

ナノ化ハイドロキシアパタイトによる軟化根管象牙質の再硬化
口腔唾液の接触が根管象牙質の再硬化におよぼす影響および再硬化人工軟化根管象
牙質の硬さの経時変化

日本大学松戸歯学部 再生歯科治療学講座

研究講座員：崎山宗紀

(指導：和田守康 教授)

目 次

緒言	----- 1
材料および方法	----- 1
1 軟化象牙質の作製	
2. ナノ化 HA 応用による軟化根管象牙質の硬度の経時変化	
3. 唾液接触後の軟化根管象牙質へのナノ化 HA 応用による再硬化と根管象牙質 表面の観察	
結果	----- 3
1. 軟化象牙質の作製	
2. ナノ化 HA 応用による軟化根管象牙質の硬度の経時変化	
3. 唾液接触後の軟化根管象牙質へのナノ化 HA 応用による再硬化と根管象牙質 表面の観察	
考察	----- 4
結論	----- 7
参考文献	----- 8
図および表	-----10
英文抄録	-----15

緒言

感染根管治療における根管内無菌化は根管治療の成否に大きく関与する。根管の石灰化、狭窄、彎曲、側枝や副根管の存在により、根管拡大や根管深層部への貼薬剤の到達が困難となる。そのため根管内の清掃が十分行なえず、根管内細菌の取り残しが生じ、治療期間の延長や再根管治療の原因となる¹⁾。また、軟化象牙質が多量に認められる歯において、軟化象牙質の完全除去による歯質の損失は最終補綴物装着後、補綴物の保持力の低下に伴う脱離や歯の破折の要因となり予後に大きな影響を及ぼす²⁻⁵⁾。軟化象牙質を保存して、再硬化することができ、しかも、これが疾患の原因とならないようにすることが可能ならば理想である。換言すれば、軟化象牙質を無菌的に再硬化あるいは再石灰化させることが可能であれば歯質を保存することができ、また、その後補綴処置を行なう場合、より確実な治療が可能となる。

菊地⁶⁾は、超微細（直径 100～150nm）のハイドロキシアパタイト（ナノ化 HA）を応用し、軟化根管象牙質の再硬化を試み、その結果、ナノ化 HA 作用後 24 時間で人工軟化根管象牙質（以下軟化象牙質という）において再硬化が認められたことを報告している。

しかしながら、ナノ化 HA 作用後 24 時間で再硬化が得られたとしても、臨床的に果たしてその再硬化が長期にわたり維持できるかどうかはわからない。また、根管内の軟化象牙質には多数の細菌が存在しており、さらに長期間、唾液に晒されている。臨床に応用するには、より詳細な研究が必要である。

そこで、今回、ナノ化 HA を応用し、再硬化させた軟化象牙質の経時的な硬度の変化を測定した。また、唾液に接触した軟化根管象牙質にナノ化 HA を応用させることで、唾液の接触が再硬化にどのような影響を及ぼすかについても検討した。

材料および方法

1. 軟化根管象牙質の作製

屠殺直後のウシ下顎前歯を 120 本抜去後、歯髄を除去して直ちに冷凍保存した。人工軟化根管象牙質の作製は、菊地⁶⁾の方法に準じて行ない 100 本作製した。すなわち、牛歯を使用直前に流水下で解凍後、即時重合レジン(ユニファスト II, GC)で包埋した。#80 K 型ファイルを用いて根管象牙質の表面のファイリングを行った。生成したスメア一層を除去する目的で EDTA を 5 分間、NaOCl を 1 分間で処理した⁷⁻¹¹⁾。そして、根管内面象牙質以外の象牙質表面をスティッキーワックス(大成歯科工業株式会社)で覆い、急速脱灰液(K-CX:成分 塩酸 藤沢薬品 PH1.2~2.0;以下脱灰液)を根管のみに 10 時間作用させた後、根管内を十分に洗い流して軟化根管象牙質を作製した(図 1)。なお、残りの 20 本は脱灰液を作用させない未脱灰象牙質とした。

