

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月17日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792448

 研究課題名（和文） 焼結体炭酸カルシウムにおける歯髄の石灰化および生活歯髄切断法への  
応用

研究課題名（英文） Development of Sintered calcium carbonate by SPS

研究代表者

荒井 清司（ARAI KIYOSHI）

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：90453886

研究成果の概要（和文）：

焼結体で作製した炭酸カルシウムをラット歯髄切断に使用することで従来の方法である水酸化カルシウム法と比較検討を行った。また比較には *in vivo* マイクロCTとH-E重染色、免疫組織染色(nestin, OPN, DMP-1)を用いて比較検討を行った。その結果、炭酸カルシウムを使用することで歯髄組織に炎症を惹起することなく硬組織の誘導を行うことが可能となった。

研究成果の概要（英文）：

We investigated restitution processes in mechanically exposed rat molar pulp during pulpotomy with sintered calcium carbonate. The result of the calcium carbonate treatment were then compared with calcium hydroxide. *In vivo* CT, Hematoxylin and eosin staining and immunoreactivity for nestin, dentin matrix protein-1 (DMP-1), and osteopontin were also analyzed. The increment of dentin like calcified tissue in the pulp was observed by Micro CT. Both groups induced pulpotomy resulted in changes associated with inflammation followed by progressive odontoblasts differentiation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,800,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：成長発育

キーワード：歯髄、マイクロCT

## 1. 研究開始当初の背景

SPSにより処理されたアパタイトの開発において従来 $\beta$ -TCPなどが使用されていた。しかしながら吸収速度が遅く骨置換に時間がかかるという欠点があった。そこで我々は骨置換において炭酸カルシウムを使用した場合骨吸収が速くなることが基礎研究から明らかとなっていた。そこで硬組織に変化しやすい歯髄細胞に着目して炭酸カルシウムの有効性を検証した。

## 2. 研究の目的

臨床において断髄法には、様々な材料が

用いられており、なかでも、覆髄剤に水酸化カルシウムが頻用されている。水酸化カルシウムは、優れた硬組織誘導能を有する一方、pHが高い原因で、歯髄壁に内部吸収などを生じる事や、異所性の石灰化物、壊死層などの組織為害性が挙げられている。現在、これらの問題点を解決すべく、生体に対し強い刺激を与える薬剤よりも、歯髄組織に優しい材料を主眼に開発が行われている。水酸化カルシウムを断髄覆髄剤として使用時、水酸化カルシウムから炭酸イオンと歯髄から二酸化炭素素により、炭酸カルシウムが認められた。そこで新しく形成された炭酸カルシウム層

が表面壊死層には最下層であり、象牙質を形成する歯髄と隣接している。そこで本研究は、炭酸カルシウムの覆髄剤としての有用性について検討した。マイクロCTを用い、新しく形成されている象牙質を認められていました。ネスチンは分化している象牙質細胞と効用の象牙質細胞のマーカーとして、象牙質マトリックスタンパク質-1 (DMP-1) は象牙質細胞外マトリックスの形成と石灰化のマーカーとして、オステオポンチン (OPN) は象牙質形成するの石灰化の補助のマーカーとして、組織免疫学的評価にて行った。血管拡張率と新しく形成されている象牙質の厚さを半定量的に測定した。水酸化カルシウムを含むカルビタールはコントロールとして行った。

### 3. 研究の方法

本研究は日本大学松戸歯学部実験動物論理委員会 (承諾番号: 08-0029) の承認を得て、日本大学松戸歯学部実験指針に基づいて行った。Wistar系ラット28匹 (雄5週齢、体重 $152 \pm 16$  g) を1週間の予備飼育後、上顎両側第一臼歯に断髄を施した。3匹のラットがコントロールとしてを除いて、ナトリウムチオペンタール (田辺製薬)  $20$  mg/kg を腹腔内に投与して全身麻酔を行った。過酸化水素 (オキシドール、Japan) とクロルヘキシジングルコン酸塩 (和光純薬) を交替して用い、口腔内を消毒した。滅菌生理食塩水を滴下しながら臨床術式に順じ No. 1/2 のラウンドバーを用い断髄を行った。断髄後、次亜塩素酸ナトリウム (ネオクリナー)、過酸化水素 (オキシドール) に交互洗浄を行って、滅菌生理食塩水を洗浄を行って、軽く滅菌綿球にて圧接し、止血確認後、創面を実験材料 (炭酸カルシウム (CC) あるいはカルビタール (CH)) によって覆髄処置を行った。覆髄後、ハイボンドカルボキシレートセメント (松風社製) にて裏装し、光重合レジン (3M社製) にて形成修復を行った。マイクロCT撮影は、in vivo micro-CT (Rigaku社製) を用い管電圧 $90$  kV、管電流 $50$   $\mu$ A、画像の厚さ $30$   $\mu$ mの撮影条件下で同一個体の0、1、3、7、14日 および28日の経時的変化を評価した。断髄処置後、1、3、7、14日 および28日の飼育後、同じナトリウムチオペンタールを用いて全身麻酔下で開胸し、左心室より phosphate buffer saline (PBS) 溶液にて脱血後、pH7.4に調整した4%パラホルムアルデヒド (和光純薬) で灌流固定後、直ぐに上顎骨を摘出した。摘出した上顎骨を同じ調整した4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定した24時間後、5%EDTA溶液を用いて4度で4週間脱灰した。その後、通法に従いパラフィン包埋し、厚さ約 $4$   $\mu$ mの連続切片標

本を作製し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色およびABC法による免疫組織化学染色を施した。免疫組織化学染色は、PBS溶液で洗浄し、0.3%過酸化水素 (オキシドール、Japan) を30分間作用させ、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした。切片に対して一次抗体として抗nestin抗体 (Gene Tex, USA) を反応させた切片、抗DMP-1抗体 (Takara, Japan) を反応させた切片と、抗OPN抗体 (Novus, USA) を反応させた切片を作製した。そして、一次抗体反応後にPBS溶液で洗浄、二次抗体としてウマ抗マウス抗体 (Vector Laboratories, CA) と、ヤギ抗ウサギ抗体 (Biosciences, Japan) を室温30分反応させた。発色は、 $1$  mg/ml DABを含むTris/HCl緩衝液 (pH 7.5) を作用させた。なお、陰性対照染色として、一次抗体の代わりにPBSを反応させ、染色反応を行い、反応が陰性であることを確認した。最後に、標本は通法に従い、アルコール系列にて脱水、透徹、封入した。HE染色切片の拡張血管率と新しく形成されている象牙質の厚さにより、半定量化画像解析ソフトであるImage-pro plus 5.0 J (Planetron, Japan) を用いたコンピュータ画像解析を行った。Tukey's t-testによる統計解析を有意水準5%にて行った。

### 4. 研究成果

CC群における切断面下に象牙質様硬組織形成は、術後14日時に軽度認められた。対照であるCH群は、術後7日から切断面下に象牙質様硬組織形成が認められた。さらに、両方でも象牙質様硬組織の形成量が増加しているのが確認できた。術後7日には、両方でも切断面下に象牙質様硬組織ブリッジが確認できた。

術後1日から、CC群とCH群は血管拡張が認められた。CC群における切断面下に壊死層を認められなかった。対照であるCH群は、切断面下に壊死層を認められた。術後3日目、CC群とCH群は血管拡張、白血球の浸潤などの炎症像が増加しているのが認められた。CC群における切断面下に壊死層を認められなかった。対照であるCH群は、切断面下に壊死層を認められた。術後7日目、CC群とCH群は軽度の炎症性細胞の浸潤が認められた。しかし、術後3日と比較して炎症は軽減した。CH群は、術後7日から切断面下に象牙質様硬組織形成が認められた。それに、切断面下に壊死層はほとんど消失した。術後14日目、CC群とCH群は切断面下に象牙質様硬組織形成認められた。CH群は、切断面下に壊死層は全部消失した。CC群における象牙質様硬組織の中に象牙質細胞と象牙質様細胞の陥入が認められた。術後28日目、CC群とCH群は象牙質様硬組織ブリッジが確認できた。術後1日目、CC群における切断面下にnestin免

疫反応陽性細胞が細い繊維状的に認められた。対照である CH 群は、nestin 免疫反応陽性細胞が認められなかった。術後 3 日目、CC 群と CH 群は切断面下に nestin 免疫反応陽性細胞が認められた。しかし、CC 群における切断面下に nestin 免疫反応陽性細胞が太く線条状、立方体であり、対照である CH 群における nestin 免疫反応陽性細胞が単一の細い繊維状であった。術後 7 日目、CC 群における切断面下と歯髄中に nestin 免疫反応陽性細胞が認められ、対照である CH 群における切断面下だけに nestin 免疫反応陽性細胞が認められた。術後 14 日目、CC 群における象牙質様硬組織の中に nestin 免疫反応陽性である象牙質細胞と象牙質様細胞の陥入が認められた。対照である CH 群は、nestin 免疫反応陽性細胞が象牙質様硬組織の下に線のよな並んで認められなかった。CC 群と CH 群は象牙質様硬組織形成が髄側壁部においても同時に認められた。術後 28 日目、CC 群と CH 群は nestin 免疫反応陽性細胞が消失して確認できた。術後 7 日から、CC 群と CH 群は切断面下に DMP-1 免疫反応陽性マトリックスが認められた。術後 28 日まで、DMP-1 免疫反応陽性マトリックスの量が増加しているのが確認できた。しかし、CC 群における DMP-1 免疫反応陽性マトリックスが切断面下と歯髄中において分散しており、CH 群における DMP-1 免疫反応陽性マトリックスが切断面下だけに太い線のように存在していた。術後 28 日目、CC 群と CH 群は象牙質様硬組織ブリッジの中に OPN 免疫反応陽性細胞が認められた。OPN 免疫反応陽性細胞が象牙質様硬組織ブリッジの陥穴の中しか発見されなかった。血管拡張率における、術後 3 日目 CH 群が CC 群より高く ( $p < 0.01$ )、術後 7 日目 CH 群が CC 群より高く ( $p < 0.05$ )。新しく形成されている象牙質の厚さにおける、術後 14 日目 CC 群が CH 群より高く ( $p < 0.05$ )、術後 7 日目 CC 群が CH 群より高くあった ( $p < 0.01$ )

