

Er:YAG レーザーの根管処置への応用 -殺菌効果の検討-

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座¹、保存修復学講座²

○ 千田晋平¹、稲本京子¹、堀場直樹¹、千田彰²、中村洋¹

Use of Er:YAG laser for Endodontic treatment -Study on Bactericidal effect-

Department of Endodontics¹, Department of Operative Dentistry²,
School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○ SENDA Shinpei¹, INAMOTO Kyoko¹, HORIBA Naoki¹, SENDA Akira², NAKAMURA Hiroshi¹

【研究目的】

近年、歯科用レーザーの根管治療への応用に関する研究が多く行われている。我々も第 127 回学会秋季学術大会において、Er:YAG レーザーを用いた根管拡大形成の有用性について報告した。Er:YAG レーザーは 2.94 μm の波長を有し、水に対する吸収特性が非常に高いため、生体組織での蒸散能力が高く、周囲組織への熱影響も少ないことが報告されている。本研究では、側方方向への照射を主とし、根管内へ導光可能な極めて細い照射チップを用い、Er:YAG レーザーの殺菌効果について検討した。

【材料および方法】

Er:YAG レーザー照射装置として、Erwin AdvErl (モリタ製作所) を使用した。照射用チップは、R200T (コア径 200 μm) を用い、表示出力を 10pps・30mJ あるいは 25pps・30mJ とし、移動速度を 1mm/sec、往復回数を 10 往復とした。

実験①：試料として、ヒトの新鮮抜去歯歯根を用いた。エポキシ樹脂に歯根を包埋後、歯軸に平行に切断し耐水研磨紙を用いて研磨した。10%EDTA と 10%NaClO を用いて化学的清掃した後、超音波洗浄した。次いで、オートクレーブ滅菌し、*Enterococcus faecalis* (*E.faecalis*) を播種した BHI 液体培地内に試料を 5 日間、好気培養下で留置し、感染根管モデルを作製した。作製した試料、および照射チップを移動ステージに固定した。その後、照射チップを試料に平行に接触させた。その状態から照射チップを試料から 90 μm あるいは 140 μm 離し、上記条件でレーザー照射を行った。レーザー照射後、通法に従い、走査電子顕微鏡(SEM)にて観察した。

実験②：試料として、透明根管模型および天然歯を用いた。通法に従い RT ファイルにて根管拡大形成した。実験①と同様に化学的清掃した後、超音波洗浄した。オートクレーブ滅菌した後、透明根管模型ではレーザー照射直前に *Streptococcus mutans* (*S.mutans*) を根管内に注入し、また天然歯では *S.mutans* を根管内に注入し 24 時間好気培養することで感染根管モデルとした。試料を移動ステージ固定後、固定した照射チップを根管内に挿入し、上記条件でレーザー照射を行った。レーザー照射後、根管内容液を回収し、倍数希釈した後 MS 寒天培地に塗抹し、2 日間、好気培養することにより CFU/ml を算出した。

【結果】

実験①：SEM 像において、レーザー照射後の細菌は未照射の細菌と比較して、蒸散あるいは熱によるものと思われる細菌の萎縮、変性、破壊が認められた。しかし、照射条件間での細菌の形態学的変化の違いは認められなかった。

実験②：透明根管模型において、25pps・30mJ の照射条件ではいずれの試料からも細菌は検出されなかった。10pps・30mJ の照射条件では細菌が検出された試料も認められた。照射チップを挿入しただけのコントロールとの比較においては明らかな細菌数の減少が認められた。

天然歯において、照射条件は 25pps・30mJ の条件であったが、透明根管模型とは異なり、照射後細菌が検出された試料も認められた。しかし、コントロールと比較し、細菌数は減少していた。

【考察】

本研究の結果から、今回用いた Er:YAG レーザーの照射条件において、細菌構造の破壊および細菌数の減少が認められた。しかし、照射条件によっては根管内の無菌化は困難と考えられた。この要因として、天然歯では根管湾曲、側枝、イスマス、フィンなど根管形態が複雑であることが考えられる。今回の照射条件は当講座の稲本らの報告に基づき設定したが、今後、根管無菌化により適した照射条件を検討する必要がある。

髓腔窩洞形成の客観的評価法について

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室 第一歯科保存学教室¹⁾

○飯野史明 細矢哲康 山口貴央 石尾登子 安達 厚 知野弘太 新井 高 倉地祐治¹⁾ 桃井保子¹⁾

Objective evaluation of access cavity preparation for root canal treatment

Department of Periodontics and Endodontics Department of Operative Dentistry¹⁾

Tsurumi University School of Dental Medicine

○IINO Fumiaki, HOSOYA Noriyasu, YAMAGUCHI Takao, ISHIO Takako, ADACHI Atsushi, CHINO Kota, ARAI Takashi, KURACHI Yuji¹⁾, MOMOI Yasuko¹⁾

目 的

歯学部における歯内療法学基礎実習は、知識の確認と手技の修得を目的とした臨床実習に先立つ必修科目である。基礎実習における評価は、プロセスとプロダクトならびに試験によって行なわれる。基礎実習における髓腔窩洞形成の評価は、これまで担当指導者や実習責任者により行なわれてきた。しかしながら、臨床経験の異なる担当指導者間においては言うまでもなく、同一指導者でも常に同じ基準で判定しているかどうかは疑問である。今回、レーザー測定器を応用した評価装置を用いて、髓腔窩洞の客観的評価を行った。また、臨床経験の異なる指導者による評価の比較、ならびにレーザー測定評価と指導者評価とを比較し、評価法による整合性に関して検討した。

材料と方法

調査対象は、鶴見大学歯学部の3年生(112名)が、3学年後期に歯内療法基礎実習の実技試験で行なった、上顎左側第一大臼歯の髓腔開拓窩洞である。使用した歯は、髓腔付きメラミン歯(A12AN92-#26, ニッシン)であり、顎模型(D18-FE-500A, ニッシン)ならびにファントーム(DR-10, モリタ)に装着して試験を行なった。試験における窩洞形成は、通常的基础実習と同様に、ライト付きタービン、注水式低速エンジン、湿式・乾式バキュームならびに歯科用照明装置などを装備した実習台で行い、試験時間は20分間とした。

調査方法

指導者による評価：臨床経験3年目から25年目以上の、鶴見大学歯学部保存学教室の6名の歯科医師(指導者)によって行われた。評価方法は5項目におよぶ評価基準をあらかじめ設定し、1項目あたり5段階評価(0~4点)によって行った。第1項目は髓腔窩洞の外形、第2項目は天蓋の残存状態、第3項目は髓腔側壁の切削状態、第4項目は髓床底の切削状態、第5項目は穿孔の有無である。すべての項目の合計点は20点満点であり、歯種間違いをした場合は、当該窩洞のすべての項目を0点とした。

レーザー測定器を使用した評価方法：窩洞測定用の非接触・高速3次元形状計測装置(SURFLACER: VMS-250R, ユニスン)ならびに画像処理装置(3D-VMS, ユニスン)を用いた。評価方法は、基準となるマスター窩洞の計測画像に、試料の画像を重ね合わせて行なった。計測用の画像は、対象試料に対してレーザー測定器で0.1mm間隔でレーザー光を照射し、その反射光を2台のCCDカメラで測定して、コンピューターにて画像構築を行なった。重ね合わせ画像をもとに、基準窩洞からの逸脱程度を観察し点数化した後、減点法にて採点し評価点とした。

整合性の検討方法：窩洞外形に関して、レーザー測定器を用いた評価と指導者による評価の整合性を検討した。すなわち、指導者による、窩洞外形(バランス、根管口の見え方および歯質の保存状態など)の5段階評価を比較対象とし、レーザー測定による結果との点数割合を調整して比較し、統計学的検索を行なった。

結果および考察

指導者の評価では、穿孔の有無を除けばデザイン性や切削状態の判定となることから、各項目で詳細な基準を定めたものの評価者の主観が大きく反映された結果となった。すなわち、指導者間の評価にはばらつきが認められ、窩洞外形の項目においては、すべての指導者の評価が一致することはなかった。穿孔の有無ならびに歯種間違いに関する評価では、指導者間の差は非常に小さかった。レーザー測定器による評価では、窩洞が大きくなる傾向が判定され、特に近心歯質の削除量が多く評価された。これは、ファントームに取り付けた模型上での形成によるためと考えられる。窩洞外形に関する指導者評価の一致率が高い試料に対して、レーザー測定器による評価結果を比較すると、非常に類似した結果が得られた。したがって、レーザー測定器による窩洞外形の評価は有効である。また、学生が比較画像を用いて、窩洞外形の逸脱の程度を視認することは手技の向上に非常に効果的であると考えられる。

半導体レーザー照射後のラット臼歯歯髄反応に関する免疫組織化学的検討

新潟大学医歯学総合病院 総合臨床研修センター¹, 新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔健康科学講座 う蝕学分野², たなか歯科³

○笹なつき¹, 重谷佳見², 鈴木啓展³, 吉羽邦彦², 吉羽永子², 興地隆史²

Immunohistochemical Study on Pulpal Responses to GaAlAs Laser Irradiation in Rat Molars

¹ Niigata University Medical and Dental Hospital, ² Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, ³ Tanaka Dental Clinic

○SASA Natsuki¹, SHIGETANI Yoshimi², SUZUKI Hironobu³, YOSHIBA Kunihiko², YOSHIBA Nagako², OKIJI Takashi²

【目的】

半導体レーザー照射に対する象牙質/歯髄複合体の反応様式についての知見は未だ十分といえない。そこで本研究では、同レーザー照射後の歯髄内硬組織形成過程を組織学的および免疫組織化学的に観察した。

【材料および方法】

生後8週齢 Wistar 系雄性ラットの上顎第一臼歯近心に、半導体レーザー装置（オサダライトサージ3000）を用いて、出力0.5Wもしくは1.5W、60秒×3回照射の条件でレーザー照射を行った。非照射の反対側同名歯を対照とした。照射直後から4週後に4%パラホルムアルデヒド液で灌流固定した。脱灰後、パラフィン切片を作成し、HE染色ならびに象牙芽細胞の分化マーカーである heat-shock protein 25 (Hsp-25) および nestin、また石灰化組織に関連する非コラーゲンタンパクである osteopontin (OPN) および dentin matrix protein 1 (DMP-1) に対する酵素抗体染色を行った。

【結果】

0.5W 照射群では、照射直後に照射部直下での象牙芽細胞の配列の乱れと Hsp-25 および nestin 陽性反応の消失がみられたが、2日後以降では Hsp-25 および nestin 陽性反応が象牙芽細胞に観察された。3週以降、明瞭な細管構造を有する象牙質様新生硬組織の形成が照射部直下に限局性に観察され、この新生硬組織と原生象牙質との境界部近傍に DMP-1 陽性反応が認められた。

1.5W 照射群では、照射直後より歯髄に壊死層が形成されたが、1週後より Hsp-25 および nestin 陽性の象牙芽細胞様細胞の再配列ならびに新生硬組織形成が観察され、2週以降、不規則な細管構造を有する象牙質様、あるいは細胞の封入を伴う骨様の新生硬組織形成が経時的に顕著となった。原生象牙質と新生硬組織との境界部近傍には OPN および DMP-1 陽性反応が観察され、さらに DMP-1 陽性反応は新生硬組織内にも認められた。

【考察】

半導体レーザー照射により形成された新生硬組織は0.5W照射群では反応性象牙質、1.5W照射群ではいわゆる骨様象牙質もしくは修復象牙質に分類可能と思われた。また、0.5W照射群、1.5W照射群間で観察された OPN および DMP-1 の局在の相違は、上記の新生硬組織の形成・石灰化機序あるいは組成の相違を反映している可能性が示唆された。

【結論】

低出力条件（0.5W）では細管構造の明瞭な新生硬組織が少量形成されたのに対し、高出力条件（1.5W）では不規則もしくは骨様の新生硬組織が多量に形成された。OPN および DMP-1 の新生硬組織における局在様式には、両出力条件間での相違が観察された。

【謝辞】

本研究は、新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座硬組織形態学分野 大島勇人教授との共同研究である。

Mineral Trioxide Aggregate (MTA)からの析出物の化学的分析
新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野
韓 臨麟、興地隆史

**Chemical Analysis of Crystalline Precipitates on Mineral Trioxide Aggregate (MTA)
Immersed in Different Liquids**

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
HAN Linlin, OKIJI Takashi

緒言

MTA はポルトランドセメントを基礎として開発された水硬性セメントであり、直接覆髄、逆根管充填、根未完成歯の根尖部封鎖、根管壁穿孔部修復などへの適用後に新生硬組織形成を伴う治癒をもたらすことが報告されている。MTA 硬化体からは、水和反応の過程で形成された水酸化カルシウム結晶の溶解等に伴うカルシウムイオンの持続的放出が生じることが知られており、これに伴う表層析出物の形成は、本材の生体機能性や封鎖性を説明する現象と想定されている。そこで本研究では、蒸留水(DW)およびリン酸緩衝液 (PBS) 浸漬条件下で生成した MTA 表層析出物の化学分析を行なった。

材料および方法

White ProRoot MTA (Dentsply; Tulsa Dental Products, Tulsa, OK, USA; Lot number: 08003395) を実験材料とした。水/粉比 0.3(重量比)の割合で MTA を混和し、内径 8 mm、高さ 4 mm のアクリル樹脂製リングに充填し、湿度 100%, 37°C の恒温環境に 24 時間保管した後、50 ml の PBS (Ca/Mg-free, pH 7.4) もしくは DW (各 n = 10) を入れた容器に移し、37°C, 14 日間保管した。その後、試片を流水下で約 1 時間洗浄し、乾燥ボックスにて乾燥して分析試片とした。また、MTA の粉末を内径 4 mm、高さ 2 mm のアルミホルダに填入し、3 kg で加重したものを化学分析用粉末試片とした。MTA 表面析出物を実体顕微鏡で観察するとともに、波長分散型マイクロアナライザー(WDX-EPMA 1610, Shimadzu)による表面観察、化学成分分析および状態分析を行なった。また、元素分析には、X線回折(XRD)法とフーリエ変換赤外分光(FT-IR)法を併せて行った。

結果及び考察

MTA の粉末試片の WDX-EPMA 元素分析により、Ca (26 at%), O: (58 at%) が検出されたが P、C は検出されなかった。また、XRD 分析により、DW 浸漬試片、PBS 浸漬試片ともに水和反応により生成されたと思われる水酸化カルシウム (CH) 相を含むことが確認された。

DW 浸漬試片表面については、実体顕微鏡下で透明な六角板状結晶の形成がみられた。これらは EPMA では結晶方位の等しい六角板状結晶の集合体として観察され、元素分析により Ca: 17 at%, O: 67 at%, C: 17 at% が検出された。また、結晶の状態分析により、CH 相を含むことが示唆された。

一方、PBS 浸漬試片では実体顕微鏡下で透明で細かい球状結晶が観察されたが、これらは EPMA による表面観察では針状突起を持つ小球状結晶として観察された。元素分析では Ca: 41 at%, O: 29 at%, P: 27 at% が 97at% 占められること、Ca/P が 1.52 であること、および酸化物分析で結晶成分の 92 at% が CaO と PO_4^{3-} であることから、これらは Ca^{2+} 成分の低い amorphous calcium phosphate (ACP) であると考えられ、さらに FT-IR によっても、ACP であると確認された。

MTA 表層に形成される結晶性析出物は、本材の生物活性に関与しうるのみならず、MTA 内部もしくは外部への形成の進行により、MTA 内部、あるいは MTA・歯質界面の空隙封鎖にも寄与することが推定される。一方、P の存在する条件では、MTA 表面に Octocalcium phosphate の豊富な炭酸アパタイト (CAp: ACP と構造的に非常に近い) が析出するとの報告もみられる。この CAp は、Ca/P < 1.5 であり、pH = 11.0-9.4 の環境で生成しやすいとされている。MTA の生物学的活性に対する CAp 形成の意義についても検討の余地があると思われる。

低侵襲性治療で閉鎖した超高齢者の外歯瘻症例

特定医療法人里仁会 興生総合病院歯科・口腔外科¹, 特定医療法人里仁会 興生総合病院皮膚科², 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野³, 岡山大学病院 歯周科⁴, 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野⁵
○小出康史^{1,4}, 成石浩司^{1,4}, 柴 秀樹^{1,5}, 内田雄士^{1,3}, 峯柴淳二^{1,3}, 小原淳伸², 前田博史³, 高柴正悟³

A Case of Successful Less Invasive Therapy in Elderly Patient with External Dental Fistula

Rijinkai Medical Foundation Kohsei General Hospital of dentistry¹, Rijinkai Medical Foundation Kohsei General Hospital Division of Dermatology², Department of Pathophysiology-Periodontal science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences³, Department of Periodontics & Endodontics, Okayama University Hospital of Medicine and Dentistry⁴, Department of Periodontal Medicine, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences⁵

○Yasushi Koide^{1,4}, Koji Naruishi^{1,4}, Hideki Shiba^{1,5}, Yuushi Uchida^{1,3}, Junji Mineshiba^{1,3}, Atsunobu Ohara², Hiroshi Maeda³, Shogo Takashiba³

【緒言】

外歯瘻は、瘻孔開口部が口腔外に生じるため、患者は歯科を受診する前に皮膚科を受診することが多い。外歯瘻の治療法としては、原因歯の抜歯および嚢胞摘出などに加えて、瘻管と瘻孔を含めた瘻痕組織の外科的切除が主流である。一方、非観血的処置、すなわち感染根管治療による外歯瘻の報告もある。

現在は高齢化社会であり、多くの患者が複数の疾患に罹患し、外科的治療が困難な患者が多い。今回我々は、複数の全身疾患を伴う高齢者の外歯瘻を、外科的処置に比べ低侵襲性である感染根管治療によって閉鎖出来た症例を経験したので報告する。

【患者】91歳の男性。当院の皮膚科から左側下顎底部瘻孔の精査を依頼され、2008年6月10日に歯科受診となった。

【既往歴】脳梗塞、高血圧、尿路結石、てんかん

【初診時】

口腔外所見：下顎顎底部に瘻孔を中心とした直径約10mmの変色した皮膚があり、瘻孔から淡黄色の排膿が持続していた。

口腔内所見：45-47には全部鑄造冠が、44には部分被覆冠が装着され、補綴物の辺縁には二次う触が存在した。

臨床所見：44と45に軽度打診がある以外は、他歯牙に打診痛、圧痛、そして自覚症状がなかった。口腔内に内歯瘻は存在しなかった。電気歯髄診に44は反応したが、43、45、46、そして47に反応はなかった。

X線所見：44と45根尖相当部には、連続した小豆大のびまん性透過像が存在した。

【歯科臨床診断】①慢性化膿性根尖性歯周炎(45)、②う触(42、43、44)

【治療方針】脳梗塞およびてんかんの治療中であり、血圧も高い超高齢者であることから全身疾患に配慮して、低侵襲性に外歯瘻の閉鎖を目的に治療を行うこと。

【治療計画】①原因歯牙の感染根管治療(45)、②カリエス処置(42、43、44)

【治療経過】初診日に患者および家族に外歯瘻の治療に歯科治療が必要であることを説明した。

同日44、45の全部鑄造冠を除去した。さらに44はカリエス除去中に露髄したため局所麻酔下にて抜髄を行い、45は感染根管治療を開始した。その後、1ヶ月半で5回にわたり44、45の便宜拡大と、機械的・化学的清掃による根管治療を行った結果、感染根管治療開始2ヶ月後に、瘻孔からの浸出液の停止と外歯瘻の閉鎖を確認し、根管充填を行った。根管充填から1ヶ月経過後、外歯瘻の閉鎖と口腔内に臨床症状がないことを確認して、22、23のレジジン充填と共に、44、45に全部鑄造冠を装着した。感染根管治療開始から半年経過後も外歯瘻の再発はなく、順調に推移している。

【考察】歯牙の細菌感染が原因となる外歯瘻では、抗生剤の処方は一時的な症状の緩和しかもたらさず、再燃する可能性が高い。そのため、歯科による歯牙内の感染を除去する治療である感染根管治療が必要である。根尖性歯周炎は症状をほとんど自覚することなく緩慢に進行するため、歯科医師が外科的治療を必要と判断するような骨欠損や外歯瘻に出会うことが少なくない。また、大きな根尖病巣を有する歯牙の非外科的歯内療法は成績が悪いという報告もあるが、高齢者にとって外科治療が選択されることは精神的・肉体的に苦痛を伴うことが多い。そのために、高齢者の外歯瘻においては根管治療が優先されるべきであると考えられる。本症例では、患者に精神的・肉体的負担を与えることなく非観血的な感染根管治療によって外歯瘻を閉鎖することに成功した。

CAS プログラムフリーザーを用いた歯髄の凍結保存について

昭和大学歯科病院・歯内治療科¹、昭和大学歯学部・歯科理工学教室²、口腔生化学教室³
○大場 崇史¹、増田 宜子¹、藤島 昭宏²、宮本 洋一³、山田 嘉重¹、上條 竜太郎³

The pulp preservation by CAS program freezer.

Showa University, Dental Hospital, Endodontics¹, Showa University, School of Dentistry, Dept. of Oral Biomaterials² and Technology², Dept of Biochemistry³.
OBA Takashi¹, MASUDA Yoshiko¹, FUJISHIMA Akihiro², MIYAMOTO Yoichi³, YAMADA Yoshishige¹, Kamijo Ryutarō³

(目的) 近年修復象牙質を産生する象牙芽細胞様細胞に分化する歯髄の幹細胞の存在が注目されてきている。歯髄には、休止状態の元祖の細胞 (progenitor) もしくは基幹細胞があり、脂肪細胞や神経様細胞に分化する能力があることが示されている。抜歯した歯を保存する際、歯髄も将来有効に活用することが可能ではないかと考えられる。今回、CAS プログラムフリーザー (株式会社 ABI) を用いてラット下顎骨を凍結・解凍し、細胞の特性の変化を-80度凍結と比較検討することとした。

(材料と方法) 5週齢の雄性 Wister ラット 6匹の下顎切歯を α -MEM 培地とセルバンカー 1 (日本全薬工業) に浸漬し CAS プログラムフリーザーにて凍結し 1ヶ月後に 37°C Water Bath にて解凍した。下顎骨 8個は、歯髄組織を摘出し、Collagenase、trypsin、EDTA を含む酵素液にて細胞を分離し 5%CO₂ 条件下にて α -MEM 培地に 10% FBS を加え培養した。この際トルイジンブルー染色を行った。1週間後に 12 ウェルプレートに 4 x 10⁴ 個/well にて継代し 300 μ g/ml β -Glycerophosphate、50 μ g/ml Ascorbic acid を α -MEM (FBS) に加えて培養した。培養液は 2日ごとに交換した。継代 7, 15日にてそれぞれ Total RNA を精製し cDNA を合成し、dspp, osteocalcin 遺伝子の発現の変化を RT-PCR によって調べた。残りの下顎骨は歯髄組織を摘出し解凍後 Natural SEM (N-SEM: 日立) にて細胞の構造の変化を観察した。コントロールとして下顎骨を-80度凍結し解凍したものを同様に調べた。

(結果) 解凍直後の生細胞数の割合は CAS プログラムフリーザーを用い α -MEM 培地で凍結の場合 3% であり、セルバンカー 1 にて凍結では 27% であった。-80度凍結では、セルバンカー 1 に浸漬した場合であっても 8% であった。CAS プログラムフリーザーを用いセルバンカー 1 にて凍結したものは β -Glycerophosphate、Ascorbic acid を α -MEM (FBS) に加えて培養した場合 dspp, osteocalcin 遺伝子の発現が認められた。Natural SEM にて解凍後の組織を観察したところ CAS プログラムフリーザーを用いセルバンカー 1 にて凍結したものは細胞膜が破壊されずに残されていた。

(考察及び結論)

CAS プログラムフリーザーを用いて凍結した歯髄は-80度凍結と比較して細胞の生存率も高く将来歯髄を保存し活用するためには有効であると示唆された。凍結保存の際は、浸漬する保存液によって細胞の状態が影響を受けるため保存液の果たす役割も重要であることがわかった。今後は解凍の際に細胞を傷つけない方法も考慮したい。

歯内療法の使用器具薬剤に関するアンケート結果 第2報：大学診療室

¹ 歯内療法教育勉強会,

² 神奈川歯科大学口腔治療学講座歯内療法学分野, ³ 鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室, ⁴ 松本歯科大学歯科保存第二講座, ⁵ 日本大学松戸歯学部歯内療法学講座, ⁶ 東京歯科大学歯内療法学講座, ⁷ 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), ⁸ 株式会社ニッシン

山内由美^{1,8}, 石井信之^{1,2}, 小澤寿子^{1,3}, 笠原悦男^{1,4}, 辻本恭久^{1,5}, 中川寛一^{1,6}, 林 美加子^{1,7},

Questionnaire on endodontic instruments and medicine Part2: Clinics in university hospitals

¹The Society for Endodontic Education, ²Department of Oral Medicine, Division of Endodontics, Kanagawa Dental College, ³Department of Periodontics and Endodontics, Tsurumi University School of Dental Medicine, ⁴Department of Endodontics and Operative Dentistry, Matsumoto Dental University, ⁵Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, ⁶Department of Endodontics, Tokyo dental college, ⁷Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University graduate School of Dentistry, ⁸Nissin Dental Products INC.

YAMAUCHI Yumi^{1,8}, TANI-ISHII Nobuyuki^{1,2}, OZAWA Toshiko^{1,3}, KASAHARA Etsuo^{1,4}, TSUJIMOTO Yasuhisa^{1,5}, NAKAGAWA Kan-ichi^{1,6}, HAYASHI Mikako^{1,7}

【研究目的】

国内の歯科大学および大学歯学部 29 校における実習および診療室にて使用している器具器材、薬剤などについて、その内容や相違を把握することを目的としてアンケート調査を行った。今回は、大学診療室についてのアンケート結果をまとめ、教育実習の内容と比較検討することを目的とする。

【対象および方法】

2008 年 11 月に 29 校の歯内療法教育担当者に協力依頼し、E メール送受信および郵送によるアンケート調査を行った。卒前教育実習 (以後、実習と略す) および大学診療室において使用している器具器材、薬剤など 11 項目について質問票を送付し回答結果を集計した。回答結果様式は、各項目に列記した回答欄にチェックをいれる方式で行い、複数回答可とした。

【結果】

2009 年 1 月末までに 29 校全てからアンケートの回答があり、回収率 100%であった。

診療室では根管洗浄剤として NaOCl は 29 校、H₂O₂ は 28 校で使用されていた。実習では NaOCl、H₂O₂ 共に 27 校で使用していたが、両根管洗浄剤で交互洗浄を行っていたのは 25 校であった。EDTA は診療室では 25 校、実習では 10 校が使用していた。診療室では根管貼薬剤として水酸化カルシウムを 29 校すべてで使用していたが、実習では 12 校であり、ホルムクレゾールの使用の方が多かった。また、水硬性仮封材の使用は診療室では 22 校、実習では 8 校であった。根管拡大形成器具としては診療室、実習共に K ファイルが最多で、診療室では 28 校、実習では 27 校が使用していた。Ni-Ti ファイルについては診療室では 21 校、実習では 7 校が使用していた。器具については、スプーンエキスカバーターを診療室では 29 校すべてが使用していたが、実習では 23 校の使用であった。ペーパーポイント診療室では 24 校、実習では 15 校が使用していた。

【考察および結論】

大学間における使用器具・薬剤の相違に加え、同大学内でも診療室と実習との間に使用される器具・薬剤の相違があることが分かった。これらの相違と実習の教育効果との関係を見ていくことが実習教育の効果向上のために必要となるであろう。今回は使用器具・薬剤のみに関する調査であったが、今後、手技手法に関する調査も実施し比較する予定である。

謝辞：アンケートにご協力いただきました各校担当の先生方に心より感謝申し上げます。

硬組織形成量に対する円筒状ハイドロキシアパタイト担体の内径の影響

大阪歯科大学口腔治療学講座

○辻 則正、好川正孝、下村容規、柿木栄幸、藪内 崇督、林 宏行

The influence of diameter of a hollow center in cylindrical hydroxyapatite scaffold for hard tissue formation

Department of Endodontics, Osaka dental university

○TSUJI Norimasa, YOSHIKAWA Masataka, SHIMOMURA Yasunori, KAKIGI Hideyuki,
YABUUCHI Takayoshi, HAYASHI Hiroyuki

【研究目的】

三次元的構造を有する組織の再生にはその立体構造維持に担体が利用される。硬組織の再生では多孔質ハイドロキシアパタイトを担体として幹細胞を用いた報告が多数あり、すでに骨組織では臨床応用されている。しかし、すべての担体の気孔内に硬組織は形成されず、硬組織の形成は一部にとどまるようである。

我々は、先の本学会において円筒状と円柱状のハイドロキシアパタイト担体を比較し、円筒状の担体により多くの硬組織が形成されることを報告した。

しかし、円筒の中空部の径が大きくなると担体の強度低下に結びつくために担体部を大きくするべきと考えている。そこで以前に報告した円筒状の担体より中空部の径が小さいハイドロキシアパタイト担体を2種類作成し、これらについて気孔内硬組織の形成を試験した。

【材料および方法】

直径8mm、高さ10mm、気孔率55%の円柱状多孔質ハイドロキシアパタイトの中央部に直径2mmと3mmの中空を持つ円筒状多孔質ハイドロキシアパタイト担体を用いた。

6週齢雄性Fischer 344ラット大腿骨から骨髓細胞を採取し、1週間の初代培養後、デキサメタゾンを1週間作用させた。その後、トリプシン-EDTAで処理し細胞浮遊液を得た。細胞浮遊液は 1×10^7 cells/mlに調整した。担体に細胞浮遊液を浸潤させ気孔内へ細胞を播種し、さらに細胞浮遊液に担体を浸漬した。37°C CO₂インキュベータ内で3時間静置した。

これらの担体を7週齢雄性Fischer 344ラットの背部皮下に8週間埋入後、摘出した。これらの担体を10%ギ酸で脱灰後、パラフィンに包埋、薄切して組織学的に観察した。硬組織の形成した気孔数を計測し、単位面積当たりの硬組織形成量を求め比較した。検定にはstudent's T-testを用い0.1%の有意差で検定した。

【成績および考察】

中空部の直径が2mmの担体では担体の外表面に近い気孔に多数の硬組織形成を認めたが、中空部に近い担体気孔内の硬組織形成は少なかった。また、中空部分の組織では硬組織の形成が認められる一方ほとんどの結合組織が壊死していることがうかがわれた。他方、直径が3mmの担体では担体全体に多数の硬組織の形成を認めた。また、中空部分では硬組織の形成を認め、結合組織の壊死は2mmの担体よりも少なかった。

単位面積の硬組織形成気孔数は中空部の直径が2mmの担体は1cm²あたり260.6±60.9個、3mmの担体は1cm²あたり589.6±73.3個であった。両者の間には統計的有意差を認めた。(P<0.001)。