2. ナノ化 HA 応用による軟化根管象牙質の硬度の経時変化

主剤であるナノ化 HA 粉末(サンギより提供)について電界放射走査電子顕微鏡(Field-emission scanning electron microscopy, FE-SEM, JSM-6340F, JEOL)での表面の観察および X 線回析(RINT2000, Rigaku)を対陰極 Cu, 加速電圧 50kv, 加速電流 300 mA, サンプリング幅 0.020° の条件下で行なった。

作製した軟化根管象牙質のうち 80 本を用い、菊地の方法⁶⁾に準じて軟化根管象牙質を再硬化させた。すなわちナノ化 HA 粒子と精製水を 1:2 の割合で混和し、ペースト状にしたものを根管内に可及的に填入し、超音波スケーラーに超音波チップを装着し、3 分間根管内中心部に作用させた。その後、湿箱中に保存した。保存期間は 24 時間、1, 2 および 4 週間とし、各試料 20 本ずつ行なった。

硬さの測定は、即時重合レジンで包埋した牛歯歯根を歯軸方向に切断しダイヤモンドペーストをつけたバフ(表面粗さ 6 μm , 1 μm , 0.25 μm)で滑沢に仕上げた超音波洗浄を行い、微小硬度計(HMV-2000, 島津製作所)を用いて荷重 25 g 負荷時間 15 秒の条件下で根管壁から歯根表面にむかって 200 μm 間隔で 2,000 μm までのヌープ硬さ(KHN)を測定した。測定部位は切断面の歯冠側 3 分の 1 のところに設定した(図 2)。

未脱灰象牙質および軟化象牙質についても硬度測定を行い、それぞれ 20 本の平均値とした。

3. 唾液接触後の軟化根管象牙質へのナノ化 HA 応用による再硬化と根管象牙質表面の観察

作製した 30 本の軟化根管象牙質の根管内にヒト唾液を注入し、24 時間湿箱中に放置した。その後、根管を十分に洗い流して、菊地⁶⁾の方法に準じてナノ化 HA 粉末を根管内に応用し、24 時間湿箱中に保管した後、硬さを測定した。

コントロールとして各々 30 本の未脱灰象牙質および軟化象牙質の根管を 24 時間、唾液に接触させ上記と同様に硬度の測定をした。結果はそれぞれ 30 本の平均値とした。

硬さ測定後、未脱灰象牙質およびナノ化 HA 作用象牙質の 2 種類の試料について根管表面の形態観察を行った。超音波洗浄後、アルコール系列による脱水、酢酸イソアミル固定、臨界点乾燥 (Critical Point Dryer, 日立) を行った。次に 200 秒、20 mA の条件下で白金蒸し器 (JFC-1600, JEOL) 後、電界放射走査電子顕微鏡で根管象牙質表面を観察した。

結果

1. ナノ化 HA 応用による軟化根管象牙質の硬度の経時変化

今回使用したナノ化 HA 粒子の X 線回折試験の結果、そのパターンは典型的なハイドロキシアパタイトの回折パターンを示した (図 3)。また、SEM による観察結果、その粒子の直径は約 100 nm であることが確認された (図 4)。

ヌープ硬さ (KHN) の測定結果、脱灰液を作用させない未脱灰の象牙質では、根管壁から歯根表面にむかって KHN 25 から 40 の範囲であった。脱灰液を 10 時間作用させた軟化根管象牙質は、根管壁からの距離 1,000 μm まで硬さはほぼ 0 に近い値を示し

完全軟化が認められた。それより深部では、KHN 5 から 10 の範囲であり、軟化が認められた。再硬化された軟化根管象牙質において、ナノ化 HA 作用後、湿箱での保存期間が 24 時間では KHN 28 から 34 の範囲であった。1 週間では KHN 30 から 35 の範囲であった。そして、保存期間が 2 週間では KHN 36 から 40、4 週間では KHN 37 から 42 の範囲であった(図 5)。

