



Title	レジン系材料が骨芽細胞の増殖、分化ならびに石灰化に及ぼす影響
Author(s)	堀川, 大輔
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/45563
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

レジン系材料が骨芽細胞の増殖，分化ならびに石灰化に
及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻（歯科保存学教室）

（指導教官：恵比須 繁之 教授）

堀川 大輔

レジ系材料が骨芽細胞の増殖，分化ならびに石灰化に
及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科

分子病態口腔科学専攻（歯科保存学教室）

（指導教官：恵比須 繁之 教授）

堀川 大輔

本論文の要旨の一部は、第 117 回日本歯科保存学会 (平成 13 年 11 月, 徳島)

および 81st General Session of International Association for Dental Research (June

2003, Göteborg, Sweden)において発表した。

緒言

レジン系材料は、歯質接着性と審美性を兼ね備えた修復材料として、現在、歯冠部の欠損の修復や補綴治療などに高頻度で使用されている。とくに、近年の製品は、樹脂含浸層の形成を中心とした接着機構により高い象牙質接着性能を示し、露出した象牙質を封鎖するうえでも有効であるとの認識が広まっている¹⁾。以前から、このような歯質接着性にすぐれたレジン系修復材料を、根尖部の封鎖を目的として歯根端切除後の逆根管充填に適用する試みがいくつかなされてきた²⁻⁷⁾が、近年はさらに、歯根破折歯の接着再建・再植法⁸⁻¹¹⁾や穿孔部の封鎖^{12,13)}などへとその用途が拡大されつつある。

ところで、逆根管充填処置や歯根破折歯の接着再建・再植法などにおいては、歯冠修復や補綴治療の場合とは異なり、適用したレジン系材料が上皮下の創傷部に於いて使用されることとなる。したがって、これらの用法を対象とした場合、これまで行われてきたような歯髄に対する安全性の評価¹⁴⁾だけでなく、歯根周囲組織の治癒に及ぼす影響という観点からレジン系材料の有用性を検索する必要がある。しかしながら、この点については、動物実験による病理組織学的検討¹⁵⁻¹⁷⁾がいくつかあるのみで、骨や歯根膜、あるいはセメント質などの再生に関与する細胞への為害性を調べた研究は極めて少なく、細胞レベルでの生体組織の治癒に対するレジン系材料

の影響についてはほとんど解明されていない。

そこで本研究では、三種の異なる組成のレジシン系修復材料を被験対象として、それらが骨芽細胞系細胞の増殖、分化ならびに石灰化に及ぼす影響について、*in vitro* で検討することを目的とした。

材料と方法

細胞および培養方法

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株である MC3T3-E1 細胞 (Riken Cell Bank, 茨城) を、10% ウシ胎仔血清 (FCS ; HyClone, South Logan, UT, USA), 100 units/mL penicillin G (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA), 100 μ g/mL streptomycin (Invitrogen Corp.) を添加した α -Minimum Essential Medium (Invitrogen Corp.) を用いて、37°C, 5%CO₂ 下にて培養した。また、MC3T3-E1 細胞の分化、石灰化を誘導する際には、前述の増殖培地に、50 μ g/mL ascorbic acid (Invitrogen Corp.), 10 mM β -glycerol phosphate (和光純薬, 大阪) および 50 nM dexamethasone (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を添加した分化誘導培地を用いて培養を行った。

マウス筋芽細胞様細胞株である C2C12 細胞 (Riken Cell Bank) は、10%FCS (HyClone), 100 units/mL penicillin G (Invitrogen Corp.), 100 μ g/mL streptomycin (Invitrogen Corp.)

を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (ナカライテスク, 京都) を用いて, 37°C, 5%CO₂ 下にて培養した。

実験 1. 硬化試料上での細胞の付着・増殖と分化活性の検討

1. 被験材料

表 1 に供試したレジン系材料を示す。APX, SB, LC は, それぞれ Bis-GMA/TEGDMA 系コンポジットレジン, MMA/PMMA 系レジンセメントおよびレジンモディファイドガラスアイオノマーセメントとして臨床において頻用される材料である。また, 比較のため, 逆根管充填材として臨床現場で用いられている酸化亜鉛ユージノールセメントの EBA を使用した。

直径 10 mm, 深さ 2 mm のシリコーンモールドに各ペーストを填入し, ポリエステルストリップス (GC, 東京) を介在させて厚さ 1.3 mm のスライドガラスにより圧接した。その後, 光重合型である APX と LC は, 光照射器 (JET LIGHT, モリタ, 京都) を用いて表裏各 40 秒間の光照射を行って硬化させた。化学重合型の SB および EBA は, 室温で 30 分間放置して硬化させた。各硬化試料をエチレンオキシドガス (EOG) にて 55°C, 7 時間の条件で滅菌し, 12 時間のデギャッシングの後, 実験に供した。

2. 付着・増殖試験

48 ウェル細胞培養用プレート (Corning Inc., New York, NY, USA) の各ウェル (直径 10.2 mm) に硬化試料 1 枚を置き, 分化誘導培地を用いて 5×10^4 cells/ウェルとなるように調整した MC3T3-E1 細胞または C2C12 細胞浮遊液 500 μ L を試料上に播種した。3 日ごとに培地を交換しながら 3, 7, 14, 21 日間培養を行った後, 試料を pH7.2 の phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄し, 0.1 M half-Karnovsky 溶液を用いて 30 分間固定した。つづいて, 0.1 M cacodylate buffer (pH7.4) で洗浄し, 上昇 ethanol 系列 (50, 70, 80, 90, 96, 100%) による脱水を行った後, *t*-butyl alcohol に置換した。その後, 凍結乾燥装置 (JFD-310, 日本電子, 東京) を用いて試料を凍結乾燥し, イオンスパッタコーティング装置 (PLASMA MULTI COATER PMC-5000, 盟和商事, 大阪) により白金蒸着を施して, 走査型電子顕微鏡 (SEM ; JEM-840A, 日本電子) を用いて観察を行った。なお, 試料を浸漬していないウェルで培養した場合をコントロールとし, 実験を各試料につき三回繰り返した。

3. 細胞増殖活性および Alkaline Phosphatase (ALP) 活性の測定

細胞の増殖活性は, MTT アッセイにより評価した。付着・増殖試験と同様にして MC3T3-E1 細胞または C2C12 細胞を試料上で培養後, 培地に MTT (tetrazolium

diphenyltetrazolium bromide, 5 mg/mL, Sigma Chemical Co.) 含有 PBS を添加し, 37°C, 5%CO₂ 下にて 4 時間培養した。その後, 20%SDS-0.01 N HCL (ナカライテスク) 含有 PBS を添加して 37°C 下にて 8 時間反応させ, 570 nm における吸光度をマイクロプレートリーダー (Model 550, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA) にて測定した。

ALP 活性は, Bessay ら¹⁸⁾の方法により測定した。付着・増殖試験と同様にして MC3T3-E1 細胞または C2C12 細胞を培養後, PBS にて洗浄し, 0.02 (w/v) % Triton X-100 (和光純薬) 含有 PBS を添加して凍結・融解を二回繰り返して破碎した。その後, 遠心分離 (15000 g, 4°C, 10 分) により得られた上清を用いて, ALP によって分解される基質量を測定した。すなわち, 上清 20 μ L に *p*-nitrophenylphosphate の基質溶液 80 μ L を加え, 37°C にて 30 分間反応させた後, 100 μ L の 0.4 N NaOH を加えて反応を停止させた。反応溶液の 405 nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定し, *p*-nitrophenol 検量曲線により定量した。さらに, 市販キット (BCA Protein Assay Kit, PIERCE, Rockford, IL, USA) を用いて, 上清のタンパク濃度を Smith ら¹⁹⁾の方法に準じて測定し, ALP 活性 (μ mol/min/ μ g) を算出した。細胞増殖活性, ALP 活性測定とも, 試料を置かずに細胞培養用プレートのウェルで培養した場合をコントロールとし, 試料数は各材料につき 5 とした。

4. 硬化試料から溶出する未重合モノマーの同定と定量

48 ウェル細胞培養用プレートのウェルに各硬化試料 1 枚を置き、0.5 mL の滅菌蒸留水を加えて 37°C、5%CO₂ 下にて静置した。3 日ごとに新たな滅菌蒸留水 0.5 mL と交換しながら、回収された液中に含まれるモノマーの濃度を高速液体クロマトグラフィー（HPLC ; LC Module-1, Waters, Milford, MA, USA）により 21 日まで測定した。移動相には 70% acetonitrile 水溶液を使用し、シリカ系カラムである Puresil 5 μ C18（Waters）を用いて、波長 254 nm にてモノマーの検出を行った。溶出したモノマー濃度の定量には絶対検量線法を用いた。試料数は各材料につき 3 とした。

5. 試料浸漬培地の pH 測定

48 ウェル細胞培養用プレートのウェルに各硬化試料 1 枚を置き、0.5 mL の分化誘導培地を加えて 37°C、5%CO₂ 下にて静置した。培地を 3 日ごとに交換しながら、回収された培地の pH 値をフラット型 pH 電極（6261-10C, Horiba, 京都）を用いて 21 日まで測定した。試料を浸漬していない培地をコントロールとし、試料数は各材料につき 3 とした。

実験 2. レジンモノマーが細胞の増殖、分化ならびに石灰化に及ぼす影響の検討

1. 被験材料

実験 1 で各レジン系材料からの溶出が検出された TEGDMA (和光純薬), MMA (和光純薬), HEMA (東京化成工業, 東京) の三種のモノマーと, EBA からの溶出が確認された 4-allyl-2-methoxyphenol (eugenol ; 東京化成工業) を被験材料とした。いずれも各製造社から入手した純度 98%以上のものを使用した。

2. 細胞増殖試験

増殖培地を用いて 5×10^4 cells/ウェルとなるように調整した MC3T3-E1 細胞浮遊液 0.5 mL を 48 ウェル細胞培養用プレートに播種し, 24 時間培養した。細胞がコンフルエントな状態まで増殖していることを確認した後, 各モノマーを添加した分化誘導培地に交換した。添加濃度は, TEGDMA: 100, 50, 10 μ g/mL, MMA: 10, 5, 1 μ g/mL, HEMA: 400, 200, 100, 50 μ g/mL とした。モノマー添加培地で 3 日間培養を行った後, モノマーを含まない分化誘導培地を用いて, 3 日ごとに培地の交換を行いながらさらに培養を継続した。3, 7, 14, 21, 28 日目に, ウェルに付着した細胞を実験 1 での付着・増殖試験と同様にして固定, 脱水, 凍結乾燥し, SEM にて観察した。また, 250, 100, 50 μ g/mL の eugenol を添加した分化誘導培地で継続的に培養した場合についても, 同様にして増殖状態を観察した。実験は, 各モノマーにつき三回行っ

た。

3. 骨分化マーカーの発現の検討

被験モノマーを添加して培養した MC3T3-E1 細胞における骨分化マーカーの発現を、Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法にて検討した。先の増殖試験と同様にして所定時間培養を行った後、細胞を PBS にて洗浄し、TRIzol (Invitrogen Corp.) を加えて細胞から total RNA を抽出した。得られた total RNA 試料 1 μ g を random hexamer (最終濃度 50 mg/L, 宝酒造, 大津) 中に添加して容量を 13 μ L とし、70°C で 10 分間変性させた。氷上にて急冷し、4 μ L の 5 $\times$ buffer, dNTP mixture (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 最終濃度各 1 mM, 宝酒造), および 100 units の逆転写酵素 (ReverTra Ace, 東洋紡, 大阪) を添加して最終容量を 20 μ L に調整し、25°C で 10 分間反応させた後に 42°C で 60 分間逆転写を行い、cDNA を作成した。その後、99°C で 5 分間処理して逆転写酵素を失活させた。得られた cDNA と, type I collagen, osteonectin, osteopontin, bone-sialoprotein (BSP) および osteocalcin の遺伝子特異的プライマー (表 2) を用いて PCR を行った。なお、増幅断片は、1.5% agarose (ナカライテスク) を用いた電気泳動により分離し、ethidium bromide (Sigma Chemical Co.) にて染色を行って、紫外線 (302 nm) 照射下で検出した。モノマーを添加せずに培

養した場合をコントロールとし、実験を三回繰り返した。

4. 石灰化物形成の観察

石灰化物の形成は、Dahl²⁰⁾の方法により検出した。増殖実験と同様の条件で MC3T3-E1 細胞を所定時間培養後、培地を除去して PBS で洗浄し、95% ethanol で 15 分間固定した。その後、1% Alizarin red S 溶液（和光純薬）を用いて 2 分間染色した。蒸留水にて 15 秒間流水洗浄した後、実体顕微鏡（SMZ-U, ニコン, 東京）下で石灰化物の形成状態を観察した。モノマーを添加せずに培養した場合をコントロールとし、実験を三回繰り返した。

実験 3. 酸性環境が細胞の増殖に及ぼす影響の検討

1. レジンモノマー添加培地の pH 測定

TEGDMA, MMA あるいは HEMA を実験 2 と同様の濃度で分化誘導培地に添加し、37℃下にて 30 分間静置後、フラット型 pH 電極を用いて培地の pH 値を測定した。試料数はそれぞれ 3 とした。

2. 低 pH 下での細胞増殖状態の評価

まず、酸の添加と培地の pH 値との関係を調べるために、20 (w/v) %ポリアクリル酸水溶液 (GC) を 1 – 20 mg/mL の濃度で分化誘導培地に添加し、37°C, 5%CO₂ 下にて 1, 2 または 3 日間静置後、培地の pH 値を測定した。

つづいて、 5×10^4 cells/ウェルとなるように調整した MC3T3-E1 細胞浮遊液 0.5 mL を 48 ウェル細胞培養用プレートに播種し、24 時間培養を行った。細胞がコンフルエントな状態まで増殖していることを確認した後、前述の測定結果に基づいてポリアクリル酸水溶液を添加して pH 値を 5.0, 5.6 あるいは 6.0 に調整した分化誘導培地に交換した。3 日間培養後、SEM にて細胞の増殖状態を観察した。

統計分析

有意差の検定は、ANOVA および Scheffe's *F* test を用いて行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

実験 1. 硬化試料上での細胞の付着・増殖と分化活性の検討

1. 付着・増殖試験

硬化試料上における MC3T3-E1 細胞の付着・増殖状態を図 1 に示す。APX と SB では、培養期間を通して良好な細胞の付着と増殖が認められ、コントロールとの間に違いはみられなかった。すなわち、培養開始 3 日後から樹状突起を伸展した細胞の付着が観察され、培養期間の経過に伴って細胞数が増加した。培養 14 日目には、試料全面が扁平状でよく伸展した細胞で密に覆われ、21 日目にはさらに細胞数の増加が認められた。これに対し、LC と EBA では付着・増殖の強い抑制が観察された。すなわち、LC では 3 日間培養後の試料上の細胞は突起のない不正形で、7 日目以降 21 日目まで常に同様の形態の萎縮した細胞が点在するのみであった。また、EBA でも、3-7 日間培養後では球状の細胞の点在が観察され、14 日目以降はさらに細胞数の減少が認められた。

C2C12 細胞についても、結果は MC3T3-E1 細胞と同様であった（図 2）。APX と SB では、3 日目から突起を進展した多数の細胞が付着し、7 日目以降細胞数の増加が認められたのに対し、LC と EBA では、培養期間を通して萎縮した細胞の点在が観察されるのみで、付着・増殖が強く抑制された。なお、三回の実験とも結果は全く同じ

であった。

2. MTT アッセイ

硬化試料上で MC3T3-E1 細胞および C2C12 細胞を培養した場合の MTT アッセイの結果を図 3 に示す。培養期間ごとに各材料の結果をコントロールと比較すると、まず APX では、MC3T3-E1 細胞で 14 日目以後、C2C12 細胞で 7 日目以後に細胞増殖活性の低下が認められた。また、SB では、両細胞とも 7 日目以降は増殖活性が低下した。しかし、LC と EBA では、両細胞とも、全培養期間を通して増殖活性がコントロールよりも有意に低い結果となった。しかも、この二種の材料では、すべての培養期間において APX と SB よりも有意に強い細胞増殖活性の抑制が認められた。