中空部分の直径を3mmにすることで、担体内側の気孔内に硬組織を形成させるための十分な栄養供給がおこなわれたことが示唆された。

【結論】

直径8mm、高さ10mm、気孔率55%の円柱状多孔質ハイドロキシアパタイトの中央部に直径3mmの中空を持つ円筒状多孔質ハイドロキシアパタイト担体は多くの気孔内に硬組織を形成させて緻密な構造となる。

4META/MMA-TBB resin 添加 MTA の物理的強度の測定

昭和大学歯科病院・歯内治療科¹

昭和大学歯学部・歯科理工学教室²

○小林 未歩¹、増田 宜子¹、山田 嘉重¹、玉置 幸道²

Mechanical property of MTA with 4META/MMA-TBB resin

Department of Endodontics , Showa University Dental Hospital¹

Department of Oral Biomaterials and Technology, School of Dentistry Showa University²

○Miho Kobayashi¹, Yoshiko Masuda¹, Yoshishige Yamada¹, Yukimichi Tamaki²

【目的】

Mineral trioxide aggregate (MTA) は、根管の穿孔時の封鎖や根管充填、覆髄剤として利用されており歯髄や歯周組織への組織親和性が良好であるが操作性において欠点がある。一方、歯の破折の際に使用されている 4META/MMA-TBB resin (スーパーボンド[®]) も比較的組織親和性が良好であるためこれらを混合し臨床へ応用が可能か検討することとした。今回、物理的強度の特性を調べることにした。

【材料および方法】

MTA (PRORoot[®], DENTSPLY) を 10, 30, 50, 80, 90% となるようにポリマーに混和、コントロールとして MTA100%, 4META/MMA-TBB resin100% を直径 7mm、高さ 3mm のブロックを作製し 37°C 湿潤下にて 48 時間硬化させた。MVK-H1 Hardness Testing Machine (Akashi) を用いてビッカース硬さ HV (MPa) を測定した。

【結果】

MTA100% の値は 127.93 (MPa) であり、4META/MMA-TBB resin (以下 SB) を添加するに従って値は低下した。SB 添加 10% では 73.42、20% では 64.38、50% では 53.70、70% では 21.64、90% では 18.1 となり、70% 以上添加の場合 SB (26.88) より強度が低下した。(エナメル質：400、象牙質：68、セメント質：43、アクリルレジン：16-20) MTA への 4META/MMA-TBB resin 添加量が増加することにより強度の低下がみられた。

【考察および結論】

SB100% よりも SB90%, 70% 混和において硬さが低下したのは組成の異なる材料を混ぜ合わせたためと推測される。生体親和性が良好であると言われている MTA に 4META/MMA-TBB resin を添加することにより強度の低下はみられたが、以後辺縁封鎖性や組織親和性への影響を調べる必要がある。生体への影響や質を保持した上で、高価な材料である MTA の使用量を最小限に抑え、より経済的かつ効果的な使用法を今後検討課題としたい。

新規歯内療法学実習用模型を用いた教育効果について

日本大学松戸歯学部 歯内療法学講座

○ 川島 正、辻本恭久、小塚昌宏、坂本真樹、岡部 達

松井 智、安念素代、和田陽子、高橋知多香、室町幸一郎、松島 潔

Educational Effects Using New Endodontic Practice Model

Department of Endodontics

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Kawashima Tadashi, Tsujimoto Yasuhisa, Kozuka Masahiro, Sakamoto Maki, Okabe Tatsu
Matsui Satoshi, Annen Motoyo, Wada Yoko, Takahashi Chitaka, Muromati Koichiro, Matsushima Kiyoshi

【研究目的】 歯内実習を行うために抜去歯を集めるのが近年非常に困難になってきている。われわれは歯学部の学生、大学院生、研修医に対して行われる歯内療法学実習において、同一条件で教育および評価ができるヒトの歯と同条件の人工歯の開発を行っている。第 129 回日本歯科保存学会においてフィルムケースに植立した人工歯に根管治療・根管充填を行ったところ、規格化された人工歯を用いて評価するほうが天然歯を用いるよりも歯内療法の実習教育に有用であることを報告している。今回、4 年次生の歯内療法学実習で人工歯の根管治療・根管充填を行い、人工歯の評価を天然歯と比較することによって教育にどのような効果があるかを検討した。

【材料および方法】 (株)ニッシンの協力の下に開発した上顎第一小臼歯を植立した顎模型をマネキンに装着し、ラバーダム防湿下で 4 年次生の歯内療法学実習試験を行った。アクセスオープニング後、電氣的根管長測定を行い、作業長を決定し、根管治療・根管充填を行った。評価は以下のように行った。①感染歯質 (着色部) の取り残し部位 ② X線上的の根管充填の状態 ③アクセスオープニングの外形 ④穿孔部位

なお、評価は臨床経験 25 年と 3 年の医局員 2 名で行った。

【成績および考察】 ①染歯質 (着色) の取り残し部位 : pulp floor には 47 本 (44.8%) に取り残しが認められた。これは、pulp floor の位置が高位でバーが届かなかったためか、十分にミラーで見ることができなかったために取り残しがあったものと思われた。頬側根管では coronal third に 45 本 (42.9%)、middle third に 11 本 (10.5%)、apical third に 71 本 (67.6%) の取り残しがみられたが、口蓋側根管ではそれぞれ 19 本 (18.1%)、31 本 (29.5%)、58 本 (55.2%) であった。頬側根管の coronal third が多く取り残されたのは口蓋根管よりも切削器具が入りにくい方向のためと思われた。apical third は両根管共に 55~70% ほど取り残しがあったが、根管の狭窄や彎曲があるため器具が到達しなかったためと思われた。頬側根管に取り残しなかったものは 10 本 (9.5%)、口蓋側根管では 26 本 (24.8%) であり、pulp floor を含み頬側、口蓋側根管全てに取り残しなかったものは 9 本 (8.6%) であった。②根管充填の状態 : 頬側根管では Under filling-Over extension が 34 本 (32.4%)、Under filling-Under extension が 61 本 (58.1%)、Over filling-Over extension が 3 本 (2.9%)、Good filling が 4 本 (3.8%) であった。口蓋側根管ではそれぞれ 39 本 (37.1%)、44 本 (41.9%)、5 本 (4.8%)、9 本 (8.6%) であった。Under filling が多くなった理由は着色の取り残しが apical third に多くみられたことより、根尖部の拡大・形成が十分に行われなかったためと思われた。③アクセスオープニングの外形 : 標準的な外形線より過剰に切削されている部位を頬側、口蓋側、遠心側、近心側に分けて分類した。それぞれ 4 本 (3.8%)、10 本 (9.5%)、49 本 (46.7%)、21 本 (20%) であった。近遠心方向に過剰に切削する傾向がみられた。④穿孔部位 : 4 本 (3.8%) に穿孔が見られた。口蓋根では根尖部付近で 1 例に対し、頬側根では見られなかった。歯頸部付近の穿孔は遠心側、近心口蓋側、遠心頬側の 3 例であった。

【結論】 今回、複根管人工歯を用いて歯内実習を行ったが、根が半透明なため、感染部の取り残しが 91.4% もあることがわかり、天然歯では見ることができなかったところを肉眼で評価することができた。また天然歯を用いた以前の報告では外形線が適切であったものは 2.3% であったが、今回の人工歯では 20% に増加した。また穿孔は天然歯が 9.3% に対して人工歯では 3.8% と減少した。以上のことにより学生全員が同じ規格の人工歯を繰り返し用いることにより根管の拡大・形成方法、感染部の取り残しやすい部位、穿孔を起こしやすい部位等を十分学習でき、天然歯で行うよりも公平に評価ができ、歯内療法学実習教育効果が向上したことが示唆された。

直接覆髄法における高周波ラジオ波メスの応用

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯蝕制御治療学分野
半田 慶介、小池 俊之、林 敬次郎、斎藤 隆史

Application of high frequency radio wave surgical knife in direct pulp capping

Health Sciences University of Hokkaido
School of Dentistry, Department of Oral rehabilitation
Division of Cariology and Endodontology
Keisuke Handa, Toshiyuki Koike, Keijiro Hayashi, Takashi Saito

【目的】

直接覆髄において、露髄部の出血に対しては通常、次亜塩素酸ナトリウムによるケミカルサージェリー後に綿球による圧迫止血が行われる。この際、露髄部の止血の成否が臨床成績を大きく左右することが知られている。高周波ラジオ波メス(デントサージ IEC ; エルマンジャパン)は、4MHz の高周波ラジオ波によって軟組織中の水分を蒸散し、同時に組織を凝固する機器として主に外科領域で切開等に用いられている。本研究の目的は、高周波ラジオ波メスの組織凝固作用による止血効果に着目し、直接覆髄における高周波ラジオ波メスによる露髄部の止血効果を評価するとともに、修復象牙質形成誘導に対する影響を検討することである。

【方法】

全身麻酔を施した 8 週齢ウィスター系雄性ラットの顎第一臼歯に人工露髄面を形成し、綿球にて露髄部の血液を軽く除去した後、高周波ラジオ波メスを用いて止血モード強度 1, 3, 5 および 7 で止血を行い、水酸化カルシウム製剤 (MultiCal, Pulpdent 社) を貼付した。コントロール群は、通法により止血し、水酸化カルシウム製剤を貼付した。それぞれの群で止血に要した時間を計測した。ラットを術後 14 日および 28 日に屠殺し、歯を顎骨ごと摘出し通法に従って HE 染色切片を作製した。その後、光学顕鏡にて病理組織学的観察と誘導された修復象牙質の形態計測を行った。

【結果および考察】

コントロール群では、術後 14 日で露髄面に壊死層の形成を認め、28 日においても歯髄に強い炎症反応が認められた。止血時間は平均 2 分 9 秒 (n=29) であり、高周波ラジオ波メス (平均 10 秒) よりも止血に時間を要した。また、誘導された修復象牙質の歯髄腔に占める割合は、28 日後で 20.6 % であり、多孔性でトンネル状欠損・裂隙が多数存在していた。さらに、修復象牙質直下の象牙芽細胞層は不明瞭であった。これらの結果はこれまでの報告と一致していた。これに対して、高周波ラジオ波メス止血モード強度 1 群は、術後 14 日において歯髄の炎症は弱いものの、修復象牙質の形成は不十分であった。強度 3 群では、術後 14 日で修復象牙質の形成が認められ、28 日で細管構造を有する厚く良質な修復象牙質が形成されていた (修復象牙質の割合 : 17.8 %)。また、歯髄の炎症は認められなかった。強度 5 群では、術後 14 日で露髄面に修復象牙質形成が認められ、28 日ではさらに厚みのある修復象牙質形成が認められ (修復象牙質の割合 : 19.9%)、露髄面を完全に覆っていた。歯髄には軽度の歯髄充血が認められた。術後 28 日では、コントロール群、強度 3 および強度 5 の間で修復象牙質形成量に有意差は認められなかった。しかし、強度 7 群では、術後 14 日で強い歯髄炎症反応を示し、修復象牙質もコントロール群と同様に多孔質であった。またこれらの結果から、高周波ラジオ波メスによる止血は、創面一層のみ蒸散凝固することで水酸化カルシウム製剤の歯髄に対する為害作用の拡散を防止すると考察された。しかしながら、過度の強度での高周波ラジオ波メスの使用は、歯髄にダメージを与え、良質な修復象牙質形成を阻害すると考えられた。

【まとめ】

ラット直接覆髄モデルにおいて、適切な強度 (強度 3, 5) で用いられた高周波ラジオ波メスによる露髄部の止血法は、従来の止血法と比較して簡便であり、歯髄への為害作用が少なく、良質な修復象牙質の形成に寄与することが明らかになった。

低サイクル疲労領域におけるニッケルチタンファイルの疲労挙動

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

Low-cycle Fatigue Properties of Nickel-titanium Endodontic Instruments

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、根管形成中に予期せずに破折するという欠点を有する。近年の知見から、疲労破折の中でも、特に低サイクル疲労破折の頻度が最も高いことが示唆されている。しかしながら、低サイクル疲労領域における、ニッケルチタンファイルの変形量と疲労寿命について着目した研究はほとんどない。そこで本研究では、自作疲労試験器を用いて、ファイル先端部の変位量と疲労破折の関係を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

試料：直径 1.00 mm の超弾性、直線記憶ニッケルチタン合金ワイヤー (NT-N, Ti-50.95 mol% Ni, 古河テクノマテリアル) を、先端径 0.30 mm, 0.06 テーパーの円錐形に加工したものを、試料とした。

疲労試験：Cheung ら¹⁾の方法に準じた疲労試験を行った。荷重点間距離は 5 mm とし、ファイル先端 2 mm に位置した円柱形治具を水平方向に移動させることにより、ファイルの変位量を規定した。また、中央の円柱形治具にはロードセルを接続し、試験中の疲労荷重を計測した。試験条件は、先端から 2 mm の変位量が 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.2, 1.5, 2.0 および 2.5 mm の 9 条件とした。試料は変位量一定のまま 250 rpm で破折するまで回転させた。潤滑材にはシリコンオイル (KF-96-100CS, 信越化学工業) を使用した。なお、 10^4 回転を超えても疲労破折が生じない場合には、試験を終了させた。各条件とも $n=10$ とした。疲労試験から、各試料の疲労破折に至るまでに要した回転数 (以下、NCF)、および疲労曲線を求めた。描いた疲労曲線から、破折に至るまでの平均疲労荷重を求めた。各群とも $n=10$ とした。統計学的解析として、平均疲労荷重については、一元配置分散分析および Tukey-Kramer's test を、NCF については、Kaplan-Meier 法および Logrank 試験を用いた (有意水準 5%)。

【結果】

疲労曲線から、すべての試料で試験開始直後より疲労荷重の上昇がみられた。さらに、変位量 0.6 から 1.0 mm までの各群では、疲労荷重の上昇後、疲労荷重は漸次下降し、その後、破折へと至った。疲労試験から得られた各変位量と NCF の関係および近似曲線を図に示す。変位量 0.6 mm のうち 9 本、0.7 mm のうち 1 本の試料では、 10^4 回転を超えても疲労破折が生じなかった。また、変位量が小さくなるほど、NCF はその値が大きくなった ($p < 0.05$)。平均疲労荷重は、変位量 1.2, 1.5 および 2.0 mm のとき、16.48 ~ 19.64 N と有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。

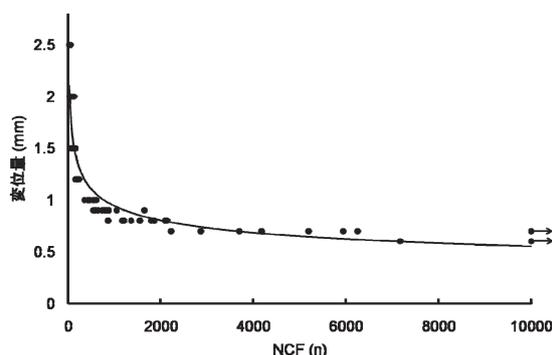


図. 各変位量におけるNCFおよび、近似曲線

【考察】

本研究で得られた疲労曲線では、すべての試料で試験初期に疲労荷重の上昇が認められたことから、ニッケルチタンファイルは疲労の初期段階では、加工硬化が生じていることが推察された。さらに、変位量が 1.2 mm よりも大きい条件下では、荷重の上昇中に破折が生じており、加工硬化を伴う脆性破壊に近い破折様相を呈することが推察された。本研究から、変位量と疲労破折は直線的な相関関係ではなく、ある一定の変位量を超えると急激に NCF は減じることが示唆された。

1) Cheung GS, Darvell BW: Fatigue testing of a NiTi rotary instrument. Part 1: Strain-life relationship; Int Endod J 40, 612-618, 2007.

改良型電氣的根管長測定器を用いた根管内乾燥度の評価

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯内疾患制御学研究分野
西垣奏一郎、吉嶺嘉人、坂田篤信、松本妃可、
後藤千里、牛島 寛、佐藤浩美、赤峰昭文

Evaluation of intra-canal moisture using the modified electric apex locator

Dept. of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Kyushu University
Soichiro Nishigaki, Yoshito Yoshimine, Atsunobu Sakata, Himeka Matsumoto,
Chisato Goto, Kan Ushijima, Hiromi Sato, Akifumi Akamine

【研究目的】根管治療における最終処置である根管充填を施す前に、根管内を可及的に乾燥状態にすることは、持続的な湿潤状態による再感染の危険性、根管充填時のシーラーの硬化阻害、など予後に影響する可能性が危惧される。すなわち、根管を洗浄した後に、確実に根管内を乾燥することは根管治療を成功に導くための重要な要素の一つであると考えられる。

従来より、根管内の乾燥手段としてブローチ綿栓による乾燥法が主流であるが、根尖付近の乾燥は不十分であることが多い。更に、補助的手段として、滅菌ペーパーポイントの応用、根管内バキュームによる吸引、などが臨床で用いられている。現在のところ、それらの乾燥効果を定量化し統計学的に評価した報告はみられない。

本研究では、改良型電氣的根管長測定器を使用することで、抵抗値により根管内の乾燥状態を評価する方法の有効性を検討する目的で、各乾燥法の比較を行った。

【材料および方法】今回の研究は、九州大学病院歯内治療科外来における来院患者を対象に行なった。本研究を実施するにあたり、患者に十分な説明を行い同意を得た。通法に従って、患歯の根管拡大・形成を行い、洗浄後、各種根管乾燥法（①綿栓のみ、②ペーパーポイント併用、③根管内バキューム併用）適用後における抵抗値を改良型 Root-ZX（モリタ）を用いて計測した。メーターの表示値 3、2、1、0.5 における抵抗値を 3 回計測し、平均値を計測データとした。更に、Student の t 検定にて統計学的な解析を行った。

【成績】根管内における乾燥状態が良好なほど高い抵抗値が観察された。すなわち、メーター表示値 3 と 2 における抵抗値は各乾燥法においてほぼ同程度の値を示したが、メーター表示値 1 と 0.5 における抵抗値は、①に比較して②および③において有意に高い値を示した。②と③の間に有意差は認められなかった。

【考察】今回使用した改良型 Root-ZX は、8KHz と 400Hz の 2 つの異なる周波数に対する根管内の抵抗値の比を利用する従来の第三世代電氣的根管長測定器の機能に加えて、各周波数における抵抗値を数値化する機能を有した装置である。根管内が湿潤状態にあると通電性が増すため、根尖までの抵抗値は低くなる原理を本研究では応用した。

今回の実験結果から、綿栓のみの乾燥法では、根尖付近における乾燥状況がペーパーポイントや根管内バキューム使用時と比較して不十分であることが示された。一方、ペーパーポイントと根管内バキューム使用後の抵抗値はほぼ同程度の計測値を示し、両者に差異は認められなかった。

歯質接着性を備え、溶解性が低いために長期安定性が期待できるレジン系根管用シーラーが歯内療法に用いられるようになっており、根管充填前に可及的に良好な根管内の乾燥状態を獲得することは、重要な課題であると考えられる。

【結論】抵抗値計測による根管内乾燥状態の定量化は、乾燥状態を比較し乾燥法を選択する上で有用である可能性が示唆された。

薬液を応用した NiTi ファイル破折片の除去に関する研究 —薬液温度の影響について—

明海大学歯学部 機能保存回復学分野 歯内療法学講座
○牛込瑛子, 高橋哲哉, 小林健二, 小谷依子, 呉 崇史, 関根 慧, 中村幸生

A Study on Removal of Broken NiTi files by Using Solution —Influence of Solution Temperature—

Division of Endodontics, Department of Restorative and Biomaterials Sciences,
Meikai University School of Dentistry
○USHIGOME Eiko, TAKAHASHI Tetsuya, KOBAYASHI Kenji, KOTANI Yoriko, KURE Takashi,
SEKINE Kei and NAKAMURA Yukio

【緒言】

根管内で破折した NiTi ファイルを除去する方法には機械的, 化学的, 外科的な方法がそれぞれ検討されてきた。これまでに我々は, 化学的方法として, 根管象牙質に影響を与えることなく根管内から NiTi ファイル破折片を容易に除去することを目的とし, 薬液の応用により破折片を腐食させる基礎的研究を行ってきた。すなわち, 2 種類の薬液を NiTi ファイル破折片に作用させた場合, 3~24 時間の浸漬によって破折片は腐食溶解し, その溶解様相が薬液によって異なることを明らかにした。(第 125, 126, 128 回日本歯科保存学会) しかし, 臨床応用を考えた場合, 長時間における薬液の応用は実用性が難しい。そこで今回, 薬液温度が NiTi ファイル破折片の腐蝕溶解にどのような影響を及ぼすのかを検討し, ファイルの腐食溶解に要する時間を短縮することが可能であるかを検討した。

【材料および方法】

NiTi ローターファイルとして, ProFile®(DENSPLY) #25/.04, ProTaper®(DENSPLY) #25/F2, K³™(SybronEndo) #25/.04 の 3 種類を使用した。ファイルは全て未使用のものをを用い, それぞれ先端から 5mm の部位をバイスで固定し, 回転して破断させたものを試料とした。浸漬薬剤には, 10% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 19% (w/v) 塩化ナトリウムを加えて調製した薬液 (以下 NCN) と, pH4.5 に調整したリン酸酸性 2% (w/v) フッ化ナトリウム溶液 (以下 APF) を, それぞれ 1 試料当たり 5ml 用いた。薬液温度は, 25, 37, 45, 60°C の 4 条件を設定した。試料は, NCN および APF にそれぞれの温度条件で浸漬し, 恒温槽中で保存した。そして, 薬剤による腐食溶解の判定基準として 1, 3, 6, 24 時間後の経時的な重量変化を測定した。さらに 3 時間後における破断側について SEM 像を撮影して観察した。

【結果および考察】

NiTi ファイル破折片は, いずれも NCN への浸漬において, 25°C では重量減少がほとんど認められなかったが, 薬液温度の上昇に伴い, 重量減少は促進された。一方, APF への浸漬においても, 薬液温度を上昇させるほど重量減少は促進された。このことから, NCN および APF において, NiTi ファイル破折片の腐食溶解には薬液温度が関係しており, 温度を上昇させることにより, 腐食溶解の化学反応が促進したものと考えられる。また, 薬液に 3 時間浸漬させた破折片の SEM 像の観察により, NCN への浸漬では, ファイル破断側の溶解様相において薬液温度による差はみられなかったが, 薬液温度の上昇に伴い, ファイル破断側からの崩壊が著しく観察された。一方 APF では, 薬液温度を上昇させたものほど, ファイル全体に見られる小孔の大きさが増大し, さらに数の増加も認められ, 薬液温度の上昇により溶解速度が促進した様相が観察された。

【結論】

NCN および APF において, 薬液温度を上昇させることは, 浸漬させた NiTi ファイル破折片の腐食溶解に要する時間を短縮させることが明らかとなった。

【文献】

高橋哲哉, 小林健二, 小谷依子他 2 名: 根管破折器具の除去に関する基礎的研究 ニッケルチタン製ファイルの腐食性の検討: 日歯保存誌 50: 203-212, 2007.

根管拡大形成操作解析装置の開発 - トルク、荷重データの数値解析 -

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野
○庭野 和明, 興地 隆史

Development of a device for analyzing dynamic characteristics of root canal preparation - Numerical analysis of torque and force data -

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata
University Graduate School of Medical and Dental Sciences
○NIWANO Kazuaki, OKIJI Takashi

【研究目的】

根管拡大操作手技の習得過程において適切なフィードバックは技術レベルの向上、習得期間の短縮に寄与すると考えられる。しかしながら根管拡大形成時の器具操作状態は一般的には術者の動作等からの推察によらざるを得ない。演者らは根管拡大形成操作の客観的評価法を開発することを目的とし、根管模型への力学的作用の記録、表示をリアルタイムで行う装置(根管拡大形成操作解析装置)を試作し、第125回学会で報告した。本装置は、根管模型基部に連結した歪みゲージにより、拡大中のトルク・荷重データを1/200秒毎に連続してコンピュータに取り込み記録することを基本原理とするものである。今回は、根管拡大形成操作の客観的評価に資する数的指標を見いだすことを目的として、本装置を用いた観測記録データの数値解析を行った。

【材料および方法】

1. トルク・荷重データの記録

本学歯学部6年次学生5名および1年次歯科研修医5名を被験者とし、根管拡大形成操作解析装置に接続したエポキシレジン製透明直線根管模型(S8 ニッシン社製)に対して、K-ファイルで#15号から#35号まで根管拡大が行われた際のトルク・荷重データを記録した。なお、根管拡大はファイルの到達度を電氣的根管長測定器(ROOT ZX:モリタ社製)で連続的にモニターしながら行い、また術者の判断により順に次号ファイルに移行した。

2. 数値解析法

本研究では、ファイル運動がファイル長軸方向の平行運動(荷重負荷)とファイル長軸を軸とした回転運動(トルク負荷)の2つで構成され、両者は相互に転換しないものとして解析を行った。また、荷重ではUP(歯頂側方向)とDOWN(根尖側方向)、トルクではCW(時計回り)とCCW(反時計回り)を区別し、センサの出力極性によりUPとCWは正の値、DOWNとCCWは負の値として記録した。これを基にトルク値をX軸、荷重値をY軸としたデータ散布図を作成すると、X軸、Y軸によってUP_CW、UP_CCW、DOWN_CCWおよびDOWN_CWの4つの領域に分割される。そこで本研究では、これら4領域および全体について作業時間、トルク時間積、荷重時間積、平均トルク、平均荷重などの様々な指標値を導出し、それらに統計学的検討を加えた。すなわち、総作業時間、総トルク時間積、総荷重時間積、総平均トルクおよび総平均荷重について、学生群および研修医群間でt検定により危険率5%で検定を行った。また全被験者のデータを用いて、総作業時間とその他の指標値との相関の有無について、スピアマンの順位相関係数により危険率5%で検定した。

【成績】

学生群、研修医群間に総作業時間、総トルク時間積、総荷重時間積、総平均トルクおよび総平均荷重の全てで有意差を認めなかった。総作業時間との相関については、UP_CCW領域作業時間と有意な正の相関が、さらにDOWN_CW領域平均荷重と有意な負の相関が認められた。

【考察】

根管拡大形成操作解析装置により採得されたトルク、荷重データを4領域に分類し、そこから得られる各種指標値を解析する方法が、根管拡大形成操作に対する客観的評価の一方法となる可能性が示された。また、本実験条件では、根管拡大形成においてDOWN領域に荷重負荷を加えた状態でトルク負荷を与える操作様式が効率的であることが示唆された。一方、UP_CCW領域に属するファイル操作では作業効率が良好でないことも示唆されたが、その機序として術者が切削に適さない本領域の操作を多用した場合と、術者の拡大様式がDOWN領域荷重を十分に加えない操作である場合の2つが考えられた。

【結論】

根管拡大形成の作業時間と正あるいは負の相関を示し、客観的評価の指標となりうる数的指標として、それぞれUP_CCW領域作業時間およびDOWN_CW領域平均荷重が見いだされた。

バラ抽出成分の口腔細菌に対する抗菌および消臭効果について

神奈川歯科大学 口腔治療学講座 歯内療法学分野¹⁾
神奈川歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野²⁾
○ 佐藤武則¹⁾, 石川恵里子²⁾, 浜田信城²⁾, 石井信之¹⁾

The bactericidal and deodorant effects against oral microorganisms

Department of Oral Medicine, Division of Endodontics, Kanagawa Dental College¹⁾,
Department of Infection Control, Division of Microbiology, Kanagawa Dental College²⁾
SATO Takenori¹⁾, ISHIKAWA Eriko²⁾, HAMADA Nobushiro²⁾, TANI-ISHII Nobuyuki¹⁾

【研究目的】近年、口腔に対する健康意識が高まり歯周病や口臭予防を目的とした口腔ケアが重要視され、天然抽出物質の口腔ケアへの応用に関する研究が数多く行われている。歯周病は口腔常在細菌が歯周組織で定着・増殖し、種々の毒素を産生することによって歯槽骨の破壊を誘発することで生じることが知られている。一方、口臭は舌表面や歯周ポケット内の口腔細菌が硫化水素 (H_2S)、メチルメルカプタン (CH_3SH)、ジメチルサルファイド ($(\text{CH}_3\text{S})_2\text{H}$) などの揮発性硫化物 (VSC) を産生することによって生じ、さらにこれらのガスが口腔粘膜への透過性を亢進させることにより歯周病を惹起させるといわれている。そこで今回我々はダマスクローズから抽出される精油成分含有のローズウォーター (NO-MU-BA-RA[®]) を用いて口腔細菌に対する抗菌効果と消臭効果について検討した。

【材料および方法】供試菌は *S. aureus* ATCC 12600, *E. coli* HB 101, *C. albicans* ATCC 10231, *A. viscosus* ATCC 15987, *L. casei* ATCC 393, *S. mutans* Ingbritt, *P. gingivalis* ATCC 33277, *F. nucleatum* ATCC 25586, *V. parvula* GAI-0580 の 9 菌種を用いた。

1. 増殖抑制効果: BHI 液体培地にローズウォーターまたは PBS (コントロール) を添加し各供試菌を接種後、経時的に細菌の増殖を吸光度 (OD: 600 nm) で測定した。ローズウォーターによる増殖抑制効果は細菌の増殖抑制率を算出し評価した。
2. 抗菌効果: ローズウォーターに各供試菌液を接種し抗菌効果を判定した。すなわち実験開始直後、30 分後、1 時間後、24 時間後に経時的に混合液を採取し生菌数測定を行い、各供試菌の減少率を算出した。
3. 消臭効果: 口臭原因菌とされている *P. gingivalis*, *F. nucleatum* を用い、両菌から産生される VSC に対するローズウォーターの消臭効果を簡易ガスクロマトグラフィー方式の口臭測定器、オーラルクロマTM (アビリット社製) を用いて測定した。すなわち、各供試菌液にローズウォーターまたは 0.9% 生理食塩水 (コントロール群) を添加したものをプラスチック製容器に入れパラフィルムにより完全密封し室温下にて放置した。ローズウォーター添加後 5 分後、2 時間後、5 時間後の VSC の産生量を測定し、コントロール群と比較することにより消臭率を算出した。

【成績】

1. 増殖抑制効果: 供試菌のうち、口腔細菌に対してローズウォーター添加後 12 時間後まで細菌の増殖抑制効果が認められた。
2. 抗菌効果: 供試菌液とローズウォーターを混合してから 30 分後より抗菌効果が認められた。グラム陽性菌とグラム陰性菌で比較したところ、グラム陰性菌の方が高い抗菌効果を示した。
3. 消臭効果: *P. gingivalis*, *F. nucleatum* が産生する VSC に対する消臭効果は、ローズウォーターの添加直後より認められ、2 時間後まで効果が持続した。*P. gingivalis* においてはローズウォーターを添加 5 分後で H_2S の消臭率は 100%、 CH_3SH の消臭率は 82.0%、2 時間後では H_2S の消臭率は 93.0%、 CH_3SH の消臭率は 53.2%であった。一方 *F. nucleatum* においてはローズウォーターを添加して 5 分後では H_2S の消臭率は 100%、 CH_3SH の消臭率は 60.1%、2 時間後では、 H_2S の消臭率が 100%、 CH_3SH の消臭率が 48.3%であった。 H_2S と CH_3SH の各測定値間に統計学的有意差が認められた ($P < 0.05$)。尚、両菌から $(\text{CH}_3\text{S})_2\text{H}$ の産生は認められなかった。