2. 唾液接触後の軟化根管象牙質へのナノ化 HA 応用による再硬化と根管象牙質表面の観察

軟化象牙質(根管表面からの 300 μm の深さまで KHN はほぼ 0 に近い値、それより深部では KHN 5~22)に唾液接触させた後にナノ化 HA を応用すると軟化根管象牙質の硬度は根管壁表面から深部まで KHN 25~33 を示し、ほぼ未脱灰象牙質と同じ硬さ(KHN 25~35)となった(図 6)。この結果は、唾液を接触させない軟化根管象牙質の硬さの測定結果と比較した結果、ほぼ同じ硬さを示した(図 6, 7)。

唾液接触させた軟化根管象牙質表面には多くの細菌が観察された(図 8)。そして、唾液作用後、ナノ化 HA を作用させた軟化根管象牙質では、細菌表面にナノ化 HA 粒子が沈着している像が観察された(図 9)。

考察

口腔内の軟化象牙質の存在は、歯科治療にとって害はあるものの、益はないといわれる。継続歯の脱離の原因や充填物の適合の阻害になっている。菊地⁶⁾は、脱灰液による軟化根管象牙質の作製とこれにナノ化 HA を応用し、24 時間後のこの軟化象牙質の再硬化を報告した。しかしながら、この再硬化が果たして長期期間にわたって維持するか否かは临床上、重要な問題である。本研究ではナノ化 HA 応用による軟化根管象牙質の再硬化の経時変化において、保存期間が 1 週間までは、未脱灰象牙質の硬さと同等であった。保存期間が 2 週間および 4 週間ではその硬さが僅かに上昇してい

ることが認められた。すなわち、ナノ化 HA 応用によって軟化根管象牙質を再硬化してもその硬さは実験期間で設定した4週間までは維持することができた。さらに、時間経過するに従い増加する傾向も認められた。このことは、超音波振動で根管内に満たされたナノ化 HA が時間の経過とともに根管内深層部に徐々に侵入すると考えられる。そのためには、今回の再硬化させた軟化根管象牙質の保存期間は4週間としたが、さらに長期的に行なうには、ナノ化 HA ペーストが一定の流動性が維持できるように品質改良を行うことが必要であると思われる。

さて、臨床の場で遭遇する残根状態の歯は、通常、多量の軟化象牙質で覆われ、また口腔内唾液に長期間、晒されている。そこで、24時間、唾液に接触させた軟化根管象牙質を作製し、ナノ化 HA を用いて再硬化の実験を行った。その結果、根管象牙質表層部において完全軟化していた軟化根管象牙質や中央部から深部にかけて一部軟化していた象牙質の硬度は未脱灰象牙質の硬さと同等の硬さまで回復した。

以上のことは、軟化された根管象牙質表層部から超微粒子の HA が24時間で徐々に象牙質内に浸入し、再硬化することを示唆するものである。また、象牙質深層部における硬さの増加は HA の作用によるものであり、超音波の振動により継続的に根管象牙質深層部まで侵入し、象牙質に作用し再硬化したものであると思われる。また、ナノ化 HA 応用による再硬化された軟化根管象牙質では唾液による影響はほとんどないと思われる。

SEM の写真で観察されるように、管間象牙質には象牙質の主成分であるコラーゲン線維が認められ、その線維表面にはナノ化 HA の沈着が認められた。試料作製のために超音波による洗浄を行なったにもかかわらず、コラーゲン線維から脱落していなかったことから、コラーゲン線維にナノ化 HA 粒子が付着していることが示唆された。そして、これが軟化象牙質の再硬化に関与していることが推測された。また、唾液の接触によって細菌も観察され、細菌の表面に数多くのナノ化 HA 粒子が付着している像が確認された。ナノ化 HA によって細菌増殖が抑制されているかは不明であるが、

HA は口腔内の細菌に対して非常に高い付着能力があり、細菌の表面に HA が付着することによって増殖を抑制、死滅させるという報告がある¹²⁻¹⁴⁾。今回用いた HA 粒子は直径が約 100 nm の超微粒子であるため、象牙質内部、側枝や副根管まで徐々に侵入し、細菌表面に付着することにより細菌の増殖抑制効果が期待できると思われる。したがって、難治性根管治療においてナノ化 HA を応用することが可能であれば、従来の根管治療法にとって代わる有効な方法になると思われる。

一方、臨床でよく遭遇する感染根管象牙質の根尖部は破壊された状態である。感染根管にナノ化 HA を応用するにあたり、その材料が例え組織親和性を有していても、これが多量に根尖孔外へ溢出すると根尖周囲組織の損傷や血管内への流出などの物理的傷害となることは臨床的問題として留意すべき事柄である。これを防止するための手段として根尖部に抵抗形態を付与し、自家象牙質削粉で堅固な apical barrier を形成すれば根尖孔外への溢出はほとんど無いという報告がある¹⁵⁻¹⁸⁾。また、根尖孔から HA が溢出した場合においても異物反応はほとんど認められないという報告もある¹⁵⁻¹⁸⁾。根尖部において、厳密な根管充填をほどこすことは難しく、しかも今回材料として用いた HA はナノ粒子であるため、根尖孔より溢出することが危惧される。よって、ナノ化 HA が根尖孔外へ溢出しないようにするためにナノ化 HA 粒子が根管に可能な限り留まるようにコントロールするためになんらかの処置を施すなど検討する必要がある。

歯は本来、生活歯として機能すべきものである。齶蝕が歯髄に達して抜髄が施こされると、その歯は失活歯となる。齶蝕を完全に除去して健康な残存歯質を保護し、適切な根管治療、支台築造を施すことによって生活歯とほとんど同様に機能することができるが、軟化象牙質が多量にみられる残根状態の歯、つまり健康象牙質の歯質量が少ない歯においては適切な治療ができず抜歯となる場合が多い。よって健康な残存歯質の保護が必要不可欠となる。この研究の最終目標は、このような適切な治療ができない歯に対して、本来の象牙質と同等の硬さまで軟化象牙質を再硬化させることによ

って歯質を保存し、その後の治療により長期的に口腔機能の維持改善させることである。

しかし、適切な治療を行い口腔機能が改善されたとしても、失活歯において、長期にわたり象牙質の物性に変化が生じ脆くなり、いわば枯れ木同然となり歯質の破折を引き起こすことにより予後不良となる場合が多い。今回の研究における再硬化された軟化根管象牙質についてもそのようなことが言える。ナノ化 HA 応用によって得られた再硬化された軟化根管象牙質の硬さは本来の象牙質の硬さとほぼ同等の硬さであるため硬さに関しては問題ないが、失活歯であることに変わりなく、長期間にわたり破折等を引き起こし予後不良となる可能性がある。

近年、歯の再生治療に関する研究が盛んに行なわれている。すなわち抜歯予定の親知らずの歯や矯正治療のための便宜抜歯予定の歯の歯髄の移植、また、歯髄そのものの再生に関する研究が数多く報告されている¹⁹⁻²¹⁾。これらの研究と併用し応用すれば、将来的に軟化根管象牙質の多量に見られる歯において本来の生活歯と近似した象牙質ができる可能性があると思われる。

結論

ナノ化 HA を応用し、再硬化された軟化根管象牙質の硬さは4週間経過しても24時間と同様の硬化を持続した。

また、軟化根管象牙質が唾液に晒されていてもナノ化 HA を使用すると、未脱灰象牙質の硬さと同じ硬さまで再硬化し、唾液の影響のないことが判明した。

参考文献

- 1) 興地隆史. 歯内療法の争点—難治性根尖性歯周炎の病因と臨床—. Niigata Dent J 2006;36:209-223.
- 2) 坪田有史. レジン支台築造. 日本歯科評論 No. 756 2005;65(10):53-75.
- 3) 福島俊士, 坪田有史. 支台築造の予後成績. 補綴誌 2001;45:660-668.
- 4) 渡辺厚生. 支台築造に関する研究. 補綴誌 1990;34:7-17.
- 5) 福島俊士, 坪田有史, 天川由美子, 石原正隆. 支台築造の位置づけ. 接着歯学 1999;17(2):111-118.
- 6) 菊地信之. 軟化根管象牙質の再硬化に関する基礎的研究 第1報: ナノ化ハイドロキシアパタイトの応用による軟化根管象牙質の強化. 再生歯 2008;5(2):117-128.
- 7) Cengiz T, Akatener BO, Piskin B. The effect of dentinal tubule orientation on the removal of smear layer by root canal irrigants. A scanning electron microscopic study. Int Endod J 1990;23:163-171.
- 8) Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. Int Endod J 1990;23:20-27.
- 9) Drake DR, Wiemann AH, Rivera EM, Walton RE. Bacterial retention in canal walls in vitro: Effect of smear layer. J Endodon 1994;20(2):78-82.
- 10) Lumlry PJ, Walmsley AD, Walton RE, Rippin JW. Effect of precurving endosonic files on the amount of debris and smear layer remaining in curved root canals. J Endodon 1992;18(12):616-619.
- 11) 真鍋圭毅, 吉田隆一, 竹中武久, 山下晴男, 関根一郎, 向山嘉幸. 細い根管における 15%EDTA の Smear layer 除去効果について. 日歯保存誌 1987;30:1610-1618.
- 12) 近藤慶一郎, 秋本文子, 大谷浩淑, 杉山眞次, 村上幸孝, 石崎勉, 藤田恵二郎,

- 前田伸子, 尾崎哲則, 吉田茂. ハイドロキシアパタイトへの *Streptococcus mutans* の付着に関する研究. 口腔衛生会誌 1999;49:614-615.
- 13) 安室操, 近藤慶一郎, 前原純子, 杉山眞次, 石崎勉, 村上幸孝, 前田伸子, 尾崎哲則, 吉田茂. 歯面モデルに付着した *Streptococcus mutans* に対するハイドロキシアパタイトの影響. 口腔衛生会誌 1999;49:616-617.
- 14) 荒川正嘉, 石崎勉, 花田信弘, 泉福英信. 口腔レンサ球菌に対するハイドロキシアパタイトの付着効果に関する研究. 口腔衛生会誌 2002;52:574-575.
- 15) 吉田隆一. 合成ハイドロキシアパタイトの Apical barrier への応用に関する実験的研究. 岐阜学誌 1987;14(2):309-328.
- 16) 庄司茂, 石川潤一, 八巻恵子, 堀内博. 多孔質ハイドロキシアパタイトの歯内療法への応用. 日歯保誌 1984;27(3):658-667.
- 17) Denissen HW, Groot K. Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxyapatite. J Prosthet Dent 1976;42:551-556.
- 18) Obersztyn A. Healing of pinpoint exposure of rat incisor pulp under various capping agents. J Dent Res 1966;45:1130-1143.
- 19) 庵原耕一郎, 中島 美砂子. 歯髄幹細胞を用いた臨床研究を目指した細胞加工施設への歯の輸送法の確立. 日歯保誌 2012;55(4):272-277.
- 20) 石坂亮, 庵原 耕一郎, 古賀 豪, 福田 理, 中島 美砂子. 歯髄 骨髄 脂肪 CD3 SP 細胞の血管新生能および歯髄再生能の比較. 小児歯科学雑誌 2011;49(4):369.
- 21) 中島美砂子. 歯髄再生による新しい歯内治療法の臨床研究に向けて. 福岡歯科大学学会雑誌 2012;38(2):67-73.

