

## ヒト BSP 遺伝子発現に対する副甲状腺ホルモンの影響

日本大学松戸歯学部歯周治療学講座 1), 口腔科学研究所 2)

○荒木正大 1), 目澤優 1), 金東淳 1), 高井英樹 1), 中山洋平 1), 2), 小方頼昌 1), 2)

### Effects of Parathyroid Hormone on the Human Bone Sialoprotein Gene Expression

Departments of Periodontology 1) and Research Institute of Oral Science 2),

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○ Shouta Araki 1), Masaru Mezawa 1), Dong-Soon Kim 1), Hideki Takai 1),  
Youhei Nakayama 1), 2) and Yorimasa Ogata 1), 2)

#### [目的]

骨シアロタンパク質 (BSP) は、石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現するリン酸化および硫酸化を受けた糖タンパク質で、アパタイト結晶形成能を有することから、初期の石灰化において重要な役割を果たすと考えられている。副甲状腺ホルモン (PTH) は主要なカルシウム調節因子として知られており、主に骨と腎に作用して、骨吸収と骨形成を調節する。今回は、ヒト骨芽細胞様細胞である Saos2 細胞を用いて、ヒト BSP の転写に対する PTH の影響を検索した。さらにヒト BSP プロモーター配列中の PTH 応答配列の検索を行った。

#### [材料および方法]

1) Saos2 細胞を用いて、BSPmRNA 発現に対する PTH の効果をノーザンブロット法にて検索した。2) PTH 刺激後の BSP, Runx2 および Osterix の mRNA 量の変化を調べるために Real-time PCR にて検索を行った。3) ヒト BSP 遺伝子プロモーターの長さを変化させたルシフェラーゼコンストラクトを Saos2 細胞に導入し、BSP の転写に対する PTH (10 nM) 刺激後 3 時間および 6 時間の効果をルシフェラーゼアッセイ法にて検索を行った。4) BSP 遺伝子プロモーター配列中の転写因子結合配列と PTH (10 nM) にて経時的 (0, 3, 6, 12, 24 時間) に刺激した Saos2 細胞から抽出した核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイ法により検索を行った。

#### [結果]

1) PTH (10 nM) にて経時的 (0, 3, 6, 12, 24 時間) に Saos2 細胞を刺激した結果、BSP mRNA 量は PTH 刺激 3 時間後に最大となった。2) Runx2 と Osterix の mRNA 量は PTH (10 nM) 刺激後 6 時間で最大になった。3) ルシフェラーゼアッセイの結果、PTH (10 nM) にて 3 時間または 6 時間刺激すると、-184 塩基対および -868 塩基対上流までを含むヒト BSP プロモーターコンストラクトで転写活性が上昇した。4) ヒト BSP プロモーター配列中に存在する逆方向の CCAAT 配列 (nts; -54~-50), cAMP 応答配列 1 (CRE1, nts; -79~-72), FGF2 応答配列 (FRE, nts; -97~-90), 転写開始点より -673 塩基対上流に存在する cAMP 応答配列 2 (CRE2, nts; -673~-666) のオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイの結果、CRE1 と CRE2 配列への核内タンパク質の結合が PTH 刺激 3 時間後に増加した。抗体を用いたゲルシフトアッセイの結果、PTH による BSP の転写調節には、CREB およびリン酸化 CREB が関与すると考えられた。

#### [考察および結論]

Saos2 細胞を PTH (10 nM) にて刺激すると、BSPmRNA 量は 3 時間後に最大となった。ルシフェラーゼアッセイの結果、ヒト BSP 遺伝子ルシフェラーゼコンストラクトである -184 および -868 で転写活性が最大となった。ゲルシフトアッセイの結果、ヒト BSP 遺伝子プロモーターの転写開始点から -79 塩基対上流に存在する CRE1 配列 (nts; -79~-72) と -673 塩基対に存在する CRE2 配列 (nts; -673~-666) と核内タンパク質との結合が PTH 刺激 3 時間後に増加した。以上のことからヒト BSP プロモーター配列中の CRE1 と CRE2 配列が PTH に応答する配列であると考えられた。また、PTH は CRE 配列に結合する転写因子 (CREB, リン酸化 CREB) の結合を増加させ、BSP の転写活性を調節していると考えられた。

## 脳由来神経栄養因子(BDNF)と高分子ヒアルロン酸を用いた歯周組織再生療法の開発 — $\beta$ -TCP 併用効果の検討—

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座

歯周病態学分野<sup>1</sup>, 電気化学工業(株)<sup>2</sup>, (株)ツーセル<sup>3</sup>

○坂井宣之<sup>1</sup>, 武田克浩<sup>1</sup>, 柴 秀樹<sup>1</sup>, 河口浩之<sup>1</sup>, 橋本正道<sup>2</sup>, 辻紘一郎<sup>3</sup> 栗原英見<sup>1,3</sup>

Development of a newly medical device for periodontal tissue regeneration using  
brain-derived neurotrophic factor(BDNF) / hyaluronic acid /  $\beta$ -TCP complex

<sup>1</sup>Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University Graduate  
School of Biomedical Sciences, <sup>2</sup>DENKI KAGAKU KOGYO K.K., <sup>3</sup>TWO CELLS Co. Ltd.

○Noriyuki Sakai<sup>1</sup>, Katsuhiko Takeda<sup>1</sup>, Hideki Shiba<sup>1</sup>, Hiroyuki Kawaguchi<sup>1</sup>, Masamichi Hashimoto<sup>2</sup>,  
Kouichirou Tsuji<sup>3</sup>, Hidemi Kurihara<sup>1,3</sup>

### [研究目的]

近年、血小板由来増殖因子(PDGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、骨形成タンパク質(BMP)などの成長因子を用いた歯周組織再生療法の開発が盛んに行われている。これまでの *in vitro*, *in vivo* の研究から脳由来神経栄養因子(BDNF)が歯周組織再生に有効であることが明らかになっている。また 2008 年日本歯周病学会春季学術大会において、高分子ヒアルロン酸複合体と BDNF の併用が *in vivo* において歯周組織再生を促進することを明らかにし、BDNF による安全性の高い歯周組織再生治療法を確立出来る可能性を示した。本学会においては、より多様な歯周組織欠損に対応することを目的として、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体に $\beta$ -三リン酸カルシウム( $\beta$ -TCP)を併用して、歯周組織再生に及ぼす影響を検討することとした。

### [材料および方法]

雌ビーグル犬(12~20 ヶ月齢、体重 10~14kg)の下顎第 2、3、4 小臼歯にⅢ級根分岐部歯周組織欠損を作成し、アルジネート印象材を填入することで実験的歯周炎を惹起させた。一週間後、印象材を除去し、ルートプレーニングを行い、歯肉弁を復位して縫合した。その後ブラッシングによる口腔内細菌のコントロールによって炎症を可及的に抑制した。さらに一週間後、BDNF(50  $\mu$ g/ml)/高分子ヒアルロン酸/ $\beta$ -TCP(0.5 g/ml)複合体を欠損部に充填した。コントロール群として高分子ヒアルロン酸のみを充填した。手術後 6 週間経過観察した後、灌流固定を行い、組織標本作製した。切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下で組織観察後、セメント質再生率・歯槽骨再生率を計測した。

### [結果]

BDNF/高分子ヒアルロン酸/ $\beta$ -TCP 複合体充填群では露出象牙質表面の大部分で新生セメント質が観察され、上皮の侵入やアンキロシスは観察されなかった。また、以前に実施した BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体充填群と比較すると、歯槽骨再生率は高い傾向を示した。それに対し、コントロール群では、根分岐部直下に上皮の侵入がみられる標本が多く、歯周組織の再生もほとんど観察されなかった。

### [考察および結論]

以上の結果から、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体に $\beta$ -TCP を併用することで歯周組織再生の確実性が高まり、早期に歯周組織を再生出来ることが示唆された。

