

デュアルキュア型覆髄剤におけるデンティンブリッジ形成能 および osteocalcin 産生誘導能

西 原 安 那

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野
(指導: 浅野正岳 教授, 米原啓之 教授, 金子忠良 教授)

要旨

【目的】 直接覆髄剤である mineral trioxide aggregate (MTA) の改良を目的として, 多くの関連材料が開発されてきた。本研究ではこれらの関連製品の硬組織形成誘導能の差異について検討した。

【方法】 実験には, ProRoot MTA, TheraCal PT, NEX MTA セメント, およびエンドセム MTA premixed を用いた。ラットの上顎第一臼歯に露髄面を形成し, 各種覆髄剤を貼付後, スーパーボンドで封鎖した。処置後 1, 2 および 4 週後に, パラフィン切片を作製し, デンティンブリッジの形成について観察した。また TheraCal PT では, osteocalcin (OC) の形成について免疫組織学的に観察した。加えて, ProRoot MTA と TheraCal PT をマウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞 MC3T3-E1 に作用させ, OC 産生について免疫組織学的に検討した。

【結果】 各種覆髄剤間でデンティンブリッジの形成に差異は認めなかった。TheraCal PT では, 形成されたデンティンブリッジ周囲の間質部に, 抗 OC 抗体の陽性反応が認められた。また, MC3T3-E1 細胞における OC の産生は, ProRoot MTA よりも TheraCal PT を添加した際に顕著な上昇を示した。

【結論】 4 種類の覆髄剤はいずれも同程度のデンティンブリッジ形成誘導能を有していた。また, TheraCal PT は, ProRoot MTA に比較して OC の顕著な産生誘導を示した。

キーワード: デュアルキュア型覆髄剤, bioactive dental material, osteocalcin

Dentin bridge forming ability and osteocalcin production inducing ability in dual-cured pulp-capping material

Anna Nishihara

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Applied Oral Sciences
(Directors: Prof. Masatake Asano, Prof. Hiroyuki Yonehara, Prof. Tadayoshi Kaneko)

Abstract

【Purpose】 Up to date, various mineral trioxide aggregate (MTA)-based dental pulp-capping materials have been developed. The purpose of the present study was to compare the ability of dentin bridge formation and osteocalcin (OC) induction using four different MTA cements.

【Methods】 ProRoot MTA, TheraCal PT, NEX MTA cement, and Endocem MTA premixed were applied to the exposed dental pulp on the first maxillary molar of Wister rats. The dentin bridge formation was examined by hematoxylin-eosin staining. The OC induction of TheraCal PT was examined by immunohistochemistry. In addition, ProRoot MTA and TheraCal PT were applied to the osteoblast-like cell line, MC3T3-E1, and OC induction was also examined by the immunocytochemical method.

【Results】 There was no difference in the formation of dentin bridges among the MTA cements tested. In TheraCal PT, a positive anti-OC antibody reaction was observed in the stromal area around the formed dentin bridge. In addition, OC production in MC3T3-E1 cells was most markedly increased by TheraCal PT.

【Conclusion】 All four MTA cements had the same ability to induce dentin bridge formation. In addition, TheraCal PT showed remarkable OC production compared to ProRoot MTA.

Keywords: dual-cured pulp capping material, bioactive dental material, osteocalcin

緒 言

象牙質の再石灰化を誘導し、これによって歯髄の保存を目指す治療法は、近年の歯科保存学領域の重要な課題であり、この目的を達成するために様々な材料が開発されている¹⁾。なかでも mineral trioxide aggregate (MTA) は、いわゆる bioactive dental material (BDM) の代表的な材料であり²⁾、現在これらを用いた直接覆髄法が盛んに行われ、歯髄保存療法にとって有用な材料とされている³⁾。MTA の主成分はケイ酸カルシウムであり、これが組織液と接触することによってマトリックスが形成され、水中で加水分解して水酸化カルシウムとケイ酸カルシウム水和物が形成される。この形成された水和物からのカルシウム、ケイ酸、アルミニウムあるいはビスマスイオンが徐放することで石灰化を促進するとされている^{4,5)}。我が国においては、2007 年から ProRoot MTA (Dentsply Tulsa, OK, USA) が市販された。一方、MTA1 は硬化に比較的長い時間を要し、そのため硬化初期段階では十分な封鎖性が得られないことが問題点とされてきた^{6,7)}。この点を克服すべく、これまでに多くの MTA 関連の BDM が開発されてきている。