図および表

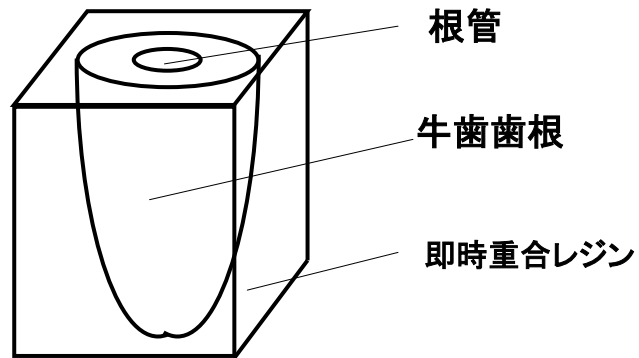


図1：軟化根管象牙質の作製

牛歯を即時重合レジンで包埋し, 根管内に脱灰液を10時間作用させ作製した.

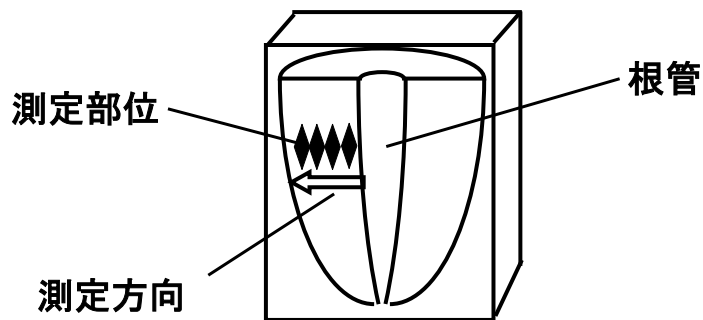


図2：硬さの測定部位を示す模式図

微小硬度計で根管壁から歯根表面に向かってヌープ硬さ (KHN) を測定した. 測定部位は切断面の歯冠側3分の1のところを設定した.

