

シランカップリング剤とデンティンボンディング材の混和効果による接着
ノブデンタルオフィス¹

昭和大学歯学部 歯科保存学講座²

北原 信也¹、伊藤 和雄²、楠 みづほ²、及川 美早²、久光 久²

Effect of mixing of silane coupling agent and dentin bonding agent on porcelain bond.

Nobu Dental Office¹

Department of Clinical Cariology, Showa University School of Dentistry²

KITAHARA Nobuya¹, ITOH Kazuo², KUSUNOKI Mizuho², OIKAWA Misa², HISAMITU Hisashi²

【研究目的】近年、審美歯科修復治療に対する患者の要求が高まると同時に、患者、術者双方に、歯質をできるだけ保存するミナマルインターベンション (MI) の重要性が強く認識されている。このような要求のために考案されたポーセレンラミネートベニア修復は、原則として唇側エナメル質内に歯質削除をとどめることにより歯質を最大限に保存でき、さらにポーセレンによる優れた審美性を回復する修復方法として臨床実践されてきた。ところが、この修復法はレジンセメントを介して、ほぼ平面に近いポーセレンおよび歯質に対する接着にのみ保持を求めているため、より確実な接着が要求される。従来より、レジン材料が酸処理されたエナメル質に対して強固な接着性を示すことは認識されているが、ポーセレンに対するシランカップリング剤の臨床的な使用方法には一定の基準が見られない。すなわち、シランカップリング剤の単独使用を指示するメーカーに対して、加熱処理や酸性環境下での適用を推奨する報告もあり、適切な使用方法の確立が望まれる。本実験ではセラミックスに対するシランカップリング剤の加熱、およびボンディング材との混和が接着性に与える影響を剪断接着強さの計測によって検討し、さらにセメント除去を容易にするために開発中の分離材の効果をもあわせて比較検討した。

【材料および方法】円柱形の二ケイ酸リチウムガラス含有セラミックス (E-max, Ivoclar Vivadent) (直径 10mm、厚さ 10mm) をエポキシ樹脂に包埋し、#600 耐水研磨紙上でセラミックス平面を露出させた。セラミックス表面をフッ化水素酸処理後、接着面積とセメント菲膜厚さを規定するために直径 3.6mm の穴をあけた厚さ 0.67mm のテープを貼付した。接着処理としては、シランカップリング剤 (Clearfil Porcelain Bond Activator, Kuraray Medical) 単体塗布、シランカップリング剤塗布後 TESCO 社製ドライヤーを使用して 80°C 3 分間加熱処理、またはシランカップリング剤と市販ボンディング材 (Clearfil Photo Bond, Kuraray Medical) の混和液塗布の 3 種類を用い、フロアブルレジン (Clearfil Majesty LV, Kuraray Medical) を介して、同様に接着処理した直径約 5mm、厚さ 1.5mm の円柱状セラミックス試片を接着させた。また、レジンセメントの除去を容易にする目的で試作した水溶性ポリマーを含むレジン分離材を塗布後、シランカップリング剤とボンディング材の混和液を塗布した 1 種類を加え合計 5 種類、各群 10 個合計 50 個の試片を調整した。各試片は室温水中に 24 時間保管後、万能試験機 (Model 4302 Instron) を用いて剪断接着力を計測した。

【結果および考察】	セラミックスの接着処理	専断接着強さ (MPa)
	シランカップリング処理なし	6.26 ± 1.48 a
	シランカップリング処理あり	12.06 ± 3.61 b
	シランカップリング処理後加熱処理	12.75 ± 4.51 d
	分離剤塗布*	18.03 ± 3.74 c
	シランカップリング剤とボンディング材混和	22.99 ± 4.32

*：試作分離剤塗布後にシランカップリング剤と Clearfil Photo Bond の練和液を塗布した

同一文字で示す群は有意差が認められなかったことを示す。(Kruskal Wallis test and Steel-Dwass test, p<0.05).

シランカップリング剤使用群は、用いなかった群に比較して接着強さが有意に増加し、さらにシランカップリング剤を Clearfil Photo Bond と混和して用いることにより、接着強さはより著明に増加した。これに対して、シランカップリング剤塗布後に加熱処理した場合には、処理しない場合に比較して有意差は認められなかった。したがってシランカップリング剤は、酸性環境下におかれることにより確実に活性化されると考えられた。また、試作分離剤を使用した場合には、接着強さは有意に低下することがなく、分離剤の成分にはさらなる検討が必要であると考えられた。臨床的には、シランカップリング剤はボンディング材と混和して用いるべきであると結論された。

GIC に対する各種レジン接着処理の効果

愛知学院大学歯学部保存修復学講座

○森田有香、堀江 卓、杉尾憲一、佐藤かおり、村田公成、富士谷盛興、千田 彰

Adhesive effects of various resin-bonding treatments of GIC

Aichi Gakuin University, Department of Operative Dentistry

○MORITA Yuka, HORIE Taku, SUGIO Kenichi, SATOH Kaori, MURATA Kousei, FUJITANI Morioki, SENDA Akira

【研究目的】

コンポジットレジン修復にグラスアイオノマーセメント(GIC)を裏層材として用いる、いわゆるサンドイッチテクニックでは、従来 GIC とレジンの接着性向上のために、機械的嵌合効力を期待して GIC 表面のリン酸エッチング処理が行われた。しかし本法は、酸エッチングによる接着システムが中心であった時に行われたものであり、最近のセルフエッチングプライミングシステムの場合の効果については十分検討されていない。本研究は、従来型 GIC に対する効果的なレジンの接着処理方法を検索することを目的とした。そして種々のボンディング処理が施された GIC に対するレジン接着性を検討した。

【材料および方法】

被着 GIC としてフジIX_{gp} ファストカプセル(GC、以下フジIX)を用いた。エポキシ樹脂製(SCANDIQUICK)の試料台に形成された内径 8mm、深さ 2.5mm の窩洞にフジIXをメーカー指示通りに練和充填し、37°C水中で 24 時間保管後、耐水研磨紙#600 で被着面を調製した。その面に以下のような様々な接着処理を施した後、内径 6mm、高さ 2mm のシリコンモールドを両面テープで固定し、ソラーレ(GC)を充填後、20 秒間光照射(Curing Light XL 3000、3M ESPE)した。なお接着処理には、Scotch Bond Etchant(3M ESPE)、Unifil Bond(GC)、Clearfil Mega Bond(Kuraray Medical)、G-Bond Plus(GC)、Bond Force(Tokuyama Dental)、Beauti Bond(松風)、Easy Bond(3M ESPE)、Single Bond Plus(3M ESPE)を用いた(表)。これらを 37°C水中で 24 時間保管後、クロスヘッドスピード 1mm/min で圧縮剪断試験(EZ Test、島津製作所)を行い、得られた接着強さを比較検討した(Scheffé test、危険率 5%)。

【結果ならびに考察】

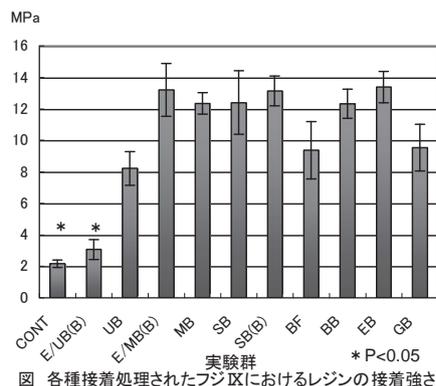
各種接着処理されたフジIXにおけるレジンの接着強さを図に示す。無処理と E/UB(B)間には有意差はなく、2~3MPa の値を示し、界面破壊がほとんどであった。2 ステップタイプの UB、MB、SB、1 ステップタイプの各種接着システム、ならびに SB の Bond のみの処理を施した群はいずれも 9~13MPa の接着強さを示し(P>0.05)、ほとんどの破断試料において GIC 内凝集破壊及びレジンと GIC の混合破壊が認められ、接着処理方法あるいは接着システムによる差異は認められなかった。これらのことより、従来型 GIC に対するレジンの接着促進には、親水性モノマーが関与しているように考えられた。

表 各種接着処理方法

接着処理法	略号
無処理	CONT
Etch/Unifil Bond(Bond)	E/UB(B)
Unifil Bond	UB
Etch/Mega Bond(Bond)	E/MB(B)
Mega Bond	MB
Single Bond	SB
Single Bond(Bond)	SB(B)
Bond Force	BF
Beauti Bond	BB
Easy Bond	EB
G-Bond Plus	GB

【結論】

従来型 GIC に対するレジンの接着には、リン酸エッチング後ボンディング処理を施すよりも、リン酸エッチング後セルフプライミングボンディングシステム、あるいはセルフエッチングプライミングシステムを用いるほうが効果的であることが示唆された。



口腔内環境想定ストレス因子が 歯頸部コンポジットレジン修復の接着特性に及ぼす影響

日本歯科大学 生命歯学部 歯科保存学講座

○原 学、貴美島 哲、奈良陽一郎、勝海一郎

Effect of stress factors simulating intraoral environment on characteristics in adhesion of cervical resin composite restoration

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

○ HARA Manabu, KIMISHIMA Tetsu, NARA Yoichiro, KATSUUMI Ichiroh

【研究目的】 コンポジットレジン修復は、歯質・レジン接着システム・コンポジットレジン三者間の理工学的性質が異なるために、多様なストレスが負荷されることによって、膨縮や変形などに代表される形状変化に基づく侵襲が生じる。特に、口腔内で生じる代表的なストレス因子としては、温度ストレスと荷重ストレスを挙げることができ、これら口腔内の代表的なストレス因子がコンポジットレジン修復の歯質接着に及ぼす影響について探究することは、予後予測のための客観的指標のみならず、新たな修復材料や修復方法の開発・開拓にも寄与すると考えられる。そこで本実験では、口腔内環境における代表的なストレス因子である温度負荷と荷重負荷に注目し、それらの単独ならびに複合ストレスが歯頸部コンポジットレジン修復の接着特性に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、微小引張接着強さ (μ -TBS) の測定およびワイブル分析によるストレス因子の接着信頼性に関する評価と特徴づけを行うことによって検討した。

【材料および方法】 被験歯にはヒト抜去健全下顎小臼歯 40 本を用いた。材料には、クラレメディカル社のワンボトル・オールインワン・アドヒーズシステムである Clearfil Tri-S Bond、修復用レジンとして Clearfil AP-X (A3) を用いた。まず被験歯に対し、歯頂側壁がエナメル質と象牙質によって、歯肉側壁が象牙質のみによって構成された類側歯頸部規格化 V 字状窩洞を形成した。ついで、製造者指定の歯面処理、修復用レジンの一塊充填、光照射、37°C 湿ボックス中の 24 時間保管を経て、Soflex® XT (3M ESPE) による一連の研磨を行った。その後、修復試料はストレス非負荷 (Control: C)、温度ストレス (Thermal Stress: T)、荷重ストレス (Load Stress: L)、複合ストレス (Thermal Stress + Load Stress: T+L) の 4 群に分別し、試験を行った。なおストレス条件は、T において 5°C/55°C 間 (各 20 秒間浸漬) 2,000 セットのサーマルサイクリング、L では 12kgf \times 10 万回 (90 回/分) の繰り返し荷重、T+L では T 条件と同一のサーマルサイクリングと L 条件と同一の繰り返し荷重による同時負荷とした。ついで、全試料は歯軸と平行に窩洞中央部で半切研磨し、近心・遠心 2 試料それぞれから厚さ 1.0mm の板状切片切り出しを行った。その後、歯肉側壁中央部の象牙質面に対する μ -TBS 値測定のために、被着面積 1.0mm²、最狭窄部幅・厚さ・平行部長さ各 1.0mm の規格化ダンベル状試料を作製し、テストスピード 1.0mm/min 下における測定 (n=20) を行った。なお、 μ -TBS 値は、一元配置分散分析と Tukey の q 検定による水準間多重比較ならびにメジアンランク法によるワイブル分析によって統計学的解析を行った。

【成績】 Fig. 1 に、4 種実験条件の平均 μ -TBS 値 (s. d.) を示す。分析の結果、ストレス条件の違いは μ -TBS 値に有意な影響を与え、さらに T は C と同等の μ -TBS 値を示すものの、L および T+L の μ -TBS 値は C より有意に低い値であった。なお、ストレスを加えた 3 種条件間の μ -TBS 値は統計学的に同等であった。Fig. 2 に Gauss の最小二乗法から求めた 4 種実験条件のワイブルプロット (n=20) に基づく回帰直線を示す。ワイブル分析の結果、C/T/L/T+L のワイブル係数 (m 値) はそれぞれ 4.18/4.97/4.58/2.78 を示した。各条件の m 値について有意性の検定を行った結果、T+L 値は他の 3 種条件値に比べ危険率 1% で有意に小さいことが判明した。

【考察および結論】 口腔内環境想定ストレス因子負荷後における歯頸部 V 字状窩洞内象牙質接着強さは C > T > L > T+L の順となる平均 μ -TBS 値を示すものの、T 因子は C 条件下で得られる接着強さを顕著に遞減させる要因とはなっていないことが判明した。しかし、L 因子は T 因子に比べ強い接着強さ遞減因子であり、両者から構成された T+L 因子はさらに強い遞減効果を有することが明らかとなった。また、Clearfil Tri-S Bond 固有の接着強さ獲得のための信頼性は、T+L 因子の負荷によって有意に低下し、T 因子または L 因子単独の負荷は C 条件と同等の信頼性を維持していることが判明した。接着強さ試験では、ストレス因子の負荷条件内における有意差は認めなかったものの、接着信頼性に関する評価においては T+L 因子のみに顕著な低下作用が認められた。以上から、T 因子と L 因子それぞれの単独負荷では口腔内環境の再現は不十分であり、両因子による複合ストレス負荷によって口腔内環境の再現性は向上し、臨床的な接着挙動や窩洞内の接着特性の検証に寄与することが示唆された。

なお、ヒト抜去歯の使用に関しては日本歯科大学生命歯学部倫理委員会の承認を得た。

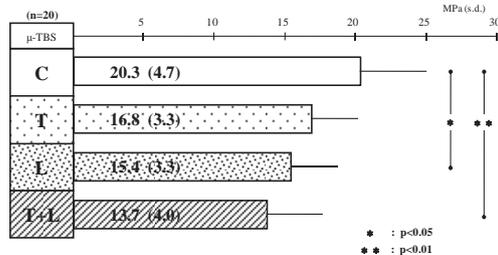


Fig.1 Mean μ -TBS of four types of stress condition

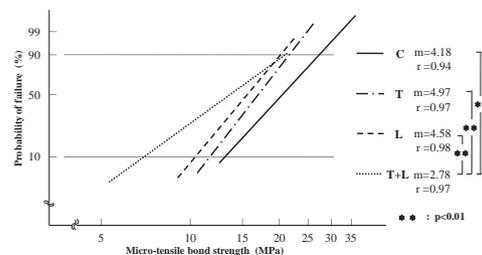


Fig.2 Difference in the probability of failure against μ -TBS among four types of stress condition

う蝕検知液の着色除去に関する各種根管洗浄液の影響

鶴見大学歯学部附属病院総合歯科 2 *鶴見大学歯学部歯科保存学第二講座

○矢作保澄 山口博康 新井 高* 高水正明

Influence of root canal irrigating solutions on the removal of a caries detecting dye solution.

Department of General Dentistry and Clinical Education Tsurumi University School of Dental Medicine

*Department of Periodontics and Endodontics Tsurumi University School of Dental Medicine

○Hozumi YAHAGI, Hiroyasu YAMAGUCHI, Takashi ARAI, Masaaki TAKAMIZU.

