

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462898

研究課題名(和文) ケイ酸カルシウムを添加したフルオロアパタイト形成セメントに関する基礎的研究

研究課題名(英文) A basic study of fluorapatite-forming calcium phosphate cement with calcium silicate

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は歯内療法における高い臨床的有用性が認められている。しかしながら硬化時間の短縮などの問題点も指摘されており、これを改善したセメントを開発することは臨床上有用と考えられる。本研究では骨補填材であるリン酸カルシウムセメントに着目し、フッ化ナトリウムとケイ酸カルシウムを配合させたCPCを試作し、歯内療法用セメントとしての有用性について検討した。その結果、生体親和性、辺縁封鎖性および細胞に及ぼす影響などはMTAと同等であるが、硬化時間が有意に短いことが確認された。以上のことから、本材は歯内療法用セメントとして使用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mineral trioxide aggregate (MTA) is a promising biomaterial in endodontic treatments. However, a disadvantage of this material is its difficult handling properties, namely, relatively long setting times. Thus, a need has been identified for the development of materials more suitable for endodontic applications. Calcium phosphate cement (CPC) has become a subject of interest in medical applications as bone graft biomaterials. For endodontic treatments, fluorapatite-forming CPC with tricalcium silicate (FA-forming CPC with TCS) was developed and evaluated for endodontic cements. In results, setting time of FA-forming CPC with TCS was shorter than that of MTA, on the other hand, it has similar sealing ability and biocompatibility as those of MTA. These results suggested that FA-forming CPC with TCS had an appropriate characteristic as endodontic cements. Therefore, FA-forming CPC with TCS may be useful for endodontic applications.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯内療法用セメント リン酸カルシウムセメント フルオロアパタイト ケイ酸カルシウム

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯内療法領域で使用されるセメントや充填材料としては、酸化亜鉛ユージオールセメント、水酸化カルシウム、ガラスイオノマーセメントおよび各種レジン材料などが、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 Mineral Trioxide Aggregate (MTA) が高い生体親和性および辺縁封鎖性を持つことから、多くの症例で使用されるようになった。近年では、その適応範囲は逆根管充填、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 MTA の硬化時間は3時間以上を要し他のセメントと比較すると最も長いことや、MTA の混和後の状態は狭小な場所に充填するには難しいため操作性の改善なども指摘されている (Parirokh M *et al.*, J Endod 2010;36:400-413)。また、生体に及ぼす影響に関しては細胞培養実験や動物実験などがこれまでに進められてきた (Torabinejad M *et al.*, J Endod 2010;36:190-202) が、その詳細なメカニズムについては不明な点が多く、材料の価格自体も高価であると認識されている (Mooney GC *et al.*, Dent Traumatol 2008;24:65-69)。したがって、これらの問題点を解決した新たな歯内療法用セメントの開発は歯科临床上非常に有用であると考えられる。

(2) 代表者は歯内療法用セメントに関する基礎的研究を継続して行っており、MTA は水酸化カルシウム製材と比較して優れた硬組織形成促進作用と高い細胞遊走能および細胞増殖能があり、これには遊離するカルシウムイオンが関与することを明らかにした (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)。さらに、MTA からのカルシウムイオンは未分化間葉系細胞の細胞質に直接取り込まれ、骨芽細胞への分化に導くことも報告した (Hayashi M *et al.*, J Endod 2013;39:68-75、Hayashi M *et al.*, J Hard Tissue Biology 2013;22:13-18)。そこでカルシウムイオンが歯内療法用セメントとしての重要な要件の1つであると考え、水分の介在でハイドロキシアパタイトを形成する Calcium Phosphate Cement (CPC) に着目し、MTA の問題点を改善した新たな歯内療法用セメントへの応用について検討を始めた。これまでに、CPC 粉末とグリセロールをあらかじめ混和させておき歯内療法用に操作性を改善させたときの骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響 (Hayashi M *et al.*, Dent Mater J 2012;31:92-97) や CPC にフッ化物を添加してフルオロアパタイト (fluorapatite: FA) を形成させた時の結晶性、吸収性などの材料学的特性 (Hayashi M *et al.*, J Res Natl Inst Stand Technol 2010;115:267-276) について検討してきた。

(3) そこで代表者は次の研究段階として、ケイ酸カルシウム (tricalcium silicate: TCS) は水分と反応してカルシウム-ケイ酸水和物ゲルを形成し高い封鎖性につながるとの報告 (Camilleri J, Dent Mater 2011;27:836-844) を受け、フッ化ナトリウムおよび TCS を添加させることによって新しい歯内療法用セメントである TCS を添加した FA を形成する新しい歯内療法用セメント (FA-forming CPC with TCS) としての可能性を検証するという着想に至った。

2. 研究の目的

上記の背景より、新しい歯内療法用セメントの開発を目的とし、FA-forming CPC with TCS を試作し、歯内療法用セメントとして重要な理工学的特性、辺縁封鎖性、生体親和性、硬組織形成細胞に及ぼす影響、実験動物に歯内療法処置を応用した際の生体反応などを MTA と比較検討した。

3. 研究の方法

(1) 供試材料

供試材料として CPC に FA を形成させるためにフッ化ナトリウムと高い封鎖性を獲得するために TCS を添加させた FA-forming CPC with TCS を用いた。対照材料として歯内療法領域の代表的なセメントである MTA を使用した。

(2) 理工学的特性

① 硬化時間ダイアメトラル引張強さ

硬化時間はギルモア針 (453.5 g) を用いて、試験片に針跡がつかなくなるまでの時間とした。

② ダイアメトラル引張強さ

ダイアメトラル引張強さは直径 6 mm、厚さ 3 mm の円板状試料を用い、クロスヘッド速度 10 mm/min で測定した。

③ X線回折 (XRD) による成分分析

ダイアメトラル引張強さに使用した試料を細かく粉砕し、垂直マウントのディフラクションシステム (DMAX 2000, Rigaku) を用い、40 kV、40 mA で照射した $\text{CuK}\alpha$ 線によって得られる XRD パターンを計測した。

④ セメント浸漬溶液の pH 測定

pH 測定は粉砕した試料を 30 mM KCl 溶液に浸漬し、攪拌中の溶液 pH を測定した。

(3) 辺縁封鎖性

ヒト新鮮単根抜去歯を通法に従い根管口を明示した後、Ni-Ti ロータリーファイルであるプロテーパー F3 まで根管拡大・形成を行った。その後、根尖部を歯軸長軸に垂直に 3 mm 切除し、逆根管充填窩洞をレトロチップにて

3 mm の深さで形成し、各被験材料をプラグーにて填塞した。

細菌漏洩試験は Split Chamber 法 (図 1) を用いて行った。すなわち、upper chamber に抜去歯を固定し、ヒト唾液および *Enterococcus Faecalis* を根管内に挿入した。また、lower chamber には細菌の漏洩を評価するために purple broth を入れた。細菌漏洩の判定は、purple broth の色の変化 (紫→黄) により行い、37°C、湿度 100% の条件下で 4 週間観察した。なお、被験材料未填入のものを Positive Control (PC)、根尖部をネイルバーニッシュで被覆したものを Negative Control (NC) とした。

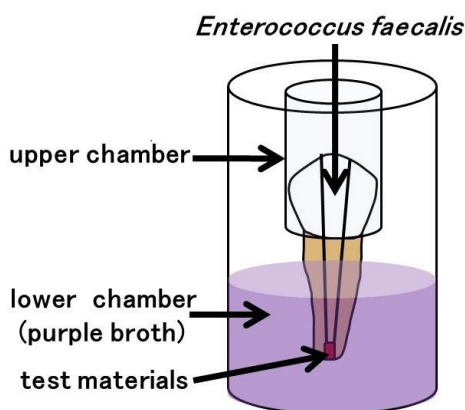


図 1. Split Chamber 法

(4) 生体親和性

ラット背部皮下組織内に FA-forming CPC with TCS を填入したポリエチレンチューブを埋入し、*in vivo* における生体親和性についてチューブ断端の組織反応を病理組織学的に MTA と比較検討した。

(5) 硬組織形成細胞に及ぼす影響

FA-forming CPC with TCS の骨芽細胞に対する影響を MTA と比較検討した。骨芽細胞は、ラット骨肉腫由来の株化骨芽細胞 (ROS 17/2.8 細胞) を用い、24 穴の cell culture insert plate の lower chamber に ROS 17/2.8 細胞 (2.0×10^4 cells)、upper chamber に直径 3 mm、厚さ 0.5 mm の形状で硬化させた FA-forming CPC with TCS または MTA を静置して 9 日間培養した。一定期間培養後、細胞数の測定および光学顕微鏡下で細胞形態の観察を行った。さらに、基質としてパラニトロフェニルリン酸を利用した比色法によってアルカリホスファターゼ (ALPase) 活性を測定した。

(6) 実験動物に歯内療法処置を応用

した際の生体反応

ラットの臼歯を使用して FA-forming CPC with TCS を用いた直接覆髄法を施行し、*in vivo* における病理組織学的検索を HE 染色にて行った。

4. 研究成果

(1) 理工学的特性

FA-forming CPC with TCS の硬化時間およびダイアメトラル引張強さは、それぞれ 10.3 ± 0.6 分、 3.89 ± 0.76 MPa であり、TCS を添加しなかった FA-forming CPC と比較して有意な ST の短縮と DTS の向上が認められた。また、FA-forming CPC with TCS 硬化後の XRD では、高い結晶性を有する FA の形成が示された (図 2)。FA-forming CPC with TCS の pH は MTA よりも低かったが、pH 11.0 の高いアルカリ性であり、TCS を添加しなかった FA-forming CPC と比較して高い値であった (図 3)。

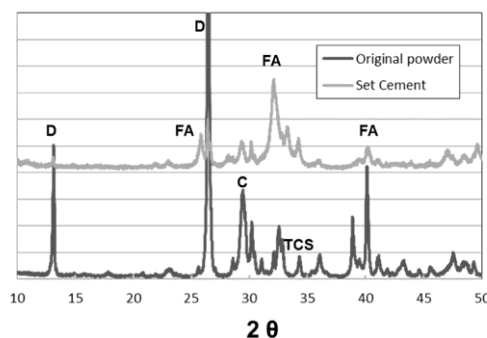


図 2. FA-forming CPC with TCS の成分分析

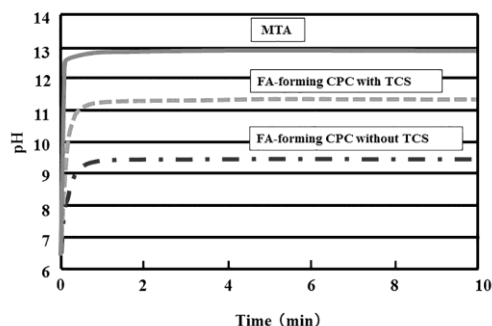


図 3. FA-forming CPC with TCS の pH

(2) 辺縁封鎖性

一部の FA-forming CPC 群において細菌漏洩は認められたが、MTA 群と有意差は認められなかった。一方、すべての PC 群では 24 時間以内に漏洩が確認され、NC 群では実験期間内において漏洩は認められなかった。

(3) 生体親和性

ラット皮下組織を用いた生体親和性試験では、FA-forming CPC with TCS の組織反応は MTA と有意差は認められず、高い生体親和性を確認した (図 4)。これらのことから、FA-forming CPC with TCS は歯内療法用セメントとして望ましい理工学的特性および MTA と同程度の生体親和性を示すことが明

らかになった。

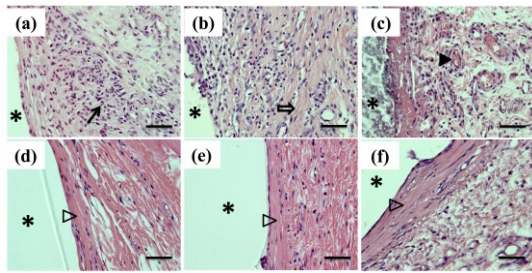


図 4. FA-forming CPC with TCS の組織反応

a, d : ポリエチレンチューブ

b, e : FA-forming CPC with TCS

c, f : MTA

→ : 炎症性細胞, * : ポリエチレンチューブ,

▷ : コラーゲン線維, ▶ : 血管の充血,

— : 50 μm

(4) 硬組織形成細胞に及ぼす影響

細胞増殖, 細胞形態 (図 5) および ALPase 活性において, FA-forming CPC with TCS と MTA 間に有意差は認められず, FA-forming CPC with TCS の骨芽細胞に対する影響は, MTA と同程度であることが明らかとなった。

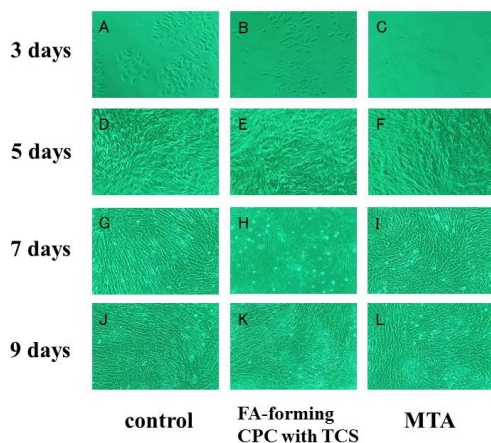


図 5. FA-forming CPC with TCS が骨芽細胞に及ぼす影響

(5) 実験動物に歯内療法処置を応用した際の生体反応

FA-forming CPC with TCS は 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しており, 現在も実験を継続している。

以上の結果から, FA-forming CPC with TCS は代表的な歯内療法セメントである MTA の欠点である硬化時間を改善し, 同等な生体親和性や封鎖性を具備していることが推察された。FA-forming CPC with TCS は, 新たな歯内療法用セメントとしての有用性が示唆された。

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. T. Yasukawa, M. Hayashi, N. Tanabe, H. Tsuda, Y. Suzuki, T. Kawato, N. Suzuki and B. Ogiso: Involvement of the calcium-sensing receptor in mineral trioxide aggregate-induced osteogenic gene expression in murine MC3T3-E1 cells, *Dent Mater J*, in press, 2017. 査読有
DOI: 10.4012/dmj.2016-313
2. H. Ogata, S. Takagi, M. Hayashi, T. Yasukawa, H. Ibi, Y. Hirano, Y. Suzuki, S. Matsuura, B. Ogiso and LC. Chow: *In vitro* properties of fluorapatite-forming calcium phosphate cements, *Jpn J Conserv Dent*, 59 (6), 472-478, 2016. 査読有
DOI: 10.11471/shikahozon.59.472
3. 林 誠, 小木曾文内: MTA の生物学的特性 —細胞, 組織に対する作用—, 日本歯科理工学会誌, 第 35 巻 4・5 号, 241-244, 2016. 査読有
http://www.kokuhoken.or.jp/publication/de_28.shtml
4. 林 誠: 新規歯内治療用セメントの開発に関する基礎的研究、日本大学歯学部同窓会会誌, 第 59 巻 3 号, 9-11, 2015. 査読無
https://www.aa-nusd.jp/page/index.php?action=details&page_id=2060
5. Y. Suzuki, M. Hayashi, T. Yasukawa, H. Kobayashi, K. Makino, Y. Hirano, S. Takagi, LC. Chow and B. Ogiso: Development of a novel fluorapatite-forming calcium phosphate cement with calcium silicate: In vitro and in vivo characteristics, *Dent Mater J*, 34 (2), 263-269, 2015. 査読有
DOI: 10.4012/dmj.2014-255
6. Y. Suzuki, M. Hayashi, N. Tanabe, T. Yasukawa, Y. Hirano, S. Takagi, LC. Chow, N. Suzuki and B. Ogiso: Effect of a novel fluorapatite-forming calcium phosphate cement with calcium silicate on osteoblasts in comparison with mineral trioxide aggregate, *J Oral Sci*, 57 (1), 25-30, 2015. 査読有
DOI: org/10.2334/josnusd.57.25

[学会発表] (計 6 件)

1. 安川拓也, 林 誠, 黄 紀蓉, 田邊奈津子, 川戸貴行, 小木曾文内: 骨芽細胞における calcium-sensing receptor を介した mineral trioxide aggregate による骨形成誘導, 第 146 回春季日本歯科保存学会, 6 月 8-9 日, リンクステーションホール青森 (青森県・青森市), 2017.
2. 安川拓也, 林 誠, 羽鳥啓介, 田邊奈津子, 川戸貴行, 小木曾文内: Mineral

trioxide aggregate による骨芽細胞の分化促進に及ぼす Calcium-sensing receptor の関与, 第 145 回秋季日本歯科保存学会, 10月27-28日, キッセイ文化ホール (長野県・松本市), 2016.

3. 安川拓也, 林 誠, 田邊奈津子, 津田啓方, 鈴木直人, 前野正夫, 小木曾文内: Mineral trioxide aggregate は calcium-sensing receptor を介して骨芽細胞の分化を促進する, 第25回硬組織再生生物学会, 8月26-27日, 日本大学歯学部大講堂 (東京都・千代田区), 2016.
4. M. Hayashi, M. Tamura, S. Takagi, L. Chow, K. Ochiai, B. Ogiso: Bacterial leakage of fluorapatite-forming calcium phosphate cement containing tricalcium silicate, 45th Annual Meeting & Exhibition of the American Association for Dental Research, March 16-19, Los Angeles (USA), 2016.
5. T. Yasukawa, M. Hayashi, N. Tanabe, H. Tsuda, N. Suzuki, B. Ogiso: Osteogenic gene expression induced by MTA via calcium-sensing receptor, 45th Annual Meeting & Exhibition of the American Association for Dental Research, March 16-19, Los Angeles (USA), 2016.
6. 鈴木裕介, 林 誠, 安川拓也, 鈴木菜お, 鶴町 保, 鈴木直人, 小木曾文内: NEX MTA セメントが骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響, 第140回春季日本歯科保存学会, 6月19-20日, 滋賀県立芸術劇場 (滋賀県・大津市), 2014.

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

(4) 研究協力者

CHOW, Laurence C.
TAKAGI, Shozo
鈴木 裕介 (SUZUKI, Yusuke)
安川 拓也 (YASUKAWA, Takuya)