## 脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生療法の開発

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)

○小笹匡雄、橋川智子、島袋善夫、岩山智明、大原廣之、梶川哲宏、安齋 純、村上伸也

### Periodontal tissue regeneration by transplantation of adipose-tissue derived stem cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Masao Ozasa, Tomoko Hashikawa, Yoshio Shimabukuro, Tomoaki Iwayama,

Hiroyuki Oohara, Tetsuhiro Kajikawa, Jun Anzai, Shinya Murakami

#### [目的]

間葉系幹細胞は高い自己複製能と多分化能を有することから、再生医療における細胞源として注目を集めている。しかしながら、歯周組織再生医療の分野においては未だ幹細胞移植の実用性、有用性の詳細は十分に検討されていない。私たちの研究室では、採取に際して患者への負担が少なく安全性も高いと考えられる脂肪組織中に存在する未分化間葉系幹細胞(ADSC)に着目し、ADSCを用いた新規歯周組織再生療法の確立をめざした様々な解析を行い報告してきた。本研究においては、ビーグル犬の2級根分岐部病変モデルおよび2壁性骨欠損モデルを用いて、同一ビーグル犬脂肪組織より単離したADSCの移植による歯周組織再生誘導効果について検討を行った。

#### [材料および方法]

##### 1. ビーグル犬脂肪組織からのADSC単離

ビーグル犬の腹部内臓脂肪である大網より脂肪組織を採取、細断し、1時間のコラゲナーゼ処理を行った。得られた細胞よりficollを用いた比重遠心により赤血球を除去し、得られた細胞を播種後、培養プレートに付着した細胞を3代継代し、得られた細胞をADSCとした。

##### 2. ビーグル犬を用いた実験的歯周病モデルの作製およびADSCの移植

①根分岐部歯周病モデル：ビーグル犬1頭を用い、全身麻酔下にて第四前臼歯側分岐部に頬舌径3mm、深さ5mmの人工的2級根分岐部病変を作製し、シリコン材を填入、その後4週目に、作成した左右両側の人工的骨欠損のうち一側を被験部位として、ADSC+フィブリンを移植した。一方、対照部位にはフィブリンのみを移入した。移植後6週目に屠殺し、マイクロCTにより歯周組織の断層撮影による歯槽骨再生の評価を行うとともに、組織切片を作成して組織学的に歯周組織再生効果を評価した。

②2壁性骨欠損歯周病モデル：ビーグル犬5頭を用い、左右両側の下顎第四前臼歯を抜歯し、約3ヶ月間の治癒期間を経た後に第一後臼歯の近心部の歯槽骨を、頬舌径3mm、近遠径5mm、深さ4mmとなるように規格化を行い同上骨欠損を作製した。さらに、露出した第一後臼歯近心根のルートプレーニングを行った。作製した左右両側の人工的骨欠損のうち一側を被験部位として、ADSC+フィブリンを移植した。一方、対照部位にはフィブリンのみを移入した。移植後の解析は、根分岐部病変モデルと同様に行った。さらに、コンピューターアナライザーを用いて3次元画像解析と組織学的計測を行った。

#### [結果]

2級根分岐部病変モデルおよび2壁性骨欠損病変モデルにおいて、対照側と比しADSCの移植による著明な歯槽骨の添加を認めた。さらに2壁性骨欠損歯周病モデルにおいて、既存のセメント質とは連続しないコラーゲン線維の埋入を伴ったセメント質新生が有意に認められた。また、どの処置群においてもアンキローシスや歯根吸収等の非生理的治癒は認められず、ADSC移植による歯周組織再生促進を確認した。

#### [考察]

今後の検討課題の一つとして、ADSC用の至適再生誘導用足場材を選定することが必須であり、現在検討を開始している。本研究の成果は、「口と歯」が支えるQOLの維持・増進に寄与する次世代の歯周組織再生療法の開発に直結するものであり、将来的にはトランスレーショナルリサーチを通じて、臨床応用の道が開かれるものと考えられる。

本研究の遂行にあたり、本学医学部附属病院未来医療センター澤 芳樹センター長、松山晃文先生、菰田 弘先生よりいただいた御協力ならびに御助言に深く感謝致します。

## 歯の再生機構解明を目指した遺伝子改変型人工歯胚作製法の開発

大阪大学大学院歯学研究科生化学教室<sup>1</sup> 東京理科大学大学院基礎工学研究科<sup>2</sup>

○和田 知子<sup>1,2</sup>、齋藤 正寛<sup>1</sup>

### Development of a transgenic bioengineered tooth germ for analyzing molecular mechanism of tooth regeneration.

Osaka University, Graduate School of Dentistry Department of Molecular and Cellular Biochemistry  
Tokyo University of Science, Graduate School of industrial Science and Technology  
Tomoko WADA, Masahiro SAITO

**研究目的** 現在、次世代医療として一度失った組織や器官を再生させる再生医療が脚光を浴びている。再生医療には組織幹細胞を移植する細胞移入療法と、ex vivo で作製した再生臓器を移植する臓器置換移植療法が考えられている。一方、歯科領域においても歯周病あるいは歯蝕により失われた組織を再生する新たな治療法の実験系が開発が試みられている。しかし歯および歯周組織の発生・再生機構が十分に理解されていないため、歯科領域における再生医療研究開発は困難を極めている。その最大の理由として、歯および歯周組織形成に関わる分子群の機能解析できる有効な実験系が確立されていない事が上げられる。そこで我々は辻らが開発した器官原基法により人工歯胚を作製する技術に着目し、同技術を応用して遺伝子改変型人工歯胚 (TG-再構成歯胚) を作製し、機能的に歯および歯周組織発生機構を評価できる解析システムの構築を試みた。

#### 材料および方法

1. マウスの臼歯歯胚間葉細胞 (Mice Dental Mesenchyme Cells:MDM 細胞) の培養条件の検討  
胎齢 14.5 日のマウス胎児より MDM 細胞を採取し、6well 上で初代培養を試みた。次に培養した MDM 細胞を回収し胎齢 14.5 日のマウス胎児の臼歯歯胚上皮組織と組み合わせた再構成歯胚を作製した。
2. GFP 発現 TG-再構成歯胚 (TG-GFP 再構成歯胚) の作製  
レンチウイルスベクター (CS-CDF-CG-PRE:理化学研究所筑波研究所、三好浩之博士より供与) を 293T 細胞にトランスフェクションし、レンチウイルスを作製した。得られたウイルスを初代培養中の MDM 細胞に感染させ、GFP 発現 MDM 細胞を作製した。この細胞を回収し、胎齢 14.5 日マウス胎児の臼歯歯胚上皮組織と組み合わせて再構成歯胚を作製した。これを 8 週齢の雄マウスの腎被膜下に移植して器官培養を行った。
3. GFP 発現 TG-再構成歯胚 (TG-GFP 再構成歯胚) の解析  
腎被膜下移植を行った再構成歯胚を摘出して、固定、脱灰、脱水処理後に凍結切片を作製し、その形態形成および、歯原生間葉細胞由来組織における GFP の発現を解析した。

**結果** MDM細胞を培養開始後 2 日以内に回収して再構成歯胚に利用すれば 90%以上の確率で歯に発生することが分かった。またレンチウイルス発現系を用いてGFPを遺伝子導入したMDM<sup>GFP</sup>細胞を用いて作製したTG-再構成歯胚は (TG-GFP再構成歯胚)、正常に歯および歯周組織を形成し、さらに象牙芽細胞、歯髓細胞、歯根膜細胞及び歯槽骨細胞を含む歯原生間葉細胞由来組織においてのみ強いGFPの発現が観察され、歯原性上皮細胞由来組織では検出されなかった。

**考察** レンチウイルス発現系を用いた TG-再構成歯胚作製技術の開発に成功した。TG-GFP 再構成歯胚は歯原性間葉細胞由来組織が GFP 陽性であったことから、この技術を用いて歯および歯周組織の分子メカニズムを解析できる可能性が示唆された。