【緒言】

感染根管治療において根管上部の感染歯質の除去は根管象牙質の細菌感染を防止するためにも重要である。

感染根管治療ではクラウンダウン法が応用され、この術式は根管上部から汚染象牙質を根管外に除去し根尖方向にアプローチすることにより、汚染物質を根尖孔外へ押し出すことを防ぐと考えられる。

根尖周囲への細菌感染はフレアアップ、根尖性歯周炎の難治化、根尖孔周囲へのバイオフィーム形成が生じると考えられている。これらを防ぐ為にも、クラウンダウン法を応用することによりメカニカルな感染歯質の除去と化学的に根管洗浄することにより汚染物質を根管内から除去し、無菌化により良好な結果が得られる。

この術式を遂行する上で根管内の感染歯質の除去のためう蝕象牙質の染色を行なうことは重要であると考えられる。この根管内におけるう蝕象牙質への染色後と切削後の洗浄に根管洗浄液を使用により根管治療は効率的に無菌性の向上することが考えられる。

近年、マイクロスコープが歯内療法にも応用されより、根管内のクラック、穿孔、など肉眼では困難であった診断および治療が可能となりより細密な感染象牙質の除去が可能となった。そこで根管内の効率的な無菌化を目的とした根管治療中におけるう蝕検知液の洗浄液の選択について、根管洗浄液のう蝕検知液の染色性への影響について検討した。

【実験方法】

う蝕検知液 (カリエスチェック日本歯科薬品 山口) レッド、ブルーの染色性に根管洗浄剤が影響を与えるか否かについて洗浄液以下、3%過酸化水素水、3%次亜塩素酸ナトリウム溶液、スメアクリーン溶液 (日本歯科薬品 山口) を用いコントロールを蒸留水 (DW) とした。

1) う蝕検知液の吸収波長ピークの検出

カリエスチェック：レッド、ブルーを 1000 倍希釈し、この吸収波長のピークについて分光光度計にて吸収波長のピークを (Smart Spec 3000 USA) 検出した。

2) う蝕検知液希釈実験

1) 実験で得られた吸収波長のピークについて、カリエスチェックのレッド、ブルーの染色液 50 μ l に対して各洗浄液で 2000 倍、3000 倍、4000 倍希釈し、分光光度計で (U-1100 日立, 東京) 吸光度を計測した。

【結果】

1) う蝕検知液：レッド：569nm ブルー：626nm の吸収波長のピークを検出した

2) う蝕検知液の希釈実験

3%次亜塩素酸ナトリウム溶液はコントロールである DW, 3%過酸化水素水、スメアクリーンに比較して有意に低い吸光度を示した。またブルーはレッドに比較して顕著に低い吸光度を示した。

【考察】

感染根管治療における感染歯質の除去は必須であると考えられるが詳しい術式については明らかにされていない。そこで、根管内の効率的な無菌化を目的とした根管治療中におけるう蝕検知液と根管洗浄液の影響について検討した。その結果、次亜塩素酸ナトリウム溶液では吸光度が低値を示したことからう蝕検知液の脱色の可能性が示唆された。今後、う蝕象牙質の染色性と確実な除去術式について検索を加える予定である。

【結論】

3%次亜塩素酸ナトリウム溶液はう蝕検知液の染色性に影響を及ぼす。

レーザー高吸収体配合う蝕検知液を用いたう蝕の選択的除去

¹大歯大・保存, ²阪大院・工・量子エネルギー

- 吉川一志¹⁾, 保尾謙三¹⁾, 松田有之¹⁾, 善入寛仁¹⁾, 竹内 撰¹⁾,
鈴木康一郎¹⁾, 谷本啓彰¹⁾, 岩田有弘¹⁾, 粟津邦男²⁾, 山本一世¹⁾

Selective Removal of Caries Using Experimental Caries-detecting-dye-solutions with Highly Laser-absorptive substances

Osaka Dental University, Osaka University.

○YOSHIKAWA Kazushi, YASUO Kenzo, MATSUDA Tomoyuki, ZENNYU Kanji, TAKEUCHI Osamu,
SUZUKI Koichiro, TANIMOTO Hiroaki, IWATA Naohiro, AWAZU Kunio, YAMAMOTO Kazuyou

【目的】患者の治療時, minimal intervention(MI)のコンセプトが歯科医師の間で浸透し, う蝕治療に関しても歯の削除量を減らすためにう蝕検知液の改良やう蝕を選択的に削除する器機の開発が行われてきた。我々は各種波長のレーザーの吸収特異性に注目し, 青もしくは緑のう蝕検知液で吸収率が向上したことを報告してきたが, その研究過程で第1級アミノ基を有する化合物(レーザー高吸収体)を配合するとEr:YAGレーザーの吸収率を向上させることが可能であることが判明した。今回, 我々はレーザー高吸収体を配合したう蝕検知液を試作し, Er:YAGレーザーに対する吸収率と染色した人工う蝕象牙質に対する除去効率を測定し, レーザー高吸収体配合う蝕検知液の吸収特異性を検討したので報告する。

【材料と方法】

(吸収率の測定)う蝕検知液としてレーザー高吸収体を1.0, 2.0, 4.0%配合した無色と緑色のう蝕検知液を試作した。試作う蝕検知液をくぼみのあるスライドグラスに滴下し, 気泡の入らないようにカバーグラスを静置し, Er:YAGレーザーを35mJ, 10ppsの条件で照射し, 透過するエネルギー量をレーザーパワーメーター(FieldMax II, Coherent社)で測定した。Er:YAGレーザー発振装置としてErwin AdvErl®(モリタ製作所)を実験に供した。スライドグラスとカバーグラスのみでレーザーを照射し, 得た数値をコントロールとしてう蝕検知液による照射エネルギーの吸収率を算出した。算出したデータは一元配置分散分析とScheffeの検定で統計処理を行った(n=3)。

(除去効率の測定)ウシ歯象牙質を5×5mm, 厚さ1mmに成型し, 表面を除いてネイルヴァーニッシュでコーティングを行った後, 0.1M乳酸に24時間浸漬し, 人工う蝕象牙質を作製した。各濃度の無色と緑色のう蝕検知液を滴下し, Er:YAGレーザーを100mJ, 1ppsの条件で10パルス照射し, 形成された窩洞を3次元形状測定装置にて測定し, 深さ, 除去体積を測定した。同様の条件でう蝕検知液を滴下していない人工う蝕象牙質に形成された窩洞を測定し, 得た数値をコントロールとした。算出したデータは一元配置分散分析とScheffeの検定で統計処理を行った(n=5)。

【成績および考察】吸収率については, う蝕検知液のレーザー高吸収体の濃度が増加すると吸収率も増加する傾向が認められた。同じ濃度のレーザー高吸収体を配合した無色と緑色の試作う蝕検知液の吸収率を比較した場合, 緑色の試作う蝕検知液の方が有意に高い吸収率を示した(p<0.05)。

除去効率については, う蝕検知液のレーザー高吸収体の濃度が増加すると窩洞の深さ, 除去体積量共に増加する傾向が認められた。レーザー高吸収体を4.0%配合するう蝕検知液を使用した場合, 窩洞の深さはコントロールと比べて有意に高い値を示し, また窩洞の除去体積量はその他の濃度と比べて有意に高い値を示した(p<0.05)。同じ濃度のレーザー高吸収体を配合する無色と緑色のう蝕検知液を滴下した人工う蝕象牙質にEr:YAGレーザー照射した場合, 窩洞の深さ, 除去体積量に有意差は認められなかった。

Er:YAGレーザーは歯質の削除に最も適したレーザーであり, 今回試作したレーザー高吸収体配合う蝕検知液を使用することにより吸収特異性が認められたことから, レーザー高吸収体配合う蝕検知液に染色されたう蝕象牙質のみが削除できるエネルギー設定を行うことにより, 安全で, かつ効率的な選択的う蝕除去ができると考えられる。

【結論】レーザー高吸収体配合う蝕検知液は Er:YAG レーザーの吸収率を増加させ, また Er:YAG レーザーによる窩洞形成の深さ, 除去体積量ともに増加させる効果が認められたことから, レーザー高吸収体配合う蝕検知液を使用することにより, Er:YAG レーザーによる選択的う蝕除去の可能性が示唆された。

本研究は平成 21 年度 文部科学省 科学研究費補助金 基盤研究 (C) 18592104 の助成を受け行われた。

う蝕硬さ測定システムの開発

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座
清水明彦

Development of a Hardness Detecting System of Carious Dentin
Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine
Akihiko SHIMIZU

【緒言】

う蝕象牙質の硬さは、病巣を除去する場合の重要な指標の一つとして、修復学の教科書やう蝕治療ガイドラインに記載されている。しかし、う蝕象牙質の硬さを測定する機器が、わが国にも世界的にも存在しないため、う蝕象牙質の硬さの判定は、学生の実習教育の場でも、臨床研修医のトレーニングの場でも、さらに臨床の現場においても、感触、手ごたえ、着色など、もっぱら主観的なものに頼らざるを得なかった。

そこで、客観的にう蝕象牙質の硬さを評価する必要性から、「う蝕硬さ測定システム」を開発したので報告する。

【本システムの硬さ測定原理と構成】

1. 硬さ測定原理：

塗料を塗布した圧子を、一定荷重で試料に押し込み、塗料の消失距離から押し込み深さを求め、硬さに換算する (2009年11月30日 特許出願)。

2. 硬さ測定システムの主要構成機器：

ハンドピース (三栄エムイー)、顕微鏡 (DS-3UX-SH、マイクロ・スクエア)、ノートパソコン

3. ハンドピース：

ハンドピース (含アーム)・・・全長17cm、重さ60g

圧子・・・直径1mmの超硬合金棒の一端を円錐形にしたもので、内抱角50度、先端曲率半径18 μ m
測定圧・・・150gf (ブザーが鳴る)

【硬さ測定の方法】

- ① 圧子の先端に塗料 (白色ボスカ、三菱鉛筆) を塗布
- ② 圧子を象牙質面に垂直に押し付け、荷重が150gfに達したら引き離す
- ③ USBケーブルでパソコンに接続された顕微鏡の試料台に、圧子を置く
- ④ 圧子の先端から白色塗料の消失ラインまでの距離 (μ m) を、計測ソフトで測定
- ⑤ 「距離 (μ m) - 硬さ (KHN) 曲線」あるいは「換算表」を用いてヌーブ硬さに換算

【考察】

正確な硬さ値を求めるには、圧子をできるだけ象牙質面に垂直に押し当てる必要があり、それには、ある程度の慣れも必要である。今回新しく開発したう蝕硬さ測定システムは、ハンドピースが小型軽量であり、抜去歯や口腔内のう蝕に対し、非破壊的かつリアルタイムに硬さ測定ができる点に特徴がある。従って、う蝕象牙質の再石灰化の様相を、臨床の場で硬さを指標に評価することが出来る。さらにこの硬さ測定システムは、ポータブル硬さ試験機として、歯だけでなく、骨、プラスチック、金属、塗装膜など、色々な物質の硬さ測定にも広く利用することができる。

【結論】

今回開発された硬さ測定システムは、ハンドピース、顕微鏡、ノートパソコンから構成され、圧子がう蝕象牙質に押し込まれた深さ (μ m) を計測してヌーブ硬さ (KHN) に換算するものであり、非破壊的かつリアルタイムにう蝕象牙質の硬さを求めることができる点に特徴がある。

健全象牙質およびう蝕象牙質からの励起蛍光の分光特性について

昭和大学歯学部歯学教育研修センター¹⁾、歯科保存学講座²⁾、大塚電子株式会社³⁾
長谷川篤司¹⁾、國井麻依子¹⁾、伊佐津克彦¹⁾、伊藤和雄²⁾、星野功雄³⁾

Spectroscopic characterization of light-induced fluorescence from sound and caries dentin

Department of Comprehensive Dentistry¹⁾, Clinical Cariology²⁾, Otsuka Electronics³⁾
Tokuji Hasegawa¹⁾, Maiko Kunii¹⁾, Katsuhiko Isatsu¹⁾, Kazuo Itoh²⁾, Isao Hoshino³⁾

【目的】

近年、歯の保存治療は初期う蝕を認識し、定量・定性してう蝕活動性の管理を行うことが重要であると考えられている。しかし、従来実施されてきた探針などの直接接触による診察では、再石灰化界面を損傷するだけでなく、表面化脱灰や下ばれう蝕などの評価に限界があった。そこで、歯質の励起蛍光特性を利用した非接触型う蝕認識システムが開発、市販に至っているが、これらの検出精度や計測値などに明確な統一見解が得られていないのが現状である。そこで本研究では歯からの励起蛍光を正しく評価して、精度高くう蝕を定量・定性するシステムを開発する一助として、市販う蝕認識システムに使用されている励起光の分光特性を確認するとともに、健全あるいはう蝕象牙質からの励起蛍光の分光特性を解析、検討した。

【材料と方法】

市販非接触型う蝕認識システムの励起光の分光特性

市販非接触型う蝕認識システムとしてLED光源使用のビスタカム-P (Durr Dental)、レーザー光源使用のダイアグノデント (KAVO) の2種光源を準備し、分光分析器 (MCPD3700、大塚電子) に装着した石英ファイバー受光端末と光線照出口との距離を40cmに設定して励起光の分光特性を解析した。

象牙質の励起蛍光の分光特性

象牙質う蝕のあるヒト抜去大白歯の隣接面を歯軸と平行に削除して、直径2mm以上の象牙質う蝕が肉眼で確認できる平面を露出させ、耐水研磨紙#1000まで仕上げて測定用象牙質平面を作成した。次に、計測用平面がサンプルステージ上で水平になるよう抜去歯をガラスプレート上に常温重合レジンで固定し、計測用平面をE-Lizeコンディショナーで20秒間歯面清掃、水洗、乾燥して計測に供した。励起蛍光特性測定システムは150Wキセノン光源、分光器、Y型ファイバー、分光分析器で構成し、キセノン光源から出力された光線を分光器で360, 380, 400, 420, 440nmのピーク波長を持つ5種単色光 (励起光) に変換して使用した。分光器から照出された励起光をY型ファイバーで誘導して光出射端末の投光用ファイバーから計測用歯面上の健全象牙質あるいはう蝕象牙質に照射し、発現した励起蛍光を光出射端末の受光用ファイバーで採集して分光分析器に誘導し、PCにて解析した。

【結果および考察】

市販非接触型う蝕認識システムの励起光の分光特性

LEDのビスタカム-Pでは408nmに単一ピークを持つ分光スペクトルが、レーザーであるダイアグノデントでは654nmに単一ピークを持つ分光スペクトルが確認された。ダイアグノデントのピーク波長強度はビスタカム-Pの約100分の1であった。

象牙質の励起蛍光の分光特性

健全象牙質では (励起光波長の約90nm上方に) 緩やかな単一ピークを持つ分光スペクトルの励起蛍光が確認され、このピークは励起光波長が400nmの場合に最も強く明瞭であった。一方、う蝕象牙質では励起光波長360~400nmの場合に620nm、682nm、765nm付近に3つのピークをもつ分光スペクトルの励起蛍光が確認されるが、420nm以上の励起波長光の場合には不明瞭となった。

以上の結果より、健全象牙質およびう蝕象牙質は400nm前後の励起光によって明らかに異なる励起蛍光を発現する。また、この励起蛍光は分光スペクトルによる分光特性として確認できることが明らかとなった。

データマイニングの手法を用いたう蝕病変発生予測モデルの構築

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)¹

大阪大学大学院医学系研究科内科系臨床医学情報統合医学講座²

○伊藤 中¹、林 美加子¹、濱崎 俊光²、恵比須 繁之¹

Prediction of dental caries using data mining approach

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry¹

Department of Biomedical Statistics, Osaka University Graduate School of Medicine²

