

超高圧電子顕微鏡を用いた修復材料と象牙質の接着界面微細構造観察

大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部 *大阪大学超高圧電子顕微鏡センター
○三浦治郎、長島 正、竹重文雄、森博太郎*

Observations of Interfacia between human dentin and composite resin by Ultra-high Voltage Electron Microscope

○Jiro Miura, Tadashi Nagashima, Fumio Takeshige, *Hirotarō Mori
Osaka University Dental Hospital Division for Interdisciplinary Dentistry
*Osaka University Research Center for Ultra High Voltage Electron Microscopy

【目的】透過型電子顕微鏡試料の試料作製方法はミクロトームといった刃物による超薄切片加工が主流であった。しかし、象牙質といった石灰化硬組織に対しては、薄切は困難であり、出来たとしても切断時刃物の抵抗により界面の損傷が起こっていることが考えられる。今回提案する手法では、ガリウムイオンビームを用いて切削することにより切削時の振動や刃物による傷の影響を極力少なくした状態での試料作成が可能となった。さらにこの手法では、サブミクロンスケールの構造を観察しながら切削でき、ターゲットを絞った試料作成が可能となった。界面観察には、加速電圧3000kVの性能を持つ超高圧電子顕微鏡を用いることにより、従来の透過型電子顕微鏡では観察できなかった2 μ m以上の厚さを有する試料の観察を行うことが可能となった。一連の方法により、これまで超薄切の脱灰試料でしか観察し得なかった歯質とコンポジットレジンの接着界面を観察することが可能となった。

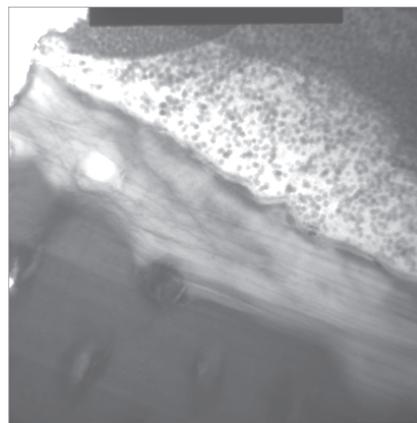
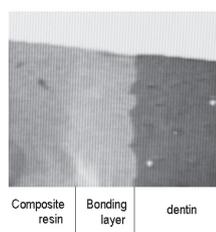
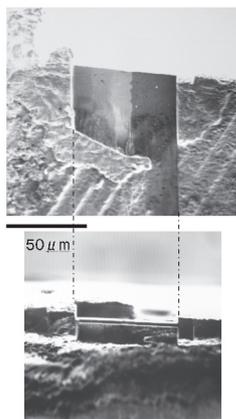
【方法】セルフエッチングプライマーボンディングシステムとしてクリアフィルメガボンド(クラレメディカル)を用いメーカーの指示通りに処理後、EsteliteLV(トクヤマデンタル)を充填した。ダイヤモンドカッターにて厚さ50 μ mほどに薄切した試料を、2.5%のparaformaldehyde、2%glutaraldehydeおよび2%四酸化オスミウムを用いて2重固定を行った。

観察試料作成は、集束イオンビーム(FIB:FB2000A,HITACHI)を用いて、厚さ2 μ mの象牙質-コンポジットレジン界面を含む切片の作成した後に、酢酸ウランとクエン酸鉛により電子染色を行った。試料は、超高圧電子顕微鏡H-3000(HITACHI)を用いて加速電圧2081kVにて観察を行った。

【観察結果】図1から修復材料と象牙質の界面が選択的に切り出されている状態が確認できた。また、図2の超高圧電子顕微鏡の観察結果から、当手法を用いることによりこれまでは困難であった比較的厚みのある試料でも透過観察にて界面の状態を観察できるということが分かった。

【考察】以上の結果は、本手法が非脱灰状態での硬組織および内部に存在するコラーゲン繊維のナノオーダーでの三次元観察を行うことが可能であり、電子線の透過度の低く、また薄切が困難な硬組織における界面観察においては、特に有効な手法であるということが示された。

本研究の一部は平成20年度文部科学省科学研究補助金若手研究(B)20791384の補助のもとに行われた。



(上: レジン 中: ボンディング層 下: 象牙質)

図1: FIBによる界面薄切加工

図2: 界面の透過観察(超高圧電顕像 ×3000)

象牙質形成における Dentin sialoprotein と Dentin phosphoprotein の機能解析

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研究室
鈴木 茂樹、西村 英紀

Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization
Department of Dental Science for Health Promotion, Division of Cervico-Gnathostomatology, Hiroshima
University Graduate School of Biomedical Sciences
Shigeki SUZUKI, Fusanori NISHIMURA

【研究目的】DSPP (Dentin Sialophosphoprotein) は象牙質に最も多く存在する非コラーゲンタンパクである。ヒト *DSPP* 遺伝子変異が象牙前質の拡大を伴う象牙質形成不全症 (Dentinogenesis Imperfecta, DGI) を呈すること (Xiao et al. 2001 Nat. Genet. 27, 201-204)、*Dspp* ノックアウトマウスが同様の症状を呈すること (Sreenath et al. 2003 J. Biol. Chem. 278, 24874-24880) から、DSPP は象牙質形成に必須の役割を果たすことが明らかにされている。興味深いことに、*DSPP* は 1 遺伝子でありながら、その翻訳産物は常に DSP (Dentin Sialoprotein) と DPP (Dentin phosphoprotein) の 2 つに開裂されて象牙質に沈着する。in vitro 研究から、DPP はハイドロキシアパタイトの形成、成熟に寄与することが報告されている (He et al. 2005 J. Biol. Chem. 280, 33109-33114, Milan et al. 2006 Eur. J. Oral Sci. 114, 223-231) もの、DSP の役割に関しては不明な点が多い。そこで本研究では DSP と DPP の in vivo における個別の役割を解析することを目的とした。【材料及び方法】DSPP プロモーター下で DSP を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、そのマウスと DSPP ノックアウトマウスとを掛け合わせることで、DSP のみをレスキューした、つまり DPP のみを欠損したマウス (DSPP^{g+}/DSPP^{-/-}) を作製することに成功した (DPPcKO マウスと表記する)。次に、DPPcKO マウスの臼歯における表現型を、DSPP^{+/-} マウス (DSP 及び DPP を発現、Wild Type と同等の表現型を示す) をポジティブコントロールに、DSPP ノックアウトマウス (DSP、DPP ともに発現せず) をネガティブコントロールとして H&E 染色、X-ray、マイクロ CT 等を用いて解析した。【結果】DSPP ノックアウトマウスの臼歯では、象牙前質と象牙質の境界である石灰化前線が不規則であり、また象牙質内に石灰化不全領域を認められた。一方、DPPcKO マウスでは、DSPP ノックアウトマウスとは異なり、DSPP^{+/-} マウス同様に石灰化前線は歯髄腔に沿ってスムーズに存在し、象牙質内に石灰化不全領域を認めなかった。マイクロ CT を用いて象牙質量 (象牙質の体積量) 及び象牙質密度 (象牙質単位体積あたりのハイドロキシアパタイトの量) の測定を行った結果、DSPP ノックアウトマウスでは象牙質量及び象牙質密度は DSPP^{+/-}マウスと比較して共に有意に低下した。一方、DPPcKO マウスでは象牙質量はほぼ DSPP^{+/-}マウスと同レベルに戻ったものの、象牙質密度は DSPP ノックアウトマウスと同様に低いままであった。【考察及び結論】DSP のみをレスキューすると象牙質量は大きく回復するものの、象牙質密度は変わらないことから、DSP は象牙質形成 (前象牙質から象牙質への変換) に積極的に寄与し、DPP は主に象牙質形成後の象牙質成熟に寄与することが示唆された。「会員外研究協力者」Dr. Ashok Kulkarni (NIH/NIDCR USA)

ブタ永久歯エナメル質中の有機質について

鶴見大学歯学部第一歯科保存学教室¹⁾，鶴見大学歯学部生化学教室²⁾
中村 ルミ¹⁾，山本 竜司²⁾，深江 允²⁾，桃井 保子¹⁾

Organic component in enamel of porcine permanent teeth

Department of Operative Dentistry¹⁾

Department of Biochemistry²⁾, Tsurumi University School of Dental Medicine

NAKAMURA Rumi¹⁾, YAMAMOTO Ryuji²⁾, FUKAE Makoto²⁾, MOMOI Yasuko¹⁾

【研究目的】

最近，歯の色調を改善する目的で行われる歯の漂白の一般臨床への普及がめざましい。しかし，エナメル質が変色したり，漂白されたりするメカニズムは，未だに十分に解明されてはいない。エナメル質の色調変化には，無機質ではなく，有機質(すなわちタンパク質)が関与していることが容易に推測されるが，成熟ヒトエナメル質中には，有機質が非常に少なく，実験設定の難しさゆえ，研究が少なく，知見にも乏しいのが現状である。そこで，本研究では，まず，ブタ永久歯を用い，エナメル質中のタンパク質を生化学的に分析することから始めることとした。

【材料および方法】

①不溶性構造物の抽出：ブタ永久歯歯冠部のみを調整し，エナメル質表面の汚れを除去後，0.5M 酢酸溶液で静置脱灰した。エナメル質が脱灰され，象牙質表面に残存する不溶性の構造物は，エナメル叢であると考えられた(図)。その構造物を象牙質の混入のないように実体顕微鏡下で，ピンセットを用いて採取した。採取した構造物は，脱灰後にも関わらず，多量のミネラルが残存していたので，酢酸溶液を加えてさらに脱灰し，可溶性画分と不溶性画分に別けて，凍結乾燥し，試料とした。

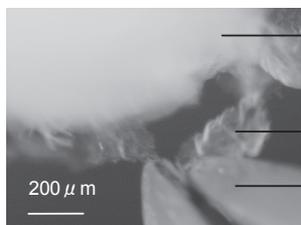
②生化学的解析：不溶性画分の凍結乾燥物 100 μg の試料に 15 μL の SDS 電気泳動用試料溶液を加え，100 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加熱して，可溶化した。SDS 電気泳動後のゲルに銀染色をし，タンパクバンドを切り出し，質量分析を行った。

③抗体による検出：可溶性と不溶性画分の凍結乾燥物に，SDS 電気泳動用試料溶液を加えて，免疫反応のための試料を調製した。アモログニン，エナメルリン，アルブミンの検出のために，試料 10 μg に 15 μL の割合で試料溶液を加え，100 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間加熱して，可溶化した。また，シースプロテインの検出のためには，0.1 μg に 15 μL の割合で調製した。可溶化した画分は，アモログニン，エナメルリン，シースプロテイン，アルブミンの抗体を使い，Western blotting を行った。

【結果および考察】

電気泳動後の銀染色像から，エナメル質の酢酸脱灰後のエナメル叢には，多数のタンパクバンドが認められた。質量分析や Western blotting の結果から，その中には，少量であるが，エナメルタンパクであるアモログニン，エナメルリン，シースプロテインが，また多量に，血液成分であるアルブミンが存在していた。さらに，質量分析の結果からは，血液成分である α -2-HS-グリコプロテインやヘモグロビンの分解産物が，多数のバンドに含まれていることが確認されたので，これらが調製時の血液の混入によるのではなく，エナメル叢中に固有に含まれているものと考えられた。

本研究の結果から，エナメル質の変色や漂白においては，エナメル質中に存在する上記のタンパク質が関与している可能性が示唆された。



象牙質

有機質 (エナメル叢)

ピンセット

図：エナメル質を脱灰した後に，象牙質表面に残った有機質をピンセットで採取しているところ

リン酸化オリゴ糖カルシウム (POs-Ca) および緑茶抽出フッ素配合ガム咀嚼後の エナメル質初期う蝕の再石灰化効果および微細構造変化

¹東京医科歯科大学大学院摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野 ²東京医科歯科大学歯学部附属歯科技工士学校 ³江崎グリコ株式会社健康科学研究所 ⁴財団法人高輝度光科学研究センター ⁵東京医科歯科大学

GCOE プログラム歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点

○田中 美由紀¹、北迫 勇一¹、半場 秀典¹、二階堂 徹¹、池田 正臣²、
田中 智子³、滝井 寛³、釜阪 寛³、八木 直人⁴、田上 順次^{1,5}

Effect of chewing gum containing Phosphoryl Oligosaccharides of Calcium (POs-Ca) and fluoride obtained from green tea on remineralization and hydroxyapatite crystallites of enamel subsurface lesions *in situ*

¹Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ²

Dentistry School for Dental Technology, Tokyo Medical and Dental University, ³Ezaki Glico Co., LTD., Health Science Laboratory, ⁴Japan Synchrotron Radiation Research Institute, ⁵Global COE Program; International Research Center for

Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University

○Miyuki Tanaka¹、Yuichi Kitasako¹、Hidenori Hamba¹、Toru Nikaido¹、Masaomi Ikeda²、
Tomoko Tanaka³、Hiroshi Takii³、Hiroshi Kamasaka³、Naoto Yagi⁴、Junji Tagami^{1,5}

【研究目的】

デンタルガム (江崎グリコ株式会社) に配合されているリン酸化オリゴ糖カルシウム (Phosphoryl Oligosaccharides of Calcium ; POs-Ca) は、再石灰化を促進する素材として知られているが、ヒト口腔内環境下における POs-Ca の再石灰化効果についての報告は少ない。また、低ポリフェノール・フッ素高含有お茶抽出物由来のフッ素と POs-Ca の双方がイオン化状態で共存でき、POs-Ca の再石灰化を阻害せず耐酸性効果を付与する条件を *in vitro* で見出した。そこで本実験では、ヒト口腔内環境下におけるエナメル質初期う蝕に対する POs-Ca および茶フッ素配合ガムの再石灰化効果および結晶構造変化を明らかにするために、Transversal Microradiography (以下 TMR) 法を用いてミネラル回復量を定量的に評価するとともに、広角エックス線回折を用いて再石灰化部位の結晶構造変化を観察した。

【材料と方法】

被験者 36 名を 3 群に分け、エナメル質初期う蝕サンプルを取り付けた口腔内装置を装着した状態で、コントロールガム (I 群)、1 粒あたり POs-Ca 2.5% を配合したガム (II 群)、POs-Ca 2.5% と茶フッ素 1.2% を配合したガム (III 群) のいずれかを二重盲検下にて 1 回 2 粒 1 日 3 回 14 日間摂取させた。ミネラル量の変化については TMR 法を、ハイドロキシアパタイト結晶構造変化については、高輝度エックス線マイクロビームを用いた広角エックス線回折にて解析した。広角エックス線回折では、エナメル質表層から深層へ 6 μ m のビームを 5 μ m ステップで連続撮影することで、再石灰化部位における結晶の配向性を知ることができ、ハイドロキシアパタイトと同じ部位に散乱光が検出されることで配向性が一致していると推察できる。なお、TMR データは t 検定を用いて危険率 5% にて検定をおこなった。

【結果および考察】

TMR 解析結果を図 1 に、再石灰化部位における代表的な広角エックス線撮影像を図 2 に示す。TMR 分析より、I 群では 16.25 \pm 9.47%、II 群では 21.60 \pm 8.03%、III 群では 23.28 \pm 5.98% のミネラル密度の回復が認められ、全ての群間において有意差が認められた ($p < 0.05$)。これにより、ヒト口腔内環境において POs-Ca 配合ガムを摂取することにより、エナメル質初期う蝕の再石灰化が促進されること、茶フッ素を加えることでより高い再石灰化効果が得られることが明らかになった。また、広角エックス線撮影像より、上記の散乱光検出位置の一致が確認され (図中矢印部)、TMR 法にて観察されたミネラル密度の回復は、ハイドロキシアパタイト結晶量の回復である可能性が示唆された。

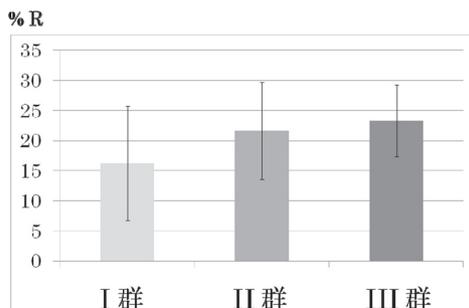


図 1

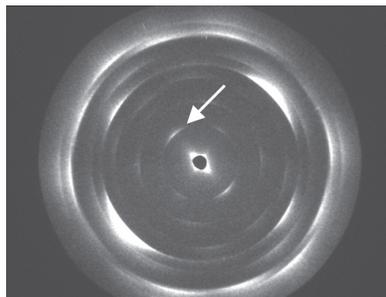


図 2

動的荷重因子がメタルフリー間接修復の接着に及ぼす影響

日本歯科大学 生命歯学部 歯科保存学講座

○山田 正, 原 学, 小川信太郎, 柵木寿男, 奈良陽一郎, 勝海一郎

Effect of dynamic load factor on adhesion of metal-free indirect restoration

Department of Endodontics and Operative Dentistry,
School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

○Yamada T, Hara M, Ogawa S, Maseki T, Nara Y, Katsuumi I

【研究目的】 歯冠修復を行う際の低侵襲性処置や審美的対応は、今日の患者にとって至極当然のニーズとして術者に求められている。またその対象は、歯冠部の狭小な歯面のみならず広範な歯面に、前歯部に止まらず臼歯部にも及んでいる。特に隣接面を含み咬頭被覆を要するような修復に際しては、接着を活用したメタルフリー間接修復が患者のニーズを充たし、かつ信頼性に長けた選択肢となっている。また、社会・行政・経済的観点からも歯冠部修復のメタルフリー化は時勢の求めとなりつつある。そこで本研究では、ハイブリッドセラミックスを用いたメタルフリー間接修復に焦点を絞り、口腔内環境想定動的荷重が当該修復の接着に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、荷重方向に直交または平行な位置をとる2窩壁の象牙質面に対する微小引張り接着強さ(μ -TBS)を測定し、評価検討した。

【材料および方法】 被験歯には、0.1%チモール水溶液中に保存したヒト抜去健全下顎第一大臼歯 20本を用いた。まず、被験歯の近心頬・舌側咬頭頂と遠心頬側咬頭頂とによって決定される平面が植立用規格化円筒モールド底面と平行になるよう被験歯を植立した。ついで、透明レジンによる咬合面形態再現用コアの作製を経て、規格窩洞形成器と基準窩洞模型の併用により、Fig. 1に示す規格化 MODB アンレー窩洞を全被験歯に形成した。その後、Clearfil Tri-S Bond (Kuraray Medical) と Clearfil Protect Liner (同社)による象牙質レジンコーティング、印象採得、作業模型作製後、Estenia C&B (同社) と咬合面形態再現用コアを用いてハイブリッドセラミックスアンレーを作製した。アンレーの合着操作は、窩洞内の象牙質レジンコーティング部に対しては Clearfil Ceramic Primer (同社) を、エナメル質切削面には ED Primer II (同社) を用いて、一方、アンレー体内面に対してはサンドブラスト、酸処理後に Clearfil Ceramic Primer 処理を行い、Clearfil Esthetic Cement (同社) を用いて合着させた。その後、修復試料は動的荷重の負荷群(+)と非負荷群(-)とに区分し、+群に対しては複合機能試験機を用いて 37°C水中における 16 kgf × 30 万回 (90 回/分) の繰り返し動的荷重を負荷した。ついで、全試料は歯軸(植立軸)と平行かつ舌側壁窩縁に直交する面によって縦切断し、中心窩直下の髓側壁象牙質被着面(P)を含む厚さ 1.0mm の板状試片を切り出し、その後、歯軸および舌側壁窩縁に平行な面によって縦切断し、中心窩直下相当部の近心軸側壁象牙質被着面(A)を含む厚さ 1.0mm の板状試片を切り出した。その後、規格化試料形態調整器を用いて、最狭窄部の幅: 1.0mm、厚さ: 1.0 mm、平行部長さ: 1.0 mm の規格化ダンベル状試料に調整後、 μ -TBS 値 (n=10) を測定した。得られた測定値は、二元配置分散分析および多重比較による分析を行った。

【成績ならびに考察】 Fig. 2 に得られた結果を示す。統計学的分析の結果、動的荷重の負荷は μ -TBS 値を有意 ($p < 0.01$) に減弱させ、さらに動的荷重が μ -TBS 値に及ぼす影響は窩壁の違いによって異なる ($p < 0.05$) ことが明らかとなった。また、動的荷重(-)条件下における P と A の μ -TBS 値は同等であるものの、(+)条件下においては P の μ -TBS 値が A より有意に小さいことが判明した。なお、接着強さ測定後の破断面様相は、動的荷重の有無・窩壁の違いにかかわらず、アンレー体とセメント間の界面破壊およびセメント内の凝集破壊による混合破壊が主体であった。したがって、口腔内の咀嚼を想定した繰り返し動的荷重の負荷は、そのエネルギーが直交的に伝達される髓側壁(P)接合界面部の接着劣化には意義ある因子として作用しているものの、ずれ(剪断)応力として働く軸側壁(A)においては、歯肉側壁と髓側壁負担によるエネルギー吸収によって、接着劣化因子として強く作用しないことが推察できる。また、接着劣化の起点としては、修復物/セメント接合界面部とセメント自体が考えられることから、修復物内面処理の改良、セメントの接着性向上およびセメントの強度増強などが、動的荷重因子に対する耐久性の改善に有効と思われる。

本研究は、平成 21 年度科学研究費補助金・基盤研究(C)課題番号 19592214 の支援を受けて実施された。

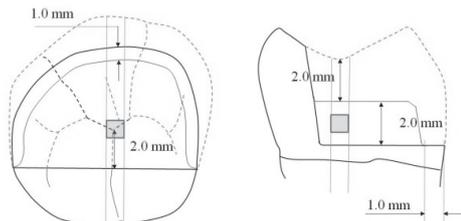


Fig. 1 Dimension of standardized onlay cavity and μ -TBS measuring area

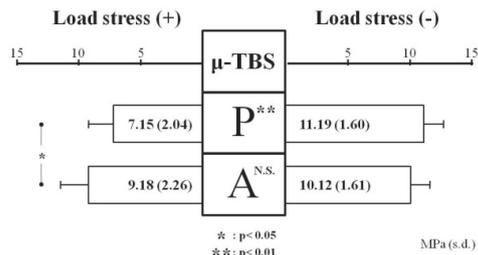


Fig. 2 Mean μ -TBS to pulpal and axial dentin wall with/without dynamic load stress

オフィスホワイトニング後の時間経過がエナメル質に対する 各種接着システムの接着強さに及ぼす影響

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体機能再生・再建学講座 歯科保存修復学分野
○穴吹優佳、神農泰生、岸本麻実、中田 貴、田中久美子、西谷佳浩、吉山昌宏

Effect of time interval on bond strengths of selected adhesive systems to enamel after office whitening

Department of Operative Dentistry, Field of Study of Biofunctional Recovery and Reconstruction,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

○Yuka ANABUKI, Yasuo SHINNO, Mami KISHIMOTO, Takashi NAKATA,
Kumiko TANAKA, Yoshihiro NISHITANI, Masahiro YOSHIYAMA

【緒言】

近年、審美歯科に対するニーズの高まりに伴い、歯の漂白が注目されている。日本では1998年に35%過酸化水素水を主成分とするSHOFU Hi-Lite(松風)の使用が厚生労働省より認可され、漂白処置が急速に臨床に組み込まれた。しかしホワイトニング法に関する問題点の一つに接着修復において漂白処理が接着強さに影響を及ぼすことがあげられている。一方で、2ステップ・1ステップの種々の接着システムが市販され、現在主流となっているが、漂白後のエナメル質に対して接着システムの違いが接着強さに影響を与えるかどうかは明らかにされていない。第128回日本歯科保存学会で我々は、接着システムの種類によって漂白処理が接着強さに与える影響が、処理直後では異なることを報告した。そこで今回は、接着システムの違いが、漂白処理後2週間水中保管した未研削エナメル質への接着強さに対して、どのように影響を与えるか検討を行った。

【材料および方法】

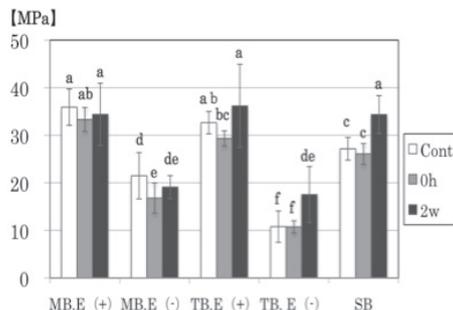
抜歯後凍結保存していたヒト上下顎健全前歯の唇側面(未研削)を使用し、漂白処理にはSHOFU Hi-Lite(松風: Hi-Lite)を用いた。各接着処置には、オールインワンボンディングシステム(1ステップ)のCLEARFIL S³ BOND(クラレメディカル:TB)、セルフエッチングシステム(2ステップ)のCLEARFIL MEGA BOND(クラレメディカル:MB)、ウェットボンディングシステム(2ステップ)のSingle Bond(3M ESPE:SB)の3種類のボンディングシステムを用いた。TBおよびMBは前処置としてK-etchant(クラレメディカル)を用いたエッチング処理群(E(+))と未処理群(E(-))の各2群にわけ計5群とした。TB,MBにはClearfil AP-X(クラレメディカル)、SBには,Supreme DL(3M ESPE)を填塞した。漂白処理を行わず、そのまま接着処置を行ったものをControl群、Hi-Liteによる漂白処理を行い、漂白処理直後に接着処置を行ったものを0h群、漂白処理後2週間37°Cの水中で保管した後に接着処置を行ったものを2w群とした。Hi-Liteによる漂白処理は、メーカー指示通り一回の操作につき3回漂白を行い、この操作を一週間ごと計3回行った。この間、全ての試料は37°Cの水中で保管した。接着処置はメーカー指示通り通法に従い行った。接着処置を行った試料は37°C水中で24時間保管し、その後Isometを用いて1mm×1mmの短冊状にし、微小引張り接着強さ(MPa)の測定を行った(n=20)。得られた結果は、one-way ANOVA および Tukey's test を用いて有意水準5%で統計分析を行った。

