handling property and short setting time; Premixed CPC and Fluorapatite forming CPC. Mineralizing ability in osteoblasts and rat subcutaneous tissue response of CPCs were evaluated when compared to MTA. These CPCs indicated the same cell proliferation, alkaline phosphatase activity, mineralized nodule formation, and calcium contents in nodules as those of MTA. These results suggest that these CPCs has the possibility of novel endodontic cement.

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：歯内療法用セメント 硬組織形成 calcium phosphate cement 生体親和性

## 1. 研究開始当初の背景

従来より歯内療法領域の充填材料としては、アマルガム、酸化亜鉛ユージオールセメント、水酸化カルシウム、グラスアイオノマーセメントおよびコンポジットレジンなどが、症例によって適宜選択使用されてきた。1990年代に入ると Torabinejad らにより開発された歯内治療用セメント MTA が高い生体親和性と辺縁封鎖性を持つことから、多くの症例に使用可能との報告が示された (Torabinejad M *et al.*, J Endod 1999;25:197-205)。近年では、その範囲は逆根管充填、穿孔封鎖、直接覆髄および根未完成歯の根管充填など多岐にわたっている。しかしながら、実際の臨床使用時の硬化時間は約3時間を要するため他のセメントと比較すると最も長いことや、MTA 混和後の状態は狭小な場所に充填するには不向きであるため操作性の改善などが指摘されている (Johnson BR, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1999;87:398-404)。また、MTA が生体に及ぼす影響に関しては、*in vitro* および *in vivo* レベルで細胞培養実験 (Camilleri J *et al.*, Int Endod J 2004;37:699-704) および動物実験 (Ham KA *et al.* J Endod 2005;31:275-279) などが行われてきたが、そのメカニズムについては不明な点が多い。さらにイギリスの小児歯科に携わる歯科医師に対して行ったアンケート結果では、「MTA は高価である」と考える歯科医師が全体の 63.6% であるとの報告 (Mooney GC *et al.*, Dent Traumatol 2008;24:65-69) で見られるように、MTA は比較的高価な材料という認識がある。したがって、**これらの問題を解決した新たな歯内治療用セメントの開発は临床上非常に有用である**と考える。

一方、研究代表者は MTA の直接覆髄材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おり、水酸化カルシウム製材と比較して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り、遊離する**カルシウムイオンが関与する**ことをこれまでに明らかにした (Hayashi M *et al.*, Int Endod J 2006;39:415-422, 林 誠 他, 日歯保存誌 2006;49:159-167, 林 誠 他, 日大歯学 2007;81:145-150)。そこでカルシウムイオンが遊離する可能性のある材料としてフッ素の含有された Calcium Phosphate Cement (CPC) や近年開発されたアパタイト材料など新規材料に焦点をあて、実験動物に埋入して優れた生体内安定性と生体親和性を認めたと (Hayashi M *et al.*, J Res Natl Inst Stand Technol 2010;115:267-276, 林 誠 他, 日大歯学 2010;84:93-96)。さらに、硬組織形成に関与すると考えられている 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-4-ribofuranoside (AICAR) にも着目し、ヒト歯

髄細胞に与える影響について検討し、分化を促進する可能性についても検討した (林 誠 他, 日大歯学 2010;84:81-84)。

そこで次の研究段階として、これらの材料を応用し、直接覆髄のみではなく歯内療法全般に使用できる**新しい歯内治療用セメントの開発**の必要性が考えられた。

## 2. 研究の目的

上記の背景から新しい歯内治療用セメントの開発のため、これらの材料を用いた硬組織形成細胞に及ぼす影響について細胞培養実験を、また実際の歯内処置における生体内反応については動物実験を行い、*in vitro* および *in vivo* の両視点から検証することが本実験の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試材料

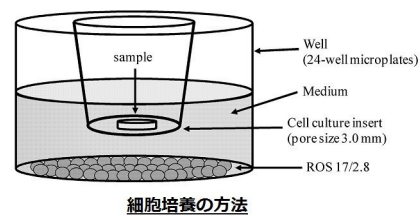
試験材料として前述した各種CPCなどを使用し、対照試料としては現在広く用いられている歯内治療用セメントのMTAや強化型酸化亜鉛ユージオールセメントなどを使用した。

### (2) 培養細胞

使用する硬組織形成細胞は、骨芽細胞株 (ラット骨肉腫由来の株化骨芽細胞 ROS17/2.8) として、研究代表者がこれまで行ってきた方法 (林 誠 他, 日大歯学 2010;84:93-96) にて行った。すなわち無菌条件下にて、10% FBS, 抗生物質を含むα-MEM にて37℃, 5%CO<sub>2</sub>存在下で継代培養を行った。

### (3) 培養方法

培養にはマルチウェルプレート内にセルカルチャーインサートを設置し、その底部に供試材料を設置した。その後ウェル内に細胞を播種して材料のない細胞だけのものをコントロールとした。



### (4) 細胞の増殖に与える影響

被検材料が細胞増殖に与える影響を Cell Counting Kit を使用して経時的に計測した。

### (5) 細胞のアルカリフォスファターゼ活性に与える影響

Paranitrophenol-phosphate を利用した比色法にてアルカリフォスファターゼ活性を経時的に計測した。

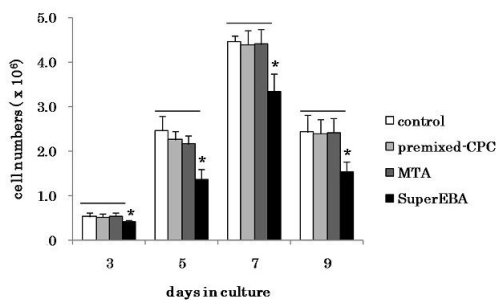
### (6) 細胞分化マーカーの遺伝子・タンパク質発現に及ぼす影響

未分化間葉系細胞が供試材料によって硬組織形成を促すように分化誘導されることは、歯内治療用セメントにおいて重要な要素である。そこで未分化間葉系細胞の分化を免疫組織学的検索およびCbfa/Runx2, アルカリフォスファターゼ, BMP, BMPレセプターなどの遺伝子およびタンパク発現をReal-time PCR法とWestern blot法にて解析した。また、共焦点レーザー顕微鏡にて分化に関与すると考えられるカルシウムイオン濃度を測定した。

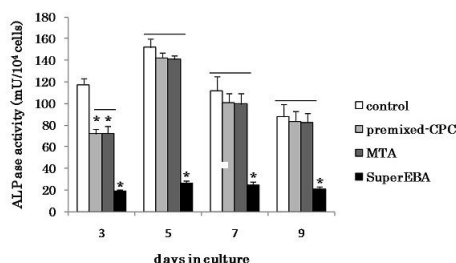
(7) 実験動物を使用した病理組織学的検索  
全身麻酔下において雄性ラット(約300g)の皮下組織に供試材料を埋入し、組織反応をHE染色にて病理組織学的検索を行った。さらに上顎臼歯部に歯内療法処置(穿孔部封鎖, 直接覆髄および生活歯髄切断など)を供試材料にて施行し、病理組織学的検索を同様に行った。また、飼育期間中にはエックス線マイクロCT撮影を経時的に行い、硬組織形成状態を客観的に確認・評価した。

#### 4. 研究成果

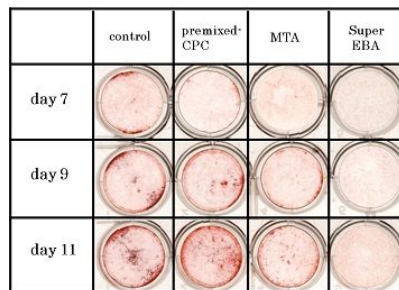
(1) 試験材料として、硬組織形成に関与することが考えられる Calcium Phosphate cement (CPC)の硬化時間と操作性を向上させた Premixed-CPC を考案し、骨芽細胞に対する影響を他の歯内治療用セメントと比較検討した。その結果、細胞増殖, ALPase 活性および石灰化 nodule 形成において、Premixed-CPC と MTA 間に有意差は認められなかったが、強化型酸化亜鉛ユージノールセメント(SuperEBA)は Premixed-CPC および MTA と比較して有意に低い値を示した。以上の成績から、Premixed-CPC の骨芽細胞に対する影響は、MTA とほぼ同等であることが明らかとなり、本材料の歯内療法用セメントとしての有用性が示唆された。