○Ataru ITOU¹, Mikako HAYASHI¹, Toshimitsu HAMASAKI² and Shigeyuki EBISU¹

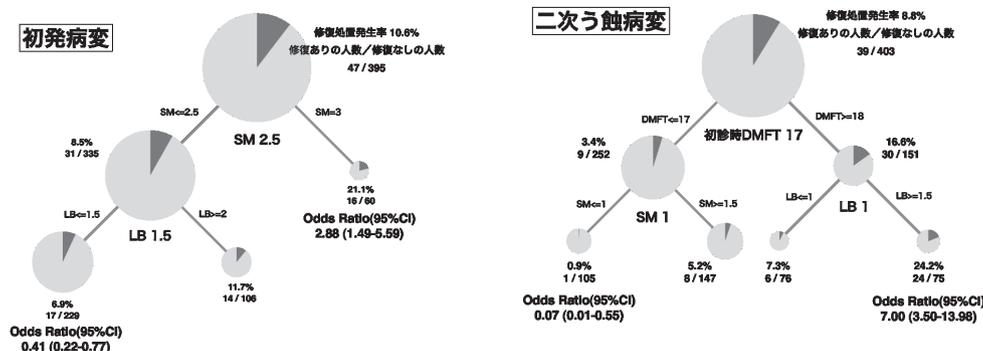
【緒言】う蝕は、脱灰と再石灰化のバランスの崩れが長期間持続することにより、歯に実質欠損を引き起こす疾患である。脱灰、再石灰化の平衡に影響を及ぼす要因としては、う蝕原性細菌、唾液の量や緩衝能などが知られているが、各要因のう蝕病変発生に及ぼす影響の強さについては明らかにされていない。また、カリエスリスク要因による将来の齲蝕病変発生の予測についても、確定的なモデルは構築されていない。本研究では、一般開業歯科医院の来院患者の臨床データの統計学的分析を通じて、う蝕病変発生予測モデルの構築に関する知見を得たので報告する

【対象患者】伊藤歯科クリニック (大阪府茨木市) における最終来院日が 2008 年 2 月 9 日以前で、データベースに臨床データが登録されている初診時年齢が 20 歳以上で 64 歳以下の患者のうち、初診日から 365 日以内にカリエスリスク検査を実施した 442 名 (男性 130 名、女性 312 名) であった。

【分析方法】mutans streptococci 数、Lactobacillus 数およびメンテナンス来院状況の初発う蝕病変および二次う蝕病変に対する影響の経時的変化について検索した。観察期間を、初診から 3 年以内、3 年を超えて 5 年以内、5 年を超えての 3 時期に分けて、多重ロジスティック回帰分析を行って各要因の相対オッズを算出し、その経時的変化を調べた。さらに、う蝕病変発生のハイリスク患者とローリスク患者を分別していくため、赤池情報量規準 (AIC) を参考に変数を抽出して classification and regression trees (CART) を応用したう蝕病変発生予測モデルの検討を行った。

【結果および考察】各期間で分析対象となった患者は、3 年以内で 442 名、3 年を超えて 5 年以内で 217 名、5 年を超えて 114 名であった。う蝕病変を発生した人数は、初診から 3 年以内、3 年を超えて 5 年以内、5 年を超えての順に、初発病変で 47 名、30 名、26 名、二次う蝕病変で 39 名、35 名、32 名であった。初発病変発生のオッズ比 (95% 信頼区間) は、3 年以内で SM が 10^6 CFU/ml 以上の場合に 2.34 (1.15-4.76) であった。また、5 年を超えてメンテナンス受診状況が「やや不良」あるいは「不良」の場合には 3.03 (1.20-7.66) であった。一方、二次う蝕病変発生のオッズ比 (95% 信頼区間) は、3 年以内で SM が 5×10^5 CFU/ml を超える場合が 2.22 (1.06-4.62) で、LB が 10^4 CFU/ml を超える場合には 3.04 (1.35-6.85) となった。これらの結果から、SM および LB は 3 年ごとの検査が望ましいことと、初発病変の発生を抑制するためには、メンテナンスの 5 年以上の継続が必要であることが示唆された。

また、CART により、初診より 3 年以内の初発病変では、SM が 10^6 CFU/ml 以上の場合に、他に比べて初発病変が 2.88 倍発生しやすいハイリスク患者群と、SM が 10^6 CFU/ml 未満かつ LB が 10^5 CFU/ml 未満の場合には、他に比べて初発病変の発生が 0.41 倍に抑えられるローリスク患者群がそれぞれ同定された (下左図)。また、初診より 3 年以内の二次う蝕病変では、初診時 DMFT が 18 以上かつ LB が 10^4 CFU/ml を超える場合に、他に比べて二次う蝕病変が 7.00 倍発生しやすいハイリスク患者群と、初診時 DMFT が 17 以下かつ SM が 10^5 CFU/ml 以下の場合に、他に比べて二次う蝕病変の発生が 0.07 倍に抑えられるローリスク患者群がそれぞれ同定された (下右図)。このように CART を用いることで、より少ないパラメーターで患者の将来の初発病変および二次う蝕病変の発生を予測することが可能となった。



初心者による各種象牙質接着剤の接着強さについて

北海道大学大学院歯学研究科口腔科学講座歯科保存学教室
○付 佳楽, 角田晋一, 池田考績, 佐野英彦

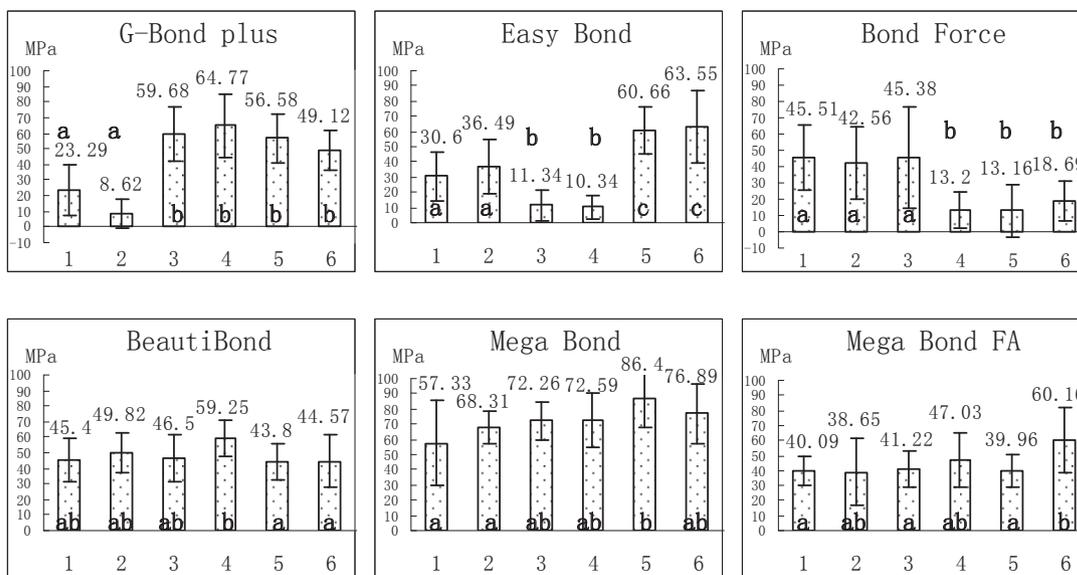
The μ TBS of six self-etching adhesives preformed by an uninitiated researcher

Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science, Hokkaido University, Graduate School of Dental Medicine
Jiale Fu, Siniti Kakuda, Takatsumi Ikeda, Hidehiko Sano

Objective: The subject of this study was to evaluate the technique sensitivity among the results of contemporary self-etching systems (SES) through the same uninitiated researcher's operation.

Materials and Methods: Thirty six human third molars were used in this study and every six teeth were assigned to each one-step SES, G-Bond plus (GBp), Easy Bond (EB), Bond Force (BF), BeautiBond (BB), and two 2-step SES Mega Bond (MG) and Mega Bond FA (MGFA). Each material was applied and followed by build-up of resin composite (Clearfil APX). After storage in 37°C distilled water for 24 hours, each tooth was cut into bar-shaped specimens (1.0mm²) for the micro-tensile bond strength (μ TBS) test. Both preparation of specimens and μ TBS testing were repeated six times for each adhesive and accomplished by the same operator who admitted to PHD course of Hokkaido University seven months before this project, and informed only from the manufacturers' instruction. The obtained data was expressed as MPa and statically analyzed using the Games-Howell and Tukey test.

Results: The results of μ TBS testing were indicated in the figures. Regarding GBp and EB, the μ TBS values illustrated up and down trends. On the other hand, the result of BF significantly decreased in 4-6 testing. As the other systems, BB, MB and MGFA showed stable results.



Same letters mean no statistical difference in each adhesive ($P > 0.05$)

Discussion: To obtain higher performance of self-etching adhesives, it should be important to understand the technique sensitivity of each bonding material, especially when operators were not accustomed with the latest adhesives. Therefore, manufactures should notify the information that how to gain the maximum performance of the newly developed products as possible.

Conclusion: It should be better to aware of the technique sensitivity of different adhesives before their use.

光干渉断層 (Optical Coherence Tomography) 装置を用いた接着欠陥の検出

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門², (株)モリタ東京製作所³
○島村 穰¹, 黒川弘康^{1,2}, 村山良介¹, 岩佐美香¹,
陸田明智^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 釜口昌平³, 三畑幸則³

Detection of Adhesion Defect by Means of Optical Coherence Tomography

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry, J. MORITA TOKYO MFG CORP.³
○SHIMAMURA Yutaka¹, KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, MURAYAMA Ryosuke¹, IWASA Mika¹,
RIKUTA Akitomo^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, KAMAGUCHI Syohei³, MIHATA Yukinori³

【緒言】

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

今回, OCT の効果的な臨床使用術式を確立するための基礎的研究の一環として, 光重合型レジン修復において生じる可能性のある, 歯質と光重合型レジンとの接合界面付近における接着欠陥について検討することを企画した。すなわち, OCT を用いることによって, 口腔内での検出が困難である接着欠陥の観察が可能であるかについて検討した。

【材料および方法】

供試した接着システムとしては, 2ステップシステムとして Clearfil Mega Bond (クラレメディカル, 以後 MB) およびシングルステップシステムとして Clearfil tri-S Bond (クラレメディカル, 以後 TS) の2製品を用いた。また, レジンペーストとして Clearfil AP-X (クラレメディカル, 以後 AP) を用いた。接着欠陥の検出は, ウシ下顎前歯歯冠部唇側面中央付近に直径 2mm, 深さ 1mm の規格窩洞を形成し, 異なる条件でレジンペーストを填塞した際の接合界面付近の変化について観察した。

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

観察対象としては,

1. 製造者指示条件で歯面処理を行った後, レジンペーストを填塞, 重合した窩洞
2. 歯面処理を行わずにレジンペーストのみを填塞, 重合した窩洞
3. アドヒージブ塗布後, これに光照射を行わずにレジンペーストを填塞, 重合した窩洞

の3条件とした。

OCT を用いてこれらの断層像を観察するとともに, 形状測定レーザー顕微鏡 (VK-9710, キーエンス) を用いて縦断面を撮影し比較, 検討した。なお, OCT による観察時期はレジンペースト填塞後, 24時間とした。

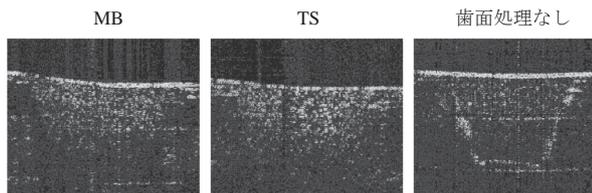
【成績および考察】

試作 OCT 装置を用いて, レジンペーストを填塞, 重合した窩洞の断層像を観察したところ, 製造者指示条件で歯面処理を行った場合には, いずれの歯面処理材においても歯質と光重合型レジンとの境界部が移行的な像として観察された。一方, 歯面処理を行わず

にレジンペーストを填塞, 重合した条件では, 歯質と光重合型レジンとの境界部にシグナルが強く現れる傾向を示した。このように, 歯面処理条件の違いが断層像に影響を及ぼした原因としては, 光重合型レジンの重合収縮によって, 歯質と光重合型レジンとの境界部に何らかの影響が生じたためと考えられた。また, 歯面処理条件の違いによってその程度が異なり, OCT から照射された近赤外光の接合界面付近での散乱の程度が異なったためと考えられた。

【結論】

OCT を用いて歯質と光重合型レジンとの接合界面を観察することは可能であり, 接着欠陥も, その程度によっては検出が可能であることが判明した。今後, 口腔内において補修復が必要と考えられる症例において, その断層像を OCT を用いて観察, 検討する予定である。



フッ化炭素鎖を含む表面処理剤の歯科への応用 (XIX) –HAP に対する新規ハイブリッド界面活性剤の改質効果–
神奈川歯科大学口腔治療学講座保存修復学分野, ¹⁾神奈川歯科大学生体材料器械学講座, ²⁾東京理科大学工学部工業化学科
○森 梨江, 二瓶智太郎, 大橋 桂, 三宅 香, 芹田枝里, 近藤行成²⁾, 倉田茂昭¹⁾, 好野則夫²⁾, 寺中敏夫

Application of Surface Modifier Containing Fluorocarbon Chain in Dentistry (XIX)
–Modification Effect of a Novel Hybrid Surfactant on Hydroxyapatite–

Div Resto Dent, Dept of Oral Med, Kanagawa Dent Coll. ¹⁾Dept of Biomater, Kanagawa Dent Coll.

²⁾Dept of Industrial Chemistry, Tokyo University of Science.

○MORI Rie, NIHEI Tomotaro, OHASHI Katsura, MIYAKE Kaori, SERITA Eri,
KONDO Yukishige²⁾, KURATA Shigeaki¹⁾, YOSHINO Norio²⁾ and TERANAKA Toshio

【研究目的】

我々は歯質表面の表面自由エネルギーを低下させ、かつ耐酸性を付与することができる歯面改質剤を開発し、ブラークの付着、形成ならびに脱灰を抑制して、齲蝕および歯周疾患を予防することを目的として研究を進めてきた。そこで本研究では、新規に合成した6個のフッ化炭素をもち、水溶性で歯磨剤に添加可能な新規リン酸エステル塩型ハイブリッド界面活性剤 (sodium phenyl 1-[(4-perfluorohexyl)phenyl]-1-hexylphosphate :F6H5OP) にてエナメル質の主成分であるハイドロキシアパタイト粉末 (HAP powder) を改質し、タンパク質吸着抑制能により改質効果を検討した。

【材料および方法】

99.5%エタノールにて1.0, 3.0および5.0 mmol/lに調製したF6H5OP溶液にHAP powder (ハイドロキシアパタイト HAP 200, 太平洋化学) 50 mg を各々加えて懸濁し、乾燥させた。タンパク質吸着量の測定は、改質HAP powder 50 mg に1,000 μ g のホスピチン (Sigma) 水溶液を加え、振盪器で10, 20, 30, 40, 60, 80, 100分、および2, 3, 6, 12時間攪拌、反応させ、400 gで10分間遠心分離を行い、HAP powder に吸着せず上澄に残ったホスピチンをゲルパーミエーションクロマトグラフィー分析装置 (GPC ; C-R4A, 島津製作所) により定量し、HAP powder に吸着したホスピチン量を算出した。

洗浄によるF6H5OP残量の測定は、3.0および5.0 mmol/lに調製したF6H5OP水溶液にて改質したHAP沈査に脱イオン水を加え、30秒間攪拌後、400 gで10分間遠沈し、上澄中のF6H5OPを高速液体クロマトグラフィー (HPLC ; LC-10AD, 島津製作所) にて測定した。この洗浄操作を2回繰り返して、測定した。洗浄後のタンパク質吸着量の測定は、1および2回洗浄したHAP powder の入った試験管に前述のホスピチン水溶液を加え、振盪器で30分、1, 2, 3, 6および12時間攪拌、反応させ、400 gで10分間遠心分離を行った上澄からHAP powder に吸着せずに残ったホスピチンをGPCにより定量し、未改質HAP powder それぞれの反応時間における平均吸着量で除し、ホスピチン吸着抑制率を算出した。HAP powder に対するタンパク質の吸着量の測定により得られた値は、それぞれの平均値および標準偏差を求め、一元配置分散分析により統計学的に処理し、さらに有意差が認められた場合にはTukeyによる多重比較検定を行った ($\alpha=0.01$)。また、1回および2回の洗浄により改質HAP powder から脱離したF6H5OP量はt検定により統計学的に分析した ($\alpha=0.01$)。