**結論** 本技術の開発によって、歯および歯周組織発生を制御する分子を同定できる可能性が示唆され、歯科における再生医療技術開発ならびに創薬ターゲットの探索に繋がる事が期待される。

## クラス II HLA 分子を介した刺激を受けた歯肉線維芽細胞による Th 細胞応答性の制御

兵庫医科大学 病理学講座・機能病理部門<sup>1)</sup>, 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態機構学講座 歯周病態学分野<sup>2)</sup>, 広島大学 大学院医歯薬学総合研究科 顎口腔頸部医科学講座 健康増進歯学<sup>3)</sup>

○ 大山 秀樹<sup>1)</sup>, 小越 菜保子<sup>1)</sup>, 目黒 道生<sup>2)</sup>, 吉澤 さゆり<sup>2)</sup>, 岡田 祐佳<sup>2)</sup>, 西村 英紀<sup>3)</sup>

### Regulation of Th-cell responses by gingival fibroblasts upon stimulus via HLA-II molecules

Dept. of Pathology, Hyogo College of Medicine<sup>1)</sup>, Dept. of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences<sup>2)</sup>, Dept. of Dental Science for Health Promotion, Division of Cervico-Gnathostomatology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences<sup>3)</sup>

○ Hideki Ohyama<sup>1)</sup>, Nahoko Kato-Kogoe<sup>1)</sup>, Michio Meguro<sup>2)</sup>, Sayuri Yoshizawa<sup>2)</sup>, Yuka Okada<sup>2)</sup>, Fusanori Nishimura<sup>3)</sup>

#### 【目的】

歯肉線維芽細胞 (GF) は、IFN- $\gamma$  刺激によってクラス II HLA (HLA-II) 分子を発現する。この GF 上に発現する HLA-II 分子は抗原提示分子としてよりもむしろレセプター分子として機能することが、我々の多角的な研究によって明らかになってきた。すなわち、我々は、単クローン抗体を用いた架橋反応、あるいは抗原ペプチド-T細胞レセプターとの間で複合体を形成するなどの HLA-II 分子を介した刺激を細胞内に与えた場合、GF は種々のケモカイン・サイトカインを産生することを明らかにした (Ohyama H *et al.*, *Cytokine*, 2002)。これら産生されるケモカイン・サイトカインは、歯周病巣への免疫担当細胞の浸潤、さらには病巣局所における様々な炎症反応に関わる細胞機能に影響することが考えられる。特に、HLA-II 分子-T細胞レセプターとの間で複合体が形成された場合、GF のカウンターパートとなるヘルパー T (Th) 細胞および Th 細胞に対して抗原提示を行なう樹状細胞 (DC) のそれぞれは、GF から産生される液性因子によってその応答性が大きく規定される細胞集団群であると思われる。

そこで、本研究は、GF が HLA-II 分子を介した刺激を受けたときに産生物される液性因子が、DC および Th 細胞応答にどのような影響を与えるかについて調べることを目的とした。

#### 【材料および方法】

1. HLA-II 分子を介した刺激を受けた GF 細胞株の培養上清の調整: 健康者歯肉から分離・培養を行なった GF 細胞株を抗 HLA-II 抗体 (抗 HLA-DR, -DQ 抗体) および陰性対照抗体の存在下で培養することによって、液性因子の産生を誘導した。それら回収した培養上清を以下の混合培養系に供した。
2. 混合リンパ球培養反応 (MLR) による GF 細胞株産生物が Th 細胞応答性に及ぼす影響の評価: 健康人末梢血単核球由来 CD14<sup>+</sup>細胞から分化誘導させた成熟樹状細胞 (mDC) と HLA-DR タイプの異なるドナーから分取したナイーブ T 細胞とを 7 日間混合培養することによって MLR を誘導した。CD14<sup>+</sup>細胞およびナイーブ T 細胞の分離調整は、磁気ビーズを用いた negative selection 法によって行なわれた。mDC の分化誘導は、CD14<sup>+</sup>細胞を IL-4 および GM-CSF 存在下で 5 日間培養することによって未熟樹状細胞 (iDC) を誘導した後、成熟因子である TNF- $\alpha$  刺激を行ない、さらに 2 日間培養することによって行なわれた。なお、GF 産生物が DC および Th 細胞応答に及ぼす影響についての評価は、1) iDC  $\rightarrow$  mDC 成熟過程および 2) MLR 誘導過程のそれぞれにおいて、上記 1. で回収した GF 培養上清存在下および非存在下で培養を行ない、T 細胞が産生するサイトカイン・プロファイルを培養上清存在下および非存在下の間で比較することによって行なわれた。

#### 【結果と考察】

HLA-II 分子を介した刺激を受けた GF が産生物する液性因子存在下で MLR を行なった Th 細胞が産生するサイトカイン・プロファイルは、非存在下で MLR を行なった Th 細胞のそれに比べて、IL-5, IL-13 などの Th2 タイプ・サイトカインに有意に偏ったものであった。HLA- DQ 分子を架橋した時に GF が産生する液性因子は、DR 分子を架橋したときのそれに比べて、有意に強く Th 細胞のサイトカイン産生を Th2 タイプに偏向させた。また、GF が産生物する液性因子は、MLR 誘導過程に存在した場合と比較して、iDC  $\rightarrow$  mDC 成熟過程に存在した場合のほうが、より強く Th 細胞のサイトカイン産生に影響を与えた。以上のことから、HLA-II 分子を介した刺激を受けた GF が産生物する液性因子は、おもに DC の分化過程に作用することによって、歯周病巣局所における DC-Th 細胞応答におけるサイトカイン産生性を制御する要素の一つとして考えられることが明らかとなった。

## ラット修復象牙質形成における遺伝子発現の網羅的解析

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)  
○高橋雄介、吉岡靖介、今里 聡、騎馬和歌子、恵比須繁之

**Comprehensive analysis of gene expression  
involved in reparative dentinogenesis of rats**  
Department of Restorative Dentistry and Endodontology,  
Osaka University Graduate School of Dentistry

○Yusuke TAKAHASHI, Seisuke YOSHIOKA, Satoshi IMAZATO, Wakako KIBA and Shigeyuki EBISU

### 【研究目的】

原生象牙質は、歯の発生段階において上皮組織と間葉組織の相互作用により形成されることが分かっているが、う蝕や修復処置などの歯髄への刺激によって生じる修復象牙質については、その形成メカニズムがまだ不明である。そこで、われわれは、どのような分子がどのような過程において修復象牙質形成を誘導するのかを明らかにするために、ラットを用いた *in vivo* 系での研究に着手し、まず第 121 回学会において、ラット健全歯に実験的窩洞を形成した場合、窩洞直下の象牙質や形成された修復象牙質に Dentin Matrix Protein 1 が観察されることを報告した。

今回は、修復象牙質形成過程で発現する遺伝子を網羅的に検索することを目的に、ラットを用いたモデルで、実験的窩洞を形成した後に歯髄腔内の細胞において発現する遺伝子をマイクロアレイ法により解析した。

### 【材料および方法】

#### 1. マイクロアレイ解析

9 週齢雄性 Wistar 系ラット上顎第一臼歯に、全身麻酔下でラウンドバーを用いて深さ約 0.4mm の窩洞を形成し、グラスアイオノマーセメントにて仮封を行った。窩洞形成直後、1 日後もしくは 3 日後に被験歯を抜去して歯髄腔内の細胞より total RNA を調製し、発現している遺伝子を GeneChip® 遺伝子解析アレイ (Rat Genome 230 2.0 Array, Affymetrix, USA) を用いて解析した。得られた結果について、実験群と窩洞形成を施していないコントロール間での比較を行い、2 倍以上の発現差があるものを抽出した。

