



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	炭酸カルシウムが4-META/MMA-TBBレジン上への骨形成に与える影響
Author(s)	逸見, 優; 菅谷, 勉; 中塚, 愛 他
Citation	北海道歯学雑誌, 32(2), 114-123
Issue Date	2012-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/48706
Type	journal article
File Information	02-henmi_gencho.pdf



原 著

炭酸カルシウムが4-META/MMA-TBBレジン上への 骨形成に与える影響

逸見 優 菅谷 勉 中塚 愛 川浪 雅光

抄 録 : 4-META/MMA-TBBレジンには優れた封鎖性と生体親和性により、歯根破折の接着や穿孔部の封鎖などに用いられているが、レジン上に硬組織を形成させることはできていない。そこで表面に硬組織形成が可能なレジンを開発するために、4-META/MMA-TBBレジンに炭酸カルシウム顆粒を添加して骨髓腔内に移植し、レジン表面への骨の形成に及ぼす効果を評価した。

4-META/MMA-TBBレジンのポリマー粉末に、0, 30, 60%の重量比で粒径5~10 μ mの炭酸カルシウム顆粒を混合し、直径1mmの円柱状に硬化後、長さ5mmに破断して移植試料とした。10週齢ウィスター雄性ラットの左右大腿骨に、直径1mmの大きさで骨髓腔に穿孔し、試料底部が骨髓腔内に達するように試料を移植した。術後2, 8週で大腿骨を採取、脱灰薄切標本を作製してH-E染色し、試料底部の骨形成状態を光学顕微鏡で観察、骨形成率、骨接触率等を計測した。さらに移植8週後の標本の一部は、試料底部と新生骨との界面を走査型電子顕微鏡で観察した。

2週後、すべての群で試料全体を取り囲むように新生骨が形成されていた。0%群と30%群では試料と新生骨の間に軟組織が厚く介在していたのに対し、60%群では1~数層の細胞が見られたのみであった。8週後、3群とも試料と骨は近接し、0%群では直接接している部分はなかったが、30%群と60%群では試料と骨が直接接している部位がみられた。2週後の試料と骨の接触率は、0%群が0%, 30%群が0%, 60%群が $0.6 \pm 1.5\%$ で3群間に有意差は認められなかった。8週後はそれぞれ0%, $6.6 \pm 6.5\%$, $18.3 \pm 8.9\%$ で60%群は0%群に対して有意に高い値を示した。SEM観察では、術後8週の60%群で、レジンと新生骨との間に間隙が認められない部分も観察された。

60%群では光学顕微鏡観察で有意に骨接触率が高かったこと、およびSEM観察でレジンと骨とが間隙なく結合している部分が認められたことから、4-META/MMA-TBBレジンに炭酸カルシウムを添加すると、レジンと骨との直接接触が高まり、骨との結合を促進させる可能性が示唆された。

キーワード : 炭酸カルシウム・4-META/MMA-TBBレジン・骨形成

緒 言

4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride/methyl methacrylate tri-n-butylborane (4-META/MMA-TBB) レジンは歯質に対する優れた接着性を有し^{1,2)}、また生体親和性もきわめて高いこと^{3,4)}が知られている。このことから、われわれは4-META/MMA-TBBレジンを用いた歯根端切除術や再植術時のroot-end sealing^{5~7)}、垂直歯根破折の接着治療^{8~10)}、髓床底穿孔部の封鎖^{11, 12)}に応用し、良好な成績を報告してきた。これらの研究では、術後に炎症が生じることはなく良好な歯周組織の改善が得られたが、硬化したレジン上にセメント質の形成は認められず、歯頸部に大きな穿孔や幅の広い破折間隙がある場合には、

上皮が根尖側移動して歯周ポケットを形成しやすい¹³⁾。

一方、4-META/MMA-TBBレジンを用いたラット頭蓋骨に接着させた研究¹⁴⁾では、レジンが接着した骨でも正常なリモデリングが行われ、硬化したレジン表面にも周囲から新生骨が増生した。光学顕微鏡観察では、この骨とレジンとの間には結合組織の介在が認められず両者が直接接していた。このことから、4-META/MMA-TBBレジンには骨に対する親和性も高いことが明らかとなり、硬化したレジン表面にも硬組織が形成される可能性が示された。しかし硬化したレジン上への新生骨の増生速度はきわめて遅く、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察ではレジンと骨との間には微細な間隙がみられ結合してはいなかった。そこで、4-META/MMA-TBBレジンの優れた接着性や生体親和

性を生かしながら、表面にセメント質を誘導して強い結合をさせるためには、硬組織形成を促進し、直接硬組織と結合する材料と、4-META/MMA-TBBレジンとを複合化させることが有効ではないかと考えた。

このような材料として、我々は炭酸カルシウムに着目した。炭酸カルシウムは良好な骨伝導性を有すると報告されており¹⁵⁻¹⁷⁾、また、炭酸カルシウムを大腿骨に埋入した実験では新生骨の石灰化を促進すると報告されている¹⁸⁾。また、歯髄への覆髄剤として応用した実験では、象牙質様硬組織形成が促進されたと報告されている^{19,20)}。このように、炭酸カルシウムは生体に対し為害性がなく、硬組織形成を促進し、さらに新生骨と直接結合する²¹⁾。また、歯磨剤、化粧品原料、食品添加物としても広く使用されており、入手しやすく安価であることから臨床応用しやすい材料と考えられた。

そこで本研究では、炭酸カルシウムの濃度を変えて4-META/MMA-TBBレジンに複合化させ、大腿骨骨髓腔に移植して骨増生への影響や新生骨との結合状態などを評価した。

材 料 と 方 法

1. 試料作製方法

4-META/MMA-TBBレジン（スーパーボンドC&B[®]、クリア、サンメディカル）のポリマーに、粒子サイズ5～10 μ mの炭酸カルシウム（和光純薬）を0、30、60%の重量比で混和した。炭酸カルシウムを混和したポリマー粉末3/4カップ、モノマー液4滴、キャタリスト1滴の割合で混和し、内径1mmのポリプロピレンチューブに填入、24時間硬化させた後にチューブから取り出し、長さ5mmに破断して円柱形試料を作製した。

2. 試料のSEM観察

各炭酸カルシウム濃度の円柱形試料をさらに長さ2mmに破断し、乾燥、白金蒸着した。走査型電子顕微鏡（SEM：S-4000、日立ハイテクフィールドイニング）を使用して10kVの加速電圧で、試料破断面を観察した。