TheraCal LC (Bisco, Schaumburg, IL, USA) は、遅延型アレルギー反応を惹起するとされる 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)⁸⁻¹⁰⁾ を含まない BDM である。その特徴として光照射によって硬化し、高い密閉性を得ることができる。また、製造者によればこの製品は、象牙細管に浸透しやすい親水性モノマーを含んでいるものの、水に難溶性であることなどの利点を有している。一方、TheraCal LC の重合深度は 1.7 mm であり¹¹⁾、製造者指示条件でも 1 mm 以下で積層するよう指示されている。

光重合型製品が有する重合特性という欠点を補う目的で開発された覆髄剤が TheraCal PT (Bisco) である。この製品は、光重合に加えて化学重合により重合反応する、いわゆるデュアルキュアを採用しており、光線が到達しない深部は、化学重合により硬化することが期待できる。また、TheraCal LC で用いられている親水性モノマーを含有することで、Ca²⁺をはじめとした各種イオンを徐放することを可能とした覆髄剤である。

NEX MTA セメント (ジーシー、東京) は、MTA の主成分であるポルトランドセメントに、二水石膏が配合された覆髄剤である。焼成後の粉末化のための粉碎工程で、大粒径・小粒径の割合をコントロールし、練和性および反応性を最適化したとされる材料である。

エンドセム MTA premixed (Maruchi, Gangwon-do, South Korea) は、水溶性シリカを配合することで、緻密化が促進するため、充填作業が短時間でできる利点を有し、硬化後も強アルカリ性が持続されることにより強い抗菌特性を発揮するとされている¹²⁾。

以上のように、種々の利便性を特徴として開発が進められている MTA 系材料であるが、それぞれの硬組織形成能を比較した報告はみられない。本研究では、ラット露髄面に対して各種 BDM を用いて覆髄した際のデンティンブリッジ形成の差異について検討するとともに、ProRoot MTA および TheraCal PT については *in vitro* における osteocalcin (OC) 産生誘導能についても検討を加えた。

材料および方法

1. 実験動物

実験には、Wistar 系雄性ラット (6-7 週齢) を用いた。ラットは、12 時間の明暗サイクルの環境下、恒温室 (23℃) で自由に食物および水分摂取ができる状態で飼育した。本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認 (AP19 DEN033-2) を受け、国際疼痛学会のガイドライン¹³⁾ に準拠して行った。

2. 覆髄剤

本実験には直接覆髄剤として、ProRoot MTA、TheraCal PT、NEX MTA セメント、およびエンドセム MTA premixed を用いた (表 1)。

3. ラット上顎第一臼歯に対する覆髄剤貼付

5% イソフルラン吸入による麻酔導入後、三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.15 mg/kg + ミタゾラム 2 mg/kg + 酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg) を腹腔内注射し全身麻酔を施した。麻酔の奏功を確認した後、開口器を用いて開口させ、両側上顎第一臼歯をラバーダム防湿し、術野を隔離した (図 1 a)。近心小窩付近のエナメル質を滅菌したダイヤモンドポイント (MI-F06 P, 松風, 京都) で削除した後、滅菌された # 1/2 ラウンドバー (ISO #006, 松風, 京都) を用い、直径約 0.7 mm の露髄面を有する窩洞を形成した (図 1 b)。回転切削器具操作は軽圧注水下で熟練した術者が行った。窩洞を滅菌生理食塩水で洗浄し、止血を確認した後、露髄面に各覆髄剤を各製造者指示条件に従って貼付した。TheraCal PT においては、可視光線照射器 (ブライト 5, Medicode Technology, New Taipei city, Taiwan) を用いて 10 秒間光照射し、硬化させた (図 1 c)。覆髄剤が硬化していることを探針を用いて確認した後、窩洞を製造者指示条件でスーパーボンド (C&B セット, サンメディカル, 守山) を用いて筆積み法によって封鎖し、咬合による影響を避けるため対合歯咬合面を削合した。