供試材料が細胞増殖に与える影響

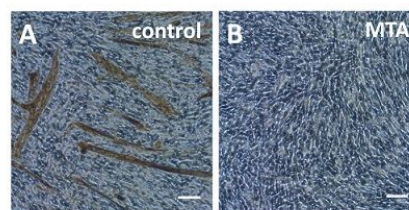


供試材料がALP活性に与える影響

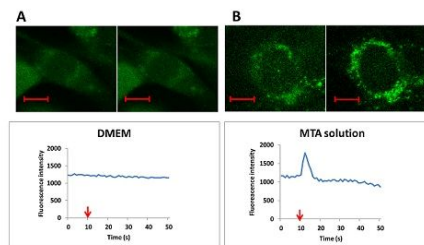


供試材料が石灰化に及ぼす影響

(2) 供試材料が未分化間葉系細胞の分化マーカーの遺伝子およびタンパク発現に及ぼす影響について解析を行った。実験系確立のため代表的なセメントである MTA を使用して多分化能を有する未分化間葉系細胞株である C2C12 細胞を使用し、セルカルチャーインサートにて共培養した。筋芽細胞への分化について免疫組織学的解析を行ったところ、MTA は筋芽細胞への分化を抑制した。細胞増殖については MTA を設置しなかった control と類似した増殖傾向を示し、Runx2, Osterix, および Sox9 発現は control より MTA で有意に増加し、MyoD および LPL では有意に減少した。さらに MTA によって増加した Runx2, Osterix および Sox9 発現はカルシウムチャンネルブロッカーである verapamil 添加によって有意に減少した。一方、MTA の存在により低下した LPL および MyoD 発現は、verapamil 添加によって control レベルまで上昇した。また、細胞内のカルシウムイオンの増加を共焦点レーザー顕微鏡にて確認した。以上のことから MTA は C2C12 細胞の骨芽細胞への分化を、遊離するカルシウムイオンによって促進することが示唆された。現在、各種 CPC を用いて同条件で検索を継続している。



myotube形成に及ぼすMTAの影響



MTAによる細胞内カルシウム濃度の上昇

(3) Calcium Phosphate Cement (CPC) に

フッ化物を添加することによりフルオロアパタイトを形成する新たな歯内療法セメントを開発した。本材は骨芽細胞の分化と骨形成を促進する可能性が考えられ、骨芽細胞を使用した *in vitro* の培養実験を前述した方法で行い、さらにラットの皮下組織を使用した *in vivo* の組織反応解析も行ったところ、高い生体親和性を確認した。現在、本材の C2C12 細胞の分化に及ぼす影響についても検討を行っている。

(4) これまで開発した材料を使用し実験動物にて歯内療法処置(直接覆髄など)を施行した。評価の方法として飼育期間終了後に脱灰切片を作成し、病理組織学的検索を HE 染色にて解析を行った。その結果、MTA と同様な硬組織形成反応を確認し、これまでの実験結果を裏付ける基礎的データを取得することができた。現在、マイクロ CT 撮影を使用した解析および穿孔封鎖処置に関する評価を遂行している。

