

〔原 著〕

試作シアノアクリレート系裏装材の細胞毒性
—ミリポアフィルター重層法による細胞毒性評価—

広瀬由紀人、越智守生、日景 盛、
坂口邦彦、井上龍一郎

東日本学園大学歯学部歯科補綴学第II講座

(主任：坂口邦彦教授)

Cytotoxicity of experimental cyanoacrylate base cement
—Evaluation of cytotoxicity by means of the millipore filter method—

Yukito HIROSE, Morio OCHI, Sakari HIKAGE,
Kunihiko SAKAGUCHI and Ryuichiro INOUE

Department of Crown and Bridge Prosthodontics, School of Dentistry,

HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY.

(Chief: Prof. Kunihiko SAKAGUCHI)

Abstract

In a previous study (J.Jpn.Prosthodont.Soc.,33:1388~1397, 1989.), Ochi et al., reported on the adhesive strength of cyanoacrylate dental cement (F.H cement®), and showed that even after thermal-cycle treatment the cement had an adhesive strength to dentin which was nearly equal to that of the dental adhesive resin (Panavia EX®) under the same treatment conditions. Nakagawa et al. investigated the pathology of dental pulp treated with F.H cement® and reported that the cement had a protective effect.

Based on these previous reports we produced an experimental cyanoacrylate base cement. In this experimental base cement, the liquid compound was to isobutyle-cyanoacrylate instead of the ethyl-cyanoacrylate used in F.H cement®. The purpose of the study reported here was to use the millipore filter method to evaluate the cytotoxicity of the experimental base cement on herdening process of the cement, from mixing it complete hardening. The filters were examined macroscopically and scores from 0 to 3 were assigned to grade the severity of the cell respons. The experimental base cement showed no toxic effect on the cells even immediately after mixing. It was

concluded that the experimental base cement was the least toxic compound in its effect on the cells.

Accordingly, the experimental base cement is harmless to dental pulp in clinical uses in dentistry.

緒 言

1989年に越智ら¹⁾は、当教室と株式会社ニッシンで共同開発したシアノアクリレート系接着用セメント(F.Hセメント®)の接着強さについての検討を行ない、このセメントが熱サイクルを付与した後も象牙質に対して同条件試験下のパナビアEX®に匹敵する接着強さを有することを明らかにした。また、F.Hセメント®に関して病理学的見地から検討した中川ら²⁾は、このセメントに歯髄保護作用があることを報告している。

歯科用セメントの多くは練和後10分以内で硬化するものが多く、硬化したセメントではほとんど毒性を示さなくなる傾向があることが知られている。しかし、佐藤³⁾が指摘しているようにセメントのような硬化性の歯科材料は、完成した材料の問題と加工過程の問題の2面性について考えなければならない。すなわち、このような歯科材料の細胞毒性を検討する場合は、材料の硬化前と硬化後の細胞毒性を調べる必要がある。

本研究では、先の報告に着目して試作されたシアノアクリレート系裏装用セメントについて、セメント練和直後からの経時的細胞毒性の変化を評価する目的で、FDI(国際歯科連盟)ならびにISO(国際標準化機構)の歯科材料の生物学的評価基準⁴⁾の中にあるミリポアフィルター重層法による細胞毒性試験^{5~7)}を行った。

材料と方法

1. 検体試料とその調整法

検体には、試作セメント(粉材;イソブチル

シアノアクリレート 94%, PMMA 6%, 液材;シリカ 49%, 硫酸バリウム 35%, PMMA 15%), 比較としてガラスアイオノマー系裏装用セメント(ライニングセメント, GC社), 陰性対照のテフロン棒(直径7mm×5mm), 陽性対照として練和直後のリン酸亜鉛セメント(エリートセメント100, GC社)を用いた。3種類のセメントは、粉液比は試作セメントが2.4:1, ライニングセメントが1.2:1, リン酸亜鉛セメントが2.9:1として試験に供した。検体試料はセメントを練和直後に内径7mm, 高さ5mmのガラスリングに填入し、練和直後、練和1分後、練和5分後および練和45分後のものを作製して実験に用いた。テフロン棒ならびにガラスリングは、121°Cで20分間の高圧滅菌を行ない試験に供した。なお、材料を注入するガラスリングについてもブランクとして細胞毒性の有無を確認した。

検体試料の例数は各条件で10としたが、練和45分後のものは例数を各5とした。

2. 培養細胞と培地

試験にはマウス線維芽細胞のL-929細胞を用いた。培地はEagle MEM(ニッスイ)に10%牛胎仔血清+2mM・L-グルタミン+10mM・NaHCO₃+10mM・HEPESを添加して増殖用培地とした。L-929細胞の培養は、この増殖用培地を3日毎に交換して行なった。

また、増殖用培地の2倍濃度のものを寒天培地用培地とした。そして、この寒天培地用培地と精製寒天(Bacto-Ager, Difco)の3%水溶液を1:1の割合で混合して寒天培地とした。試験では、硬化していない寒天培地を直径60mmシャーレに5mlずつ分注し、寒天が冷えて固化し

てから使用した。

3. 試験方法

直径60mmシャーレ内に直径47mmのミリポアフィルター（孔径0.45 μ m）を敷き、内径45mm、高さ5mmのフィルター固定用ガラスリングでフィルターを固定した。リングの中に増殖用培地を用いて細胞数を 1.5×10^5 個/mlに調整した細胞浮遊液を6ml入れ、37°C、5%CO₂・空気気相、100%湿度の炭酸ガス恒温器中で72時間培養した。培養後、フィルターを取り出し、細胞面が下側になるように裏返してあらかじめ作製しておいた寒天平板上に置いた。そしてフィルター上へ図1に示した位置で各検体試料を置き、炭酸ガス恒温器中で2時間培養した。また、細胞を播種していないフィルターにも同様に検体試料を置いて炭酸ガス恒温器中に2時間静置した。2時間後に検体試料を取り除き、フィルターを寒天平板から剥がしてコハク酸脱水素酵素反応基質溶液 [2.5M・コハク酸ソーダ 10ml, 4mg/ml ニトロブルー・テトラゾリウム・クロライド 10ml, 0.1M・リン酸緩衝液 (pH7.4) 10ml, 0.33M・CaCl₂0.2ml, 蒸留水6.8ml, pHを7.0~7.2に補正] にフィルターを移し、37°C、3時間放置して染色を行なった。

その後、反応基質溶液を取り除きフィルターを10%ホルマリン生理食塩水に15分間浸漬して固定を行ない、蒸留水で洗浄して乾燥した。

なお、試験に用いた反応基質液はPearse⁹⁾の方法を参考に、Barka and Anderson⁹⁾の方法を一部改変した日景らの方法¹⁰⁾に準じて調整した。

4. 評価方法と判定法

ミリポアフィルター重層法は、コハク酸脱水素酵素反応基質溶液を用いて細胞内のコハク酸脱水素酵素を組織化学的に発色させ、フィルター上においた検体試料によって生じる発色阻止域を肉眼的に観察し、毒性を評価する。本研究の試験結果は検体試料と接している部分の所見

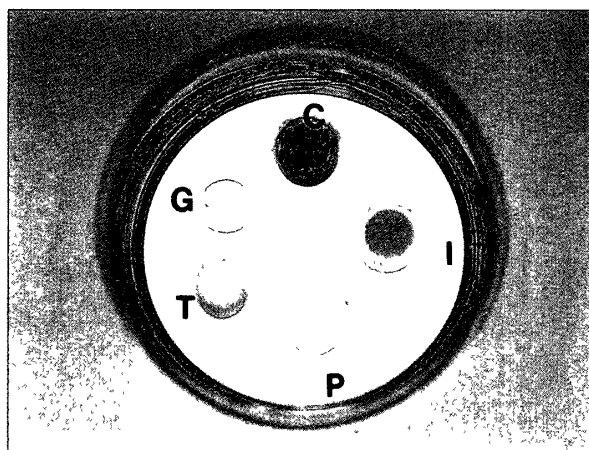


図1 寒天平板上のミリポアフィルターと検体試料

- C：試作セメント
- G：ガラスリング
- T：テフロン
- P：陽性対照
- I：ライニングセメント

を次のスコアにより区分した。

- 0：検体試料と接している部分の染色性が、検体試料と離れた部分の染色性と差がない場合
- 1：染色性の低下あるいは消失している領域が検体試料の直径7mm以下である場合
- 2：染色性の消失している領域が7~11mmである場合
- 3：染色性の消失している領域が12mm以上である場合。

これらのスコアの得点からセメントの毒性を判定した。判定法を表1に示す。

表1 判定法

スコア	判定
0	無細胞毒性
1	弱い細胞毒性
2	中程度の細胞毒性
3	強い細胞毒性

結 果

試験の結果を表2, 表3および図2に示す。

細胞を播種したフィルターは染色後濃青色となった。細胞を播種していないフィルターは全く染色されず, 検体試料を置いた部分も周囲と同様に染色されず, 色の変化は認められなかった(図2 a)。

練和直後では, 陽性対照のリン酸亜鉛セメントと試作セメントの比較としたグラスアイオノマー系のライニングセメントに染色性の消失が確認された。リン酸亜鉛セメントは10例中8例がスコア2, 2例がスコア3となり中程度以上の細胞毒性と評価した。ライニングセメントは10例中10例がスコア2となり中程度の細胞毒性と評価した。図2 bに示すフィルターではリン酸亜鉛セメントならびにライニングセメントの判定はスコア2となった。それに対して試作セメントは10例全てに染色性の差を認めず, スコア0で細胞毒性はなかった(図2 b)。陰性対照のテフロンならびにセメントの填入に用いたガラスリングも試作セメントの場合と同様に全てがスコア0となった(図2 b)。

練和後1分では, ライニングセメントに染色

性の一部消失ならびに染色性の低下が認められた(図2 c)。ライニングセメントは10例中3例がスコア0, 4例がスコア1, 3例がスコア2となり中程度以下の細胞毒性と評価した。それに対して試作セメントは10例全てに染色性の差を認めず, スコア0で細胞毒性はなかった。

練和後5分では, ライニングセメントは10例中8例がスコア0, 2例がスコア1となり弱い細胞毒性と評価した。図2 dに示すフィルターではライニングセメントに染色性の一部消失ならびに染色性の低下が認められ, 判定はスコア1となった。それに対して試作セメントは10例全てに染色性の差を認めず, スコアは0で細胞毒性はなかった。

練和後45分では, 図2 eに示すフィルターのように, ライニングセメントならびに試作セメントの各5例全てに染色性の差が認められず, スコアは0で細胞毒性はなかった。

グラスアイオノマー系のライニングセメントは, 練和直後で中程度の細胞毒性を発現し, 時間の経過にともない無細胞毒性となったが, 試作セメントは, 練和直後から無細胞毒性だった(表3)。

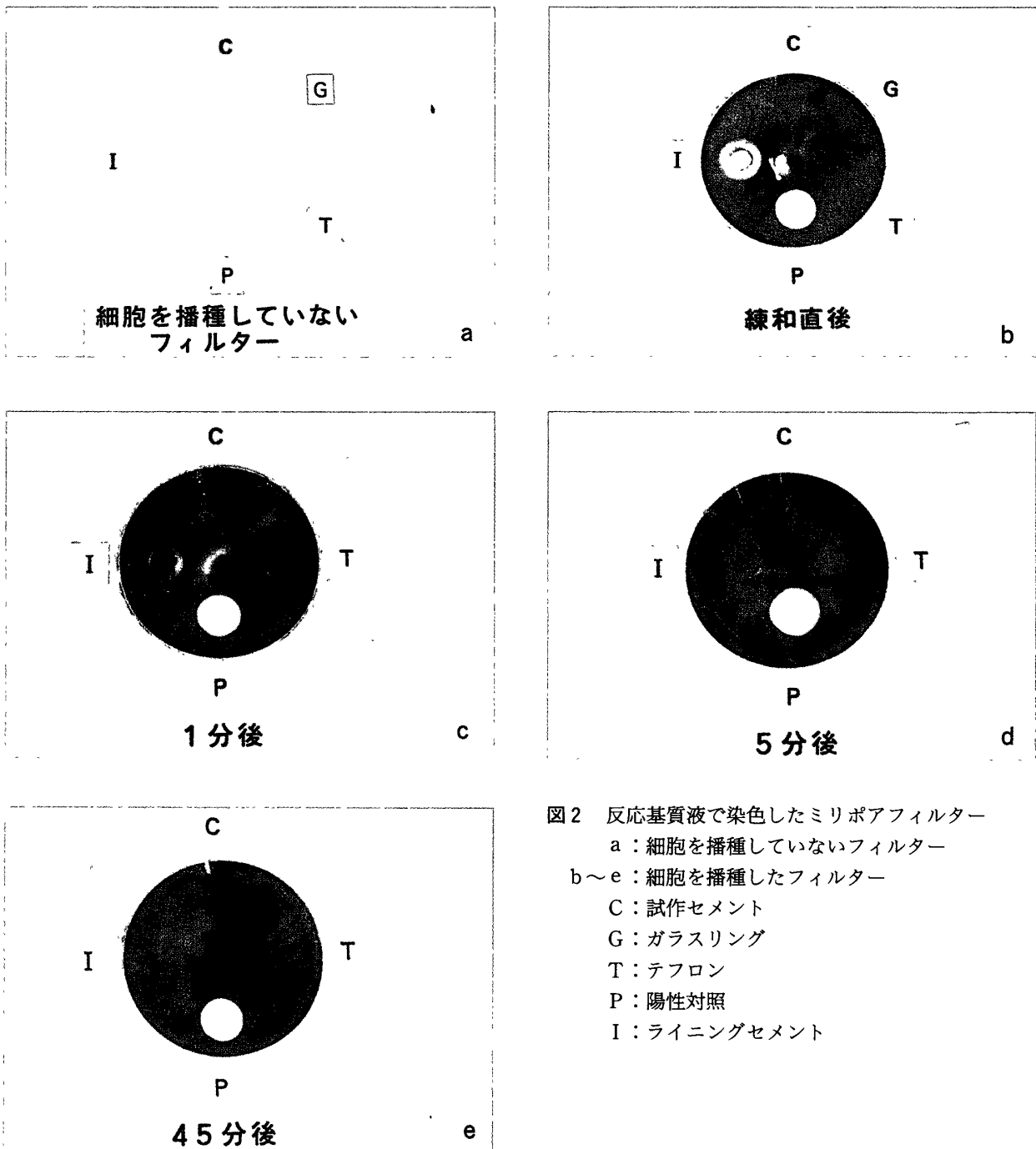
表2 細胞毒性の評価

検体	練和直後	1分後	5分後	45分後
	スコア 0 1 2 3	スコア 0 1 2 3	スコア 0 1 2 3	スコア 0 1 2 3
試作セメント	10	10	10	5
ライニングセメント	10	3 4 3	8 2	5
陰性対照	10	10	10	5
陽性対照	8 2	8 2	10	5
ガラスリング	10			

* 45分後は例数が各5

表 3 試作セメントとライニングセメントの細胞毒性の比較

セメントの種類	練和直後	1分後	5分後	45分後
シアノアクリレート系 試作セメント	無細胞毒性	無細胞毒性	無細胞毒性	無細胞毒性
ガラスアイオノマー系 ライニングセメント	中程度の 細胞毒性	中程度以下の 細胞毒性	弱い 細胞毒性	無細胞毒性



考 察

裏装は、種々の刺激性物質の歯髄への侵入防止を目的とし、主に金属修復材料を用いた場合におこる温熱的刺激を遮断するために行なう。故に窩洞に填塞する裏装材は、それ自体が、合着用あるいは接着用セメントに比べて歯髄に対して為害性がなく、炎症を惹起すものであってはならない。本研究で細胞毒性評価を行なった試作シアノアクリレート系裏装用セメントは、液材にイソブチルシアノアクリレートを使用しているの、液材がエチルシアノアクリレートのF.Hセメント®よりは組織に対する障害が少なくなっていると思われる。医科・歯科領域でのシアノアクリレートの応用は1960年頃にはじまり、外科手術後の生体組織の接着に対する有効性が多数報告され^{11~16)}、同時に基礎的研究も多数行なわれている^{2,17~19)}。これらの研究においてイソブチルシアノアクリレートは各種シアノアクリレート系接着材の間で最も生体組織に対する障害が少ないことが示唆されている^{17,18)}。また、サル歯髄にイソブチルシアノアクリレートを用いて直接覆髄を行なったCvek, M.ら²⁰⁾は、イソブチルシアノアクリレートによる第2象牙質の形成を報告している。シアノアクリレートの組織為害性は加水分解時に産生されるホルムアルデヒドによるもので、田村ら²¹⁾によると産生されるホルムアルデヒドの量はイソブチルシアノアクリレートが100 μ g中0.005 μ gであるのに対し、エチルシアノアクリレートでは100 μ g中約18倍の0.088 μ gと報告している。試作セメントは、以上の理由から液材にイソブチルシアノアクリレートを使用している。さらに、試作セメントでは粉材にシリカとPMMAを使用することで、加水分解をおこすイソブチルシアノアクリレートの量を相対的に減少させ、組織為害性の低下とともにシアノアクリレートの接着耐久性の向上^{22,23)}を図った。

硬化性材料の裏装材や合着材(または接着剤)においては、その細胞毒性を練和直後から硬化までの間で経時的に評価することが重要であると思われる。なぜなら、硬化性材料は硬化後はほとんど細胞毒性を発現しないか、発現しても非常に少なくなるものが多いので練和直後から硬化するまでの間の細胞障害性が問題となる。また、窩洞形成や支台歯形成を行なった歯冠部歯髄は切削時の刺激で必ず器質的变化を生じるため²⁴⁾、ここに応用される材料は歯面に接する初期から歯髄に対して無侵襲でなければ後に重篤な組織障害をおこさせる可能性がある。また、生体組織内に長期間使用される歯科材料(裏装材、根管充填剤、修復用金属材料、インプラントなど)の安全性試験要求度は口腔粘膜に一時的に接触する印象材などに比べてはるかに高いと思われる。細胞毒性試験のミリポアフィルター重層法は生体材料の局所的毒性を評価するものである。本法は硬化性材料など溶出物の比較的多い材料の毒性検出に適し、材料を直接細胞に接触させたときに生じる物理的、機械的損傷を排除することができる⁷⁾。以上の理由で本研究の目的からミリポアフィルター重層法を使用した。しかし、細胞毒性の定量は陽性対照との相対的な比較であり、試験の結果は半定量的表示にとどまった。

試験の結果、ライニングセメントが練和直後の試料で中程度の細胞毒性を発現したのに対し、試作セメントは練和直後の検体試料からすでに無細胞毒性を示し、練和1、5および45分後の検体試料においても無細胞毒性であった。このことは試作セメントの主成分以外(顔料など)に、強い細胞毒性を発現する材料が含まれていないことを示唆するものと思われる。さらに、硬化した試作セメントの抽出液をBritish standardに準拠した細胞毒性試験で評価した報告²⁵⁾において、硬化後のセメントの抽出液は細胞死を惹起するような毒性を示さなかったこと

からも試作セメントに強い細胞毒性を発現する材料が含まれていないと思われた。また、試作セメントではシアノアクリレートが水を触媒としてアニオン重合が開始するため²⁶⁾ミリポアフィルターに存在する水分によってセメント表面が瞬間的に硬化する。故に試作セメントに細胞毒性を発現する材料が含まれていたとしてもそれらが溶出しにくい、または成分が溶出して細胞毒性を発現するほどの濃度にならなかったと考えられる。

結 論

今回、試作シアノアクリレート系裏装用セメントの細胞毒性試験を行った結果、比較としたガラスイオノマー系裏装用セメントは練和直後で中程度の細胞毒性、5分後でも弱い細胞毒性を発現したのに対し、試作セメントは練和直後から無細胞毒性だった。

以上の事から試作シアノアクリレート系裏装用セメントは、細胞に対して障害性の非常に少ない材料と思われる。従って、臨床応用においても試作セメントの歯髄に対する障害は少ないと推定される。

文 献

- 越智守生, 広瀬由紀人, 肥後文章, 大河 勝, 澤田教彰, 日景 盛, 坂口邦彦: シアノアクリレート系F.Hセメント®の接着強度試験に関する研究 — 熱サイクルによる影響 —, 補綴誌, 33:1388-1397, 1989.
- 中川寛一, 古沢正仁, 森永一喜, 吉田 隆, 藤井利彦, 伊藤彰人, 浅井康宏: シアノアクリレート系合着材に関する研究 (第1報) 特にF.Hセメント®の窩底象牙質を介して歯髄に及ぼす影響に関する臨床病理学的研究, 日歯保誌, 31:1466-1474, 1989.
- 佐藤温重: 歯科材料の為害作用, 歯科ジャーナル, 29:711-724, 1989.
- 佐藤温重; 概説, 佐藤温重, 桜井靖久: 医・歯科用バイオマテリアルの安全評価法, 36-39, サイエンスフォーラム, 東京, 1987.
- Wennberg, A., Hasselgren, G. and Tronstad, L.: A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters, J. Biomed. Mater. Res., 13:109-120, 1979.
- Stanford, J.W.: Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials, Int. Dent. J., 30:162-163, 1980.
- 佐藤温重; 細胞毒性III ミリポアフィルター重層法, 佐藤温重, 桜井靖久: 医・歯科用バイオマテリアルの安全評価法, 86-88, サイエンスフォーラム, 東京, 1987.
- Pearse, A. G. E.; Theoretical and Applied, Pearse, A. G. E.: Histochemistry, 1342-1343, Churchill Livingstone, London, 1972.
- Barka, T. and Anderson, P.J.; Theory, Practice and bibliography, Barka, T. and Paul, J.: Histochemistry, 313, Harper and Row, New York, 1963.
- 日景 盛, 大野弘機, 坂口邦彦, 飯塚恵文: 金属表面改質材アドロイ—OH (Ga-Sn合金の細胞毒性第2報. 純金円板表面に応用したアドロイ—OHの細胞毒性, 補綴誌, 36:64-68, 1992.
- 吉村敬三, 小池 正, 日野和雄, 水野克巳, 太田和夫, 市川 進, 平田克治, 飯塚紀文, 吉川謙三, 古川俊隆, 稲生綱政: 外科的接着剤の研究 — 第1報 —, 最新医学, 15:2922-2927, 1960.
- 吉村敬三, 太田和夫, 小池 正, 古川俊隆, 日野和雄, 水野克巳, 高田真行, 稲生綱政: 外科的接着剤の研究 (第2報) — 血管外科領域における接着剤の応用 —, 日本臨床, 21:563-573, 1963.
- 水野克巳: 接着剤の外科的応用に関する研究 (皮膚及び消化管を中心として), 東京医学雑誌, 71(5):152-171, 1963.
- 太田和夫: 血管外科における接着剤の応用に関する研究, 東京医学雑誌, 71(5):172-198, 1963.
- Bhasker, S.N., Frisch, J., Cutright, D.E. and Margetis, P.: Effect of butyl cyanoacrylate on the healing of extraction wounds, Oral Surg., 24:604-616, 1967.
- Bhasker, S. N. and Frisch, J.: Use of cyanoacrylate adhesives in dentistry. J. Amer. dent. Ass., 77:831-837, 1968.
- Spangberg, L., Rodrigues, H. and Langeland, K.: Effect of isobutyl cyanoacrylate on Hela cells in vitro, Oral Surg., 37:438-440, 1974.

18. 森岡俊介：Isobutyl cyanoacrylate の露出歯髄保護効果に関する臨床病理学的研究，歯科学報，76: 197-249, 1976.
19. 森川公博：歯科領域への α -シアノアクリレート系瞬間接着剤の応用に関する生物化学的検討，歯科学報，90:201-224, 1990.
20. Cvek, M., Granath, L., Cleaton-Jones, P and Austin, J. : Hard tissue barrier formation in pulpotomized monkey teeth capped with cyanoacrylate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes, J. Dent. Res., 66:1166-1174, 1987.
21. 田村康一, 河原崎茂孝, 人見滋樹, 曾 英超, 玄 蒸, 筏 義人, 清水慶彦：外科用接着剤としての Ethoxyethylcyanoacrylate の応用 — 組織反応性について —, 人口臓器, 17:739-742, 1988.
22. 杉村俊之, 相 三衛：アルキル α -シアノアクリレートのPMMA添加による接着の影響について, 歯科学報, 67:402-406, 1967.
23. 赤間ゆかり, 野口八九重, 佐藤正孝, 大八木薫博：歯科用シアノアクリレートセメント“FH”の接着耐久性改善に関する研究, 歯材器, 10:452-457, 1991.
24. 伊藤彰人：支台歯形成に関する歯内療法学的検討特に高速切削による支台歯形成が歯髄に及ぼす影響およびその後処置（保護）に関する臨床病理学的研究, 日歯保誌, 17: 1-76, 1976.
25. 杉本 茂：British standardに準拠した細胞毒性試験, 試験報告添付資料：1- 8, 1990.
26. Pepper, D. C. : Kinetics and mechanisms of zwitterionic polymerization of alkyl cyanoacrylates, Polym. J., 12(6):629-637, 1980.