3. ALP 活性

硬化試料上で培養した MC3T3-E1 細胞および C2C12 細胞の ALP 活性を図 4 に示す。MC3T3-E1 細胞を APX あるいは SB 上で培養すると、3, 14, 21 日目に活性の低下が認められたが、LC と EBA ではすべての培養期間を通じてコントロールよりも ALP 活性が有意に低い結果となった。しかもその抑制作用は、常に APX および SB よりも有意に強かった。

C2C12 細胞については、APX と SB では、コントロールとの間に ALP 活性の値に有意差がなく、抑制は認められなかった。しかし、LC と EBA では、すべての培養期間において ALP 活性の有意な低下が認められた。

4. 硬化試料から溶出する未重合モノマーの同定と定量

図 5 に、各硬化試料から溶出した未重合モノマーとその濃度を示す。3 日間の蒸留水浸漬により、APX, SB, LC から、それぞれ、TEGDMA, MMA, HEMA の溶出が検出された。3 日後の溶出濃度は、LC からの HEMA が $401.7 \pm 33.8 \mu\text{g/mL}$ と最も高く、ついで APX からの TEGDMA の $94.6 \pm 10.8 \mu\text{g/mL}$ であり、SB からの MMA は $9.8 \pm 3.9 \mu\text{g/mL}$ と低濃度であった。各モノマーとも、3 日目以降は急激に溶出濃度が低下し、SB からの MMA は 6 日後に、APX からの TEGDMA と LC からの HEMA も 9 日後には検出限界 ($1.0 \mu\text{g/mL}$) 未満の濃度となった。EBA からは、3 – 21 日の浸漬期間中、 $176 - 314 \mu\text{g/mL}$ の持続的な eugenol の溶出が認められた。

5. 試料浸漬培地の pH 測定

図 6 に硬化試料を浸漬した培地の pH 値の経時的変化を示す。APX, SB あるいは EBA を浸漬した場合、3 日から 21 日の間 pH 値の変化は生じず、試料を浸漬してい

ないコントロールと同様の 7.6 前後の値を示した。しかし、LC では、その浸漬により pH 値が 3 日後には 5.6 に低下した。培地交換によって LC 浸漬培地の 6 日目の pH 値は 6.6 となり、その後徐々に pH 値が上昇して、15 日後には約 7.4 を示した。

実験 2. レジンモノマーが細胞の増殖、分化ならびに石灰化に及ぼす影響の検討

1. 細胞増殖試験

各被験モノマー添加群の MC3T3-E1 細胞の増殖状態を図 7, 8, 9 に、eugenol 添加群の増殖状態を図 10 に示す。三回の実験とも結果は全く同じであった。

まず、TEGDMA と MMA については、いずれの添加濃度においても細胞の増殖への影響はみられなかった（図 7, 8）。すなわち、モノマー非添加の場合（実験 1 での付着・増殖試験におけるコントロール、図 1）と同様に、3 日後から突起の伸びた扁平な形態の細胞が増殖し、7 日目以降も順調に細胞数が増加した。HEMA 添加の場合、100 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度では細胞の増殖に影響はみられなかったが、200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では増殖阻害が認められた（図 9）。すなわち、細胞の形態は突起の伸展が阻害された菱形を呈し、培養期間の経過に伴って細胞数は増加したものの、28 日間培養後でも形態、密度ともに明らかな阻害が観察された。また、増殖阻害の程度は、とくに細胞密度の点で、400 $\mu\text{g/mL}$ の HEMA 添加群では 200 $\mu\text{g/mL}$ 添加群より

も大きかった。

eugenol 添加群では、いずれの濃度においても増殖阻害が認められた (図 10)。とくに、100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では、3 日から 28 日まで不正形や球形の細胞が点在する状態が続いた。

2. RT-PCR

各被験モノマー添加群の培養 7, 21, 28 日後の MC3T3-E1 細胞の分化マーカーの発現を図 11, 12, 13 に示す。培養 7 日後 (図 11) と 14 日後においては、いずれのモノマーの存在もマーカーの発現には影響を示さず、コントロールと同様に type I collagen と osteonectin の発現が認められた。21 日間培養後には、コントロールと低濃度の TEGDMA または MMA 添加群では、これら二つのマーカーに加えて BSP の弱い発現が認められたが、HEMA 添加群では、いずれの濃度でも、eugenol 添加群と同様に BSP の発現は観察されなかった (図 12)。28 日間培養後には (図 13), TEGDMA と MMA 添加群では、コントロールと同様に type I collagen と osteonectin に加えて osteocalcin の明瞭な発現が確認された。しかし、100 $\mu\text{g/mL}$ 以上の HEMA の添加によって osteocalcin の発現は抑制され、とくに 200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の HEMA 存在下では強い抑制が観察された。また、低濃度の TEGDMA と MMA 添加群においてのみ

osteopontin が弱く発現した。なお、三回の実験とも結果は同じであった。

3. 石灰化物形成

MC3T3-E1 細胞による石灰化物形成の結果を図 14, 15 に示す。TEGDMA あるいは MMA 添加群では、いずれの濃度でも、モノマー非添加のコントロールと同様に、培養 14 日目から石灰化物形成が始まり、時間経過に伴って石灰化物の量が増加した（図 14）。一方、HEMA 添加群では、100 $\mu\text{g/mL}$ 以下の濃度ではコントロールと同様の結果であったが、200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では、eugenol を添加した場合と同様に強い石灰化物形成阻害が認められ、28 日間培養後でも石灰化物が全く観察されなかった（図 15）。なお、三回の実験とも結果は同じであった。

実験 3. 酸性環境が細胞の増殖に及ぼす影響の検討

1. レジンモノマー添加培地の pH 測定

各被験モノマーあるいは eugenol を添加した培地の pH 値を表 3 に示す。いずれのモノマーを添加しても、培地の pH 値は 7.4–7.7 の範囲にあり、とくに変化は認められなかった。Eugenol についても、その添加による pH 変化は生じなかった。

2. 低 pH 下での細胞増殖状態の評価

表 4 は, ポリアクリル酸水溶液を添加した培地の pH 値を三回の実験の平均値として示したものである。ポリアクリル酸の添加濃度の増加に伴って培地の pH 値が低下し, 13 mg/mL の添加により約 5.6 に下がることが分かった。

上記の結果に基づいて, pH 値を 5.0, 5.6, 6.0 に調整した培地を用いて 3 日間培養を行った MC3T3-E1 細胞の増殖状態を図 16 に示す。pH6.0 下で培養を行った場合は, pH7.6 の場合と同様の良好な細胞の増殖が認められたが, pH5.6 の場合には, 形態には異常はないものの細胞密度がコントロールに比べて低く, 増殖抑制が認められた。pH5.0 では, 細胞に対する強い障害が認められ, 球状の形態をした細胞が観察された。

考察

本研究では、レジン系材料の骨芽細胞に対する影響を検討するにあたり、Clearfil AP-X (APX)、Super-Bond C&B (SB)、ならびに Fuji Ionomer Type II LC (LC) の三種を選択した。APX は、Bis-GMA と TEGDMA が約 7:3 の割合で混合されたベースモノマーに 85 (wt) %のバリウムガラスフィラーが配合されたコンポジットレジンで、現在臨床で使用されている Bis-GMA 系修復用コンポジットレジンの代表的な組成を有している。SB は、フィラーを含まない MMA/PMMA 系レジンセメントであり、酸素の存在下で重合が開始する TBB 触媒系が利用されているため、穿孔部の封鎖や歯根破折歯の接着再建に使用されている⁸⁻¹¹⁾。また、LC は、グラスアイオノマーセメントにレジン成分である HEMA が添加されたレジンモディファイドグラスアイオノマーであり、現在、アマルガムにかわる逆根管充填材として使用されることも少なくない²¹⁾。

一方、実験に使用する細胞としては、本来はセメント芽細胞が最も適当であると考えられる。これは、逆根管充填や歯根破折歯の接着再建・再植法では、セメント質が材料を被覆する形で新生することが理想的な治癒とされるためである。しかし、現時点では cell line 化されたセメント芽細胞株は存在せず^{22,23)}、*in vitro* 実験において安定したセメント芽細胞を使用することは困難である。そのため、本研究では、代

替として主に骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を使用した。MC3T3-E1 細胞は、生体材料との相互作用の解析に高頻度に使用される細胞であり²⁴⁻²⁶⁾、分化マーカーをはじめ、硬組織形成細胞としての特性が十分に解明されているため、増殖や分化能に対する影響を詳細に検討するうえで有用であると判断したからである。

まず実験 1 では、硬化した各レジジン系材料と接触した細胞の付着・増殖、代謝および分化活性を調べることを目的として、硬化試料上で細胞を培養し、SEM による観察、MTT アッセイ、ならびに ALP 活性の測定を行った。その結果、細胞の付着・増殖については、MC3T3-E1 細胞、C2C12 細胞ともに、APX あるいは SB では良好であったのに対し、LC では EBA と同様に強い抑制が認められた（図 1, 2）。骨芽細胞の材料表面への付着にはさまざまな因子が関与するとされている²⁷⁾が、代表的な非特異的因子のひとつに被着体の表面粗さがあげられている^{28,29)}。今回用いた試料は、いずれもストリップスを介してスライドガラスで圧接して作製しており、実験に供した際の表面性状はほぼ同一である。さらに、培地への浸漬後に試料の表面を SEM で観察したところ、浸漬前と変化がなく、三種のレジジン系材料間に細胞の付着に違いをもたらすほどの差は認められなかった（データ非提示）ことから、本実験で確認された試料ごとの細胞付着・増殖性の違いは、表面性状の差に由来するものではないと考えられる。また、MTT アッセイにおいても、SEM での観察結果を反映して、

LC と EBA では、両細胞とも培養期間を通して増殖活性がコントロールよりも有意に低く、APX と SB に比べて明らかに抑制が強いという結果が得られた（図 3）。これらの事実は、LC の表面が toxic であり、細胞が付着し生存していく足場としては APX や SB の方が LC よりも有利であることを示している。ただし、SEM 観察と MTT アッセイの結果は完全には一致せず、APX あるいは SB 上でも 7 日もしくは 14 日以降にある程度の細胞増殖活性の抑制が認められたことから、APX および SB の表面は、MC3T3-E1 細胞や C2C12 細胞の付着・増殖に適しているが、付着した細胞に対してその代謝をいくらか抑制する程度に toxic であると言ってよいであろう。

次に、硬化試料上で培養した細胞の ALP 活性を測定したところ、MC3T3-E1 細胞については、LC または EBA ではすべての培養期間においてコントロールよりも活性が有意に低く、その抑制程度が APX や SB に比べて有意に大きかった（図 4）。ALP 活性は骨芽細胞の分化能の重要な指標として知られている^{24,30,31}。本研究では、単位タンパク量（ $\mu\text{g protein}$ ）あたりの ALP 活性を算出しているため、その値が細胞数の多寡には影響されない。したがって、LC あるいは EBA 上では、単に MC3T3-E1 細胞の増殖が抑制されるだけでなく、分化能そのものも強く阻害されるものと判断された。一方、C2C12 細胞については、材料間の差がより明瞭に表れ、APX と SB 上では ALP 活性は全く抑制されないが、LC と EBA ではすべての培養期間において活

性の明らかな低下が認められた。C2C12 細胞は、筋芽細胞、脂肪細胞、骨芽細胞などに分化可能な未分化間葉系細胞である。とくに BMP などの形態形成因子を添加して培養すると骨芽細胞へと強く誘導される^{32,33)}が、培地に FCS を添加するだけでも ALP 活性を発現するようになることが確認されている^{32, 33)}。そのため、本研究では、M3CT3-E1 細胞よりも幼若な段階の硬組織形成細胞として用いるため、FCS を含む増殖培地で C2C12 細胞を培養する条件で実験を行った。APX および SB は、このような比較的幼若な硬組織形成細胞に対しても、代謝および分化活性への影響が小さい材料であることが分かった。

レジン系材料は、C=C が開裂してポリマーとなり硬化するが、反応の進行に伴って生じる立体構造障害のために 100%の重合は達成されず、水系環境下において硬化体から未重合モノマーが溶出する³⁴⁻³⁸⁾。そこで、各試料からの未重合モノマーの溶出挙動を HPLC を用いて調べたところ、はじめの 3 日間に、APX からは TEGDMA が、SB からは MMA が、LC からは HEMA の溶出が生じることが分かった。とくに、LC からの HEMA の溶出濃度は約 400 $\mu\text{g/mL}$ と高く、APX から溶出する TEGDMA の約 4 倍、SB から溶出する MMA の約 40 倍であった。MMA と HEMA はいずれも水溶性が高いモノマーである³⁹⁾にもかかわらず、LC からの HEMA の溶出が高濃度であったのは、硬化時にガラスイオノマー反応が同時に進行するためレジンの重合が SB

ほど高率には起こりにくいことや、レジンに比べてガラスアイオノマー系材料の方が吸水しやすい⁴⁰⁾ことに起因しているものと思われる。

さらに、試料を浸漬した培地の pH 値を経時的に測定したところ、LC においてのみ変化が認められ、培養開始 3 日後には 5.6 まで低下することが分かった。ガラスアイオノマーセメントでもある LC は、主成分としてポリアクリル酸を含有している。HPLC ではピークの分離が不確実で正確な濃度測定は不可能であった（データ非提示）が、LC 硬化体から比較的高濃度のポリアクリル酸が溶出したものと考えられ、これによって培地の pH が低下したのであろう。これらの事実を考慮すると、LC 上での細胞の付着・増殖、細胞増殖活性および ALP 活性の抑制には、未重合 HEMA の溶出と培地の pH 低下が関与しているのではないかと推測された。

そこで、続いての実験 2 では、各レジン系材料から溶出する未重合モノマーが骨芽細胞系細胞に及ぼす影響を調べることを目的として、レジンモノマー存在下での MC3T3-E1 細胞の増殖、分化および石灰化について検討した。実験の条件は、HPLC 分析で確認された硬化体からの未重合モノマー溶出挙動を考慮して設定した。すなわち、まずモノマー添加濃度については、はじめの 3 日間に各硬化体から溶出するおよその濃度（TEGDMA 100 $\mu\text{g/mL}$, MMA 10 $\mu\text{g/mL}$, HEMA 400 $\mu\text{g/mL}$ ）とそれらを数段階希釈したものとした。また、硬化体からのモノマーの溶出がはじめの 3 日

間でほぼ完了し、それ以後はほとんど溶出が生じなくなる（図 5）ことから、モノマー添加培地での 3 日間の培養後、モノマーを添加していない分化誘導培地に交換して培養を継続する条件を採用した。なお、EBA からは約 180 – 300 $\mu\text{g/mL}$ の eugenol の持続的な溶出が生じることから、eugenol を 250, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で添加した培地で継続的に培養した場合をポジティブコントロールとした。

まず、細胞の増殖については、TEGDMA と MMA では、いずれの濃度で添加しても影響が認められず、モノマー非添加の場合と同様の良好な増殖状態が観察された（図 7, 8）。しかし、HEMA を添加して培養を行った場合、100 $\mu\text{g/mL}$ 以下では影響はなかったが、200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では、形態的にもまた細胞密度の点でも増殖の阻害が認められ、その程度はとくに 400 $\mu\text{g/mL}$ の HEMA 添加群において顕著であった（図 9）。この結果より、硬化した APX あるいは SB からの未重合モノマーは MC3T3-E1 細胞の増殖に影響を与えないが、LC から溶出する濃度の HEMA の存在は細胞の増殖阻害を生じることが明らかとなり、実験 1 で確認された LC 上での細胞の付着と増殖の阻害の一因が HEMA の溶出であるものと判断された。一方、eugenol 添加での非常に強い細胞増殖阻害の結果は、線維芽細胞や象牙芽細胞に対して強い毒性を有する eugenol⁴¹⁻⁴³⁾の持続的な溶出が EBA 上での細胞の付着・増殖抑制をもたらしたことを示しているが、400 $\mu\text{g/mL}$ の HEMA 添加群においては eugenol ほどの強

