

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

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¹, 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部
口腔微生物学分野 日本学術振興会特別研究員 PD², 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³

○細川義隆¹, 細川育子², 尾崎和美³, 中西正¹, 中江英明¹, 松尾敬志¹

The effect of theaflavin on IL-6 production in TNFSF14-stimulated human gingival fibroblasts

Department of Conservative Dentistry, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School,
Tokushima, Japan¹, Department of Oral Microbiology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima
Graduate School, JSPS Research Fellow, Tokushima, Japan², Department of Oral Health Care Promotion, Institute of Health
Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan³

○Hosokawa Yoshitaka¹, Hosokawa Ikuko², Ozaki Kazumi³, Nakanishi Tadashi¹, Nakae Hideaki¹, Matsuo Takashi¹

【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などから産生されることが明らかとなっている。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破骨細胞分化因子(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、theaflavinは紅茶に含まれるポリフェノールであり、抗酸化作用、抗癌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、theaflavin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。

【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theaflavinの主な成分であるTheaflavin-3,3'-digallate (TFDG)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)のリン酸化およびIκB-αの分解をwestern blot法にて解析を行った。また、TNFSF14誘導IL-6産生に関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。TFDG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のリン酸化ならびにIκB-αの分解も抑制された。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。

【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、TFDG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、theaflavin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。

TLR2/TLR3 共刺激が歯肉上皮細胞の免疫応答に及ぼす影響

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 (口腔治療学講座)

○森健太, 柳田学, 兒嶋由子, 梶川哲宏, 中村友美, 山下元三, 山田聡, 北村正博, 村上伸也

Effects of costimulation of TLR2/TLR3 on immune responses in human gingival epithelial cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Mori Kenta, Yanagita Manabu, Kojima Yuko, Kajikawa Tetsuhiro, Nakamura Tomomi, Yamashita Motozo,
Yamada Satoru, Kitamura Masahiro, Murakami Shinya

【目的】上皮細胞は生体の最前線に位置しており外来刺激からの物理的防御壁として機能している。さらに immuno-modulator として免疫反応に積極的に関与している事が明らかにされている。歯周病の発症進行においても歯肉上皮細胞がこの様な役割を担っていると考えられる。歯周炎は、歯周病原性細菌が主たる原因となり発症するが、近年重度歯周炎患者の歯周組織においてウイルスの存在が報告されている。歯肉上皮細胞は代表的な自然免疫の受容体である Toll-like receptors (TLRs) を介して種々のサイトカイン、ケモカインを発現する。しかしながら、歯肉上皮細胞において歯周病原細菌およびウイルスとの相互関係に関する報告はほとんどない。そこで、本研究で歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* LPS の主要な受容体である TLR2、二本鎖 RNA ウイルスの類似構造体 Poly(I:C) を認識する TLR3 に着目して歯肉上皮細胞が歯周病原細菌およびウイルスに曝露される事により、どのような炎症反応および免疫応答を惹起するか検討した。

【材料及び方法】1. ヒト歯肉上皮不死化細胞株 epi4 より、RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて TLR2, TLR3 の発現を解析した。2. epi4 を *P.g* LPS および Poly(I:C) 存在下で培養し、48 時間後の TLR2, TLR3 の発現の変化を FCM にて解析した。3. epi4 を *P.g* LPS および Poly(I:C) 存在下で培養し、RNA を抽出し、サイトカイン、ケモカイン(1,4,8 時間後)、共刺激分子(24 時間後)の発現を Real-time PCR 法にて解析した。また *P.g* LPS および Poly(I:C) を一次刺激として epi4 に反応させ、さらに 24 時間後に二次刺激を加えた際のサイトカイン、ケモカインの発現を検討した。

【結果】1. ヒト歯肉上皮不死化細胞 epi4 は TLR2, TLR3 を発現していた。Poly(I:C) 刺激により epi4 における TLR2, 3 の発現が上昇する一方、*P.g* LPS 刺激による TLR2, TLR3 の発現に変化を認めなかった。Poly(I:C), *P.g* LPS 刺激により MCP-1, IL-6, IL-8 の発現が誘導された。2. epi4 において *P.g* LPS 刺激により T 細胞活性化共刺激分子の発現が増加し、Poly(I:C) 刺激により T 細胞抑制共刺激分子の発現の増加を認めた。3. epi4 において IFN β は Poly(I:C) 刺激でのみ発現が誘導された。epi4 を一次刺激として LPS 前処理した後に二次刺激として Poly(I:C) 刺激を加えると IFN- β の発現はさらに増強した。MCP-1 も LPS 前処理後に Poly(I:C) 刺激した群で発現が増強した。IL-6, 8 はさらに、LPS と Poly(I:C) それぞれの組み合わせで刺激した epi4 において全て発現が増強された。

【考察及び結論】ヒト歯肉上皮細胞は Poly(I:C) の刺激により TLR2, TLR3 の発現を上昇させ、*P.g* LPS によって誘導される炎症性サイトカインの発現を増加し、炎症反応を増強させる可能性が示唆された。また、*P.g* LPS は TLR2, TLR3 の発現には関与を認めないものの、LPS 刺激により活性化される細胞内シグナル間の cross-talk により、Poly(I:C) によって誘導される炎症性サイトカイン、ケモカインの発現を増強している可能性が示唆された。さらに、Poly(I:C) の刺激によりヒト歯肉上皮細胞における T 細胞抑制共刺激分子の発現が増加するため *P.g* をはじめとする歯周病原細菌の排除を困難にしている可能性も示唆された。

歯根膜細胞の分化過程における BMP と Wnt シグナルへの Rho kinases の影響

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態学分野¹,
岡山大学病院 歯周科²

○鶴川祐樹¹, 山本直史², 山城圭介¹, 下江正幸², 富川和哉¹, 本郷昌一¹, 前田博史¹, 高柴正悟¹

Effects of Rho kinases on BMP and Wnt Signaling in Human Periodontal Ligament Cells during Osteogenic Differentiation

Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry,
Okayama, Japan¹, Department of Periodontics & Endodontics, Okayama University Hospital, Okayama, Japan²

○Ugawa Yuki¹, Yamamoto Tadashi², Yamashiro Keisuke¹, Shimoe Masayuki², Tomikawa Kazuya¹, Hongo Shoichi¹,
Maeda Hiroshi¹, Takashiba Shogo¹

【緒言】 歯根膜細胞は、未分化な間葉系幹細胞を含むヘテロな細胞集団であり、歯周組織の創傷治癒や再生に必須の細胞である。歯根膜細胞の増殖と分化は、種々の成長因子によるシグナルに加えて、細胞骨格の性状によっても制御を受けると考えられている。近年、我々は細胞骨格制御分子である Rho kinases (ROCK) の抑制が歯根膜細胞のオステオカルシン産生を減少し、硬組織分化を抑制することを明らかにした。しかし、細胞骨格による分化制御機構は未だ不明な点が多く、関与するシグナル分子も明らかではない。Bone morphogenetic protein (BMP) と Wnt は硬組織の発生および形成に必須のシグナル分子であり、これらシグナルの相互作用は、未分化細胞の分化制御に重要な役割を果たすと考えられている。そこで本研究では、ROCK による歯根膜細胞の分化制御機構を調べることを目的に、ROCK 阻害剤による BMP および Wnt シグナル関連分子の経時的な遺伝子発現変化を検討した。

【材料および方法】

1. **歯根膜細胞の分離と培養:** 健康な歯周組織を有するドナーの智歯を抜去し、その歯根膜組織を採取した^{*}。歯根膜細胞は Seoらの方法 (Lancet 2004) にしたがって、3 mg/mL collagenase type I および 4 mg/mL dispase で分離した single-cell suspension (total で 1×10^4 細胞を 10 mL の培地に懸濁) を 10 cm 培養皿に播種し、ウシ胎児血清を 20% の割合に含む α -MEM (Invitrogen) を用いて、37 °C, 5% CO₂ 存在下で 2 週間培養した。
2. **硬組織形成細胞への分化誘導:** 上記の single-cell suspension が形成したコロニーを継代して得た歯根膜細胞がコンフルエントになった後、50 μ M ascorbic acid-2-phosphate, 100 nM dexamethasone, および 10 mM β -glycerophosphate を添加し、それらを 12 日間培養した。なお、24 時間ごとに ROCK 特異的阻害剤 (10 μ M Y-27632; Nacalai Tesque) を添加した。
3. **BMP および Wnt シグナル関連遺伝子発現の検討:** RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、上記の条件で培養した細胞を経時的 (硬組織分化誘導後 3, 6, 9, および 12 日) に回収し、全 RNA を抽出した。硬組織分化に関連するシグナル分子である BMP-2, BMP-4, Wnt3a, および Wnt5a の遺伝子発現量を、また硬組織分化マーカーとして alkaline phosphatase (ALP), Runx2, および Osterix の遺伝子発現量を、リアルタイム RT-PCR 法にて蓄積された mRNA 量として定量的に調べた。

【結果】

1. 歯根膜細胞の硬組織分化に伴って、BMP-2 発現は増加したが、BMP-4 発現は 3 日目をピークに減少した。また、BMP-4 発現は 3 日目において ROCK 阻害剤によって抑制された。
2. Wnt3a 発現は 9 日目に増加し、Wnt5a 発現は 3 日目をピークに減少した。また、Wnt5a 発現は 3 日目において ROCK 阻害剤によって抑制された。
3. ALP 発現は、9 日目に増加し、その発現は ROCK 阻害剤によって抑制された。
4. Runx2 および Osterix 発現は 3 日目以降に減少した。また、それぞれの発現は ROCK 阻害剤によって有意には抑制されなかった。

【考察および結論】 BMP と Wnt のシグナリング間の協調は、未分化細胞の細胞系列の決定に重要な役割を担っている。本研究では、ROCK 阻害剤によって BMP-4, Wnt5a, および ALP の発現が抑制されたことから、これら遺伝子発現のメカニズムに細胞骨格の性状変化が影響を及ぼすことが明らかになった。Wnt3a は硬組織分化を抑制する一方で、Wnt5a は分化を促進するという相反作用の報告があることから、これら遺伝子発現の時間的な調節が、歯根膜細胞の分化に重要な役割を果たしていると考えられる。また、初期の分化マーカーである Runx2 と Osterix の発現に対して ROCK の影響が少なかったことから、細胞骨格の性状変化は歯根膜細胞の分化と成熟の過程を制御する機構に影響を及ぼす可能性がある。

※) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会承認番号 975

根面齲蝕関連菌 *Actinomyces* の酸産生活性とそれに及ぼす環境 pH、重炭酸、フッ化物の影響

東北大学大学院歯学研究科 歯内歯周治療学分野¹, 東北大学大学院歯学研究科 口腔生化学分野²

○川嶋順子¹, 中條和子², 鷲尾純平², 島内英俊¹, 高橋信博²

The acid production of root surface caries-related *Actinomyces* and its interaction with pH, bicarbonate and fluoride

Division of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan¹, Division of Oral Ecology and Biochemistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan²

○Kawashima Junko¹, Nakajo Kazuko², Washio Junpei², Shimauchi Hidetoshi¹, Takahashi Nobuhiro²

【目的】 *Actinomyces* は主要な口腔内細菌の一つであり、健全なデンタルプラークバイオフィルムからは *Streptococcus* と同程度、あるいはそれに次いで高比率で検出される¹⁾。一方、根面齲蝕病巣細菌叢の約 14 %²⁾、歯周炎病巣細菌叢の約 20 %³⁾を占めるなど、同菌と各種口腔疾患との関連が示されている。また、現在の日本では、65 歳以上の高齢者が全人口の約 23%を占め(2011 年現在)、さらに 60 歳以上の高齢者の約 50%が根面齲蝕を有すること⁴⁾から、根面齲蝕は今後ますます増加することが危惧される。そこで、根面齲蝕関連菌である *Actinomyces* の糖代謝による酸産生活性に着目した。これまでに、重炭酸(HCO₃⁻:唾液含有物質)は *Actinomyces* の増殖⁵⁾と酸産生⁶⁾を促進すること、フッ化物(F:齲蝕予防剤)は *Streptococcus* に加え *Actinomyces* の酸産生を阻害し、酸性環境でより効果が高いこと⁷⁾が知られているが、これら 2 つの環境因子が共存した場合の酸産生の様相や阻害メカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では、重炭酸、フッ化物に加え、環境 pH も考慮し、これら 3 つが *Actinomyces* の酸産生活性に与える相互影響について検討を行った。

【方法】 *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 (*An*)、*Actinomyces oris* WVU 627 (*Ao*)を高度嫌気条件(N₂: 80%, H₂: 10%, CO₂: 10%)で培養し、2 mMリン酸緩衝溶液を用いて集菌・洗菌後、同溶液で菌懸濁液(OD at 660 nm = 3.5)を調整した。調整した菌懸濁液に 10 mM グルコース添加後、20 分間の酸産生量を高度嫌気条件下(N₂: 90%, H₂: 10%)にて pH-stat を用いて測定した。その際、1) pH 7.0 または pH 5.5、2) フッ化物(KF:F= 4.5, 9, 15, 22.5, 45, 90, 225, 450 ppm)の有無、3) 重炭酸ナトリウム(NaHCO₃ = 4 mM)の有無の影響を検討した。

【結果】 *An* の酸産生量は、重炭酸がない場合(重炭酸(-))に比べて重炭酸がある場合(重炭酸(+))の方が、pH 7.0(F=0 ppm)で 1.14 倍、pH 5.5(F=0 ppm)で 1.15 倍高いことが示された。また、pH 7.0 で 225 ppm F が存在すると、酸産生量は、重炭酸(-)で 70±4%、重炭酸(+)で 43±9% 減少し、重炭酸(-)の方が F による酸産生抑制が強かった。pH 5.5 では、わずか 15 ppm F が存在すると、酸産生量は重炭酸(-)で 60±21%、重炭酸(+)で 27±12%減少した。pH 5.5 においても重炭酸の存在の有無が F による酸産生の抑制に示す影響は同様であるが、pH 7.0 に比べて 1/20 ~1/10 程度の低濃度 F により同等の酸産生抑制効果を示した。*Ao* においても *An* と同様の傾向が見られた。

【考察】 今回の研究により、*Actinomyces* の酸産生は F で抑制されるが、重炭酸が存在すると *Actinomyces* の酸産生は F に対して抑制されにくくなることが明らかになった。さらに、発表者らが既に報告している *Streptococcus mutans* (*Sm*)の結果⁸⁾と比較すると、*Actinomyces* の酸産生は、重炭酸がない場合でも、*Sm* よりも pH 7.0 で 2.4 倍、pH 5.5 で 1.5 倍の F 濃度まで抑制されないこと、重炭酸が存在すると、pH 7.0 で 7.2 倍、pH 5.5 では 2.4 倍の F 濃度まで抑制されないことがわかった。*Actinomyces* は重炭酸を固定する代謝酵素(phosphoenolpyruvate carboxykinase、phosphoenolpyruvate carboxylase)をもち、クエン酸回路の一部を利用するなど、解糖系を主体とする *Sm* などの口腔細菌とは異なる糖代謝系を持つこと⁹⁾から、これまでに明らかとなっている *Sm* のものとは異なる、同菌属に特有の F による酸産生阻害機構やその回避・減弱機構の存在が示唆される。