3. 埋植方法

実験動物には、10週齢のWistar系雄性ラット13匹を使用した。ジエチルエーテルおよびペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル注射液[®]、共立製薬）を用いて全身麻酔を施した後、左右の大腿部皮膚を切開、大腿骨中央部の骨膜を剥離して、直径1mmのフィッシャーバー（メルファースチールバー[®]、デンツプライ三金）を用い、生理食塩水の注水下で大腿骨骨髓腔に2か所穿孔した（図1）。各試料を破断面（試料底部）が骨髓腔内に位置するように移植し、試料を骨表面にスーパーボンドC&B[®]で固定、切開部を縫合した（図1）。炭酸カルシウムを混合した濃度により、0%群（n=16）、30%群（n=14）16%群（n=16）に分けた。

動物実験は、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受け、同指針に従って行った（承認番号：09-0122）。

4. 光学顕微鏡観察および計測

観察期間は2、8週とし、観察期間終了後、ジエチルエーテル吸引にて安楽死させ、大腿骨を採取、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて浸漬固定を行った。アセトンでスーパーボンドC&B[®]を溶解させた後、5%ギ酸で脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋して、厚さ5 μ mの薄切標本を作製した。その後ヘマトキシリン・エオジン重染色し、光学顕微鏡観察および組織学的計測を行った。

計測は標本の中央部の切片を選択し、画像解析ソフト（Image J 1. 41, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）を用いて、試料破断面（底部）を対象に行った。計測項目は、試料破断面の長さ（L）（ μ m）、新生骨基質の長さ（BL）（ μ m）、試料と新生骨基質の間の面積（ST）（ μ m²）、試料と新生骨基質が直接接している長さ（C）（ μ m）とし、骨基質形成率（BL/L $\times$ 100）（%）、試料と骨基質との距離（ST/BL）（ μ m）、試料と骨基質の接触率（C/L $\times$ 100）（%）を求めた（図2）。計測結果は、SPSS10.0J[®]（SPSS）を用い、二次元配置分散分析およびScheffeの多重比較検討を行った。危険率は0.05とした。

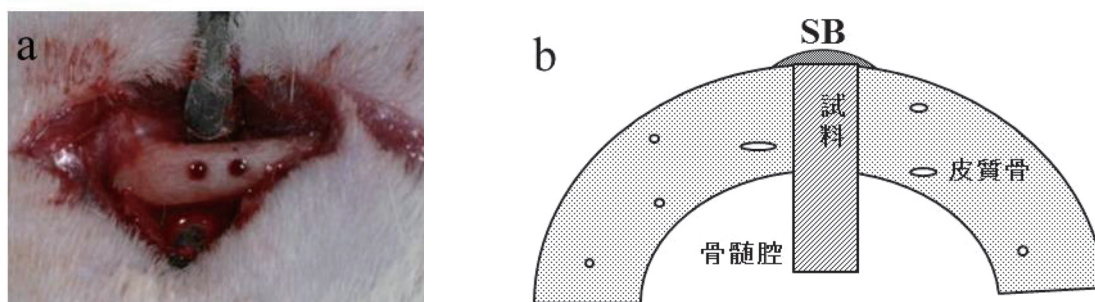


図1.

a：骨髓腔穿孔時 b：大腿骨骨髓腔への試料移植方法

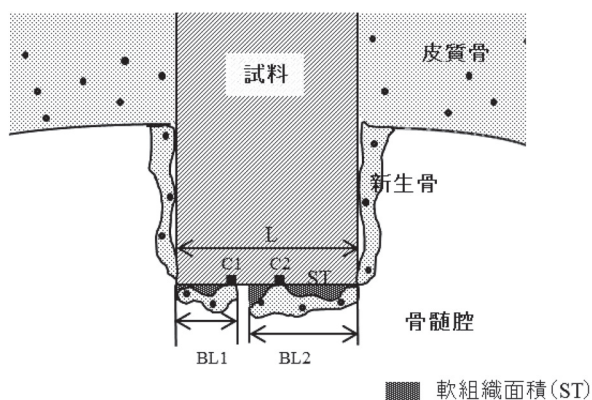


図2.

組織計測方法

L: 試料破断面の長さ

BL1+BL2: 新生骨基質の長さ

ST: 試料と新生骨基質の間の面積

C1+C2: 試料と新生骨基質が直接接している長さ

統計分析項目

骨基質形成率 = $(BL1+BL2) / L \times 100 (\%)$ 試料と骨基質との距離 = $ST / (BL1+BL2) \times 100 (\%)$ 試料と骨基質の接触率 = $(C1+C2) / L \times 100 (\%)$

5. 走査型電子顕微鏡観察

60%群の一部は、8週の観察期間終了後、大腿骨を採取して10%中性緩衝ホルマリン溶液にて浸漬固定を行った。その後低速回転ダイヤモンドカッターを用いて、試料のほぼ中央部で切断、断面をアルミナバフ研磨し、脱水、乾燥して白金蒸着した。走査型電子顕微鏡 (SEM: S-4000, 日立ハイテクフィールドイング) を使用、10kVの加速電圧で試料底部と新生骨との界面を観察した。

結 果

1. 試料破断面のSEM観察

0%試料の破断面は均一な構造であった。炭酸カルシウ

ムを混和した試料では、炭酸カルシウムが約5 μ mの立方体として観察されたが、一部には凝集している部分もあった。炭酸カルシウムとレジンとの間には、わずかに間隙が認められるものが多かった。30%試料と比較して60%試料では、破断面に露出している炭酸カルシウムが多数認められた (図3)。

2. 光学顕微鏡観察

1) 術後2週

0%, 30%, 60%の3群とも、試料周囲に炎症性細胞の浸潤や多核巨細胞は認められなかった。

0%群では、試料は軟組織に被包され、軟組織の外側に新生骨の形成が見られた。新生骨の形成は、試料全周に及んでいる標本も見られた。新生骨は薄く梁状で、骨の周囲には多数の類円形の細胞が認められた。試料と新生骨との間の軟組織は厚く、扁平あるいは類円形の細胞が配列していた (図4)。

30%群では、0%群と同様に試料破断面は軟組織で被覆され、その外側に新生骨が形成されていた。新生骨の厚みは0%群よりやや厚かったが、その構造は0%群と同様に薄く幼弱な梁状であった。試料と骨との間の軟組織の幅は0%群より薄かったが、類円形の細胞と扁平な細胞が0%群と同様に認められた (図5)。

60%群では、新生骨の厚さは0%群、30%群に比較するとやや厚く、その構造は緻密であった。試料と新生骨との距離は0%群や30%群に比較するとかなり近接しており、1~数層の扁平な細胞が観察されるのみであった (図6)。

2) 術後8週

3群とも試料周囲に炎症性細胞浸潤は認めなかった。0%群は、術後2週と比較すると新生骨は緻密化していた。新生骨と試料底部破断面は近接していたが、直接接している部分は見られず、1~数層の細胞が介在していた (図7)。

