

接着性レジンの培養ラット歯髓細胞に及ぼす影響に関する研究

三 島 幸 司

Cell Reaction of Cultured Rat Pulpal Cells to Various Adhesive Resins

Koji Mishima

(平成16年3月18日受付)

緒 言

齲蝕に代表される歯牙硬組織疾患は、自然治癒力のほとんど望めない疾患である。従って、歯牙の切削と生じた実質欠損に対する人工物による修復処置は基本的に避けて通れない処置行為である。ところで、この保存修復処置における修復材料は、かつてはセメント類、銀アマルガム、金箔及びレジン等の成形修復材料や、圧延冠やメタルインレー等に用いられた金属材料が主流であった。これらの材料を用いた修復法は、実質欠損を修復する材料に歯質接着性がなかったため、修復物の機械的維持のための保持形態、修復物や歯質が破損しないための抵抗形態、或いは二次齲蝕予防のための外形等、各種窩洞形態の付与のために健全歯質をさらに削除する、いわゆる G. V. Black の窩洞の分類¹⁾を基本とし確立され、長年臨床応用されてきた。

このような機械的アプローチによる保存修復法が行われていた一方で、生体材料学の進歩に伴い歯質接着性を有する材料や修復法の開発も試みられた。1955年、Buonocore²⁾はエナメル質表面を85%リン酸で処理することにより、アクリリックレジンがエナメル質に良好に接着することを明らかにした。その後、修復技法に変革が起こり、まず、エナメル質窩緑酸処理法が修復処置に導入され³⁾、次いで、酸処理と低粘性レジンモ

ノマーの塗布が前処理法⁴⁾として応用されるようになった⁵⁾。また、歯質、とくに象牙質に接着性を有するモノマーの開発も行われ、竹山ら⁶⁾により4-META、山内ら⁷⁾により Phenyl-P などが開発された。

このように歯質接着性材料や修復法の開発が行われる一方で、Fusayama⁸⁾は、Black の機械的アプローチによる窩洞形成法を見直し、臨床的及び生物学的観点に立脚した窩洞形成法を提唱した。すなわち、齲蝕象牙質は細菌に感染し生理的に再石灰化不可能な外層と、齲蝕の影響は被っているが細菌感染がなく生理的に再石灰化可能な内層より構成され、除去すべきは齲蝕象牙質外層であることを見出し、これら2層を判別するために齲蝕検知液を開発した。さらに、Hosoda ら⁹⁾は生活反応のある内層を極力保存する、いわゆる生物学的アプローチによる歯質保存治療法を実践するためには、歯質接着性材料で修復する事が必要不可欠であることを示し、これを受けて世界に先駆けて日本で初めてエナメル質・象牙質双方に接着する接着性モノマー (Phenyl-P) を配合した化学重合型コンポジットレジンが開発された。爾来、歯質接着性修復材料は飛躍の進歩を遂げ、現在では安定した接着性を有する材料として用いられている。

一方、Oram ら¹⁰⁾は Black の概念に基づいた機械的アプローチによる修復物の寿命が10年前後であることを臨床的追跡調査により明らかにした。この evidence は、齲蝕の処置時には再修復を考慮した窩洞形成法、並びに修復法が必要である事を提示しており、前述したようにカリオロジーと歯質接着性材料の急激な発展を遂げる中、Black の概念から脱却し、健全歯質を極力保存し歯質接着性材料で修復する生物学的アプローチによる保存修復法に変革する機運が急速に高まった。

このような状況を受けて FDI は、今世紀の初頭より、最小限の切削で健全歯質を極力保存する Minimal

広島大学医学部・歯学部附属病院口腔維持修復歯科
むし歯・変色歯診療科 (主任: 新谷英章教授) 本論文の要旨の一部は、第42回日本歯科基礎医学会 (2000年9月, 大阪), 第113回日本歯科保存学会 (2000年11月, 東京), 第114回日本歯科保存学会 (2001年6月, 神奈川), 第115回日本歯科保存学会 (2001年11月, 福岡), 第80回 IADR (2002年3月, San Diego), 第116回日本歯科保存学会 (2002年6月, 東京), 第117回日本歯科保存学会 (2002年11月, 徳島) において発表した。

Intervention Dentistry (MID) の概念¹¹⁾ を推進している。本概念は、前述した Fusayama⁸⁾ の Painless Restoration, 及び Hosoda ら⁹⁾ の Tooth Substance Saving Restoration の概念が基本となっている。いずれにせよ、修復材料の安定した歯質接着性、並びに辺縁封鎖性が獲得されたことにより初めて実現に至ったものである。

ところで、この MID の概念は「健康な歯髄は最良の根管充填材」と言われる歯髄に対しても当てはまるものと考えられる。歯髄保護は従来から主として水酸化カルシウム製剤が覆髄材として用いられてきた。しかし、本製剤は、直接覆髄材として用いた場合、露髄部に壊死層を形成したり末梢側の歯髄が壊死に陥ったりする可能性がある等の報告がなされている¹²⁻²¹⁾。また、覆髄材自体に接着性を有しないため、外側性窩洞の形成等の偶発的露髄時における直接覆髄には適応不可能で、やむなく抜髄に至るケースも多々あった。さらに、加藤ら^{26, 29-30)} は、露髄窩洞における接着性レジン修復において、レジン以外の材料を用いて直接覆髄を施す処置を省略することにより、臨床操作の簡略化とレジンの被着面積の確保を指向した単一・一体化修復法を提唱している。このような状況下において、接着性レジンの直接覆髄材としての可能性が現在検討されている²²⁻³²⁾。

ところが、接着性レジンの象牙質/歯髄複合体に及ぼす刺激性についてはその有無について種々議論がある。象牙質窩洞における接着性レジンの歯髄刺激性、すなわちレジン修復物と歯髄組織との間に象牙質が一層介する場合の刺激性については、酸エッチング剤、ボンディング材並びに修復用レジン自体の化学的刺激、及び歯面処理を含めた一連の修復操作による刺激は皆無ではないが一過性のものであり、重篤な歯髄炎や歯髄壊死を惹起する程度ではないとのコンセンサスが得られている^{33, 34)}。また、それに伴ってリン酸によるトータルエッチング処理を含む接着システム、すなわちウェットボンディングシステムが開発され臨床に應用されている³⁵⁾。しかし、接着性レジンによる直接覆髄における歯髄刺激性、換言すればレジンと歯髄組織が直接接触する場合の刺激性についてはいまだコンセンサスが得られていない。臨床的、実験病理学的にはレジン歯髄の良好な修復性変化を妨げないという報告^{22, 30)}がある一方で、レジンの各構成成分の中には培養細胞に対して毒性を有するものも存在するとの相反する研究結果³⁶⁻⁴⁵⁾も見受けられ、レジンの化学的毒性に対する懸念が未だ払拭されていないのが現状である。

しかるに、現在報告されている *in vitro* の研究を改め

て検討してみると、これらの研究では予め公表されているレジンの構成成分を単独で用い、さらに適当な濃度に設定してそれらの細胞毒性の検討を行っているのみである。すなわち、従来の *in vitro* におけるレジンの細胞毒性に関する研究には、レジンの重合硬化後、実際に溶出する成分の種類やその溶出濃度について詳細に検討した報告は見受けられず、また、各溶出成分の溶出濃度における細胞毒性や、さらにそれらの成分が混合された場合の細胞に及ぼす相互作用については検討されていない。このことが現在、*in vitro* と *in vivo* の研究成果が平行線をたどっている要因になっているのではないかと推察される。

本研究では、現在汎用性の高い接着性レジンを用いて従来の *in vitro* の研究におけるいくつかの問題点を検討し、培養ラット歯髄細胞に及ぼす影響を検索する目的で実験を立案計画し、考究を試みた。

材料と方法

実験 1：重合硬化後のレジンより溶出する成分とその濃度変化に関する検討

1) 供試接着性レジン材料

本実験で使用した接着性レジン材料とその公表されている構成成分を一括して表 1 に示す。すなわち、Bis-GMA 系接着性レジンの Clearfil Linerbond II Σ (クラレメディカル、東京、以下 LB と略す) および 4-META/MMA-TBB 系レジンの Super-Bond D Liner DUAL (サンメディカル、滋賀、以下 SB と略す) を用いた。

表 1 実験に供された各ボンディングレジンの構成成分

Clearfil Linerbond II Σ (LB) :	
LB BOND A [Lot No. 00087A]	
Bis-GMA	
MDP	
Hydrophobic DMA	
HEMA	
Microfiller	
光増感剤	
Super-Bond D Liner DUAL (SB)	
Base [Lot No. VR 1]	Catalyst [Lot No. VF 63]
4-META	TBB
HEMA	
ジメタクリレート	
MMA	
PMMA 系ポリマー	
光増感剤	

表2 GC-MS の仕様

QP 1100EX	
Injection Temperature	230°C
Column	DB-1 (J & W Scientific Incorporated, USA)
Column Temperature	150°C (1 min)-230°C (20 min) 10°C/min
Carrier Gas	He
Ionization Method	EI
Electron Energy	70 eV
Interface Temperature	250°C
Ion Source Temperature	250°C

2) レジン試片の調製

各接着性レジンを経細胞培養用の 24 well dish (MULTIDISH 24WELLS, ナルジェスインターナショナル, 東京) に採取し, 製造業者の指示に従い重合硬化させた。LB は 1 well あたりボンド A を 2 滴採取し, SB は 1 well あたりベースを 2 滴, キャタリストを 1 滴採取し混合した。いずれのボンディングレジンもレジン練和棒により攪拌した後, well 底面に均一な厚さになる様に調整し, 光照射器 (OPTILUX 500, Sybron/KERR, California, USA) を用いて 20 秒間光照射し硬化させた。

半数はそのまま室温にて 24 時間保存し, 残りは細菌等の簡易嫌気培養に用いられる BBL GasPac Anaerobic System (Becton Dickinson and Co., USA) と Anaero Pack (三菱ガス化学株式会社, 東京) との併用による CO₂ 環境の下, 60°C パラフィン熔融器中で, 24 時間保存した。

3) レジンの重合度の検討

前述の方法にて重合硬化されたレジン試片の重合度を検討するために, アストラブルーのメタノール溶液によるレジン表面の未重合層の検索⁴⁶⁾ と, フーリエ変換赤外分光装置 (FTIR-4200, 島津製作所, 京都, 以下 FT-IR と略す) による二重結合の残余の観察を行った。