4. 組織学的観察

イソフルラン吸入による麻酔導入後、三種混合麻酔薬を腹腔内注射し全身麻酔を施行した。麻酔の奏功を確認した後、0.9% 生理的食塩水 (500 ml) を用いて経心的に脱血し安楽死させた。その後、phosphate buffered saline (PBS) に溶解した 4% paraform aldehyde (pH7.4) を用い

て灌流固定を行った。固定後、ラット上顎骨を摘出し、4% paraform aldehydeに浸漬し、24時間固定した。組織片をPBSで洗浄した後、迅速脱灰液(K-CX, ファルマ, 東京)により室温で48時間脱灰を行った。脱灰後、透徹し、パラフィンに包埋した。ミクロトーム(LS-113, 大和光機工業, 朝霞)を用いて4 μ mの薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。

TheraCal PT 貼付検体の免疫組織染色においては、切片を室温で0.3% 過酸化水素加メタノール中に浸漬し20分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性を不活化させた。ブロッキングは、1% bovine serum albumin (BSA)-PBS中で1時間反応させた。その後、1% BSA-PBSで100倍に希釈した抗OC抗体を作用させて室温で24時間反応させた。ネガティブコントロールには抗OC抗体を含まない1% BSA-PBSを用いた。次いで、horse radish peroxidase(HRP)標識IgG抗体(500倍に希釈)を室温で1時間反応させた。PBSを用いて洗浄後、diaminobenzidine(DAB)発色させ、ヘマトキシリンによる核染色後封入し、顕微鏡観察を行った。観察はオールワン顕微鏡(BZ-X810, キーエンス, 大阪)を用いて行った。

5. 細胞培養および覆髄剤刺激

ProRoot MTA および TheraCal PT において、生物活性について検討を行った。マウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞 MC3T3-E1(理化学研究所バイオリソース研究センター, つくば)は、 α -minimum essential medium (α -MEM; 富士フィルム和光純薬, 大阪)に10%ウシ胎児血清および1% ペニシリン-ストレプトマイシン(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)を添加したものの(10% FCS α -MEM)により37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂存在下で培養した。MC3 T3-E1細胞は6穴プレート(AGC テクノグラス, 榛原郡吉田町)に3 \times 10⁵ cells/wellとなるよう播種し、18時間後に培養液を、10 nM β -glycerophosphate(富士フィルム和光純薬)および50 μ g/mL L-ascorbic acid(富士フィルム和光純薬)を添加した骨形成誘導培地に交換した。ProRoot MTAを練和後、内径3 mm, 厚さ1 mmの円形の型に填塞し、室温で24時間放置して硬化させたものを、プレート上部のインサート(ポアサイズ3 μ m, クラボウ, 大阪)に設置し、細胞に72時間作用させた。また、TheraCal PTは、ProRoot MTA同様にディスク紙片を作製し、培養液に24時間浸漬した後、同様に細胞に72時間作用させた。その後、細胞を



図1 ラット上顎第一臼歯に対する覆髄剤貼薬
a. ラバーダム防湿による術野の隔離
b. 露髄面(直径0.7 mm)を有する窩洞形成
c. 露髄面への覆髄剤(TheraCal PT)の貼付

表1 実験に用いた覆髄剤とその組成

製品 (製造者)	組成
ProRoot MTA (Dentsply Tulsa)	粉: 酸化カルシウム, 二酸化ケイ素, 酸化ビスマス, 酸化アルミニウム
	液: 精製水
TheraCal PT (BISCO)	ベース: ポルトランドセメント, ポリエチレングリコールジメタクリレート, Bis-GMA, ストロンチウムガラス, 二酸化ケイ素
	キャタリスト: ストロンチウムガラス, Bis-GMA, トリエチレングリコールジメタクリレート, ジルコン酸バリウム
NEX MTAセメント (ジーシー)	粉: 酸化カルシウム, 酸化ビスマス, 二酸化ケイ素, 酸化アルミニウム
	液: 精製水
エンドセム MTA premixed (Maruchi)	酸化カルシウム, 二酸化ケイ素, 二酸化ジルコニウム, 三酸化ビスマス, 増粘剤, 有機溶剤

※Bis-GMA: 2,2-ビス[4-(ヒドロキシ-3-メタクリロイルオキシプロポキシ)フェニル]プロパン

PBSで洗浄し、4% paraform aldehydeで固定した後、抗 OC 抗体により免疫組織染色を行った。

結 果

1. 各種覆髄剤の比較

ラット第一臼歯に人為的に作製した露髄面に4種の覆髄剤を貼付し、貼付1, 2および4週後に歯髄の石灰化およびデンティンブリッジの形成状況について組織学的に観察した。その結果、貼付1週後にすべての覆髄剤で貼付部位に一致した歯髄腔内に少量の石灰化物の形成が見られた(図2 ab, 上段)。貼付2週後からは石灰化物内に線維様の構造が出現するとともに、石灰化物の量が増加した(図2 ab, 中段)。貼付4週後には図中矢印に示したように、細管構造が明瞭に認められるデンティンブリッジの形成を確認することが出来た(図2 ab, 下段)。組織学的にはこれらの変化は4種類の覆髄剤で同程度に観察され、材料間で顕著な違いは見られなかった。また、すべての覆髄剤において、貼付2週後までは歯髄腔内に炎症性細胞浸潤や歯髄充血等が確認されたが、貼付4週後には炎症反応はほぼ消失していた。

2. 免疫組織学的観察

貼付4週間後に明らかなデンティンブリッジの形成が

見られたため、周辺の象牙芽細胞様細胞の集積について免疫組織学的に検討した。本実験に用いた4種類の覆髄剤においてデンティンブリッジの形成に大きな差が認められなかったことから、TheraCal PTに着目して検討したところ、形成されたデンティンブリッジの周囲に抗 OC 抗体に対する陽性反応が見られた(図3)。しかし、明瞭な抗 OC 抗体陽性反応を示す細胞構造は確認されなかった。一方、覆髄剤の貼付を行わなかった露髄面には、抗 OC 抗体陽性反応は確認されなかった。

3. MC3T3-E1 細胞に対する作用

ProRoot MTA と TheraCal PT の生物活性について培養細胞を用いて比較を行った。MC3T3-E1 細胞にそれぞれの覆髄剤を作用させ、免疫組織染色により OC の発現を確認した。その結果、図4に示したように培養72時間後に、ネガティブコントロールと比較してTheraCal PT 作用群では顕著に OC の発現が上昇していることが確認された。この反応は、主として細胞外基質に認められ、細胞質内には一部で陽性反応を認めるのみであった(図4, 下図)。一方、ProRoot MTA では、TheraCal PT と比較して OC の産生は微弱で、細胞内及び細胞外基質における陽性反応はほとんど観察されなかった(図4, 中央)。

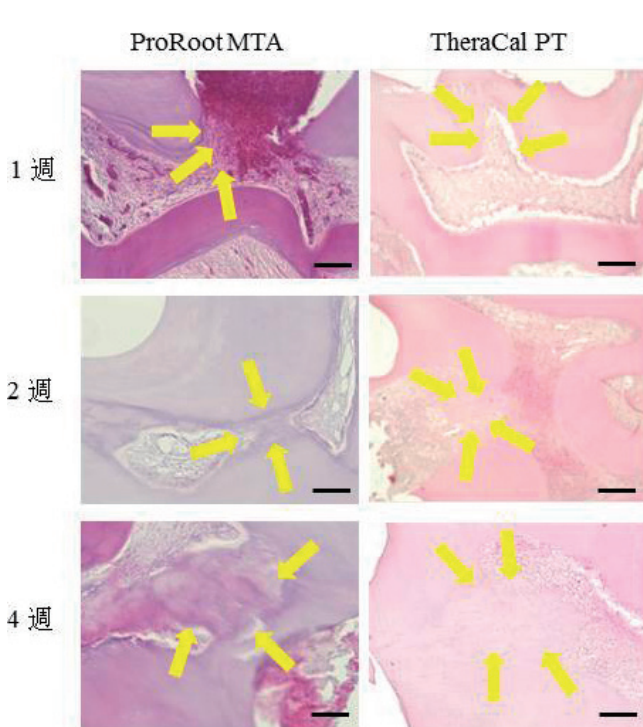


図 2a 各種覆髄剤を貼付したラット上顎第一臼歯の HE 染色像
各種覆髄剤貼付1, 2及び4週後にラットを灌流固定し、第一臼歯を含む上顎骨を摘出した。脱灰後、パラフィン切片を作製し、HE染色によりデンティンブリッジの形成状況について観察した(n=7)。
スケール：100 μm

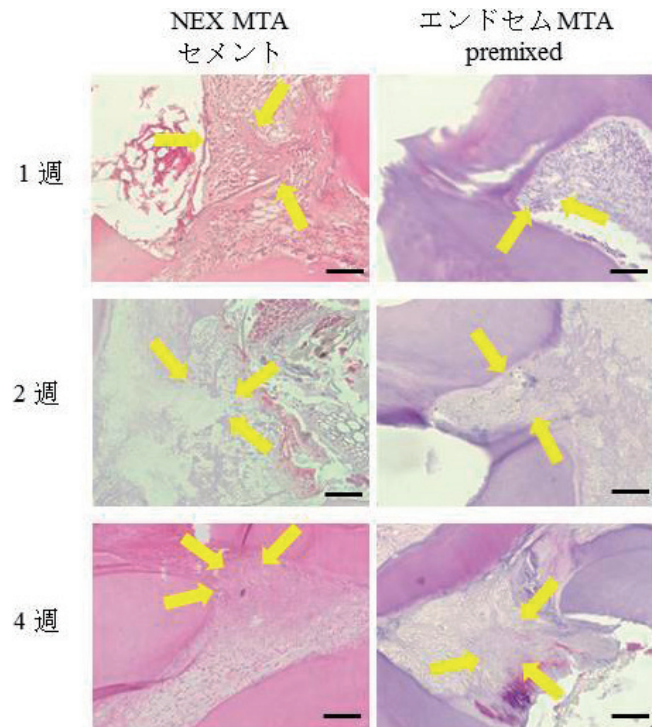


図 2b 各種覆髄剤を貼付したラット上顎第一臼歯の HE 染色像
各種覆髄剤貼付1, 2及び4週後にラットを灌流固定し、第一臼歯を含む上顎骨を摘出した。脱灰後、パラフィン切片を作製し、HE染色によりデンティンブリッジの形成状況について観察した(n=7)。
スケール：100 μm

考 察

本研究では、ラット上顎第一臼歯の咬合面に人為的に露髄面を作製し、これに対して4種類のBDMを作用させ、デンティンブリッジ形成効果の差異について検討した。その結果、組織学的にはいずれの材料も、ほぼ同程度のデンティンブリッジ形成能を有すると共に、形態学的に象牙細管を伴う明瞭なデンティンブリッジが、貼付後4週間で形成されることが明らかとなった。TheraCal PTにおける抗OC抗体に対する免疫組織染色では、陽性反応は細胞外基質に対するものであると考えられた(図3)。また、培養細胞においてもTheraCal PT

は細胞外基質にOCを蓄積する効果があることが示された(図4)。MTAによる直接覆髄による、デンティンブリッジの形成については様々な動物種で検討されてきた¹⁴⁻¹⁸⁾。その結果、齧歯類を用いた組織学的な評価では、BDM貼付後1週間で象牙質基質が形成され、3~4週間で象牙細管を伴う象牙質形成が見られるとされており^{19,20)}、本研究の結果と一致した。

ProRoot MTAは硬化時間が長く、硬化初期段階で緊密な封鎖性が得られないという欠点が指摘されている²¹⁾。また、覆髄時のpHが12程度であり、この性質が細菌の感染を抑制するとされる²²⁾。一方、MTAはその硬化初期においては、組織に対する為害性を有するこ

