

根管充填用シーラーのセメント芽細胞に対する細胞障害性に関する研究

鈴木 エリ 武藤 徳子 石井 信之

神奈川県立歯科大学大学院歯学研究科 歯髄生物学講座

抄録

目的：本研究は根管充填用シーラーのセメント質誘導能を比較検討することを目的とする初期研究として、セメント芽細胞に対する細胞障害性を細胞増殖率より測定し、継時的細胞形態の変化を形態学的に解析した。

材料と方法：ヒトセメント芽細胞 (HCEM) を 1×10^5 cells/well になるように 6 well Culture Plate に播種した。チャンネル N (Canals N), ニシカチャンネルシーラー N (CS-N), S-PRG 含有シーラー (Surface Pre Reacted Glass-ionomer : SPRG) はあらかじめ円形ディスク枠 (直径 2 mm, 高さ 1 mm) で指示書に従い硬化させたものを添加して 5% CO₂ 条件下で共培養し、培養 24, 48, 72 時間後に細胞数を測定した。培養後の HCEM は位相差顕微鏡を用いて観察し、形態学的変化を比較した。

結果：根管充填用シーラー刺激によるセメント芽細胞の生細胞数をコントロール群と比較した結果、24 時間後で Canals N $84.2 \pm 10.0\%$, CS-N $83.4 \pm 11.7\%$, SPRG $77.0 \pm 9.6\%$ を示し、統計学的有意差は認められなかった。また、すべての供試試料群における細胞増殖率は 24 時間後から 72 時間後においてもコントロール群との間に有意差は認められなかった。さらに、供試試料間による細胞形態に変化はなく、培養期間中に異常所見は認められなかった。

結論：根管充填用シーラーの HCEM に対する細胞障害性を生細胞数測定と形態学的変化によって解析した結果、細胞障害性は認められなかった。

キーワード：セメント芽細胞, 根管充填用シーラー, 生体親和性

責任著者連絡先：武藤徳子

〒 238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町 82 神奈川県立歯科大学大学院歯学研究科歯髄生物学講座

TEL : 046-822-9527, FAX : 046-822-8856, E-mail : mutoh@kdu.ac.jp

受付：平成 27 年 11 月 15 日/受理：平成 27 年 12 月 28 日

DOI : 10.11471/shikahozon.59.119

緒言

歯内療法成功率を高めるためには、根管感染源の除去が最も重要である¹⁾。しかしながら、歯内療法の対象である根管系は解剖学的にきわめて複雑な形態であることから、根管感染源を完全に除去することは困難である。現在、根管感染源の除去は根管拡大形成による機械的清掃と根管洗浄剤による化学的清掃によって行っているが、根管を完全に無菌化することは不可能であることから、緊密な根管充填により象牙細管内の侵入細菌や側枝・根尖分岐などに残存する細菌の栄養供給路を遮断することが重要である¹⁾。すなわち、根管充填による緊密な根管封鎖性は臨床成績を左右することが明らかにされている。

根尖孔の物理的封鎖を目的とした根管充填材（ガッタパーチャ、根管充填用セメント）は、経年的に物理性状が劣化するために根尖封鎖性が低下することが指摘されている。ガッタパーチャと根管充填用シーラーによる根尖封鎖性は、経年的な劣化により再感染が惹起されて臨床成績が低下すると考えられている²⁾。従来から、根管充填後の理想的治癒形態はセメント質による根尖孔の被覆と考えられ、根管充填用セメントには根尖歯周組織の生体親和性とセメント質誘導作用が期待されている。しかしながら、現在までに生体親和性に優れセメント質を確実に誘導する根管充填材に関する報告はない。

根尖孔周囲の歯根膜組織には未分化間葉系幹細胞が局在し、未分化間葉系幹細胞自身の増殖と分化によってセメント質誘導は効果的に促進できる可能性がある³⁾。歯根膜は1930年以前に、抜歯後、歯根膜は再生せず、移植・再植において歯槽骨の増殖により象牙質が吸収すること、さらに1960年頃から歯根膜の構造についてコラーゲン弾性線維ならびに微細線維、さらに石灰化機序のマーカーとして、bone sialoprotein, osteopontinなどの発現に関する研究がされてきたと同時に、歯根膜細胞の代謝とこれらの石灰化マーカーとの関係も研究され、歯根膜の病態生理がすでに明らかになっている⁴⁾。よってセメント質による根尖孔封鎖の誘導の可能性は、十分満たすと考えられる。セメント質形成による根尖封鎖の条件としては、根尖歯周組織に存在している細胞に対する生体親和性とセメント芽細胞遊走亢進およびセメント質分化誘導能を有する成長因子・基剤を利用し、根尖最狭窄部を意図的に封鎖しうることから、以上よりセメント質被覆による根尖部封鎖を確立することが歯内療法の臨床成績に影響すると考えられる。本研究で用いたシーラーは、チャンネルN、ニシカチャンネルシーラーN、S-PRG含有シーラーであり、本研究は、根管充填用シー-

ラーのセメント芽細胞に対する細胞障害性を解析することを目的として、セメント芽細胞に対する生体親和性を細胞増殖率より測定し、継時的細胞形態の変化を形態学的に解析した。

材料および方法

1. 供試細胞

ヒトセメント芽細胞（HCEM：広島大学歯学部 高田隆教授から供与）を10% fetal bovine serum 含有 alpha Modified Eagle Minimum Essential Medium (α -MEM, penicillin/streptomycin 100 units/ml, Invitrogen, USA) で 1×10^5 cell/well になるように細胞数を調整し 6 well Culture Plate (MULTIWELL 6 Well, FALCON, USA) に播種し、37°C、5% CO₂条件下で細胞がコンフルエントな状態になるまで48時間培養した。

2. 試料の作製

チャンネルN（昭和薬品化工、以後、Canals N）、ニシカチャンネルシーラーN（日本歯科薬品、以後、CS-N）、新規試用 Surface Pre Reacted Glass-ionomer 含有根管充填用シーラー（松風、以後、SPRG）を指示書に従い練和した後、直径2mm、厚さ1mmの円形ディスクの型に填入した。24時間静置して、硬化を確認後、エチレンオキシドガス滅菌を行い供試試料とした。なお試料は使用するまで湿度100%、37°Cの環境下にて保存した。

3. 細胞障害性の測定

1) 細胞増殖率の測定

供試試料を添加したHCEMの生細胞数から細胞増殖率を測定し、細胞障害性を解析した。コンフルエントになったHCEMの各wellにCell Culture Insert (pore size 0.4 μ m, FALCON) を装着しディスクを添加し、HCEMと共培養を行った。培養24、48、72時間後に細胞を回収し、コールターカウンターZ1 (BECKMAN COULTER, USA) にて細胞数を測定した。各実験群3回ずつ行い、その平均細胞数を結果とした。さらに、各培養時間における細胞増殖率（実験群の平均細胞数 \pm SD/コントロール群の細胞数）を計算し、各供試試料の細胞障害性を比較検討した。

2) HCEMの形態変化

HCEMの形態変化は、供試試料片を添加した培養後のHCEMを観察した。形態学的特徴については、細胞突起の伸展が観察される状態を増殖可能とし、伸展せず、細胞突起が丸みを帯びて伸展の認められないものは増殖環境に適さないと判断し、いずれもコントロール群と比較した。なお、試料片の未添加群をコントロールとした。

4. 統計学的解析

統計解析にはTukeyの多重比較検定を用いて危険率

5%で判定した。

結果

1. 細胞増殖率の測定

各根管充填用シーラーに対する HCEM の生細胞数を Fig.1 に示した。各根管充填用シーラーに対する HCEM 数は培養 24 時間から 72 時間の間において、コントロール群と同様に細胞数が増加し、供試試料間において統計学的有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。

供試試料に対する HCEM の細胞増殖率 (実験群の平均細胞数 \pm SD / コントロール群の細胞数) を Table 1 に示した。培養 24 時間後ではコントロール群に対して Canals N $84.2 \pm 10.0\%$ (平均値 \pm SD), CS-N $83.4 \pm 11.7\%$, SPRG $77.0 \pm 9.6\%$ を示した。培養 48 時間では、コントロール群に対して Canals N $78.4 \pm 14.6\%$, CS-N $86.9 \pm 10.5\%$, SPRG $69.9 \pm 15.6\%$ の増殖率を示した。さらに、培養 72 時間後はコントロール群に対して Canals N $102.7 \pm 17.7\%$, CS-N $108.6 \pm 22.0\%$, SPRG $79.6 \pm 13.8\%$ の増殖率が示されたが、培養 24 から 72 時間のいずれの期間においても供試試料間において統計学的有意差 ($p < 0.05$) は認められなかった。

2. HCEM の形態変化

位相差顕微鏡による細胞形態の比較においては、いずれの実験群においてもコントロール群と同様に紡錘形を

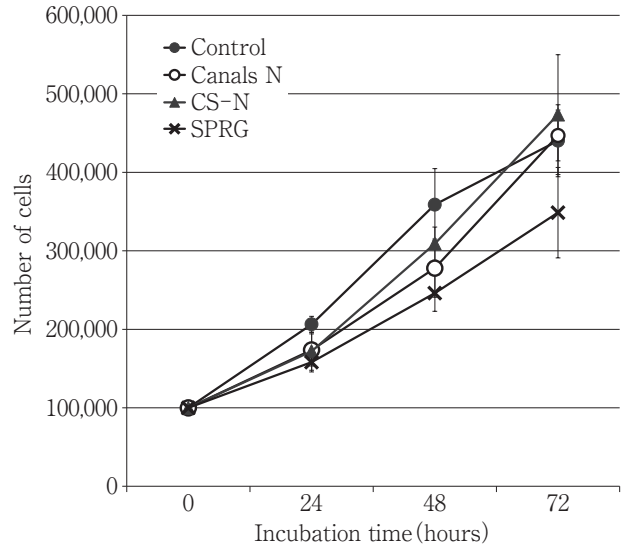


Fig. 1 Cell proliferation rate, which represents a biological affinity of root canal filling sealer for cementblasts

Table 1 The cytotoxicity evaluation of root canal sealers

Sealer	Incubation time (hours)		
	24	48	72
Canals N	84.2 ± 10.0	78.4 ± 14.6	102.7 ± 17.7
CS-N	83.4 ± 11.7	86.9 ± 10.5	108.6 ± 22.0
SPRG	77.0 ± 9.6	69.9 ± 15.6	79.6 ± 13.8

(% \pm SD)

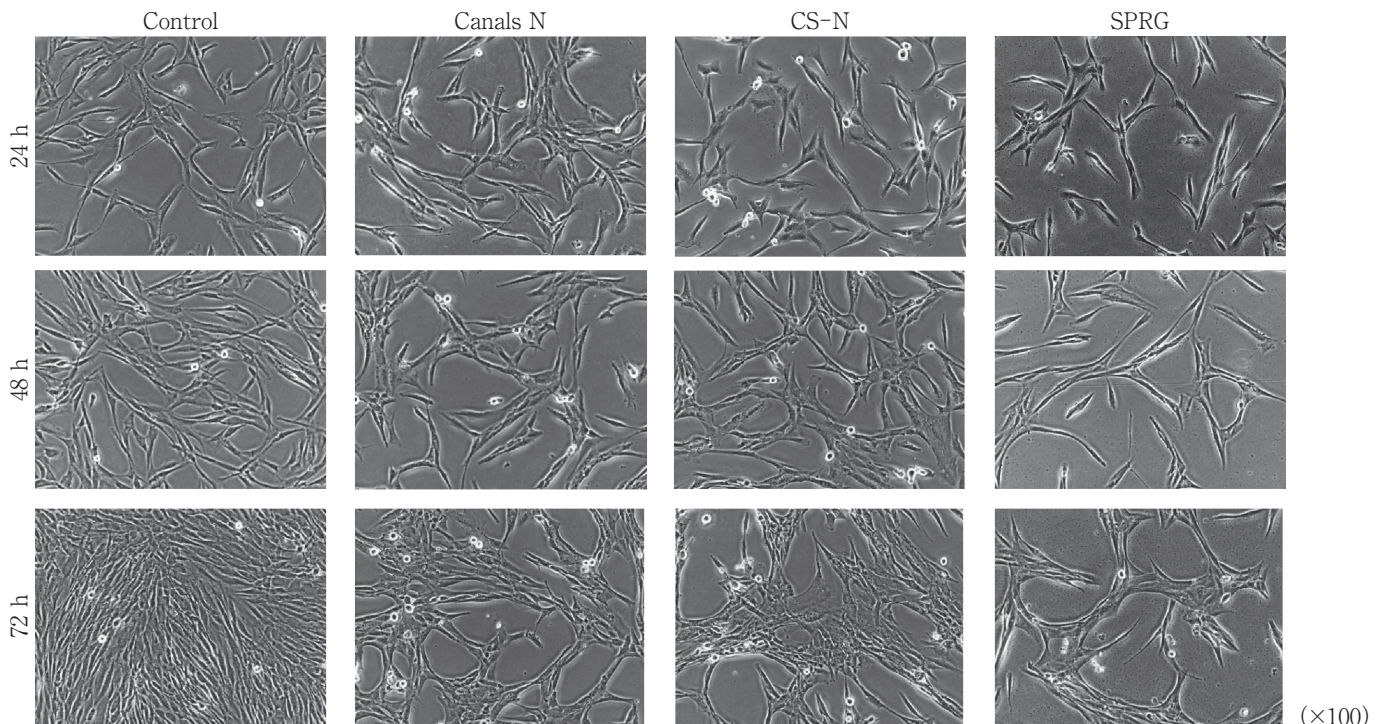


Fig. 2 Comparison of cell morphology by phase-contrast microscope

Cell morphological features were the same in normal cell growth that compared with control.

呈しており、細胞突起の伸展や核の形態に異常は認められず、コントロール群と同様に増殖している状態が認められた (Fig. 2).

考 察

根管充填後の根尖封鎖性が、治癒成績に影響を及ぼすことはすでに報告されている⁵⁾。生理学的根尖孔を維持し適切な根管形成で根管充填を行った症例は、生理学的根尖孔が破壊され根尖歯周組織に根管充填材を溢出した症例と比較して、根尖孔のセメント質被蓋硬組織添加が促進され、同時にこの現象は根管充填用シーラーの種類や成分の相違に影響されないことが報告されている⁶⁾。なお根尖部に誘導される組織として、根尖孔より根管内に侵入してきた肉芽組織が石灰化したもの⁷⁾、細胞性セメント質、そして象牙質様硬組織が報告されている³⁾。根管充填用シーラーは、解剖学的に複雑な形態を有する根管内の無菌化が困難であることを考慮すると、根管に残存細菌に対する抗菌活性を有することが望ましいことが報告されている⁸⁾。しかしながら、根管充填後の理想的治癒形態は根尖孔の硬組織被蓋であり、根管内に細菌が残存しても根尖歯周組織からの栄養供給路が遮断され、根尖孔からの再感染を防ぐことが可能である³⁾。このようにセメント質による根尖孔の封鎖は重要と考えられ、HCEMに対する根管充填用シーラーの影響に注目される。今回用いた3種類の根管充填用シーラーの硬化後可溶成分は、セメント芽細胞の増殖に影響を及ぼすが、コントロールに比べ有意差は認められなかった。しかしながら、細胞増殖曲線では非ユージノール系根管充填用シーラーの2つ (Canals N, CS-N) はそれぞれ対数増殖期相当時期に、コントロール群に対して Canals N 78.4±14.6%, CS-N 86.9±10.5%の増殖率が示された。このことから可溶性成分の抗菌効果⁹⁾を考慮しても正常細胞に大きな影響を与えないことが示唆された。

生体材料による根尖部封鎖および硬組織形成を誘導することは、適切な化学的清掃および機械的清掃を行い緊密な根管充填が行われたうえで可能になる。しかしながら、生体材料の維持を長期的に行う目的においても、生体材料上に選択的に硬組織を根尖部に誘導することができれば、良好な治癒成績を期待することが可能である。現在の歯内療法において、歯根破折、歯根吸収や、機械的な破壊によって拡大された根尖孔の物理的な封鎖は困難であるが、そのことが根管治療後、長期間疼痛が消失しない原因の可能性になっている。歯根破折において

は、象牙質接着性を有する根管充填用シーラーを用いることで、破折抵抗性が有意に増強することが報告されている¹⁰⁾。また、根管穿孔や根尖孔破壊などの偶発症に対しても硬組織を誘導する生体材料 (MTA セメント) の臨床応用が行われている¹¹⁾。いずれも根尖封鎖性が歯内療法の臨床成績に関していることが示されている。

結 論

根管充填用シーラーにおけるセメント芽細胞に対する生体親和性と細胞形態学的変化を解析した結果、細胞障害性は低く正常細胞に影響を与えないことが示された。

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) 川島伸之. メディエーターコントロールによる歯髄炎治療. 炎症と免疫 2010; 18: 332-339.
- 2) Shinohara T, Doi T, Saito T, Yoshida T, Sekine I, Mukoyama Y. Chronological changes in root canal filling materials. J Gifu Dent Soc 1993; 20: 33-40.
- 3) 五明俊二, 河野 哲, 吉田隆一, 関根一郎. 硬組織による根尖孔の封鎖例. 日歯保存誌 2007; 50: 350-357.
- 4) 森 昌彦, 江原雄一, 住友伸一郎. 歯根膜について考察する 歯根膜の再生. 日外傷歯誌 2012; 8: 1-16.
- 5) Ingle JL, Oliet S, Carlos EB. 砂田今男 監訳. イングルエンドドンティックス, 2版. 医歯薬出版: 東京; 1982. 32-53.
- 6) 岡村義重. 無菌ラットにおける根管充填後の根尖部創傷治癒について. 日歯保存誌 1992; 35: 147-161.
- 7) 下野正基. 治癒の病理 エンドのゴールを目指して 根尖組織の再生. 阪大歯学誌 1990; 35: 435-437.
- 8) Shirley HHH, Ariffin Z, Alam MK. In vitro study of antibacterial properties of endodontic sealers and medications towards *Streptococcus mutans* and *Enterococcus faecalis*. Int Med J 2013; 20: 493-495.
- 9) 佐藤武則, 鈴木二郎, 横田兼欣, 常川勝由, 浜田信城, 石井信之. 新規開発ペーストタイプ根管充填用シーラーの物理的特性および抗菌効果. 日歯内療誌 2009; 30: 125-131.
- 10) Sagsen B, Uestuen Y, Pala K, Demirbuga S. Resistance to fracture of roots filled with different sealers. Dent Mater J 2012; 31: 528-532.
- 11) 興地隆史. MTA の理化学的・生物学的特性と臨床. 日歯内療誌 2012; 33: 3-13.

The Cytotoxicity of Root Canal Sealer for Human Cementoblasts

SUZUKI Eri, MUTO Noriko and TANI-ISHII Nobuyuki

Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University

Abstract

Purpose: This study aimed to evaluate the cytotoxicity for cementoblasts by the root canal sealer; the biocompatibility was measured from the cell proliferation rate, and morphological changes.

Methods: The human cementoblasts (HCEM) were seeded in 6 well culture plates 1×10^5 cell/well, Canals N, Canal sealer N (CS-N), and Surface Pre Reacted Glass-ionomer (SPRG) in 5% CO₂ conditions. The cultured cells were collected 24, 48 and 72 hours after incubation to measure the number of cells. Cementoblasts after culture were observed using a phase contrast microscope and compared with morphological changes.

Result: The cytotoxic ratio stimulated by root canal sealer was compared to non-stimulated HCEM. The cytotoxic ratio showed there was not a significant difference between control and root canal sealers (Canals N $84.2 \pm 10.0\%$, CS-N $83.4 \pm 11.7\%$, SPRG $77.0 \pm 9.6\%$) after 24 hours. The cell growth ratios by root canal sealers were not different significantly between control and root canal sealers from 24 hours to 72 hours. The cell morphology was not changed by all root canal sealers from 24 hours to 72 hours.

Conclusion: For the cytotoxicity of the root canal sealer for human cementoblasts by a viable cell count measurement and morphological changes, the result of the analysis showed that there was no cytotoxicity.

Key words: cementoblasts, root canal filling sealer, biocompatibility