

新規接着性モノマーを配合したグラスアイオノマーセメントの
暫間的間接覆髄材への応用

令和3年度

北海道医療大学 歯学部 口腔機能修復・再建学系 高度先進保存学分野

佐藤 幸平

要 旨

歯髄温存療法の一つに、暫間的間接覆髄法 (Indirect pulp capping ; 以下 IPC) があり、用いる覆髄材として水酸化カルシウム製剤などが推奨されているが、機械的強度や歯質接着性に乏しく、マイクロリークによる細菌感染の可能性が指摘されている。また覆髄後の経過観察期間は、コンポジットレジンやガラスアイオノマーセメントによる暫間修復が必要などの課題もある。本研究では優れた封鎖性と再石灰化誘導能を有する覆髄材の開発を目指し、象牙質再石灰化誘導活性を有する新規接着性モノマーである 4-MET-Ca (calcium 4-Methacryloxyethyl trimellitate; CMET) を従来型 GIC に添加した試作セメントの硬化体 (C-GIC) を製作し、材料学的および生物学的特性について検討を行った。C-GIC に対する比較対象には、4-MET を添加した試作セメントの硬化体 (4M-GIC) を用いた。

各種セメント硬化体の溶出液の pH 測定を行った結果、pH は GIC, C-GIC, 4M-GIC 群の順で高く、各群ともに CMET, 4-MET の用量依存的に低下した。また、C-GIC 群の Si, Al, Sr, Ca, F イオン徐放量は用量依存的に有意な増加を認め、20 % (w/w) 添加量で最も高いことを確認した。圧縮強さは C-GIC, 4M-GIC 群ともに CMET, 4-MET の用量依存的に低下を認めたが、せん断強さは用量に依存せず、20 % (w/w) C-GIC 群では、GIC 群と同等の高い値を維持したことを確認した。これは、CMET 由来の Ca イオンが GIC の架橋反応に関与し、マトリックスの形成に寄与したためと考えられた。

ヒト歯髄幹細胞 (hDPSCs) に対する C-GIC 群の細胞毒性は 10 % (v/v) C-GIC 群がすべての群において最も低かった。また、細胞増殖性においても他群と比較して高く、5, 10 % (v/v) 添加量が最も高い増殖性を確認した。これは、4-MET の溶出量、C-GIC が唯一保有する Ca イオンに加え、各種徐放イオンや化合物の影響を受けたと推測した。ALP 活性はすべての群で経目的に上昇を示し、15 日目では GIC, C-GIC 群で有意に高い活性値を確認した。また、アリザリンレッド染色では 28 日目の 10 % (v/v) C-GIC 群で有意な Ca 沈着量の亢進を示した。この理由として、CMET 由来の Ca イオンが細胞内に効率良く取り込まれた結果、細胞外基質中により多くの Ca の沈着量の亢進を認めたと考えられた。

以上より、C-GIC は象牙質の再石灰化が期待され、従来型 GIC と同等の歯質接着性を有し、歯髄保護を兼ね備えた IPC 用の充填材として応用できる可能性が示唆された。

目 次

| | |
|--------------------|---|
| 緒言 | 1 |
| 材料および方法 | 4 |
| 1. 材料学的検討 | |
| 1) 実験材料 | |
| 2) pH およびイオン徐放量の測定 | |
| 3) 圧縮強さの測定 | |
| 4) せん断接着強さの測定 | |
| 5) 破断面の観察 | |
| 6) 抗菌性試験 | |
| 7) 統計処理 | |
| 2. 生物学的検討..... | 7 |
| 1) 溶出液の作製 | |
| 2) 細胞培養 | |
| 3) 細胞毒性試験 | |
| 4) 細胞増殖試験 | |
| 5) 細胞分化に関する検討 | |
| 6) 石灰化能の評価 | |
| 7) 統計処理 | |
| 結果 | 9 |
| 1. 材料学的検討 | |
| 1) pH およびイオン徐放量の測定 | |
| (1) pH | |
| (2) Si イオン | |
| (3) Al イオン | |
| (4) Sr イオン | |

| | |
|--------------------------|----|
| (5) Ca イオン | |
| (6) F イオン | |
| 2) 圧縮強さの測定 | |
| 3) せん断接着強さの測定 | |
| 4) 破断面の観察 | |
| 5) 抗菌性試験 | |
| 2. 生物学的検討..... | 13 |
| 1) 細胞毒性試験 | |
| 2) 細胞増殖試験 | |
| 3) 細胞分化に関する検討 | |
| 4) 石灰化能の評価 | |
| 考察 | 14 |
| 1. 材料学的検討 | |
| 1) pH およびイオン徐放量の測定 | |
| 2) 圧縮強さの測定 | |
| 3) せん断接着強さの測定 | |
| 4) 破断面の観察 | |
| 5) 抗菌性試験 | |
| 2. 生物学的検討..... | 21 |
| 1) 細胞形態の観察・細胞毒性 / 細胞増殖試験 | |
| 2) 細胞分化に関する検討 | |
| 3) 石灰化能の評価 | |
| 結論 | 26 |
| 謝辞 | 27 |
| 文献 | 28 |
| 表・付図 | |

緒 言

厚生労働省の 2018 年度全国抜歯原因調査(公益財団法人 8020 推進財団, 2018)によると, 歯の喪失原因として歯周病に次いで多いのが, う蝕と破折であり, 両者には密接な関係がある. う蝕が原因で抜髄された無髄歯は, 最終的には歯冠補綴によって咬合再建が施されるが, 中には, う蝕による歯質の欠損範囲が大きい場合や, 根管治療における過度の歯質の切削, 不適切な支台築造処置などによって, 日常の咬合負担に耐えきれず破折に至ることも多い. つまり, 破折とう蝕をまとめて「う蝕由来」として考えると, 割合は最も多くなり, 歯の喪失の最大の原因と考えることができる. 歯髄が保存され, 無髄歯に至らなければ, 歯の破折も生じにくくなり, 結果として国民の歯の喪失を防ぐことができる.

日常の歯科臨床において, 歯髄に達するような深在性のう蝕に遭遇することは珍しくない. その多くは自発痛などの臨床症状を伴い, 不可逆性の歯髄炎の診断のもとに抜髄が適応されるが, 中には臨床症状を伴わず, 可逆性の歯髄炎に留まっているものもある. そのような場合には, 感染歯質の除去後は, 可能な限り歯髄の温存に努め, 歯冠修復が行われる. しかし, 感染歯質の完全な除去は, う蝕治療の基本ではあるが, 深在性のう蝕においては, 積極的な感染歯質の除去によって, 偶発的な露髄が避けられない場合も多い. 偶発的な露髄が生じた場合には, 直接覆髄が適応され, 従来から水酸化カルシウムが第一選択として用いられてきたが, 近年, MTA セメント (Mineral Trioxide Aggregate, 以下, MTA) の登場によって, 水酸化カルシウムに代わる新しい直接覆髄材として, 現在の歯科臨床には欠かせない生体材料として世界的に普及している (興地ら, 2012). 直接覆髄は材料学的な観点からみると, MTA を用いた場合は, 水酸化カルシウムを用いた場合に比べ, 良好な予後が得られたとの報告 (興地ら, 2012) があるが, 直接覆髄法は, その成功率にはばらつきがあり, 必ずしも常に安定した予後が得られているわけではないとされている (日本歯科保存学会, 2015). 一方, 同様の深在性のう蝕において, 露髄を生じさせることなく修復できた場合には, ほぼすべての症例において良好な予後が得られることが多く, 歯髄の温存においては, 直接覆髄に比べて予知性の高い結果が得られている (日本歯科保存学会, 2015). これらから, 歯髄を保存することは「う蝕由来」

による歯の喪失を防ぐことに大きく貢献できると考えられる。

暫間的間接覆髄法 (Indirect pulp capping, 以下, IPC) は、深在性のう蝕を有する歯において、う蝕の完全除去によって露髄を生じる可能性がある場合に、感染象牙質深層を意図的に残存させ、暫間的に覆髄を行い、感染象牙質の再石灰化や修復象牙質形成を促す方法であり、自発痛などの臨床症状のない場合、あるいは可逆性の歯髄炎と診断された歯に対して適応される (千田ら, 2016)。IPC の最大の特徴は、間接覆髄や直接覆髄とは異なり、露髄の回避を最優先と考え、そのために戦略的に感染象牙質を残置させること、また、生体自身の自己修復能力によって修復象牙質を形成させながら、複数回に分けて罹患歯質の除去が行われる (後藤, 1985)。これらの事から、感染象牙質の再石灰化と、修復象牙質の形成促進作用を有することは、IPC に用いる材料にとっては重要な要件となる。水酸化カルシウム製剤は、IPC だけに限らず、間接覆髄や生活歯髄切断法、直接覆髄法などの歯髄温存療法全般に従来から用いられてきた (Hilton, 2009)。その目的は、歯髄近傍の象牙質や露髄面に、修復象牙質や被蓋硬組織を誘導・形成させることである。形成された修復象牙質や被蓋硬組織によって、生体自身の能力で歯髄が保護され、歯髄を保存することができる。しかし、水酸化カルシウムは機械的強度に乏しく、歯質に対する封鎖性にも乏しいため、歯髄保護中の仮封期間におけるマイクロリークや、それに起因した細菌感染を引き起こす懸念がある (興地ら, 2012; Hilton, 2009)。IPC においては、最終修復までの一定期間中に施される仮封の良否が、その予後を左右するとの報告もあることから (後藤, 1985)、残置した感染象牙質の石灰化と、十分な修復象牙質の形成をすることができ、かつ、良好な歯質接着性を有する修復材料の適用が望ましいと考える。

水酸化カルシウムなどによる覆髄材の貼付後は、グラスアイオノマーセメント (以下, GIC) など で強固な暫間的修復が施される (千田ら, 2016)。GIC は、セメント自体が歯質接着性を有し (Wilson AD et al., 1983)、被着面に多少の水分や体液などが付着していても接着や硬化に影響が少なく (Chalmers JM, 2006; Jenson et al., 2007)、耐酸性の向上やフッ化物の徐放といった特徴を有している (棚瀬, 1983)。現在、日常の歯科臨床においては、接着性修復材料を用いて修復処置を行う場合、歯質接着性や強度、審美性などが GIC より優れているという理由から、コンポジットレジンが第一選択となっている (日本歯科保存学会, 2015) が、開発途

上国における ART 法 (Atraumatic Restorative Treatment : 非侵襲的修復治療) (Frencken et al., 1996) においては GIC が第一選択として適用されている。ART 法は、手用切削器具によって可及的に感染歯質を除去した後、従来型 GIC による修復を行うものである。感染歯質の除去後も、窩底象牙質には細菌が残存している可能性が高いが、GIC からのフッ化物の徐放による抗う蝕作用と再石灰化、歯質接着性に期待した治療法である (千田ら, 2016)。IPC と ART は、開発に至った背景やコンセプト、詳細な手技などは異なるが、処置において歯髄に与える影響が少ない点と、感染象牙質を残置させたまま窩を封鎖する点に関しては、両者は非常に類似している。

IPC での最終修復は、う窩のリエントリーと残置した感染象牙質の除去は必ずしも必要でないとする報告がある (Malts M, 2012)。感染象牙質の除去なしに最終修復を行うことに関しては、十分な根拠が未だないため (Kidd, 2000; Ranly & Garcia-Godoy, 2000)、現時点ではリエントリーして残置した感染象牙質の除去を行った上での最終修復が推奨されている (日本歯科保存学会, 2015)。残置した感染象牙質を、石灰化させることができ、高い修復象牙質形成能と歯質接着性、長期耐久性を有する修復材料を開発・応用することができれば、覆髄や暫間修復だけではなく、最終修復前の裏層にも応用することによってリエントリーの回数を減らせる可能性があり、歯髄の保存、さらには歯の保存に大きく貢献することができると考えられる。

Ito らは、象牙質再石灰化誘導活性を有する新規モノマーである 4-MET-Ca (calcium 4-Methacryloxyethyl triellitate, 以下, CMET) を開発した (Ito ら, 2012)。CMET は、従来から用いられている接着性モノマーである 4-MET のカルシウム塩である (図 1)。これまでの研究によれば、CMET 自体が石灰化能を有するだけではなく、象牙質再石灰化にも影響を与えていることが報告されている (Ito ら, 2012; 甕ら, 2015; 伊藤, 2017)。

本研究では、この CMET を従来型 GIC に応用することで、従来の IPC における封鎖性の改善に加え、残置された感染象牙質、並びに、象牙質の石灰化誘導活性を有する新規材料を開発することを目的とした。そこで、CMET を従来型 GIC に添加した試作セメントの硬化体 (以下, C-GIC) を用いて、暫間的間接覆髄材としての機能を持った修復材料の可能性を材料学的、生物学的に検討した。

材料および方法

1. 材料学的検討

1) 実験材料

実験には、従来型 GIC であるフジⅦ（ジーシー）と、接着性モノマーとして CMET および 4-MET（サンメディカル）を使用した。材料の組成を表 1 に示す。CMET の添加量がセメントへの物性に及ぼす影響を検討するために、フジⅦに CMET をそれぞれ 10 % (w/w), 20 % (w/w) 添加した試作セメントの硬化体を製作した。C-GIC に対する比較対象には、フジⅦに 4-MET をそれぞれ 10 % (w/w), 20 % (w/w) 添加した試作セメント（以下、4M-GIC）の硬化体を製作して用い、また、コントロールにはフジⅦを用いた（以下、GIC）（表 2）。

2) pH およびイオン徐放量の測定

直径 18 mm × 厚さ 2 mm の円形シリコン包埋板（堂阪イーエム）に各種セメント練和物を填入し、ガラス練板を介して加圧器で圧接加圧を行い、セメント硬化体のディスクを製作した（以下、ディスク）。セメント練和物は、練和開始 1 分 40 秒経過後、加圧器で固定したまま 37℃、相対湿度 90 %の恒温器中に 60 分静置した。静置後、ディスクを包埋板から取り出し、20 ml の超純水に浸漬させ、1 日間室温で保管した。浸漬後、ディスクを取り出し、溶液を 0.2 μ m セルローズフィルター（DISMIC-25CS, アドバンテック）で濾過し、得られた溶出液を試料として、ケイ素 (Si), アルミニウム (Al), ストロニウム (Sr), カルシウム (Ca), フッ素 (F) イオンの溶出量と pH を測定した。F イオンの測定は、製作した溶出液 10 ml に対し、全イオン強度調整剤として TISABⅢ (Thermo Fisher Scientific) を 1 ml 加えて攪拌した後、複合型フッ化物イオン選択性電極 (6561S-10C, 堀場製作所) を用いて行った。Si, Al, Sr, Ca イオンの測定には、高周波発光プラズマ発光分析装置 (ICPE-9000, 島津製作所) を用い、pH の測定には、pH 電極 (6367-10D, 堀場製作所) を用いた。各測定項目につき、試料数は n=5 とした。

3) 圧縮強さの測定

直径 6 mm × 高さ 12 mm の真鍮製円柱型モールドに各種セメント練和物を填入し、ガラス練板を介して加圧器で固定し、圧接加圧により余剰な練和物を除去して円柱状の試料を製作した。コントロールと同様、粉液比はすべての群で 1.8/1.0 とした。なお、試料は練和開始から 1 分 40 秒経過後、加圧器で固定したまま 37℃、相対湿度 90 %の恒温器中で 60 分間静置した。硬化後、試料をモールドから取り出し、37℃の蒸留水中に 1 日、7 日、28 日間浸漬させ、精密万能試験機 (AG-IS20kN, 島津製作所) を用いて、ロードセル容量 20kN , クロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件下で、試料の長軸方向に圧縮荷重を加えて測定を行った。試料が破断するまでの最大荷重を記録し、圧縮強さを算出した。なお、試料数は各条件につき $n=6$ とした。

4) せん断接着強さの測定

北海道医療大学病院に来院し、治療上抜歯が必要と診断され、本研究の内容に関してインフォームドコンセントが得られた患者より提供された、う蝕のない抜去大白歯 75 本を実験に用いた。なお、本研究は、北海道医療大学歯学倫理審査委員会に承認された (承認番号 第 203 号)。抜去歯の歯冠中央部を、歯軸に対して平行にかつ近遠心方向に精密低速切断機 (Isomet, low speed saw, Buehler) にて切断し、健全な象牙質を露出させた後、露出面が上面となるように歯科汎用アクリル系レジン (TRAYRESIN II, 松風) を用いてモールド内に包埋した。包埋後、露出面を #600 耐水研磨紙を用いて研磨し、得られた被着面に、直径 3.0 mm × 高さ 3.0 mm のポリエチレン製モールドを置き、各種セメント練和物を填入、圧接し、円柱状の試料を得た。本実験で用いる試作セメントは、暫間的間接覆髄材を想定したものであり、歯髄近傍の象牙質に対する歯質接着性を評価する必要があるため、抜去歯の天蓋直上の象牙質に円柱状試料が位置するように設置した。試作セメントの練和は、圧縮強さの測定時と同様に、液はフジVIIのものを使用し、粉液比はすべての群で 1.8/1.0 とした。練和から 1 分 40 秒経過後、試料を 37℃、相対湿度 90 %で 30 分間静置し、ポリエチレン製モールドを除去した後、37℃の蒸留水中に 1 日、7 日、28 日間浸漬させ、万能試験機 (EZ test, 島津製作所) を用いて、ロードセル容量 500 N , クロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件下で、被着面に平行な

方向から接着界面部分に圧縮せん断応力荷重を加えて測定を行った。試料が破断するまでの最大荷重を記録し、接着強さを算出した。試料数は各条件につき $n=10$ とした (図 2)。

5) 破断面の観察

接着強さの測定後、試料 ($n=10$) をアルコール脱水にて十分に乾燥させ、イオンコーター (IB-3, エイコー) にて金蒸着を行い、走査電子顕微鏡 (SSR-550, 島津製作所, 以下, SEM) を用いて破断面の観察を行った。セメントと象牙質間の破壊様式は、凝集破壊, 混合破壊, 界面破壊の 3 つに分類した。

