

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 日向 剛
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 336 号
学位授与の日付 平成 28 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Bioactivity and biomineralization ability of calcium silicate-based pulp-capping materials as evaluated with subcutaneous implantation into rats. (ケイ酸カルシウム系覆髄材のラット皮下への移植による生体活性とバイオミネラリゼーション能力の評価)

論文審査委員 主査 教授 泉 健次
副査 教授 織田 公光
副査 准教授 吉羽 邦彦

博士論文の要旨

【目的】

近年、Mineral Trioxide Aggregate (MTA)をはじめとするケイ酸カルシウム系歯内療法用材料が注目されている。本材は硬化反応の過程で水酸化カルシウム結晶を生成し、硬化体からの水酸化カルシウムの緩徐な溶解に伴うカルシウムイオンや水酸化物イオンの持続的放出が、本材の生体親和性や生体機能性と関連すると考えられている。直接覆髄後の組織学的観察において、本材は従来の水酸化カルシウム製剤と比較して良好な被蓋硬組織誘導能を示すとともに、臨床的評価においても同等以上の成績を示すとの報告がなされている。現在では効果時間の短縮や操作性の向上を図る目的で、様々なケイ酸カルシウム系歯内療法用材料が開発されているが、これらの材料の生体内における挙動に関する知見は未だ十分とはいえない。そこで、本研究では剤型の異なるケイ酸カルシウム系覆髄材をラットの背部皮下組織に埋入し、結合組織と接する材料表面の微細構造学的観察および組成分析ならびに組成分布分析を行うことにより生体内での材料の挙動について評価した。

【材料および方法】

被験材として、White ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental)、TheraCal LC(光硬化型ケイ酸カルシウム系覆髄材:Biscoc)および試作覆髄材 (日本歯科薬品) の 3 種を使用した。滅菌 PTFE チューブ(内径 2mm、外径 3mm、長さ 5mm)にメーカーの指示に従って練和した材料を填入し、初期硬化後あるいは光重合による硬化後、直ちに 4 週齢 Wistar 系雄性ラット背部皮下組織内に埋入、縫合した。7,14,28 日経過後に移植体を周囲結合組織とともに摘出し、カコジル酸緩衝 2.5% グルタルアルデヒド固定液で 24 時間浸漬固定した。その後、(1) 被験材表面の析出物の微細構造観察のために、固定した試料を、10%次亜塩素酸ナトリウム溶液に浸漬し周囲結合組織を除去し、埋入した材料表面を走査電子顕微鏡にて観察を行うとともに、波長分散型マイクロアナライザー (SEM-EPMA: EPMA1610; 島津) による組成分析を行なった。(2) 同様にして固定した試料の一部について、臨界点乾燥後、樹脂包埋を行い、被験材と皮下結合組織の界面部におけるカルシウム (Ca) とリン (P) の分布について SEM-EPMA を用いて元素マッピング解析を行った。これらのデータをもとに、Ca-P 高濃度層の厚さを測定し材料間で比較した。なお、本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施された (承認番号: 207 号 3)。

【結果】

(1) 被験材表面の SEM 観察において、各材料表面には類球形の析出物が生成され、その径は経時的に増大する傾向を示した。また、析出物の径は ProRoot MTA が他の材料に比較して大

きかった。さらに、成分分析では、すべての材料において、Ca, P, C, O, Si を主成分とする析出物であることが明らかにされ、また Ca/P 比は 1.8~2.64 の値を示した。(2) 組織と材料の界面部における元素マッピング解析では、各材料と組織の界面近傍に Ca と P 濃度が高い領域がほぼ一致して観察された。この領域の厚さをそれぞれの材料間で比較した結果、移植 7 日後の TheraCal LC、試作覆髄材間に有意差を認めなかったものの、他の全ての観察期間で ProRoot MTA > 試作覆髄材 > TheraCal LC であった ($P < 0.05$)。