【考察および結論】抗菌効果および増殖抑制効果においてローズウォーターは偏性嫌気性グラム陰性菌に対して強い効果を示した。またローズウォーターは歯周病原性菌でかつ、口臭原因菌でもある *P. gingivalis*, *F. nucleatum* が産生する VSC に対しても強い消臭効果を示した。以上のことから本研究で供試したローズウォーターは歯周病予防に有用であることが示唆され、また口臭予防にも効果があるものと考えられた。

歯肉線維芽細胞におけるセラミドの抗炎症作用

¹ 日本大学松戸歯学部口腔分子薬理学講座, ² 歯内療法学講座
○中尾 寿美¹, 室町 幸一郎², 神尾 直人², 松島 潔²

Anti-inflammatory effect of ceramide in human gingival fibroblasts

¹Departments of Oral Molecular Pharmacology, ²Endodontics
○NAKAO Sumi¹, MUROMACHI Kouichirou², KAMIO Naoto², MATSUSHIMA Kiyoshi²

【緒言】

セラミドは細胞膜に高濃度で存在するスフィンゴミエリンを構成する脂質であり、脂質二重層を構成する主要な脂質の一つである。細胞膜に存在するセラミドとその他のスフィンゴ脂質は単なる脂質膜の構成要素であると考えられてきたが、最近では細胞内情報伝達系を介して細胞の分化増殖、アポトーシスなどの制御に関与することから、重要な脂質セカンドメッセンジャーの一つとして注目されている。またヒトにおいては、セラミドの合成障害によりアトピー性皮膚炎などを生じることが報告されている。

我々はこれまでヒト歯肉線維芽細胞におけるプロスタグランジン_{E2} (PGE₂)産生機構について検討を行い、サイトカイン刺激によるシクロオキシゲナーゼ (COX-2) を介するPGE₂産生を報告している。本研究はセラミドの歯周組織における炎症反応に対する作用に注目し、歯肉線維芽細胞におけるIL-1によるPGE₂産生およびPGE₂によるcAMP産生に対するC₂-セラミドの効果について検討を行った。

【方法および材料】

歯肉線維芽細胞は臨床的に健康な歯周組織を有する患者から歯肉を採取し、10%牛胎児血清を含有するD-MEM培地を用い37°C、5%CO₂の条件下で培養し、5-10代継代した細胞を使用した。

歯肉線維芽細胞におけるcAMPとPGE₂産生は免疫抗体法を用いて測定した。COX-2とPGE₂レセプターのmRNA発現はRT-PCR法を用いて観察した。

セラミドは合成セラミドであるC₂-ceramide (N-acetyl-D-erythrospingosine) とC₂-ceramideアナログであるDihydro-N-acetyl-D-erythrospingosineを使用した。

【結果および考察】

合成セラミドであるC₂-セラミドを歯肉線維芽細胞に作用するとIL-1によるCOX-2を介するPGE₂産生が抑制された。また歯肉線維芽細胞にPGE₂を作用するとcAMP産生の上昇が認められた。C₂-セラミドで前処置を行い、PGE₂によるcAMP産生を測定したところ、C₂-セラミド単独ではcAMP産生に影響をおよぼさなかったが、C₂-セラミドは用量依存的にPGE₂によるcAMP産生を抑制した。一方、C₂-セラミドアナログ(不活性型)では大きな変化が認められなかった。さらにマストパラン、フォルスコリン、IBMXなどのレセプターを介さずcAMPを上昇させる物質によるcAMP産生はC₂-セラミドによる影響を受けなかった。PGE₂レセプターのなかでEP2およびEP4がcAMP産生に関わっていることから、歯肉線維芽細胞におけるEP2およびEP4のmRNA発現をRT-PCR法を用いて測定した。歯肉線維芽細胞では無刺激な状態においてもEP2およびEP4のmRNA発現が認められ、EP2およびEP4を介するcAMP産生が示唆された。

以上の結果よりC₂-セラミドの歯肉線維芽細胞に対する作用の1つはIL-1を介するPGE₂産生を抑制し、2つ目はPGE₂による作用を抑制した。さらにPGE₂によるcAMP産生はEP2およびEP4を介することから、歯肉線維芽細胞膜におけるC₂-セラミドの作用は、PGE₂のレセプター結合部位における関与が推測される。

plasmin 刺激によるヒト歯根膜培養細胞の Protease-activated receptor - 2 (PAR-2) mRNA 発現調節について

日本大学松戸歯学部 歯内療法学講座¹⁾ 口腔分子薬理学講座²⁾ 日本大学口腔科学研究所³⁾
○ 室町 幸一郎¹⁾, 神尾 直人¹⁾, 橋爪 英城^{1,3)}, 中尾 寿美^{2,3)}, 松島 潔^{1,3)}

Regulation of plasmin-induced protease-activated receptor-2 (PAR-2) mRNA expression in human periodontal ligament cells

Department of Endodontics¹⁾, Oral Molecular Pharmacology²⁾, and Research Institute of Oral Science³⁾,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo
Koichiro MUROMACHI¹⁾, Naoto KAMIO¹⁾, Hideki HASHIZUME^{1,3)}, Sumi NAKAO^{2,3)}, Kiyoshi MATSUSHIMA^{1,3)}

【目的】

演者らは、第 129 回日本歯科保存学会にて、ヒト歯根膜培養細胞に Protease-activated receptor (PAR)-1, 2, 4 の mRNA が恒常的に発現し、plasmin 刺激によって PAR-2 mRNA 発現が増強すること、PAR-1 および PAR-2 アゴニストペプチド刺激によって細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) が増加することから PAR-1, PAR-2 が機能している可能性があることを報告した。plasmin は、MMP の前駆体である proMMP を活性化して炎症時の細胞外マトリクス分解に関与している。一方、ヒト歯髓培養細胞において plasmin が PAR-1 を介して IL-8 や PGE₂ の産生を促し炎症に促進的に作用することを示唆する報告がある。また、PAR-2 はヒト気管支などにおいて、炎症の進展に関与することが示唆されているが、その発現の調節機構は明らかでない。本研究では、ヒト歯根膜培養細胞の plasmin 刺激による PAR-2 mRNA 発現調節についての検討を行った。

【材料および方法】

- 1) 細胞培養：矯正治療目的（病的原因以外）で抜歯予定の患者に研究のインフォームドコンセントを行い、同意を得た後に抜去された歯から歯根膜を分離した後、Somerman らの方法によって培養シャーレに静置し、10% ウシ胎児血清 (FBS)、100 μg/ml kanamycin、20 U/ml penicillin G、0.25 μg/ml fungizone を添加した α-MEM を用いて 37°C、5%CO₂、95%気相下にて培養し、7~9 代継代した細胞をヒト歯根膜培養細胞として実験に用いた。
- 2) PAR-2 mRNA 発現：ヒト歯根膜培養細胞における PAR-2 mRNA の発現を RT-PCR にて検索した。

【結果】

- 1) ヒト歯根膜培養細胞において、plasmin 刺激による PAR-2 mRNA 発現増強が認められ、100 nM plasmin 刺激では 6 時間で発現が最大となった。
- 2) plasmin 刺激による PAR-2 mRNA 発現増強は Antiplasmin によって抑制された。
- 3) PAR-1, 2, 3, 4 アゴニストペプチド、α-thrombin、および trypsin 刺激による PAR-2 mRNA 発現増強は認められなかった。
- 4) plasmin 刺激による PAR-2 mRNA 発現増強は、PAR-1 阻害剤 (SCH79797) では抑制されなかった。
- 5) plasmin 刺激による PAR-2 mRNA 発現増強は、チロシンキナーゼ阻害剤 (Genistein, Herbimycin) によって抑制され、チロシンホスファターゼ阻害剤 (Orthovanadate) によってさらに増強した。
- 6) plasmin 刺激による PAR-2 mRNA 発現増強は、NF-κB 阻害剤 (PDTC) によって抑制された。

【考察】

以上の結果から、ヒト歯根膜培養細胞において、plasmin は PAR-2 mRNA 発現を増強し、その発現には plasmin のプロテアーゼとしての活性が必要であると示唆された。また、PAR-2 mRNA 発現は PAR-1, 2, 3, 4 刺激では増強しなかったことから、plasmin は PARs 以外の受容機構を介して PAR-2 mRNA 発現に関与していることが示唆された。さらにその細胞内シグナルには、チロシンリン酸化および NF-κB が関与すると考えられた。

PAR-2 は炎症への関与が報告されることから、plasmin 存在下の歯根膜では炎症が促進されると推測され、今後発現した PAR-2 の活性化と炎症との関連を解明することは、根尖性歯周炎の治療において有用であると考えられる。

本研究の一部は、平成 21 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) No. 21592431)、(若手研究 (スタートアップ) No. 20890237)、および日本大学学術研究助成金 (一般研究 (個人研究) No. 個 09-104) により行った。

象牙細管封鎖による細菌感染抑制効果および歯髄組織反応に関する研究

神奈川歯科大学 口腔治療学講座 歯内療法学分野
○飯塚純子, 三橋 晃, 武藤徳子, 石井信之

Bactericidal effects and dental pulp response with dentinal tubules sealing.
Department of Oral Medicine, Division of Endodontics, Kanagawa Dental College
○IIIZUKA Junko, MITSUHASHI Akira, MUTOH Noriko, TANI-ISHII Nobuki

[目的]

象牙細管を介した歯髄組織への細菌感染は歯髄炎、歯髄壊死を誘発するため、歯科治療時におけるインフェクションコントロールは極めて重要である。唾液中には 10^9 CFU/mlの口腔常在菌が存在し、う蝕罹患歯の象牙細管は常に細菌侵入を受けやすい状態にある。

本研究は、硬組織切削器具による窩洞形成から最終補綴物装着までの期間、象牙細管を効果的に封鎖することで、口腔内細菌の象牙細管内侵入を最小限に抑えて健康歯髄組織を保持することを目的とした。今回はその第一段階として抜去歯を用い、開口した象牙細管の封鎖効果についての検討を行った。

[方法]

象牙細管封鎖に対する歯面シーリング・コーティング材として Hybrid Coat (サンメディカル株式会社) を用いた。0.5%クロラミン T 水溶液 (4℃) 中に保管したヒト抜去歯歯冠部にタービンを用い、注水下にて窩洞形成を行い、可及的平坦な象牙質面を被着面とした。切削面をアクセル (サンメディカル株式会社) を作用させ、その後リン酸処置を施し水洗、乾燥後に Hybrid Coat を通法に従い塗布、光重合により硬化させ、被験試料とした。切削面側の厚みを2mmになるように試料を作成し、走査型共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS 社製) を用いて SEM 観察を行った。また、窩洞形成面に仮封用セメント充填群および未処置群をコントロール群と比較して検討を行った。

[成績および考察]

レーザー顕微鏡観察によるコントロール群のスミア層は、ほぼ完全に除去され象牙細管が開口していた。仮封用セメントによる封鎖のみの群では、象牙細管内にプラグ形成は認められないが、切削面からは封鎖されている像が観察された。Hybrid Coat 群では切削した象牙細管内に樹脂含浸層の形成が認められた。象牙細管内の樹脂含浸構造に亀裂は観察されず、良好な封鎖性を示していた。

[結論]

今回、供試した Hybrid Coat は、象牙細管内に樹脂含浸層を形成することで、良好な封鎖性が得られることが明らかになった。Hybrid Coat により形成された樹脂含浸層は象牙細管を経由した口腔内常在菌の侵入を阻止する可能性が示唆された。

象牙芽細胞様細胞株の有する熱耐性および熱馴化能

九州歯科大学口腔治療学講座齲蝕歯髄疾患制御学分野¹、医療人間形成学講座総合診療学分野²
○諸富孝彦¹、北村知昭¹、寺下正道²

Capability of Heat Tolerance and Acclimation of Odontoblast-like Cell.

Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Department of Cariology and Periodontology¹,
and Division of Comprehensive Dentistry, Department of Clinical Communication and Practice²,
Kyushu Dental College

【研究目的】

回転切削器具やレーザーを用いた窩洞形成時に生じる発熱は、象牙質-歯髄複合体に傷害を引き起こすことが知られている。熱刺激が過度でなければ歯髄細胞は増殖・分化し象牙質-歯髄複合体は修復されるが、熱刺激が許容範囲を超えると歯髄壊死を引き起こす。歯髄保存の観点から、熱刺激の歯髄への影響と治癒・再生機構を解明することは、臨床上有意義である。これまでに我々は、象牙芽細胞様細胞株 (KN-3 細胞) は熱耐性を有し、刺激後も増殖能や象牙質形成能を維持し続けることを報告した。

今回、mild heat stress を事前に加えることによる KN-3 細胞が示す熱耐性の変化について検討した。

【材料および方法】

KN-3 細胞を培養ディッシュに播種後、10%ウシ胎仔血清添加培地 (Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification: α -MEM) を用いて 37°C、5%CO₂ 条件下で培養した。細胞がサブコンフルエントに達した後、KN-3 細胞を 39 または 41°C で一週間培養し、熱馴化能を確認した。

次に、39 または 41°C による熱刺激 (mild heat stress) により KN-3 細胞を 10 分間から 24 時間の各一定時間刺激した。この後、恒温器内に静置したアルミブロック上で高温 (45 または 46°C)、5 分間の熱刺激 (severe heat stress) を加えることにより KN-3 細胞が示す熱耐性の変化を検討した。コントロール群には 39 または 41°C による pre-heat を加えず、45 または 46°C の severe heat stress のみ加えた。

【結果】

KN-3 細胞を一週間、39、41 あるいは 37°C の各温度で培養した場合、細胞生存に差異は認められなかった。

次に、KN-3 細胞に 46°C の severe heat stress を加えたところ細胞は死滅したが、45°C の severe heat stress では多くの細胞が死滅するもののわずかな細胞が生存しその後増殖傾向を示した。

一方、45°C の severe heat stress を加える直前に 39°C の mild heat stress (39°C pre-heat) を加えた。1 時間未満の 39°C pre-heat ではコントロールと比較し差を認めなかったものの、6、12 および 24 時間の 39°C pre-heat により 45°C の severe heat stress によって誘導される細胞死に減少傾向が認められた。

また、45°C の severe heat stress を加える直前に 41°C の mild heat stress を加えた群 (41°C pre-heat) では、1 時間未満の 41°C pre-heat では 39°C pre-heat と同様にコントロールとの間に差を認めなかったものの、6、12 および 24 時間の 41°C pre-heat では、45°C の severe heat stress による細胞死誘導の有意な減少が認められた。

【考察】

今回、39 および 41°C、5%CO₂ 条件下で 37°C と同じ培養が可能であったことから KN-3 細胞はこれらの温度に対する熱馴化能を有していること、39 あるいは 41°C で pre-heat を長時間加えることにより高温の熱刺激に対する KN-3 細胞の熱耐性が上昇すること、さらに pre-heat による熱耐性の上昇は 41°C で顕著であることが明らかとなった。一方、短時間の mild pre-heat は KN-3 細胞の熱耐性に影響を及ぼさないことが示された。以上の結果は、窩洞形成時の発熱による象牙質-歯髄複合体への刺激を、適切な温度・時間による pre-heat が減弱させる可能性を示唆している。

【結論】

象牙芽細胞様細胞株である KN-3 細胞は、mild heat stress で事前に刺激することにより熱耐性が上昇する。

ヒト歯髄培養細胞の plasmin による COX-2 の産生におけるカルシニューリンの関与

日本大学松戸歯学部 歯内療法学講座¹⁾, 口腔分子薬理学講座²⁾, 日本大学口腔科学研究所³⁾
○神尾直人¹⁾, 室町幸一郎¹⁾, 五味博之¹⁾, 酒井きよ美¹⁾, 田中みどり¹⁾, 中尾寿美^{2,3)}, 松島 潔^{1,3)}

Involvement of calcineurin in plasmin-provoked COX-2 production on human dental pulp cells.

Department of Endodontics¹⁾, Oral Molecular Pharmacology²⁾, Research Institute of Oral Science³⁾

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

KAMIO Naoto¹⁾, MUROMACHI Koichiro¹⁾, GOMI Hiroyuki¹⁾, SAKAI Kiyomi¹⁾, TANAKA Midori¹⁾

NAKAO Sumi^{2,3)}, MATSUSHIMA Kiyoshi^{1,3)}

【目的】

演者らは、第 128 回歯科保存学会にて、細胞外基質破壊や前駆体 MMPs 活性化に関する plasmin が、トロンビン受容体である Protease Activated Receptor (PAR) -1 を介して細胞内カルシウムイオン (Ca²⁺) 濃度を上昇させ、刺激後 10 分においてプロスタグランジン E₂ (PGE₂) の培養上清中への遊離を引き起こすことを報告し、plasmin が細胞内シグナル伝達を行うアゴニスト分子として歯髄炎進行に関わる可能性があることを示した。そこで本研究では、plasmin による PGE₂ 産生とそれに関する細胞内シグナル伝達について、PGE₂ 合成酵素である cyclooxygenase (COX) -2 と、Ca²⁺/カルモジュリン依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンに焦点を当て検討を行った。

【材料および方法】

細胞は、研究のインフォームドコンセントを十分に行って同意を得られた患者の、矯正学的理由によって抜去された健康な歯から歯髄組織を無菌的に取り出し、10%牛胎児血清を含む α -MEM を用いて 5~9 代継代し、37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。歯髄培養細胞における COX-2 mRNA 発現およびタンパク質産生を、RT-PCR 法、ウェスタンブロット法にて検討した。また、培養上清中の PGE₂ 量を ELISA 法にて測定した。

【結果】

1. ヒト歯髄培養細胞において、plasmin は培養上清中の PGE₂ 量を時間依存的に増加させた。
2. plasmin は、COX-2 mRNA 発現を濃度依存的、時間依存的に増強させた。
3. カルシニューリン阻害剤である FK506 は、plasmin による COX-2 mRNA 発現およびタンパク質産生を抑制した。
4. 以上の結果は PAR-1 アゴニストペプチドである SFLLRN でも同様に認められた。

【考察】

ヒト歯髄培養細胞において、plasmin は PGE₂ の関わる炎症反応に関与していることが示唆された。また、その PGE₂ 産生には細胞内におけるカルシニューリンを介した COX-2 の産生機構が関与している可能性が示唆された。今後は、カルシニューリンの代表的な標的転写因子である nuclear factor of activated T cell (NFAT) の転写活性について検討していく予定である。

本研究の一部は、平成 21 年度科学研究費補助金 (若手研究 (スタートアップ) No. 20890237) にて行った。

根尖性歯周炎の発症および進展における TLRs の役割に関する研究

神奈川歯科大学口腔治療学講座歯内療法学分野

○武藤徳子, 三壁信洋, 渡部弘隆, 石井信之

The study of the role of TLRs in periapical lesion development.

Department of oral medicine, Division of Endodontics, Kanagawa Dental College

○MUTOH Noriko, MIKABE Nobuhiro, WATABE Hirotaka, TANI-ISHII Nobuyuki

【目的】

根尖性歯周炎の発症と進展に伴う歯槽骨破壊は、口腔常在菌に対する宿主の免疫応答が密接に関係することが示されている。また根尖性歯周炎における骨吸収過程に出現した破骨細胞にも T 細胞から産生される RANKL を介した免疫応答と骨吸収に密接な関係があることが報告され、近年の破骨細胞分化メカニズムの解明とともに破骨細胞と免疫制御分子との解析から骨免疫学分野の研究発展に貢献してきた。本研究は、歯槽骨吸収過程における自然免疫の関与を明らかにすることを目的として、歯髄炎から根尖性歯周炎の進展に伴う Toll-Like Receptor の局在と発現細胞の同定、破骨細胞の動態および骨吸収との相関関係を組織学的に解析した。

【方法】

BALB/c マウス♀7w (n=18) を麻酔下にて右側上顎第一臼歯近心隣接面を注水下でタービンにてグループ状に窩洞形成後露髄させ、口腔常在菌による感染を惹起した。露髄処置による歯髄感染直後から 24、72 h、5 d、1、2 および 3W 後に 4%Paraformaldehyde にて灌流固定後、24h 浸漬固定し、EDTA 脱灰後の試料を採取し凍結切片を作成した。解析方法として HE 染色を用いて歯髄炎から根尖性歯周炎へ炎症が拡大する際の細胞動態を、また抗 TLR2, 4 ポリクローナル抗体および活性化マクロファージのマーカーである抗 CD64 抗体を用い免疫組織染色を行い、TLR 発現細胞の同定を行った。また反対側を未処置のコントロールとした。

【結果と考察】

窩洞形成後の組織変化は、コントロール群と比較して歯髄感染後 24h において根尖歯周組織の毛細血管は多数の血球成分の滲出所見が認められた。歯髄感染後 5d の根尖歯周組織において毛細血管の新生が認められ、同様の組織所見は 2W まで継続して認められた。

根尖性歯周炎の発症時における歯槽骨吸収と自然免疫応答の関与を TLR 産生細胞の動態により解析した結果、歯髄感染 24h 後の根尖歯周組織には、骨芽細胞および破骨細胞に TLR2 陽性所見が認められ、その発現は 1W まで確認された。術後 1W の根尖孔直下の毛細血管では血管壁から滲出したと考えられる多形核白血球やマクロファージに TLR4 陽性所見が認められた。また、歯髄感染 24h 後の根尖周囲の歯槽骨髄組織においては、多数の TLR4 陽性細胞の発現が認められた。骨髄内の TLR4 陽性細胞は形態学的に骨髄細胞のみならず、多形核白血球であり同様の所見は 5d 後まで強陽性像が認められた。これらの組織学的所見から自然免疫から獲得免疫への移行に TLR シグナルが深く関わっていることが示唆された。

【結論】

根尖性歯周炎には TLR2, 4 陽性の骨芽細胞と破骨細胞が歯髄感染 24 時間後に出現することが認められたことから、歯槽骨吸収過程初期から TLR シグナルを介した自然免疫応答が骨吸収メカニズムに関与していることが示された。

炎症性サイトカインや PAMP 刺激によるヒト培養歯髄細胞における Alarmin の産生・放出

¹⁾徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 発達予防医歯学部門 健康長寿歯科学講座
歯科保存学分野、²⁾日本大学松戸歯学部 臨床薬理学講座
○高橋加奈子¹⁾、湯本浩通¹⁾、平尾功治²⁾、中西正¹⁾、武川大輔¹⁾、松尾敬志¹⁾

Production and release of Alarmin by pro-inflammatory cytokine- and PAMP-stimulated human cultured dental pulp cells

¹⁾Department of Conservative Dentistry, Institute of Health BioSciences, The University of Tokushima Graduate School, ²⁾Department of Clinical Pharmacology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○Kanako TAKAHASHI¹⁾, Hiromichi YUMOTO¹⁾, Kouji HIRAO²⁾, Tadashi NAKANISHI¹⁾, Daisuke TAKEGAWA¹⁾, Takashi MATSUO¹⁾

【研究目的】

歯髄炎は、う蝕関連細菌やその菌体成分の侵襲に対して歯髄の生体防御機構が作動する事により惹起され、う蝕の進行に伴い、その病態は可逆性から不可逆性の歯髄炎へと進行すると考えられている。近年、感染や細胞障害により細胞にダメージが蓄積して細胞死が生じると、Alarmins と呼ばれるカテゴリーの細胞内蛋白質(endogeneous molecules)が放出され、周囲の組織や細胞へ危険信号を伝達する事が明らかとなった。放出された Alarmins は、外因性の PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns)と同様に TLR (Toll-like receptor)等のレセプターを介して炎症性反応を惹起する事も報告されている。しかしながら、歯髄炎の病態形成における Alarmins の産生・放出とその役割については不明な点も多い。そこで本研究では、歯髄炎における Alarmins の産生・放出機構を解明する事を目的として、Alarmins の中でも特に HMGB1 (High Mobility Group Box 1)や HSPs (Heat Shock Proteins)に着目し、炎症性サイトカインや PAMPs 刺激による培養歯髄細胞からの Alarmins の産生・放出について検討した。

【材料および方法】

1. ヒト歯髄細胞の培養

徳島大学病院歯科を受診し、う蝕及び歯周炎を有さない健全抜去智歯または矯正治療目的の為に抜去された健全小臼歯より歯髄を採取し、5~10代培養後したものを実験に供した。

2. 培養歯髄細胞への刺激

PRRs specific ligands として Pam3CSK4 (TLR2 ligand)、*E. coli* LPS (TLR4 ligand)を、炎症性サイトカインとして IL-1 β , TNF- α , IFN- γ を用いた。またう蝕原性細菌として *Streptococcus mutans* MT8148 を、死菌として熱処理した *S. mutans* も実験に供した。これらを用いて、コンフルエントに単層培養した培養歯髄細胞を刺激した。

3. Alarmin 産生・放出の検出

刺激した培養歯髄細胞を回収・溶解し、蛋白回収・定量を行い、Alarmins の発現は、特異抗体を用いた Western Blot 法にて解析した。また培養上清中の Alarmins の濃度を ELISA 法にて測定した。

【結果】

- PRRs ligands (Pam3CSK4, LPS)や炎症性サイトカイン(IL-1 β , TNF- α , IFN- γ)の単独刺激により、培養上清中への HMGB-1 の放出量は、濃度依存的に増加した。*S. mutans* の刺激により、培養上清中への HMGB-1 の放出量は、菌量依存的に増加したが、熱処理した *S. mutans* では、その効果は顕著に減弱していた。
- 上記の HMGB-1 の放出は、EGCG (Epigallocatechin-3-gallate; 50 μ g/ml)の添加により顕著に抑制された。
- Pam3CSK4 単独刺激した培養歯髄細胞内で、Western blot 及び ELISA により HSP60 の産生増強が認められた。
- PRRs ligands や IL-1 β の単独刺激により、培養上清中への HSP70 の顕著な放出は、認められなかった。

【考察および結論】

PRRs ligands や炎症性サイトカイン、さらには *S. mutans* で培養歯髄細胞を単独刺激することにより、HMGB-1 の放出と HSP60 の産生増強が認められた。さらに、この HMGB-1 の放出は、カテキンの一つである EGCG により抑制された。これらの結果より、歯髄細胞から細胞の危険信号を伝達する物質である Alarmins の産生・放出が、歯髄炎の病態形成に関与している事が示唆された。

マクロファージの NO 産生能に対する MMP-3 の影響

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¹⁾
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”
—デント・メドミクスのインテリジェンスハブ—²⁾
国立長寿医療センター研究所 口腔疾患研究部³⁾
○瀧本晃陽¹⁾、川島伸之¹⁾、小泉悠¹⁾、中島美砂子³⁾、須田英明^{1),2)}

Effects of MMP-3 on NO Production from Macrophages

¹⁾Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences, Graduate School,
Tokyo Medical and Dental University

²⁾GCOE Program -International Research Center for Molecular Sciences in Tooth and Bone Diseases-,
Tokyo Medical and Dental University

³⁾Laboratory of Oral Disease Research, National Institute for Longevity Sciences,
National Center for Geriatrics and Gerontology

○TAKIMOTO Kouyou¹⁾, KAWASHIMA Nobuyuki¹⁾, KOIZUMI Yu¹⁾, NAKASHIMA Misako³⁾ and SUDA Hideaki^{1),2)}

【目的】

MMPs (マトリックス金属プロテアーゼ) は細胞外マトリックスを分解するタンパク質分解酵素で、生体内において多様な機能を有することが知られている。中でも MMP-3 は、細胞遊走能、創傷治癒、血管新生、抗炎症作用など様々な機能を持つことが報告されており、組織修復能を有することから歯髄治療薬としての可能性を示唆する報告¹⁾がなされている。炎症歯髄組織においても MMP-3 の発現が報告されているが、その詳細な機能については不明な点が多い。本研究では、炎症における MMP-3 の働きについて明らかにする目的で、代表的な炎症性細胞であるマクロファージを用い、LPS 刺激により誘発される一酸化窒素 (NO) 産生が MMP-3 存在下でどのように変動するかについて検討した。

【材料および方法】

生後 16 週齢メス Wistar ラットに、全身麻酔下にて冷却したリン酸塩緩衝液を腹腔内に注入し、腹腔マクロファージを採取した。採取したラット腹腔マクロファージを、96 穴プレートに 3×10^4 個/well となるように播種し、RPMI-1640 (和光純薬) に 10% Fetal Bovine Serum (FBS)、1% Penicillin+Streptomycin を加えた培地で培養した。その後、LPS (*E.coli*O : 111 B4, Sigma) を 10、100、1000 ng/ml の濃度で添加し、20 時間後に NO 産生量を Griess 試薬 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% phosphoric acid, 以上和光純薬) にて測定した。次に、LPS とともに MMP-3 (Recombinant human MMP-3, Acris) を 100 ng/ml を添加し、NO 産生量を測定した。LPS を添加しなかったサンプルをコントロールとした。また、各サンプルのタンパク量についても測定した (Protein Quantification Kit-Rapid, 同仁化学)。

【結果および考察】

ラット腹腔マクロファージに LPS を添加すると、濃度依存的に NO 産生量が増加した。LPS とともに MMP-3 を添加すると、LPS 1000 ng/ml を除き有意に NO 産生量が減少した。MMP-3 の存在下で、LPS 刺激により誘発されるマクロファージからの NO 産生量が抑制されたことから、MMP-3 にはマクロファージからの炎症性メディエーター産生を抑制する働きがあるものと推察される。MMP-3 は細胞外マトリックスを破壊することから、炎症における組織破壊に加担していると一般には考えられている。しかし、主要な炎症性メディエーターである NO のマクロファージからの産生を抑制したことから、MMP-3 は炎症の増悪を抑える機能も有している可能性が高いと考えられる。

【結論】

MMP-3 は LPS により誘発されるマクロファージからの NO 産生を抑制した。

【文献】

- 1) 天野一晴, 中島美砂子, 鄭力, 庵原耕一郎, 松井寛敬, 山崎雅弘, 松下健二, 中村洋: ラット歯髄創傷治癒過程における MMP-3 の機能解析; 日歯保存誌 51, 602-613, 2008.