##### 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 9 件)

- ① Silk fibroin-based scaffolds for bone regeneration Kuboyama N, Kiba H, Arai K, Uchida R, Tanimoto Y, Bhawal UK, Abiko Y, Miyamoto S, Knight D, Asakura T, Nishiyama N. J Biomed Mater Res 101(2), Page 295-302, 2013. [査読あり]
- ② EFFECT OF STORAGE CONDITIONS ON PERIODONTAL HEALING MECHANISM AFTER TOOTH REPLANTATION: Takashi Asano, Elif Bahar Tuna, Kiyoshi Arai 日

本外傷歯科学会 (in press) 2013 [査読あり]

- ③ Magnitude effect of Dynamic Occlusal Guidance Force on Root Resorption in Dog K Hagiwara, K Arai Int J Oral-Med Sci Page 280-290, 2013 [査読あり]
- ④ 小児の歯内療法を探る 断髄法における現状と今後 荒井 清司 小児歯科臨床 17 巻 6 号 Page19-24, 2012. [査読あり]
- ⑤ 生活歯髄切断法における新規貼薬材料の検討 炭酸カルシウムの可能性について 荒井 清司 小児歯科学雑誌 49 巻 3 号 Page231-242, 2011. [査読あり]
- ⑥ 上顎中切歯の萌出異常を起こしたエプーリスの 1 例 松根 健介, 岡田 裕之, 中山 務, 中村 均, 荒井 清司, 萩原 和典, 高橋 昌嗣, 柴崎 兼次, 山本 浩嗣, 前田 隆秀 日大口腔科学 37 巻 1 号 Page31-35, 2011 [査読あり]
- ⑦ 乳歯用既製金属冠に与えるフッ化物の影響 荒井 清司 DENTAL DIAMOND 36 巻 11 号 Page129-131, 2011. [査読あり]
- ⑧ 1/5 希釈ホルムクレゾール断髄法下における患児、術者ならびに介補者のホルムアルデヒドの吸引についての検討 吉岡 潤一郎, 荒井 清司, 柴崎 兼次, 臼井 朗, 那須 郁夫, 前田 隆秀 日大口腔科学 37 巻 2 号 Page99-105, 2011. [査読あり]
- ⑨ The formaldehyde inspiration by the child patient, dentist, and dental assistant during formocresol pulpotomy K Arai, A Usui, J Yoshioka, K hagiwara, K Matsune, I Nasu, T Maeda Pediatr Dent J Page138-144, 2011. [査読あり]

[学会発表] (計 9 件)

- ① The effect of dog adiposed-derived stem cell on trauma model Kiyoshi Arai, Ryouichi Hirata, Koh Kimura, Naoki Urushihata, Moriyasu Wada, Takahide Maeda. IADR General Session, Iguacu Falls, Brazil June 18-23, 2012.
- ② 歯周疾患を随伴する Lowe 症候群の長期管理例 國分輝和, 平井則光, 荒井清司, 松根健介, 前田隆秀 第 50 回小児歯科学会 (東京 東京国際フォーラム) 2012.5.12-13.
- ③ Papillon-Lefevre 症候群における外傷を経験した一例 荒井清司, 臼井朗, 松根健介, 前田隆秀 第 50 回小児歯科学会 (東京 東京国際フォーラム) 2012.5.12-13.
- ④ 脂肪由来幹細胞を用いたイヌ歯根膜の変化: 荒井清司, 横田容子, 平田亮太郎, 木村功, 小林 平, 漆畑直樹, 和田守康, 前田隆秀: 日本保存歯科学会 (広島 広島国際会

- 議場) 2012.11.22-23.
- ⑤ 凍結保存されたヒト歯髄細胞における幹細胞関連遺伝子の発現解析 横田容子, 染井千佳子, 荒井清司, 平田亮太郎, 木村功, 小林平, 漆畑直樹, 和田守康, 前田隆秀: 日本保存歯科学会 (広島 広島国際会議場) 2012.11.22-23.
- ⑥ 脂肪組織由来間葉系幹細胞移植による歯周組織再生治療の検討 平田亮太郎, 荒井清司, 塚本亮一, 横田容子, 牧村英樹, 菊地信之, 染井千佳子, 木村功, 小林平, 漆畑直樹, 長濱文雄, 和田守康, 前田隆秀: 日本保存歯科学会 (広島 広島国際会議場) 2012.11.22-23.
- ⑦ 上顎両側犬歯の異所萌出した一例 荒井清司, 白井朗, 萩原和典, 松根健介, 前田隆秀 第49回小児歯科学会 (岩手県岩手県情報交流センター) 2011.11.28-29.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒井 清司 (ARAI KIYOSHI)  
日本大学・松戸歯学部・助教  
研究者番号: 90453886