30%群も術後2週と比較すると新生骨は緻密化していた。基質と試料が直接接している部分がわずかに認められ、

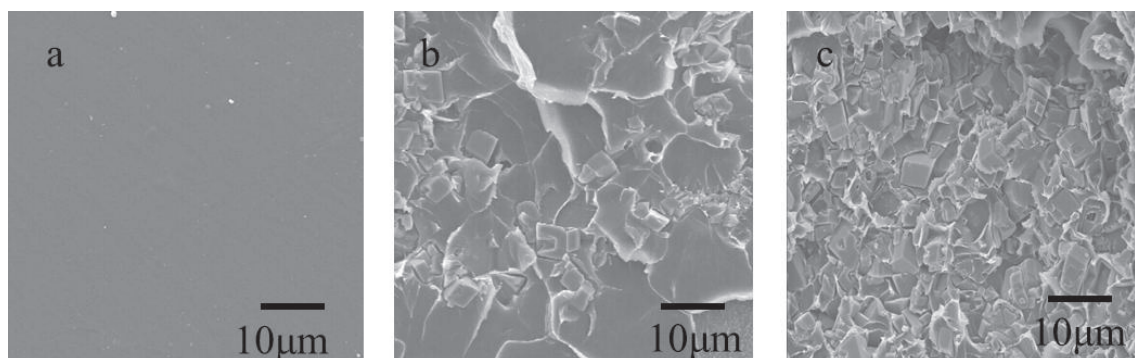


図3.

試料破断面のSEM像

a: 0%試料 b: 30%試料 c: 60%試料

炭酸カルシウムを混和した試料では、立方体の炭酸カルシウムが観察された

30%試料と比較し60%試料では、破断面に露出している炭酸カルシウムの量が多い

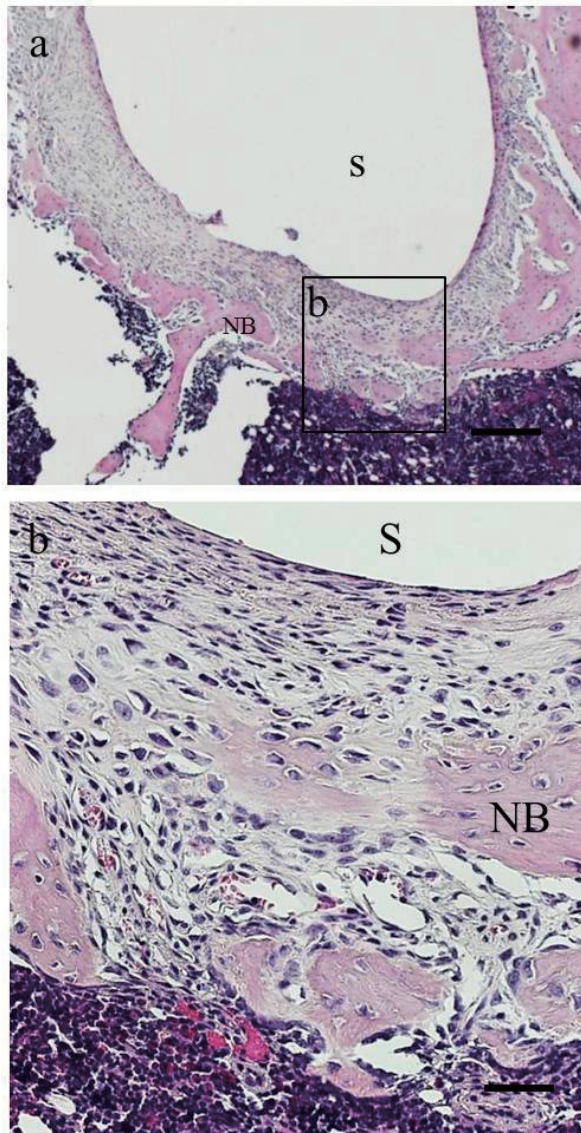


図 4.

2 週 0 % 群の H-E 染色

a : 全体像 (bar200 μ m) b : a の拡大像 (bar20 μ m)

(S : 移植試料 NB : 新生骨)

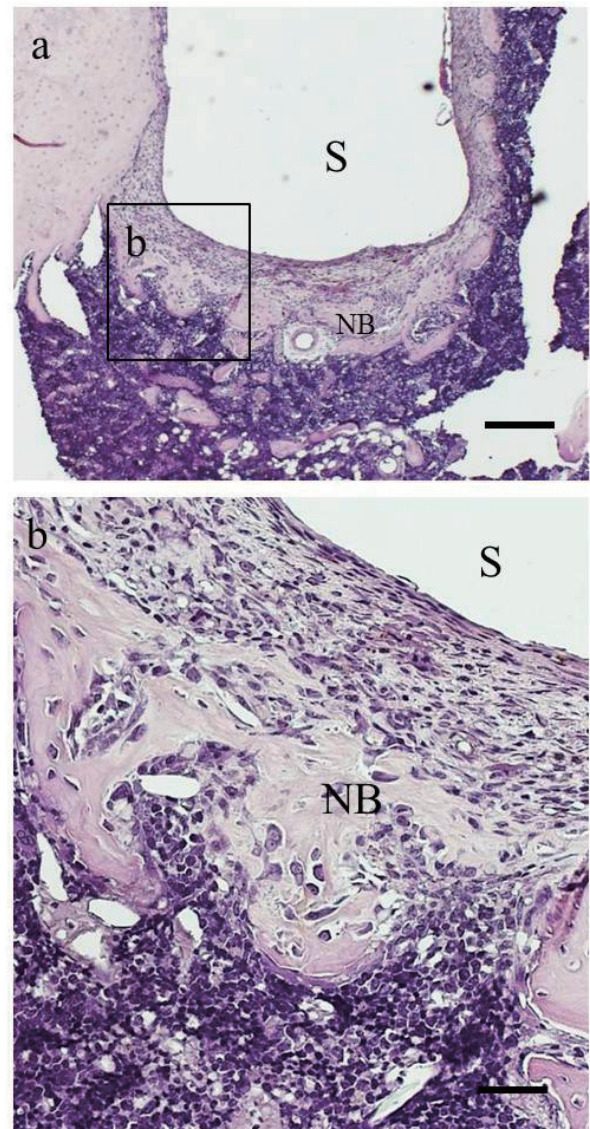


図 5.

