

## アドヒーズシブ表層の低重合層が象牙質接着性に及ぼす影響

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>,  
特別医療法人刀圭会 協立病院<sup>3</sup>, すずき歯科クリニック<sup>4</sup>

○辻本暁正<sup>1</sup>, 瀧本正行<sup>1</sup>, 大塚詠一郎<sup>1</sup>, 吉田武史<sup>1</sup>, 高見澤俊樹<sup>1,2</sup>,  
安藤 進<sup>1,2</sup>, 宮崎真至<sup>1,2</sup>, 長谷川 賢<sup>1,3</sup>, 鈴木敏裕<sup>1,4</sup>

### Influence of oxygen-inhibited layer of single-step adhesives on dentin bond strength

Department of Operative Dentistry<sup>1</sup>, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center<sup>2</sup>,

Nihon University School of Dentistry, Tokeikai Kyoritsu Hospital<sup>3</sup>, Suzuki Dental Clinic<sup>4</sup>

○TSUJIMOTO Akimasa<sup>1</sup>, TAKIMOTO Masayuki<sup>1</sup>, OOTSUKA Eiichirou<sup>1</sup>, YOSHIDA Takeshi<sup>1</sup>,  
TAKAMIZAWA Toshiki<sup>1,2</sup>, ANDO Susumu<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>, HASEGAWA Ken<sup>1,3</sup>, SUZUKI Toshihiro<sup>1,4</sup>

#### 【研究目的】

歯質接着システムとして、シングルステップアドヒーズシブの臨床における使用頻度が増加している。その硬化したアドヒーズシブ表層には、大気中の酸素によって影響を受けた低重合層が存在しているが、これが象牙質接着性に及ぼす影響については、一部で検討されているものの、詳細については不明である。

そこで演者は、シングルステップアドヒーズシブの接着機構を解明する研究の一環として、アドヒーズシブ表層の低重合層が接着性に及ぼす影響について、表面自由エネルギーとともに剪断接着強さ試験を指標として検討した。

#### 【材料および方法】

供試したシングルステップシステムは、G-Bond Plus (GC, 以後 GB), Clearfil tri-S Bond (Kuraray Medical, 以後 TS), BeautiBond (Shofu, 以後 BB) および Bond Force (Tokuyama Dental, 以後 BF) の、合計 4 製品とした。また、コンポジットレジンとしては、光重合型の Clearfil AP-X (Kuraray Medical, 以後 AP) および化学重合型の Clearfil F II (Kuraray Medical, 以後 F II) の 2 製品を用いた。

#### 1. 表面自由エネルギーの測定

ウシ下顎前歯歯冠部の象牙質に対して、SiC ペーパーの #600 まで研削を行い、被着歯面とした。これらの被着歯面に対し、供試したシングルステップアドヒーズシブを製造者指示に従って塗布し、エアブローおよび光照射し、低重合層を有する試片 (以後、OL) およびアドヒーズシブ表層の低重合層をエタノール綿で除去した試片 (以後、EW)とした。これらの試片を、全自動接触角計 (DM500, Kyowa Interface Science) に静置し、プロモナフタレン、エチレングリコールおよび蒸留水との接触角を測定し、得られた接触角から酸塩基理論を用いて、表面自由エネルギーを算出した。

#### 2. 接着試験

接着試験に際しては、表面自由エネルギーの測定と同様に調整した試片に対し、重合方式の異なるレジンペーストを充填し、通法に従って接着試験用試片を製作した。これらの試片は、37 °C 精製水中に 24 時間保管後、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いて、クロスヘッドスピード 1 mm/min の条件で剪断接着強さを測定した。

#### 3. SEM 観察

コンポジットレジンと歯質との接合状態を検討するため、通法に従って試片を製作し、FE-SEM (ERA-8800FE, Elionix) を用いて、その接着界面を加速電圧 10 kV の条件で観察した。

#### 【成績および考察】

表面自由エネルギーは、いずれの製品においても、OL 群と比較して EW 群で有意に高い値を示した。表面自由エネルギーを構成する成分である  $\gamma$  の成績においては、いずれの製品においても EW 群と比較して OL 群で有意に高い値を示した。AP の接着強さは、OL 群で EW 群と比較して有意に高い値を示した。F II の接着強さは、有意差は認められないものの、OL 群と比較して EW 群で高い傾向を示した。以上のような、アドヒーズシブ表面における条件による違いは、その表層における低重合層中の酸性成分あるいは残留した水分によって、コンポジットレジンの重合反応が影響された可能性などが考えられた。

#### 【結論】

シングルステップアドヒーズシブの表面自由エネルギーは、アドヒーズシブ表層の低重合層により低下することが判明した。シングルステップアドヒーズシブの表層の低重合層は、光重合型レジンを用いた際の接着強さへの影響は少ないものの、化学重合型レジンを用いた場合には影響されることが判明した。

### 試作セルフエッチアドヒーシブ(MTB-200)の歯質接着耐久性

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>,  
日野浦歯科医院<sup>3</sup>, 東京電力病院<sup>4</sup>  
○田村ゆきえ<sup>1</sup>, 島村 穰<sup>1</sup>, 浅野和正<sup>1</sup>, 砂田識敦<sup>1</sup>, 大藤竜樹<sup>1</sup>, 安藤 進<sup>1,2</sup>,  
宮崎真至<sup>1,2</sup>, 日野浦 光<sup>3</sup>, 岩崎圭祐<sup>4</sup>

#### Bond durability of newly developed self-etch adhesive system(MTB-200) on bovine tooth

Department of Operative of Dentistry<sup>1</sup>, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center<sup>2</sup>,  
Nihon University School of Dentistry, Hinoura Dental Clinic<sup>3</sup>, Tokyo Electric Power Company Hospital<sup>4</sup>  
○TAMURA Yukie<sup>1</sup>, SHIMAMURA Yutaka<sup>1</sup>, ASANO Kazumasa<sup>1</sup>, SUNADA Noriatsu<sup>1</sup>, OTO Tatsuki<sup>1</sup>,  
ANDO Susumu<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>, HINOURA Ko<sup>3</sup>, IWASAKI Keisuke<sup>4</sup>

#### 【研究目的】

臨床操作時間の短縮あるいは煩雑な操作ステップの簡略化を目的として、シングルステップのセルフエッチアドヒーシブが臨床応用されている。このアドヒーシブは、機能性モノマーをはじめとしたレジン成分とともに水分を含有していることを特徴としている。そのために、アドヒーシブの重合特性、機械的強度あるいは接着耐久性などに課題が残されているのが現状である。そこで、歯質接着の長期的な安定性を求め、試作シングルステップセルフエッチアドヒーシブとして MTB-200 (Kuraray Medical) が開発された。

今回演者らは、試作アドヒーシブの MTB-200 を用いて、エナメル質および象牙質への歯質接着耐久性について剪断接着試験、破断面の観察および走査電子顕微鏡 (以後、SEM) 観察を行うことによって検討した。

#### 【材料および方法】

供試したセルフエッチシステムは、試作の MTB-200 (以後 MTB) と、対照として Clearfil tri-S Bond (以後 CTS, Kuraray Medical) および G-Bond Plus (以後 GBP, GC) を用いた。可視光線照射器としては Optilux 501 (sds Kerr) を、実験期間を通じてその光強度が 600 mW/cm<sup>2</sup> 以上であることを確認して使用した。

接着試験には、被着体としてウシの下顎前歯を用い、その歯冠部を常温重合レジンに包埋し、エナメル質および象牙質面を SiC ペーパー#600 まで順次研磨した。この面に製造者指示に従ってアドヒーシブを塗布し、光照射を行った。次いで直径 2.4 mm のデュラコン型を静置し、これにレジンペースト (Clearfil AP-X, Kuraray Medical) を填塞して照射を行い、接着試験用試片とした。

これらの試片を、37°C 精製水中に 24 時間保管、あるいは 24 時間保管後にサーマル試験機を用いて 4 °C - 60 °C (係留時間 1 分間) を 1 サイクルとする温熱負荷を 5,000, 10,000, および 20,000 回負荷した後、万能試験機 (Type 5500R, Instron) に静置された Ultradent Jig を用いてクロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件でその剪断接着強さを測定した。なお、各製品における試片の数は 10 個とし、それぞれの平均値および標準偏差を求めて、各条件間の有意差検定を有意水準 0.05 の条件で統計学的検定を行った。

接着試験後の破断面の詳細を知るために、通法に従って臨界点乾燥を行った試片について、金蒸着を施し、フィールドエミッション型 SEM (ERA-8800FE, Elionix) を用いて加速電圧 15 kV の条件で試片の観察を行った。

#### 【結果ならびに考察】

供試したセルフエッチシステムの 24 時間保管後のエナメル質に対する接着強さは、MTB で 25.6 MPa であり CTB で 23.8 MPa, GBP では 25.5 MPa の値を示した。また象牙質に対する接着強さは、MTB で 30.2 MPa であり CTB で 29.3 MPa, GBP では 29.7 MPa の値を示した。サーマルサイクル負荷後では MTB, CTB とともに接着強さの向上傾向が認められた。この結果は、本実験で用いた接着システムの成分および配合比により、歯質脱灰能、アドヒーシブの拡散浸透性あるいは重合硬化後の材料的性質などが影響したものと考えられた。

#### 【結論】

本実験の結果から、新規セルフエッチアドヒーシブである MTB-200 は、エナメル質および象牙質ともに優れた歯質接着耐久性を有する接着システムであることが示された。

## 新規開発接着性レジン MTB200 の象牙質接着性能

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院 歯学部 歯科 歯質工学分野

<sup>2</sup>東京医科歯科大学 歯と骨の GCOE プログラム

○保坂啓一<sup>1</sup>、中島正俊<sup>1</sup>、篠田祐子<sup>1</sup>、Prasansuttiporn Taweesak<sup>1</sup>、Sitthikorn Kunawarote<sup>1</sup>、坂野若詠<sup>1</sup>、高橋真広<sup>1</sup>、岸川隆蔵<sup>1</sup>、田上順次<sup>1,2</sup>

### Microtensile Bond Strength of the newly developed one-step self-etch system.

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical & Dental University, <sup>2</sup>Global Center of Excellence Program, Tokyo Medical & Dental University

○Hosaka K, Nakajima M, Shinoda Y, Taweesak P, Kunawarote S, Sakano W, Takahashi M, Kishikawa R, Tagami J

#### 【緒言】

ワンステップボンディング材は機能性モノマーや多官能モノマーだけでなく、水・有機溶媒を含み、多くの製品では、歯質への浸透性を向上させる目的で HEMA などの親水性モノマーが使用されている。親水性になったボンディング材は接着操作時に象牙質からボンディング層への水の侵入をゆるすばかりでなく硬化後も吸水することによりその物性には変化が生じる。またワンステップボンディング材では溶媒の完全な除去は難しく、残存した溶媒はモノマー成分の重合を阻害し、未重合モノマー部には水や口腔内のさまざまな物質が浸透する。これらはワンステップボンディング材の象牙質への接着性能に影響を与えるものと考えられる。クラレメディカル社製より開発された新規ワンステップボンディングシステム MTB200 には重合率を向上させる新しい触媒と、吸水性を低減させる技術が取り入れられ、より安定した接着界面がつけられることにより接着性能の向上が期待される。本学術講演会では、MTB200 の象牙質に対する初期微小引張り接着強さを他のワンステップボンディング材、ツーステップボンディング材と比較し検討を行ったので報告する。

#### 【材料と方法】

1、本実験には新規開発のワンステップボンディングシステムである MTB200 に加え、同じくワンステップの Clearfil S<sup>3</sup> Bond (クラレメディカル社製)、Bond Force (トクヤマデンタル社製)、ツーステップボンディングシステムとして Clearfil Mega Bond (クラレメディカル社製) を用いた。

2、微小引張り接着強さの測定

ヒト健全抜去大白歯歯冠中央部に平坦象牙質を作成し、#600 耐水研磨紙にて仕上げ、被着象牙質面とした。前述 4 種のボンディングシステムを用い業者指示通り接着操作を行った後、Clearfil AP-X (シェード A2) を充填し、24 時間 37°C 水中保管後、被着面積 1×1 mm の棒状試料を作製し、マイクロテンスイル法を用いて微小引張り接着強さを測定した。得られた接着強さの結果は、One-way ANOVA および、Dunnnett T3 test を用いて有意水準 5% にて統計処理を行った。

#### 【結果および考察】

表に微小引張り接着強さ (μTBS) の結果を示す。すべての材料間に統計学的有意差が認められた(p<0.05)。

(N=10)	MTB200	Clearfil S <sup>3</sup> Bond	Bond Force	Clearfil Mega Bond
μTBS	59.8±6.8 <sup>A</sup>	41.0±9.6 <sup>B</sup>	34.7±3.1 <sup>C</sup>	74.8±9.6 <sup>D</sup>

#### 【結論】

新規開発ワンステップボンディング材 MTB200 の象牙質への微小引張り接着強さは、ツーステップセルフエッチングシステムである Clearfil Mega Bond には及ばないものの他のワンステップシステムと比較し有意に高い値を示した。親水性であるワンステップボンディング材の吸水は機械的強度の低下を起し、また除去できず残存した溶媒のレジンモノマーへの重合性への影響は、象牙質接着の長期耐久性に影響を与えると考えられており、MTB200 で改良された重合性や吸水性が長期耐久性にどのような効果をもたらすか今後さらなる検討が必要である。

## 支台築造用 1 ステップ化学重合型ボンド(DBC-510)の根管壁象牙質への接着性能

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>歯と骨のGCOE

○THITTHAWERAT Suppasorn<sup>1</sup> 坂野若詠<sup>1</sup> 中島正俊<sup>1</sup> 田上順次<sup>1,2</sup>