【参考文献】

1. Marsh and Martin (1999). Oral Microbiology. 4th edn. Elsevier Health Sciences
2. van Houte *et al*, J Dent Res 69: 1463, 1990
3. Moore and Moore, Periodontol 2000 5: 66, 1994
4. Imazato *et al*, J Oral Rehabil 33: 137, 2006
5. Schofield and Schaal, J Gen Microbiol 127: 237, 1981
6. Takahashi *et al*, Oral Microbiol Immunol 7: 165, 1992
7. Hamilton and Ellwood, Infect Immun 42: 19, 1983
8. Maehara *et al*, Caries Res 39: 521, 2005
9. Takahashi and Yamada Crit Rev Oral Biol Med 10: 487, 1999

歯周病原細菌の検出と歯周病罹患状況の横断的研究

つくばヘルスケア歯科クリニック¹, 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野², 歯学部附属口腔保健教育研究センター³, ハーバード大学医学部 ジョスリン糖尿病センター⁴, グローバル COE プログラム⁵, 東京女子医科大学先端生命医学研究所⁶

○千ヶ崎乙文¹, 梅田誠², 青木章², 竹内康雄², 佐々木好幸³, 水谷幸嗣⁴, 青山典生², 池田裕一², 鈴木允文², 鈴木允文⁵, 石川烈⁶, 和泉雄一², 和泉雄一⁵

Detection of periodontal pathogenic bacteria and evaluation of periodontal condition: A cross-sectional study

Tsukuba Health-Care Dental Clinic, Tsukuba, Japan¹, Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Graduate School², Center for education and Research in Oral Health Care, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University³, Research Division, Joslin Diabetes Center, Harvard Medical School⁴, Global Center of Excellence Program, Tokyo Medical and Dental University⁵, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Woman's Medical University⁶

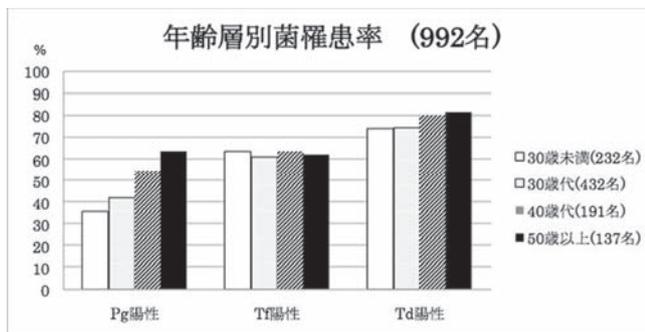
○Chigasaki Otofumi¹, Umeda Makoto², Aoki Akira², Takeuchi Yasuo², Sasaki Yoshiyuki³, Mizutani Kouji⁴, Aoyama Norio², Ikeda Yuuichi², Suzuki Takafumi², Suzuki Takafumi⁵, Ishikawa Isao⁶, Izumi Yuuichi², Izumi Yuuichi⁵

【緒言】*Porphyromonas gingivalis* (Pg)、*Tannerella forsythia* (Tf)、*Treponema denticola* (Td)の3菌種は red complex と呼ばれる歯周病原細菌であり、歯周組織破壊が特に進行した部位から高頻度に検出される。歯周病原細菌検査は、適切な予防処置や治療を行う上で歯周病のリスク診断の一助となると考えられる。歯周病原細菌と歯周病の臨床症状との関係については、これまでも多くの疫学的な報告がされている。しかしながら小規模の研究がほとんどで、日本人について多数の患者を対象に詳細な検討が行われたことは殆どない。そこで、本研究は一般歯科医院に来院した患者において、唾液中の歯周病原細菌の検出率および歯周病の罹患状況について分析を行うことを目的とした。

【対象および方法】1. 平成15年3月から平成18年3月までに、つくばヘルスケア歯科クリニック(茨城県つくば市)に来院し、唾液による細菌検査に同意の得られた患者のうち、6か月以内に歯周治療を受けておらず、3か月以内の抗菌薬服用がない者を調査対象とした。2. サンプルとして初診時に刺激唾液を採取し、細菌DNAを抽出後、Real-time PCR法によりPg、Tf、Tdの3菌種の検出を行った。同時に6点法による歯周組織検査によりプロービングポケット深さ(PPD)、プロービング時の出血の有無(BOP)を記録した。また、デンタルX線写真撮影(14枚法)を行い、X線写真上で全ての歯において近遠心側の歯槽骨頂の位置を計測した。また、過去および現在の喫煙習慣を調べた。

【成績】1. 本研究において、全ての検査が行われた被験者は992名(男性329名、女性663名)で、平均年齢は38.0±10.2歳(18-73歳)であった。このうち、161名は現在喫煙者であった。2. 年齢層が上がるごとに、4mm以上のPPDやBOPが認められる部位の割合が増加しており、骨吸収もより進行していた。また、喫煙者ではより若い年齢層からこれらの傾向が認められた。3. PgはTdやTfとは大きく異なり、年齢層の増加とともに検出率が明らかに増加した(図)。喫煙者においてPgは30歳以下の若い年齢層から非喫煙者より高い検出率を示した。

【考察および結論】年齢層が高い群ほどPPD、BOP陽性率、および骨吸収度が増加しており、年齢が歯周病と関連があることが確認され、Pgの検出率が年齢と相関していた。また、本研究でも喫煙者は非喫煙者と比べより高い臨床パラメータ値が示された。同時にPgの検出率も高く、これらの傾向は若年層であっても明らかであった。これらのことから、Pgは歯周病の臨床症状と強い関連があり、本菌を対象としたスクリーニングやモニタリングが歯周病の予防処置や治療を行う上で有用なマーカーとなる可能性が示唆された。



新規機能性食品の口腔衛生およびブレスケアへの臨床応用

東京医科歯科大学 大学院 歯医学総合研究科 生体硬組織再生学講座 歯周病学分野

○渡辺久, 萩原さつき, 和泉雄一

Clinical application of a novel functional food for oral hygiene and breath care

Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo
Medical and Dental University, Tokyo, Japan

○Watanabe Hisashi, Hagiwara Satsuki, Izumi Yuichi

【目的】歯周病は歯周病原細菌を中心とするバイオフィルムにより歯を支える歯肉や歯槽骨等が破壊され、歯を失う原因になる病気である。この病気に対してカテキンの効用が注目されている。カテキンは抗菌作用や抗酸化作用を有しており、緑茶にはそのカテキンの含有量が多いことで知られている。今回、ペにふうきTM 緑茶葉を超微粒子粉末にし、それを含有した新規機能性食品を作製した。この食品は最初タブレットの形状であるが、咀嚼することによりガム状に変化し、ペにふうきTM の成分が徐放性に溶出される。本研究は超微粒子緑茶粉末を含有した機能性食品を口腔内で使用した時の臨床的・細菌学的効果について検討することを目的とした。なお、本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理委員会ならびに利益相反委員会の承認を受けて行われた。

【方法】32名の慢性歯周炎患者に超微粒子粉末茶葉を含有した機能性食品を1日3回、一回当たり3分間、4週間噛んでもらい、開始時、2週および4週後に、臨床パラメーターによる歯周組織検査と開始時と4週後に *Porphyromonas gingivalis* の菌数変化と口臭変化を検討した。*P. gingivalis* の検出には本菌に対する16S rRNA 遺伝子領域に特異的なプライマーおよびTaqManプローブを設定して、Abiprism 7700によるreal time PCR 定量を実施した。口臭変化の定量には口腔内の揮発性硫黄化合物 (VSC) の濃度を測定する口臭測定器ブレストロン[®] (ヨシダ, 東京)を用いた。統計処理はSigned Rank sum test および対応のあるt検定により解析し評価した。

【成績】その結果、4週間の機能食品の使用により、歯肉の炎症状態を示す「腫脹」、「発赤」、「出血」、「プラーク付着量」の各項目は改善が認められた。しかしながら、「排膿」、「動揺」、「ポケット深さ」には変化は認められなかった。一方、細菌検査では総菌数および歯周病の原因である *P. gingivalis* の菌数には変化は見られなかったが、総菌数に対する *P. gingivalis* の比率では、介入後に有意に減少した ($p < 0.05$)。また、本機能性食品の使用により明らかな口臭抑制効果が認められた ($p < 0.05$)。

【結論】本研究により、ペにふうきTM 緑茶葉超微粒子粉末含有新規機能性食品の口腔内使用の有効性が示唆された。

ニコチンがヒト歯肉線維芽細胞に及ぼす影響

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

○山本健太¹, 山本俊郎¹, 市岡宏顕¹, 赤松佑紀¹, 大迫文重¹, 中西哲¹, 喜多正和², 金村成智¹

The effects of nicotine on cytokine production in human gingival fibroblasts

Department of Dental Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science¹,

Department of Microbiology, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science²

○Yamamoto Kenta¹, Yamamoto Toshiro¹, Ichioka Hiroaki¹, Akamatsu Yuki¹, Oseko Fumishige¹, Nakanishi Akira¹,

Kita Masakazu², Kanamura Narisato¹

【目的】喫煙は、歯周病の重大なリスクファクターであり、歯周病に罹患した患者において喫煙者では非喫煙者と比較して、歯槽骨吸収が著しいことや歯周治療の効果が乏しいことが特徴としてあげられる。ニコチンはタバコ煙に含まれる最も代表的な化学物質であり、*P. gingivalis* は代表的な歯周病原菌である。そこで本研究では、ヒト正常歯肉線維芽細胞株である Gin-1 を用いて、歯肉線維芽細胞のニコチンならびにニコチンと *P. gingivalis* LPS 複合刺激に対する炎症性サイトカインと OPG の遺伝子発現とタンパク産生、さらに MAPK 阻害剤を用いた産生応答のシグナル伝達経路について検討を行った。

【方法】Gin-1 を 10%FBS/DMEM で満たしたプレートに播種し、コンフルエントに達した後、任意の濃度でニコチン刺激 (1, 10, 100 μ g/ml, 1mg/ml) またはニコチンと *P. gingivalis* LPS の複合刺激を行った。その後、Gin-1 のサイトカイン発現および産生、形態的变化、細胞活性についての評価を行った。また MAPK 阻害剤を用いて、ニコチン刺激におけるサイトカイン産生のシグナリングの検討も併せて行った。

【成績】高濃度のニコチン刺激 (1mg/ml) では、Gin-1 に対し細胞毒性を示した。中濃度のニコチン刺激 (10, 100 μ g/ml) では、細胞毒性は示さないものの、Real time RT-PCR にて濃度および時間依存的に IL-6, IL-8, TNF- α の発現増加と OPG の発現抑制を示し、ELISA にて IL-6 および IL-8 の産生増加および OPG の産生抑制を示した。しかしながら、低濃度のニコチン刺激 (1 μ g/ml) では、特に影響を認めなかった。またニコチンと *P. gingivalis* LPS 複合刺激では IL-6 産生増加を認めた。なお、ニコチン刺激によって増大した IL-6 および IL-8 の産生は p-38, ERK 阻害剤の添加によって一部抑制された。

【結論】以上より、喫煙が歯周病を増悪させる要因の一つとして、歯周病原菌による歯周組織局所の炎症が、喫煙によってさらに増悪される可能性が考えられた。また歯周疾患に罹患した喫煙者での歯周組織の治癒機転の低下および歯槽骨吸収には、タバコの主成分であるニコチンが歯肉線維芽細胞に作用し細胞障害を示すことや、p-38 および ERK 経路を通じて骨吸収促進作用のある炎症性サイトカインの増加ならびに骨吸収抑制物質である OPG を抑制することが関与している可能性が示唆された。

***Porphyromonas gingivalis* バイオフィルムに対する各種抗菌薬の抗バイオフィルム効果**

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)

○前歯葉月, 野杵由一郎, 朝日陽子, 山口幹代, 山本れいこ, 藪根敏晃, 恵比須繁之

The anti-biofilm effects of antibiotics on *Porphyromonas gingivalis*

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

○Maezono Hazuki, Noiri Yuichiro, Asahi Yoko, Yamaguchi Mikiyo, Yamamoto Reiko, Yabune Toshiaki, Ebisu Shigeyuki

【目的】

グラム陰性嫌気性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* はヒトの歯周ポケット全域に分布するほか¹⁾、根尖性歯周炎においても難治化した感染巣である根尖孔外バイオフィルムから高頻度に検出され²⁾、辺縁性および根尖性歯周炎の主要病原性細菌として注目を集めている。一般的にバイオフィルムは抗菌薬に抵抗性を示すが、マクロライド系抗菌薬であるアジスロマイシンおよびエリスロマイシンは、96 穴プレートを用いて作製した初期バイオフィルムモデルに対し、最小発育阻止濃度(MIC)以下の濃度(sub-MIC)でバイオフィルムを有意に抑制する($P < 0.01$)³⁾。本研究では、アジスロマイシン、エリスロマイシンを含む各種抗菌薬が、種々の *P. gingivalis* 菌株の成熟バイオフィルムに及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

供試菌株として *P. gingivalis* 381 株、HW24D1 株、6/26 株、ならびに W83 株を用い、抗菌薬はアジスロマイシン (AZM)、エリスロマイシン (EM)、ゲンタマイシン (GM) を使用した。*P. gingivalis* 381 株ではアンピシリン (ABPC)、オフロキサシン (OFX) に対する影響についても検討を行った。各種 *P. gingivalis* 菌株に対する上記抗菌薬の MIC を連続希釈法により測定した。次に modified Robbins device (MRD) を用い、各種 *P. gingivalis* 菌液を 14 日間灌流し、バイオフィルムを作製した後、各種抗菌薬 (0、0.125、1 および 10 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、さらに 3 日間灌流した。バイオフィルム細菌の定量は、ATP 測定により行い、各種抗菌薬の持つ抗バイオフィルム効果についての検討を行った。

【結果】

AZM、EM、GM に対する MIC 測定の結果は各々 *P. gingivalis* 381 株で 0.5、0.5、2000 $\mu\text{g/ml}$ であった。HW24D1 株では各々 0.3、0.16、320 $\mu\text{g/ml}$ であり、6/26 株では 5、1.25、10 $\mu\text{g/ml}$ であった。W83 株では各々 0.6、0.16、640 $\mu\text{g/ml}$ となった。*P. gingivalis* 381 株、HW24D1 株、6/26 株、ならびに W83 株のバイオフィルムは、AZM 添加時に MIC 以下の濃度で抗菌薬非添加のコントロール群と比べ有意に ATP 量が減少した (Student's *t*-test, $p < 0.005$)。EM 添加群では 381 株、W83 株においてのみ MIC 以上の濃度で *P. gingivalis* の ATP 量が有意に減少したが、その他の株では減少を認めなかった。GM は供試したいずれの菌株においても *P. gingivalis* に対する抗バイオフィルム効果を示さなかった。また、*P. gingivalis* 381 株では ABPC、OFX についても検討を行ったが、EM 同様 MIC 以上の濃度でのみ *P. gingivalis* に対する抗バイオフィルム効果を示した。

【考察および結論】

供試した *P. gingivalis* 各菌株の成熟バイオフィルムに対し、AZM のみが sub-MIC において抗バイオフィルム効果を示した。EM については、96 穴プレートを用いた初期バイオフィルムモデルでは sub-MIC でバイオフィルムの抑制が認められたが、成熟バイオフィルムについての効果を検討した本研究においては sub-MIC では抑制効果を認めなかった。この原因としては、バイオフィルムの厚みや密度といった 3 次元的構造の違いにより、96 穴プレートを使用した初期バイオフィルムモデルと MRD を用いて作製したバイオフィルムに対する抗菌薬の抑制効果に差が生じたのではないかと推察される。

【参考文献】

1. Noiri Y, Li L, Ebisu S: *J Dent Res* 80: 1930-1934, 2001.
2. Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S: *Appl Environ Microbiol* 71: 8738-8743, 2005.
3. 前歯葉月、野杵由一郎ほか 日本歯科保存学会第 130 回学術大会、2009

新規直接覆髄剤としての大豆イソフラボンの可能性について

北海道医療大学 歯学部 口腔機能修復・再建学系 う蝕制御治療学分野

○林敬次郎, 半田慶介, 小池俊之, POLANMOHAMMAD ALI AKBOR, 斉藤隆史

A study on reparative dentin formation by soy isoflavone in rats

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences
University of Hokkaido, Hokkaido, Japan

○Hayashi Keijiro, Handa Kesuke, Koike Toshiyuki, Polan Mohammad Ali Akbor, Saito Takashi

【目的】 直接覆髄においては、従来から水酸化カルシウム製剤が使用されてきた。しかし、水酸化カルシウムは高アルカリ(pH12)であるため歯髄為害性が懸念されている。また、形成された修復象牙質は多孔質でありトンネル状の欠損や裂隙などが存在し、必ずしも磐石な硬組織形成を期待できるとは言えない。そのため、良質な修復象牙質をより効果的に誘導する安全性の高い覆髄剤の開発が望まれている。大豆イソフラボンは、フラボノイドに分類され、食品添加物やサプリメントとして摂取される健康食品であり、様々な生理活性効果が期待されている。また、エストロゲン様作用を有し、特に骨組織で優位に発現するエストロゲンレセプターβ(ERβ)との高親和性から、骨粗鬆症の予防や改善に有効であるとされている。そこで本研究では、大豆イソフラボンのひとつである genistein を用いて、*in vitro* 実験系でラット歯髄細胞に対する増殖・分化誘導能を検討した。さらに、*in vivo* 実験系でラット露髄面での修復象牙質形成能を検討し、水酸化カルシウム製剤との比較・検討を行った。

【材料及び方法】 12週齢 Wistar 系雌性ラットの両側下顎中切歯から歯髄組織を採取し、collagenase A (Roche)を用いて段階的に酵素消化し、ラット歯髄細胞(Rat Dental Pulp Cells, 以下, RDP)を得た。RDPは10% FBS (Invitrogen)を含むDMEM (Sigma)で37°C、5%CO₂存在下にて培養し、以下の実験に供した。

1. *in vitro* における細胞増殖能および分化誘導能の検討

各種濃度の genistein(Wako)をRDPに添加し、Alamar Blue(Biosource)を用いて細胞増殖に関する測定を行った。また、ALPase 染色を行った。さらに total RNA を抽出し、RT-PCR 法によって象牙質形成関連遺伝子群(type I collagen, Bone sialoprotein, Osteocalcin, Osteopontin)の発現および ERβ 発現の検討を行った。

2. *in vivo* における修復象牙質形成の観察

熱架橋処理したクラビオ®AG クラレメディカル:以下 AG)を1×1×1 mmの大きさに成形し、各種濃度の genistein を含浸させて複合体を作製した。全身麻酔を施した8週齢 Wistar 系雌性ラットの上顎第一臼歯近心咬頭に人工露髄面を形成し、genistein 0.1 μM 添加群(以下 G0.1)、genistein 10 μM 添加群(以下 G10)、AGのみ、および水酸化カルシウム製剤(MultiCal, Pulpdent:以下 Ca)を覆髄材料として直接覆髄を施した。術後4週目に実験歯を顎骨ごと摘出し、10%中性ホルマリン緩衝液にて固定、Plank-Rychlo 法により脱灰後、通法に従ってH-E染色を行い、光学顕微鏡にて組織学的観察を行い、修復象牙質形成程度および歯髄の炎症程度を比較・検討した。

【結果および考察】 1. 各種濃度の genistein 添加(0.1 μM, 1 μM, 10 μM, 100 μM)により、100 μM 添加群では細胞増殖が優位に抑制されたが、他の濃度では細胞増殖に変化は観察されなかった。genistein 添加後17日目におけるALPase活性は、1 μM 群および10 μM 群で観察されたが、他の濃度では観察されなかった。また、象牙質形成関連遺伝子群および ERβ の遺伝子発現が1 μM 添加群で上昇していた。よって、genistein を添加することで、RDPに含まれる未分化間葉細胞に発現するERβを増強し、象牙芽細胞へと分化誘導させる可能性が示唆された。

2. AG 群では修復象牙質がほとんど観察されなかったが、G0.1 群では、厚みのある修復象牙質形成が認められ、露髄面を完全に覆っていた。歯髄には軽度の歯髄充血が認められたが、Ca 群と比較して軽微の炎症反応であった。G10 群では、強い炎症反応と若干の修復象牙質形成が観察されたが、露髄面を完全に覆うものではなかった。Ca 群では、これまでの報告と同様に、歯髄には強い炎症反応が観察され、修復象牙質内部は多孔性であった。これは水酸化カルシウム製剤の高 pH による歯髄傷害が長期にわたり継続したと考えられる。これに対して、genistein 添加群では、歯髄傷害が軽微で、さらに低濃度で効果的に修復象牙質形成が誘導され、短期間で露髄面の完全封鎖が認められた。

【まとめ】 *in vitro* において、genistein によりRDPは象牙芽細胞へと分化誘導され、将来的に石灰化するものと考えられる。また、*in vivo* ラット直接覆髄実験の結果から、genistein は有用な直接覆髄材となりうる可能性が示唆された。

歯の他家移植後の歯髄・歯周組織治癒過程と組織幹細胞の動態

神奈川県大学 口腔治療学講座 歯内療法学分野¹, 新潟大学大学院医学総合研究科 顎顔面再建学講座
硬組織形態学分野²,

○武藤徳子¹, 石井信之¹, 大島勇人²

Pulpal and periodontal healing process and dynamics of adult stem cells following allogeneic tooth transplantation

Division of Endodontics, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College, Kanagawa, Japan¹, Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan²

○Mutoh Noriko¹, Ishii Nobuyuki¹, Ohshima Hayato²

【目的】 自家歯牙移植は喪失歯に対する一般的な治療方法であるが、移植できるドナーの歯に制限がある。一方、他家歯牙移植は免疫拒絶反応など多くの問題があるが、臨床応用が実現すると移植の適応範囲が広がる。我々が確立したマウス臼歯他家移植後の歯髄では、少なくとも象牙質形成と骨組織形成の二つの治癒パターンが起こるが、両者の治癒パターンを規定するメカニズムは不明である。最近我々は、胎生期にプロモドオキシウリジン(BrdU)を投与し非対称分裂する歯髄組織幹細胞と一時的増幅細胞をラベルする胎生期 BrdU ラベリング法を確立した。今回はこの胎生期 BrdU ラベリング法を歯の他家移植に応用し、歯の移植後の歯髄治癒過程における label-retaining cells (LRCs) の動態を観察すると共に、GFP マウスを用いて移植後の治癒過程におけるドナーとホストの関わりを検索した。

【方法】妊娠 ICR マウスに3日間 (E15~E17) BrdU を腹腔内投与し、生後2週齢のラベル、非ラベルマウス間で上顎第1臼歯を麻酔下で抜去後、互いに他家移植を行った。術後3日~8週に4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、EDTA 脱灰後、パラフィン切片を作製し、抗ネスチン、抗オステオポンチン(OPN)、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色、*Opn*、ペリオスチン *in situ* ハイブリダイゼーションを施し顕微鏡で観察した。さらに、GFP マウスと野生型マウス間で他家移植を行い、同様な方法で術後2週後の切片を作製し、蛍光顕微鏡にて観察した。

【成績】移植後の歯髄腔には、免疫拒絶反応群、象牙質形成群および象牙質+骨組織混在群の3通りの治癒パターンが観察された。移植後3日では歯根部歯髄組織に血行の回復が見られ、5日後ではその範囲が咬頭頂部位の歯髄組織にまで及んでいた。7日後では、歯冠および歯根歯髄でネスチン陽性の象牙芽細胞様細胞分化が認められ、歯髄中央部及び歯周組織に核が強くラベルされる LRCs が維持されており、LRCs は象牙芽細胞様細胞にコミットされていた。また、象牙芽細胞分化に先立ち、歯髄内では *Opn* およびペリオスチンの発現が観察された。2週間後には、象牙質形成部位には歯髄中央部に LRCs が観察され、骨組織形成部位には LRCs は観察されなかった。一方、GFP マウスを用いた移植実験では、ドナー細胞は移植歯の内皮細胞と一部の遊走細胞を除く歯髄細胞を構成しており、歯周組織はマラッセ上皮遺残を除きホスト細胞に置き換わっていた。

【結論】歯の移植後に、象牙質形成群では歯髄幹細胞と思われる多数の LRCs が歯髄中心部血管周囲に維持されていた。•LRCs は象牙芽細胞に分化する能力のある歯髄幹細胞であると考えられた。•LRCs が歯髄内に維持されないと、歯髄組織が骨組織に置換された。•歯髄内での *Opn* 発現の亢進が象牙芽細胞分化に先立ち起こることが明らかとなった。•歯髄治癒過程で、血管内皮細胞を含むホスト細胞が歯髄内に侵入する一方、歯周組織はマラッセ上皮遺残を除きホスト組織に置き換わっていた。•歯の損傷後に LRCs が歯髄内で維持される調節メカニズムを解明することが必要である。

培養ヒト歯根膜由来上皮細胞および線維芽細胞間相互作用による Amelogenin H72、Ameloblastin および
KLK4 の誘導

東北大学病院 総合歯科診療部¹, 東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座歯科保存学分野²

○渡邊弘淳¹, 下西充¹, 高橋健¹, 齋藤修¹, 小松正志²

**Interactions between epithelial cells and fibroblasts from human periodontal ligament induce amelogenin H72,
ameloblastin and KLK4**

Division of Comprehensive Dentistry, Tohoku University Hospital, Sendai, Japan¹, Division of Operative Dentistry, Tohoku
University Graduate School of Dentistry²

○Watanabe Hiroatsu¹, Shimonishi Mitsuru¹, Takahashi Ken¹, Saito Shu¹, Komatsu Masashi²

(研究目的) 歯の萌出後、断裂して残った上皮細胞の集団であるマラッセの上皮遺残は上皮-間葉間相互作用によって歯根膜の恒常性維持に関与している可能性がある。エナメルマトリックスプロテインの Amelogenin、Ameloblastin およびエナメルマトリックスプロテアーゼの MMP-20、Kallikrein-4 (KLK4)はエナメル質形成に大きく関与するが、セメント質形成後の関与に関しては未だ不明である。本研究では、マラッセの上皮遺残由来上皮細胞と歯根膜由来線維芽細胞を同一シャーレ内で共培養し、その細胞間相互作用による Amelogenin、Ameloblastin、MMP-20 および KLK4 の発現に関する検討を行った。

(材料および方法) 東北大学病院口腔外科外来で抜歯した第三大臼歯より歯根膜組織を採取し、無血清混合培地により同一組織片より上皮細胞および線維芽細胞を培養し、境界部の確認をした後、サンプルとして実験に用いた。細胞は、10分間 4%Paraformaldehyde で固定後、通法に従い In situ hybridization 法にて Amelogenin exon6、Ameloblastin、MMP-20 および KLK4 の mRNA の発現を解析した。また、上皮細胞と線維芽細胞の境界部のサンプルを取り出すために、ワセリンを底部にぬった直径5mm のシリコンリングを境界部に挿入抽出し、Amelogenin、Ameloblastin、MMP-20 および KLK4 の mRNA の発現を半定量的 RT-PCR 法を用いて調べた。コントロールとして、上皮細胞のみを培養したものをを用いた。

(結果) In situ hybridization 法では、共培養の上皮細胞に Ameloblastin および KLK4 の mRNA の発現が強くみられた。また、Amelogenin exon6 の mRNA の発現も観察された。一方、MMP-20 の mRNA は発現がみられなかった。RT-PCR 法では、共培養したサンプルに Amelogenin H58 (LRAP)および H72 (LRAP+exon 4)の mRNA が発現したが、コントロールでは Amelogenin H58 のみ観察され、Amelogenin H58 の発現に有意差はみられなかった。また、共培養したサンプルに Ameloblastin および KLK4 の mRNA の有意な発現がみられた。一方、MMP-20 の mRNA の発現はいずれも観察されなかった。

(考察) 上皮細胞-線維芽細胞間相互作用による発現した Amelogenin H72 および Ameloblastin、KLK4、さらに、MMP-20 の発現が観察されないことは、歯の萌出後、マラッセの上皮遺残がセメント質形成の調整に関与している可能性を示唆するものと考えられる。

光干渉断層画像診断法(OCT)の歯周組織診断への応用—歯石の検出

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¹, ハーバード大学医学部 ジョスリン糖尿病センター², 国立長寿医療研究センター病院先端診療部歯科口腔外科³, 東京医科歯科大学グローバルCOEプログラム歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点⁴

○坪川正樹¹, 青木章¹, 佐藤郁文¹, 谷口陽一¹, 江尻健一郎¹, 澤辺正規¹, 水谷幸嗣², 秋月達也¹, 小田茂¹, 角保徳³, 和泉雄一¹

Application of Optical Coherence Tomography (OCT) in Periodontal Diagnosis -Detection of Dental Calculus

Department of Periodontology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan¹, Division of Research, Joslin, Diabetes Center, Harvard Medical School², Director, Division of Oral and Dental Surgery, Department of Advanced Medicine, National Hospital for Geriatric Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology³, Global Center of Excellence Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases⁴

○Tsubokawa Masaki¹, Aoki Akira¹, Sato Ikufumi¹, Taniguchi Yoichi¹, Ejiri Kenichiro¹, Sawabe Masanori¹, Mizutani Koji², Akiduki Tatsuya¹, Oda Shigeru¹, Sumi Yasunori³, Izumi Yuichi¹

【研究目的】 光干渉断層画像 (Optical Coherence Tomography: OCT) は、X 線、コンピュータ断層撮影(CT)、核磁気共鳴画像法(MRI)、超音波に加え最先端の画像診断装置として研究されてきている。OCT は、光エネルギーを用いた非侵襲性の断層画像診断システムであり、他の画像診断法と比較して、放射線被曝などの生体に対する有害作用が極めて低く安全で、またリアルタイム診断のため短時間で診断が可能である。

歯周治療においては、歯周組織の断層診断法として病態の把握、および治療後の治癒の評価法への応用などに期待が持たれているが、詳細な研究はほとんど行われていない。本研究は、OCT 画像における歯周組織診断の基本的な読影、および評価分析法を確立するため、抜去歯および患者の口腔内の歯石を OCT 画像上で検出し、その特徴を同定することを目的とした。