#### 2. Real-time PCR

実験 1 で抽出された遺伝子の中から、Gene Ontology 分類に基づき、炎症反応や創傷治癒、細胞の発生、分化に関するものについて、Real-time RT-PCR 法を用いてマイクロアレイの結果の検証を行った。

### 【成績】

実験群では、窩洞形成直後において、コントロールと比較して 308 遺伝子の発現上昇と 203 遺伝子の発現抑制が認められた。窩洞形成 1 日後では、329 遺伝子の発現上昇と 123 遺伝子の発現抑制が、3 日後では 337 遺伝子の発現上昇と 169 遺伝子の発現抑制が認められた。また、発現が変化した遺伝子の中で、実験期間中の少なくとも連続した 2 期間以上において発現上昇が認められたものは 73 遺伝子、発現が抑制されたものは 7 遺伝子であった。

連続的な発現上昇が確認された 73 遺伝子のうち、*Matrix Metalloproteinase 13* や *Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1* などの創傷治癒に関連する遺伝子について、Real-time RT-PCR 法で解析を行ったところ、マイクロアレイの結果と同様に、実験群では、コントロールに比べてこれらの遺伝子の発現上昇が認められた。

### 【考察と結論】

マイクロアレイ解析の結果から、窩洞形成の刺激により、形成直後から多数の遺伝子の発現変動が生じることが分かり、また、Real-time PCR での検証によって、いくつかの遺伝子の持続的な発現上昇が確認された。今回の実験は、窩洞形成直後から 3 日目までの遺伝子発現について調べたものであるが、この期間に発現上昇が認められた遺伝子の中に、歯髄の創傷治癒や修復象牙質の誘導に関与するものが含まれている可能性は十分に考えられる。今後、これらの遺伝子 (群) について、その局在の検索や、修復象牙質形成との関連性の検討を行っていく予定である。

本研究の一部は、平成 19-20 年度文部科学省科学研究費補助金若手研究 (B) (19791397) を用いて遂行された。

## ヒト象牙芽細胞層の三次元的カップリングネットワーク

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野

○池田 英治, 須田 英明

### Three-dimensional Coupling Network in the Human Odontoblastic Layer

Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences,

Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

○IKEDA Hideharu and SUDA Hideaki

#### 【研究目的】

これまで我々は、単離した新鮮象牙芽細胞実験モデルを用いて、象牙芽細胞が刺激センサーである可能性を調べてきた(第 127, 126 本学会学術大会)。そして、ヒト象牙芽細胞層に細胞間カップリングネットワークが存在し、年齢や細胞外 pH によって細胞間 transjunctional conductance が影響を受けることを示した。ただしこの方法は象牙芽細胞を象牙細管から外す際に細胞膜に機械的ダメージを加えている可能性がある。そこで今回、我々は単離の際に生じる象牙芽細胞間の electrical-あるいは dye-coupling へのダメージを減らすために、象牙質-歯髄ディスクモデルを新しく考案した。この新しい実験モデルを用い、カップリングネットワークの特性を明らかにする目的で本研究を行った。

#### 【材料と方法】

矯正治療のために便宜抜去した 3 本(患者年齢 15, 16, 20 歳)の新鮮小臼歯を用いた。抜歯後直ちに歯冠部を斜め方向に切断して、歯髄を含んだ象牙質ディスクを作製した。芯部の歯髄は実体顕微鏡下(Wild M650, Switzerland)で先端細ピンセット(Dumont no.5, Switzerland)で除去した後、トリプシン(Sigma, Japan)を用いて細胞や線維の残存断片物を除去し、破損されていない象牙芽細胞膜を露出した。パッチクランプ法あるいは細胞内記録法を用いて電気生理学的記録を行い、細胞間電位固定を行った際に流れる電流や、電流を注入することによって生じる他細胞における電位の時間による推移をモニターした。また、電極先端に入れた lucifer yellow をイオン導入法によって単一の象牙芽細胞内に注入し、dye-coupling を介してどれほど広がるかを確認した。

#### 【成績】

1. 電流を注入した細胞からかなり離れた象牙芽細胞からも電位変化を記録できた。すなわち、電流注入細胞-記録細胞間の距離依存性に電位の減衰はみられたが、ディスクのほぼ反対側の象牙芽細胞からさえも電位変化を記録することができた。
2. 注入した lucifer yellow は、ほぼ反対側の細胞まで広がることが確認された。
3. 電流注入細胞-記録細胞間における electrotonic coupling probability と electrotonic coupling coefficient は、距離依存性に減少した。

#### 【考察】

細胞間ネットワークは、斜めにスライスした象牙質-歯髄ディスク上で広がり、ディスク反対側まで及ぶことがわかった。このことから、水平方向と歯軸方向ともに細胞間結合が確立されていることがわかった。

#### 【結論】

ヒト象牙芽細胞は、個々に機能するというよりも、むしろ 3 次的に構築された機能複合体として存在することが示唆された。

## Lef-1 は培養歯髄細胞の石灰化に影響する

奥羽大学歯学部歯科保存学講座  
○横瀬 敏志、中 貴弘、天野 義和

**Lef-1 influenced on mineralized nodule formation in dental pulp cells isolated from rat incisors.**  
Department of Conservative Dentistry Ohu University School of Dentistry  
○Satoshi Yokose, Takahiro Naka, Yoshikazu Amano

目的 : Lef-1 (lymphoid enhancing factor 1) は歯の形成過程での上皮間葉相互作用において重要な役割を果たしており、*lef-1* の遺伝子を knockout したマウスの歯胚は歯乳頭の形成が進まず、bud stage 後半で発育が停止してしまうことが知られている。このため *lef-1* は神経提細胞由来の歯乳頭間葉細胞の分化、増殖をコントロールしていることが知られている。さらに、*lef-1* は wnt シグナル経路において細胞内  $\beta$ -catenin の co-activator として、転写因子として細胞分化を調節している。歯の発生に深く関与する *lef-1* であるが、その詳細な作用機序は未だ明確にされていないのが現状である。本研究では vital pulp therapy の開発のための基礎研究として、dentinogenesis に対する *lef-1* の作用機序を調べた。すなわちラット切歯から分離した培養歯髄細胞を用いて *lef-1* の歯髄細胞の分化に対する影響を調べたので報告する。

材料と方法 : 6 週齢のメス SD ラットの顎切歯から collagenase-trypsin にて分離した歯髄細胞を用いた。10%FBS、50  $\mu$ g/ml アスコルビン酸、2mM  $\beta$  グリセロリン酸を含んだ  $\alpha$  MEM にて 5、10、15、20 日間培養して実験に使用した。培養開始後 3 日目には *lef-1* の mRNA に対する siRNA を組み込んだ発現 vector を培養歯髄細胞に transfection し、knock down (KD) を行った。一方、*lef-1* の mRNA の full length を CMV promoter を持った GFP を reporter とした発現 vector に組み込み、同様に培養歯髄細胞に transfection し、*lef-1* の mRNA を強制発現させた。

これらの細胞に対して、分子生物学的な検索として、alkaline phosphatase (ALP)、*lef-1*、dentin sialoprotein (DSPP)、osteocalcin の mRNA の発現を real time PCR 解析を行った。また、蛍光顕微鏡下にて GFP の発現を観察し、ALP 酵素組織化学的染色と von kossa 染色を行った後、石灰化結節を顕微鏡下で観察した。また、細胞増殖に対する影響も調べた。

結果と考察 : Real time PCR の結果から、*Lef-1* の発現は siRNA の作用により培養 10 日まで対照群の細胞に比較して 30 - 40 % の発現に抑制された。しかしながら培養 15、20 日目では *Lef-1* の発現は対照群との差はみられなくなった。一方、培養 5 日から *lef-1* の強制発現させた細胞は GFP タンパク質の発現が確認され、*lef-1* の発現は対照群に比較して約 700 倍の発現量を示した。また、この発現量は培養 15 日まで維持され、20 日目では約 3 倍の発現量であった。DSPP の発現は培養 15 日目では対照群の細胞に対して *lef-1* を KD した細胞では 60% に抑制されていた。これに対して *lef-1* を強制発現させた細胞では 400% まで増加していた。同様に osteocalcin の発現も *lef-1* を KD した細胞では 10-40% に抑制され、*lef-1* を強制発現した細胞では 4 倍に増加していた。これらの結果を反映して、石灰化結節の形成も *lef-1* を KD した細胞では対照群の細胞に比較して有為に減少しており、逆に *lef-1* を強制発現させた細胞では有為に増加していた。細胞増殖能は、*lef-1* を強制発現させた細胞が有意に増加しており、逆に *lef-1* を KD した細胞では有意に低下していた。

以上の結果から培養歯髄細胞の増殖期の限局された時期に *lef-1* の発現が抑制されたにもかかわらず最終分化としてみられる DSPP、osteocalcin の発現に作用し、象牙質様石灰化基質の形成を抑制した。また、逆に *lef-1* の強制発現ではこれらの遺伝子発現を促進させ、象牙質様石灰化基質合成を促進したことが分かった。したがって歯髄細胞における象牙芽細胞への分化において wnt シグナル経路を担う *lef-1* は直接的に DSPP と osteocalcin の転写を調節し、dentinogenesis に重要な役割を果たしていることが示唆された。

結論 : Lef-1 は dentinogenesis に関与する。



## ヒアルロン酸スポンジに対する歯髄組織の炎症応答

九州歯科大学口腔治療学講座齲蝕歯髄疾患制御学分野<sup>1</sup>、医療人間形成学講座総合診療学分野<sup>2</sup>

○犬山喜夫<sup>1</sup>、北村知昭<sup>1</sup>、諸富孝彦<sup>1</sup>、永吉雅人<sup>1</sup>、寺下正道<sup>2</sup>

Pulp Inflammatory Responses against Hyaluronic Acid Sponge

Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Department of Cariology and Periodontology<sup>1</sup>, and Division of Comprehensive Dentistry, Department of Clinical Communication and Practice<sup>2</sup>, Kyushu Dental College

○INUYAMA Yoshio<sup>1</sup>, KITAMURA Chiaki<sup>1</sup>, MOROTOMI Takahiko<sup>1</sup>, NAGAYOSHI Masato<sup>1</sup>, TERASHITA Masamichi<sup>2</sup>

### 【目的】

ヒアルロン酸は細胞外マトリックス構成因子であるグリコサミノグリカンの1種である。組織創傷治癒・再生療法に幅広く応用されており、象牙質/歯髄複合体においても創傷治癒・再生に適した環境を構築することが期待されている。これまでに我々は、象牙質/歯髄複合体再生療法におけるスキャホールドとしてヒアルロン酸スポンジの有用性を報告してきた。今回、ヒアルロン酸スポンジに対する歯髄組織反応を検討した。

### 【材料と方法】

ラット歯髄より樹立した象牙芽細胞様細胞株(KN-3細胞)をヒアルロン酸スポンジおよびコラーゲンスポンジに播種後一定期間培養し、それぞれのスポンジからプレート底部に漏出した細胞数をカウントしスポンジの細胞保持力を検討するとともに、走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行った。また、KN-3細胞を各スポンジに播種・培養後にみられる炎症性メディエーターの発現を測定した。次に、9週齢ラットの上顎第一臼歯咬合面から生活歯髄切断を行い、断髄面を次亜塩素酸ナトリウム、オキシドール、滅菌生理食塩水で洗浄・止血後、ヒアルロン酸スポンジあるいはコラーゲンスポンジを窩洞に充填・封鎖し、一定期間経過後の歯髄組織の変化をヘマトキシリン-エオシン染色により組織学的に観察するとともに、充填部における炎症細胞数を顕微鏡下で測定した。

### 【結果】

SEM像から、コラーゲンスポンジはヒアルロン酸スポンジよりも多孔質な構造を有していることが確認された。KN-3細胞を各スポンジ内で培養したところ、両スポンジともKN-3細胞は良好に付着していたが、コラーゲンスポンジでは紡錘形で偽足を出したKN-3細胞が観察されたのに対し、ヒアルロン酸スポンジでは球型のまま付着しているKN-3細胞が観察された。細胞播種後、培養期間中にスポンジから漏出し培養プレート底部に接着している細胞数はコラーゲンスポンジで有意に多く、また炎症性メディエーター誘導も観察された。

次にラット上顎第一臼歯生活歯髄切断部に各スポンジを充填し組織変化を観察した。術後1週では、コラーゲンスポンジ群においてスポンジ残存と好中球を中心とした多数の顆粒球侵入が観察された。一方、ヒアルロン酸スポンジ群では炎症反応はほとんど認められず、スポンジは吸収され歯髄細胞および血管侵入の多い残存歯髄と類似した組織構造が観察された。術後3週では、コラーゲンスポンジ群においてスポンジ残存と炎症反応は持続しており歯髄細胞や血管侵入も少なかった。一方、ヒアルロン酸スポンジ群では術後1週の状態が持続していた。充填された各スポンジにおける炎症細胞数は、コラーゲンスポンジ群がヒアルロン酸スポンジ群の約1.6倍を示していた。

### 【考察】

以上の結果より、ヒアルロン酸スポンジは歯髄細胞保持力を有しているとともに、コラーゲンスポンジに比べ歯髄創傷治癒過程で見られる炎症反応を抑制する可能性が示唆された。

### 【結論】

ヒアルロン酸スポンジは、高い歯髄組織親和性を持ち象牙質/歯髄複合体再生療法におけるスキャホールドとして有用である。

## 象牙芽細胞様細胞の有する象牙質形成能への熱刺激の影響

九州歯科大学口腔治療学講座齲蝕歯髓疾患制御学分野<sup>1</sup>、医療人間形成学講座総合診療学分野<sup>2</sup>

○諸富孝彦<sup>1</sup>、北村知昭<sup>1</sup>、寺下正道<sup>2</sup>

Effect of Heat Stress on Capacity to formation of Dentin in Odontoblast-like Cell.  
Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Department of Cariology and Periodontology<sup>1</sup>,  
and Division of Comprehensive Dentistry, Department of Clinical Communication and Practice<sup>2</sup>,  
Kyushu Dental Collage

○MOROTOMI Takahiko<sup>1</sup>, KITAMURA Chiaki<sup>1</sup>, TERASHITA Masamichi<sup>2</sup>

### 【目的】

歯髓組織は歯の知覚や栄養、免疫および修復などを司る重要な組織であるが、周囲を硬組織で囲まれた特殊な閉鎖空間に存在し、歯髓に過度の刺激が加わると重篤な炎症へと陥りやすい。そのため歯髓保存の観点から、歯髓刺激とその後の創傷治癒過程を解明することは有意義である。生活歯における窩洞形成時に生じる発熱も、象牙質-歯髓複合体に傷害を引き起こすが、熱刺激が重度でなければ象牙質-歯髓複合体は創傷治癒過程を経て修復される。これまでに我々は、象牙質-歯髓複合体の創傷治癒・再生機構を解明するために有用と考えられる、象牙芽細胞様の特徴を有する細胞株 KN-3 を、ラット下顎切歯歯髓組織細胞群より樹立した。今回、象牙質-歯髓複合体への熱刺激の影響と創傷治癒・再生機構の解明を目的として、通常培養条件下 (10%ウシ胎仔血清:FBS 含有培地) および浸潤麻酔による血流量低下を想定した貧栄養条件下 (1%FBS 含有培地) において KN-3 細胞に熱刺激を加え、その影響について検討した。

### 【材料と方法】

KN-3 細胞を  $9.0 \times 10^3$  cell/cm<sup>2</sup> の密度で各細胞培養容器に播種し、10%または1%のFBS添加培地 ( $\alpha$ -MEM) で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下において 24 時間培養の後、43°C、45 分間の熱刺激を加えた。刺激直後、12 時間、1 日、3 日および 7 日後における細胞増殖能の変化を MTS assay で確認し、細胞形態を顕微鏡下で観察した。また RT-PCR 法により各種炎症マーカーと、象牙質形成への関与が報告されているホメオドメイン型転写因子 (Runx2/Cbfa1)、象牙芽細胞が産生する非コラーゲン性タンパクである象牙質シアロリントタンパク (DSPP) それぞれの mRNA 発現を確認した。さらに、*p*-ニトロフェニルリン酸基質法によりアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を測定した。また熱刺激後、石灰化誘導培地中で培養した細胞の 3 週目以降における石灰化能を von Kossa 反応により検出した。

### 【結果】

熱刺激後、KN-3 細胞の増殖能は一過性に低下した。特に 1%FBS 添加群では、10%FBS 添加群と比べ有意に増殖能は低下したが、両群とも時間経過とともに細胞増殖能が回復した。熱刺激から 12 時間後にはサイズの縮小や核の凝縮・断片化といったアポトーシス細胞に特徴的な形態をもつ細胞が観察され、36 時間後には小粒状に凝縮した細胞や、これらの細胞を細胞質内へと取り込んでいる貪食細胞も観察された。RT-PCR 法においては、熱刺激により炎症マーカーの発現増加が一過性に認められた。Runx2 は熱刺激直後より発現低下が認められたが、7 日目にはコントロール群との差を認めなくなった。DSPP は観察期間を通して発現に変化は認められなかった。ALP 活性については、熱刺激群はコントロール群より低い値を示し、中でも 1%FBS 添加群は 10%FBS 添加群と比較してより低値を示した。von Kossa 反応では、熱刺激後 3 週目で熱刺激群はコントロール群より弱い染色性を認めたが、その後は差が少なくなった。

### 【考察】

熱刺激後に細胞数減少、アポトーシス様細胞の出現、Runx2 発現減少や ALP 活性低下が観察されたことから、象牙芽細胞様細胞は熱刺激により傷害を受けることが明らかとなった。さらにその影響は貧栄養状態の方が富栄養条件下よりも大きいことが確認された。しかしながら、熱刺激から一定時間経過するといずれの栄養条件下においても細胞増殖能、ALP 活性、Runx2 や DSPP 発現および石灰化能の回復が認められた。以上の結果は、熱刺激後に細胞死に至らず生存した象牙芽細胞様細胞は、特徴的性質を保持し続けることを示唆している。一方、栄養条件に関わらず熱刺激により KN-3 細胞は炎症性マーカーを発現することから、象牙芽細胞様細胞は熱刺激に対し各種炎症応答を示すことが示唆された。

### 【結論】

象牙芽細胞様細胞株 KN-3 は耐熱性を有し硬組織形成能を維持するとともに、熱刺激に対し炎症応答を示す。

## ホルマリン・グアヤコール (FG) 根管貼薬時のホルムアルデヒド蒸気測定

<sup>1</sup>東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野

<sup>2</sup>東北大学環境保全センター

<sup>3</sup>東北大学大学院歯学研究科口腔保健発育学講座予防歯科学分野

<sup>1</sup>井川資英、<sup>2</sup>進藤 拓、<sup>3</sup>井川恭子、<sup>1</sup>島内英俊

The measurement of formaldehyde vapor during intracanal dressing of Formalin Guaiacol (FG)

<sup>1</sup>Div. of Periodontology and Endodontology, Dept. of Oral Biology, Tohoku Univ. Graduate School of Dentistry

<sup>2</sup>Environment Conservation Center, Tohoku University

<sup>3</sup>Div. of Preventive Dentistry, Dept Oral Health Sciences, Tohoku Univ Graduate School of Dentistry

<sup>1</sup>Motohide IKAWA, <sup>2</sup>Taku SHINDOH, <sup>3</sup>Kyoko IKAWA, <sup>1</sup>Hidetoshi SHIMAUCHI

### [研究目的]

ホルマリン・グアヤコール (FG) はホルマリンとグアヤコールの合剤で、根管消毒剤として広く普及している。ホルムアルデヒドは従来、労働安全衛生法施行令 (昭和 47 年政令第 318 号) の特定化学物質障害予防規則 (特化則) により特定化学物質の第 3 類に分類されていたが、平成 20 年 3 月 1 日に施行令の一部が改正され第 2 類へと分類変更され、使用場所におけるホルムアルデヒドの管理濃度 (空气中濃度基準値) は 0.25ppm から 0.1ppm と厳しくされた。本研究の目的は、診療時における FG から蒸散するホルムアルデヒド濃度に関する知見を得ることである。

### [材料および方法]

予め髓腔開拓および根管拡大を行ったヒト抜去歯根管にブローチ綿花にしみ込ませたホルマリン・グアヤコール (FG 「ネオ」、ネオ製薬工業、以下 FG と略す) を貼薬し、その際に蒸発するホルムアルデヒドをガス検知管 (710、光明理化学工業) および DNPH 捕集管 (DNPH シリカゲルアクティブガスト्यूブ、柴田科学) によって測定した。抜去歯を診療ユニットのヘッドレストにユーティリティワックスを用いて固定し、抜去歯から約 20cm 離れた位置に検知管・チューブの吸引口先端を配し、10 分間測定を行った。測定は、1) 局所排気を全く行わずに FG をしみ込ませた貼薬綿栓を根管に挿入し 10 分間放置 (条件 1)、2) FG をしみ込ませた貼薬綿栓を根管に挿入し 10 分間放置、その間ユニット付属の吸引装置とバキューチップを使用して抜去歯周囲の空気を吸引し続けた場合 (条件 2)、3) FG をしみ込ませた貼薬綿栓を根管に挿入し 10 分間放置、その間口腔外大容量吸引装置 (Denpax NDP-510、(株) デンパックス) を使用して抜去歯周囲の空気を吸引し続けた場合 (条件 3)、4) 局所排気を全く行わずに FG をしみ込ませた貼薬綿栓を、根管には挿入せずヘッドレスト上に 10 分間放置 (条件 4)、のうちのいずれかの条件下で行った。

### [結果]

各条件下で空气中に蒸散したホルムアルデヒドの平均濃度は、条件 1 では  $0.0023 \pm 0.0069$  ppm (平均±標準偏差、以下同じ)、条件 2 では  $0.0008 \pm 0.0048$  ppm、条件 3 では  $0.0011 \pm 0.0057$  ppm、そして条件 4 では  $0.0282 \pm 0.0295$  ppm であった (それぞれ n=5)。これら 4 つの条件下でのホルムアルデヒド濃度には統計学的な有意差が得られた (Kruskal-Wallis 検定、 $p < 0.05$ )。

### [考察]

今回の 4 つの条件下で蒸散したホルムアルデヒド濃度は、特化則で定められた管理濃度に達しない値であった。通常根管貼薬の際に貼薬綿栓を空气中に曝露させる時間は今回の設定時間 (10 分間) よりも短いことを考慮すると、実際の診療において蒸散するホルムアルデヒド濃度は更に低いものと考えられる。

今回の測定で、ユニット付属の吸引装置を用いることは抜去歯周囲空气中のホルムアルデヒド濃度の低減に有効であることが明らかとなった。特化則第 2 類物質を使用する際は局所排気装置を使用して有害物質蒸気等の拡散を抑えることとされているが、こうした吸引装置は局所排気装置に相当し、これを使用することは空气中ホルムアルデヒド濃度の低減に有効であると思われる。

## 曲率半径と荷重がニッケルチタンファイルの疲労破折に与える影響

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野  
○八幡祥生, 林洋介, 海老原新, 小林千尋, 須田英明