歯の凍結保存が歯根膜細胞活性に与える影響 —第2報 保存液としてのトレハロースの効果—

日本大学松戸歯学部再生歯科治療学講座¹ 日本大学松戸歯学部歯科矯正学講座²
○染井 千佳子¹, 峰村 良太¹, 平手 友里恵², 高野 真知², 牧村 英樹¹, 菊地 信之¹, 木村 功¹, 山口 大²
長濱 文雄¹, 葛西 一貴², 和田 守康¹

Effect of the tooth cryopreservations for the cell activity of periodontal membrane on tooth cryopreservation

Second report: Analysis of cryopreservative solutions

Departments of ¹Reascent Dentistry and ²Orthodontics Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○SOMEI Chikako¹, MINEMURA Ryouta¹, HIRATE Yurie², TAKANO Machi², MAKIMURA Hideki¹, KIKUCHI Nobuyuki¹,
KIMURA Koh¹, YAMAGUCHI Masaru², NAGAHAMA Fumio¹, KASAI Kazutaka², WADA Moriyasu¹

【研究目的】

歯の凍結保存液が、次第に普及してきた。我々はその際、凍結保存液として患者の血清に凍害防止剤としてCP-1を混合したものを使用している。しかし、一般開業医においては、患者の血清を調整することは困難であり、それに代わる新たな保存液を検索する必要がある。

そこで、本研究では、現在凍結乾燥による細胞保護作用があるとされている trehalose を含有させた保存液について検討した。

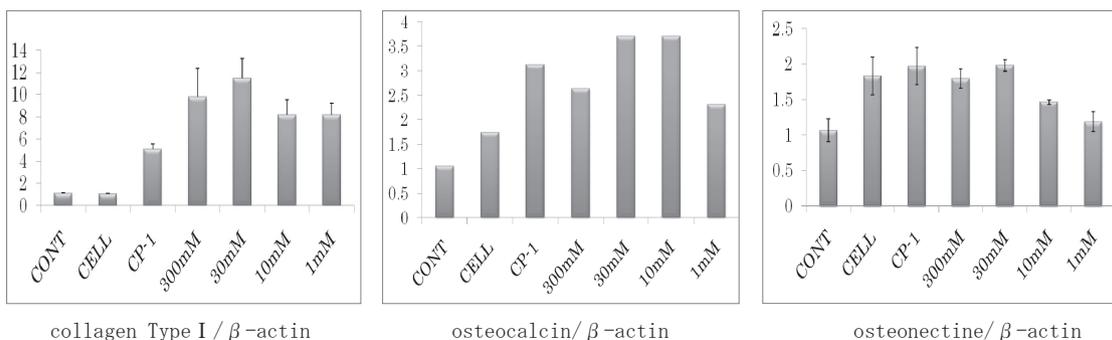
【材料及び方法】

- 1、実験方法：ヒト歯根膜細胞は、研究のインホームドコンセントを十分に行って同意を得られた患者の、矯正的理由によって抜去された健康な歯牙から歯根膜組織を無菌的に取り出し、FBS10%含有α-MEM培地を用いて37°C、5%CO₂の条件で培養を行い、3~5回継代の細胞を用いた。培養細胞からRNAを抽出したものをコントロールとし、比較群は、培養細胞を種々の保存液にて凍結保存を行った。今回使用した保存液は、血清とCP-1を混合したもの、セルバンカー及び、セルバンカーにtrehaloseを300mM、30mM、10mM、1mM濃度で混合したものである。保存は、プログラムフリーザーで-40°Cまで緩速凍結を行い、更に-80°Cで24時間凍結保存を行い、更に-150°Cで2週間凍結保存を行った。
- 2、歯根膜細胞内における活性化因子の発現：解凍した歯から、歯根膜組織を採取し、RNAの抽出を行い、使用したRNA量をβ-actinの発現量に対する比で評価した。プライマーはβ-actin, collagen Type I, osteocalcin 及び osteonectinを使用した。
- 3、ヒト歯根膜細胞増殖能の検討：保存終了後、それぞれの細胞を37°Cの恒温槽に入れ解凍し、細胞増殖ELISA試験を行い代謝活性細胞の数を測定した。また、位相差顕微鏡にて形態学的観察を行った。

【結果および考察】

今回使用した collagen Type I, osteocalcin, osteonectin について、凍結保存液の違いによる歯根膜細胞内における活性化因子の発現を検討した結果 trehalose の4種類の濃度の中で30mMが最も優れた発現誘導を認めた。また、セルバンカーのみでは血清+CP-1より遺伝子発現誘導が認められなかった。

以上のことにより、セルバンカーに trehalose30mMを添加すれば血清+CP-1の代用として使用可能であり歯の凍結保存液に有効であることが示唆された。



歯根膜から得た上皮細胞と線維芽細胞を用いた三次元培養に対する組織化学的観察

1) 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第1講座
2) 日本歯科大学 大学院新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学
○北島佳代子¹⁾、新井恭子¹⁾、長谷川有紀²⁾、松田浩一郎²⁾、山田理絵²⁾、五十嵐勝¹⁾

Histo-chemical investigations of three dimensional culture using epithelial cells and fibroblasts derived from PDL

1) Department of Endodontics, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University
2) Advanced Operative Dentistry · Endodontics, Graduate School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University
OKITAJIMA Kayoko¹⁾, ARAI Kyoko¹⁾, HASEGAWA Yuki²⁾, MATSUDA Koichiro²⁾, YAMADA Rie²⁾ and IGARASHI Masaru¹⁾

【緒言】

抜去歯の歯根面には歯根膜組織の一部が付着残存しており、その残存歯根膜組織を剝削採取して初代培養を行うと歯根膜組織由来の線維芽細胞と上皮系細胞を得ることができる。その線維芽細胞を組織親和性の高いコラーゲンゲルに浮遊させ、上面に上皮細胞を播種して気相培養を行うと角化層を伴う三次元再構成組織を培養できる。当教室では、第111回本大会において、皮膚と歯肉の上皮細胞と線維芽細胞を用いた三次元再構成培養を行い、上皮角化細胞の正常組織に類似した分化について報告し、第116回本大会では歯根膜から得られた線維芽細胞と上皮細胞を用いた培養組織の経時変化を組織学的に観察し上皮細胞の剥離状態を報告した。今回われわれは、ブタ乳歯歯根膜由来の線維芽細胞と上皮細胞を用いた三次元培養を行い、再構成された上皮細胞層の組織化学的観察を行ったので報告する。

【実験材料および方法】

生後約6か月のブタ下顎骨から第1、第2乳臼歯を抜去し、4℃のFAD (DMEMとHam'sF12の3:1混合液、penicillin 100units/ml、streptomycin 100 μg/ml、hydrocortisone 400ng/ml、Epithelial Growth Factor 10ng/ml、cholera toxin 8.4ng/ml、bovine insulin 5 μg/ml、adenin 18.2 μg/ml、FBS10%(V/V)含有)中に投入保存した。ついで4℃ PBS (Penicillin 200units/ml、Streptomycin 200 μg/ml、Amphotericin B 5 μg/ml含有)で15分ずつ3回洗浄を行った後、実体顕微鏡下で歯根中央1/3の歯根膜を剝削採取し、37℃、CO₂下で初代培養を行った。その際、線維芽細胞培養にはDMEM (DMEMに10%(V/V)FBS添加)、上皮細胞にはFADを使用し、Mitomycin処理3T3細胞(ATCC#CCL92)をfeeder layerとして同時に播種した。コラーゲンゲル内培養には4~5継代の線維芽細胞を用い、コラーゲン液にDMEMを添加後1N-NaOHで中和し、10%(V/V)FBSと線維芽細胞0.3X10⁵/mlを加えた。37℃、CO₂下で20分間インキュベートし、ゲル化させた線維芽細胞のみの群と2~3継代の上皮細胞を0.8X10⁵/mlでゲル表面に播種した上皮細胞群の2種類を作製した。コラーゲンゲルをナイロンメッシュに移し、表面を空気に暴露したair-medium interface(気相)で培養を継続し、1、2週時に標本を取り出してOCTコンパウンドで凍結包埋し凍結切片を作製するとともに、中性ホルマリン浸漬固定を行い、厚さ6 μmの連続パラフィン切片を作製した。標本は一般染色としてHE重染色、Azan染色、Masson Trichrome染色のほか、CK、CD抗体等に対する免疫染色を行い顕微鏡にて観察した。

【結果と考察】

肉眼的観察では、培養後1日目にはコラーゲンゲルの厚さが垂直的に減少したが、水平的な収縮は認められず、週の経過時でも培養組織の大きさにほとんど変化はみられなかった。上皮細胞播種を行ったコラーゲンゲルでは、1週例で細胞が層状配列を示し、数層の上皮からなる厚みを持った上皮層が観察されたが、厚い角化上皮を伴う重層扁平上皮様構造はみられず、2週例で上皮細胞が散在する様相を呈した。これらの所見の違いから、歯根膜組織から得られた上皮細胞は厚い角化上皮を伴う重層扁平上皮から成る皮膚や歯肉とは異なる細胞分化様式を示すことが考えられる。

【結論】

歯根膜組織から得られた上皮細胞と線維芽細胞を用いた三次元再構成培養の結果、歯根膜組織内に存在する上皮細胞は歯肉上皮を形成する細胞とは同一とはいえない可能性が示唆された。

TLR リガンド刺激したヒト培養歯髄細胞における IL-6, CXCL10 産生を インターフェロン γ は増強させる

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 発達予防医歯学部門 健康長寿歯科学講座
歯科保存学分野、²⁾日本大学松戸歯学部 臨床薬理学講座
○武川大輔¹⁾、中西 正¹⁾、平尾功治²⁾、湯本浩通¹⁾、高橋加奈子¹⁾、松尾敬志¹⁾

Synergistic effects of interferon- γ on IL-6 and CXCL10 production by cultured human dental pulp cells stimulated with TLR ligands

¹⁾Department of Conservative Dentistry, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, ²⁾Department of Clinical Pharmacology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○Daisuke TAKEGAWA¹⁾, Tadashi NAKANISHI¹⁾, Kouji HIRAO²⁾, Hiromichi YUMOTO¹⁾, Kanako TAKAHASHI¹⁾,
Takashi MATSUO¹⁾

【研究目的】

歯髄炎は、主にう蝕細菌による侵襲に対して歯髄の生体防御機構が作動することにより惹起されると考えられている。歯髄細胞は歯髄組織の大部分を占めており、組織の維持だけでなく歯髄の免疫応答においても重要な働きを担っている可能性があり、Toll-like receptor (TLR) に代表される自然免疫に関与するレセプター群 (Pattern Recognition Receptors ; PRRs) に対するリガンド刺激において、歯髄細胞から IL-6 などの炎症性サイトカインが産生されることがすでに報告されている (Matsushima et al. 1998, Tokuda et al. 2001)。また、我々もリンパ球浸潤に関与するケモカインの1つである CXCL10 が歯髄細胞により産生されることを明らかにしている (Adachi et al. 2007)。

今回、活性化された T 細胞で産生され、免疫系に対して調節作用を有するインターフェロン γ (IFN- γ) に着目し、TLR リガンド刺激した歯髄細胞の IFN- γ に対する反応性、特に IL-6 や CXCL10 など炎症関連因子の発現への影響について検討した。

【材料と方法】

1. 歯髄細胞の培養

徳島大学病院歯科を受診し、う蝕および歯周炎を有さず矯正目的のために抜去された健全智歯より歯髄を採取し、細切後 outgrowth した細胞を歯髄細胞とし、5~10代継代したものを実験に使用した。

2. TLR リガンド刺激した歯髄細胞における IFN- γ の影響の解析

歯髄細胞をプレートに播種し、サブコンフルエントまで培養した後、TLR リガンドである Pam3CSK4 (TLR2 リガンド)、*E. coli* LPS (TLR4 リガンド) とともに IFN- γ にて一定時間刺激し、上清中の IL-6 および CXCL10 濃度を ELISA 法にて測定した。

【結果および考察】

TLR リガンド刺激した歯髄細胞に IFN- γ を共刺激させることで、IL-6 および CXCL10 の産生は相乗的に増加した。また、その相乗効果は IFN- γ 濃度依存的に増大した。これらの結果より、IFN- γ は歯髄細胞の自然免疫反応を修飾している可能性が示唆された。今後は、Muramyl dipeptide (MDP) など他の PRRs リガンド刺激した歯髄細胞に対する IFN- γ の影響についても検討する予定である。

【結論】

TLR リガンド刺激したヒト培養歯髄細胞における IL-6, CXCL10 産生を、IFN- γ が増強させることが示された。

培養ヒト歯根膜細胞における補体制御因子の発現

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 歯科保存学分野
作田哲也、徳田雅行、小山徹、梶原武弘、森元陽子、藤澤真理、江本真規子、宮下桂子、鳥居光男

Expression of Complement Regulatory Factors on Human Periodontal Ligament Cell in cultures
Department of Restorative Dentistry and Endodontology
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
SAKUTA Tetsuya, TOKUDA Masayuki, OYAMA Tohru, KAJIHARA Takehiro, MORIMOTO Yoko, FUJISAWA Mari,
EMOTO Makiko, MIYASHITA Keiko, and TORII Mitsuo

【研究目的】 細菌感染に対して宿主は様々な免疫反応を示すが、自然免疫の一つとして補体系が挙げられる。すなわち、細菌の侵入は、①抗体の結合を伴う第一経路 ②マンナン結合タンパクなどが関与するレクチン経路や ③細菌表面上で直接 C3 因子の活性化が起こる第二経路により、炎症巣へ白血球を動員し、また食細胞の活性化（オプソニン効果）や膜障害性複合体の形成によって細菌の破壊をもたらす。補体による攻撃は宿主細胞に対しても作用するが、宿主側は補体による攻撃から自らを守る手段として、細胞膜上に CD55 (DAF; Decay accelerating factor)、CD59 や CD46 を発現し、補体による攻撃を回避している。CD55 は C3b/C3Bb 転換酵素と C4b/C4b2a 転換酵素を阻害し、また CD59 は C5-8 あるいは C5-9 複合体に結合し最終的な膜障害性複合体の形成を妨げることで補体による溶解を防いでいる。さらに、CD46 は C3b あるいは C4b と結合して血漿中の I 因子（セリンプロテアーゼ）による分解を受けやすくする作用を持つ。すなわち補体系には、補体の活性化とそれらを制御する分子 (CD55、CD59 や CD46) という 2 つのバランスが重要であることが示唆される。

根尖性歯周炎の発症には、細菌の菌体成分やその産生物が、免疫系細胞の他、歯根膜細胞や骨芽細胞などの歯周組織を構成する細胞を刺激して、サイトカインネットワークの破綻をきたし、根尖部歯周組織における細胞外基質の破壊と骨吸収をもたらすことが強く関与している。しかしながら病的な補体攻撃を受けることにより、炎症性細胞の動員や細胞の溶解を引き起こすことから、補体系も重要な役割を果たしているものと考えられる。

本研究では、ヒト歯根膜細胞を用いて補体制御因子の発現動態について検討したので報告する。

【材料と方法】

1. 矯正学的理由で抜歯した小白歯より歯根膜を採取し、10%FBS 添加 D-MEM で培養した。実験には継代数 5-10 代までの細胞を用いた。
2. ヒト歯根膜細胞における補体制御因子 (CD55, CD59 と CD46) の発現をウェスタンブロット法により解析した。
3. ヒト歯根膜細胞を腫瘍壊死因子 (TNF- α) や *Escherichia coli* の LPS で刺激し、各補体制御因子の発現動態を、ウェスタンブロット法により解析した。

【結果と考察】

1. ヒト歯根膜細胞には補体制御因子 (CD55, CD59 と CD46) の発現が認められた。
2. ヒト歯根膜細胞において、TNF- α で前処理した後に LPS で刺激すると、前処理しないものに比べて CD59 の発現は抑制された。

以上のことから、ヒト歯根膜細胞上には補体の活性化を制御する因子が発現していること、また、炎症状態で細菌感染が起こると補体による攻撃を受けやすくなる可能性が示唆された。今後は CD59 以外の補体制御因子による代償作用について検討を加える予定である。

IL-17A KO マウスにおける根尖病巣の骨吸収に対する免疫学的検討

京都府立医科大学大学院医学研究科 歯科口腔科学¹
京都府立医科大学大学院医学研究科 微生物学²

○大迫文重¹、山本俊郎¹、山本健太¹、赤松佑紀¹、雨宮傑¹、中村亨¹、喜多正和²、金村成智¹

IL-17A is involved in bone resorption in mouse periapical lesions.

Department of Dental Medicine¹ and Microbiology²
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

○ Fumishige Oseko¹, Toshiro Yamamoto¹, Kenta Yamamoto¹, Yuki Akamatsu¹, Takeshi Amemiya¹,
Toru Nakamura¹, Masakazu Kita² and Narisato Kanamura¹

【緒言】

我々は、第122回本学会にてマイクロCTを用いたマウス根尖病巣の三次元解析と免疫学的検討についての報告を行い、マウス根尖病巣における骨吸収には、サイトカインネットワークを介した様々な経路の関与が予想されるとともに、IFN- γ とTNF- α の直接的な関与の可能性が少ないことを報告した。また、IL-17は主に活性化T細胞より産生され線維芽細胞などに作用し、炎症性サイトカインなどの種々の因子を誘導し炎症を誘導する。さらに、Th1細胞やTh2細胞から産生されるのではなくT細胞のサブセットであるTh17細胞より産生されることがわかり、炎症や感染防御において重要な役割を担うと考えられている。そこで、我々はIL-17に着目し、根尖病巣マウスモデルにおけるIL-17の役割について検討した。

【対象および方法】

実験にはIL-17A^{-/-}マウス及びC57BL/6正常マウス(♀, n=5)を用いた。マウス臼歯の歯冠部を削除し、*Prevotella intermedia*(ATCC25611)及び*Porphyromonas gingivalis*(ATCC33277)を歯髓腔内に感染させ、感染群とした。なお、対象群として、髓室開拓を行わない正常マウスを用いた。感染21日後に下顎骨を μ CT(島津製作所製 SMX-225CT-SV3)により撮影を行ない、3次元画像解析ソフト TRI/3D SRF II (ラトック社製、東京)を用いて分析した。正常マウス感染群と対照群における骨吸収部分の体積を測定した。さらに、根尖周囲の病変部を周囲の骨と共に一塊として摘出し、RT-PCRおよびreal time PCR法を用いIL-17について免疫学的検討を行った。

【結果】

正常マウスでは感染後、 μ CT画像解析にて明らかな根尖病巣の形成が認められたのに対し、IL-17A^{-/-}マウスにおいては根尖病巣の形成が認められなかった。また、RT-PCR法において感染前の正常マウスにおいてはIL-17A mRNA発現は検出されなかったが、感染後、根尖病巣において明らかなIL-17A mRNA発現が検出された。さらに、real time RT-PCR法において対照群に比べ、感染群の根尖病巣において有意にIL-17A mRNAの発現が増強していた。

【考察および結論】

近年、IL-17が炎症性疾患に関与していることが報告されている。特に、慢性関節リウマチにおいてIL-17は骨芽細胞からのRANKL産生を誘導することなどが報告され、IL-17が骨破壊に関与していることが報告されている。本研究では、IL-17^{-/-}マウスを用いて、根尖病巣の形成におけるIL-17の関与を検討した。IL-17A^{-/-}感染群は、正常マウス対照群と比較して骨吸収において有意差を認めなかった。また、RT-PCR法の結果では感染後IL-17A mRNAの発現が誘導された。さらに、real time PCR法で相対量評価したところ非感染群に対して感染群のIL-17が有意な発現を認めた。従って、正常マウスの根尖病巣にはIL-17Aが産生されていることが証明された。

以上より、IL-17Aは根尖病巣の形成において重要な役割を果たしていると考えられた。

歯根肉芽腫中の血管内皮細胞における midkine 及び chemokine 発現

日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座¹, 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門²,
○羽鳥啓介¹, 武市 収^{1,2}, 岩田桜子¹, 勝呂 尚^{1,2}, 小木曾文内^{1,2}

The expression of midkine and chemokine in human periapical granuloma

Department of Endodontics¹ and Division of Advanced Dental Treatment², Dental Research Center,
Nihon University School of Dentistry

○Keisuke Hatori¹, Osamu Takeichi^{1,2}, Sakurako Iwata¹, Hisashi Suguro^{1,2}, Bunnai Ogiso^{1,2}

【背景】

midkine は血管内皮細胞から発現されるヘパリン結合性成長因子であり、正常な組織ではほぼ見られず、髄膜腫などの腫瘍で多量に発現し、細胞の分化や成長などを促進していることが知られている。近年の研究から関節リウマチ(RA)の発症に関与し、炎症局所でのマクロファージから破骨細胞への分化や炎症性細胞の遊走などを促進し、組織の炎症を惹起するとともにその修復機序に深く関与していることが報告されている。これらのことから、口腔内においても midkine は慢性炎症中での炎症性細胞の浸潤や根尖病巣の発生や成長にも深く関与している可能性が疑われる。

一方、chemokine は免疫担当細胞の遊走を促進し、特に CXCL12、CX3CL1、CXCL13、CXCL16 は midkine と同様に血管内皮細胞から発現し、T リンパ球、B リンパ球、マクロファージなど免疫担当細胞の遊走への関与が報告されていることから、根尖病巣成立においても chemokine が何らかの形で関与しているものと考えられる。

【研究目的】

歯根肉芽腫中の midkine、CXCL12、CX3CL1、CXCL13、CXCL16 の局在とこれら因子の相互作用について免疫組織学的に検討する。

【材料及び方法】

口腔内診査(咬合痛、打診痛、根尖部圧痛および瘻孔の有無)ならびに根尖部エックス線写真にもとづき、慢性根尖性歯周炎で臨床的に歯内外科処置または抜歯処置と診断された患者 34 名を被験者として、根尖病巣組織を被験者から採取した。ただちに OCT コンパウンドで包埋し、ドライアイス・アセトンを用いて凍結し、クレオスタットを用いて、5 μm の凍結切片を作製した。すべてのサンプルは HE 染色を行って、歯根肉芽腫であることを確認した。その後、各サンプルの midkine および chemokine の発現を検索するためアビジン・ビオチン酵素複合体(ABC 法)を用いて免疫組織化学的に検索した。また、各サンプルにおける midkine、CXCL12、CX3CL1、CXCL13、CXCL16 の二重蛍光免疫染色を行った。

【成績】

1. midkine の発現程度はサンプル間で違いがあり、個体差が認められた。
2. midkine は免疫組織学的検索から歯根肉芽腫中の血管内皮細胞に発現していることが確認された。
3. chemokine ならびに midkine は歯根肉芽腫中の血管内皮細胞に発現していることが確認された。

【考察】

以上の成績から midkine 発現には個体差があるものの、歯根肉芽腫中の血管内皮細胞に発現しており、歯根肉芽腫の発生・成長に関与している可能性が考えられた。また、歯根肉芽腫中の血管内皮細胞からは chemokine の発現見られたことから、炎症性細胞の遊走により慢性炎症が惹起されていることが推測された。

各種サイトカインが象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響

九州歯科大学医療人間形成学講座総合診療学分野¹

口腔治療学講座齲蝕歯髄疾患制御学分野²

○鷺尾絢子¹、北村知昭²、諸富孝彦²、寺下正道¹

Effects of cytokines on odontoblast-like cells

Division of Comprehensive Dentistry, Department of Clinical Communication and Practice¹, Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Department of Cariology and Periodontology², Kyushu Dental College

○WASHIO Ayako¹, KITAMURA Chiaki², MOROTOMI Takahiko², TERASHITA Masamichi²

<目的>

我々の研究グループでは、歯髄創傷治癒メカニズムの解明と象牙質・歯髄複合体再生療法確立を目的として、Runx-2、DSPP および collagen type I の発現や石灰化能(象牙質形成能)といった象牙芽細胞の特徴を有する象牙芽細胞様細胞株(KN-3細胞)を樹立した。樹立した細胞を用いて、我々はリポ多糖(LPS)がKN-3細胞の示す象牙芽細胞分化能および象牙質形成能を抑制すること、LPSはKN-3細胞にIL-6やTNF- α 発現等の炎症応答を誘導すること、またLPSに対するKN-3細胞の応答には細胞内シグナル伝達分子としてp38等のMAPKが関与していることを明らかにした。さらに、LPSが示すKN-3細胞の石灰化能の抑制や炎症応答誘導は、LPSをオゾン水で処理することにより抑制されることを明らかにしてきた。今回、KN-3細胞の特徴を明らかにするため、各種サイトカイン(BMPs、NGF、activin)のKN-3細胞の増殖能、石灰化能および関連する細胞内シグナル伝達に及ぼす影響について検討した。

<材料と方法>

各種サイトカイン(100 ng/ml)の存在下・非存在下でKN-3細胞を72時間培養後、位相差顕微鏡観察下で形態学的観察を行った。また、細胞増殖能に及ぼす影響をWST-1 assayで、石灰化能へ及ぼす影響をAlkaline phosphatase(ALP)活性を測定することにより検討した。さらに、細胞内シグナル伝達経路への影響を検討するため、Smad1、5、8のリン酸化をウェスタンブロット法にて検討した。

<結果>

各種サイトカインの存在下・非存在下でKN-3細胞を培養し、各刺激へのKN-3細胞の反応を検討した。その結果、細胞形態や増殖能およびALP活性に大きな変化は認められなかった。一方、BMPs等の細胞内シグナル伝達に関与しているSmad1、5、8のリン酸化誘導が認められた。

<考察>

今回の実験結果より、象牙芽細胞の特徴を有するKN-3細胞は各種サイトカインによる影響を受けることが示された。

<結論>

象牙芽細胞様細胞であるKN-3細胞の分化誘導に細胞内シグナル伝達分子の1つであるSmadのリン酸化が深く関与していることが示唆された。

ラット実験的根尖性歯周炎の進展におけるカテプシン K 阻害剤の抑制効果

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¹
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”²
○鈴木規元¹、川島伸之¹、許 婧^{1,2}、須田英明^{1,2}

Inhibitory effects of the cathepsin K inhibitor on the progress of rat periapical lesions
Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences, Graduate School,¹
GCOE Program—International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases—,²
Tokyo Medical and Dental University
○SUZUKI Noriyuki¹, KAWASHIMA Nobuyuki¹, XU Jing^{1,2}, SUDA Hideaki^{1,2}

【研究目的】

カテプシン K は破骨細胞に特異的に発現するシステインプロテアーゼであり、骨吸収において重要な役割を果たしていることが知られている。カテプシン K 阻害剤である NC-2300 (日本ケミファ) は、関節リウマチの治療薬として新たに開発された経口投与可能な薬剤である。関節リウマチモデルにおいて、NC-2300 投与により関節の骨破壊が抑制されるばかりでなく、樹状細胞における Toll-like receptor 9 を介するシグナル伝達を阻害することにより炎症反応も抑制されることがこれまでに報告されている¹⁾。ところで、根尖性歯周炎は根尖周囲における炎症性の骨破壊を特徴とすることから、NC-2300 が根尖性歯周炎の進展を抑制する可能性が高いと思われる。本研究の目的は、ラットに実験的に誘発した根尖性歯周炎のモデルを用い、根尖性歯周炎の進展における NC-2300 の抑制効果を検討することである。

【材料および方法】

実験には、6 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。下顎第一臼歯をラウンドバーにて露髄後、抜髄し、口腔内に開放することにより根尖性歯周炎を誘発した。実験群では、露髄開放時より NC-2300 (150 mg/kg) を 1 日 2 回経口投与した。非投与群をコントロールとした。21 日後に屠殺して下顎臼歯を周囲の顎骨ごと摘出し、左側は 4%パラホルムアルデヒドリン酸塩緩衝液(PBS)にて固定(4℃, 12 時間)した後、マイクロ CT 撮影により根尖病変の大きさを測定した。その後、15%EDTA 溶液にて脱灰、OCT コンパウンドにて包埋し、厚さ 7 μm の凍結切片を作製してヘマトキシリン・エオジン(HE)染色および酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色を行い、組織学的に検討した。右側は、根尖周囲の病変部を根尖とともに一塊として摘出し、RNA 抽出後、通法に従い cDNA を作製し、リアルタイム PCR にて起炎症性サイトカイン(IL-1α, IL-6)の発現量を測定した。

【結果および考察】

根尖病変の大きさをマイクロ CT により評価した結果、コントロール群では大きな根尖病変が形成されていた。一方、NC-2300 投与群においても根尖病変は形成されていたが、その大きさはコントロール群と比較して小さかった。また、組織学的に検討した結果、コントロール群においては多数の破骨細胞が根尖周囲の歯槽骨上に観察され、活発な骨吸収が行われている像が認められた。これに対し、NC-2300 群では破骨細胞は認められるものの、その数は少ない傾向にあった。病変中の炎症性サイトカイン発現を比較したところ、NC-2300 投与群においては IL-1α および IL-6 の発現が有意に抑制されていた。

以上の結果より、NC-2300 の投与によって、破骨細胞におけるカテプシン K 阻害作用による骨吸収抑制に加えて、炎症性サイトカインの発現が減少することにより破骨細胞形成が抑制され、その結果として根尖周囲の骨吸収が抑制された可能性が示唆された。

【結論】

カテプシン K 阻害剤である NC-2300 が、ラット実験的根尖性歯周炎の進展に対して抑制効果を示した。

【謝辞】

本研究の遂行にあたり、適切なご助言およびご指導をいただいた東京医科歯科大学大学院分子情報伝達学分野 高柳広教授、ならびに NC-2300 をご供与いただいた日本ケミファ株式会社創薬研究所 山川富雄様に深謝いたします。

【文献】

1) Asagiri M *et al.* Cathepsin K-dependent Toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* 319, 624-627, 2008.

痛み発症における血小板活性化因子(PAF)受容体の関与

¹⁾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(健康増進歯学分野), ²⁾病態探究医科学講座(歯科薬理学),
³⁾日本薬科大学(薬物治療学)

○ 本山 直世¹⁾, 貴船 幸基²⁾, 森田 克也²⁾, 北山 友也²⁾, 神人 友樹¹⁾, 西村 英紀¹⁾, 兼松 隆²⁾, 土肥 敏博³⁾

Role of platelet-activating factor (PAF) receptor in the enhancement of pain sensation.

¹⁾Department of Dental Science for Health Promotion, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, ²⁾Department of Dental Pharmacology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences, ³⁾Department of Clinical Pharmacology, Nihon Pharmaceutical University.