【結果及び考察】

MB, E(+)群ではどの群でも接着強さに有意差は見られず、漂白の有無に関わらず比較的安定した高い値を示した。MB, E(-)群では0h群がControl群に比べて有意に低い値を示し、TB, E(+)群、TB, E(-)群と、SB群では0h群に比べて2w群が有意に高い値を示した。TB, E(-)群、SB群ではControl群に比べ、2w群が有意に高い値を示した。また、すべての群で、2w群はControl群と同等か、それ以上の接着強さを示した。

2w群で良好な接着強さを示したのは、従来の報告にあるように重合阻害を起こすフリーラジカルが漂白後に時間を置くことで減少したことが原因と考えられる。TB, E(-)群と、SB群では、Control群に比べて2w群が有意に高い値を示したのは、前述の事に加え、漂白による歯面の表面粗さの変化や組成の変化などが接着に有利に働いたのではないかと考えられる。

また、漂白処理の有無に関わらず、SB群を含むエッチング処理を行った全ての群では、エッチング処理を行わない群より接着強さは高い値を示した。このことより、未研削エナメル質に接着を行う際には、漂白処理を行った場合もエッチング処理を行う方がより高い接着強さが得られることがわかった。以上より漂白処理後の未研削エナメル質に対する接着処置の際には、漂白後時間をおくことでどの接着システムにおいてもコントロールと同等、またはそれ以上の接着強さが得られることがわかった。以上より、接着システムの違いは、漂白処理後2週間水中保管した未研削エナメル質への接着強さに対して影響を与えなかった。



※同一文字間に有意差は認めない

図1. 未研削エナメル質に対する微小引張り接着強さ

ゼロステップコンポジットレジン接着システムの可能性について

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯冠修復学

○小竹宏朋、福田隆光、望月久子、大橋静江、堀田正人

Possibility of Zero-Step Resin Composite Adhesive System

Division of Oral Functional Science and Rehabilitation, Department of Operative Dentistry, Asahi University School of Dentistry

KOTAKE Hiroto, FUKUDA Takateru, MOCHIZUKI Hisako, OHASHI Shizue, HOTTA Masato

【緒言】

近年、歯科用接着材料の進歩は目覚しく、従来のエッチング、プライミング、ボンディングのスリーステップボンディングシステムから省ステップ化が図られ、セルフエッチングシステムや、ウエットボンディングシステムなどのツーステップボンディングシステム、さらに1液性のワンステップボンディングシステムなど、接着手順をより簡便な方法に移行するものが開発され、市販されている。Technique sensitive 材料であるという宿命から、さらに省ステップ化することが望まれる。

前回大会は、ゼロステップボンディングシステムの可能性について発表したが、今回はコンポジットレジン自体に接着性を付与するにあたり、市販の4種類のワンステップボンディングシステムを使用して、4種類の試作レジンを作製し検討した。

【材料および方法】

供試材料：今回使用した試作レジンではガラスフィラー（50wt%）と市販のワンステップボンディングシステムのビューティボンド（松風）、イージーボンド（スリーエム）、トライエスボンド（クラレメディカル）、ボンドフォース（トクヤマデンタル）を用いた。各ボンディング材にエアを吹き付け、ボンディング材中の溶媒を乾燥したのち、ガラスフィラーと混和したものを試料とした（表）。

実験方法：ヒト抜去歯の象牙質を用い、#600の耐水研磨紙で研磨した。平坦化した象牙質上に内径3.0mm、外径5.0mm、深さ4.0mmのテフロンモールドを固定し、各試作レジンを填入し照射を行い重合させた。作製した試料片は、37°C蒸留水中に24時間保管後、引張り接着試験用アダプターに固定し、万能試験機（EZ Graph、SHIMADZU）により、クロスヘッドスピード0.25mm/minの条件で引張り、破断時の値を単位面積当りに換算し、引張り接着強さ（MPa）を測定した。測定は各試作レジンについて10回行った。

【結果および考察】

試作レジン1の平均引張り接着強さは3.55MPa、試作レジン2は2.18MPa、試作レジン3は1.84MPa、試作レジン4は5.26MPaであった（図）。同一試料でのばらつきは、試料作製過程で溶媒をエアで乾燥・分離するだけでは完全に除去することはできないためではないかと考えた。また、試料間で差が生じたのは、成分、特に各種機能性モノマーと溶媒（アセトン、エタノール、精製水など）が関与していると考えられた。溶媒は重合性だけでなく、象牙質の改質、すなわちスミア層の除去にも大きく関与していると思われる。今後はワンステップボンディング材の成分について検討し、ゼロステップコンポジットレジン接着システムの可能性について、さらに発展させたいと考えている。

【結論】

混合させたボンディング材の種類によってコンポジットレジン自体の象牙質に対する引張り接着強さに差が認められた。

表 試作レジン

	試作レジン1	試作レジン2	試作レジン3	試作レジン4
ボンディング材 (50wt%)	ビューティボンド アセトン、精製水、Bis-GMA、カルボン酸系モノマー、TEGDMA、ホスホン酸系モノマー、その他	イージーボンド リン酸エステル系モノマー、メタクリレート、重合開始剤、その他、（エタノール、水）	トライエスボンド フィラー、モノマー（Bis-GMA、MDP、HEMA）、エタノール、光重合触媒、精製水、その他	ボンドフォース リン酸モノマー、Bis-GMA、TEGDMA、HEMA、アルコール（イソプロパノール）、精製水、カンファキノン、その他
フィラー (50wt%)	ガラスフィラー			

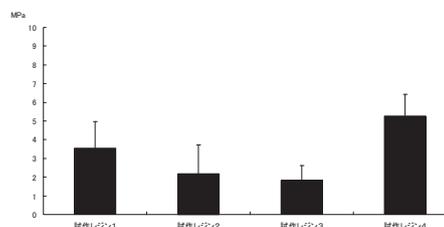


図 引張試験結果 (n=10)

新規支台築造用レジンコアシステム ECQ と歯質との接合界面の SEM 観察

虎の門病院歯科
○杉崎順平、森上 誠、宇野 滋、山田敏元

SEM observation on the resin / radicular dentin interface of a newly designed resin core system
Toranomon Hospital, Department of Dentistry
○SUGIZAKI Jumpei, MORIGAMI Makoto, UNO Shigeru, YAMADA Toshimoto

【研究目的】

無髄歯における垂直性の歯根破折は、その芳しくない予後経過から抜歯に至るケースが多い。そのため、特に歯根象牙質壁が脆弱な場合の支台築造には、メタルコアよりもより歯質に近似した弾性係数をもつコンポジットレジンをを用いた支台築造が選択されることが増えてきている。このたび(株)トクヤマデンタルからオートミックスタイプのデュアルキュアレジンコアペーストと 1 ステップタイプのデュアルキュアボンディングシステムから構成される支台築造システムが市販された。今回われわれはこのシステムによる支台築造を行った際のレジンと歯質との接合界面、またファイバーポストとの界面の様相について SEM 観察を行ったので報告する。

【材料と方法】

材料： 1. ボンディングシステムはデュアルキュア型の 2 液 1 ステップタイプのシステムで、2 液を混和し歯面に塗布後 10 秒間以上の放置、弱圧～中・強圧エアで乾燥後 10 秒間の光照射を行うというものである。
2. コア用コンポジットレジンペースト (ECQ) はトクヤマディスペンサーに装着し直接根管へ注入する。
トクヤマ FR ポストを用いる場合には、予め長さを調整したポストの表面にトクソーセラミックスプライマーを用いて処理を行っておき、根管内挿入後光照射によって仮固定を行っておく。

方法： 単根のヒト抜去歯を歯頸部付近で切断し、抜髄操作後 FR ポスト用ドリルを用いて根管形成を行い、上記手順に従って FR ポストを用いてコアの築盛を行い接着試片とした。24 時間後試片は根管中央付近を通るように歯軸方向に縦断されエポキシ樹脂に包埋された。樹脂硬化後研磨された試片は通法に従いアルゴンイオンエッチングを施した後、レジンと根管内象牙質との界面、ならびにレジンとファイバーポストとの界面を中心に FE-SEM を用いて観察を行った。

【結果および考察】

FR ポストはレジン成分の中に直径約 $10\mu\text{m}$ のガラスファイバーが縦方向に密に配置されている像が観察された。また、コア用レジン ECQ は $2\text{--}5\mu\text{m}$ 程度の不定形なフィラーと、その間に $0.1\mu\text{m}$ 程度の非常に細かな球状フィラーが高密度に充填されているのが観察された。観察部位によってボンディング材の厚さにばらつきがあったものの、象牙質との界面は非常に良好で緊密な接合状態を示していた。しかしながら、その界面にはハイブリッド層は明瞭には観察されなかった。コア用レジンとファイバーポストとの接合状態も良好で界面にギャップは観察されなかった。

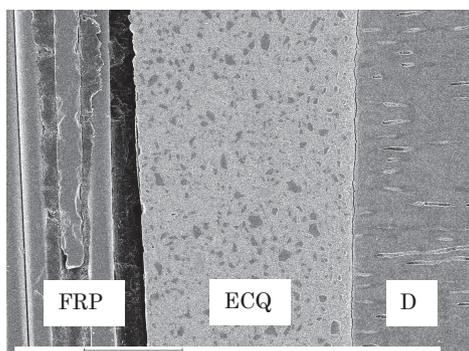


図 レジン(ECQ)と根管内象牙質(D)、ファイバーポスト(FRP)との接合界面 (x500)

【結 論】

今回トクヤマデンタルから市販された支台築造用コンポジットレジン、独自の球状フィラーを生かしたその良好な操作性により容易に築盛が可能であり、しかも新規接着性モノマーを採用することによって歯質やファイバーポストとの接着性も十分に満足できるものであることが判明した。今後、他社製品と比較した接着耐久性などについても検討していく予定である。

各種被着面に対する接着システムの引張接着強さ

大阪歯科大学 歯科保存学講座

初岡昌憲, 西田尚敬, 坂中幸誠, 村田文子, 野津繁生, 宮地秀彦, 山本一世

Tensile bond strength of bonding system to various adherends

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University.

○HATSUOKA Yoshinori, NISIDA Hisataka, SAKANAKA Kosei,

MURATA Ayako, NODU Shigeo, MIYAJI Hidehiko, YAMAMOTO Kazuyo.