### Micro-tensile Bond Strength to Root Canal Dentin Using Newly Developed 1-step Chemical-cure Bond (DBC-510)

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate school, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>GCOE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases

○Suppasorn THITTHAWERAT<sup>1</sup>, Wakae SAKANO<sup>1</sup>, Masatoshi NAKAJIMA<sup>1</sup>, Junji TAGAMI<sup>1,2</sup>

#### 【緒言】

コンポジットレジンを用いた支台築造法において、根管内に形成されたポスト窩洞の壁面象牙質に対する接着性能は、その予後を左右する重要な因子のひとつである。ポスト窩洞壁面へのレジンの接着において、窩洞底部は照射器チップ先端から離れており光エネルギーが十分に到達しにくいこともあって、デュアルキュア型接着システムが推奨されている。しかしながら、デュアルキュア型接着システムを用いた場合でも、照射が十分でないと接着性能が低下することが報告されており、照射ステップに依存しない接着システムの開発が望まれている。本研究では、新しく開発された 1 ステップ化学重合型ボンドを付属する支台築造システム(DBC-510; トクヤマデンタル社製)を用いて、ポスト窩洞面(根管壁象牙質)に対する接着強さについて検討した。

#### 【材料および方法】

ヒト抜去下顎小白歯の歯冠を除去した後、歯根部根管内に径 1.5 mm、深さ 8 mmのポスト窩洞を形成した。DBC-510の A 液および B 液を等量混和後、ポスト窩洞壁の象牙質面を 10 秒間処理し、ペーパーポイントで余剰分を除去した後、エアブローを 10 秒間行って、ボンド層を薄層にした。その後、付属のデュアルキュア型コア用レジンを充填し、ポスト窩洞開口部より 10 秒間照射し、硬化させた。一方、コントロール群としてデュアルキュア型接着システムであるエステライトコアクイック (トクヤマ)、クリアフィル DC ボンド (クラレ) およびユニフィルコア EM (ジーシー) を用いて、業者指示に従って (ボンディング材に照射を行い) 接着操作を行った後、それぞれ付属のコア用レジンを充填・光硬化させて接着試料を作成した。接着試料は 37℃水中に 24 時間保管後、歯根軸に対し直角方向にマイクロテンサイル試験用棒状試片を 1 窩洞につき 8 枚作製し、クロスヘッドスピード 1 mm/min にて引張り接着試験を行った。得られた結果は、歯冠側および根尖側グループに分類し、two-way ANOVA および Tukey's HSD test、T-test により有意水準 5 %にて統計処理された。

#### 【結果】

	DBC510	エステライト コアクイック	クリアフィル DC ボンド	ユニフィルコア EM
歯冠側	38.8±7.7 <sup>A</sup>	47.4±5.6 <sup>B</sup>	37.1±5.6 <sup>A</sup>	28.6±5.4 <sup>C</sup>
	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	NS
根尖側	23.3±4.6 <sup>a</sup>	28.7±6.2 <sup>a</sup>	26.3±7.7 <sup>a</sup>	22.6±5.3 <sup>a</sup>

#### 【結論】

ボンディング材への照射を必要としない 1 ステップ化学重合型接着システム(DBC-510)は、ボンディング材に照射を行ったデュアルキュア型接着システムと同等の根管壁象牙質への接着性能を示した。

## 新規接着修復システム LLB-2 の象牙質接着性について

<sup>1</sup>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  
<sup>2</sup>歯と骨のGCOE  
○坂野若詠<sup>1</sup> Prasansuttiporn Taweesak<sup>1</sup> 中島正俊<sup>1</sup> 田上順次<sup>1,2</sup>

### Micro-tensile Bond Strength to Dentin Using Newly Developed Bonding System (LLB-2)

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate school, Tokyo Medical and Dental University  
<sup>2</sup>GCOE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases  
○Wakae SAKANO<sup>1</sup>, Taweesak PRASANSUTTIPORN<sup>1</sup>, Masatoshi NAKAJIMA<sup>1</sup>, Junji TAGAMI<sup>1,2</sup>

【緒言】近年様々な接着システムが開発されており、現在市販されている接着システムはエナメル質、象牙質双方に強力に接着するようになってきている。その為新規接着システムの開発に於いては、操作性の簡便化や処理時間の短縮がより重要視されてきている。新規接着修復システムである LLB-2 は、一液性のボンディング材と専用のフロアブルコンポジットレジンが一体になっており、ボンディング材塗布後の光照射は不要の接着システムとなっている。即ちボンディング材塗布後、付属のフロアブルレジンを含ませることにより、フロアブルレジンに含まれている触媒が、ボンディング材中の基材と反応し重合硬化するシステムになっている。臨床に於いてコンポジットレジンには多様な形状や深さの窩洞に対して充填されるが、この場合レジンの重合硬化中に起る重合収縮応力が接着界面に影響し、窩底面への接着性能に影響を与えることが知られている。そこで本実験では新規接着修復システム及びフロアブルレジンを用い、平坦面象牙質及び窩洞底部象牙質に於ける接着性について比較検討した。

【材料及び方法】実験群として新規接着修復システム LLB-2(Tokuyama Dental,以下 LLB) と付属の専用フロアブルレジン LLB-CR4(Tokuyama Dental,以下 CR4)、またコントロール群として Bond Force(Tokuyama Dental,以下 BF)と、エステライトフロークイック (Tokuyama Dental,以下 FQ)を組み合わせて使用した。ヒト抜去健全大白歯 20 本を使用し、歯軸に垂直に象牙質平坦面を露出させた後、#600 耐水研磨紙で仕上げ、平坦被着象牙質面(F)を作成し、フロアブルレジン の厚さを均一にするために既製の黒いプラスチックリング(内径 8mm,深さ 2mm)を設置した。一方で深さ 2mm, 4x4mm の窩洞をダイヤモンドバー(松風,SF1140)にて形成し、これを窩洞被着群(C)とした。各接着修復システムを平坦面群 (F-BF 及び F-LLB)と窩洞群(C-BF 及び C-LLB)の全 4 群(各群 N=5)に分けて実験を行った。LLB は塗布後 10 秒間放置、エアブロー後、CR4 を築盛し 30 秒間光照射した(F-LLB 及び C-LLB)。また BF に於いては取扱説明書に順じて接着操作を行い、10 秒間光照射しボンディング材を硬化させた後、FQ を築盛 10 秒間光照射した(F-BF 及び C-BF)。これらの試料を 37°C で 24 時間水中保管後、試料を 1x1mm のビーム型にトリミングし、クロスヘッドスピード 1mm/min にて微小引張り接着試験を行った。

【結果】Two-way ANOVA 及び T-test を用いて統計処理を有意水準 5%にて行った。LLB と BF を比較した時、窩洞及び平坦群の両方に於いて、LLB の方が有意に高い象牙質接着強さを認めた。また各接着システムの平坦群と窩洞群を比較した時、共に窩洞群に於いて象牙質接着強さが有意に低下した。

	LLB	BF
Flat(F)	44.6±3.1 <sup>A</sup> ( <i>p</i> <0.05)	38.4±4.0 <sup>B</sup> ( <i>p</i> <0.05)
Cavity(C)	20.1±2.9 <sup>a</sup>	14.6±2.6 <sup>b</sup>

Group identified the different superscript letters are significant different (*p*<0.05)

【結論】ボンディング材塗布後の光照射が不要な修復システム LLB-2-CR4 は優れた象牙質接着性能を示す接着システムであることが示された。

## メカニカルストレスが下顎骨由来骨芽細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響

京都府立医科大学大学院医学研究科歯科口腔科学<sup>1)</sup>

京都府立医科大学大学院医学研究科免疫・微生物学<sup>2)</sup>

○山本健太<sup>1,2)</sup>、山本俊郎<sup>1,2)</sup>、上岡栄理華<sup>1)</sup>、市岡宏顕<sup>1,2)</sup>、赤松佑紀<sup>1,2)</sup>、  
大迫文重<sup>1,2)</sup>、喜多正和<sup>2)</sup>、金村成智<sup>1)</sup>

Effects of mechanical stress on the cytokine production  
in mandible derived osteoblasts

Department of Dental Medicine<sup>1)</sup> and Microbiology and Immunology<sup>2)</sup>,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

○ Kenta Yamamoto<sup>1,2)</sup>, Toshiro Yamamoto<sup>1,2)</sup>, Hiroaki Ichioka<sup>1,2)</sup>,

Yuki Akamatsu<sup>1,2)</sup>, Fumishige Oseko<sup>1,2)</sup>, Masakazu Kita<sup>2)</sup> and Narisato Kanamura<sup>1)</sup>

### 【研究目的】

メカニカルストレスの受容組織として代表的なものに骨組織があげられ、その影響で骨組織は骨形成・吸収の代謝作用を受ける。顎骨は、メカニカルストレスの一つである咬合力の受容の場であるが、これまでに咬合力に匹敵するメカニカルストレスを骨芽細胞に負荷した報告は認められない。

そこで今回マウス下顎骨より骨芽細胞を分離培養し、咬合力様式をモデルとしたメカニカルストレスとして、静水圧を用いて負荷する実験系を考案、サイトカイン産生に及ぼす影響の検討を行ったので報告する。

### 【材料および方法】

骨芽細胞は、4~5週齢のC57BL/6マウスの下顎骨を無菌的に採取し、コラゲナーゼ処理後、37°C、5% CO<sub>2</sub>条件下で10%FBS/DMEM培養液にて、out growth法で分離培養した。分離細胞が骨芽細胞の性質を示すことを確認した後、2~4代継代培養し、1×10<sup>6</sup> cells/mlにて播種、コンフルエントに達した後、メカニカルストレス(0.1, 1, 6 MPa: 10~60min)を負荷した。

その後、炎症性サイトカインであるIL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ および骨代謝関連サイトカインであるRANKL、OPGに関してReal-time RT-PCRおよびELISAまたはwestern blottingにて分析を行った。また細胞の形態学的変化は、ギムザ染色後に位相差顕微鏡による鏡頭像にて評価した。

### 【成績】

Real-time RT-PCRの結果、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ はいずれも、メカニカルストレスの負荷により有意に増加し、その増加は、メカニカルストレスの強さおよび負荷時間に依存的であった。またIL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ の中でもTNF- $\alpha$ の上昇が顕著であった。RANKL、OPGは、ともにメカニカルストレスの負荷により上昇したが、RANKL/OPG比率では、有意な上昇を示した。

ELISAの結果、IL-1 $\beta$ は検出されなかったが、IL-6およびTNF- $\alpha$ の産生は認められ、その産生量はメカニカルストレス負荷により有意に増加した。

Western blottingの結果、RANKLおよびOPGのタンパク発現を認め、タンパクレベルにおいてもRANKL/OPG比率の上昇を認めた。

また、鏡頭像にてメカニカルストレス負荷により骨芽細胞の形態的变化は認めなかった。

### 【考察および結論】

本研究から、炎症性サイトカイン産生は、メカニカルストレスの強さならびに負荷時間に依存して増大し、RANKL/OPG比はメカニカルストレスの負荷により増加した。このことから、下顎骨骨芽細胞由来のサイトカインは、メカニカルストレスの影響を受け、顎骨局所の炎症と骨リモデリングに関与する可能性が示唆された。そして、生体において顎骨では咬合力の影響を受け、骨リモデリングの活性化といったホメオスタシスが維持されていると考えられた。また、これまでも、骨芽細胞とメカニカルストレスに関する報告では、サイトカイン産生が影響を受けることが知られているが、我々の結果と必ずしも一致していない。これはメカニカルストレスの強さ、時間、種類によるものと思われる。本研究では、細胞に対して生体環境に近いメカニカルストレスを負荷する実験系を考案したが、今後さらなる検討が必要と考えられた。

## FGF-2 刺激によるマウス歯根膜細胞からの VEGF の誘導

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)  
○兒嶋由子、柳田学、森健太、山田聡、北村正博、村上伸也

### FGF-2 induces VEGF expression by mouse periodontal ligament cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Yuko Kojima, Manabu Yanagita, Kenta Mori, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura,  
and Shinya Murakami

#### 【目的】

近年、サイトカインや細胞増殖因子を局所応用することにより歯周組織再生を誘導する試みがなされている。当研究室では、これまで、FGF-2 による細胞増殖促進・細胞外基質産生制御などの微小環境の整備が、歯周組織再生促進に寄与している可能性を示してきた。一方、歯周組織再生過程において不可欠なイベントである血管新生に関しては未だ十分には明らかにされていない。歯根膜細胞において VEGF (vascular endothelial growth factor)、VEGF 受容体の発現が観察され、それらの発現が FGF-2 濃度依存的に誘導されることを以前の発表で言及したが、VEGF が歯根膜細胞に及ぼす影響及び VEGF と FGF-2 の相互作用については明らかでない。本研究では、当研究室で樹立した培養マウス歯根膜細胞 (MPDL22) に VEGF、FGF-2 刺激を加えた際の、歯周組織再生に関わる細胞動態について検討した。