【材料および方法】 本研究では、波長走査型光干渉断層画像装置 [swept-source OCT (ss-OCT), IV-2000, Santec 社] を使用した。ss-OCT は、レーザー光源の発振波長を連続的に掃引しながら、検出した反射光をフーリエ解析し断層画像を構築するシステムを採用している。装置の仕様は波長 1260-1360nm、掃引率 20kHz、水平方向分解能 37 μ m、深さ方向分解能 8 μ m(組織中)、出力 4mW、画像構成時間 25ms である。

実験では、まず *in vitro* において帯状に歯肉縁下歯石の付着した抜去歯6本を用い、根面のデブライドメントを行った。術前に OCT 断層撮影を行った後、3 歯はグレーシー型キュレットにてスケーリング・ルートプレーニング(SRP)、他の 3 歯は超音波スケーラーにてデブライドメント後、再度撮影を行い、比較分析した。さらに処置後、歯の未脱灰標本を作製し、根面のセメント質の状態を精査し、OCT 画像と比較分析した。次に、臨床において、患者の同意を得て、歯肉縁下歯石を有するポケットを対象とし、SRP 前後に OCT 撮影を行い、比較分析した。(東京医科歯科大学歯学部倫理委員会承認済み)

【結果および考察】 抜去歯での OCT 撮影画像においては、まず、エナメル質、象牙質、セメント質などの基本的な解剖学的形態を明瞭に確認することができた。根面上の歯肉縁下歯石は、一様に強い白色を示す構造物として検出され、歯石除去後に消失し、また、デブライドメント面の残存セメント質の有無も確認できた。歯石が存在する場合には、その直下の歯質の画像は白色化して識別不能であったが、歯石除去後には明瞭に造影された。

口腔内では、解析のためのレーザー光が歯肉を通過する際に、散乱による光エネルギーの減弱が生じるため、現状の装置では深部の観察はできなかったが、頬側の歯頸部付近では、抜去歯上での画像とは異なり、不鮮明ながらも境界不明瞭な白色像として歯石を検出することが可能であり、除石後にその消失が確認された。

実際に口腔内においても、限られた条件下ではあるが、歯石の探知も可能であったことから、OCT は根面のデブライドメントにおける時、チェアーサイドにおける歯石の探知の補助的な診断装置としても有用になる可能性が示唆された。OCT は今後、装置の性能の向上が必要であるが、断層画像から得られる情報は臨床において非常に有用であると考えられた。

歯髄刺激に伴う血漿中カテコールアミンレベルの動態におよぼすナロキソン投与の影響

兵庫医科大学 医学部 歯科口腔外科学講座

○長谷川誠実, 阿部徹也, 藤原正識, 大津奈央, 本田公亮

Effects of naloxone on tooth pulp stimulation-induced changes in plasma catecholamine levels

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan

○Hasegawa Makoto, Abe Tetsuya, Fujiwara Masanori, Ohtsu Nao, Honda Kousuke

【緒言】第 129 回本学会において歯髄の電気刺激により海馬に血流増加反応を生じること、そしてその海馬血流増加反応にアドレナリンが関与していることを明らかにした。第 132 回本学会では、歯髄の 10 分間刺激による血中カテコールアミンレベル、第 133 回本学会では、歯髄の 10 分間刺激による血中コルチコステロン濃度と血糖値の動態について検討し、歯髄の繰り返し刺激がストレス鎮痛を惹起する可能性について報告した。そこで今回はストレス鎮痛に焦点を当て、歯髄刺激に伴う血漿中カテコールアミン動態に対するナロキソン投与の影響について調べ、歯髄刺激と内因性オピオイドとの関係について考えた。

【実験材料と方法】実験には、ウイスター系雄性ラット(13 週齢、体重 380-400 g)26 匹を使用した。ラットにはすべてウレタン(1.2 g / kg)による全身麻酔を施した。まず、大腿静脈にカテーテルを挿入し、採血用の静脈路の確保を行った後、下顎両側切歯の歯冠部を切断除去し、先端以外を絶縁したステンレス針電極を根管内に挿入し歯髄刺激電極とした。次に、ラットを脳定位固定装置に固定し、左側海馬内に血流測定用プローブを挿入し実験を開始した。始めにオピオイド拮抗薬であるナロキソン 0.2 mg を静脈内投与し、20 分後に 1 回目の採血(1.5 ml)を行った。その後歯髄刺激(以下 TPS)群では intensity 3.3 mA (TPS に対する海馬血流増加反応閾値の 5 倍)、対照(以下 Sham)群では 0.0 mA の duration 0.5 ms で interval 10 ms からなる pulse train 10 s の電気刺激を 20 s 毎に 10 分間与えた。刺激 1 時間後および 2 時間後にそれぞれ採血を行った。有効な歯髄刺激の判断は海馬血流増加反応によるモニタリングで行った。その後、採取した血液から遠心分離により血漿を採取し、カテコールアミン分析を行い、TPS と Sham 群間における比較を行った。統計学的分析には、Student の T-test を用いて行った。

【結果】アドレナリンに関しては、ナロキソン投与下における TPS と Sham 群間に差はなく、経時的な遊離抑制を認めた。ノルアドレナリンに関してはナロキソン投与下における TPS 1 時間および 2 時間後ともに Sham 群に対して有意に遊離抑制が抑制されていた。ドーパミンに関しては、ナロキソン投与下における TPS と Sham 群間に差はなく、経時的な遊離抑制が生じていた。

【考察】ナロキソン投与による内因性オピオイド抑制下の歯髄刺激に伴うカテコールアミン動態は、第 132 回本学会で報告したオピオイド非抑制下と同様の結果であった。このことは、歯髄刺激によるカテコールアミンの遊離抑制にオピオイドが関与しないことを示す。しかしながら Sham 群において、第 132 回本学会で報告した非オピオイド抑制下で経時的遊離増加を示したドーパミンが、オピオイド抑制下では遊離抑制を生じた。アドレナリンもノルアドレナリンもドーパミンから生成されることを考えると、今回の結果から一定の結論を得るためには、まず血漿中のドーパミンとオピオイドの関係を明確にする必要がある。会員外協力者: 秦 順一(社会福祉法人、枚方療育園)本研究は、科学研究費助成金: 基盤研究(C)、課題番号: 21592438 の助成を受けて行われた。

歯髄細胞の分化に及ぼす Ameloblast 様細胞株の影響

広島大学 医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻 顎口腔頸部医科学講座 健康増進歯学分野

○藤井紗貴子, 尾田良, 西村英紀

Effect of ameloblast lineage cells on differentiation of pulp cells

Graduate School of Biomedical Sciences, Division of Cervico-Gnathostomatology, Department of Dental Science for Health Promotion, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

○Fujii Sakiko, Oda Ryo, Nishimura Fusanori

【背景】歯の発生は、上皮・間葉相互作用によって制御される。歯髄由来細胞は、in vitro において石灰化誘導培地中で培養することで石灰化物を形成する。しかし、in vivo では歯髄由来細胞だけでは歯牙形成には至らず、上皮系細胞の関与が必須である。したがって、in vitro での歯髄由来細胞の石灰化においてもエナメル芽細胞を利用することによって石灰化を亢進できると考えられた。そこで、石灰化誘導培地 (ascorbic acid, dexamethasone, β -glycerophosphate を添加した 10%FBS 含有 DMEM) とインキュベートしたマウス由来 Ameloblast lineage cell (ALC) の conditioned medium (ALC-CM) が歯髄細胞の石灰化に及ぼす影響を検討した。

【方法と結果】Confluent まで増殖させた ALC を石灰化誘導培地で培養し、回収した上清を ALC-CM とし、石灰化誘導培地と種々の割合で混合した。歯髄細胞は 24-25 歳女性の健全な上顎第三大臼歯歯髄組織から outgrowth 法により培養増殖させたものを用いた。

1. 石灰化誘導培地にそれぞれ 0, 10, 20, 30, 40, 50% の割合で ALC-CM を混合して、confluent まで増殖させた歯髄細胞に対して分化誘導を 18 日間行った。その結果、ALC-CM は早期に石灰化物形成を誘導し、そして ALC-CM の濃度依存性に石灰化を促進した。
2. 石灰化誘導培地に 50% の割合で ALC-CM を混合した培地で歯髄細胞の分化誘導を行った後、total RNA を回収し、real time PCR 法により Alkaline phosphatase (ALP), osteocalcin (OCN) の mRNA 発現を調べた。ALC-CM は ALP mRNA 発現量に影響しなかったが、OCN mRNA 発現量を早期に上昇させた。

【考察】ALC-CM は歯髄細胞の石灰化を促進し、通常 ALP と OCN の mRNA 発現には相関があると言われているが、ALC-CM により石灰化誘導が促進された歯髄細胞では ALP を介さず OCN のみが影響を受けていたので、ALC-CM による石灰化には独自のメカニズムを介することが示唆された。また、マウス由来 ALC は歯髄細胞の石灰化を促進する因子を分泌していることが示唆された。

OCT の歯根破折線の検出精度について

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野¹, 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野²

○吉岡俊彦¹, 小松恵¹, 坂上斉¹, 石村瞳¹, 海老原新¹, 島田康史², 田上順次², 須田英明¹

Accuracy of Detecting Root Fracture Line by OCT

Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan¹, Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan²

○Yoshioka Toshihiko¹, Komatsu Kei¹, Sakaue Hitoshi¹, Ishimura Hitomi¹, Ebihara Arata¹, Shimada Ysushi², Tagami Junji², Suda Hideaki¹

【研究目的】垂直性歯根破折は、慢性根尖性歯周炎とその症状が類似しており、鑑別診断が重要である。確定診断には破折線の検出が不可欠であり、目視・拡大鏡・歯科用実体顕微鏡(以下 MS)による外科的・非外科的な視診が用いられている。しかし、それらの方法は、いずれも歯根表面に視認可能な幅・長さの破折線が出現したときに初めて有用となるものである。また、それらは客観性に欠けることが問題である。

本研究では、目視、MS および Optical Coherence Tomography(以下 OCT)を用いた場合の、歯根破折線の検出精度について、ヒト抜去歯を用いて検討した。

【材料および方法】実験には、抜去後に水中保管したヒト下顎大白歯 12 本を使用した。被験歯は 2 根性が 11 本、3 根性が 1 本で、計 25 本の歯根を評価対象とした。観察部位は分岐部側を除く歯根表面とした。まずマイクロフォーカス X 線 CT (InspeXio SMX100CT[®], 島津製作所, 京都)にて各被験歯を撮影し、各根の破折の有無を決定した。破折は 17 本の根に認められ、8 本は破折のない健全な根であった。

観察者は歯科医師 3 名とし、以下の方法で各根の破折・非破折の判定を行った。

1. 目視にて抜去歯の観察を行った。抜去歯は観察者が手に持ち、目と抜去歯の距離は 20cm 以上とした。
2. MS(OPMI[®]pico, Zeiss, ドイツ)にて抜去歯の観察を行った。拡大倍率は 13.6 倍とした。
3. 抜去歯を OCT にて撮影し、三次元画像解析ソフト(Amira5.3, Visage Imaging, オーストリア)を用いて作成したスライス画像の観察を行った。それぞれの判定の感度・特異度・正答度を算出した。また、各根に対する 3 名の観察者の診断が一致した割合を一致度として算出し、正答度と一致度に関してカイ二乗検定を用い、統計学的解析を行った。

【結果】結果を下表に示す。観察者 1 および 3 では、MS および OCT の方が目視に比べて有意に正答度が高かった。観察者 2 では、OCT の方が目視に比べて有意に正答度が高かった。それ以外の群間に有意差は認められなかった。解の一致度に関してはすべての診断方法で有意差は認められなかった。

	目視			MS			OCT		
	感度	特異度	正答度	感度	特異度	正答度	感度	特異度	正答度
観察者1	0.47	1	0.64 ab	0.94	0.88	0.92 a	0.88	1	0.92 b
観察者2	0.53	0.75	0.6 c	0.82	0.75	0.8	0.82	1	0.88 c
観察者3	0.47	1	0.64 de	0.82	1	0.88 d	1	0.63	0.88 e
解の一致度	0.64			0.64			0.72		

同一アルファベット間には有意差あり

【考察】OCT はレーザーの照射方向と平行に虚像が頻出することが確認されており、入射角度を変えることで、ある程度改善することが報告されている。本実験では、OCT の連続的なスライス画像を用いて評価を行うことによって、虚像と実像の鑑別が容易になったと考えられる。また、OCT では目視や MS と違い、画像を供覧することが可能で客観性に優れていると考えられる。本実験でも、目視や MS と比較し、観察者間で判定が変化しにくいことが示唆された。また、OCT は物質内部の状態を詳細に把握することが可能であり、根表から内部へ進展している破折線の広がりや、根表に達していない内部からの破折線の評価できる可能性があると考えられる。

【結論】OCT の歯根破折の検出能力は目視よりも優れており、歯科用実体顕微鏡と同程度であることが示唆された。

唾液分泌量および唾液緩衝能と最大咬合圧の関連性

東京医科歯科大学 大学院 歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野¹, 東京医科歯科大学 歯学部
附属歯科技工士学校², 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³

○田中美由紀¹, 北迫勇一¹, 池田正臣², 田上順次^{1,3}

Association of salivary flow rate and buffering capacity with maximal bite force

Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University¹, Dentistry School for Dental Technology, Tokyo Medical and Dental University², Global COE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University³

○Tanaka Miyuki¹, Kitasako Yuichi¹, Ikeda Masaomi², Tagami Junji^{1,3}

【目的】 唾液緩衝能と唾液分泌量の間、および最大咬合圧と唾液分泌量の間には、各々正の相関性があることがあることが報告されている(Tenovou 1997, Yeh CK et al. 2000)。しかしながら、最大咬合圧と唾液緩衝能との相関性は未だ不明である。そこで、本研究では、最大咬合圧と唾液緩衝能との関連性について検討し、あわせて口腔内情報との比較を行うことで、その臨床的意義について検討を加えた。

【材料・方法】 被験者 195 名(男性 89 名、女性 106 名)に対し、唾液分泌量・唾液緩衝能・最大咬合圧の測定を行った。すなわち、唾液検査キット・チェックパフ(モリタ)を用いて、刺激唾液を採取し、唾液分泌量(ml/min)および唾液緩衝能(初期 pH・酸滴下後の最終 pH)を測定した。また、オクルーザルフォースメーター(モリタ)を用い、左右第一大臼歯部における最大咬合圧(N)を測定した。最大咬合圧の結果をもとに、グループ I(～300N)、II(301～600N)、III(600N～)の 3 群に分け、唾液分泌量・唾液緩衝能(最終 pH)・最大咬合圧間の相関性について統計処理を行った。また、口腔内情報として、最大咬合圧測定部位となる第一大臼歯の有無および処置状況(健全・鑄造冠補綴、ブリッジ・ポテンティック・義歯)を調査し、唾液分泌量・唾液緩衝能・最大咬合圧との関連性について比較検討を加えた。

【結果・考察】 唾液分泌量・唾液緩衝能ともに、各群間に有意な差が認められた(wilcoxon rank sum test with Bonferroni correction, $p < 0.0167$, 表 1)。これにより、唾液分泌量と最大咬合圧間の関連性が改めて確認されたとともに、唾液緩衝能と最大咬合圧間にも関連性があることが示唆された。一般に、刺激唾液は、安静時唾液より多くの炭酸水素イオンを含むことが知られおり、十分な咬合が得られることで各唾液腺の刺激唾液分泌が促進された結果、高い唾液緩衝能が得られたものと考えられる。また、同一被験者に対し、測定部位における欠損補綴の有無と唾液分泌量・唾液緩衝能・最大咬合圧との関連性について比較検討したところ、補綴物の無い者は補綴物を有するものに比べて、最大咬合圧・唾液分泌量・唾液緩衝能のすべてで有意な差が認めら

れた(wilcoxon rank sum test, $p < 0.05$, 表 2)。高齢化の進む近年、QOL の向上について考える際、口腔内環境の及ぼす影響は極めて大きい。本研究により、歯の喪失等により咬合圧が低下した結果、唾液分泌量・唾液緩衝能の低下が起り、さらなるう蝕および歯周病リスクの増加、ひいては歯の喪失の危険性が高まる可能性が示唆された。このため、う蝕治療に際しては、歯の保存を考慮した、最低限の侵襲を指向した介入が推奨される。

表1

	I 群(n=55)	II 群(n=90)	III 群(n=50)
唾液分泌量	1.01 ± 0.50 ml ^{ab}	1.50 ± 0.68 ml ^{ac}	1.98 ± 0.69 ml ^{bc}
最終 pH	5.20 ± 0.71 ^{de}	5.61 ± 0.63 ^{df}	6.07 ± 0.46 ^{ef}

同一文字間に有意差あり($p < 0.0167$)

表2

	唾液量	最大咬合圧	最終pH
補綴あり(N=23)	1.10 ± 0.65 ml ^e	218.48 ± 165.51 N ^b	5.31 ± 0.49 ⁱ
補綴なし(N=172)	1.54 ± 0.72 ml ^e	481.54 ± 236.98 N ^b	5.65 ± 0.71 ⁱ

同一文字間に有意差あり($p < 0.05$)

洗口剤および液状歯磨剤の *Streptococcus mutans* バイオフィームに対する膜傷害・剥離効果

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔健康科学講座 う蝕学分野

○若松里佳, 竹中彰治, 大墨竜也, 興地隆史

Membrane-disrupting and detaching effects of commercially available mouthrinses on *Streptococcus mutans* in an artificial biofilm model

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Wakamatsu Rika, Takenaka Shouji, Ohsumi Tatsuya, Okiji Takashi

【目的】

洗口剤などによる化学的プラークコントロールは、物理的プラークコントロールと併用することで、器具が到達しえない局所に形成されたバイオフィームの抑制に有効であることが期待されるが、口腔内での作用時間が約 30 秒と限られるため、抗菌成分の浸透性が重要な因子である。本研究では、*Streptococcus mutans* バイオフィームの深層部に対する洗口剤や液状歯磨剤の膜傷害効果および剥離効果について比較検討した。

【材料及び方法】

使用した材料は、国内外で販売されている洗口液・液体歯磨に分類される4種類およびコントロール(バッファー、C 群)で、主成分別に0.12%クロルヘキシジン(CX 群)、塩化セチルピリジニウム(CP 群)、イソプロピルメチルフェノール(IP 群)、チモール(TH 群)である。*Streptococcus mutans* ATCC 25175 株を、ガラスベースディッシュを用い0.5% sucrose 含有 BHI 液体培地中で 24 時間嫌気培養することによりバイオフィームを形成させた(n=6)。24 時間後、Calcein-AM (10 μ g/ml)を 2時間作用させ生菌を染色し、共焦点レーザー顕微鏡(オリンパス FV300: Ex/Em= 488/ 510-530)を用いて、XYZ 断面像を採取したのち、焦点をバイオフィーム底面に固定し、各材料の作用直後から 15 秒間隔で 10 分間共焦点画像をリアルタイムに採取した。採取した共焦点画像から無作為に最もバイオフィームの厚みがある部位を含む3領域(25 μ m 四方)の厚み(概算値)を算出し、蛍光量の減少率を Metamorph ソフトウェアを用いて解析した。また、作用前後のディッシュ付着面の細菌の分散剥離効果を領域内の細菌密度で比較検討した。

【結果】

バイオフィームの厚み(概算値)は最大で 31.5 μ m であった。C 群における 10 分後の蛍光褪色は 11.1 \pm 3.4% であった。領域内の蛍光量が 50% 減少するまでに要した最大時間は、それぞれ 90 秒(TH 群)、240 秒(IP 群)、360 秒(CX 群)および 450 秒(CP 群)であり、TH 群は有意に短時間であった(二元配置分散分析, Dunnett test, $p < 0.05$)。50% 蛍光量減少までの時間はバイオフィームの厚みと正の相関関係にあり、それぞれ $y = 1.892x$, $r^2 = 0.964$ (TH 群), $y = 8.672x$, $r^2 = 0.995$ (IP 群), $y = 10.784x$, $r^2 = 0.990$ (CX 群) および $y = 12.112x$, $r^2 = 0.977$ (CP 群) であり、TH 群においても最大 135 秒必要であった。また、すべての群において、ディッシュ付着面の細菌密度に有意な変化はみられなかった。

【考察および結論】

今回作成した *S. mutans* バイオフィームにおいては、TH 群がバイオフィーム底面の細菌に対して最も高い膜傷害効果を与えていたが、30 秒接触ではバイオフィーム内部の細菌に十分な膜傷害作用や分散剥離効果を示さないように思われた。

3 因子・4 因子導入マウス iPS 細胞の低酸素培養における増殖・分化について

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 齶蝕学分野

○杉本浩司, 石崎秀隆, 林善彦

Proliferation and differentiation of murine induced pluripotent stem cells introduced three or four factors in hypoxic environment

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

○Sugimoto Koji, Ishizaki Hidetaka, Hayashi Yoshihiko

[研究目的]

近年、医学領域では心筋細胞の再生などの臨床研究も進んでいるが、歯科領域においても失われた歯の再生を目的とした再生療法が注目されている。

iPS 細胞は、ES 細胞のもつ倫理的問題を回避することを可能とし、創薬、難病治療や再生医療の発達につながっていくことが期待されている。iPS 細胞樹立時に導入される4因子(c-Myc, Oct3/4, Klf4, Sox2)のうち癌遺伝子である c-Myc が導入されることから細胞の癌化が懸念されたが、c-Myc を除く Oct3/4, Klf4, Sox2 の3 因子の導入での iPS 細胞の樹立も成功し、研究が進められている。また、低酸素培養による iPS 細胞樹立効率の改善も報告されている。そこで本研究では、4因子と3因子導入マウス iPS 細胞を用いた低酸素培養下での増殖・分化、骨芽細胞誘導時における影響について検討した。

[材料および方法]

実験には理研 CELL BANK より購入したマウス iPS 細胞(iPS-MEF-Ng-20D-17, iPS-MEF-Ng-178B-5)を用いた。MEF を播種した Dish 上に、マウス iPS 細胞を5日間 FBS、2-Mercaptoethanol、NEAA、mouseLIF、penicillin/streptomycin、bFGF 添加 DMEM で培養。継代後 1.0×10^5 cell/cm² の密度で播種し、5%および21%O₂ の条件下で7日間培養し、形態学的観察に加え、細胞数測定を行った。

3 因子、4因子導入マウス iPS 細胞は、MEF を播種した 6wellDish 上に 1.0×10^4 cell/cm² の密度で播種され、5%および21%O₂ の条件下で骨分化誘導培地および維持培地上で20日間培養した。その後、3、7、15、20日目にそれぞれ Alizarin-Red 染色で石灰化の状況を検討した。

[結果]

4因子と3因子導入マウス iPS 細胞どちらにおいても、低酸素条件下では21%O₂ 下より細胞増殖が速かった。しかし、4因子と3因子導入マウス iPS 細胞とも、低酸素条件下での長期維持の困難なことがわかった。

また、骨分化誘導培地における4因子と3因子導入マウス iPS 細胞の Alizarin-Red 染色の結果において、石灰化の進行に顕著な差異は認められなかった。

[考察および結論]

4因子と3因子導入マウス iPS 細胞を比較して、低酸素条件下での培養で増殖・分化に有意差はないことが明らかとなった。骨分化誘導時においても、4因子と3因子導入での差はなく今後は、癌遺伝子を含む3因子導入マウス iPS 細胞を用いて、さらなる基礎実験を行っていく予定である。

High Voltage Electron Microscope による原子レベルの結晶性硬組織の観察

北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯科保存学教室¹, 北海道大学病院歯科診療センター 咬合系歯科², 北海道大学病院歯科診療センター 口腔総合治療部³, 岩手医科大学 総合歯科学講座 保存修復学分野⁴

○中沖靖子¹, 福岡杏理², 角田晋一¹, 付佳楽¹, 星加修平¹, 松田康裕², 奥山克史¹, 川本千春², 池田考績¹, 田中享², 井上哲³, 小松久憲¹, 野田守⁴, 佐野英彦¹

High Voltage Electron Microscopic Analysis of Crystalline Hard Tissue

Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine¹, Oral Rehabilitation, Hokkaido University Hospital², General Dentistry, Hokkaido University Hospital³, Operative Dentistry, Division of General Dentistry, Iwate Medical University⁴

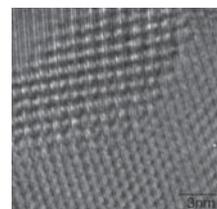
○Nakaoki Yasuko¹, Fukuoka Anri², Kakuda Shinichi¹, Fu Jiale¹, Hoshika Shuhei¹, Matsuda Yasuhiro², Okuyama Katsushi¹, Kawamoto Chiharu², Ikeda Takatsumi¹, Tanaka Toru², Inoue Satoshi³, Komatsu Hisanori¹, Noda Mamoru⁴, Sano Hidehiko¹

【緒言】 高分解能で知られる超高压電子顕微鏡(High Voltage Electron Microscope)は、硬組織の超微細構造検索に有用である。但しプローブの精度が増すにつれて試料作製の難易度もあがる事は周知の事実であり、また原子レベルの像では、得られた像が正確に原子の位置関係を表すかの検証も重要となる。本発表では、従来から困難とされてきた結晶性硬組織であるエナメル質の試料作製や像の取得、並びに超微細構造の検証について、その手法を確立するに到ったことを示す。

【方法】 健全ヒト抜去歯エナメル質小切片を、樹脂系材料を用いて TEM 用リングに固定し 50 μ m 程の厚さに研削した後、アルミナ粒子にて鏡面研磨し厚み数 μ m の試料とした。これを更に精密イオン研磨装置(Gatan PIPS Model 691)にて研磨を行い、中心に微小孔が作製されるまで薄片化した。観察器機としては北海道大学エネルギー・マテリアル融合領域研究センターに設置されているマルチビーム超高压電子顕微鏡システム(Multi-Beam High Voltage Electron Microscope JEM-ARM 1300 日本電子)を使用し、加速電圧 1250kV にて試料の中心部の近傍をプローブ、格子像がクリアに確認される数 nm ~ 30 nm 程度の薄層となっている部分を観察した。ここで得られた画像とマルチスライスシミュレーションによる計算像を比較し、さらに原子の正確な位置と種類(原子番号)を反映する結晶構造像からそれぞれの原子のポジションを推定した。

【結果と考察】 得られた HRTEM 像の一例を示す。ここでは軸方向の異なる少なくとも三種の結晶粒が観察される。この格子像と、結晶モデルに基づく計算像との比較より原子の位置を割り出すことになる。

超高压電顕による観察は、通常の TEM の 10 倍程度の非常に高電圧で加速された高速の電子を利用するため、理論的にも実際にも分解能が高く、電子線の試料透過能が高く熱発生や電離が起きにくいので、それに伴う加熱や化学構造の破壊による試料の損傷が少ないという利点を持つ。精密イオン研磨法も、イオンの加速電圧を適切に選ぶことで発熱の少ない薄片化手段として有用である。更に格子像と原子構造を一対一で対応させることが可能となり、これより原子の位置を正確に把握する事ができた。今後この技術をもってすれば、エナメル質のみならず、生体と生体材料との分子、原子レベルの関係解析への応用が可能となるであろう。(本研究の一部は科学研究費基盤 C20592219 の助成による。)



【謝辞】 本研究遂行に多大なご協力を頂きました北海道大学大学院工学研究院附属エネルギー・マテリアル融合領域研究センターの高橋平七郎名誉教授並びに坂口紀史准教授に深く感謝いたします。また、硬組織学的観点から本研究へのご助力、ご教示を賜りました脇田 稔副学長に心から感謝いたします。

【参照】 北海道大学超高压電子顕微鏡研究室ホームページ <http://www.caret.hokudai.ac.jp/HVEM/index.html>

抗菌性表面処理剤の歯科への応用(2)

—抗菌性シランカップリング剤の合成と細胞毒性について—

神奈川歯科大学 口腔治療学講座 保存修復学分野¹, 神奈川歯科大学総合歯科学講座², 東京理科大学工学部工業化学科³, 神奈川歯科大学生体材料器械学講座⁴

○三宅香¹, 大橋桂¹, 二瓶智太郎¹, 山口真一郎², 小泉忠彦², 近藤行成³, 倉田茂昭⁴, 好野則夫³, 寺中敏夫¹

Application of surface modifier having antibacterial potency in dentistry (Part.2)

Syntheses and cytotoxicities of antimicrobial silane coupling agents

Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College, Yokosuka, Kanagawa, Japan¹,
Department of Comprehensive Dentistry, Kanagawa Dental College, Kanagawa, Japan², Department of Industrial Chemistry,
Tokyo University of Science, Tokyo, Japan³, Department of Biomaterials and Devices, Kanagawa Dental
College, Yokosuka, Kanagawa, Japan⁴

○Miyake Kaori¹, Ohashi Katsura¹, Nihei Tomotaro¹, Yamaguchi Shinichiro², Koizumi Tadahiko², Kondo Yukishige³,
Kurata Shigeaki⁴, Yoshino Norio³, Teranaka Toshio¹

【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、プラークの付着、形成ならびに歯質の脱灰を抑制して、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。本研究では材料表面への抗菌性の付与を目的として第4級アンモニウム塩の構造を有するシランカップリング剤 *N*-allyl-*N*-decyl-*N*-methyl-*N*-trimethoxysilylpropylammonium iodide (10-I), *N*-allyl-*N*-methyl-*N*-trimethoxysilylpropyl-*N*-octadecylammonium iodide (18-I) を合成、開発し、これら改質剤の生体為害作用の有無を細胞毒性試験により検討した

【材料および方法】

1. 新規表面処理剤の合成

合成は *N,N*-ジアルキルメチルアミン(MDAA)を出発原料とし、塩化白金酸触媒を用いてトリメトキシシランでヒドロシリル化し、中間体アミノシラン MDAA3M を合成後、アセトニトリル溶媒中において1-ヨードデカン、1-ヨードオクタデカンと反応させることにより、新規な第4級アンモニウム塩型シランカップリング剤を合成した。同定は¹H-NMR (DPX 400 型 NMR 装置, Bruker), FT-IR (AVATAR360FT-IR Spectrometer, Nicolet), ならびに質量分析装置 (JMS-SX 102A, 日本電子) により行った。

2. 細胞毒性試験

「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安全試験の基本的考え方について」(平成15年医療審発第0213001号)の別途「医療機器の生物学的安全性評価の基本的考え方」に従ってコロニー形成阻害試験を行った。20 mM に調製した 10-I および 18-I で、表面を改質した並板ガラスを細胞培養液に浸漬し、37°C の 5%CO₂ インキュベーター中で 24 時間抽出した。その後、抽出液のみを取り出し、これを 100% 抽出液とし、さらに培養液で 0.5, 1, 3.13, 5, 6.25, 10, 12.5, 25, および 50% の計 10 濃度の検体液を調製した。単層に増殖した V79 細胞をトリプシン処理により剥離し、MO 培地を用いて 100 個/mL の細胞浮遊液を調整した。この細胞浮遊液を組織培養用プラスチックプレートの各ウエルに 0.5mL ずつ播種し、37°C の 5%CO₂ インキュベーター中で約 6 時間培養した。培養後、細胞がウエルの底面に接着していることを確認してから培地を除き、各濃度の検体試験液を各々 4 個のウエルに 0.5 mL ずつ加え、37°C の 5%CO₂ インキュベーター中で 6 日間培養した。培養終了後、各ウエルを 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、0.1 %メチレンブルー溶液で染色して、細胞数 50 個以上のコロニーを計数した。

【結果および考察】

1. 化合物の同定

合成した各化合物は¹H-NMR スペクトルでは、ピークの積分比が目的生成物の各スペクトルと一致し、FT-IR および質量分析においても生成物が目的化合物であることを裏付ける結果が得られた。

2. 細胞毒性試験

10-I におけるコロニー形成率はブランクコントロールに対して低下はなく、細胞毒性は認められなかった。一方、18-I は濃度依存的にコロニーの形成を阻害し、中程度の細胞毒性を有することが示された。

Interface between teeth coronal hard tissue and bioactive layer of 45S5 bioglass

東京医科歯科大学 大学院 う蝕制御学分野¹,
グローバル COE プログラム 歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点²

○Bakry Ahmed¹, 大槻昌幸¹, 田上順次²

Interface between teeth coronal hard tissue and bioactive layer of 45S5 bioglass

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan¹, GCOE Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo

Medical and Dental University, Tokyo, Japan²

○Bakry Ahmed¹, Otsuki Masayuki¹, Tagami Junji²

Objectives: 45S5 bioglass mixed with 50% phosphoric acid has been suggested to treat dentin hypersensitivity and incipient enamel caries. However, there was no information regarding the interaction of the newly formed crystallized layer and the enamel and dentin surfaces. This study is going to evaluate the ultrastructure changes induced on the enamel and dentin surfaces when applying the 45S5 bioglass paste.

Methods: Enamel and dentin flat surfaces were obtained from the buccal surfaces of 80 extracted human non-carious third molars. The enamel surfaces were covered with nail varnish leaving a circular window of 2 mm in diameter. All of the enamel specimens were acid challenged in an acidic buffer solution (pH 4.5) for 4 days at 37°C. The dentin specimens were treated with EDTA (pH 6) for 2 minutes. 45S5 bioglass powder (NovaMin, 5 μ average particle) was mixed with 50% phosphoric acid and applied on the enamel and dentin surfaces of 40 specimens, while the remaining samples acted as a control. All specimens were stored in artificial saliva solution for 7 days. The cross-cut surfaces of the specimens were observed by FE-SEM/EDS and TEM, electron diffraction of the observed crystals at the interface was examined.

Results: The enamel and dentin surfaces on which the bioglass was applied showed 100% coverage of all specimens by a layer rich in calcium phosphate crystals. The enamel and dentin crystals showed intimate contact between the newly formed crystals produced by the bioglass application.

Conclusion: A crystallized calcium phosphate rich layer was upon application of the aforementioned technique for the possible treatment of incipient enamel lesions and dentin hypersensitivity. This study was supported by grant in aid from JSPS and the GCOE Program, ICTB at TMDU.

齶蝕由来型歯牙喪失患者に対する残存歯への歯科保存学的アプローチ

日本大学松戸歯学部 保存修復学講座¹, 医療法人社団 和晃会 松戸ボックスヒル歯科²

○熱田 互^{1,2}, 鈴木義純^{1,2}, 三田肇^{1,2}, 並木泰次¹, 鈴木英明¹, 池見宅司¹

Conservative dentistry approach to missing teeth by carious type

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo¹, Matsudo Box Hill Dental Clinic²

○Atsuta Wataru^{1,2}, Suzuki Yoshizumi^{1,2}, Mita Hajime^{1,2}, Namiki Yasuji¹, Suzuki Hideaki¹, Ikemi Takuji¹

【目的】 歯を喪失する原因には、歯周病に起因する歯周病由来型と齶蝕に起因する齶蝕由来型に分類される。歯周病由来型の場合、残存歯や骨の状態を注意深く検査した上で治療方針を検討し、咬合の安定、再生治療や吸収した顎骨へのGBRなどの治療が試みられる。また、治療後のメンテナンスの際もエックス線、PPD測定、BOPならびに排膿などの検査や臨床症状により、病状の進行をある程度明確に診断できることが知られている。しかし、齶蝕由来型の場合、抜歯後の骨吸収が少なく残存歯の骨植も良好であることが多いため、歯周病型より比較的容易に治療方針を決めることができると考えられる。また、その容易さのイメージから、メンテナンスについても特異的な方法を行うことは少なく、通常の定期健診で視診、触診およびエックス線診にてチェックを行う程度にとどまることが多いように思われる。しかしながら、残存歯の保存という観点から考えれば、歯周病由来型は、そのリスク因子を排除することにより長期的な予後が期待できるものの、齶蝕由来型はリスク因子が排除されないままメンテナンスへ移行することが多い。そこで、本研究は、齶蝕由来型の患者への術前および術後のメンテナンス時の検査について、簡便で効率のよい方法を考えることを目的に、临床上齶蝕リスクが高いと思われた患者について、齶蝕リスク検査を実施し、そのリスク因子の排除について検討した。

【方法】 被験者は医療法人社団和晃会・松戸ボックスヒル歯科(以下、当院)に受診されたなかで、特に齶蝕リスクが高いと思われた患者6名を抽出し、患者の同意を得て齶蝕リスク検査を行った。抽出に際し、DMF指数が高いだけでなく、視診にて2次齶蝕が多いと思われた患者を選択した。齶蝕リスク検査は、齶蝕関連菌検査(株式会社ビー・エム・エル)にて行った。

【成績】 齶蝕原因菌として考えられている *Streptococcus mutans*(以下、*S. mutans*)および *Streptococcus sobrinus*(以下、*S. sobrinus*) の齶蝕菌比率は、0から3まで4段階で評価されるが、5%以上のハイリスクを示したのは、1名のみであった。また、6名中3名は、ローリスクもしくはノーリスクであった。唾液量は、1名のみノーリスクであり、2名がリスク、3名がハイリスクであった。

【結論】 齶蝕由来型の患者治療には、術前およびメンテナンス時に齶蝕リスク検査を行うことにより、残存歯の状態を把握する1つの指標になり得ることが示唆された。しかし、一部の齶蝕ハイリスク患者は、*S. mutans* および *S. sobrinus* 菌比率に関与せず環境因子に依存する可能性が示唆された。このことより、今後、ブラッシング歯垢内の菌量検査を簡便にできるシステムの検討や主な齶蝕予防法である3DS、PMTC、フッ素塗布のうち、除菌がメインである3DS、PMTCの効果について新たに検討する必要性が示唆された。

辺縁着色への対処法に関する研究

長崎大学病院 臨床教育・研修センター¹, 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齲蝕学²

○久保至誠¹, 林善彦²

Decision-making of treatment for restorations with marginal discoloration

Center for Clinical Education and Training, Nagasaki University Hospital, Nagasaki, Japan¹, Department of Cariology,

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan²

○Kubo Shisei¹, Hayashi Yoshihiko²

〔緒言〕確立された判定基準がないためか、成人の歯冠修復に関する治療の約 6 割を再治療が占め、必要以上に再治療が繰り返されていることが指摘されている。再修復のサイクルに陥らないことが修復物および歯の寿命の延長につながると考えられる。したがって、う蝕の予防や治療と同程度とは言わないまでも、再修復に関する教育も修復学では必要と思われる。ところが、再治療に関する科学的な基礎データが少ないため、十分な教育はできないのが実情である。一方、う蝕学の研究成果ならびに接着性修復材料の著しい進歩と疫学データを基に MI (Minimal Intervention Dentistry) が提唱され、問題点への対処法も多様化してきた。われわれは再修復の意思決定にかかわる要因の探索的研究と支援モデルの構築を目的とし、研究に取り組んでいる。今回、現状を把握するとともに、どのような要因が意思決定に影響を与えているかを明らかにするため、アンケート調査を行った。その結果、辺縁着色に関して、特に興味ある知見が得られたので報告する。

〔材料ならびに方法〕長崎大学歯学部同窓会の協力を得て、各卒業期から無作為に 250 名を抽出した。臨床症状はなく、患者はう蝕に気付いていないか、気付いていても気になっていないという想定のもとで、下図のような画像を提示しながら、種々の問題を有する修復物への対処法に関する無記名式アンケート調査を行った。統計学的解析には、ロジスティック回帰分析、順序ロジスティック回帰分析および生存分析を用いた。

〔結果ならびに考察〕データ回収率は住所変更のため返送されてきた 9 名を除くと 45% (109 名) であった。表 1 に結果を示す。部位 (歯頂側エナメル質か歯肉側象牙質) に関係なく、辺縁着色の程度が進むに従って修復 (補修も含む) による対応が増加した。同程度の着色の場合、修復による対処が象牙質において有意に多いことが判明した。また、う蝕に対する修復の意思決定と辺縁着色における再修復の判定基準との間には関連性が認められた。さらに、辺縁着色への対処法に関する意思決定には、着色部位と程度のみならず、臨床経験、勤務形態、定期管理などの要因が複雑に関与していることが明らかになった。本研究は科研費 (C 20592230) の助成によって実施した。

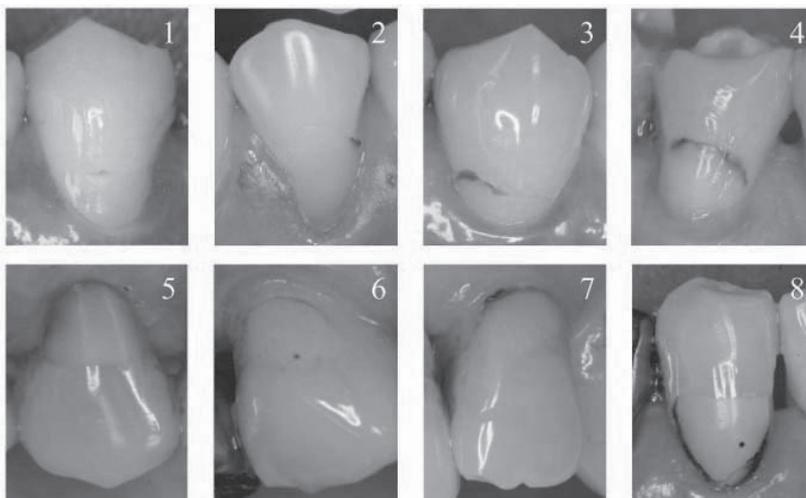


表1 辺縁着色への対処法 (回答者数)

症例	1	2	3	4	5	6	7	8
経過観察	78	19	6	19	85	75	30	16
再研磨	29	81	71	47	13	8	26	17
補修	0	4	19	24	5	12	35	20
再修復	2	5	13	19	6	14	18	56

グレープシードによるヒト歯根面象牙質脱灰後のコラーゲンの保護と、再石灰化への影響

東京医科歯科大学大学院 歯制御学分野¹, 東京医科歯科大学大学院歯と骨の GCOE²

○Islam Sofiqul¹, 平石典子¹, 大槻昌幸¹, 田上順次²

Effect of Grape Seeds on Stabilization of Collagen and Remineralization of the Root Dentin Lesion

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University,

Tokyo, Japan¹, GCOE Program at Tokyo Medical and Dental University²

○Islam Sofiqul¹, Hiraishi Noriko¹, Otsuki Hasayuki¹, Tagami Junji²

Introduction: In the elderly population, root caries becomes a more significant problem than crown surface caries. Although the mechanism of root caries has not been well established, the de/re-mineralizing process would be regulated through the interactions of mineral contents with the condition of exposed collagen matrix. It was reported that stability of dentin matrix can be achieved by the use of grape seed (proanthocyanidin) because of its effect of collagen cross-linkers. Chlorhexidine also has been considered to inhibit the proteolytic activity of dentin collagen by inhibiting MMPs. The aim of this study was to observe the effect of grape seed in vitro root human dentin collagen and de/re-mineralization and compare with that of chlorhexidine.

Material and Methods: Twenty four root slabs were obtained from medial and distal root surfaces of human molar teeth. The slabs were first immersed in demineralizing solution (pH 4.5) for 96 hours to create pre-lesion. Each sample was immersed individually in the demineralizing solution (pH 5.0) for 14 hours, in the testing solution with grape seed (0.5%) or chlorhexidine (0.2%) for 2 hours and in the remineralizing solution (pH 7.0) for 8 hours. The remineralizing solution contained 7.5 U/mL bacterial collagenase. The pH cycling was then performed at 37 C for 8 days. Those groups without incubating grape seed or chlorhexidine served the positive control (collagenase in remineralization) and the negative control (no collagenase in remineralization). Degradation of collagen during the pH cycling was determined using the chloramine T method by estimating hydroxyproline content from degraded collagen. Dissolved calcium ion was measured by means of an atomic absorption spectroscopy. The slabs were longitudinally sectioned into $220 \pm 20 \mu\text{m}$ thickness and the mineral loss and lesion depth was examined using transverse microradiography.

Results and Discussion: One-way ANOVA showed significant differences among the tested groups ($p < 0.05$), except calcium release. The collagen stabilization by grape seed was increased significantly when compare with chlorhexidine and positive control ($p < 0.05$). Grape seed showed the minimum lesion depth and mineral loss among all groups. Grape seeds preserved collagen and inhibited further demineralization and/or enhanced remineralization even under the fluoride-free condition.

Groups	Collagen degradation (μg)	Calcium release	Lesion depth (μm)	Mineral loss (vol% μm)
Grape seed	$2.9 \pm 1.2\text{a}$	$5.5 \pm 0.1\text{a}$	79.5 ± 3.4	$1033 \pm 53\text{a}$
Chlorhexidine	$10.7 \pm 2.9\text{b}$	$6.5 \pm 0.3\text{a}$	93.7 ± 2.9	$1183 \pm 109\text{a}$
Positive control	$28.8 \pm 4.5\text{c}$	$6.9 \pm 0.4\text{a}$	126.8 ± 3.4	$1877 \pm 148\text{b}$
Negative control	$1.3 \pm 0.2\text{a}$	$5.6 \pm 0.3\text{a}$	113.3 ± 2.3	$1299 \pm 103\text{a}$

ヘスペリジンによる牛歯根面象牙質脱灰後のコラーゲン崩壊及び脱灰抑制効果-新しい根面齲蝕予防のアプローチ

ローチ

東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野¹, サンスター株式会社研究開発部², 東京医科歯科大学大学院
歯と骨の GCOE³

○平石典子¹, 曾野良平², イスラムソフィクル¹, 大槻昌幸¹, 田上順次³

Effect of Hesperidin on Collagen and Demineralization in Bovine Root Dentin

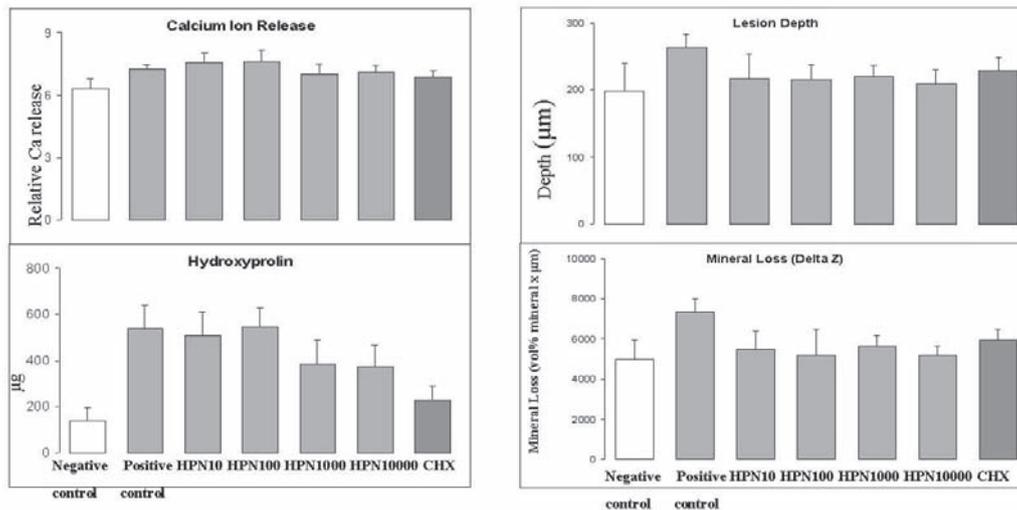
Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan¹, R&D Center, Sunstar Inc., Osaka, Japan², GCOE Program at Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan³

○Hiraishi Noriko¹, Sono Ryouhei², Islam Sofiqul¹, Otsuki Masayuki¹, Tagami Junji³

概要:高齢者社会で根面齲蝕罹患者は増加する傾向にあり、歯周病と並び、歯の喪失要因のひとつと報告されている。現在、根面齲蝕の発症のメカニズムについては完全に解明されていないが、そのひとつの可能性として有機質(コラーゲン)の崩壊によって齲蝕が進行するということが示唆されている。本実験では、天然フラボノイドのヘスペリジン(HPN)がコラーゲンの崩壊を抑制し、う蝕の進行抑制または再石灰化に有用な化合物であることを、牛歯根面象牙質を用いpHcycling法にて評価した。

方法:牛歯根部ブロックの作成し、脱灰液処理14時間→サンプル処理2時間→コラゲナーゼ含有再石灰化液8時間の順で8日間 37 C でpHcycling法を行った。脱灰液は 1.5mM 塩化カルシウム、0.9mM リン酸2水素カリウム、50mM 酢酸、pH5.0、サンプル処理溶液は、HPN 10, 100, 1000, 10000 ppm または、クロロヘキシジン(CHX) 2000ppm、を使用、再石灰化液は 1.5mM 塩化カルシウム、0.9mM リン酸2水素カリウム、130mM 塩化カリウム、20mM HEPES、pH7.0 を使用した。象牙質コラーゲンの、脱灰または再石灰化への影響を検討するために、再石灰化液中に Clostridium histolyticum 由来のコラゲナーゼを 7.5 U/ mL 作用させた。脱灰抑制効果評価は、脱灰液中溶解カルシウムを原子吸光分析にて定量を行った。象牙質コラーゲンの崩壊抑制効果の評価は、再石灰化液中の可溶性コラーゲンを酸加水分解後、アミノ酸分析を HPLC 法にて行った。また、pHcycling終了後、transverse microradiography (TMR)にてミネラル脱灰の形態を分析した。得られたデータは one-way ANOVA で検定後、Tukey 多重比較を行った。

結果考察:HPN1000ppm,10000ppm と CHX は、コントロールと比較し有意義(p<0.05)にコラーゲンの崩壊を抑制した。TMR の結果、脱灰深度、脱灰量では、HPN、CHX とともにコントロールより少なかった。HPN は、高濃度では、コラゲナーゼによるコラーゲンの崩壊を抑制し、脱灰抑制、または再石灰化促進効果が見られた。これにより、天然由来の安全性の高い有機化合物であるヘスペリジンの、根面象牙質う蝕治療効果が示唆された。



眼の加齢変化と色彩識別能力との関連について

明倫短期大学 歯科技工士学科¹, 新潟大学眼科²

○木暮ミカ¹, 飛田滋¹, 長谷部日²

Influence of chromatic discrimination on color by ocular aging alternation

Department of Dental Technology, Meirin College, Niigata, Japan¹, Department of Ophthalmology, Niigata University

School of Medicine, Niigata, Japan²

○Kogure Mika¹, Tobita Shigeru¹, Hasebe Hiruma²

【目的】

21世紀に入り、我が国の高齢化は急速に進行しており、歯科医療従事者の高齢化も同様のペースで進むものと予想されている。そのため、加齢に伴う心身機能の低下を考慮した作業環境の整備や作業方法の改善などの対策を講ずる必要がある⁽¹⁾。そこで本研究では、高齢者の色覚特性に影響する眼光学系の加齢変化による歯科領域の業務への影響を検討するため、年齢、臨床経験、眼疾患の有無、中心窩網膜厚と色彩識別能力との関連を調査した。

【方法】

- ・対象: 21歳から64歳の男女22例44眼(本学所属の教職員、学生)
- ・方法: 日本眼科学会認定眼科専門医による眼科検診を受診し、矯正視力、眼圧、無散瞳カメラによる眼底検査、光干渉断層計「RS-3000」(ニデック社製)による中心窩網膜厚の測定をした。また、100色相配列検査器「ND-100 Hue Test」(日本色彩研究所製)による色彩弁別能力検査を行った。なお照明にはD₆₅蛍光灯を用い、作業面の照度は1000luxとした。

【成績】

1. 対象の平均は年齢: 33歳±15、矯正視力: 右1.17、左1.19、眼圧: 右14±3、左14.3±3、中心窩網膜厚: 右279±36、左276.2±23 μmであった。40歳以上に白内障や緑内障を有する者が有意に認められたが(p<0.01)、いずれも初期病変と診断され、中心窩網膜厚との間には相関は認められなかった。

2. 色彩弁別能力検査の総偏差点の平均値は80.3±69点であった。年齢と総偏差点の間にr=-0.4の負の相関が認められたが、眼疾患の有無とは相関は認められなかった。さらに臨床経験の有無と総偏差点には有意に相関が認められた(r<0.14, p<0.01)(図1)。

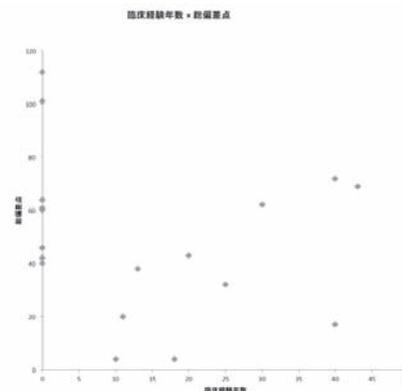
3. 100色相を赤(R)緑(G)青(B)の領域に3分割し、各領域の偏差点と臨床経験の有無について分析したところ、R領域群に負の相関が有意に認められた(r=-0.3, p<0.05)。

【結論】

これまでの研究では、加齢により100色相のR色およびBG色での色彩弁別能力が低下するとされていた⁽²⁾⁻⁽⁵⁾。しかし今回の調査結果から、加齢による眼光学系の基質変化が色彩弁別能力に与える影響は低く、色彩弁別能力は弁別経験を蓄積することで向上しないしは維持することが可能であることが示唆された。

【参考文献】

- [1] 池田和生, 成田長人: 加齢を考慮した情報画面の配色評価・補正支援装置, 映像情報メディア学会誌, 62(7), 1110-1115, 2008
- [2] 大森 正子, 他: 加齢に伴う水晶体白濁度と光源色の色彩識別能力の検討. 日本色彩学会誌 34, 112-113, 2010.
- [3] 仙波 祥子, 他: 100色相配列検査器を用いた色彩弁別能力の判定. 日本歯科技工学会雑誌, 28(2), 190, 2007.
- [4] 吉田 奈央, 他: FM 100 Hue Test における光学的高齢者視覚シミュレーションの検証. 日本色彩学会誌, 33: 4-5, 2009.
- [5] 川口 順子, 他: 100 hue test による高齢者の色彩弁別能力. 日本生理人類学会誌, 10(1): 1-7, 2005.



SS-OCT を用いた象牙質脱灰病変(表層下脱灰)の経時観察と定量評価の試み

東京医科歯科大学 大学院 歯学総合研究科 口腔機能再構築学系 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野¹, 国立
長寿医療センター先端医療部口腔機能再建科², 歯と骨の GCOE³

○中嶋省志¹, サドルアリレザ³, 島田康史¹, 夏目悠子¹, 角保徳², 田上順次³

Longitudinal observation of demineralized dentin with surface layer and quantification by SS-OCT

Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University¹, Division of Oral and Dental Surgery, Department
of Advanced Medicine, National Hospital for Geriatric Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology², GCOE
Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases³

○Nakashima Syozi¹, Sadr Alireza³, Shimada Yasushi¹, Natsume Yuko¹, Sumi Yasunori², Tagami Junji³

【研究目的】 表層を有する脱灰象牙質を人工的に作製し、その病変の経時変化を SS-OCT (Swept Source Optical Coherence Tomography) で断層画像として観察し、一方で TMR (Transverse Microradiography) により脱灰程度 (深さ、ミネラル損失量など) を計測し、SS-OCT にて脱灰程度が推定できるかどうかを検討することである。

【材料及び方法】 表面研磨した牛歯根象牙質 (サンプル) を 7 群に分けそれぞれ一定期間 (1~30 日間) 脱灰した。同時に、SS-OCT (HSL-2000®, Santec, 波長 1260-1360nm) にて、脱灰前後の断層画像を取得した (図 1, 2)。同画像にて、脱灰前線と推察される輝度変化の境界 (boundary) が観察されたので、サンプル表面からそこまでの深さを計測した。また Image J 画像解析ソフトを用いて SS-OCT 画像の断層プロファイル (輝度 dB vs 深さ) を作成し、脱灰量と推定される面積値 (R 値: dB×boundary までの深さの積分値) も算出した。一方、脱灰終了後、サンプルから TMR 用の薄切片を作製し、画像を取得後 (図 3)、解析ソフトにて脱灰パラメータ (深さ、脱灰量: ΔZ 、表層の厚さ、表層でのミネラル密度、病変での最大最低ミネラル密度) を算出した。こうして得られた OCT 情報 (boundary 深さ、断層プロファイル) と脱灰パラメータとの相関性を検討した。

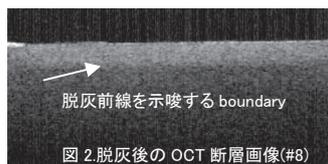
【結果】 1) OCT 画像で推定された脱灰深さ (boundary 深さ) と TMR 解析で得られた脱灰深さとの間に高い相関性を認めた (図 4. Pearson 係数: 0.950)。2) R 値と ΔZ との間にも高い相関性を認めた (図 5. Pearson 係数: 0.850)。3) 断層プロファイルでは、脱灰表層付近では脱灰初期 (~5 日) で dB 値が急上昇したが、その後の脱灰ではむしろ低下した (図 6)。4) 断層プロファイルにおいて、脱灰深さと表層の厚さと関連する「特徴 (ピークや屈曲点など)」が多くのサンプルで見られたが、プロファイルの様子がサンプル間で幾分異なるため、その確証は得られなかった。

【考察】 OCT 画像から脱灰深さを推定できる知見が得られた。また、断層プロファイルからは ΔZ を推定できる知見が得られたが、これは脱灰深さの寄与が大きいことによるもので、必ずしも脱灰による dB 値の変化の寄与とは限らなかった。一方、今回は断層プロファイルにて、脱灰深さと表層の厚さと関連する「特徴」の確証は得られなかった。これは、脱灰後において dB 値に与える要因 (ミネラル密度、露出コラーゲン量、水分量、dB 値の光学的な自然減衰など) が各サンプルによって異なり、「特徴」が現れにくかったと推察された。

【結論】 表層のある象牙質脱灰病変において、OCT 画像からその脱灰深さを推定できることが示された。しかし、それ以外の脱灰パラメータの推定については更なる検討が必要であった。



図 1. 脱灰前の OCT 断層画像 (#8)



脱灰前線を示唆する boundary

図 2. 脱灰後の OCT 断層画像 (#8)

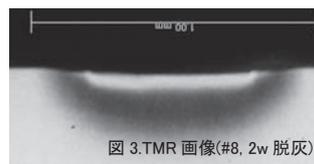


図 3. TMR 画像 (#8, 2w 脱灰)

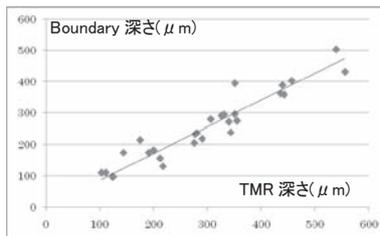


図 4. boundary 深さと TMR 深さとの相関性

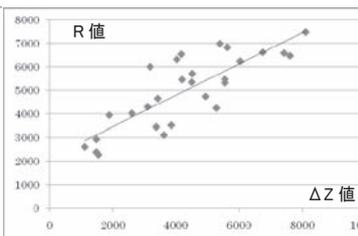


図 5. R 値と ΔZ との相関性

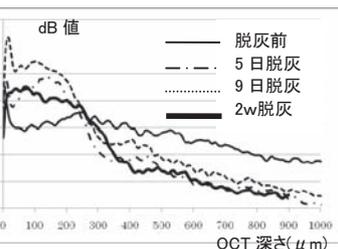


図 6. 断層プロファイルの経時変化 (#8)

OCT イメージ像と各種齲蝕診査機器との比較

日本大学 歯学部 保存学教室 修復学講座¹, 日本大学歯学部 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, 青島歯科医院⁴

○島村穰¹, 黒川弘康^{1,2}, 村山良介¹, 藤井雄介¹, 遠藤肇¹, 山本明¹, 宮崎真至^{1,2}, 釜口昌平³, 三畑幸則³, 青島裕⁴

Comparison of OCT Images with Other Devices for Detecting Carious Lesions

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan¹, Division of Biomaterials Science Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan², J. Morita Tokyo Mfg. Corp, Tokyo, Japan³, Aoshima Dental Clinic, Tokyo, Japan⁴

○Shimamura Yutaka¹, Kurokawa Hiroyasu^{1,2}, Murayama Ryosuke¹, Fujii Yusuke¹, Endo Hajime¹, Yamamoto Akira¹, Miyazaki Masashi^{1,2}, Kamaguchi Syohei³, Mihata Yukinori³, Aoshima Yutaka⁴

【緒言】

光干渉断層画像化法(Optical Coherence Tomography, 以後, OCT)は, チェアサイドで簡便かつ非侵襲的に高解像度の組織精密断層像を得ることを可能とする新たな画像診断システムとして注目されている。これまで演者らは, OCT イメージ像に及ぼす影響因子を検討するとともに, 光重合型コンポジットレジン修復における接着欠陥の検出など, 歯科臨床における応用の可能性と有効性を報告してきた。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, OCT およびその他の齲蝕診査機器を用いて口腔内観察を行い, 得られた情報を比較することで, それぞれの齲蝕検出能および臨床特性について検討した。

【材料および方法】

口腔内の観察は, 日本大学歯学部付属歯科病院保存修復科に通院中で, 本臨床研究の趣旨を理解し, 協力を得られた患者 30 名を対象として行った。すなわち, 齲蝕あるいは齲蝕の疑いのある歯牙 60 本に対して, SLD を光源とし, マイケルソン型光干渉計の応用技術によって構築された, OCT (モリタ東京製作所)を用いて断層像の観察を行った。さらに, 可及的同一部位について, レーザー蛍光法を応用することで非破壊的に齲蝕の進行程度を数値化する DIAGNOdent Pen (KaVo), および白色および青色 LED を光源とし, 齲蝕部位を蛍光の違いとして視覚的に検出する SOPROLIFE (ACTEON)を用いて比較, 検討した。なお, 本臨床研究を実施するにあたっては, 日本大学歯学部倫理委員会の承認を得ている。

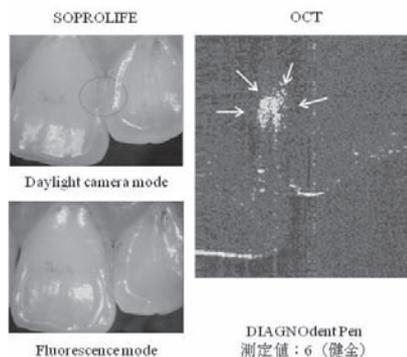
【成績および考察】

OCT イメージ像を観察したところ, 視診では確認が困難な小窩裂溝および隣接面部における初期齲蝕病変を, 健全歯質とは異なるシグナルとして検出することが可能であった。一方, 同一部位を DIAGNOdent Pen および SOPROLIFE を用いて診査したところ, OCT によって検出可能であった齲蝕病変が検出されない, あるいは偽陽性と診断される場合があり, 必ずしも OCT イメージ像と一致するものではなかった。

以上のように, OCT イメージ像と DIAGNOdent Pen および SOPROLIFE の診断結果に違いが認められた原因としては, 後者の 2 装置においては, 歯面に照射したレーザー光線からの蛍光反射を検出する装置であり, そのために観察部位あるいは歯質の性状によって影響が生じたものと考えられた。一方, OCT では, 歯質に対する透過性の高い 1300 nm 付近の近赤外線を照射して, その反射光を検出しているところから, 蛍光性には影響されず, これが齲蝕検出能の違いとなって現れたと考えられた。

【結論】

視診では診断が困難な齲蝕病変に対して, OCT, DIAGNOdent Pen および SOPROLIFE の応用は有効であり, 客観的に齲蝕病変を検出することが可能であった。しかし, 齲蝕の存在する部位, 進行程度あるいは歯質の表面性状など, 齲蝕検出能に影響をおよぼす因子が存在することから, 診査を行う際には, 各装置に適した測定条件を考慮する必要性が示唆された。



SS-OCTを用いた級窩洞における各種フロアブルレジンの接着界面の考察

東京医科歯科大学 歯と骨の GCOE 拠点 う蝕制御学分野¹, 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 う蝕制御学分野², 国立長寿医療センター病院先端医療部口腔機能再建科³

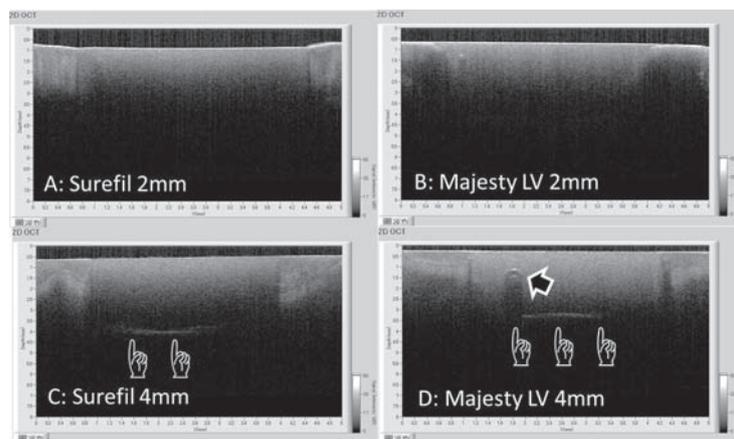
○NAZARI AMIR¹, SADR ALIREZA¹, 島田康史², 田上順次¹, 角保徳³

Evaluation of adaptation of flowable composite resin base in bulk-filled deep class I cavities by SS-OCT

Department of Cariology and Operative Dentistry, Global COE, Tokyo Medical and Dental University¹, Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan², National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu, Japan³

○Nazari Amir¹, Sadr Alireza¹, Shimada Yasushi², Tagami Junji¹, Sumi Yasunori³

[Objective] Low viscosity of flowable composites allows close adaptation to the structures in the floor and walls of the cavity. However, due to polymerization contraction of the resin matrix or other factors create micro-gaps and subsequently increased chance of failure. Recently, new flowable resin composites have been introduced with advanced chemistry which may result in lower shrinkage stress. The aim of this study was to evaluate the prevalence of gap formation at the cavity floor using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT), which is a new noninvasive imaging modality in dentistry. [Methods] Two flowable resin composites; Surefil SDR Flow (Dentsply Caulk, USA) and Clearfil Majesty LV (Kuraray Medical, Japan), an all-in-one step self-etch adhesive Tri-S bond (Kuraray Medical) and 20 human molar teeth were used in this study. Large cavities (5mm diameter; 2 or 4 mm depth) were made at occlusal surfaces of human molar teeth in 4 groups (n=5). The cavities were filled with either Surefil or Majesty LV. The bonding interface at the cavity base was evaluated on cross-sectional images obtained using SS-OCT (Santec, Japan). Due to the depth limitation of SS-OCT imaging, in 4mm groups the cavities were reduced to 2mm after curing. The specimens were then cut and observed under confocal laser scanning microscope (CLSM) to confirm SS-OCT findings. [Results] Surefil showed a homogeneous bulk, while Majesty LV occasionally showed bubbles within the composite. At 2mm depth, both materials showed gap-free interfaces. However, at 4mm some gaps were for both, with Surefil showing significantly higher gap-free slices and continuous interface compared to Majesty LV. Occasionally, a gap was observed between the composite and adhesive in the 4mm groups under CLSM. [Conclusions] It can be concluded that the both Surefil and Majesty have acceptable results for bulk filling up to 2 mm depth. A lower prevalence of gaps in 4mm-deep was observed with bulk placement of Surefil. In addition to good flow and low shrinkage, a tight interface at a deep cavity requires excellent copolymerization between the adhesive and the composite. Supported by GCOE at TMDU. Figure: Representative SS-OCT cross-sectional b-scans of all groups; the fine white line (finger pointer) in (C) and (D) represent gap formation. In (D), the arrow indicates a bubble formed within the composite body.



SS-OCT とナノインデンテーション法による硬化象牙質の光学的ならびに機械的特性

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯蝕制御学分野¹, 東京医科歯科大学 歯と骨のGCOE拠点 歯蝕制御学分野², 国立長寿医療センター病院先端医療部口腔機能再建科³

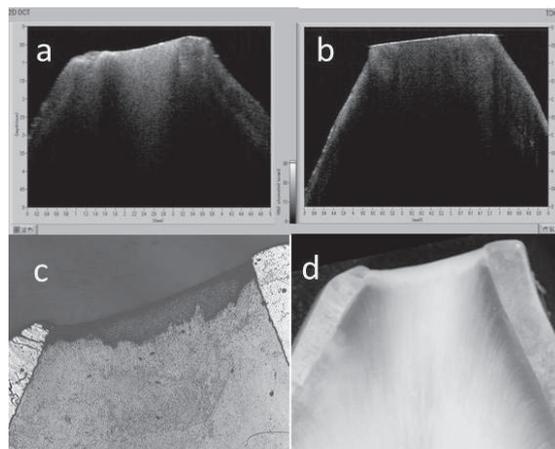
○MANDURAH MONA¹, SADR ALIREZA², 島田康史¹, 田上順次², 角保徳³

Optical and mechanical characterization of sclerotic dentin in attrited teeth using SS-OCT and nanoindentation

Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan¹, Gobaal Center of Excellence Program, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan², National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu, Japan³

○Mandurah Mona¹, Sadr Alireza², Shimada Yasushi¹, Tagami Junji², Sumi Yasunori³

[Objectives]With aging, loss of enamel and dentin due to attrition cause exposure of the dentinal tubules and sclerosis of dentin as a protective response. The aim of this study was to characterize sclerotic dentin by nanoindentation, microscopy, and swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) which is a new noninvasive imaging modality.[Methods]Six anterior and 4 posterior teeth with saucer-shaped occlusal or incisal attrition were selected and compared to control teeth. The exposed dentin was glossy, smooth and slightly discolored. SS-OCT (center wavelength: 1310nm; Santec, Japan) images were taken from the attrition surfaces mesio-distally. The teeth were then into slices longitudinally, fine polished and observed under light microscope and confocal laser scanning microscope (CLSM; Lasertec, Japan). Mechanical properties were evaluated by a nanoindentation technique (Elionix, Japan) under a maximum force of 10 mN. Indentations were located across from the sclerotic and sound dentin up to 1mm depth from surface. [Results]SS-OCT cross-sectional images of attrition teeth were remarkable different from the control, with increased backscatter signal intensity in the sclerotic dentin region probably related to the presence of the sclerotic casts within the dentinal tubules. The corresponding images of light microscope confirmed the lack of orientation of dentinal tubules with discoloration of the superficial region of sclerotic dentin. CLSM images occasionally showed a clear and linear demarcation between the sclerotic dentin with irregular dentinal patterns and the normal dentin with well-organized homogeneous structure of dentinal tubules. The depth of altered dentin was a few hundred micrometers. Mechanical testing of the sclerotic dentin revealed significantly reduced hardness and modulus of elasticity compared to normal dentin. [Conclusion] SS-OCT is a potential noninvasive diagnosis tool for sclerotic lesions on worn surfaces. Clinically, it can assist dentists for their restorative treatments, especially for the elderly patients. (study was supported by GCOE at TMDU) [Figure] Lower central incisor (a) SS-OCT images of the tooth with attrition shows increased backscatter from the sclerotic dentin different from sound dentin in control specimen (b). (c, d) CLSM and light-microscopy images of the same cross-section as seen in (a) after cutting.



紫色半導体レーザーを用いたレジンの光重合 —各種重合開始剤による機械的性質の比較—

東京歯科大学 千葉病院 総合診療科¹, 東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 摂食機能保存学講座
う蝕制御学分野²

○亀山敦史¹, 加藤純二², 春山亜貴子¹, 寺岡裕美¹, 高瀬保晶¹, 角田正健¹

Light-curing of unfilled resins with violet laser diode: The effect of photoinitiator on mechanical strength

Division of General Dentistry, Tokyo Dental College Chiba Hospital¹, Cariology and Operative Dentistry, Graduate School,
Tokyo Medical and Dental University²

○Kameyama Atsushi¹, Kato Junji², Haruyama Akiko¹, Teraoka Hiromi¹, Takase Yasuaki¹, Tsunoda Masatake¹

【目的】 紫色半導体レーザーは生体軟組織の蒸散・切開、二酸化チタン配合漂白材料の光源としてなど、歯科領域への幅広い応用が期待されている。現在、光重合型レジン系歯科材料の多くは重合開始剤としてカンファーキノンを採用しているが、中には他の重合開始剤が補助的に添加されている製品も少なくない。一般に、これらの重合開始剤は紫外線～可視青紫色領域に吸収波長を有しているため、紫色半導体レーザーを重合用光源として使用できる可能性がある。そこで本研究では、各種重合開始剤を添加した試作レジンに対して紫色半導体レーザーを照射し、硬化体の機械的性質を比較、検討した。

【材料および方法】 重合開始剤としてカンファーキノン(CQ)、1-phenyl-1,2-propanedione(PPD)または2,4,6-trimethylbenzoyl diphenylphosphine oxide(MAPO)を1%添加したフィラー未配合のレジンを試作し、本研究に用いた(以下、Exp-CQ, Exp-PPD, Exp-MAPO)。また、重合用光源には紫色半導体レーザー(VLM 500, 住友電気工業, 波長409nm)、および2種類のLED型光照射器(キュアノス, 松風;G-ライトブリマ, ジーシー)を用いた。なお、G-ライトブリマではノーマルモード、PLモードについてそれぞれ検討を行った。

1. 試作レジンの光透過特性

試作レジンに広範囲波長光(210-2000nm)(DH-2000, Ocean Optics)を照射し、高分解能マルチチャンネル分光器(USB4000, Ocean Optics)を用いて光透過特性を計測した。

2. 微小引張り強さの測定

内径9mm, 高さ0.6mmのアクリルフレームに各種試作レジンを填入し、スライドガラス圧接下にて60秒間の光照射を行った。硬化体をフレームから取り出し、37°C水中に遮光下で静置保管した。24時間経過後、ダイヤモンドポイントを用いて硬化体を砂時計型に成形し、万能試験機(Tensilon RTC-1150-TSD, オリエンテック)を用い、クロスヘッドスピード1.0mm/minにて硬化体の微小引張り強さを測定した。

【結果および考察】 試作レジンの光透過特性:Exp-CQ, Exp-PPDでは、それぞれ430-490nm, 360-485nmの範囲で光の透過率が減少した。またExp-MAPOでは366nm, 381nm, 396nmに下向きのピークが出現した。微小引張り強さ:キュアノスを用いた場合、Exp-CQ, Exp-PPDはそれぞれ101.2±13.7MPa, 87.2±18.9MPaであったのに対し、Exp-MAPOでは49.9±7.0MPaと有意に低かった(p<0.05)。これは、Exp-MAPOの吸光スペクトルとキュアノスのスペクトルが不一致であるためと思われる。一方、G-ライトブリマ(ノーマルモード)を用いた場合は、Exp-CQ, Exp-PPD, Exp-MAPOでそれぞれ102.1±18.1MPa, 99.4±24.7MPa, 92.5±13.1MPaを示し、3群間に有意差を認めなかった(p>0.05)。また、Exp-MAPOにおいて、ノーマルモードを用いた場合とPLモードを用いた場合との間に有意差を認めなかった(p>0.05)ことから、弱い紫色光を照射するとExp-MAPOを十分に硬化できることが確認された。VLM 500を用いた場合、Exp-CQ, Exp-PPD, Exp-MAPOでそれぞれ97.9±21.9MPa, 92.2±9.9MPa, 80.3±6.3MPaを示し、3群間に有意差を認めなかった(p>0.05)。これらの結果から、パワー密度の高い紫色光を用いることで、CQのように本来紫色光に反応しにくい吸光スペクトルをもつ重合開始剤でも重合できることが明らかとなった。

【結論】 光重合型レジンの重合用光源として紫色半導体レーザーの有用性が示唆された。

本研究は科学研究費補助金 若手研究(B) 21791864 の助成を受けて行われた。