研 究 者：今村　由紀（所属：東京医科歯科大学歯学部附属病院小児歯科）

研究題目：リン酸カルシウムセメントの乳歯用歯科材料への応用

目　的：

乳歯の根管充填材料には，歯の交換期における生理的歯根吸収に伴う材料の生体吸収性と優れた生体親和性が求められる。しかし現時点において歯根と同時に吸収する材料や歯周組織ならびに後続永久歯へ刺激を与えないとされる材料は存在せず，吸収の進んだ乳歯への歯内治療は不可能であり抜歯の適応とされている。リン酸八カルシウムは生体アパタイトの前駆体であり，生体内に適用した場合，象牙質類似のハイドロキシアパタイトに転化する。我々はこれまでにα型リン酸三カルシウムを添加したリン酸八カルシウム硬化体（以下 OCP セメント）が歯科材料として優れた機械的性質と生体親和性を持つことを報告してきた[1-3)]。本研究は，OCP セメントを，生体親和性に優れ乳歯根と同時に吸収が起こる根管充填材料として応用することを最終目的とし，まず，OCP セメントの結晶構造変化の過程を *in vivo* において観察し，本セメントの体内環境下における象牙質類似アパタイトへの転化を追跡した。また，乳歯の生理的歯根吸収は破歯細胞によるものであるため，*in vitro* における本セメント硬化体の生体吸収性を評価し，乳歯根と同時に吸収がおこる根管充填材料としての応用の可能性を検討した。

対象および方法：

1. セメント作製

リン酸二水素カルシウム一水和物と炭酸カルシウム，α型第三リン酸カルシウムを重量比 3：5：9 で混合して得られた粉末をセメント粉末成分とし，リン酸水素ナトリウム緩衝液（pH=7.4）をセメント液体成分として用いた。

2. *in vivo* キャラクタリゼイション

粉液錬和直後の OCP セメントを 5 週齢マウス（オス）背部皮下にシリンジで注入し，体内で硬化させた（Fig.1）。1 週間後に取り出し，XRD 測定および SEM 観察による生成相のキャラクタリゼイションを行った。

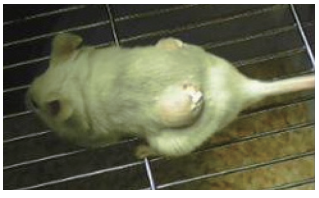


Fig.1　セメント注入直後のマウス

3. *in vitro* 生体吸収性評価

①試料作成

錬和直後の OCP セメントをディスク状に成型し，37℃インキュベータ内で硬化させた。試料硬化体を培養液に浸漬し，XRD および FTIR 測定にて炭酸アパタイトに転化していることを確認した後，以下の実験に供した。対照群には，牛大腿骨スライス，市販根管充填材料（酸化亜鉛ユージノールセメント，オブチュレーションガッタパーチャ），細胞培養用プラスチッ

クプレートを用いた。

②破骨細胞培養

十分な説明を受けた上で同意した健康なボランティアから静脈血を採取した。新鮮血から血球細胞を分離したのち，各試料上に播種し，分化誘導因子によって破骨細胞へ分化させた。

③ pH 測定

OCP セメント存在下での周囲の pH 変化を追跡するため，細胞を播種した試験片を浸漬した培養液の pH 測定を行った。対照群として，細胞を播種していない試験片を浸漬した培養液，および細胞を播種した細胞培養用プラスチックシャーレに入れた培養液の pH 測定を行った。測定は各群 5 ウェルずつ行い，平均値を算出した。

④吸収能評価

破骨細胞への分化はプラスチックプレート上細胞を tartrate-resistant acid phophatase（TRAP）染色することによって確認し，試料上の細胞については細胞骨格タンパク質及び核を染色した。破骨細胞は分化し，吸収能を獲得する過程でアクチン繊維が細胞辺縁部にリング状に集積するアクチンリング形成が特徴的に観察されるということが知られている。このため，破骨細胞分化及び吸収の指標の一つとしてアクチンリング観察を行った。

結果および考察：

1. *in vivo* キャラクタリゼイション

埋入 1 週間後の XRD 測定の結果，生体アパタイト類似のブロードなピークが確認され，OCP のピークも出現していた（Fig.2）。破断面 SEM 像からは，セメント表面の空隙内の結晶成長が確認できた（Fig.3）。これはこれまで報告している *in vitro* での結果と同様であるが，OCP セメントは体内環境においても HA への転化が起こることが確認できた。これまでの *in vitro* での結果では，OCP セメントは最終相としてアパタイト単層へと転化していることから，今後さらに長期間の追跡が必要である。また，セメント最終相については FTIR 測定を行い，象牙質類似の炭酸含有アパタイトへと転化していることを確認する必要がある。

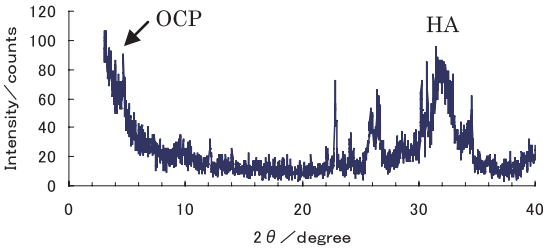


Fig.2　XPD 測定結果（1 週間後）

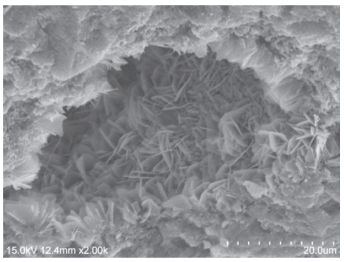


Fig.3　SEM 像（1 週間後）

2. *in vitro* 生体吸収性評価

1）セメントキャラクタリゼイション

XRD 測定の結果，硬化後培養液に 6 週間浸漬したセメントは，アパタイト単層に転化していることが確認できた。また FT-IR 結果より，得られたセメントは生体象牙質同様，炭酸含有アパタイトであることが確認された。

2）pH 測定結果

2 週間の培養液 pH 測定の結果，

①細胞を播種した試験片を浸漬した培養液
②細胞を播種していない試験片を浸漬した培養液
③細胞を播種した細胞培養用プラスチックシャーレに入れた培養液

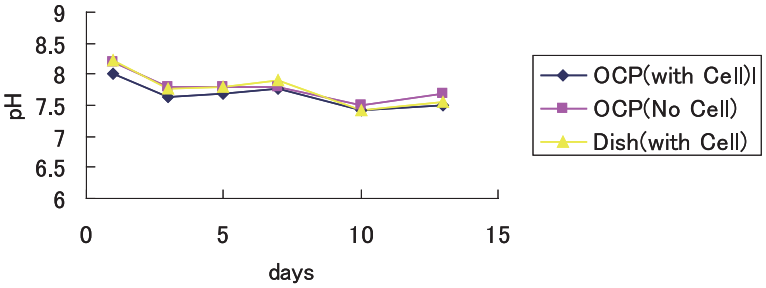


Fig.4　各培養液の pH 変化

①～③いずれも 7.5～8.0 の値を示し（Fig.4）
OCP セメントによる pH 変化の影響はないことが示唆された。

3）吸収能評価

ヒト新鮮血から分離した血球細胞は，プラスチックプレート上の細胞を TRAP 染色することにより，破骨細胞に分化していることが確認できた。骨スライス上，OCP セメントサンプル上においては蛍光染色により，アクチンリングを認める多核巨細胞に分化していることが確認されたが，酸化亜鉛ユージノールセメントサンプル上では細胞は成長を確認できず，オブチュレーションガッタパーチャサンプル上では細胞は単核のまま分化を認められなかった（Fig.5）。OCP セメントはこれまでの根管充填材料とは異なり，象牙質同様，破骨細胞による吸収がおこる可能性が示唆された。しかし，分化した破骨細胞によるサンプルの吸収能については，現在のところサンプル間における差が大きく，安定した結果を得るには至っていない。従って今後サンプル数を増やし，引き続き同様の実験を行う必要がある

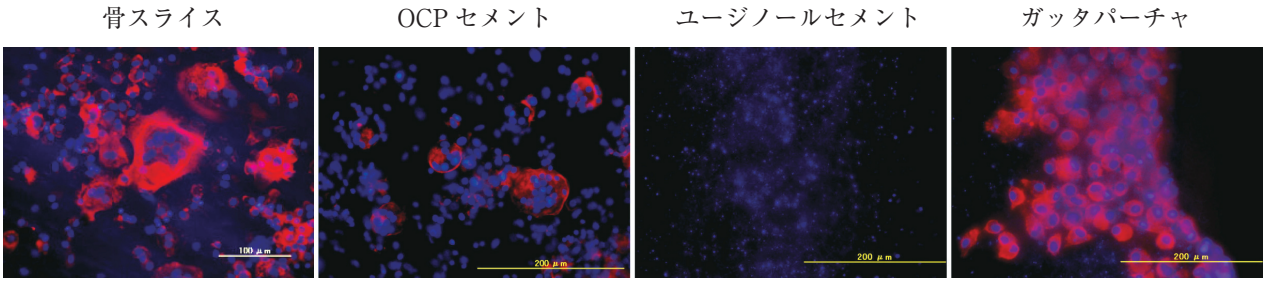


Fig.5　各サンプル上における血球細胞の分化の様子

参考文献：

1）Y. Nakano, M. Ogaki, S. Nakamura, Y. Takagi, K. Yamashita.：Bioceramics 12：325-318, 1999
2）M. Sena, Y. Yamashita, Y. Nakano, M. Ogaki, S. Nakamura, K. Yamashita, Y. Takagi.：Oral Surg Oral Med Oral Pathol 97：749-755, 2004
3）Y. Imamura, Y. Tanaka, A. Nagai, K. Yamashita, Y. Takagi.：Dental Material Journal 29：582-588, 2010

成果発表：（予定を含めて口頭発表，学術雑誌など）
国際小児歯科学会（2011 年 6 月，アテネ）発表予定