#### 【材料及び方法】

1. 2.5 週齢の BALB/c マウスの下顎大白歯の歯根表面より採取して得られた細胞を、FGF-2 存在下で限界希釈法にてクローニングすることにより樹立したクローンから、最も Alkaline Phosphatase 活性の高いクローン (MPDL22) を用いた。100ng/ml FGF-2 を添加した  $\alpha$ -MEM 培地 (10% Fatal Calf Serum 添加) にて継代を行った。
2. WST-1 を用い、VEGF、FGF-2 及び両者を混合した刺激を加えた際の MPDL22 の増殖について検討を行った。また、VEGF 中和抗体を用いて同様の実験を行い、比較検討した。
3. QCM chemotaxis 96-well migration assay kit (Chemicon) および CytoSelect™ 24-Well Wound Healing Assay (Cell Biolabs, Inc) を用いて、VEGF、FGF-2 および両者を混合した刺激を加えた際の MPDL22 の遊走能を測定した。
4. 石灰化誘導培地にて培養した MPDL22 に VEGF 刺激を加え、*Alp*・*Runx2*・*Col1a1*・*Bsp*・*Op*・*Osterix* mRNA の変化をリアルタイム PCR にて検討し、アリザリン染色にて石灰化能を検討した。
5. b.End5 (mouse brain endothelial cell) を用い、Endothelial Tube Formation Assay (Cell Biolabs, Inc) にて VEGF、FGF-2 及び両者を混合した刺激を加えた際の、3 次元培養での血管管腔形成に及ぼす影響について検討した。

#### 【結果及び考察】

マウス歯根膜細胞において VEGF が低濃度の FGF-2 と協調的に働き、細胞増殖及び遊走に関与すること、また高濃度の FGF-2 存在下では、その働きを抑制することが明らかとなった。また、血管内皮細胞の血管管腔形成においては低濃度の VEGF に FGF-2 を作用させた場合は血管管腔形成を促進するが、VEGF が高濃度の場合 FGF-2 は管腔形成を抑制する方向に働くことが明らかとなった。加えて、今回の研究においては、VEGF が石灰化に及ぼす著明な影響は観察されなかった。FGF-2 による歯周組織再生誘導メカニズムの一端として、FGF-2 と VEGF は互いの働きを濃度に依存して制御することにより、再生の場における局所環境を最適条件に整えている可能性が示唆された。

### Catechin が TNFSF14 刺激ヒト歯肉線維芽細胞の IL-6 産生に与える影響

<sup>1)</sup>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 <sup>2)</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔微生物学分野 日本学術振興会特別研究員 PD <sup>3)</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野

○ 細川義隆<sup>1)</sup>、細川育子<sup>2)</sup>、尾崎和美<sup>3)</sup>、中西正<sup>1)</sup>、中江英明<sup>1)</sup>、松尾敬志<sup>1)</sup>

#### The effect of catechin on IL-6 production from TNFSF14-stimulated human gingival fibroblasts

<sup>1)</sup>Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School, <sup>2)</sup>Department of Oral Microbiology, The University of Tokushima Graduate School, JSPS Research Fellow <sup>3)</sup>Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School

○Yoshitaka Hosokawa<sup>1)</sup>, Ikuko Hosokawa<sup>1) 2)</sup>, Kazumi Ozaki<sup>3)</sup>, Tadashi Nakanishi<sup>1)</sup>, Hideaki Nakae<sup>1)</sup> Takashi Matsuo<sup>1)</sup>

#### 【研究目的】

Tumor necrosis factor superfamily, member 14 (TNFSF14)はTNF superfamilyに属するサイトカインであり、活性化T細胞や抗原提示細胞から産生されることが報告されている。また、IL-6は歯周炎病変局所において骨芽細胞や線維芽細胞のRANKL発現を誘導することにより破骨細胞の活性化を促し、炎症性骨吸収に関与している事が示唆されている。しかしながら、TNFSF14がヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) のIL-6産生へ及ぼす影響に関しては不明な点が多い。また、catechinは緑茶に多く含まれるポリフェノールであり、抗酸化作用、抗癌作用、抗炎症作用などがあることが報告されているが、サイトカイン産生に与える影響に関しては報告が少なく不明な点が多い。本研究では、TNFSF14がHGFsのIL-6産生に与える影響ならびにcatechinがTNFSF14刺激HGFsからのIL-6産生に与える影響に関して検討を行った。

#### 【材料および方法】

HGFsは智歯抜歯時に正常歯肉組織よりout growth法により分離し、10%FBSを含むDMEM培地にて培養し実験に用いた。まず、HGFsのTNFSF14 receptor (HVEM, LTβR)発現をflow cytometryを用い解析した。次に、HGFsをTNFSF14で刺激しIL-6産生をELISA法により解析した。さらにcatechinの主な成分であるEpigallocatechin gallate (EGCG)ならびにEpicatechin gallate (ECG)にてHGFsを1時間前処理後TNFSF14刺激を行い、IL-6産生をELISA法にて、細胞内シグナル伝達分子 (MAPKsおよびIκB-α) のリン酸化をwestern blot法にて解析を行った。また、TNFSF14誘導IL-6産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにシグナル伝達阻害物質にて前処理後、TNFSF14刺激を行いIL-6産生を確認した。

#### 【成績】

HGFsはTNFSF14 receptor (HVEM, LTβR)を恒常的に発現していた。また、TNFSF14刺激は濃度依存的にHGFsのIL-6産生を誘導した。EGCGとECGの前処理によりTNFSF14が誘導したIL-6産生は抑制された。また、TNFSF14刺激が誘導したERKならびにIκB-αのリン酸化も抑制された。ERKおよびNF-κBのシグナル伝達阻害物質はTNFSF14が誘導したIL-6産生を抑制した。

#### 【考察および結論】

今回の結果より、HGFsにはTNFSF14 receptorが機能的に発現し、TNFSF14刺激によりIL-6産生が誘導されることが明らかとなった。また、EGCGならびにECGはERKならびにNF-κBを介したシグナル伝達経路を抑制することにより、TNFSF14が誘導したIL-6産生を抑制することが明らかとなった。これらの結果より、TNFSF14は歯周炎病変局所でIL-6産生を誘導することにより炎症性骨吸収に関与している事が示唆された。また、catechinはHGFsからのIL-6産生を抑制することにより、炎症性骨吸収を減少させることにより、歯周炎治療に用いることが出来る可能性が示唆された。



## ヒト歯根膜組織完全長 cDNA ライブラリーを用いた *Cathepsin K* の同定および機能解析

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)  
○尾崎 亘弘、山田 聡、藤原 千春、田内 拓史、梶川 哲宏、栗田 敏仁、小澤 康宏、村上 伸也

### Analysis of *Cathepsin K* identified by human periodontal ligament full length cDNA library

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry  
○Nobuhiro Ozaki, Satoru Yamada, Chiharu Fujihara, Takushi Tauchi, Tetsuhiro Kajikawa,  
Toshihito Awata, Yasuhiro Ozawa and Shinya Murakami

#### 〔目的〕

歯根膜組織は歯周組織の恒常性維持に重要なだけでなく、歯周組織の修復・再生に必須の役割を果たす未分化間葉系細胞群の供給源となっている。このような歯根膜組織に特徴的な形態、機能、分化、組織修復および再生過程を分子・遺伝子レベルで理解することは、次世代の歯周治療を創出する上で重要な知見を与えるものと考えられる。そこで、我々はヒト歯根膜組織完全長 cDNA ライブラリーを作製し、歯根膜組織における遺伝子発現状況を網羅的に解析した。さらにこれまでに歯根膜組織における報告の全くなかった遺伝子 *Cathepsin K* が高頻度に発現していることを見出し、歯根膜組織における同分子の発現パターンおよび機能について検討を行ったので報告する。

#### 〔材料および方法〕

- 1) ヒト歯根膜組織完全長 cDNA ライブラリーを用いた歯根膜特異的遺伝子の選出：矯正治療患者から便宜抜去された歯根膜組織を用いて完全長 cDNA ライブラリーを作製し、約 2 万クローンを DNA シークエンスすることにより遺伝子発現データベース (Full-PerioGen データベース) を構築した。同データベース解析の結果、歯根膜において高頻度で発現が認められ、これまでに歯根膜での機能が報告されていない遺伝子を選出した。
- 2) ヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程における各遺伝子の発現解析：ヒト歯根膜細胞を石灰化誘導培地 (10% FCS, 10mM  $\beta$ -glycerophosphate, 50 $\mu$ g/ml ascorbic acid 含有  $\alpha$ -MEM) にて長期培養し、各遺伝子の発現動態をリアルタイム PCR 法により解析した。
- 3) ヒト各組織における *Cathepsin K* の発現解析：ヒトの全身各種組織より採取した RNA を用いて、リアルタイム PCR 法にて *Cathepsin K* の発現解析を行った。
- 4) サイトカイン刺激による *Cathepsin K* の発現誘導解析：ヒト歯根膜細胞を、各種サイトカインにて 48 時間刺激し、リアルタイム PCR 法により *Cathepsin K* の発現解析を行った。

#### 〔結果〕

Full-PerioGen データベース解析の結果、発現頻度 30 以上の高発現遺伝子を 26 種見出した。その中で、これまでに歯根膜組織においてその発現や機能が報告されていない遺伝子 8 種を選出し、ヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程における発現を解析したところ、システインプロテアーゼの *Cathepsin K*、鉄イオン貯蔵関連タンパクの *Ferritin*、および機能未知の *FLJ25143* は、ヒト歯根膜細胞の分化誘導時において発現が上昇する遺伝子であることが明らかとなった。また、ヒト全身各種組織のなかで歯根膜組織は非常に高い *Cathepsin K* 発現を示すことが明らかとなった。さらにヒト歯根膜細胞において、*Cathepsin K* は、IL-1 $\alpha$ 、IFN- $\gamma$  刺激にて発現上昇が誘導され、FGF-2、BMP-2、IGF 刺激にて発現の抑制が認められた。

#### 〔結論と考察〕

Full-PerioGen データベース解析の結果、ヒト歯根膜組織における *Cathepsin K* の発現が初めて見出された。肺の線維芽細胞において、*Cathepsin K* は貪食されたコラーゲンを細胞内で分解していることが報告されており、歯根膜組織において *Cathepsin K* は、コラーゲン代謝を介した組織の恒常性の維持、歯周組織の修復・再生に関与している可能性が示唆された。

## 硫化水素はヒト歯髄幹細胞にアポトーシスを誘導する

<sup>1</sup>東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 生体硬組織再生学講座 歯周病学分野

<sup>2</sup>日本歯科大学 生命歯学部 衛生学講座

<sup>3</sup>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

○小林 知映<sup>1</sup>、八重垣 健<sup>2</sup>、小林 宏明<sup>1</sup>、和泉 雄一<sup>1,3</sup>

### Hydrogen sulfide causes apoptosis in human pulp stem cells

<sup>1</sup>Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>Department of Oral Health, Nippon Dental University

<sup>3</sup>Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University

○Chie Kobayashi<sup>1</sup>, Ken Yaegaki<sup>2</sup>, Hiroaki Kobayashi<sup>1</sup>, Yuichi Izumi<sup>1,3</sup>

#### 【研究目的】

歯髄炎は複雑な炎症過程を経る。しかし最終的には、齲蝕による細菌感染の進行により歯髄全体の壊死が引き起こされる。過去の研究から歯髄炎における細菌性抗原と免疫性防御反応について明らかとなったが、歯髄炎発生の生理的・生化学的機序については不明な点も多い。近年、*Streptococcus mutans* のリポタイコ酸 (LTA) が歯髄細胞にアポトーシスを引き起こす事が報告された。また細菌感染と同様に、アポトーシスは炎症過程あるいは起炎過程に大きく影響する事が報告されている。LTA 以外にも歯髄細胞へアポトーシスを起こす物質が存在するとすれば歯髄炎の進行に深く関わりを持つと考えられる。口臭原因物質・硫化水素 ( $H_2S$ ) は口腔諸組織にアポトーシスを惹起する。そこで本研究では、硫化水素 ( $H_2S$ ) に注目し、歯髄炎との関連を検討した。歯髄炎で、歯髄から検出される細菌の多くが  $H_2S$  を産生する。 $H_2S$  は口腔組織である歯肉線維芽細胞・歯肉上皮細胞にアポトーシスを誘導する事が報告されている。一方、歯髄炎の際、成熟歯髄細胞が壊死する過程で、歯髄幹細胞はその多分化能と自己複製能により、歯髄の生活能力を維持しようとする。歯髄幹細胞は歯髄の生存において最も重要なものである。本研究の目的は、 $H_2S$  がヒト歯髄幹細胞にアポトーシスを起こすかどうか、またそのシグナル経路を明らかにすることである。

#### 【材料及び方法】

日本歯科大学倫理審査委員会および東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て研究を行った。抜歯後非感染性の歯髄細胞を採取し、一定条件下で培養した。MACS 細胞分離カラム (Miltenyi Biotec) を用い、CD117 陽性のヒト歯髄幹細胞を抽出し、50ng/mL 濃度の  $H_2S$  下で 48 時間培養した。アポトーシスの判定には Annexin V 及び 7-AAD を用い flow cytometry にて検出した。アポトーシス経路の同定には、ミトコンドリア内膜の脱分極、cytochrome C 逸脱量、caspase-9、caspase-8、caspase-3 活性を flow cytometry あるいは ELISA 法にて測定した。

#### 【結果】

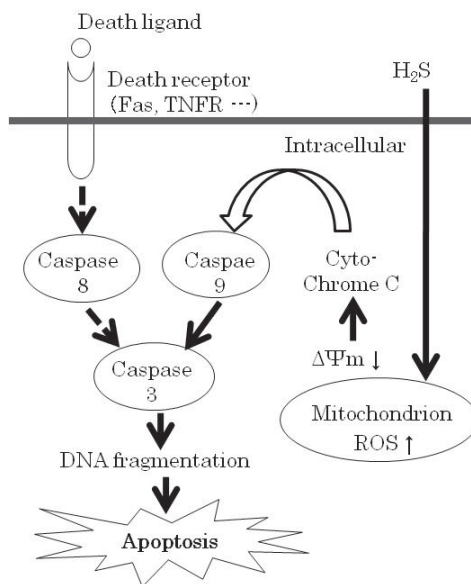
50ng/mL 濃度  $H_2S$  の 48 時間暴露によりアポトーシス細胞数は 1.6% から 16.3% に有意に増加した ( $p < 0.01$ )。ミトコンドリア内膜の脱分極も有意に増加し ( $p < 0.05$ )、また cytochrome C、caspase-9、caspase-3 も有意に増加した ( $p < 0.01$ )。一方、caspase-8 産生は、コントロール群と比較して有意な変化は見られなかった。