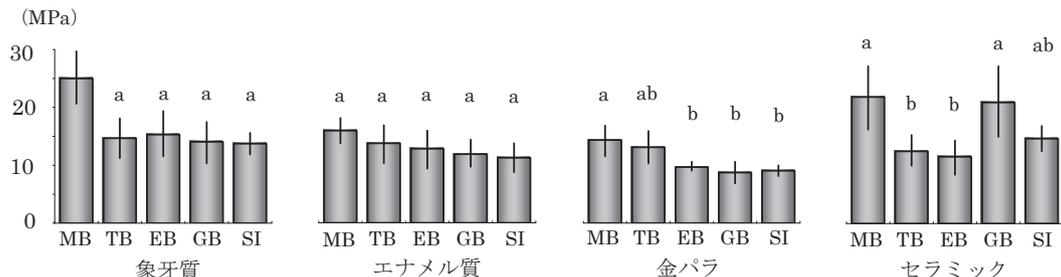
【緒言】

近年、コンポジットレジン修復において歯面処理が簡略された接着システムが広く使用されている。一方、臨床では補修修復のように、金属やセラミックスに対する接着処理を行った後、コンポジットレジン修復を行う症例が存在する。本研究では、1 ボトル・1 ステップ接着システムのエナメル質、象牙質、12%金銀パラジウム合金およびセラミックスに対する引張接着強さについて検討した。

【実験材料および方法】

コンポジットレジンには Clearfil AP-X (Kuraray Medical, Shade A3) を使用した。接着システムは Clearfil S³ BOND (以後 TB, Kuraray Medical), AdperTM Easy Bond Self-Etch Adhesive (以後 EB, 3M ESPE), G BOND PLUS (以後 GB, GC), 試作 SI-R20605 (以後 SI, 松風) を使用した。また、比較対照として 2 ステップシステムの Clearfil Mega Bond (以後 MB, Kuraray Medical) を使用した。抜去歯に #600 の耐水研磨紙を用いてエナメル質および象牙質平坦面を作製し、エナメル質および象牙質被着体とした。12%金銀パラジウム合金 (以後金パラ, GC) およびセラミックス (VITABLOCS[®] Mark II, VITA) に #600 の耐水研磨紙を用いて研磨した後、サンドブラスト処理 (金パラ: 0.5MPa, セラミックス: 0.3MPa) を行い金パラ被着面およびセラミックス被着面とした。被着面積は直径 3mm に規定し、それぞれの接着システムの製造者指示に従い各被着面に対し接着操作を行った。接着後 24 時間 37°C 水中保管した後、引張試験機 (IM-20, INTESCO) を用いて CHS 0.3mm/min にて接着強さを測定した。各条件につき 8 試料とした。なお統計処理は、一元配置分散分析および Scheffé の検定を行った。

【結果】



グラフ内の同一のアルファベットは有意差がない (p<0.05)

【考察および結論】

1 ボトル・1 ステップ接着システムの象牙質に対する引張接着強さは、MB と比較すると低かったが、エナメル質において有意差は認められなかった。金パラおよびセラミックにおいて各システム間に有意差が認められるも、良好な接着強さが得られた。今回使用した 1 ボトル・1 ステップ接着システムは、簡便さだけでなく、臨床において広く応用できる可能性が示唆された。

金属面やセラミック面に対しコンポジットレジンにて補修修復を行う場合、通常は修復物のプライマー処理が行われるが、そのプライマー処理が歯面への汚染となる可能性があり、歯面に対する接着強さに悪影響を及ぼすことも考えられる。

今後、金属およびセラミックプライマーの歯面に対する影響やサーマルサイクリング負荷の影響について検討を行う予定である。

高出力 LED 照射器がレジンの象牙質への接着に及ぼす影響

1) 東京医科歯科大学大学院 う蝕制御学分野 2) GCOE プログラム歯と骨の分子疾患科学の国際研究拠点
○野村 知正¹⁾、池田 一郎¹⁾、大槻 昌幸¹⁾、田上 順次^{1,2)}

Effect of high-intensity LED curing unit on bond strength of composite resin to dentin

1) Tokyo Medical and Dental University, Cariology and Operative Dentistry
2) GCOE Program, "International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases"
Tomomasa NOMURA¹⁾, Ichiro IKEDA¹⁾, Masayuki OTSUKI¹⁾, Junji TAGAMI^{1,2)}

【研究目的】近年、青色 LED を光源とする高出力の照射器が開発され、従来よりも照射時間の短縮が可能であるとされているものの、その際の接着強さについては明らかではない。本研究では、高出力 LED 照射器の照射時間がレジンの象牙質に対する接着に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】ヒト抜去大白歯の咬合面を研削して象牙質平坦面を調製し、#600 耐水研磨紙で仕上げ、被験面とした。被験面に内径 8mm の黒色プラスチックリングを静置し、2 種の歯質接着材（クリアフィル メガボンド、クリアフィル トライエスボンド、いずれもクラレメディカル製）で処理し、光重合レジン（クリアフィル AP-X、クラレメディカル製）をリング内に填入し、硬化させた。光照射には、青色 LED を光源とする高出力照射器（MiniLED、Satelec 製、1900mW/cm²）を用い、接着材およびレジンへの照射時間は、3 秒-5 秒、5 秒-5 秒、3 秒-10 秒、5 秒-10 秒のいずれかとした。また、ハロゲン照射器（コービー、ジーシー製、770mW/cm²）10 秒-40 秒および LED 照射器（G-ライト、ジーシー製、650mW/cm²）5 秒-10 秒、10 秒-40 秒の試料も作製した。37°C の水中に 24 時間保管後、試料を接着面と垂直に切断し、断面が約 0.7×0.7mm のビーム状試片を調製し、クロスヘッドスピード 1mm/min で、微小引張り試験を行った。各実験群の試料数は 30 とし、得られた値は、二元および一元配置分散分析および Bonferroni の方法で統計学的検討を行った。

【成績】得られた引張り強さを図に示す。クリアフィル メガボンドにおいては、MiniLED 5 秒-10 秒の接着強さは、コービー 10 秒-40 秒よりも有意に低かったが、G-ライト 10 秒-40 秒と差は認められなかった。また、MiniLED の各実験群の引張り強さに有意差は認められなかった。クリアフィル トライエスボンドにおいては、コービー 10 秒-40 秒、G-ライト 10 秒-40 秒、MiniLED 5 秒-10 秒の間に有意差は認められなかった。MiniLED においては、05 秒-10 秒と 3 秒-10 秒の間に差は認められなかったが、05 秒-10 秒と 3 秒-5 秒、5 秒-5 秒の間に有意差が認められた。

【考察】クリアフィル メガボンドにおいては、LED 照射器ではハロゲン照射器に比べてやや低い接着強さであった。また、MiniLED においては、照射時間の短縮が接着強さに影響を及ぼさなかった。クリアフィル トライエスボンドにおいては、照射時間が十分であれば LED 照射器とハロゲン照射器で接着強さに差はなかったが、MiniLED では、照射時間が減少すると接着強さが低下した。このように接着材料間で傾向が異なったのは、光開始剤など接着材の構成成分の差による可能性が考えられる。したがって、高出力照射器を用いた際の照射時間の短縮の可否については、接着材料ごとに評価を行った上で判断する必要がある。また、高出力で短時間の照射はレジンの窩壁適合性などへの影響も考えられ、これについても検討が必要である。

【結論】高出力 LED 照射器を用いて、照射時間の短縮がレジンの象牙質に対する接着強さに及ぼす影響について検討したところ、接着材によって異なる傾向を示した。

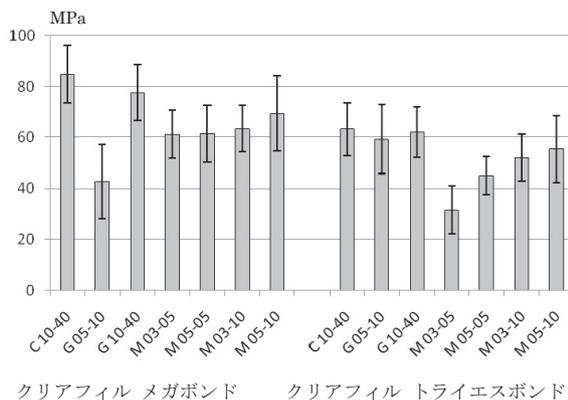


図 各種照射条件による接着強さ (N=30)

C : コービー、G : G-ライト、M : MiniLED

数字は、接着材とレジンへの照射時間 (秒)

残存歯質厚径測定への OCT の応用

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門², (株)モリタ東京製作所³
○黒川弘康^{1,2}, 渡邊孝行¹, 田村ゆきえ¹, 陸田明智^{1,2},
安藤 進^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 釜口昌平³, 三畑幸則³

Application of Optical Coherence Tomography for Monitoring Residual Tooth Thickness
Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry, J. MORITA TOKYO MFG. CORP.³
○KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, WATANABE Takayuki¹, TAMURA Yukie¹, RIKUTA Akitomo^{1,2},
ANDO Susumu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, KAMAGUCHI Syohei³, MIHATA Yukinori³

【緒言】

光干渉断層画像化法 (Optical Coherence Tomography, 以後, OCT) は, 他の医療用画像技術と比較してチェアサイドで簡便かつ非侵襲的に高解像度の組織精密断層像を得ることを特徴としている。これまで演者らは, OCT の断層像に及ぼす影響因子を検討し, 歯科臨床への応用が可能であることを報告してきた。

今回, OCT の効果的な臨床使用術式を確立するための基礎的研究の一環として, 歯面形成あるいは齶蝕除去を想定して歯質を削除した場合の残存歯質厚径の測定に, OCT の応用が有効か検討した。

【材料および方法】

残存歯質厚径の測定には, 健全ヒト抜去前歯, 大白歯および咬合面齶蝕を有するヒト抜去大白歯を用いた。これら測定用試片は, 実験期間を通じて 37°C の精製水中に保管し, 実験に供試する際に水中から取り出して使用した。また, 供試したヒト抜去歯は異なる時期に採取されたものであり, 個人の特定が不可能なものである。なお本研究は, 日本大学歯学部倫理委員会の審査を経て承認を得ている (倫許 2008-17)。

断層像の観察は, 試作 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用いた。本装置は, 光源の低コヒーレンス性を応用したものであり, Super Luminescent Diode (SLD) 光源からの光を光分割器により 2 束に分割し, 1 束を参照鏡に, 他方を対象物に入射し, それぞれから反射してきた光を干渉させ, 測定対象物の表層から深層にわたる反射光分布を測定することで断層像を得るものである。

測定対象としては,

1. 健全ヒト抜去前歯唇側歯質を SiC ペーパーの #180 あるいは #2,000 を用いて 3 条件の異なる深さまで研削し, 残存したエナメル質
2. 健全ヒト抜去前歯唇側歯質を SiC ペーパーの #180 あるいは #2,000 を用いて 3 条件の異なる深さまで研削し, 残存した象牙質
3. 健全ヒト抜去大白歯咬合面歯質をマイクロモーターおよびダイヤモンドポイント (FG401, 松風) を用いて 3 条件の異なる深さまで研削し, 残存した窩底部歯質
4. 咬合面齶蝕を有するヒト抜去大白歯に対して, 齶蝕検知液 (クラレメメディカル) を指標として, マイクロモーターおよびダイヤモンドポイント (FG440, 松風) を用いて齶蝕除去を行い, 残存した窩底部象牙質の 4 条件とした。

OCT を用いてこれらの断層像を観察することで残存歯質厚径を測定するとともに, レーザー顕微鏡 (VK-9710, キーエンス) を用いて歯質の縦断面を撮影し, 得られた両測定値を比較, 検討した。

【成績および考察】

試作 OCT 装置を用いて残存歯質厚径の測定を行ったところ, SiC ペーパーを用いて研削した平坦面では, 残存歯質厚径の測定が可能であるものの, 研削深さおよび測定対象によって異なった傾向を示した。また, 表面性状の違いが測定値に及ぼす影響は少なかった。一方, 咬合面窩洞における窩底部残存歯質厚径の測定は, 深さによって異なるものの, 平坦面と比較して困難となる傾向を示した。このように, 形成面の形状が残存歯質厚径の測定に影響を及ぼした原因としては, プローブ先端からの測定対象までの距離が変化し, 測定深度に影響を及ぼしたためと考えられた。

【結論】

OCT を用いた残存歯質厚径の測定は, 形成した歯面の形状に影響を受けることが判明した。したがって, この影響を減少させるために, 測定部位によってプローブ形状を変更するなどの改良が必要であることが示唆された。

OCTを用いた隣接面う蝕モデルの非侵襲断層画像診査

東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野
歯と骨のGCOE

○有吉芽生 島田康史 Sadr Alireza 田上順次

Non-invasive cross-sectional imaging of the interproximal cavity at contact region using OCT

Cariology and Operative Dentistry, Graduate school, Tokyo Medical and Dental University
GCOE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases

○Meu ARIYOSHI, Yasushi SHIMADA, Sadr ALIREZA, Junji TAGAMI

【緒言】OCT (Optical Coherence Tomography) は生体に無害な近赤外線光を用いた光干渉断層画像法である。1991年の報告以来、電離放射線による被曝を伴わないため、非侵襲的な診断技術として医学領域の臨床現場に普及しつつあるが、歯科・口腔領域での臨床応用は極めて少なく、この分野においても、OCTの可能性の検証が求められている。近年、う蝕の中でも、特に隣接面に生じたう蝕は視診や触診のみでの発見は困難であり、画像診断に頼るところが大きい。OCTは、隣接面う蝕の観察においても有用であることが期待できるが、観察範囲に限界があることから隣接する歯のコンタクト直下まで画像を構築する事が可能かという点については疑問が残る。そこで、本研究では、隣接面う蝕を想定したモデルを作製し、OCTによる断層画像診査を試みた。