い影響が認められなかった。したがって、EBAと同程度に強いLCによる細胞の付着・増殖阻害には、HEMA以外の要因も関与していることがうかがえた。

MC3T3-E1細胞の骨分化マーカーの発現に関してもHEMAの存在による影響が確認され、とくに200 $\mu\text{g/mL}$ 以上のHEMA添加群では、osteocalcinの明瞭な発現抑制が認められた(図13)。さらに、石灰化物形成の観察結果もRT-PCRの結果とほぼ合致しており、TEGDMAあるいはMMAは、被験したいずれの濃度でも影響を及ぼさないが、200 $\mu\text{g/mL}$ 以上のHEMAの存在は強い骨様硬組織形成の抑制を引き起こした(図15)。すなわち、LCから溶出する濃度のHEMAは、骨芽細胞の分化の過程に対してもtoxicに働き、その結果として石灰化物形成阻害をもたらすことが明らかとなった。

線維芽細胞や歯肉細胞、あるいは歯髄細胞に対するHEMAのLD50値は230–327 $\mu\text{g/mL}$ であると報告されている⁴⁴⁾。細胞の種類が異なると毒性物質に対する感受性も異なるが、200 $\mu\text{g/mL}$ 以上のHEMAがMC3T3-E1細胞にtoxicに働き、その増殖や分化に抑制的に作用することは十分うなづける。400 $\mu\text{g/mL}$ のHEMAの存在下ではより明確な抑制作用が確認されたことから、LCからの高濃度のHEMAの溶出が、骨芽細胞系細胞の機能に根本的な障害を引き起こした原因の一つであると考えてよいであろう。一方、TEGDMAの細胞毒性に関しても多くの研究がなされており⁴⁴⁻⁴⁶⁾、

線維芽細胞や歯肉細胞、および歯髄細胞に対する LD50 の値は 34.3 – 74.4 $\mu\text{g/mL}$ であるとされている⁴⁴⁾。したがって、実験 1 で認められた APX による細胞増殖活性と ALP 活性の若干の低下には、約 95 $\mu\text{g/mL}$ という濃度の TEGDMA の溶出が関与していることが考えられる。ただし、分化マーカーの osteocalcin の発現に関しては、100 $\mu\text{g/mL}$ の TEGDMA の添加では抑制されず、同じ濃度の HEMA 存在下では抑制される結果となった。前述のように、線維芽細胞系の細胞に対する TEGDMA の LD50 値は HEMA のそれよりも小さく、細胞に対する毒性は一般的に TEGDMA の方が強い。それにもかかわらず、特定のマーカーへの影響が HEMA のみで認められたという事実は、toxic な作用以外に、HEMA が遺伝子レベルで特異的な作用を及ぼしている可能性を示唆しており、転写因子への影響など、この点についてのより詳細な検討が今後必要である。

Taira ら⁴⁷⁾は、MC3T3-E1 細胞に対する MMA の毒性について検討し、LD50 値が 1.6 mg/mL であったと報告している。SB からの未重合 MMA の溶出濃度はこの値に比べるとはるかに小さく、実際に 10 $\mu\text{g/mL}$ という低濃度の MMA は MC3T3-E1 細胞の増殖や分化能、石灰化能には全く影響を示さなかった。ただし、APX と同様に、SB 上で培養した場合には、骨芽細胞系細胞の増殖活性と分化がわずかに抑制されたことから、MMA 以外の微量溶出成分がいくらか toxic に働いた可能性がある。SB に

は、歯髄細胞に対して毒性を示す 4-META や TBB^{48,49)}が含まれており、これらの成分の溶出が影響を及ぼした一因ではないかと推察される。

実験 2 の結果から、LC による骨芽細胞系細胞の増殖と分化の抑制の原因のひとつが HEMA の溶出であることが明らかとなったが、SEM で観察された LC 上での細胞の障害程度が 400 $\mu\text{g/mL}$ の HEMA 存在下で培養した場合と完全に一致しないことより、未重合モノマー以外の他の因子の関与が推測された。とくに、実験 1 で認められた培地の酸性化が細胞に影響を及ぼした可能性が高い。そこで、低 pH 環境での細胞の増殖状態について検討したところ、LC の浸漬によってもたらされる pH5.6 の環境下では MC3T3-E1 細胞の増殖抑制が生じることが確認された。モノマー添加培地の pH 測定でも示されたように、HEMA は酸性を示すモノマーではないため、実際に培地に添加しても TEGDMA や MMA と同様に pH 変化は起こらない。したがって、LC からポリアクリル酸の溶出が生じ、それによってもたらされた pH 低下が骨芽細胞系細胞に非特異的な障害を与えたものと考えてよいであろう。一方、今回は溶出濃度を定量できなかったためその関連性を正確に判定できないが、pH 低下だけでなく、ポリアクリル酸分子そのものが細胞毒性を発現することも報告されている^{50,51)}。pH5.6 レベルの酸性環境では、MC3T3-E1 細胞の形態に異常が生じるほどの影響は認められなかったことを考慮すると、LC 表面の EBA と同程度の toxic な作用は、溶出

する HEMA とポリアクリル酸, pH 低下といった複数の要因があいまった結果である
ものと判断される。

本研究では、被験試料を EOG 滅菌して実験に供したが、作製直後の試料と EOG 滅菌した試料からのモノマー溶出性を比較したところ、未重合モノマーの溶出濃度には差が認められなかった（データ非提示）。したがって、試料を細胞と接触させるまでにある程度の時間が経過したことやガス滅菌処理そのものは重合率には影響を与えなかったと考えてよい。しかし、細胞を用いた *in vitro* 実験は、条件を単純化して組み立てられており、*in vivo* での環境を直接的に反映するものではないため、本研究で被験したレジン系材料が生体内で使用された場合には、今回使用した試料とは重合程度が異なる可能性がある。例えば、逆根管充填処置に際しては、術野が湿潤状態になりやすいことや、光照射の方向が制限されることなどから、適用した材料の重合率は *in vitro* 実験の場合よりも低くなりがちである。また、マトリックスによる材料の圧接は通常行われないので、表面の酸素による重合阻害層の厚みが大きくなり、より多くのモノマーが溶出する可能性も考えられる。すなわち、硬化の条件という点では *in vivo* は *in vitro* よりも不利であり、重合率の低下によって溶出する成分が増加し、細胞への影響がより強く現れることが予想される。もちろん、生体は細胞培養のような微少な閉鎖空間ではないため、創傷部局所での溶出成分の濃度は

in vitro の場合よりも低くなるかも知れない。しかし、生体組織内では、培地中のような水系環境よりも溶出成分の拡散が生じにくく、滞留した高濃度の溶出成分と細胞との接触が一定期間維持されることも考えられ、本研究で明らかとなったような細胞の反応が材料表面やその近傍で引き起こされることは十分に想定される。

本研究の結果からすれば、硬組織形成細胞への影響という点では、三種のレジン系材料のうちでは、Bis-GMA/TEGDMA 系レジンである APX と MMA/PMMA 系レジンである SB がレジンモディファイドグラスアイオノマーである LC よりも、細胞親和性が高いと結論づけることができる。Andreasen ら¹⁹⁾が Bis-GMA 系コンポジットレジンである Retroplast と接着システムを用いてサルの歯に逆根管充填を行い、病理組織学的に評価した研究では、コンポジットレジン上へのセメント質の増生が観察されており、今回の APX に対する良好な細胞反応の結果とも一致している。使用する材料の辺縁封鎖性だけでなく、硬組織形成細胞との親和性も、逆根管充填や接着再建・再植法などにおいてセメント質の被覆による理想的な治癒を達成するための重要な因子であると考えてよいであろう。

結論

本研究では、三種のレジン系修復材料（APX, SB, LC）が骨芽細胞系細胞の増殖、分化、および石灰化に及ぼす影響を *in vitro* において検討し、以下のような結論を得た。

1. 硬化した APX あるいは SB 上では、MC3T3-E1 細胞および C2C12 細胞の良好な付着と増殖が認められ、細胞増殖活性や ALP 活性への影響も少なかったのに対し、LC 上では、両細胞の付着・増殖ならびに ALP 活性が強く抑制された。
2. APX, SB, LC からは、それぞれ約 95 $\mu\text{g/mL}$ の TEGDMA、約 10 $\mu\text{g/mL}$ の MMA、約 400 $\mu\text{g/mL}$ の HEMA の溶出が認められた。また、LC では、その浸漬により培地の pH 低下が生じた。
3. 硬化レジンから溶出する濃度の TEGDMA あるいは MMA は、MC3T3-E1 細胞の増殖、骨分化マーカーの発現や石灰化物形成に影響を与えなかった。しかし、HEMA の場合、200 $\mu\text{g/mL}$ 以上の濃度では MC3T3-E1 細胞の増殖が阻害され、osteocalcin の発現抑制と強い石灰化物形成阻害が生じた。
4. LC の浸漬によりもたらされる培地の pH 低下は、MC3T3-E1 の増殖抑制を生じるレベルであることが確認された。

以上の結果より、Bis-GMA/TEGDMA 系コンポジットレジンである APX および

MMA/PMMA 系レジンセメントである SB は、レジンモディファイドグラスアイオノマーである LC に比べて骨芽細胞系細胞への為害性が少なく、逆根管充填や歯根破折歯の接着再建・再植法などに応用した場合、歯根周囲組織の治癒に及ぼす悪影響が小さい材料である可能性が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導とご校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）恵比須繁之教授に甚大なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり多大なご指導、ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 今里 聡助教授、故 江原 篤博士に心から感謝の意を表します。最後になりましたが、終始暖かいご援助をいただきました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) Nakabayashi, N., Pashley, D.H. (1998): Hybridization of dental hard tissues. Quintessence Publishing Co., Tokyo.
- 2) Rud, J., Munksgaard, E.C., Andreasen, J.O., Rud, V. (1991): Retrograde root filling with composite and a dentin-bonding agent. 2. *Endod Dent Traumatol*, **7**, 126-131.
- 3) Andreasen, J.O., Munksgaard, E.C., Fredebo, L., Rud, J. (1993): Periodontal tissue regeneration including cementogenesis adjacent to dentin-bonded retrograde composite fillings in humans. *J Endod*, **19**, 151-153.
- 4) Rud, J., Rud, V., Munksgaard, E.C. (1996): Long-term evaluation of retrograde root filling with dentin-bonded resin composite. *J Endod*, **22**, 90-93.
- 5) Rud, J., Rud, V., Munksgaard, E.C. (1996): Retrograde root filling with dentin-bonded modified resin composite. *J Endod*, **22**, 477-480.
- 6) Rud, J., Rud, V., Munksgaard, E.C. (2001): Periapical healing of mandibular molars after root-end sealing with dentine-bonded composite. *Int Endod J*, **34**, 285-292.
- 7) 管谷 勉, 野口裕史, 長谷川有紀子, 田中裕子, 川浪雅光 (2001): 歯根端切除時に 4-META/MMA-TBB レジン を root-end sealant として用いた場合の臨床成績. 日歯保存誌, **45**, 62-67, 平成 13.
- 8) 真坂信夫 (1995): 垂直破折歯の接着修復保存 - 接着修復保存症例の長期臨床経過 -. 接着歯学, **13**, 156-170, 平成 7.
- 9) Hayashi, M., Kinomoto, Y., Miura, M., Sato, I., Takeshige, F., Ebisu, S. (2002): Short-term evaluation of intentional replantation of vertically fractured roots reconstructed with dentin-bonded resin. *J Endod*, **28**, 120-124.

- 10) Kudou, Y., Kubota, M. (2003): Replantation with intentional rotation of a complete vertically fractured root using adhesive resin cement. *Dent Traumatol*, **19**, 115-117.
- 11) Hayashi, M., Kinomoto, Y., Takeshige, F., Ebisu, S. (2004): Prognosis of intentional replantation of vertically fractured roots reconstructed with dentin-bonded resin. *J Endod*, **30**, 145-148.
- 12) Rud, J., Rud, V., Munksgaard, E.C. (1998): Retrograde sealing of accidental root perforations with dentin-bonded composite resin. *J Endod*, **24**, 671-677.
- 13) 浮舟宣武 (1999): 意図的再植術の新しい可能性 - 歯質接着性コンポジットレジンをを用いた歯根穿孔部の処置 -. 日歯保存誌, **42**, 368-377, 平成 11.
- 14) Geurtsen, W. (2000): Biocompatibility of resin-modified filling materials. *Crit Rev Oral Biol Med*, **11**, 333-355.
- 15) Rud, J., Munksgaard, E.C., Andreasen, J.O., Rud, V., Asmussen, E. (1991): Retrograde root filling with composite and a dentin-bonding agent. 1. *Endod Dent Traumatol*, **7**, 118-125.
- 16) Trope, M., Lost, C., Schmitz, H.J., Friedman, S. (1996): Healing of apical periodontitis in dogs after apicoectomy and retrofilling with various filling materials. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **81**, 221-228.
- 17) Maeda, H., Hashiguchi, I., Nakamuta, H., Toriya, Y., Wada, N., Akamine, A. (1999): Histological study of periapical tissue healing in the rat molar after retrofilling with various materials. *J Endod*, **25**, 38-42.
- 18) Bessay, O., Lowry, O.H., Brock, M. J. (1946): A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem*, **260**, 13029-13034.
- 19) Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C. (1985): Measurement of

protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, **150**, 76-85.

20) Dahl, L.K. (1952): A simple and sensitive histochemical method for calcium. *Proc Soc Exp Biol Med*, **80**, 474-479.

21) Duprez, J.P., Bouvier, D., Bittar, E. (2004): Infected immature teeth treated with surgical endodontic treatment and root-reinforcing technique with glass ionomer cement. *Dent Traumatol*, **20**, 233-240.

22) Grzesik, W.J., Narayanan, A.S. (2002): Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med*, **13**, 474-484.

23) Handa, K., Saito, M., Yamauchi, M., Kiyono, T., Sato, S., Teranaka, T., Sampath, N. A. (2002): Cementum matrix formation in vivo by cultured dental follicle cells. *Bone*, **31**, 606-611.

24) Matsumoto, T., Kawakami, M., Kuribayashi, K., Takenaka, T., Minamide, A., Tamaki, T. (1999): Effects of sintered bovine bone on cell proliferation, collagen synthesis, and osteoblastic expression in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *J Orthop Res*, **17**, 586-592.

25) Kikuchi, M., Tanaka, J., Koyama, Y., Takakuda, K. (1999): Cell culture test of TCP/CPLA composite. *Biomed Mater Res*, **48**, 108-110.

26) Ogata, K., Imazato, S., Ehara, A., Ebisu, S., Kinomoto, Y., Nakano, T., Umakoshi, Y. (2005): Comparison of osteoblast responses to hydroxyapatite and hydroxyapatite/soluble calcium phosphate composites. *J Biomed Mater Res*, **72A**, 127-135.

27) Anselme, K. (2000): Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, **21**, 667-681.

28) Lampin, M., Warocquier, C., Legris, C., Degrange, M., Sigot-Luizard, M.F. (1997): Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion, and cell migration. *J Biomed Mater Res*, **36**, 99-108.

- 29) Hatano, K., Inoue, H., Kojo, T., Matsunaga, T., Tsujisawa, T., Uchiyama, C., Uchida, Y. (1999): Effect of surface roughness on proliferation and alkaline phosphatase expression of rat calvarial cells cultured on polystyrene. *Bone*, **25**, 439-445.
- 30) Beck, G.R., Jr., Sullivan, E.C., Moran, E., Zerler, B. (1998): Relationship between alkaline phosphatase levels, osteopontin expression, and mineralization in differentiating MC3T3-E1 osteoblasts. *J Cell Biochem*, **68**, 269-280.
- 31) Malaval, L., Liu, F., Roche, P., Aubin, J.E. (1999): Kinetics of osteoprogenitor proliferation and osteoblast differentiation in vitro. *J Cell Biochem*, **74**, 616-627.
- 32) Yang, X.L., Matsuura, H., Fu, Y., Sugiyama, T., Miura, N. (2000): MFH-1 is required for bone morphogenetic protein-2-induced osteoblastic differentiation of C2C12 myoblasts. *FEBS Lett*, **470**, 29-34.
- 33) Ohyama, M., Suzuki, N., Yamaguchi, Y., Maeno, M., Otsuka, K., Ito, K. (2002): Effect of enamel matrix derivative on the differentiation of C2C12 cells. *J Periodontol*, **73**, 543-550.
- 34) 今里 聡, 横田若生, 樽味 寿, 鳥居光男, 土谷裕彦 (1991): コンポジットレジン修復物からのモノマー溶出性 - 特にボンディング層の透過性について -. 歯材器, **10**, 601-605, 平成 3.
- 35) Ferracane, J.L. (1994): Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil*, **21**, 441-452.
- 36) 樽味 寿, 今里 聡, 横田若生, 平栗英樹, 小林恭子, 小田晃三, 鳥居光男, 土谷裕彦 (1994): Bis-GMA 系コンポジットレジンにおける TEGDMA 配合量がモノマー溶出濃度と細胞毒性に及ぼす影響. 日歯保存誌, **37**, 1435-1442, 平成 6.
- 37) Spahl, W., Budzikiewicz, H., Geurtsen, W. (1998): Determination of leachable components from four commercial dental composites by gas and liquid chromatography/mass spectrometry. *J Dent*, **26**, 137-145.

- 38) Bagis, Y.H., Rueggeberg, F.A. (2000): The effect of post-cure heating on residual, unreacted monomer in a commercial resin composite. *Dent Mater*, **16**, 244-247.
- 39) Kawai, K., Torii, M., Tsuchitani, Y. (1998): Measurement of water solubility of resin components by means of high performance liquid chromatography. *J Osaka Univ Dent Sch*, **28**, 153-160.
- 40) Iwami, Y., Yamamoto, H., Sato, W., Kawai, K., Torii, M., Ebisu, S. (1998): Weight change of various light-cured restorative materials after water immersion. *Oper Dent*, **23**, 132-137.
- 41) Costa, C.A., Vaerten, M.A., Edwards, C.A., Hanks, C.T. (1999): Cytotoxic effects of current dental adhesive system on immortalized odontoblast cell line MDPC-23. *Dent Mater*, **15**, 434-441.
- 42) Chen, C.C., Chen, R.C., Huang, S.T. (2002): Enzymatic responses of human deciduous pulpal fibroblasts to dental restorative materials. *J Biomed Mater Res*, **60**, 452-457.
- 43) Bonson, S., Jeansonne, B.G., Lallier, T.E. (2004): Root-end filling materials alter fibroblast differentiation. *J Dent Res*, **83**, 408-413.
- 44) Geurtsen, W., Lehmann, F., Spahl, W., Leyhausen, G. (1998): Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res*, **41**, 474-480.
- 45) Lena, S., Mathieu, L., Katia, B., Esmat, S.M., Michel, G., Axel, P. (2002): TEGDMA-induced toxicity in human fibroblast is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *J Biomed Mater Res*, **66**, 476-482.
- 46) Thonemann, B., Schmalz, G., Hiller, K.A., Schweikl, H. (2002): Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Mater*, **18**, 318-323.

- 47) Taira, M., Nakao, H., Matsumoto, T., Takahashi, J. (2000): Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Int J Prosthodont*, **13**, 311-315.
- 48) Inoue, T., Miyakoshi, S., Shimono, M. (2001): The in vitro and in vivo influence of 4-META/MMA-TBB resin components on dental pulp tissues. *Adv Dent Res*, **15**, 101-104.
- 49) Fujisawa, S., Atsumi, T. (2004): Cytotoxicities of a 4-META/MMA-TBBO resin against human pulp fibroblasts. *Dent Mater J*, **23**, 106-108.
- 50) 曾川清志 (1981): グラスアイオノマーセメントの細胞毒性の発現機構に関する実験的研究 (*in vitro*). 歯理工誌, **22**, 172-186, 昭和 56.
- 51) 榎本貢三, 渡辺清子, 倉田茂昭, 梅本俊夫, 磯辺俊明 (1999): ポリアクリル酸の細胞毒性と炎症性サイトカイン産生誘導能. 歯材器, **18**, 1-7, 平成 11.

表1 被験材料

材料	略号	製造社（所在地）	主要成分
Clearfil AP-X	APX	クラレメディカル（東京）	Bis-GMA ^a TEGDMA ^b バリウムガラスフィラー
Super-Bond C&B	SB	サンメディカル（守山）	MMA ^c PMMA ^d 4-META ^e TBB ^f
Fuji Ionomer Type II LC	LC	GC（東京）	HEMA ^g ポリアクリル酸 アルミノシリケートガラス
Super EBA	EBA	Bosworth（Skokie, IL, USA）	eugenol 安息香酸 酸化亜鉛 アルミナ

^a2,2-bis[4(2-hydroxy-3-methacryloyloxy)-phenyl]propane
^btriethylene glycol dimethacrylate
^cmethyl methacrylate
^dpolymethyl methacrylate

^e4-methacryloxyethyl trimellitate anhydride
^ftri-n-butyl-borane
^g2-hydroxyethyl methacrylate

表2 骨分化マーカーのmRNA検出用PCRプライマーとPCRサイクル数

type I collagen	upstream	5'-gaggcataaagggcatcgtgg-3'	25サイクル
	downstream	5'-cattaggcgcaggaaggtcagc-3'	
osteonectin	upstream	5'-cgccccctgcctggattccg-3'	25サイクル
	downstream	5'-gatcaccagatccttggtgatgtcctgc-3'	
osteopontin	upstream	5'-ctgctagtagacacaagcagaca-3'	30サイクル
	downstream	5'-catgagaaattcggaatttcag-3'	
BSP	upstream	5'-accggccacgctactttcttt-3'	25サイクル
	downstream	5'-gaccgccagctcggtttca-3'	
osteocalcin	upstream	5'-ctggccctggctgcgctctgt-3'	30サイクル
	downstream	5'-ggtcctaaatagtgataccgtagatgcg-3'	

表3 各モノマーあるいはeugenolを添加した培地のpH値

TEGDMA	100μg/mL	50μg/mL	10μg/mL	-
pH値	7.61	7.60	7.71	-
MMA	10μg/mL	5μg/mL	1μg/mL	-
pH値	7.69	7.61	7.73	-
HEMA	400μg/mL	200μg/mL	100μg/mL	50μg/mL
pH値	7.44	7.57	7.47	7.53
eugenol	250μg/mL	100μg/mL	50μg/mL	-
pH値	7.66	7.66	7.54	-

表4 ポリアクリル酸水溶液を添加した培地のpH値

濃度 (mg/mL)	1日後	2日後	3日後
1	7.34	7.45	7.50
2	6.00	6.64	6.65
3	5.79	6.62	6.62
4	5.79	6.61	6.61
5	5.65	6.59	6.61
6	5.62	6.23	6.24
8	5.60	6.10	6.09
10	5.54	5.89	5.90
13	5.35	5.60	5.59
15	5.20	5.20	5.19
18	4.88	4.89	4.90
20	4.76	4.76	4.76

