

レジンの象牙質接着強さに及ぼす残存象牙質厚さの影響について

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 歯制御学分野¹,
Naresuan 大学修復学講座², 歯と骨の GCOE³
○吉川孝子¹, WATTANAWONGPITAK Nipaporn², 趙 永哲¹, 田上順次^{1,3}

Effect of RDT on Resin Composite Bond Strength to the Dentin

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University¹, Dept. of Restorative Dentistry, Naresuan University², GCOE Program; IRCMSTBD³
○YOSHIKAWA Takako¹, WATTANAWONGPITAK Nipaporn², CHO Eitetsu¹, TAGAMI Junji^{1,3}

【研究目的】

レジンの接着強さは、平坦面の象牙質被着体に対して評価されることが多いが、残存象牙質厚さが少ないとレジンの象牙質への接着強さが低下することが報告されている。そこで本研究では、各種ボンディングシステムを使用したレジンの接着強さに及ぼす残存象牙質厚さの影響について検討した。

【材料および方法】

ヒト抜去大白歯の咬合面エナメル質を削除し、600番のシリコンカーバイドペーパーで仕上げた象牙質平坦面を製作した。3種の接着システム；Clearfil Mega Bond (MB: Kuraray Medical)、Single Bond (SB: 3M ESPE)、Clearfil Tri-S Bond (TB: Kuraray Medical)を用い業者指示に従い処理した後、Z-100 (3M ESPE)のレジンを3x5x2mm(C-factor=0.3)に築盛し、実験用ハロゲンランプ電圧可変光照射器(GC)を用い、出力600 mW/cm²で40秒間光照射を行い重合硬化させた。37℃暗所水中に24時間保管後、試料中央部から長軸方向に、約1mm²の試片を切り出した。これら試片の残存象牙質厚さ(RDT)を測定した後、試片の両端を試験装置にシアノアクリレートで接着し、これをEZ test (島津製作所)に装着して、クロスヘッドスピード1mm/minで微小引張り接着強さ(μ-TBS)を測定した。接着強さはRDTにより、1~4 flatの4群に分けた。1 flat: RDT<2 mm, 2 flat: 2 ≤<3 mm, 3 flat: 3 ≤<4 mm, 4 flat: ≥ 4 mm。測定値(n=8)は、Bonferroni testを用いて統計処理を行った。微小引張り接着強さ測定後の試料破断面は走査電子顕微鏡にて観察し、接着界面の破壊様式を分類し評価した。

【成績ならびに考察】

RDTが4mm以上の群においては、Clearfil Mega Bondの接着強さが最も高く、以下Single Bond、Clearfil Tri-S Bondの順に有意に低くなった。ツーステップセルフエッチングシステムのClearfil Mega BondはRDTが増すと、有意に接着強さが高くなった。一方、トータルエッチングシステムのSingle Bondは、どちらのRDTでも同程度の接着強さを示した。ワンステップセルフエッチングシステムのClearfil Tri-S Bondは、RDT2mm未満の群は、2mm以上のどの群より有意に低い接着強さを示した。残存象牙質厚さが少ない歯髓腔に近接している部分は、象牙細管の直径が大きく、象牙細管密度が高いことにより、管間象牙質の面積が少ないことにより接着強さが低下したものと考えられる。

Adhesive system	1 flat	2 flat	3 flat	4 flat
MB	60.7 (6.0) ^{a,A}	75.0 (5.6) ^{a,A}	76.9 (4.4) ^{a,A}	84.6 (6.8) ^{a,A}
SB	65.3 (4.2) ^b	66.2 (3.6) ^a	67.0 (4.9) ^a	65.9 (6.2) ^a
TS	39.9 (3.2) ^{a,b,A,B,C}	53.0 (1.4) ^{a,A}	49.3 (4.1) ^{a,B}	51.2 (3.7) ^{a,C}

Intergroup data designated with same superscript small letters each adhesive are significantly different (p<0.05).

Intergroup data designated with same superscript capital letters each RDT are significantly different (p<0.05).

【結 論】

全ての群でClearfil Mega Bondが最も高い接着強さを示した。Clearfil Mega Bondの接着強さはRDTと高い相関があり、Single Bondの接着強さはRDTの影響を受けず、Clearfil Tri-S Bondの接着強さはRDTが2mm未満の場合のみ低下することが明らかとなった。レジンの象牙質接着強さへ及ぼすRDTの影響は、ボンディングシステムにより異なる傾向を示すことが示唆された。

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金#22592115ならびに歯と骨のグローバルCOEプログラムにより行われた。

STD-NMR 法を用いたコラーゲンモデルと接着性モノマー相互作用の分析

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

○平石典子¹, 大槻昌幸¹, 田上順次^{1,2}

STD-NMR studies on the interaction of adhesive monomers with collagen model peptide

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University¹, GCOE Program at Tokyo Medical and Dental University²

○HIRAISHI Noriko¹, OTSUKI Masayuki¹, TAGAMI Junji^{1,2}

【諸言 目的】

現在の接着性モノマーの開発で、歯質への接着は大いに向上した。しかし、接着界面での分子レベルでの解析はまだ十分に行われていないのが現状である。分子レベルでの解析法の一つである NMR を応用した歯科接着性モノマーのスクリーニングは、モノマーの加水分解、またはミネラルとの相互作用が報告されている。しかし象牙質有機質との相互作用は未発表であり、コラーゲンと接着性モノマーの結合性、複合体としての動向は興味深い分析である。今回我々は飽和移動差 (Saturation Transfer Difference, STD)NMR 法を用い、コラーゲンモデルと接着性モノマーの相互作用を評価し、コラーゲンに対する接着性モノマーの相互作用部位 (エピトープ) を解析した。

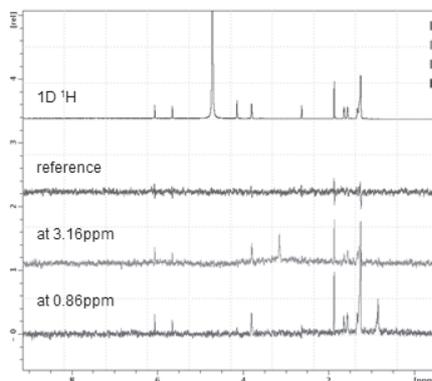
【方法】

化合物 (4-META, MDP) はすべて *d*-DMSO に溶解後、最終 1 mM に調整(最終 *d*-DMSO は 5%)した。コラーゲン分子の mono helical chain の ペプチドモデルを Gly Pro Hyp (M.W. 3000), また N-, C-両末端のテロペプチドを酵素処理し水溶性を高めた Triple helical コラーゲンモデルを使用した。ペプチドモデルは最終 50 μ M に調製、Triple helical 水溶性コラーゲンは飽和溶液を 20 倍に希釈して最終サンプルとした。バッファー条件は 50 mM *d*-Acetic acid NaOD (pD 4.0), 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% NaN₃ in D₂O とした。NMR 測定は全て Bruker 800 MHz equipped with CryoProbe を用い、温度 298K にて行った。1D 1H 測定の条件は 16384 pts x 8 scans, inter delay (D1)= 3sec で、1H STD の測定条件は 16384 pts x 512 scans, d1 = 3 sec でそれぞれ行った。

【結果 考察】

4-META と MDP についてはペプチドモデル、コラーゲンモデルともに STD を観測することができた。結合の強度は 4-META よりも MDP が強いことが示唆され、MDP については積算回数を増やした測定を行い、STD を再確認した。これらの結果より、MDP 配合の接着性レジンにて象牙質を接着した場合、接着界面でコラーゲンと結合し、より安定した複合体を構築し、強い接着強さを生み出すものと示唆できた。

水溶性コラーゲンモデル V.S. MDP 積算回数 3072 回



26

ガラスイオノマーセメントの表面処理条件がコンポジットレジンとの接着に及ぼす影響 -表面自由エネルギーからの検討-

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門², 若松歯科医院³,
○大塚詠一朗¹, 小倉由佳理¹, 白玉康司¹, 太田舞子¹, 吉田武史¹, 高見澤俊樹^{1,2},
瀧川智義^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 若松英輝³

Influence of surface treatment of glass-ionomer cements on bond strength with resin composite -A surface free energy perspective-

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry, Wakamatsu Dental Clinic³
○OTSUKA Eiichiro¹, OGURA Yukari¹, SHIRATSUCHI Koji¹, OTA Maiko¹, YOSHIDA Takeshi¹,
TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2}, TAKIGAWA Tomoyoshi^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, WAKAMATSU Hideki³

【研究目的】

コンポジットレジン修復に先立って、ガラスイオノマーセメント（以後、GIC）を裏層材として用いるサンドイッチテクニックが行われている。この臨床技法において、GICとコンポジットレジンとの良好な接着が必要でありGIC表面の処理法について検討がされてきた。しかし、その検討の多くは剪断あるいは引っ張り試験などの力学的強度試験を指標として評価してきたのが現状である。

そこで演者らは、GICとコンポジットレジンとの接着機構を解明する研究の一環として、GICの表面処理条件がコンポジットレジンとの接着性に及ぼす影響について、剪断接着強さ試験とともに表面自由エネルギーを指標として検討した。

【材料および方法】

供試したGICは、Fuji IX (GC), Fuji II LC EM (GC), Fuji LC Flow (GC)および試作GICであるEHM-10 (GC)の、合計4種類とした。また、光重合型コンポジットレジンとしては、Clearfil AP-X (Kuraray Medical)を用いた。