【結果および考察】

HAP powder に対するホスピチンの吸着量は、12時間後でF6H5OP 1.0 mmol/l改質は370 μ g, 3.0 mmol/lは244 μ g, 5.0 mmol/lは239 μ g と未改質HAP powder の940 μ gと比較して有意に低い吸着量を示した ($p<0.01$)。

洗浄によるF6H5OPの脱離量は、1回の洗浄により3.0 mmol/lでは約0.05 μ mol, 5.0 mmol/lでは約0.25 μ mol, 2回の洗浄により3.0および5.0 mmol/lともに約0.04 μ molの溶出を示し、洗浄後では5.0 mmol/lのみ1回目と2回目の溶出量に有意差が認められた ($p<0.01$)。さらにタンパク質吸着抑制率は、ホスピチン添加30分後では全ての改質群において約95%以上の抑制率を示したが、12時間後では36~60%を示した。

以上の結果より、HAP powder に結合したF6H5OPは洗浄により解離し、改質効果は経時的に徐々に低下するものの、12時間にわたりタンパク質吸着抑制効果を維持し、ブラークの歯面付着を抑制し得ることが示唆された。

PRG フィラー溶出液による歯質の石灰化—超音波装置による検討

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹、総合歯学研究所生体工学研究部門²

○川本 諒¹、安田源沢¹、田久保周子¹、辻本暁正¹

利根川雅佳¹、高見澤俊樹^{1,2}、瀧川智義¹、安藤 進^{1,2}、宮崎真至^{1,2}

Effect of PRG Filler Extract Application on Remineralization of Tooth Substrate

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²

Nihon University School of Dentistry

○ KAWAMOTO Ryo¹, YASUDA Genta¹, TAKUBO Chikako¹, TSUJIMOTO Akimasa¹,
TONEGAWA Motoka¹, TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2}, TAKIGAWA Tomoyoshi¹, ANDO Susumu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}

【緒言】

齲蝕は、脱灰と再石灰化との動的平衡が崩れた結果として生じる病変であることが判明している。この脱灰病変に対しては、病巣を早期に発見して早期に治療するという考え方から、齲蝕リスクを低減化させ、脱灰と再石灰化の動的平衡をいかにしてコントロールするかが重要であるという考え方に変化している。そこで演者らは、そのひとつとして多種のイオンを徐放する PRG フィラーの溶出液を利用して歯質の積極的な再石灰化を図る方法に着目した。今回は、PRG フィラー溶出液を歯質に作用させ、歯質に生じた脱灰あるいは再石灰化という変化を、非破壊的に物質の状態変化を測定可能である超音波透過法を用いて検討した。また、走査電子顕微鏡 (SEM) 観察ならびにレーザー顕微鏡観察を併せて行い、考察資料とした。

【材料および方法】

1. 超音波測定用試片の製作

ウシ抜去下顎前歯を用い、その唇側エナメル質および象牙質を 4×4×1 mm のブロックとして切り出した。次いで、耐水性 SiC ペーパーの #2,000 まで順次研磨し、これを試片とした。試片の数は各条件についてそれぞれ 6 個とした。

2. pH サイクル試験

37℃人工唾液(pH 7.0)の浸漬保管に先立ち、以下の条件で pH サイクルを設定した。

1) 0.1 M 乳酸緩衝液(pH 4.75)に 10 分間浸漬 (以後、De 群)

2) 脱灰溶液への浸漬に先立って、PRG フィラー溶出液 (PRG-14, 松風)に 10 分間浸漬 (以後、PRG 群)

なお、pH サイクルは 1 日 2 回、28 日間行った。

また、コントロールとして実験期間を通じて人工唾液への浸漬のみを行った群 (以後、Control 群) を設定した。

3. 超音波伝播時間の測定および FE-SEM 観察ならびにレーザー顕微鏡観察

超音波測定装置(Model 5900, Panametrics)を用いて、縦波で発せられる超音波の伝播時間を測定した。また、各試片の厚みから計算式を用いて縦波音速を求めた。所定期間の浸漬が終了した試片について、通法に従って SEM 観察用試料を製作し、FE-SEM(ERA-8800FE, Elionix)を用いて加速電圧 10 kV で観察を行った。また、レーザー顕微鏡 (VK-8700, Keyence)を用いて表面性状の経時的変化を観察した。

【成績および考察】

脱灰溶液に浸漬した De 群では、他の条件と比較して経時的にその音速が減少する傾向が認められた。一方、PRG 群では、エナメル質および象牙質試片ともに音速が増加する傾向が認められた。この歯質を透過する音速の変化は、PRG フィラー溶出液が脱灰抑制あるいは再石灰化に影響を及ぼしたことを示すものと考えられた。また、エナメル質のレーザー顕微鏡観察像からは、PRG 群では脱灰を示す像は観察されず、PRG フィラー由来と考えられる付着物あるいは析出物が認められ、De 群と明らかに異なる像を呈した。一方、象牙質においては De 群で象牙細管の漏斗状拡大が観察されたが、PRG 群では象牙細管の開口あるいは閉鎖している像などが混在して認められた。SEM 観察からも同様の観察像が認められた。

【結論】

PRG フィラー溶出液は、歯質の脱灰抑制効果および再石灰化促進に寄与する可能性が示唆された。

薄膜コーティングの歯ブラシ摩耗に対する耐久性

¹東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野

²歯と骨のGCOE

○丸藤伊織¹ 有吉芽生¹ 二階堂徹¹ 田上順次^{1,2}

Abrasion of coating materials by toothbrush

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

²GCOE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases

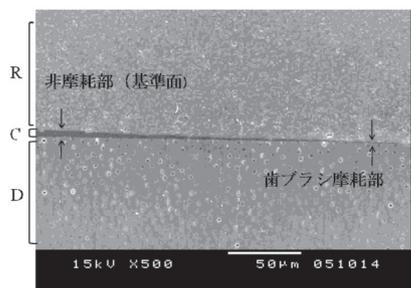
○ Iori GANDO¹, Meu ARIYOSHI¹, Toru NIKAIDO¹, Junji TAGAMI^{1,2}

【緒言】近年、口腔衛生状態の改善により、加齢に伴う有歯顎者の割合は急速に増加している。そのため、根面う蝕や象牙質知覚過敏症例への予防対策が求められており、その一つとして根面コーティング法が挙げられる。根面コーティング法とは、露出した歯根表面にボンディング材で薄いコーティング層を形成することであり、これまでの研究から、歯根のコーティングによって脱灰の抑制、バイオフィルムの付着抑制などの効果が報告されている。しかし、日常の歯面清掃によってコーティング面は常に歯ブラシによる摩耗が繰り返されることが予想され、薄膜コーティングの摩耗やその耐久性について検討することが重要である。そこで本研究では、薄膜コーティング材による根面コーティングの歯ブラシ摩耗に対する耐久性について検討を行った。

【材料及び方法】コーティング材には、Shiled Force (Tokuyama Dental, 以下SF)、Hybrid Coat (Sun Medical, 以下HC)の2種を用いた。牛歯の唇側象牙質を注水下にて露出させ、均一な被着面を得るため#4000SiCにて表面を研削後、各業者指示に従いSF、HCにて接着処理を行った。その後試料は37℃水中に24時間保管し、摩耗部となる中央2mmを残しマスキングテープにて基準面を保護した。SF群、HC群ともに歯ブラシ摩耗試験機K236(東京技研)に、歯ブラシ;プロスベックヤング(GC)を装備し、ストローク幅10mm、荷重300gfの条件下で1万回、5万回、10万回における繰り返し摩耗試験を行った。また、各回数においては歯磨剤の有無についても検討し、歯磨剤なしの群では精製水を、歯磨剤有りの群では、歯磨剤;ホワイトアンドホワイト(Lion)100gを700mlの精製水に溶解したものをスラリーとし、1万回毎に新しいものと交換した。摩耗試験後は、試料表面をレジセメント(Bistite, Tokuyama Dental)で被覆し、24時間保管後、アクリルレジン内に包埋した。これを3mmの厚みに切断し、各側面を鏡面研磨後、マスキング部分を基準面とし、そこからの各コーティング材の厚み変化をSEM観察により測定した。

【結果】摩耗部と非摩耗部(基準面)の境界移行部のSEM像をFig.1に示す。非摩耗部から摩耗部にかけては、コーティング層のスロープ状の減少が認められた。繰り返し摩耗試験におけるコーティング材の厚みの測定結果をFig.2に示す。SF群、HC群共に1万回、5万回、10万回と摩耗回数の増加に伴い、コーティング材の厚みも減少していく傾向を示した。しかし両群の間に摩耗量の大きな差は認められなかった。さらに、SF群とHC群共に歯磨剤有りの群は歯磨剤無しの群に比較し、摩耗量が大きく、歯磨剤有りのSF群の10万回、HC群の5万回と10万回では摩耗部が象牙質にまで達し、コーティング材自体の厚みが測定不能となった。

【考察】本実験から、SFとHCの材料間における歯ブラシ摩耗に対する耐久性に違いは認められず、歯磨剤の有無が大きく影響を与えることがわかった。



R: Resin cement C: Coating material D: Dentin

Fig.1 非摩耗部と歯ブラシ摩耗部の移行部

HC / 歯磨剤有り群 10000回

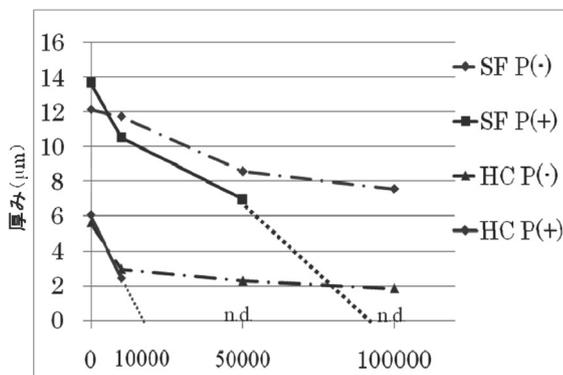


Fig.2 繰り返し摩耗におけるコーティング材の厚み

形状の異なる二酸化チタン光触媒から発生する free radical の漂白効果

1. 日本大学松戸歯学部歯内療法学講座, 2. モリタ製作所

○ 高橋知多香¹, 松井智¹, 小峯千明¹, 和田陽子¹, 高瀬俊彦¹, 的場一成², 辻本恭久¹, 松島潔¹

Bleaching effect of free radical generated by difference types of titanium dioxide

1. Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

2. J.MORITA MFG.CORP.

○TAKAHASHI Chitaka¹, MATSUI Satoshi¹, KOMINE Chiaki¹, WADA Yoko¹, TAKASE Toshihiko¹,

MATOBA Kazunari², TSUJIMOTO Yasuhisa¹ and MATSUSHIMA Kiyoshi¹

【目的】

漂白法で用いられる薬液は、30～35%の高濃度の過酸化水素水 (H₂O₂) を用いることが多く、その副作用として、有髄歯では知覚過敏症、無髄歯では歯根に外部吸収を引き起こす可能性が報告されている。近年、二酸化チタン (TiO₂) 含有低濃度 H₂O₂ が、漂白剤として開発され、TiO₂ の光触媒作用により 3.5% という低濃度の H₂O₂ でも優れた漂白効果が、引き出せることで注目されている。しかしながら、TiO₂ の光触媒活性については、未知の部分が多く、特に光の波長や TiO₂ の濃度の違いにより発生する free radical の役割や直接的な漂白効果についての報告は少ない。そこで本研究では、結晶構造および光触媒活性を持つ Anatase 型および Rutile 型、非晶質で光触媒活性を持たない Amorphous 型の TiO₂ に、低濃度 H₂O₂ を作用させ、波長の異なる LED 照射を行うことで発生する free radical の違いが、漂白効果におよぼす影響について、検討をおこなった。

【材料および方法】

1. Free radical の測定 : 6% H₂O₂ (最終濃度 3%) に各濃度に調整した TiO₂ (0～2.0%) を作用させ 180 μl とし 890 mM DMPO 20 μl を加え、波長 405, 470 nm の LED 照射を行い、電子スピン共鳴装置にて DMPO の ESR signal として捕捉し、反応後 1, 3, 5, 10 分後に free radical の測定を行った。

2. 漂白実験モデル系における検討 (ヘマトポルフィリン染色紙に対する漂白効果) : 象牙質の着色原因の一因子であるヘマトポルフィリンに対するモデル実験を行った。ヘマトポルフィリン 0.4 g をエタノール 400 ml に溶解させ、0.1% とし、インクジェットプリンター用光沢フィルムを染色させ、9×50 mm に裁断したものをヘマトポルフィリン染色紙として実験に用いた。ヘマトポルフィリン染色紙に上記の条件に調整した TiO₂ を作用させたものを塗布し、1 分間光照射し、照射終了後、キムワイプで拭き取った。ここまでの処理を 1 回とし、計 5 回 (5 分) 行った。漂白処理後の測色は接触型の三刺激値直読測色器であるシェードアイ NCC (松風) を使用して、L* 値、a* 値、および b* 値を求め、処理前の基準値を L*₀, a*₀, および b*₀, 5 分後の値を L*₁, a*₁, および b*₁ とした。また、色差を表す ΔE*ab 値を、 $\Delta E^*ab = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ から求め、色の変化および漂白効果を判定した。

【結果および考察】

Free radical の測定において、Antase 型、Rutile 型では、LED 照射による光触媒活性が増加し、free radical の発生量の増加が認められたが、Amorphous 型では認められなかった。本実験系の可視光領域での光触媒活性は、Rutile 型 > Anatase 型の順で上昇した。また、405 nm の LED 照射では、470 nm の LED 照射行った時よりも、free radical の発生量の増加が認められた。Rutile 型および Anatase 型では、低濃度において、ヒドロキシラジカル (・OH) の ESR スピンアダクトが認められたが、濃度の上昇に伴い、初期段階ではスーパーオキサイドアニオン (O₂⁻) の ESR スピンアダクトが検出され、経時的に・OH の ESR スピンアダクトへ変化していくのが認められた。Amorphous 型では、ESR シグナルに変化は認められなかった。

ヘマトポルフィリン染色紙に対する漂白実験では、L* 値では、全ての群で 470 nm の LED 照射で最も高い値を示した。a* 値および b* 値では、全ての群で 470 nm の LED 照射で最も低い値を示した。算出した ΔE*ab 値では、全ての群で 470 nm の LED 照射で最も高い値を示した。これらの結果から、TiO₂ の種類に関係なく 470 nm の波長でヘマトポルフィリン染色紙に対する漂白効果が高いことが示唆された。本実験系では、405 nm の LED 照射で free radical の発生量の増加が認められたが、ヘマトポルフィリン染色試験では、405 nm と比較して 470 nm の LED 照射でヘマトポルフィリン染色紙に対する漂白効果が認められた。

これらのことから推測ではあるが、office bleaching 法の作用機序は、free radical の量に依存すると考えられているので、本実験系の結果より、光触媒活性を有する Rutile 型や Anatase 型が、有効であると考えられた。一方、walking bleach 法では、H₂O₂ が象牙質に浸透し漂白効果を高めるため、光触媒活性がなく H₂O₂ を持続的に供給できる Amorphous 型の TiO₂ の併用が有効である可能性が考えられた。

新規レジンセメント “G-ルーティング” の歯質接合界面の SEM 観察

虎の門病院・歯科、*株式会社ジーシー
行定健治、徳井秀樹*、森上 誠、杉崎順平、宇野 滋、山田敏元

SEM observation of the bonding-interface created with a newly designed resin cement “G-Luting”

Toranomon Hospital, Department of Dentistry

*GC Corporation

Yukisada K, Tokui H*, Morigami M, Sugizaki J, Uno S, Yamada T

【研究目的】

近年、審美的なニーズの高まりからセラミックやジルコニアなどを用いた修復が行われ、合着材として接着性レジンセメントが用いられるケースが増えている。これらは各種被着体および歯面に対してそれぞれ特有の前処理法を必要としており、合着手順が煩雑になる傾向がある。2009年ジーシー社より、リン酸エステルモノマーを配合することによりメタル、セラミックス、ハイブリッドレジン等の各種修復物および歯面に対する前処理なしで合着可能なセルフアドヒーズタイプのレジンセメント “G-ルーティング” が開発・市販されるに至った。本研究では、G-ルーティング硬化物表面と、ヒト新鮮抜去歯を用いてエナメル質および象牙質との接合界面について SEM 観察を行ったので報告する。

【材料および方法】

G-ルーティングはツーペーストタイプであり、CD ディスペンサーにセットして押し出すだけで容易かつ正確に等量のペーストを採取することが可能である。また、ジーシー社によれば、G-ルーティングの基礎的性能は、被膜厚さ 10 μm 、操作時間 3 分、硬化時間 4 分、曲げ強さ 130MPa、圧縮強さ 264MPa、吸水性 23 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ 、溶解性 0.6 $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ とのことである。

G-ルーティングの A ペーストと B ペーストを練和紙上で 10 秒間練和してからモールドに填入し、30 秒間光照射して硬化させた後、エポキシレジンにより包埋した。また、ヒト新鮮抜去臼歯の歯冠を歯軸に垂直に切断して 2 枚のディスク状試片を作製し、#1,000 耐水シリコンカーバイドペーパーにて仕上げた面をエナメル質および象牙質の被着面とした。G-ルーティングを同様に練和してから被着面に塗布し、その上からもう一枚のディスク状試片の被着面を圧接して保持し、硬化させた (アドヒーズサンドイッチテクニック)。その後、直ちに半切し、エポキシレジンにより包埋した。1 週間後に、これらの試料を耐水シリコンカーバイドペーパーおよびダイヤモンドペーストで鏡面研磨した後、Ar イオンシャワー装置 (EIS-200ER, エリオニクス) を用いて Ar イオンエッチングを 1keV, 1.8mA/cm² の条件で 35 秒間行った後、白金蒸着を 2 分間施し、SEM (ERA-8900FE, エリオニクス) にて観察し、写真撮影を行った。

【結果および考察】

G-ルーティング硬化物表面の SEM 観察より、G-ルーティングには、2~4 μm のフルオロアルミノシリケートガラスと思われるフィラーとシリカフィラーを緻密に配合していることが明らかとなった。

エナメル質との接合界面の SEM 観察より、G-ルーティングはエナメル質と緊密に接合しており、gap の生成は認められなかった。象牙質との接合界面の SEM 観察より、界面における接着欠陥もなく良好に接合していることが確認され、象牙質表層には非常に幅の小さいハイブリッド層が認められた。

今後、各種修復物および歯質に対する接着性に関してさらに検討を加える予定である。

【結 論】

各種修復物および歯面に対する前処理なしで合着可能な G-ルーティングとヒト新鮮抜去歯エナメル質および象牙質との接合界面に Ar イオンエッチングを施し、SEM 観察を行ったところ、いずれも緊密な接合状態を示し、象牙質表層には非常に幅の小さいハイブリッド層が認められた。

MMP-3によるヒト単球系細胞株 THP-1からの可溶性 IL-6 受容体の産生亢進

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野, ²岡山大学病院 歯周科
○小林寛也¹, 大森一弘¹, 成石浩司², 山口知子², 富山高史², 久保克行¹, 前田博史¹, 高柴正悟¹

Enhancement of Soluble Interleukin-6 Receptor Production in Human Monocytic Cell Line, THP-1, by Matrix Metalloproteinase-3

¹Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ²Department of Periodontics & Endodontics, Okayama University Hospital

○Hiroya Kobayashi, Kazuhiro Omori, Koji Naruishi, Tomoko Yamaguchi, Takashi Tomiyama, Katsuyuki Kubo, Hiroshi Maeda, Shogo Takashiba

【緒言】

インターロイキン6 (IL-6) は様々な細胞に作用して、歯周病の病態形成に関与する炎症性サイトカインである。IL-6 が標的細胞の膜型 IL-6 受容体 (IL-6R) と結合した後、そのシグナル伝達分子 gp130 下流域の細胞内シグナル伝達系が活性化される (IL-6 classical-signaling)。一方、可溶性 IL-6R は IL-6 シグナルのアゴニスト作用を有することが知られ、細胞外領域において IL-6 と二量体を形成した後に gp130 と結合する (IL-6 trans-signaling)。すなわち、可溶性 IL-6R は IL-6 によって惹起される様々な炎症反応を増強する。したがって、歯周炎組織における可溶性 IL-6R の産生を制御できれば、歯周炎症制御の新たな治療戦略の確立に繋がる可能性がある。

慢性歯周炎の組織に集積するマクロファージなどの炎症性細胞は、可溶性 IL-6R の主な産生細胞である。可溶性 IL-6R は、選択的スプライシングや切断酵素による膜型 IL-6R のシェディングによって産生される。昨今、TNF- α 変換酵素 (TACE) が CD4 陽性 T 細胞の膜型 IL-6R のシェディングを誘導することが報告された (Briso *et al.*, *J Immunol*, 2008)。また、Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) の阻害によって、ヒト多発性骨髄腫細胞からの可溶性 IL-6R の産生が抑制されることも報告された (Hargreaves *et al.*, *Br J Haematol*, 1998)。MMP-3 は、MMP-1 を前駆型から活性型に変換する作用を持つプロテアーゼとして、歯周病悪化の一翼を担うことが知られている。しかしながら、MMP-3 が炎症性細胞の膜型 IL-6R のシェディングを誘導して、可溶性 IL-6R の産生を促進するかどうかは不明である。

今回、我々は可溶性 IL-6R の産生機序を調べるために、MMP-3 のシェディング機能に着目し、ヒト単球系細胞株 THP-1 による可溶性 IL-6R の産生性を検討した。

【材料および方法】

細胞および培養: ヒト単球系細胞株 THP-1 は、ウシ胎児血清を 10% の割合に含む RPMI1640 (Invitrogen) を用いて、37 °C, 5% CO₂ 存在下で培養した。マクロファージ様細胞への分化は、通法にしたがい phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA: 10 nM, Sigma) で細胞を刺激して行った。また、PMA で 24 時間刺激した後の付着細胞を実験に供した。

膜型 IL-6R および可溶性 IL-6R の mRNA 発現の検討: 6 穴プレートに 2.5×10^6 個/well の細胞を播種し、分化誘導した後、Trizol 試薬 (Invitrogen) を用いて全 RNA を回収した。標的遺伝子の mRNA 発現は、通法にしたがい RT-PCR 法を用いて検討した。

阻害剤による細胞増殖活性の影響: MMP-3 inhibitor (0~200 nM, Calbiochem)、あるいは TACE 阻害剤である TNF- α proteinase inhibitor (TAPI-1: 0~20 μ M, Calbiochem) を作用させた時の細胞増殖活性は、MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma) 法を用いて検討した。すなわち、96 穴プレートに 1.6×10^4 個/well の細胞を播種し分化誘導した後に各阻害剤を作用させた。その後 24~72 時間培養し、MTT を最終濃度 0.5 mg/ml になるように添加した。細胞増殖活性の程度は、MTT を吸収して青褐色のホルマザン形成した細胞を酸性プロパノールで溶解した後の溶解液の吸光度を計測して評価した (測定波長: 595 nm)。

可溶性 IL-6R 産生性に及ぼす MMP-3 の影響: 可溶性 IL-6R の産生量は市販の ELISA キット (R&D) を用いて測定した。すなわち、6 穴プレートに 1.0×10^5 個/well の細胞を播種し分化誘導した後に MMP-3 inhibitor (100 nM) を添加した後、24~72 時間培養した後の培養上清を試料として回収した。また、TAPI-1 を作用させた実験系を対照群とした。

統計解析: 各実験結果における有意差は Student's *t*-test を用いて検定し、P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

マクロファージ様 THP-1 細胞において、

1. 膜型 IL-6R および可溶性 IL-6R は遺伝子レベルで発現した。
2. MMP-3 inhibitor は、100 nM までは細胞増殖活性を抑制しなかったが、200 nM では有意に抑制した。一方、TAPI-1 は 10 μ M までは細胞増殖活性を抑制しなかったが、20 μ M では有意に抑制した。
3. MMP-3 inhibitor (100 nM) の添加によって、可溶性 IL-6R の産生量が有意に抑制された (P<0.05)。また、TAPI-1 (10 μ M) の添加によっても、可溶性 IL-6R の産生量が有意に抑制された (P<0.01)。

【考察・結論】

マクロファージ様 THP-1 細胞からの可溶性 IL-6R の産生機序として、選択的スプライシングおよび MMP-3 による膜型 IL-6R のシェディング機構の関与が示唆された。すなわち、MMP-3 は、内因性の切断酵素 TACE とともに外因性の切断酵素として可溶性 IL-6R の産生亢進作用を有すると考えられる。このことは、歯周炎症の増悪を制御し得る新たな標的カスケードになるものと期待される。

イルソグラジンマレイン酸による歯肉上皮細胞のバリアー機能制御について

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) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯科保存学分野

○藤田 剛, 應原一久, 湯本浩通, 林田浩一, 柴 秀樹, 岩田倫幸, 内田雄士, 宮川剛史, 河口浩之,
松尾敬志, 栗原英見

Irsogladine maleate regulates gingival epithelial barrier function.

1) Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, 2) Tokushima University

○Tsuyoshi Fujita, Kazuhisa Ouhara, Hiromichi Yumoto, Kouichi Hayashida, Hideki Shiba, Tomoyuki Iwata, Yuushi Uchida, Tsuyoshi Miyagawa, Hiroyuki Kawaguchi, Takashi Matsuo, Hidemi Kurihara

研究目的

歯周病は細菌感染に対する宿主の免疫応答の結果として歯周組織が破壊される疾患である。接合上皮の上皮細胞は歯周病原細菌の侵入に対して物理的なバリアーとして防衛的に機能する。一般的に炎症が進行すると上皮細胞間バリアーは破壊されることから、歯肉上皮細胞のバリアー機能の維持は歯周病の予防に有効であると考えられる。イルソグラジンマレイン酸(IM)は胃粘膜上皮細胞の機能を制御することによって防御系胃潰瘍治療薬として用いられていることから、同様にIMが歯肉上皮細胞の機能を制御することによって歯周病を予防できる可能性がある。私どもはこれまでにIMが歯肉上皮細胞のケモカイン発現を抑制すること、また歯肉上皮細胞の細胞間連絡や接着を制御することを明らかにしてきた。さらに、バリアー機能に深く関与すると考えられている claudin-1 が接合上皮に発現することを報告した。これらのことから、IMが claudin-1 の発現を調節することによって、上皮間バリアーを制御する可能性がある。本研究ではIMがラット接合上皮における claudin-1 の発現に及ぼす影響、またヒト歯肉上皮細胞(HGEC)培養系において、tumor necrosis factor (TNF)- α によって誘導される細胞間バリアー機能及び claudin-1 発現、局在の変化に対するIMの効果について検討した。

方法

- 1) 実験動物には9週齢のFischer344ラットを用いた。IM投与群(12匹)、非投与群(12匹)に分け、それぞれのラットの歯肉溝に *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) 生菌を塗布し、接合上皮における claudin-1 の発現を免疫染色法で調べた。
- 2) HGEC 培養系において、IM存在下、非存在下における TNF- α 刺激下において以下のことを検討した。
 - ① 細胞間透過性: Transepithelial electrical resistance (TER) を測定することによって、細胞間透過性を評価した。
 - ② claudin-1 の発現: HGEC から total RNA および cell layer を回収し、real-time PCR 法, Western blotting を用いて mRNA および蛋白レベルで分析した。
 - ③ claudin-1 の局在: HGEC における claudin-1 の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

結果

- 1) IM非投与群の *Aa* 塗布側のラット接合上皮では, claudin-1 の発現低下が認められたが, IM投与群の *Aa* 塗布側の接合上皮においては, *Aa* 非塗布側と同様に claudin-1 の強い発現が認められた。
- 2) TNF- α はHGECの細胞間の透過性を亢進したが, IMはその透過性亢進を抑制した。
- 3) TNF- α のHGEC培養系への添加は claudin-1 mRNA 及び蛋白発現を濃度・時間依存的に増加させた。
- 4) 共焦点レーザー顕微鏡での観察では TNF- α 存在下のHGECにおいて claudin-1 の不均一な局在が確認された。しかしながら, IMはTNF- α による claudin-1 の局在の変化を抑制した。

考察

Aa または TNF- α 刺激によって歯肉上皮細胞のバリアー機能は低下し, バリアー機能に関わる細胞間接着蛋白の発現, 局在が変化した。IMは上皮細胞のバリアー機能低下させるこれらの変化を回復させた。このことから, IMが上皮間バリアーを維持・強化するという新しい概念の歯周病予防を可能にすることが示唆された。

セメント芽細胞におけるプロテインキナーゼ C 依存性 Fibroblast growth factor 2 発現 増強作用

東北大学大学院歯学研究科 歯内歯周治療学分野
金谷聡介、根本英二、後藤和宏、島内英俊

Increased fibroblast growth factor-2 gene expression via a PKC dependent pathway in cementoblasts
Department of Periodontology and Endodontology Tohoku University Graduate School of Dentistry
Sousuke Kanaya, Eiji Nemoto, Kazuhiro Gotou, Hidetoshi Shimauchi

【研究目的】

セメント質は歯根と歯周組織の付着に重要な役割を果たすことから、セメント芽細胞は歯周組織再生において重要な役割を担っていると考えられる。以前、我々は細胞外 Ca^{2+} 刺激によりプロテインキナーゼ A 依存的にセメント芽細胞の Fibroblast growth factor (FGF)-2 mRNA およびタンパク発現が誘導されることを報告した。一方、プロテインキナーゼ C 活性化物質である Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) は、Erk1/2 および p-38 MAP キナーゼを介して細胞の増殖促進やアポトーシス抑制に関与するが、我々はセメント芽細胞を PMA で刺激することでやはり FGF-2 mRNA の発現が増強されることを見いだした。そこで、本研究では、セメント芽細胞の機能調節に対する PMA の関与の機構についてプロテインキナーゼを介したシグナル伝達経路に着目して検討した。

【材料および方法】

細胞: マウスセメント芽細胞は Somerman 博士の研究室 (ワシントン大、シアトル) で樹立された不死化細胞株 (OCCM-30) を用い、10%FBS D-MEM 培地にて継代培養を行い、コンフルエントになった細胞を実験に供した。

PMA 刺激: PMA を DMSO に溶解したものをを用い、DMSO 最終濃度を統一し、0.2%以下になるように調整した。

遺伝子発現: FGF-2 mRNA 発現は SYBR グリーンを用いたリアルタイム RT-PCR 法 (Bio Rad) にて解析した。

【成績】

1. OCCM-30 を PMA で刺激したところ、10 nM 濃度および刺激後 6 時間をピークとして FGF-2 mRNA の強い発現誘導がみられた。
2. PMA による FGF-2 mRNA の発現誘導は、プロテインキナーゼ C 阻害剤である GF-109203X を存在させることによってほぼ完全に抑制された。
3. プロテインキナーゼ A 阻害剤である H-89 およびアデニル酸シクラーゼ阻害剤である MDL-12330A では、PMA による FGF-2 mRNA の発現誘導の抑制がみられなかった。
4. PMA 刺激では cAMP 産生の増強はみられなかった。一方、プロテインキナーゼ A 活性化物質である Forskolin では刺激後 10 分で cAMP 産生の著明な増強がみられた。
5. PMA による FGF-2 mRNA の発現誘導は L 型 Ca^{2+} チャネル拮抗薬である nifedipine の前処理によっては抑制されなかった。
6. PMA による FGF-2 mRNA の発現誘導に対する MAP キナーゼ阻害剤の影響を調べたところ、p-38 阻害剤である SB203580 で強い抑制がみられた。また Erk1/2 の阻害剤である PD98059 によっても部分的に抑制がみられた。一方 JNK の阻害剤である SP600125 では抑制はみられなかった。