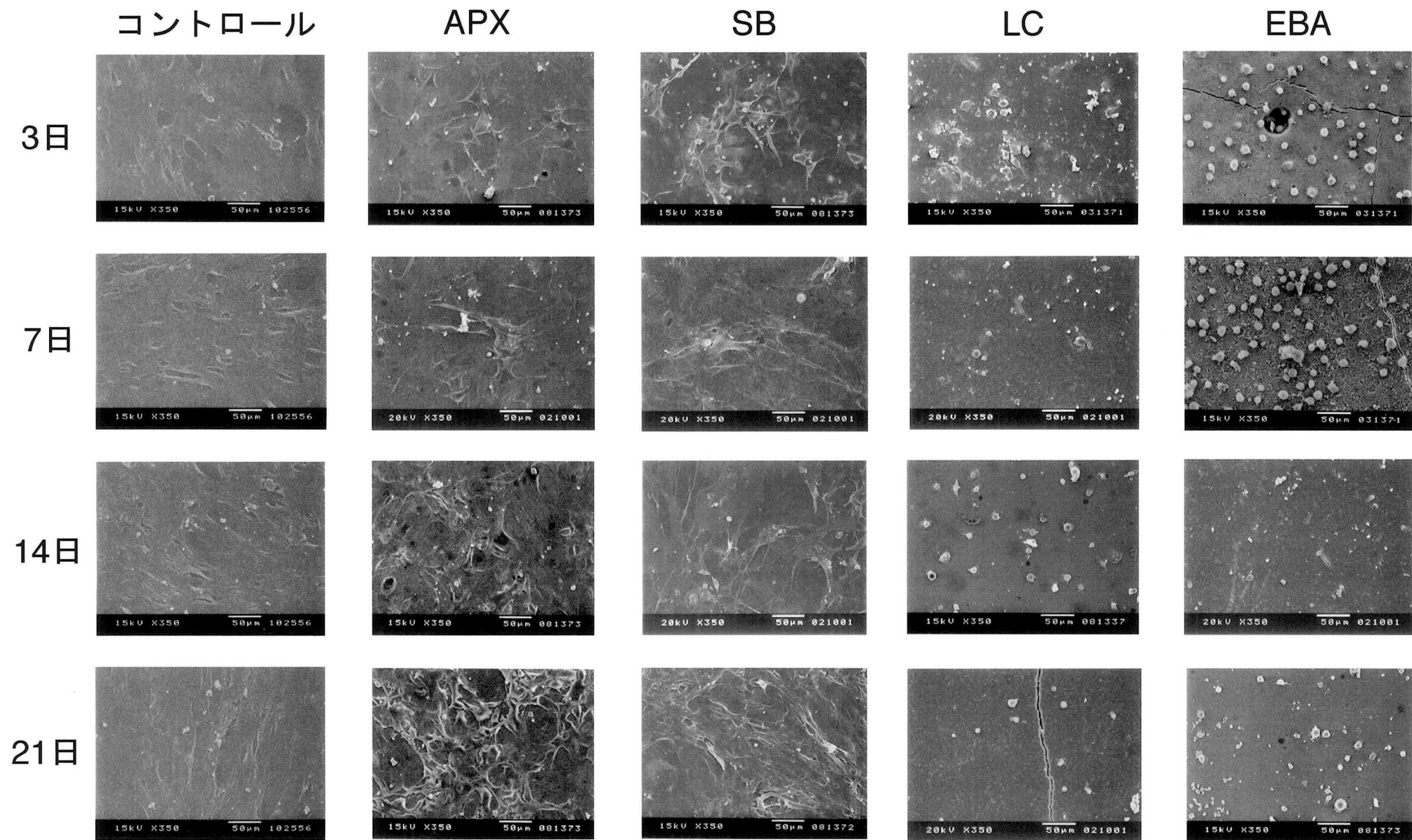


図1 硬化試料上におけるMC3T3-E1細胞の付着・増殖状態（×350）

コントロール：試料を浸漬せずに細胞培養用プレートで培養した場合

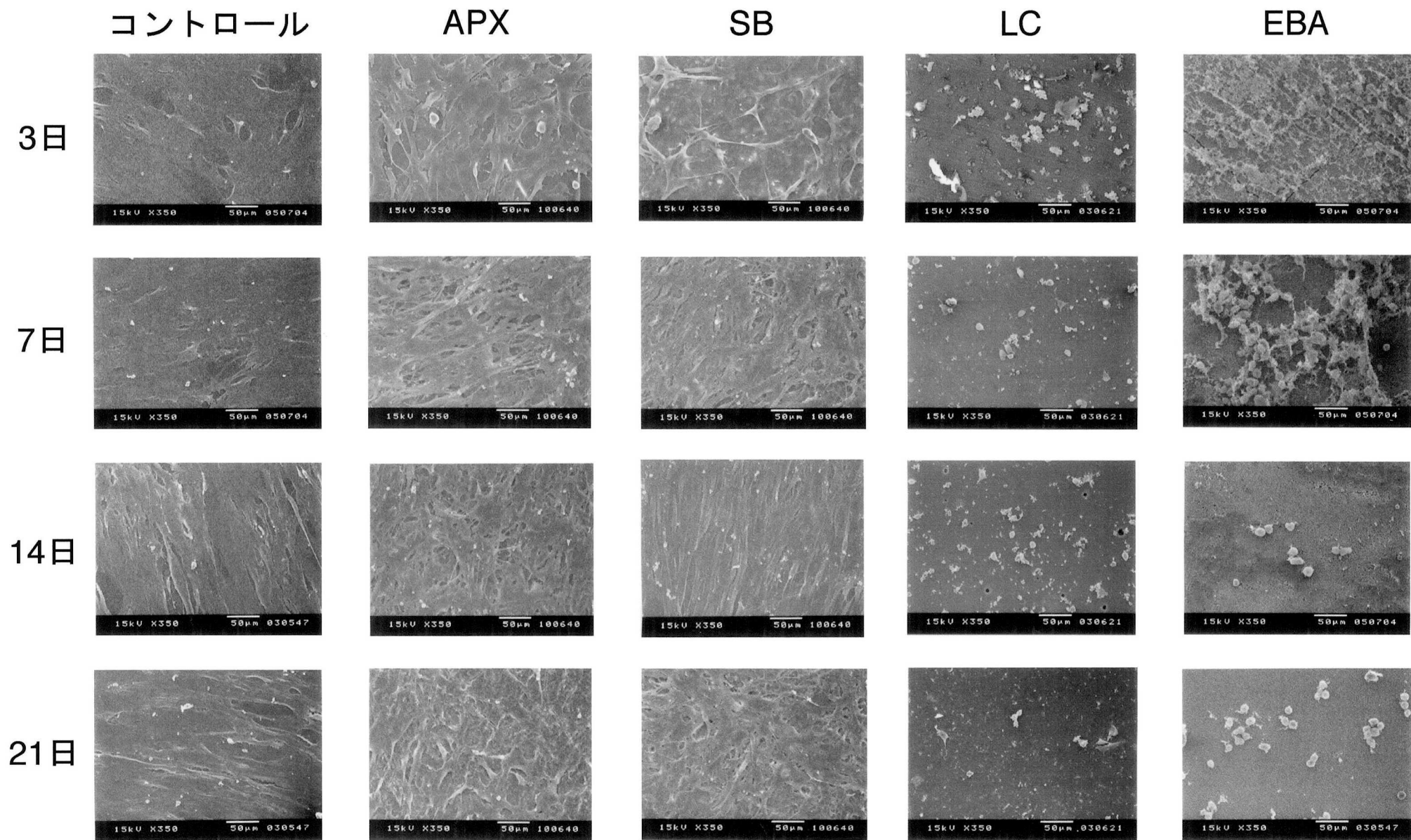


図2 硬化試料上におけるC2C12細胞の付着・増殖状態 (×350)
 コントロール：試料を浸漬せずに細胞培養用プレートで培養した場合

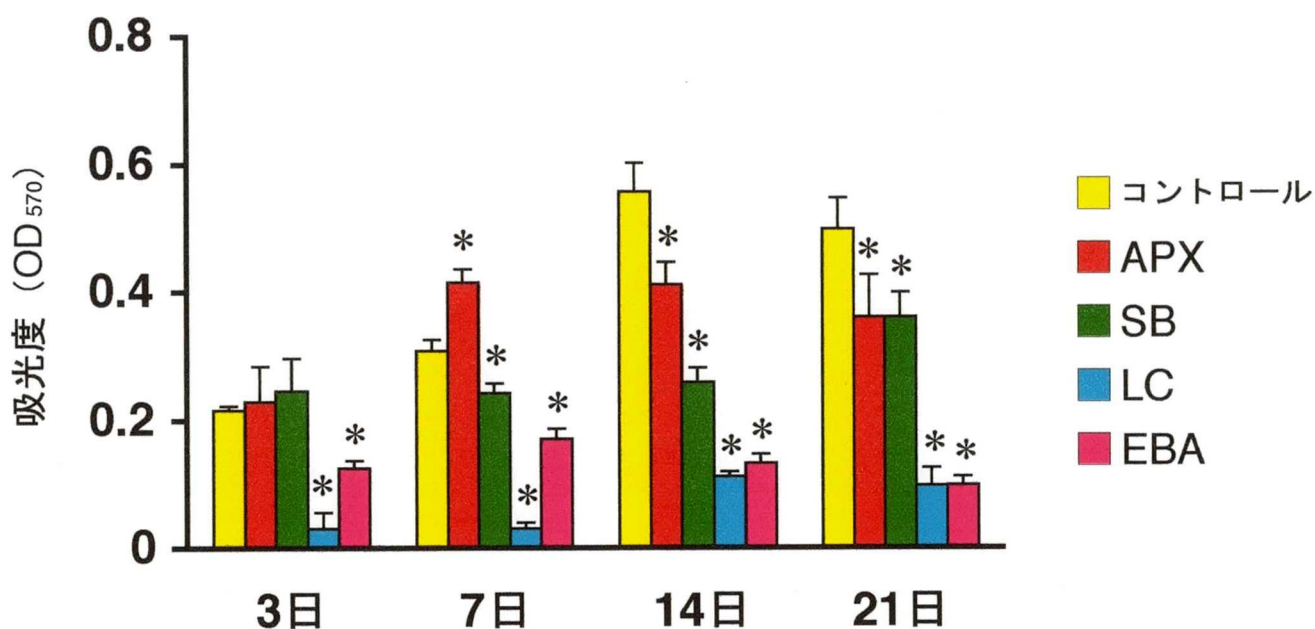
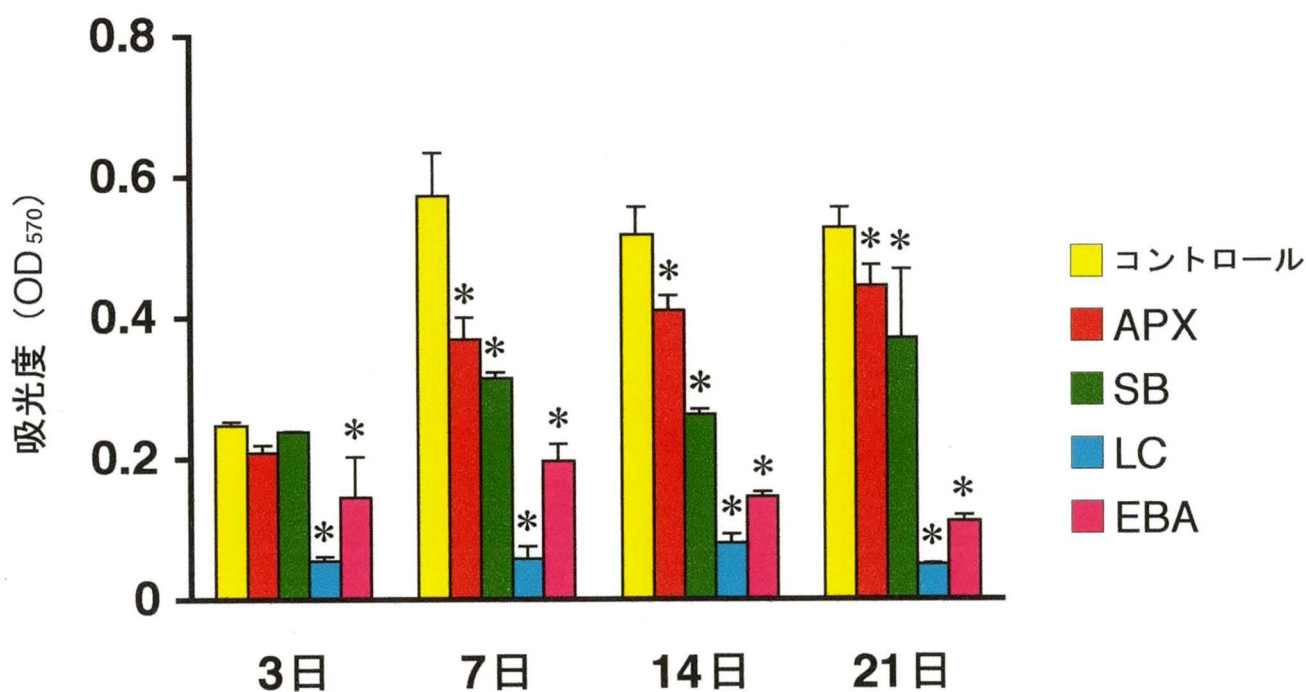
A**B**

図3 硬化試料上で培養した場合のMTT アッセイの結果

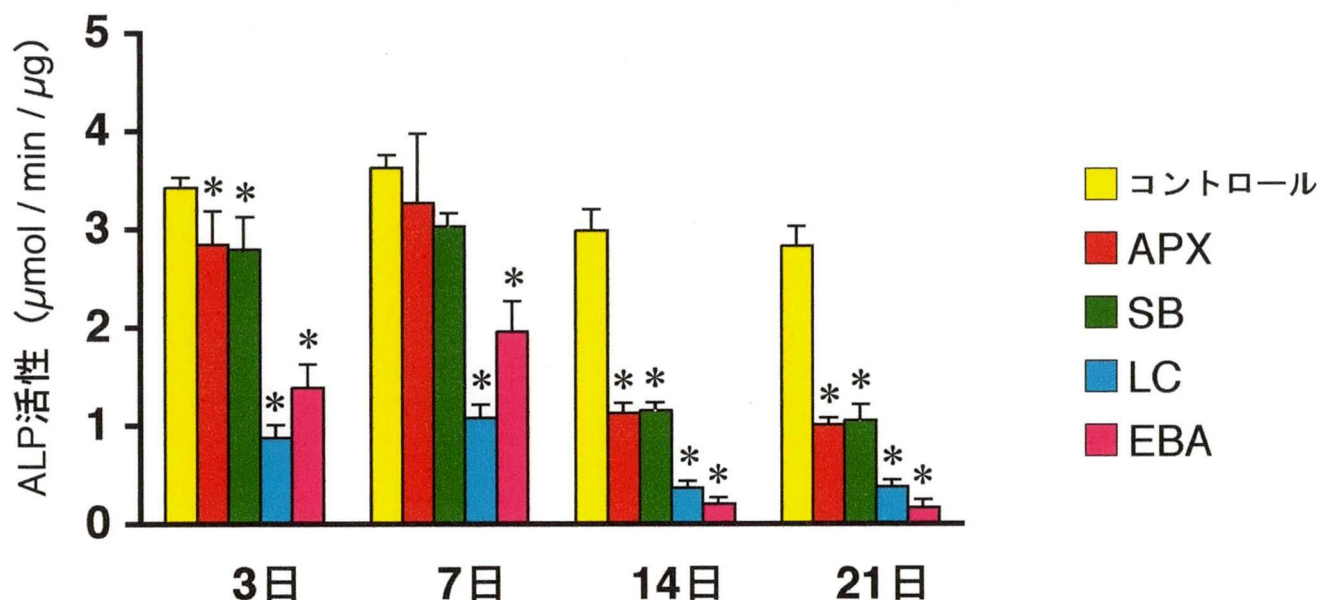
A: MC3T3-E1細胞 B: C2C12細胞

各値は、平均値+標準偏差 (n=5) で示す

コントロール: 試料を浸漬せずに細胞培養用プレートで培養した場合

*: 各培養期間におけるコントロールとの比較において有意差を認める
(ANOVAおよびScheffe's *F* test, $p < 0.05$)

A



B

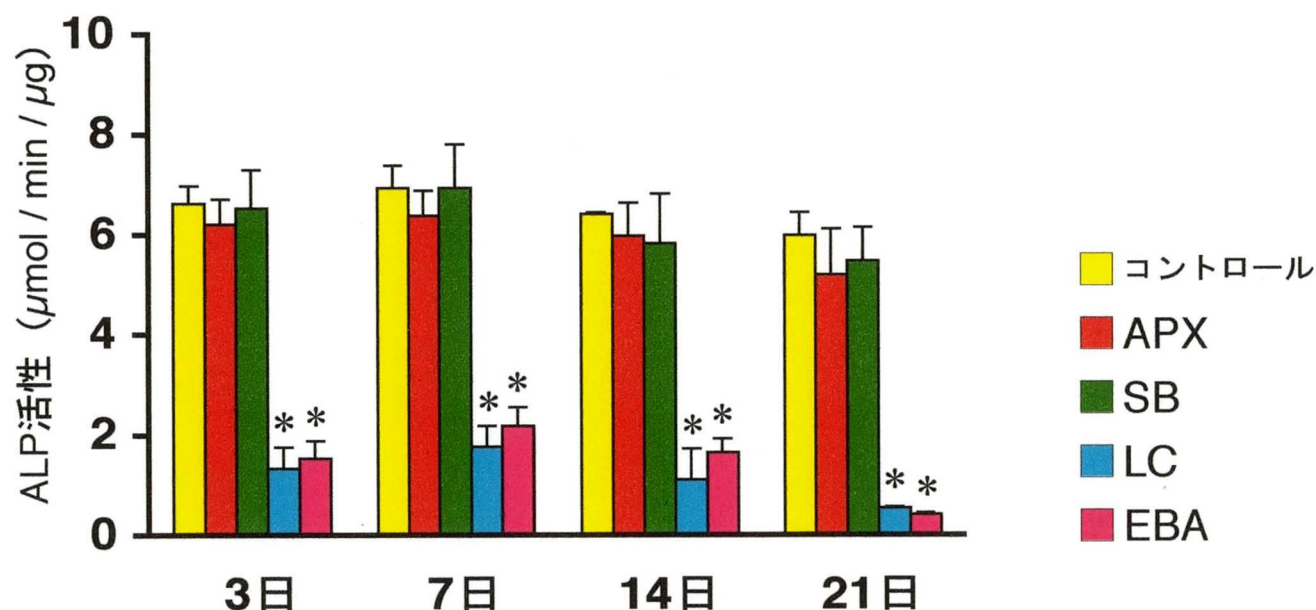


図4 硬化試料上で培養した細胞のALP活性

A: MC3T3-E1細胞 B: C2C12細胞

各値は、平均値+標準偏差 (n=5) で示す

コントロール: 試料を浸漬せずに細胞培養用プレートで培養した場合

*: 各培養期間におけるコントロールとの比較において有意差を認める
(ANOVAおよびScheffe's F test, $p < 0.05$)

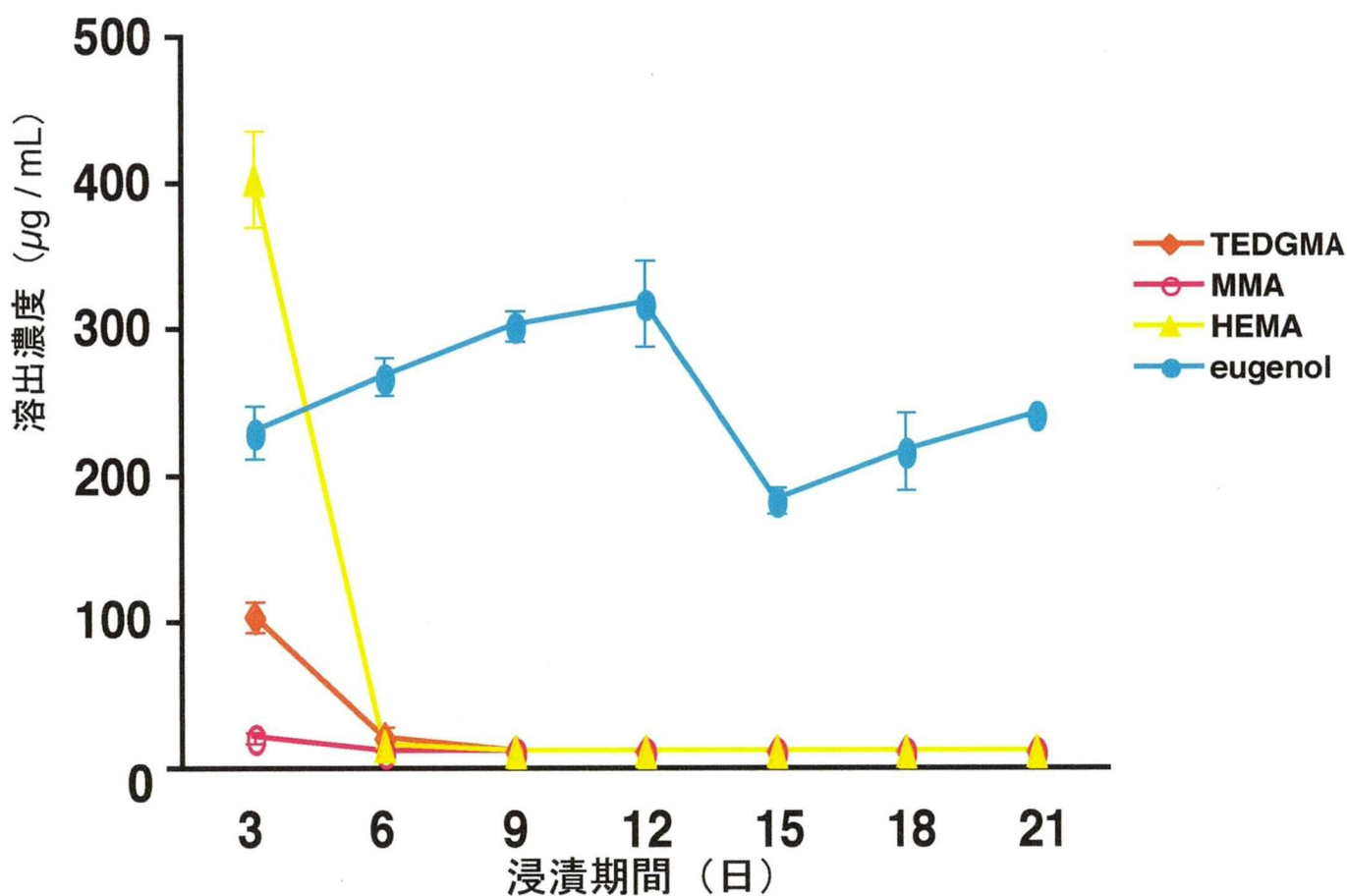


図5 硬化試料からの未重合モノマーの溶出濃度
各値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=3) で示す

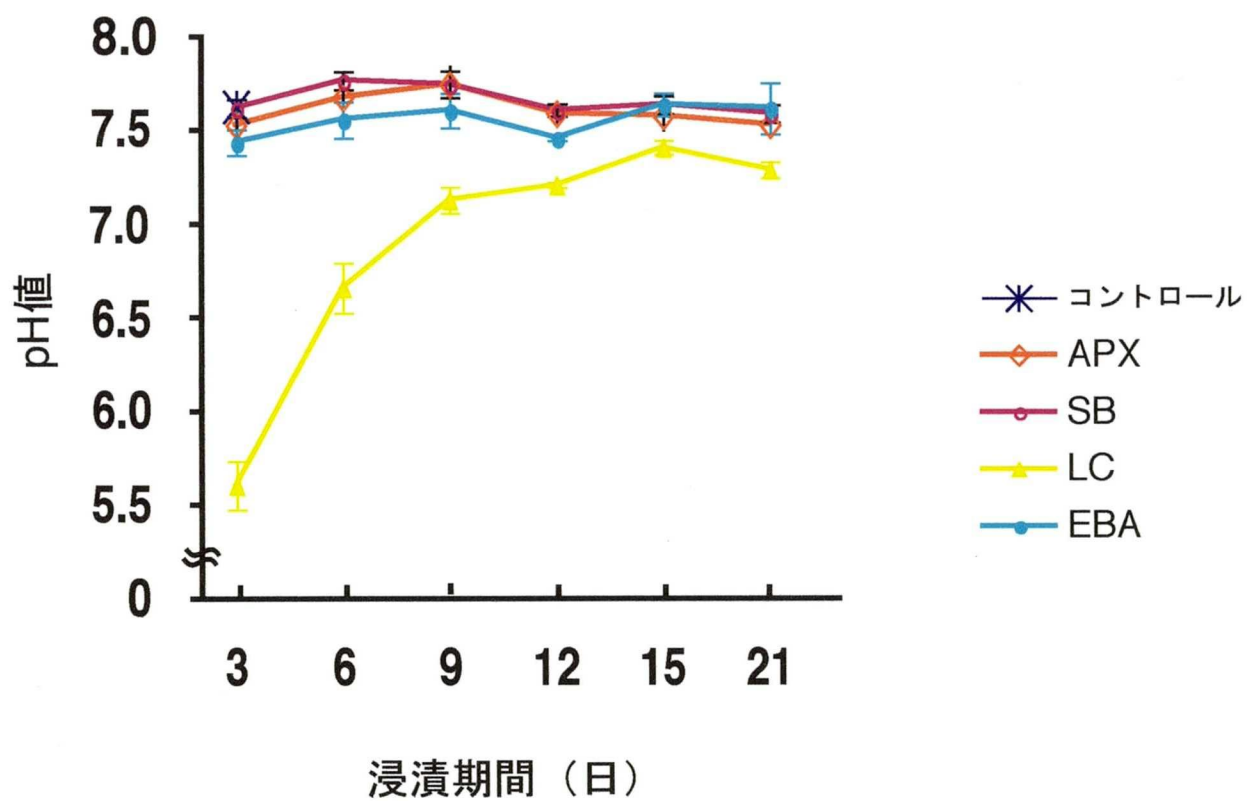


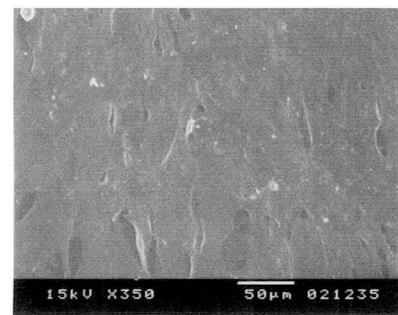
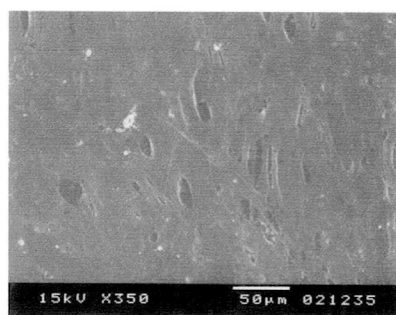
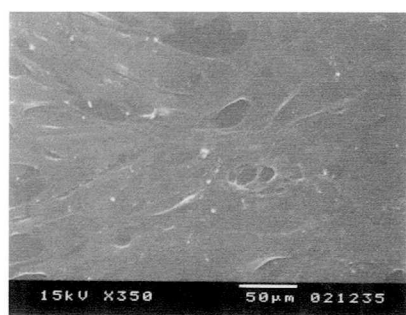
図6 硬化試料を浸漬した培地のpH値の経時的変化
各値は平均値±標準偏差 (n=3) で示す

100 μ g/mL

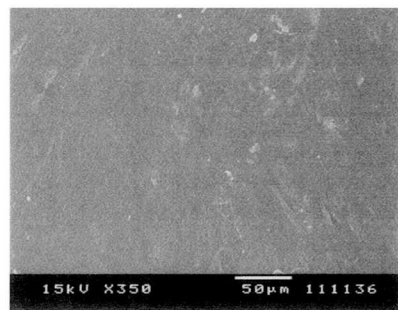
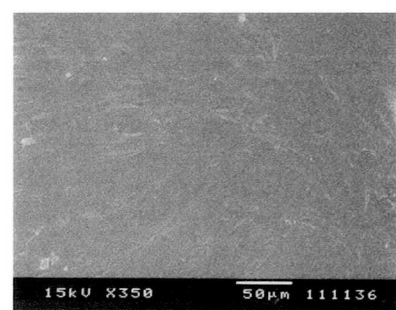
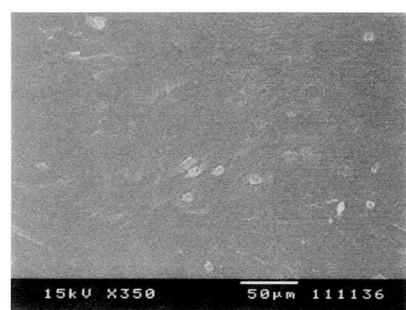
50 μ g/mL

10 μ g/mL

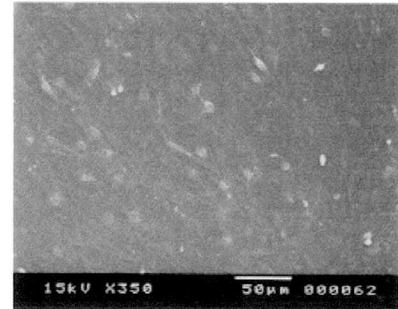
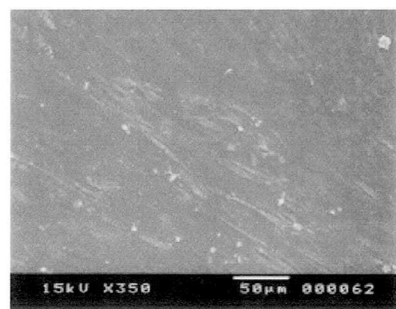
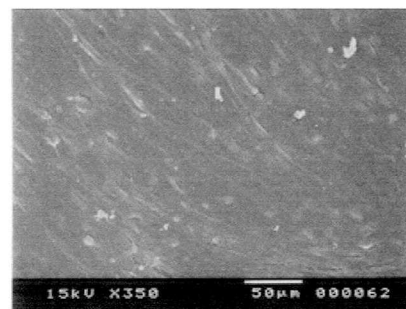
3日



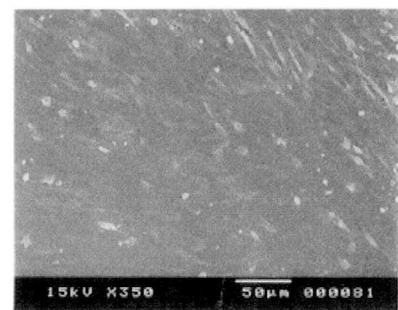
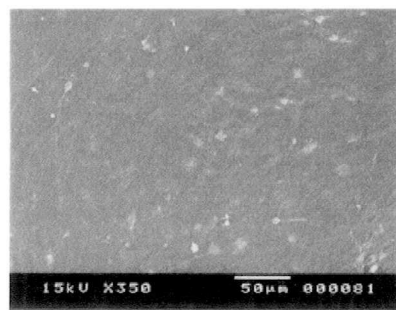
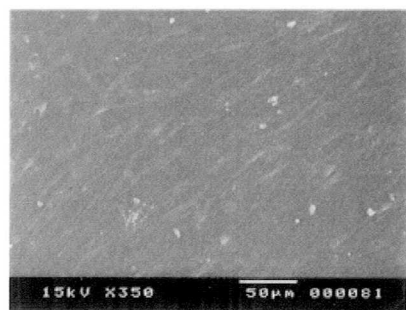
7日



14日



21日



28日

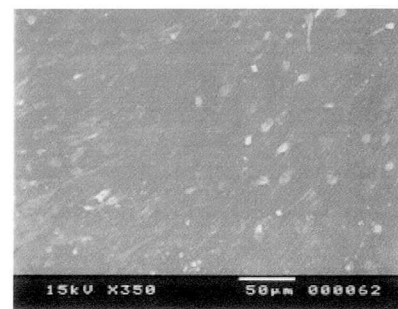
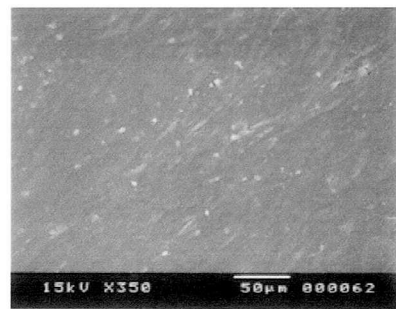
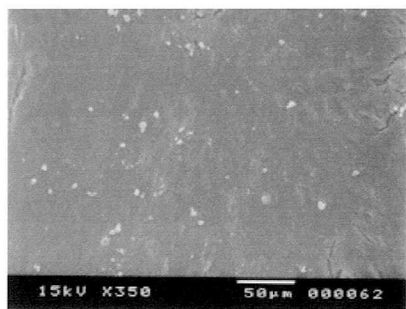


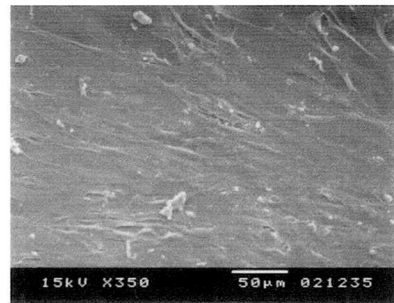
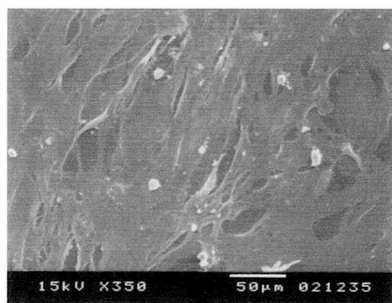
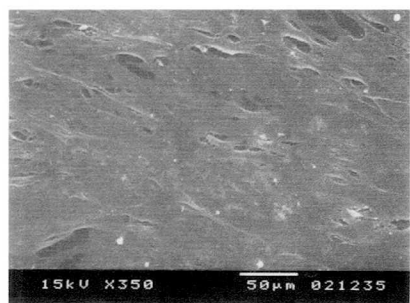
図7 TEGDMAを添加して培養したMC3T3-E1細胞の増殖状態（×350）

10 μ g/mL

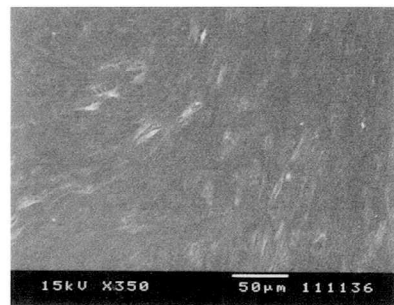
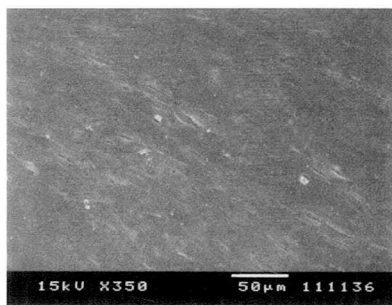
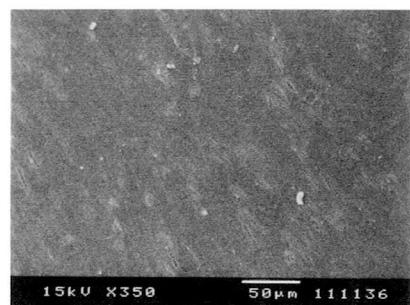
5 μ g/mL

1 μ g/mL

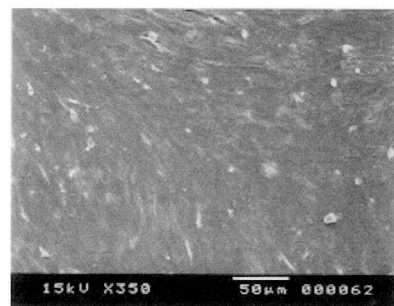
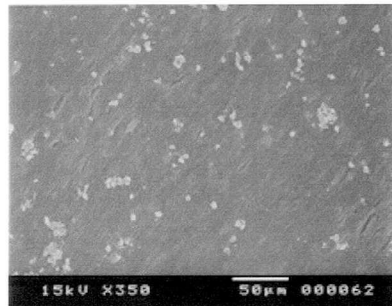
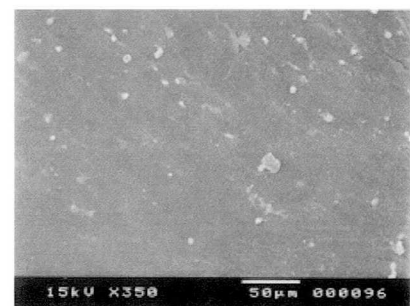
3日



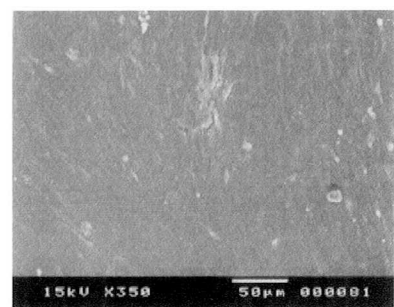
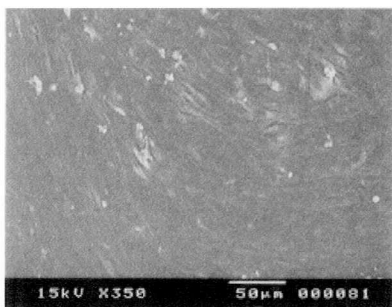
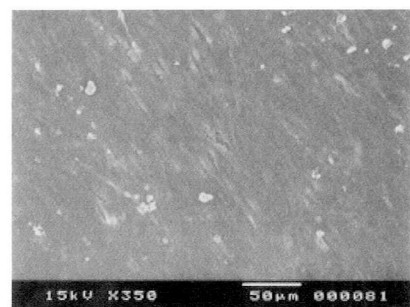
7日



14日



21日



28日

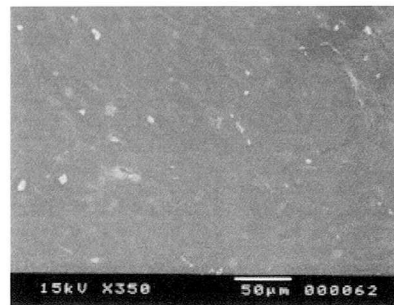
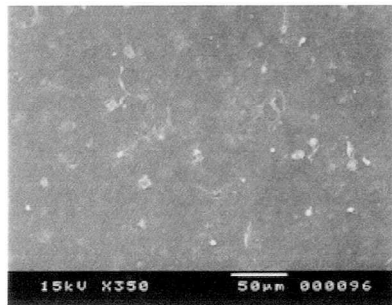
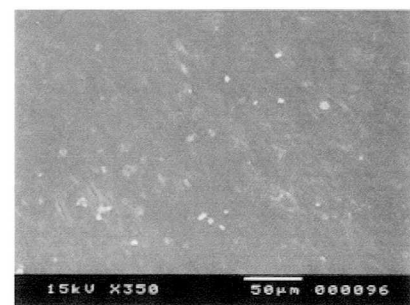


図8 MMAを添加して培養したMC3T3-E1細胞の増殖状態（×350）

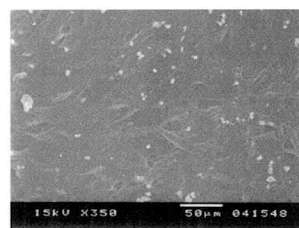
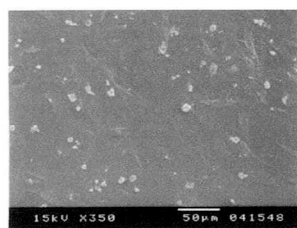
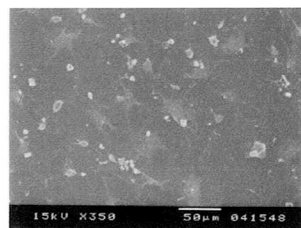
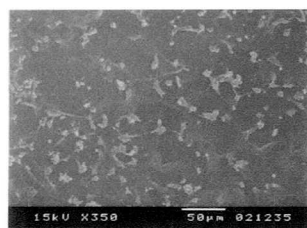
400 μ g/mL