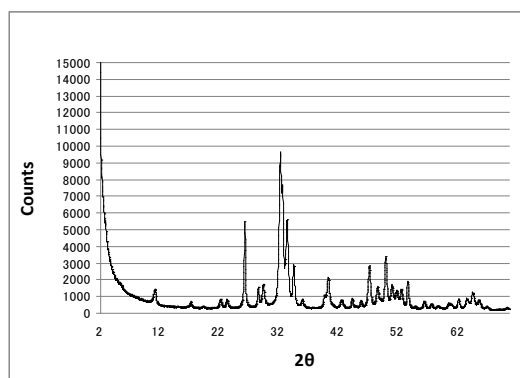


図3：ナノ化HA粒子のX線回析

典型的なHAの回析パターンを示した。

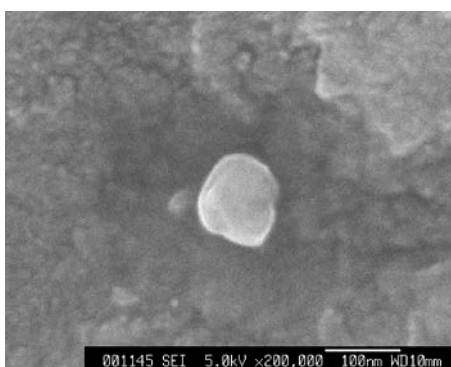


図4：ナノ化HA粒子のSEM像

粒子の直径は100nmであることが確認された。

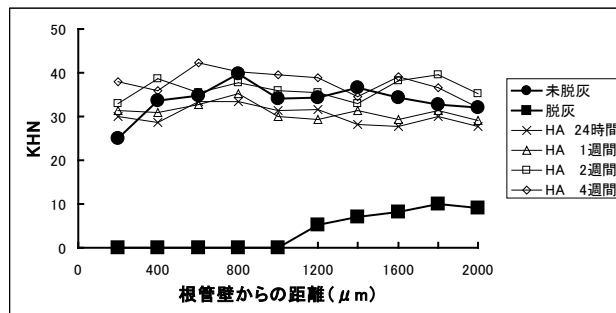


図 5：ナノ化HA応用による再硬化人工軟化根管象牙質の経時変化

未脱灰の象牙質（コントロール）では、根管壁から歯根表面に向かってKHN25から40の範囲であった。脱灰象牙質は、根管壁からの距離1,000 μm まで完全軟化が認められた。それ以降では、歯根表面に向かってKHN5から10の範囲であり、一定の軟化が認められた。再硬化根管象牙質において、ナノ化HA作用後、湿箱での保存期間が24時間のものはKHN28から34の範囲であった。1週間のものはKHN30から35の範囲であった。そして、保存期間が2週間のものはKHN36から40の範囲であり、4週間のものはKHN37から42の範囲であった。

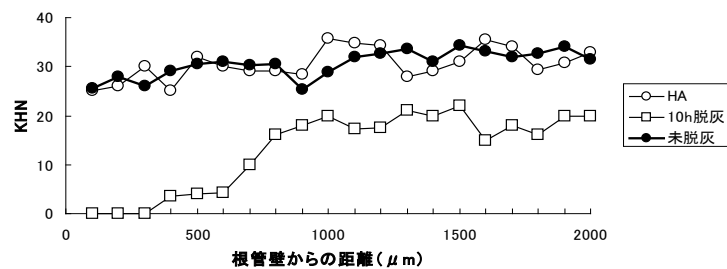


図 6：作用時間による硬度曲線（唾液接触あり）

未脱灰の根管象牙質は根管壁からセメント質にかけてヌープ硬さが25から35の範囲であった。脱灰液を10時間作用の人工軟化根管象牙質は、根管壁からの距離300 μm までヌープ硬さはほぼ0を示した。根管壁より400 μm 以降ではヌープ硬さの値は5から22の範囲であり、一定の軟化が認められた。

ナノ化HAを作用させた人工軟化根管象牙質では根管壁からセメント質にかけてヌープ硬さの値は25から33の範囲であり、ほぼ未脱灰象牙質と同じ硬さであった。

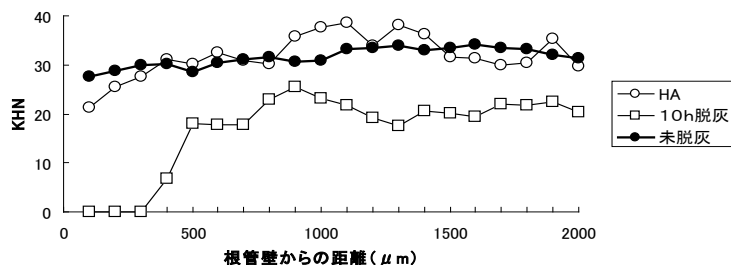


図 7：作用時間による硬度曲線（唾液接触なし）

未脱灰の根管象牙質は根管壁からセメント質にかけてヌープ硬さが25から35の範囲であった。脱灰液を10時間作用の人工軟化根管象牙質では300 μm までヌープ硬さはほぼ0を示した。ナノ化HAを作用させた人工軟化根管象牙質では根管壁からセメント質にかけてヌープ硬さの値は20から40の範囲であり、ほぼ未脱灰象牙質と同じ硬さであった。

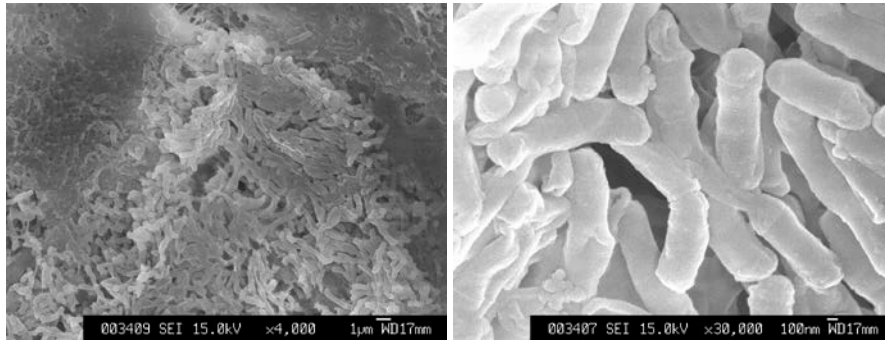


図 8 : 未脱灰根管象牙質のSEM像

唾液を接触させた根管象牙質表面には数多くの桿菌が観察された。

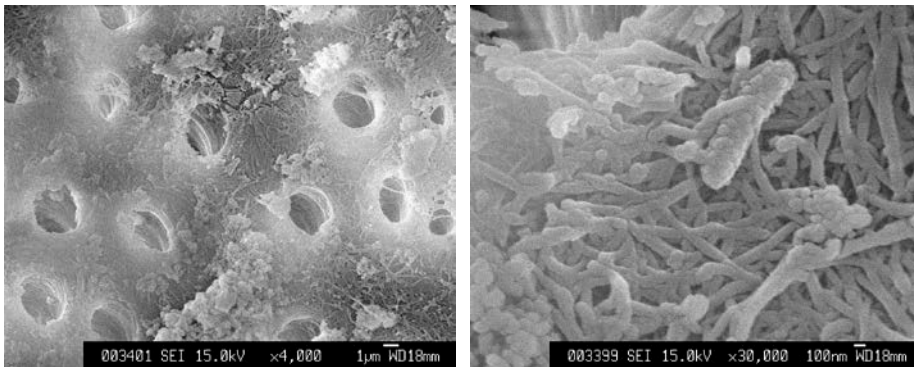


図 9 : ナノ化HA作用後の根管象牙質のSEM像

細菌の表面にナノ化HA粒子が付着がしているのが認められる。

Rehardening of Demineralized Root Canal Dentin Using Nano-hydroxyapatite
Effects of Contact with Oral Saliva on Rehardening of Root Canal Dentin and
Time-Dependent Changes in Artificial Demineralized Root Canal Dentin Rehardened by
Applying Nano-hydroxyapatite

Sakiyama muneki

Department of Renascent Dentistry Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Key words

nano-hydroxyapatite, saliva, demineralized root canal dentin, rehardening of demineralized root canal dentin, time-dependent changes in demineralized root canal dentin

The present study aimed to develop a method for conserving dentin that has been demineralized, which in principle is completely removed, by rehardening it. It has been reported that artificial demineralized root canal dentin was prepared when bovine dental root was demineralized from within the root canal using a rapid-decalcification agent (K-CX). Furthermore, when this artificial dentin was applied inside the root canal using nano-hydroxyapatite (nano-HA), the artificial demineralized root canal dentin was found to rehardens to the same degree of hardness as undecalcified dentin. However, while the artificial demineralized root canal dentin that had been prepared as the test sample was free of bacterial infection, infected root canals seen in the clinical setting often contain large numbers of bacteria, and it is unclear how these bacteria affect the rehardening of demineralized root canal dentin using nano-HA. Consequently, we prepared artificial

demineralized root canal dentin that had been in contact with oral saliva, and then applied nano-HA in the same manner. The results demonstrated that the artificial demineralized root canal dentin that had been in contact with oral saliva rehardened to the same degree of hardness as undecalcified dentin.

The kinds of changes that take place in rehardened artificial demineralized root canal dentin over time remain unclear and no published reports have addressed this issue. Therefore, we investigated the time-dependent changes that take place in artificial demineralized root canal dentin that has been rehardened by applying nano-HA. The results indicated that over time, the hardness of the rehardened artificial demineralized root canal dentin tends to increase.

The fact that there was no change in the hardness of the rehardened demineralized dentin over the long term when the dentin was rehardened to the hardness of undecalcified dentin using nano-HA suggests that it may be possible to conserve demineralized root canal dentin, which must normally be removed.