以上の結果から、本材料が臨床に応用できる可能性が示唆された。

#### 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6件)

1. Y. Kobayashi, M. Hayashi, F. Yoshino, M. Tamura, A. Yoshida, H. Ibi, MC. Lee, K. Ochiai and B. Ogiso: Bactericidal effect of hydroxyl radicals generated from a low concentration hydrogen peroxide with ultrasound in endodontic treatment, *J Clin Biochem Nutr* 54, 1-5, 2014. 査読有, doi:10.3164/jcfn.13-86
2. Y. Kobayashi, M. Hayashi, F. Yoshino, M. Tamura, A. Yoshida, H. Ibi, MC. Lee, K. Ochiai and B. Ogiso: Passive ultrasonic irrigation in the presence of a low concentration of hydrogen peroxide enhances hydroxyl radical generation and bactericidal effect against *Enterococcus faecalis*, *J Oral Sci*, 56, 35-39, 2014. 査読有, doi:10.3164/jcfn.13-86
3. S. Matsumoto, M. Hayashi, N. Tanabe, Y. Suzuki, Y. Kobayashi, H. Kobayashi, N. Suzuki, M. Maeno and B. Ogiso: Calcium ions released from mineral trioxide aggregate are taken up by C2C12 cells via the L-type voltage-dependent calcium receptor, *J Hard Tissue Biology*, 22, 13-18, 2013. 査読有, doi:10.2485/jhtb.22.13
4. S. Matsumoto, M. Hayashi, Y. Suzuki, N. Suzuki, M. Maeno and B. Ogiso: Calcium ions released from mineral trioxide aggregate convert the differentiation pathway of C2C12 cells into osteoblast lineage, *J Endod*, 39, 68-75, 2013. 査読有,

doi: 10.1016/j.joen.2012.10.006

5. C. Kobayashi, M. Hayashi, M. Yamaoka, K. Hashimoto, T. Kato, N. Komori and B. Ogiso : Assessing qualitative changes in simulated periodontal ligament and alveolar bone using a non-contact electromagnetic vibration device, *Clin Oral Investig*, 16 (4), 1161-1169, 2012. 査読有, doi: 10.1007/s00784-011-0597-9

6. H. Ogata, M. Hayashi, H. Tsuda, N. Suzuki, M. Maeno, A. Sugawara and B. Ogiso : Effects of a calcium phosphate cement on mineralized nodule formation compared with endodontic cements, *Dent Mater J*, 31, 92-97, 2012. 査読有, doi: 10.4012/dmj.2011-151

[学会発表](計21件)

1. 鈴木裕介, 林 誠, 鶴町 保, 高木章三, Laurence C. Chow, 小木曾文内: フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントに関する基礎的研究 - ケイ酸カルシウムを添加した場合の辺縁封鎖性について -, 第139回秋季日本歯科保存学会, 10月17-18日, 秋田, 2013.
2. 小林 寛, 林 誠, 小森規雄, 清水康平, 山岡 大, 小木曾文内: 試作非接触型電磁式加振装置に関する基礎的研究 - レーザ変位計による力学的パラメータの検出 -, 第139回秋季日本歯科保存学会, 10月17-18日, 秋田, 2013.
3. Y. Suzuki, M. Hayashi, H. Ogata, T. Yaskawa, S. TAKAGI, L. CHOW, B. Ogiso: Biocompatibility of novel fluorapatite cement with calcium silicate for endodontics, 2<sup>nd</sup> Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region, Aug 21-23, Bangkok, Thailand, 2013.
4. Y. Kobayashi, M. Hayashi, F. Yoshino, M. Tamura, A. Yoshida, M. Chang-il Lee, K. Ochiai and B. Ogiso: ROS generation by ultrasonic irradiation: New disinfection technique in endodontics, The 2<sup>nd</sup> Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region, Aug 21-23, Bangkok, Thailand, 2013.
5. 小林慶美, 林 誠, 吉野文彦, 田村宗明, 吉田彩佳, 李 昌一, 落合邦康, 小木曾文内: 新たな根管清掃・消毒法に関する基礎的研究 - LED 照射が低濃度過酸化水素水の活性酸素種生成に及ぼす影響 -, 第138回春季日本歯科保存学会, 6月27-28日, 福岡, 2013.
6. 尾形英大, 林 誠, 小森規雄, 羽鳥啓介, 牧野公亮, 高木章三, Laurence C. Chow, 小木曾文内: フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントに関する基礎的研究 (第3報) - リン酸カルシウム粉末の大きさが反応生成物に及ぼす影響について -, 第1

38回春季日本歯科保存学会, 6月27 - 28日, 福岡, 2013.

7. 明石俊和, 林 誠, 小木曾文内: エアスケラーによる根管治療 髄腔開拓から根管形成そして根管洗浄について, 第138回春季日本歯科保存学会, 6月27 - 28日, 福岡, 2013.

8. M. Hayashi, O. Takeichi, H. Suguro, B. Ogiso: Calcium ions released from mineral trioxide aggregate convert the differentiation pathway of C2C12 cells into osteoblast lineage via the L-type voltage-dependent calcium channel, The 9<sup>th</sup> World Endodontic Congress, May 23-26, Tokyo, Japan, 2013.

9. 鈴木裕介 林 誠 鈴木直人 高木章三, Laurence C. CHOW, 小木曾文内: 新規歯内療法用セメントの生体親和性に関する基礎的研究, 第65回日本大学歯学会総会, 5月19日, 東京, 2013.

10. A. Sugawara, K. Fujikawa, M. Hayashi, H. Ogata, S. Matsumoto, Y. Suzuki, M. Oki, B. Ogiso, S. Takagi, and L. Chow: Histopathological study of rapid setting TTCP-cements used for bone defect, 91<sup>st</sup> General session & Exhibition of the IADR, March 20-23, Seattle, WA, USA, 2013.

11. 尾形英大, 林 誠, 小森規雄, 高木章三, Laurence C. Chow, 小木曾文内: フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントに関する基礎的研究(第1報) - フッ化ナトリウム配合量が反応生成物に及ぼす影響について -, 第137回秋季日本歯科保存学会, 11月22 - 23日, 広島, 2012.

12. 鈴木裕介 尾形英大 林 誠 勝呂 尚, 高木章三, Laurence C. Chow, 小木曾文内: フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントに関する基礎的研究(第2報) - ケイ酸カルシウムを添加した歯内療法用セメントの生体親和性について -, 第137回秋季日本歯科保存学会, 11月22 - 23日, 広島, 2012.

13. 小林慶美, 林 誠, 吉野文彦, 田村宗明, 吉田彩佳, 李 昌一, 落合邦康, 小木曾文内: 新たな根管清掃・消毒法に関する基礎的研究 - 超音波振動が低濃度過酸化水素水の活性酸素種発生に及ぼす影響 -, 第137回秋季日本歯科保存学会, 11月22 - 23日, 広島, 2012.

14. 明石俊和, 林 誠, 小木曾文内: 歯科用エアスケラーによる根管治療 髄腔開拓から根管形成そして根管洗浄について, 第137回秋季日本歯科保存学会, 11月22 - 23日, 広島, 2012.

15. 松本桜子, 林 誠, 鈴木裕介, 鈴木直人, 前野正夫, 小木曾文内: MTA は未分化間葉系細胞 C2C12 の骨芽細胞への分化を促進する, 第22回日本歯科医学会総会, 11月9日 - 11日, 大阪, 2012.

16. S. Matsumoto, M. Hayashi, N. Suzuki, M. Maeno, B. Ogiso: MTA Controls the Differentiation of C2C12 Cells into Osteoblasts, The 6th IADR Pan European Region (PER) Congress & Exhibition, September 12-15, Helsinki, Finland, 2012.

17. 清水康平, 林 誠, 矢崎直香, 小森規雄, 小木曾文内: 慢性根尖性歯周炎に起因した口腔顔面領域における疼痛異常の神経機構, 第136回春季日本歯科保存学会, 6月28 - 29日, 那覇, 2012.

18. 明石俊和, 林 誠, 小木曾文内: エンドチップによる根管治療 - バリオス 970 の活用 -, 第33回日本歯内療法学会学術大会, 6月16 - 17日, 東京, 2012.

19. 尾形英大 小森規雄 鈴木裕介 林 誠, 高木章三, Laurence C. CHOW, 小木曾文内: フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントの物理的特性, 第135回秋季日本歯科保存学会, 10月20 - 21日, 大阪, 2011.

20. 岩田桜子, 林 誠, 武市 収, 清水康平, 鈴木直人, 前野正夫, 小木曾文内: MTA の骨芽細胞分化促進作用は溶出する Ca<sup>2+</sup>を介する. 第135回秋季日本歯科保存学会, 10月20 - 21日, 大阪, 2011.

21. 明石俊和, 林 誠, 小木曾文内: 超音波チップによる根管治療 髄腔開拓から根管形成そして根管洗浄・清掃について. 第32回日本歯内療法学会学術大会, 7月30 - 31日, 長崎, 2011.

## 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