200 μ g/mL

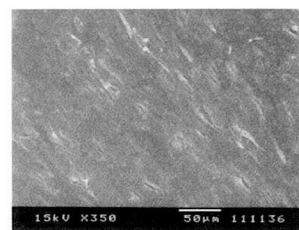
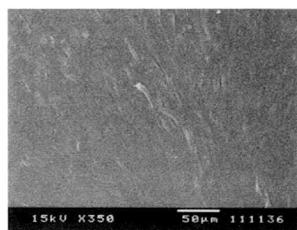
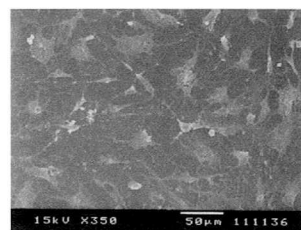
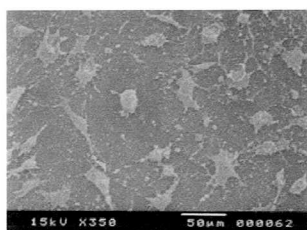
100 μ g/mL

50 μ g/mL

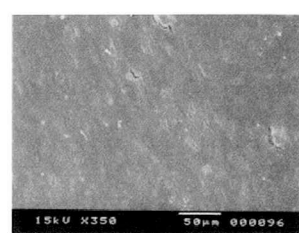
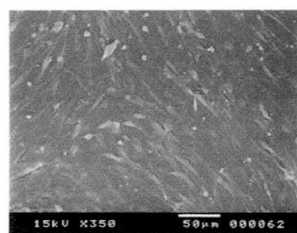
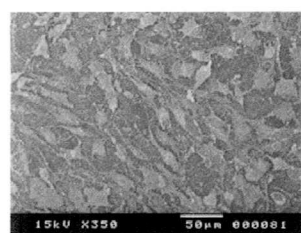
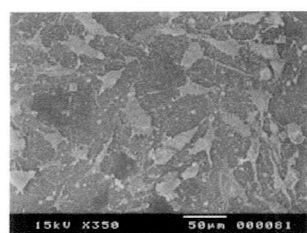
3日



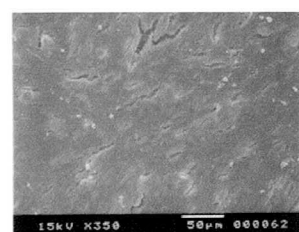
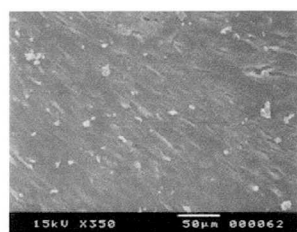
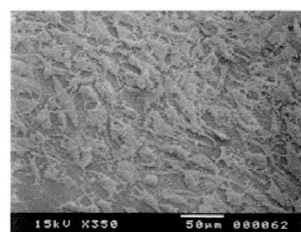
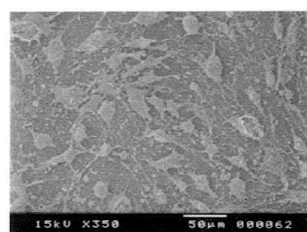
7日



14日



21日



28日

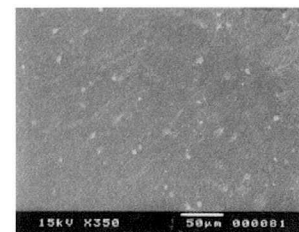
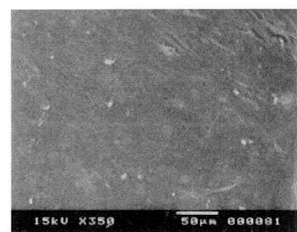
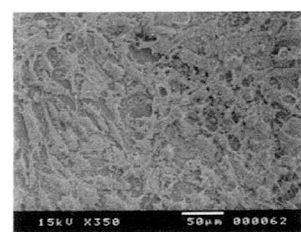
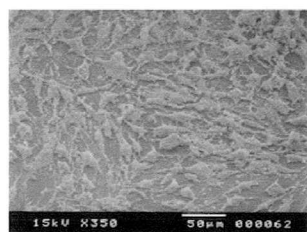


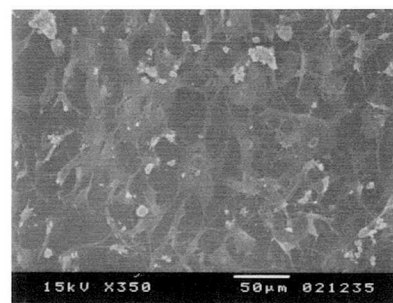
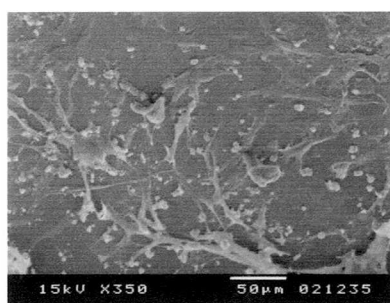
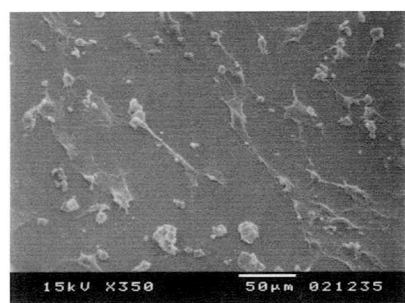
図9 HEMAを添加して培養したMC3T3-E1細胞の増殖状態（×350）

250 μ g/mL

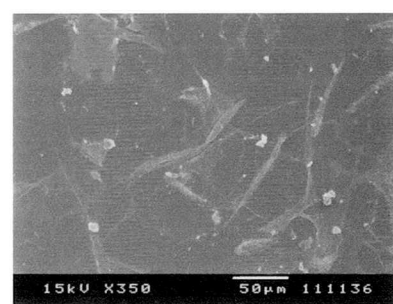
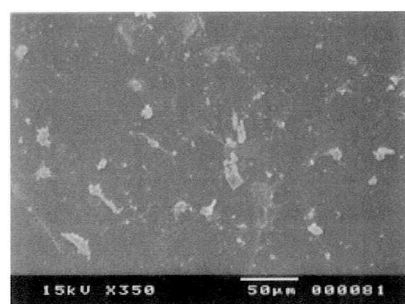
100 μ g/mL

50 μ g/mL

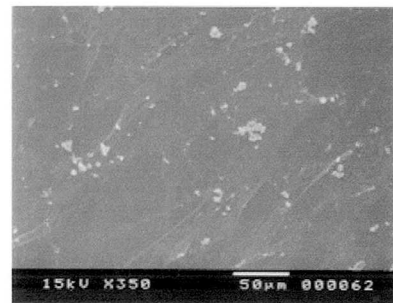
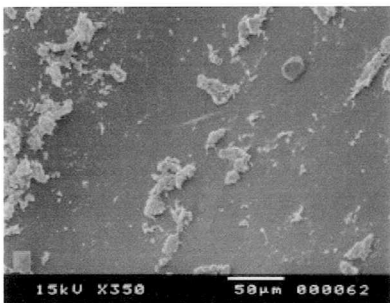
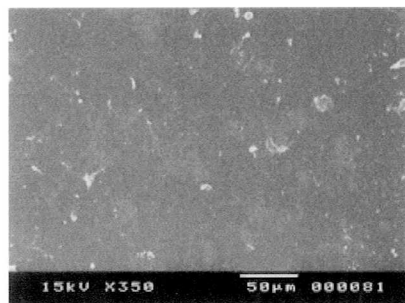
3日



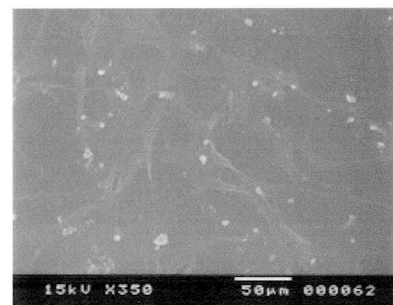
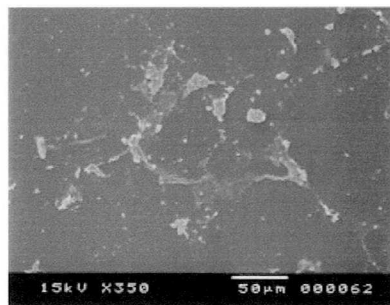
7日



14日



21日



28日

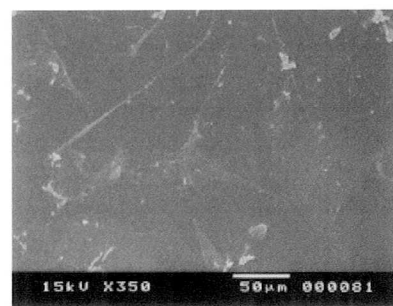
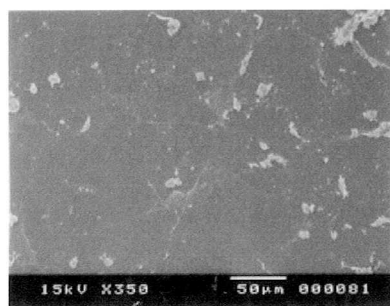