2 週 30 % 群の H-E 染色

a : 全体像 (bar200 μ m) b : a の拡大像 (bar20 μ m)

(S : 移植試料 NB : 新生骨)

直接接していない部分でもわずかに細胞が介在するのみであった (図 8)。

60%群では、新生骨の厚さが最も大きく、骨は緻密化し、新生骨と試料は近接して骨基質が試料と直接接している部分が多く観察された。接していない部分では、わずかに細胞が散在しているのみであった (図 9)。

3. 組織学的計測

1) 試料破断面の長さ (表 1)

2 週後の 0 % 群 (n=8) が $934.8 \pm 150.3 \mu\text{m}$, 30%群 (n=7) が $819.3 \pm 99.3 \mu\text{m}$, 60 % 群 (n=7) が $733.5 \pm 168.4 \mu\text{m}$ で、8 週後はそれぞれ $764.9 \pm 67.7 \mu\text{m}$ (n=8), $719.6 \pm 122.8 \mu\text{m}$ (n=7), $837.6 \pm 90.6 \mu\text{m}$ (n=7) で、いずれも 3 群間に有意差は認められなかった。

2) 骨基質形成率 (表 2)

2 週後、0 % 群は試料底部の長さに対して $69.7 \pm 24.1\%$, 30%群は $72.1 \pm 31.6\%$, 60%群は $78.9 \pm 20.4\%$ の新生骨が観察された。3 群間に有意差は認められなかった。8 週後は 3 群とも増加が見られ、それぞれ $86.7 \pm 7.6\%$, $75.0 \pm 14.6\%$, $92.7 \pm 5.2\%$ で、3 群間に有意差は認められなかった。2 週後と 8 週後の同じ群を比較すると、3 群とも有意差は認められなかった。

3) 試料と骨基質間の距離 (表 3)

2 週後、0 % 群は $40.5 \pm 27.0 \mu\text{m}$, 30%群は $19.2 \pm 5.0 \mu\text{m}$, 60%群は $10.2 \pm 6.1 \mu\text{m}$ で 60%群は 0 % 群に比較して有意に小さい値であった。8 週後は 3 群とも減少し、それぞれ $10.8 \pm 8.5 \mu\text{m}$, $5.2 \pm 2.3 \mu\text{m}$, $3.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ で、3 群間に有意

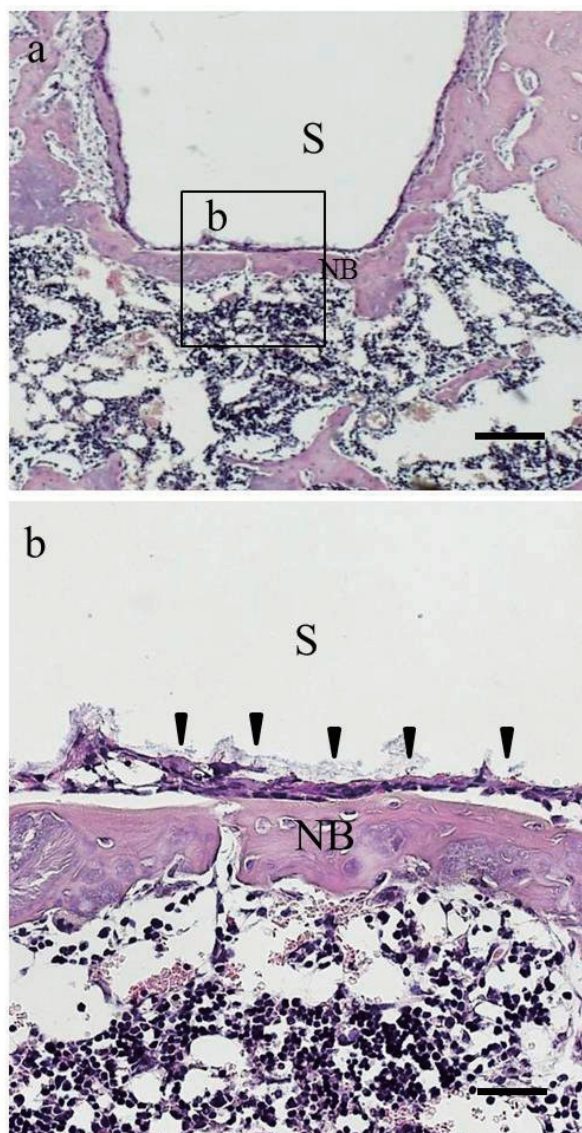


図 6.

2 週 60% 群の H-E 染色

a: 弱拡大像 (bar200 μ m) b: a の拡大像 (bar20 μ m)

(S: 移植試料 NB: 新生骨 ▼: 試料と新生骨間に介在する細胞)

差は見られなかった。2 週後と 8 週後を比較すると、0 % 群、30 % 群では有意に減少していた。

4) 試料と骨基質との接触率 (表 4)

2 週後、0 % 群と 30 % 群は 0 %、60 % 群は $0.6 \pm 1.5\%$ で、3 群間に有意差はなかった。8 週後、0 % 群は 0 %、30 % 群は $6.6 \pm 6.5\%$ 、60 % 群は $18.3 \pm 8.9\%$ で、60 % 群は 0 % 群に対して有意に高かった。2 週後と 8 週後を比較すると、0 % 群と 30 % 群では有意差がなかったが、60 % 群では有意に増加していた。

4. SEM 観察

60 % 群は、試料破断面に炭酸カルシウムの露出が多数観察された部分で、露出した炭酸カルシウムが骨基質と直接

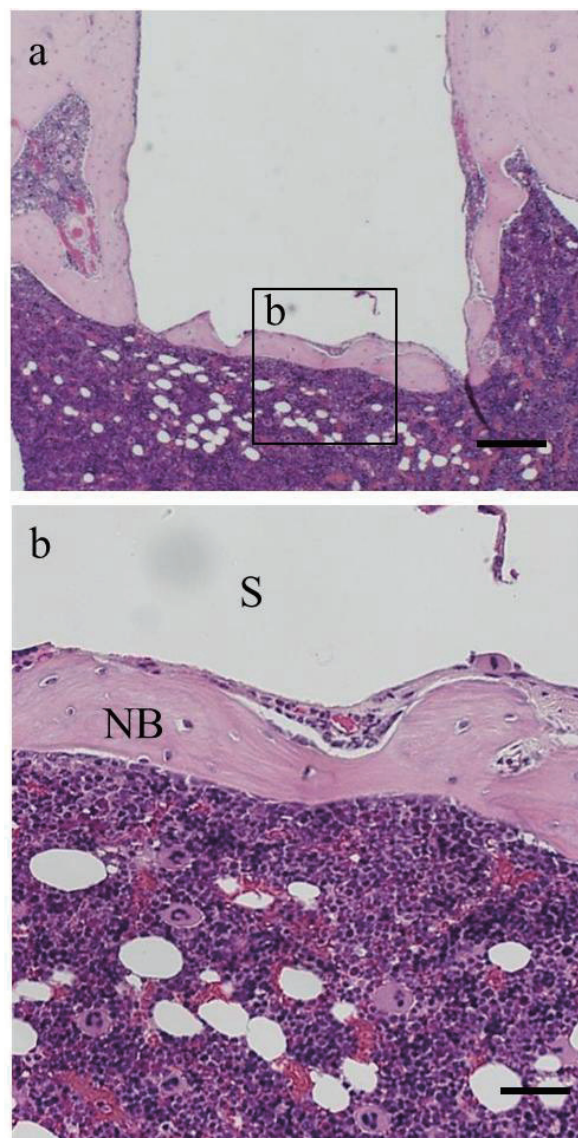


図 7.

8 週 0 % 群の H-E 染色

a: 弱拡大像 (bar200 μ m) b: a の拡大像 (bar20 μ m)

(S: 移植試料 NB: 新生骨)

表 1 試料底部の長さ

	0%	30%	60%
2 週	934.8 ± 150.3	819.3 ± 99.3	733.5 ± 168.4
8 週	764.9 ± 67.7	719.6 ± 122.8	837.6 ± 90.6

平均 $\pm$ 標準偏差 (μ m)

すべて有意差なし

表 2 骨基質形成率

	0%	30%	60%
2 週	69.7 ± 24.1	81.1 ± 14.2	78.9 ± 20.4
8 週	86.7 ± 7.6	75.0 ± 14.6	92.7 ± 5.2

平均 $\pm$ 標準偏差 (%)

すべて有意差なし

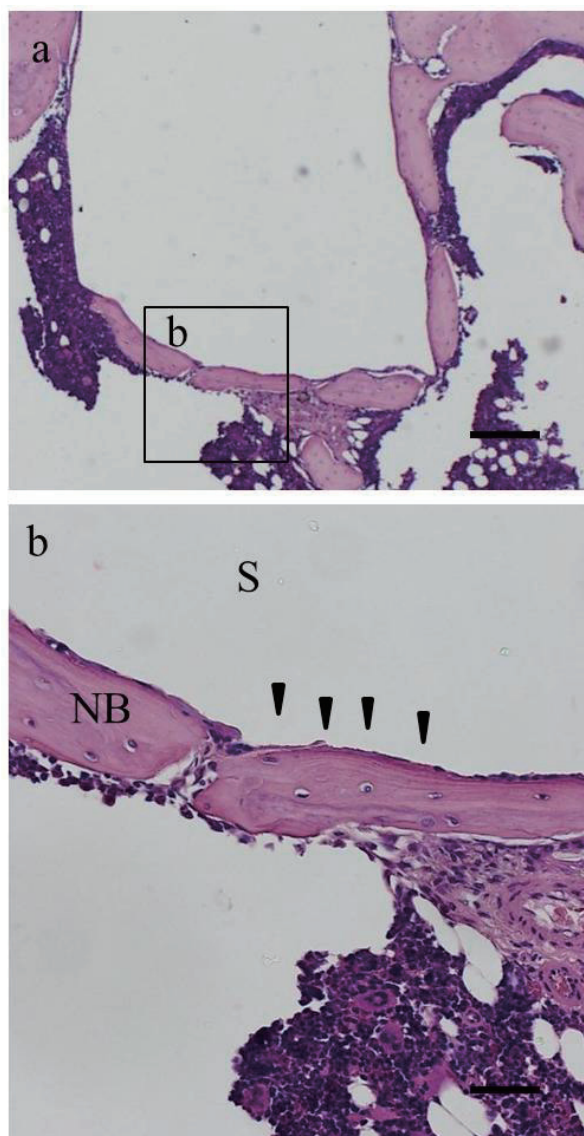


図 8.

8 週30%群のH-E染色

a : 弱拡大像 (bar200 μ m) b : aの拡大像 (bar20 μ m)

(S : 移植試料 NB : 新生骨 ▼ : 試料と新生骨基質が直接接している)

表 3 試料と骨基質間の距離

	0%	30%	60%
2 週	40.5 $\pm$ 27.0	19.2 $\pm$ 5.0	10.2 $\pm$ 6.1*
8 週	10.8 $\pm$ 8.5 §	5.2 $\pm$ 2.3 §	3.3 $\pm$ 0.9

平均 $\pm$ 標準偏差 (μ m)* : 0 %との比較で有意差あり ($p < 0.05$) § : 2 週との比較で有意差あり ($p < 0.05$)

接して間隙が認められない部分が多かった。また、試料破断面には数 μ mの立方形の陥凹が認められ、陥凹部には新生骨が増生して、レジンあるいは炭酸カルシウムと間隙なく直接接していた。このような陥凹部や炭酸カルシウムが

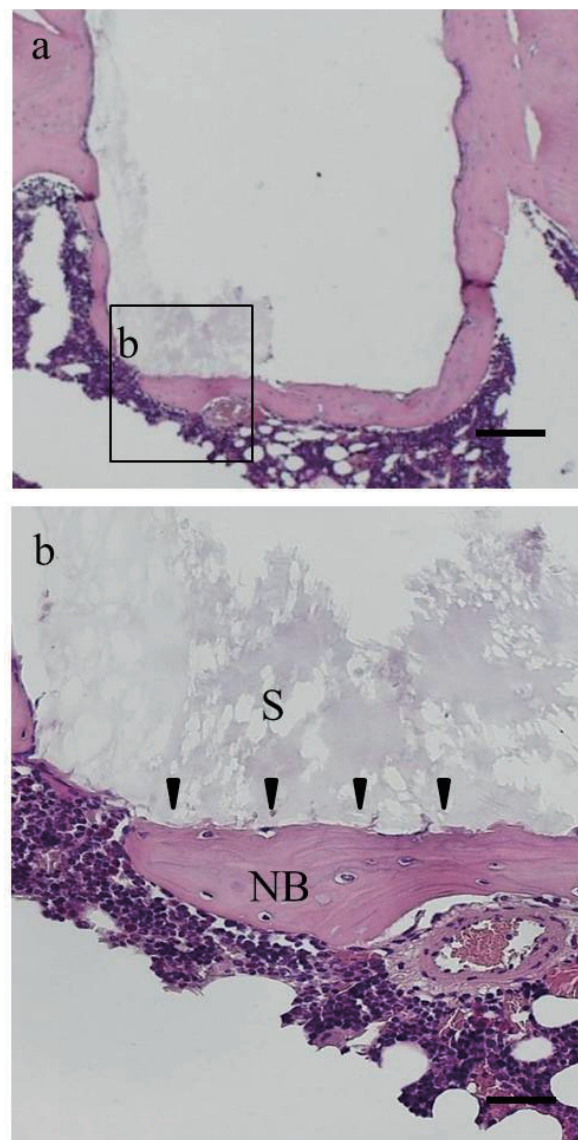


図 9.

8 週60%群のH-E染色

a : 弱拡大像 (bar200 μ m) b : aの拡大像 (bar20 μ m)

(S : 移植試料 NB : 新生骨 ▼ : 試料と新生骨基質が直接接している)

表 4 試料と骨基質との接触率

	0%	30%	60%
2 週	0	0	0.6 $\pm$ 1.5
8 週	0	6.6 $\pm$ 6.5	18.3 $\pm$ 8.9* §

平均 $\pm$ 標準偏差 (%)* : 0 %との比較で有意差あり ($p < 0.05$) § : 2 週との比較で有意差あり ($p < 0.05$)

露出して骨基質と間隙なく接している部分では、その周囲のレジンと骨基質の間にも間隙がみられない部位が多かった (図10)。

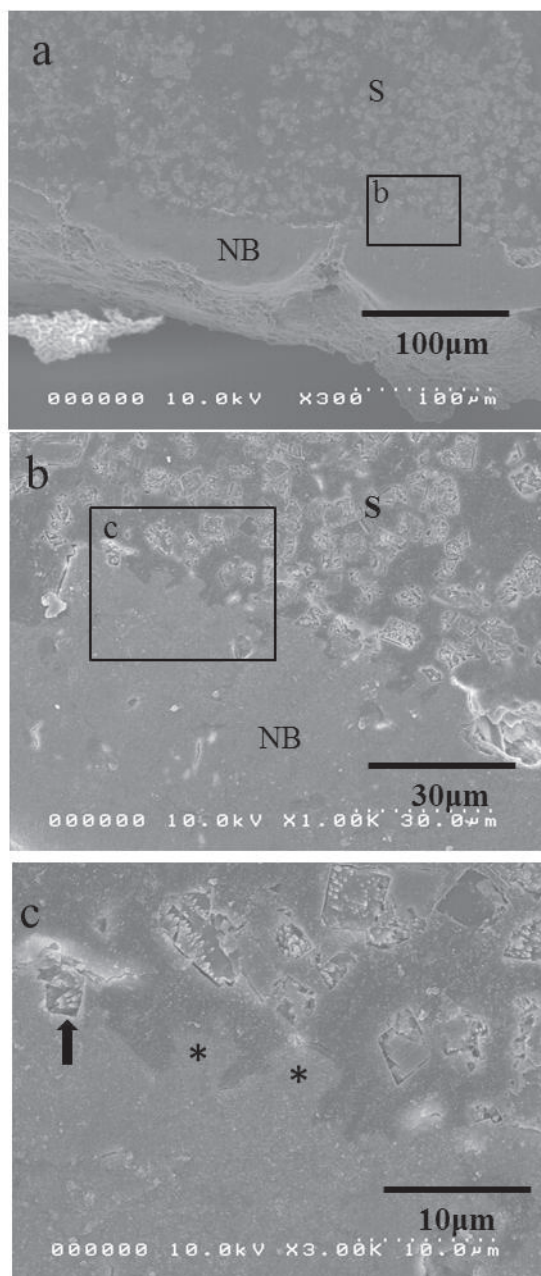


図10

8 週60%群のSEM像

a: 弱拡大像 b: aの拡大像 c: bの拡大像

(S: 移植試料 NB: 新生骨)

増生した骨基質がレジンの陥凹部に入り込んで結合している(*)

露出した炭酸カルシウムと骨基質が結合している (↑)

考 察

本研究は、4-META/MMA-TBBレジンに炭酸カルシウムを複合化することによって、硬化したレジン表面にセメント質が結合可能となることをめざし、その第一段階として、炭酸カルシウムの濃度が骨形成や骨との結合状態に及ぼす影響を評価した。新生骨と試料との界面の観察は、試料の側面ではなく底部で行った。これは側面を研磨して

炭酸カルシウムを露出させようとする炭酸カルシウムとレジンが十分に接着していないため、レジンから脱離する粒子が多く、試料間で露出量にバラつきが認められたが、破断面では、SEM観察の結果、混和した濃度に比例して炭酸カルシウムが露出していると思われたためである。また、大腿骨を穿孔した際、穿孔部の直径が十分に規格化できなかったため骨と試料との距離にバラつきが見られ、試料側面部では組織の治癒や新生骨の形成に影響があり、炭酸カルシウムの濃度の影響を十分に評価できなくなる可能性が考えられたためである。

実験期間を通して、0%, 30%, 60%すべての群で試料周囲に炎症性細胞浸潤は認めなかった。4-META/MMA-TBBレジンはTBBを重合開始剤として用いているため、水分があっても高い重合率を示し²²⁾、生体親和性が高いことは数多く報告されている。しかしレジンの重合に影響する因子は多く、炭酸カルシウムを高濃度で混和すると、レジンの重合が阻害されて炎症が生じる危険性もあった。しかし、60%群でも炎症は生じなかったことから、炭酸カルシウムを60%混和させても十分な重合が得られていると考えられた。

骨基質形成率は各群とも2週より8週の方が大きい傾向が見られたが、統計学的に有意差はなく、また各群間にも有意差は見られなかった。したがって、試料底部周囲への骨形成速度はきわめて速く、炭酸カルシウムの影響はほとんどないものと思われた。一方、新生骨基質と試料との距離は、炭酸カルシウム含有量が多いほど小さく、術後2週では、60%群が0%, 30%群と比較して有意に小さかった。さらに0, 30%群では2週後より8週後の方が有意に小さかった。したがって、試料底部への骨形成は試料に接して骨が周囲から連続的に増生するのではなく、試料表面が軟組織で被包されてその外側に骨が形成され、その後軟組織が骨に置換して試料に近接していくと考えられた。さらに、その速度は炭酸カルシウムの含有量が多いほど速くなると思われた。また、骨基質と試料との接触は、2週間には3群ともほとんどなかったが、8週後は60%群が18.3%と高い接触率を示し、0%群に比較して有意差が認められ、60%群では2週後に比較して8週後が有意に高い接触率であった。したがって、炭酸カルシウム含有量を多くすることは、骨基質と試料が直接接する面積を増加させるために有効であると思われた。

炭酸カルシウムは骨形成を促進することが知られている。炭酸カルシウムを主成分とするサンゴを骨髓腔内に移植した実験¹⁸⁾では、サンゴは破骨細胞により吸収され、周囲に骨芽細胞が出現して新生骨が形成されることが観察されている。また、カルシウム濃度の上昇は骨芽細胞の増殖やコラーゲン合成を刺激するとともに、Bone Morphogenetic Protein (BMP) の遺伝子発現を亢進することが報告されている^{23, 24)}。さらに、骨の石灰化部位で