【考察および結論】

以上のことから、セメント芽細胞において、PMA 刺激はプロテインキナーゼ C 依存的に MAP キナーゼである p-38 および Erk1/2 を介して FGF-2 mRNA の発現を誘導していることが明らかとなった。一方、我々はこれまでに細胞外 Ca^{2+} 刺激により PKA 依存的かつ PKC 非依的に FGF-2 が産生されることを報告してきた。今回の結果は、セメント芽細胞における FGF-2 mRNA 発現誘導には複数の機構が存在することを示唆するものとする。今後、これらの機構におけるクロストークを含めその全容を解明することは、新たな歯周組織再生療法の確立に有用であると考えられる。

FGF-2 は MAPK 依存性に BMP による Smad1 リン酸化を抑制する

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)

○河原貴展、山下元三、橋本悠平、梶川哲宏、前田憲一郎、北垣次郎太、山田聡、北村正博、村上伸也

Opposing effects of FGF-2-MAPK on BMP/Smad signaling axis in mineralization of periodontal ligament cell

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Takanobu Kawahara, Motozo Yamashita, Yuhei Hashimoto, Tetsuhiro Kajikawa, Kenichiro Maeda,
Jirota Kitagaki, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami

【研究目的】

歯周組織の発生並びに再生過程では、様々なサイトカインが組織構成細胞に対して時空間特異的に機能することで生理的機構が維持されている。すなわち、多種多様なサイトカインの細胞膜表面受容体への結合により惹起された刺激伝達システムが細胞内においてクロストークし、相互補完、調節制御することにより、特定遺伝子の発現を誘導することで細胞の恒常性が維持されている。本研究では、様々な細胞に対する増殖因子、組織修復因子として機能することが報告されている FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2) シグナルにより、歯根膜細胞の分化誘導因子である BMP シグナルがどのような影響を受けているか否かを分子レベルで検討した。

【材料と方法】

1. 歯根膜細胞における受容体発現

高い硬組織形成能を有するマウス歯根膜細胞株 (以下 MPDL22) を用いた *in vitro* 長期培養系を構築し、石灰化過程における各種 FGF 受容体サブタイプ並びに、BMP 受容体の発現を RT-PCR 法により解析した。

2. 歯根膜細胞の石灰化物形成過程における、各種サイトカイン及び FGF1 型受容体特異的なチロシンキナーゼ阻害剤処理の検討

MPDL22 の石灰化誘導培養系において、BMP-2 並びに FGF-2 を受容体阻害剤 (SU5402) と共に添加培養することで、長期培養による石灰化物形成に与える影響を解析した。

3. 歯根膜細胞の石灰化過程におけるサイトカイン刺激伝達システムの活性化の検討

MPDL22 の石灰化過程時において BMP-2 リガンド刺激により誘導された、Smad1 蛋白のリン酸化状態の解析を Linker 部位 (Ser206)、C 末端 (Ser463/465) に対するリン酸化特異的抗体を用いたウエスタンブロット法にて解析するとともに、BMP-Smad1 シグナルの直接の標的遺伝子である Id1 の発現を real-Time PCR 法にて検討した。

【結果および考察】

BMP-2 により誘導される歯根膜細胞株、MPDL22 の石灰化物形成は FGF2 添加により抑制される一方、FGF1 型受容体阻害剤である SU5402 の添加により著しく増強された。

興味深いことに、FGF-2 添加時には、BMP-2 刺激に誘導される細胞内 Smad1 の C 末端リン酸化のみならず Linker 部位のリン酸化が検出された。また、MAPK 阻害剤処理により Linker 部位のリン酸化が消失することを確認した。さらには、BMP-Smad1 の直接の標的遺伝子である Id-1 の mRNA 発現は FGF-2 添加により、濃度依存的に抑制された。FGF-2 は MAPK 依存性に Smad1 の Linker 部位をリン酸化することで、BMP-Smad シグナル伝達系を修飾すること、結果として、標的遺伝子の発現を転写レベルで制御し、歯根膜細胞の石灰化機能に影響することが示唆された。

【結論】

健全歯周組織における内在性の FGF-2 による歯根膜組織の石灰化の制御機構並びに、FGF-2 を用いた歯周組織再生時におけるアンキローシス回避の細胞内分子機構の一端が明らかとなった。

ADAMTSL6 β による歯根膜再生能力に関する研究

東京理科大学・基礎工・生物工¹、大学院・基礎工²、総合研究機構³、株式会社オーガンテクノロジーズ⁴

○黒河みさ紀¹、花岡麻伊¹、羽田康叙¹、大島正充²、中尾一久³、辻 孝^{1,3,4}、齋藤正寛¹

Functional analysis of ADAMTSL6 β on regeneration of periodontal ligament.

Tokyo University of Science Faculty of Industrial Science and technology^{1,2}, Research Institute for Science and technology³, Organ Technologies Inc.⁴

Misaki KUROKAWA¹, Mai HANAOKA¹, Yasunobu HADA¹, Masamitsu OSHIMA², Takashi TSUJI^{1,3,4}, Masahiro SAITO¹

研究目的：弾性線維は結合組織中に存在する弾性と強度を調節する細胞外マトリクス成分であり、伸縮することで組織の強度を維持している。歯根膜においても弾性線維の主成分である Fibrillin-1 は豊富に含まれており、*Fibrillin-1* の遺伝子変異により引き起こされるマルファン症候群(MFS)では重篤な歯周病を発症することから、歯根膜の機能維持において弾性線維が重要な役割を果たす事が示唆されている。これまで我々は Fibrillin-1 と結合し弾性線維形成を誘導する ADAMTSL6 β が歯根膜発生過程で高発現することから、同分子が歯根膜弾性線維形成を制御している可能性を本学会で報告してきた。そこで本研究では ADAMTSL6 β が歯根膜の弾性線維形成に及ぼす影響を解析すると共に MFS モデルマウスにおける弾性線維形成不全に対する改善能力を解析することを目的とした。

材料および方法

1. 歯根膜再生モデルを用いた ADAMTSL6 β の発現パターンの検討

成獣マウス上顎臼歯を抜歯後に再植処置を施し、歯根膜損傷後の創傷治癒過程における ADAMTSL6 β の発現パターンを *in situ* hybridization 法ならびに免疫染色法で観察した。

2. ADAMTSL6 β アデノウイルスの作製

ADAMTSL6 β アデノウイルス発現ベクター (pAxCawit)を COS-TPC 法にて 293 細胞に遺伝子導入を行い、業者指定の方法に従いアデノウイルスを産生した。

3. ADAMTSL6 β 遺伝子導入型再構成歯胚の作製

胎生 14.5 日齢のマウス臼歯歯胚より歯原性間葉細胞を分離培養し、ADAMTSL6 β アデノウイルスを感染させた。遺伝子導入された歯原性間葉細胞を歯原性上皮組織と結合させ、ADAMTSL6 β 遺伝子導入型再構成歯胚を作製した。6 日間器官培養した後に、弾性線維形成能力を免疫染色にて観察し、また *in situ* hybridization 法にて *Fibrillin-1* 遺伝子の発現レベルを解析した。またコントロールとして *LacZ* アデノウイルスを感染させた再構成歯胚を用いた。

4. ADAMTSL6 β が MFS モデルマウス由来歯胚細胞へ及ぼす影響

胎生 14.5 日齢の MFS モデルマウスより臼歯歯胚を採取し、ADAMTSL6 β アデノウイルスを感染させた。6日間器官培養した後に3と同様の方法で解析した。

成績：歯根膜損傷モデルにおける ADAMTSL6 β 遺伝子の発現を調べた結果、創傷治癒後3日～7日目まで発現上昇が確認されたが、14日目では発現が顕著に減弱した。*Fibrillin-1* の遺伝子発現も同じ発現パターンを示した。また免疫染色の結果から同時期において ADAMTSL6 β および *Fibrillin-1* 陽性の弾性線維形成が促進していることが判明した。この結果より、ADAMTSL6 β が歯根膜再生初期過程において弾性線維再生を誘導している可能性が示された。次に ADAMTSL6 β 遺伝子導入型再構成歯胚を解析した結果、*LacZ* 遺伝子導入型再構成歯胚と比較して明らかに *Fibrillin-1* 陽性弾性線維形成が促進していた。また *in situ* hybridization 法により *Fibrillin-1* 遺伝子の発現を解析した結果、ADAMTSL6 β 遺伝子導入型再構成歯胚ではその遺伝子発現に変化がない事が判明した。最後に MFS 由来歯胚細胞に ADAMTSL6 β を過剰発現させ、弾性線維形成不全が改善できるかを解析した。その結果、MFS 由来歯胚で見られる弾性線維形成不全は ADAMTSL6 β 過剰発現により改善される事が明らかになった。

考察：ADAMTSL6 β は歯根膜再生過程において、*Fibrillin-1* と結合して弾性線維形成を誘導することを明らかにした。また MFS においても *Fibrillin-1* 弾性線維形成を誘導することから、弾性線維再生誘導能を有する事が示唆された。

結論：ADAMTSL6 β は歯根膜弾性線維形成の調節因子として働き、MFS における治療薬として応用される可能性が示された。

細胞外 NAD⁺によるマトリックスメタロプロテアーゼの発現抑制作用

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野
○後藤和宏、根本英二、金谷聡介、多田浩之、島内英俊

Inhibition of matrix metallo-protease expression by extracellular NAD⁺
Department of Periodontology and Endodontology
Tohoku University Graduate School of Dentistry
○K. Gotou, E. Nemoto, S. Kanaya, H. Tada, H. Shimauchi

【研究目的】

β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) は細胞内の多くの酸化還元反応においての必須成分 (補酵素) であるばかりでなく、細胞膜上に発現する酵素 (細胞膜表面酵素: ectoenzyme) の基質となることが知られている。それら酵素のうち、特に CD38/CD157 (ADP ribose hydrolase/ NAD glycohydrolase) および CD296 (ADP-ribosyltransferase) はその活性を介して、それぞれが特有な細胞機能調節作用を発揮することが報告されている。歯肉線維芽細胞は、歯肉結合組織の恒常性維持、炎症反応調節、さらには組織修復を担う上で重要な役割を果たしている。我々は同細胞のこれらの機能に対して細胞外 NAD⁺が与える影響を解析したところ、IL-1 刺激により誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼの発現を著明に抑制することを見出した。今回、我々はそのメカニズムの解析を行った。

【材料および方法】

ヒト歯肉線維芽細胞: 東北大学病院にて、埋伏智歯抜歯に際してインフォームドコンセントを得て歯肉片を採取した。歯肉片を培養皿に播種し 10%牛胎児血清 (FBS) を含む α-minimum essential medium (α-MEM) で培養し、組織片から伸展・増殖してきた細胞を継代し、5~10 代のもので実験に供試した。

NAD⁺処理: コンフルエントとなった細胞を各濃度の NAD⁺で 90 分間前処理したのち、NAD⁺存在下で各実験系に移行した。

細胞増殖能: 対数増殖期における細胞増殖能を水溶性テトラゾリウム塩 (WST-8) を基質として、生成されるホルマザン量を吸光度計で測定した。さらにセルカウント法も併用した。

遺伝子発現の解析: ヒトリコンビナント IL-1α (1 ng/ml, PEPROTECH) 刺激後 6 時間で誘導されるマトリックスメタロプロテアーゼ遺伝子の発現を定量リアルタイム RT-PCR 法 (iCycler, BioRad) にて解析した。

【結果】

- 1) NAD⁺ (1 μM~1 mM) 存在下において歯肉線維芽細胞の増殖能に有意な変化はみられなかった。
- 2) しかし IL-1α で 6 時間の刺激を行うと、matrix metallo-protease (MMP)1, MMP3 および IL-8 の mRNA 発現が顕著に誘導された。
- 3) また NAD⁺ (1 mM) 存在下において、MMP1 および MMP3 の遺伝子発現が有意に抑制された。しかし、IL-8 遺伝子発現には影響を与えなかった。
- 4) NAD⁺による MMP1 および MMP3 の遺伝子発現抑制作用は濃度依存的であり、10 μM 以上の NAD⁺によって有意な抑制が認められた。

【考察および結論】

IL-1 刺激によるヒト歯肉線維芽細胞からの MMP1 および MMP3 の遺伝子発現誘導に対して、NAD⁺は著明な抑制作用を示した。また、有意な抑制効果は 10 μM 濃度から認められた。以上の結果から、NAD⁺は歯周組織における炎症反応に伴う組織破壊を制御しうるポテンシャルを有していることが示唆された。

BDNF による細胞遊走促進過程における ERK を介した integrin の発現、及び Focal adhesion kinase(FAK) のリン酸化の制御

広島大学医歯薬学総合研究科歯周病態学分野
松田真司、藤田剛、加治屋幹人、武田克浩、柴秀樹、河口浩之、栗原英見

BDNF Regulates the Expression of Integrin and Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase(FAK) through ERK in Cell Migration
Department of Periodontal Medicine Division of Frontier Medical Science Hiroshima University
Graduated School of Biomedical Science
Shinji Matsuda, Tsuyoshi Fujita, Mikihiro Kajiya, Katsuhiko Takeda, Hideki Shiba, Hiroyuki Kawaguchi, Hidemi Kurihara

研究目的

脳由来神経栄養因子 (BDNF) はビーグル犬の歯周炎モデルにおいて、上皮の侵入を抑制し、歯周靭帯、セメント質、歯槽骨を再生する。また、BDNF は歯周靭帯由来線維芽細胞やセメント芽細胞の骨関連タンパク質の発現を促進することを明らかにしてきた。

血管新生は組織再生に不可欠であり、血管内皮細胞の機能は血管新生に重要な役割を担っている。BDNF は血管内皮細胞の遊走、管腔形成を促進するが、その作用機序の詳細は不明である。integrin $\alpha V \beta 3$ の発現、局在は血管内皮細胞の細胞遊走に深く関与しており、focal adhesion kinase (FAK) のリン酸化は細胞遊走のシグナル伝達に関わっていると考えられている。また MAP kinase cascade の一つである ERK のリン酸化は血管内皮細胞遊走を促進することが報告されている。そこで本研究では、BDNF による血管内皮細胞遊走過程における integrin $\alpha V \beta 3$ の発現、局在、また FAK のリン酸化について検討した。さらに ERK の関与についても解析した。

材料および方法

1. ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC、CAMBREX 社) は 5 代継代培養した細胞を実験に使用した。
2. integrin $\alpha V, \beta 3$ の発現、局在の解析は、蛍光免疫染色、Western blotting を用いて BDNF 作用群、非作用群の比較を ERK inhibitor (PD98059) 存在下で行った。
3. HMVEC の FAK のリン酸化に及ぼす BDNF の影響を蛍光免疫染色、Western blotting で解析した。

結果

1. BDNF は HMVEC の integrin $\alpha V, \beta 3$ の局在を変化させ、また発現の増強が認められた。
2. BDNF は HMVEC の integrin $\beta 3$ のタンパクレベルの発現を増強した。
3. PD98059 は BDNF による HMVEC の integrin αV の局在の変化、発現の増加を抑制した。
4. BDNF は HMVEC の FAK のリン酸化を促進した。

考察および結論

BDNF は血管内皮細胞の FAK のリン酸化を促進し、integrin $\alpha V \beta 3$ の局在、発現を変化させた。このことは、BDNF が ERK を介し血管内皮細胞遊走過程における integrin の発現、FAK のリン酸化を制御し、血管新生を促進していることが示唆された。以上のことから BDNF による歯周組織再生において、血管新生促進のための血管内皮細胞の細胞機能の制御の一部に BDNF が直接関わっている可能性が明らかとなった。

歯周病原細菌は血管内皮細胞において IL-6/sIL-6R を介し、CRP 産生を誘導する
1.新潟大学歯学部 口腔生命福祉学科 口腔衛生支援学講座 2.新潟大学超域研究機構
○前川知樹^{1,2}、奥井桂子^{1,2}、奥井隆文^{1,2}、中島貴子^{1,2}、多部田康一²、山崎和久^{1,2}

**Periodontal infection induces C-reactive protein production
via IL6/sIL-6R in human coronary artery endothelial cells**

1. Periodontology and Immunology, Department of Oral Health and Welfare,
Niigata University Faculty of Dentistry
2. Center for Transdisciplinary Research, Niigata University
○Tomoki Maekawa^{1,2}, Keiko Okui^{1,2}, Takafumi Okui^{1,2}, Takako Nakajima^{1,2}, Koichi Tabeta²,
Kazuhisa Yamazaki^{1,2}

【目的】

歯周炎は局所の歯周組織破壊を引き起こすとともに全身に影響を及ぼすことが知られている。我々はこれまでに歯周病原細菌感染が全身レベルで冠動脈疾患のリスクマーカーである血清中 C-reactive protein (CRP) を上昇させることを報告した。また、CRP は主に肝臓で産生されているが、内皮細胞によっても産生されているという報告がある。一方、予備的な実験から歯周炎罹患歯肉組織と比較して CRP の遺伝子発現が亢進しており、それが血管内皮細胞に由来することが想定された。そこで今回我々は、局所の感染・炎症が内皮細胞の CRP 発現に及ぼす影響を明らかにすることとした。

【材料と方法】

ヒト冠状動脈血管内皮細胞(HCAECs)は、増殖因子EGM-2MVを添加したEBM-2培地にて継代培養し、実験に供した。ヒト上皮細胞(HGECs)は、第三大臼歯遠心の歯肉を採取し、DMED(0.025% trypsin 含)にて4°Cで1日培養後、増殖因子S7を添加したEpilifelにて継代培養し、実験に供した。線維芽細胞(HFB)も同様に採取し、RPMI1640(10%FBS)にて継代培養し、実験に供した。HCAECs、HGEC、HFBにおけるCRPの遺伝子発現をRT-PCR法にて解析した。HCAECsを 1×10^5 /mlの濃度で12穴プレートに播種し、超音波破砕した*P.gingivalis*抗原(1-10 μ g/ml)、*P.gingivalis* LPS(0.1-1 μ g/ml)、*E.coli* LPS(10-100ng/ml)、IL-1 β (0.1-10 μ g/ml)、IL-6(0.1-10 μ g/ml)およびsoluble IL-6 receptor (sIL-6R; 1-100 μ g/ml)により刺激した。刺激24時間後のIL-1 β 、IL-6、CRPの遺伝子発現をreal-time PCR 法にて解析した。また、培養上清中のCRP産生量をELISAにより測定した。CRP産生に及ぼすIL-6の影響を検討するため、抗IL-6中和抗体(1-10ng/ml)を加え同様に刺激しCRP産生量を測定した。

【結果・考察】

- ① r HGEC、HFBにCRPの遺伝子発現は認められず、HCAECsにのみ認められた。
- ② r HCAECsを*P.gingivalis* 抗原、*P.gingivalis* LPSまたは*E.coli* LPSにより単独刺激した場合にはCRP発現は認められず、sIL-6R を加えると刺激濃度依存的にCRPの発現上昇が認められた。また、sIL-6Rを加えることでIL-6の発現が増強され、CRPのさらなる発現上昇も認められた。
- ③ r HCAECsのCRP産生におけるIL-6の影響を検討するため、抗IL-6中和抗体を用いるとIL-1 β 刺激によるCRP産生が抑制された。

以上のことから歯周病原細菌、LPSは血管内皮細胞においてIL-1 β 産生を誘導し、オートクライン的にIL-6の産生を亢進させることにより血中のsIL-6Rと協調してCRP発現を亢進させることが考えられる。

【結論】

歯周炎の病態形成には感染と炎症性サイトカインに加え、局所で産生された CRP が関与していることが示唆された。

マウス歯周組織発生過程における PLAP-1 タンパクの発現解析

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)
梶川 哲宏、山田 聡、小澤 康宏、藤原 千春、田内 拓史、尾崎 亘弘、村上 伸也

Immunohistochemical analysis of PLAP-1 in mouse periodontal tissue development
Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
Tetsuhiro Kajikawa, Satoru Yamada, Yasuhiro Ozawa, Chiharu Fujihara, Takushi Tauchi,
Nobuhiro Ozaki, Shinya Murakami

【研究目的】

我々はこれまでに、ヒト歯根膜遺伝子発現プロファイル解析の結果、新規プロテオグリカン様分子 PLAP-1 を単離・同定し、解析を行ってきた。PLAP-1 は Decorin、Biglycan と共に細胞外マトリックスタンパクの一種である small leucine rich proteoglycan family class I に属する分子であり、*in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果から、歯周組織における歯根膜組織に局限した PLAP-1 の mRNA の発現が明らかとなっている。また *in vitro* における実験の結果から、PLAP-1 の持つ機能の一つとして、PLAP-1 は BMP-2 のアンタゴニストであり、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を抑制することがわかっている。これらのことから、PLAP-1 は歯周組織において歯根膜の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが示唆されている。

しかしながら、歯周組織の発生過程における PLAP-1 の機能については、いまだ詳細な検討はなされておらず、不明点が多い。そこで本研究では、歯周組織発生過程における PLAP-1 の発現をより明らかにするため、抗 PLAP-1 特異抗体を用いて、マウス歯周組織における PLAP-1 のタンパクレベルでの発現分布を解析したので報告する。

【材料および方法】

胎生 18.5 日、生後 1 日の BALB/c マウスを 4%パラホルムアルデヒド (PFA) 溶液にて固定し、凍結切片を作製した。また 6 週齢 BALB/c マウスについては、4%PFA 溶液にて灌流固定したのち、顎骨を採取、7.5%EDTA 溶液にて脱灰を行い、前歯、臼歯の凍結切片を作製した。以上のサンプルに対し、一次抗体として抗 PLAP-1 抗体を使用し、3,3'-ジアミノベンジントラヒドロクロライド (DAB) による酵素抗体反応を利用した免疫組織化学を行い、歯胚の発生過程及び、歯牙萌出後の切歯及び臼歯における PLAP-1 タンパクの発現を解析した。

【結果および考察】

マウス臼歯歯胚の発生過程において、PLAP-1 は cap stage (帽状期) 以降、将来歯根膜組織へと分化する歯小囊において発現を認め、その発現の強さは分化が進むにつれ上昇した。歯牙が萌出し咬合するようになると、歯根膜における PLAP-1 の発現はより明確になった。一方、将来歯髄へと分化する歯乳頭においてはいずれの分化段階においても、PLAP-1 の発現を認めなかった。

マウス切歯における PLAP-1 の発現は、root analogue 側においては、alveolus-related 領域及び shear zone の歯根膜細胞で認めた。また、crown analogue 側においては、エナメル芽細胞の一部で発現を認めた。

【結論】

以上のことにより、PLAP-1 タンパクは *in vivo* において歯小囊及び同組織が分化成熟した歯根膜細胞のほか、エナメル芽細胞の一部にも発現し、歯周組織の発生、およびエナメル質の形成に関与している可能性が示唆された。

ハムスター実験的歯周炎モデルにおける L-システインの歯槽骨吸収抑制効果

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, サンスター株式会社*

○ 二宮 雅美, 米田 哲, 坂本 英次郎, 中島 由紀子, 徳永 格, Purevjav Javkhlan,
竹田 洋子*, 江口 徹*, 武村 あかね*, 永田 俊彦

Inhibitory Effects of L-Cysteine on Alveolar Bone Resorption in Hamster Experimental Periodontitis

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School

○ Masami Ninomiya, Satoshi Yoneda, Eijiro Sakamoto, Yukiko Nakajima, Kaku Tokunaga, Javkhlan Purevjav,
Yoko Takeda*, Toru Eguchi*, Akane Takemura* and Toshihiko Nagata

【研究目的】

アミノ酸の1つであるシステイン(Cys)は、体内でグルタチオンに代謝され抗酸化作用を発現する。このグルタチオンは歯周組織に高濃度に存在し、活性酸素の除去を介してサイトカインやマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の産生を抑制し歯周炎の進行を抑制するのに大きな影響を与えている可能性が報告されている。そこで今回我々は、実験的歯周炎動物モデルを用いてL-Cysの歯槽骨吸収抑制効果を検討した。

【材料および方法】

1) ハムスター実験的歯周炎モデルの作製

Kametakaらの報告(J Periodontol 60, 285-291, 1989)に従い、5週齢ゴールデンシリアンハムスターに *Actinomyces viscosus* ATCC 15978 (1×10^{10} CFU/ml) を5日間連続で $100 \mu\text{l}$ 口腔内に滴下接種して感染させた。

2) 実験群の設定

歯周炎モデルを作製後、粉末飼料(Diet-2050)に各濃度(2, 4, 8mg/kg/日)のL-Cys、その誘導体であるN-アセチルシステイン(NAC: 8mg/kg/日)およびポジティブコントロールとしてドキシサイクリン塩酸塩(1mg/kg/日)を混和し最長12週間の経口投与を行った。投与6、12週後にハムスターを安楽死させ、左右両側の下顎骨を採取した。

3) 歯槽骨吸収の評価

採取した左側下顎骨の第一臼歯近心部の骨吸収量をマイクロCT(Model MIF-100; 日立メディコ)にて計測した。骨吸収量はセメントエナメル境(CEJ)から歯槽骨頂までの距離を画像解析ソフト(TRI/SD-BON; ラトックシステムエンジニアリング)にて3回計測し、その平均値を骨吸収量とした。また同時に第一臼歯近心部の骨密度も計測した。右側下顎骨は10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、10%ギ酸クエン酸ナトリウムで脱灰した後、通常に従い組織切片(H.E.染色、Azan染色)を作製し、組織学的に評価した。

4) 歯肉組織中のMMP活性の測定

左側下顎骨から採取した歯肉組織中のMMP活性をI型コラゲナーゼ活性測定キット(有限会社ライフ研究所)にて測定した。

【結果】

実験期間を通して各群のハムスターの体重変化に有意差は認められなかった。マイクロCT解析では、下顎第一臼歯近心部において感染群は非感染群と比較して6週目で歯槽骨吸収が認められ、さらに12週目には歯根長2/3以上の著明な歯槽骨吸収が認められた。薬剤投与群のうち、6週目では低濃度(2mg/kg/日、4mg/kg/日)のL-Cys投与群において感染群より骨吸収量が減少しており、骨吸収抑制効果が認められた。12週目には、2, 4, 8mg/kg/日のL-Cys投与群、NAC投与群、ドキシサイクリン投与群のすべてにおいて骨吸収抑制効果が認められた。骨密度に関しては、感染群において減少傾向が認められたが、各群間で有意差は認められなかった。組織学的観察では、12週感染群で認められた付着歯肉の幅の減少や結合組織内の炎症性細胞浸潤は、L-Cys投与群、NAC投与群、ドキシサイクリン投与群ではほとんどみられず、骨高径や骨幅の減少も認められなかった。歯肉組織中のMMP活性は、12週感染群と比較してL-Cys投与(4mg/kg/日)群で最も有意に低下していた。

【考察および結論】

今回の結果から、L-Cysは歯肉組織中のMMP活性を有意に抑制して骨吸収抑制効果を示し、歯周炎の薬物療法として応用できる可能性が示唆された。

低出力超音波は HSP を介して *S. mutans* の付着を阻害する

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻応用口腔科学分野¹, 日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座²,
衛生学教室³, 総合歯学研究所高度先端医療研究部門⁴, 総合歯学研究所機能形態部門⁵
石橋和也¹, 嶋田浩一^{2,4}, 新井伸治², 江田昌弘², 川戸貴行^{3,5}, 前野正夫^{3,5}, 伊藤公一^{2,4}

Low-energy pulsed ultrasound inhibits adhesion of *Streptococcus mutans* through heat shock proteins

Division of Applied Oral Sciences, Nihon University Graduate School of Dentistry¹, Departments of
Periodontology², and Oral Health Sciences³, and Divisions of Advanced Dental Treatment⁴, and
Functional Morphology⁵, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry
Kazuya Ishibashi¹, Koichi Shimada^{2,4}, Shinji Arai², Masahiro Eda², Takayuki Kawato^{3,5}, Masao Maeno^{3,5},
Koichi Ito^{2,4}

【研究目的】

近年、低出力超音波刺激は使用時に発熱がなく安全性が高いといった特徴から診断、治療などの目的で幅広く医療に応用されており、細胞へ及ぼす影響についてさまざまな報告がされている。しかし、細菌に及ぼす影響を検討した報告は少ない。そこで、我々は低出力超音波刺激が口腔内常在菌に及ぼす影響について調べることを目的とした。

【材料および方法】

供試菌株は *Streptococcus oralis* ATCC9811, *Streptococcus mutans* ATCC25175, *Streptococcus sobrinus* MT8145 とした。対数増殖期の各菌株に種々の出力の超音波刺激 (1.6 MHz, 3.0-12.0 V, 音響強度 I_{spta} 64 ~ 1100 mW/cm²) を与え、1 時間毎に吸光度を測定することで増殖曲線を作成した。次に、低出力超音波刺激の殺菌作用を検討するため、刺激後の菌液を寒天平板培地上で、培養した後にコロニー数から殺菌率を調べた。また、*S. mutans*, *S. sobrinus* の 96 穴プレートへの付着に及ぼす低出力超音波刺激の影響を検討し、付着に関与する表層タンパク抗原である Protein Antigen serotype c (PAc), Protein Antigen serotype g (PAg) および不溶性グルカン合成酵素である glucosyltransferase-I (GTF-I) のタンパクおよび遺伝子発現に及ぼす低出力超音波刺激の影響を調べた。また、ストレスに応答するタンパクである Heat Shock Proteins (HSP) の関連を調べるため、低出力超音波刺激が *S. mutans* の HSP のタンパクおよび遺伝子発現に及ぼす影響を検討し、さらに HSP inhibitor による HSP の抑制条件下での *S. mutans* の付着および PAc のタンパク発現を調べた。なお、タンパク発現はウェスタンブロッティング法、遺伝子発現はリアルタイム PCR 法を用いた。

【成績】

供試菌において 610 mW/cm² 以上の長時間の超音波刺激した場合は全く菌の発育を認めなかった。また、*S. oralis*, *S. mutans* では出力強度 610 および 1100 mW/cm² の超音波刺激 3 時間以上、*S. sobrinus* では 6 時間で約 99 % の殺菌作用を認めた。発育抑制や殺菌作用には及ばない短時間の低出力超音波刺激が *S. mutans*, *S. sobrinus* の付着に及ぼす影響を調べた結果、610 mW/cm², 5 分以上、超音波刺激した群で、未処理群と比較して有意に付着の阻害が認められた ($p < 0.05$)。また、供試菌の付着因子である PAc, PAg のタンパクおよび遺伝子発現は出力強度 610 mW/cm² の超音波刺激を与えることにより 20 分間まで時間依存的に抑制された。しかし、GTF-I の発現には変化が認められなかった。また、付着阻害を認めた短時間刺激の条件下における HSP の発現はタンパクおよび遺伝子レベルで抑制された。さらに、inhibitor で HSP の発現を抑制させた結果、*S. mutans* の付着は inhibitor の濃度依存的に抑制され、同時に付着因子の PAc のタンパク発現も抑制された。

【考察および結論】

低出力超音波により *Streptococcus* 属の発育抑制、殺菌作用を示すためには長時間の刺激が必要とされることが明らかになった。また、短時間の刺激においては供試菌の付着に関与する表層タンパク抗原である PAc, PAg の発現抑制にともなう付着阻害を認めた。さらに、様々なストレスに応答するタンパクである HSP は低出力超音波の短時間刺激で発現が抑制され、inhibitor を用いて HSP を抑制することでも、低出力超音波刺激と同様に *S. mutans* の PAc 発現は抑制され、付着の阻害が認められた。すなわち、短時間の超音波刺激が *S. mutans* の付着を阻害し、PAc の発現を抑制することが明らかとなった。また、その付着抑制のメカニズムには HSP の発現抑制が関与することが示唆された。

動脈硬化自然発症モデルマウスにおける *Porphyromonas gingivalis* 長期感染後の血清脂質プロファイルの変化

1.新潟大学超域研究機構 2. 新潟大学歯学部 口腔生命福祉学科 口腔衛生支援学講座
○多部田康一¹、前川知樹^{1,2}、高橋直紀^{1,2}、青木由香莉^{1,2}、宮下博考^{1,2}、宮内小百合^{1,2}、
奥井隆文^{1,2}、中島貴子^{1,2}、山崎和久^{1,2}

Oral infection of *Porphyromonas gingivalis* in long term alters the serum lipid profile in ApoE deficient mouse

1.Center for Transdisciplinary Research, Niigata University 2. Periodontology and Immunology,
Department of Oral Health and Welfare, Niigata University Faculty of Dentistry
○Koichi Tabeta¹, Tomoki Maekawa^{1,2}, Naoki Takahashi^{1,2}, Yukari Aoki^{1,2},
Hirotaka Miyashita^{1,2}, Sayuri Miyauchi^{1,2}, Takafumi Okui^{1,2}, Takako Nakajima^{1,2}, Kazuhisa Yamazaki^{1,2}

【目的】

動脈硬化性疾患と歯周炎の関連について、病因論に対するアプローチとしてのマウス歯周炎モデルを用いた解析が行われている。動脈硬化症自然発症をフェノタイプとする Apolipoprotein E ノックアウトマウス (ApoE KO マウス)を用いた *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 感染モデルにおいて、感染による動脈硬化病変の進行や血清脂質の変動が報告されているが、マウスの遺伝的バックグラウンド、菌の strain、感染方法の違いによりそれぞれの実験モデルに観察される現象が異なっている。そこで我々は直接的に細菌が血中に移行する可能性の低いと考えられる口腔感染モデルにおいての *P. gingivalis* 長期感染による血清脂質プロファイルの変化について ApoE KO マウス (C57BL/6 バックグラウンド) において検討した。

【対象】

6週齢雄の C57BL/6, ApoE KO マウスに2%カルボキシメチルセルロースをキャリアーとして *P. gingivalis* W83 株 (10⁹ CFU/ml)を3日毎にフィーディングニードルを用いて経口的に投与した。コントロール群には2%カルボキシメチルセルロースのみを投与した。投与から4週(短期)、32週(長期)経過後に①X線μ-CTによる歯槽骨吸収の評価②PCR法による血液及び血管における *P. gingivalis* の有無③オイルレッド染色により大動脈壁のアテローム形成④コレステロール及びトリグリセリド中 CM, VLDL, LDL, HDL の血清脂質プロファイルの変化 (LipoSEARCH, skylight Biotech)を比較検討した。

【結果・考察】

①C57BL/6, ApoE KO マウスにおいて共に有意な歯槽骨の吸収を認めた。

②血液及び血管において *P. gingivalis* は検出されなかった。

③C57BL/6 マウスにおいては長期感染後も動脈硬化組織の形成は認められなかった。ApoE KO マウスにおいては、長期感染群において動脈硬化組織の有意な進展が認められた。

④長期感染後の血清脂質プロファイルにおいては、ApoE KO マウスにおいてコレステロール中の LDL、VLDL 分画の上昇、HDL 分画の減少が有意に認められた。C57BL/6 マウスにおいては、HDL 分画のみ有意に減少した。

また ApoE KO、C57BL/6 感染群の両群において総トリグリセリドが有意に減少した。

これまでの報告では大動脈組織に *P. gingivalis* が検出されており、炎症応答として動脈硬化病変の促進に重要な要因となることが考察されている。しかしながら我々の口腔感染モデルでは4週、32週後に血管、血流から細菌は検出されなかった。本実験モデルにおいては *P. gingivalis* 感染により血清脂質プロファイルが動脈硬化促進リスク上げる方向へ変動することから感染による作用としての脂質代謝の変化が動脈硬化を促進することを示唆する。ApoE KO マウスにおいて、短期では認められなかった血清脂質プロファイル変動が長期感染後に顕著に認められることから、遺伝的バックグラウンドの他に、*P. gingivalis* 感染により進行した動脈硬化病変の進行が、血清脂質の変化に影響していると考えられる。

口腔内細菌の増殖に対するプロポリスの効果

日本歯科大学新潟病院総合診療科¹⁾、慶應義塾大学医学部 歯科・口腔外科学教室²⁾、
日本自然療法株式会社³⁾、日本歯科大学新潟生命歯学部 歯周病学講座⁴⁾
織田洋武¹⁾、中川種昭²⁾、堂野 禪、³⁾佐藤聡⁴⁾

Effect of propolis on the growth of oral pathogen

The Nippon dental university school of life dentistry at Niigata Niigata hospital comprehensive dental care¹⁾、
Department of Dentistry and Oral Surgery Keio University, School of Medicine²⁾、Nihon natural therapy Co.,Ltd³⁾
The Nippon dental university school of life dentistry at Niigata department of periodontology⁴⁾
Hirotake Oda¹⁾、Taneaki Nakagawa²⁾、Yuzuru Dono³⁾、Soh Sato⁴⁾

【目的】

口腔内の主要な疾患であるウ蝕や歯周病は多種類の細菌によって形成されるプラークが主な原因であり、ウ蝕においては原因菌として *Streptococcus mutans* が報告されている。一方歯周病においては、Socransky らは複数の菌種 (*Porphyromonas gingivalis*、*Prevotella intermedia* など) と歯周病の病態が相関することを報告している (*J Clin Periodontol* 1998;25:134-144)。

これらウ蝕や歯周病の病因が追究される中、予防や治療においては様々な歯面清掃器具を使用したプラークコントロールが行われてきた。また、機械的歯面清掃のみでなく化学的プラークコントロールとしてクロルヘキシジンや抗菌薬を使用したウ蝕・歯周病原細菌の除菌が提唱されてきた。

プロポリスはフラボノイド類や桂皮酸誘導体などにより広い抗菌作用を持つ生理活性物質である。われわれは広い抗菌作用と高い安全性を持つプロポリスに注目し、ウ蝕病原細菌 (*S. mutans*) と歯周病原細菌 (*P.gingivalis*、*A. actinomycetemcomitans*、*P. intermedia*) の増殖に対する影響を検証した。

【材料および方法】

各濃度のプロポリスを含有した液体培地で *P.gingivalis* (W83, ATCC33277)、*A. actinomycetemcomitans* (ATCC29522)、*P. intermedia* (ATCC25611)、*S. mutans* (ATCC25175)の培養を行い、それら細菌の増殖を分光光度計で観察した。

【結果および考察】

2mg/ml 以上のプロポリス含有培地では *P.gingivalis* (W83, ATCC33277) と *S. mutans*、*P. intermedia* は増殖しなかった。しかし、*A. actinomycetemcomitans* の増殖に影響は見られなかった。*P.gingivalis* は 0.1mg/ml で増殖の抑制 ($p<0.05$)、0.4mg/ml で強い抑制が観察された。*P. intermedia* は 0.1mg/ml 以下でも強い増殖の抑制 ($p<0.05$) が見られた。また、*S. mutans* の増殖は 0.5、1mg/ml ($p<0.05$) で抑制、2mg/ml で強い抑制が観察された。

プロポリスは蜂の巣から精製される物質でフラボノイド類や桂皮酸誘導体などにより免疫調節、抗腫瘍、抗菌作用、抗炎症、抗酸化作用が報告されている。今回の実験でプロポリスは *P.gingivalis*、*S. mutans*、*P. intermedia* の増殖を抑制したが *A. actinomycetemcomitans* の増殖は抑制しなかった。このことからプロポリスはプラーク中の細菌の増殖を選択的に抑制することが示唆された。

フローセル系と静置系の2つのバイオフィームモデルにおける *Porphyromonas gingivalis* の遺伝子発現の経時的变化

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)
○山本 れいこ, 野杵 由一郎, 山口 幹代, 朝日 陽子, 前菌 葉月, 恵比須 繁之

Temporal gene-expression of *Porphyromonas gingivalis* biofilm using flow-cell and static models
Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○YAMAMOTO Reiko, NOIRI Yuichiro, YAMAGUCHI Mikiyo, ASAHI Yoko, MAEZONO Hazuki,
and EBISU Shigeyuki

【研究目的】

緑膿菌においてバイオフィーム形成細菌と液体培地中の浮遊細菌では、約 1% 遺伝子発現が異なることが報告され¹⁾、さらに大腸菌のバイオフィーム形成過程で遺伝子発現が経時的に変化することが明らかとなった²⁾。これらのことより、細菌は増殖・発育環境の相違・変化によって種々の遺伝子の発現が異なることが示唆された。

今回我々は、ヒトの歯周病関連細菌の 1 種であり、根尖性歯周炎の難治化に関与する、*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成過程における遺伝子発現の経時的变化を、フローセル系及び静置系の 2 種類のバイオフィーム形成モデルを用いて検索した。

【材料及び方法】

フローセル系におけるバイオフィームは、テフロン製のカラム管にハイドロキシアパタイト (HA) 顆粒を充填し、ペリスタポンプにてカラム管内に *P. gingivalis* ATCC 33277 株の菌液を灌流することにより、HA 顆粒表面に作製した。3, 6, 9, ならびに 14 日後に、HA 顆粒に形成したバイオフィームを採取して RNA を抽出し、マイクロアレイにより遺伝子の発現を解析した。各採取日に得られた 4 試料を、それぞれ FB1, FB2, FB3, ならびに FB4 とした。

また、静置系によるバイオフィームは、ポリスチレン製の 96 ウェルプレートに *P. gingivalis* ATCC 33277 株の培養液を 1/10 に希釈し、37 度、嫌氣的条件下で培養することにより、各ウェルの壁面に作製した。1, 2, 3, ならびに 5 日後に、形成したバイオフィームを採集して RNA を抽出し、マイクロアレイを行った。各採取日に得られた 4 試料を、それぞれ SB1, SB2, SB3, ならびに SB4 とした。

一方、浮遊細菌は、500 ml 三角フラスコに *P. gingivalis* ATCC 33277 株の培養液を 1/10 に希釈し、37 度、嫌氣的条件下で培養した。吸光度を 1 時間毎に測定し、OD₅₅₀ の値がそれぞれ 0.3, 1.0, 1.7, ならびに 2.0 になった時点で菌液を採取し、バイオフィーム系細菌と同様に RNA を抽出し、マイクロアレイを行った。各採取時に得られた 4 試料を、それぞれ P1, P2, P3, ならびに P4 とした。

【成績】

遺伝子の発現頻度は、各時点とその他の時点との発現量の比率で評価した。即ち、浮遊細菌では、P1/P2, P1/P3, P1/P4, P2/P3, P2/P4, ならびに P3/P4、フローセル系バイオフィーム細菌では、FB1/FB2, FB1/FB3, FB1/FB4, FB2/FB3, FB2/FB4, ならびに FB3/FB4、静置系バイオフィーム細菌では、SB1/SB2, SB1/SB3, SB1/SB4, SB2/SB3, SB2/SB4, ならびに SB3/SB4、の各 6 組の相対比率で発現頻度を比較検討した。全 2,090 遺伝子中、いずれかの発現頻度が 7.5 倍以上であったものは、浮遊細菌では 19 遺伝子、静置系バイオフィーム細菌では 17 遺伝子であったが、フローセル系バイオフィーム細菌では存在しなかった。

一方、経時的な発現量の変化はそれぞれの系で、浮遊細菌では、P1-P2, P2-P3, ならびに P3-P4、フローセル系バイオフィーム細菌では、FB1-FB2, FB2-FB3, ならびに FB3-FB4、静置系バイオフィーム細菌では、SB1-SB2, SB2-SB3, ならびに SB3-SB4、という各 3 組の期間で評価した。各系で 2 倍以上の発現量の変化が認められた遺伝子数が最も多い期間は、浮遊細菌では P1-P2、静置系バイオフィーム細菌では SB1-SB2 であったが、フローセル系バイオフィーム細菌では FB3-FB4 であった。

【考察及び結論】

フローセル系バイオフィーム細菌では、浮遊細菌や静置系バイオフィーム細菌に比べ、発現頻度が大きく異なる遺伝子は少なかった。これは、フローセルモデル中のバイオフィーム細菌は代謝活性が低下していることが一因であると推察された。

*Porphyromonas gingivalis*の糖タンパク質の検出と同定

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座
岸 美和子, 中村 洋

Detection and identification of glycoproteins from *Porphyromonas gingivalis*
Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University
Miwako Kishi, Hiroshi Nakamura

【研究目的】

グラム陰性偏性嫌気性桿菌*Porphyromonas gingivalis*は*Tannerella forsythia*や*Treponema denticola*と並び、歯周炎の発症や進行において最重要視されている病原性細菌である。またこれらの細菌は感染根管からも高頻度に分離される。タンパク質の多くは糖鎖修飾などの翻訳後修飾を受け、その機能と密接に関連している。糖鎖修飾されたタンパク質の存在は真核生物特有の現象ではなく、原核生物でもみられることが報告され始めている。ところが、*P. gingivalis*では糖タンパク質の存在がまだよく分かっていない。そこで本研究では、二次元電気泳動、糖タンパク質特異的染色およびMALDI-TOF質量分析を用い、*P. gingivalis*菌体の糖タンパク質の検出と同定を試みた。

【材料および方法】

使用菌株および培養条件：*P. gingivalis* ATCC 33277株をヘミン、メナジオンおよびジチオスレイトールを添加したTrypticase soy brothを用いて、嫌気条件下で37℃にて48時間培養した。

試料の調製：集菌した菌体をトリクロロ酢酸で処理後、ジエチルエーテルで洗浄した。室温にて風乾させたものを、全菌体試料として使用した。また集菌した菌体を超音波処理により破碎し、その遠心上清を可溶性画分として用いた。二次元電気泳動：調製した全菌体試料と可溶性画分を試料溶解液に溶かし、膨潤させたImmobiline DryStrip (GE) にサンプルカップから添加して等電点電気泳動を行った。泳動終了後のDryStripを平衡化し、12 %アクリルアミド・ゲルの上端に置き、アガロースで封入後、二次元目のSDS-PAGEを行った。

ゲルの染色：メタノールと酢酸を含む固定液でゲルを固定し、過ヨウ素酸で糖の酸化処理を行った。その後、糖タンパク質特異的染色試薬Pro-Q emerald (Invitrogen) で蛍光染色した。ゲルを紫外線で励起し、糖タンパク質のスポットを検出した。総タンパク質の検出にはクマシー染色を行った。

質量分析：糖タンパク質スポットを切り出し、トリプシンによる消化後、ペプチド断片を抽出した。4800 MALDI-TOF/TOF Analyzer (ABI) で質量分析を行い、サンプルに含まれるペプチドに対応したスペクトルのピーク値を得た。質量分析タンパク質同定システムであるMascotを使い、得られたマス・スペクトルデータをもとにデータベースを検索して、糖タンパク質を同定した。

【結果および考察】

全菌体試料を電気泳動したゲルからは4個の糖タンパク質スポットが検出された。これらの糖タンパク質スポットの質量分析を行った結果、41 kDa付近のPGN_0729 (Outer membrane protein 41 precursor), 30 kDa付近のPGN_0743 (Probably FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FkpA), 35 kDa付近のPGN_0876 (TPR domain protein), 42 kDa付近のPGN_1513 (Hypothetical protein)と30 kDa付近のPGN_1695 (Putative fructose-bisphosphate aldolase)が同定された。可溶性画分を用いた場合は7個の糖タンパク質スポットが検出され、質量分析の結果、PGN_0743, PGN_0876, PGN_1513およびPGN_1695が同定された。したがってこれら4種類の糖タンパク質は細胞質またはペリプラズムに存在すると推測される。PGN_0729については、すでに外膜に存在することが明らかになっている、OmpA様タンパク質である。今回同定した*P. gingivalis*に存在する5種類の糖タンパク質は本菌の病原性の発揮に関与していると考えられるため、現在これらの機能解析を進めている。