【考察】

本研究の結果、各種ケイ酸カルシウム系覆髄材を皮下移植するとその表面に Ca と P を主成分とする結晶様構造物が析出することが確認され、これらの材料をリン酸含有生理食塩水 (PBS) 中に浸漬するとアパタイト様のリン酸カルシウム結晶が形成されるという *in vitro* の結果と一致していた。生体内においても材料から放出された Ca イオンと体液由来の P イオンが反応し、リン酸カルシウム結晶として材料表面に析出したものと考えられ、各材料とも Ca イオンの放出に基づく生体機能性を生体内で発揮していることが示唆された。さらに、本研究では、結合組織との界面部に Ca-P 高濃度層の形成を誘導することが明らかにされたが、その厚さに材料間で差が認められ、材料の成分や剤型の相違により、生体内において異なる挙動を示すことが推測された。

【結論】

本研究で用いた 3 種のケイ酸カルシウム系覆髄材をラット皮下組織内に移植すると、結合組織と接する材料表面にカルシウムとリンを含む析出物が生成されるとともに、組織内に Ca-P 高濃度層が誘導されたが、その厚さは材料間で異なることが示された。

審査結果の要旨

本実験に用いた材料の成分と機能に関して、試作覆髄材におけるジルコニウムは、硬度をあげるためでなく造影剤として使用され、ProRoot MTA では酸化ビスマスが、TheraCal ではバリウムがそれにあたるなど、知識を有していた。材料の操作性に関するポイントといえる硬化時間と性質については、ProRoot MTA は、約 3 時間 (製造元による) としているが、試作覆髄剤は硬化促進剤の添加により約 13 分で硬化するとしている。そして、硬化のメカニズムに関しては、擬似体液中に MTA を浸漬すると材料表面にハイドロキシアパタイトの結晶が析出するという過去の報告から、材料から放出されたカルシウムイオンと擬似体液から供給されるリン酸イオンの反応により生成されると考えられ、本実験から、生体内でも類似した結晶構造と化学的組成が確認できたので、アパタイト様の析出物の生成が材料の硬化に寄与しているとの理解を得た。さらに、本実験の実験結果の解釈に関する質問として、粒子の大きさはどのような影響があるのか、について問うたところ、粒子の大きさが経時的に大きくなるということは、持続的に材料からカルシウムイオンが放出され、生体からの供給されるリンイオンとの反応により、アパタイト様のリン酸カルシウムが成長をし続けるということであるとの回答を得た。これは、材料と根管壁象牙質のギャップをこの析出物が補填し、硬化膨張することで、封鎖性が向上することに寄与しているというメカニズムにも言及してくれた。また、析出物は生体内で安定した物質と考えてよいのか、に関しては、生体内では材料表面の析出物の溶解や貪食といった所見は認めなかったため、生体内では安定した物質であると考えるところであった。さらに、骨組織との違いについて説明を求めたところ、今回確認された析出物は、*in vitro* の実験系においても確認されており、骨とは異なるということであった。炎症性細胞浸潤を含め、覆髄材による歯髄の修復過程について本実験結果と過去の報告を総合しての説明としては、MTA の場合、露髄部直下で、壊死層の形成と炎症性細胞の浸潤が生じる。しかし、組織修復マクロファージ (M2 マクロファージ: 創傷治癒の初期過程で壊死組織の貪食やサイトカイン・成長因子の産生などにより、組織修復の進行に役割を

演じる) マーカー (CD163, CD204) を強く発現する細胞も早期に出現し、覆髄部直下の壊死層の処理および組織修復に関与するため、早期に下層の歯髄内での活発な細胞増殖に引き続き露髄部に線維性基質の形成と新生象牙質細胞様細胞の配列が生じ、最終的に細管構造を有する象牙質様基質が形成される。この時、本実験で確認された析出物にファイブロネクチンやオステオポンチンが結合し、これらが未分化細胞の接着と分化のための足場となることで被蓋硬組織 (デンチンブリッジ) 形成が開始されることが想定されるということであった。最も肝心の、ProRoot MTA が最も良い材料なのか、については、ProRoot MTA の特許が切れたばかりで、後発材の製品化が進んでいるものの、他の材料は臨床データとして ProRoot MTA ほど効果的でなく、どの材料が最も良い材料かということは断言しにくく、ProRoot MTA を明らかに超えた材料はないが、操作性の良いもの、硬化時間の短いもの、変色しないもの等が試作されている現状の説明を受けた。