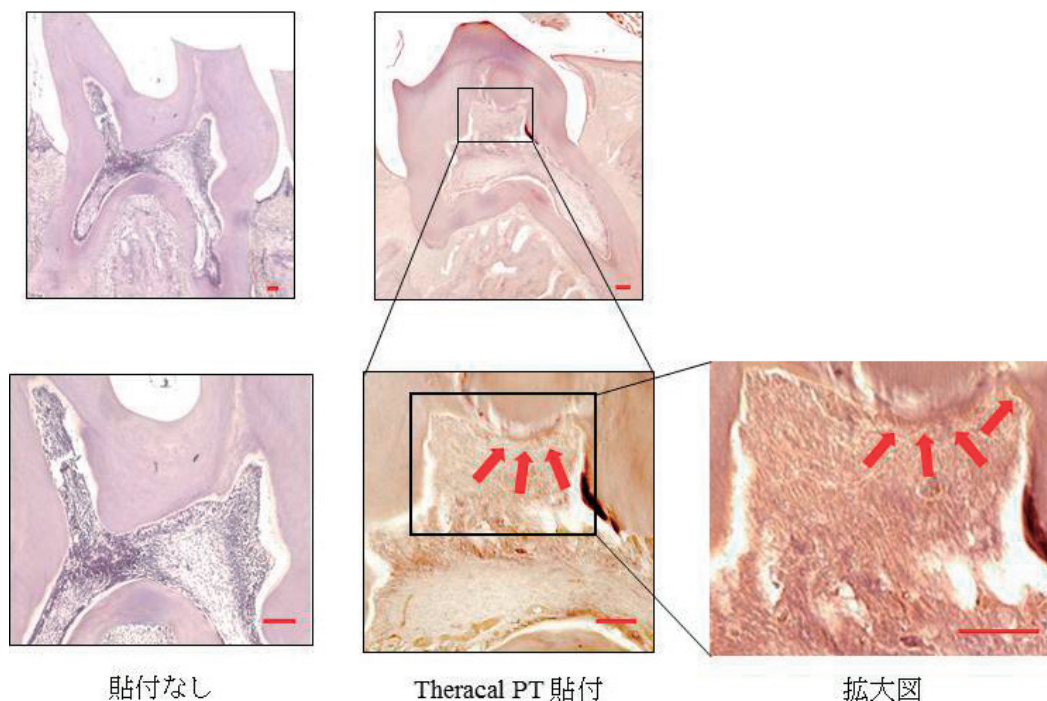


図3 抗OC抗体を用いたTheraCal PT貼付4週の免疫組織染色
TheraCal PT貼付4週のパラフィン切片を用いて、抗OC抗体による免疫染色を行った(右下図：形成されたデンティンブリッジの周囲に抗OC抗体に対する陽性反応(矢印))。
上段：×40顕微鏡像、下段×100顕微鏡像 スケール：100 μm

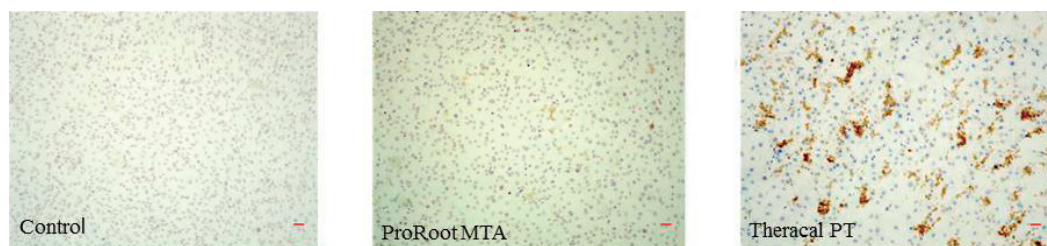


図4 覆髄剤刺激下にて72時間培養後MC3T3-E1への抗OC抗体を用いた免疫染色
MC3T3-E1を覆髄剤の非存在下(左図)、ProRootMTA存在下(中央)、またはTheraCal PT存在下(右図)で72時間培養後、抗OC抗体により免疫染色を行った。
スケール：20 μm

とが指摘されている²³⁾。そこで本研究における *in vitro* 実験では、ProRoot MTA を硬化させた後に、また TheraCal PT は光照射後、硬化体を細胞培養液に浸漬した後に MC3T3-E1 細胞に作用させた。その結果、両覆髄剤とも、培養細胞に対する為害性は極めて低く、培養 24 時間後の細胞生存率は 90% 以上に保たれていた。

ラット歯髄細胞を用いた実験では、ProRoot MTA は為害性を示さないばかりでなく、骨形成を促進する bone morphogenetic protein-2 や dentin sialoprotein の産生を誘導するとされ^{24,25)}、生体活性効果も期待できると考えられている。本研究においても、マウス骨芽細胞系培養細胞 MC3T3-E1 細胞における OC 産生誘導について検討を行った。硬組織産生誘導の指標として OC を用いたが、OC は骨芽細胞により産生分泌される 5.6 kDa のタンパク質であり^{26,27)}、様々な生体活性を有する²⁷⁾。象牙芽細胞のマーカー分子としては Lhx6 の存在が知られているが²⁸⁾、OC は象牙芽細胞でも強い発現が確認されているところから²⁹⁾、象牙質基質産生を促進するものと考えられる。そこで、本研究では OC について免疫組織学的に検討した。その結果、TheraCal PT による 24 時間培養後の細胞外基質に極めて強い反応が観察され、これは硬組織形成が誘導された結果、細胞外基質内に OC が蓄積したためと考えられた。TheraCal PT 貼付 4 週間後の組織における免疫組織染色では、細胞外基質において抗 OC 抗体に対して陽性反応が観察されたことは、*in vitro* 実験の結果とも一致するものであった。

本研究では、ProRoot MTA に比較して、TheraCal PT でより強い OC 誘導能が確認された。デュアルキュアによって硬化する TheraCal PT は、その組成としてはレジンモノマーを含有していることから、持続的に Ca²⁺ などのイオンの徐放性が ProRoot MTA と比較して低く、ProRoot MTA ではさらにイオン徐放性が高いものと考えられる。本研究の予備実験では、ProRoot MTA を未硬化の状態でも、また TheraCal PT は光照射直後に MC3T3-E1 細胞に作用させたが、培養 24 時間後にはほぼすべての細胞が死滅した。そこで、本研究では光重合させた後に細胞に作用させたことが TheraCal PT からの適切な Ca²⁺ イオンなどの徐放につながった可能性が考えられた。さらに今後 OC 遺伝子の発現は転写因子 Runx2 により調節されているため³⁰⁾、TheraCal PT による OC 産生増強が転写レベルで調節されているのかについても検討が必要と考えられた。

結 論

本実験の結果から、本研究で用いた覆髄剤はいずれもほぼ同程度のデンティンブリッジ形成能を有することがわかった。また *in vivo* 実験および MC3T3-E1 細胞を用いた実験から TheraCal PT は ProRoot MTA と比較し

て OC 産生が顕著であり OC は細胞外基質に蓄積することが明らかとなった。

稿を終えるにあたり、格別なるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部口腔外科学第 II 講座 米原啓之教授、金子忠良教授および病理学講座 浅野正岳教授に心より感謝申し上げます。また、本研究の遂行に際し、多大なるご協力とご支援を頂いた日本大学歯学部口腔外科学第 II 講座および病理学講座の皆様へ厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は平成 29 年度日本大学歯学部上村研究費および JSPS 科研費 JP20K16342 の助成を受けて行われた。

なお、本研究では開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Ricketts D, Lamont T, Innes NPT, Kidd E, Clarkson JE (2013) Operative caries management in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 3, CD003808.
- 2) Roberts HW, Toth JM, Berzins DW, Charlton DG (2008) Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater* 24, 149-164.
- 3) Bjørndal L, Simon S, Tomson PL, Duncan HF (2019) Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J* 52, 949-973.
- 4) Camilleri J (2007) Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* 40, 462-470.
- 5) Parirokh M, Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 36, 400-413.
- 6) Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR (1995) Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* 21, 349-353.
- 7) Gandolfi MG, Iacono F, Agee K, Siboni F, Tay F, Pashley DH, Prati C (2009) Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108, e39-e45.
- 8) K Katsuno, A Manabe, T Hasegawa, S Nakayama, K Itoh, S Wakumoto, H Hisamitsu (1992) Possibility of allergic reaction to dentin primer--application on the skin of guinea pigs. *Dent Mater J* 11, 77-82.
- 9) Katsuno K, Manabe A, Itoh K, Hisamitsu H, Wakumoto S, Nakayama S, Yoshida T (1995) A delayed hypersensitivity reaction to dentine primer in the guinea-pig. *J Dent* 23, 295-299.
- 10) Katsuno K, Manabe A, Itoh K, Nakamura Y, Wakumoto S, Hisamitsu H, Yoshida T (1996) Contact dermatitis caused by 2-HEMA and GM dentin primer solutions applied to guinea pigs and humans. *Dent Mater J* 15, 22-30.
- 11) Gandolfi MG, Siboni F, Prati C (2012) Chemical-physical properties of TheraCal, a novel light-curable MTA-like material for pulp capping. *Int Endod J* 45, 571-579.
- 12) Shin JH, Lee DY, Lee SH (2018) Comparison of antimicrobial activity of traditional and new developed