○ Naoyo Motoyama¹⁾, Kouki Kifune²⁾, Katsuya Morita²⁾, Tomoya Kitayama²⁾, Tomoki Jinnin¹⁾, Fusanori Nishimura¹⁾, Takashi Kanematsu²⁾, Toshihiro Dohi³⁾

【緒言】 血小板活性化因子(PAF)は、種々の組織で細胞外からの刺激に応答して、細胞膜エーテル型リン脂質から phospholipase A2 によりアラキドン酸と同時に産生され、炎症・免疫系細胞の活性化、強い血管透過性亢進作用や気管支収縮作用、妊娠・分娩、循環系など多彩な生理・病態生理に関係するオートコイドとしての作用が注目されている。私達は、歯髄炎、歯周炎等の炎症部位で PAF 濃度が高いこと、さらに PAF の脊髄腔内投与により強力な接触性疼痛(アロディニア)を誘発することを見出し、この作用に PAF 受容体刺激による ATP、グルタミン酸の遊離、ATP-P2X 受容体および NMDA 受容体の活性化とそれに伴う NO 合成系が関与しており、NO 生産とそれに続く可溶性グアニル酸シクラーゼおよび PKG の活性化が脊髄における痛みシグナル伝達において重要な役割を演ずること、PKG はグリシン受容体 (GlyR) α 3 機能の抑制、即ち、痛覚抑制系を脱抑制することによりアロディニア発現に関与すること等を報告してきた(Morita et al., Pain 111:351-359, 2004; Pain 138:525-536, 2008)。これらの知見は、PAF が痛みシグナル伝達の調節に重要な役割を果たしており、PAF 受容体阻害薬が新しい鎮痛薬となる可能性を示唆するものである。本研究では、神経因性疼痛モデルにおける PAF 受容体阻害薬の効果を検討した。

【実験方法】 実験には ddY 系雄性マウスを用い、神経因性疼痛モデルとして坐骨神経部分結紮モデル、およびストレプトゾトシン(STZ, 200 mg/kg 静脈内投与 (i.v. 投与)) により誘発した有痛性糖尿病性ニューロパチーモデルを作成した。薬物は人工脳脊髄液 (ACSF) 5 μ l に溶解し第 5, 第 6 腰椎間から脊髄腔内投与 (i.t.投与) または i.v.投与した。脊髄 GlyR α 3 ノックダウンマウスは、GlyR α 3 遺伝子の特異的配列から siRNA を作成し、i.t.投与することにより作成した。アロディニア反応は、ペイントブラシによる軽い触覚刺激に対するアロディニアスコアと von Frey フィラメントによる足蹠刺激に対するマウス後足の逃避行動閾値により評価した。

【結果ならびに考察】 坐骨神経部分結紮モデルマウスにおいて、PAF 受容体阻害薬 TCV-309 (0.1 mg/kg) i.v.投与は強力に 6 日以上持続する長期間持続性の抗アロディニア作用を示し、その作用は濃度依存性であった。同様の抗アロディニア作用は構造の異なる PAF 受容体阻害薬 BN50739 および WEB2086 の i.v.投与でも認められた。これら阻害薬は経口投与しても有効であった。さらに、これら阻害薬は STZ 誘発有痛性糖尿病性ニューロパチーモデルにおいても同様の抗アロディニア作用を示した。また、PAF 受容体阻害薬を i.t.投与しても同様の抗アロディニア作用を示すことより、脊髄の PAF 受容体を阻害して鎮痛作用を惹起することが示唆された。

PAF 受容体特異的 siRNA の i.t.投与による脊髄 PAF 受容体ノックダウンマウスを作成した。PAF 受容体ノックダウンにより、脊髄該当タンパク質の 65%以上の減少を認めた。この時 PAF i.t.投与によるアロディニア発現は消失した。神経損傷モデルマウス、有痛性糖尿病性ニューロパチーモデルマウスにおいても、PAF 受容体ノックダウンによりアロディニア応答は著明に抑制されたが、PAF 受容体の発現と共に回復した。また、PAF 受容体阻害薬前処置および PAF 受容体ノックダウンにより神経損傷および STZ 誘発アロディニア発症の遅延を認め、PAF 受容体の活性化が神経因性疼痛の発症と維持に関与することを明らかにした。さらに PAF 受容体阻害薬は、慢性炎症疼痛モデル(アジュバント誘発慢性炎症性疼痛モデル)、炎症疼痛モデル(酢酸ライシングテスト、ホルマリンテスト)でも同様の鎮痛作用を発揮することを認めた。

以上より、脊髄 PAF 受容体が炎症性疼痛のみならず神経因性疼痛においても疼痛制御に重要な役割を果たしており、難治性疼痛の新しい治療薬として PAF 受容体阻害薬の有用性を示した。このことは、歯科領域における炎症、組織損傷に伴う疼痛や難治性疼痛への応用が期待される。

フィッシュコラーゲンペプチドによるヒト骨芽細胞における石灰化の促進作用

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野
○山田志津香, 池田 毅, 林 善彦

Acceleration of Osteoblastic Mineralization by Fish Collagen Peptides

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
○Yamada Shizuka, Ikeda Takeshi, Hayashi Yoshihiko

【目的】

コラーゲンは、ヒトにおいて全タンパク質の約 30%を占めるといわれている。コラーゲンの主な機能・効果として、コラーゲン合成を促進、皮膚角質層の代謝促進、創傷治癒促進、潰瘍形成の抑制、血圧上昇の抑制、変形性関節症や慢性関節リウマチの予防・改善、骨強度の向上などがあげられる。これまで、医薬品、医薬部外品にはウシ由来のコラーゲンが多用されていた。しかし、1980 年代後半から狂牛病の発症が世界的に大きな社会問題となり、現在は医療用素材としてウシ由来コラーゲンの使用が禁止されている。そこで、最近、調理後の鮮魚の皮、鱗、骨から抽出・精製されたフィッシュコラーゲンの利用に注目が集まっている。そこで、我々は、第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会において、培地に添加したフィッシュコラーゲンでヒト骨芽細胞の培養を行い、骨芽細胞の増殖ならびに分化マーカーの上昇について報告した。今回は、ヒト培養骨芽細胞を用いて、その石灰化への影響を確認するために、von Kossa 法を用いて組織学的に検討を行った。

【材料と方法】

細胞は、当教室に現有するヒト骨肉腫由来骨芽細胞(NOS-1 細胞)を使用した。

まず、35mm 培養皿に 2×10^5 cells を播種して、10% FBS 含有 α -MEM にて 37°C、5%CO₂ 下で培養を行った。コンフルエントに達した 1 週間後、5mM β グリセロリン酸ナトリウムと総濃度 0.1%(w/v)フィッシュコラーゲンペプチド(FCP)を添加した α -MEM にて培養を開始した。FCP 不含 5mM β グリセロリン酸ナトリウム添加 α -MEM で培養したものをコントロール群とした。培養 7、14、21 日目に NOS-1 細胞は 10%ホルマリン液で 40 分間固定が行われた。その後、5%硝酸銀で 90 分間置換、5%チオ硫酸ナトリウム液で 3 分間定着させた。そして、ケルンエヒトロート液で 3 分間核染を行った後、光学顕微鏡にて石灰化物の沈着を観察した。

【結果】

培養期間を通して、経時的にコントロール、FCP 群ともに石灰化塊が増大していった。しかし、コントロール群が培養 14 日目まで石灰化物が点在、21 日目によく石灰化塊が散在してきたのに対して、FCP 群は培養 7 日目から、コントロール群と比較してやや大きな石灰化物を認め、14、21 日目になるとコントロール群よりも明らかに大きな石灰化塊が存在していた。

【考察】

以前、我々は、ヒト骨芽細胞を用いた FCP 添加培地での短期培養において、細胞増殖の促進、細胞増殖・分化に関連するマーカー(osteopontin, osteocalcin, integrin β 3, BMP-2)発現ならびにアルカリフォスファターゼ活性の上昇を報告した。これらの結果から、FCP は培養初期段階で骨芽細胞機能を亢進させる可能性が示唆された。

今回は、この結果に基づいて、長期培養における FCP の骨芽細胞への影響を検討するために、von Kossa 法を用いて石灰化物の形成状況を光学顕微鏡にて観察した。その結果、コントロール、FCP 群ともに培養期間中、石灰化物の沈着を認めたが、FCP 群の方が石灰化塊の形成が早いことが明らかとなった。また、上記と同濃度のカゼインペプチド(CP)を含有した培地を用いた *in vitro* の実験では、培養 3 日目における骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性をコントロール群および FCP 群と比較したところ、CP 群はその上昇が認められなかったことを確認している。

以上の結果により、単に培地中のアミノ酸増加により栄養源が増えたことで細胞増殖や石灰化が亢進したわけではなく、FCP が、骨芽細胞の石灰化関連遺伝子に強力に作用することにより、長期培養においても石灰化を促進する可能性が示唆された。

※本研究の一部は、平成 20～21 年度日本学術振興会科学研究費補助金(若手研究 (B) No. 20791389)によった。

生体に安全なガスで生成されたプラズマによる滅菌効果 一次世代の低温滅菌法の開発を目指してー

東北大学大学院歯学研究科歯内歯周治療学分野¹ 東北大学病院附属歯科医療センター感染予防対策治療部²
○玉澤かほる¹, 玉澤佳純², 島内英俊¹

The sterilization effect of plasma produced by safety gas -Aiming to develop a new low-temperature sterilization-

Division of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry¹
Division of Infection Control, Tohoku University Hospital Dental center²
○TAMAZAWA Kaoru¹, TAMAZAWA Yoshinori², SHIMAUCHI Hidetoshi¹

【目的】

再生医療などの医療の高度化・先端化に伴い、精密でしかも生体への安全性が要求される医療器材の需要が増加し、そのために、発ガン性の問題から使用を規制されたEO(エチレンオキシド)ガス滅菌に代わる低湿・低温滅菌法の開発が急務とされている。現在,"プラズマ滅菌"と呼ばれている滅菌法(過酸化水素低温プラズマ滅菌システム, ステラッド®, ジョンソン・エンド・ジョンソン)では,プラズマは滅菌行程の主体ではなく,有毒な過酸化水素ガスの分解・無毒化を主に担うにすぎず(玉澤ら, 医学 2001, 日歯保存誌 2005),滅菌終了後も過酸化水素ガスの残留がある(玉澤ら, 医学 2006; 上田ら, 医学 2008)などの問題点が指摘されている。本研究の目的は,このような背景から,生体に安全なガスで生成したプラズマによる低温滅菌法を開発することにある。

【材料と方法】

1. 処理装置と処理ガス

プラズマ装置として,工業用プラズマアッシング装置(PACKIII, ワイエイシイ(株))を用い,処理ガスとしてO₂, "O₂+H₂O", "Air+H₂O"を用いた。"O₂+H₂O"および"Air+H₂O"は, O₂あるいはAirの導入管をガラス瓶に蓄えた蒸留水中を通過させることにより供給した。

2. 滅菌効果の評価

2種類の医療滅菌用芽胞懸濁液(*G. stearothermophilus*: ATCC#7953, 2.2×10⁶ Spores/0.1ml, NAMSA; *B. atrophaeus*: ATCC#9372, 2.2×10⁶ Spores/0.1ml, NAMSA)を各々ステンレス製の円柱台(内径10mm 深さ1mm)に100μl 滴下し,乾燥したものを試料とした(以下,調製したそれぞれの試料を*G. stea* 試料, *B. atro* 試料と略す)。試料は,プラズマ処理(出力150W,チャンバ温度60℃)した後,Trypticase Soy Broth(BBL)中で,*G. stea* 試料は58℃,*B. atro* 試料は32℃にて72時間培養した。液の濁りの有無で培養の陽性・陰性を判定した。併せて,真空処理と加熱処理による滅菌効果についても調べた。

【結果および考察】

- 10⁵CFU *G. stea* 試料に対して,処理ガス(3種),ガス圧(13~100 Pa),ガス流量(50~500 ml/min)をパラメータとして10分間プラズマ処理後の滅菌効果を検討した。その結果,13~50Paで処理した108試料で検討すると,"O₂+H₂O"プラズマの滅菌効果が最も高く(χ²検定, p<0.05),次いでO₂, "Air+H₂O"の順であった。また,処理ガスの圧力が低く(高真空ほど),流量も低い方が滅菌効果が高くなる傾向にあり,ガス圧13Pa,ガス流量50ml/minの条件では,O₂群(6試料),"O₂+H₂O"群(6試料),"Air+H₂O"群(6試料)の全てが培養陰性を示した。なお,同時に処理したガラス板(試料置き台)の温度をサーモラベルで測定したところ,65~71℃であった。
- 10⁵CFU *B. atr* 試料は7分以上で,10⁶CFU *B. atr* 試料は20分で陰性培養が得られた。
- 10⁵CFU *G. stea* 試料をチャンバに入れ,圧力を5Pa未満に維持した状態で,60℃~140℃に10分加熱し,プラズマ放電しない場合の滅菌効果を検討した。その結果,陰性培養を得るには,真空下では120℃の加熱が必要であり,大気圧下では140℃に加熱しても陰性培養は得られなかった。

以上より,O₂, Air, H₂Oという生体に安全なガスを用いて,チャンバを60℃に維持して,低いガス圧下でプラズマ処理をすると10分間で高い滅菌効果を得られることが示された。特に,"O₂+H₂O"プラズマで滅菌効果が優れていたが,これはH₂Oの分解・励起により,Oラジカルだけでなく,OHラジカルが生成されたことで,滅菌効果が高くなったものと推察された。

キトサンスポンジに添加した bFGF の徐放性に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野

○池田 毅, 石崎秀隆, 松永常典, 柳口嘉治郎, 山田志津香, 林 善彦

Controlled release of bFGF from chitosan sponge

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
IKEDA Takeshi, ISHIZAKI Hidetaka, MATSUNAGA Tsunenori, YANAGIGUCHI Kajiro, YAMADA Shizuka,
HAYASHI Yoshihiko

【目的】

組織内で細胞の増殖と分化誘導を行い、正常組織や臓器を再生させる治療の試みが再生医療である。それには増殖と分化に適した場を構築することが重要であり、この再生の場の構築には細胞の足場ならびに細胞増殖因子などの活用が不可欠である。特に、足場は酸素や栄養分を供給する脈管系の誘導や細胞増殖のため、空間確保ならびに細胞群の三次元配列の再構成といった非常に重要な役割が求められている。足場材として従来より無機材料や有機高分子を用いた細胞の三次元培養可能な多孔性担体の検討がなされており、前者には HAP や β TCP や CaCO_3 などがあり、後者には天然高分子としてコラーゲン、ゼラチン、セルロース、ヒアルロン酸やキチン・キトサンなどがあげられる。

キチンは、昆虫類、カニやエビの外骨格や細菌の細胞壁に存在し、N-アセチル-D-グルコサミンを基本構成単位とする生体内高分子のアミノ多糖体である。また自然界ではセルロースに次いで多量に存在し、キチンを脱アセチル化処理して得られるキトサンは生体親和性、生分解性や細胞接着に優れ、様々な形状への加工特性も担持することから細胞の足場となる天然素材として有益なバイオマテリアルの一つである。我々の教室では以前よりこのような特性を利用し、キトサンによって骨芽細胞の増殖と分化の亢進、生物学的初期石灰化促進効果などの有用性を実証してきた。

そこで今回、硬組織再生を目指した細胞の足場材として、キトサンから作製した多孔性担体へ細胞増殖因子を添加した場合の徐放性について検討を行った。

【材料および方法】

2%酢酸にて1、2、4%キトサン(甲陽ケミカル社製 MW 約10万、DA85%)溶液を作製し、50°C2時間攪拌後 pH7.4 に調整した。その後24時間真空脱気を行い、4°C2時間、0°C12時間、-35°C24時間、-80°C24時間の冷却スケジュールの後、最終的には凍結乾燥処理を行いスポンジ状に成形した。スポンジ体の表面および内部微細構造は走査型電子顕微鏡にて観察した。またキトサン濃度の違いによるスポンジ体について気孔径および気孔率を比較検討した。

スポンジ体の徐放性を検討するため、細胞成長因子として既に許認可されている rh-bFGF 製剤であるフィブラストスプレー(科研製薬社製)をスポンジ体に添加したのち、PBS(pH7.4)に浸漬後の経時的な遊離量を ELISA 法で計測した。また、コラーゲン製スポンジ体を対照とした。

【結果および考察】

気孔径については150~300 μm を目安とした。その結果キトサン濃度が大きくなるにしたがって pore size が小さくなり気孔壁の厚さも増大する傾向を示した。気孔率に関しては75~85%程度となり有意差はみられなかったが、キトサン濃度が大きくなるにしたがって porosity の減少傾向が認められた。

徐放性については、1%キトサン群では浸漬後1週間経過時に約80%が放出され、2%群では2週間経過時に70%が放出され、4%群では2週間経過時に50%が放出され、その後も持続的に遊離された。このことよりキトサン濃度が大きくなるにしたがって徐放性が継続される傾向となったが、これはキトサン分子に固定される増殖因子が増加した結果、静電的効果により遊離する時間が延長されたものと示唆された。

【結論】

生体吸収性高分子内に固定された細胞増殖因子が担体の分解とともに徐放化されることによって、周囲組織に因子濃度を必要な期間に渡って有効域に保つことで、細胞の増殖と分化が高まり、生体組織の再生が促進される。将来人体に用いる臨床応用を前提とした場合、マテリアルの安全性の確保は当然のことながら、その形状、物性、化学的特性、さらには様々な細胞成長因子を徐放させるなどの機能性や適当なタイミングでの生分解性、加工性などを考慮したマテリアルエンジニアリングとしての研究・開発がさらに必要である。

口腔病原菌に対する高周波・電磁波照射の殺菌効果

¹⁾徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 発達予防医歯学部門 健康長寿歯科学講座
歯科保存学分野、²⁾医療法人とみなが歯科医院、³⁾日本大学松戸歯学部 臨床薬理学講座
○湯本浩通¹⁾、富永敏彦^{1,2)}、平尾功治³⁾、柴田眞吾¹⁾、松尾敬志¹⁾

The Effects of Electro-Magnetic-Wave on Oral Bacterial Viability

¹⁾Department of Conservative Dentistry, Institute of Health BioSciences, The University of Tokushima Graduate School, ²⁾Tominaga Dental Clinic, ³⁾Department of Clinical Pharmacology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Hiromichi YUMOTO¹⁾, Toshihiko TOMINAGA^{1,2)}, Kouji HIRAO³⁾, Shingo SHIBATA¹⁾, Takashi MATSUO¹⁾

【研究目的】

感染根管治療においては、根管系が非常に複雑な形態であることから、完全に病原細菌や感染歯質を除去する事は困難であり、通常の治療に反応せずに予後不良の場合には、抜歯せざるを得ない場合もある。さらに近年、根管系のみならず根尖孔外の歯根表面に病原細菌が Biofilm を形成し、これが持続的な慢性炎症を惹起し、難治性の炎症疾患を形成している原因である事が示唆されている。しかしながら、このような複雑な根管系から病原細菌や感染歯質を除去する方法としては、根管治療用器具（ファイル等）やレーザー等を改良したという報告をみるのみであり、その除去効果や器具到達領域に限界がある事から改善の余地は大きく残されている。すなわち、複雑な根管系や根尖孔外に棲息・定着している細菌を殺菌する事が可能となれば、炎症の改善・消退や歯槽骨・歯周組織治癒を促進し、臨床成績を向上し得る可能性がある。本研究では、病原細菌の消毒・軟組織の焼灼・凝固及び治癒促進に応用されている高周波治療と電磁波の電磁エネルギーにより発生するジュール熱を利用したジアテルミー療法に着目し、まず初めに高周波・電磁波照射の口腔内細菌に対する殺菌効果について検討した。

【材料および方法】

1. 高周波・電磁波照射器と能動電極： 周波数は 500 kHz～1,000 kHz に設定し、通電時間は 1 秒間に規定し、能動電極は Mani 社製 K-file を使用した。顕熱物質として卵白やアルブミンを 45mm 注入した透明樹脂製円柱状容器に、能動電極（K-file #10 号～40）を容器中に挿入して、20 W 出力で 1 秒間通電させ、生じた蛋白凝固層を観察した。
2. 電磁波・高周波照射の口腔内細菌に対する殺菌効果の解析： 寒天培地上に播種した大腸菌(*Escherichia coli*)や口腔内細菌(*Fusobacterium nucleatum*)に、能動電極として K-file (#10)を用いて高周波・電磁波を照射し、生じた発育阻止円の直径を測定した。また、口腔内細菌(*Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mutans*, *S. intermedius* や *Enterococcus faecalis*)の菌懸濁液に高周波・電磁波を照射後、培養し、colony count を行って殺菌効果を解析した。
3. 高周波・電磁波照射による口腔内細菌の電子顕微鏡下での形態変化の観察： 高周波・電磁波照射による形態変化を走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察を行った。

【結果および考察】

1. 卵白やアルブミンに 500 kHz～1,000 kHz の高周波・電磁波照射後、生じた蛋白凝固層を確認すると、能動電極である File 先端部の側面方向に 1-2 mm 程度の蛋白凝固層が認められた。
 2. 寒天培地上に播種した *E. coli* や *F. nucleatum* に、上記と同様に高周波・電磁波を照射すると約 2-3 mm の阻止円が確認され、上述の蛋白凝固層と同様に、寒天培地上で側方に向けての殺菌効果が確認できた。
 3. *Porphyromonas gingivalis*, *F. nucleatum*, *Streptococcus mutans*, *S. intermedius* や *Enterococcus faecalis* の菌懸濁液に高周波を照射すると、照射回数依存的に colony count により顕著な viability の減少、すなわち殺菌効果が認められた。
 4. SEM 観察により、電磁波・高周波照射後のレンサ球菌では明らかな連鎖の減少と変性した細菌塊が認められた。
- これらの結果より、高周波・電磁波照射は、蛋白凝固効果に加えて、顕著な殺菌効果を認め、根管系に棲息する病原細菌の殺菌に有効である可能性が示唆された。さらに、今回の方法では、根管治療に使用する細く・フレキシブルな根管治療用 file を応用できることから、細く彎曲した根管のみならず、根尖孔外にも照射可能である利点を有する事が示唆された。

ヒト象牙細管の機能的幅径計測の試み

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

○李 穎, 池田 英治, 須田 英明

An Attempt to Measure Functional Space of Dentinal Tubules in Human Dentin

Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences,

Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

○LI Ying, IKEDA Hideharu and SUDA Hideaki

【研究目的】

象牙質には高密度の象牙細管が存在し、外界と歯髄を結ぶルートとして、外来刺激とのバランスをとりながら歯髄生活性は維持されている。すなわち、細菌およびその分解産物、化学的刺激性物質の歯髄内への侵入に対しては、歯髄組織圧に由来する象牙細管内容液の外向きの流れが、生体防御機構として働いている。また、象牙質刺激によって象牙細管内容液の内外への急速な移動が生じ、感覚神経終末が変形するため鋭痛が生じることも、動水力学説として広く知られている。

しかし、象牙細管はエナメル質側に向かって先細りし、内部には象牙芽細胞突起や感覚神経終末などが存在しているので、水力学的圧の及ぶスペースは複雑な形状であることが推測される。電子顕微鏡写真から細胞成分と象牙細管壁との距離を推測できるが、収縮変形を考慮しなければならない。そこで本研究は、生体に近い状態で、ヒト象牙細管がどれほど大きい機能的幅径を有しているかを計測することを目的とした。

【材料および方法】

本研究は東京医科歯科大学歯学系倫理審査委員会の承認を得て行われた。研究内容に関する説明を行い、歯の提供に同意の得られた患者から、矯正治療目的で抜歯された新鮮ヒト小白歯6本を用いた(年齢14、14、15、23、27、29歳)。4歯では抜歯後速やかに、歯冠象牙質を露出させる直径2mmの窩洞を歯冠中央の近遠心、頬舌側の4カ所に形成した。半数の窩洞で象牙質のエッチング処理を行った。事前に演者Aが混和した、外径と励起波長の異なる fluorescent microsphere を混和した液を、内容物を知らない演者Bが窩洞内に30分間作用させた。残りの2歯(14、15歳例)では脱臼し、抜歯直前に4窩洞を形成し、microsphere 混和液を2分間作用後直ちに抜歯した。固定、脱灰後、凍結標本を作製し、蛍光顕微鏡下で microsphere の象牙質、歯髄進入深度を画像解析ソフト上で計測した。

【成績】

- ①Microsphere 液を脱臼状態で作用させた歯では、象牙質外側1/3～中央1/3に0.1～0.5 μm までの microsphere が集積し、内側1/3では数個のみ確認できた。象牙芽細胞層および歯髄では、microsphere は確認されなかった。
- ②microsphere 液を抜歯後作用させた歯では、窩洞直下から象牙質外側1/3にかけて0.1～0.5 μm の microsphere が確認できた。しかし、1.0～4.0 μm の microsphere の集積は、象牙質外側1/3のみに限られていた。1歯(14歳例)のみ、数個の0.1～0.5 μm の microsphere が内側1/3に確認された。
- ③エッチングの有無、窩洞の位置は到達深度に影響しなかった。

【考察】

ヒト歯冠部象牙質の内側1/3には、0.5～1.0 μm の隙間が存在し、象牙細管内容液はそのスペースを移動することが推測された。それより大きい microsphere は、通過が困難であることが示唆された。外向きの組織圧が microsphere の侵入を妨げるとともに、象牙芽細胞突起を外側に伸展させているのかもしれない。

【結論】

fluorescent microsphere を用いた方法は、ヒト象牙細管腔で動水力学的に象牙細管内容液が移動できるスペースをシュミレーションできる方法であると考えられる。

ラット骨髓細胞における EMD 由来合成ペプチドによる骨分化関連遺伝子への影響

¹大阪歯科大学 歯周病学講座, ²大阪歯科大学 口腔病理学講座
○田口洋一郎¹, 安井菜津希¹, 寺田昌一郎¹, 富永和也², 田中昭男², 上田雅俊¹

Effect of oligopeptide derived from enamel matrix derivative on genes related to osteogenic differentiation in rat bone marrow cells

Osaka Dental University, ¹Department of Periodontology, ²Oral Pathology

○Yoichiro Taguchi¹, Natsuki Yasui¹, Shoichiro Terada¹, Kazuya Tominaga², Akio Tanaka², Masatoshi Ueda¹

【目的】

幼若ブタの歯胚から抽出されたエムドゲイン® (以下, EMD と略す) は, 歯槽骨吸収の著しい歯周炎患者の歯周組織再生, とくにセメント質を誘導し歯周組織の再生を促す薬剤として現在広く臨床応用されている。しかし, 現在市場に流通している EMD は生物由来材料のため, 未知の病原体の問題点を払拭できず患者からの拒否感があるのも事実であり, 生物に由来しない合成ペプチドの開発が望まれている。今回, EMD の基礎研究から得た成果をもとに作製した新規合成ペプチドの骨髓細胞に対する分化誘導の影響について, 骨芽細胞への分化マーカー関連遺伝子の発現量を元に検討した。

【材料と方法】

生後 7 週齢の SD 系雄性ラットの両側大腿骨から骨髓細胞を採取し 10% FBS・抗菌薬含有 MEM にて初代培養を確立し, 3 代目を 1 穴あたり 4×10^4 個ずつ播種し実験に供した。各培地に 10 mM β -グリセロリン酸ナトリウムと 82 μ g/mL アスכולピン酸含有の分化誘導培地を用い, 20, 100, 200 ng/mL の各濃度で合成ペプチドを溶解させ骨髓細胞に応用した。対照群として合成ペプチドを含まない培地を用いた。培養後 3, 7 および 14 日の骨髓細胞から通法に従い Total RNA を抽出し逆転写反応によって cDNA を作製し, Applied Biosystem 社製 StepOne Plus™ リアルタイム PCR システムを用いて骨芽細胞への分化マーカーである Runx2 mRNA, ALP mRNA, Osetocalcin mRNA の遺伝子発現量について解析を行なった。

【結果】

骨芽細胞への初期分化マーカーである Runx2 mRNA については, 培養後 3 および 7 日においては対照群と有意な差は認められなかったが, 培養後 14 日においては 100, 200 ng/mL の濃度の合成ペプチド応用群において有意な差が認められた。

骨芽細胞への中期分化マーカーである ALP mRNA についても, Runx2 mRNA と同じく培養後 3 および 7 日においては対照群と有意な差は認められなかったが, 培養後 14 日においては有意な差が認められなかったものの 100, 200 ng/mL の濃度の合成ペプチド応用群において対照群と比べて発現量が高い傾向がみられた。

骨芽細胞への中・後期分化マーカーである Osetocalcin mRNA については, 培養後 7 日において 3 および 14 日に比べて発現量は高く合成ペプチドの応用が高濃度ほど発現量が高かった。しかし, 培養後 3 および 14 日においては, 対照群と比べて発現量に有意な差は認められなかった。

【考察】

今回, EMD の基礎研究をもとに作製した新規合成ペプチドの骨分化誘導能の存在は明らかとなった。また, Runx2 mRNA と ALP mRNA の発現からみても培養後 14 日前後で合成ペプチド応用の骨分化誘導が認められる。しかしながらその一方で, Osetocalcin mRNA の発現において 7 日から 14 日にかけて発現量の減少傾向がみられる点において更なる解析・検討が必要と考えられる。

歯周治療における抗ジンジパイン鶏卵抗体を用いた受動免疫療法の併用効果

日本大学歯学部歯周病学講座¹, 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門²,
ビーンスターク・スノー (株) 開発部³, (株) ゲン・コーポレーション免疫研究所⁴,
○菅野 直之^{1,2}, 高根 正敏^{1,2}, 山村 淳一³, Nguyen Van Sa⁴, 吉沼 直人^{1,2}, 伊藤 公一^{1,2}

Adjunctive effects of passive immunization using anti-gingipain egg yolk antibody containing tablets in periodontal treatment

Departments of Periodontology¹, Dental Research Center Divisions of Advanced Dental Treatment²,
Nihon University School of Dentistry, Research & Development Dept., Bean Stalk Snow Co., Ltd.³,
Immunology Research Institute, GHEN Corporation⁴

○Naoyuki SUGANO^{1,2}, Masatoshi TAKANE^{1,2}, Junichi YAMAMURA³, Nguyen Van SA⁴, Naoto YOSHINUMA^{1,2},
Koichi ITO^{1,2}

【目的】

グラム陰性の偏性嫌気性菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は、歯周病の最も有力な原因菌であると考えられている。*P. gingivalis* の産生するジンジパインは、発育増殖に不可欠な因子であると同時に、宿主タンパクを広範に分解し宿主免疫機構の破綻をきたす重要な病原因子である。本研究では、ジンジパインを標的とした受動免疫療法を併用した歯周治療の可能性について検討した。

【材料および方法】

受動免疫療法に用いた抗体は、ジンジパイン抗原を接種した鶏から採卵、卵黄別し精製したものをを用いた。総数 34 名の軽度歯周炎を有する被験者を対象に、全顎のスクレーリング・ルートプレーニングならびに歯面研磨を行った後、鶏卵抗体含有タブレットを毎食後 (朝、昼、晩) あるいはブラッシング後、1 日 3 個、12 週間使用した。テスト群のタブレットは抗ジンジパイン鶏卵抗体を 220mg 含み、コントロール群は免疫をしていない鶏卵抗体を同量含むタブレットとした。臨床パラメータとして 6 歯を対象に歯周ポケット深さ (PD)、プロービング時の出血 (BOP) およびプラークコントロールレコード (PCR) を記録した。また、ペーパーポイントを用いて、最深 PD 部位の歯肉縁下プラークを採取し、*P. gingivalis* 菌数および総細菌数を PCR-Invader 法で測定した。

【結果】

臨床パラメータでは、テスト群、コントロール群のいずれにおいても PCR に変化は見られなかったが、BOP は減少傾向にあった。一方、PD はテスト群で有意 ($P < 0.05$) な減少が見られた。細菌学的検討では、テスト群において歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数および総細菌数に対する *P. gingivalis* 菌数の割合が有意 ($P < 0.05$) に減少したが、コントロール群では有意な変化は見られなかった。

【考察および結論】

これまでの研究において、抗ジンジパイン鶏卵抗体含有タブレットを単に使用するだけでは、歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数に影響を与えることは無く、効果は限定的であった。しかし、本研究ではスクレーリング・ルートプレーニングおよび歯面研磨後にタブレットを使用することにより、12 週後での歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* 菌数の有意な減少が見られたことから、歯周治療において受動免疫療法は、機械的プラークコントロールと組み合わせることによってその効果を、より発揮するものと考えられた。

2型糖尿病患者における歯周治療の影響

東京医科歯科大学大学院歯周病学分野¹, 東京医科歯科大学大学院歯科医療行動科学分野²,
北海道医療大学歯周歯内治療学分野³, 東京医科歯科大学 GCOE プログラム⁴

○和田 真由子¹, 片桐 さやか¹, 新田 浩², 長澤 敏行³, 小林 宏明¹, 竹内 康雄¹, Bharti Pariksha^{1,4},
谷口 陽一¹, 南原 弘美¹, 高松 秀行¹, 和泉 雄一^{1,4}

Effect of periodontal treatment in patients with type2 diabetes mellitus.