【材料及び方法】水中保管したヒト抜去大臼歯を2歯1組にし、隣接面う蝕を想定したモデルを作成した。2歯を接触させ、咬合紙にて隣接面にコンタクトが存在することを確認後、その状態を再現できるように即時重合レジンを用いてモールドを作成した。片方の歯の隣接面コンタクト直下にダイヤモンドラウンドバーを用いて窩洞を形成し、OCT (Santec OCT-2000®, Santec) で咬合面方向から観察を行った。窩洞の大きさ、および位置を変えることで、画像がどのように変化するかについて検討した上で、実際に隣接面う蝕が存在する歯についても、観察を行った。

【結果】隣接面のコンタクト直下における窩洞はOCTにより観察されることが分かった (Fig. 1)。OCT画像は、深さ方向の情報に伴い、散乱した光の輝度変換によって画像が構築される。撮影時には下記のようなグラフがリアルタイムで画像と同時に表示されるが、これは深さによる光強度の変化を示しており、これによって窩洞の有無を確認することが出来た。Fig. 2の窩洞無しの隣接面における波長に比較すると、窩洞を形成した場合のFig. 3では、窩洞辺縁に一致する3mmの深さの位置において、光強度の波長の上昇が認められた。また、実際の隣接面う蝕を観察した場合にも、う蝕を画像上で確認できるだけでなく、このような波長の変化も認められることが分かった。

【考察】本実験から、OCTを用いることでコンタクト直下に存在する隣接面窩洞を検出できることが分かった。それに伴い、臨床における隣接面う蝕もOCTにより検出できる可能性が示唆された。

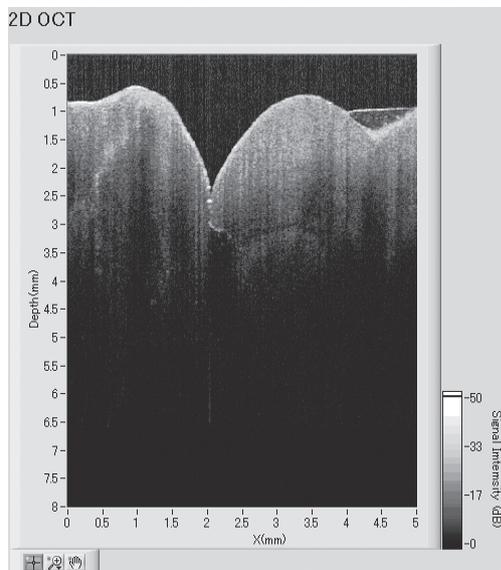


Fig. 1: 窩洞形成後のOCT画像

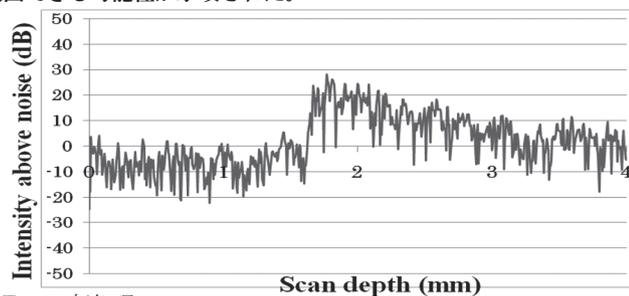


Fig. 2: 無処理

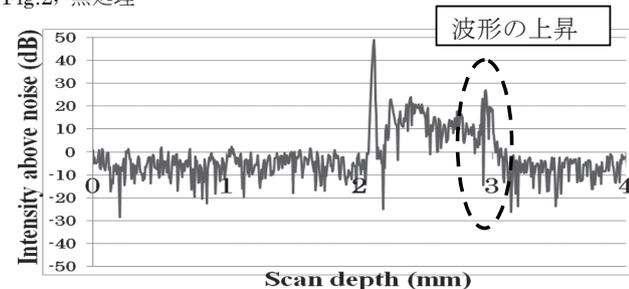


Fig. 3: 隣接面窩洞形成後

口腔内における歯質の湿潤状態が OCT 断層像に及ぼす影響

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹、総合歯学研究所生体工学研究部門²、
(株)モリタ東京製作所³、かなまる歯科クリニック⁴
○島村 穰¹、村山良介¹、黒川弘康^{1,2}、高見澤俊樹^{1,2}、
安藤 進^{1,2}、宮崎真至^{1,2}、釜口昌平³、三畑幸則³、金丸寿良⁴

Effect of Tooth Surface Moisture on In Vivo Imaging by Means of Optical Coherence Tomography.

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry, J. MORITA TOKYO MFG. CORP.³, Kanamaru Dental Clinic⁴
○SHIMAMURA Yutaka¹, MURAYAMA Ryosuke¹, KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2},
ANDO Susumu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, KAMAGUCHI Syohei³, MIHATA Yukinori³, KANAMARU Toshiro⁴

【緒言】

光干渉断層画像化法 (Optical Coherence Tomography, 以後, OCT) は, 非侵襲的に組織の精密断層像を得るとともに, 他の医療用画像技術と比較しても高解像度を有していることから, 歯科臨床への応用が期待されている。これまで演者らは, 歯質の湿潤状態が OCT の断層像に及ぼす影響について抜去歯を用いて検討し, 第 130 回日本歯科保存学会春季学術大会において, 歯質表面の水分の有無および乾燥状態が断層像に影響を及ぼすことを発表した。

今回, OCT の効果的な臨床使用術式を確立するための基礎的研究の一環として, 口腔内で OCT を使用し, 歯質の湿潤状態が断層像に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

OCT の測定は, 日本大学歯学部附属歯科病院保存修復科に通院中で, 本臨床研究の趣旨を理解して協力を得られた患者 10 名の, 健全な下顎前歯, 下顎第一小臼歯および下顎第一大臼歯を対象とした。なお, 本臨床研究を実施するにあたっては, 日本大学歯学部倫理委員会の審査を経て承認を得ている (倫 2008-17 号)。

断層像の観察は, 試作 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用いた。本装置は, 光源の低コヒーレンス性を応用したものであり, Super Luminescent Diode (SLD) 光源からの光を光分割器により 2 束に分割し, 1 束を参照鏡に, 他方を対象物に入射し, それぞれから反射してきた光を干渉させ, 測定対象物の表層から深層にわたる反射光分布を測定することで断層像を得るものである。

観察条件としては,

1. 歯質表面に唾液が残留
2. 歯質表面を十分に水洗
3. 歯質表面を水洗後, 乾燥
4. 歯質表面をポリッシング後, 水洗, 乾燥
5. 歯質表面を水洗後, 乾燥後, 対象歯をラバーダム防湿

の 5 条件とした。

【成績および考察】

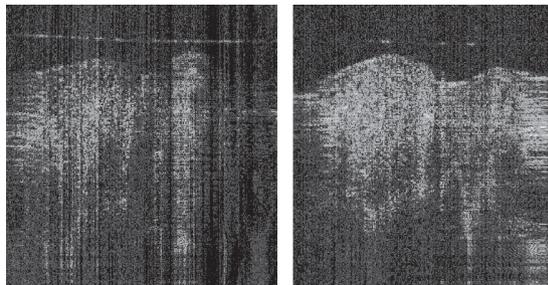
試作 OCT 装置を用いて口腔内で歯牙の観察を行ったところ, 平滑面ではいずれの条件においても, 断層構造がほぼ同様な像として観察可能であった。一方, 小窩裂溝部では歯質の湿潤状態により断層像に変化が認められた。すなわち, 測定時に歯質表面に唾液が残留する条件では, 断層構造の観察が困難となった。このように, 小窩裂溝部で, 唾液の残留が断層像に及ぼす影響が大きかった原因としては, OCT から照射された近赤外線が, 歯質表面の裂溝部に貯留した唾液によって散乱したためと考えられた。また, この傾向は, 水分と比較しても唾液において顕著であった。

【結論】

口腔内で OCT を用いて歯牙の観察を行った場合, 歯面の形状および口腔内環境により歯質の断層像に変化が認められ, 小窩裂溝部で歯質表面の湿潤状態の影響を受けやすく, とくに水分と比較して唾液による影響が大きかった。したがって, OCT を用いて口腔内で歯質を観察する場合, 唾液の排除が必要であることが示唆された。

唾液残留

ラバーダム防湿



DIAGNOdent pen™ の隣接面う蝕検出能に関する *in vitro* 研究

愛知学院大学歯学部保存修復学講座

○青山 剛大、中野 健二郎、成橋 昌剛、佐藤 かおり、富士谷 盛興、千田 彰

Proximal Lesion Detectability of DIAGNOdent pen™ *in vitro*

Aichi Gakuin University, School of Dentistry, Department of Operative Dentistry

○ Godai AOYAMA, Kenjiro NAKANO, Masayoshi NARUHASHI, Kaori SATOH,
Morioki FUJITANI, Akira SENDA

【研究目的】

う蝕の検査に用いられる DIAGNOdent™ (Kavo) は、レーザー蛍光法を応用したう蝕診断装置で、簡易かつ非破壊的であることなどの特長をもつ。さらに、う蝕の進行、経過を計ることも可能である。しかし、これまでの製品に付属しているチップでは、小窩裂溝や平滑面のう蝕の検出には優れるものの、隣接面う蝕の検出は困難であった。最近、ハンディタイプの DIAGNOdent pen™ が開発され、これには従来の裂溝う蝕用プローブの他に隣接面う蝕用プローブが装備されている。

本研究は、DIAGNOdent pen™ (以下、ペン型) の隣接面う蝕用プローブ (以下、隣接面プローブ) の検査、診断能を検索すべく、DIAGNOdent™ (以下、従来型) の小窩裂溝う蝕用プローブ (Aプローブ) と比較検討することとし、臨床を想定して隣接面う蝕を有する歯を植立した顎模型を用いて、ペン型の隣接面プローブの有用性について検討した。

【研究材料および方法】

本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認 (承認番号: 168) を得て遂行された。う蝕を有するヒト抜去永久歯をロビンソンブラシにて清掃し、超音波洗浄 5 分間を 3 回行った後、生理食塩水中に 24 時間保管したものを試料として供した。

実験1: う窩に直接プローブを当てた場合におけるペン型隣接面プローブと従来型Aプローブの性能の比較とそれらの整合性

C₁あるいはC₂(島田らの分類)^{*}の隣接面う蝕を有する小臼歯各 10 本を試料として使用した。これらをモデリングコンパウンドに一本ずつ植立して固定し、また、プローブはう窩の同一箇所直接当たるよう固定して測定した。隣接面プローブとAプローブを用いて、同一う蝕部位を 3 回ずつ測定し、その平均値を各々の代表値とした。両プローブの性能と整合性を検索するため、これらの測定値よりピアソンの相関係数を求め相関性を検討した。

実験2: 植立歯の隣接面う蝕におけるペン型隣接面プローブと従来型Aプローブの性能の比較と隣接面プローブの臨床有用性

試料は実験1と同じものを用いた。メラミン歯列中にこれらを植立した顎模型 (AC-29, NISSIN) を固定し、隣接面う蝕を検出すべくペン型およびA型プローブを口腔内を想定した状態で当てて測定した。このとき、毎回同一箇所が測定されるようプローブも固定した。測定は 3 回ずつ行い、その平均値を各々の代表値とした。両プローブの性能と整合性を検索するため、これらの測定値よりピアソンの相関係数を求め相関性を検討した。さらに、隣接面プローブの隣接面う蝕検出能を検索するため、う窩に直接プローブを当てた場合の測定値 (実験1) と、その歯を植立し隣接面部よりプローブを当てた場合の測定値 (実験2) の差を求め、それらを比較検討した (*t*-test)。

^{*}く島田らの分類 > C₁: 表面的なう窩で、探針によりう窩の存在、または歯質の崩壊が認められるもの。明瞭な sticky fissure を含む。C₂: う蝕象牙質の存在が確実なもの。小窩裂溝部では探針先端が象牙質に達したと思われるまで刺入されたものを含む。

【結果および考察】

実験1において、ペン型と従来型のプローブによる測定値間には、高い相関関係を認めた (C₁: $r=0.915$, C₂: $r=0.885$, $p<0.05$)。したがって、両者の間には整合性が確認され、ペン型プローブは従来型プローブと同様のう蝕検出能をもつことが判明した。

実験2では、ペン型と従来型のプローブによる測定値間には、相関関係は認められなかった (C₁: $r=0.276$, C₂: $r=-0.090$, $p>0.05$)。したがって、ペン型プローブの隣接面う蝕検出能は従来型プローブのそれとは異なることが判明した。そこで、プローブをう窩に直接当てた場合の測定値と、その歯を植立して隣接面部からプローブを当てた場合の測定値との差を比較検討したところ、ペン型プローブの方が高い検出能を有することが判明した ($p<0.05$)。

【結論】

DIAGNOdent pen™ の隣接面用プローブは、DIAGNOdent™ の小窩裂溝用プローブと同様にう蝕の検査、診断に用いることが可能で、さらに、隣接面う蝕の検出能は従来型より格段に優れており、臨床における有用性が示唆された。

レーザーう蝕診断器 DIAGNOdent による慢性う蝕病巣の評価

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)

○岩見 行晃, 山本 洋子, 恵比須 繁之

Evaluation of chronic carious lesions using a laser fluorescence device, DIAGNOdent

Department of Restorative Dentistry and Endodontology,
Osaka University Graduate School of Dentistry

○IWAMI Yukiteru, YAMAMOTO Hiroko and EBISU Shigeyuki

【目的】

口腔内でう蝕病巣の診断を行う機器として市販されているレーザーう蝕診断器 (DIAGNOdent, KaVo, 以下DIAGNOdent) は, う蝕病巣内から発せられる蛍光の強度でう蝕病巣の状態を評価する機器である. 演者らは, 先に急性う蝕の象牙質病巣において DIAGNOdent による評価結果と病巣内の細菌感染の間には密接な関係があり, DIAGNOdent によって, 急性う蝕の象牙質病巣における細菌感染の状態が客観的な数値で把握できることを報告した¹⁾. 一方, 慢性う蝕病巣についても, Minimal Intervention の概念に沿った処置方針の決定と具体的な処置を行うにあたって, 病巣内の感染状態を客観的に把握することは重要である. そこで, 本研究では, 慢性う蝕の象牙質病巣における細菌感染と DIAGNOdent による評価結果の関係を調べ, 慢性象牙質う蝕病巣に対する DIAGNOdent を用いた評価の可能性を検討した.

【材料および方法】

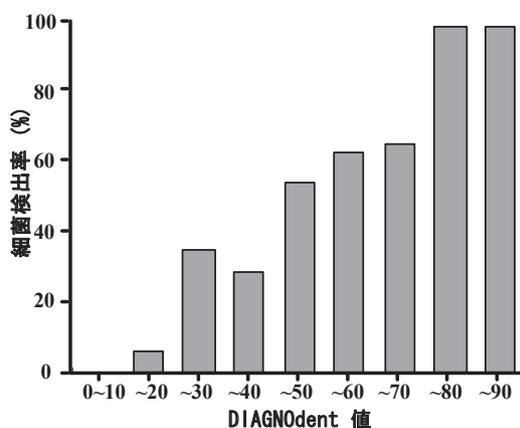
黒色または茶褐色でう蝕検知液 (Caries Detector, クラレメディカル) による染色が認められないう蝕病巣を持つヒト抜去大白歯 10 歯について, エナメル質う蝕部分を削除後, 規格窩洞過形成器 (伊藤エンジニアリング) とラウンドバーにて, 歯髄方向に 150 μ m ほどのう蝕病巣の削除を, う蝕による象牙質の着色が認められなくなるまで繰り返した. この際, 歯質削除ごとに, DIAGNOdent によって削除面の歯質を評価し, 細菌 16S rDNA の保存された領域の塩基配列をもとに設計したユニバーサルプライマーを用いた PCR にてラウンドバーに付着した象牙質削片中の細菌 DNA を検出した. そして, う蝕象牙質面の DIAGNOdent 値とその直下の象牙質削片中の細菌検出率 (%) の関係を調べた.

【結果】

慢性う蝕病巣においては, う蝕象牙質面の DIAGNOdent 値が増加すると, その直下の象牙質削片中の細菌検出率も増加する傾向が認められ, DIAGNOdent 値が 10 以下の場合, 細菌検出率は 0% になった. また, 細菌検出率に対する DIAGNOdent 値の受信者動作特性曲線において, 曲線下の面積は 0.87 となった.

【考察および結論】

慢性う蝕病巣において, う蝕象牙質の DIAGNOdent 値と細菌検出率の間には密接な関係が認められた. したがって, 慢性う蝕において DIAGNOdent は象牙質病巣の細菌感染に対する客観的な指標となり得る可能性が示された.



【文献】

1) Iwami Y *et al.* Relationship between bacterial Infection and evaluation using a laser fluorescence device, DIAGNOdent: Eur J Oral Sci 112, 419-423, 2004.

グレーおよびホワイト MTA における砒素含有量の原子吸光分析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野¹⁾

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座²⁾

○松永常典、川島 正、辻本恭久、林 善彦

Concentration of Arsenic in Gray and White MTA using Atomic Absorption Spectrometry

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences¹⁾

Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo²⁾

○MATSUNAGA Tsunenori, KAWASHIMA Tadashi, TSUJIMOTO Yasuhisa and HAYASHI Yoshihiko

【緒言】

MTA (Mineral Trioxide Aggregate) は優れた硬組織形成誘導能および生体親和性を有することから、穿孔部の修復、アペキシフィケーション、覆髄、根管充填剤などを目的として諸外国で用いられている。グレーMTA は、歯や歯肉の変色を生じる危険性があるため、ホワイト MTA が同じ目的で歯内療法に導入された。日本ではホワイト MTA であるプロルート MTA® (デンツプライ三金株式会社) が覆髄を適応症として、厚生労働省に 2006 年 10 月 30 日に認可(管理医療機器 歯科用覆髄材料 38770000, 医療機器承認番号: 21800BZY10238000)された。

MTA の構成元素は主に Ca, Si, Bi および O であり、グレー MTA は少量の Fe を含む。しかし、MTA に微量の重金属が含まれている可能性があり、As の存在に関しても危惧されている。As は、有機・無機の両方の形態をとる半金属で、化合物(特に 3 価のもの)は強い毒性を持っている。ISO 規格で、歯科用セメントにおける As の基準値は 2mg/kg (2ppm) 以下とされている。今回、原子吸光分析法を用いて、グレーおよびホワイト MTA における 3 価の As の定量分析を行い、比較検討した。

【材料および方法】

ISO9917-1 規格に準拠して行った。標準混水比で練和したグレーおよびホワイト MTA を 37°C で 24 時間保管後、メノウ乳棒・乳鉢を用いて微粒子に粉碎した。この粉末 2g と 7%塩酸 50mL とを混和し(今回は 3/10 の量で実施)、攪拌後 16 時間静置した。遠心分離(日立 SCT5B 型: 1000rpm, 10 分間)を行い、その上清を採取しサンプルとした。

また、37°C のリン酸緩衝液(pH7.4) 100μl 中に、練和直後および練和後 30 分の MTA (1×1×1mm) 試料を浸漬し(今回は 1mL に試料 10 個を浸漬)、24 時間後に遠心分離(1000rpm, 10 分間)を行い、上清を採取した。

As の定量化には、原子吸光分光光度計(SAS-7500: セイコウインスツルメンツ社)を使用した。0, 5, 10, 20 および 40ppb で構成された標準曲線によって、As 濃度を決定した。

【結果とまとめ】

ISO 規格に準拠した測定では、As 濃度はグレーMTA およびホワイト MTA のいずれも歯科用セメントの基準値を大きく下回っていた。また、実際の覆髄処置を想定して行った、リン酸緩衝液を用いた測定においても、As 濃度は基準値を下回っていた。

単体 As およびほとんどの As 化合物は人体に非常に有害であり、国際癌研究機関(IRAC)より発癌性があると警告されている。国内における As の水質および環境基準値は 10ppb 以下であるが、今回の実験でプロルート MTA® から放出された As 濃度はその値をも下回っており、歯内療法での使用において、安全性に問題はないと考えられる。

クオラムセンシング関連物質と抗菌剤の併用が *Porphyromonas gingivalis* の
バイオフィーム形成に及ぼす影響

¹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)

²大塚化学株式会社 探索研究所

○朝日陽子¹, 野村由一郎¹, 五十嵐 潤², 前菌葉月¹, 山本れいこ¹, 恵比須繁之¹

Effects of Antimicrobial Agents on *Porphyromonas gingivalis* Biofilm under Chemical Substance
Associated with Quorum Sensing

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

²Discovery Research Lab. Otsuka Chemical Co.Ltd.

○ASAHI Yoko¹, NOIRI Yuichiro¹, IGARASHI Jun², MAEZONO Hazuki¹, YAMAMOTO Reiko¹, EBISU Shigeyuki¹

【研究目的】

抗菌療法に抵抗する細菌バイオフィームの抑制法として、歯科臨床では機械的除去が第一選択として行われている。一方、難治性根尖性歯周炎には、根尖孔外バイオフィームが関与し、*Porphyromonas gingivalis*をはじめとするグラム陰性菌が高頻度で検出されることが明らかとなっている。このように除去が困難な部位に形成されたバイオフィームに対しては、有効な化学的コントロール法の開発が必要である。細菌にはクオラムセンシング(QS)と呼ばれる自己誘導因子 (AI) を介した細胞間コミュニケーションが存在し、毒素の産生やバイオフィーム形成等に関与している。緑膿菌では、AI 類似化合物の一部が QS を攪乱しバイオフィーム形成を抑制し、これら類似化合物存在下でバイオフィームに対する抗菌剤の効果を増強することが報告されている。我々は、AI 類似化合物の一部が、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成に対し、抑制的に働くことを明らかにした¹⁾。今回、AI 類似化合物が *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす影響を経時的に検索した。さらに、これらの化合物と抗菌剤の併用が、*P. gingivalis* のバイオフィームに及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

1. *P. gingivalis* 381 の培養液中に最終濃度が 100 μ M に調整した 3 種の AI 類似化合物 (C₁₀H₂₀N₂O₂、C₁₆H₃₂N₂、C₁₉H₂₉NO₃) を添加し、Modified Robbins device(MRD)中を嫌気条件下で還流することにより、唾液処理したハイドロキシアパタイト(HA)ディスクあるいはセルロイドディスク上にバイオフィームを作製した。バイオフィーム形成開始 1, 3, 5, 7 および 14 日後にバイオフィームサンプルを取り出し、HA ディスク上のサンプルは吸光度測定に、セルロイドディスク上のサンプルは共焦点レーザー顕微鏡観察に供した。化合物を無添加で菌液のみを還流して作製したバイオフィームをコントロール群とした。統計学的有意差の検討には student's t-test を用いた。

2. 100 μ M に調整した AI 類似化合物を添加した液体培地を MRD 中で 14 日間還流し、HA ディスク上にバイオフィームを作製した。その後、培地にセフロキシム (1 μ g/ml) を添加しさらに 3 日間還流した。HA ディスクを MRD より採取し、ATP 活性を測定することによりバイオフィーム形成量を評価した。化合物および抗菌剤を添加しなかったものをコントロール群、化合物のみ添加したものを化合物添加群、抗菌剤のみを添加したものを抗菌剤添加群、化合物および抗菌剤を添加したものを併用群とした。統計学的有意差の検討には student's t-test を用いた。

【成績】

1. 供試した 3 種の化合物のうち、2 種は化合物添加群においてコントロール群と比較しバイオフィーム形成 7 日以降に有意にバイオフィーム形成量が低下した (p<0.05)。残り 1 種についてはバイオフィーム形成開始 5 日後にコントロール群と比較してバイオフィーム形成量の有意な低下がみられた (p<0.05)。共焦点レーザー顕微鏡観察においては、形成開始 5 日後まではいずれのサンプルにおいてもマイクロコロニーの形成のみがみられた。

2. コントロール群と他の 3 群との間でいずれもバイオフィーム量に有意差を認めた (p<0.05)。抗菌剤添加群および化合物添加群と比較して併用群でいずれもバイオフィーム量が有意に低下した (p<0.05)。

【考察および結論】

1. バイオフィーム形成を阻害した化合物は、*P. gingivalis* の初期付着およびマイクロコロニーの形成には影響を与えず、バイオフィームの成長過程で作用することが示唆された。

2. *P. gingivalis* バイオフィームにおいて、AI 類似化合物と併用することで、セフロキシムがより効果的に作用する可能性が示唆された。

参考文献 1) 朝日陽子ら, 日歯保存学誌 51 (春季特別号), 34, 2008

高度骨再性能を有する新規細胞集団精製法についての報告

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)

○伊藤 祥作, 松下 健太, 恵比須 繁之

A novel purification method for osteoprogenitors

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○ITOH Shousaku, MATSUSHITA Kenta, EBISU Shigeyuki

【研究目的】

未分化間葉系幹細胞は、骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨芽細胞に分化しうる幹細胞として定義されている。そして、歯周組織を構成する骨芽細胞・線維芽細胞・象牙芽細胞は、未分化間葉系幹細胞由来であると考えられている。未分化間葉系幹細胞は骨髓から調製することができるが、マウス骨髓細胞は造血幹細胞を含む血球細胞が多数を占めているという問題点がある。また、マクロファージや樹上細胞なども付着系細胞であることが、同じく付着系細胞である未分化間葉系幹細胞の精製を困難にしていた。今回、われわれは非常に簡便な精製法により未分化間葉系幹細胞の濃縮に成功したので報告する。

【材料と方法】

- 1) マウス骨髓から骨髓細胞を調整し、10%FBS 含有 α MEM 中で培養する。培養 3 日目に PBS にて浮遊細胞を除去する。2 週間培養の後、トリプシン・EDTA 処理により付着細胞を回収する (骨髓ストローマ細胞)。
- 2) 回収した骨髓ストローマ細胞と、血球系細胞のマーカー分子に対する抗体を結合したマグネティックビーズとを反応させる。反応後、細胞をマグネティックカラムに注入し、カラムから流出してきた細胞を回収する。
- 3) マグネティックビーズ法により精製した新規細胞集団について以下の方法にて評価を行った。
 - (1) フローサイトメトリーによる未分化間葉系幹細胞の細胞表面マーカーとして考えられている分子の発現解析
 - (2) 新規細胞集団の骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨芽細胞への分化能についての解析
 - ①骨芽細胞への分化：10%FCS 含有の α MEM と ascorbic acid(50 μ g/ml)、 β -glycerophosphate(10mM)、dexamethasone (10^{-8} M) にて 4 週間培養する。その後、これらの細胞をアルカリフォスファターゼ染色と von Kossa 染色することにより骨芽細胞への分化能について評価する。
 - ②軟骨芽細胞への分化：10%FCS、ascorbic acid(50 μ g/ml)、dexamethasone (10^{-8} M)、rBMP2 (50ng/ml) を添加した DMEM/Ham F-12 培地にて 2 週間培養する。その後、これらの細胞を Anti-Type II collagen 抗体にて免疫染色し、軟骨芽細胞への分化能について評価する。
 - ③脂肪細胞への分化：10%FCS、ascorbic acid(50 μ g/ml)、BRL-49653 (10^{-6} M) を添加した α MEM 培地で 2 週間培養する。その後、これらの細胞を Oil Red O 染色し、脂肪細胞への分化能について評価する。
 - (3) 新規細胞集団に含まれる幹細胞数について Limiting dilution 法にて評価する。
 - (4) in vivo における組織再生能について移植実験により評価する：C57BL6/J から調整した新規細胞集団を ICR nude マウスに移入する。約 8 週後に移植片を摘出し microCT にて硬組織量を計測した。

【結果】

新規細胞集団は、全ての未分化間葉系幹細胞表面マーカーを発現していた。興味深いことに、Sca-1 の発現はほぼ 100% であった。また、この細胞集団は骨芽細胞・軟骨芽細胞・脂肪細胞へ分化可能であった。特に、骨芽細胞前駆体を多く含む細胞集団であることがわかった。In vivo の移植実験から、この細胞集団は硬組織の再性能が非常に高いことが microCT による解析によりわかった。

【結論】

われわれが開発した精製法により見出された新規細胞集団は高度な骨再性能を有することが明らかとなった。

4-META/MMA-TBB レジンに止血材を併用した場合の組織反応

北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室
○高輪 泰弘, 川村 直人, 中塚 愛, 本間 啓史, 菅谷 勉, 川浪 雅光

Tissue Reaction of 4-META/MMA-TBB Resin Using Together with Hemostasis Materials

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine
○TAKANAWA Yasuhiro, KAWAMURA Naoto, NAKATSUKA Megumi, HONMA Keishi, SUGAYA Tsutomu, KAWANAMI Masamitsu

研究目的: 歯内療法において, 根管壁や髄床底の穿孔は頻度の高い偶発事故の一つとされている。穿孔を起こした場合には, 4-META/MMA-TBB レジンを用いて穿孔部の封鎖を行うことで良好な成績が報告されているが, 穿孔が大きいなど止血が困難な場合には封鎖が難しくなる。そこで本研究は, 穿孔部に止血材を用いさらに4-META/MMA-TBB レジンで封鎖する方法を確立する研究の第一段階として, 止血材上で4-META/MMA-TBB レジンを硬化させ, ラット皮下結合組織内に移植して組織反応を病理組織学的に検討した。

材料および方法: 被験材料にはテルダーミス^(R) (オリンパステルモバイオマテリアル)とサージセル^(R)・アブソーバブル・ヘモスタット(Johnson and Johnson, USA)を用いた。実験動物には, Wister 系雄性ラット(10 週齢)40 匹を用いた。血液群では各止血材に血液を充分浸漬させ, 止血材表面から繊維が視認できる程度にエアブローして, 4-META/MMA-TBB レジン(スーパーボンド C&B^(R), サンメディカル)を通法に従って筆積み法にて塗布, 10 分間硬化させ, 止血材とレジンを一塊としてラット背部皮下結合組織に埋入した。乾燥群は血液を浸漬させない各止血材に, 血液群と同様にスーパーボンド C&B^(R)を塗布して硬化させ, 埋入した。観察期間は 7, 21, 42 日とし, 薄切標本を HE 染色して病理組織学的に観察した。残存止血材面積を計測するとともに, スーパーボンド C&B^(R)と止血材の境界部分を 400 倍でランダムに 5 ヲ所撮影し, Scale 0: 炎症性細胞が認められない, 1: 軽度(炎症性細胞の数が 1~100 個以下), 2: 中等度(101~200 個以下), 3: 高度(201~300 個以下), 4: 著明(300 個以上)に振り分けスコア化し, 炎症性細胞浸潤の程度を評価した。統計処理には, S P S S10.0 J^(R) (S P S S)を用い Mann Whitney U 検定を行った。危険率は 0.05 とした。

結果:止血材はすべての群において 3 週までにほとんど吸収され, 6 週には完全に消失し, 炎症性細胞浸潤は全ての群において経時的に減少した。テルダーミス^(R)とサージセル^(R)・アブソーバブル・ヘモスタットを比較すると, すべての観察期間でいずれの群もテルダーミス^(R)の方が有意に炎症は少なかった($p<0.05$)。止血材が完全に吸収された 6 週後のレジン表面に対する炎症性細胞浸潤は, テルダーミス^(R)の血液群がテルダーミス^(R)の乾燥群よりも少なく, 両群間には有意差が認められた($p<0.05$)。

考察: テルダーミス^(R)の血液群が乾燥群に比べ炎症性細胞浸潤が少ない理由として, テルダーミス^(R)に血液を含浸させてスーパーボンド C&B^(R)を塗布した場合は, スーパーボンド C&B^(R)がテルダーミス^(R)のコラーゲン線維内に浸透せず, 血液に接した状態で良好に重合したため, テルダーミス^(R)が吸収した後に炎症がほとんど生じなかったと考えられた。しかし, 血液を含浸させずに乾燥した状態でスーパーボンド C&B^(R)を塗布した場合は, 空気を多く含んだコラーゲン線維間にスーパーボンド C&B^(R)が浸透し, 血液に接した状態で重合した場合よりもやや重合率が低下したため, テルダーミス^(R)が吸収された後のレジン表面で炎症性細胞浸潤が多くなったと思われた。

結論: 止血材と 4-META/MMA-TBB レジンを併用した場合, 止血材の種類や血液の浸潤状態によって止血材吸収後の炎症の程度に差が生じることが明らかとなった。

歯周外科後に生じたセメント質と象牙質の接合に関する研究

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周歯内療法教室
○原橋 宏幸, 小田島 朝臣, 逸見 優, 半田 良平, 中澤 篤史, 本間 啓史, 川浪 雅光

A study of the cemento-dentinal attachment after periodontal surgery

Department of Periodontology and Endodontology, Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine
○HARAHASHI Hiroyuki, ODAZIMA Tomoomi, HENMI Masaru, HANDA Ryouhei,
NAKAZAWA Atsushi, HONMA Keishi and KAWANAMI Masamitsu

【研究目的】

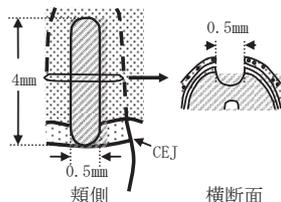
骨シアロ蛋白(BSP: bone sialoprotein)およびオステオポンチン(OPN: osteopontin)は、セメント質の発生と成熟に関与する糖蛋白であることが知られおり、セメント質と象牙質の接合(セメント-象牙境)においてコラーゲン線維の交織と並ぶ重要な接着因子として存在し、免疫学的反応を示すことが明らかになっている¹⁻³⁾。

これまでは歯周外科後に生じたセメント質や骨の再生量のみ焦点をあてた報告が多数であるが、生じたセメント質と象牙質の接合状態の解明は十分ではない。

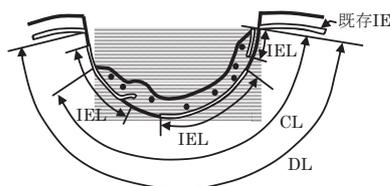
本研究の目的は、異なる歯周外科後に生じたセメント質と象牙質の接合部におけるBSPおよびOPNの発現に関して免疫組織学的に検討することである。

【材料および方法】

実験動物には、ニホンザル2頭(オス, 平均体重8.6kg)を用いた。実験部位は、上顎側側歯根部合計36部位を用い、歯肉弁を全層弁剥離し、図Aのように骨から象牙質におよぶ裂開状欠損(0.5×4mm)を作成した。欠損のみの群をFop群、露出根面を24%EDTAで15秒間エッチングした群をEtc群、エッチング処理後にエムドゲインゲル(エムドゲイン[®]ゲル, 生化学工業, 東京)を塗布した群をEMD群とし、観察期間は3ヶ月とした。欠損に対して横断連続切片を作成し、BSPとOPNによる免疫染色を用い、生じたセメント質と象牙質の接合部に関して、病理組織観察および組織統計分析を行った。分析項目は図Bのように、セメント質再生率および免疫学的発現率とした。



図A 裂開状欠損



図B 計測項目

DL: 欠損距離
CL: セメント質距離
IEL: 免疫学的発現距離

セメント質再生率
= CL/DL × 100 (%)
免疫学的発現率
= IELの総和/DL × 100 (%)

【結果】

病理組織観察により、3群ともに生じたセメント質と象牙質の接合部に、既存のセメント象牙境と同様なBSPとOPNの発現がみられた。また、象牙質に接している結合組織の一部にも同様な所見がみられた。

組織統計分析により、BSPとOPNの発現に相違はみられなかった。セメント質再生率と免疫学的発現率は、3群間で統計学的に有意な差は認められなかった。免疫学的発現率はセメント質再生率よりも、いずれの群内においても統計学的に有意に大きかった。

【まとめ】

歯周外科後に生じたセメント質と象牙質の接合部に、既存のセメント象牙境と同様なBSPとOPNの発現がみられ、発現率は根面のエッチングやエムドゲインゲルの塗布によって影響されない可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Yamamoto T et al.: The structure and function of the cemento-dentinal junction in human teeth; J Periodontol Res, 361-8, 1999
- 2) Yamamoto T et al.: The fibrillar structure of the cemento-dentinal junction in different kinds of human teeth; J Periodontol Res, 317-21, 2001
- 3) 福島千史 山本恒之 他: セメント象牙境の構造と機能に関する組織学的および免疫組織学的研究; 北海道歯学雑誌, 27, 159-170, 2006

脂肪組織由来間葉系幹細胞の分化能および安全性に関する解析

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)¹、
日本大学松戸歯学部 生化学・分子生物学講座²
○岩山智明¹、橋川智子¹、島袋善夫¹、小笹匡雄¹、
柴田恭子²、安孫子宜光²、村上伸也¹

Characterization of adipose-tissue derived stem cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry¹,
Department of Biochemistry, Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo²
○Tomoaki Iwayama¹, Tomoko Hashikawa¹, Yoshio Shimabukuro¹,
Masao Ozasa¹, Yasuko Shibata², Yoshimitsu Abiko², Shinya Murakami¹

【目的】

間葉系幹細胞は、その高い自己複製能と多分化能から再生医療のための細胞ソースとして注目されている。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の間葉系幹細胞 (Adipose-tissue Derived Stem Cells, ADSC) に着目し、ADSC を用いた次世代の歯周組織再生療法の開発を目指している。本研究では、*in vitro*にて ADSC の硬組織形成細胞への分化能および同分化過程における遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、さらに臨床応用を見据え安全性の検討を行った。

【材料および方法】

- 1) 細胞：ADSC は大阪大学医学部附属病院でインフォームドコンセントを得た手術患者を対象に、手術時に廃棄となる脂肪組織より本学医学部未来医療センターにて単離した。
- 2) 表面抗原の解析：フローサイトメトリーを用いて、ADSC の各種表面抗原の解析を行った。
- 3) アルカリフォスファターゼ活性の測定および石灰化ノジュール形成の解析：ADSC を 24well plate に播種後、硬組織誘導培地 (10mM β -グリセロリン酸、50 μ g/ml アスコルビン酸、10%FCS 添加 D-MEM) にて長期培養を行った際の ALPase 活性を経時的に測定し、また、石灰化ノジュールの形成をアリザリン染色を用いて解析した。
- 4) 硬組織形成細胞分化過程における遺伝子発現解析：ADSC を硬組織誘導培地にて長期培養を行った際の遺伝子発現の変化を GeneChip アレイ (affymetrix 社) を用いて網羅的に解析を行った。
- 5) 硬組織誘導関連遺伝子の解析：ADSC を 6well plate に播種後、硬組織誘導培地にて長期培養を行った際の経時的変化を realtime-PCR 法にて解析した。
- 6) 増殖能は増殖曲線により解析し、増殖能が消失するまで継代後、G-band 法・SKY 法にて染色体検査を行った。

【結果】

- 1) ADSC 上には各継代数において CD73、CD44、CD105、CD166、SSEA4 の発現を認め、CD133、STRO-1、CD34、CD45 の発現は認めなかった。
- 2) ADSC は硬組織誘導培地にて培養することにより、ALP 活性が上昇し、石灰化ノジュールの形成が認められた。
- 3) ADSC を硬組織誘導培地にて長期培養を行った際の遺伝子発現の変化を網羅的に検討したところ、対照群と比較して発現に差のある遺伝子群を見出し、硬組織分化特異的遺伝子である *ALP*、*RUNX-2* および歯根膜特異的遺伝子である *PLAP-1/asporin* が対照群と比較して発現上昇していることが確認された。
- 4) ADSC は 8 代目程度まで継代を重ねても高い増殖能を示した。
- 5) ADSC はさらに継代を重ね、増殖しなくなる 14 代目程度まで継代数が進んでも染色体異常は認められなかった。

【考察】

ADSC は高い増殖能と硬組織形成能を有することが確認され、また長期培養後の形質転換もなく安全性が高いことが示唆された。今後、*in vivo*での有用性の評価およびさらなる安全性の検討を通じて、ADSC を用いた歯周組織再生療法の臨床応用が実現するものと期待している。

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、李 千萬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。

梅肉抽出成分 MK615 は *Porphyromonas gingivalis* LPS 刺激による TNF- α 産生を抑制する

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 歯科保存学分野

○森元 陽子、徳田 雅行、作田 哲也、川上 克子、小山 徹、宮下 桂子、藤澤 真理、
江本 真規子、鳥居 光男

MK615, an extract of compounds from *Ume*, attenuates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced TNF-alpha release

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Yoko Morimoto, Masayuki Tokuda, Tetsuya Sakuta, Yoshiko Kawakami, Tohru Oyama, Keiko Miyashita, Mari Fujisawa, Makiko Emoto, Mitsuo Torii

[研究目的]

天然産物は新薬開発の分野において重要な役割を果たしている。実際、現代医療で使用されているいくつかの薬剤は薬効成分のある植物由来である。近年、梅肉抽出エキス MK615 には抗腫瘍作用、血流改善作用、ピロリ菌に対する殺菌作用などがあることが報告されており、また、抗酸化作用による抗炎症効果も注目されている。我々はこれまでに MK615 の抗酸化作用により炎症性サイトカン様物質(High Mobility Group Box-1: HMGB1)の産生が抑制されることを明らかにした。しかし、MK615 の歯周組織における効果は不明である。そこで今回、MK615 の抗炎症作用に着目し、murine macrophage-like RAW264.7 cells (RAW264.7 cells)を用い、MK615 により歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)の LPS 刺激での tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)の産生が抑制されるか検討した。

[材料および方法]

RAW264.7 cells を MK615(0, 0.1, 1, 10 μ l/ml)で2時間前処理した後、*P. gingivalis* LPS(100ng/ml)で6時間刺激した際の TNF- α の産生を ELISA 法にて分析した。MK615 による TNF- α 産生の MAPKs 抑制経路は Western blot 法を用いて解析した。また、MK615 による NF- κ B 活性化の抑制効果を Western blot 法、NF- κ B p65 の核内移行の抑制効果を蛍光免疫染色にて解析した。

[結果]

- ①RAW264.7 cells を *P. gingivalis* LPS(100ng/ml)で刺激した際の TNF- α の産生は MK615 の濃度依存的に抑制された。
- ②MK615(10 μ l/ml)により *P. gingivalis* LPS(100ng/ml)刺激による MAPKs(ERK1/2, p38MAPK, JNK)のリン酸化が有意に抑制された。
- ③MK615(10 μ l/ml)により *P. gingivalis* LPS(100ng/ml)刺激による I κ B の degradation は有意に抑制され、NF- κ B p65 のリン酸化も有意に抑制された。
- ④MK615(10 μ l/ml)で前処理することにより *P. gingivalis* LPS(100ng/ml)刺激による NF- κ B p65 の核内移行は有意に抑制された。

[考察および結論]

今回の結果より MK615 は RAW264.7 cells を歯周病原菌の1つである *P. gingivalis* の LPS で刺激した際の TNF- α 産生を抑制し、それは MAPKs/ NF- κ B 経路の阻害によるものであることが示された。MK615 の抗炎症効果は新たな歯周病の予防・治療法に繋がる可能性が示唆され、今後は歯周組織細胞における検索と共に *in vivo* での検討を行っていく予定である。

Adrenomedullin が樹状細胞の Th17 関連サイトカイン産生に及ぼす影響

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔微生物学分野 日本学術振興会特別研究員 PD

²⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯科保存学分野

³⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野

○細川育子¹⁾、細川義隆²⁾、尾崎和美³⁾、松尾敬志²⁾

The effect of adrenomedullin on Th17-related cytokines production from human dendritic cells

¹⁾Department of Oral Microbiology, The University of Tokushima Graduate School, JSPS Research Fellow,

²⁾Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School,

³⁾Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School

○Ikuko Hosokawa¹⁾, Yoshitaka Hosokawa²⁾, Kazumi Ozaki³⁾, and Takashi Matsuo²⁾

【研究目的】

近年、新規ThサブセットであるTh17細胞の存在が明らかにされ、関節リウマチといった炎症性疾患における骨吸収に関与していることが報告されている。また、歯周炎病態形成においても、Th17細胞の分化および増殖を制御するサイトカインの存在も明らかにされており、Th17細胞の関与が示唆されている。一方、Adrenomedullin(AM)は、血管拡張を介した降圧作用をはじめとした多くの生理活性を有することが知られるペプチドであるが、近年、抗炎症作用をもった内在性の免疫調節因子として作用することが報告されている。しかしながら、歯周炎病変局所においてAMがTh17細胞が関与する免疫調節機構にどのように関わっているか明らかにされていない。そこで、本研究ではAMがTh17細胞への分化誘導機構にどのような影響を及ぼすかヒト末梢血由来樹状細胞を用いて検討を行った。

【材料および方法】

健康人末梢血より単核球を遠心分離後、磁気ビーズ(MACS)を用いてCD14陽性細胞を分離した。このCD14陽性細胞をGM-CSF(50ng/ml)およびIL-4(50ng/ml)存在下において10%FBSを含むRPMI1640培地にて5%CO₂、37°Cの条件下で7日間培養し、未成熟樹状細胞へ分化させ実験に用いた。AMおよびAMのレセプターである calcitonin-receptor-like receptor(CRLR)、receptor-activity-modifying protein type2 (RAMP2) およびRAMP3の未成熟樹状細胞におけるmRNA発現をRT-PCR法で解析した。さらに、未成熟樹状細胞をAM存在下あるいは非存在下においてTLR-4 ligand (Lipid A) で刺激し、上清中のTh17細胞の分化および増殖を制御するサイトカイン(IL-23, IL-6, IL-1β)濃度をELISA法にて解析した。

【成績】

AM、CRLRおよびRAMP2のmRNA発現がヒト末梢血由来の未成熟樹状細胞で認められたが、RAMP3のmRNA発現は認められなかった。さらに、Lipid A刺激で誘導したヒト末梢血由来樹状細胞からのIL-23, IL-6およびIL-1β産生は、AMを加えることにより抑制された。

【考察および結論】

今回の結果より、AMはTLR-4 ligand (Lipid A) 刺激による樹状細胞からのIL-23, IL-6 およびIL-1β産生を抑制することが明らかとなった。このことより、AMが歯周炎病変局所において樹状細胞からのIL-23, IL-6 およびIL-1β産生を抑制することにより、Th17細胞への分化および増殖を抑制している可能性が考えられた。さらに、Th17細胞が歯周炎における骨吸収への関与が考えられることより、歯周炎治療に応用できる可能性も示唆された。

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

—高分子ヒアルロン酸のヒト歯周靭帯細胞に及ぼす影響—

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¹, 電気化学工業(株)², (株)ツーセル³

○武田克浩¹, 永原隆吉¹, 柴 秀樹¹, 藤田 剛¹, 松田真司¹,
河口浩之¹, 橋本正道², 辻紘一郎³, 栗原英見^{1,3}

Development of a new medical device for periodontal tissue regeneration using brain-derived neurotrophic factor(BDNF) / hyaluronic acid -Effects of hyaluronic acid on human periodontal ligament cells-

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

○Katsuhiko Takeda¹, Takayoshi Nagahara¹, Hideki Shiba¹, Tsuyoshi Fujita¹, Shinji Matsuda¹,
Hiroyuki Kawaguchi¹, Masamichi Hashimoto², Kouichirou Tsuji³, Hidemi Kurihara^{1,3}

[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。私どもは、脳由来神経栄養因子(BDNF)に着目し、BDNFが歯周組織再生に有効であることを *in vitro*、*in vivo* の両面から明らかにしてきた。

本研究では、BDNFを歯周組織再生治療に臨床応用することを目的として、安全性の高い高分子ヒアルロン酸複合体とBDNFの組み合わせが歯周組織再生を促進するかどうかを明らかにすることとした。

[材料および方法]

(1) *In vitro*

1. 高分子ヒアルロン酸のBDNF徐放能:高分子ヒアルロン酸から徐放されるBDNFのタンパク量はELISAを用いて測定した。
2. 供試細胞とその培養:歯周靭帯細胞(HPL cells)は健全な抜去小白歯の歯周靭帯から遊出させ、10% FCSを添加したDMEMで培養した。6~8代継代HPL cellsを以下の実験に供した。
3. HPL cellsにおけるCD44(ヒアルロン酸レセプター)発現を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
4. HPL cellsの高分子ヒアルロン酸への接着能をcell adhesion assayで検討した。
5. 高分子ヒアルロン酸のHPL cellsの細胞増殖に及ぼす影響をcell proliferation ELISA systemで解析した。
6. 高分子ヒアルロン酸のHPL cellsの骨関連タンパク質(alkaline phosphatase, bone morphogenetic protein-2, osteopontin, osteocalcin)mRNA発現に及ぼす影響をreal-time PCR法にて解析した。

(2) *In vivo*

雌ビーグル犬(12~20ヵ月齢、体重10~14kg)の下顎第2、3、4小白歯に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によって実験的歯周炎を惹起させた。一週間後、印象材を除去し、引き続きルートプレーニングを行い、歯肉弁を元に戻して縫合した。その後ブラッシングによって、炎症を可及的に抑制した。一週間後、BDNF群としてBDNF(5、50、500、2000 µg/ml)/高分子ヒアルロン酸複合体、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週間後、灌流固定を行い、組織標本を作製した。切片作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡下にて組織観察後、セメント質再生率・歯槽骨再生率を計測した。

[結果]

(1) *In vitro*

1. 高分子ヒアルロン酸はBDNF徐放能を有していた。
2. HPL cellsはCD44を発現していた。
3. HPL cellsは高分子ヒアルロン酸への接着能を有していた。
4. 高分子ヒアルロン酸はHPL cellsの細胞増殖を促進した。
5. 高分子ヒアルロン酸はHPL cellsの骨関連タンパク質mRNA発現に影響を及ぼさなかった。

(2) *In vivo*

BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体充填群では、露出象牙質表面の大部分で新生セメント質が観察され、作成した欠損の半分程度まで歯槽骨が再生していた。また、新生セメント質と新生歯槽骨の間には一定の幅を維持した歯周靭帯が存在していた。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。

[結論]

高分子ヒアルロン酸はBDNFの担体として有効であり、BDNF/高分子ヒアルロン酸複合体は歯周組織再生を促進する歯科材料となりうる可能性が示唆された。