#### 【考察および結論】

$H_2S$  暴露によりアポトーシスの増加がみられたことから、感染歯髄内細菌が産生する  $H_2S$  はヒト歯髄幹細胞にアポトーシスを誘導すると考えられた。歯髄幹細胞内でミトコンドリア脱分極が増加し、cytochrome C が細胞質へ放出され、caspase-9、caspase-3 量が増加したことから、ミトコンドリア経路によるアポトーシス誘導が起こっていると考えられた。また、caspase-8 量に変化が無い結果から、細胞膜表面のレセプターを介するアポトーシスは誘導されていない可能性が高い。以上のことから、口腔内細菌によって産生される  $H_2S$  は歯髄細胞にミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導し、歯髄炎の疾患進行に関与している可能性が示唆された。

#### 【謝辞】

日本歯科大学・生命歯学部・衛生学講座の Dr. Bogdan Calenic, Dr. Nikolay Ishkitiev, 今井敏夫准教授から、本研究遂行にあたり、ご指導・ご鞭撻を頂きました。衷心より御礼申し上げます。



## ビスフォスフォネート製剤投与ラットにおける顎骨壊死誘導モデルの作成 —歯周炎誘発モデルにおける下顎骨の形態変化—

神奈川県立歯科大学 口腔治療学講座 歯内療法学分野<sup>1</sup>  
神奈川県立歯科大学 生体機能学講座 生化学・分子生物学分野<sup>2</sup>  
○渡部弘隆<sup>1</sup> 武藤徳子<sup>1</sup> 佐藤武則<sup>1</sup> 高垣裕子<sup>2</sup> 石井信之<sup>1</sup>

### Analysis of a rat periodontal disease model of bisphosphonate related osteonecrosis of jaw (BRONJ)

Department of Oral Medicine, Division of Endodontics, Kanagawa Dental College<sup>1</sup>  
Department of Functional Biology, Division of Biochemistry and Molecular Biology, Kanagawa Dental College<sup>2</sup>  
WATABE Hirotsugu<sup>1</sup>, MUTO Noriko<sup>1</sup>, Sato Takenori<sup>1</sup>, TAKAGAKI Yuko<sup>2</sup>, TANI-ISHII Nobuyuki<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

Bisphosphonate (BP) は、ハイドロキシアパタイトへの親和性と破骨細胞の分化及び機能の抑制により骨吸収を阻害することから、ページェット病や高カルシウム血症、悪性腫瘍の骨転移防止および骨粗鬆症による骨折予防の目的で広く用いられている。BP 服用患者の歯科治療時に BP 誘発性の顎骨壊死 (BRONJ) が 2002 年に米国で初めて報告されて以来、BRONJ 発症患者は毎年増加傾向を示しているが、BRONJ の発生機序、予防法、治療方法は明確になっていない。BP 服用患者に対する抜歯やインプラント処置などの外科処置を避けることが推奨されており、代わって歯科保存処置の有用性が注目されている。

本研究では BP による BRONJ の発症メカニズムを解析する目的で、BP 投与下でラット歯周炎誘発モデルを作製し、下顎骨の形態変化を末梢骨定量的 CT 法 (pQCT)、ラマン分光分析法、病理組織学的に解析した。

#### 【材料および方法】

雌の 4 週齢 Wistar 系ラットに対して絶食下にてアレンドロネート (ALN) 1mg/kg を 8 週間、週 3 回隔日経口投与した。ALN 投与後、*P. gingivalis* 33277 株 (1012CFU/ml in PBS+5%carboxymethylcellulose) 混合液 0.5ml を 2 週間、同様に口腔内に接種した。投与終了後、ラットを安楽死させて下顎骨を採取した。採取した左側下顎骨は、末梢骨定量的 CT 法 (pQCT) にて骨量測定、共焦点顕微レーザーラマン分光装置 (Nicolet Almega XR) を用いた分光分析法にて骨質の解析を行った。実験群とコントロール群を比較し、得られたデータは一元配置分散分析ならびに多重比較を用い、有意水準 5%にて統計学的検定を行った。

また、採取した右側下顎骨は 4%paraformaldehyde で固定後、EDTA 脱灰、パラフィン包埋し連続薄切切片を作成後、HE 染色を行い、病理組織学的検索を行った。

#### 【結果および考察】

pQCT の測定結果では BP 投与細菌接種群の Sub-cort.+皮質骨の骨塩量は各群に対して有意な減少を示し、全骨塩量も BP 投与細菌接種群に減少傾向を示した。ラマン分析の結果においては、BP 投与細菌接種群が BP 投与非接種群に対してミネラル/マトリックス比の有意な減少を示した。CO<sub>3</sub>/PO<sub>4</sub> 比に変化は認められなかった。得られた結果より、BP 服用下での細菌感染が骨量低下および骨質の劣化をもたらすことが考えられる。

病理組織学的に解析した結果、BP 投与細菌接種群において、破骨細胞数に減少傾向が認められ、骨小腔内に存在する骨細胞が萎縮および欠損していたことから骨細胞に影響を及ぼしていることが示された。

#### 【結論】

本研究の結果から、ALN の経口投与、*P. gingivalis* 33277 株混合液の口腔内接種を行うことにより、BRONJ 誘発の素地を研究するラットモデルが作製されたこと、BRONJ の発生機序には口腔内細菌の関与が重要であることが示された。

## Microcosm バイオフィームモデルを用いた齶蝕原生検討のための基礎的研究

神奈川県立歯科大学 口腔治療学講座保存修復学分野<sup>1)</sup>, ACTA CEP<sup>2)</sup>

○富山 潔<sup>1)</sup>, Exterkate R.A.M<sup>2)</sup>, ten Cate J.M<sup>2)</sup>, 向井義晴<sup>1)</sup>, 寺中敏夫<sup>1)</sup>

### Fundamental study on cariogenicity in microcosm biofilms

Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College<sup>1)</sup>

Department of Cariology Endodontology Pedodontology, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA)<sup>2)</sup>,

○TOMIYAMA Kiyoshi<sup>1)</sup>, Exterkate R.A.M<sup>2)</sup>, ten Cate J.M<sup>2)</sup>, MUKAI Yoshiharu<sup>1)</sup>, TERANAKA Toshio<sup>1)</sup>

【研究目的】 口腔内のバイオフィームは多種多様な細菌から構成されており、その成長、代謝活性、抗菌剤への耐性は同じプラーク内ですら一様ではない。細菌間の相互作用なども考慮すると、口腔内バイオフィームのう蝕原生を検討する上で、Microcosm バイオフィームの研究は重要である。Microcosm バイオフィームは、*S. mutans* バイオフィームと比較し、抗菌剤治療に対して異なった性質を示すことが Exterkate らによって示唆されている。本研究では、異なった基質上で長期間培養したバイオフィームの性質を検討するとともに、クロルヘキシジン処理に対してどのような動態を示すのかを検討した。

【材料および方法】 ウシ下顎中切歯より切り出した直径 6mm の円盤状象牙質片を研磨し、平坦な面を作製した。その後、歯質表面が外側になるように二枚の試片を貼り合わせて厚さ 3mm の試片を作製し、側面をネイルバーニッシュで被覆した。また、ガラス基質として glass cover slips (Menzel, Braunschweig, Germany) を使用した。バイオフィームの作製には、Exterkate の報告した Microcosm バイオフィームモデルを用いた。すなわちポリスチレン製の 24 ウェルプレートに 1 被験者から採取した刺激唾液を緩衝剤非含有の McBain medium (McBain 2005, 0.2% スクロース, pH 7.5) で 50 倍希釈し、37°C、嫌気的条件下で 8 時間培養し、ステンレス製の蓋に固定した試片の両面にバイオフィームを作製した。各培養時期におけるバイオフィームの代謝活性の比較は、使用済み medium の pH、象牙質から medium 中へのカルシウム溶出量、バイオフィームの乳酸産生量および総細菌量測定により行った。さらにバイオフィーム成分の比較を行なうために、培養 192 時間のサンプルから抽出した DNA を PCR 処理後、Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE, Bio - Rad Dcode system) により、細菌叢の多様性を観察し、比較した。細菌叢成分の比較は 48 時間または 192 時間で行なった。[実験 1] 長期培養モデルを確立するため、48, 120, 144, 168, 192 時間培養を行ない、すべての培養時期でバイオフィームの代謝活性を評価した。[実験 2] 0.2% グルコン酸クロルヘキシジン (CHX, Corsodyl, GlaxoSmithKline) 処理を行なう時期により実験群を分類し、72 時間処理群、192 時間処理群、そして 72 および 192 時間での複数回処理群の 3 群とした。[実験 3] 0.05% CHX (4 倍希釈 Corsodyl) 処理を行なう時期により、72 時間処理群、192 時間処理群、そして 72, 152, 168, 192 時間での複数回処理群の 3 群とした。実験 1 および 2 の対象群には滅菌水処理を行なった。統計分析には、一元配置の分散分析および Tukey's HSD test を用い有意水準 5% にて行なった。

【結果】 [実験 1] 異なった基質の medium の pH は約 1 ユニットの差があり (象牙質 : 5.24, ガラス : 4.15,  $p < 0.05$ )、象牙質上では安定した脱灰が継続していた。ガラス上で形成されたバイオフィームの酸産生量と総細菌量は、培養期間の延長とともに増加したが、象牙質上では比較的安定していた。[実験 2, 3] 0.05% CHX および 0.2% CHX 処理後、象牙質上に形成されたバイオフィームの pH は、ガラス上とは異なり、対象群と比較して一貫して低く、酸性 pH の回復も遅かった。複数回処理後の酸産生量およびカルシウム溶出量は象牙質上で有意に増加し、ガラス上の酸産生量は有意に減少した ( $p < 0.05$ )。初期バイオフィームへの 0.2% CHX 処理は、両基質上の総細菌量を有意に減少させ、両基質上の総細菌量の差は顕著だった (象牙質 :  $1.14 \times 10^7$ , ガラス :  $3.85 \times 10^4$ )。また、0.05% CHX 処理はガラス上でのみ減少させた。一方、CHX 処理後の長期培養バイオフィームは、ガラス上で感受性が高く、象牙質上で安定していた。

【考察】 象牙質上で形成されたバイオフィームは、脱灰の緩衝作用により pH が高く保たれ、これが抗菌剤処理後に生じるバイオフィーム中の細菌の代謝に影響している可能性があると思われた。対照的にガラス上のバイオフィームはクロルヘキシジン処理に対して感受性が高く、バイオフィームの成分を観察した結果、象牙質よりも酸抵抗性、酸産生ともに高い細菌種が形成するバイオフィームに移行しているものと思われた。

【結論】 Microcosm バイオフィームの代謝活性および細菌成分は、培養基質の違いに起因する pH 値の違いにより顕著に影響を受け、さらにバイオフィームの抗菌剤に対する抵抗性にも影響する可能性が示唆された。

## 各種う蝕部位におけるう蝕除去前後の pH 変化とう蝕細菌叢 qPCR 解析

<sup>1</sup>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 <sup>2</sup>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

○栗林 恵美<sup>1</sup>, 北迫 勇一<sup>1</sup>, マティン カイルール<sup>1</sup>, 田上 順次<sup>1,2</sup>

### Analyzing location based pH change on removal of caries and Real Time PCR of cariogenic bacteria

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>Global COE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University,

○Megumi Kuribayashi<sup>1</sup>, Yuichi Kitasako<sup>1</sup>, Khairul Matin<sup>1</sup>, Junji Tagami<sup>1,2</sup>

#### 【研究目的】

演者らは、第 127 回日本歯科保存学会にて、臨床用試作微小 pH センサーを用い、急性ならびに慢性う蝕象牙質除去前後の表層 pH 変化（う蝕活動性評価）およびう蝕サンプル中の細菌叢遺伝子分析について報告した。今回、同 pH センサーを用い、う蝕部位別（隣接面・咬合面・歯頸部・根面）におけるう蝕除去前後の pH 値を測定し、あわせてう蝕サンプル中の細菌叢遺伝子分析を行い、測定された pH 環境を形成するう蝕細菌叢について検討を加えたので報告する。

#### 【材料と方法】

東京医科歯科大学歯学部附属病院に来院した患者で、原発性象牙質う蝕を有する者に対し、本学倫理審査委員会承認のもと、本研究趣旨に関する説明を行い、被験者としての同意を得た（被験者数 72 名・年齢 18 歳～81 歳・平均年齢 49.0 歳）。問診および臨床所見に基づき、各被験歯を急性（亜急性含む）または慢性う蝕に分類した後（急性 39・慢性 33）、試作臨床用微小 pH センサー（堀場製作所）を用いて、健全エナメル質およびう蝕象牙質表層の pH 値を測定した。エキスカバーターならびにラウンドスチールバーを用いてう蝕サンプルを採取した後、う蝕除去後の象牙質表層 pH 値を測定した。さらに、測定された pH 値環境を形成するう蝕原因細菌叢について検討するため、う蝕サンプルの重さを測定し、各サンプルから採取した試料に存在する Oral bacteria, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacilli* spp. の定量的遺伝子解析を行った。すなわち、7500 Real Time PCR Sequence Detection System (SDS; ABI PRISM®7500, Applied Biosystems, USA) および Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて、各サンプルから抽出した DNA を鋳型とし、Oral bacteria, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacilli* spp. の検出用プライマーと混合して、う蝕サンプル 10 µg あたりの DNA コピー比率を算出した。ウィルコクソン検定を用いて、危険率 5%にて検定を行った。

#### 【結果および考察】

急性（亜急性含む）う蝕の結果を表に示す。う蝕表層 pH 値は歯頸部・隣接面で低く、根面で高い傾向を示し、歯頸部・根面間、隣接面・根面間に各々有意差を認めた ( $p < 0.008$ )。また、う蝕除去前後の表層 pH 値はすべての部位で有意差を認めたのに対し ( $p < 0.05$ )、う蝕除去後の表層 pH 値は部位間での有意差を認めなかった ( $p > 0.008$ )。う蝕表層 pH 値の低い歯頸部・隣接面では、*Lactobacilli* spp. が多く検出された。歯頸部と根面は近接した部位であるが、pH 値や細菌叢に大きな違いが認められることから、その環境を形成する因子の存在が示唆された。咬合面では、各サンプルから Oral bacteria が多く検出されたが、代表的なう蝕原因細菌 (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *Lactobacilli* spp.) が比較的少ない結果となった。一方、慢性う蝕では、う蝕表層の pH 値が、すべての部位において急性と比較して有意に高い値を示したものの ( $p < 0.05$ )（隣接面：pH 6.1・咬合面：pH 6.1・歯頸部：pH 6.3・根面：pH 6.2）、部位間における有意差は認められなかった ( $p > 0.008$ )。さらに、う蝕細菌叢についても部位間の差を認めなかった。今後、他の菌種についても同定を行い、部位ごとの細菌叢の違いについてさらなる検討を加える予定である。

急性	表層 pH 値			Real Time PCR (数字はサンプル数, () 内は検出限界以下のサンプル数)							
	健全エナメル質	う蝕		<i>Oral bacteria</i>		<i>Lactobacilli</i> spp.		<i>S. mutans</i>		<i>S. sobrinus</i>	
		除去前	除去後	≥100000	<100000	≥1000	<1000	≥1000	<1000	≥1000	<1000
隣接面 (n=10)	6.8	5.2	6.5	8	2	4	6 (6)	4	6 (2)	1	9 (7)
咬合面 (n=10)	6.9	5.4	6.5	4	6	0	10 (10)	4	6 (4)	0	10 (10)
歯頸部 (n=10)	6.8	5.2	6.4	6	4	5	5 (3)	6	4 (0)	4	6 (5)
根面 (n=9)	6.8	5.7	6.5	7	2	0	9 (9)	7	2 (1)	2	7 (5)

## *Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成に対するレクチンによる抑制機構

<sup>1</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野

<sup>2</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体材料学分野 <sup>3</sup>株式会社グライエンス

○伊東 孝<sup>1</sup>, 吉田靖弘<sup>2</sup>, 峯柴淳二<sup>1</sup>, 難波尚子<sup>1</sup>, 今村幸治<sup>3</sup>, 竹内英明<sup>3</sup>, 鈴木一臣<sup>2</sup>, 高柴正悟<sup>1</sup>

### Mechanism of inhibition by lectin against biofilm formation of *Streptococcus mutans*

<sup>1</sup>Department of Pathophysiology - Periodontal Science, <sup>2</sup>Department of Biomaterials,

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, <sup>3</sup>GLYENCE Co. Ltd.

○Takashi ITO<sup>1</sup>, Yasuhiro YOSHIDA<sup>2</sup>, Junji MINESHIBA<sup>1</sup>, Naoko NAMBA<sup>1</sup>, Koji IMAMURA<sup>3</sup>,  
Hideaki TAKEUCHI<sup>3</sup>, Kazuomi SUZUKI<sup>2</sup>, Shogo TAKASHIBA<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

レクチンとは糖鎖と特異的に結合する能力を有する酵素や抗体以外のタンパク質の総称である。これらは、原始的生物から高等生物に至るまであらゆる生物に存在し、結合する糖鎖によって多くのファミリーが存在する。また、植物レクチンの中でグルコース・マンノース認識レクチンに *Streptococcus* 属細菌の初期付着及びバイオフィーム形成の抑制効果があることは既に報告されている (E. H. Teixeira *et al.*, 2005; B. Islam *et al.*, 2008)。しかし、ペリクル介在下での糖鎖と *Streptococcus* 属細菌の初期付着時における相互作用は、示唆されてはいるが、その結合機構は不明である。これを解明して応用することは、口腔内感染症の根本的な予防技術の開発につながることは確実である。糖鎖を介した口腔感染症原因菌の初期付着機構の解明のために、本研究では 70 種類のレクチンおよび 4 人の唾液を用いた網羅的解析によって、初期付着に関与するペリクル中の糖鎖構造を検討した。また、Surface plasmon resonance (SPR) を用いて、レクチン解析から予想された糖鎖と *S. mutans* の初期付着時における相互作用を解明した。

#### 【材料および方法】

##### 1. *S. mutans* のバイオフィーム形成に対するレクチンの抑制効果の網羅的解析

96 穴マルチプレート (nunc 社) の各ウェルにヒト唾液 100 $\mu$ l を添加し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間コーティングした。ウェルを PBS(-) で 3 回洗浄後、100 $\mu$ g/ml に希釈した各種レクチンを各ウェルに 100 $\mu$ l 添加した。37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、PBS(-) で 3 回洗浄した。5 $\times$ 10<sup>8</sup> 個/ml となるように PBS(-) で希釈した *S. mutans* ATCC25175 株培養液を 100 $\mu$ l ずつ播種し、37 $^{\circ}$ C で 12 時間好気条件下において培養した。PBS(-) で 3 回洗浄後、0.25% グルタルアルデヒドで固定し、クリスタルバイオレットで染色・抽出し、吸光度 (570 nm) を測定して、菌体数の定量を行った。同時に走査電子顕微鏡 (SEM) を用いて各ウェルの *S. mutans* の付着状態を観察した。

##### 2. SPR を用いた *S. mutans* とムチン型糖鎖の相互作用の解析

各種糖鎖 (Core1, Core3, Sialyl T) を固相化したセンサーチップに *S. mutans* を注入し、特異的結合反応に伴うシグナル増加を Biacore 2000 で測定した。

#### 【成績および考察】

##### 1. *S. mutans* のバイオフィーム形成に対するレクチンの抑制効果の網羅的解析

陽性対照条件 (レクチンなし) に対して、唾液を適応した被験者ごとにバイオフィーム抑制効果を発揮するレクチンの種類が違った。また、同種のレクチン間においても、被験者ごとに抑制の程度に差があった。しかし、全ての被験者において、Core1 構造 (Gal  $\beta$  1-3GalNAc) 認識レクチンである ABA (*Agaricus bisporus* 由来) を作用させたウェルは有意に低い吸光度を示した。このことから、ABA は唾液にコーティングされたウェル基質への *S. mutans* の付着及びバイオフィーム形成を抑制していることが考えられた。また、ABA 以外の Core1 構造認識レクチンを作用させたウェルが陽性対照条件 (レクチンなし) よりも低い吸光度を示したことから、Core1 構造認識レクチンが *S. mutans* のバイオフィーム形成を抑制する傾向をもつ事が示唆された。また、SEM の観察では、Core1 構造認識レクチンが *S. mutans* の付着様式の形態を変化させていた。

##### 2. SPR を用いた *S. mutans* とムチン型糖鎖の相互作用の解析

Core1 を固相化したセンサーチップでは、他の糖鎖よりも *S. mutans* が強く結合し解離しにくいことが観察された。 *S. mutans* はペリクルに含まれるムチン型糖鎖の Core1 構造を認識して結合することが示唆された。

#### 【結論】

Core1 構造を認識するレクチンはペリクル中のムチン型糖鎖である Core1 構造に対して *S. mutans* と競合的に結合することによって初期付着を阻害し、その結果としてバイオフィームの形成を抑制することが示唆された。

## 口腔レンサ球菌の産生するバクテリオシンに対する *Streptococcus mutans* の感受性と 関与する二成分制御系因子の解析

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科顎顔面機能再建学講座歯科保存学分野

○藤島慶 徳田雅行 鳥居光男

### **Analysis of TCS in *Streptococcus mutans* related to bacteriocin susceptibility produced by oral Streptococci**

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

○FUJISHIMA Kei, TOKUDA Masayuki and TORI I Mitsuo

#### 【目的】

口腔内常在菌であり、う蝕原性菌である *Streptococcus mutans* が、他の口腔レンサ球菌の産生する抗菌性因子 (バクテリオシン) に対してどのような感受性を示すかを検証する。細菌は、他菌の産生するバクテリオシンの感知・適応も含め、さまざまな外環境の変化の情報伝達を二成分制御系 (TCS) を介して行う。二成分制御系 (TCS) とは、外環境の変化を感知する、センサーとしての役割を持つヒスチジンキナーゼ (HK) と、ヒスチジンキナーゼ (HK) からのシグナルを受け取り種々の遺伝子の発現を制御するレスポンスレギュレーター (RR) の2成分からなる、細菌特有の情報伝達系である。

今回、さらに、バクテリオシン感受性に関与する *S. mutans* の二成分制御系 (TCS) についても網羅的に検証する。

#### 【方法】

*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus gordonii*、*Streptococcus mitis*、*Streptococcus salivarius*、*Streptococcus sobrinus* が産生するバクテリオシンに対する感受性を、寒天培地を用いた増殖阻害実験にて検証した。方法としては、これら5菌種を50% TSB 寒天培地上に滴下し、37°C で一晚培養し、コロニーを形成させた。次に、コロニーから一定距離に *S. mutans* UA159 株を滴下しさらに一晚培養し、*S. mutans* UA159 株のコロニー成育阻害度を検証した。*S. mutans* に対し、抗菌作用が認められた口腔レンサ球菌については、既に作製している *S. mutans* UA159 株の生育に必須の二成分制御系 (TCS) を除く、他の全ての TCS 欠損株を用いて同様の増殖阻害実験を行い、バクテリオシン感受性に関与している二成分制御系 (TCS) を検証した。

#### 【結果】

本研究から、*S. mutans* に対して、抗菌性因子 (バクテリオシン) を産生する口腔レンサ球菌は *S. sanguinis* と *S. gordonii* であることが明らかになった。さらにこれらの2菌種に対する *S. mutans* UA159 株の TCS 欠損株を用いた増殖阻害実験から、1つの TCS 欠損株で感受性の増大が認められた。このことから、*S. mutans* の二成分制御系 (TCS) が他菌の産生するバクテリオシン耐性に関与していることが示唆された。

#### 【考察】

本研究から他菌の産生するバクテリオシンを *S. mutans* の二成分制御系 (TCS) が感知し適応していると考えられ、このことは *S. mutans* がブランク中でバクテリオシンを感知し適応することで、他菌との共生が可能になっているのではないかと考えられる。今後は二成分制御系 (TCS) を介した他菌の産生するバクテリオシン耐性メカニズムについても検証を進める予定である。

*Porphyromonas gingivalis* バイオフィルムの菌体外マトリックスに対する  
陽イオン性抗菌剤の影響

<sup>1)</sup>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)

<sup>2)</sup>大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座 (予防歯科学教室)

○山口幹代<sup>1)</sup>、野杵由一郎<sup>1)</sup>、久保庭雅惠<sup>2)</sup>、前菌葉月<sup>1)</sup>、山本れいこ<sup>1)</sup>、恵比須繁之<sup>1)</sup>

Effects of cationic antimicrobial against exopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* biofilm

<sup>1)</sup>Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

<sup>2)</sup>Department of Preventive Dentistry, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Mikiyo Yamaguchi<sup>1)</sup>, Yuichiro Noiri<sup>1)</sup>, Masae Kuboniwa<sup>2)</sup>, Hazuki Maezono<sup>1)</sup>, Reiko Yamamoto<sup>1)</sup>,  
Shigeyuki Ebisu<sup>1)</sup>

[研究目的]

陽イオン性の抗菌剤であるグルコン酸クロルヘキシジン(CHX)は、辺縁性歯周炎や難治性根尖性歯周炎の病原性細菌である *P. gingivalis* のバイオフィルムに著効を示すことが報告されている。しかし、これらの実験では、抗菌剤の効果をバイオフィルム中の菌体の生死により判定していたものが多く、バイオフィルム表層を被覆する菌体外マトリックスに対する効果を評価した報告は少ない。我々は、CHX が *P. gingivalis* ATCC 33277 株および 381 株のバイオフィルム中の菌体に対しては有効であるが、菌体外マトリックスの主成分と考えられている菌体外多糖には効果を示さないことを明らかにし、第 132 回本学会で報告した。一方、陽イオン性の抗菌剤である塩化セチルピリジニウム(CPC)や CHX は、菌体の疎水性を増加させるため、この種の抗菌剤を作用させた後に残存したバイオフィルムに対し、バイオフィルムの再形成を助長する可能性がある。そこで、本研究では、CPC の菌体外マトリックスへの影響を検索するとともに、CHX 作用後に残存した菌体外マトリックスの性状について検討した。

[材料および方法]

1. 使用菌株および抗菌剤

菌株は、*P. gingivalis* ATCC 33277 株を使用した。抗菌剤は、CHX(0.2%)および CPC(0.0005-0.2%)を用いた。

2. 共焦点走査型レーザー顕微鏡(CLSM)による解析

*P. gingivalis* を DAPI (50 µg/ml)にて染色し、唾液処理を施したカバーガラスチャンパー内で 37°C、嫌気条件下にて 24 時間培養し、バイオフィルムを形成した。形成したバイオフィルムに、CPC を 5 分間作用させた後、菌体外多糖を Concanavalin A-FITC および Wheat germ agglutinin-FITC にて 30 分間染色し、CLSM 観察に供した。CLSM より得られた像から画像解析ソフトを用いて、バイオフィルムの 3 次元構造の観察および定量的解析を行った。

3. CHX 処理後のバイオフィルムの物理的強度の測定

*P. gingivalis* を唾液処理を施したカバーガラスチャンパー内で 24 時間培養し、形成したバイオフィルムに、CHX を 5 分間作用させ、各サンプルを 10 分間超音波処理した後、残存したバイオフィルムを回収し、その吸光度を 550 nm(OD<sub>550</sub>)で測定した。

4. CHX 処理後に残存したバイオフィルム上に再形成したバイオフィルムの定量

上記 3 項と同一の方法にて形成したバイオフィルムに、CHX を 5 分間作用させた後、PBS にて 3 回洗浄し、菌液に交換後、さらに 24 時間培養し、回収したバイオフィルムの吸光度を OD<sub>550</sub> で測定した。

5. 統計学的解析

得られた結果は Student's *t*-test にて有意差検定を行った。

[結果および考察]

CLSM 像から定量的解析を行った結果、全ての CPC 添加群でコントロール群と比較し、菌体の体積が有意に減少した( $p < 0.001$ )が、臨床的な配合上限である 0.05%以下の CPC 添加群で菌体外多糖の体積に有意差は認められなかった。また、CHX 処理後のバイオフィルムはコントロール群と比較し、超音波処理により剥離しにくく、残存した菌体外多糖上にバイオフィルムが再形成されやすいことが明らかとなった。

これらの結果より、CPC は、CHX と同様に *P. gingivalis* バイオフィルム中の菌体外多糖には作用せず、菌体のみを選択的に排除・抑制することが示唆された。また、残存した菌体外多糖は機械的除去が困難で、バイオフィルムの再形成を促進することが示唆された。

[結論]

CHX および CPC は、*P. gingivalis* バイオフィルム中の菌体には有効であるが、菌体外マトリックスの主成分である菌体外多糖を除去できないだけでなく、残存した菌体外多糖はバイオフィルム再形成の足場となりうることを示唆された。



Er:YAG レーザーの歯内治療への応用  
-根管細菌およびLPSに対する影響-

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座<sup>1</sup>、保存修復学講座<sup>2</sup>

○ 千田晋平<sup>1</sup>、稲本京子<sup>1</sup>、堀場直樹<sup>1</sup>、千田彰<sup>2</sup>、中村洋<sup>1</sup>

Study on the Use of Er:YAG Laser for Endodontic Treatment  
-Effects for Intracanal Bacteria and Lipopolysaccharides-

Department of Endodontics<sup>1</sup>, Department of Operative Dentistry<sup>2</sup>,  
School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○ SENDA Shinpei<sup>1</sup>, INAMOTO Kyoko<sup>1</sup>, HORIBA Naoki<sup>1</sup>, SENDA Akira<sup>2</sup>, NAKAMURA Hiroshi<sup>1</sup>

【研究目的】

我々は、第131回秋季大会において、根管拡大形成可能なEr:YAGレーザーの照射条件における、根管殺菌効果の有用性について報告した。そこで今回我々は、Er:YAGレーザーの波長(2.94 $\mu$ m)とLPSの吸収波長(2.92 $\mu$ m)の近似に着目し、LPSを人為的に感染させたヒト抜去歯を用いて、Er:YAGレーザー照射による抗LPS効果についても検討した。

【材料および方法】

Er:YAGレーザーとして、Erwin AdvErL<sup>®</sup>を使用した。照射用チップはR200Tを用い、表示出力を25pps・30mJとし、移動速度を1mm/sec、往復回数を10往復の照射条件とした。

①殺菌効果の検討：試料として、ヒトの新鮮抜去歯歯根を用いた。根管拡大形成および化学的清掃した歯根をエポキシ樹脂に包埋した後、オートクレーブ滅菌した。その後、BHI液体培地で一昼夜培養した*S. mutans*および*E. faecalis*を根管内に注入し、湿度100%下で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に固定後、照射チップを根管内に挿入し、上記条件下でレーザー照射を行った。次いで、根管菌液を回収しMSあるいはBHI寒天培地にそれぞれ塗抹した。2日間培養した後、コロニー数をカウントし、コントロール(未照射)と比較した時の殺菌効果を検討した。また、*E. faecalis*を感染させた天然歯を用い、レーザー照射後の象牙質内への殺菌効果を確認するために、LIVE/DEAD<sup>®</sup>染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

②抗LPS効果の検討：試料として、ヒトの新鮮抜去歯歯根を用いた。歯冠部を切断した後、歯根を歯軸と平行に2分割し、耐水研磨紙を用いて研磨した。化学的清掃および超音波洗浄した後、オートクレーブ滅菌した。試料をLPS(*E. coli*0111:B4)溶液に2週間浸漬した後、上記条件下でレーザー照射を行った。その後、試料のレーザー照射部を中心に断面積が、約1mm<sup>2</sup>の四角柱になるように切断した。その試料を真鍮ロットに固定した後、ロットをマイクロケータに取り付け、マイクロサンプリング法にて根管側からセメント質側へ、100 $\mu$ mごと、500 $\mu$ mまでの5層の象牙質粉を採取した。採取した象牙質粉からのLPS量を、エンドスペクター<sup>®</sup>を用いたジアゾカップリング法による吸光度測定から定量した。

【結果】

①殺菌効果：*S. mutans*および*E. faecalis*ともに99.0%以上の殺菌効果を認め、両者間には有意差は認められなかった。また、LIVE/DEAD<sup>®</sup>染色により、根管側から約400 $\mu$ mの深さまで、死菌層が確認された。

②抗LPS効果：根管側から100 $\mu$ mまでの層においては、レーザー照射群のLPS量はコントロール群と比較して、有意に減少していた。また、レーザー照射群の200、300および500 $\mu$ m層におけるLPS量は、コントロール群と比較してそれぞれ減少していたものの、いずれも有意差は認められなかった。

【考察および結論】

本研究の結果から、根管拡大形成に用いることができるEr:YAGレーザーの照射条件において、99.0%以上の細菌数の減少および、根管側から100 $\mu$ mの深さではあるが、LPSの減少を認めた。しかし、根管を完全に無菌化することは困難と思われた。この要因としては、側枝、イスマス、フィンなど、複雑な根管形態の存在が考えられる。また、象牙細管深部にまでは、レーザーの作用が及ばないことも考えられる。LPSに関して、自発痛などの臨床症状との関連性も示唆されており、炎症との関わりが深い。根管内に存在するLPSが、100 $\mu$ mの深さまでではあるが、細菌とともに根管内から排除され、Er:YAGレーザーの根管処置への有用性が示唆された。

演題 B7 (歯周)  
【2504】

ヒト歯肉上皮細胞において *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* が誘導する炎症関連因子の発現に対する  
イルソグラジンマレイン酸の効果

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  
宮川剛史、藤田 剛、應原一久、松田真司、武田克浩、内田雄士、柴 秀樹、河口浩之、栗原英見

Irsogladine maleate regulates the expression of inflammatory related genes in human gingival epithelium cells  
stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*  
Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University Graduate School  
of Biomedical Sciences

Tsuyoshi Miyagawa, Tsuyoshi Fujita, Kazuhisa Ouhara, Shinji Matsuda, Katsuhiko Takeda, Yuushi Uchida,  
Hideki Shiba, Hiroyuki Kawaguchi, Hidemi Kurihara

#### 研究目的

イルソグラジンマレイン酸 (IM) は *A.actinomycetemcomitans* (*A.a*) が誘導するヒト歯肉上皮細胞(HGEC)の IL-8 産生および E-cadherin などの接着タンパクの発現を制御することで歯肉の炎症を抑制する。さらに IM は HGEC の ERK や p38 MAP kinase のリン酸化を抑制し、*A.a* が誘導する IL-8 や E-cadherin の発現を調整している。本研究では IM の抗炎症作用をより詳細に検討することを目的として、他の炎症関連因子、特にケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼに注目し、*A.a* 刺激下の HGEC における IM の影響を検討した。また、これらのケモカイン、プロテアーゼの発現に対する ERK, p38 MAP kinase の関与を明らかにした。

#### 方法

HGEC は健康な歯肉組織から酵素消化法によって分離し、3-4 代継代培養したものを実験に使用した。培地は Hu-mediaKB2 に insulin, transferrin, 2-mercaptoethanol, sodium selenite, bovine pituitary extract を添加したものをを用いた。*A.a* は 1%ホルマリンにて 4℃、12 時間処理し、死菌としたものを用いた。

HGEC に IM (1 μM), p38 MAP kinase inhibitor である SB203580 (10 μM), あるいは ERK inhibitor である PD98059 (10 μM) 存在下または非存在下で *A.a*( $5 \times 10^8$  cell/ml) を作用させ、12 時間後に totalRNA を回収した。

MMP-1, -3, CXCL-2, -3, CCL20, ICAM-1, IL-6 の mRNA 発現は、real-time PCR 法で解析した。さらに細胞上清中の MMP-3, IL-6 量を ELISA を用いて測定した。

#### 結果

*A.a* 刺激によって HGEC の MMP-1, -3, CXCL-2, -3, CCL20, ICAM-1, IL-6 の mRNA 発現が増加した。また IM はいずれの発現も抑制した。MMP-3, CXCL-2, -3, CCL20 の mRNA の発現増加は SB203580, PD98059 の添加によって抑制され、MMP-1, ICAM-1 の mRNA の発現増加は PD98059 の添加によって抑制された。また、IL-6 の mRNA の発現増加は SB203580 の添加によって抑制された。

MMP-3 と IL-6 分子の発現は mRNA 発現とほぼ同様の傾向を示した。

#### 考察

IM は *A.actinomycetemcomitans* 刺激下によって誘導される炎症に関するサイトカイン、ケモカイン、マトリックスメタロプロテアーゼの発現を p38 MAP kinase あるいは ERK を制御することで抑制していることが示唆された。

## 必須微量元素亜鉛の基質小胞性石灰化促進効果

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野  
○川久保 敦, 松永 常典, 石崎 秀隆, 山田 志津香, 林 善彦

### Zinc as Essential Trace Element Accelerates Matrix Vesicles-Mediated Mineralization

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences,  
○Atsushi Kawakubo, Tsunenori Matsunaga, Hidetaka Ishizaki,  
Shizuka Yamada, Yoshihiko Hayashi

#### 【緒言】

必須微量元素である亜鉛 (Zn) は、不足した際に味覚障害や肌荒れ、不妊症などが起こることで有名である。また、コラーゲン合成や骨の石灰化に必要な元素であることも知られている。21 世紀に入り、特に初期の齶蝕への対応は、従来の切削・修復から MI に基づく再石灰化現象を活用した自然治癒促進療法へと大きくシフトしている。また、歯折予防の面からも、歯髄温存を目的とした覆髄処置への期待は高まっている。このような背景から、微量元素である Zn を、再石灰化現象を促進させるために応用・活用することが期待される。なお、我々はこれまで過去 3 年間にわたり、つくば市にある高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設 (KEK PF) の放射光を用いて、再石灰化エナメル質において、Zn に注目して蛍光 X 線分析を行ってきた (Arch Oral Biol, 2009)。最近の 2 年間は、この研究をさらに発展させるため、基質小胞性石灰化過程に及ぼす微量の Zn の影響を検討してきた。すなわち、培養 5 日目までの基質小胞性石灰化現象への Zn の影響を Ca の集積との関係から明らかとした。

#### 【方法】

教室保存の骨芽細胞株 (NOS-1) を使用した。様々な濃度の  $\text{ZnSO}_4$  を添加した培地を用いて NOS-1 の培養を行い、培養 1,3,5 日目でアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を計測し、最適な  $\text{ZnSO}_4$  濃度を求めた。次に、100ml の培養皿に、 $1 \times 10^6$  個の細胞を播種、培養 (血清添加  $\alpha$ -MEM を作製) し、60~70%コンフルエントの時点で、培養細胞をコラゲナーゼ (20mg/5mL ハンクス液) で処理し、18200rpm, 20 分の超遠心操作を行い、細胞画分を分離したのち、その上清を回収し 50000rpm, 10 分間の超遠心操作によって、基質小胞を分離した。ハンクス液で洗浄ののち、同様の超遠心操作を行い、基質小胞を回収した。その後、血清無添加、5mM Na- $\beta$ グリセロリン酸添加の  $\alpha$ -MEM ( $\text{ZnSO}_4$  添加群、無添加群) を分離した基質小胞へ加え、炭酸ガス培養器にて培養した (5%  $\text{CO}_2$ , 37°C, 湿度 100%)。培養 1,3,5 日後、超遠心を行ったのちパラホルムアルデヒド-グルタルアルデヒドで前固定、エタノール脱水・ブタノール置換後、凍結乾燥を行った。石灰化物 (沈殿物) を KEK PF の放射光 (BL-4A) を用いて蛍光 X 線分析を行い、Zn, Ca の定性・定量を行った。

#### 【結果と考察】

Zn 濃度を  $1 \times 10^{-6}\text{M}$  から  $1 \times 10^{-3}\text{M}$  まで変化させ、その中で ALP 活性の高かった  $1 \times 10^{-5}\text{M}$  を至適濃度とした。培養 1, 3, 5 日目での亜鉛相対値の平均に、経時的上昇が認められた。また、細胞培養時に Zn 添加群で、3 日目、5 日目で亜鉛の相対値が高い傾向にあった。また石灰化物の蛍光 X 線定性・定量分析において、Zn 添加群が無添加群に比べて、3 日目、5 日目で Ca 相対値平均の上昇、また、走査型電子顕微鏡を用いた観察において、1 日目においては顆粒状の構造物がみられ、5 日目になると球状、または板状の構造物も認められた。

