

論文題目

MTA セメントに配合されている酸化物粉末に対する細胞
の反応

平成 26 年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

戸島 洋和

[諸言]

歯内療法に応用される Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は、ポルトランドセメント(PC)に類似した成分を有している。MTA は生体親和性に優れるが、水和反応が遅く硬化時間が長い欠点がある (Torabinejad et al., 1995)。また、X 線造影性を付与するために酸化ビスマスや酸化ジルコニウムなどが添加されている (小林, 2013)。本研究では、硬化前の PC 粉末や酸化ビスマスおよび酸化ジルコニウム粉末が細胞に及ぼす影響について検討するため、それぞれの粉末に対するマクロファージ様細胞と骨芽細胞様細胞の反応について調べた。

[材料および方法]

PC 粉末にはホワイトセメント (太平洋セメント) を使用し、酸化物粉末は酸化ビスマス (Bi_2O_3) と酸化ジルコニウム (ZrO_2) を使用した。細胞にマクロファージ様細胞 (RAW264.7) および骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用いた。10% FBS を添加した D-MEM を培養液とし、培養プレートに細胞を 5×10^4 cells/ml となるよう播種した後、 37°C 、5% CO_2 環境下にて 1 日間培養したものを実験に供した。

(1) 浸漬液の成分分析: 平均粒径を約 $13 \mu\text{m}$ に調整した各粉末を 10 mM となるよう PBS (gibco) もしくは pH4.7 の mcilvaine 緩衝液に添加した。 37°C にて 3 日間静置後に粉末をろ過し、ICP 発光分光法を用いて溶出元素を定量した。

(2) 細胞活性試験: 平均粒径を約 $1 \mu\text{m}$ と約 $13 \mu\text{m}$ に調整した各粉末を培養液に対し 0.01, 0.1, 1 および 10 mM となるよう加え、さらに 3 日間培養後に WST-8 を用い、細胞活性を評価した。また、平均粒径を約 $13 \mu\text{m}$ に調整した各粉末を 10 mM となるよう培養液に添加したものをろ過し、その浸漬液を細胞に加え同様に細胞活性を評価した。

(3) 細胞傷害性試験: 平均粒径を約 $1 \mu\text{m}$ と約 $13 \mu\text{m}$ に調整した各粉末を、FBS 無添加の D-MEM に対し 0.01, 0.1, および 1 mM となるように添加し、プレート上の細胞に加え、さらに 1 日間培養した。その後培養上清を採取し、LDH 活性に反応する INT を用い、細胞傷害性を評価した。

(4) 活性酸素種 (ROS) の測定: 各細胞は 2×10^5 cells/well となるようプレート上に播種した。さらに、平均粒径約 $1 \mu\text{m}$ の Bi_2O_3 粉末を 0.1, 1 および 10 mM となるようプレート上の細胞に

添加して8時間培養後、CellROX®Green (Life Technologies)を加えた。37°C、5%CO₂下にて30分間染色後にマイクロプレートリーダーを用いて蛍光強度を測定した。さらに、蛍光強度を測定した細胞をプレートから剥離し、血球計算盤を用いて細胞数を算定した。測定された各群の蛍光強度を細胞数で除し、細胞数で規格化した蛍光強度を求めた。

(5) SEM 観察:細胞を播種し、平均粒径約 1 μm の粉末を加え、3日間培養後に PBS 希釈 2.5%グルタルアルデヒドで固定した。エタノール系列脱水し、HMDS 中に浸漬後、室温で乾燥した。金蒸着後に SEM にて細胞と粉末粒子の形態を観察した。

(6) TEM 観察:SEM 観察と同様に細胞を固定後、さらに四酸化オスmiumにて後固定し、エタノール系列脱水後、エポキシ樹脂にて包埋し、厚さ 90 nm の超薄切片を作製した。超薄切片は酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色後に TEM にて細胞を観察した。

(7) 細胞内粒子の同定

無染色の試料を STEM-EDX (JSM-7500F, 日本電子)にて元素分析を行った。PC 粉末では Si Kα, Bi₂O₃ 粉末では Bi Mα, ZrO₂ 粉末では Zr Lα のマッピングから各元素の分布を確認し。細胞内粒子の点分析によるスペクトルを得た。

[結果]

溶出試験の結果、0.1 mM の PC 粉末から pH7.4 の PBS に溶出したカルシウムイオンとケイ酸イオンはそれぞれ約 3 μg/ml であった。また、Bi₂O₃ 粉末から溶出したビスマスイオンは 0.02 μg/ml 以下と微量であり、ZrO₂ 粉末からはジルコニウムイオンの溶出は検出できなかった。これに対し、pH 4.7 の酸性下では 0.1 mM の Bi₂O₃ 粉末の添加で約 14 μg/ml と溶出量が増加した。一方、PC 粉末や ZrO₂ 粉末からの溶出量は変わらなかった。

培養試験の結果、平均粒径約 1 μm の粉末 を添加したところ、RAW264.7 に対して Bi₂O₃ 粉末を 0.1 mM 以上添加した群では、代謝活性を示す吸光度はコントロール群と比較して 20%以下となり、有意に細胞の活性が低下することが分かった。ZrO₂ 粉末と PC 粉末に関しては、1 mM 以下の添加群では活性の低下はみられなかったが、10 mM 添加群で吸光度は約 50%に低下した。MC3T3-E1 では、Bi₂O₃ 粉末を 0.1 mM 以上添加した群で吸光度は 10% 以下になり、有意に細胞の活性が低下した。一方、ZrO₂ 粉末と PC 粉末では、10 mM 添加群

においても細胞活性の低下は見られなかった。

平均粒径約 13 μm の粉末を添加したところ、RAW264.7 では Bi_2O_3 粉末を 10 mM 添加した群で吸光度は 20% 以下となり、有意に細胞の活性が下がったが、 ZrO_2 粉末と PC 粉末は、10 mM 添加群においても有意な活性の低下がみられないことが分かった。MC3T3-E1 では、 Bi_2O_3 粉末を 1 mM 以上添加した群で吸光度は 20% 以下となり、有意に細胞の活性が減少したが、 ZrO_2 粉末と PC 粉末は、10 mM 添加群においても細胞活性の有意な減少は見られなかった。

一方、各粉末の浸漬液の添加では、どの群においても細胞活性に有意な差は見られなかった。

また、平均粒径約 1 μm の粉末を添加した場合、 Bi_2O_3 粉末を 0.1 mM 以上添加した群では、両細胞とも有意に細胞傷害も増加した。一方、 ZrO_2 粉末と PC 粉末を添加した群では MC3T3-E1 への細胞傷害は認められず、RAW264.7 に対しても粉末を 0.1 mM 以下添加した群では細胞傷害は認められなかった。

平均粒径約 13 μm の粉末を添加した場合は Bi_2O_3 粉末を 1 mM 添加した群では、やや細胞傷害を認めたが、その他の群では細胞傷害は認められなかった。

さらに、 Bi_2O_3 粉末を 1 mM 添加した群では、ROS の酸化力は有意に上昇した。

SEM 観察の結果、いずれの粉末も細胞の表面へ付着していることがわかった。 ZrO_2 粉末および PC 粉末を添加した群では、通常細胞に比べ形態に大きな変化はみられなかった。一方、 Bi_2O_3 粉末を添加した群では、球状の細胞や突起の伸展が少ない細胞がみられ、細胞数も少なかった。

TEM 観察の結果、RAW264.7 と MC3T3-E1 の細胞質内には取り込まれた粒子が認められた。 ZrO_2 粉末と PC 粉末を添加した群では、細胞の形態はコントロール群と比べ明らかな差異はなく、細胞膜や核の破壊像は見られなかった。一方、 Bi_2O_3 粉末を添加した群では、破裂や膨潤した細胞や細胞小器官がみられ、細胞の破壊が顕著であった。

STEM-EDX 元素マップから、STEM 像に見られる細胞質内の粒子と、各元素の分布はほぼ一致していた。また、粒子中の一点から検出された特性 X 線のスペクトルでは、Bi, Zr, Si および Al にピークが見られた。

[考察および結論]

ZrO₂ 粉末や PC 粉末の添加により細胞に活性の低下が生じたが、その原因は溶出成分による作用よりも、粉末の取り込みによる作用が大きいと思われる。しかし、高い濃度でなければ細胞の活性の低下は認められず、ZrO₂ 粉末や未硬化の PC 粉末の毒性は低いと考えられる。

一方、Bi₂O₃ 粒子の細胞傷害は比較的強く、中性溶液に比べ酸性溶液中での Bi₂O₃ 粉末からの溶出量は増加することや、細胞に取り込まれにくい平均粒径約 13 μm の粉末添加による細胞障害が小さいことから、その傷害は粒子の細胞内への取り込みと、細胞内の酸性環境での溶解に伴って発現すると思われる。さらに、細胞内で溶出したビスマスイオンは活性酸素種を産生し、酸化ストレスによってネクロシス様に細胞が破壊される可能性が高いことが分かった (Fiers et al., 1999)。

MTA セメントは歯内療法用セメントとして優れた性質を有しているが、粒径が小さい X 線造影剤を添加する場合は、Bi₂O₃ よりも ZrO₂ などの化学的に安定な酸化物を用いた方が、より生体安全性が高くなることが明らかとなった。

[文献]

Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., & Vandenabeele, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, 18(54), 7719-7730.1999.

小林 千尋.MTA の臨床-よりよいエンドの治癒を目指して.東京;2013

Torabinejad M., Hong C. U., McDonald F., & Pitt Ford T. R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of endodontics*, 21(7), 349-353.1995.