Sections of Periodontology¹, Behavioral Dentistry², Graduate School, Tokyo Medical and Dental University,
Section of Periodontology and Endodontology, Health Science University of Hokkaido³,
GCOE program, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University⁴

○Mayuko Wada¹, Sayaka Katagiri¹, Hiroshi Nitta², Toshiyuki Nagasawa³, Hiroaki Kobayashi¹, Yasuo Takeuchi¹,
Bhariti Pariksha^{1,4}, Youichi Taniguchi¹, Hiromi Nanbara¹, Hideyuki Takamatsu¹, Yuichi Izumi^{1,4}

【研究目的】 近年、歯周病と糖尿病は相互に影響することが明らかとなってきた。しかしながら、糖尿病患者における歯周治療の血糖コントロールへの影響については結論には至っていない。歯周病患者の血液中の炎症性マーカーのレベルは一般的に高く、歯周治療後に低下すると報告されている。歯周治療が糖尿病に影響するメカニズムとして、CRP や様々なサイトカインが関わっていると考えられているが、糖尿病患者を対象にした歯周治療がサイトカインレベルに与える影響を調査した報告はほとんどない。本研究は 2 型糖尿病患者における歯周治療が炎症性マーカーである C-reactive protein (CRP)、IL-6、TNF- α およびインスリン抵抗性を改善する Adiponectin、Resistin に影響を与えるかどうかを検討した。

【材料および方法】

・対象：40～80 歳の血糖コントロール状態が安定している (HbA_{1c}6.5～8.5%)2 型糖尿病患者で、過去 2 か月間糖尿病の治療方法を変えておらず、Probing Pocket Depth (PPD)4mm 以上の歯が 4 歯以上ある歯周病患者 21 名 (男性 14 名、女性 7 名) を被験者とした。除外基準は、過去 3 か月以内の抗菌剤を服用した者、過去 6 か月以内に歯周治療を受けた者、テトラサイクリン系抗菌剤にアレルギーがある者および喫煙者とした。

・方法：歯周治療の開始前、治療終了 2、6 か月後に、歯周組織の評価として、PPD、Bleeding on Probing (BOP)、口腔衛生状態の評価として Plaque Control Record (PCR) を測定した。代謝コントロールの指標として HbA_{1c} を測定した。血清中の CRP、IL-6、TNF- α 、Adiponectin、Resistin を測定した。研究期間中、内科的な糖尿病治療は変更なく行われた。

・治療介入方法：歯周治療は 2 か月間に 4 回の歯周治療を行った。口腔衛生指導と超音波スケーラーを用いた歯肉縁上、歯肉縁下のデブライドメント、および各回治療後に口腔内全体の歯周ポケットに対して抗菌剤 (ペリオフィール®) を局所投与した。

・統計分析：治療前後の比較には Wilcoxon signed ranked test を用い、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

【結果】

・歯周治療後に、歯周組織および口腔衛生状態の評価項目 (PPD、BOP、PCR) で有意な改善が認められた。

・歯周治療 6 か月後で HbA_{1c} の有意な改善が認められた。

・歯周治療前後において、血清中の CRP、IL-6、TNF- α 、Resistin に有意な変化は認められなかった。

・歯周治療 6 か月後に、Adiponectin が有意に増加した。

・研究期間を通して、BMI の有意な変化は認められなかった。

【考察】 本研究の被験者は歯周病の状態は有意に改善し、また歯周治療 6 か月後において HbA_{1c} の有意な改善と血清中の Adiponectin の有意な上昇が認められた。Adiponectin は脂肪細胞より分泌され、インスリンの感受性を高め、糖尿病や動脈硬化に対して予防的な働きをすると考えられている。本研究期間中に被験者の BMI の有意な変化は認められなかったことから、2 型糖尿病患者における歯周治療による血糖コントロールの改善のメカニズムに Adiponectin が関与している可能性が考えられる。

【結論】 歯周治療の介入による 2 型糖尿病患者の血糖コントロールの改善に、Adiponectin が関与している可能性が示唆された。

加速度センサを搭載した電動歯ブラシのプラーク除去効果

日本歯科大学新潟病院総合診療科¹ 日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座²

オムロンヘルスケア株式会社³

○高塩智子¹, 両角祐子², 岩堀敏之³, 山下亜希², 多田和弘², 菅原淳道², 中村俊美¹, 佐藤 聡²

Plaque Removal Efficacy of Introducing Accelerometer in Powered Toothbrush

¹Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University, Dental Hospital at Niigata

²Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

³Omron Healthcare Co.,Ltd.

【目的】

歯周病の予防および治療において、プラークコントロールは重要な治療法の1つであり、様々な器具が使用されている。その中でも電動歯ブラシは各種手用歯ブラシに加え、比較的簡便かつ有効にプラークコントロールが行える手段として広く普及している。電動歯ブラシの清掃性に関与する要素としては、運動様式、振幅、振動数などが考えられている。振動数が高い電動歯ブラシはプラークを効率よく除去できる一方、歯周組織に対する影響も否定できない。一般的に用いられるブラッシング方法の一つに毛先を歯軸に対し45度に傾け、毛先の一部が歯肉溝の中に入るようにするパス法がある。パス法は、プラークの除去効果が高く、歯面の磨耗も少ないが、刷掃角度(刷毛の歯面に対する角度)など正しい技術の習得が難しいとされている。そこで、本研究では、刷掃角度に応じ振動数が変化する加速度センサを搭載した音波式電動歯ブラシを用い、運動様式の違いによるプラーク除去効果を比較検討した。

【対象および方法】

被験者は日本歯科大学新潟病院で診療に従事する歯科医師6名(男性3名、女性3名、平均28.8歳)とし、被験歯は全歯を対象とした。

本研究ではトリプルクリアブラシスリムを装着した音波式電動歯ブラシ(HT-B551、オムロンヘルスケア株式会社、京都)を用いた。この電動歯ブラシは、加速度センサを利用して刷掃角度が0度付近、45度付近、90度付近においてそれぞれ高速、中速、低速に振動数が自動的に変化する運動様式と一定の振動数を維持する従来型の運動様式を有している。この2つの運動様式においてそれぞれ3分間ブラッシングを行い、ブラッシング前後のプラークスコアの変化からプラーク除去率を求めた。プラーク付着状態の検査は、0' LearyらのPlaque Control Recordに準じて測定し、本研究では6点法に加え、臼歯部の咬合面も検査対象とした。

【結果および考察】

全類的なプラークの平均除去率は振動数が自動的に変化する運動様式では74.5±6.5%、従来型の運動様式では66.9±11.3%であった。隣接面のプラーク平均除去率は振動数が自動的に変化する運動様式では67.8±6.6%、従来型の運動様式では59.7±13.3%と、一定の速度を維持する従来型の運動様式はプラーク除去効果が最も高い高速で使用したにもかかわらず、振動数が自動的に変化する運動様式に比較し、プラーク除去率が低かった。部位別の比較でも、頬側、舌側、前歯部、臼歯部において自動的に変化する運動様式の方がプラーク除去率が高く、同様の結果であった。

本研究で用いた音波式電動歯ブラシの振動数が自動的に変化する運動様式は、頬舌側面において低速でありながら共振により振動振幅が増大する運動様式で動作するため、硬組織、軟組織に対する影響が少ないにも関わらず、比較的高いプラーク除去効果を得られる。一方、一般に高速で動作する電動歯ブラシは高いプラーク除去効果を得られる反面、伝わる振動や音などが違和感として感じられ、ブラッシング時間が短くなる傾向にある。このため、振動数が自動的に変化する運動様式では高速で動作する従来型の運動様式と比較し、特に頬舌側面においてブラッシング時間が確保でき、結果的に振動数が自動的に変化する運動様式のほうが高いプラーク除去効果を得られたと考えられる。したがって、従来型の高速で一定の振動数を維持する音波式電動歯ブラシに対して、共振領域を利用した音波式電動歯ブラシにおいてブラッシング部位に応じた最適動作モードを選択する機能を付加することにより、さらに効果的なプラークコントロールが可能になるとともに、プラークコントロールの際の歯周組織に対する影響も少なくできると考えられる。

歯周病の進行リスクについての追跡調査

花王株式会社 パーソナルヘルスケア研究所
○押野 一志, 市村 育久, 山岸 敦, 高柳 篤史

The cohort study related to risk factors for periodontal disease progression

Global R&D - Personal Health Care, Kao Corporation

○OSHINO Kazushi, ICHIMURA Ikuhisa, YAMAGISHI Atsushi, TAKAYANAGI Atsushi

【研究目的】

歯周病、特に慢性歯周炎は部位特異性があり、成人有病率が高い疾患であり、口腔清掃の不良のみならず、喫煙、ストレスなどがリスク因子としてあげられている。これまで我々は、一般の生活者を対象とした横断的研究において、Probing Pocket Depth (PPD) は Oral Hygiene Index (OHI) との相関性が高く、PPD が深い部位ほど *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) や *Tannerella forsythia* (*T.f.*) の菌数が多いことを第 47 回春季歯周病学会で報告した。また、ブラッシング圧が低い人ほど OHI が大きくなる傾向があり、ブラッシング指導を受けてもほとんどが自己流に戻ってしまうことを第 53 回口腔衛生学会で報告した。しかし、日本人の歯周病の進行リスクについての縦断的研究は少ないことから、これらの関連性を明らかにすべく、既報の横断的研究と同じ被験者を対象にして追跡調査を行った。

【材料および方法】

4 年前の調査に参加し、更に本研究に同意を得られた首都圏に在住する 31~61 歳の女性 37 名 (手動ハブラシ使用、歯周治療の経験なし) を被験者とした。アンケート用紙により、歯みがき回数、ブラッシング方法、喫煙、飲酒、飲茶、運動などの生活習慣、病院への通院、ストレス自覚について調査した。また、4 年前と同じ歯科医師 (10 年以上の臨床経験あり) が全額について、PPD、Bleeding on Probing (BOP)、OHI の測定を行なった。その後、4 年後の PPD 平均値を目的変数として 4 年前の測定値や生活習慣を投入した重回帰分析、4 年間の PPD 平均値の変化や BOP 変化を目的変数として 4 年間の生活習慣を投入した重回帰分析、更に、主な調査項目別に 4 年間の PPD 平均値の増加に対する相対リスクの計算を行った。なお、統計解析は SPSS16.0J を用いた。

【結果および考察】

PPD 平均値は 4 年間で増加 27 人、減少 10 人で、被験者全体の平均値は $2.20 \pm 0.46\text{mm}$ から $2.42 \pm 0.33\text{mm}$ へ増加した ($p < 0.005$)。重回帰分析の結果、4 年後の PPD 平均値に対しては OHI 平均値・運動習慣 (週に 1 回以上) なし が説明変数として選択され、4 年間の PPD 平均値の変化量に対しては 4 年間の BOP 変化量・飲酒 (週に 3 回以上) あり が説明変数として選択され、4 年間の BOP 変化量に対しては 緑茶の飲用 (1 日 5 杯以上) なし・年齢・ストレス自覚 が説明変数として選択された。また、4 年間で PPD 平均値が増加する相対リスクは、OHI 平均値 (1.0 以上) 1.15 倍、*P.g.* 検出 0.87 倍、*T.f.* 検出 1.14 倍、歯みがき回数 (2 回 vs 3 回) 1.22 倍、ブラッシング圧の平均値 (190g 以下) 1.85 倍、喫煙あり 1.22 倍、病院通院あり 1.25 倍、ストレス自覚あり 1.63 倍 であった。

PPD への寄与が大きい因子として OHI があげられ、ブラッシング圧が低い人や歯みがき回数が少ない人ほど口腔清掃が不良になるために、細菌由来の刺激が大きくなり PPD が進行しやすくなると考えられる。一方、*P.g.* や *T.f.* は、PPD が深い活動性病変に多く存在するが、同じ人の 4 年後の PPD との関連性は見出されなかったことから、PPD の発症や進行のリスク因子としての可能性は低いと考えられる。また、炎症活動性の指標と考えられる歯肉出血の増減は PPD の増減への関連性が高いことから、歯肉出血の環境因子である 緑茶の飲用なし・ストレス自覚 とは逆に、緑茶の飲用 (1 日 5 杯以上) あり・ストレス自覚の低減 ができれば、歯周病の進行抑制につながる事が期待される。

【結論】

一般の日本人女性を対象にした 4 年間の縦断的研究により、ブラッシング圧が低い・歯みがき回数が少ないは 歯周病進行のリスク因子に、緑茶の飲用なし・ストレス自覚は 歯肉出血のリスク因子に なりうる事が示唆された。

歯周病学卒前基礎実習(模型実習)による基礎知識習得効果の検討

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学(口腔治療学教室)
○佐保輝之、北村正博、小林良平、市川朋生、小澤康宏、山下元三、柳田 学、橋川智子、野崎剛徳、
山田 聡、島袋善夫、村上伸也

Educational Effects of Basic Training of Periodontics

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Teruyuki SAHO, Masahiro KITAMURA, Ryohei KOBAYASHI, Tomoo ICHIKAWA, Yasuhiro OZAWA, Motozo YAMASHITA, Manabu YANAGITA, Tomoko HASHIKAWA, Takenori NOZAKI, Satoru YAMADA, Yoshio SHIMABUKURO and Shinya MURAKAMI

【目的】歯周病学を効果的に習得するためには、様々な歯周治療の手技や歯周治療に特有な使用器具の理解が必要である。大阪大学歯学部口腔治療学教室では学生の歯周病学に対する理解を支援するため、従前からの歯周治療の手技および症例の写真や図を多用した講義に加え、歯周病の病態を再現した実際の三次元素材(顎模型)を導入して、臨床により近似した模型実習を実施してきた。そこで今回、より効果的な歯周病学卒前基礎実習法(模型実習)を確立することを目的として、歯学部学生を対象に模型実習の基礎知識習得効果について検討した。

【材料および方法】

顎模型は、歯槽骨欠損(1-4 壁性骨欠損、クレーター状欠損、根分岐部病変)や歯肉増殖、歯肉退縮等を可塑性樹脂とシリコンゴム製粘膜により再現したものを株式会社ニッシン(京都)に依頼し作製したものを使用した。そして、大阪大学歯学部4年生63名を対象として、この顎模型を用いてプロービングなどの検査法、スケーリング、ルートプレーニング、暫間固定などの歯周基本治療およびENAP、歯肉切除術、歯肉剥離搔爬術、歯根切除などの歯周外科処置に至る歯周病学卒前基礎実習(模型実習)を行った。今回の研究では、歯周病学の講義終了後、上記模型実習の前後に同じ歯周治療学に関する複数の選択式設問に解答させ、実習前後の正答率について比較検討した。

【結果】

1. グレーシーのキュレットを含め歯周治療に使用する器具の名称に関しては、講義後の模型実習開始前にすでに理解している学生数が多かった。しかしながら、根分岐部用プローブに関しては、模型実習前の理解度は低かった。
2. グレーシーのキュレットの各部の構造と使用法については、模型実習を行い実際にキュレットを使用することにより理解できた学生数が増加した。
3. 模型実習前に著しく正答率の低かった縫合に関する問題も、実習終了後には正答率が上昇した(9.5%→77.8%)。
4. 歯周外科処置の術式について、歯肉切除術、歯肉剥離搔爬術、ヘミセクション、ルートアンブレーションといった模型実習で行った項目については、実習後に理解できた学生数が増加した。しかしながら歯周組織再生療法や歯肉歯槽粘膜外科手術など、模型実習では十分に実習が行えなかった内容については、実習の前後共に理解している学生が少なかった。

【考察】

本学における歯周治療学に関する講義は、学生の理解を支援するために写真ならびに図などの視覚素材を多用して行っているが、根分岐部用プローブやグレーシーのキュレットなどの特徴的な三次元構造を持つ歯周治療用器具については、実際に使用して始めて、その形態の臨床的意義が理解できるようになったと考えられる。また、概ね歯周外科処置に対する正答率が実習終了後に上昇したことから、模型実習で三次元的に歯周病の病態(歯周組織の状態)を観察し、さらに実際に治療器具を用いて歯周治療法を体験することが、基礎知識の習得に効果的であることが改めて明らかとなった。しかしながら、模型の材質的な問題で実習が困難であるため本実習では十分に行えなかった歯肉歯槽粘膜外科手術などに関しては、実習の前後で正答率に著明な変化は認められなかったことから、模型に関しても改良が必要であると考えられる。今後これらの結果を踏まえて、再生療法の模型実習の改善に加え、模型の材質的な限界を補うために、仮想実体感覚を体験できるハプティックデバイスの導入も検討し、より効果的な歯周病学卒前基礎実習の構築を図って行きたいと考えている。

ウェルナー症候群における歯周病の実態

広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・健康増進歯学分野
○荒川 真、鈴木茂樹、山下明子、白井憲一、藤井理史、西村英紀

Periodontal conditions in patients with Werner Syndrome

Department of Dental Sciences for Health Promotion, Graduate School of Biomedical Sciences,
Hiroshima University

○ ARAKAWA Makoto, SUZUKI Shigeki, YAMASHITA Akiko,
SHIRAI Kenichi, FUJII Masashi, NISHIMURA Fusanori

【目的】

歯周病は成人における歯牙喪失の原因の第一位を占める慢性進行性の炎症性疾患である。歯周病による歯牙の喪失は45歳を過ぎるころから急激に増加し始めることから、生体の老化がその病因に何らかの形で関与することが考えられる。しかしながら、高齢者に多く見られる歯周組織破壊が、①生体の老化そのものが疾患の進行促進因子として働いた結果であるのか、あるいは②慢性的に徐々に組織破壊が進行した結果であるのか、については未だコンセンサスが得られていない。

ウェルナー症候群はDNAヘリケース遺伝子異常によって惹起される代表的な早期老化症であり、日本人に比較的多いとされるがそれでも日本人における頻度は10万人に3人程度と報告されている。本疾患の特徴は患者が成人に達するまでは正常に発育し、成人期に達した後、急速に生体の老化が進むことである。一般にウェルナー症候群の患者は正常者の2倍のスピードで老化が進行するとされている。したがって同症候群患者の歯周病が同年代の非ウェルナー症候群患者の歯周病に比べ、より重症化しているとすれば生体の老化に伴う何らかの要因が疾患の進行を早めたものと考えられる。この様な背景から、成人に達した後、急激に生体の老化が進むとされるウェルナー症候群の歯周病の実態を把握することを計画した。

本研究の目的はウェルナー症候群患者の歯周病の実態を横断的および縦断的に調査することであり、ここでは横断的な観察結果を報告する。

【方法】

- 1) 被験者：ウェルナー症候群患者（共同研究者の後藤らの診断基準によって診断された患者）3名
- 2) 調査項目
 - ①年齢 ②性別
- 3) 診査項目
 - ①問診（現病歴、既往歴）、②レントゲン検査（パノラマエックス線写真撮影）：平均骨吸収率の算出、③歯周組織診査：ポケット測定、歯肉出血指数、歯牙動揺度

【結論および考察】

現時点で検診が可能であった症例は3例であった。いずれも40代後半から50代であり、非ウェルナーの70代から80代に相当すると考えられた。このうち、無歯顎者は1名もいなかった。平均骨吸収率、歯肉出血歯数あるいは平均ポケット長のいずれも比較的低い値を示した。また喪失歯数は平成17年度歯科疾患実態調査による70代あるいは80代の喪失歯数と同程度、あるいはむしろ少ないという結果であった。

以上から、ウェルナー症候群患者において歯周病は見られるものの非ウェルナー患者と比較して著しく進行しているケースは見出せなかった。すなわち、ウェルナー遺伝子（DNAヘリケース遺伝子）が歯周疾患のリスクを亢進させる要因になる可能性は低いものと考えられる。また、ウェルナー症候群患者例から考察すると、高齢者に見られる歯周疾患による高度な組織破壊は、生体の老化そのものがその進行促進因子として働いた結果と云うよりも、むしろ慢性的に組織破壊が進行し蓄積した結果である可能性が高いと考えられた。今後、本患者の歯周病の進行程度を縦断的に観察することでさらに詳細な解析を行いたい。

本調査の概要は広島大学疫学研究倫理委員会において承認済み（平成20年8月28日付 第 疫-56号）である。

（会員外研究協力者：桐蔭横浜大学・後藤真教授）

短期間禁煙が GCF エラスターゼ活性と唾液成分に及ぼす影響

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座、日本歯科大学附属病院¹⁾、東京都²⁾
伊藤 弘、小川智久¹⁾、中村彰一郎¹⁾、永田達也²⁾、伊藤明子²⁾、沼部幸博

The Effects of Short Term Smoking Cessation on GCF Elastase Activity and Salivary Component

The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, Department of Periodontology,

The Nippon Dental University Hospital, General Dentistry¹⁾, Tokyo-to²⁾

Hiroshi Ito, Tomohisa Ogawa, Shoichiro Nakamura, Tatsuya Nagata, Akiko Ito and Yukihiro Numabe

【目的】

喫煙が歯周病最大の環境因子であることは世界的認知されており、そのメカニズムに関する多くの報告がある。しかし、その見解は様々であり、歯周組織破壊のメカニズムは不明な点が多いものの、喫煙が歯周組織免疫応答の不均衡に大きく関わっていると考えられている。そこで、禁煙より変化しうると考えられる GCF 中に反映されるエラスターゼ活性とその周辺の生化学的な変化を検索し、喫煙が歯周組織免疫応答におよぼす影響を検索した。禁煙達成の一つの指標として、唾液中コチニン量が 0ng/ml となることとし、第二の指標として受動喫煙者の唾液中コチニン量である 1.6~4.5ng/ml に近似する測定値の獲得を目標とした。生化学的対象は、GCF に多く検出される細胞成分である好中球を対象として、好中球由来エラスターゼ活性、インヒビター、そしてインヒビターと結合した複合体量とした。同時に、唾液中コチニン量に対するエラスターゼ活性との相関を検索し考察を加えた。

【材料および方法】

被験者は、健康な歯周組織を有し、3 か月間抗菌薬の投与のない日本歯科大学附属病院の研修医および医員を対象とした。被験者は、喫煙習慣のある男性のみを対象とし、まずファガーストロームのタバコ依存度テストを行った。その後、被験者には、生活に支障の無い限り禁煙を行ってもらい、禁煙前・禁煙中・喫煙再開時期に、臨床パラメータと GCF 中に反映されるエラスターゼ活性、 α 1-antitrypsin(A1AT) 量、エラスターゼ α 1AT complex (E-A1AT) 形成量と唾液中に反映されるコチニン量と抗酸化能の変化を観察した。臨床パラメータには、PPD、GI、PII、GCF 量 (peritoron[®] 値) を用いた。GCF の採取は、修復物のない上顎犬歯もしくは側切歯とした。GCF 中における生化学的検査項目は、エラスターゼ活性(フリーエラスターゼと active elastase- α 2-macroglobin complex(E-A2MG)形成量)を enzyme assay にて計測した。A1AT、E-A1AT 及び唾液中コチニン量の測定には、ELISA を用いて解析した。なお本研究は、日本歯科大学生命歯学部倫理委員会の承認のもと行われた。

【結果】

- 1、被験者のタバコ依存度はファガーストロームのタバコ依存度テストでは普通であった。
- 2、本研究に参加した常用喫煙者において、日常生活に支障のない禁煙期間は 7.8 日であった。
- 3、最短の禁煙期間は 3 日であった。よって、3 日間の短期間禁煙の変化を検索した。
- 4、3 日間の短期間禁煙では唾液・GCF に対する生化学的な変化は認められなかった。
- 5、禁煙 10 日で唾液中コチニン量は 0ng/ml となった。
- 6、唾液中コチニン量が 0ng/ml 達成により、緩やかなエラスターゼ活性、A1AT 量、E-A1AT 量の低下が観察された。

【結論および考察】

喫煙習慣や禁煙の達成度の測定には、唾液中・血清中・尿中コチニン量の計測があげられる。唾液に反映されるコチニン量は、禁煙開始を行ったとしてもその半減期が 20~40 時間であり、1 週間以上の禁煙により生体内のコチニンレベルが大きく変化する報告と同様に、短期間による禁煙では唾液中のコチニンレベルは、僅かな減少をとどめるのみであった。同様に、唾液・GCF における生化学的な変化は禁煙開始前と比較してその変化は認められなかった。しかしながら、1 例のみ禁煙により唾液中コチニン量が 0ng/ml に達した場合は、GCF 内における好中球の機能の低下が見られ、この変化は、タバコ煙暴露による慢性反応が、禁煙により変化したものと推察された。今後、禁煙期間の延長により生化学的変化の現れる時期を唾液中コチニン量と比較する検討が必要であると考えており、その生化学的変化が、喫煙による歯周組織破壊に関与するひとつの生化学的マーカーとなりうる可能性があるかと推察された。

本研究は、文部省科学研究費助成金：基盤研究 C、課題番号：20592437 の助成を受けて行われた。

歯科給水系統で使用されるチューブからの従属栄養細菌の検出

¹ 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
² 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔健康科学専攻 口腔健康科学講座 口腔保健管理学分野
○仁井谷善恵^{1,2}、日野孝宗¹、應原一久¹、林田浩一¹、柴秀樹¹、
河口浩之¹、竹本俊伸²、栗原英見¹

Analyses of Heterotrophic Bacteria detected through Tubes for Waterline of Dental Units

¹ Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science,
Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences
² Department of Oral Health Management Division of Oral Health Sciences,
Master's Program for Oral Health Sciences
Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences
Yoshie Niitani^{1,2}, Takamune Hino¹, Ouhara Kazuhisa¹, Kouichi Hayashida¹, Hideki Shiba¹,
Kawaguchi Hiroyuki¹, Toshinobu Takemoto² and Hidemi Kurihara¹

【研究目的】

水道水質基準の水質管理目標設定項目に従属栄養細菌が追加されたが、デンタルユニットから供給される水の細菌密度は休日明けなど長時間通水していないと 10,000CFU/ml 以上になると報告されている。歯科給水系統の給水管素材が原因で塩素濃度が低下することによって消毒効果が減弱し、細菌が滞留水中で増殖すると考えられている。一方、治療器具装着側から給水管側に細菌汚染が及んでいるという見方もある。本研究は歯科医療給水の汚染状況を明らかにすることを目的として、デンタルユニット給水中の従属栄養細菌の細菌密度を明らかにし、デンタルユニットの使用年数やチューブの材質との関連を検討した。

【材料と方法】

- 1) 被験水；保存治療系を主体とする歯科治療に使用されているデンタルユニット（給水管材質はウレタンもしくはポリフッ化ビニレン（PVDF）の①洗口給水および、②スリーウェイシリンジ、③タービンからの水。対照として診療室外に設置された手洗い用給水からの水。被験水は各部位からの 10 秒間の放水水を滅菌遠沈管（15ml あるいは 50ml）に採取した。
- 2) 被験水の採取時期；①二日間の通水停止後、②30 秒間通水後、③一日の診療終了後に行った。
- 3) 細菌の検出；被験水を従属栄養細菌培養用 R2A 寒天培地（日本ベクトン・ディッキンソン、東京）に播種、23°C、7 日間、好気培養を行った。培養終了後、コロニー数をカウントし、被験水の細菌密度（CFU/ml）を算出した。
- 4) チューブの採取；ユニットのチューブ（ウレタンまたは PVDF）を 1×5mm² 片に切り取った。
- 5) 走査型電子顕微鏡観察試料作製；チューブ片を 1%オスミウム酸を含む 0.1M カジール酸ナトリウム緩衝液で固定した。脱水、凍結乾燥、金蒸着後、走査型電子顕微鏡（S-4100, 日立製作所および VE-8800, キヤノン）で観察した。

【結果】

- 1) タービンとスリーウェイシリンジから採取した被験水中の従属栄養細菌の密度は、ウレタンチューブのユニットが、PVDF チューブのユニットより有意に高かった。（*t*-test、*p*<0.05）
- 2) ウレタンチューブのユニットのタービンとスリーウェイシリンジから採取した水、および PVDF チューブのユニットの洗口給水から採取した水は、30 秒間通水によって従属栄養細菌密度が低下した。（*t*-test、*p*<0.05）
- 3) ウレタンチューブのタービンとスリーウェイシリンジから採取した水は、洗口給水のものより検出細菌密度が高かった。（*t*-test、*p*<0.05）
- 4) チューブ内壁の走査型電子顕微鏡観察では器具装着側と給水元側で細菌バイオフィーム形成状態に差はみられなかった。
- 5) デンタルユニットのチューブ交換前後の水から検出された従属栄養細菌の密度に差はなかった。

【考察および結論】

デンタルユニット給水から従属栄養細菌が高い密度で検出されており、わが国の水道水質基準の水質管理目標設定項目を超えている可能性が示唆された。今後、歯科給水の細菌汚染を基準値以下にするため、汚染機序を明らかにする必要があると考える。

唾液中のβ-galactosidase 活性と口臭の関係

福岡歯科大学総合歯科学講座総合歯科学分野

○ 榎尾陽介、米田雅裕、鈴木奈央、岩元知之、内藤 徹、山田和彦、岡田一三、藤本暁江、廣藤卓雄

Relationship between β-galactosidase activity and oral malodour

Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College

○ Yosuke Masuo, Masahiro Yoneda, Nao Suzuki, Tomoyuki Iwamoto, Toru Naito, Kazuhiko Yamada, Ichizo Okada, Akie Fujimoto, Takao Hirofuji

【緒言】

口臭は *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原性細菌が揮発性硫黄化合物 (VSC) を産生することによって生じると考えられている。*P. gingivalis* などは唾液のムチンや上皮細胞成分を分解するが、これらのタンパク質はその表面に多数の糖タンパクを有している。糖タンパクの分解には表面の糖鎖の切断が必要であり、β-galactosidase がその作用に重要な役割を果たしていることが知られている。今回われわれは唾液中のβ-galactosidase 活性と口臭の各種パラメーターとの関連について検討した。

【方法】

福岡歯科大学医科歯科総合病院口臭クリニックを受診した 49 名の患者の唾液サンプルを実験に使用した。患者の口臭を測定し、歯周組織、舌苔、および歯の状態を調べた。唾液中のβ-galactosidase 活性は以下の方法で測定した。Whatman フィルターペーパーディスクを基質溶液 (X-gal + IPTG) に浸漬後、37 °C で一晩乾燥させた。唾液サンプルをディスクに滴下し室温で 10 分間静置した。他のパラメーターの情報を持たない評価者がディスクの色を 3 段階 (0 : 無色、1 : うすい青、2 : 中程度から濃い青) に評価した。