細胞培養用の 24 well dish において, 前述の 2 種の環境下で重合硬化されたレジン試片にアストラブルーのメタノール飽和溶液を 2 分間塗布後, 水洗乾燥し, その染色性を比較検討した。また, FT-IR 分析用試料の調製は以下のごとく行った。すなわち, BaF₂ Windows-Discs (φ13 mm×2 mm, S. T. JAPAN INC., 東京) 上で各レジンを経約 12 μm の厚さで前述の 2 種の環境下で重合硬化させ, 赤外光透過法で測定した。

4) 溶出成分の同定と濃度変化の分析

調製された各レジン試片を 10% FETAL BOVINE SERUM (三光純薬, 以下 FBS と略す) 添加の培養液 (ダルベッコイーグル培地, 日水製薬, 東京, 以下

DMEM 培地と略す) に浸漬し, 培養液を 1 日ごとに回収し, 交換した。回収された培養液を経ガスクロマトグラフィー (QP 1100EX, 島津製作所, 京都, 以下 GC-MS と略す) を用いて, ガスクロマトグラフ-質量スペクトル装置結合分析法 (GC-MS 法)⁴⁷⁾ に従い分析し, 各レジンから溶出する構成成分の同定とその濃度変化を検討した。なお, GC-MS の仕様を表 2 に示す。

実験 2 : 測定された溶出濃度に調製された各種溶出成分を含む培養液において培養された歯髄細胞の初期付着及び増殖に関する検討

1) 歯髄細胞

8 週齢の Lewis 系雄性ラットにクロロホルムの吸入麻酔法により全身麻酔を施し, 上下顎前歯より歯髄組織を無菌的に摘出した。その後, 2.0 mg/ml のコラゲナーゼ (和光純薬工業, 大阪) および 2.5 mg/ml のトリプシン (和光純薬工業, 大阪) を DMEM 培地に加えた酵素液中にて 37°C で 20 分間の攪拌を 4 回行い, 摘出された歯髄組織より歯髄細胞を単離した。単離された歯髄細胞は, 10% FBS を添加した DMEM 培地にて培養され 2 回継代したものが実験に供された。

2) 溶出構成成分添加培養液の調製

実験 1 で同定された溶出構成成分を, 測定された溶出濃度の最大値 (表 3) になる様に濃度調整した 10% FBS 添加の DMEM 培地と, その最大濃度で各溶出成分を添加混合した 10% FBS 添加の DMEM 培地を実験に用いた。溶出成分を加えない 10% FBS 添加の DMEM 培地を対照とした。

3) 歯髄細胞の初期付着能と増殖活性の検討

調製された培養液を用いて細胞培養用 24 well dish で 1 well あたり 3×10⁴ 個の細胞を培養し, 付着細胞数の経日的変化を細胞計数装置 (COULTER COUNTER Z1, ベックマン・コールター, 東京) を用いて測定した。なお, 初期付着能は, 細胞播種後 12 時間後の付着細胞数にて検討し, 細胞増殖活性は細胞播種後 1, 3, 7 および 14 日後の付着細胞数を経以って検討した。

表3 各レジンにおける溶出構成成分と測定された溶出濃度の最大値

Clearfil Linerbond II Σ (LB) :	
光増感剤 (カンファーキノロン)	0.38 μg/ml
HEMA	17.0 μg/ml
還元剤 (ジヒドロキシエチル-P-トルイジン)	0.21 μg/ml
安定剤 (ブチルヒドロキシトルエン)	0.21 μg/ml
Super-Bond D Liner DUAL (SB) :	
光増感剤 (カンファーキノロン)	4.73 μg/ml
HEMA	9.92 μg/ml
TBB	7.70 μg/ml
MMA	0.27 μg/ml

実験3 : RT-PCR 法による歯髄細胞の分化に関する検討

1) 歯髄細胞

実験2と同様に、8週齢の Lewis 系雄性ラットにクロロホルムの吸入麻酔法により全身麻酔を施し、上下顎前歯より歯髄組織を無菌的に摘出した。その後、2.0 mg/ml のコラゲナーゼおよび 2.5 mg/ml のトリプシン含有 DMEM 培地中にて 37°C で 20 分間の搅拌を 4 回行い、摘出された歯髄組織より歯髄細胞を単離した。単離された歯髄細胞は、10% FBS を添加した DMEM 培地にて培養し、2 回継代したものを実験に供した。

2) 培養液の調製

実験2と同様に、同定された溶出成分を測定された溶出濃度の最大値(表3)になる様に濃度調整した 10% FBS 添加の DMEM 培地、および、その最大濃度で各溶出成分を添加混合した 10% FBS 添加の DMEM 培地を実験に用いた。溶出成分を加えない 10% FBS 添加の DMEM 培地で培養した歯髄細胞を対照とした。

3) total RNA の抽出, 精製

歯髄細胞を 60 mm 培養 dish (スミロンセルタイト C-1 シャーレ 60 φ, 住友ベークライト, 東京) に播種し、調整された各種培養液において培養した。歯髄細胞がコンフルエントになったのを確認し、TRIzol 試

薬 (TRIzol Reagent, インビトロジェン, 東京) を用い、使用説明書に従って total RNA を抽出した。回収された total RNA を DNase I (SIGMA, 東京) 処理した後、Purification kit (QIAGEN, 東京) により精製したものを試料とした。

4) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

抽出した total RNA のうち各々 1 μg を実験に供した。1 × RT Buffer, 1 mM dNTPs, RNase Inhibitor, 1.25 μM Random Primer, および, Rever Tra Ace (東洋紡績, 大阪) を用いて 42°C で 20 分間、さらに 99°C で 5 分間の逆転写酵素反応により、cDNA の合成を行った。

合成された等量の cDNA を 1 × PCR buffer, KOD-Plus-DNA polymerase, 0.2 mM dNTPs, 1 mM MgSO₄ (東洋紡績, 大阪) および 0.3 μM Primer mix を各々加え、サーマルサイクラー PC-701 (Astec, 福岡) にて増幅した。変性反応を 94°C で 15 秒間、増幅反応を ALP, Col I および BSP の各々のアニーリング温度で 30 秒間、伸長反応を 68°C で 1 分間施し、これを 30 サイクル行った。生成された PCR 産物を 1.8% agarose gel で電気泳動により確認した。用いたこれらのプライマーおよび反応条件を表 4 に示す。

表4 RT-PCR 法における primer sets および反応条件

RT-PCR primer set	Sequence	Product length (bp)	Annealing temperature (°C)
ALP	F 5'-aggcaggattgaccacgg-3' R 5'-tgtagtctgctcatga-3'	440	55.0
Col I	F 5'-ctgacctctctgcgcctgatgtcc-3' R 5'-gtctggggcaccacgtccaaggg-3'	300	56.5
BSP	F 5'-cactcactgtctctctccag-3' R 5'-ctgagagtgtggcgttctct-3'	385	57.6

実験4：各種溶出成分の混合時における物質変化の検討

LB および SB から溶出する各構成成分を、測定された溶出濃度の最大値で混合し蒸留水に溶解させた。構成成分の混合直後の溶液と、混合後室温、大気下において7日間放置した溶液における各成分の量の測定と、それら成分の経日的物質変化を高速液体クロマトグラフィー (LC-10 A, 島津製作所, 京都, 以下 HPLC と略す) を用いて分析した。HPLC の仕様を表5に示す。

表5 HPLC の仕様

LC-10 A	
Column	STR OSD- II (Shinwa Chem. Ind. Ltd., Japan)
Mobile phase	Acetonitrile/Water = 1/1 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min.
Detector	SPD-10A
Wave length	245 nm
Column Temperature	40°C

結 果

実験 1

1. レジンの重合度の検討

(1) アストラブルーによるレジン表面の未重合層の検索

重合硬化させたレジン試片のアストラブルーによる染色像を図1に示す。LB, SB ともに、レジンを好気下において重合 (大気下, 室温, 24時間保存) させた試片はアストラブルー溶液による染色性が認められたが、嫌気下において重合 (CO₂ 環境下, 60°C, 24時間保存) させた試片は不染色であった。

(2) FT-IR による残余二重結合の検索

重合硬化後の各レジン表面の FT-IR 分析結果を図2に示す。LB および SB ともにマトリックスレジンのメタクリロキシ基中の C=C 量のピークは 1640 cm⁻¹ 付近に示された。重合に関与しないベンゼン環内の C=C 量のピークを基準にすると、いずれのレジンも嫌気下で重合硬化させた場合は好気下で重合させた場合と比較してメタクリロキシ基中の C=C 量のピークは減少した。

2. 溶出成分の同定とその濃度変化の分析

LB および SB において、GC-MS 法により分析された重合硬化後に溶出する構成成分の質量スペクトルを

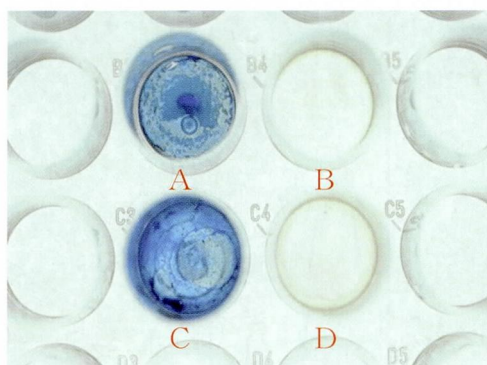


図1 アストラブルーによるレジン表面の染色像
LB, SB ともに、レジンを好気下において重合 (大気下, 室温, 24時間保存) させた試片はアストラブルー溶液による染色性が認められたが、嫌気下において重合 (CO₂ 環境下, 60°C, 24時間保存) させた試片は不染色であった。(A: LB を好気下において重合させた試片 B: LB を嫌気下において重合させた試片 C: SB を好気下において重合させた試片 D: SB を嫌気下において重合させた試片)

図3および図4に示す。LB からは、光増感剤 (カンファーキノン), HEMA, 還元剤 (ジヒドロキシエチル-P-トルイジン), および安定剤 (ブチルヒドロキシトルエン) の溶出を認めた。また、SB からは光増感剤 (カンファーキノン), HEMA, TBB および MMA の溶出を認めた。

一方、同定された各レジンの溶出構成成分の溶出濃度変化を図5および図6に示す。LB において、光増感剤と HEMA は培養液に浸漬後2日間で溶出量の大部分が溶出し、3日後にはそれらの溶出はほとんど検出されなかった。また、還元剤と安定剤は少量ながら持続的な溶出を認めた。SB においては、光増感剤, HEMA, TBB および MMA はいずれも培養液に浸漬後2日間で大部分が溶出し、3日後にはそれらの溶出はほとんど検出されなかった。

実験 2

1. 初期付着能

各レジンの溶出構成成分の測定した濃度の最大値になる様に濃度調整した培養液と、これら成分をその濃度で混合した培養液において培養した歯髄細胞の初期付着能の測定結果を図7, 8に示す。LB において、光増感剤では対照と比較すると有意差は認められなかったが、HEMA, 還元剤および安定剤では有意に抑制された ($p < 0.05$)。また、それらが混合された場合では HEMA, 還元剤および安定剤の単独の場合に示された

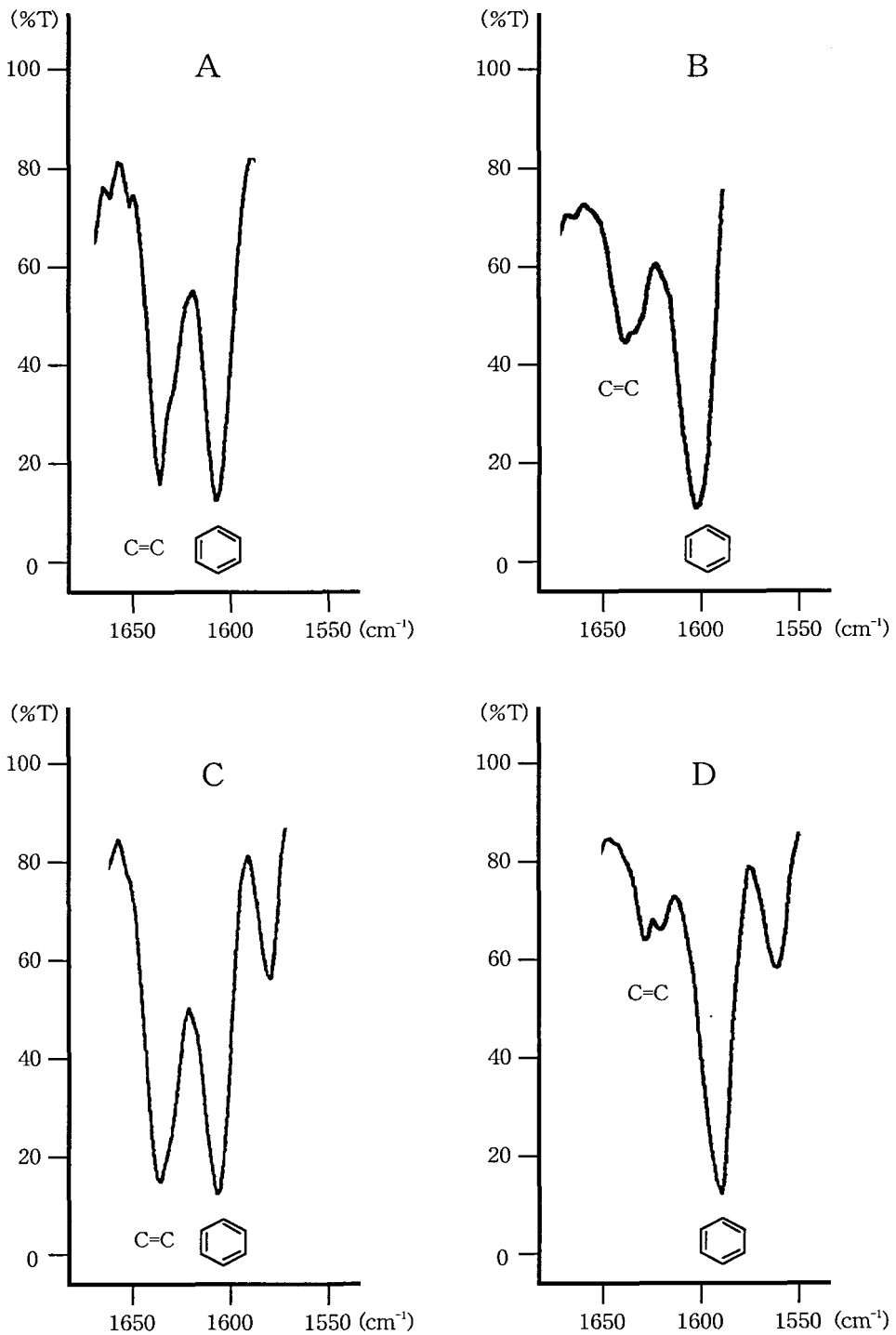


図2 レジン表面のFT-IRによる分析スペクトル
 重合に関与しないベンゼン環内のC=C量のピークを基準にすると、いずれのレジンも嫌気下で重合硬化(CO₂環境下, 60°C, 24時間保存)させた場合は好気下で重合(大気下, 室温, 24時間保存)させた場合と比較してメタクリロキシ基中のC=C量のピークは減少した。(A: LBを好気下において重合させた試片 B: LBを嫌気下において重合(させた試片 C: SBを好気下において重合させた試片 D: SBを嫌気下において重合させた試片)

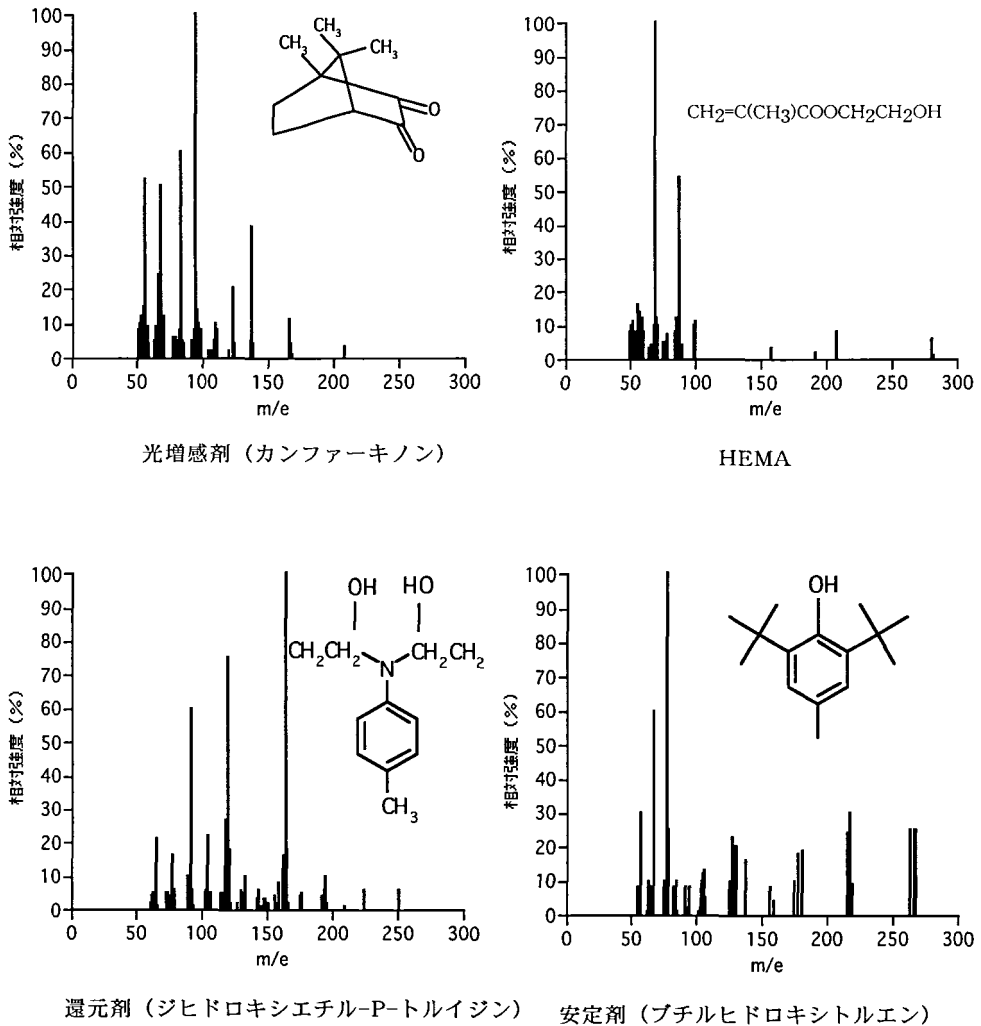


図3 LBにおける溶出構成成分のGC-MS分析による質量スペクトル
光増感剤(カンファーキノン), HEMA, 還元剤(ジヒドロキシエチル-P-トルイジン), および安定剤(ブチルヒドロキシトルエン)の溶出を認めた。

抑制作用は軽減され、対照との間に有意差は認められなかった。SBにおいて、光増感剤, TBB および MMA では対照と比較して有意差は認められなかった。しかし, HEMA ではLBの場合と同様に有意に抑制されていた ($p < 0.05$)。また, 混合された場合, SBにおいても HEMA の単独の場合に認められた様な抑制作用は軽減され、対照との間に有意差は認められなかった。

2. 増殖活性

各レジン溶出構成成分の測定した濃度の最大値になる様に濃度調整した培養液において培養した歯髓細胞の増殖活性を図9, 10に示す。LBにおいて、光増感剤は対照とほぼ同程度の増殖活性を示したが、HEMAは培養1日目から増殖活性は有意に抑制された。また、

還元剤および安定剤は、程度の差はあるが培養7日目以降に有意に抑制された ($p < 0.05$)。SBにおいては、光増感剤, TBB および MMA は対照とほぼ同程度の増殖活性を示したが、HEMAは培養3日目以降に増殖活性は有意に抑制されていることが示された ($p < 0.05$)。

各レジン溶出構成成分の測定した濃度の最大値で混合した培養液において培養した歯髓細胞の増殖活性を図11, 12に示す。LBならびにSBにおいて溶出成分単独の場合では増殖活性を抑制する成分、すなわち HEMA, 還元剤および安定剤が存在したが、混合した場合には、LBおよびSBともにその抑制作用は軽減され、14日後では対照との間に有意差は認められなかった。