図10 eugenolを添加して培養したMC3T3-E1細胞の増殖状態（×350）

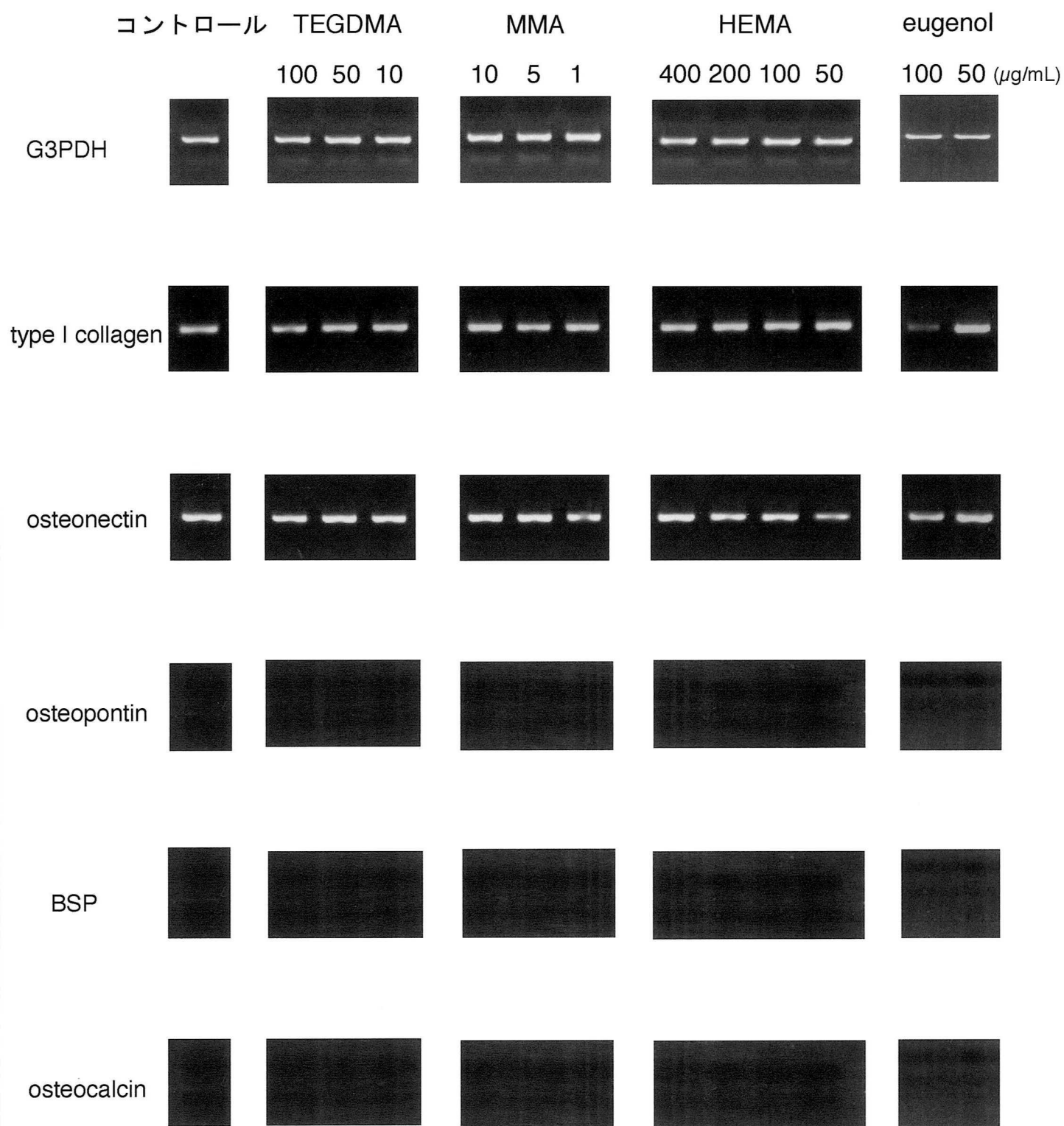


図11 各モノマーを添加して培養したMC3T3-E1細胞のmRNAの発現（7日間培養後）
 コントロール：モノマーを添加せずに培養した場合

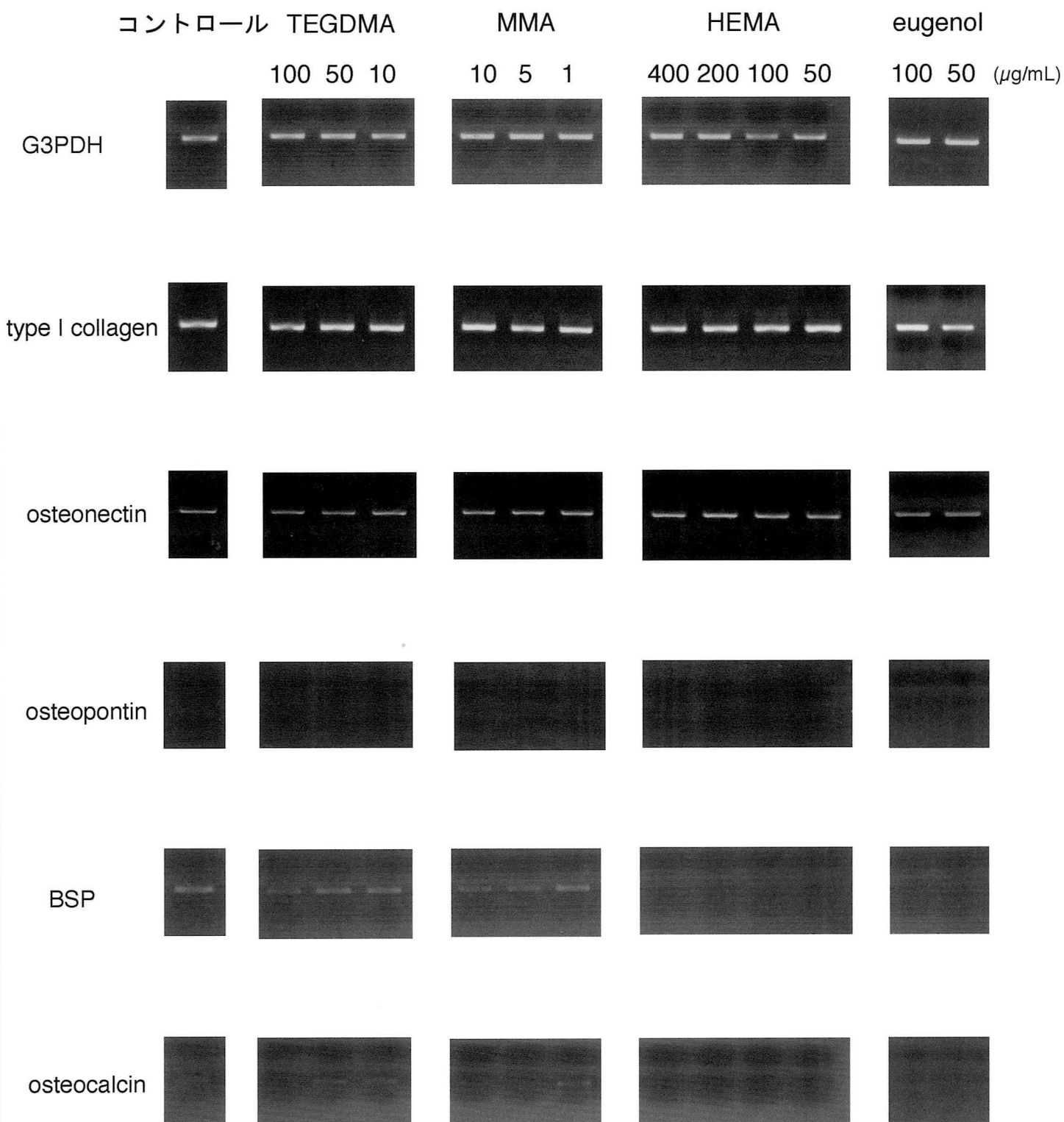


図12 各モノマーを添加して培養したMC3T3-E1細胞のmRNAの発現（21日間培養後）
 コントロール：モノマーを添加せずに培養した場合

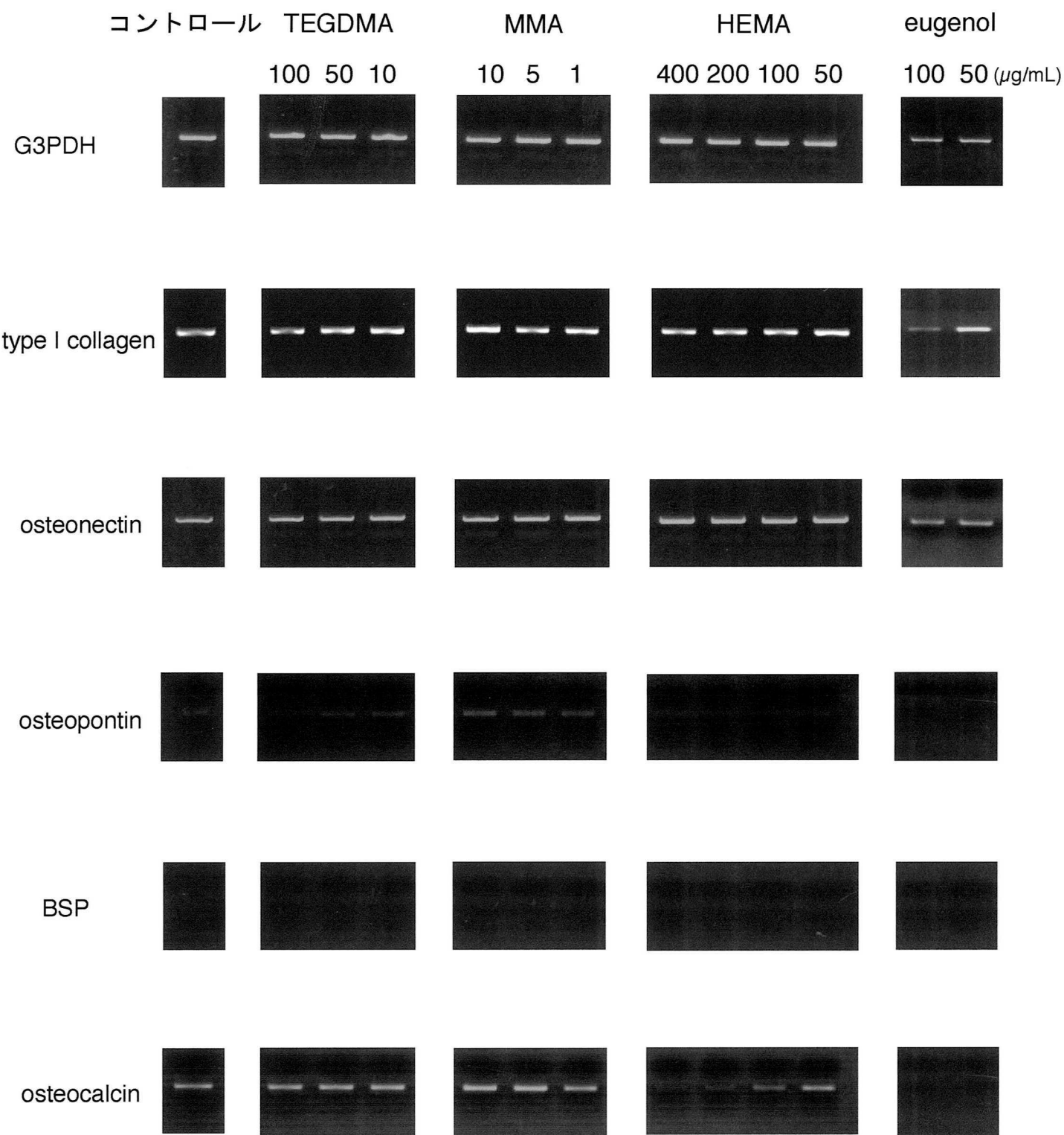


図13 各モノマーを添加して培養したMC3T3-E1細胞のmRNAの発現（28日間培養後）
 コントロール：モノマーを添加せずに培養した場合

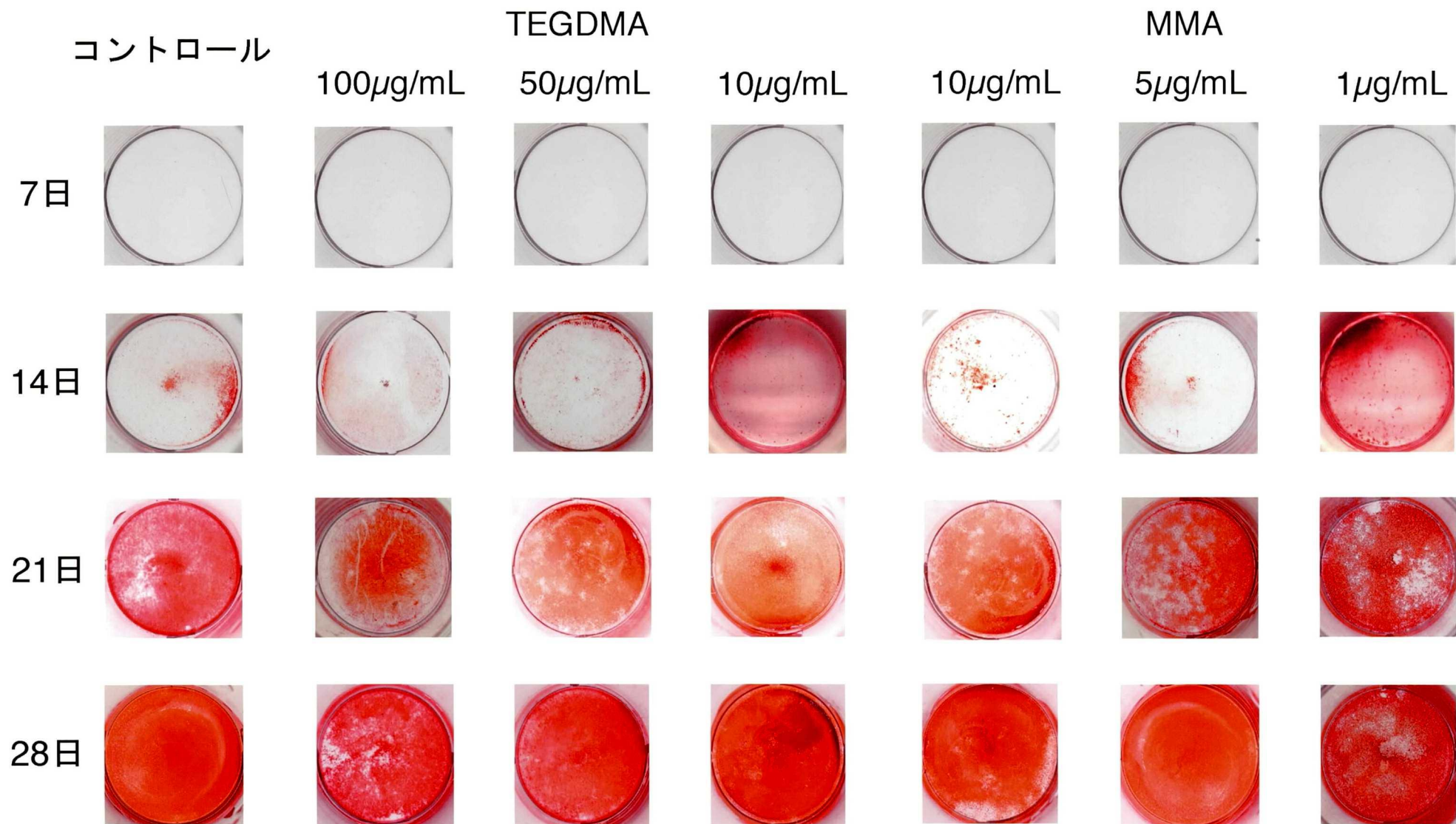


図14 TEGDMAあるいはMMA存在下でのMC3T3-E1細胞による石灰化物形成
 コントロール：モノマーを添加せずに培養した場合

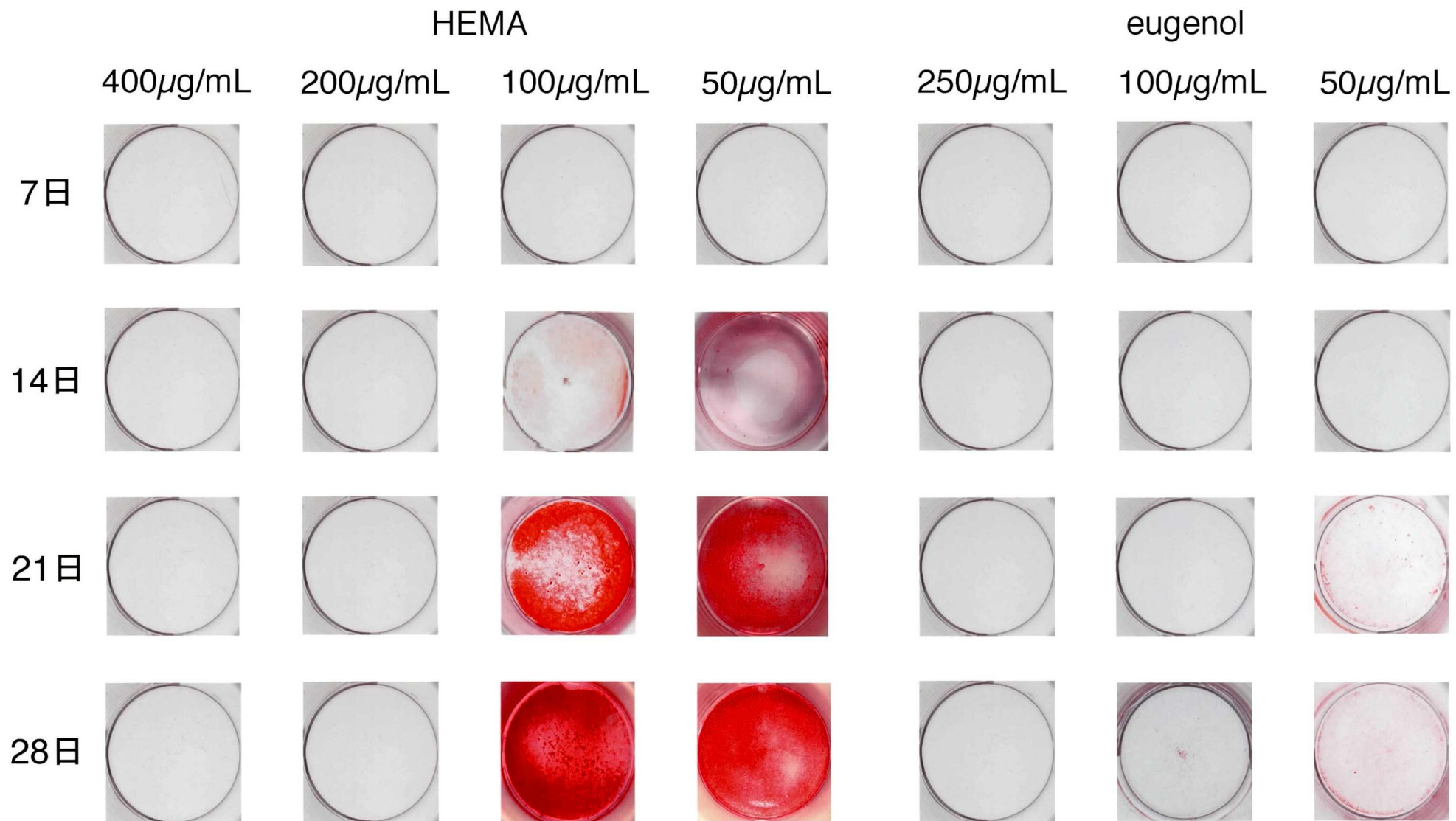
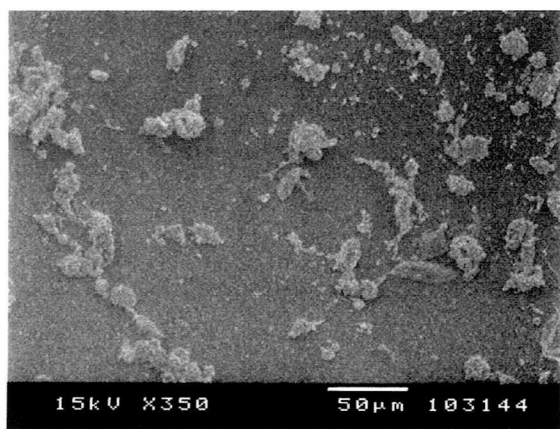
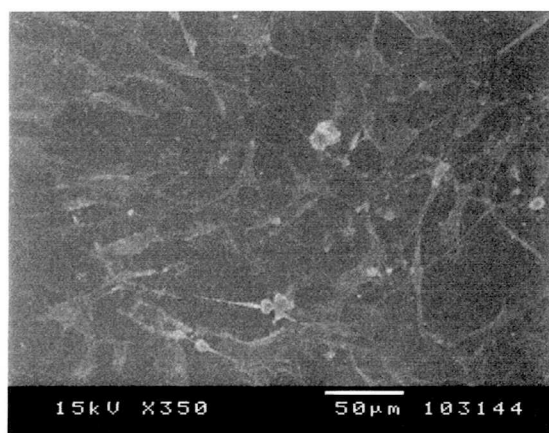


図15 HEMAあるいはeugenol存在下でのMC3T3-E1細胞による石灰化物形成
 コントロール：モノマーを添加せずに培養した場合

pH5.0



pH5.6



pH6.0



pH7.6 (コントロール)

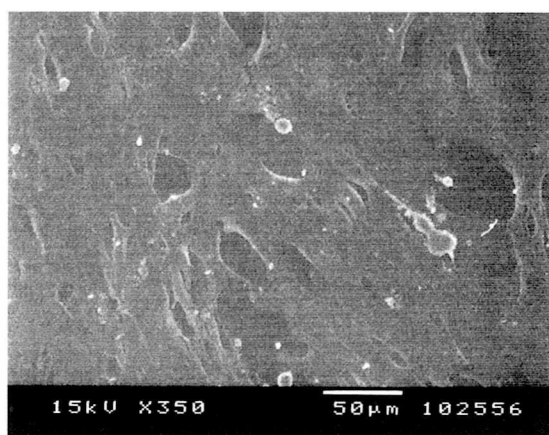


図16 低pH下で培養したMC3T3-E1細胞の増殖状態 (×350)