1. 表面自由エネルギーの測定

供試したGICを製造者指示に従って練和し、硬化後SiCペーパーの#600まで研削し、測定面とした。その表面処理としては、リン酸エッチング、セルフエッチングプライマー、シランカップリングおよびサンドブラストとした。これらの試片を、全自動接触角計 (DM500, 協和界面科学) 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。また、被着面に表面処理を施すことなく測定を行ったものをコントロールとした。

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、表面処理を施した試片に対し、レジンをペーストを充填し、接着試験用試片を製作した。これらの試片は、37℃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

GICとコンポジットレジン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、その接合界面を観察した。

【成績および考察】

表面処理後の表面自由エネルギーは、未処理面と比較していずれの製品においても高い値を示すとともに表面処理法の違いによって異なるものであった。このことは、異なる表面処理によってGIC表面の改質あるいは表面性状の変化が生じ、表面自由エネルギーが向上したことを示すものと考えられた。表面処理後のGICに対するコンポジットレジンとの接着強さは、未処理面と比較していずれの条件においても高くなる傾向を示した。これは、被着面の処理によって、その界面化学および機械的嵌合力の変化が生じたためと考えられた。

【結論】

ガラスイオノマーセメントに対するコンポジットレジンとの接着強さに関して、表面自由エネルギーをパラメーターとして検討することが可能であり、これによって最適な表面処理法を提示できる可能性が示された。

種々の被着体に接着性を有する多目的接着システムのレジン接着について
第1報 レジンと象牙質を同時接着処理した場合のレジンの接着強さ

愛知学院大学歯学部保存修復学講座

○杉尾憲一, 森田有香, 佐藤かおり, 富士谷盛興, 千田 彰

Resin-Bond of Multipurpose Adhesive System to Various Adherents
Part 1 Resin-Bond Strengths to Simultaneously Conditioned Resin and Dentin

Aichi Gakuin University, Department of Operative Dentistry

○SUGIO Kenichi, MORITA Yuka, SATOH Kaori, FUJITANI Morioki, SENDA Akira

【緒言】

MI の理念に基づいた歯科治療では、二次う蝕または辺縁の着色など欠陥が認められる修復に対しては、それらの臨床状況により補修修復が選択肢となる。また、この補修修復も含め、1 歯の修復に異なる材料で修復(複合修復)する場合もある。すなわち、コンポジットレジンを用いた MI 修復法では、歯質のみならずレジン、セラミクス、金属、セメントなど種々の被着体に対し、各々の接着処理が行われ、さらにこれらの被着体の種類によりレジンの接着性には差が生じる可能性がある。このような被着体によってレジンの接着性能に差がある場合は、修復部位の形態的な影響(C-factor)と同様にレジン修復の臨床経過に重大な問題を生じる可能性をもつ。従って、被着体間でレジンの接着強さに差異のないバランスのとれた接着材を用いれば、これらのリスクの減少と接着耐久性向上が期待できると考えられる。最近、エナメル質、象牙質、金属、ジルコニアあるいはアルミナ等に対して接着性をもつ多目的接着システムが開発された。そこで、種々の被着体を本接着システムにより同時処理した場合のレジンの接着性について検討することにし、本研究では、まず象牙質とコンポジットレジン被着体とした場合のレジンの接着性について検討した。

【材料および方法】

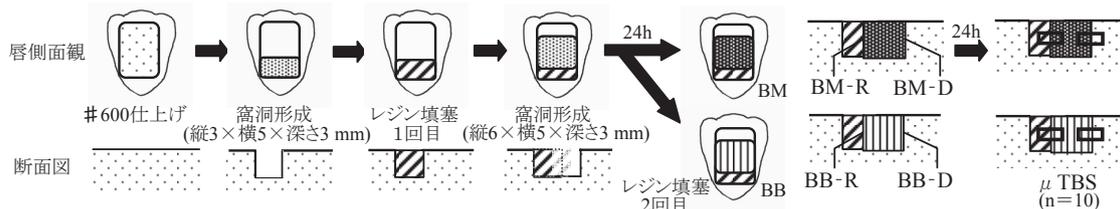


図 試料調製方法ならびに実験群

表 2回目のレジン充填時の接着処理方法

BM処理群	ビューティボンドマルチ塗布10秒→ビューティボンドマルチ PRプラス 5秒(アジテーション)→光照射10秒→ビューティフィル II 充填
BB処理群	リン酸処理10秒→松風ボーセレンプライマー塗布10秒→ビューティボンド塗布10秒→光照射10秒→ビューティフィル II 充填

本実験で使用した材料を表に示す。また、試料調製方法と実験群を図に示す。ウシ抜去切歯歯冠部唇側象牙質に、箱型窩洞を形成後、レジン充填し、37℃蒸留水中に24時間保管した。その後、充填したレジンが露出するように、箱型窩洞を形成し(図)、表に示す接着処理を行った後、レジンを追加充填し、37℃蒸留水中に24時間保管した。BM処理群のうち、窩壁が象牙質のものをBM-D群、レジンのものをBM-R群とし、BB処理群も同様にそれぞれBB-D群、BB-R群とし、各群の接着強さを微小引張り試験により検討した。得られた測定値は、Bonferroni/Dunnの多重比較検定を用いて有意水準5%にて統計処理した。また接着面試験後の破断面の破壊形態を実体顕微鏡で観察した。

【結果および考察】

得られた接着強さは、28.1±6.6 MPa (BM-R群)、19.4±5.5 MPa (BM-D群)、24.3±5.9 MPa (BB-R群)、20.6±5.9 MPa (BB-D群)であった。各群間における有意な差は認められなかった。また微小引張り試験後の破壊形態は、BM-R群、BB-R群においてはレジン内凝集破壊が認められ、BM-D群、BB-D群では界面破壊が多かった。

【結論】

本研究で用いられた多目的接着システムは、レジンと象牙質を同時処理したときの被着体間での接着強さに差異がなかった。従来のボンディング材に比べて、ステップの簡略化が図られたにも関わらず、ほぼ同等の接着強さが得られた。

Er:YAG レーザー照射歯質に対するコンポジットレジン修復物の窩壁適合性に関する研究
大阪歯科大学 歯科保存学講座
○保尾謙三, 吉川一志, 山本一世

Study on Marginal Adaptation of composite restorations to Dental Hard Tissues Irradiated
by Er:YAG Laser

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University
○YASUO Kenzo, YOSHIKAWA Kazushi, YAMAMOTO Kazuyo

【研究目的】 歯の硬組織の除去に優れた Er:YAG レーザー (以下レーザー) は臨床応用されているが, レーザー照射象牙質面は切削象牙質面と比較してコンポジットレジンの接着強さや辺縁封鎖性が低下することが報告されている. 以前我々は, レジン添加型ガラスイオノマーセメントによる被膜裏層が, レーザー照射象牙質に対するコンポジットレジン修復における辺縁封鎖性の改善に有効であり, その理由はコンポジットレジンの重合収縮応力を緩和することによるものであると報告した (第 10 回日本歯科用レーザー学会学術大会). 今回, コンポジットレジンの重合収縮応力を緩和する方法としてレーザー照射歯質に対してコンポジットレジンの積層充填を行い, 辺縁封鎖性を検討したので報告する.

【材料と方法】 レーザー照射装置として Erwin® Adver1 (MORITA) を用い, C600F チップを使用, 先端出力 100mJ, 10pps とした. 被膜裏層材に, 従来型ガラスイオノマーセメント GC LINING CEMENT (GC, 以下 LI) を使用した. ボンディング剤に 1 ボトル 1 ステップシステム G-BOND PLUS (GC, 以下 GP) を, 光硬化型コンポジットレジンに SOLARE (GC, 以下 SO) を使用した.

辺縁漏洩試験: 抜去ヒト大臼歯を被験歯とし, 近遠心側歯頸部に長径 3mm・幅径 2mm・深さ 1.5mm の楕円形窩洞を形成した. レーザー照射は窩洞内面全体に, LI による被膜裏層はレーザー照射後の窩洞象牙質面にのみ行った. 別途記載した各条件通りに処理と接着操作を行い, 接着後 37°C 水中に 24 時間保管した. その後, 5-55°C・2000 回のサーマルストレスを負荷し, 色素浸透試験を行った. エナメル質側, 象牙質側それぞれについて 0~3 のスコアリングを行い, Mann-Whitney 法により有意差を検討した (n=10).

【結果ならびに考察】 エナメル質側については有意差は認められなかった. 象牙質側については, レーザー非照射の切削群と比べて Er, LI 群は優位に高い漏洩度を示した. 切削群と比べて IF1, IL1, IF2, IL2 群は優位に高い漏洩度が認められ, レーザー照射の Er 群ならびに被膜裏層を行った LI 群と比べて, 同程度の漏洩が認められた. IF1, IL1, IF2, IL2 群はそれぞれの間に漏洩に有意差は認められなかった. 本実験で行ったコンポジットレジンの積層充填の方法では, レーザー照射象牙質に対するコンポジットレジン修復時の重合収縮応力を十分に緩和できなかった可能性が示唆される.

本研究は, 平成 22 年度大阪歯科大学学術研究奨励助成金 (研究課題番号 10-01) により行った.

各群の接着条件

①削群	窩洞形成→GP処理→SOをBulk充填	④IF1群	窩洞形成→レーザー照射→GP処理→SOを積層充填(エナメル質側から)
②Er群	窩洞形成→レーザー照射→GP処理→SOをBulk充填	⑤IL1群	窩洞形成→レーザー照射→LI塗布→GP処理→SOを積層充填(エナメル質側から)
③LI群	窩洞形成→レーザー照射→LI塗布→GP処理→SOをBulk充填	⑥IF2群	窩洞形成→レーザー照射→GP処理→SOを積層充填(象牙質側から)
		⑦IL2群	窩洞形成→レーザー照射→LI塗布→GP処理→SOを積層充填(象牙質側から)

新規開発オールインワン接着システムを用いた歯頸部修復の接着信頼性 に及ぼす口腔内環境想定複合ストレスによる影響

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座¹、ハーバード大学歯学部修復学生体材料学講座²

○前野雅彦¹、秋山沙絵子¹、小川信太郎¹、山田 正¹、原 学¹、
柵木寿男¹、奈良陽一郎¹、勝海一郎¹、I. L. Dogon²

Effect of combination stress simulating intra-oral environment on bonding reliability of cervical resin composite restoration with a newly developed all-in-one adhesive system

Dept. of Endodontics and Operative Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University¹

Dept. of Restorative Dentistry and Biomaterials Sciences, Harvard School of Dental Medicine²

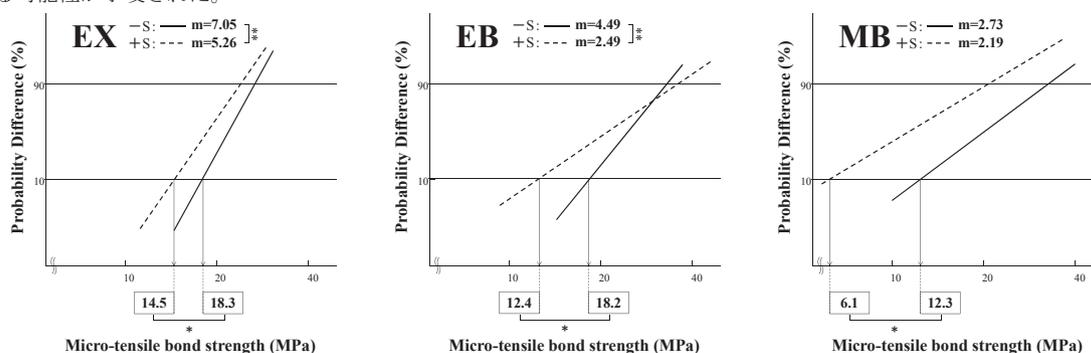
○MAENO Masahiko¹, AKIYAMA Saeko¹, OGAWA Shintaro¹, YAMADA Tadashi¹, HARA Manabu¹,
MASEKI Toshio¹, NARA Yoichiro¹, KATSUUMI Ichiroh¹, DOGON I. L.²

【研究目的】 今日、簡便な操作性と優れた歯質接着性を兼備したオールインワン接着システムの研究開発が進み、臨床においても広く普及している。しかし、それらシステムを用いたコンポジットレジン修復に対する口腔内ストレスによる影響は多様性を示す。そこで本研究では、新規開発のオールインワン接着システムに注目し、当該システムを用いた歯頸部修復の接着信頼性を明らかにすることを目的に、口腔内環境想定複合ストレスの有無を条件とした微小引張接着強さ(μ-TBS)に基づく評価検討を行った。

【材料および方法】 被験歯には、本学部研究倫理委員会の承認を得てヒト抜去健全下顎小白歯 60 本を用いた。被験材料には、新規開発オールインワン接着システムである EXL759 (EX, 3M ESPE) を選択し、また現在市販されている先行システム: Adper Easy Bond (EB, 3M ESPE) ならびに優れた歯質接着性を具備しているとの国内外評価を得ている 2 ステップ型セルフエッチングプライマーシステム: Clearfil Mega Bond (MB, クラレメディカル) を対照として用いた。なお、修復用コンポジットレジンには各製造者推奨の光重合型コンポジットレジンを用いた。評価に際しては、まず被験歯に対し、歯頂側壁がエナメル質と象牙質によって、歯肉側壁が象牙質のみによって構成される規格化 V 字状窩洞を形成した。ついで、製造者指定の歯面処理、修復用レジンの一塊充填、光照射を行い、37℃湿ボックス中に 24 時間保管後、Soflex® XT (3M ESPE) による一連の研磨を行った。修復試料は複合ストレス非負荷群(-Stress : -S) と負荷群(+Stress : +S) に区分し、4℃/60℃間 (各 15 秒間浸漬) 1,250 セットのサーマルサイクリングと 12 kgf×10 万回 (90 回/分) の繰り返し荷重による同時負荷を加えた。ついで、全試料は窩洞中央部を歯軸と平行に半切研磨後、近心・遠心 2 試料それぞれから厚さ 1.0 mm の板状切片を切り出し、歯肉側壁中央部の象牙質面に対する μ-TBS 値測定のために、被着面積 1.0mm²、最狭部幅・厚さ・平行部長さ各 1.0 mm の規格化ダンベル状試料に調整し、テストスピード 1.0 mm / min 下における μ-TBS 値の測定(n=20)を行った。なお、μ-TBS 値はメジアンランク法によるワイブル分析によって統計学的解析を行った。

【成績】 3 種システムの下 S / +S 条件下における μ-TBS 値 (MPa) は、EX : 23.8 (3.8) / 20.5 (4.1)、EB : 27.4 (6.4) / 26.8 (10.7)、MB : 24.8 (9.3) / 14.9 (8.2) であった。下図に、ワイブル分析から得た各システムの μ-TBS 値と累積破壊確率との関係における複合ストレス有無間の違いを示す。3 種システムの下 S / +S 条件下におけるワイブル係数 (m 値) は、EX : 7.05 / 5.26、EB : 4.49 / 2.49、MB : 2.73 / 2.19 であった。m 値に対する有意差検定の結果、EX は EB と同様に +S 値が -S 値より有意 (p<0.01) に小さく、+S 値と -S 値が同等を示した MB とは異なる信頼性の挙動を呈することが判明した。しかし、EX の m 値は -S 条件下において EB 値と同等、MB 値より有意 (p<0.01) に大きく、+S 条件下で EB 値・MB 値より有意 (p<0.01) に大きいことが判明した。また、臨床的意義が高いと考えられる累積破壊確率 10% における推定破壊応力値はシステムにかかわらず +S 値が -S 値より有意 (p<0.05) に小さい。しかし、EX の +S 推定破壊応力値は EB・MB 値より有意 (p<0.05) に大きな値を示し、接着破壊耐性に優れていると考えられる。

【考察ならびに結論】 新規開発のオールインワン接着システム: EXL759 を用いた歯頸部修復は、口腔内環境想定複合ストレス負荷条件下であっても EB・MB より優れたシステム固有の接着強さ獲得のための信頼性を具備していた。したがって、当該システムを用いた修復は、苛酷な口腔内環境にあっても堅固な接着を維持し、良好な予後獲得に寄与する可能性が示唆された。



Difference in probability of failure against micro tensile bond strength between with and without combination stress

シングルステップアドヒーシブの表面処理がエナメル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¹、総合歯学研究所生体工学研究部門²
長崎大学大学院歯薬学総合研究科 小児顎口腔発達管理学分野³、医療法人社団刀圭会 協立病院⁴
○坪田圭司^{1,2}、瀧本正行¹、古宅真由美¹、井上直樹¹、
渡邊孝行¹、宮崎真至^{1,2}、細矢由美子³、長谷川 賢⁴

Effect of application methods of single-step adhesives on enamel bond strength

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center², School of Dentistry, Nihon University, Department of Pediatric Dentistry, Course of Medical and Dental Science, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences³, Toukeikai Kyouritsu Hospital⁴
○TSUBOTA Keishi^{1,2}, TAKIMOTO Masayuki¹, KOTAKU Mayumi¹, INOUE Naoki¹,
WATANABE Takayuki¹, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, HOSOYA Yumiko³, HASEGAWA Ken⁴

【研究目的】

近年、光重合型レジン接着システムとして、操作ステップを簡略化したシングルステップアドヒーシブの臨床使用頻度が増加している。これに伴って、多くの製品が市販されているが、アドヒーシブの塗布法は製品によって異なっており、テクニックセンシティブ因子になることが懸念される。

そこで演者らは、シングルステップアドヒーシブの臨床術式を確立する研究の一環として、アドヒーシブの塗布方法がエナメル質接着性に及ぼす影響について、接着試験およびSEM観察を行うことによって検討した。

【材料および方法】

供試したシングルステップシステムは、G-Bond Plus (GC)、iBond Self Etch (Heraeus Kluzer)、Optibond All in One (SDS Kerr) および Xeno V (Dentsply) の4種類とした。

接着試験用試片の製作には、被着体としてヒト抜去智歯を用い、エナメル質をSiCペーパー#600まで順次研磨した。歯面処理法としては、アドヒーシブの塗布をアジテーションで行う群と行わない群の2条件を設定し、塗布回数と時間は製造者指示条件で行った。また、シングルステップシステムのエナメル質接着性を向上させることが知られているリン酸エッチングによる前処理による影響も併せて検討した。規定した歯面処理を行った後、Ultradent shear bond deviceを用いて、レジンペースト (TPH[®], Dentsply) を充填、照射を行い、これを接着試験用試片とした。次いで、これらの試片は37°Cの精製水中に24時間保管、あるいは24時間保管後に、5°C⇄55°Cを1サイクルとするサーマルサイクルを4000回負荷した。所定の保管期間が経過した後、万能試験機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求めた。なお、各条件における試片の数は10個とした。また、各条件間の有意差検定は多群比較検定で行った。

アドヒーシブ処理後のエナメル歯面に関しては、電子顕微鏡 (Miniscope TM3000, 日立ハイテクノロジーズ) を用いて、通法に従って観察を行った。

【成績および考察】

供試した全てのシングルステップアドヒーシブの24時間後のエナメル質接着強さは、アジテーションを行った群で向上する傾向が認められた。一方、リン酸エッチングによる前処理を行った条件では、アジテーションを行わないもので接着強さが高くなる製品が認められた。エナメル質に対するサーマルサイクルの影響においては、負荷後に接着強さが向上、低下あるいは変わらないものなど製品によって異なる傾向を示した。また、リン酸エッチングの影響においては、いずれの製品においてリン酸エッチングを行った群で接着強さが高くなる傾向を示した。アジテーション塗布によって接着強さが向上、低下あるいは変わらないものなど製品により違いが認められた。このように、塗布法によって接着強さに違いが認められた理由としては、エッチングパターンの影響、機能性モノマーとアパタイトとの反応性、あるいは硬化させたアドヒーシブに残留している溶媒などの影響による重合性などが関係しているものと考えられた。

【結論】

供試したシングルステップ接着システムは、アジテーション群が、これを行わないものに比較して有意向上する傾向が認められた。しかし、リン酸エッチングによる前処理を行った群ではアジテーションで塗布した群で接着強さが低下する製品もあることから、臨床では塗布方法を十分に留意する必要があることが示唆された。

ワンボトル・セルフエッチボンディング材を応用した新規デュアルキュアレジンコアシステム(MTB-200/NDC-100)
の根管壁象牙質に対する接着性能

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

○ティッタウィーラット スッパソン, 中島正俊, 田上順次

Micro-tensile bond strength of a newly-developed resin core system (MTB-200/NDC-100) to root canal dentin

Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

○THITTHAWEEERAT Suppason, NAKAJIMA Masatoshi, TAGAMI Junji

Introduction Dual-cure adhesive systems have been developed for the bonding placements of indirect restoration in vital tooth and core build-up/prefabricated fiber post in non-vital tooth, in which it is required to chemically polymerize resin material with absent of light penetration. However, there is still limitation for bonding to deeper region of root canal because dual-cure adhesive with chemical activation has slower polymerization behavior and lower mechanical properties than that of light activation. Recently, a newly-developed 1-bottle self-etch adhesive: MTB-200 has been introduced, which was reported to have superior bonding performance to coronal dentin. MTB-200 is a light-cure adhesive, but can chemically polymerize without light activation in conjunction with an accompanying dual-cure core material (NDC-100), due to polymerizing reaction between a chemical accelerator in MTB-200 and a chemical initiator in DNC-100. The purpose of this study was to evaluate the bonding efficacy of a newly developed resin core system (MTB-200/NDC-100) with different activation mode of the adhesive to root canal dentin.

Materials & Methods The 36 post spaces (depth of 8 mm; diameter of 1.5 mm) were prepared in extracted human lower premolars using FiberKor drill. Two dual-cure resin core systems (Clearfil DC Core system:CDB/CDC and New experimental system: MTB-200/NDC-100, Kuraray) were used in this study. The adhesives were applied to root canal dentin surface according to the manufacturer's instruction, followed by light activation for 10s (LA10s), 20s (LA20s) or none (CA). After filled into post space, resin core materials were light activated for 60s (Optilux 501) and then all specimens were stored in water for 24 hours. Each bonded specimen was serially sectioned into 8, 0.6 x 0.6-mm thick beams for the μ TBS test. EZ testing machine was used to measure the bond strength values at crosshead speed 1mm/min. The failure mode was also observed after testing using SEM. 3way-ANOVA and Dunnett's T3 test were used for statistical analysis of the bond strength values. The failure mode was statistically analyzed using Chi-square test.

Results The micro-tensile bond strengths (MPa) are presented in Table.

Resin core system	CDB / CDC			MTB-200 / NDC-100		
	Adhesive activation modes	CA	LA10s	LA20s	CA	LA10s
Coronal	n.d.	37.14±5.06 ^{B2}	39.60±6.22 ^{B2}	31.66±7.71 ^{A2}	37.85±3.6 ^{B2}	39.51±7.22 ^{B2}
Apical	n.d.	26.32±5.76 ^{ab1}	30.91±2.23 ^{c1}	24.89±6.96 ^{a1}	30.24±4.8 ^{bc1}	32.54±2.58 ^{c1}

All values are mean±SD. The same superscript letter and number mean no statistical differences in each row and column, respectively ($p>0.05$). n.d.= No data available.

Conclusions For both materials, there were significant differences in the μ TBS to root canal dentin among light and chemical activation mode. When using chemical activation, MTB-200/NDC-100 was higher bond strength to root canal dentin than CDB/CDC. When using light activation, μ TBS of MTB-200/NDC-100 to each region was not influence by light irradiation time. On the other hand, μ TBS of CDB/CDC to apical region was dependent upon the light irradiation time, although there was no significant difference in μ TBS to coronal region among light irradiation time.

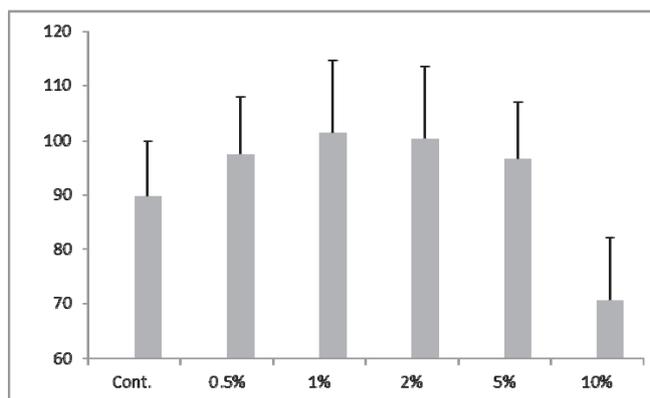
ヘスペリジン配合セルフエッチングプライマーの象牙質接着性への影響
東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野¹, 東京医科歯科大学大学院歯と骨の GCOE²
○イスラム ソフィクル^{1,2}, 平石典子¹, 大槻昌幸¹, 田上順次^{1,2}

Effect of Incorporation of Hesperidin in a Self-etching Primer on Dentin Bond Strength

Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Science, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan¹,
Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases at Tokyo
Medical and Dental University, Tokyo, Japan²

○ISLAM Sofiqul^{1,2}, HIRAISHI Noriko¹, OTSUKI Masayuki¹, TAGAMI Junji^{1,2}

Objectives: Deterioration of dentin bond durability should be related with degradation in resin-dentin interface. This degradation occurs because hydrophilic characteristic of the monomer can be hydrolyzed. Resulting exposed collagen matrix should be protected by MMPs inhibitors or cross-linker. In this study we attempted hesperidin (HPN), a citrus flavonoid, to add into a self-etching primer and evaluated the micro tensile bond strength (μ TBS) and its effect as a natural cross-linker. **Methods:** Flat dentin surfaces were obtained from 18 extracted human molar teeth and smear layer was created on each surface. HPN (0.5wt %, 1.0 wt %, 2.0wt %, 5.0 wt %, 10.0 wt %) was incorporated into the Clearfil SE primer (Kuraray) to prepare the experimental primers. Pure SE primer was preserved as a control. Each experimental primer applied on a flat dentin surface. Each sample was bonded with Clearfil SE bond and restored with resin composite. After storage in water for 24 hours at 37 ° C, the bonded specimens were cut using a low speed diamond saw to obtain beams (0.9 x 0.9 mm) and subjected to micro tensile bond testing. Failure mode analysis of dentin surface and the morphological observation on each self-etching effect were performed using Scanning Electron Microscope (SEM). **Results and discussion:** One-way ANOVA showed a significant difference among the tested groups ($p < 0.05$). Tukey post-hoc test revealed that the μ TBS was improved in 0.5 wt% group (97.5 \pm 10.5 MPa) though it was not statistically significant ($p > .05$). The μ TBS 1.0 wt% incorporated group (101.4 \pm 13.2 MPa) and 2.0 wt% incorporated group (100.4 \pm 13.2 MPa) was significantly higher when compared with the control group (89.7 \pm 10.3 MPa). The μ TBS significantly reduced in 10.0 wt% group (70.6 \pm 11.5 MPa) and increased percentage of adhesive failure on bonded interface. The increase in μ TBS was observed by greater concentration of HPN up to 5.0 %.



自己接着性フロアブルコンポジットの歯質接合界面の SEM 観察

虎の門病院・歯科¹, 鶴見大学歯学部・教育探索歯学寄附講座²

○宇野 滋¹, 阿保備子^{1,2}, 森上 誠¹, 杉崎順平¹, 山田敏元¹

SEM observation on the interface between a self-adhering flowable composite and tooth substrates

Toranomon Hospital, Department of Dentistry¹,

Tsurumi University, School of Dental Medicine, Translational Research²

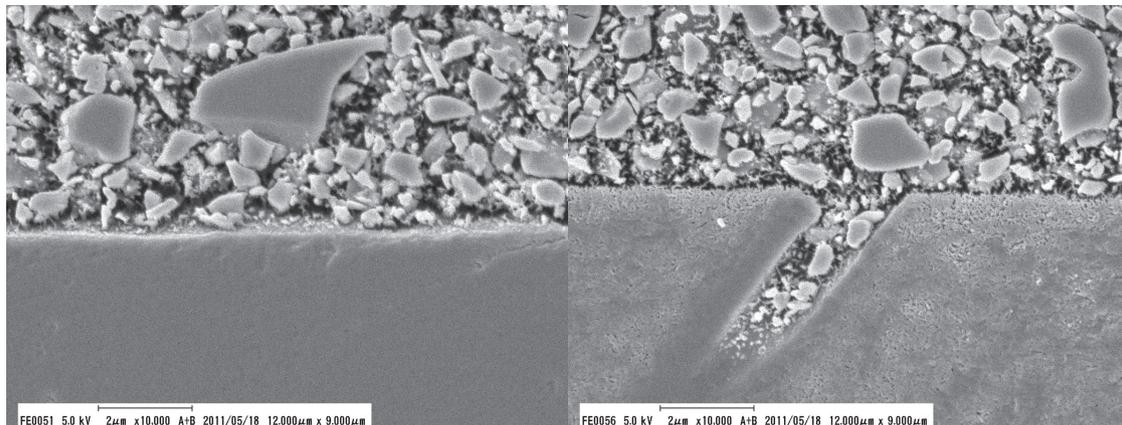
○UNO Shigeru¹, ABO Tomoko^{1,2}, MORIGAMI Makoto¹, SUGIZAKI Jumpei¹, YAMADA Toshimoto¹

近年の目覚ましい接着技術、とりわけセルフエッチングの進歩により、より少ない接着ステップで確実なレジン接着が可能となった。この技術は、自己接着性レジンセメントのようなレジン系含着材の分野のものが応用されている。一方、修復材料に関しては従来のコンポジットレジンに加え種々流動性を有するフロアブルレジンが多用されるようになってきた。こうした中 Kerr 社は、レジンボンディング材とコンポジットレジンの技術を併用して、自己接着性のフルアブルレジン・バーティス (Vertise) を開発した。この材料にはリン酸基を有する接着性モノマー-GPDM が使用されており、ボンディング材による接着操作を必要とせず、接着性モノマーを含んだレジンペーストを歯面にこすりつけることにより接着機構が働き、充填と同時に歯質との接着が得られる“ゼロステップ”タイプのものである。本研究では、本材の性能を評価する一環として、歯質との接合界面の SEM 観察を行った。

【材料と方法】ヒト抜去大白歯の歯冠部を水平に切断、SiC#1000 にて研削した面を被着面とした。Vertise をメーカー指示にしたがって被着面上に約 1mm の厚さに充填・照射した。24 時間水中に保存した後、歯軸方向に歯冠を 2 分割しエポキシレジンに包埋した。包埋材が十分に硬化した後、試料の切断面を SiC (#800, #1000, #1200) およびダイヤモンドペースト (6, 3, 1, 0.25 μm) を用いて鏡面研磨した。この試料にアルゴンイオンエッチングを 35 秒間施し、通法により白金蒸着し、FE-SEM (ERA-8900FE, エリオニクス) にて接着界面の SEM 観測を行った。

【結果およびまとめ】Vertise のエナメル質と象牙質との接着界面の SEM 像 (×10,000) を図に示す。コンポジットレジンには prepolymerized fillers と思われる大きさ 1 μm 前後のものやさらに細かいフィラーが含まれており、この層が直接歯質と接合している。従来のボンディング材層がアルゴンイオンエッチングされた際に示すような網目状構造は認められない。エナメル質および象牙質表面に脱灰像はほとんど認められないものの、双方と緊密な接合状態を示していた。

接着界面を SEM 観察する限り Vertise の歯質との接着は良好なものと判断されたが、その接着機構は歯表面のごく表層において生じているものと思われる。



エナメル質

象牙質

光強度が試作コア用レジンの象牙質接着性に及ぼす影響

日本大学歯学部保存修復学教室¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門²
かなまる歯科クリニック³

○大藤竜樹¹, 清水裕亮¹, 田村ゆきえ¹, 藤井雄介¹, 坪田圭司^{1, 2}, 陸田明智^{1, 2}, 安藤 進^{1, 2},
宮崎真至^{1, 2}, 金丸壽良³

Influence of power density on bond strength of trial core foundation systems

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry, Kanamaru Dental Clinic³

○OTO Tatsuki¹, SHIMIZU Yusuke¹, TAMURA Yukie¹, FUJII Yusuke¹, TSUBOTA Keishi^{1, 2}, RIKUTA Akitomo^{1, 2},
ANDO Susumu^{1, 2}, MIYAZAKI Masashi^{1, 2}, KANAMARU Toshio³

【研究目的】

近年、コンポジットレジンの機械的性質およびアドヒーシブの歯質接着性の向上によって、根管治療後に直接法によるコア用レジンをを用いた支台築造が行われる頻度が増加している。これらコア用レジンの多くは、化学重合と光重合の性質を併せ持つデュアルキュア型が採用されている。そのため、照射光線の到達しにくい部位においても重合硬化が進行することから、良好な接着性および物性を有することが期待されている。その一方で、光強度が象牙質接着性に及ぼす影響については不明な点が多い。

そこで演者らは、試作コア用レジンシステムである SI-R 20907 (Shofu)を用いて、照射強度と象牙質接着性の関連性について接着試験および電子顕微鏡観察を行うことによって検討した。

【材料および方法】

供試したコア用レジンシステムとしては、開発コード SI-R 20907 (以後 SI, Shofu), Estelite Core Quick (以後 EQ, Tokuyama Dental), Unifil Core EM (以後 EM, GC)および Clearfil DC Core Automix(以後 DC, Kuraray Medical)を用いた。接着システムとしては、各コア用レジンシステムに付属のものを用いた。可視光線照射器としては Optilux 501 (sds Kerr)を用い、スライドレギュレーターに接続し、その照射強度が 200, 400, 600 mW/cm²となるように調整した。

接着試験に際し、被着体としてはウシ下顎前歯の歯冠部を常温重合レジンに包埋したのものを用いた。次いで、SiCペーパーの#600まで研削した後、超音波洗浄し被着面とした。この被着面に対し、製造者指示条件に従ってアドヒーシブ処理を行い、内径4 mm、高さ2 mm、の円筒形テフロン型を静置し、練和したペーストを型に填塞したものを接着試片とした。コア用レジンに対する光線照射条件としては0 (照射無し)、200, 400および600 mW/cm²に設定し製造者指示時間照射を行った。

ペーストの練和開始から10分間経過した後、37°C精製水中に24時間保管した後、万能試験機 (Type 5500R, Instron)を用いてC.H.S = 1.0 mm/minの条件で剪断接着強さの測定を行った。なお、試片の数は各条件につき10個とし、ANOVAおよびTukey HSD testを用いて統計学的検定を行った。接着強さ試験後の破断試片について、その破壊形式の観察を行った。

接着界面の観察には、接着試験に用いたのと同様に接着操作を行った試片の縦断面を、通法に従って走査電子顕微鏡(ERA-8800FE, 以後 SEM)を用いて観察を行った。

【成績および考察】

DCおよびEMは照射強度の上昇に伴って、象牙質接着強さも上昇する傾向が認められた。一方、SIおよびEQではいずれの照射条件においてもその接着強さに有意差は認められなかった。接着強さ測定後の破壊形式では、EQにおいてはそのほとんどが象牙質の凝集破壊を示したものの、DC、EMおよびSIでは界面破壊が多数を占めた。また、SEMによる接合界面の観察では、いずれのシステムにおいても接合界面にギャップの形成は認められず良好な接合状態を呈した。

このように製品によって照射強度による接着強さの違いに異なる傾向が認められた理由としては、システムによる重合開始剤系の違いによるものと考えられた。

【結論】

本実験の結果から、照射強度によるコア用レジンの象牙質接着強さの変化は、製品によって異なる傾向を示すことが明らかになった。以上のことから、製品の特性を理解して臨床使用することが不可欠であることが示唆された。

リン酸カルシウムから成る新規の象牙質知覚過敏抑制材の実験室評価

-長期間人工唾液に浸漬した後の効果の持続性-

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¹, 口腔臨床科学分野², 歯と骨のGCOE³
○タナヴァラーゴン オルニチャ^{1,3}, 中嶋省志¹, 池田正臣², 田上順次^{1,3}

In vitro Evaluation of a Newly Formulated Calcium Phosphates Desensitizing Material

-Durability after long term immersion in artificial saliva-

Cariology and Operative Dentistry¹, Oral Health Care Science², Tokyo Medical and Dental University
GCOE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases³

○THANATVARAKORN Ornnicha^{1,3}, NAKASHIMA Syozi¹, IKEDA Masaomi², TAGAMI Junji^{1,3}

Objectives: to evaluate and compare the ability of two desensitizing agents, CPD-100 (development code, a new formula of calcium phosphates, Kuraray Medical) and SuperSeal® (SS, Phoenix Dental), on dentinal tubule occlusion and permeability reduction immediately after their applications and after post-treatment with immersion in artificial saliva.

Materials and methods: Dentin discs prepared from human molars were firstly divided into 2 groups to simulate sensitive dentin by treating surface with 0.5 M EDTA, or 0.5 M EDTA followed by 5% NaOCl. Each group was applied with CPD-100 or SS, then dentin permeability reduction (PR%) was evaluated by hydraulic conductance device. The treated dentin discs were immersed in artificial saliva (AS) for 4 weeks and PR% was again evaluated and the morphology was observed by SEM.

Results: Both desensitizing agents showed significant PR% ($p < 0.05$, Fig. 1) immediately after application. After the immersion in AS, CPD-100 group (EDTA/NaOCl) showed significant increase in PR% ($p < 0.05$, Fig. 1), whereas SS groups showed relapsed PR% ($p < 0.05$, Fig. 1). SEM observation exhibited the deposition of crystals on dentin surface and in some dentinal tubules in CPD-100 groups, whereas less crystal deposition on dentin surface was found in SS groups (Fig. 2).

Discussion: Increase in PR% by CPD-100 treatment after immersion in AS could be attributed to crystal growth of existing apatite minerals (HA) induced by CPD-100 due to supersaturation of the AS regarding HA, resulting in further occlusion of dentinal tubules. Whereas the relapsed PR% in of SS groups could be explained by partial dissolution of calcium oxalate (CaOX) due to undersaturation of the AS regarding CaOX. Moreover, dissolved oxalate ion from CaOX might inhibit HA formation. Study on dynamic crystal growth in the former and the dissolution in the latter after immersion in salivary fluid would be needed to elucidate the relevant mechanisms on the durability of PR%.

Conclusion: The application of CPD-100 or SS could effectively reduce dentin permeability. CPD-100 is expected to be a new generation material in the meaning of self growing of the crystal, leading to long term stability in oral environment.

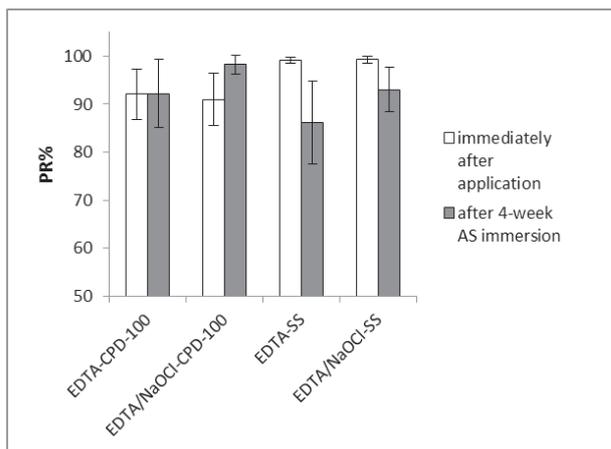


Fig. 1 Mean ± standard deviations of PR% before and after AS immersion for 4 weeks (n=10 per group)

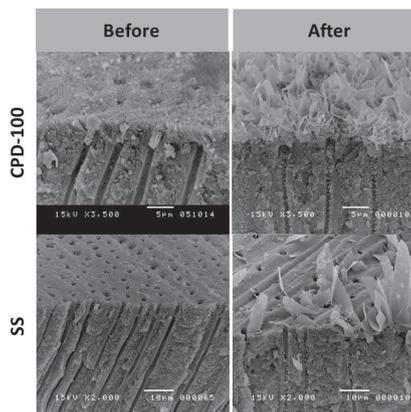


Fig. 2 SEM images before and after AS immersion

試作知覚過敏抑制材の象牙細管封鎖性に関する研究 -超音波透過法を用いた検討

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

○遠藤 肇¹, 川本 諒¹, 岩佐美香¹, 高見澤俊樹^{1,2}

黒川弘康^{1,2}, 安藤 進^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 山形哲則³

Evaluation of Newly Developed Dentin Sensitivity Suppressor by means of ultrasonic device
Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²
Nihon University School of Dentistry, Hanazono Dental Clinic³

○ENDO Hajime¹, KAWAMOTO Ryo¹, IWASA Mika¹, TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2},
KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, ANDO Susumu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, YAMAGATA Tetsunori³

【緒言】

象牙質知覚過敏症に対する処置には、これまで多くの方法が提案されてきた。とくに、患部に塗布することでその疼痛を軽減する知覚過敏抑制材は、操作が簡便であるところから様々なタイプの製品が臨床応用されている。しかし、即効性に優れるとともに、持続的な効果を有する知覚過敏抑制材は少ないのが現状である。そこで演者らは、クラレメディカルによって新たに開発された、生体親和性に優れた新規自己硬化性リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材(開発コード CPD-100)を用い、その再石灰化能あるいは象牙質封鎖性について検討した。すなわち、CPD-100を歯質に塗布し、その後生じた歯質に生じた脱灰あるいは再石灰化という変化を、非破壊的に物質の状態変化を測定可能である超音波透過法を用いて検討した。さらに、レーザー顕微鏡観察、走査電子顕微鏡 (SEM) 観察および元素組成分析を併せて行い、考察資料とした。

【材料および方法】

1. 象牙質知覚過敏試片の製作

ウシ抜去下顎前歯の唇側象牙質を 4×4×1 mm のブロックとして切り出し、耐水性 SiC ペーパーの #2,000 まで順次研磨した。これら試片に対して超音波洗浄を 30 分間作用させ、象牙細管の開口を伴う知覚過敏モデルを製作した。

2. pH サイクル試験

口腔内環境をシミュレートするために、37°C人工唾液 (pH 7.0) の浸漬保管に先立ち、pH サイクルを設定した。

- 1) 0.1 M 乳酸緩衝液 (pH 4.75) に 10 分間浸漬 (以後、De 群)
- 2) 脱灰液への浸漬に先立って、CPD-100 を 1 度塗布し、水洗する群 (以後、CPD 群)
- 3) 脱灰液への浸漬に先立って、CPD-100 を塗布、水洗し、これを 7 日毎に行う群 (以後、Repeat 群)
- 4) CPD-100 を塗布、水洗した後、実験期間を通じて人工唾液への浸漬のみを行う群 (以後、Control 群)

なお、pH サイクルは 1 日 2 回、28 日間行った。

3. 超音波伝播時間の測定およびレーザー顕微鏡観察

超音波測定装置(Model 5900, Panametrics)を用いて、縦波で発せられる超音波の伝播時間を測定し、縦波音速を求めた。また、所定期間の浸漬が終了した試片について、レーザー顕微鏡を用いて表面性状の経時的変化を観察した。

4. SEM 観察および元素組成分析

FE-SEM (ERA8800-FE, エリオニクス)を用いて、試片の断面を観察し、象牙細管内への知覚過敏抑制材浸透性を評価した。また、象牙質に生じた変化については元素分析を併せて行った。

【成績および考察】

脱灰溶液に浸漬した De 群では、他の条件と比較して経時的にその音速が低下する傾向が認められたが、CPD 群ならびに Repeat 群では、音速が高くなる傾向が認められた。この歯質を透過する音速の変化は、CPD-100 が脱灰抑制あるいは再石灰化に影響を及ぼしたことを示すものと考えられた。また、レーザー顕微鏡観察からは、CPD 群および Repeat 群においては脱灰を示す像は認められず、細管内に CPD-100 由来と考えられる付着物あるいは析出物が認められた。SEM 観察からは Repeat 群では CPD 群と比較して、象牙細管の深部まで浸透している像が観察された。

【結論】

試作知覚過敏抑制材 CPD-100 は、歯質の再石灰化効果および象牙細管の封鎖によって知覚過敏の抑制に寄与する可能性を有することが示唆された。

新規デバイス開発のための歯科切削音および咀嚼音の骨導音計測の試み

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)

○山田 朋美, 板東 秀典, 恵比須 繁之

Measurement of bone-conducted sound in dental treatment for new device development

Department of Restorative Dentistry and Endodontology,

Osaka University Graduate School of Dentistry

○YAMADA Tomomi, BANDO Hidenori, EBISU Shigeyuki

【研究目的】

エタービンハンドピースやスケーラなどの音は歯科治療を受ける多くの患者に不快感を与えている。我々は、患者が快適に受診できるように不快感低減デバイスの開発をめざした研究に取り組んでいる。これまでに、第 129 回および第 131 回本学会において、気導切削音に含まれる 8kHz 以上の高周波成分の不快感への関与について心理評価法や光トポグラフィー装置を用い検討し報告してきた。治療中の患者は、気導音だけではなく、歯から骨を介した骨導音も知覚している。タービンやスケーラからの発生音に含まれる高周波成分は骨導においても伝達されている可能性があり、骨導音を測定し歯科における骨導知覚の詳細を明かにする必要がある。しかし、従来の骨導マイクロホンは主に通話用であるため高周波成分を抑圧する性質があり、高周波成分を含む骨導音計測を実施することは困難であった。

今回、高周波まで対応した試作骨導マイクロホンを用いて気導音および骨導音同時測定システムの構築を行い、歯科領域に関わる様々な骨導音の測定を試みたので報告する。

【方法】

大阪大学歯学研究科に設置された防音室および大阪大学歯学部附属病院保存科診療室において、発音、咀嚼音およびタービンやスケーラ使用時の気導音および骨導音測定を行った。骨導音は、小林理学研究所圧電応用研究室安野功修氏により試作提供されたヘッドホン式骨導マイクロホンおよびヘッドバンド式骨導マイクロホンを用いて収録した。オーディオインターフェイスを介した骨導マイクロホンは、気導音集音のためのコンデンサーマイクロホンとともに多チャンネルレコーダーに接続し同時レコーディングを行った。骨導マイクロホンは被験者の甲状軟骨上または前額部および左右頬骨上に装着し、気導音集音用マイクロホンは頭部より 15センチの距離に設置した。被験者はいくつかの単語を発音し、その後、テクスチャーの異なる数種類の食物を咀嚼し嚥下するまでを計測した。歯面上の即時重合レジンダイヤモンドバーおよびスケーラを用いて切削した時の音を切削音として収録した。収録されたデータは、コンピューター上で再生し、音響解析ソフトにより波形解析および周波数解析をおこなった。本研究は大阪大学の倫理委員会の審査を受け、被験者には十分な説明と同意を得て行ったものである。

【結果と考察】

波形解析の結果、気導音と同期する骨導信号波形を確認した。周波数解析により、発音時の気導音は主に 6 kHz までの周波数成分が多く認められ、骨導音では高い周波数帯域では減衰が認められた。硬い食物の粉碎時の咀嚼音には、20 kHz にいたる高周波域の音響信号が発生することを確認した。タービンおよびスケーラによる気導切削音には複数の突出した特徴周波数成分が 20 kHz までに複数認め、骨導においても同周波数帯域で高いレベルのスペクトルを確認した。

今回、新たに試作した骨導マイクロホンを用いることにより幅広い帯域の骨導音の計測が可能であることを確認した。今後、計測した音響信号レベルと知覚レベルの関係を明かにして不快感低減デバイス開発の検討を進めていく予定である。

殺菌処理後に残存したバイオフィーム構造への *Streptococcus mutans* の付着について

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

○大墨竜也, 竹中彰治, 若松里佳, 興地隆史

Secondary adhesion of *Streptococcus mutans* to disinfected biofilm structures

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

○OSUMI Tatsuya, TAKENAKA Shoji, WAKAMATSU Rika, OKIJI Takashi

【目的】 演者らは第 134 回本学術大会において、洗口液を用いてバイオフィーム中の細菌が殺菌されてもその構造が付着界面に残存することを報告した。残されたバイオフィーム構造は、蛋白質、多糖体を含む細胞壁が残存するとともに表面が粗造であるため、バイオフィーム再形成への足がかりとなる可能性がある。本研究では、殺菌処理した *in vitro Streptococcus mutans* バイオフィームに対する細菌の付着性について検討した。

【材料及び方法】

(バイオフィーム) 直径 6 mm, 厚み 1.5 mm のレジンディスク (Premise flowable, Kerr 社) を 10^6 /ml に調整した *Streptococcus mutans* ATCC 25175 株培養液中に 75 rpm の速度で回転させながら 37°C、2 時間浸漬することにより、ディスク表面に細菌を付着させた。2 時間後、Rotating Disc Reactor (RDR; BioSurface Technologies 社) を用いて 50 rpm の速度で回転させながら毎分 4.6 ml の速度で 0.05% スクロースを含む 1/10 濃度の BHI 液体培地を灌流させ 3 日間好気培養することによりバイオフィームを形成させた。3 日後、70% イソプロピルアルコールに 90 分浸漬し殺菌したのち、再度 RDR 中で 10^6 /ml に調整した *Streptococcus mutans* 培養液を 4 時間灌流させた。

(実験 1 : 共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察) SYTO9/PI 染色 (Invitrogen 社) もしくは Calcein-AM (CAM)/Rhodamine (Rho) 染色を施した後、XYZ 断層像を採取するとともに、厚さ 8 μ m の凍結切片を各試料 (n = 5) について 40 μ m おきに 30 枚作製した。CLSM を用いて、バイオフィームの厚さを計測するとともに、殺菌処理後のバイオフィーム構造および新たに付着した生菌の面積を Metamorph ソフトウェアを用いて解析した。

(実験 2 : 付着細菌数および総菌数計測) ディスクを PBS に浸漬し超音波処理によりバイオフィームを回収したのち、生菌数を Plate count 法により、総菌数を PCR-Invader 法により計測した。

【結果】 3 日培養で形成されたバイオフィームの厚さは最大で 150.6 μ m であった。三次元構築像から、殺菌処理後のバイオフィーム構造が残存する部位では、主としてバイオフィーム底部で培地の反流動側に沿って引っかかるように蓄積する生菌が観察された。一方、バイオフィーム構造が存在しない界面では新たに付着した生菌の厚さは小さい傾向にあった。殺菌処理されたバイオフィーム構造に対する新たに付着した細菌叢の面積比は SYTO9/PI 染色では $19.1 \pm 11.3\%$ (最大 47.6%)、CAM/Rho 染色では $20.1 \pm 14.4\%$ (最大 64.1%) であった。ディスク上の生菌数は 2.4×10^4 - 2.7×10^6 cfu/ml、総菌数は 10^7 copies/ml 程度であった。

【考察および結論】 殺菌処理後に残存するバイオフィーム構造に、新たな浮遊細菌の付着が生じることが認められた。残存バイオフィーム構造が新たなバイオフィーム形成の起点となることが示唆された。

ラット根尖病変における ADAM-8 と ADAM-17 の役割

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座

○田中 毅, 尾関伸明, 川合里絵, 今泉一郎, 山崎雅弘, 中村 洋

Roles of ADAM-8 and ADAM-17 in Development of Rat Periradicular Lesion

Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○TANAKA Tsuyoshi, OZEKI Nobuaki, KAWAI Rie, IMAIZUMI Ichiro, YAMASAKI Masahiro, NAKAMURA Hiroshi

【目的】

根尖性歯周炎は、根尖部歯周組織の破壊を特徴とする炎症性疾患である。根尖病変でみられる組織破壊には、結合組織の主要構成成分である細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の分解が深く関係しており、好中球やマクロファージなどの炎症性細胞から放出される MMPs(matrix metalloproteinases) などのプロテアーゼによって組織破壊が進行する。近年、MMPsの近縁遺伝子ファミリーでメタロプロテアーゼとインテグリンの相互作用を有する ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases) ファミリーに属する ADAM-8 と ADAM-17 が、好中球の浸潤や TNF- α の産生を制御し、骨吸収を伴う炎症性疾患に関与することが報告されているが、根尖病変における詳細な役割について明らかにされていない。そこで本研究では、ラット根尖病変における ADAM-8 と ADAM-17 の動態を、RT-PCR 法を用いた遺伝子解析と免疫組織化学染色により評価した。

【材料および方法】

生後 8 週齢、体重 240 g の雄性ウイスター系ラットを用いて、下顎左右第一臼歯の咬合面をラウンドバーにて露髄後 0 週 (未露髄)、2, 4, 6, 8 週で屠殺を行い実験試料とした。摘出した下顎骨を 4%パラホルムアルデヒドで 12 時間固定後 0.5M EDTA 溶液 (pH7.4) で低温脱灰し、厚さ 7 μ m の連続切片を作製した。摘出した下顎骨から第一臼歯近心根の根尖部歯周組織を採取し、TRIzol Reagent (Invitrogen, CA, USA)を用いて、total RNA の抽出を行った。RT-PCR は INV SSIII OneStep HiF 100REX (Invitrogen)を用いて行い、ADAM-8 と ADAM-17 の遺伝子発現を検索した。さらに、ADAM-8、ADAM-17 および好中球の局在を免疫組織化学染色により評価した。また、下顎第一臼歯近心根の根尖部面積は Keyence BZ-9000 fluorescence microscope (Keyence, 東京)および、BZ-II Analyzer software (Keyence)を使用して計測した。

【結果】

RT-PCR 法による遺伝子解析において、ADAM-8 は露髄後 2 週で発現し、4 週で発現のピークを示した。一方、ADAM-17 は露髄後 2 週から 4 週にかけて発現のピークを示し、その後、減少傾向を示した。免疫組織化学染色により、露髄後 2 週的好中球浸潤部位と根尖部歯槽骨に隣在して ADAM-8 陽性細胞がわずかに認められ、ADAM-17 陽性細胞は根尖部の炎症性細胞浸潤部位にわずかに観察された。露髄後 4 週では根尖部歯周組織の炎症性細胞浸潤はさらに強くなり、膿瘍形成と根尖部の骨吸収が認められ、好中球浸潤部位と根尖部歯槽骨に隣在して ADAM-8 陽性細胞の増加が観察された。また、膿瘍中に ADAM-17 陽性細胞が観察された。さらに、露髄後 6 週と 8 週では、線維性結合組織の増生が観察され、ADAM-8 陽性細胞はほとんど認められず、ADAM-17 陽性細胞の減少が認められた。

【考察および結論】

ラット根尖病変は露髄後 2 週から 4 週にかけて著しい好中球の浸潤が認められ、病変が急速に拡大した。一方、4 週から 6 週にかけて病変の大きさに変化は見られず、慢性期に移行したことが推測される。ADAM-8 陽性細胞は露髄後 2 週から 4 週にかけて好中球の浸潤部位と根尖部歯槽骨に隣在して発現を認めた。また、ADAM-17 陽性細胞も同様に露髄後 2 週から 4 週にかけて炎症性細胞浸潤部位に発現が認められたが、根尖病変が減少傾向を示す 6 週から 8 週にかけて発現が減少を示した。以上の結果から、ADAM-8 と ADAM-17 は根尖病変成立過程において、ECM 破壊と破骨細胞の活性促進による病変拡大に関与している可能性が示唆された。