6) 抗菌性試験

試料には、溶出液の pH およびイオン徐放量の測定と同様の方法で製作した各種ディスク (直径 18 mm, 厚さ 2 mm) を用い、被検材料とした。なお、コントロールは GIC 群とした。供試菌として、*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, ACTT 12600), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*, NCTC 10449), *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*, ACTT 19246), *Candida albicans* (*C. albicans*, ACTT 18804) の 4 菌種を使用した。培地は、*S. aureus* には Mannit Salt agar (日本 BD), *S. mutans* には Mitis-Salivarius agar (日水製薬), *A. viscosus* には Brain heart infusion agar (日本 BD, 以下, BHI agar), *C. albicans* には Sabouraud agar (日本 BD) を用いて、24 時間予備培養を行った。培養条件は、*S. aureus*, *C. albicans* は 37°C, 大気中 (BIO-SHAKER BR-15, TAITEC), *S. mutans* は、37°C (CO₂ INCUBATOR, SANYO), 5 %CO₂, *A. viscosus* は、37°C, 嫌気環境 (TE-HER ANAEROBOX ANB-120R, ヒラサワ) とした。予備培養から得られた一つのコロニーを 2.0 ml の BHI 液体培地に接種して、さらに 24 時間予備培養を行った。この各菌液が対数増殖期となるように 50 μ l/50 ml (BHI) で接種し、2~8 時間の予備培養後、吸光光度計 (UV mini-1240, 島津製作所) を用いて菌液の濁度を OD₆₀₀ にて測定した。濁度をもとに、各供試菌に応じた OD₆₀₀ (*S. aureus*: 0.001, *S. mutans*: 0.01, *A. viscosus*: 0.1, *C. albicans*: 0.01) となるように各菌液濃度を調整して、10 ml の新たな BHI 液体培地に添加した。各種ディスクを 12 well-plate に設置し、各菌液を 1.0 ml/well となるように添加しディスクを浸漬させた。各供試菌を至適培養条件下で 24 時間培養後、プレー

トミキサー (Micro Mixer E-36, TAITEC) にて各菌液を攪拌し、培養原液を PBS にて 10^2 , 10^4 , 10^6 倍に段階希釈を行った。各菌液の原液と、各希釈液の $100\ \mu\text{l}$ を、BHI agar に塗抹して、各供試菌の培養条件下で 24 時間培養し、形成したコロニー数を算定し、生菌数 (単位: Colony Forming Unit: CFU) を求めた ($n=3$)。

7) 統計処理

pH およびイオン徐放量の測定においては、one-way ANOVA および Tukey' s test を用いて、圧縮強さならびにせん断接着強さの測定においては、Two-way ANOVA および Tukey' s test を用いて、抗菌性試験においては、one-way ANOVA および Games-Howell test を用いて、ともに有意水準 5 %にて統計処理を行った。統計解析には、SPSS 26.0 (IBM) を用いた。

2. 生物学的検討

1) 溶出液の作製

pH およびイオン徐放量の測定時と同様の方法で、各種セメントの溶出液を作製した。作製にあたっては、C-GIC, 4M-GIC 両群の溶出液中に含まれる 4-MET 分子のモル数を揃える目的で、20 % (w/w) C-GIC と 18 % (w/w) 4M-GIC を用い、コントロールは GIC 群とした。得られた各種溶出液は、適切な条件濃度に調整し、培養液に添加し、検討した。

2) 細胞培養

本研究における検討には、ヒト歯髄幹細胞 (Human dental pulp cells; hDPSCs, catalog number PT-5025; Lot number 0000361427, Lonza) を用いた。通常培地には、Dulbecco Modified Eagle' s Medium (DMEM, Sigma Aldrich) 培地に、10 %ウシ胎児血清 (Gibco), 100 U/mL ペニシリン (Gibco), 100 $\mu\text{g/mL}$ ストレプトマイシン (Gibco) を添加したものをを用いた。分化誘導培地には、通常培地に 10 mmol/L β -グリセロリン酸 (和光純薬), 50 $\mu\text{g/mL}$ アスコルビン酸 (和光純薬) を添加したものをを用いた。hDPSCs を通常培地中で、37°C, 湿度 100 %, 5 %CO₂ の存在下で培養し、継代培養後の、第 4 継代の細胞を検討に用いた。

3) 細胞毒性試験

hDPSCs を 96 well plate に 1.0×10^3 cells/well で播種した。1 日経過後に、各種溶出液を 10, 20, 30, 40, 50 % (v/v) に調整して通常培地に添加し、播種 3 日目に、細胞毒性試験を行った。検討は、細胞増殖/細胞毒性測定用試薬の WST-8 (Cell counting kit-8 assay; CCK-8, 同仁堂) の添付文書に従い行った。測定時、各 well に 10 μ l の CCK-8 試薬を添加し、37°C, 5 %CO₂ 下で 80 分間経過後、マイクロプレートリーダー (iMark™, Bio-Rad) を用いて、波長 450 nm で吸光度を測定した。

4) 細胞増殖試験

細胞毒性試験と同様の方法で細胞を播種し、1 日経過後に、各種溶出液を 1, 2, 5, 10, 15, 20 % (v/v) に調整して通常培地に添加した。播種 5 日目に、細胞増殖試験を行った。増殖性の検討は、細胞毒性試験と同様に CCK-8 を用いて行った。

5) 細胞分化に関する検討

hDPSCs を 6 well plate に 5.0×10^4 cells/well で播種した。播種 6 日目に、通常培地から分化誘導培地に交換し、各種溶出液を 2.5, 5, 10 % (v/v) に調整して添加し、播種 9 日, 12 日, 15 日目に、ALP 活性の測定を行った。PBS にて well 内を洗浄し、300 μ l の 0.1 % Triton-X-100 (Sigma-Aldrich) を加えて氷上にて細胞を溶解した。その後、細胞溶解液を回収し、氷上で 10 分間の超音波処理を施した後、4°C, 120,000 rpm で 15 分間遠心分離を行い、細胞上清を回収した。初めに LabAssay™ ALP (和光純薬) を用いて ALP 活性を測定した。96 well-plate に 20 μ l/well の細胞上清と、100 μ l/well の基質緩衝液 (ρ -ニトロフェニルリン酸二ナトリウム, 6.7mmol/l) を加えて、プレートミキサー (Micro Mixer E-36, TAITEC) にて 1 分間攪拌した後、37°C の恒温器中で 15 分間反応させた。その後、80 μ l/well の反応停止液 (水酸化ナトリウム溶液, 0.2mol/l) を加え、プレートミキサーにて 1 分間攪拌し、マイクロプレートリーダーにて波長 405 nm で吸光度を測定した。続いて BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いてタンパク質量を測定し、波長 570 nm で吸光度を測定した。pH9.8, 37°C で 1 分間に 1 nmol の ρ -Nitrophenol を生成する酵素活性を 1 unit とし、これを試料中の

タンパク質量で除したものを最終的な ALP 活性値として算出した。

6) 石灰化能の評価

hDPSCs を 6 well plate に 3.0×10^4 cells/well で播種した。播種 7 日目に、通常培地から分化誘導培地に交換し、各種溶出液を 2.5, 5, 10 % (v/v) に調整して添加した。播種 21 日, 28 日目に、PBS にて well 内を洗浄し、細胞を 10 % 中性ホルマリン緩衝液 (和光純薬) にて 10 分間固定した。固定後、超純水にて洗浄し、細胞のミネラル化を可視化するためにアリザリンレッド染色液 (1 %m/v, pH4.02) (ARS, 和光純薬) を加え、37°C の恒温器中に 10 分間静置した。その後、染色液を除去し、洗浄液が透明になるまで細胞単層を数回洗浄し、倒立デジタルカメラ (キヤノン) を組み込んだデジタル画像システム (船越) を用いて、染色像を撮影した。

染色後、塩化セチルピリジニウム溶液 (10 %m/v 蒸留水) (CPC, Sigma-Aldrich) を各 well に添加して 37°C の恒温器中に 60 分間静置した。その後、溶液を 96 well plate に $200 \mu\text{l/well}$ 添加し、マイクロプレートリーダーにて 570 nm の波長で吸光度を測定し、Ca 沈着量の定量化を行った。

7) 統計処理

すべてのデータの統計処理は、One-way ANOVA および Tukey' s test を用いて、有意水準 5 % にて行った。統計解析には、SPSS 26.0 (IBM) を用いた。

結 果

1. 材料学的検討

1) pH およびイオン徐放量の測定

(1) pH の測定

各種溶出液の pH の測定結果を表 3 に示す。pH は、コントロール群 (5.81 ± 0.05) が最も高く、続いて 10 % (w/w) (5.69 ± 0.02)、20 % (w/w) C-GIC (5.37 ± 0.03)、10 % (w/w) (5.41 ± 0.07)、20 % (w/w) 4M-GIC (4.99 ± 0.05) の順となった。両群ともに、用量依存的に有意な低下を示し ($p < 0.05$)、10 % C-GIC と 10 % 4M-GIC、20 % C-GIC と 20 % 4M-GIC の比較 (以下、同一添加量間での比較と表記す

る) では 4M-GIC 群で有意な低下を示した ($p < 0.05$).

(2) Si イオン

Si イオン徐放量の測定結果を 図 3 に示す. コントロール群が 7.07 ± 0.89 ppm, 10 % (w/w) C-GIC が 9.69 ± 0.69 ppm, 20 % (w/w) C-GIC が 16.66 ± 1.93 ppm, 10 % (w/w) 4M-GIC が 11.82 ± 0.83 ppm, 20 % (w/w) C-GIC が 17.10 ± 2.07 ppm であった. C-GIC, 4M-GIC 群ともに, 用量依存的に徐放量の増加を認め, 20 %添加量で有意に高い値を示した ($p < 0.05$). 同一添加量間の比較では, 10 %, 20 %ともに有意差は認めなかった ($p > 0.05$).

(3) Al イオン

Al イオン徐放量の測定結果を 図 3 に示す. コントロール群が 12.42 ± 1.33 ppm, 10 % (w/w) C-GIC が 15.48 ± 0.87 ppm, 20 % (w/w) C-GIC が 26.32 ± 2.37 ppm, 10 % (w/w) 4M-GIC が 28.60 ± 2.54 ppm, 20 % (w/w) C-GIC が 55.56 ± 5.59 ppm であった. C-GIC, 4M-GIC 群ともに, 用量依存的に徐放量の増加を認め, 20 % (w/w) 添加量で有意に高い値を示した ($p < 0.05$). 同一添加量間の比較では, 10 % (w/w), 20 % (w/w) ともに 4M-GIC 群で有意に高い値を示した ($p < 0.05$).

(4) Sr イオン

Sr イオン徐放量の測定結果を 図 3 に示す. コントロール群が 0.50 ± 0.13 ppm, 10 % (w/w) C-GIC が 8.38 ± 0.37 ppm, 20 % (w/w) C-GIC ppm が 49.74 ± 4.51 ppm, 10 % (w/w) 4M-GIC が 21.62 ± 5.13 ppm, 20 % (w/w) C-GIC が 82.92 ± 10.99 ppm であった. Al イオン同様, C-GIC 群, 4M-GIC 群ともに, 用量依存的に徐放量の増加を認め, 20 % (w/w) 添加量で有意に高い値を示し ($p < 0.05$), 同一添加量間の比較においても, 10 % (w/w), 20 % (w/w) 添加量ともに 4M-GIC 群で有意に高い値を示した ($p < 0.05$).

(5) Ca イオン

Ca イオン徐放量の測定結果を 図 3 に示す. Ca イオンの徐放は, C-GIC 群のみに認められ, 10 % (w/w) C-GIC で 0.81 ± 0.10 ppm, 20 % (w/w) C-GIC で 11.94

±1.21 ppm であり, 20 %添加量で有意に高い値を示した ($p < 0.05$).

(6) F イオン

F イオン徐放量の測定結果を図 3 に示す. コントロール群が 12.84 ± 0.65 ppm, 10 % (w/w) C-GIC が 12.84 ± 0.59 ppm, 20 % (w/w) C-GIC が 15.20 ± 0.67 ppm, 10 % (w/w) 4M-GIC が 16.36 ± 0.81 ppm, 20 % (w/w) C-GIC が 17.60 ± 0.41 ppm であった. C-GIC 群においては, コントロール群と 10 % (w/w) 添加量間で有意差は認めず ($p > 0.05$), 20 % (w/w) 添加量で有意に高い値を示した ($p < 0.05$). 一方, 4M-GIC 群では, コントロール群に対し, 10 % (w/w), 20 % (w/w) 添加量で有意に高い値を示したが ($p < 0.05$), 10 % (w/w), 20 % (w/w) 添加量間には有意差は認めなかった ($p > 0.05$).

2) 圧縮強さの測定

圧縮強さの測定結果を図 4 に示す. 浸漬 1 日の圧縮強さは, コントロール群が 124.96 ± 12.76 MPa, 10 % (w/w) C-GIC が 98.36 ± 4.10 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 74.16 ± 3.06 MPa, 10 % (w/w) 4M-GIC が 94.23 ± 8.16 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 65.93 ± 7.53 MPa であった. 浸漬 7 日の圧縮強さは, コントロール群が 121.50 ± 9.14 MPa, 10 % (w/w) C-GIC が 94.28 ± 13.23 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 71.29 ± 11.62 MPa, 10 % (w/w) 4M-GIC が 95.09 ± 12.73 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 66.56 ± 5.68 MPa であり, 浸漬 28 日の圧縮強さは, コントロール群が 114.71 ± 13.33 MPa, 10 % (w/w) C-GIC が 97.41 ± 9.29 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 77.28 ± 9.06 MPa, 10 % (w/w) 4M-GIC が 94.27 ± 13.06 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 62.02 ± 10.16 MPa であった. 圧縮強さは, すべての浸漬期間においてコントロール群が最も高く, C-GIC, 4M-GIC 群は, 用量依存的に有意な低下を認めた ($p < 0.05$). 同一添加量間では有意差は認めず ($p > 0.05$), また, すべての群において, 浸漬期間は圧縮強さに有意な影響を与えなかった ($p > 0.05$).

3) せん断接着強さの測定

接着強さの測定結果を図 5 に示す. 浸漬 1 日の接着強さは, コントロール群が 4.55 ± 1.33 MPa, 10 % (w/w) C-GIC が 4.83 ± 0.79 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 3.94

± 1.55 MPa, 10 % (w/w) 4M-GIC が 2.24 ± 1.67 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 1.37 ± 0.76 MPa であった. 浸漬 7 日の接着強さは, コントロール群が 4.99 ± 1.75 MPa, 10 % (w/w) C-GIC が 4.89 ± 1.59 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 4.52 ± 1.25 MPa, 10 % (w/w) 4M-GIC が 2.56 ± 1.08 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 1.52 ± 1.12 MPa であり, 浸漬 28 日の接着強さは, コントロール群が 4.84 ± 1.58 MPa, 10 % (w/w) C-GIC が 5.05 ± 2.60 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 4.11 ± 1.18 MPa, 10 % (w/w) 4M-GIC が 2.11 ± 1.28 MPa, 20 % (w/w) C-GIC が 1.32 ± 0.59 MPa であった. C-GIC 群は, すべての浸漬期間において 4M-GIC 群に対し有意に高い接着強さを示し ($p < 0.05$), コントロール群とは同等の接着強さを示した. また, 両群ともに, 粉末の添加量は接着強さに有意な影響を与えず ($p > 0.05$), 浸漬期間もまた、有意な影響を与えなかった ($p > 0.05$).

4) 破断面の観察

接着強さの測定後の破壊様式の結果を 表 4 に示す. コントロール群, C-GIC 群は, 浸漬 1 日目, 7 日目で凝集破壊が多く, 28 日目では、混合破壊が多くなり, 次いで界面破壊が増加した. 一方, 4M-GIC 群は, 浸漬 1 日目で界面破壊が多く, 7 日目, 28 日目では混合破壊が増加した.

5) 抗菌性試験

抗菌性試験の結果を図 6 に示す. *S. aureus* の生菌数は, 無添加群 (N.A; No Addition) が 2.8×10^9 CFU/ml, コントロール群が 5.9×10^8 CFU/ml, C-GIC 群が 1.3×10^8 CFU/ml, 4M-GIC 群が 1.9×10^7 CFU/ml であり, 無添加群に対してコントロール群, C-GIC 群, 4M-GIC 群は, 有意に生菌数の減少を認めたが, 3 群間には有意差は認めなかった. *S. mutans* の生菌数は, 無添加群が 6.0×10^8 CFU/ml, コントロール群が 1.9×10^8 CFU/ml, C-GIC 群が 1.4×10^8 CFU/ml, 4M-GIC 群が 1.2×10^7 CFU/ml であり, また, *A. viscosus* の生菌数は, 無添加群が 1.2×10^9 CFU/ml, コントロール群が 3.2×10^8 CFU/ml, C-GIC 群が 7.0×10^7 CFU/ml, 4M-GIC 群が 1.0×10^7 CFU/ml であった. *S. mutans* と *A. viscosus* は, *S. aureus* と同様に, 無添加群に対してコントロール群, C-GIC 群, 4M-GIC 群で有意に生菌数の減少を認め, 3 群間には有意差は認めなかったが, 実測値としては 3 菌種ともに 4M-GIC

群が最も生菌数が少なく，続いて C-GIC 群，コントロール群の順に少ない傾向を示した．一方，*C. albicans* の生菌数は，無添加群が 2.9×10^7 CFU/ml，コントロール群が 3.5×10^9 CFU/ml，C-GIC 群が 3.2×10^7 CFU/ml，4M-GIC 群が 3.2×10^7 CFU/ml であり，無添加群を含むすべての群間に有意差は認めず、同等の生菌数であった．

2. 生物学的検討

1) 細胞毒性試験

細胞形態は，無添加群を除くすべての群において，濃度依存的に hDPSC に特徴的な紡錘形の形態が萎縮し，丸みを帯びた形態を呈した．また，細胞は，密度や増殖性が失われてゆく傾向を示し（図 7-9），特に，4M-GIC 群で顕著に認められた（図 9）．また，細胞毒性試験の結果，10 % (v/v) C-GIC（吸光度 0.24 ± 0.03 ）と 20 % (v/v) C-GIC（ 0.19 ± 0.03 ）は，コントロール群，4M-GIC 群よりも有意に低い毒性を示した（ $p < 0.05$ ）（図 10）．

2) 細胞増殖試験

細胞の増殖性は，C-GIC 群が他群に比較して高い傾向を示し（ $p < 0.05$ ），5 % (v/v) C-GIC（吸光度 0.38 ± 0.05 ）および 10 % (v/v) C-GIC（吸光度 0.38 ± 0.04 ）は，最も高い値を示した（ $p < 0.05$ ）（図 11）．

3) 細胞分化に関する検討

ALP 活性値は，すべての群で経日的に上昇し，播種 12 日目から 15 日目において上昇する傾向を認めた．特に 15 日目では，2.5 % (v/v) GIC の ALP 活性値が吸光度 0.075 ± 0.003 ，5 % (v/v) GIC が 0.081 ± 0.008 ，10 % (v/v) GIC が 0.081 ± 0.015 であり，コントロール群が高い ALP 活性値を示した．また，2.5 % (v/v) C-GIC の ALP 活性値は吸光度 0.067 ± 0.004 ，10 % (v/v) C-GIC は 0.60 ± 0.004 であり，C-GIC 群はコントロール群，4M-GIC 群と比較して高い ALP 活性値の傾向を示した（図 12）．

4) 石灰化能の評価

21 日目の染色像では、10 % (v/v) C-GIC, 5 % (v/v), 10 % (v/v) 4M-GIC で淡い赤染を認めたが、28 日目では、10 % (v/v) C-GIC で濃染を認めた。(図 13, 15) CPC による 21 日目の Ca 沈着量は、10 % (v/v) C-GIC が吸光度 0.12 ± 0.01 , 5 % (v/v) 4M-GIC が 0.10 ± 0.01 , 10 % (v/v) 4M-GIC が 0.12 ± 0.01 であり、他群に比較して有意な Ca の沈着量を認め ($p < 0.05$), 28 日目においては、10 % (v/v) C-GIC が吸光度 0.26 ± 0.03 であり、他群に比較して有意に高い Ca 沈着量の亢進を認めた ($p < 0.05$) (図 14, 16).