### Effects of radius of curvature and load on fatigue fracture of nickel-titanium files

Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences,  
Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

○YAHATA Yoshio, HAYASHI Yohsuke, EBIHARA Arata, KOBAYASHI Chihiro, and SUDA Hideaki

#### 【緒言】

ニッケルチタンファイルは根管形成中に突然破折するという大きな欠点を有している。こうした破折を解析するため、これまでに多くの研究が行われており、疲労破折に対しては曲率半径が大きな影響を与えることが示唆されている。他方、金属材料の疲労破折は、高サイクル疲労と低サイクル疲労に大別され、荷重やひずみによってその破折様相が大きく異なる。しかし、ニッケルチタンファイルにおいて疲労破折様相に着目した研究は少なく、疲労時に加わる荷重とその挙動の詳細については未だ解明されていない。そこで本実験では、ファイルに任意の曲率半径を与え、荷重の測定を合わせて行うことのできる試験器を新たに考案し、曲率半径とファイルに加わる荷重が疲労破折に与える影響を調べた。

#### 【材料と方法】

**疲労試験器**：ロードセルに接続された3本のφ0.2mm、長さ10mm、高硬度ステンレススチール製の可動円柱型治具により、ファイルの曲率半径を任意に規定することができる自作試験器を用いた。

**疲労試験**：試料には、先端径0.3mm、0.06テーパーのProFile (Dentsply Maillefer, Switzerland)を用いた。曲率半径の設定はPruettらの方法に準拠し、4, 5, 6, 7, 8 mmの5条件とした。ニッケルチタンファイルは破断するまで250rpmにて回転させ、それぞれ疲労破折に至るまでに要した回転数(以下、NCF)、および荷重曲線を求めた。さらに曲率半径とNCFから近似曲線を、荷重曲線から破折に至るまでの平均荷重を求めた。なお、 $10^4$ 回転を超えても疲労破折が生じない場合は、試験を終了させた。各群ともn=5とした。平均荷重の統計学的解析には一元配置分散分析およびTukey's testを用いた(有意水準5%)。

#### 【結果】

疲労試験から得られたNCFと曲率半径の関係および近似曲線を図に示す。曲率半径8mm群の3つの試料では、 $10^4$ 回転を超えても疲労破折が生じなかった。平均荷重は、4, 5, 6 mmの群で、それぞれ7, 8 mmの群よりも高い値を示した。

#### 【考察および結論】

本研究からNCFと曲率半径間に直線関係はみられず、小さい曲率半径でNCFは急激に減じたことから、ニッケルチタンファイルは低サイクル疲労および高サイクル疲労を示すことが示唆された。

また、NCFが低サイクル疲労領域の時、平均荷重は高い値を示したが、塑性変形が生じる荷重を認めなかったことから、ニッケルチタンファイルの疲労破折は塑性変形のみならず、相変態が関与している可能性が推察された。

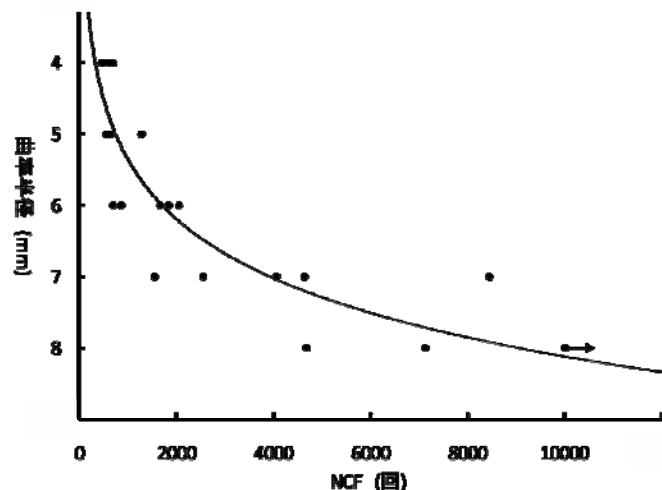


図. NCFと曲率半径の関係および近似曲線

## 18 ヶ月水中保管された根管充填歯における歯根破折について

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野

○石村瞳、花田隆周、菊地和泉、吉岡隆知、小林千尋、須田英明

### Vertical Root Fracture of Root Canal-filled Teeth Stored in Water for 18 Months

Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University.

○ISHIMURA Hitomi, HANADA Takahiro,

KIKUCHI Izumi, YOSHIOKA Takatomo, KOBAYASHI Chihiro, and SUDA Hideaki

#### 【研究目的】

垂直性歯根破折(VRF)は根管処置歯に多くみられ、歯の喪失原因となることが報告されている。しかし、VRF を実験的に再現した研究は少なく、その原因についても十分明らかにされていない。我々は第 126 回本学会で歯種、イスマスなどの解剖学的形態、および MAF(master apical file)のサイズが VRF に有意に関連することを報告した。本研究では、根管充填歯を水中で 18 ヶ月保存した後の根尖部の変化について検討を行った。

#### 【材料および方法】

被験歯として抜去後水中保管したヒト上顎前歯 20 本、および単根で二根管性のヒト上顎小白歯 20 本を使用した。小白歯は頰側根管のみ使用した。根尖 1mm をサンドペーパーで削除後、耐水研磨紙・ダイヤモンドペーストで研磨した。それぞれの歯種について、被験歯を無作為に 10 本ずつ 2 群 (MAF#40 群・MAF#80 群) に分類した。ゲーツ・グリッデン・ドリル#1-4(Dentsply/Maillefer)にて上部拡大後、#10~#40 もしくは#10~#80 K ファイル (Zipperer) の先端が根尖孔部で視認できるまで挿入し、根管形成を行った。その後、MAF#40 群では NiTi 製プロファイル#5 (Dentsply Talsa)、MAF#80 群ではプロファイル#7 を根尖まで挿入し根管形成終了とした。

メインポイント(ジーシー)を根管内に挿入後、NiTi 製スプレッダー(ブラッセラー)で加圧し、さらに、アクセサリポイント(特、ジーシー)を挿入後にスプレッダーで加圧した。この操作をもう一度繰り返した後、SystemB (Analytic Endodontics)プラグを根尖切断面から 3mm まで挿入し、根管充填終了とした。

その後、根尖研磨面をメチレンブルーで染色水洗し、CCD カメラ VH-8000(キーエンス)を用いて 150-175 倍で撮影した (第 1 群)。

被験歯を水中にて 18 ヶ月保存後、再度根尖研磨面をメチレンブルーで染色水洗し、CCD カメラを用いて撮影した (第 2 群)。

第 1 群と 2 群を比較し、VRF の発生、VRF の拡大、およびガッタパーチャポイント (GP) の変化を判定した。以下に判定基準を示す。

VRF の発生：第 2 群画像で新たに染色が確認された破折線

VRF の拡大：第 1 群画像で確認された破折線で、第 2 群画像において破折幅が拡大した破折線

GP の変化：第 1 群と比較して第 2 群画像で確認された GP の収縮

歯種および MAF が VRF の発生、VRF の拡大および GP の収縮に及ぼす影響について、ロジスティック回帰分析を用い、有意水準 5% で統計的に解析した。

#### 【結果】

VRF の発生は、小白歯と比較し、前歯で有意に多く認められた( $p < 0.05$ )。また、VRF の拡大および GP の収縮は、いずれも MAF サイズに関して有意差を認め( $p < 0.05$ )、#80 群で大きかった。

#### 【考察および結論】

本研究では、根管充填した歯を負荷が加わらない条件で 18 ヶ月水中保管した。静的な保管条件であったにも関わらず、前歯では新たな破折線が有意に多く認められ、MAF#80 群では破折線の幅が広がりやすいことが明らかになった。これらは、根管処置で生じたひずみが徐々に開放されたことと関連があると思われる。また、小白歯では、根管充填直後に既に破折線が生じてしまっていたため、新たな破折線は生じにくかったものと考えられた。MAF#80 群では、GP の収縮が有意に大きく、根管充填後の漏洩に関与する可能性が考えられた。

## Er:YAG レーザー照射による根管充填材除去時の象牙質の歪

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野

○渡辺 聡, 石澤 千鶴子, Bolortuya Gomb, 三枝 英敏, 安生 智郎, 海老原 新, 小林 千尋, 須田 英明  
Dentin Strain Caused by Removal of Root Canal Obturation with Er:YAG Laser Irradiation

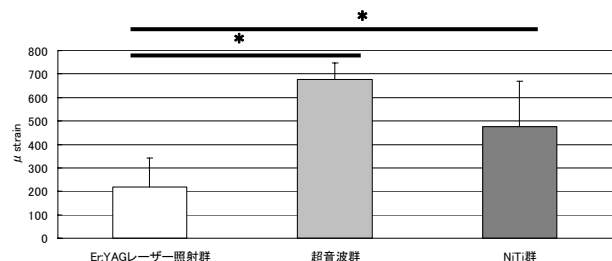
OWATANABE Satoshi, KOKUZAWA Chizuko, GOMB Bolortuya, SAEGUSA Hidetoshi, ANJO Tomoo, EBIHARA Arata, KOBAYASHI Chihiro  
and SUDA Hideaki

Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

**【緒言】** 近年、歯根破折の重要性が注目されており、根管治療を行うことで歯根歯折の危険性は高まるといわれている。さらに、やむを得ず再根管治療を行う場合、歯質削除は最小限にすることを考えなければならない。再治療を行う際、根管充填材の除去が必要となることが多いが、過去の治療により薄くなった歯質は、大きな歪が生じたとき破折が生じる可能性がある。他方、Er:YAG レーザーは、その作用機序から機械的除去に比較して歯質に歪を与えずに根管充填材を除去できる可能性が考えられる。そこで、本研究ではEr:YAGレーザーを用い、歯冠側の根管充填材の除去について検討することを目的とした。

**【材料および方法】** 試料としてヒト抜去単根歯 15 本を使用し、歯根長 10 mm となるよう歯冠を切断、#35K ファイルを MAF として通法通りに根管のステップバック形成を行った。形成終了後、根管洗浄および乾燥を行い、通法通り側方加圧にて根管充填(ガッタパーチャポイント, Zipperer)を行った。近遠心方向および頬舌方向における歪変化を測定するために 2 枚のストレインゲージ(KFG02-120-C1-16, 共和電業)を根上部の近心側および頬側歯根表面に固定、ブリッジボックス(5370, NEC-三栄), ストレインアンプ(AS 1603, NEC-三栄)を介して、モバイルレコーダ(NR1000, キーエンス)に接続した。さらに、温度変化を測定するために熱電対(GB5911, 岡崎)を歯根象牙質表面に設置し、上記のレコーダに接続した。その後、試料を無作為に以下の 3 群(n=5)に分けた: ①注水(3.0 ml/min)下で Er:YAG レーザー(Erwin AdvErL, R300T, モリタ製作所, 140 mJ 10 pps)を照射した群(Er:YAG レーザー照射群), ②超音波(Piezon Master400, 松風, 非注水)にて除去を行った群(超音波群), ③NiTi ファイル(Orifice Shaper #4, Maillefer, 非注水)にて除去を行った群(NiTi群)とし、それぞれ器具が 5 mm 到達するまでに生じた最大の歪、温度変化の計測を行った。

**【結果】** Er:YAG レーザー照射群は、超音波群および NiTi 群に比較して有意に小さな歪を示した ( $p < 0.05$ , 図)。また、Er:YAG レーザー照射群および NiTi 群は、超音波群に比較して有意差に小さな温度変化を示した ( $p < 0.05$ )。



図：根管充填材除去時の象牙質の歪

**【考察および結論】** 象牙質に亀裂を引き起こす歪の大きさは、およそ 800  $\mu$ strain との報告がある。亀裂を引き起こすか否かは、歯質の形状、性質、構造により異なると推測されるが、歪を最小限にさせることは亀裂の発生を少なくすることにつながると考えられる。歪の発生原因としては、熱および応力が考えられる。超音波による除去は、熱を利用して根管充填材を溶解させるため、歯根象牙質の熱膨張が起こると考えられる。また NiTi ファイルによる除去は、そのテーパの大きさにより楔効果が発生し、また回転切削による応力が働くと考えられる。他方注水下における Er:YAG レーザー照射については熱的影響が少なく、応力もほとんど起こらずに根管充填材の蒸散が起こると推察され、象牙質に大きな歪を与えずに根管充填材の除去が可能であることが示唆された。

## 根管洗浄の新しい評価方法

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野

○小林千尋, 吉岡隆知, 須田英明

### A new evaluation method for root canal irrigation

Pulp Biology and Endodontics, Dept. of Restorative Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

○Chihiro Kobayashi, Takatomo Yoshioka, Hideaki Suda

#### 【研究目的】

模型を透過する光量を測定することによって、簡易に根管洗浄の効果判定ができる新しい装置を考案し、この装置を用いて洗浄効果に及ぼす様々な要因の影響を明らかにする。

#### 【材料および方法】

半透明 10  $\mu$ L ピペットチップ (104, QSP) を根管模型として用いた。この模型 (チップ) の根尖孔の直径は 0.4 mm, 根尖から 20 mm までの taper は 0.06 である。黒色不透明フィルムケース (Kodak 35 mm film) の底部に光センサーを設置し、ケースの蓋にこのチップを貫通させ仮固定できるようにした。高出力青色 LED (3.3V で定電圧駆動) でチップの口より照射し、チップを透過した光を光センサーで検出した。光センサーの出力は、照度に比例する電位に変換し、直流電圧計で直読できるようにした。本装置における測定値の再現性は、空のチップあるいは水を入れたチップで確認した。つぎに、チップの根尖をエポキシ樹脂で封鎖し、水酸化カルシウム (Calcipex, 日本歯科薬品) をチップの根尖から 10 mm 歯冠側まで満たし、作業模型とした。洗浄後の照度から術前の照度を減算し、その値を洗浄効果とした。洗浄には、27G プラント洗浄針 (27G と略, 以下同様, ニプロ), 31G プラント洗浄針 (31G, ウルトラデント), 27G クリーンウォッシングニードル (CW, デンツプライ三金), 27G クレンジングニードル (CL, みくに工業) の 4 種を用いた。34kPa の圧力で洗浄針から水を出したとき、あるいは、クリーンウォッシングニードル用シリンジ (ニプロ) に洗浄針を装着し手指で水を出したとき、の 2 種の洗浄方法で比較した。全てのグループで 5 チップずつ実験を行った。

#### 【結果】

本装置により簡便に洗浄効果の評価ができた。34kPa の圧力のときには、27G, CW, CL のほうが有意に (危険率 5%) 31G より洗浄効果が優れていた。手指の時には、31G ほうが有意に CW, CL より洗浄効果が優れていた。

#### 【考察】

過去の *in vitro* の根管洗浄の実験においては、根尖孔を閉じて実験することはほとんどなかった。本実験のように根尖孔を閉じた模型を用いないと、根管洗浄の正しい評価はできないと思われる。根管が見えないようにして同様の実験を行うと、かなりの量の水酸化カルシウムが根管内に残存していた。このことから、臨床での根管洗浄において、根管を完全に洗浄するというのは非常に困難であることが予想された。

LED の光照射には指向性があるため、チップの部位により照射される光の強さに差がでる可能性がある。また、センサーがチップのどの部位からの透過光を主に検出しているかについても不明である。これらの点は今後検討する必要がある。

また、本実験で使用した模型を用いると根管内を見ながら洗浄できるので、初心者には洗浄方法を教育するのに有効と思われた。

#### 【結論】

模型を透過する光量を測定する本装置によって、根管洗浄の効果判定が簡便にできた。