- root sealers against pathogens related root canal. *J Dent Sci* 13, 54-59.
- 13) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 14) Simon S, Cooper P, Smith A, Picard B, Ifi CN, Berdal A (2008) Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. *Int Endod J* 9, 781-790.
- 15) Okiji T, Yoshida K (2009) Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *Int J Dent*, 2009, 464280.
- 16) Zarrabi MH, Javidi M, Jafarian AH, Joushan B (2011) Immunohistochemical expression of fibronectin and tenascin in human tooth pulp capped with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. *J Endod* 37, 1613-1618.
- 17) Khalil IT, Sarkis T, Naaman A (2013) MM-MTA for direct pulp capping: a histologic comparison with ProRoot MTA in rat molars. *J Contemp Dent Pract* 6, 1019-1023.
- 18) Moradi S, Saghravanian N, Moushekhian S, Fatemi S, Forghani M (2015) Immunohistochemical evaluation of fibronectin and tenascin following direct pulp capping with mineral trioxide aggregate, platelet-rich plasma and propolis in dogs' teeth. *Iran Endod J* 3, 188-192.
- 19) 堀江 卓, 劉 利恵, 富士谷盛興, 河合達志, 千田 彰 (2009) BMP を添加した MTA による直接覆髄の効果について. *日歯保存誌* 52, 393-401.
- 20) 中村裕子, 井出祐樹, 鈴木瑛子, 上田堯之, 日下洋平, 横瀬敏志 (2016) Mineral Trioxide Aggregate による象牙質 - 歯髄複合体再生の組織学的評価. *日歯保存誌* 59, 370-380.
- 21) Dammaschke T, Gerth HU, Züchner H, Schäfer E (2005) Chemical and physical surface and bulk material characterization of white ProRoot MTA and two Portland cements. *Dent Mater* 21, 731-738.
- 22) Eldeniz AU, Hadimli HH, Ataoglu H, Orstavik D (2006) Antibacterial effect of selected root-end filling materials. *J Endod* 32, 345-349.
- 23) 半田慶介, 安田善之, 斎藤隆史 (2008) 新規直接覆髄剤としての mineral trioxide aggregate (MTA) について. *北医療大歯誌* 27, 121-122.
- 24) Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T (2008) The effect of mineral trioxide aggregate on the mineralization ability of rat dental pulp cells: An *in vitro* study. *J Endod* 34, 1057-1060.
- 25) Masuda-Murakami Y, Kobayashi M, Wang X, Yamada Y, Kimura Y, Hossain M, Matsumoto K (2010) Effects of mineral trioxide aggregate on the differentiation of rat dental pulp cells. *Acta Histochem* 112, 452-458.
- 26) Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM (1989) Osteocalcin and matrix Gla protein: Vitamin K-dependent proteins in bone. *Physiol Rev* 69, 990-1047.
- 27) Zoch ML, Clemens TL, Riddle RC (2016) New insights into the biology of osteocalcin. *Bone* 82, 42-49.
- 28) Priam F, Ronco V, Locker M, Bourd K, Bonnefoix M, Duchêne T, Bitard J, Wurtz T, Kellermann O, Goldberg M, Poliard A (2005) New cellular models for tracking the odontoblast phenotype. *Arch Oral Biol* 50, 271-277.
- 29) Burkhardt JK, Halama D, Frerich B, Gaunitz F (2009) Real-time RT-PCR discriminating mRNA encoding osteocalcin from unspecific targets. *Anal Bioanal Chem* 393, 1351-1355.
- 30) Carvallo L, Henríquez B, Paredes R, Olate J, Onate S, van Wijnen AJ, Lian JB, Stein GS, Stein JL, Montecino M (2008) 1 alpha, 25-dihydroxy vitamin D3-enhanced expression of the osteocalcin gene involves increased promoter occupancy of basal transcription regulators and gradual recruitment of the 1 alpha, 25-dihydroxy vitamin D3 receptor-SRC-I coactivator complex. *J Cell Physiol* 214, 740-749.