考 察

1. 材料学的検討

GIC は、粉末のフルオロアルミノシリケートガラスと、液のポリカルボン酸を主成分とし、これらが練和されることで酸 - 塩基反応が生じて硬化する。練和開始後、ポリカルボン酸がアルミノシリケートガラス粉末表面を溶解し、Al イオンや Ca イオンが溶出する。これらのイオンがポリカルボン酸中のカルボキシル基と反応し、未溶解のアルミノシリケートガラス粉末を抱え込むようにイオン架橋が次々と起きて結合が増強し硬化する(宮坂ら, 2020)。セメント硬化体は、未溶解のアルミノシリケートガラスがコアとなり、ポリカルボン酸塩からなるケイ酸ゲルがマトリックスを形成するような有芯構造となっている(日比野, 2016)。また、酸によって脱灰された歯質表層の Ca と、ポリアクリル酸中のカルボキシル基がイオン結合して歯質との接着が生じる。

1) pH およびイオン徐放量の測定

今回研究に用いた試作セメントの硬化体を用いて、pH およびイオン徐放量の測定を行った。C-GIC 群, 4M-GIC 群ともに、用量依存的に溶出液の pH は有意に低下した。両群における粉液比は、粉末の総量に対して常に 1.8/1.0 で一定であるから、粉末の添加量増加に伴い、セメント硬化体中には未反応のポリアクリル酸が増え、溶出液の pH を低下させたと考えられた。また、同一添加量間で比較した場合、10 % (w/w), 20 % (w/w) 添加量ともに 4M-GIC 群の方が低い pH を示した。

CMET および 4-MET 単体では、前者は中性、後者は酸性を示す報告 (Qiu et al., 2020) があり、本研究の結果は、未反応のポリアクリル酸の影響に加え、4-MET 自身の酸性性質も影響した可能性が考えられた。

セメント硬化体からの各種イオンの徐放は、セメントの崩壊に影響を受けることが知られており、さらにその崩壊には、粉液比や硬化体中のコアとマトリックスの割合に関連する機械的強さなどが関与しているといわれている (野俣, 1990; 小出ら, 1993; 小出ら, 1995)。本研究では、試作セメントの Si, Al, Sr, Ca, F イオンの 5 種類のイオンの徐放量を測定し、検討を行った。

C-GIC 群, 4M-GIC 群の Si イオンと Al イオンは、用量依存的に徐放量の増加を認め、両群ともに 20 % (w/w) 添加量で有意に高かった。同一添加量間での比較では、Si イオン徐放量は 10 % (w/w), 20 % (w/w) 添加量ともに有意差は認めなかったが、Al イオンでは 10 % (w/w), 20 % (w/w) 添加量ともに 4M-GIC 群が有意に高かった。GIC における崩壊は、Si イオンと Al イオンの徐放量を用いて評価することができる (野俣, 1990)。Si はガラス粉末の基質として含まれており、セメント硬化体中ではコアとして存在している (日比野, 2016)。よって、Si イオンの徐放量は、セメントの崩壊を直接的に反映し、コアによる機械的強さの指標として考えることができる (野俣, 1990)。Al イオンの徐放量は、セメントの崩壊とともに、マトリックスによる機械的強さの指標として考えることができる (野俣, 1990)。本研究の結果から、両群ともに、セメントの崩壊は粉液比の影響を受けるが、コアよりもマトリックスでの崩壊が多く生じていることが推察され、特に 4M-GIC 群では、より低い pH 環境によって、ガラス粉末表層が強く侵食され、イオン徐放量が増加した可能性が考えられた。

測定した徐放イオンの中で、C-GIC 群, 4M-GIC 群ともに最も徐放量が多かったのは、20 % (w/w) 添加量における Sr イオンであった。今回用いた GIC であるフジVIIには Ca が配合されておらず、造影効果の向上を目的に Sr が配合されている (Sayed & Ian, 2009)。フジVII以外にも、Ca の代わりに Sr が用いられている GIC があり、それらを用いたセメントの崩壊と溶出に関する研究では、Sr が Ca の代わりに硬化反応に関与するとの報告がある (野俣, 1990)。Sr イオンの徐放は、コントロール群ではほとんど認めなかった。これは、一次硬化反応は、練和開始から約 30 分ではほぼ終了しており (野俣, 1990)、ほぼすべての Sr イオンが反応で

消費されたためと考えられた。一方、C-GIC 群、4M-GIC 群は、用量依存的に有意な徐放量の増加を認め、特に 20 % (w/w) 添加量では急激な増加を認めた。また、同一添加量間での比較では、4M-GIC 群が有意に高かった。通常の一次硬化反応は Sr イオンを介して行われるが、C-GIC 群の場合は CMET 由来の Ca イオンが供給されることによって、Ca イオンを介した反応が生じ、反応に関与できなくなった Sr がマトリックス内に蓄積していくと考えられる。さらに、酸による侵食によってガラス粉末表層からは多くの Sr イオンが放出され、マトリックス内に過剰に蓄積したことで徐放量が増加したと考えられた。4M-GIC 群においては、Ca イオンによる Sr イオンへの影響はないが、C-GIC 群より低い pH 環境によって、ガラス粉末表層が強く侵食され、イオン徐放量が増加した可能性が考えられた。

Ca イオンの徐放は C-GIC 群のみに認められ、10 % (w/w) 添加量ではイオンの徐放はほとんど認めず、20 % (w/w) 添加量で急激な徐放量の増加を認めた。10 % (w/w) 添加量では、実際には CMET から Ca イオンが放出されなかったわけではなく、反応には Sr イオンよりも Ca イオンが優先して消費されたため、溶出液中に検出されなかった可能性が高いと思われる。これは、10 % (w/w) 添加量の Sr イオン徐放量がコントロールに対し増加していることから裏付けることができる。20 % (w/w) C-GIC 群での急激な徐放量の増加は、反応で消費されずにマトリックス中に余った Ca イオンと、浸漬によるセメントの崩壊によって溶出した CMET から解離した Ca イオンが増加したためと考えられた。

F イオンの徐放量もまた、他の溶出イオンと同様に粉液比の増減、セメントの崩壊などに影響を受けることが知られている（小出ら, 1993; 小出ら, 1995; Crisp et al., 1976）。Kuhn らは、GIC からの F イオンの徐放メカニズムを、セメント表層からの徐放、セメントの崩壊、セメント内部からの拡散に分類している（Kuhn & Wilson, 1985）。セメント硬化後、ガラス粉末より遊離した F イオンは形成されたマトリックス中に存在しており、硬化初期ではセメント表層のマトリックス中に存在する F イオンが徐放するといわれている（小出ら, 1995）。本研究における他のイオンの徐放傾向をみると、C-GIC 群、4M-GIC 群ともに、20 % (w/w) 添加量で最も高く、この付近での添加量で各種イオンの徐放に影響を与えるような崩壊が生じている可能性が示唆される。コントロール群と 10 % (w/w) C-GIC 間で F イオンの徐放量に有意差が認められなかったのは、崩壊による影響が少なくセメント表層

からの溶出に比較的留まっているため、20 % (w/w) C-GIC で徐放量が有意に高かったのは、崩壊による影響を受けたためと考えることができる。しかし、10 % (w/w), 20 % (w/w) 4M-GIC 間に有意差が認められなかった結果に関しては、粉液比や本研究での他のイオンの徐放傾向、Kuhn の分類などから説明することは難しく、溶出液中で他の金属イオンにトラップされて、フッ化アルミニウムやフッ化ストロンチウムなどの化合物を形成している可能性が考えられた。

2) 圧縮強さの測定

試作セメントの機械的強度を評価する目的で圧縮強さの測定を行った結果、C-GIC 群、4M-GIC 群は、用量依存的に有意な低下を認めたが、同一添加量間では有意差は認めなかった。これは、試料の圧縮強さは、粉末の添加量に大きく影響を受け、添加した粉末の種類には影響を受けにくいことを示している。セメント硬化体の機械的強さは、コアの強さ、マトリックスの強さ、コアとマトリックスの結合強さに影響を受け（鈴木ら、2009）、これらの比率はセメントの粉液比によって変化する（山崎ら、2007）。そして、その粉液比が機械的性質や接着性に影響を与えているという報告は多く（日比野ら、1988; Hibino et al., 2002; Hibino et al., 2004; 尾松ら、2010）、それらによると、粉液比が大きくなるとセメント硬化体の機械的強さは大きくなるといわれている。CMET および 4-MET 中には、アルミノシリケートガラスのようなセメント硬化体中でコアとなりうる物質は含まない。粉液比の低下に伴い、セメント硬化体中のコアとなる粉末のアルミノシリケートガラス量は減り、周囲の反応相よりなるマトリックスの量が多くなるため圧縮強さは低下したと考えられた。しかし、20 % (w/w) C-GIC の圧縮強さは他の覆髄材や裏層材と比較しても十分な強度を有していることがわかった。Torabinejad ら（Torabinejad et al., 1995）の MTA セメントの硬化に関する報告によると、水中での浸漬 24 時間後の圧縮強さは 40 MPa であり、21 日後では 67.3 MPa であった。これは、Super EBA セメントや IRM (Intermediate Restorative Material) セメントなどの強化型酸化亜鉛ユージノールセメントとほぼ同程度の値である。20 % (w/w) C-GIC の圧縮強さは、浸漬 24 時間で 74.16 ± 3.36 MPa、1 週間で 71.29 ± 11.62 MPa、4 週間で 77.28 ± 9.06 MPa であった。C-GIC の適用は、暫間的間接覆髄と暫間修復、最終修復前の裏層であり、最終的な歯冠修復は想定していないため、成形修復材料

としてのコンポジットレジンや GIC のような高い機械的強さは必ずしも必要ではない。臨床においては適応症例を見極める必要があるが、残存歯質の多い歯に対する暫間的間接覆髄やその後の裏層などには応用可能と考えられた。また、pH およびイオン徐放量の測定結果から、セメントの崩壊程度は C-GIC 群よりも 4M-GIC 群の方が大きい可能性が示唆されたが、圧縮強さが添加した粉末の種類には影響を受けにくい結果から、セメントの崩壊は、圧縮強さに有意な影響を与えなかった可能性が考えられた。

3) セン断接着強さの測定

C-GIC 群の接着強さは、すべての浸漬期間において 4M-GIC 群に対し有意に高く、コントロール群と同等の接着強さを示した。機械的強さと同様に、接着強さもまた粉液比の影響を受けることが知られている（日比野ら, 1988; Hibino et al., 2002; Hibino et al., 2004; 尾松ら, 2010）。GIC 成分の粉液比の低下によって、両群ともに GIC のみに関与する接着力に低下が生じたと考えられるが、C-GIC 群は CMET 由来の Ca イオンが、一時硬化反応における架橋反応に関与したことによって、新たな接着が獲得されたため、その接着力は 4M-GIC 群よりも高く、また、GIC の低下した接着力を補っている可能性が考えられた。IPC においては、最終修復までの一定期間中に施される仮封の良否が、その予後を左右するため（後藤, 1985）、浸漬期間が接着強さに影響を与えなかったことは、封鎖性の観点からは有利であると思われる。しかし、本研究での検討は最長でも 28 日間であり、実際の経過観察期間は数カ月間に及ぶことから、今後の課題として、浸漬期間を延長したさらなる長期接着耐久性の検討と評価が必要であると考えられる。

4) 破断面の観察

コントロール群および C-GIC 群では、浸漬 1 日目から 7 日目にかけては凝集破壊が多く、28 日目では、混合破壊が多くなり、次いで界面破壊が増加した。また、4M-GIC 群では、浸漬 1 日目で界面破壊が多く、7 日目、28 日目では混合破壊が増加した。これらの結果から、コントロール群、C-GIC 群では浸漬初期の水分による接着力への影響は受けにくく 4M-GIC 群では受けやすいが、浸漬期間の延長に伴いその影響は増し、すべての群において接着強さや機械的強度に低下を生じさ

せた可能性が考えられた。

5) 抗菌性試験

本研究では, *S. aureus*, *S. mutans*, *A. viscosus*, *C. albicans* の 4 菌種に対して, 各種セメントの抗菌性に関する検討を行った. う蝕深層の細菌叢では, *S. mutans* のような通性嫌気性菌は少なく, その 80 %以上は *Actinomyces* や *Lactobacillus* などの偏性嫌気性菌が優勢であるとされている (Hoshino, 1985). 一方, 歯髄炎を伴う深在う蝕歯の象牙質 - 歯髄境界部からは, 偏性嫌気性菌の *Actinomyces* や *Lactobacillus* 以外にも, 通性嫌気性菌の *Streptococcus* が検出された報告 (中西ら, 2008) もある. IPC では深在性のう蝕に対して, 意図的・戦略的に感染象牙質を残置させるため, 材料自体が抗菌性を有し, 深部のう蝕最前線の細菌に対してその効力を発揮することができれば, 歯髄の温存に大きく貢献できると考えられる. C-GIC 群は, コントロール群と 4M-GIC 群間で有意差は認めなかったが, *A. viscosus* と *S. mutans* に対して抗菌性を示したことから, う蝕深層の細菌叢に対して有利である可能性が示唆された. また, 唾液や歯垢中にも多く見られる *Streptococcus* が, 仮封を行った窩洞内に侵入した細菌の過半数を占めたとする報告があり (細谷, 1991), C-GIC は歯面やセメント表層などの浅部に存在する細菌叢に対しても有利であると考えられた.

S. aureus は, ヒトの皮膚や鼻咽腔などに常在しており (石山ら, 1994), 口腔内においては, 唾液や歯垢中からも検出される口腔常在菌の一つでもある (野田ら, 1994). また, 近年, 超高齢社会を迎え, う蝕や歯周病に罹患した高齢者や compromised host が増加し, 口腔をリザーバーとして誤嚥性肺炎に罹患した患者の肺吸引物などからも分離されている (形山ら, 2008). *S. aureus* は, 歯髄感染の初期や, 根尖性歯周炎の根管內, 根尖部膿瘍からも検出され, *C. albicans* などとともに根尖性歯周炎を難治化させる報告がある (Lai et al., 2001; Peciuliene et al., 2001; Yasuda et al., 2008; Ingle et al., 2008). 歯髄保護中の経過観察期間中は, 残置した感染歯質や偶発的に生じてしまったリーケージなどによって, 内部でう蝕が進行し, 歯髄への感染が生じてしまう可能性がある. 本研究の結果において, C-GIC 群は *S. aureus* に対して抗菌性を認めたことから, 歯髄感染や根尖性歯周炎への移行を防ぐことができる可能性が考えられた.

これら *S. mutans*, *A. viscosus*, *S. aureus* の 3 菌種は、無添加群に対し有意に抗菌性を示した。3 種のセメント群間に有意差は認めなかったが、実測値としての生菌数は 4M-GIC 群が最も少なく、続いて C-GIC, コントロール群の順で少なかった。この傾向は、材料学的検討における各種セメント溶出液の pH およびイオン徐放量の測定結果と同じ傾向であった。従来型 GIC の硬化後の低い pH と F イオンの徐放量は、細菌の発育阻害に関与するという報告や (Benderli & Gökçe, 2013), F イオンによる細菌の増殖抑制効果や代謝阻害効果を, Al イオンが増強するという報告 (Hayacibara et al., 2003) がある。本研究においても, pH の低下, F イオンや Al イオンの徐放が 4M-GIC 群, C-GIC 群, GIC 群の順に認められ, pH の低下とこれらのイオンあるいはイオン同士の相互作用によって, 抗菌作用を示した可能性が考えられた。また, 歯科用レジンにおける溶出モノマーが口腔内細菌に対して抗菌性を示した報告があり (山内ら, 1989; 苦瓜ら, 1998), 本研究においても 4M-GIC 群, C-GIC 群に含まれる元来からのレジンモノマー由来の 4-MET が溶出し, 抗菌作用を示した可能性も考えられた。

C. albicans は、口腔内に見られる細菌叢の一部として、最も頻繁に検出される真菌である (Cannon & Caffin, 1999)。 *C. albicans* は、バイオフィルム形成能を有し (二川ら, 2005), 薬剤に対する耐性を獲得することによって、根尖性歯周炎を難治化させる原因としても知られている (興地, 2006)。抗菌性に関する過去の報告によれば、多種のイオン放出能を有する生体活性ガラスとして知られる S-PRG (Surface pre-reacted glass ionomer) フィラーは、 *C. albicans* の増殖と病原性因子を濃度依存的に阻害したとされている (Tamura et al., 2018)。S-PRG フィラーからは、Al, B, F, Na, Si, Sr イオンが放出され (Fujimoto et al., 2010), 従来型 GIC から放出されるいくつかのイオンと共通しており、本研究で用いた 3 種のセメント硬化体からも確認されている。これらのイオンの放出量は、従来型 GIC よりも S-PRG フィラーの方が多とする報告がある (Fujita et al., 2016)。本研究における検討の結果、すべてのセメント群において、 *C. albicans* に対する抗菌性は認められなかった。この理由として、各種イオンの徐放量が少なく、抗菌性を発揮する濃度に達しなかった可能性や、 *C. albicans* の一部にバイオフィルム様の構造物が形成され、抗菌効果が得られなかった可能性が考えられた。 *C. albicans* は、形成したバイオフィルム内において、 *S. mutans* に対して付着部位を提供し、

S. mutans が産生した乳酸を自身の代謝に使用することで共生関係を築くと考えられている (Ene et al., 2012; Metwalli et al., 2013). さらに, *C. albicans* の存在が, 乳酸の消費によってバイオフィルム内のアルカリ化を代謝的に促進し, 歯質の脱灰が減少する結果として, う蝕の進行が抑制されるという報告がある (Willemse et al., 2016). *C. albicans* に対する抗菌性が認められなかったという本研究の結果は, *C. albicans* のみが選択的に障害されなかったとも考えることができ, これにより, 覆髄材としてう蝕の進行抑制効果が期待できる可能性が示唆された.

2. 生物学的検討

1) 細胞毒性/細胞増殖試験

本研究では, hDPSCs の細胞増殖を指標として, 細胞生存率を測定し, 各種試作セメントの細胞毒性について検討した. 歯科材料の生体適合性を評価した研究は多く, セメントからの徐放イオン (棚瀬, 1983; Fujita et al., 2016) や, レジンモノマーに関する細胞毒性 (Fukumoto et al., 2013; 藤沢ら, 1993) が報告されている.

従来型 GIC は, 酸 - 塩基反応による硬化によって, すみやかな pH 上昇が生じるため, 歯髄刺激性の低いセメントとして知られているが, pH が上昇する前の硬化初期では細胞への刺激性は強いとされている (島田ら, 2006). 練和直後のセメント表層の pH は 3~4 と低い, 練和 15 分後に 15 分間蒸留水中に浸漬した場合には, pH5~6 の範囲を示した報告がある (加我ら, 2003). pH 測定の結果, すべての群で pH は 5~6 程度となり, この報告と一致した. 製作した溶出液は, 必要な濃度に調整し, 培養液に添加して用いたが, 十分に硬化した GIC の pH が酸性であっても, 培養液中ではその緩衝作用によって中性領域に維持されるという報告 (加我ら, 2003) から, pH は細胞毒性や細胞増殖に, 直接的な影響は与えなかったと考えられた.

GIC におけるもう一つの特徴的な性質として, フッ素徐放性があり, 抗う蝕作用や, 再石灰化作用に関与することが知られている (棚瀬, 1983). しかし, F イオンは, 用量依存的に細胞の増殖と細胞外マトリックス合成を阻害し (Chang & Chou, 2001), その細胞毒性が懸念されている. F イオンの細胞毒性試験に関するいくつかの報告によると, F イオンが約 5.0 ppm 以下の低濃度では細胞増殖は促進, 約 40 ppm 以上の高濃度では細胞増殖は抑制され, 細胞毒性を示すとされている (Chang & Chou, 2001; Thaweboon et al., 2003). 培養液に添加した各種溶出液中の F イオン濃度は, 最も

高い 50 % (v/v) 4M-GIC でも 8.6 ppm 程度であり、F イオンによる細胞毒性の影響はほとんどないものと考えられた。細胞の増殖性に関しては、上記の報告に加え、Al イオンが F イオンと共存した場合に、増殖が促進されたという報告 (Fujita et al., 2016) から、低濃度の F イオン単独もしくは Al イオンとの相互作用による影響を受けた可能性が考えられた。

Ca イオンもまた、細胞の機能維持に影響を与える重要なイオンであり、本研究においては C-GIC 群が唯一保有するイオンである。近年、直接覆髄に用いられている MTA に関する研究において、セメントから溶出した Ca イオンが、ヒト歯髄由来細胞の増殖を有意に促進させたという報告 (林, 2019) や、細胞外 Ca イオンの上昇が、ヒト骨芽細胞の細胞増殖を有意に増加させ、その最適濃度が約 0.4 mM であったという報告 (高橋ら, 1997) がある。本研究において、細胞増殖性は C-GIC 群がすべての群で最も高く、10 % (v/v) C-GIC の Ca イオン濃度は約 0.3 mM であり、過去に報告されている最適濃度にも近似した。このことから、Ca イオンは、hDPSCs の細胞増殖性を有意に高める因子として作用した可能性が考えられた。

一方、歯科領域で用いられるレジン系材料の問題点の一つとして、未重合の残留モノマーが細胞毒性の原因となっていることが知られており、レジンモノマーが共通して有するメタクリロイル基の二重結合が、細胞内活性酸素種の産生と細胞毒性を強く誘導するとされている (Fukumoto et al., 2013)。4-MET も例外ではなく、従来から用いられているカルボン酸系接着性モノマーであり、その毒性に関して報告されている (藤沢ら, 1993)。細胞毒性試験の結果、C-GIC 群は毒性が低く、特に 10 % (v/v) 添加量で最も低かった。一方、4M-GIC 群の細胞毒性は高い傾向を示した。この結果は、位相差顕微鏡による細胞形態の観察結果とも一致した。すべての群で、細胞形態は濃度依存的に進展性が失われ、萎縮・球状化し、最終濃度の 50 % (v/v) 添加量では、本来の細胞形態が失われる像を呈した。この傾向は、4M-GIC 群で顕著であった。CMET は 4-MET の Ca 塩であり、水溶液中ではその一部が Ca イオンと、酸型あるいは解離型の 4-MET に解離して存在する。4-MET は、分子構造中のフタル酸部分の 2 つのカルボキシル基により、Ca とのイオン結合を有する CMET よりも水への溶解性が高いと考えられ、C-GIC 群と 4M-GIC 群の細胞毒性の差は、両者の溶解性に起因し、溶出した 4-MET の用量に依存するものと考えられた。

2) 細胞分化に関する検討

ALP は、骨芽細胞における初期の分化マーカーとして知られている。(大井田, 佐々木, 1977; 鈴木, 2016). 本研究では, hDPSCs の ALP 活性を経時的に測定し, 検討を行った. ALP 活性は, すべての群で経時的に上昇傾向を認め, 15 日目で高い傾向を示した. 活性値の上昇は, 石灰化による硬組織形成が促進されたことを意味している. ALP 活性の上昇機序には, ALP 自体の酵素の活性化, 細胞増殖の増加に伴う二次的な酵素量の増加, 酵素生成の誘導促進などが考えられており (後藤, 橋本, 2000), さらに, 種々のイオンが活性に影響を与えている.

F イオンの ALP 活性に対する影響は, 低濃度で促進され, 20 ppm 以上での高濃度では抑制されたという報告がある (Thaweboon et al., 2003). 本研究では, すべての群で F イオンの徐放を認めたが, 細胞への添加時の濃度は低く, 細胞増殖の増加に伴う酵素量の増加によって, ALP 活性の上昇に関与した可能性が考えられた.

Si イオンもまた石灰化に関与するイオンのひとつであり, F イオンよりも強力に石灰化促進能を有しているとされ, 脱灰象牙質の再石灰化に貢献している可能性が指摘されている (Saito et al., 2003). 骨組織においては, 骨芽細胞の成長サイクルを短縮させ, 増殖を促進させる報告 (Sun et al., 2007) や, ALP 活性測定では分化の促進が認められたとする報告もある (Sun et al., 2018). 本研究において, Si イオンの溶出はすべての群で認められ, ALP 活性の上昇に関与した可能性が考えられた.

細胞外 Ca イオンの上昇が細胞増殖を増加させた報告 (高橋ら, 1997) では, 分化に及ぼす効果はほとんど認められなかったとされ, C-GIC 群において, Ca イオンが ALP 活性に直接的な影響を与えた可能性は低いと考えられた. しかし, 上記報告では, 0.4~1.2 mM の範囲では I 型コラーゲンの合成を高めたとされており, 結晶沈着の足場の役割を持つ I 型コラーゲンの合成促進によって, ALP 活性の上昇とは別の機序で, 間接的に石灰化に寄与した可能性が考えられた.

Sr イオンは, Ca イオンと同じアルカリ土類金属に属し, その親和性も同程度であることから, ハイドロキシアパタイトの表面や内部において, Ca と置換して取り込まれることが知られている (安田, 和田, 2007). 今回用いたフジⅦのような Sr イオンが添加された GIC を基材に用いた場合, Sr イオンが Ca イオンと相乗

的に作用して (Thuy et al., 2008), Ca イオン単独よりも強い歯質強化と再石灰化が期待できる可能性が考えられる. Sr イオンの歯髄細胞に対する影響に関する報告 (後藤, 橋本, 2000) によると, 1.0×10^{-4} M 以下の濃度では ALP の活性を上昇させたとされ, これは, 細胞増殖の促進によるものや, 酵素自体の活性化ではなく, 酵素産生の促進によるものとされている. コントロール群では Sr イオンの徐放はほとんどなかったが, C-GIC 群, 4M-GIC 群では認め, 10 % (v/v) 添加量ではそれぞれ, 約 0.56×10^{-4} M, 0.82×10^{-4} M, であり, Sr イオンは両群において, ALP 活性の上昇に関与した可能性が考えられた.

各種イオンの徐放量や細胞への添加量に関して、本研究の結果とこれまでの報告を合わせて考察すると、検出された金属イオンが ALP 活性の阻害因子として影響している可能性は低いと推察された. 15 日目の ALP 活性は, 4M-GIC 群が最も低く, コントロール群, C-GIC 群はともに高い活性を示したが, 実測値としてはコントロール群の方が高かった. この結果は, コントロール群の ALP 活性が促進された訳ではなく, これが標準的な活性の程度であって, C-GIC 群と 4M-GIC 群の方が, 金属イオン以外の特定の因子によって, その活性が抑制された可能性が考えられた. 接着性レジンモノマーである 4-MET には, 前述の通り細胞毒性の報告があり, 本研究の結果からもその可能性が強く示唆され, 細胞毒性による増殖の抑制に伴い, ALP の量が減少した可能性に加えて, ALP 自体の活性や, 分化に伴う ALP 産生の抑制が, 同時にかつ用量依存的に生じた可能性が考えられた. しかし, 分化に対する影響に関しては, まだまだ不明な点が多く, 今後の課題として, C-GIC が細胞の分化を誘導する効果や, 増殖に関するメカニズムを明らかにし, また, より生体に近い状態で C-GIC が歯髄にどのような影響を与えるのかを検討する必要があると考えられる.

3) 石灰化能の評価

石灰化は, 細胞外から細胞内に取り込まれた Ca イオンが石灰化最前線に排出され, 無機リン酸と反応して形成されたハイドロキシアパタイトが細胞外マトリックスに沈着することによって生じる (木村ら, 2019; 岩山, 村上, 2021). つまり, ハイドロキシアパタイトの形成には Ca イオンと無機リン酸の両方が必要である. Ca の沈着量は, すべての群で経日的に増加し, 28 日目では, 10 %

(v/v) C-GIC で有意な Ca 沈着量の亢進を認めた。これは、細胞に供給される Ca イオンが多く存在する C-GIC 群では、細胞に Ca イオンが効率良く取り込まれたことにより、細胞外基質中に、より多くのハイドロキシアパタイトを沈着させることが出来たためと考えられた。

結 論

新規接着性モノマーである CMET を GIC に添加した試作セメントを用いて、その材料学的特性と生物学的特性に関して検討を行い、以下の結論を得た。

1. 圧縮強さは、C-GIC, 4M-GIC とともに用量依存的に低下した。接着強さは、4M-GIC では低下したが C-GIC は従来型 GIC と同等の接着力を維持し、石灰化が期待できる種々のイオンの徐放が認められた。
2. C-GIC が唯一保有する Ca イオンの存在は、Ca 単独、もしくは他のイオンとの相互作用によって、細胞増殖や分化の促進に影響を与えている可能性が示唆され、体積 %濃度が 10 % (v/v) の添加量においては、細胞増殖の促進と Ca 沈着量の亢進が認められた。

以上のことより、C-GIC は、象牙質の再石灰化が期待され、従来型 GIC と同等の象牙質接着性を有し、歯髄保護を兼ね備えた暫間的間接覆髄用の充填剤として応用できる可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり，本研究の機会を与えて下さり，御懇篤なるご指導，御校閲を賜りました本学歯学部口腔機能修復・再建学系 高度先進保存学分野 川上智史教授，本学歯学部口腔機能修復・再建学系 う蝕制御治療学分野 斎藤隆史教授に深甚なる感謝の意を表するとともに，興味あるテーマをお示し下さり，終始，懇切なる直接的指導，御教示，御校閲を賜りました本学歯学部総合教育学系 歯学教育開発学分野 伊藤修一教授に心から感謝の意を表します．また，本研究を行うにあたり，御助言，御協力頂きました本学歯学部口腔機能修復・再建学系 う蝕制御治療学分野の皆様，北海道医療大学病院 歯科の皆様に深く感謝いたします．さらに，実験に御協力いただきましたサンメディカル株式会社 大槻環様に心より感謝の意を表します．

文 献

- Baumgartner JC, Jose F, Siqueria JJF, Christine MS, Kishen A. Microbiology of endodontic disease 6. In: Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC, editors Ingle's Endodontics. Ontario: BC Decker, 2008, p285.
- Benderli Y, Gökçe K. Effects of various rates of polyacrylic acid and fluoride on *Streptococcus mutans* and *Actinomyces viscosus*. Balk J Stom, 17: 31-36, 2013.
- Chalmers JM. Minimal intervention dentistry: Part 2. Strategies for addressing restorative challenges in older patients. J Can Dent Assoc 72: 435-440, 2006.
- Chang YC, Chou MY. Cytotoxicity of fluoride on human pulp cell cultures in vitro. Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Endod 91: 230-234, 2001.
- Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. Crit Rev Oral BiolMed 10: 359-383, 1999.
- Crisp S, Lewis BG, Wilson AD. Glass ionomer cements: chemistry of erosion. J Dent Res 55: 1032-1041,1976.
- Ene IV, Heilmann CJ, Sorgo AG, Walker LA, Koster CG, Munro CA, Klis FM, Brown AJ. Carbon source-induced reprogramming of the cell wall proteome and secretome modulates the adherence and drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans*. Proteomics 12: 3164-3179,2012.
- Featherstone JDB, Shields CP, Khademazad B, Oldershaw MD. Acid reactivity of carbonated apatites with strontium and fluoride substitutions. J Dent Res 62: 1049-1053,1983.
- Frencken JE, Pilot T, Songpaisan Y, Phantumvanit P. Atraumatic restorative treatment (ART): rationale, technique, and development. J Public Health Dent 56: 135-140, 1996.
- Fujita M, Mikuni-Takagaki T, Komori R, Okubo K, Yasuda M, Kimoto S. Effects of pre-reacted glass-ionomer cement on the viability and odontogenic differentiation of human dental pulp cells derived from deciduous teeth. Pediatr Dent J.26: 74-82,2016.

- 藤沢盛一郎, 菰田泰夫, 門磨義則. 4-MET モノマーとりん脂質リポソームの相互作用に関する NMR スペクトル研究 —pH の影響—. 歯材器 12.2: 162-168, 1993.
- Fukumoto I, Tamura A, Matsumura M, Miura H, Yui N. Sensitization Potential of dental resins: 2-Hydroxyethyl methacrylate and its water-soluble oligomers have immunostimulatory effects. PLoS One 8: 1-9, 2013.
- Fujimoto Y, Iwasa M, Murayama R, Miyazaki M, Nagafuji A, Nakatsuka T. Detection of ions released from S-PRG fillers and their modulation effect. Dent Mater J 29: 392-397, 2010.
- 後藤篤子, 橋本修一. 歯髓由来培養細胞および骨芽細胞に対するストロンチウムの影響—アルカリ性ホスファターゼおよびプロテインキナーゼ C 活性への作用—. 口腔衛生会誌, 50: 382-397, 2000.
- 後藤譲治. 暫間的間接歯髓覆罩法の歯髓に及ぼす影響に関する臨床病理学的研究. 小児歯誌 23: 926-938, 1985.
- Hayacibara MF, Rosa OPS, Koo, H, Torres SA, Costa B, Cury JA. Effects of fluoride and aluminum from ionomeric materials on *S. mutans* biofilm. J Dent Res 82: 267-271, 2003.
- 林 誠. Mineral trioxide aggregate から放出するカルシウムイオンの生物学的作用. 日歯内療誌 40: 1-6, 2019.
- 日比野 靖, 富岡直哉, 黒澤茂務, 菅家 豪, 橋本弘一. 各種合着用セメントの物理的性質の再評価 - とくに粉液比の影響について -. 歯材器 7: 720-728, 1988.
- Hibino Y, Kuramochi K, Hoshino T, Moriyama A, Watanabe Y, Nakajima H. Relationship between the strength of glass ionomers and their adhesive strength to metals. Dent Mater 18: 552-557, 2002.
- Hibino Y, Kuramochi K, Harashima A, Honda M, Yamazaki A, Nagasawa Y, Yamaga T, Nakajima H. Correlation between the strength of glass ionomer cements and their bond strength to bovine teeth. Dent Mater J 23: 656-660, 2004.
- 日比野 靖. セメントの粉液採取方法とその物性の関係. 日顎咬合会誌 36: 83-86, 2016.
- Hilton TJ. Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. Oper

- Dent 34: 615-625, 2009.
- Hoshino E. Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. J Dent Res 64: 1195-1198, 1985.
- 細谷哲康. 根管治療時に使用する仮封材に関する基礎的並びに臨床的研究. 日歯保存誌 34: 545-561, 1991.
- 石山京子, 田近志保子, 金子 克. 口腔からの *Staphylococcus aureus* の分離と抗菌薬感受性. 岩医大歯誌 19: 84-90, 1994.
- Ito S, Iijima M, Motai F, Mizoguchi I, Saito T. Effects of calciumsalts of acidic monomers on mineral induction of phosphoprotein immobilized to agarose beads. J Biomed Mater Res A 100: 2760-2765, 2012.
- 伊藤修一. 象牙質再石灰化を誘導する材料. 日歯保存誌 60: 267-269, 2017.
- 岩山智明, 村上伸也. 基質小胞性石灰化と歯周組織再生. 日歯周誌 63: 31-36, 2021.
- Jenson L, Budenz AW, Featherstone JD, Ramos-Gomez FJ, Spolsky VW, Young DA. Clinical protocols for caries management by risk assessment. J Calif Dent Assoc 35: 714-723, 2007.
- 加我正行, 吉田英史, 枝広あや子, 大岡貴史 櫻井誠人, 小林雅博, 大川昭治, 今政幸, 野田 守, 小口晴久. ガラス短繊維を添加したグラスアイオノマーセメントの細胞毒性とフッ素徐放について. 小児歯誌 41: 133-139, 2003.
- 形山優子, 山本満寿美, 千田好子, 狩山玲子. 誤嚥性肺炎患者の口腔内の状態と口腔ケアおよび口腔吸引痰からの検出菌に関する実態調査. 環境感染誌 23: 97-103, 2008.
- Kidd EAM. Caries removal and the pulpo-dentinal complex. Dent Update 27: 476-482, 2000.
- 木村麻記, 東川明日香, 松村 敬, 石原和幸, 齋藤 淳, 国分栄仁, 柴山和子, 菊池有一郎, 櫻井敦郎, 喜田大智, 大野建州, 澁川義幸. 「顎骨プロジェクトからの情報発信」 8. 細胞膜タンパク質を標的とする石灰化機構の解明と応用. 歯科学報 119: 301-306, 2019.
- 北川晴郎, 今里 聡. 歯科生体材料. : 宮坂 平, 遠藤一彦, 玉置幸道, 服部雅之,

- 編著. 基礎歯科理工学. 第 1 版. 東京: 医歯薬出版, 2020: 88-94.
- 小出 武, 山賀まり子, 稗田豊治. グラスアイオノマーセメントのフッ素徐放とセメント体の崩壊について. 歯材器 12: 588-594, 1993.
- 小出 武, 山賀まり子, 大東道治: グラスアイオノマーセメントのフッ素徐放と初期崩壊について - EPMA による硬化体表層部の分析-. 歯材器 591-597, 1995.
- 公益財団法人 8020 推進財団: 第 2 回永久歯の抜歯原因調査報告書. 2018.
https://www.8020zaidan.or.jp/pdf/Tooth-extraction_investigation-report-2nd.pdf (2020 年 9 月 24 日アクセス)
- Kuhn AT, Wilson AD. The dissolution mechanism of silicate and glass-ionomer dental cements. Biomaterials 6: 378-382, 1985.
- Lai CC, Huang FM, Yang HW, Chan Y, Huang MS, Chou MY. Antimicrobial activity of four root canal sealers against endodontic pathogens. Clin Oral Investig 5: 236-239, 2001.
- Malts M, Garcia R, Jardim JJ, de Paula LM, Yamaguti PM. Moura MS, Garcia F, Nascimento F, Oliveira A, Mestrinho HD. Randomized trial of partial vs. stepwise caries removal: 3-year follow-up. J Dent Res 91: 1026-1031, 2012.
- Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, and Jabra-Rizk MA. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and the human mouth: a sticky situation. PLoS Pathog 9: e1003616, 2013.
- 甕 富美子, 伊藤修一, Nahid Al NOMANN, 斎藤隆史. 新規接着性モノマー CMET 配合シーリングコート材の象牙質接着性および再石灰化誘導能. 日歯保存誌 58: 143-156, 2015.
- 中西 正, 尾崎和美, 松尾敬志. 象牙質 - 歯髄境界部における侵入細菌の局在性に関する免疫組織学的研究. 日歯保存誌 51: 63-71, 2008.
- 苦瓜明彦, 山内六車, 李 吉寿, 松木光洋, 岡本武司, 長澤 亨. 光重合型リライニング用レジンの溶出モノマーに関する検討 - 口腔内細菌に対する抗菌性について -. 補綴誌 42: 586-590, 1998.
- 日本歯科保存学会. 編. う蝕治療ガイドライン. 2 版 詳細版. 京都: 永末書店; 2015, 113-138.

- 日本歯科保存学会．編．う蝕治療ガイドライン．2 版 詳細版．京都：永末書店；2015，190-193.
- 二川浩樹，牧平清超，江草 宏，福島 整，川端涼子，浜田泰三．口腔カンジダの付着およびバイオフィルム形成．真菌誌 46: 233-242, 2005.
- 野田充宏，山村正次，高瀬市將，浅井昭次郎，梅本利彦，並河 勇．ヒト口腔および鼻腔より分離した黄色ブドウ球菌の性状．歯基礎誌 36: 263-273, 1994.
- 野俣 裕．ガラスアイオノマーセメントの崩壊，溶出に関する研究 - 接水開始時期がカルシウム，アルミニウムおよびケイ素の溶出量に及ぼす影響 -. 歯材器 9: 387-400, 1990.
- 興地隆史．歯内療法 of 争点一難治性根尖性歯周炎の病因と臨床．新潟歯学会誌 36: 1-15, 2006.
- 興地隆史，韓 臨麟，重谷佳見，吉羽邦彦．MTA の理化学的・生物学的特性と臨床．日歯内療誌 33: 3-13, 2012.
- 興地隆史．硬組織疾患の処置．：千田 彰，寺下正道，寺中敏夫，宮崎真至，編．保存修復学．第 6 版．東京：医歯薬出版，2016: 120-125.
- 尾松 純，長沢悠子，日比野 靖．合着ガラスアイオノマーセメントの機械的性質に及ぼす要因 - 粉液比が圧縮強さと破壊靱性値に及ぼす影響 -. 歯科理工会誌 29: 50-60, 2010.
- 大井田 慎一郎，佐々木 哲，硬組織のアルカリフォスファターゼの生理的意義．口病誌 44: 141-149, 1977.
- Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene L, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. Int Endod J 34: 429-434, 2001.
- Qiu Y, Tang J, Saito T. A novel bio-active adhesive monomer induces odontoblast differentiation: a comparative study. Int Endod J 53: 1413-1429, 2020.
- Ranly DM, Garcia-Godoy F. Current and potential pulp therapies for primary and young permanent teeth. J Dent 28: 153-161, 2000.
- Saito T, Toyooka H, Ito S, Crenshaw MA. (2003) *In vitro* study of remineralization of dentin: effects of ions on mineral induction by decalcified dentin matrix. Caries

- Research 37: 445–449, 2003.
- Sayed MM, Ian M. Fluoride release by glass ionomer cements, compomer and giomer. Dent Res J 6: 78–84, 2009.
- 島田康史, Md ウザマン・アルカート, 笹渕康敬, 大槻昌幸, 田上順次. レジン強化型ガラスアイオノマーセメント Ionotite F の歯髄反応. 接着歯学 24: 185-189, 2006.
- Sun J-Y, Yang Y-S, Zhong J, Greenspan DC. The effect of the ionic products of Bioglass® dissolution on human osteoblasts growth cycle in vitro. J Tissue Eng Regen Med 1: 281-286: 2007.
- Sun T, Wang M, Shao Y, Wang L, Zhu Y. The Effect and Osteoblast Signaling Response of Trace Silicon Doping Hydroxyapatite. Biol Trace Elem Res. 181: 82-94, 2018.
- 鈴木一臣, 吉田靖弘. 合着・接着用材料.: 鈴木一臣, 榎本貢三, 岡崎正之, 中畠 裕, 西山典宏, 編. スタンダード歯科理工学 – 生体材料と歯科材料 -. 第 4 版. 東京: 学建書院, 2009: 241-246.
- 鈴木邦明. アルカリフォスファターゼという酵素と硬組織形成. 北海道歯誌 37: 2-10, 2016.
- 高橋香苗, 中出 修, 小山宏樹, 賀来 亨. 細胞外カルシウム濃度が正常ヒト骨芽細胞に及ぼす影響. 東日本歯学雑誌 19: 1-13, 1997.
- Tamura M, Cueno ME, Abe K, Kamio N, Ochiai K, Imai K. Ions released from a S-PRG filler induces oxidative stress in *Candida albicans* inhibiting its growth and pathogenicity. Cell Stress Chaperones 23: 1337–1343, 2018.
- 棚瀬精三. グラスアイオノマーセメントの二次齲蝕発生抑制効果に関する基礎的研究. 小児歯誌 21: 426-440, 1983.
- 寺下正道, 北村知昭. 硬組織疾患の処置.: 千田 彰, 寺下正道, 寺中敏夫, 宮崎真至, 編. 保存修復学. 第 6 版. 東京: 医歯薬出版, 2016: 65-66.
- Thaweboon S, Thaweboon B, Chunhabundit P, Suppukpatana P. Effect of fluoride on human dental pulp cells in vitro. Southeast Asian J Trop Med Public Health 34:915–918, 2003.

- Thuy TT, Nakagaki H, Kato K, Hung PA, Inukai J, Tsuboi S, Nakagaki H, Hirose MN, Igarashi S, Robinson C. Effect of strontium in combination with fluoride on enamel remineralization in vitro. Arch Oral Biol 53: 1017-1022, 2008.
- Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. J Endod 21: 349-353, 1995.
- Willems HM, Kos K, Jabra-Rizk MA, Krom BP. *Candida albicans* in oral biofilms could prevent caries. Pathog Dis 74: 1-6, 2016.
- Wilson AD, Prosser HJ, Powis DM. Mechanism of adhesion of polyelectrolyte cements to hydroxyapatite. J Dent Res 62: 590-592, 1983.
- Xu X, Burgess JO: Compressive strength, fluoride release and recharge of fluoride-releasing materials. Biomaterials 24: 2451-2461, 2003.
- 山崎淳史, 日比野 靖, 本田宗暁, 長沢悠子, 松尾 純, 長谷川義朗, 原島 厚, 中 嶋 裕. 合着用グラスアイオノマーセメントの粉液比がせん断強さに及ぼす影響. 歯材器 26: 40-49, 2007.
- 山内六車, 苦瓜明彦, 山本宏治, 中里 剛一郎, 川野襄二, 木村健一. 床用レジンの口腔内主要細菌に対する抗菌性. 補綴誌 33: 571-576, 1989.
- 安田重光, 和田誠基. ストロンチウム製剤(特集 新しい骨疾患治療薬の骨粗鬆症治療への応用の可能性). 骨粗鬆症治療 6: 282-286, 2007.
- Yasuda Y, Kamaguchi A, Saito T. *In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a new resin-based endodontic sealer against endodontic pathogens. J Oral Sci 50: 309-313, 2008.

表・付図

表1 使用材料と組成

| 材 料 | Lot No. | 製造会社 | 組 成 | 粉液比 | 練和時間 |
|----------|---------|-------------|---|-------------|---------|
| Fuji-VII | 1709011 | GC | Powder : Fluoroaluminosilicate glass Liquid : Polyacrylic acid Polybasic carboxylic acid Distilled water | 1.8 g/1.0 g | 100 sec |
| CMET | 180614 | Sun Medical | Powder : Calcium 4-methacryloxyethyl trimelitate | - | - |
| 4-MET | VX-1 | Sun Medical | Powder : 4-methacryloxyethyl trimelitate | - | - |

表2 試作セメントにおける接着性モノマーと添加量

| 名称 | 接着性モノマー | 添加量 |
|------------------|---------|-----------|
| GIC (Control) | - | - |
| 10% (w/w) C-GIC | CMET | 10% (w/w) |
| 20% (w/w) C-GIC | CMET | 20% (w/w) |
| 10% (w/w) 4M-GIC | 4-MET | 10% (w/w) |
| 18% (w/w) 4M-GIC | 4-MET | 18% (w/w) |
| 20% (w/w) 4M-GIC | 4-MET | 20% (w/w) |

表3 試作セメント溶出液の pH

| 試作セメント | pH |
|---------------|--------------------------|
| GIC (Control) | 5.81 ± 0.05 ^a |
| 10% C-GIC | 5.69 ± 0.02 ^b |
| 20% C-GIC | 5.37 ± 0.03 ^c |
| 10% 4M-GIC | 5.41 ± 0.07 ^c |
| 20% 4M-GIC | 4.99 ± 0.05 ^d |

1-way ANOVA and Tukey's test (p < 0.05)
Same small letters indicate no statistical difference

表4 セン断接着強さ測定後の破壊様式

| 試作セメント | 浸漬期間 | 凝集破壊 | 混合破壊 | 界面破壊 |
|------------------|------|------|------|------|
| GIC (Control) | 1 日 | 5 | 4 | 1 |
| | 7 日 | 5 | 5 | 0 |
| | 28 日 | 1 | 6 | 3 |
| 10% C-GIC | 1 日 | 6 | 4 | 0 |
| | 7 日 | 7 | 2 | 1 |
| | 28 日 | 2 | 5 | 3 |
| 20% C-GIC | 1 日 | 6 | 4 | 0 |
| | 7 日 | 9 | 1 | 0 |
| | 28 日 | 3 | 5 | 2 |
| 10% 4M-GIC | 1 日 | 0 | 4 | 6 |
| | 7 日 | 2 | 7 | 1 |
| | 28 日 | 1 | 6 | 2 |
| 20% 4M-GIC | 1 日 | 0 | 4 | 6 |
| | 7 日 | 1 | 7 | 2 |
| | 28 日 | 1 | 7 | 2 |

4-methacryloxyethyl trimellitic acid (4-MET) + Ca

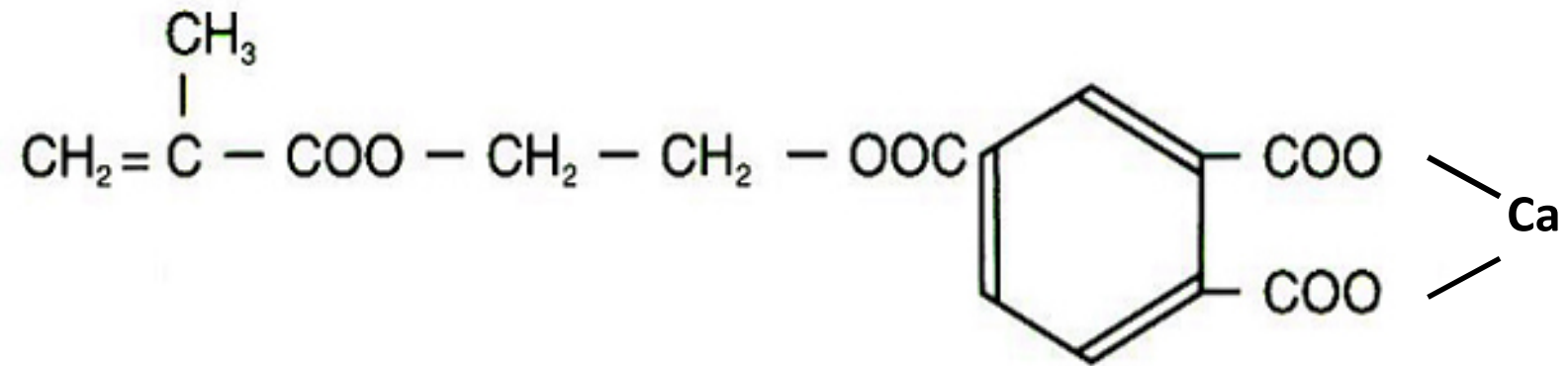


図1 4-MET-Ca (CMET) の構造式

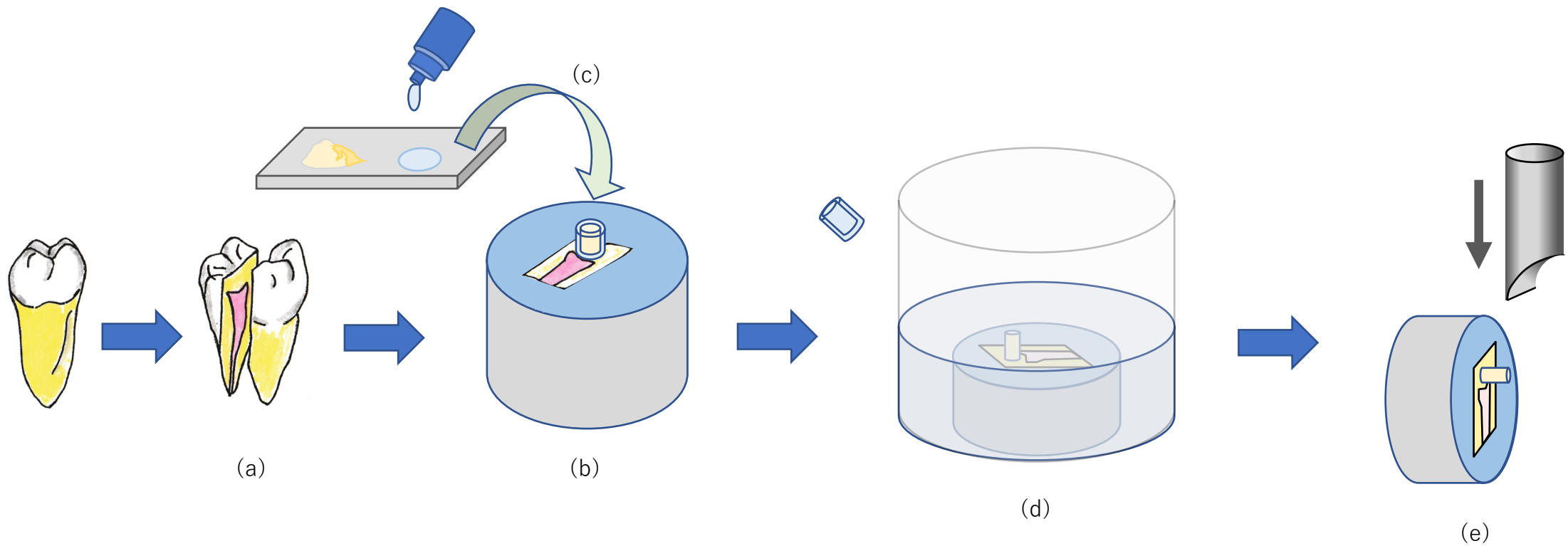


図2 せん断試験の試料製作方法

- (a) 抜去歯の歯冠中央部を，歯軸に対して平行にかつ近遠心方向に切断して健全象牙質を露出させた．
- (b) 露出面が上面となるように歯科汎用アクリル系レジンを用いてモールド内に包埋した．
- (c) 得られた被着面に，直径 3.0 mm × 高さ 3.0mm のポリエチレン製モールドを置き，各種セメント練和物を填入・圧接して円柱状の試料を得た．
- (d) 硬化後，ポリエチレン製モールドを除去し，37℃の蒸留水中に 1 日，7 日，28 日間浸漬させた．
- (e) 浸漬後，万能試験機を用いてせん断接着強さを測定した．

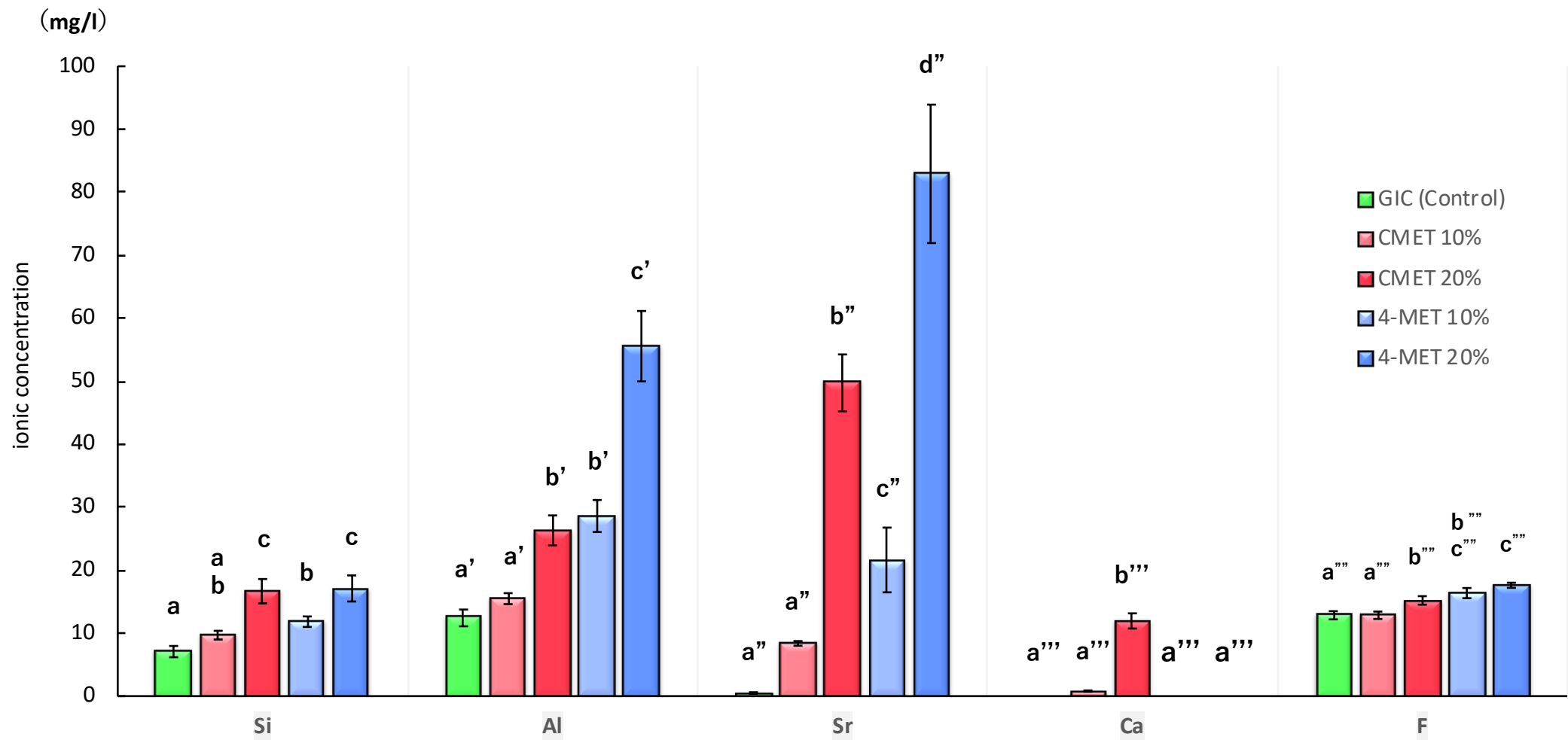


図3
佐藤幸平

1-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)
Same small letters indicate no statistical difference

図3 各種セメント溶出液の徐放イオン量

徐放イオン量は、CMET・4-METの用量依存的に増加傾向を示した。
Caイオンの徐放は、C-GIC群のみに認められた。

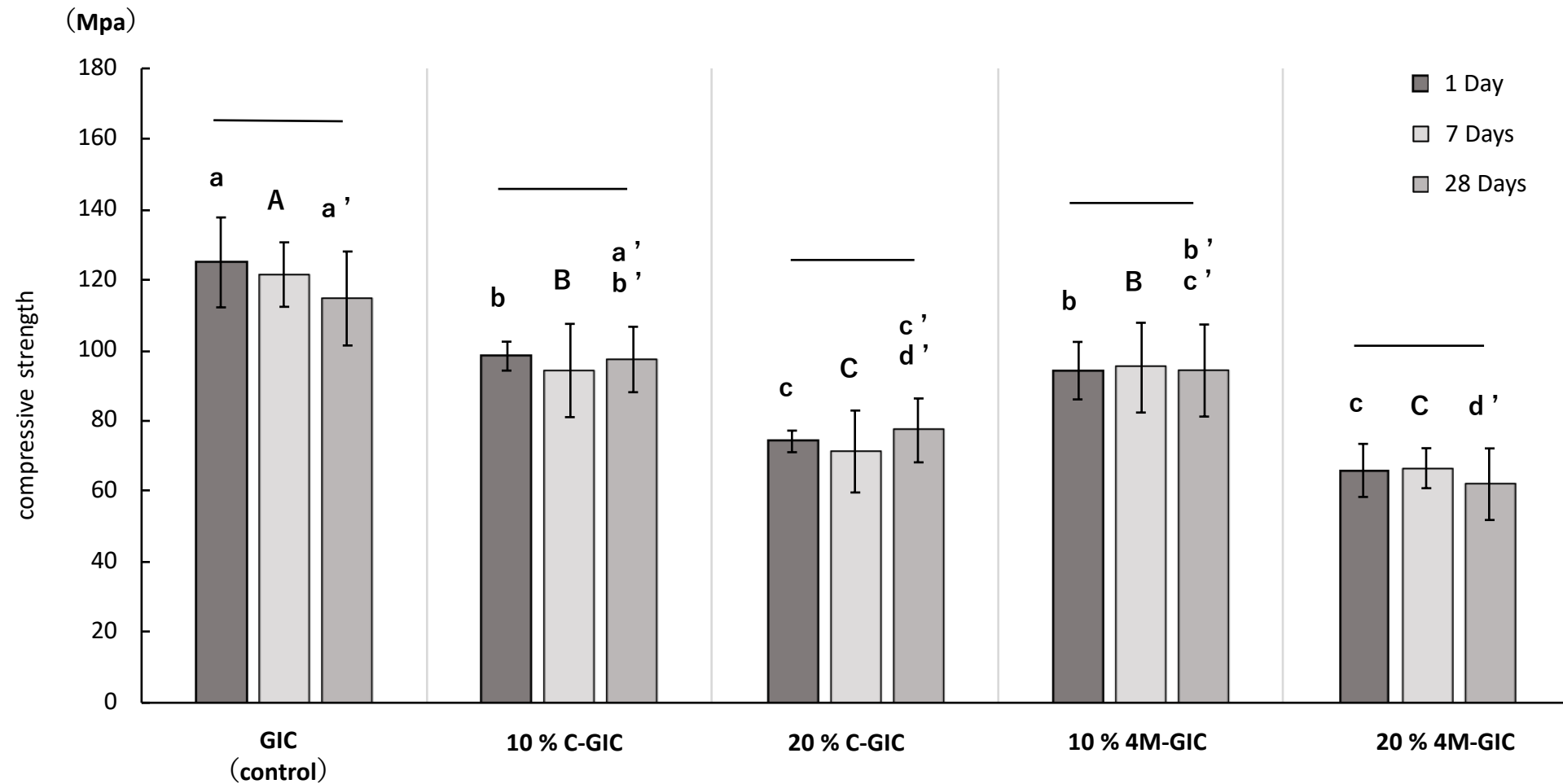
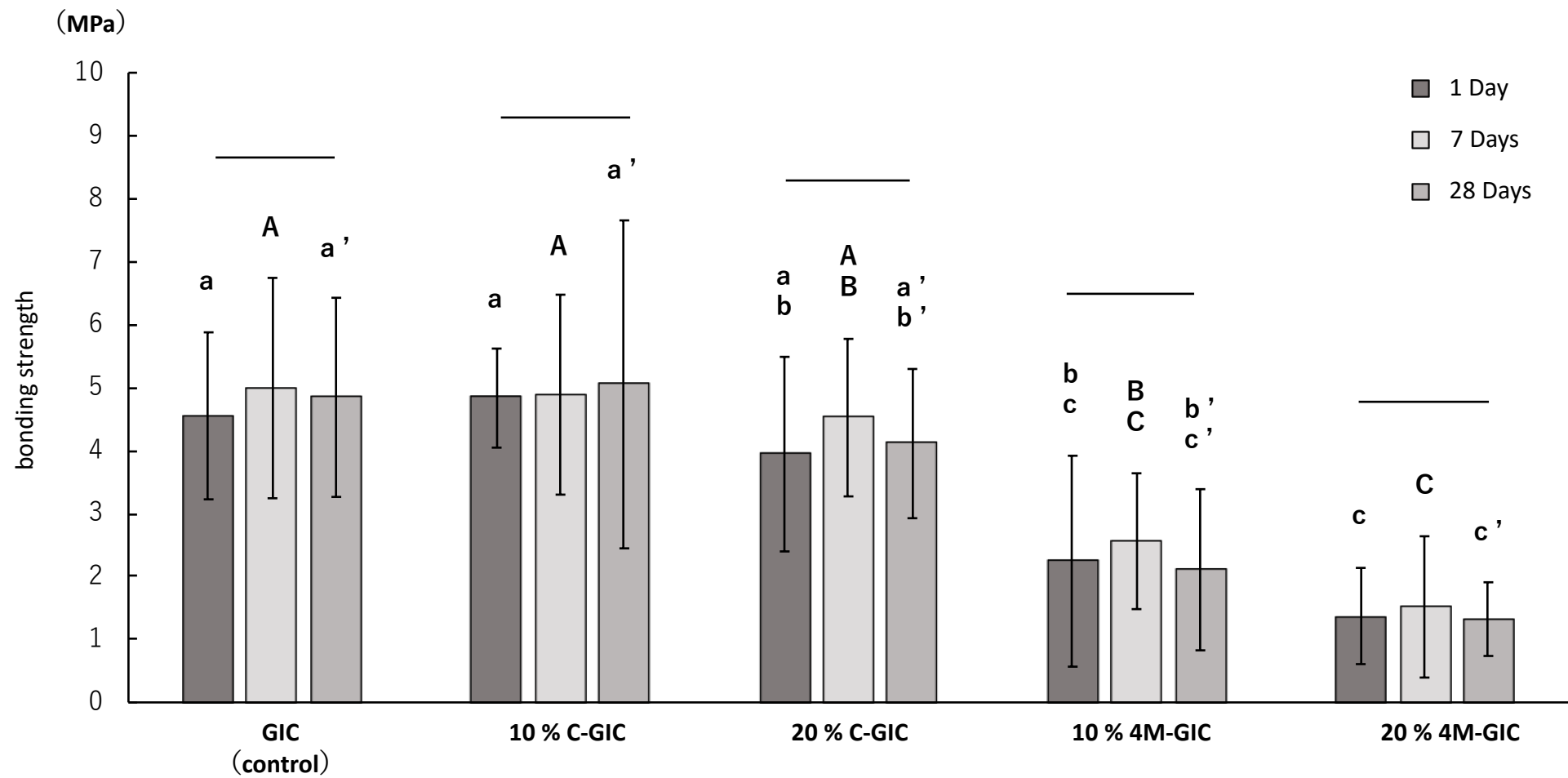


図4
佐藤幸平

2-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)
Same letters indicate no statistical difference
Horizontal bar indicates no statistical difference

図4 各種セメントの圧縮強さ

C-GIC, 4M-GIC 群の圧縮強さは、用量依存的に有意な低下を示した。
同一添加量間では有意差は認めず、すべての群で、浸漬期間は圧縮強さに有意な影響を与えなかった。



2-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)
 Same letters indicate no statistical difference
 Horizontal bar indicates no statistical difference

図5 各種セメントのせん断接着強さ

C-GIC 群は、4M-GIC 群に対し、有意に高い接着強さを示した。
 浸漬期間は、接着強さに有意な影響を与えなかった。

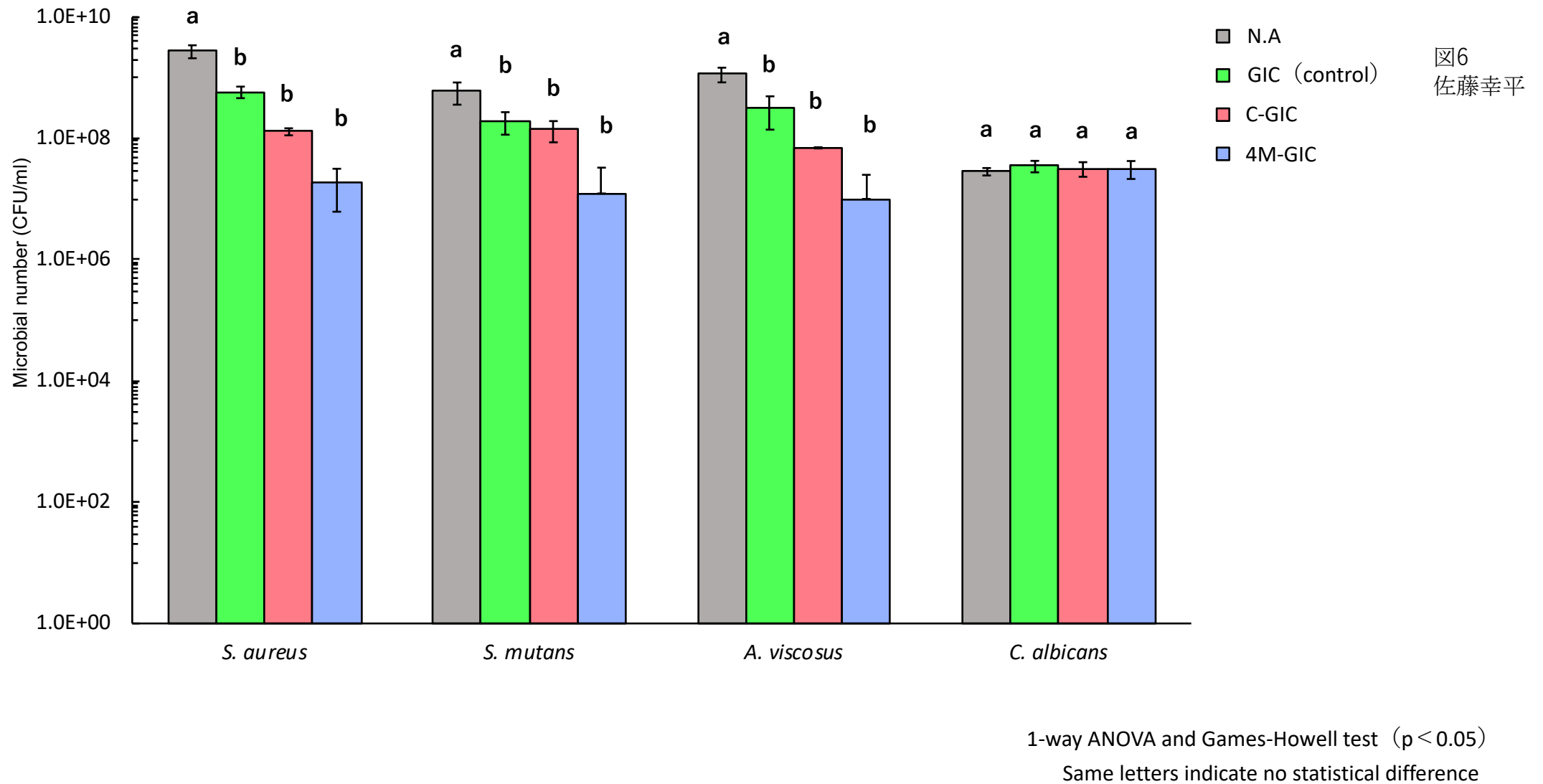


図6 各種溶出液の抗菌作用

S. aureus, *S. mutans*, *A. viscosus* では、無添加群に対し、すべてのセメントで生菌数の減少が認められた。
C. albicans では、生菌数の減少は認められなかった。

図7
佐藤幸平

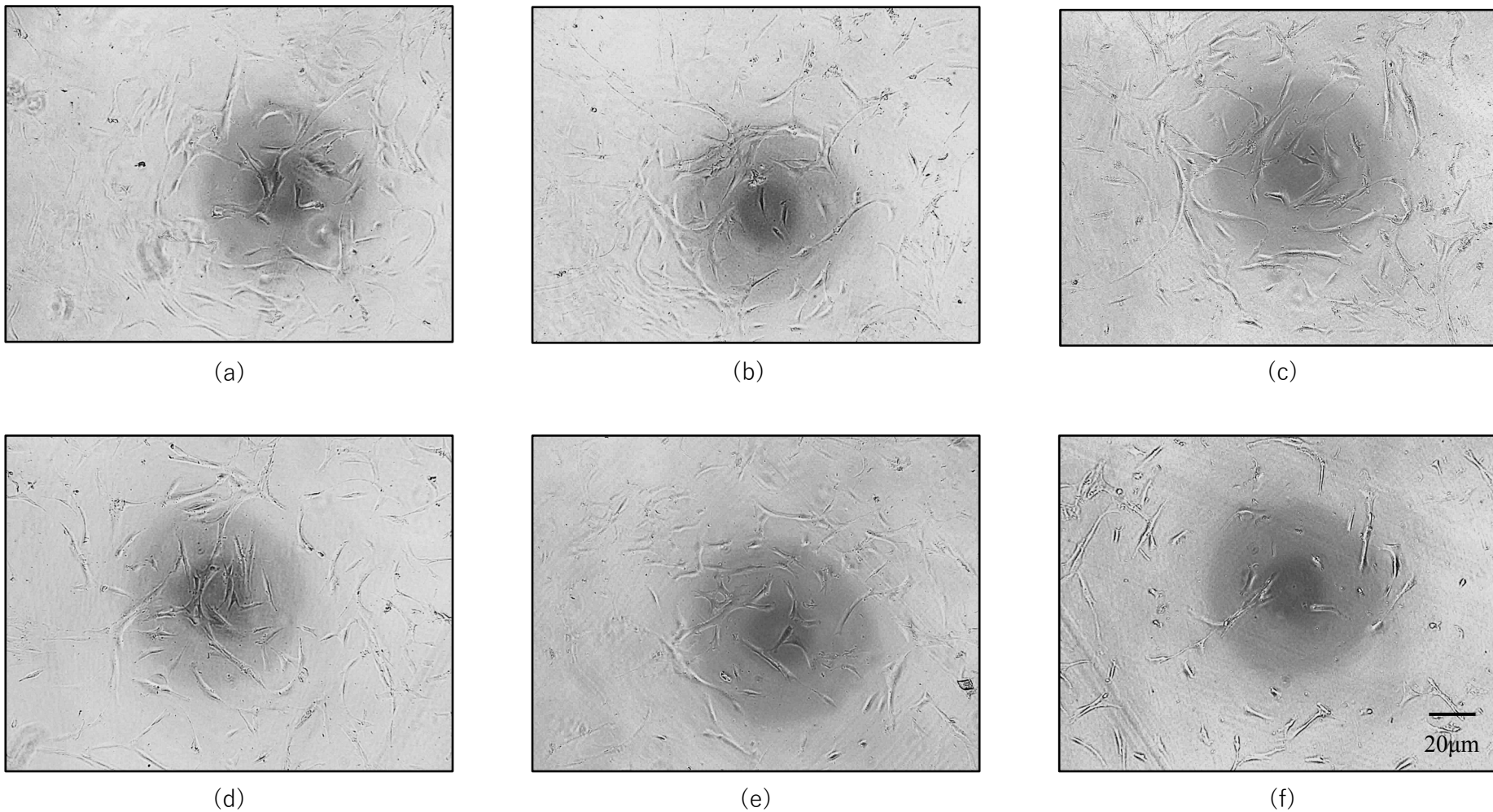
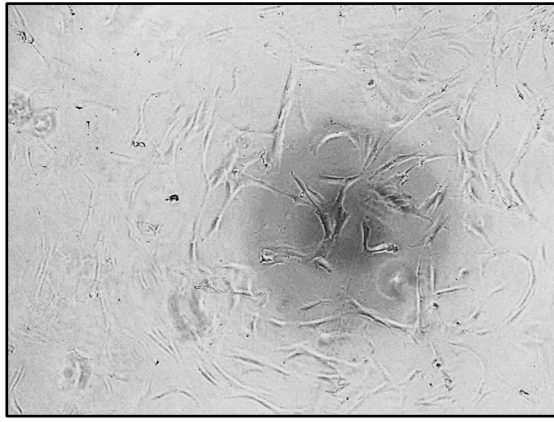


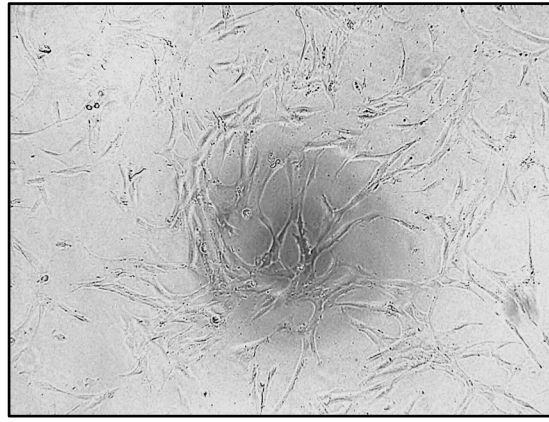
図7 GIC (Control) 溶出液添加後の細胞観察像

(a) N.A, (b) 10 % GIC, (c) 20 % GIC, (d) 30 % GIC, (e) 40 % GIC, (f) 50 % GIC
添加量の濃度依存的に, 細胞間の接着や増殖性の低下が認められた.