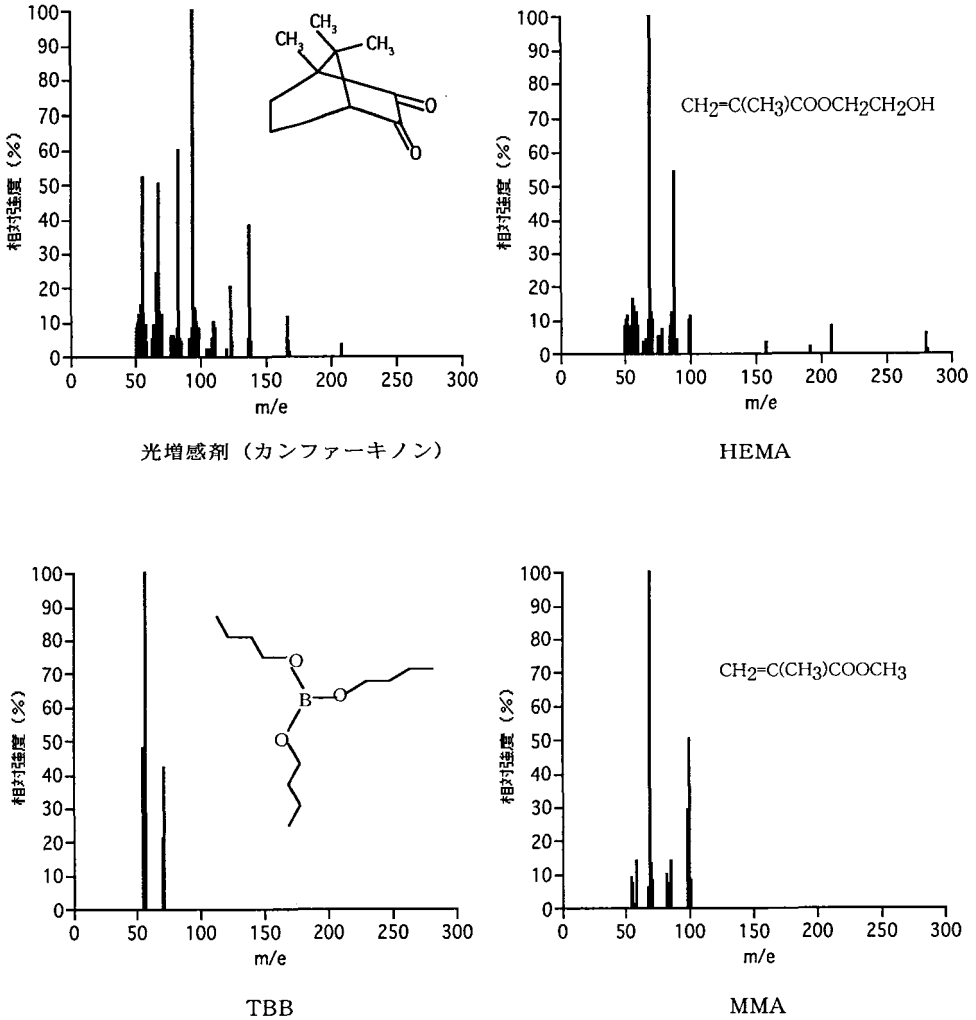


図4 SBにおける溶出構成成分のGC-MS分析による質量スペクトル
光増感剤 (カンファーキノン), HEMA, TBB および MMA の溶出を認めた。

実験 3

RT-PCR 法における分析結果を図13に示す。各溶出成分が測定した溶出濃度の最大値になる様に調整した培養液で培養した歯髄細胞も、また各溶出成分をその濃度で混合した培養液において培養した歯髄細胞も、ALP および Col I に関しては、いずれも対照と同程度の高い発現を認めた。

一方、BSP に関しては、各種溶出成分のそれぞれがさらされた歯髄細胞では、いずれも対照に比較しても発現は低下した。これらの成分を混合した場合も対照に比較して発現は低下したが、構成成分を単独で歯髄細胞にさらした場合よりも有意に高い発現を認めた。

実験 4

LB からの溶出成分を混合した場合の HPLC による物質変化の分析結果を図14に示す。3.83 min 付近に HEMA, 4.47 min 付近に還元剤, 7.84 min 付近に光増感剤のピークを認めたが、安定剤は検出されなかった。検出されたいずれの成分も混合7日後にはピーク量は減少したが、混合することによって 5.76 min 付近に新たなピークが生じ、混合7日後にはそのピーク量は増大した。

SB からの溶出成分を混合した場合の HPLC による物質変化の分析結果を図15に示す。3.83 min 付近に HEMA, 5.10 min 付近に TBB, 6.50 min 付近に MMA, 7.84 min 付近に光増感剤のピークを認めた。LB の場合と同様に、検出されたいずれの成分も混合7

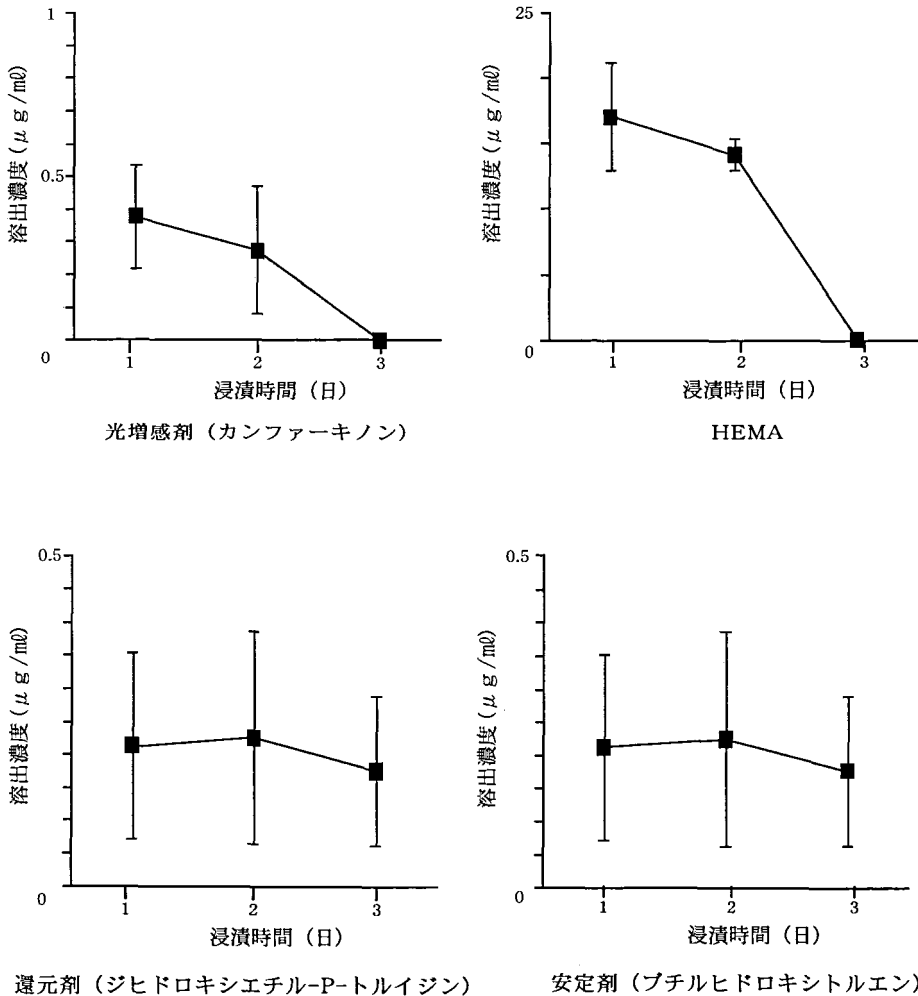


図5 LBにおける溶出構成成分の濃度変化

光増感剤とHEMAは培養液に浸漬後2日間で溶出量の大部分が溶出し、3日後にはそれらの溶出はほとんど検出されなかった。また、還元剤と安定剤は少量ながら持続的な溶出を認めた。

日後にはピーク量は減少した。さらに、混合することによって7.26 min付近に新たなピークが生じ、混合7日後にはそのピーク量は増大した。

考 察

実験 1

1. 嫌気下におけるレジンの重合度

実験に供されたレジン試片は、アストラブルーメタノール飽和溶液に不染であった。したがって、本実験において設定された嫌気雰囲気は、その環境下においてレジンを重合させると、表面の未重合層を可及的に減少可能ながことが明らかになった。

また、Bis-GMA系レジンであるLB、および4-META/MMA-TBB系レジンであるSBは、いずれもマ

トリックスレジンのメタクリロキシ基中のC=Cが開裂し、架橋しながらポリマーを形成する。すなわち、メタクリロキシ基中のC=C量の減少はレジンの高い重合度を意味する。FT-IRによる残余二重結合の検索において、LBおよびSBともに嫌気下で重合硬化させた場合は、好気下で重合させた場合と比較してメタクリロキシ基中のC=C量の減少を認めた。この結果より、本実験で設定された嫌気雰囲気下においては、レジンの表面のみならず内部においても高い重合率が得られることが判明した。

2. 嫌気下で重合されたレジン試片の意義

富士谷ら³¹⁾はBis-GMA系および4-META/MMA-TBB系レジンをサルの歯髄に直接覆髄（以下直覆と略す）した場合における露髄創傷部の治癒のプロセスを

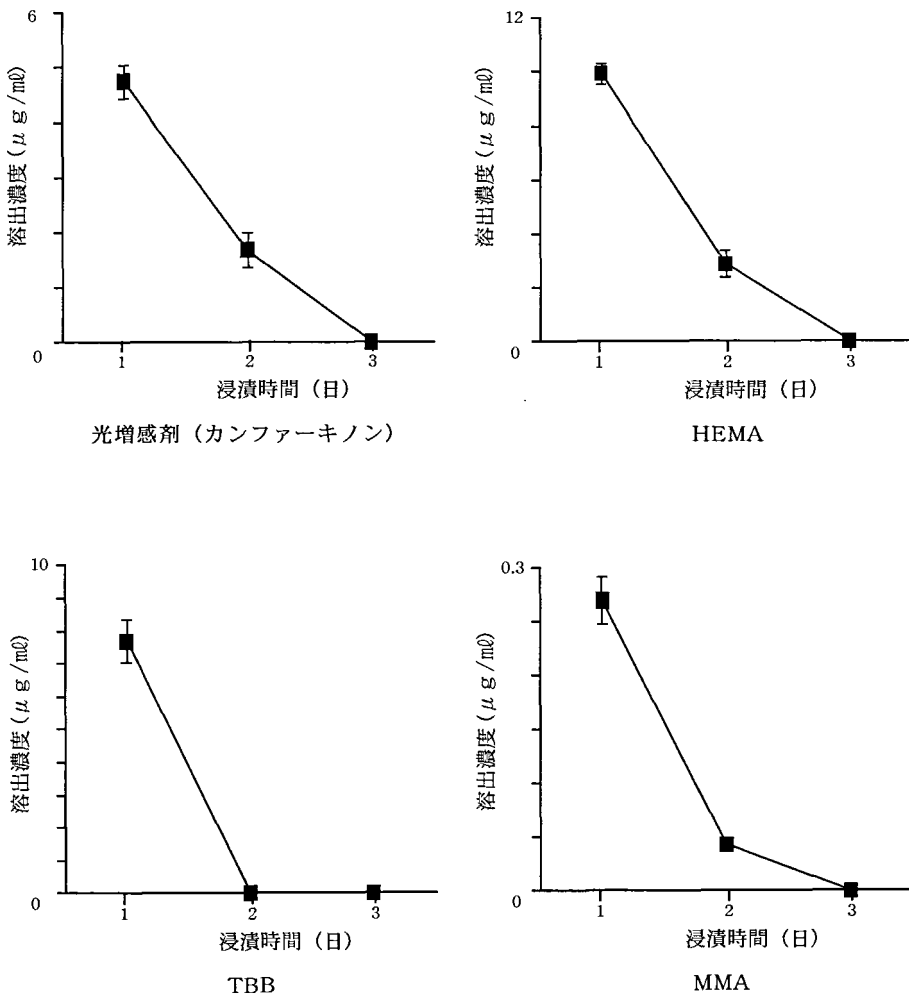


図6 SBにおける溶出構成成分の濃度変化

光増感剤, HEMA, TBB および MMA はいずれも培養液に浸漬後2日間で大部分が溶出し, 3日後にはそれらの溶出はほとんど検出されなかった。

報告している。すなわち, 直覆直後のレジンの菌髄に接する部分は重合性が不良で, その重合不全部位からの構成成分の溶出は比較的高濃度であるため露髄創傷部に限局した急性炎症を認めるが, その後, 溶出が減少し急性炎症が治まり慢性炎症期になると, 紡錘形の繊維芽細胞様の細胞, あるいはマクロファージ等が出現し, それらの溶出構成成分は貪食され排除される。この時点で露髄創傷部においては炎症性変化から修復性変化に移行し, Dentin bridge の形成を伴う治癒が起これと考察している。

本実験では, レジン重合不全の要因である酸素と水分を排除し, さらに重合度を高めるために60°Cの熱を加えることによりレジン試片表面および内部の重合不全部分を極力減少させた。したがって, 本実験条件に

おいて重合硬化されたレジンからの構成成分の溶出は可及的に少なくなり, これは前述の露髄創傷部での炎症性変化が治まり修復性変化が開始すると考えられる時点におけるレジンの状態を *in vitro* において再現しているものと考えられる。

3. 溶出成分の同定とその濃度変化の分析

重合硬化後におけるLBより, 製造業者によって公表されていない構成成分, すなわち還元剤と安定剤の溶出を認めた。一方, 公表されている構成成分のうち, Bis-GMA, MDP および Hydrophobic DMA の溶出は本実験においては確認されなかった。SBにおいても製造業者によって公表されている構成成分のうち, 4-META, ジメタクリレート, PMMA系ポリマーおよび安定剤の溶出は確認できなかった。すなわち, 公表さ

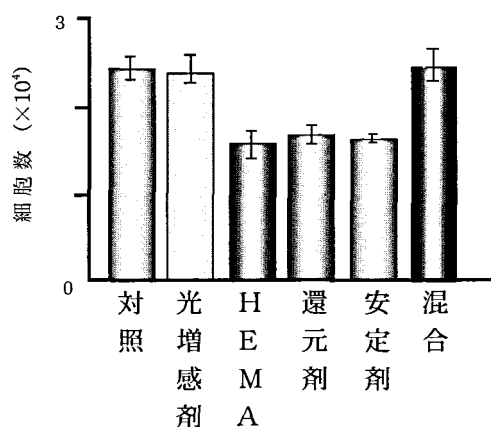


図7 LBにおける溶出構成成分に対する歯髄細胞の初期付着能

光増感剤では対照と比較すると有意差は認められなかったが、HEMA、還元剤および安定剤では有意に抑制された ($p < 0.05$)。それらが混合された場合では対照との間に有意差は認められなかった。

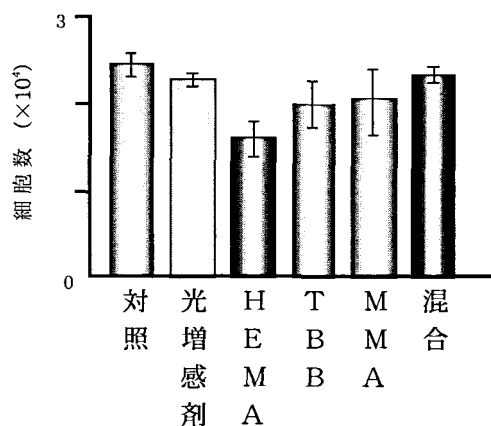


図8 SBにおける溶出構成成分に対する歯髄細胞の初期付着能

光増感剤、TBB および MMA では対照と比較して有意差は認められなかったが、HEMA では LB の場合と同様に有意に抑制された ($p < 0.05$)。それらが混合された場合では対照との間に有意差は認められなかった。

れている構成成分すべてが必ずしもレジンの重合硬化後に溶出し歯髄にさらされているのではないこと、また、その一方で、公表されていない構成成分が歯髄にさらされている可能性が示唆された。

また、同定された構成成分の溶出の様相は各成分によって異なっていた。しかし、その溶出濃度は既に報告されている、好気雰囲気下で重合したレジンの溶出

成分の測定濃度⁴⁸⁾ や培養細胞に重篤な影響を与えることとされる濃度に比較すると一般に低い値を示した。従来の *in vitro* の研究のほとんどは、予め製造業者によって公表されているレジンの各種構成成分に対する細胞毒性の検討であった。しかし、本実験により、従来の *in vitro* の研究において設定された構成成分の濃度とレジンの重合硬化後の実際の溶出濃度の様相は異なることが示唆された。

実験 2

現在までに *in vitro* における接着性レジンの構成成分の細胞毒性に関する研究報告は数多く見受けられたが、これらの研究は予め公表されているレジンの構成成分を単独で用い、さらに適当な濃度に設定してそれらの細胞毒性の検討を行っているのみであった。しかし、第Ⅱ章において明らかにされたように、レジンの重合硬化後に公表されている構成成分が必ずしも溶出して歯髄細胞にさらされている訳ではなく、さらに、公表されていない構成成分が歯髄細胞にさらされる可能性も示唆された。また、各溶出成分の測定濃度は、従来の *in vitro* の研究において細胞に対して重篤な影響を与えることとされる濃度と比較すると一般に低い値を示した。

そこで、実際に測定した各構成成分の溶出濃度となるように調製された培養液で歯髄細胞を培養したところ、歯髄細胞の初期付着能および増殖活性に対して抑制的に作用する成分が存在したが、歯髄細胞を死滅させることはなかった。すなわち、実際に重合硬化後に溶出し歯髄細胞にさらされる構成成分の濃度は、歯髄細胞を死滅させる程度ではないことが判明した。この結果は Jontell ら³⁶⁾ の報告を支持するものであり、レジンの構成成分の細胞に及ぼす影響はさらされる濃度に大きく依存し、その濃度が低いと細胞毒性の程度も軽減される可能性のあることが明らかとなった。

また、各種構成成分をそれぞれの溶出濃度で混合した場合には、個々の成分単独の場合に示された抑制作用は軽減され、対照との間に有意差は認められなかった。混合されることによってそれぞれの溶出成分が相互に反応し物質変化を起こしている可能性が考えられ、その結果、成分単独の場合に認められた歯髄細胞の初期付着能および増殖活性に対する抑制作用は軽減したのではないかと推察される。

実験 3

接着性レジンを用いて直接覆髄を施すと、レジンからの構成成分の溶出がある程度減少した時点で炎症性変化が治まり、Dentin bridge の形成を伴う修復性変化に移行する。すなわち、歯髄細胞の中にはレジンから

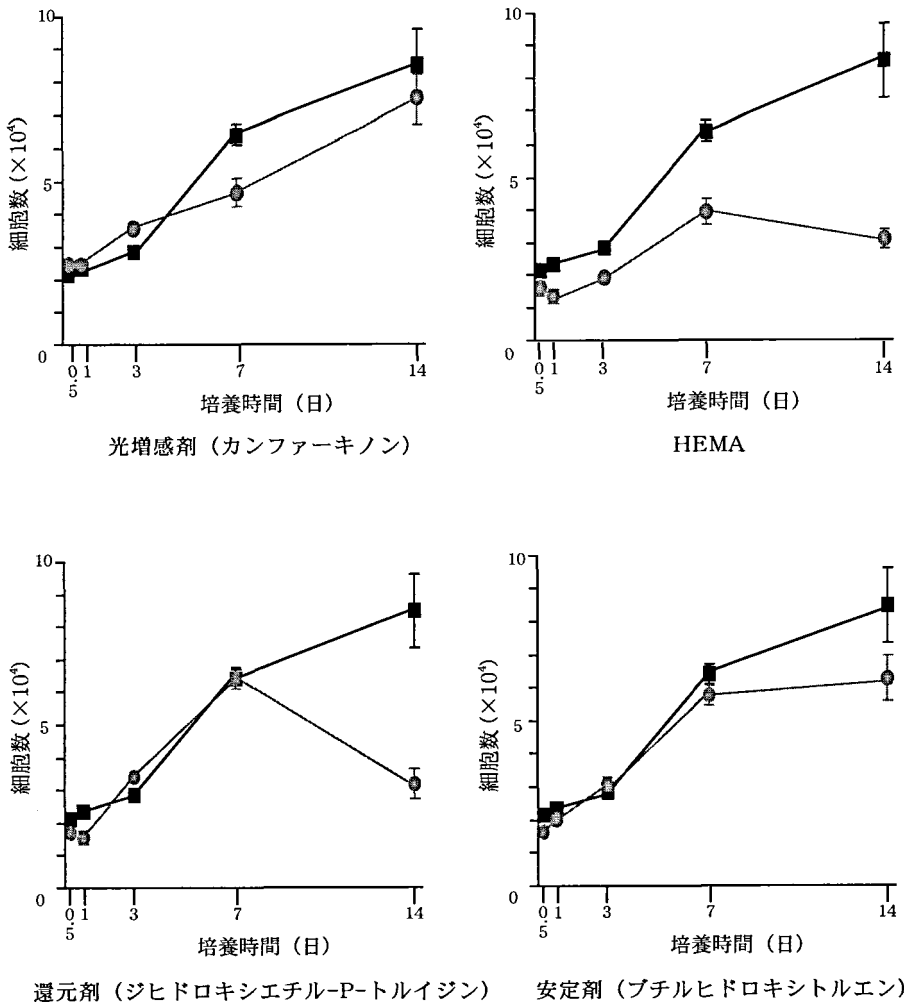


図9 LBにおける溶出構成成分に対する歯髄細胞の増殖活性

光増感剤は対照とほぼ同程度の増殖活性を示したが、HEMAは培養1日目から増殖活性は有意に抑制された。還元剤および安定剤は、程度の差はあるが培養7日目以降に有意に抑制された ($p < 0.05$)。 (●: 各溶出成分を含む培養液で培養 ■: 対照)

の溶出成分にさらされた後に象牙芽細胞に分化して Dentin bridge を形成する細胞も存在すると考えられる。

そこで、各構成成分が実際に測定した溶出濃度となるように調製された培養液で培養した歯髄細胞の分化に関して検討したところ、歯髄由来細胞の分化形成において比較的初期段階、すなわち、細胞の最も未分化な段階における分化マーカーである ALP および Col I の高い発現を認めた。しかし、BSP に関しては、対照に比し低い発現を示したが、各成分を混合することによりその発現への抑制は軽減されることが示された。

BSP は歯髄由来細胞の象牙芽細胞への最終分化の指標とされる⁴⁹⁻⁵⁴⁾。したがって、歯髄細胞が各溶出成分

の溶出濃度に単独でさらされた場合、分化の最終段階、すなわち、象牙芽細胞への分化に対して抑制的に作用することが示唆された。さらに、歯髄細胞の初期付着および増殖の場合と同様に、分化に関しても溶出成分が混合されると単独の場合に示された様な抑制作用は軽減することが明らかになった。

このように、分化に関する検討結果からも、構成成分が混合されることによって各成分が相互に反応して物質変化が起こり、成分単独の場合に認められた様な抑制作用が軽減した可能性が推察された。

実験 4

実験2 および実験3で、歯髄細胞の初期付着、増殖

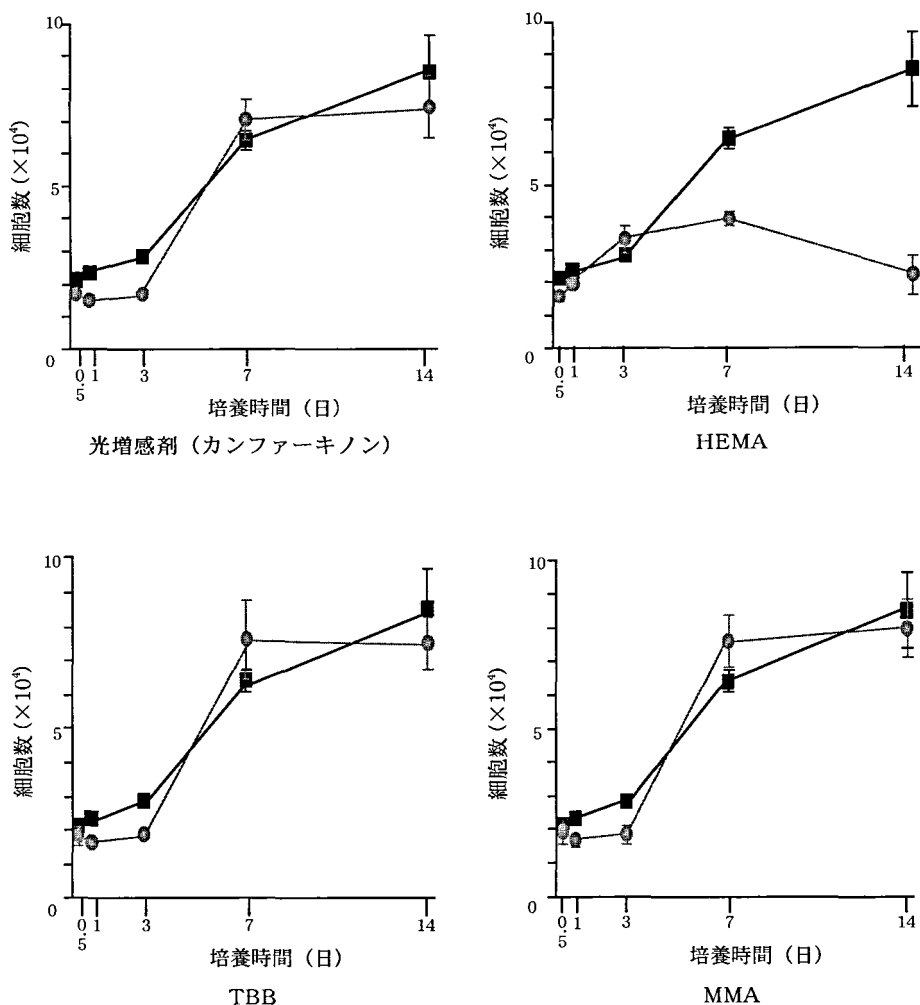


図10 SBにおける溶出構成成分に対する歯髄細胞の増殖活性

光増感剤, TBB および MMA は対照とほぼ同程度の増殖活性を示したが, HEMA は培養3日目以降に増殖活性は有意に抑制された ($p < 0.05$)。 (●: 各溶出成分を含む培養液で培養 ■: 対照)

および分化において各成分が相互に反応して物質変化が起こり, 成分単独の場合に認められた様な抑制作用が軽減した可能性が考えられた。

そこで, 各種構成成分を実際に測定した濃度の最大値で混合し, 調製された溶液の物質変化を検討したところ, 各構成成分は経時的に相互に反応してその量を減じ, 新たな物質の生じていることが判明した。

レジン重合硬化の機構を改めて考えてみると, レジンは光を吸収した光増感剤が励起されたのち容易にラジカルを発生させ重合を開始する一方, 還元剤が励起された光増感剤に作用してフリーラジカルを発生し重合硬化する。安定剤はラジカル重合において, 重合開始剤やモノマーから生じたラジカルと速やかに反応して安定なラジカル中性物質を生じて重合反応を禁止

する⁵⁵⁾。したがって, 溶出した構成成分を混合することで, 単独の場合には細胞毒性を示した成分が相互に反応, 結合し, 単独としての量は減少して, 細胞に対して安定なラジカル中性物質が新たに生じるものと考えられる。このことが実験2および実験3において, 構成成分を混合した場合に細胞に及ぼす影響が単独の場合に比べて軽減したことを裏付けているものと考えられる。

また, 本実験では, 混合した各構成成分の濃度が, 比較的希薄な溶液中で, さらに自然光の下, 室温環境下において7日間放置後その物質変化を検討した。このような条件下においても微量ながらも経時的な各成分の量の減少を認め, さらにそれらの反応による新たな物質が生じることが判明した。

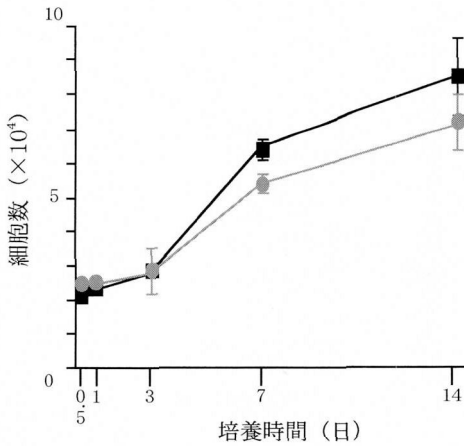


図11 LBにおける溶出構成成分を混合した場合の培養歯髄細胞の増殖活性
各溶出構成成分を混合した場合には、HEMA、還元剤および安定剤の抑制作用は軽減され、14日後では対照との間に有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。 (●：各溶出成分を含む培養液で培養 ■：対照)

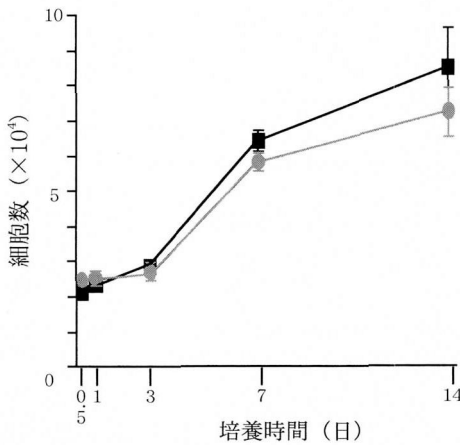


図12 SBにおける溶出構成成分を混合した場合の培養歯髄細胞の増殖活性
各溶出構成成分を混合した場合には、HEMAの抑制作用は軽減され、14日後では対照との間に有意差は認められなかった ($p < 0.05$)。 (●：各溶出成分を含む培養液で培養 ■：対照)

以上の結果より、レジンに細胞毒性を減ずる為には、レジンの重合特性を改善することにより重合度を高め、表面の未重合層を極力少なくし、また重合硬化後のレジン表面や内部からの構成成分の溶出を極力少なくすることが肝要である。さらに構成成分自体の毒性を極力減ずるとともに溶出後の各成分の相互作用を検討し、

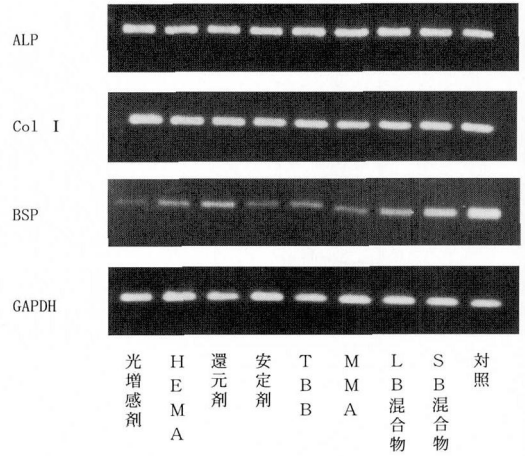


図13 RT-PCR法による分析結果
各溶出構成成分を混合した場合は、それぞれの溶出構成成分単独の場合よりも高いBSPの発現を示した。

それらを材料の改善の為にフィードバックしてゆくことが今後の生物学的により安全な修復材料の開発に大きな意義を持つものと考えられた。

総 括

近年、FDIは、最小限の切削で健全歯質を極力保存するMinimal Intervention Dentistryの概念を推進している。本概念は「健康な歯髄は最良の根管充填材」と言われる歯髄に対しても当てはまるものと考えられる。従来、歯髄保護には水酸化カルシウム製剤が覆髄剤として主として用いられてきた。しかし、本製剤は、直接覆髄剤として用いた場合、露髄部に壊死層を形成したり¹²⁻²¹⁾、覆髄材自体に接着性がないため、外側性窩洞の形成等の偶発的露髄時における直接覆髄には適応不可能で、やむなく抜髄に至るケースも多々あった。このような状況下で、接着性レジンの直接覆髄剤としての可能性が現在検討されている。

*in vivo*の臨床的、あるいは実験病理学的研究では、正常歯髄におけるレジンの直接覆髄の良好な治癒が確認され、レジン修復時に発生する一連の歯髄刺激は一過性であることが判明している。しかし、レジンの各種構成成分の中には培養細胞に重篤な影響を及ぼすものも存在するという*in vitro*の相反する研究成果も報告されており、レジンの化学的毒性に対する懸念も依然存在するのが現状である。

ところが、従来の*in vitro*におけるレジンの細胞毒性に関する研究には、レジンの重合硬化後、実際に溶出する成分の種類やその溶出濃度について詳細に検討し

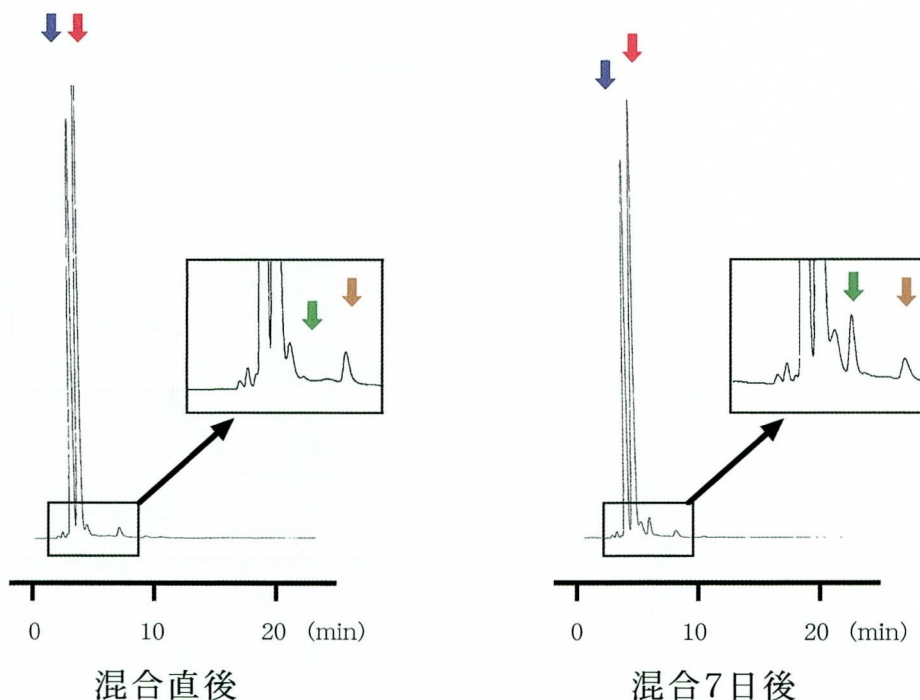


図14 LBにおける溶出成分の混合物のHPLCによる分析スペクトル
 検出されたいずれの成分も混合7日後にはピーク量は減少したが、混合することによって新たなピークが生じ、混合7日後にはそのピーク量は増大した。(↓：光増感剤 ↓：HEMA ↓：還元剤 ↓：新生物質)

た報告は見受けられず、各溶出成分の溶出濃度における細胞毒性や、それらの成分が混合された場合の細胞に及ぼす相互作用については何ら検討されていない。このことが現在、*in vitro* と *in vivo* の研究成果が平行線をたどっている要因になっているのではないかと推察される。

そこで本研究では、現在汎用性の高い Bis-GMA 系並びに 4-META/MMA-TBB 系接着性レジンの各種溶出成分を検索し、それらの培養ラット歯髄細胞に及ぼす影響を検討すると共に、前述の *in vitro* の研究におけるいくつかの問題点を検討し、*in vivo* と *in vitro* の研究成果の整合性について考察を加えた。

1. 嫌気下において重合した各レジンより溶出する成分とその濃度変化をガスクロマトグラフィーを用いて検討した。Bis-GMA 系レジンからは光増感剤、HEMA、還元剤及び安定剤、4-META/MMA-TBB 系レジンからは光増感剤、HEMA、TBB 及び MMA の溶出を認めた。光増感剤、HEMA、TBB 及び MMA は最初の 2 日以内に大部分が溶出し 3 日後にはほとんど検出されなかったが、還元剤と安定剤は少量ながら持続的な溶出が認められた。

2. 各溶出成分を測定された溶出濃度に調製した培養液において歯髄細胞を培養し、その初期附着能並びに増殖活性を検討した。光増感剤、TBB 及び MMA の細胞に及ぼす影響はほとんど認められなかったが、HEMA、還元剤及び安定剤は細胞の初期附着能並びに増殖活性を有意に抑制した。しかし、それぞれの溶出成分を混合するとその抑制作用は軽減された。
3. 各溶出成分を含む培養液中で歯髄細胞を培養し、その分化能を RT-PCR 法により alkaline phosphatase (ALP), type I collagen 及び bone sialoprotein (BSP) の発現を指標に調べた結果、各溶出成分を混合した場合はそれぞれの溶出成分単独の場合よりも高い BSP の発現を示した。
4. 各溶出成分の混合時における物質変化を高速液体クロマトグラフィーを用いて調べた結果、個々の成分が経時的に相互に反応し、新たな物質に変化していた。しかし、この新生物質が何であるのかはまだ判明しておらず、また混合した場合に細胞に対する抑制作用が軽減されたが、その作用機序は明らかにされていない。これらは今後、さらに検討する必要があると考えられる。

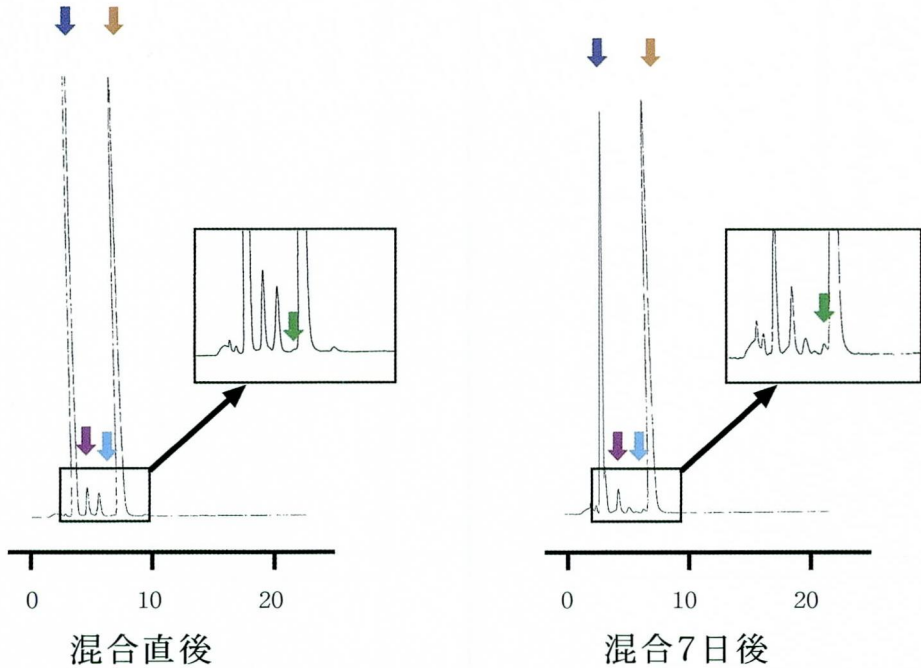


図15 SBにおける溶出成分の混合物のHPLCによる分析スペクトル

検出されたいずれの成分も混合7日後にはピーク量は減少したが、混合することによって新たなピークが生じ、混合7日後にはそのピーク量は増大した。(↓：光増感剤 ↓：HEMA ↓：TBB ↓：MMA ↓：新生物質)

本研究により、接着性レジンから種々の成分が溶出すること、測定された溶出濃度では歯髄細胞の初期付着能、増殖活性および分化能に対し抑制的に作用する成分が存在することを明らかにした。しかし、それらを混合すると物質変化を生じ、その抑制作用の軽減されることが判明した。本結果は *in vivo* と *in vitro* の従来の研究成果の整合性に関与する一見であり、今後の生物学的に安全な充填材料の開発に対して大きな意義を持つものと考えられる。

謝 辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました本学大学院医歯薬学総合研究科展開・顎口腔頸部医科学講座（保存修復学研究室）新谷英章教授に哀心より感謝の意を表します。

本研究遂行上および本論文作成上、御教示、御校閲を賜りました本学大学院医歯薬学研究科創生・先進医療開発科学講座医（口腔病理学）高田 隆教授ならびに本学大学院医歯薬学研究科創生・探索医科学講座（歯科理工学）岡崎正之教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究遂行上および論文作成上、終始御助言と御鞭撻を賜りました本学大学院医歯薬学総合研究科

展開・顎口腔頸部医科学講座（保存修復学研究室）富士谷盛興助教授に厚く御礼を申し上げます。

また、歯髄細胞の採取および培養に際し、御助言と御鞭撻を賜りました本学大学院医歯薬学総合研究科展開・顎口腔頸部医科学講座（保存修復学研究室）尾田良助手に厚く御礼を申し上げます。

また、FT-IR、GC-MS および HPLC 分析に関し、御助言と御鞭撻を賜りました本学大学院医歯薬学研究科創生・探索医科学講座（歯科理工学）野村雄二助手に厚く御礼を申し上げます。

また、RT-PCR 法による分析に関し、御助言と御鞭撻を賜りました本学大学院医歯薬学研究科創生・先進医療開発科学講座医（口腔病理学）間田裕美助手をはじめ教職員各位に厚く御礼を申し上げます。

最後に、御支援頂きました本学大学院医歯薬学総合研究科展開・顎口腔頸部医科学講座（保存修復学研究室）の教職員各位に厚く御礼を申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Black, G.V.: Operative Dentistry. Medico-dental Publishing Co., Chicago, 1908.
- 2) Buonocore, M.G.: A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to