これらの結果から、微量の Zn が存在することで、骨芽細胞の ALP 活性を亢進し、早期に基質小胞性石灰化が進行するものと考えられる。また、Zn の存在によって経時的に Ca の取り込みが促進される可能性が示唆された。

## PRG フィラー含有コーティング材の歯質石灰化効果に関する研究

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>, 近藤歯科医院<sup>3</sup>

○村山 良介<sup>1</sup>, 川本 諒<sup>1</sup>, 遠藤 肇<sup>1</sup>, 安田源沢<sup>1</sup>, 前田 徹<sup>1</sup>,  
黒川弘康<sup>1,2</sup>, 瀧川智義<sup>1</sup>, 宮崎真至<sup>1,2</sup>, 近藤 貢<sup>3</sup>

Effect of PRG Filler Contained Coating Material Application on Remineralization of Tooth Substrate

Department of Operative Dentistry<sup>1</sup>, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center<sup>2</sup>

Nihon University School of Dentistry, Kondo Dental Clinic<sup>3</sup>

○MURAYAMA Ryosuke<sup>1</sup>, KAWAMOTO Ryo<sup>1</sup>, ENDO Hajime<sup>1</sup>, YASUDA Genta<sup>1</sup>, MAEDA Toru<sup>1</sup>,  
KUROKAWA Hiroyasu<sup>1,2</sup>, TAKIGAWA Tomoyoshi<sup>1</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>, KONDO Mitsugu<sup>3</sup>

### 【緒言】

近年, う蝕リスクの低減化あるいは脱灰と再石灰化という動的平衡をコントロールすることの重要性が喧伝されている。このような観点から, 歯質の積極的な再石灰化あるいは脱灰抑制を目的として, 多種のイオンを徐放する PRG フィラーを含有したコーティング材の使用が提案されている。そこで演者らは, PRG フィラー含有試作コーティング材を歯質に塗布し, 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 Optical Coherence Tomography および超音波パルス法を用いて検討するとともに, レーザ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

ウシ下顎前歯を用い, その唇側エナメル質および象牙質を  $4 \times 4 \times 1$  mm のブロックとして切り出し, これを測定用試片とした。なお, 試片の数は各条件についてそれぞれ 5 個とした。

#### 2. 脱灰および PRG フィラー含有歯質コーティング材の塗布

試片の表面に対して 試作 PRG フィラー含有歯質コーティング材 (以後, PRG コート, 松風の塗布を行ったもの (以後, AP 群), あるいは塗布を行わないもの (以後, NA 群) の 2 条件を設定し, それぞれの試片を 0.1 M 乳酸緩衝液 (pH 4.75) に 10 分間浸漬し, その後 37°C 人工唾液 (pH 7.0) に浸漬保管した。なお, 脱灰操作は 1 日 2 回行い, これを 28 日間継続した。また, 脱灰操作を行わず, 人工唾液に浸漬保管を行うものを Control 群とした。

#### 3. 超音波伝播時間の測定, OCT およびレーザ顕微鏡観察

保管中の試片については, 試作 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用い, その経時的変化を観察した。所定の保管期間が終了した試片については, PRG コートを探針にて除去し, 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, 各試片の厚みから縦波音速を求めた。あわせて, レーザ顕微鏡 (VK-8700, KEYENCE) を用いてコート材除去後の表面性状の観察を行った。

### 【成績および考察】

PRG コート塗布直後および 4 日後の OCT 画像を示す (図 1, 2)。塗布直後の画像からは, 塗布面表層とその下方に強度分布を示す画像が得られた。その信号強度を解析したグラフからは 2 箇所の特徴が検出された。一方, 4 日後の画像からは, コート面表層および直下に信号が集中した画像が認められた。信号解析からは, そのピーク幅の延長が認められた。超音波測定の結果からは, 28 日後の NA 群の音速は Control 群と比較して有意に低下した。一方, 28 日経過後の AP 群においては, NA 群と比較してその音速に有意差は認められなかったものの, 上昇する傾向を示した。

### 【結論】

本実験の結果から, PRG フィラーを含有した歯質コーティング材は, 歯質に生じる脱灰を抑制し, 再石灰化を促進する可能性を有することが示された。

### OCT 画像と信号強度グラフ

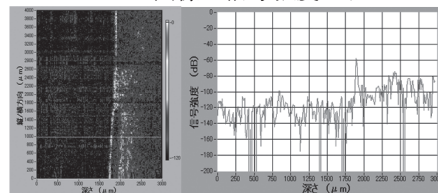


図 1 塗布直後

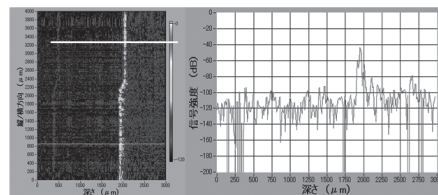


図 2 4 日後

### POs-Ca およびフッ素配合ガム咀嚼後のエナメル質初期う蝕の再石灰化効果および微小硬さ変化

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野 <sup>2</sup>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 <sup>3</sup>東京医科歯科大学歯学部附属歯科技工士学校 <sup>4</sup>江崎グリコ株式会社健康科学研究所

○北迫勇一<sup>1</sup>、半場秀典<sup>1</sup>、Alireza Sadr<sup>1,2</sup>、二階堂徹<sup>1</sup>、池田正臣<sup>3</sup>、田中智子<sup>4</sup>、滝井寛<sup>4</sup>、釜阪寛<sup>4</sup>、田上順次<sup>1,2</sup>

Effect of chewing gum containing POs-Ca and fluoride on remineralization and nanohardness of enamel subsurface lesions *in situ*

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences, <sup>2</sup>Global COE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, <sup>3</sup>Dentistry School for Dental Technology, Tokyo Medical and Dental University, <sup>4</sup>Institute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., LTD

○Yuichi Kitasako<sup>1</sup>, Hidenori Hamba<sup>1</sup>, Ali R. Sadr<sup>1,2</sup>, Toru Nikaido<sup>1</sup>, Masaomi Ikeda<sup>3</sup>,

Tomoko Tanaka<sup>4</sup>, Hiroshi Takii<sup>4</sup>, Hiroshi Kamasaka<sup>4</sup>, Junji Tagami<sup>1,2</sup>

#### [研究目的]

演者らは、第131回日本歯科保存学会にて、POs-Ca配合ガムを摂取することによりエナメル質初期う蝕の再石灰化が促進されること、またガムにフッ素を配合することでより高い再石灰化効果が得られること、さらに高輝度エックス線解析より、TMRにて観察されたミネラル密度の回復は、ハイドロキシアパタイト結晶量の回復である可能性がある事を報告した。今回、同再石灰化部の微小硬さ変化について追加検討を加えたので報告する。

#### [材料と方法]

被験者36名を3群に分け、エナメル質初期う蝕サンプルを取り付けた口腔内装置を装着した状態で、Controlガム、POs-Ca配合ガム、POs-Ca・茶フッ素配合ガムのいずれかを二重盲検下にて1回2粒1日3回14日間摂取させた。顕微X線装置(PW3830, Panalytical)を用いてTMR撮影を行い、ミネラル量の変化については、歯質ミネラル濃度分析用ソフトを用いて解析し、ミネラル回復率( $\text{Rem}\%R = (\Delta\text{Dem} - \Delta\text{Rem}) / \Delta\text{Dem} \times 100$ )を算出した。また、微小硬さ変化については、超微小硬さ測定器(ENT-1100a, Elionix)を用い荷重10mgにて解析し、エナメル初期う蝕における10 $\mu\text{m}$ 深さ別の硬さ回復率( $\text{Hardness Recovery \%} = (\text{Rem} - \text{Dem}) / \text{Sound} \times 100$ )を算出した。なお、ミネラル回復率は、*t*検定を用い危険率5%にて有意差検定をおこなった。

#### [結果および考察]

代表的なミネラル密度ならびに硬さプロファイル曲線を図1に、エナメル質初期う蝕表層より150 $\mu\text{m}$ における深さ別の硬さ回復率を図2に示す。ミネラル回復率は、Controlガムでは $16.3 \pm 9.5\%$ 、POs-Ca配合ガムでは $21.6 \pm 8.0\%$ 、POs-Ca・茶フッ素配合ガムでは $23.3 \pm 6.0\%$ のミネラル密度の回復が認められ、全ての群間において有意差が認められた( $p < 0.05$ )。また、全ての群において、ミネラル密度ならびに硬さプロファイル曲線が同様な挙動を示した。さらに、深さ別の硬さ回復率を比較したところ、50 $\mu\text{m}$ 付近で最も高い回復率を示した。また、表層0-10 $\mu\text{m}$ 付近では、Controlガムでは約2%、POs-Ca配合ガムでは約5%、POs-Ca・茶フッ素配合ガムでは約10%の硬さ回復率を示した。今後、ミネラル回復率についても深さ別の分析を行い、硬さデータとあわせPOs-Ca・フッ素配合ガムの再石灰化機序について検討を加える予定である。

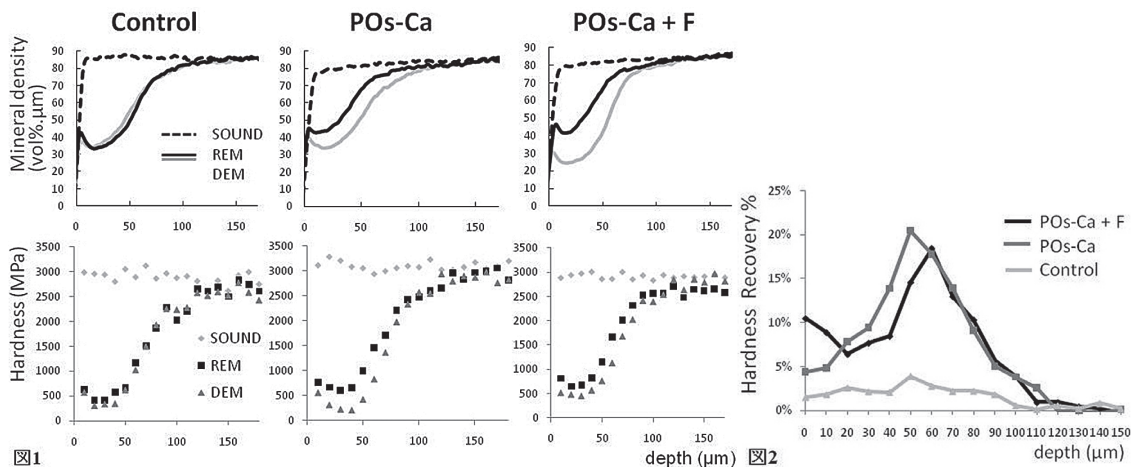


図1

図2

## POs-Ca による初期う蝕の再石灰化促進効果に最適な Ca/P モル濃度比率の探索

<sup>1</sup>江崎グリコ株式会社 健康科学研究所 <sup>2</sup>東京医科歯科大学大学院 歯制御学分野 <sup>3</sup>東京医科歯科大学 GCOE プログラム 歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点

田中智子<sup>1</sup>, 小林隆嗣<sup>1</sup>, 滝井寛<sup>1</sup>, 釜坂寛<sup>1</sup>, 栗木隆<sup>1</sup>, 北迫勇一<sup>2</sup>, 田上順次<sup>2,3</sup>

### Exploration of the optimal Ca/P molar ratio for remineralization of enamel subsurface lesion with POs-Ca

<sup>1</sup>Institute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., Ltd<sup>1</sup>, <sup>2</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, <sup>3</sup>Global COE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University

○Tomoko Tanaka<sup>1</sup>, Takatsugu Kobayashi<sup>1</sup>, Hiroshi Takii<sup>1</sup>, Hiroshi Kamasaka<sup>1</sup>, Takashi Kuriki<sup>1</sup>, Yuichi Kitasako<sup>2</sup>, Junji Tagami<sup>2,3</sup>.

#### 【研究目的】

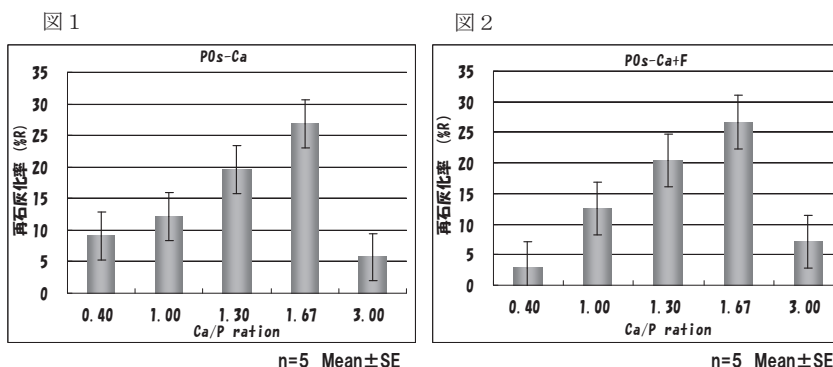
リン酸化オリゴ糖カルシウム (POs-Ca) は、馬鈴薯澱粉より調製される高水溶性カルシウム素材である。POs-Ca は、う蝕原性細菌に資化されず、Ca-P 沈殿形成を抑制する効果を有している。さらに、POs-Ca はカルシウムおよびリン酸の両イオンを高濃度に保持できることから、初期う蝕に対して高い再石灰化促進効果を有している。POs-Ca による再石灰化部位では、歯エナメル質と同じアパタイト結晶構造が回復していることも実証されている。本研究では、POs-Ca で再石灰化を促進するために、最適な Ca/P モル濃度比率の条件を探索した。また、低濃度のフッ素イオンを含有する場合についても同様に検証を試みた。

#### 【材料および方法】

- ① 再石灰化溶液の調製: 擬似唾液をベースに POs-Ca 由来のカルシウムを添加して、5つの Ca/P モル濃度比率 (0.4, 1.0, 1.3, 1.67, 3.0) の再石灰化溶液を調製した (POs-Ca)。さらに、これら5つの Ca/P モル濃度比率をもつ再石灰化溶液にフッ素濃度が 1.0 ppm になるように添加した溶液も調製した (POs-Ca+F)。なお、本研究で用いたフッ素源には食品で利用可能なフッ素含有茶抽出物を用いた。
- ② 抜去ウシ歯冠部よりエナメル質ブロックを切り出し (約 10 mm×10 mm)、レジン樹脂にエナメル質面以外を包埋後、新しいエナメル質面を研磨処理で露出させて試験試料とした (n=5)。エナメル質面 1/3 を被覆して健全部位とした後、二層ゲル法により脱灰処理を行った。脱灰処理後、脱灰処理面の 1/2 を被覆し、残りの面を各種再石灰化溶液に浸漬した。再石灰化処理完了後、各処理エリアを 1 サンプルに含むようなスライス標本 (150μm厚) を切り出し TMR 法に供した。ミネラルプロファイルからミネラル量を得て、再石灰化部位と脱灰部位との間のミネラル量差から再石灰化率を算出した [ $\text{Rem}\%R = (\Delta\text{Dem} - \Delta\text{Rem}) / \Delta\text{Dem} \times 100$ ]。

#### 【結果】

POs-Ca 由来カルシウムを加えて再石灰化処理する場合、唾液中のカルシウム濃度を生理的条件より高い濃度 (6 mM) 条件下で Ca/P モル濃度比率を 1.67 に調整したとき、最も高い再石灰化促進効果が得られた (図 1)。また、フッ素を併用した場合、フッ素による歯面の被覆効果により再石灰化が阻害されることはなく POs-Ca の効果が維持できた (図 2)。



#### 【考察】

POs-Ca 由来のカルシウムを用いて再石灰化促進処理を行った場合、最も高い効果が得られたのは、Ca/P モル濃度比率が 1.67 であった。これは通常の唾液よりも高濃度条件 (6 mM) 下でも安定してカルシウムイオンとリン酸イオンを可溶化状態で共存できるため得られた効果であると考えられた。さらに、フッ素が 1.0ppm 添加されている場合でも同様に高い効果が得られた。つまり、再石灰化促進のためには、最適な Ca/P モル濃度比率が存在することが明らかとなった。POs-Ca の場合は、そのモル濃度比率がアパタイト結晶構成のモル濃度比と同じ 1.67 であった。また、本来カルシウムと速やかに塩を形成するフッ素と、カルシウム素材である POs-Ca を併用しても十分な再石灰化効果を発揮することから、今後 POs-Ca とフッ素のオーラルケアへの利用展開が期待される。

## 過酸化水素水と炭酸水素ナトリウムによる歯の漂白 第二報—漂白効果と歯面への影響

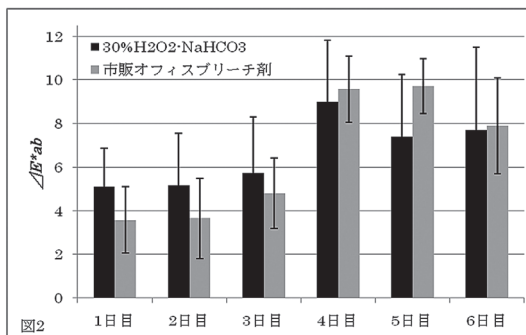
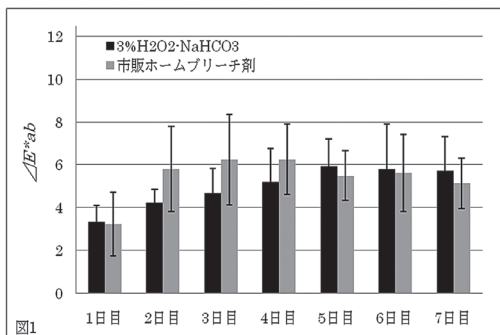
鶴見大学歯学部歯科保存学第一講座  
伊藤祐子, 清水園子, 大森かをる, 池島巖, 桃井保子

Tooth Bleaching using Hydrogen Peroxide and Sodium Hydrogen Carbonate  
- Part 2: Bleaching efficacy and influence on tooth surface -  
Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine  
ITO Yuko, SHIMIZU Sonoko, OHMORI Kaoru, IKEJIMA Iwao, MOMOI Yasuko

〔緒言〕 私達は、第 131 回本学会<sup>1)</sup>において、3%過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)と炭酸水素ナトリウム(NaHCO<sub>3</sub>: 重曹)の混和物が、ウシ歯に対して市販漂白剤と同等の漂白効果を有することを報告した。本研究では 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> と 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 混和物のヒト歯に対する漂白効果を検討した。加えて、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> による漂白が歯面に及ぼす影響について、硬さ、表面粗さ、侵蝕深さ、表面形態を評価した。

〔材料と方法〕 ヒト抜去臼歯の頬舌面それぞれを、ホームブリーチを想定した 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> (4:6) と市販ホームブリーチ剤 (ハイライトシェードアップ、松風) で、またオフィスブリーチを想定した 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> (4:6) と市販オフィスブリーチ剤 (松風ハイライト、松風) で、市販製品の手順に従い漂白した。測色は漂白前、漂白後 1 日ごとに 6 日または 7 日目まで、分光光度計 (Spectro Color Meter SE-2000, 日本電色) で行った。色差 ( $\Delta E^*ab$ ) は一元配置分散分析 (Duncan,  $\alpha=0.01$ ,  $\alpha=0.05$ ,  $n=5$ ) で統計処理した。また、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> による漂白が、ウシ歯のエナメル質表面に及ぼす影響について、1) ビッカース硬さ(VHN)、2) 表面粗さ(Ra,  $\mu\text{m}$ )、3) 表面の侵蝕の程度(深さ:  $\mu\text{m}$ )、4) SEM により評価した。1)~3) の結果は t 検定 ( $\alpha=0.05$ ) で統計処理した。

〔結果〕 漂白効果について色差の結果を図 1 と図 2 に示す。1) 漂白前後のビッカース硬さは 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> で 246 $\pm$ 18 から 238 $\pm$ 17 に、市販オフィスブリーチ剤で 258 $\pm$ 18 から 245 $\pm$ 18 へと減少する傾向にあったが、有意差はなかった。2) 漂白前後の表面粗さは 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> では 0.22 $\pm$ 0.01 から 0.21 $\pm$ 0.04 へと有意な変化は無かったが、市販オフィスブリーチ剤では 0.17 $\pm$ 0.01 から 0.21 $\pm$ 0.02 へと有意に大きくなった。3) 漂白後のエナメル質表面の侵蝕深さは 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> は 0.27 $\pm$ 0.13 で、市販オフィスブリーチ剤の 0.85 $\pm$ 0.37 と比べ有意に小さかった。4) 漂白後のエナメル質表面の SEM 観察では、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> では試料調整時に生じた研磨痕が認められたが、市販オフィスブリーチ剤では、研磨痕が消失しており、これは表面の侵蝕によるものと思われた。



〔考察〕 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>をアルカリ性環境下におくと、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の分解がより促進される。このことが、本実験で H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 混和物が、市販の漂白剤と同等の漂白効果を示した理由と考えられる。また、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> 混合物の pH は 6.2 であり、市販漂白剤の pH (3.4) に比べ高い。これが、エナメル質表面への影響が少なかった理由と思われる。

〔結論〕 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> のホームブリーチ仕様と 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> のオフィスブリーチ仕様は、ともに市販漂白剤と同等の漂白効果を示した。また、30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-NaHCO<sub>3</sub> による漂白では、市販漂白剤と比べ、エナメル質表面の物性への影響が少なかった。

<sup>1)</sup> 過酸化水素水と炭酸水素ナトリウムによる歯の漂白 第一報—3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> と NaHCO<sub>3</sub> の混和物について

## ヒト前歯部における日常的な紫外線被曝量の測定

<sup>1)</sup>鶴見大学歯学部 歯科保存学第一講座

<sup>2)</sup>大阪産業大学 人間環境学部 都市環境学科

○齋藤 渉<sup>1)</sup>, 池島 巖<sup>1)</sup>, 福田和悟<sup>2)</sup>, 桃井保子<sup>1)</sup>

### Measurements of Daily UV Exposure of Human Anterior Teeth

<sup>1)</sup>Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine

<sup>2)</sup>Department of Urban Environment, Faculty of Human Environment, Osaka Sangyo University

○SAITO Wataru<sup>1)</sup>, IKEJIMA Iwao<sup>1)</sup>, FUKUDA Yasunori<sup>2)</sup>, MOMOI Yasuko<sup>1)</sup>

【緒言】 歯科用高分子材料の変色の原因のひとつに紫外線が挙げられる。ISO 4049『歯科—ポリマー系充填, 修復及び合着材料』では, キセノンランプによる紫外線を含んだ光照射を行い, 材料の色調安定性を評価している。しかし, 口腔内に置かれた歯科材料が日常で多量の紫外線に曝露しているかは疑問であり, 被曝量に関する報告もみられない。

熱蛍光 (Thermoluminescence: TL) は, X線,  $\gamma$ 線,  $\beta$ 線などによりエネルギーを与えられた蛍光体が, 熱刺激を加えられた際に生じる発光である。これを利用した線量評価方法に熱蛍光線量計 (Thermoluminescence Dosimeter: TLD) がある。これに用いられる線量素子材の中でも, 希土類元素のテルビウム (Tb) とサマリウム (Sm) を添加したカルシウム化合物である  $\text{CaF}_2:\text{Tb,Sm}$  焼結体は, とくに太陽紫外線の UV-B (280~315 nm), UV-C (200~280 nm) 領域において有効であるとの報告がある\*。本研究では, 上顎中切歯唇面の日常での紫外線被曝量を,  $\text{CaF}_2:\text{Tb,Sm}$  焼結体による TL を利用して測定した。

【材料と方法】  $\text{CaF}_2$ 粉末 (純度 99.99 %) に, 仕込み濃度 0.06 wt% の  $\text{Tb}_2\text{O}_3$  と仕込み濃度 0.03 wt% の  $\text{Sm}_2\text{O}_3$  (ともに純度 99.99 %) を添加し, 直径 5 mm, 厚さ 1 mm の円盤状に成形した後, 大気中 1373 K で 2 時間保持して, 11 個の  $\text{CaF}_2:\text{Tb,Sm}$  焼結体を TLD 試料として作製した。この試料を紫外線透過率 90 % 以上の合成石英で製作した外径 7 mm, 高さ 3 mm, 深さ 2 mm, ガラスの厚さ 1 mm の 11 個のガラスケース内にそれぞれ封入した。試料を封入したケースをキセノンランプ耐光試験機 (SUNTEST CPS+ Type X: 45, Heraeus) 内に置き, 基準光と定めた紫外線を含むキセノンランプ光を, 30 秒~6 分の間で時間を変え数回照射した。同時に, キセノンランプから照射される紫外線を紫外線強度計 (YK-35UV, Lutron) で測定し, 1 秒毎に記録した。基準光に曝露後の試料をガラスケースから取り出し, TLD Reader (TLD Reader Model 3000, Kasei Optonix, Ltd.) を用いて TL を測定した。

測定後, 673K の熱でアニール処理した試料を再び合成石英製ケース内に置き, ケースを被験者の上顎歯列に合わせ製作したマウスピースの中切歯唇面相当部に固定した。この TLD 試料付きマウスピースを 11 人の被験者の上顎歯列に装着し, ヒト上顎前歯部の紫外線被曝量の測定を同一環境下で行った。測定時間は 24 時間とし, 測定中は 11 人の被験者は集団行動をとった。測定終了後, ケースから TLD 試料を取り出し, 再び TL を計測した。

【結果および考察】 試料に対して時間を変えて基準光を照射した際の TL をそれぞれ測定したところ, その TL グローブピーク (熱蛍光強度のピーク) が両対数グラフ上で照射線量に比例したことから, 作製した試料が紫外線線量計として有用であることがわかった。また, 基準光照射時と被験時ともに 430K 付近にグローブピークを認めたことから, この TLD 素子を用いた基準光と太陽光に含まれる紫外線量の比較が可能であることがわかった。TL 強度と紫外線量の関係から求めた上顎中切歯唇面の被験時の平均被曝量は  $72.2 \text{ mJ/cm}^2$  であった (Table)。これは ISO 4049 に定められた照射光に含まれる紫外線量の 0.02 % に相当する。

Sample No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Mean
UV ray exposure ( $\text{mJ/cm}^2$ )	48.6	41.0	32.7	88.8	143.8	51.8	53.8	61.2	60.3	108.8	103.1	72.2

【結論】 本研究により, ヒト上顎前歯部が日常において紫外線に被曝していることが確認された。また,  $\text{CaF}_2:\text{Tb,Sm}$  焼結体を用いた TLD を利用することで, ヒト口腔内の紫外線量測定が可能であることが示唆された。

\*Fukuda Y: Thermoluminescence in sintered  $\text{CaF}_2:\text{Tb}$ ; J. Radiat. Res 43 (Suppl.), S67-S69, 2002.