【結果】

唾液中のβ-galactosidase 活性と口臭の強さ、官能試験、ハリメーター、硫化水素、メチルメルカプタン、硫化ジメチル) には正の相関関係が認められた。また、β-galactosidase 活性は舌苔付着量とも相関があったが、歯周組織状態、唾液流出量、う蝕、不適合修復物、舌苔の色との間には相関がなかった。β-galactosidase 活性は *P. gingivalis*、*Toreponema denticola* の量と相関がなかったが、*Prevotella intermedia* の量との間には負の相関が認められた。

表 1 β-galactosidase 活性と各種口臭パラメーターの関係 (* : $p < 0.05$)

	β-galactosidase 陽性 (n:10)	β-galactosidase 陰性 (n:39)
Halimeter (ppb)	329.9 ± 114.0*	136.4 ± 143.8
H ₂ S (ng/10ml mouth air)	4.9 ± 2.2*	2.3 ± 2.2
CH ₃ SH (ng/10ml mouthair)	3.2 ± 1.3*	1.5 ± 1.3
CH ₃ SCH ₃ (ng/10ml mouth air)	0.8 ± 0.3*	0.4 ± 0.5
OLT score of ≥3	80.0% (8/10) *	35.9% (14/39)
舌苔スコア (2以上)	90.0% (9/10) *	51.3% (20/39)
カリエス	10.0% (1/10)	92.3% (36/39)
マージン不適	0.0% (0/10)	2.56% (2/39)
歯の動揺	0.0% (0/10)	10.3% (4/39)
PPD of ≥5 mm	50.0% (5/10)	41.0% (16/39)
唾液潜血	20.0% (2/10)	35.9% (14/39)
<i>P. gingivalis</i>	40.0% (4/10)	41.0% (16/39)
<i>T. denticola</i>	50.0% (5/10)	71.8% (28/39)
<i>P. intermedia</i>	10.0% (1/10) *	48.7% (19/39)

【結論】

以上の結果から唾液中のβ-galactosidase は、口臭の発生に重要な役割を果たしていると考えられるが、口臭を産生する歯周病原性細菌との間に相関がないことが興味深い。β-galactosidase は口腔内に特に問題や歯周疾患がなくても発生する生理的口臭と関係があるかもしれない。口臭産生におけるβ-galactosidase の役割を明らかにするための研究を現在進めている。

新潟市における口腔と全身状態の関連

日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座
○両角祐子, 佐藤 聡

The Relationship between Oral Status and General Condition in Niigata City
Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University
Yuko Morozumi, Soh Sato

【目的】

新潟市は、平成20年10月15日に市内に所在する8大学と連携協定を締結した。これは、連携し相互に協力することで、より多くの大学の英知を新潟市の施策に活用するとともに大学の地域への貢献を進め、市民のニーズ・満足度を向上させることを目的としている。現在は、平成20年度から3ヵ年で「食育・健康づくり」に取り組んでいる。「食育・健康づくり」は、小児生活習慣病予防対策プログラム開発業務、食育指導教材・プログラム開発業務、健康づくり推進研究事業、地産地消推進のための調査および実証業務の4事業で構成されている。われわれは、健康づくり推進研究事業に参加し、新潟市における口腔と全身状態の関連を分析したので報告する。

【対象および方法】

分析には、新潟市で行った平成19年度成人歯科健診と基本健康診査の検査結果を用いた。成人歯科健診の対象者は、44,927名(男性22,051名,女性22,876名)であった。対象者は、当該年度末現在の年齢が、40歳・50歳・60歳及び70歳の市民で、職場等で歯科健診の受診の機会のない者である。対象者には受診券が交付され、個別に実施医療機関を受診した。また、口腔と全身状態の関連については、平成19年度に成人歯科健診と基本健康診査の両健診を受診した922名(男性291名,女性631名)を対象に分析を行った。成人歯科健診においては、現在歯・喪失歯の状況、歯周組織の状況、口腔清掃状態、口腔に関するアンケートについて検討を行った。歯周組織の状況にはCPIを用い、各被検者の最大値を個人コードとした。また、成人歯科健診の歯周組織の状況と、基本健康診査の喫煙状況およびHbA_{1c}の関連についても検討を行った。HbA_{1c}は、HbA_{1c}5.5%以上と5.5未満の2群に分け、HbA_{1c}の値が1%以下は分析から除外した。

【結果】

成人歯科健診の受診者は2,510人(男性998人,女性1,512人)であり、受診率は5.6%であった。歯周組織の状況は、CPI個人コード3(37.7%)が最も多く、ついでコード2(21.6%)、コード4(21.2%)であり、中等度以上の歯周疾患に罹患している者(CPIコード3,4)の割合が全体の約6割を占めていた。以下、コード0(10.7%)、コード1(8.1%)であった。性別では、女性のほうが、CPIコード3,4の割合が少なかった。年齢別では、40歳ではCPIコード3,4の割合は約半数であったが、年齢とともに多くなり、70歳では約7割にのぼった。喫煙者は74名(男性52名,女性22名)、非喫煙者は779名(男性210名,女性569名)であった。喫煙者はCPIコード3,4が70.3%であり、非喫煙者の59.3%より多かった。HbA_{1c}が1%以下の者を除く、877名(男性279名,女性598名)を対象とした。HbA_{1c}5.5%との関連では、HbA_{1c}5.5%以上の群は、CPIコード3,4の者が64.7%であり、HbA_{1c}5.5%未満群の58.0%と比較し多かった。

【考察】

平成19年度新潟市成人歯科健診の受診率は5.6%であり、特に50歳男性の受診率は3.3%と低かった。新潟市の基本健康診査受診率が30%を超えるのに比較し、成人歯科健診の受診率は低く、歯・口腔の健康に対する関心が低いと考えられた。歯周組織の状況では、平成17年歯科疾患実態調査と比較し、すべての年齢において、重度歯周疾患であるコード4の割合が多かった。新潟市の40歳のコード3は36.7%、コード4は11.1%であった。歯科疾患実態調査では、35~44歳のコード3は22.6%、コード4は11.1%であり、歯周病の予防、早期発見の必要性があると考えられた。成人歯科健診と基本健康診査の結果からは、喫煙の歯周病に対する影響を知らない者も多く、HbA_{1c}5.5%以上群のほうがCPIコードが高い者が多かったことから、歯・口腔の健康のためには、歯周病のリスクファクターの知識の普及も必要と考えられた。

ウェーバー・クリスチャン (Weber-Christian) 病を有する歯周炎患者の一症例

1)岩手医科大学歯学部歯科保存学第二講座, 2)あべ歯科クリニック,
○ 村井治 1), 藤原英明 1), 佐々木大輔 1), 金澤智美 1), 阿部仰一 2), 八重柏隆 1), 國松和司 1)

A Clinical Case Report of A Periodontal Patient with Weber-Christian disease

1)Iwate Medical University School of Dentistry, Department of Periodontology, 2)Abe Dental Clinic
○ Osamu Murai 1), Hideaki Fujiwara 1), Daisuke Sasaki 1), Satomi Kanazawa 1), Koichi Abe 2),
Takashi Yaegashi 1) and Kazushi Kunimatsu 1)

【はじめに】

ウェーバー・クリスチャン (Weber-Christian) 病は, 主に四肢の皮下に生じる再発性発熱性の非化膿性結節性皮下脂肪膜炎で, 脂肪細胞の変性と間質の炎症性細胞浸潤が見られる極めて稀な原因不明の疾患である。今回我々は, 本疾患を有する歯周炎患者の歯周治療を経験したので, いくつかの治療上の注意点を含めて報告する。

【初診・診査・検査所見】

患者: 58歳, 女性

初診日: 1985年8月, 主訴: 歯肉の違和感

現病歴: 1985年に歯肉の違和感を主訴として岩手医科大学附属病院歯科医療センター歯周病診療室を受診した。その後, 一時治療が中断したが平成8年に歯肉の出血, 違和感を主訴として再来院し, 全顎的な歯周病治療及び補綴処置を行った。その後, 定期的なメンテナンス治療を受けていたが, 平成16年に全身の違和感を訴えて盛岡赤十字病院を受診し, ウェーバー・クリスチャン病の診断を受けて内科治療開始となった。当科では, 上顎右側臼歯部を中心に歯周ポケットの再発がみられたため, 再度, 歯周基本治療から開始した。

既往歴: アレルギー; 食物(-), 薬物 ペニシリン, セデス(+)

口腔内所見: 上顎右側臼歯部および下顎左側臼歯部に出血, 排膿を伴う4mm以上の歯周ポケットの存在と3度の骨吸収が認められた。

【診断】

慢性歯周炎, ウェーバー・クリスチャン病

【治療方針】

ウェーバー・クリスチャン病は合併症としてDIC(播種性血管内凝固症候群), 重症細菌感染症, 敗血症を生じることがあるため感染に注意しなければならない。そこで, プラークコントロールを徹底し, 感染源の除去を行う。また, 観血的な処置を行う場合は内科担当医と対診を行い, 全身状態を考慮して実施する。

【治療計画および治療経過】

- ① 歯周基本治療: TBI, SRP, 咬合調整, う蝕処置
- ② 再評価, ③ 修正治療: 歯周外科, 最終補綴
- ④ 再評価, SPT

【考察・まとめ】

ウェーバー・クリスチャン病は自己免疫疾患とも考えられているが詳細は不明であり, 極めて稀な疾患である。医学中央雑誌のデータベースでは, 1982年以降, 本症の報告は本邦では167件にとどまり, 歯科領域での報告はわずか2件である。今回の症例ではウェーバー・クリスチャン病の治療目的で免疫抑制剤の服用が行われた後, 上顎右側臼歯部および下顎左側臼歯部の歯周ポケットの増加, 出血, 排膿がみられたため, 歯周外科処置を含む歯周処置を行った。しかし, プラークコントロールが良好と思えても全身状態の不調により急性歯周膿瘍が発現した。現在, 投薬治療により症状は緩解し, 安定しているが, 本症の予後の不安を考慮すると口腔内感染源の除去の徹底ならびに全身状態の把握は必須であると考えられた。

ラクトフェリンによる歯周病原菌バイオフィルムの抑制

森永乳業株式会社食品基盤研究所¹、新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野²
○若林裕之¹、小林哲夫²、吉江弘正²

Inhibition of periodontopathic bacteria biofilm by lactoferrin

Food Science & Technology Institute, Morinaga Milk Industry Co., Ltd.¹
Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences²
○Hiroyuki Wakabayashi¹, Tetsuo Kobayashi², Hiromasa Yoshie²

【目的】

唾液や歯肉溝滲出液に含まれる抗菌タンパク質ラクトフェリン (LF) は歯周病原菌などの口腔内病原微生物に対して抗菌活性を示す。演者らはウシ LF 入りタブレットの摂取により歯周病患者の歯周ポケット内歯周病原菌数を低下させることをこれまで報告してきた。今回、歯周ポケット内での歯周病原菌の存在形態であるバイオフィルムに対する LF の効果、抗生物質との併用効果を *in vitro* で検討した。

【方法】

歯周病原菌として *Porphyromonas gingivalis* 3 菌株及び *Prevotella intermedia* 2 菌株を用いた。ポリ塩化ビニル製マイクロプレートに添加したヘミン・ビタミン K・イーストエクストラクト入りトリプチケイスソイブロス中、嫌気性下で 24 時間培養してバイオフィルムを形成させた。バイオフィルム量はクリスタルバイオレット染色法で定量した。LF 類としてヒト LF (天然型)、アポ・ウシ LF (鉄非結合型)、ネイティブ・ウシ LF (天然型)、ホロ・ウシ LF (鉄飽和型)、ウシ LF 由来抗菌ペプチド・ラクトフェリシン B (LFcin B) を用いた。また抗生物質としてアンピシリン、シプロフロキサシン、クラリスロマイシン、ミノサイクリンを用いた。

【結果】

①バイオフィルム形成抑制効果：5 菌株のバイオフィルム形成時にネイティブ・ウシ LF を添加したところ、全ての菌株に対して LF は低濃度 (8-31 µg/ml) から濃度依存的にバイオフィルム形成を抑制した。以後の試験ではバイオフィルム形成が良好な *P. gingivalis* ATCC 33277、*P. intermedia* ATCC 25611 を用いた。各種鉄結合型のウシ LF はいずれも 2 菌株のバイオフィルム形成を抑制した。ヒト LF も抑制効果を示したが、LFcin B の効果は弱かった。

②バイオフィルム除去効果：既に形成された *P. gingivalis* 及び *P. intermedia* のバイオフィルムに LF 類を添加して 5 時間インキュベートした。LF 類は低濃度 (8-125 µg/ml) から、LFcin B も低濃度 (6 µg/ml) からバイオフィルム量を減少させた。*P. gingivalis* に対してはアポ・ウシ LF のほうが、*P. intermedia* に対してはホロ・ウシ LF のほうが若干、効果が強かった。

③抗生物質との併用効果：既に形成された *P. gingivalis* バイオフィルムにネイティブ・ウシ LF と抗生物質を添加して 24 時間インキュベートした。4 種の抗生物質のうち一定濃度のシプロフロキサシン、クラリスロマイシン、ミノサイクリンは LF との組み合わせにより、それぞれ単独に比べて有意にバイオフィルム量を減少させた。バイオフィルム内細菌の生残性に対しては、シプロフロキサシンとの間で併用効果が確認された。

【考察】

LF は、浮遊細胞に対して抗菌活性を示すのに必要な濃度 (数百～数千 µg/ml) よりかなり低い濃度で、比較的鉄に依存しない形で歯周病原菌バイオフィルムを抑制することが示された。このことは、LF が唾液 (約 10 µg/ml) や歯肉溝滲出液 (数十 µg/ml) の成分として歯周病原菌に対する防御因子として働いている可能性を示している。また、より高濃度で効果が高まることから、ウシ LF の経口投与が歯周病に対して、予防・改善効果、化学療法の補助効果も示す可能性が示唆された。

禁煙が歯周組織に与える影響

- 1 日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座 2 日本歯科大学附属病院歯科麻酔・全身管理科
○ 武内寛子 1、村樫悦子 1、石垣佳希 2、沼部幸博 1

The effect of smoking cessation on human periodontal tissue

- 1 School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University, Department of Periodontology
2 The Nippon Dental University hospital, Dental Anesthesia
○ Takeuchi H, Murakashi E, Ishigaki Y, Numabe Y

<背景>近年、喫煙による健康問題が取り上げられており、分煙や歩きタバコの禁止等と呼ばかける働きがある。タバコの主成分の一つであるニコチンは、喫煙により全身へ吸収されると発癌のリスクの増加や組織の炎症など様々な影響がある。また、歯周組織における喫煙の影響についても多岐に渡り研究が行われているが、禁煙後における組織変化についての報告は少ない。そこで、今回我々は、ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)およびヒト歯根膜線維芽細胞(PDL cells)を用いてニコチン投与中断後の細胞変化について検討した。

<材料・方法>[実験 1] 細胞は健常歯周組織を有する患者より HGF および PDL cells を分離し、10%FBS DMEM/F-12 にてサブコンフルエントまで培養後、24 時間無血清下に置きニコチン濃度 1 μ g/ml に調整した培地に交換した。24 時間後、培養上清をニコチンを含まない培地に戻し培養を続け、形態観察を行った。

[実験 2] 両細胞を 200 個/dish、500 個/dish で播種し、24 時間培養後、上清をニコチン濃度 1 μ g/ml に調整した 0.5%FBS DMEM/F-12 に交換した。24 時間後、培養上清を 10%FBS DMEM/F-12 に戻し 12 日間培養した。

[実験 3] 両細胞をサブコンフルエントになるまで培養し、24 時間後、上清をニコチン濃度 1 μ g/ml に調整した 0.5%FBS DMEM/F-12 に交換した。24 時間後、培養上清を 10%FBS DMEM/F-12 に戻し 6 日間培養した。

<結果>ニコチン作用後 24 時間にいたるまで、両細胞の細胞質内において空胞様構造物が認められた一方、ニコチンを含まない培養上清に交換後、空胞様構造物は時間依存的に消滅し、3 時間で消滅した。両細胞のコロニー形成率は、ニコチン中断群においてコロニー形成が認められたが、control に比較して有意な減少が認められた ($p < 0.001$)。細胞生存率は、6 日間にわたり時間依存的に細胞数は有意に増加した ($p < 0.05$)。

<考察>HGF および PDL cells は、ニコチン刺激により細胞質内に空胞様構造物が生じるが、この刺激を除去することにより細胞の増殖能力を回復した。しかしながら、刺激をしないものに比べて増殖能力は劣っていたことから、喫煙により歯周組織細胞に形態的な変化及ぼす一方、喫煙を中止することにより歯周組織細胞が再活性化するもののその能力は健常組織に劣ることが示唆された。

この研究は、文部科学省科学研究費助成金：基盤研究 C、課題番号：20592437 の助成を受けて行われた。

キシリトール経口投与がラット大腿骨骨密度に及ぼす影響
-生化学的・形態学的・組織学的検討-

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座
佐藤宏和 沼部幸博

The Effects of Oral Xylitol Administration on Bone Density in Rats Femur
-Investigation of Biochemical and Morphological and Histological Analysis-

The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, Department of Periodontology
Hirokazu Sato Yukihiro Numabe

キーワード: キシリトール、大腿骨、骨密度、

[目的]

キシリトールが骨組織に影響を及ぼす可能性に関する報告は現在までいくつかあるが、そのほとんどは骨形態計測による形態学的が多く、どれも詳細なメカニズムについての報告は少ない。我々は本学会において、キシリトール経口投与がラット大腿骨の骨代謝に影響を及ぼす可能性を報告してきたが、今回、新たにアルカリホスファターゼ(ALP)、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)などの骨代謝マーカーについても検討を加え、キシリトール経口投与がラット大腿骨骨密度に及ぼす影響を、生化学的、形態学的、組織学的に検討を行ったので報告する。

[材料および方法]

生後4週齢(体重約70g前後)のWistar系雄性ラット(日本クレア, 東京)48匹を用いた。キシリトールの与え方は、通常の食餌として与えているCE-2飼料(日本クレア, 東京)に、キシリトール(和光純薬, 大阪)粉末を混ぜ、固形化したキシリトール添加特殊試料を40日間経口摂取させた。キシリトール摂取群をテスト群、キシリトール無摂取群をコントロール群とした。なお、キシリトール濃度はそれぞれ20%、10%、5%(w/w)になるよう調整した。飼育開始40日後にラット左側大腿部より血液を採取し、血清Ca濃度(OCPC法)、血清ALP濃度(4-NPP法)、TRAP(ELISA法)を測定した。

飼育40日でペントバルビタール麻酔下にて安楽死後、 μ CTにて撮影(ELESCAN, 日鉄エレックス, 福岡)した。その後、 μ CT撮影画像については、再構成ソフト(TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング, 東京)を用い、3次元解析を行った。

組織学的評価として、右側大腿骨の組織切片作成後、通法に従いH-E染色、TRAP染色を行い、光学顕微鏡下にて比較検討を行った。

なお本研究は、日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会の承認のもと、動物の愛護と福祉を遵守して行われた。

[結果および考察]

生化学的評価において、血清Ca濃度、血清ALP濃度はコントロール群と比較してテスト群で有意に高値を示し、それはキシリトール投与濃度に比例した結果となった。

μ CT解析において、大腿骨の海綿骨骨密度は、テスト群で有意に高値を示し、それはキシリトール投与濃度に比例した結果となった。

組織学的評価において、コントロール群と比較してテスト群でより密な骨梁構造が認められた。

以上の生化学的、形態学的、組織学的検討結果から、キシリトール経口投与がラット大腿骨骨密度に影響を及ぼし、またそれはキシリトール投与濃度に依存することが示唆された。

会員外共同研究者: 日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター 那須優則

日本歯科大学生命歯学部発生・再生医科学講座 井出吉昭

ニコチンは歯髄細胞・歯根膜細胞の石灰化ノジュール形成を抑制する

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)
○柳田 学、兒嶋由子、柏木陽一郎、小林良平、山田 聡、村上伸也

Nicotine inhibits the calcified nodule formation of dental pulp cells and periodontal ligament cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
Manabu YANAGITA, Yuko KOJIMA, Yoichiro KASHIWAGI,
Ryohei KOBAYASHI, Satoru YAMADA, Shinya MURAKAMI

(目的)

歯髄細胞、歯根膜細胞は硬組織形成細胞への分化能を有することが知られている。それらは口腔内の種々の環境変化に応じて修復象牙質の形成や歯槽骨のリモデリングに関与している。我々はこれまでヒト歯髄細胞やマウス歯根膜細胞において石灰化培地での長期培養により石灰化ノジュール形成を誘導することを報告してきた。一方、喫煙量と歯周病の重症度には正の相関があることが示されており、ニコチンをはじめとするタバコの煙構成成分が口腔組織へ及ぼす影響は甚大であると考えられる。しかしながらニコチンが歯髄細胞、歯根膜細胞の石灰化ノジュール形成に及ぼす影響に関する研究は十分にはなされていない。本研究ではヒト歯髄細胞とマウス歯根膜由来細胞を用いて、ニコチンによる石灰化関連遺伝子の発現及び石灰化ノジュール形成の制御に関して検討した。

(材料及び方法)

1. 細胞：ヒト歯髄細胞 (HDPC) はインフォームドコンセントを行った患者の抜去歯より歯髄組織を取り出し 10%FCS 含有 α -MEM にて培養した。マウス歯根膜由来クローン細胞 (MPDL) は 2.5 週齢の BALB/c マウスの下顎臼歯歯根面より組織を採取して限界希釈法にてクローニングして得られたクローンのうちアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の高いクローン (MPDL22) を 10%FCS 含有 α -MEM にて培養した。
2. ニコチン様アセチルコリン受容体 (nAChR) の発現：HDPC、MPDL における nAChR サブユニットの発現を RT-PCR 法にて観察した。
3. 骨関連遺伝子の発現：ニコチン存在下非存在下での HDPC、MPDL における ALP、I 型コラーゲン、骨シアロ蛋白 (BSP)、象牙質マトリクス蛋白 (DMP)-1、osterix、runx2 の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。
4. 石灰化ノジュール形成能の解析：培養した細胞層を Dah1 らの方法でアリザリン染色を行い比較検討した。

(結果)

1. HDPC、MPDL において複数の nAChR サブユニット mRNA の発現を認めた。
2. ニコチン存在下で培養することにより、HDPC では BSP、DMP-1 の発現が、MPDL においては ALP、BSP、osterix の発現が抑制された。
3. HDPC、MPDL を石灰化培地で長期培養した際、高濃度ニコチン存在下では石灰化ノジュール形成は抑制された。特に MPDL ではニコチン濃度依存的に石灰化ノジュール形成の抑制を認め、nAChR の非選択的アンタゴニストである d-ツボクラリンにより、ニコチンによる石灰化ノジュール形成の抑制効果は部分的に解除された。

(結論及び考察)

HDPC、MPDL には恒常的に複数の nAChR サブユニットが発現していることが明らかとなった。また骨関連遺伝子の発現や石灰化ノジュール形成をニコチンは抑制することも示唆された。以上の結果は喫煙によって体内に吸収されるニコチンが、修復象牙質形成能の抑制や歯槽骨の吸収に関与している可能性が示された。

歯根膜由来細胞における歯周病原因子に対するβ-cryptoxanthinの 抗炎症性効果の検討

京都府立医科大学大学院医学研究科 歯科口腔科学¹⁾ 免疫・微生物学²⁾
○ 山本健太^{1,2)}、山本俊郎^{1,2)}、赤松佑紀^{1,2)}、長谷川徹¹⁾、足立圭司¹⁾、
西垣勝¹⁾、大迫文重^{1,2)}、喜多正和²⁾、金村成智¹⁾

Anti-inflammatory effect of beta-cryptoxanthin for periodontal ligament cells stimulated with periodontal pathogenic factor

Department of Dental Medicine¹⁾ and Microbiology²⁾,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

○ Kenta Yamamoto^{1,2)}, Toshiro Yamamoto^{1,2)}, Yuki Akamatsu^{1,2)}, Toru Hasegawa¹⁾, Keiji Adachi¹⁾,
Masaru Nishigaki¹⁾, Fumishige Oseko^{1,2)}, Masakazu Kita²⁾ and Narisato Kanamura¹⁾

【研究目的】

これまでに我々は、ヒト歯根膜由来細胞（以下 hPDL 細胞）が、メカニカルストレス及び代表的な歯周病原性細菌である *P. gingivalis* に対してサイトカイン産生能を有し、歯周組織局所の炎症に関与していることを報告してきた。

近年、温州みかんに多く含まれているβ-cryptoxanthin（以下β-cry）に歯槽骨吸収抑制作用があることが報告されているが、その他の歯周組織に対する効果は未だ報告されていない。そこで今回、hPDL 細胞におけるメカニカルストレス及び *P. gingivalis* に対するβ-cry の抗炎症効果を検討したのでここに報告する。

【材料および方法】

hPDL 細胞は便宜的に抜歯された炎症所見の認めない健全な第 3 大臼歯より歯根膜の組織片を採取、10% FBS/D-MEM 培養液中で 37°C、5% CO₂ 条件下に初代培養を行った。3-7 代の継代培養後、1×10⁵ CFU/ml で播種、コンフルエントに達したのち、β-cry (1×10⁻⁷ M/ml) 添加（対照として非添加も作製）し、その後、静水圧負荷装置によるメカニカルストレス（1、6MPa）刺激（以下、1、6MPa 刺激群）あるいは *P. gingivalis* (1×10⁷ CFU/ml) 細菌刺激（以下、*P. gingivalis* 刺激群）を行った。その後、炎症性サイトカインである IL-1β、IL-6、IL-8、TNF-α に関して RT-PCR 法を用いた定性分析および ELISA 法を用いた定量分析を行った。そして、歯周病原因子刺激後の細胞形態を倒立位相差顕微鏡にて鏡検を行った。

なお hPDL 細胞の使用に関しては、当大学における人間を対象とする医学研究審査委員会より承認済みである。

【成績】

定性分析では、β-cry 添加の有無に関わらず、1、6MPa 刺激群では IL-6、IL-8、TNF-α の mRNA 発現を認め、*P. gingivalis* 刺激群では全てのサイトカインの mRNA 発現を認めた。炎症性サイトカイン産生は、両群とも IL-6、IL-8 の産生は認めしたが、IL-1β、TNF-α 産生をほとんど認めなかった。サイトカイン産生量の比較では、*P. gingivalis* 刺激群の方が 1、6MPa 刺激群に比べ有意な高値を示し、β-cry の添加時には、1、6MPa 刺激群では非添加時と比べ IL-6、IL-8 の有意な減少を認め、*P. gingivalis* 刺激群では IL-6 の有意な減少及び IL-8 の減少傾向を認めた。また、β-cry の添加による IL-6、IL-8 の減少は *P. gingivalis* 刺激群より 1、6MPa 刺激群で顕著であった。なお、歯周病原因子刺激後、hPDL 細胞の形態的变化は認めなかった。

【考察および結論】

本研究結果から、hPDL 細胞はメカニカルストレス刺激より歯周病原菌刺激に対する炎症性サイトカイン産生能が高く、また歯周病原因子で刺激された hPDL 細胞はβ-cry の影響を受けることが判明した。すなわち、歯根膜の局所炎症には歯周病原因子の中でもメカニカルストレスより歯周病原菌の影響が強く、またβ-cry は歯周病原因子により惹起された歯根膜の局所炎症に対し抗炎症効果を有する可能性が示唆された。今後は、炎症性サイトカインのみならず骨代謝関連サイトカイン等も含めた評価が必要と考えられた。

歯周病修飾因子に歯面コーティング材が及ぼす影響

日本歯科大学東京短期大学¹⁾, 日本歯科大学附属病院²⁾, 日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター³⁾,
日本歯科大学生命歯学部化学⁴⁾, 日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座⁵⁾
○斉藤洋一¹⁾, 仲谷寛²⁾, 柴田潔⁴⁾, 斉藤文重²⁾, 三橋扶佐子³⁾
伊藤弘⁵⁾, 沼部幸博⁵⁾, 小口春久¹⁾

The Effects of Relationships between Periodontal Modifying Factors and Tooth Coating Materials

The Nippon Dental University College at Tokyo¹⁾, Division of General Dentistry, The Nippon Dental University Hospital²⁾, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo, Research Center for Odontology³⁾,
Dept of chemistry⁴⁾, Dept of Periodontology⁵⁾
Saitou Youichi¹⁾, Nakaya Hiroshi²⁾, Shibata Kiyoshi⁴⁾, Saitou Fumie²⁾, Mituhashi Fusako³⁾,
Ito Hiroshi⁵⁾, Numabe Yukihiko⁵⁾, Oguchi Haruhisa¹⁾

キーワード: 歯面コーティング材, 歯周病修飾因子, バイオフィルム

[目的]

近年人々の口腔への関心は、健康的で豊かな毎日の生活を営む上で、より関心が高まりつつある。その中でも、アンチエイジング効果が期待できるホワイトニングは、女性や、審美意識の強い若者を中心に注目を集めている。そのような状況の中、ホワイトニング療法の一つである歯面コーティング材は、着色歯や補綴・修復物表面に塗布し、審美的改善を図る目的で用いられる。一方で、歯周疾患を増悪させる因子として、歯石や不良補綴物は初期治療時に除去しなければならないプラーク増加因子である。そこで今回、歯面コーティング材が、歯周病修飾因子としての影響を検討する目的で、補綴物として金属プレートに各種歯面コーティング材を塗布し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) と走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。更に洗口液中に浸漬培養後、バイオフィルムの付着状態の観察を行った。

[材料及び方法]

1) 試料の作製 3種類の歯面コーティング材; ホワイトコート (クラレメディカル, 以下 WC), ビューティーコート (松風, 以下 BC), ハニック DC [スノウ] (株式会社ハニックス, 以下 HC) を金属プレート; 歯科用パラジウム合金 (GC, 東京) に塗布し、実験に供した。

金属プレート 10 x 8mm を耐水ペーパー3000 番まで研磨し、その後歯科技工操作での研磨処理を施した。その後、各種歯面コーティング材をメーカーの指示通り、金属色が無くなるまでコーティング処理した。

2) 表面粗さの測定及び表面形状の観察

それぞれの金属プレートに歯面コーティング材を塗布した後、走査型レーザー顕微鏡 (LEICA-TCSNT, スイス) を用いて、表面粗さ (Ra) の測定及び表面形状の観察を行った。表面形状の観察は、走査型レーザー顕微鏡で立体構築した画像を用いた。

3) SEM による観察

本実験の主旨を理解し同意の得られた健常者から、口腔清掃を中止し、洗口後洗口液をバイアルに採取、液体培地に加え、それぞれ歯面コーティング処理後の金属プレートと共に 37°C、好気培養条件下にて 24 h, 72 h 培養した。各々の試料は、グルタルアルデヒドにて固定後、エタノール系列で脱水し、オスミウムでコーティング後、SEM (S-4000, HITACHI 社製) で観察した。

[結果]

CLSM による各試料の観察

立体構築像によると、WC, BC は DC と比較すると平坦でスムーズであるが、部分的に研磨操作による線状痕が観察された。DC は表面に気泡および不規則な面が観察された。(Ra) は DC が大きく、WC, BC で差をみとめなかった。歯面コーティング材と金属との境界には、大きなステップが観察された。

SEM による観察

24 h 培養後の観察では、多数の球菌が WC, BC, DC 共に観察された。特に DC において表面に多く観察された。72 h 培養後では、球菌、桿菌、糸状菌を含む成熟したバイオフィルムが観察された。これらは、歯面コーティング材と金属との境界に多く付着する状態が観察された。DC については、表面にも多く付着する様子が観察された。

[考察及び結論]

歯肉縁付近でのコーティング材の塗布は、バイオフィルムの足場となる可能性がある。よって慎重な操作が必要であることが示された。

口腔乾燥症患者における唾液中コルチゾルおよびクロモグラニン A の評価

福岡歯科大学 口腔治療学講座 歯科保存学分野
茂山 千英子, 泉 利雄, 松本 典祥, 榮田 太郎, 小松 晶絵, 國本 俊雄,
久原 裕子, 阿南 壽

Salivary cortisol and chromogranin A in patients with dry mouth

Fukuoka Dental college Operative Dentistry and Endodontology

Chieko Shigeyama, Toshio Izumi, Noriyoshi Matsumoto, Taro Eida, Akie Komatsu,
Toshio Kunimoto, Yuko Kuhara, Hisashi Anan

【背景】

高齢化社会の到来と共に、今後も口腔乾燥症患者は増加の一途をたどる事が推測される。口腔乾燥症において、唾液流出量の低下と口腔乾燥感は必ずしも相関しておらず、唾液流出量の低下はみられないが口腔乾燥感を訴えるケースもしばしば見られる。しかし、口腔乾燥症の検査は、現在のところ唾液流出量に関するものが主であり、口腔乾燥感に関する客観的な診断方法は確立されていない。

【目的】

本研究では、唾液中に検出されるうつや精神不安に関わる内分泌ホルモンであるコルチゾルおよびクロモグラニン A の変化に着目することによって口腔乾燥感の客観的な診断方法を確立することを目的とした。

【材料および方法】

口腔乾燥症と診断された 116 名をケース群とし、口腔乾燥症でない 30 名のコントロール群と比較を行った。ケース群は、症状の重症度によって 2 群に分けた。口腔乾燥感のみを持つ者を軽度群(45 名)、口腔乾燥感と唾液流出量の低下を併せ持つ者を重度群(71 名)とした。

本研究に関する十分な説明を行い、文書による同意を得た後、口腔および全身に関する問診、口腔内診査、唾液流出量検査を行った。唾液は、唾液収集用チューブを用いて、ガム法による唾液流出量を測定し、 -30°C で保存した。唾液中コルチゾルおよびクロモグラニン A の測定には、それぞれ Cortisol ELISA キット (Salimetrics 社)、CgA ELISA キット (矢内原研究所) を用いた。統計解析には、SPSS Ver. 11.0 for Windows を用いた。

【結果と考察】

コルチゾルレベルに関しては、軽度群、重度群ともにコントロール群と比較して有意に高い値を示した。同様に、クロモグラニン A レベルに関しては、軽度群とコントロール群間に有意差はみられなかったが、重度群においてはコントロール群よりも有意に高い値を示した。この有意性は、年齢、性別、服用薬で調整を行っても保たれた。

本研究の結果より、軽度口腔乾燥症では唾液中コルチゾルの有意な上昇を認める一方、クロモグラニン A においては有意な上昇は認められなかった。また、重度口腔乾燥症では唾液中のコルチゾル、クロモグラニン A ともに有意な上昇が認められた。以上のことより、従来の唾液流出量測定検査に加えてコルチゾルおよびクロモグラニン A の測定を行うことにより、唾液流出量の低下はみられないが乾燥感を訴える患者を客観的に診断することができることが推測された。

【結論】

唾液中に検出されるコルチゾルおよびクロモグラニン A は、口腔乾燥感の客観的な指標として有用であることが示唆された。

共同研究者：安細敏弘先生 (九州歯科大学保健医療フロンティア科学分野)

賦形性に優れた生体材料；DNA/プロタミン複合体の成形性と生物学的性質

株式会社マルハニチロホールディングス中央研究所¹、福岡歯科大学歯科医療工学²
御手洗 誠¹、福島 忠男²

An injectable biomaterial; formability and biological characteristics of DNA/protamine complex
Central Research Institute, Maruha Nichiro Holdings, Inc.¹, Department of Dental Engineering, Fukuoka
Dental College²
Makoto Mitarai¹, Tadao Fukushima²

【緒言】

サケの精巢（白子）から抽出・精製された DNA は、二重螺旋構造へのインターカレートやリン酸基への静電結合を利用することで、サイトカインや抗生物質のキャリアーとしての応用が可能である。本来、DNA は水溶性であるために生体内で形態を保持させることが困難であったが、カチオン性物質と静電的に結合させることで、水に不溶で且つ賦形性を持たせることができる。そこで本研究は、食品保存料やインスリン効果持続剤、ヘパリン中和剤として利用されているプロタミンと DNA との複合体に着目し、成形性および生物学的性質（細胞毒性、生体親和性、抗菌性）について基礎的な評価を行った。

【材料および方法】

材 料；300bp DNA とプロタミン硫酸塩（共にサケ白子由来、マルハニチロ食品製）の水溶液を混合し、1時間攪拌した。その後、遠心分離により沈殿を回収し、蒸留水で洗浄した後に凍結乾燥して DNA/プロタミン複合体を得た。DNA/プロタミン複合体に適量の水を加えて練和した後、内径 5mm、厚さ 1.5mm のテフロンモールドに入れて円盤状の複合体ディスクを作成した。

方 法；細胞毒性試験は、複合体の粉末を電子滅菌した後、マウス由来の骨芽細胞 MC3T3-E1 を用いて、5日間培養後における細胞生存率を求めた。抗菌試験は、供試菌として大腸菌、黄色ブドウ球菌および歯周病の主な病原菌である *P. gingivalis* (*P.G.*)と *P. intermedia* (*P.I.*)を用いて、寒天培地上で発育阻止の有無を確認した。動物実験は、複合体ペーストを 6 週齢のラットの皮下に埋入し、一定期間後（3, 10, 15, 20 日後）に皮下組織を採取し、常法にて固定、HE 染色し、鏡検した。

【結果および考察】

DNA/プロタミン複合体は、水と練和すると透明なペースト状となり、シリンジでの押し出し成形が可能であった（図 1）。また、大腸菌、黄色ブドウ球菌、*P.G.*、*P.I.* に対して生育阻止円を形成したことから、プロタミンが本来有している抗菌性を維持していることが確認された（図 2）。さらに、プロタミン単独試料よりも細胞生存率が高く、皮下組織での炎症反応も軽微であったことから、生体親和性が良好であることが示された（図 3）。

【結論】

DNA/プロタミン複合体は賦形性に優れ、複雑な形状の部位にもインジェクション注入可能である。また、抗菌作用を示すこと、生体親和性が良好であることから、従来の生分解性ポリマーやコラーゲンなどに代わる新規の生体材料として、歯周病治療や抗菌性ジェルとしての応用が期待される。

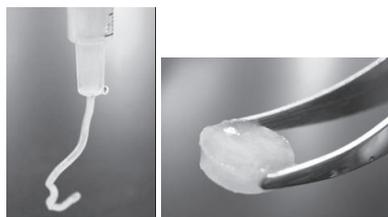


図 1 DNA/プロタミン複合体
左；シリンジからのインジェクション
右；成形品（ディスク状）

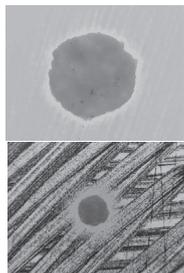


図 2 生育阻止円上；黄色ブドウ球菌
下；*P. intermedia*

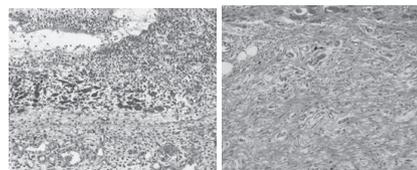


図 3 試料埋入 3 日後（左）と 20 日後
（右）のラット皮下組織
20 日後には試料は消失し、周囲結合組織
と同様の線維性結合組織に置換されて
いた。

根分岐部 class II 骨欠損にコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体を移植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

○光銭裕太, 宮治裕史, 加藤昭人, 横山裕之, 逸見 優, 小林尚子, 石塚良介, 田中佐織, 菅谷 勉, 川浪雅光

Tissue Reaction following Implantation of Collagen Hydrogel-sponge Composite into Class II Furcation Defects

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine

○KOSEN Yuta, MIYAJI Hirofumi, KATO Akihito, YOKOYAMA Hiroyuki, HENMI Masaru,
KOBAYASHI Naoko, ISHIZUKA Ryouyuke, TANAKA Saori, SUGAYA Tsutomu, KAWANAMI Masamitsu

[目的]

再生療法には、細胞が増殖するための足場と適切なスペース確保が必要である。近年我々は、高い細胞誘導効果をもつコラーゲンハイドロゲルを、生体親和性の高い線維化アテロコラーゲン-熱変性アテロコラーゲン複合体 (FC-HAC) スポンジに含浸させたコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体を作製し、ラット頭蓋部へ移植した結果、良好な細胞侵入性と組織置換性が認められ、再生スペース確保に有効であったことを報告した。本研究の目的は、根分岐部 class II 骨欠損へコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体を移植した場合の組織反応を病理組織学的に評価することである。

[材料及び方法]

コラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体は、FC-HAC スポンジに、アスコルビン酸-銅で架橋した 1.5%コラーゲンハイドロゲルを十分に浸透させて作製した。実験動物にはビーグル犬 3 頭 (雌) を使用し、被験部位は上下顎前臼歯とした。全身および局所麻酔下で頬側歯肉歯槽粘膜を部分層弁剥離して骨膜を除去し、頬側の根分岐部に高さ 5mm、水平的深さ 3mm の class II 根分岐部骨欠損を作製し、ルートプレーニングしてセメント質を除去した。次に根面を 24%EDTA で脱灰後、移植群ではコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体を根分岐部欠損内に移植し、コントロール群は何も移植せずに歯肉歯槽粘膜弁を復位縫合した。観察期間は 2 週および 4 週とし、通常に従い厚さ 6 μ m の脱灰薄切標本を作製、HE 重染色を行い、病理組織学的観察と歯槽骨新生率、セメント質新生率についての組織学的計測を行った。統計学的分析には Two-way ANOVA 検定を用い、有意水準を 5%とした。

[結果と考察]

移植群 2 週では、残存するコラーゲンハイドロゲルスポンジ複体内に線維芽細胞様細胞や骨芽細胞様細胞の侵入が認められ、血管新生や既存骨から連続した歯槽骨の再生が観察された。移植群 4 週では、大部分のコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体が吸収され、著明な歯槽骨、セメント質形成が観察された。コントロール群では、2 週、4 週ともに骨欠損部は結合組織で満たされ、わずかな歯槽骨、セメント質の再生を認めた。

新生骨面積 (%) は、移植群 2 週:25.8、コントロール群 2 週:27.0、移植群 4 週:57.1、コントロール群 4 週:33.5 であり、2 週において移植群はコントロール群と比較して有意差は認められなかったが、4 週では移植群はコントロール群と比較して有意に骨形成が観察された。新生セメント質長さ (%) は、移植群 2 週:38.0、コントロール群 2 週:15.0、移植群 4 週:69.8、コントロール群 4 週:36.2 であり、2 週では移植群とコントロール群に有意差は無かったが、4 週では移植群はコントロール群と比較してセメント質形成が有意に認められた。

以上の結果から、移植したコラーゲンハイドロゲルスポンジ複体内に歯槽骨や歯根膜由来の細胞が侵入増殖し、新生骨や新生セメント質の形成が促進されたと考えられた。

[結論]

根分岐部 class II 骨欠損にコラーゲンハイドロゲルスポンジ複合体を移植すると、歯槽骨およびセメント質の形成が促進された。

ヒト口腔上皮細胞における抗菌ペプチド遺伝子発現に及ぼす小柴胡湯の影響

¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野

²産業技術総合研究所健康工学研究センターバイオマーカー解析チーム

○廣島佑香¹、板東美香¹、木戸淳一¹、稲垣裕司¹、美原智恵¹、大石慶二¹、片岡正俊²、永田俊彦¹

The effect of Shosaikoto on antimicrobial peptide gene expression in human oral epithelial cells

¹Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, ²Nano-bioanalysis Team, Health Technology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

○Yuka HIROSHIMA¹, Mika BANDO¹, Jun-ichi KIDO¹, Yuji INAGAKI¹, Chie MIHARA¹, Keiji OISHI¹, Masatoshi KATAOKA², Toshihiko NAGATA¹

【目的】 粘膜や皮膚の上皮細胞から産生される抗菌ペプチドは、口腔内においても感染防御に働き、生体の自然免疫に貢献している。抗菌ペプチドの一つであるカルプロテクチン(S100A8 と S100A9) は歯周病原細菌 *P. gingivalis* の口腔上皮細胞への付着や増殖を抑制し、またその発現は上皮細胞で恒常的に産生されているサイトカインの Interleukin-1 α (IL-1 α)により上昇することが報告されている。

漢方薬として古くから用いられている小柴胡湯は免疫制御、サイトカイン産生調節および抗炎症などの薬理作用を有し、小柴胡湯含嗽液の口内炎に対する効果も知られている。一方、小柴胡湯が IL-1 α を介して上皮細胞の増殖や分化に影響を与えるという報告もある。そこで本研究では、小柴胡湯がカルプロテクチンを含む抗菌ペプチドの発現に与える影響およびその作用機構について検討を行った。

【材料および方法】 1. 小柴胡湯：小柴胡湯は株式会社ツムラより供与された。

2. 細胞培養：ヒト口腔粘膜上皮細胞株 TR146 は 10% ウシ胎児血清添加ハム F12 培地にてサブコンフルエントに達するまで培養し、小柴胡湯(0-250 μ g/ml)、小柴胡湯成分 (saikosaponin-d, baicalin, Ginsenoside Rb1 など)、抗 IL-1 α 抗体あるいは IL-1 レセプター阻害剤などを添加した後、以下の実験に供した。

3. マイクロアレイ解析：小柴胡湯で処理した TR146 細胞から全 RNA を分離し、GeneChip® Human Gene 1.0 ST Array (AFFYMETRIX 社)を用いて遺伝子発現分析を行い、小柴胡湯による遺伝子の発現変化を網羅的に解析した。

4. Northern blot 法、RT-PCR 分析および Real-time PCR 分析：アレイ解析によって発現が認められた抗菌ペプチド遺伝子について RT-PCR 法による解析を行った。S100A8/S100A9 遺伝子の発現については Northern blot 法および RT-PCR 法で詳細に解析を行った。また、IL-1 α を含むサイトカインの遺伝子については RT-PCR 法や Real-time PCR 法で発現分析を行った。

5. 免疫組織化学染色と ELISA 法：小柴胡湯で処理した TR146 細胞を抗カルプロテクチン抗体と Alexa Fluor® goat anti-rabbit IgG を用いて免疫染色し、細胞中でのカルプロテクチンの発現について蛍光顕微鏡にて観察を行った。また、同培養細胞から蛋白画分を抽出し、ELISA キットを用いてカルプロテクチン蛋白量を測定した。細胞上清中の IL-1 α の濃度は ELISA キットを用いて測定した。

【結果】 マイクロアレイ解析の結果、小柴胡湯により 11 個の遺伝子に 2 倍以上の発現増加が見られ、S100A7, S100A8 および S100A9 の抗菌ペプチドの発現増加が確認された。小柴胡湯はその添加 12 時間後から S100A8 と S100A9 の遺伝子の発現を上昇させ、24 時間後にそれぞれ 1.5 倍と 1.3 倍の発現増加を示し、25 μ g/ml の濃度で明らかな発現上昇が認められた。カルプロテクチン蛋白発現については、小柴胡湯により細胞のサイトゾル部にコントロールと比較してやや高い免疫反応が見られ、ELISA 分析で 1.5 倍の有意な増加が認められた。小柴胡湯成分の Baicalin と Ginsenoside Rb1 も S100A8/S100A9 の発現増加を示した。また、小柴胡湯のサイトカイン発現への影響については、IL-1 α 遺伝子および蛋白の発現増加が認められた。さらに、小柴胡湯による S100A8/S100A9 遺伝子および蛋白の発現増加は抗 IL-1 α 抗体および IL-1 レセプター阻害剤により抑制された。

【考察と結論】 本研究により、小柴胡湯が口腔上皮細胞でのカルプロテクチンおよび S100A7 の抗菌ペプチドの発現を増加させることが明らかとなった。小柴胡湯は、IL-1 α を介して口腔上皮細胞での抗菌ペプチド発現を調節することにより歯周組織の感染防御に働く可能性があり、これらの作用による歯周治療への応用が考えられる。

ラット脛骨の骨代謝におよぼす超短波照射の影響

奥羽大学歯学部歯科保存学講座
西村 翼 和田 隆史 中 貴弘 横瀬 敏志

Effect of ultra-short wave irradiation on bone metabolism in rat tibiae
Department of Conservative Dentistry, Ohu University, School of Dentistry
Nishimura Tsubasa, Wada Takashi, Naka Takahiro, and Yokose Satoshi

【目的】

保存歯科治療領域において、顎骨の再生治療は重要な課題の一つである。現在までに多くの増殖因子やサイトカインの細胞生物学的な作用を調べる研究が行われてきている。

今回我々は、Wolffの法則に着目し、メカニカルフォースを骨の再生治療に用いることにした。整形外科領域などで用いられている超短波をメカニカルフォースとしてとらえ、骨代謝における細胞生物学的な影響について調べた。

ラット脛骨の骨欠損に対して超短波を照射し、骨再生における超短波の影響を形態学的、分子生物学的に解析することを目的とした。

【材料と方法】

9週齢の雌SDラット12匹の左右脛骨に直径2.5mmのデンタルバーにて骨欠損を作成した。

術後より44W、27.12mHzの条件で毎日20分、左側脛骨に照射しUSW群とした。また右側脛骨を対照群とした。

照射から7・15・20日後に、それぞれ4匹ずつエーテル麻酔下にて左右脛骨を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。その後10%EDTAにて脱灰後、通法に従い脱水してパラフィンにて包埋し、切片を作製した。切片はH-E染色にて骨組織を観察した。また、軟エックス線写真とDEXAにて摘出した左右脛骨の骨塩量を分析した。

【結果と考察】

超短波(USW)を照射した脛骨の骨欠損部の経時的な観察では、対照群に比較して7日目から幼弱な骨の形成が亢進していることが軟エックス線写真および組織学的所見から明らかとなった。また、これらの骨は15日においてさらに石灰化が亢進していることがDEXAと組織化学的所見から示された。術後20日においてはUSW群と対照群の間では特に変化は認められなかった。これらの所見から、骨欠損の治癒過程において、USWの照射が新たな骨形成ならびに石灰化の時間を早めることが示唆された。

これはUSWがメカニカルフォースとして骨代謝に作用していることであり、Wolffの法則に従った作用であると考えられる。従って、今後の保存歯科治療領域における顎骨の再生療法にUSWが有効に使用できる可能性を示唆するものである。

【結論】

超短波は骨代謝に作用して、骨の創傷治癒過程を早めることが明らかになった。

ヒト歯根膜からの血管内皮細胞の分離とその評価

日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座¹⁾, 日本歯科大学生命歯学部再生医科学研究室²⁾

○山下 稔¹⁾, 田巻友一^{1,2)}, 佐藤 聡¹⁾

Isolation and characterization of microvascular endothelial cells from human periodontal ligament.

¹⁾Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

²⁾Laboratory of Regenerative Medical Sciences, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

○YAMASHITA JOE¹⁾, TAMAKI YUICHI^{1,2)}, SATO SOH¹⁾

【目的】

血管は、生命の維持に関わる最も重要な器官の1つであり、その構成は、内腔を一層覆う血管内皮細胞と、それをとり巻く血管壁細胞から構成されている。その中でも特に血管内皮細胞は、血液の凝固や透過、血管新生など、血管の恒常性にとって重要な担い手となっている。口腔内の歯周組織には、血管が豊富に存在し、特に歯肉固有層に歯間中隔の中隔内動脈、歯根膜の歯動脈、口腔粘膜の骨膜上動脈といった重要な血管が走行しており、歯周疾患における細菌感染に対する生体防御機構にも深い関連性を持っている。血管内皮細胞に関する研究は、組織学的にも広範囲にみられ、各臓器でその特異性を持つことが報告されている。しかしながら、口腔内組織の特に歯根膜における血管内皮細胞に関する報告は非常に少ない。その理由として、歯根膜組織が、非常に限局的な小器官であることに加え、線維芽細胞、平滑筋細胞、ならびに中皮細胞などの多種細胞の混在で、そこに存在する血管内皮細胞の数の少なさと成長の遅さが、分離培養を困難にしており、その潜在的な限界が指摘されるためである。一方、血管内皮細胞の特徴としては、特異的な形態学的所見や分子マーカー、細胞機能などが報告されており、その中でも細胞接着分子マーカー(CD31)は、血管内皮細胞や造血系細胞(単球、血小板、Tリンパ球)の構成要素分子であり、分離培養の確立における理想的なマーカーとして注目できる。また、分離培養した細胞の明確な同定は、それらの特徴を形態学的、生化学的、生物学的に多方面からの確認が必要となる。そこで、われわれは、本研究において、細胞接着分子マーカー(CD31)を応用した、ヒト歯根膜組織からの血管内皮細胞の分離培養方法とその評価について報告する。

【材料と方法】

研究材料は、日本歯科大学新潟病院にて抜歯処置を受ける患者で、本研究の趣旨を理解し、同意の得られた者の廃棄組織から採取したヒト歯根膜を研究に供した。なお、本研究は、日本歯科大学新潟生命歯学部倫理審査委員会の承認を得ている。歯根膜細胞の初代培養は、抜去した歯牙より歯根膜の組織片を採取し、Outgrowth法で15%FBS含有DMEM/F12培養液を用いて培養した。継代培養後、血管内皮細胞の分離は、抗CD31コーティングのマグネット・ビーズを用いて細胞のポジティブセレクションを行ない、35mmコラーゲンコーティング・ディッシュ上で5%FBS含有EGM-2MV培養液を用いて培養した。分離した細胞の同定は、3~5継代の細胞を使用し、光学顕微鏡による形態学的観察に加え、カルチャースライド上での培養を行い、蛍光免疫染色法を用いてCD31、Von Willebrand Factor、の発現と、UEA-1レクチンの特異的結合の確認を行なった。また、分離した細胞の機能的な評価は、96ウェルマイクロプレート上にてマトリゲルを用い、ネットワーク形成の経時的な変化を観察した。

【結果および考察】

光学顕微鏡による形態学的観察では、分離培養後の継代において、ほぼ均一に敷石状の形態を呈していた。蛍光免疫染色による評価については、CD31、Von Willebrand Factor、UEA-1レクチンの全てにおいて確認できた。また、マトリゲルを用いたネットワーク形成は、細胞播種後、約2時間のインキュベーションより典型的なネットワークを形成し始め、そのネットワーク形成は2日間でほぼ完成に至った。以上のことより、本研究における分離培養法で分離培養した細胞は、血管内皮細胞であることが同定され、歯根膜組織から血管内皮細胞を分離する新規分離培養法の確立となった。よって、本研究は、今まで困難とされてきた歯根膜組織からの血管内皮細胞の分離培養を簡便かつ確実なものとし、今後の歯根膜組織に関する研究における基盤的報告となるであろう。また、今後は、本研究における分離培養法でセレクションした血管内皮細胞を用い、細胞機能や特異性のより詳細な解明を行なっていく予定である。

血小板由来成長因子による骨芽細胞様細胞での転写因子の発現変化

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

Alteration of gene expression of transcription factor by platelet-derived growth factor in osteoblast-like cells.

Departments of Periodontology 1) and Research Institute of Oral Science 2),
Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○ Masaru Mezawa 1), Shouta Araki 1), Hideki Takai 1), 2), Yohei Nakayama 1), 2), Yorimasa Ogata 1), 2)

[目的]

血小板由来成長因子 (PDGF)は、間葉系細胞で産生され、トランスフォーミング-β (TGF-β), アンギオテンシン IIなどが産生を誘導する。骨形成に関しては、TGF-β, インスリン様成長因子 I, IIなどと共に骨芽細胞の増殖および分化を促進させることが報告されている。遺伝子発現は、各種転写因子により制御されており、これにより細胞周期の制御や細胞死への誘導が行われる。そこで、ヒト骨芽細胞様細胞 (Saos2) に PDGF を作用させた、細胞の増殖制御に関係する代表的な転写因子である Activator protein 1 (AP1) ファミリーおよび CREB の発現が、遺伝子発現に対してどのような影響を及ぼすか解析することを目的に本研究を行なった。

[材料および方法]

1) ヒト骨芽細胞様細胞として Saos2 細胞を用いた。10%FCS を含む α-MEM 培地で培養後、無血清下で PDGF-BB (5 ng/ml) を作用させ、刺激後経時的に細胞を回収し、全 RNA を抽出した。2) Saos2 細胞での PDGF 刺激 3, 6, 12 時間での効果をノーザンブロットにて解析した。3) 抽出した全 RNA を用いて、Real-time PCR 法にて細胞外マトリックスタンパク質および骨関連転写因子の発現に対する PDGF の効果を検討した。4) PDGF 刺激した Saos2 細胞より抽出した核内タンパク質中に存在する転写因子の発現量の変化をウエスタンブロットにて検索した。5) ヒト BSP プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを Saos2 細胞に導入し、PDGF-BB 刺激 12 時間後の転写活性に対する影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。6) ヒト BSP プロモーター配列と、PDGF 刺激した Saos2 細胞より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にて検索した。

[結果]

1) ノーザンブロットおよび Real-time PCR 法にて検索した結果、PDGF-BB 刺激後、石灰化に重要な転写因子である Runx2 mRNA 量は 3 時間で増加したが有意差は認められなかった。Osterix mRNA 量の発現は、6 時間で有意に増加した。2) 核内タンパク質中の BSP, OPN, CREB1, phospho-CREB1, c-Jun, c-Fos, JunD および Fra2 の発現量の変化をウエスタンブロットにて検索したところ、BSP, OPN, CREB1, phospho-CREB1, c-Fos, JunD および Fra2 のタンパク質量は、PDGF 刺激後 12 時間後で最大となった。c-Jun は、刺激後 3 時間でわずかに減少し、その後 12 時間まで変化はなかった。3) ルシフェラーゼアッセイの結果、ヒト BSP プロモーターの-184 塩基対上流で転写活性の上昇を認め、-437 および -927 塩基対上流で転写活性が最大となった。4) ゲルシフトアッセイの結果、ヒト BSP プロモーター配列中の、Cyclic AMP response element 1 (CRE1), Cyclic AMP response element 2 (CRE2), AP1(3) および Shear-stress response element 1 (SSRE1) 配列と PDGF-BB 刺激 12 時間後の核内タンパク質との結合が上昇した。非標識の 40 倍濃度の CRE1, CRE2, AP1 (3) および SSRE1 配列で競合させると、それぞれの配列と核内タンパク質の結合は減少した。抗体を用いたゲルシフトアッセイの結果、phospho- CREB, CREB1, c-Jun, c-Fos, JunD および Fra2 が遺伝子発現の調節に関与すると考えられた。

[考察および結論]

Saos2 細胞を PDGF-BB にて刺激すると、Runx2 および Osterix mRNA 量の発現は 3 および 6 時間後に増加した。ヒト BSP プロモーター中に存在する CRE1, CRE2, AP1(3) および SSRE1 配列に対する核内タンパク質の結合は、PDGF 刺激 12 時間後に増加した。CRE1 および CRE2 配列に結合する転写因子は、CREB1 およびリン酸化 CREB1 であり、AP1 (3) 配列には c-Fos, c-Jun, CREB1, JunD および Fra2 の複合体が結合していると考えられた。以上のことから、PDGF-BB は、CRE1, CRE2 および AP1 (3) 配列への転写因子 (phospho- CREB, CREB1, c-Jun, c-FOS, Jun-D, Fra-2) の結合を増加させていると考えた。今後、結合を増加させるメカニズムを解析予定である。

Calcium Hydroxide regulate Bone Sialoprotein Gene Transcription

Department of periodontology¹ and Research Institute of Oral Science²

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Stomatology College of Tianjin Medical University³

Shuang Wang^{1,3}, Yoko Sasaki¹, Hideki Takai^{1,2}, Youhei Nakayama^{1,2}, Shouta Araki¹,
Masaru Mezawa¹, Yorimasa Ogata^{1,2}

Introduction: Calcium hydroxide (Ca(OH)₂) has been widely used for a variety of applications in dentistry due to its antimicrobial effects and its capability of inducing hard tissue. Ca(OH)₂ has also been shown to enhance bone metabolism. Bone sialoprotein (BSP) is a highly sulfated, phosphorylated, and glycosylated protein that is an early marker of osteoblast differentiation and has been implicated in the nucleation of hydroxyapatite during *de novo* bone formation. Regulation of the BSP gene thus appears to be important in the differentiation of osteoblasts, in bone matrix mineralization, and in tumor metastasis. The purpose of this study was to determine the molecular mechanisms of transcriptional regulation of BSP gene by Ca(OH)₂ in osteoblast-like ROS17/2.8 cells.

Material and methods: We conducted Northern blot, luciferase analyses with chimeric constructs of the rat BSP gene promoter, gel mobility shift assays and Western blot assays.

Results: 0.4 mM Ca(OH)₂ increased BSP mRNA levels at 12 h. Ca(OH)₂ (0.4 mM, 12 h) also increased luciferase activity of the construct (pLUC4; -280 to +60) of the rat BSP gene promoter. Transcriptional activities induced by Ca(OH)₂ were inhibited by protein kinase C (PKC) and protein kinase A (PKA) inhibitors. Introduction of 2-bp mutation in the pLUC4 construct showed that the effects of Ca(OH)₂ were mediated through HOX and Runx2 site. In gel shift assays, HOX-protein binding was increased by Ca(OH)₂ (0.4 mM, 12 h). In Western blot assays, BSP and Dlx5 protein levels were increased after stimulation by Ca(OH)₂ at 12 h.

Conclusion: These studies indicated that Ca(OH)₂ increased BSP gene transcription through PKC, and PKA-dependent pathways and that the Ca(OH)₂ effects were mediated by HOX and Runx2 in the proximal rat BSP gene promoter. Dlx5 transcription factor regulates BSP transcription.

Co investigator without membership; Li Yang, Zhenyang Li, Zhitao Wang, Xinyue Li; Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan .