

機関番号：37114

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592248

研究課題名 (和文) 生体活性ガラス添加リン酸カルシウムセメントの歯内治療への応用

研究課題名 (英文) Application of calcium phosphate cement containing bioactive glasses for endodontic therapy

研究代表者

泉 利雄 (IZUMI TOSHIO)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40248547

研究成果の概要 (和文)：試作リン酸カルシウムセメント (CPC) を直接覆髄材として応用したところ、水酸化カルシウム製剤と同等のデンティンブリッジの形成能を認めた。デンティンブリッジ形成時に歯髄ではアポトーシスが認められ、アポトーシス細胞は約 60% が胞体内にアポトーシスを起こしている、あるいはアポトーシス細胞を貪食している単球・大食球系細胞で、残りはアポトーシスを起こした歯髄細胞と考える。試作 CPC は骨補填材としてハイドロキシアパタイトより優れた硬組織の形成能を示さなかった。

研究成果の概要 (英文)：The dentin bridge formation was observed when a new calcium phosphate cement (CPC) that contained bioactive glasses was used as a pulp capping agent. And there was no significant difference in the ability of dentin bridge formation between the new CPC and a calcium hydroxide. Some apoptic cells were observed in the pulp during dentin bridge formation. It was suggested that about 60% of apoptic cells should be monocytes/macrophages, which contained TUNEL+ nucleus, and the rest should be pulp cells. The new CPC did not make a significant difference in the new bone formation compared with hydroxyapatite as a bone grafting material.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：リン酸カルシウムセメント、bioactive glass、覆髄材、骨補填材

## 1. 研究開始当初の背景

生体活性ガラス (以下 BAG) は、いわゆる生体活性セラミックスの 1 つで骨伝導能を有し骨の形成を促す。BAG には他の生体活性セラミックスと異なり骨芽細胞を刺激する能力もある (schepers, 1991)。BAG を直接覆髄材として用いた実験では、形成されたデンティンブリッジは緻密でなく多孔性であった。

これは粒子間の肉芽組織の残存によるものと考えられる。また骨内に埋入した場合でもすべての BAG 粒子が硬組織形成に関与するわけではなく、一部は異物巨細胞、大食球に貪食されており慢性炎症が長期例でも認められた。BAG 粒子自体は組織液に触れても融合硬化せず一部は組織中に拡散してしまうこと、粒子径が小さいものは異物反応を

起こしやすいことが原因と考えられる。そこで、これらの BAG 粒子の欠点を補うため、コンポジットレジンフィラーの様に 基材の中に BAG 粒子を埋入させて使用してみようと考えた。基材としてリン酸カルシウムセメント（以下 CPC）を選んだ。CPC は、 $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$  と  $\text{CaHPO}_4$  を水と混ぜて硬化させるもので、ハイドロキシアパタイト（以下 HAP）が最終生成物であり、覆髄材として用いた場合、組織の壊死層がほとんど形成されずにデンティンブリッジを作ることができるとされている。しかし、水酸化カルシウムと比較してその象牙質誘導能は劣るという報告もあり、この CPC の欠点を BAG 粒子の骨伝導能と細胞活性で補えないかと考えた。

## 2. 研究の目的

試作 BAG 添加 CPC の、以下の目的での応用を検討する。

(1) 直接覆髄剤として ①現在直接覆髄材として水酸化カルシウム製剤がよく用いられている。対照である水酸化カルシウムと 壊死層の形成量、炎症の程度・継続時間、修復象牙質の形成量・形成状態を比較し 覆髄材として応用可能か検討する。  
②修復象牙質形成過程において、免疫細胞（特に  $\text{M}\phi$  系細胞）の動態を調べ、アポトーシス細胞の発現時期・状態を検索する。

(2) 骨補填材として 人工的に骨欠損部を作り、試作 CPC の骨伝導能を HAP と比較する。

## 3. 研究の方法

(1) 試作 CPC の作成・生体親和性の検索 BAG:CPC=30:70(wt%) とする。予備実験で重量比 30% での混和が操作性を考慮したうえでの最大 BAG 混和量であることを確認した。BAG 100%, 試作 CPC, CPC100% の 3 群につき SD 系 Rat 7 週齢♂を 5 匹ずつ（計 15 匹）使用し、その背部皮下 4 箇所包埋した。4 週後に屠殺してパラフィン切片標本作製し、HE 染色後光学顕微鏡で生体反応を観察した。

(2) 直接覆髄材としての応用 SD 系 Rat 5 週齢♂30 匹の上顎左右第一臼歯冠部歯髄を除去して根管口で歯髄を切断し、対照  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (カルビタール)、試作 CPC で覆髄した。1 日、3 日、7 日、10 日、14 日、21 日

後に屠殺した後、PLP 固定液で固定 EDTA 脱灰し、凍結切片を作製した。HE 染色・免疫組織化学的染色 (ED1・ED2 共に serotec 社)・TUNEL 法 (in situ apoptosis detection kit, TaKaRa 社) による二重染色を施し光学顕微鏡で観察した。陽性細胞数を光学顕微鏡視野内で定量し、統計学的処理を行った。

(3) 骨補填材としての応用 一般的な骨欠損として SD 系 Rat 5 週齢♂の左右頭頂骨にトレフィンバーで直径 4.3mm の穴をあけ、右側の欠損部に HAP あるいは試作 CPC を埋入し、左側の欠損部には 何も埋入せず対照とした。術直後・1 週・2 週・4 週・8 週後に屠殺しパラフィン切片を作製した。切片に対し HE 染色・免疫組織化学的染色を施し光学顕微鏡で観察した。

## 4. 研究成果

(1) 試作 CPC の作成・生体親和性の検索 試作 CPC、BAG、CPC のいずれにおいても試料周囲は線維化され僅かに慢性の炎症性細胞浸潤を認めるのみであった。以上から、試作 CPC は BAG や CPC と同じく優れた生体親和性を持つ可能性が示唆された。

(2) 直接覆髄材としての応用 ①覆髄処置後 3 週でパラフィン切片標本作製し治癒状態を検索したところ、試作 CPC は対照群をほぼ同じデンティンブリッジ形成頻度を示した。水酸化カルシウム製剤では硬組織直下に壊死層の形成が認められたのに対し、試作 CPC では明らかな壊死層の出現は認められなかった。デンティンブリッジ形成量は対照と比較して有意差は認められなかった。(図 1)

②アポトーシスを TUNEL 法により検出した。覆髄 14 日後に認められた TUNEL+細胞は全 TUNEL+細胞の約 60%が ED1+であり残り約 40%が ED1-だった。TUNEL+/ED1+細胞は大部分が胞体内に TUNEL+の核のみを持つ細胞で、同様の TUNEL+/ED2+細胞もごく僅かに認められた。これは単球・大食球系細胞がアポトーシスを起こしている所見と考えられる。

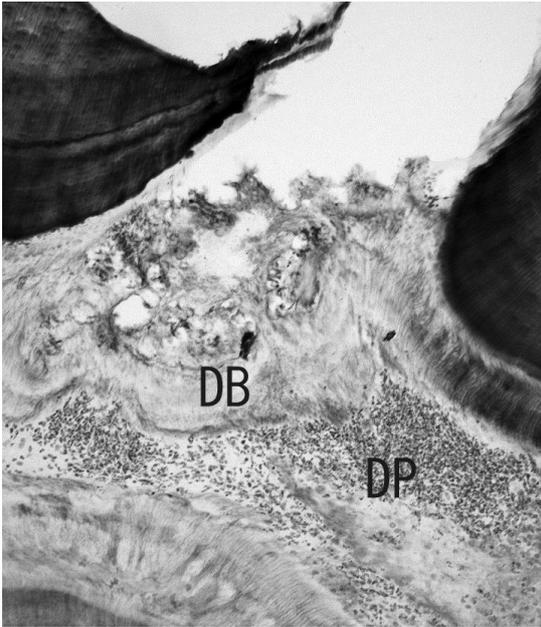


図 1. 試作 CPC 覆髓後 21 日に形成された dentin bridge (DB)

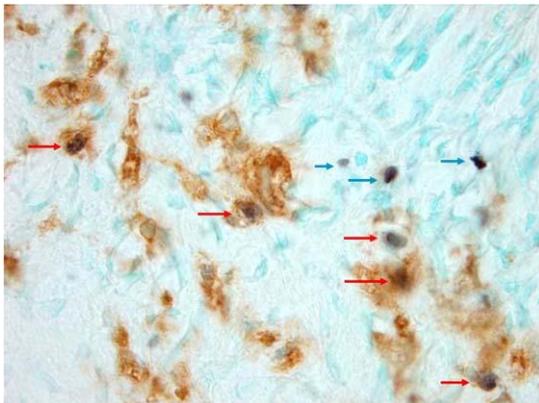


図 2. 覆髓後 2 週の TUNEL 陽性細胞 (黒色) と ED1 陽性大食球 (褐色)

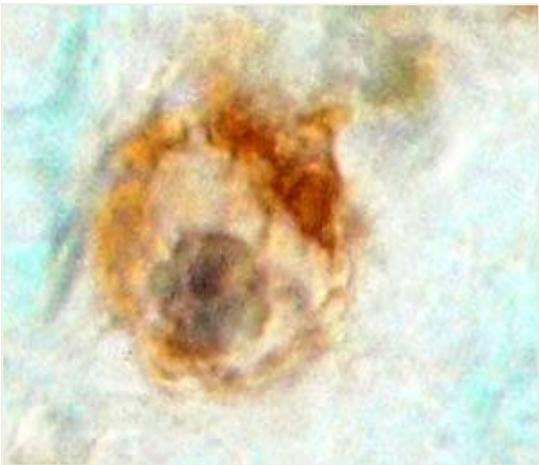


図 3. ED1+で TUNEL+の核のみを持つ細胞

また 胞体内に TUNEL+の核と TUNEL-の核の二つを持つ細胞は、アポトーシスを起こした細胞を貪食している単球・大食球系の細胞と考える。(図 4)

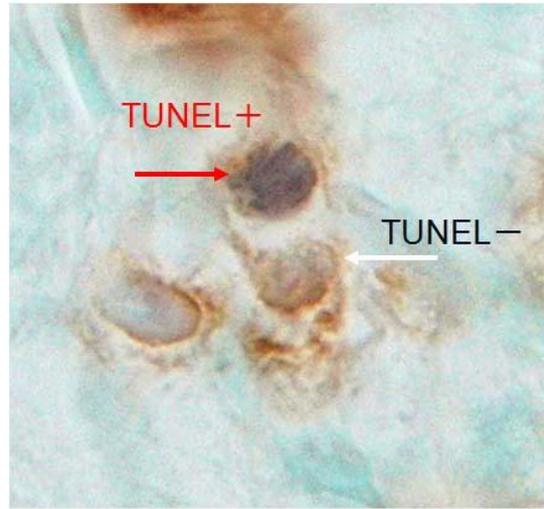


図 4. ED1+で TUNEL+と TUNEL-の二つの核を持つ細胞

約 40%の TUNEL+/ED1-細胞は アポトーシスを生じた ED1-の細胞か あるいはアポトーシスにより ED1の抗原が消失した単球・大食球であることが予想される。TUNEL 法で実際生じているアポトーシス細胞の何パーセントが検出できているのか解らないが、覆髓 2 週後の TUNEL+細胞全てが消失しても正常時の ED1+細胞数とはかなり差があるため、単球の血管内への流入も ED1+細胞数減少に関与している可能性も考えられる。覆髓 2 週後では、炎症反応はほぼ消失し、修復象牙質の形成が認められた。TUNEL+細胞は認められず ED1+細胞数も減少し 正常時の数値に近づいていた。歯髓の創傷治癒過程で歯髓内の細胞のアポトーシスが生じていること、そして その一部は 大食球系の細胞である可能性が示唆された。

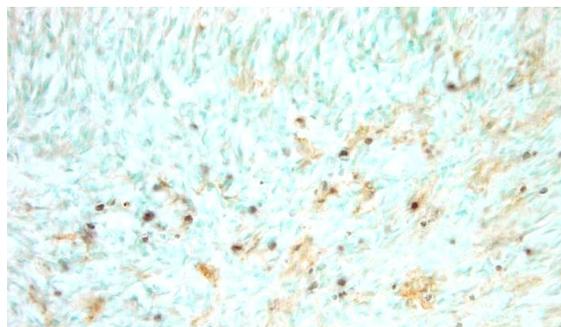


図 5. 覆髓後 2 週の ED2 陽性細胞と TUNEL 陽性細胞

ED2+細胞は治癒過程を通じて細胞数に有意な変化はなく、TUNEL+/ED2+細胞は量的に少なかった。

### (3) 骨補填材としての応用

対照群では、1週後に欠損周囲から骨芽細胞による類骨形成を認めたが、欠損の中央部は肉芽組織のままで8週後も骨の形成および欠損部の容積の回復は起こらなかった。しかし、HAPや試作CPCを充填した群では欠損部の容積が維持され、粒子の周囲には欠損周囲から新生骨が伸びてきた。(図6、7)

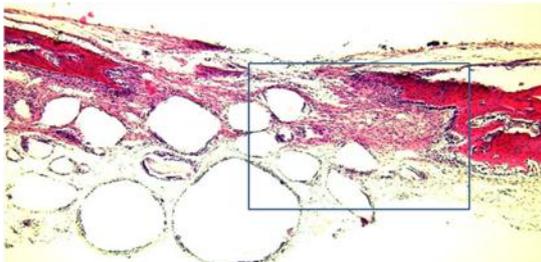


図6. ラット頭頂骨の骨欠損に試作CPC埋入後4週の組織像

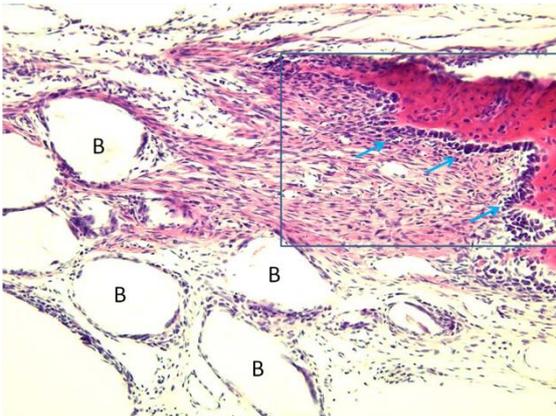


図7. 図6の□枠内の拡大像 BAG粒子(B)と新生骨(□)骨芽細胞(矢印)

試作CPC粒子周囲には、紡錘形の細胞が多層性に配列し、一部には多核の巨細胞も認められた。金本らの報告(1991)では、この巨細胞は破骨細胞の特徴を示すとされている。

新生骨の形成量は、HAPと試作CPCとで有意な差が認められなかった。

### まとめ

・BAG粒子を含有させた試作CPCは良好な生体親和性を示したが、デンティンブリッジ形成能は水酸化カルシウム製剤より優れた成績を示せなかった。

・骨補填材としては、頭頂骨の骨欠損モデルにおいて、欠損部の硬組織形成を

HAPと同程度に促進する可能性が示された。

・覆髄後の歯髄において、歯髄細胞のアポトーシスに加えて、浸潤してきた単球系細胞の一部もアポトーシスを生じてい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3件)

① Fukushima A, Kajiya H, Izumi T, Shigeyama C, Okabe K, Anan H, Pro-inflammatory cytokines induce suppressor of cytokine signaling-3 in human periodontal ligament cells, J Endod, 査読有 vol.36, 2010, 1004-1008

② 阿南壽、松本典祥、泉利雄 (他8名, 1番目と3番目) 歯髄創傷治癒に及ぼすエムドゲインゲルの影響、福岡歯科大学学会雑誌、査読有、36巻2010、1-9

③ Nakao A, Kajiya H, Fukushima H, Fukushima A, Anan H (2 others) PTHrP induces Notch signaling in periodontal ligament cells, J Dent Res, 査読有, vol.88, 2009, 551-556

[学会発表] (計0件)

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

泉利雄 (IZUMI TOSHIO)  
福岡歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号：40248547

#### (2) 研究分担者

阿南壽 (ANAN HISASHI)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80158732

