

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791398

研究課題名 (和文) 歯質石灰化促進材を応用した象牙質再生誘導覆髄法の検討

研究課題名 (英文) Pulp capping method with induction of dentin regeneration by remineralization materials

研究代表者

神農 泰生 (SHINNO YASUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60403490

研究成果の概要：

歯質再生石灰化促進材として、GC社試作の RE-06とサンメディカル社試作のEVA+C（エチレンビニルアルコール共重合体+コラーゲン）添加型スーパーボンドを用いた。

MDPC-23を用いての細胞毒性実験の結果、RE-06は多少の細胞有害性が見られるケースが認められるが、おおむね良好な結果であった。EVA+C添加型スーパーボンドでは、従来の材料とほぼ同等にほとんど細胞有害性が認められなかった。また、細胞分化に関して、両材料ともに一定の分化傾向があることが確認できた。

また、覆髄の際に患部を口腔内環境と隔離するための充填材料について、性質を検討する必要が生じたため、各材料の物性を検討し、覆髄に適した材料を見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	270,000	2,970,000

研究分野：歯科保存修復学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学、象牙質再生、覆髄材、コンポジットレジンの物性

## 1. 研究開始当初の背景

近年、再生医学が医療の可能性を大きく広げている中、歯科保存分野においてもこの再生医学を応用しようとする動きが活発になってきている。象牙質再生がその主たるテーマであり、幹細胞を利用した研究により、歯牙

発生のメカニズムが分子生物学的に解明されつつある。OSP、OSC、DSPP等の細胞分化マーカーの単離や、BMPファミリー、TGF、RUNX2、FGF、ファミリー、WNTファミリーなどの硬組織形成に関わると考えられる分化誘導因子の役割が次々と明らかになってきており、in

in vitroにおける組織再生工学の基礎的研究は成熟してきたといえる。申請者の所属する研究機関においても、BMPファミリー遺伝子とIV型コラーゲンが、歯牙発生において重要な役割を果たすことを明らかにしており、象牙芽細胞への分化誘導についての基礎的研究を継続している。

現在、臨床では歯質の最小限の切削と、それに伴う歯髄の保存が重要視されている。

一般的に、抜髄による歯牙の失活は歯牙の保存年数に大きな影響を与えることは知られている。しかし、露髄部に対する歯科処置は、抜髄または、水酸化カルシウム製剤を用いた象牙質誘導による露髄部の封鎖が通法であった。水酸化カルシウム製剤による封鎖は成功率が高いとはいえ、象牙質が形成された場合でも、新生象牙質は内向性に形成され、菲薄であることが知られており、歯髄保護に有効であるとは言い難い現状である。

申請者の所属する研究機関において、露髄歯牙に対し、外向性に象牙質を形成させることによる歯髄の有効な保護方法について研究を行っていた。外向性増殖を示す、厚みのある象牙質を形成させて、通法に比べてより正常な歯牙形態に近似する象牙質の形成に成功しているものの、既存象牙質との境界の接触形態、封鎖性、歯髄細胞の生存率などに問題が残っており、より有効な材料、方法の検討が必要であった。

一方、修復分野ではミニマルインターベンション (MI) コンセプトに基づいたう蝕治療学がスタンダードとなり、修復時の象牙質切削量の減少を目的とした新しい治療法が次々と検討、実用化されている。申請者の所属する研究機関においても、MIに基づき、吉山らによる接着性レジンの高い封鎖性を応用した、モディファイドシールドレストレーション (MSR) 法の実用検討を行っている。MSR法は

う蝕影響象牙質を切削しないため、歯髄保護に有効である。しかし、う蝕影響象牙質は脱灰変性しており、同部の再石灰化は必須である。この際、西谷らはG C社の試作歯質石灰化促進材を用い、脱灰象牙質の再石灰化を含めた接着システムのMSR法への応用を検討している。

歯科保存分野における再生医療の応用は、脱灰象牙質の再石灰化療法と、組織工学を応用した生物学的覆髄が検討されている。申請者は上記の背景の元に、再石灰化療法と組織工学を融合させるべく、歯質再石灰化促進材に着目し、今回の研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究では、象牙質再石灰化療法を応用した歯髄への為害性の少ない、効率の良い歯髄保護方法を検討することを目的として、in vitroで、歯髄幹細胞を用いた歯質石灰化促進材の生体への影響の分子生物学的、組織学的検討、および改良を検討する。ついで生物学的覆髄の臨床応用を目的として、実験動物を用いて試作歯質石灰化促進材を実験的露髄部に適用し、in vivoにおける象牙質形成形態、既存象牙質との接触形態、歯髄細胞への影響を観察する。

また、従来の歯牙、歯周組織再生における研究は、骨組織に重点を置く歯周組織再生研究が多く、象牙質再生に関しては象牙芽細胞の分化誘導因子研究など、基礎的研究にとどまっていた。現在、露髄という現象に着眼をおき、臨床応用を見据えた研究は少なく、本研究は有効であると考え。すなわち、本研究はこれまで報告のあった象牙質再生に関する基礎的研究をもとに、より臨床応用に近づけるために不可欠な研究であると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) 歯質石灰化促進材 (RE-06) を用いた培養

## 実験

歯質石灰化促進材 (RE-06) を、細胞株 (MDPC-23等) に作用させ、細胞毒性、分化誘導能、石灰化能を観察する。

### ①細胞毒性の観察

歯質石灰化促進材 (RE-06) を混じた培地にて上記の細胞を培養し、細胞増殖能、壊死細胞数を計測する。

### ②細胞分化の確認

歯質石灰化促進材 (RE-06) を混じた培地で培養した細胞の形態観察を行う。また、継時的に細胞を回収し、BMP、Cbfa1、DSPP等のRT-PCR法にて各遺伝子の発現の観察を行う。

### ③灰化能の測定

石灰化能の測定はカルシウム濃度の測定、および特殊染色を含む組織学的観察によって行う。

## (2) EVA+C添加型スーパーボンドを用いた培養実験

EVA+C添加型スーパーボンドを、細胞株 (MDPC-23等) に作用させ、細胞毒性、分化誘導能、石灰化能を観察する。

### ①細胞毒性の観察

EVA+C添加型スーパーボンドを静置した培地にて上記の細胞を培養し、細胞増殖能、壊死細胞数を計測する。

### ②細胞分化の確認

EVA+C添加型スーパーボンドを静置した培地で培養した細胞の形態観察を行う。また、継時的に細胞を回収し、BMP、Cbfa1、DSPP等のRT-PCR法にて各遺伝子の発現の観察を行う。

### ③灰化能の測定

石灰化能の測定はカルシウム濃度の測定、および特殊染色を含む組織学的観察によって行う。

## (3) 露髄部封鎖用コンポジットレジンの物性

## 検討

露髄部の封鎖性に関して、材料によって成績が異なる可能性を指摘されたため、コンポジットレジンの物性を検討することとした。

フロアブルレジンとしてUniFil LoFlo Plus (GC社:LP)、Estelite FlowQuick (トクヤマデンタル社:FQ) およびクリアフィルマジスティLV (クラレメディカル社:ML) を、ペースト状コンポジットレジンとしてGradia Direct (GC社:GD)、Solare P (GC社:SP)、エステライトPクイック (トクヤマデンタル社:PQ)、ビューティフィルII (松風社:BF)、クリアフィルAP-X (クラレメディカル社:AP) およびMAJESTY POSTERIOR (クラレメディカル社:MP) を使用し、以下の物性について実験を行う。

### ①曲げ試験

各材料において、脱イオン水、クエン酸水溶液および再石灰化溶液に1週間浸漬し、曲げ強さの測定を行う。

### ②圧縮試験

各材料において、脱イオン水、クエン酸水溶液および再石灰化溶液に1週間浸漬し、圧縮強さの測定を行う。

### ③磨耗試験

各材料において、一定の機械的刺激を与え続け、磨耗量を測定する。

## 4. 研究成果

### (1)細胞毒性、分化能

歯質再石灰化促進材として本年度は2種類の材料について検討した。一方はGC社試作の2液を混合することでリン酸カルシウム結晶を生成し、石灰化を促進するRE-06を用いた。他方はサンメディカル社試作のコラーゲンを配合し、生体親和性を高めたエチレンビニルアルコールを従来製品であるスーパーボンドに添加した、EVA+C添加型スーパーボンドを用い

た。

MDPC-23 (マウス歯乳頭由来幹細胞) を用いての *in vitro* での細胞毒性実験の結果、RE-06 は細胞増殖能、アポトーシス細胞数において、多少の細胞為害性が見られるケースもあるものの、pH等の条件の調整により細胞への影響はほとんど認められなかった (図1)。EVA+C 添加型スーパーボンドでは、従来の材料とほぼ同等にほとんど細胞為害性が認められなかった (図2)。

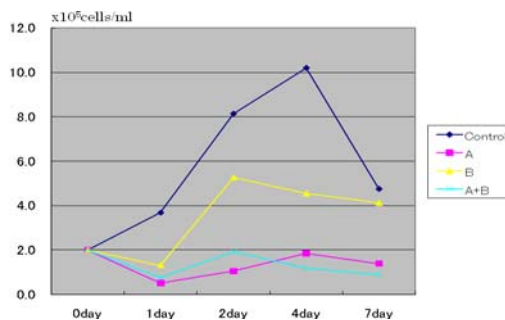


図1 RE-06下での細胞増殖

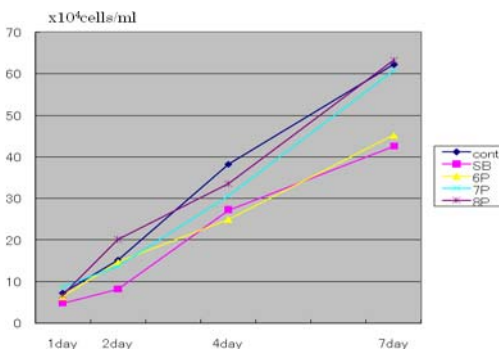


図2 EVA+C添加型SB下での細胞増殖

また、細胞分化に関して、BMP-2、BMP-4、RUNX2、DSPP等の石灰化誘導細胞への分化を示す遺伝子発現について観察し、両材料ともに一定の分化傾向があることが確認できた。しかし、*in vitro*での石灰化は観察されなかった。

## (2) コンポジットレジンの物性検討

圧縮強さの試験の結果、フロアブルタイプのFQ、MLは、脱イオン水群でペーストタイプのPQ、MPに次ぐ高い値を示した。クエン酸水

溶液群ではFQは最も高い値を示し、MLもFQ、AP、MP、PQにわずかに劣るものの高い値を示した。再石灰化溶液群ではMLが最も高い値を示し、FQはML、MP、PQ、APに次ぐ高い値を示した。MP、ML、BF、FQ、PQは、負荷条件下で圧縮強さに有意な差が認められた。曲げ強さの試験の結果、MLは、脱イオン水群でMP、PQ、APに次ぐ値を示し、BF、FQと続いた。クエン酸水溶液群では、ML、FQともにMP、PQに次ぐ高い値を示し、再石灰化溶液群でもクエン酸水溶液群と同様の傾向が見られた。また、MP、ML、FQ、PQは、負荷条件下で曲げ強さに有意な差が認められた。磨耗量試験の結果、SP、LPは他のものに比べ、磨耗量が有意に大きかった。

## (3) 総括

本研究課題の成果により、歯質再石灰化促進材としてのRE-06、EVA+C添加型スーパーボンドは露髄部の覆髄に極めて有効な材料である可能性が示唆された。これは従来の水酸化カルシウム製剤による覆髄法を置き換える可能性があることであり、歯髄保存法の新しい展開のきっかけになると考えられる。

一方で、細胞分化、石灰化能などへの影響の検証は基礎段階しか行えておらず、さらに検証する必要がある、また、臨床応用にあたっては、動物実験に関しても行う必要があると考えられる。

## 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 1 件)

① 神農泰生, 岸本麻実, 穴吹優佳, 神谷絵里子, 大前正範, 西谷佳浩, 吉山昌宏: 臼歯直接修復用コンポジットレジンの物性に関する

検討. 日本歯科保存学雑誌, 査読有, 51, 2008,  
622-629.

〔学会発表〕(計 2 件)

①神農泰生, 大前正範, 岸本麻実, 穴吹優佳,  
高橋 圭, 山路公造, 西谷佳浩, 吉山昌宏:  
コラーゲン固定化エチレン-ビニルアルコール  
共重合体 (EVA+C) 添加試作石灰化誘導促進  
性接着材の接着強さと生体親和性に関する基  
礎的研究. 第 129 回日本歯科保存学会,  
2008/11/07, 富山.

②神谷絵里子、神農泰生、吉光景子、西谷佳  
浩、吉山昌宏：再石灰化水溶液中におけるコ  
ンポジットレジンの物性に関する研究. 第 126  
回日本歯科保存学会, 2007/06/07, 埼玉.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神農 泰生 (SHINNO YASUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60403490

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし