



Title	生活歯髄切断材料における抗酸化アミノ酸の応用
Author(s)	高木, 康多
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第15928号
Issue Date	2024-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k15928
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/91760">http://hdl.handle.net/2115/91760</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	Kota_Takagi.pdf



[Instructions for use](#)

# 博士論文

---

生活歯髄切断材料における抗酸化アミノ酸の応用

---

令和6年3月申請

北海道大学  
大学院歯学院口腔医学専攻

高木 康多

## 緒言

齲蝕の有病率は徐々に減少している。一方で、重症化率は上昇しており、10本以上の重度齲蝕を有し処置をしないまま放置されている口腔崩壊が社会的問題となっている<sup>1)</sup>。つまり、小児に対する齲蝕治療は充填処置のみで済むことは少なく、歯髄処置が必要となってくることが多い<sup>2)</sup>。乳歯および幼若永久歯において歯髄の炎症が歯冠部歯髄に限局している場合には、歯冠部歯髄を根管口部で切断する生活歯髄切断法を用いる。歯髄は象牙質と連動した生体反応を示し、歯髄を保存することがその歯の寿命に大きく影響すると言われており、できる限り歯髄を保存する治療が望まれる<sup>3)</sup>。そのため、露出した歯髄はできる限り保存し、歯髄が自ら生成する硬組織であるデンティンブリッジを形成することが望ましいとされている<sup>4)</sup>。

近年は水酸化カルシウム製剤や Mineral Trioxide Aggregate(MTA)が生活歯髄切断の際の覆髄材として使用されることが多くなっている。MTAの硬化体は水中でカルシウムイオンと水酸化物イオンを持続的に溶出する<sup>5)</sup>。そのため、水酸化カルシウム製剤とMTAはともに高いpHを示し、切断面の表面に壊死層を形成する<sup>6)</sup>。MTAは水酸化カルシウム徐放性材料としての一面があり、覆髄後の治癒過程は水酸化カルシウム製剤と組織学的に類似していることが報告されており<sup>7)</sup>、壊死層の下に炎症性細胞が浸潤することで肉芽組織を形成し、象牙芽細胞様細胞が配列し、デンティンブリッジを形成する。予後についてはMTAの方が優れているという報告はあるが、必ずしも安定したものではない<sup>8,9)</sup>。また、水酸化カルシウム製剤とMTAは強アルカリを示すため、歯髄刺激が強く、炎症を惹起する。そのため、強アルカリによる刺激が臨床において問題となる。

N-アセチルシステイン(NAC)は抗酸化アミノ酸の一種で、水溶液は酸性を示し、グルタチオンの前駆体として知られている。抗菌作用を有し<sup>10,11)</sup>、炎症性サイトカインであるTNF- $\alpha$ の発現を抑制することで抗炎症作用を示すことが報告されている<sup>12)</sup>。抗菌作用や抗炎症作用は生活歯髄切断材料として必要な性質であり、これらの報告からNACは歯髄の細菌感染や炎症に有効な可能性があるが、NACを生活歯髄切断材料に応用した研究はない。

本研究では、NACの生活歯髄切断時における歯髄への効果を検証するために、ラット上顎第一臼歯に対して生活歯髄切断を行い、MTAならびにMTAにNACを添加した材料を覆髄材として使用し、また、ヒトの歯髄幹細胞を用いてNACの効果を検討した。

## 材料と方法

### 1. 実験動物

実験には生後4週齢のSD系雄性ラット(株式会社三協ラボサービス、東京)を用いた。なお、本研究に関わる動物実験は「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」(承認番号:22-0064)に基づき行った。

### 2. 覆髄材

ケイ酸カルシウム系材料のMTAセメント(ミエール<sup>®</sup>、YAMAKIN株式会社、高知)を

粉 0.12g に対して精製水 0.03g で練和し、覆髄材として使用した。また、MTA セメントに NAC (SIGMA-ALDRICH、MO、USA) を 50mg 添加したものを覆髄材として使用した。

### 3. 生活歯髄切断処置

ラットにイソフルラン (ファイザー株式会社、東京) を吸入させ入眠させた後、塩酸メデトミジン 0.15mg/kg (ドルベネ®共立製薬株式会社、東京)、ミダゾラム 2mg/kg (ドルミカム®丸石製薬株式会社、大阪)、ブトルファノール 2.5mg/kg (ベトルファール®MeijiSeika ファルマ株式会社、東京) の三種混合麻酔を腹腔内に投与した。全身麻酔を施したラットの胴体をネットで固定し、治療台の上に置いて処置を行った。両側上顎第一臼歯を 70%エタノールで消毒後、#1/2 の滅菌スチールラウンドバーで咬合面から歯髄腔に達するまで直径約 1.0mm の露髄面を形成した。マイクロ用スプーンエキスカベーターを用いて歯髄を除去し、生活歯髄切断を行った。歯髄切断後、滅菌生理食塩水で洗浄し、滅菌ペーパーポイント (#40) で止血を行った。止血確認後、MTA セメント (MTA) または MTA セメントに NAC を添加した材料 (MTA-NAC) で覆髄した。覆髄材の上部は 4-META/MMA-TBB レジン (スーパーボンド C&B®、サンメディカル株式会社、滋賀) で被覆した。また、覆髄材を使用せずに直接 4-META/MMA-TBB レジンで覆ったものをコントロールとした。対合歯は削合し、咬合しないように調整した。

### 4. 標本作製

生活歯髄切断後、3 または 7 日間飼育し、イソフルラン吸引により安楽死させた。その後、ラットの上顎骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (和光純薬工業株式会社、大阪) を用いて 24 時間浸漬固定を行った。10%EDTA 溶液で試料を 4 週間脱灰し、通法に従いパラフィン包埋し、矢状断面で厚さ 5 $\mu$ m の薄切切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) を行い、光学顕微鏡にて組織学的に観察した。

### 5. 免疫組織染色

免疫染色には 5 $\mu$ m に薄切したパラフィン切片を用いた。脱パラフィン後、3% $H_2O_2$  に 5 分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを不活化した。5%Bovine Serum Albumin solution (SIGMA-ALDRICH) にてブロッキング処理を室温で 10 分間行った後、一次抗体として抗 Dentin Sialophosphoprotein(DSPP)抗体 (Anti-DSPP、Rabbit-Poly、BS 71212、Funakoshi、東京)、抗 Osteopontin(Anti-Osteopontin、Rabbit-Poly、ab8448、abcam、Milton、UK) を使用し、室温にて 2 時間反応させた。次に二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (ヒストファイン Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG、株式会社ニチレイバイオサイエンス、東京) を用い、室温にて 1 時間反応させた。DAB 基質ユニット (タカラバイオ株式会社、滋賀) により 10 秒間発色後、マイヤーヘマトキシリンにて核染色を行った。通法に従い、脱水、封入した切片を光学顕微鏡にて観察した。

### 6. 細胞培養

ヒト歯髄幹細胞 (Lonza、MD、USA) を使用した。細胞は Dental Pulp Stem Cell Growth Media (DPSC-GM:Lonza) を用いて培養した。また、MTA セメントを内径 6mm、高さ 6mm



のテフロンモールドに填塞し、円柱試料を作製した。DPSC-GM 3mL に対して 1 試料を浸漬し、24 時間 37°C で保管したものを MTA 浸漬液とした。MTA 浸漬液に NAC を 250mM となるように溶解したものを作製し、MTA 浸漬液 (NAC250mM) とした。

## 7. 生細胞数測定

培養したヒト歯髄幹細胞を 96well プレートに、1well につき  $5.0 \times 10^4$  個の細胞密度になるように播種した。24 時間の前培養の後、培養液を DPSC-GM ならびに、MTA 浸漬液、MTA 浸漬液 (NAC250mM) に交換し、37°C、5% 気相下にて培養した。培養後、12、24、36、48 時間後に cell counting kit-8 溶液を添加し、マイクロプレートリーダーで 450nm の吸光度を測定し、細胞生存率を求めた。

## 結果

### 1. 組織学的検索

#### 1) 生活歯髄切断後 3 日目の歯髄の変化

H-E 染色の結果、コントロールでは歯髄切断面直下ならびに根管上部全体に高度の炎症性細胞の浸潤が認められた(図 1 a)。MTA では歯髄切断面直下に限局した中等度の炎症性細胞の浸潤が認められた(図 1 b)。MTA-NAC では歯髄切断面直下にごく軽度の炎症性細胞の浸潤が認められた(図 1 c)。

DSPP 染色の結果、コントロールと MTA では DSPP 陽性部位は認められなかった(図 1 d、e、g)。一方で MTA-NAC では歯髄切断面直下に DSPP 陽性部位が認められた(図 1 f、h)。

Osteopontin 染色の結果、コントロールでは Osteopontin 陽性部位は認められなかった(図 1 i)。また、MTA では歯髄切断面直下に Osteopontin 陽性部位が認められ(図 1 j)、MTA-NAC では歯髄切断面直下ならびに根管上部に Osteopontin 陽性部位が認められた(図 1 k)。

#### 2) 生活歯髄切断後 7 日目の歯髄の変化

H-E 染色の結果、コントロールでは歯髄切断面直下ならびに根管上部に中等度の炎症性細胞の浸潤が認められた(図 2 a)。MTA では、歯髄切断面直下に限局した軽度の炎症性細胞の浸潤が認められた(図 2 b)。MTA-NAC では歯髄切断面直下にわずかに炎症性細胞の浸潤が認められた。また、デンティンブリッジの形成が認められた(図 2 c)。

DSPP 染色の結果、コントロールでは DSPP 陽性部位は全く認められなかった(図 2 d)。MTA では歯髄切断面直下ならびに根管壁に沿った部分に DSPP 陽性部位を認めた(図 2 e、g)。MTA-NAC は形成されたデンティンブリッジの広範囲で DSPP 陽性部位を認めた(図 2 f、h)。

Osteopontin 染色の結果、コントロールでは歯髄切断面直下に Osteopontin 陽性部位が認められた(図 2 i)。MTA では歯髄切断面直下ならびに根管上部に Osteopontin 陽性部位が認められた(図 2 j)。MTA-NAC では歯髄切断面直下から根管上部にかけて Osteopontin 陽性部位が認められた(図 2 k)。

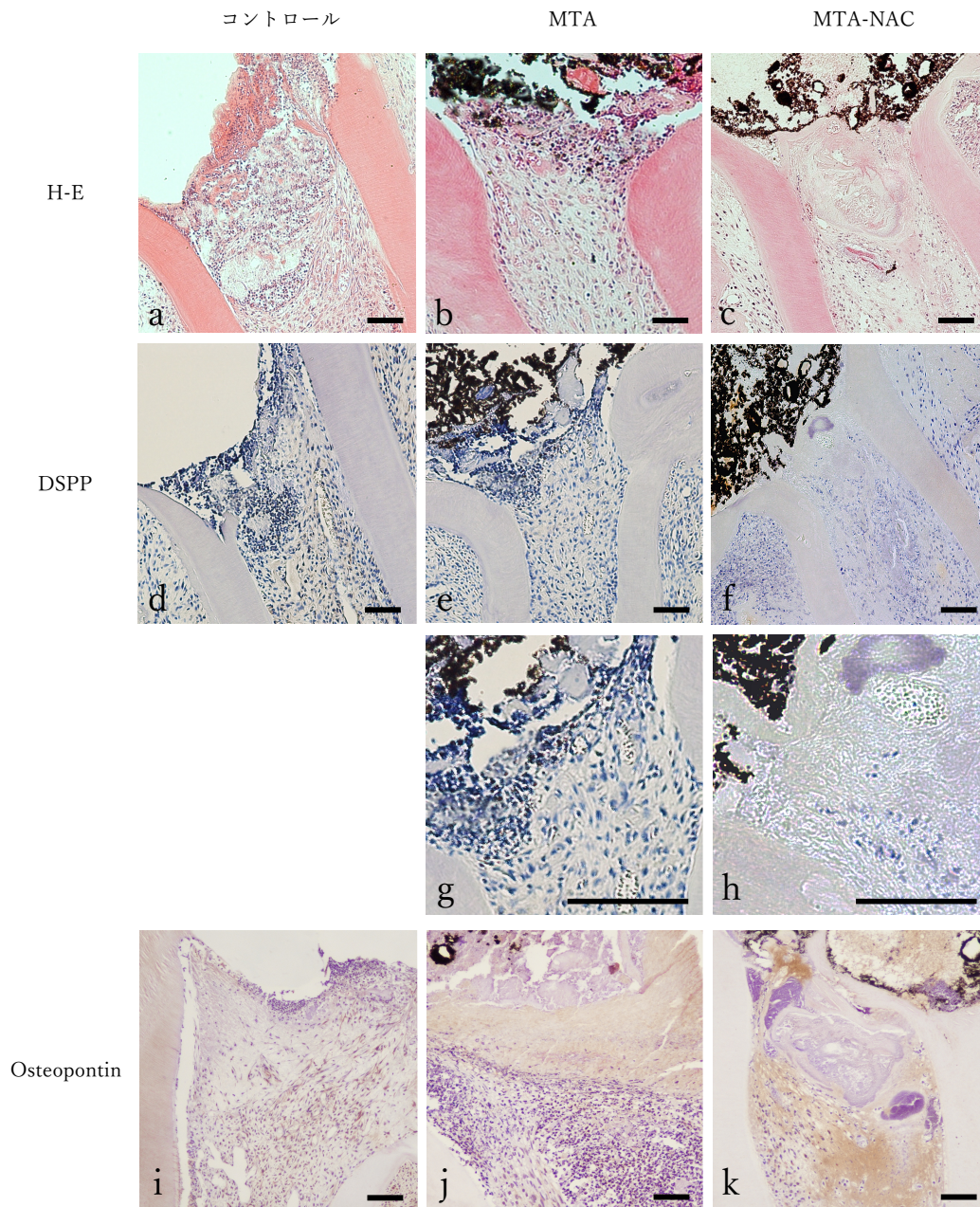


図1 生活歯髄切断後3日後の歯髄の組織学的評価

a-c: H-E染色 (a) コントロールでは歯髄切断面直下、根管上部全体に高度の炎症性細胞の浸潤を認めた。(b) MTAでは歯髄切断面直下に限局して中等度の炎症性細胞の浸潤を認めた。(c) MTA-NACではごく軽度の炎症性細胞の浸潤を認めた。d-h: DSPP免疫染色 (d)コントロールならびに(e, g) MTA においてはDSPP陽性反応は認められなかった。しかしながら、(f, h) MTA-NACでは歯髄切断面直下にDSPP陽性反応を認めた。i-k: Osteopontin免疫染色 (i)コントロールではOsteopontin陽性反応を認めなかった。(j)MTAでは歯髄切断面直下に、(k) MTA-NACでは歯髄切断面直下及び根管上部に広範囲のOsteopontin陽性反応を認めた。g, hはe, fそれぞれの強拡大、スケールバー: a-k=100μm



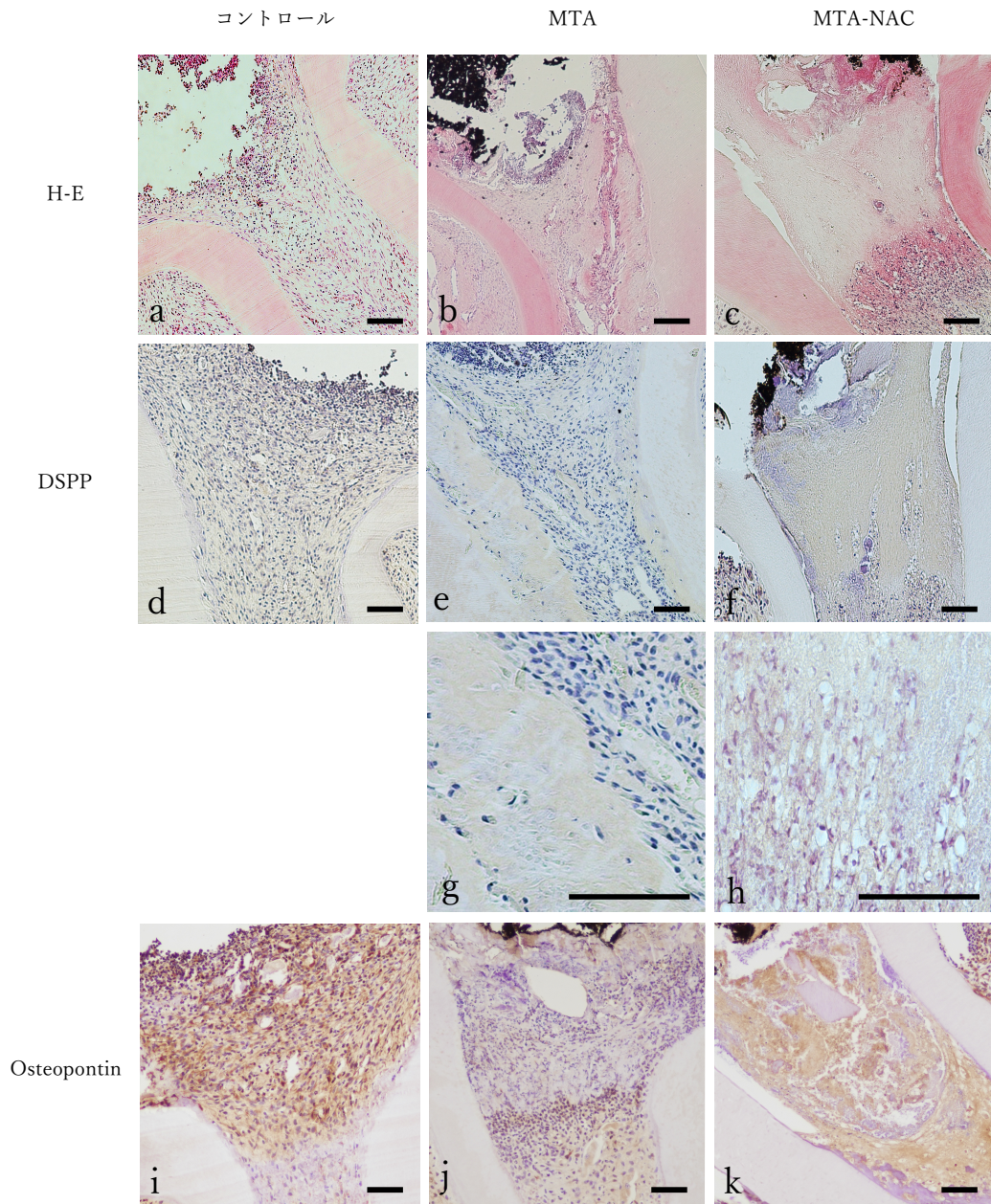


図2 生活歯髄切断後7日後の歯髄の組織学的評価  
a-c: HE染色 (a)コントロールでは歯髄切断面直下ならびに根管上部に中等度の炎症性細胞の浸潤を認めた。(b) MTAでは歯髄切断面直下に限局した軽度の炎症性細胞の浸潤を認めた。(c) MTA-NACでは歯髄切断面直下にわずかに炎症性細胞の浸潤を認めた。また、デンティンブリッジの形成を認めた。  
d-h: DSPP免疫染色 (d)コントロールではDSPP陽性反応は認められなかった。しかしながら、(e, g) MTAでは歯髄切断面直下ならびに根管壁に沿った部分にDSPP陽性反応を認め、(f, h) MTA-NACでは形成されたデンティンブリッジの広範囲でDSPP陽性反応を認めた。  
i-k: Osteopontin免疫染色 (i) コントロールでは歯髄切断面直下にOsteopontin陽性反応を認めた。(j) MTAでは歯髄切断面直下ならびに根管上部にOsteopontin陽性反応を認めた。(k) MTA-NACでは歯髄切断面直下から根管上部にかけてOsteopontin陽性反応を認めた。g, hはe, fそれぞれの強拡大、スケールバー: a-k=100µm

## 2. MTA による細胞毒性と NAC の効果

細胞増殖に対する MTA 成分の細胞毒性と、それに対する NAC の効果を検討した。細胞生存を確認するためにヒト歯髄幹細胞を各培養液で培養し、cell counting kit-8 で細胞生存率を求めた (図 3)。MTA 浸漬液ならびに MTA 浸漬液 (NAC250mM) で細胞生存率は低下したが、MTA 浸漬液 (NAC250mM) では、48 時間後には細胞生存率は回復し、コントロールと同様になった。

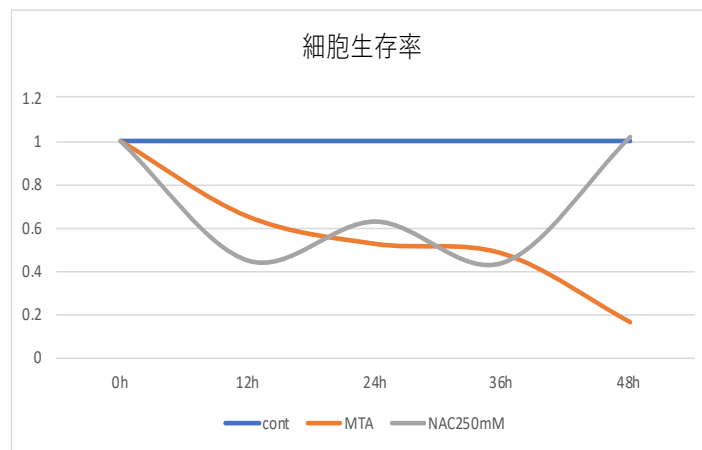


図 3 細胞生存率  
コントロールの細胞数を 1 とした場合

## 考察

生活歯髄切断は主に乳歯や幼若永久歯に対して用いられる。特に幼若永久歯は歯根が未完成であることに加え、歯質の厚みが薄く、治療は暫間的処置に留めるのが基本である。しかしながら、深部齲蝕<sup>13)</sup>や外傷性の歯冠破折<sup>14)</sup>など、どうしても歯髄処置が必要となる場合がある。そのような症例に対して、歯を長持ちさせるためには歯髄が重要であるという観点から、vital pulp therapy が注目されている。Vital pulp therapy は間接的、直接的に歯髄を薬剤で保護し、歯髄を保存する治療法であり、生活歯髄切断はその一つである。生活歯髄切断は vital pulp therapy の中でも歯質を大きく削合し、歯髄を切断することから、歯髄炎を発症する可能性が最も高く、予後が不安定になりやすい。生活歯髄切断後の予後を向上させるためには炎症を抑制すること、デンティンブリッジを早期に確実に形成することが重要となる<sup>15)</sup>。

現在、生活歯髄切断に多く使用されている材料としては、水酸化カルシウム製剤と MTA セメントがある。水酸化カルシウム製剤は生活歯髄切断後、切断面にまず壊死層を形成する。壊死層直下に炎症性細胞が浸潤し、肉芽組織を形成する。その後、象牙芽細胞様細胞の配列が認められ、デンティンブリッジが形成される。これは MTA セメント硬化体は水中でカルシウムイオンと水酸化物イオンを持続的に溶出し、水酸化カルシウム徐放性材料とし

ての一面があるためとされている。MTA セメントは水酸化カルシウム製剤と比較して辺縁封鎖性が高く、pH がやや低いため、水酸化カルシウム製剤と比較して予後が良いとされている<sup>16,17)</sup>が必ずしも安定したものではない。MTA 硬化体を水中に浸漬した場合の pH は 12 であり、強アルカリを示す。そのため、セメントと接する部分は壊死層の形成や異栄養性石灰化を認める。より良い予後を得るためには強アルカリによる刺激を軽減し、歯髄刺激の少ない材料が求められる。一方で、強アルカリにより石灰化を誘導しているため、強アルカリによる刺激を軽減しながらも石灰化誘導能を低下させないことが必要となる。

本研究では抗酸化アミノ酸である NAC を MTA セメントに添加することにより pH を低下させ、強アルカリの刺激を低下させた。MTA セメント粉末を培養液中に溶解した場合、30 分後の pH は 12.22 となるが、NAC が 250mM となるように加えることにより、pH は 10.60 となった (data not shown)。生活歯髄切断後 3 日目ならびに 7 日目の H-E 染色の結果では、MTA-NAC ではコントロールや MTA と比較して炎症性細胞の浸潤の程度が軽減していたが、これは強アルカリによる刺激が軽減した影響によるものと考えられる。さらに、細胞毒性試験として Cell counting kit-8 による細胞生存率を確認した結果では、MTA 浸漬液はコントロールと比較して細胞生存率が徐々に低下したが、MTA 浸漬液 (NAC250mM) では 12 時間から 36 時間では細胞生存率が低下したものの、48 時間後にはコントロールと同じレベルまで回復した。また、NAC においては抗炎症作用を有することが報告されており、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  の発現を抑制すること<sup>12)</sup>や、レジジン成分により誘発された炎症性物質プロスタグランジン E2 を軽減することが報告されている<sup>18)</sup>。今回の結果は NAC による抗炎症作用が発揮されている可能性も考えられる。

DSPP は象牙質に含まれる非コラーゲンタンパク質の中で最も多いタンパク質であり、象牙芽細胞から合成分泌される。また、DSPP 遺伝子は歯髄由来幹細胞から象牙芽細胞への分化マーカーとして知られている<sup>19,20)</sup>。本研究において、MTA-NAC は 3 日目で DSPP 陽性を認め始め、7 日目では広範囲にわたる DSPP 陽性とともデンティンブリッジの形成を認めた。MTA においては 7 日目に DSPP 陽性が認められ、その範囲は歯髄切断面直下のみでなく、根管壁周囲に及んだ。DSPP からプロセッシングされる DSP は象牙質の初期の石灰化に関与するとされ、同じく DSPP からプロセッシングされる DPP は象牙質の成熟に関与するとされている<sup>21)</sup>。NAC は DSPP を誘導することにより、象牙質の石灰化ならびに成熟に寄与していることが示唆された。

Osteopontin は非コラーゲン性のタンパク質であり、象牙質と修復象牙質の境界に沈着することが報告されており<sup>22)</sup>、象牙質中に含まれる有機物の主成分である I 型コラーゲンの分泌に関与することが明らかになっている<sup>23)</sup>。本研究においては、MTA-NAC で Osteopontin 陽性部位が広い範囲で認められ、NAC が Osteopontin を誘導することにより、I 型コラーゲンの形成を誘導し、石灰化を促進している可能性を示唆した。

生活歯髄切断後の予後に影響する要素としては、歯髄への細菌感染がある<sup>24)</sup>。本研究で用いたモデルは非感染モデルであり、細菌感染を想定できていない。武藤ら<sup>25)</sup>がマウスを

用いて行った研究によると、感染歯髄組織に対して MTA を用いて直接覆髄を行ったところ、水酸化カルシウム製剤と比較して良好な予後が得られたと報告している。NAC は抗菌作用を有することが報告されており<sup>10)</sup>、細菌感染を伴った場合においても MTA よりもさらに良好な予後が得られる可能性が高いと考えられる。

デンティンブリッジの形成は生活歯髄切断後の良好な予後を得るために必要だが、水酸化カルシウム製剤によりデンティンブリッジが形成されるのに必要な期間は、早いもので6週間、遅いものでは6か月間という報告がある<sup>26,27)</sup>。本研究では MTA-NAC で7日間において非常に厚いデンティンブリッジが確認された。このことは生活歯髄切断材料としては好ましい結果であり、根部歯髄の保存のために必要なことである。しかし、長期的な予後の評価については今回検討しておらず、今後さらに長期的な予後を検討していく必要がある。

本研究では、現在使用されている生活歯髄切断材料の中でも予後が良好とされている MTA に抗酸化アミノ酸の NAC を添加して、ラットの生活歯髄切断を行った。MTA は硬化膨張を伴うため、比較的高い封鎖性が得られ、さらにカルシウムイオンや水酸化物イオンを放出することにより硬組織誘導能や抗菌作用を有する。一方で、歯髄と接する面において壊死層の形成や強い炎症性細胞浸潤を引き起こす。NAC を添加することにより、歯髄の炎症は軽減し、非常に強い硬組織誘導能を示した。NAC の応用により、MTA がより生活歯髄切断材料として望ましい性質を有することとなった。強力な石灰化誘導能は生活歯髄切断材料としてのみではなく、現在の世界的な流れである段階的齲蝕除去や選択的（不完全）象牙質除去に応用できるかもしれない。そのためには間接的覆髄材としての研究や、象牙細管の透過性に関する検討が必要であり、今後の課題となる。また、本研究では物性評価、抗菌作用について検討していないが、それら进行评估、改善することにより、臨床応用に近づけていくことができると考えている。NAC を応用することにより、臨床的に優れた覆髄材が開発され、歯髄が極力保存できるようになり、齲蝕に罹患した歯の予後だけでなく、外傷後の歯の予後も良好となることを期待したい。

## 結論

NAC を MTA に添加することにより、生活歯髄切断後の歯髄炎を軽減し、デンティンブリッジの形成を促進することが明らかになった。

## 文献

- 1) 香西克之: 【子どもの貧困と健康問題】 デンタルネグレクトにより生じる子どもの口腔崩壊と健康格差. 地域保健, 49:18-22, 2018.
- 2) 秋友達哉, 浅尾友里愛, 岩本優子, 中野将志, 渡辺聖子, 達川伸行, 光畑智恵子, 香西克之: 未就学児の齲蝕重症度に関する研究. 小児歯誌, 58:1-8, 2020.
- 3) Chen Y, Chen X, Zhang Y, Zhou F, Deng J, Zou J, Wang Y. Materials for pulpotomy in immature permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. BMC Oral Health. 19:227, 2019.
- 4) Pedano MS, Li X, Yoshihara K, Van Landuyt K, Van Meerbeek B. Cytotoxicity and bioactivity of dental pulp-capping agents towards human tooth-pulp cells: a systematic review of in-vitro studies and meta-analysis of randomized and controlled clinical trials. Materials(Basel). 13: 2670, 2020.
- 5) Fridland M, Rossado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with deifferent water to powder rations. J Endod. 29:814-817, 2003.
- 6) Okabe T, Sakamoto M, Takeuchi H, Matsushima K. Effects of pH on mineralization ability of human dental pulp cells. J Endod. 32:198-201, 2006.
- 7) Faraco Jr IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. Dent Traumatol. 17:163-166, 2001.
- 8) Farsi N, Alamoudi N, Balto K, Al Mushayt A. Clinical assessment of mineral trioxide aggregate (MTA) as direct pulp capping in young permanent teeth. J Clin Pediatr Dent. 31:72-76, 2006.
- 9) Miles JP, Gluskin AH, Chambers D, Peters OA. Pulp capping with mineral trioxide aggregate (MTA): a retrospective analysis of carious pulp exposures treated by undergraduate dental students. Oper Dent. 35:20-28, 2010.
- 10) Moon JH, Jang EY, Shim KS, Lee JY. In vitro effects of N-acetyl cysteine alone and in combination with antibiotics on Prevotella intermedia. J Microbiol. 53:321-329, 2015.

- 11) Amaral EP, Conceição EL, Costa DL, Rocha MS, Marinho JM, Cordeiro-Santos M, D'Império-Lima MR, Barbosa T, Sher A, Andrade BB. N-acetyl-cysteine exhibits potent anti-mycobacterial activity in addition to its known anti-oxidative functions. *BMC Microbiol.* 16:251, 2016.
- 12) Karapinar SP, Ulum YZA, Ozcelik B, Buzoglu HD, Ceyhan D, Peynircioglu BB, Aksoy Y. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol.* 68:48-54, 2016.
- 13) Smaïl-Faugeron V, Glennly AM, Courson F, Durieux P, Muller-Bolla M, Chabouis HF. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 5:CD003220, 2018.
- 14) Donnelly A, Foschi F, McCabe P, Duncan HF. Pulpotomy for treatment of complicated crown fractures in permanent teeth: A systematic review. *Int Endod J.* 55: 290-311, 2022.
- 15) 仲井雪絵, 進賀知加子, 山中香織, 瀧村美穂枝, 下野勉: 露髄をともなう外傷性歯冠破折に応用した部分的生歯髄切断法の 1 例—5 年間の経過観察—. *小児歯誌* 47: 125-130, 2009.
- 16) Torabinejad M, Parirokh M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II : leakage and biocompatibility investigations. *J Endod.* 36:190-202,2010.
- 17) Dammaschke T, Gerth HUV, Züchner H, Schäfer E. Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements, *Dent Mater.* 21:731-738, 2005.
- 18) Nakamura K, Minamikawa H, Takahashi S, Yoshimura Y, Yawaka Y. N-acetylcysteine attenuates PGE<sub>2</sub> and ROS production stimulated by 4-META/MMA-based resin in murine osteoblastic cells. *Dent Mater J.* 40:808-812, 2021.
- 19) Tziafas, D, Kodonas K. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papillaprogenitor cells. *J Endod.* 36:781-789, 2010.
- 20) Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental



pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla. *Arch Oral Biol.* 56:709-721, 2011.

21) Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Muller R, Goldberg M, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 28:221-229, 2009.

22) Saito K, Nakatomi M, Ida H, Kenmotsu S, Ohshima H. The expression of GM-CSF and osteopontin in immunocompetent cells precedes the odontoblast differentiation following allogenic tooth transplantation in mice. *J Histochem Cytochem.* 59:518-529, 2011.

23) Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H. Osteopontin is essential for Type I Collagen secretion in reparative dentin. *J Dent Res.* 95:1034-1041, 2016.

24) Fong CD and Davis MJ. Partial pulpotomy for immature permanent teeth, its present and future. *Pediatr Dent.* 24:29-32, 2002.

25) 武藤徳子: 感染歯髄組織に対する MTA 直接覆髄後のデンティンブリッジ形成機序の解明. *神奈川歯学* 54:51-53, 2019.

26) Ram D, Holan G. Partial pulpotomy in a traumatized primary incisor with pulp exposure : case report. *Pediatr Dent,* 16:44-48, 1994.

27) Mejare I, Cvek M. Partial pulpotomy in young permanent teeth with deep carious lesions. *Endod Dent Traumatol.* 9:238-242, 1993.