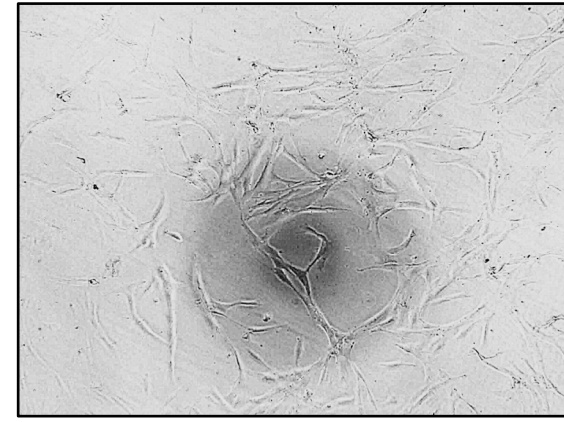
図8
佐藤幸平



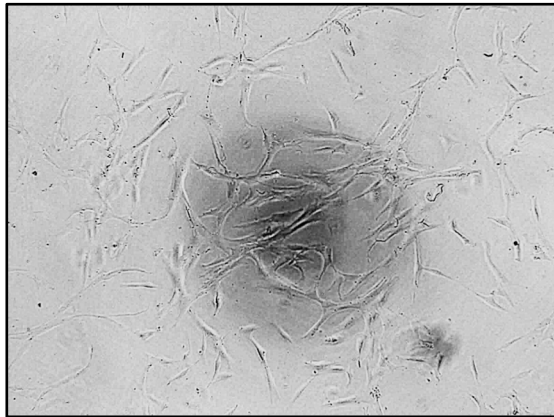
(a)



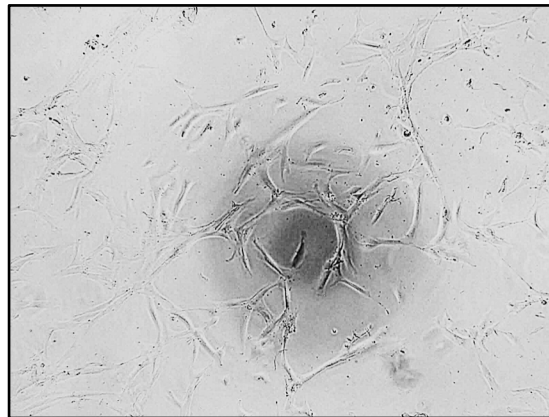
(b)



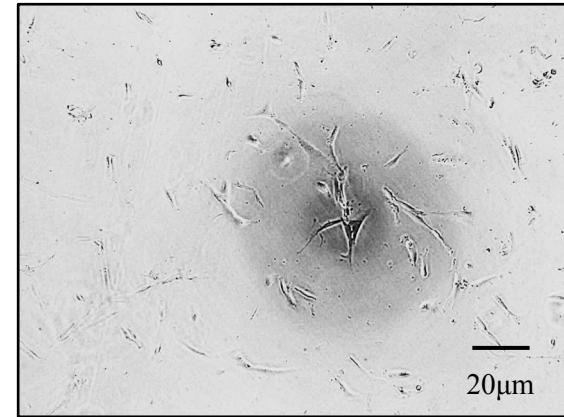
(c)



(d)



(e)



(f)

図8 C- GIC 溶出液添加後の細胞観察像

(a) N.A, (b) 10 % C-GIC, (c) 20 % C-GIC, (d) 30 % C-GIC, (e) 40 % C-GIC, (f) 50 % C-GIC
濃度依存的に，細胞形態は萎縮し，球状化傾向を示した．

図9
佐藤幸平

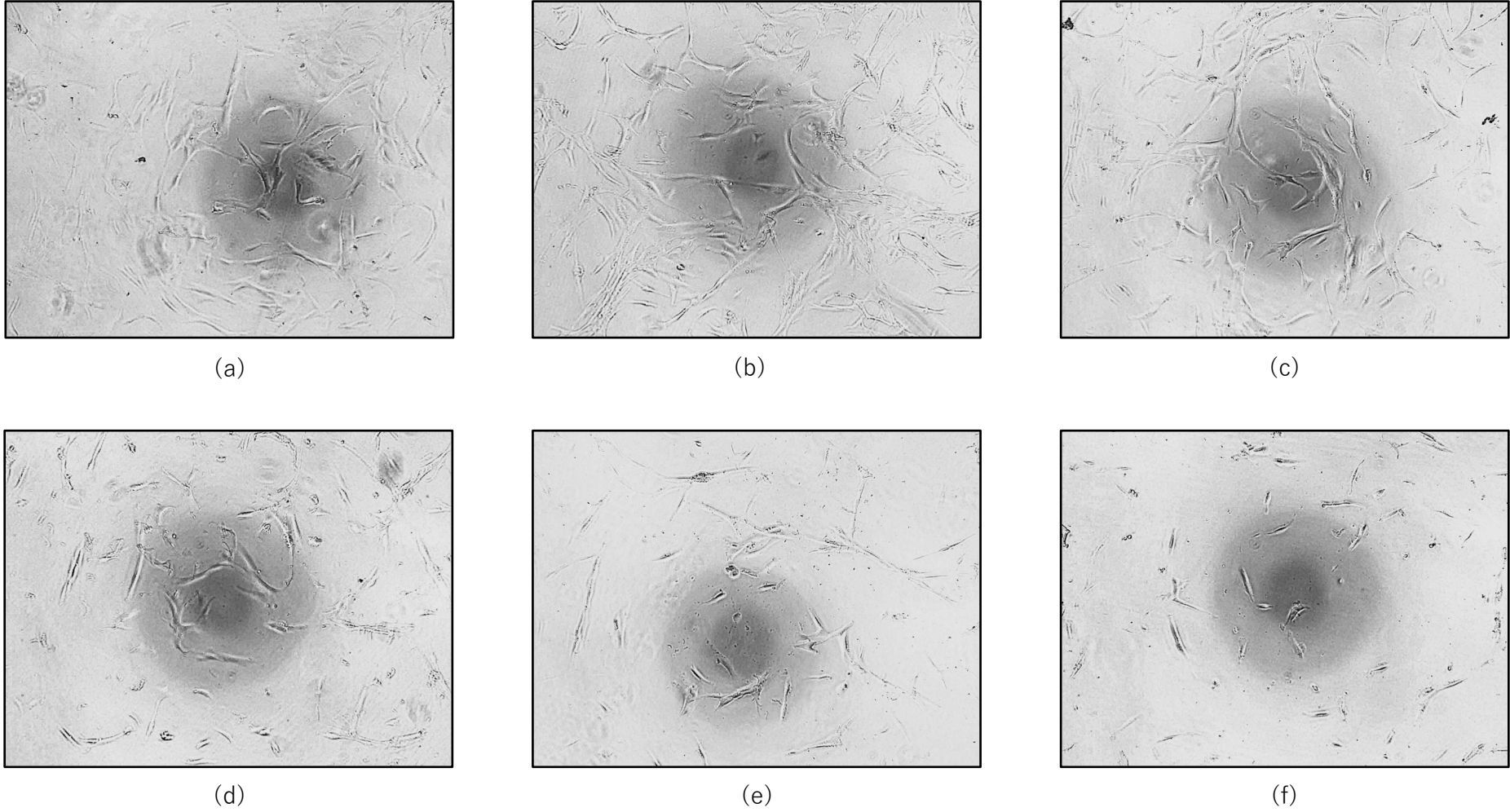
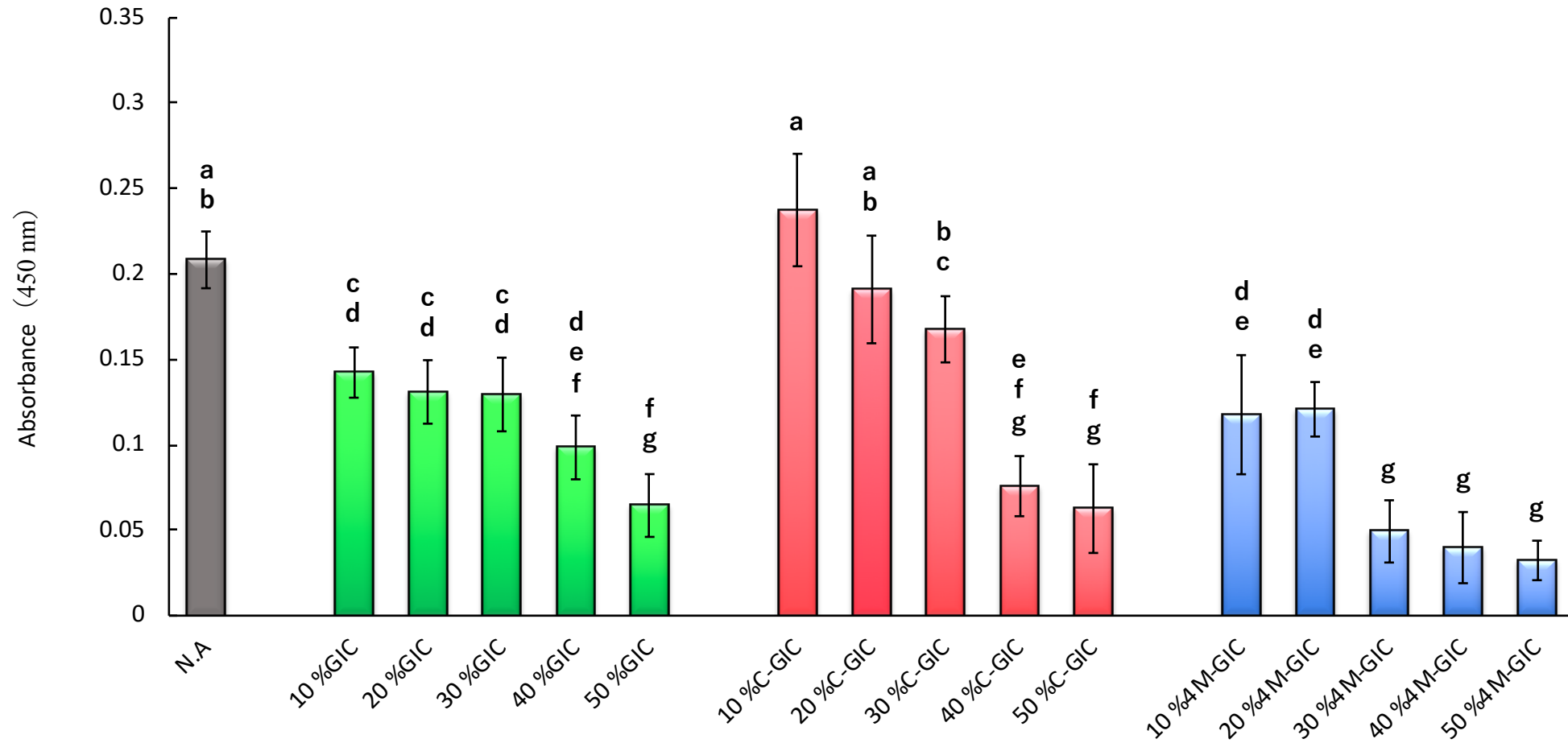


図9 4M-GIC 溶出液添加後の細胞観察像

(a) N.A, (b) 10 % 4M-GIC, (c) 20 % 4M-GIC, (d) 30 % 4M-GIC, (e) 40 % 4M-GIC, (f) 50 % 4M-GIC
細胞間の接着性, 増殖性, 形態の萎縮が, コントロール群や C-GIC 群よりも顕著であった

図10
佐藤幸平

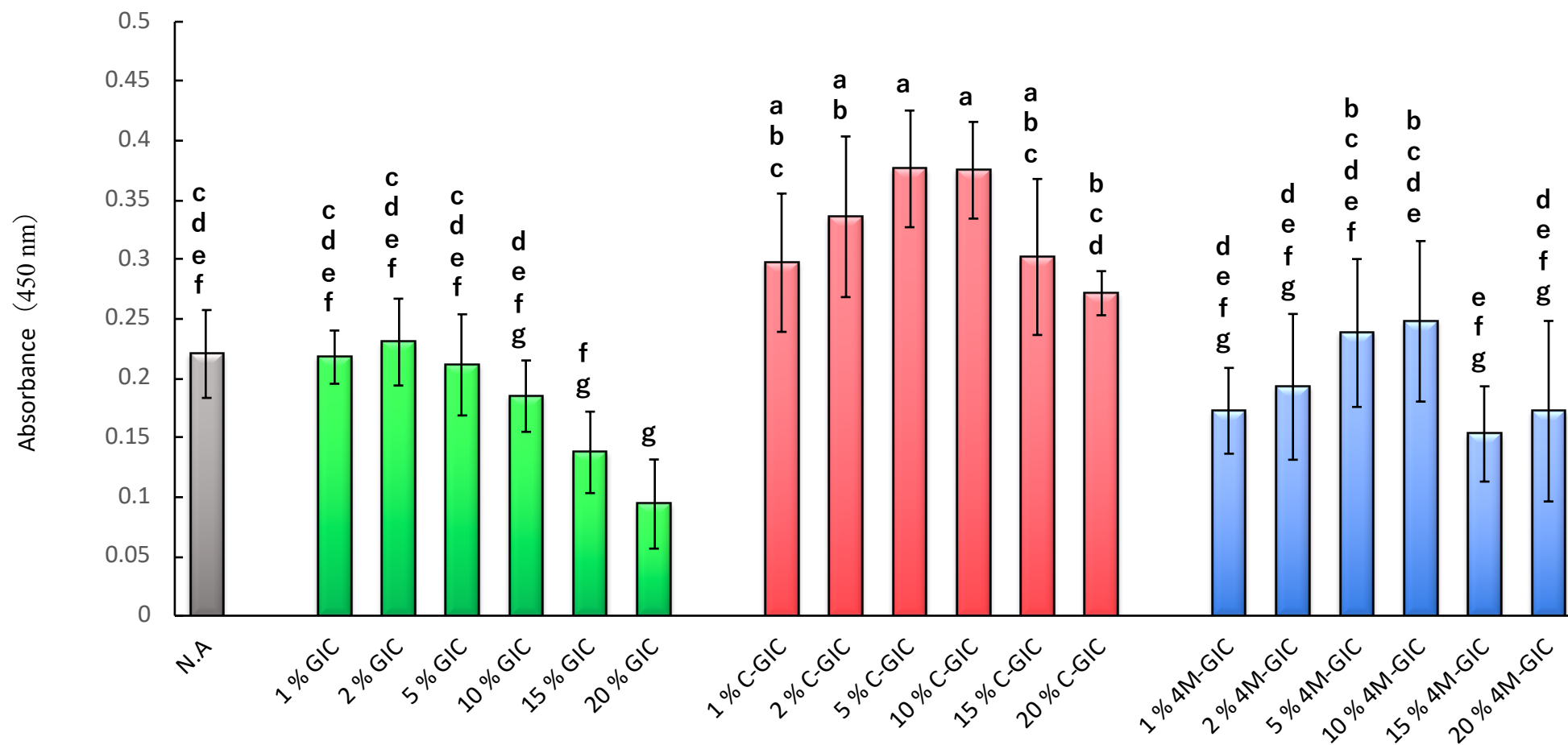


1-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)
Same small letters indicate no statistical difference

図10 各種セメント溶出液による細胞毒性

各溶出液添加群で、濃度依存的に細胞毒性傾向を示した。
10%および20% C-GIC は、コントロール群、4M-GIC 群よりも
有意に低い細胞毒性を示した。

図11
佐藤幸平

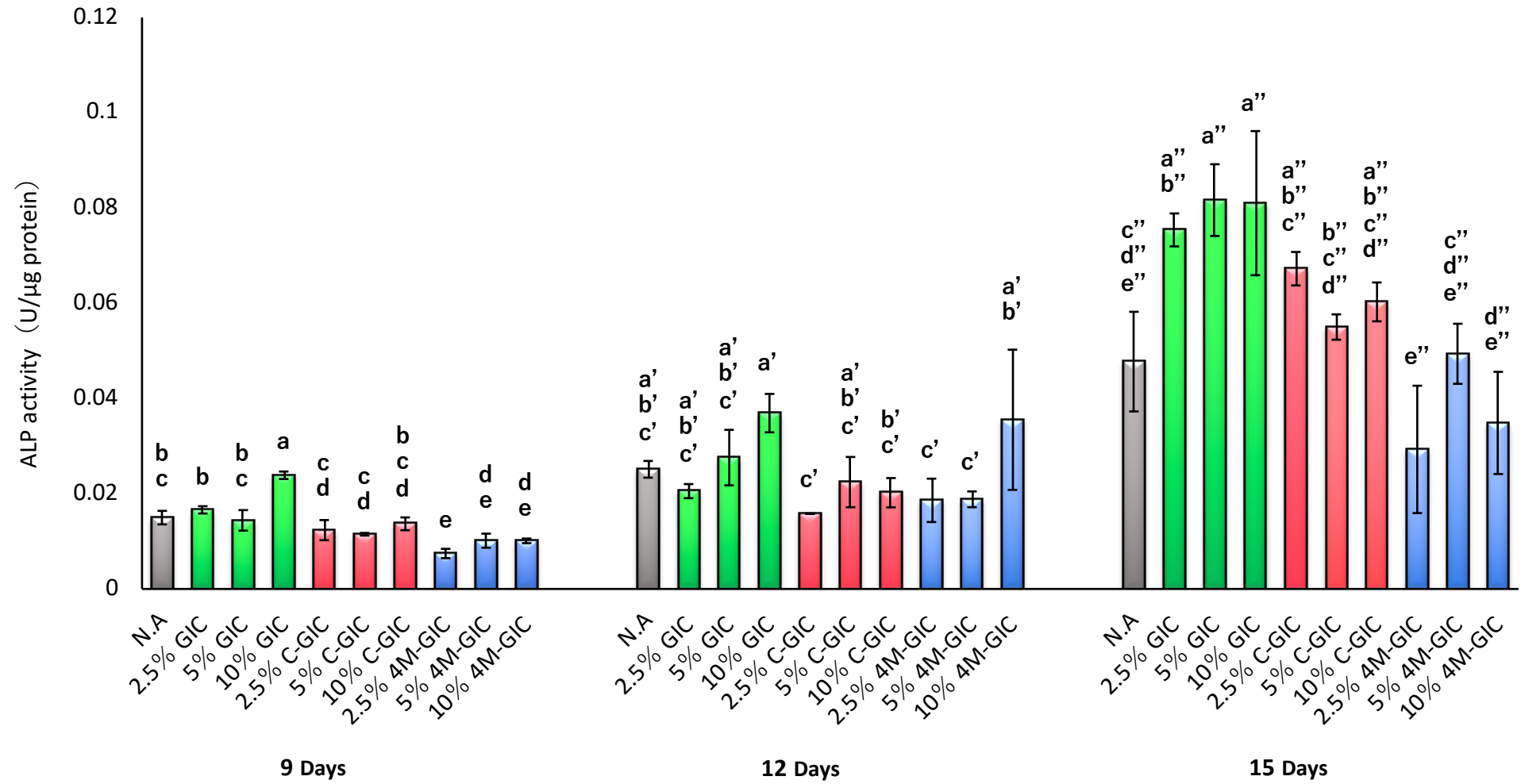


1-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)
Same small letters indicate no statistical difference

図11 各種セメント溶出液による細胞増殖能

細胞の増殖性は、C-GIC 群が他群に比較して高い傾向を示し、5 %，10 % 添加群で高い値を示した。

図12
佐藤幸平



1-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)
Same small letters indicate no statistical difference

図12 アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性
ALP 活性値は、経日的に上昇傾向を示した。
15 日目では、コントロール群が高い活性値を示した。

図13
佐藤幸平

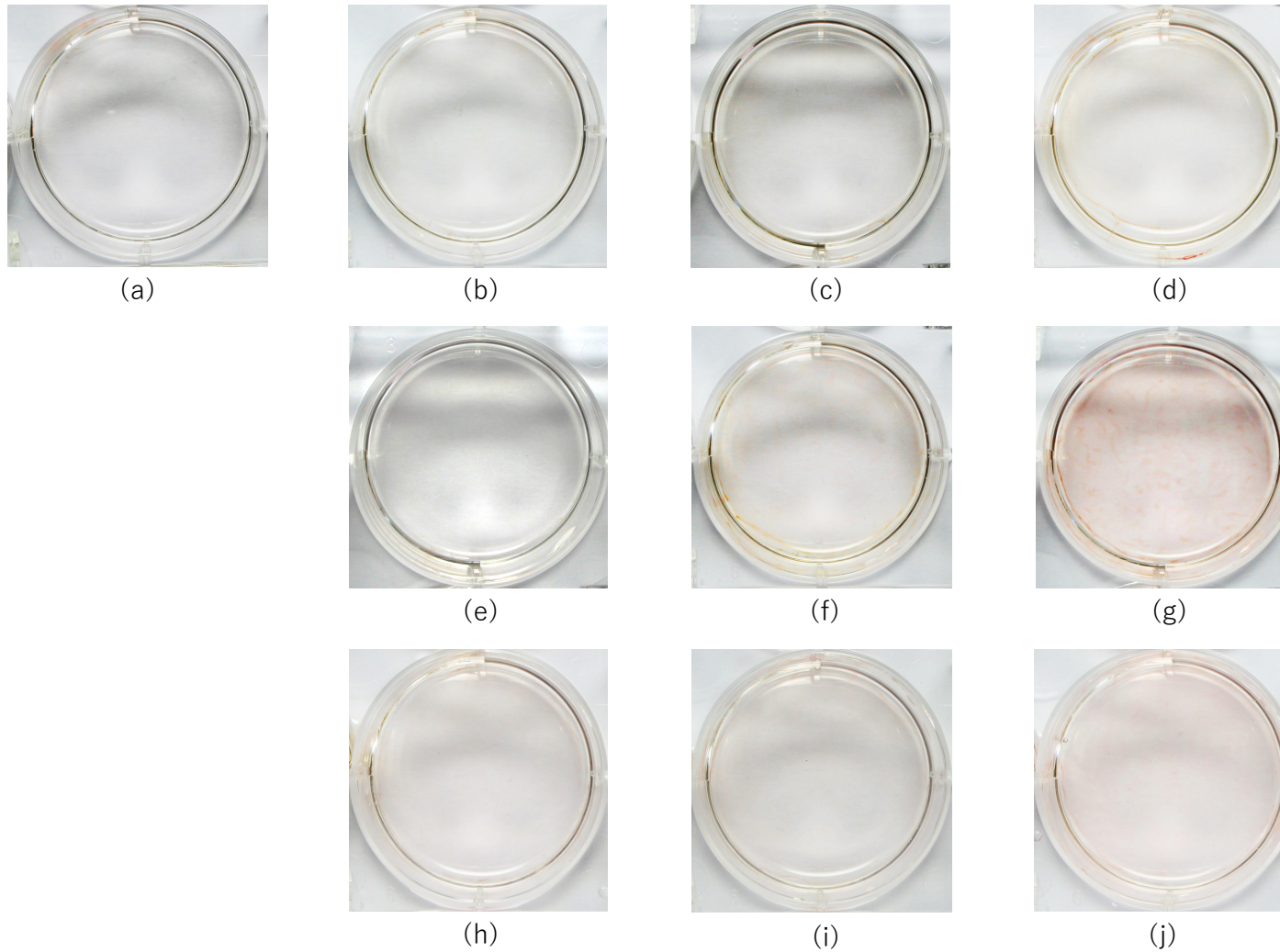
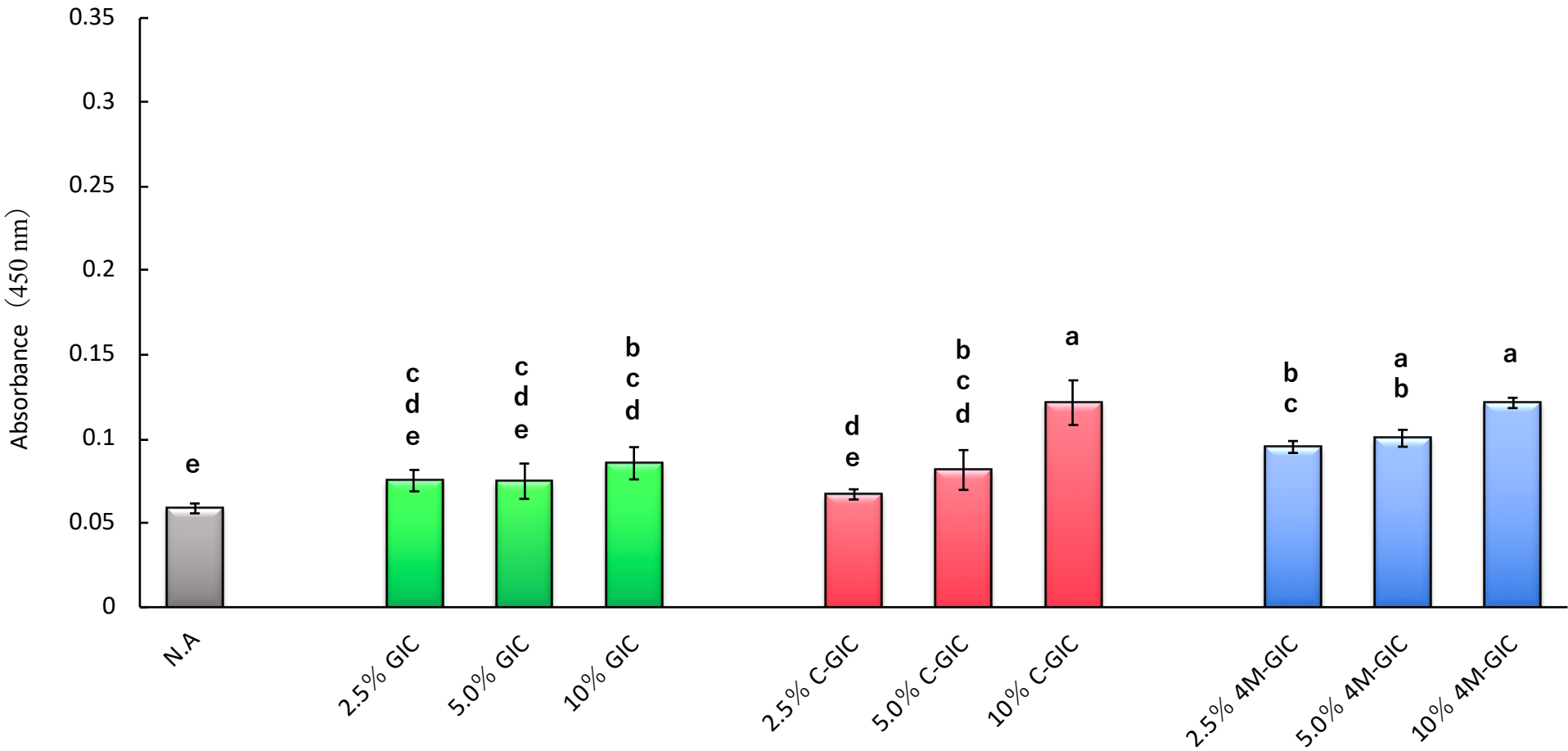


図13 アリザリンレッド染色 (21日目)

(a) N.A, (b) 2.5 % GIC, (c) 5.0 % GIC, (d) 10 % GIC
(e) 2.5 % C-GIC, (f) 5.0 % c-GIC, (g) 10 % C-GIC
(h) 2.5 % 4M-GIC, (i) 5.0 % 4M-GIC, (j) 10 % 4M-GIC

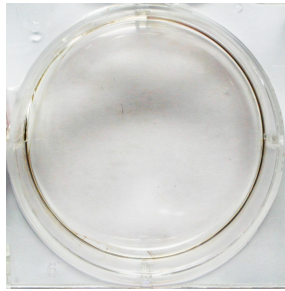
染色像は, 10 % C-GIC (g) , 5 % (i) および 10 % 4M-GIC (j) で, 淡い赤染を認めた.

図14
佐藤幸平

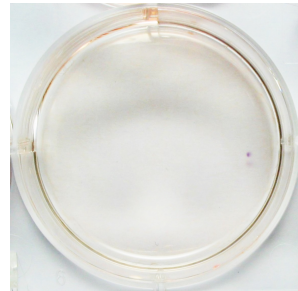


1-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)
Same small letters indicate no statistical difference

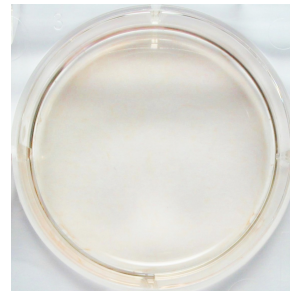
図14 CPC 定量化によるカルシウム沈着量 (21 日目)
他群比較して, 10 % C-GIC , 5 % および 10 % 4M-GIC は有意な Ca の沈着量を示した.



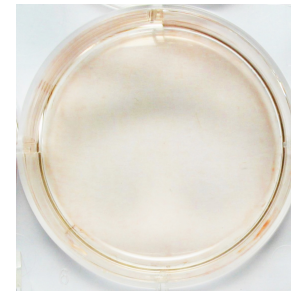
(a)



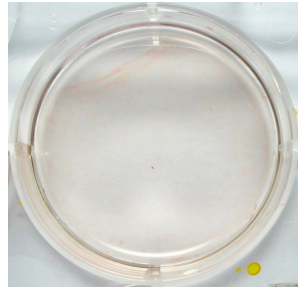
(b)



(c)



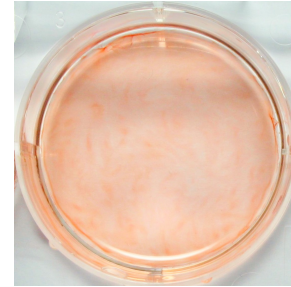
(d)



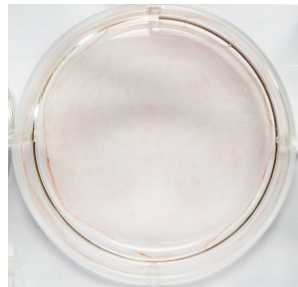
(e)



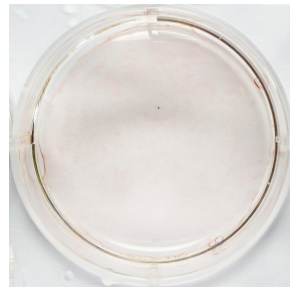
(f)



(g)



(h)



(i)



(j)

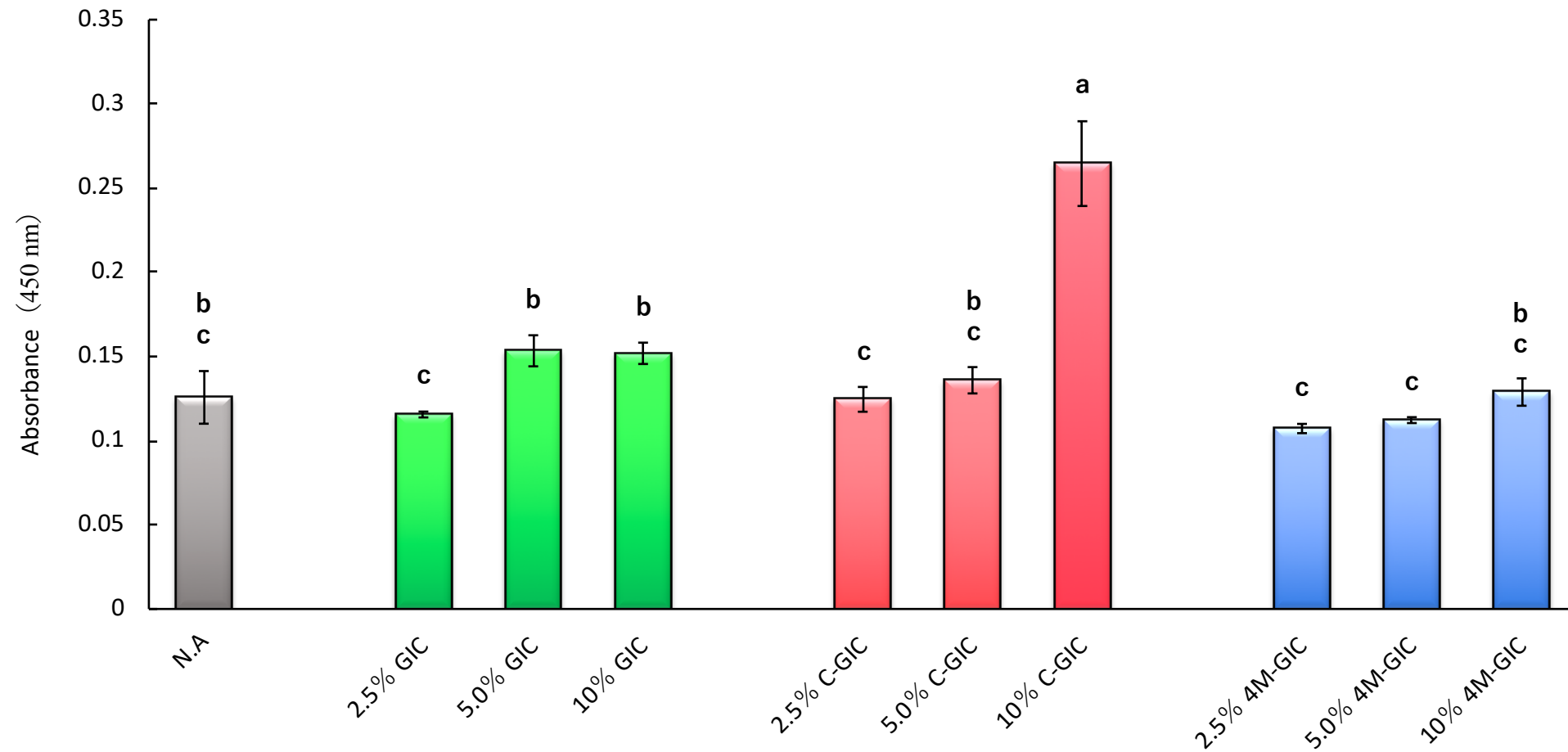
図15 アリザリンレッド染色 (28日目)

(a) N.A, (b) 2.5 % GIC, (c) 5.0 % GIC, (d) 10 % GIC
 (e) 2.5 % C-GIC, (f) 5.0 % c-GIC, (g) 10 % C-GIC
 (h) 2.5 % 4M-GIC, (i) 5.0 % 4M-GIC, (j) 10 % 4M-GIC

染色像は, 10 % C-GIC (g) で濃染を認めた.

図15
佐藤幸平

図16
佐藤幸平



1-way ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$)
Same small letters indicate no statistical difference

図16 CPC 定量化によるカルシウム沈着量 (28 日目)

他群と比較して、10 % C-GICは有意に高い Ca 沈着量の亢進を示した。