の CO_3^{2-} 濃度は Ca^{2+} や PO_4^{3-} 濃度に比べて高く、生体での骨の石灰化過程や安定性において炭酸イオンが大きな影響を及ぼすとの考えも示されている^{25,26)}。本実験においても、4-META/MMA-TBBレジンに複合化した炭酸カルシウムが生体内に溶出し、試料表面に Ca^{2+} と CO_3^{2-} が豊富に存在することによって、骨形成に有利に作用したのではないかと考えられた。

0%群では、8週でも新生骨と試料の間に軟組織がわずかに介在し、結合は得られなかった。今後さらに時間が経過すると、軟組織が骨に置換して直接接するようになる可能性も考えられる。しかし、4-META/MMA-TBBレジンに頭蓋骨に接着させて1年間観察した実験¹⁴⁾では、硬化したレジン表面に新生骨は増生したが、SEMではレジンと新生骨間には間隙が認められ、結合は得られなかったことから、本実験でもさらに長期間が経過して骨とレジンの間に組織が存在しなくなったとしても、骨基質と試料が結合する可能性は低いと思われる。

30%群でも8週後にほとんどの部位で試料と骨との間に軟組織が介在した。SEMでは試料破断面に炭酸カルシウムの露出はみられたが、濃度が低いためその効果が十分でなかったと推察された。一方60%群では、試料破断面に炭酸カルシウムの露出が増加し、露出した炭酸カルシウムが骨基質と間隙がなく結合している部分も観察された。生体活性を示す材料でも、バイオガラスやハイドロキシアパタイトでは表面に低結晶性の骨類似アパタイトが生成されて骨と結合することが知られているが²⁷⁻²⁹⁾、 β -TCPや炭酸カルシウムでは嵌合効力により直接結合すると報告されている³⁰⁾。本実験における炭酸カルシウムと骨基質との結合も、同様の様式で結合していると推測された。

一方、炭酸カルシウムと骨基質が結合している近傍のレジンも、骨基質と間隙なく接している部分が多数観察された。これは、炭酸カルシウムから溶出した Ca^{2+} や CO_3^{2-} が骨形成を促進したためと考えられるが、レジンと骨基質の結合様式については、これまでまったく研究がなく詳細は不明である。

炭酸カルシウムを複合化したレジンと骨基質との結合様式については今後の研究を待たなければならず、またいくつかの結合様式が混在している可能性もあるが、いずれの様式であっても、試料の凹凸部位に骨が嵌合してSEMで間隙が見られなかったことから、引っ張り力やせん断力に抵抗を示す可能性は十分にあると思われる。

本研究により、4-META-MMA/TBBレジンに炭酸カルシウムを添加すると、硬化したレジン上に新生骨が形成されて直接結合する可能性が示唆された。このことは、穿孔部の封鎖や破折歯根の接着に用いると、レジン上にセメント質が形成されてポケット上皮の増殖を抑制してポケット形成を阻止したり、咬合力を骨に伝えるための構造が回復できる可能性を示唆するものであり、臨床で保存不可能と

されている歯を保存可能とするだけでなく、機能を回復するうえで有効な治療法として発展することが期待される。しかし、骨と直接結合している部分は不十分であり、炭酸カルシウムとレジンとの結合も得られてはいないことから、今後、炭酸カルシウムの粒子サイズや、炭酸カルシウムをレジンコーティングしてポリマー粉末に混和する方法などを検討するとともに、BMPなどの成長因子を併用して、効率的に硬組織を誘導して結合させる方法などを検討する必要があると考えている。

結 論

本研究では、4-META/MMA-TBBレジンに炭酸カルシウムを複合化させ、大腿骨骨髓腔に移植して骨増生への影響や新生骨との結合状態などを評価した。その結果、以下の結論を得た。

1. 4-META/MMA-TBBレジンに炭酸カルシウムを添加することでレジンと骨との直接接触が高まる。
2. 4-META/MMA-TBBレジンに炭酸カルシウムを添加すると骨との結合を促進させる可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の遂行にご協力をいただきました加藤昭人博士、原橋宏幸博士、洲崎真希女史、中澤篤氏、森下長氏、金山和泉女史をはじめとする教職員各位に心より御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Nakabayashi N : Resin reinforced dentin due to infiltration of monomers into the dentin at the adhesive interface. J Jpn Dent Mater 1 : 78-81, 1982.
- 2) Tanaka S, Sugaya T, Kawanami M, Nodasaka Y, Yamamoto T, Noguchi H et al : Hybrid Layer Seals the Cementum/4-META/MMA-TBB Resin Interface. J Biomed Mater Res Part B 80B : 140-145, 2007.
- 3) 川村直人, 菅谷 勉, 宮治裕史, 川浪雅光 : 4-META/MMA-TBBレジンの硬化条件が組織反応に及ぼす影響. 日歯保存誌 46 : 853-859, 2003.
- 4) Yoshimine Y, Ono M, Akamine A : In Vitro Comparison of the Biocompatibility of Mineral Trioxide Aggregate, 4-META/MMA-TBB Resin, and Intermediate Restorative Material as Root-end-filling Materials. J Endod 33 : 1066-1069, 2007.
- 5) 菅谷 勉, 野口裕史, 長谷川有紀子, 田中裕子, 川浪雅光. 歯根端切除時に4-META/MMA-TBBレジンによるroot-end-sealingの有効性. 日歯保存誌 45 : 62-67, 2004.
- 6) 長谷川有紀子, 菅谷 勉, 川浪雅光 : 根尖性歯周炎の