- enamel surfaces. *J Dent Res* 34, 849-853, 1955.
- 3) Laswell, R.L., Welk D.A. and Regenos J.W.: Attachment of resin restoration to acid pre-treated enamel. *J Am Dent Assoc* 82, 558-563, 1971.
 - 4) Buonocore, M.G.: Adhesive sealing of pits and fissures for caries prevention, with use of ultraviolet light. *J Am Dent Assoc* 80, 324-328, 1970.
 - 5) Roberts, M.W. and Moffa, J.P.: Restoration of fractured incisal angels with an ultraviolet activated sealant and a composite resin-A case report. *J Dent Child* 39, 364-365, 1972.
 - 6) 竹山守男, 榎瀬信郎, 中林宣男, 増原英一: 歯科用即硬性レジンに関する研究 (第17報) 歯質および歯科用合金に接着するレジン. 歯理工誌 19, 179-184, 1978.
 - 7) 山内淳一, 増原英一, 中林宣男, 柴谷享一郎, 和田 徹: 歯科用材料. 日公開特報, 昭52-113089, 1977.
 - 8) Fusayama, T.: New concepts in Operative Dentistry. Quintessence Publishing Co., Chicago, 1980.
 - 9) Hosoda, H. and Fusayama, T.: A tooth substance saving restorative technique. *Int Dent J* 34, 1-12, 1984.
 - 10) Oram, D.A. and Pearson, G.J.: A survey of current practice into the use of aesthetic inlays. *Br Dent J* 176, 457-463, 1994.
 - 11) Tyas, M.J., Anusavice, K.J., Frencken, J.E. and Mount, G.J.: Minimal intervention dentistry-a review. *Int Dent J* 50, 1-12, 2000.
 - 12) Zander, H.A.: Reaction of the pulp to calcium hydroxide. *J Dent Res* 18, 373-379, 1939.
 - 13) Glass, R. L. and Zander, H.A.: Pulp healing. *J Dent Res* 28, 97-107, 1949.
 - 14) Castagnola, L. and Orlay, H.G.: Direct capping of the pulp and vital amputation. *Br Dent J* 88, 324-330, 1950.
 - 15) 枝 重夫: 歯髄内における実験的硬組織形成に関する組織学的研究. 歯科学報 61, 87-114, 1966.
 - 16) Sayegh, F.S. and Reed, A.J.: Correlated clinical and histological evaluation of Hydrex in pulp therapy. *J Dent Child* 34, 471-477, 1967.
 - 17) 桑名泰彦: 実験的象牙質形成の組織化学的研究. 歯科学報 66, 87-114, 1966.
 - 18) 市川 徹: 犬における生活歯髄切断後の Dentin bridge 形成に関する光顕ならびに電顕的研究. 歯科学報 76, 391-439, 1976.
 - 19) Tziafs, D. and Molyvdas, I.: The tissue reactions after capping of dog teeth with calcium hydroxide experimentally crammed into the pulp space. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 65, 604-608, 1988.
 - 20) Heide, S.: The effect of pulp capping and pulpotomy on hard tissue bridge of contaminated pulps. *Int Endod J* 24, 126-134, 1991.
 - 21) Morigami, M.: Study on an experimental tetracalcium phosphate cement as a direct pulp capping agent. *Jpn J Conserv Dent* 37, 467-497, 1994.
 - 22) Cox, C.F., Keall, C.L., Keall, H.J., Ostro, E. and Bergenkoltz, G.: Bicompatibility of surface-sealed dental materials against exposed pulps. *J Prosthet Dent* 57, 1-8, 1987.
 - 23) 下野正基, 井上 孝, 眞坂信夫, 諸星裕夫, 市村賢二: 歯髄保存を可能にした 接着性レジンの新たな臨床応用. 接着歯学の最前線, 補綴臨床別冊, 27-32, 1991.
 - 24) Cox, C.F.: Effects of adhesive resins and various dental cements on the pulp. *Oper Dent* 17, 165-176, 1992.
 - 25) 下野正基, 飯島国好: 接着性レジンに対する歯髄の反応, 接着性レジン—レジンに歯髄為害性はないのか?. 治癒の病理 臨床編, 医歯薬出版, 東京, 195-210, 1993.
 - 26) 加藤喜郎: 接着性レジン系材料の歯髄刺激性に関する臨床病理学的研究 (第1報) レジン直接覆罩例の臨床病理学的研究. 接着歯学 11, 199-211, 1993.
 - 27) 富士谷盛興: 露髄症例のレジンによる直接覆髓法の是非について 中間派の立場から. 接着歯学 13, 190-197, 1995.
 - 28) Bouillaguet, S., Ciucchi, B. and Holz, J.: Diagnostic et classification des pulpopathies directives therapeutiques. *Real Clin* 6, 135-143, 1995.
 - 29) 加藤喜郎, 木村 暢, 稲葉友良: 接着性レジン系材料の歯髄刺激性に関する臨床病理学的研究 (第2報) レジン直接覆罩例の臨床経過. 日歯保存誌 40, 153-162, 1997.
 - 30) 加藤喜郎, 山口龍司, 新海航一, 長谷川圭介, 木村 暢, 海老原 隆, 須崎智勝, 大原 睦, 木村慶史, 田中紀裕, 金 徹権: 接着性レジン系材料の歯髄刺激性に関する臨床病理学的研究 (第3報) カニクイザル露髄面に対するレジン直接覆罩効果. 日歯保存誌 40, 163-176, 1997.
 - 31) 富士谷盛興, 新谷英章: 接着修復と歯髄反応. 接着歯学 (日本接着歯学会編), 医歯薬出版, 東京, 190-193, 2002.
 - 32) Fujitani, M., Shibata, S., Van Meerbeek, B., Yoshida, Y. and Shintani, H.: Direct adhesive pulp capping: Pulpal healing and ultramorphology of the resin-pulp interface. *Am J Dent* 15, 395-402, 2002.
 - 33) Inokoshi, S., Iwaku, M. and Fusayama, T.: Pulpal response to a new adhesive resin restoration. *J Dent Res* 61, 1014, 1982.
 - 34) Fujitani, M., Inokoshi, S. and Hosoda, H.: Effect of acid etching on the dental pulp in adhesive composite restorations. *Int Dent J* 42, 3-11, 1992.

- 35) Ratanasathien, S., Wataha, J.C., Hanks, C.T. and Dennison, J.B.: Cytotoxic interactive effects of dentin bonding components on mouse fibroblasts. *J Dent Res* 74, 1602-1606, 1995.
- 36) Jontell, M., Hanks, C.T., Bratel, J. and Bergenholtz, G.: Effects of unpolymerized resin components on the function of accessory cells derived from the rat incisor pulp. *J Dent Res* 74, 1162-1167, 1995.
- 37) Bouillaguest, S., Virgillito, M., Wataha, J., Ciucchi, B. and Holz, J.: The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems, *in vitro*. *J Oral Rehabil* 25, 45-51, 1998.
- 38) Geurtsen, W., Lehmann, F., Spahl, W. and Leyhausen, G.: Cytotoxicity of 35 dental resin composite monomers/additives in permanent 3T3 and three human primary fibroblast cultures. *J Biomed Mater Res* 41, 474-480, 1998.
- 39) Stanislawski, L., Daniau, X., Lauti, A. and Goldberg, M.: Factors responsible for pulp cell cytotoxicity induced by resin-modified glass ionomer cements. *J Biomed Mater Res* 48, 277-288, 1999.
- 40) Bruining, M.J., Blaauwgeers, H.G., Kuijjer, R., Pels, E., Nuijts, R.M. and Koole, L.H.: Biodegradable three-dimensional networks of poly (dimethylamino ethyl methacrylate). Synthesis, characterization and *in vitro* studies of structural degradation and cytotoxicity. *Biomaterials* 21, 595-604, 2000.
- 41) Kehe, K., Reichl, F.X., Durner, J., Walther, U., Hickel, R. and Forth, W.: Cytotoxicity of dental composite components and mercury compounds in pulmonary cells. *Biomaterials* 22, 317-322, 2001.
- 42) Fujisawa, S., Atsumi, T. and Kadoma, Y.: Cytotoxicity and phospholipid-liposome phase transition properties of 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA). *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 29, 245-261, 2001.
- 43) Thonemann, B., Schmalz, G., Hiller, K.A. and Schweikl, H.: Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dent Matter* 18, 318-323, 2002.
- 44) Huang, F.M. and Chang, Y.C.: Cytotoxicity of resin-based restorative materials on human pulp cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Phasol Oral Radiol Ended* 94, 361-365, 2002.
- 45) Yoshi, E.: Cytotoxic effect of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Prosthet Dent* 52, 626-631, 1984.
- 46) De GEE, A.J., Harkel-Hagenaar, E. and Davidson, C.L.: Color dye for identification of incompletely cured composite resins. *J Prosthet Dent* 52, 626-631, 1984.
- 47) 土屋利一: GC-MS とその応用. 講談社サイエンスティフイック, 東京, 40-54, 1974.
- 48) Shintani, H., Inoue, T. and Yamaki, M.: Analysis of camphorquinone in visible lightcured composite resins. *Dent Matter* 1, 124-126, 1985.
- 49) Chen, J., Shapiro, H.S. and Sodek, J.: Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Resr* 7, 987-997, 1992.
- 50) Ruch, J.V., Lesot, H. and Begue-Kirn, C.: Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 39, 51-68, 1995.
- 51) D'Errico, J.A, MacNeil, R.L., Takata, T., Berry, J., Strayhorn, C. and Somerman, M.J.: Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, *in situ* and *in vitro*. *Bone* 20, 117-126, 1997.
- 52) Guo, L., Berry, J.E., Somerman, M.J. and Davidson, R.M.: A novel method to isolate odontoblasts from rat incisor. *Calcif Tissue Int* 66, 212-216, 2000.
- 53) Decup, F., Six, N., Palmier, B., Buch, D., Lasfargues, J.J., Salih, E. and Goldberg, M.: Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig* 4, 110-119, 2000.
- 54) Young, W.G., Li, H., Xiao, Y., Waters, M.J. and Bartold, P.M.: Growth-hormone-stimulated dentinogenesis in Lewis dwarf rat molars. *J dent Ees* 80, 1742-1747, 2001.
- 55) 岩久正明, 河野 篤, 千田 彰, 田上順次: 保存修復21. 第1版, 永末書店, 京都, 115-132, 1998.