次に MTA についてさらに詳細な解説を求めた。特性と有用性は、硬化体からカルシウムイオンや水酸化物イオンが持続的に遊離することで抗菌性、封鎖性、生体適合性、硬組織誘導能といった特性を発揮する。イオンの主な供給源は、硬化体中の水酸化カルシウム (ケイ酸カルシウムの水和反応により生じる) で、これが水に溶解する結果イオンが放出され、周囲環境がアルカリ性になり、細菌や真菌に対する効果を示すとされている。逆に、細胞障害性も報告があるが、水酸化カルシウム製材に比較して軽度で、象牙質・骨シアロリントタンパク、アルカリホスファターゼなどの硬組織形成関連分子の発現による生物学的活性が重要視されている。従って、水酸化カルシウム製材の生物学特性を維持しながら封鎖性や安定性を向上させた材料ということができ、直接覆髄や生活断髄において臨床効果が高い。問題点としては、硬化時間が長く、操作性が良好でなく、歯の変色をきたす可能性があることである。一方、TheraCal LC はレジン成分が添加された光硬化型の材料で、ワンペーストのシリンジで供給されており、光照射により硬化させる。硬化体はカルシウムイオン放出することが確認されているが、本実験では材料表面に薄いアパタイト様の Ca-P 結晶様構造物の形成のみ確認された。試作覆髄材は、不純物の混入を排除し、硬化促進剤を使用し硬化時間の短縮を図っている。また液材にメチルセルロースを加え粘稠性を持たせ、操作性の向上を図っている。さらに変色の原因である酸化ビスマスに酸化ジルコニウムに変更している。

MTA 表面と周囲の石灰化物、Ca-P 高濃度層についても詳細に解説してもらった。ハイドロキシアパタイトの Ca/P 比は 2.156 だが、本実験で皮下移植された被験材表面析出物の Ca/P 比は 1.80 ~ 2.64 であり、ハイドロキシアパタイト様のリン酸カルシウムが形成されていることが示唆される。つまり、材料側から放出されたカルシウムイオンと結合組織由来のリン酸が反応することにより、形成されたリン酸カルシウムを含む結晶様構造物は、元素マッピングで酸素を解析していないので推測の域ではあるが、形成されたのはハイドロキシアパタイトと考えられた。また、本研究結果から示唆される臨床的意義について説明を求めたところ、MTA を直接覆髄に用いた場合の治癒過程は水酸化カルシウム製剤を用いた場合に類似していることが知られている。つまり、MTA による覆髄により、一層の歯髄変性層の形成が認められる。その後、下層の歯髄内での活発な細胞増殖に引き続き、露髄部に線維性基質の形成と新生象牙芽細胞様細胞の配列が生じ、最終的に細管構造を有する象牙質様基質が形成されると報告されている。この反応は壊死層直下あるいは MTA 表面部に形成された石灰化層へファイブロネクチンやオステオポンチンなどが結合し、これらが未分化細胞との接着と分化のための足場となることで被蓋硬組織形成が開始されるものと想定されている。本研究の結果から、今回用いた全ての材料において、被蓋硬組織形成の開始に重要な役割を果たすと考えられる石灰化層の形成を確認できたことは、臨床的に重要であると考えられる。

続いて、提出された学位論文の直接的な内容を問うた。Fig. 4 で示されている Ca と P-rich area

の厚さの測定方法が記載されていないので、説明してもらったところ、EPMAにより分析されたカルシウムのマッピングデータを便宜的に析出物に対し 20 μ m 毎に垂直分割し、この範囲でカルシウムとリンの濃度分布を線分析しマッピングデータと重ね合わせた。これを元にして 0.1 (count-Norm) の位置を基準としてこの基準線よりもリン濃度の高い部分を有意の Ca-P 高濃度層と定義した。この時の距離を Ca-P 高濃度層の厚さとして測定。一つの試料につき 10箇所計測し、その平均値を Ca-P 高濃度層厚さとした。そして、考察の段落 2 “favorable tissue responses” について説明を求めたところ、MTA による直接覆髄部直下に見られる、組織修復マクロファージ (M2 マクロファージ) マーカーを強く発現する細胞の一時的な集積が認められる。M2 マクロファージは組織修復に貢献する炎症性細胞であるので、同様の反応が皮下の結合組織でも見られることが、favorable reaction である、という回答を得た。さらに、析出した Ca-P 高濃度層は、厚ければ厚いほど効果的と判断してよいかについてと、Fig 4 で示した厚さに加え、覆髄材によって誘導される、望ましい沈着物の“質”について尋ねた。厚さは、覆髄や根管充填さらには根管穿孔時の封鎖等に用いたときに良好な封鎖性を持つという特性から、持続的な析出物の生成はこの特性を付与するのに重要であるため、ある程度厚ければ必要条件を満たすと考えられ、その厚さ (量的には不明) に至るまでは厚いほうが有効と考える。また、質については、推測の域を出ないものの、Ca/P 比が関与しているかもしれない。ただ、その数字がハイドロキシアパタイトの比がベストであるかどうかについては今後の研究が待たれる、とのことであった。さらに、本文中で使用されている専門用語について、アパタイト様沈着物の形成能・Ca と P 含有沈着物・アパタイト様 Ca-P 結晶 の 3 つの言葉の使い分けについて聞いたところ、本実験で得られた析出物がハイドロキシアパタイトであるかどうかについては、X 線回折法による分析が必要となるが、析出物が微量であるため、また析出物のみを特定して取り出すこと (材料そのものとの境界が不明瞭) が困難なため分析することができず、結晶構造の特定に至らなかったため、析出物の化学的成分分析 (EPMA) を行い、結晶構造の推測をすることにした結果、析出物はカルシウムとリンを含むことがわかったため、結果では“カルシウム-リン含有結晶”と表記した。また、考察では結晶の微細構造とカルシウムとリンの比率 (成分から結晶の構造を類推した) に着目した。in vitro で得られた析出物の微細構造も本実験で得られた析出物の微細構造も、類球形であり類似していた。また、前述の実験における Ca/P 比が 1.4~1.6 程度で、理論的にもハイドロキシアパタイトの Ca/P 比は 2.156 である。本研究におけるカルシウム-リン比は 1.8~2.6 と 前述のデータと近似していたので、考察の最後では”アパタイト様のカルシウム-リン結晶”という用語を用いた。

最後に、生体応用する材料の基礎的実験という観点から、ライフサイエンスの実験系に関して問うた。本実験で PTFE チューブとこの形状を選択した理由については、PTFE (いわゆるテフロン) は化学的に非常に安定で、非粘着性で、生体適合性に優れているのが理由であり、形状については、所属する教室の過去の実験系で、根管を模した形態のチューブが用いられてきた。本研究では、材料と結合組織が接する面と露髄部を想定した形状になるよう想定し、直径 2 mm の円形のものを用いていたので、それを参考にしたというのが現実であったが、円柱にこだわる必要については根拠がないので、今後必要があれば、改変するとのことであった。また、一般に、3 材料の他に設定するのが妥当と考えられる実験群をあげてもらったところ、的確に材料学的基礎研究の視点からポジティブコントロールとネガティブコントロール群の設定が必要であると思われるという返答を頂いた。さらに、考察の段落 3 の記述は、象牙質を作れる環境における覆髄剤の動態についての考察なので、本実験とは直接関係がないと考えられる。この実験に直接的な考察とするためには、どんな追加解析が必要と思うか質問したところ、ファイブロネクチンの免疫組織化学が必要と言う妥当な回答を得た。

本研究は、現在の歯科臨床において不可欠な材料である直接覆髄材が直面している、好ましい材料が何であるかと、それが持ち合わせるべき性質を明らかにするという喫緊の課題について取り組んだ、材料の比較研究である。現在進行中である、同一実験系の病理組織学的検討と合体させて、論文を1本化することが可能であれば、卓越した論文に仕上がることを申請者は十分に理解しているが、本研究では手技的に困難な点を、EPMA分析により克服した実験システムの確立に主眼をおいて、Ca-P高濃度層の形成がカギであることを証明した優れた研究であると確信できるので、学位論文として価値があると認められる。