- 治癒に対する4-META/MMA-TBBレジンによる root-end-sealingの有効性. 日歯保存誌 47: 622-632, 2004.
- 7) 大谷香織, 菅谷 勉, 川浪雅光: 根尖切除術における 切除面の封鎖法の違いが実験的根尖性歯周炎の長期治癒に及ぼす影響. 日歯保存誌 51: 648-658, 2008.
- 8) 野口裕史, 菅谷 勉, 加藤 熙: 縦破折した歯根の接着による治療法 第2報 接着性レジンセメントで接着・再植した場合の組織学的検討. 日歯保存誌 40: 1453-1460, 1997.
- 9) Sugaya T, Kawanami M, Noguchi H, Kato H, Masaka N: Periodontal healing after bonding treatment of vertical root fracture. Dent Traumatol 17: 174-179, 2001.
- 10) 富田真仁, 菅谷 勉, 川浪雅光: 垂直歯根破折に口腔内接着法と口腔外接着・再植法を行った場合の歯周組織の治癒. 日歯保存誌 45: 787-796, 2002.
- 11) 山本俊樹, 菅谷 勉, 加藤 熙: 髄床底穿孔の処置に4-META/MMA-TBBレジンを応用した場合の歯周組織反応に関する病理組織学的検討. 日歯保存誌 43: 1239-1248, 2000.
- 12) 山本俊樹, 菅谷 勉, 川浪雅光: 髄床底穿孔の処置に4-META/MMA-TBBレジンを応用した場合の臨床成績. 日歯保存誌 47: 543-548, 2004.
- 13) 元木洋史, 菅谷 勉, 川浪雅光: 垂直破折歯根の接着治癒後に歯周組織に接するレジンの幅が上皮の根尖側移動に及ぼす影響. 日歯保存誌 48: 733-742, 2005.
- 14) 中塚 愛, 川村直人, 菅谷 勉, 川浪雅光: 4-META/MMA-TBBレジンと骨との長期安定性. 歯材器 27: 455-465, 2008.
- 15) Guillemin G, Fournie J, Chetail M: The use of coral as a bone graft substitute. J Biomed Mater Res 21: 557-567, 1987.
- 16) Guillemin G, Meunier A, Dallant P, Christel P, Pouliquen JC, Sedel L: Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. J Biomed Mater Res 23: 765-779, 1989.
- 17) Shors EC, White EW, Kopchok G: Biocompatibility, osteoconduction and biodegradation of porous hydroxyapatite, tricalcium phosphate, sintered hydroxyapatite and calcium carbonate in rabbit bone defects, Mater Res Soc Symp Proc 110: 211-218, 1989.
- 18) 星野和正: 骨髄内移植後のアラゴナイトが周囲組織に及ぼす影響. 日大口腔科学 25: 238-253, 1999.
- 19) 荒井清司, 松井 智, 松根健介, 呂 朋君, 曹 宏, 西村 眞, 辻本恭久, 松島 潔, 前田隆秀: 炭酸カルシウムがヒト歯髄培養細胞のアルカリフォスファターゼ活性におよぼす影響. 小児歯科学雑誌 45: 481-486, 2007.
- 20) 荒井清司, 松井智, 前田隆秀: 生活歯髄切断法における炭酸カルシウムの可能性. 歯科薬物療法 28: 154, 2009.
- 21) Fujita Y, Yamamuro T, Nakamura T, Kotani S: The bonding behavior of calcite to bone. J Biomed Mater Res 25: 991-1003, 1991.
- 22) 今井庸二: 歯科におけるトリブチルボランを重合開始剤とするMMAレジンに関する研究. Reports of the Institute of Biomaterials and Bioengineering 37: 4-15, 2003.
- 23) Kanatani M, Sugimoto T, Fukase M, Fujita T: Effect of elevated extracellular calcium on the proliferation of osteoblastic MC3T3-E1 cells: its direct and indirect effects via monocytes. Biochem biophys res commun 181: 1425-1430, 1991.
- 24) Nakade O, Takahashi K, Takuma T, Aoki T, Kaku T. Effect of extracellular calcium on the gene expression of bone morphogenetic protein-2 and -4 of normal human bone cells. J Bone Miner Metab 19: 13-19, 2001.
- 25) Matuura A, Kubo T, Doi K, Hayashi K, Morita K, Yokota R, Hayashi H, Hirata I, Okazaki M, Akagawa Y: Bone formation ability of carbonate apatite-collagen scaffolds with different carbonate contents. Dent Mater J 28: 234-242, 2009.
- 26) Okazaki M: Creation of highly functional CO3Ap-collagen scaffold biomaterials. Dent Mater J 29: 1-8, 2010.
- 27) Hench LL, Paschall HA: Direct chemical bond of bioactive glass-ceramic materials to bone and muscle. J Biomed Mater Res Symp 4: 25-42, 1973.
- 28) Hench LL, Paschall HA: Histochemical responses at a biomaterials interface. J Biomed Mater Res 5: 49-64, 1974.
- 29) Kitsugi T, Yamamuro T, Nakamura T, Ito S, Kokubo T, Takagi M, Shibuya T: Bone bonding behavior of three kinds of apatite containing glass ceramics. J Biomed Mater Res 20: 1295-1307, 1986.
- 30) Neo M, Kotani S, Fujita Y, Nakamura T, Yamamuro T: Differences in ceramic-bone interface between surface-active ceramics and resorbable ceramics: A study by scanning and transmission electron microscopy. J Biomed Mater Res 26: 255-267, 1992.

ORIGINAL

Effect of calcium carbonate on bone formation on 4-META/MMA-TBB resin

Masaru Henmi, Tsutomu Sugaya, Megumi Nakatsuka and Masamitsu Kawanami

ABSTRACT : The 4-META/MMA-TBB resin has been used for root-end sealing following apico-ectomy and the bonding treatment of vertical root fractures as it results in high tensile strength and is biocompatible. However hard tissue is rarely formed on the resin.

This study aims to develop the resin so that hard tissue will formed on the surface, and transplanted 4-META/MMA-TBB resin containing calcium carbonate and evaluated the effect of the bone formation on this resin.

Calcium carbonate granules with grain sizes of 5-10 μ m were mixed with the polymer powder of 4-META-MMA/TBB resin at 0, 30, and 60% weight ratios, and the mixtures were cured in 1mm in diameter cylinder shapes and were broken at 5mm lengths for the transplantation samples.

Two places of the right and left femurs of rats were trephined into a medullary cavity of 1mm diameter and the samples were transplanted so that the basal part reached into the medullary cavity.

Decalcified slice of specimens and stained with H-E staining and were observed for newly-formed bone surrounding the resin, the ossification state of the basal part of the sample with light microscopy, and the ossification rate and other parameters were measured 2 and 8 week postoperatively. Further, the interface between the resin and the newly-formed bone of some of the 8-week samples were observed with SEM.

At two weeks, few inflammatory cells were found in the three groups, and newly-formed bone was observed surrounding the whole of the samples. In the 0% and 30% groups, histomorphologically, these was thick soft tissue between the sample and the newly-formed bone, in the 60% group. The soft tissue was thin at eight weeks, the newly-formed bone was not directly in contact with the sample in the 0% group, but the 30% and 60% groups showed bone contact without intervening soft tissue. At 2 weeks, rate of the contact between bone and sample was 0%, in the 0% and 30% groups, and $0.6 \pm 1.5\%$ in the 60% group, without statistically significant differences among the samples. At 8 weeks, the rates were 0%, $6.6 \pm 6.5\%$, $18.3 \pm 8.9\%$ respectively, and the 60% group showed a statistically significant difference compared with the 0% group.

The SEM showed rigid interdigitation between the resin containing calcium carbonate and newly-formed bone in the 60% group.

These results suggested that calcium carbonate filler in cured 4META/MMA-TBB resin can facilitate direct contact and interdigitation between resin and newly formed bone.

Key Words : calcium carbonate, 4-META/MMA-TBB resin, bone formation