

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462902

研究課題名(和文)リン酸カルシウム系生体親和性覆髄材の創製と細胞生物学的評価

研究課題名(英文)Development of biocompatible direct pulp capping cements and the biological effects of the cements on the dental pulp stem cell activities

研究代表者

吉田 隆一 (Yoshida, Takakazu)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：80102127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新たな -TCP/Te-CPセメント創製のために2Mリン酸二水素Na水溶液を用い、水酸化Ca製剤を比較対照として、各セメント浸漬培地を作製しセメントの生体親和性を検討した。セメントからの溶出物の影響をヒト歯髓由来幹細胞を用いて検討したところ、-TCP/Te-CPセメント溶出物は細胞増殖を阻害せず、ALP活性の上昇と骨芽細胞マーカー遺伝子の発現上昇に寄与した。またラット直接覆髄モデルの検討では、水酸化Ca覆髄群でTUNEL陽性細胞が多数みられたが、-TCP/Te-CPセメント群では、顕著な炎症所見はみられず、被蓋硬組織誘導効果がみられ、生体親和性の高い直接覆髄材として有望であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：To develop a novel -TCP / Te-CP cement, 2 M sodium dihydrogen phosphate solution was selected for the cement. To examine the biocompatibility of the cement, we prepared the cement-immersed media. The calcium hydroxide (Ca(OH)₂) formulation was used as a control. Effects of the eluate from these cement were examined using human dental pulp derived stem cells (hDPSC). Our results revealed that the eluate from our cement did not inhibit cell proliferation, contributing to an increase in ALP activity and in the expression of osteoblast marker genes. In addition, in the animal studies of direct pulp capping, TUNEL positive cells were prominently found in the Ca(OH)₂ capped grope, however, in our cement group, there were no significant inflammation findings. In addition, hard tissue regeneration was observed in our cement group. These results suggested that our novel cements indicated both cytocompatible and tissuecompatible properties for pulpal tissue as a direct pulp capping agent.

研究分野：歯科保存学

キーワード：直接覆髄 リン酸カルシウムセメント 歯髓由来幹細胞 被蓋硬組織誘導 生体親和性 バイオマテリアル バイオアクティブ

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎え、咬合機能の維持の重要性が再認識されている。健全な歯の維持は国民の QOL 維持に不可欠であり、それには象牙質・歯髄複合体が重要な役割を果たしている。抜髄を行った歯は破折のリスクが高く変色等の審美的な問題もあり、歯髄を健全な状態で保つことが重要である。

歯科保存療法の1つである直接覆髄法は窩洞形成時等に偶発的に露出した歯髄を薬剤で保護することにより治癒を図る方法である。臨床の現場では従来から水酸化カルシウム製剤が汎用されてきたが、強アルカリ性であることから抗菌作用を有し硬組織形成が認められる反面、歯髄組織への為害性、辺縁漏えい、溶解性、修復象牙質内のトンネル状欠損など、問題点も指摘されている。そこで、現在様々な根管用セメントの覆髄材としての応用研究がなされており、中でも生体の硬組織の無機成分であるリン酸カルシウム系材料は生体親和性が高く硬組織誘導能を有するため注目を集めている。

このような背景から我々は水酸化アパタイト(HA)を適切な温度で熱分解すると、2対1のモル比で、酸性を示す α -リン酸三カルシウム(α -TCP)とアルカリ性を示すリン酸四カルシウム(Te-CP)に分解されることに着目し、 α -TCP/Te-CP 両相から成るセメントがアパタイト形成に寄与するとの仮説のもと、覆髄材、あるいは根管充填材としての応用を目的として pH の調整が可能なリン酸カルシウム系セメント(α -TCP/Te-CP セメント)の覆髄材として応用の可能性を検討するため、種々の練和液を用いて、覆髄セメントとしての操作性や、細胞培養系および動物モデルでの評価によりを行い、歯髄・象牙質複合体本来の治癒能力を阻害しないセメント材料の開発の開発を行った。

2. 研究の目的

我々が開発中の α -リン酸三カルシウム(α -TCP)/リン酸四カルシウム(Te-CP)混合セメントは硬組織の無機成分であるヒドロキシアパタイトを熱分解した場合と同等のモル比(2:1)から成る。本研究では、この α -TCP/Te-CP セメントの特性を詳細に解析するため、以下の3項目に沿って研究を実施した。

(1) 直接覆髄材の具備条件に合致する練和液の選定

(2) α -TCP/Te-CP セメント上での歯髄由来幹細胞培養試験

(3) ラット露髄モデルへの直接覆髄実験による覆髄材としての有用性の検討

これらの検討を行い、培養系での細胞応答および動物モデルでの歯髄組織の応答を解析して、適切な操作性を備え生体本来の治癒能力を阻害せずに被蓋硬組織の形成を導く組織親和性の高い覆髄材の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 直接覆髄材の具備条件に合致する練和液の選定

< pH の異なる練和液によるセメントの作成と、物理化学的性状の検討による練和条件設定 >

正リン酸、リン酸二水素ナトリウム、あるいはクエン酸からなる pH の異なる練和液を作製し、それぞれ粉液比を変化させて歯科用セメントとしての操作性を検討するとともに練和後の pH 変化を経時的に評価し、さらに、練和直後に疑似体液、細胞培養用培地に浸漬し、pH 変化を検討した。

(2) α -TCP/Te-CP セメント上での歯髄由来幹細胞培養試験

< 作成した種々のセメント上での歯髄幹細胞の接着、増殖、石灰化への分化評価 >

上記(1)により操作性の優れた α -TCP/Te-CP セメントを絞り込み、セメントを浸漬した培養液を用いてヒト歯髄由来幹細胞(hDPSC)を培養し、細胞の接着および増殖評価および、生死判定を行った。さらに、培養期間を延長し、アルカリホスファターゼ(ALP)活性の測定、骨芽細胞マーカー遺伝子、象牙芽細胞マーカー遺伝子の mRNA 発現変化をリアルタイム PCR 法にて検討した。ルへの直接覆髄実験による覆髄材としての有用性の検討した。

(3) 経時的に作成した組織切片の組織化学的、免疫組織化学的解析

8週齢の雄性 Wistar ラットの右側上顎第一臼歯を歯科用エンジンにて露髄させ、条件を絞り込んだ α -TCP/Te-CP セメントを填入する群と比較対照としてダイカル®を填入する群を作製し覆髄部での歯髄組織の反応、および被蓋硬組織形成過程でどのような細胞が機能しているかを検討するため、パラフィン包埋切片を経時的に作成して以下の組織化学的・免疫組織化学的解析を行った。具体的には、HE 染色後の切片について、覆髄部の組織の経時的な変化と、被蓋硬組織形成の有無、被蓋硬組織が形成された試料では形成組織の形態を詳細に比較検討した。また、増殖細胞核抗原や KI-67 などの細胞増殖マーカーの検出と炎症性を、被蓋硬組織形成過程の切片では象牙芽細胞マーカーの検出のため複数のマーカーについて、免疫組織化学的検討を行った。

4. 研究成果

直接覆髄薬作製のための練和液の選定

覆髄セメント存在下での歯髄由来幹細胞の動態解析

の結果から試作セメントを用いたラット露髄モデルでの直接覆髄効果の検討を行い、以下の結果を得た。

直接覆髄薬作製のための練和液の選定のため、4種のリン酸系水溶液を用いて α -リン酸三カルシウム/リン酸四カルシウム(α -TCP/Te-CP)粉末を練和し、操作性、pH変動を検討した結果、1Mリン酸二水素ナトリウム水溶液、2Mリン酸二水素ナトリウム水溶液、1Mクエン酸の水溶液を選定した。

覆髄セメント存在下での歯髄由来幹細胞の動態解析として、覆髄セメントのヒト歯髄由来幹細胞(hDPSC)に対する細胞毒性評価と覆髄セメント存在下でのhDPSCの増殖について検討した。検討の方法として、覆髄後のセメントの歯髄組織への作用を想定して、練和直後のセメントを培養液に浸漬し、溶出する成分の細胞毒性と細胞増殖におよぼす影響を検討した結果、 α -TCP/Te-CPセメントの溶出成分は比較対照とした水酸化Caセメントからの溶出成分が顕著な細胞毒性を示し、細胞増殖を阻害したのに対し、 α -TCP/Te-CPセメントはほとんど細胞毒性を示さず、細胞増殖を阻害しないことが明らかとなった(図1)。

次いで、細胞の接着や伸展について、形態観察を中心に行った。その結果、播種後3から6時間の解析で2Mリン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とした群で、細胞接着が良好であり、個々の細胞の伸展を蛍光染色後の細胞の面積を算出して比較検討した結果も2Mリン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とした群で細胞の伸展が有意にみられた。また、カルセイン・ヨウ化プロピジウム(PI)染色でも、2Mリン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とした群ではPI陽性細胞は検出されず、一方で、Dycal群では多数のPI陽性細胞が検出され、他の α -TCP/Te-CPセメント群にも散見されたことから2Mリン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とした α -TCP/Te-CPセメントが細胞親和性に優れているとの示唆を得た。

また、セメント溶出物がhDPSCの骨芽細胞様細胞への分化に及ぼす影響について、7日間~21日間培養して経時的に固定あるいはタンパク質試料、RNA試料を回収し、骨芽細胞マーカーについて解析したところ、水酸化Ca製剤では細胞活性が著しく低下し、7日目以降の解析が困難であった。 α -TCP/Te-CPセ

メント浸漬培地で培養したhDPSCでは、アルカリホスファターゼ(ALP)染色で青染され、タンパク質試料を用いたALP活性測定でも活性上昇しており、リアルタイムPCRによる解析で、骨芽細胞マーカーであるALPおよびオステオカルシンの発現上昇がみられた。

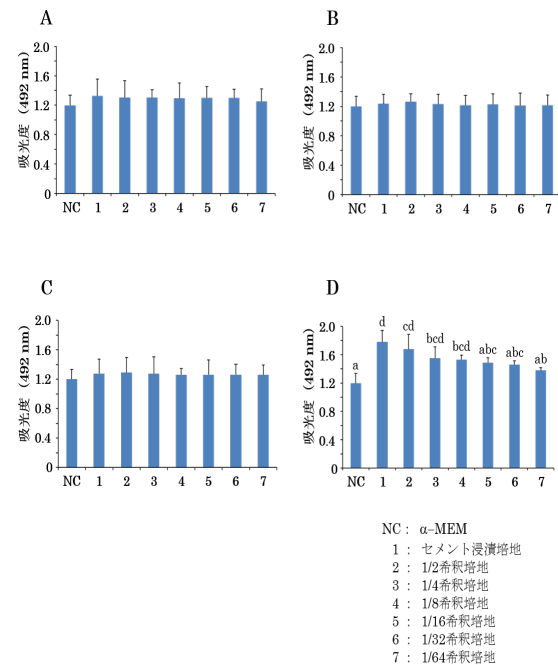


図1 セメント浸漬培地のhDPSCに対する毒性評価
A: セメントA浸漬培地およびその希釈培地中に漏出したLDH活性評価
B: セメントB浸漬培地およびその希釈培地中に漏出したLDH活性評価
C: セメントC浸漬培地およびその希釈培地中に漏出したLDH活性評価
D: 水酸化Ca製剤浸漬培地およびその希釈培地中に漏出したLDH活性評価
グラフは各群の平均値と標準偏差を示す(n=4).
グラフ中のa-dは異なるアルファベット間に有意差があることを示す(p<0.05).

ラット露髄モデルを作製して、練和液を1Mリン酸二水素ナトリウム水溶液、2Mリン酸二水素ナトリウム水溶液、1Mクエン酸の水溶液とした α -TCP/Te-CPセメントと、水酸化Caセメントにて直接覆髄を行い、覆髄後7日の組織応答について解析した結果、水酸化Caセメント覆髄群ではセメント直下に壊死層がみられ、多数のTUNEL陽性細胞が検出されたのに対し、3種の α -TCP/Te-CPセメント覆髄群ではTUNEL陽性細胞は少なく、歯髄組織の増殖がみられるものもあった(図2)。

次いで、覆髄後7日の群に増殖細胞のマーカーである増殖細胞核抗原(PCNA)の免疫染色を行ったところ、Dycal群では陽性細胞がほとんど検出されなかった一方で、3種の α -TCP/Te-CPセメント覆髄群ではPCNA陽性細胞がみとめられ、特に2Mリン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とした群で顕著であった。

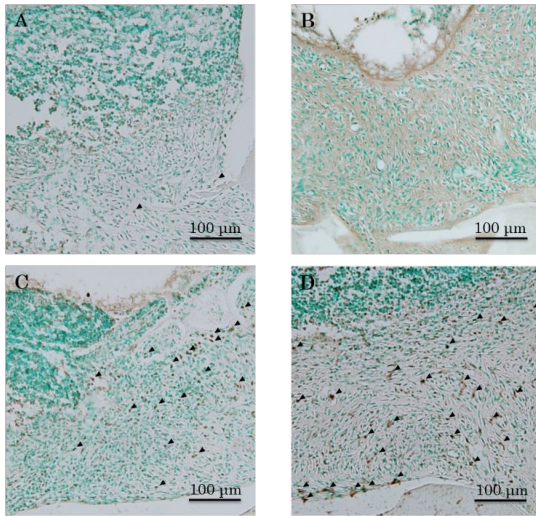


図2 覆髄7日後のTUNEL陽性細胞の分布
 A: セメントAで覆髄後, 7日目の歯髄組織のTUNEL染色像
 B: セメントBで覆髄後, 7日目の歯髄組織のTUNEL染色像
 C: セメントCで覆髄後, 7日目の歯髄組織のTUNEL染色像
 D: 水酸化Ca製剤で覆髄後, 7日目の歯髄組織のTUNEL染色像
 矢頭はTUNEL陽性細胞を示す。

また、覆髄後 14 日の群では、Dycal 群に先駆けて、 α -TCP/Te-CP セメント覆髄群で被蓋硬組織の形成がみとめられた。さらに、覆髄後 14 日以降に形成された被蓋硬組織のピクロシリウスレッド染色、マッソンゴールドナー染色を行い観察した結果、 α -TCP/Te-CP セメント直接覆髄群で被蓋硬組織が形成されており、一層の象牙芽細胞様の細胞の配向をみとめた。

以上から、2M リン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とした α -TCP/Te-CP セメントが直接覆髄材として有望であると示唆された。

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 4 件)

1. 吉田 康一, 吉田 隆一, 伊東 智美, 殿内 利夫, 斎藤 達哉, 瀧谷 佳晃, 河野 哲. 歯科医療用機能水の氷結保存前後における諸性質の変化. 日本歯科保存学雑誌. 58:456-473. 2015.
2. 河野 哲, 松原 誠, 大橋 たみえ, 奥野公巳郎, 吉田 隆一. 根尖孔外への根管治療薬(Vitapex)の溢出により生じた下唇麻痺症例. 岐阜歯科学会雑誌. 41:191-197, 2015.
3. 神山 智佳子, 河野 哲, 武田 進平, 吉田 隆一. α -TCP/Te-CP セメントの根管充填用シーラーへの応用. 日本歯科保存学雑誌. 58:124-142, 2015.
4. 吉田 康一, 吉田 隆一, 吉田 隆一. 強電解酸性水の残留塩素濃度測定が可能なメタクリル酸銀検知液の開発. 日本歯科保存学雑誌. 57:43-57, 2014.

[学会発表](計 27 件)

1. Hayashi Y, Kawaki H, Hori M, Hasegawa T, Tanaka M, Kawano S, Yoshida T, Tamaki Y. Characteristics of experimental calcium silicate as a pulp capping material. International Dental Materials Congress 2016. 2016年11月4日~6日. Bali, Indonesia.
 2. 奥野公巳郎, 川木晴美, 田中雅士, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. 骨補填材として応用した象牙質顆粒中の有効成分の探索. 第145回日本歯科保存学会平成28年度秋季大会. 2016年10月27日~28日. 松本.
 3. 林佑美代, 堀 雅晴, 河野 哲, 川木晴美, 玉置幸道, 吉田隆一. 石膏添加型試作ケイ酸カルシウムの覆髄材としての特性解析. 第37回日本歯内療法学会学術大会. 2016年7月23日~24日. 名古屋.
 4. 奥野公巳郎, 川木晴美, 田中雅士, 長谷川智哉, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. 滅菌象牙質顆粒・幹細胞ハイブリッド骨補填材の機能評価. 第37回日本歯内療法学会学術大会. 2016年7月23日~24日. 名古屋.
 5. 林佑美代, 堀 雅晴, 河野 哲, 川木晴美, 玉置幸道, 吉田隆一. 石膏添加型試作ケイ酸カルシウムの覆髄材としての物理的性質. 第144回日本歯科保存学会平成28年度春季大会. 2016年6月9日~10日. 栃木.
 1. 吉田 康一, 吉田 隆一, 伊東 智美, 殿内 利夫, 斎藤 達哉, 瀧谷 佳晃, 河野 哲. 歯科医療用機能水の氷結保存前後における諸性質の変化. 日本歯科保存学雑誌. 58:456-473. 2015.
 2. 河野 哲, 松原 誠, 大橋 たみえ, 奥野公巳郎, 吉田 隆一. 根尖孔外への根管治療薬(Vitapex)の溢出により生じた下唇麻痺症例. 岐阜歯科学会雑誌. 41:191-197, 2015.
 3. 神山 智佳子, 河野 哲, 武田 進平, 吉田 隆一. α -TCP/Te-CP セメントの根管充填用シーラーへの応用. 日本歯科保存学雑誌. 58:124-142, 2015.
 4. 吉田 康一, 吉田 隆一, 吉田 隆一. 強電解酸性水の残留塩素濃度測定が可能なメタクリル酸銀検知液の開発. 日本歯科保存学雑誌. 57:43-57, 2014.
- [学会発表](計 26 件)
5. 奥野公巳郎, 川木晴美, 田中雅士, 小栗健策, 森 春菜, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. 象牙質 / 幹細胞ハイブリッド骨補填材の機能評価. 第143回日本歯科保存学会秋季大会. 2015年11月12日~13日. 東京.

6. 林佑美代, 堀 雅晴, 河野 哲, 川木晴美, 玉置幸道, 吉田隆一. 試作ケイ酸カルシウムの覆髄剤としての特性. 第 143 回日本歯科保存学会秋季大会. 2015 年 11 月 12 日~13 日. 東京.

7. 田中雅士, 川木晴美, 奥野公巳郎, 小栗健策, 森 春菜, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. 2 種の幹細胞を用いた象牙質・幹細胞凝集複合体による歯周組織再生療法. 第 142 回日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会. 2015 年. 6 月 25 日~26 日. 福岡.

8. 神山智佳子, 武田進平, 河野 哲, 玉置幸道, 吉田隆一. -TCP/Te-CP セメントの根管充填用シーラーへの応用 -酸化ビスマス粒子径による影響-. 第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2014 年 10 月 29 日~31 日. 山形.

9. 長谷川智哉, 川木晴美, 武田進平, 河野哲, 玉置幸道, 土井 豊, 近藤信夫, 吉田隆一. -TCP/Te-CP セメントの直接覆髄薬としての評価. 第 141 回日本歯科保存学会秋季学術大会. 2014 年 10 月 29 日~31 日. 山形.

10. 神山智佳子, 武田進平, 河野 哲, 玉置幸道, 吉田隆一. -TCP/Te-CP セメントの根管充填用シーラーへの応用 : セメント硬化体の pH 挙動, XRD, SEM および色素浸透性. 第 64 回日本歯科理工学会. 2014 年 10 月 4 日~5 日. 広島.

11. 長谷川智哉, 川木晴美, 神谷真子, 河野 哲, 高山英次, 土井 豊, 玉置幸道, 吉田隆一, 近藤信夫. -TCP/Te-CP セメントの培養歯髓由来幹細胞に対する親和性の検討. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2014 年 9 月 25 日~27 日. 福岡.

12. 田中雅士, 川木晴美, 小栗健策, 森 春菜, 河野 哲, 近藤信夫, 吉田隆一. 象牙質・幹細胞凝集複合体を用いた歯周組織再生療法. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2014 年 9 月 25 日~27 日. 福岡.

13. 長谷川智哉, 川木晴美, 武田進平, 河野 哲, 土井 豊, 近藤信夫, 玉置幸道, 吉田隆一. -TCP/Te-CP セメントの直接覆髄薬としての有用性の検討. 平成 26 年度日本歯科理工学会中部地方会夏期セミナー. 2014 年 8 月 22 日~23 日. 岐阜.

14. 長谷川智哉, 川木晴美, 武田進平, 土井 豊, 近藤信夫, 吉田隆一. -TCP/Te-CP セメントに対する培養歯髓由来幹細胞の応答解析. 第 140 回日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会. 2014 年 6 月 1 8 日~20 日. 大津.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯内療法学ホームページ
<http://scw.asahi-u.ac.jp/~hozon/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田隆一 (Yoshida, Takakazu)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号: 80102127

(2)研究分担者

土井 豊 (Doi, Yutaka)
朝日大学・歯学部・名誉教授
研究者番号: 40116067

(3)研究分担者

近藤信夫 (Kondoh, Nobuo)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号: 40202072

(4)研究分担者

河野 哲 (Kawano, Satoshi)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号: 80340074

(5)研究分担者

川木晴美 (Kawaki, Harumi)
朝日大学・歯学部・准教授
研究者番号: 70513670

(6)研究協力者

長谷川智哉 (Hasegawa, Tomoya)