グリーンレンズ併用イメージファイバによる根管内の高精度観察システムの検討

九州歯科大学齶蝕歯髄疾患制御学分野¹, 早稲田大学大学院情報生産システム研究科²,

九州歯科大学総合診療学分野³, 九州歯科大学感染分子生物学分野⁴

○吉居慎二¹, 李 慧穎², 北村知昭¹, 寺下正道³, 西原達次⁴, 植田敏嗣²

Root Canal Observing System Using Image Fiber with grin lens for High precision Diagnosis
Div. of Pulp Biology, Operative Dentistry and Endodontics, Kyushu Dental College¹, Graduate School of Information, Production and Systems, Waseda University², Div. of Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental College³, Div. of Infections and Molecular Biology, Kyushu Dental College⁴
○YOSHII Shinji¹, LI Huiying², KITAMURA Chiaki¹, TERASHITA Masamichi³, NISHIHARA Tatsuji⁴, UEDA Toshitsugu²

【研究目的】

現在の歯科治療では、歯科用顕微鏡・歯科用コーンビーム CT などの診断機器により歯の複雑な解剖学的形態や破折等を高精度に検出することが可能である。しかしながら、歯の根管内部の歯質の診断や側枝の検出・歯周ポケット内の縁下歯石は通常の診断法では難しく、感覚に頼っているのが現状である。本研究は、歯の内部・根尖歯周組織および歯周ポケット内に存在する微細構造を高解像度で検出する新しい診断装置の開発を目的としている。今回の研究では、ファイバ先端にグリーンレンズを取り付けることによる焦点距離の延長、そして1本のイメージファイバでの画像の取得と観察サンプルへの光の照射を同時に行う光学システムを検討した。

【材料および方法】

実験には微細径イメージファイバ、ライトソース、イメージングシステム、モニターおよび観察試料台微調整装置を使用した。イメージファイバはフジクラ製グレーデッドインテックス型マルチモードファイバ (FIGH-10-500N) を、観察試料としてはガラス表層にクロム薄膜をスパッタリング法で作成後、格子状の等しい間隔のラインとスペースを Focused Ion Beam (FIB) を用いて形成したものを用いた。焦点距離の延長を目的としてファイバ先端に直径 1.8 mm・0.29 ピッチのグリーンレンズを接続した。まず直径・高さ共に約 3 mm の円柱状シリコンゴムの一端から 1 mm の高さまで直径 1.8 mm の円柱状に中をくり抜き、もう一端から高さ 2 mm まで直径 0.6 mm の円柱状に円の中心がそろおうようになり抜いた。このくり抜いた部分の両端よりグリーンレンズとファイバを2つが接するように挿入し、スペースに瞬間接着剤を介在させることで接続・固定した。観察は試料とグリーンレンズの間を水で満たした状態で行った。

次に、ファイバ径を小さくし鮮明な画像を取得するため、1本のイメージファイバで画像の取得と観察サンプルへの光の照射を同時に行える機器を作成した。C-MOS イメージセンサ・レンズ・プリズムビームスプリッタ・イメージファイバを順に直線状に配置し、光ファイバをそれらに対し直角にかつプリズムビームスプリッタの部位で接するように配置した。イメージファイバ・観察サンプル間を実際の使用条件に合うよう水で、界面での光反射防止のため、イメージファイバ・プリズムビームスプリッタ間、光ファイバ・プリズムビームスプリッタ間を油で満たした。

【結果】

ファイバ・グリーンレンズ間の距離を可能な限り 0 に近づけることで最大 10 mm まで焦点距離を延長することができ lines/piece $20\mu\text{m}$ の試料まで観察可能であった。機器の作成により光ファイバからの光量 0.9 mW のときファイバの画像取得面の光量は 0.1 mW で、光効率の良い光学系を開発できた。また、ここで得られた画像は従来使用していたイメージングシステム (3CCD イメージングシステム FT-203F, FiberTech 社) と同等の解像度であった。

【考察】

グリーンレンズを用いることで焦点距離の延長を可能にし、また1本のイメージファイバで画像の取得と観察サンプルへの光の照射を同時に行うことが可能となり、根管内をより深部まで観察できることが示唆された。

【結論】

今後この結果を踏まえ、1本のイメージファイバで画像の取得と観察サンプルへの光の照射を同時に行った状態で、根管内に合った径のグリーンレンズを用いて観察する必要がある。

ファイル破折をどう除去するか

日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座,

日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

○明石俊和, 小林慶美, 勝呂 尚, 鶴町 保, 小木曾文内

Removal of Fractured endodontic Instruments using An ultrasonic tip

Department of Endodontics Nihon University School of Dentistry,

Divisions of Advanced Dental Treatment Nihon University School of Dentistry

○AKASHI Toshikazu, KOBAYASHI Yoshimi, SUGURO Tadashi, TURUMACHI Tamotsu, OGISO Bunnai

【はじめに】

根管治療時の根管内でのファイルは金属製の刃部が根管壁に噛み込み切削される。そのときファイルの刃部には応力による歪が発生している。この切削操作の繰り返しかえしにより、金属疲労が刃部に蓄積し、ファイル破折が起こる。

ニッケルチタンファイルは、切削時の刃部の歪によるねじれ変形などの破折予知の兆候を目視できないため突然、予期せぬ時に破折が起こってしまう。ファイル破折はその後の根管治療に支障となり、予後に多大な影響を与える。

そのため、根管内での破折器具の予防策としてファイルの回転数、切削時間、回転トルクの調整を考慮して対応する事が望ましい。しかし、器具の管理が難しく、残念ながら破折の症例が増加傾向にある。

ファイルが破折したならば1) 残置した破折ファイルの予後不良の可能性についての対処法を説明し、患者の同意を得た上で根管充填を行う。2) 破折ファイルが除去できるまで根管充填を行わない。3) 破折ファイル除去が困難であることを説明し、除去が可能な医療機関に転医を勧める。以上が医療訴訟の予防策であり、今後は破折ファイルを残置するのではなく除去することがもっとも望ましい処置法となるであろう。

そこで、破折ファイルを効率よく除去する方法として、根管拡大・形成から根管洗浄に使用する多目的使用超音波振動装置であるバリオス 370S Lux に各種超音波チップを装着し、破折ファイル除去を行ったので報告する。

「材料および方法」

超音波振動装置にはバリオス 370S Lux 使用し、髄腔開拓にはV-G71、根管口明示にはV-G77、V-S51D は根管拡大・形成、根管洗浄、破折ファイルの除去、V-S51 は根管洗浄、破折ファイル除去に使用した。トルクはメーカー指示値の最大数を使用し、超音波切削の通報に従い拡大・形成、根管洗浄それに続く、破折ファイルの除去を行った。

【結果および考察】

破折ファイルが除去出来る理由は破折ファイル破折部にV-S51チップが接触しチップの振動が伝達され根管にくい込んでいる破折ファイルが振動により徐々に緩み根管口部に移動し排出される。

あるいは根管内のV-S51チップの振動によるキャビテーション作用と注水された水の攪拌と還流により、破折ファイルが根管内に浮遊状態となり根管口部に移動し排出される。

とくに破折ファイルを効率よく除去するには超音波チップの振動を破折ファイルに伝達する必要がある。そのためには超音波チップによる根管拡大・形成法の手順を理解し、根管を直線的に拡大することが重要である。すなわち、超音波振動による根管拡大にはV-S51Dチップ使用により根管壁象牙質を破壊（破碎）し、根管拡大する。

破折ファイルの存在はすでにガイドグループ（先導溝）が形成されており、破折ファイルまでの根管を直線的にV-S51Dチップにより拡大するとともに破折ファイルの先端部が超音波チップの先端に接触できる部位まで歯質切削を行う。

次いで、V-S51チップ先端を破折ファイルの破折部に接触させ、振動が伝達されることにより除去された。すなわち超音波チップの振動を破折ファイルに伝えることが破折ファイル除去の効果的な手段であった。

【結 論】

超音波振動装置バリオス 370S Lux と各種超音波チップの使用により破折ファイル除去が可能である。

原因の同定により短期間で患者満足が得られた歯内疾患症例

福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野

○米田雅裕, 廣藤卓雄

Obtainment of patients' satisfaction by proper diagnosis and endodontic treatment - cases series report -

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

○YONEDA Masahiro, HIROFUJI Takao

【緒言】

歯内病変は症状が当該歯およびその周囲に限局されることが多く原因歯の同定はそれほど困難ではない。しかし、時には歯周疾患に類似した症状を呈したり遠隔の部位に症状が発現したりすることがあるため注意が必要である。福岡歯科大学医科歯科総合病院総合歯科には歯周治療や他の治療を長期間受けるが症状が改善されないことを理由に来院する患者が増加している。今回、原因の同定および原因歯の歯内治療により急速に症状が改善し大きな患者満足が得られた3症例を紹介する。

【症例報告】

症例1. 患者：59歳・女性。主訴：右下奥歯の歯ぐきが腫れている。当該歯の治療歴：初診の半年前に下顎右側第一大臼歯(46)頬側歯肉が腫脹したため近医を受診。切開・排膿後、歯周治療を受け症状改善。しかし、その後たびたび歯肉腫脹を繰り返すため別の歯科医院を受診。2ヵ所目の歯科医院でも同様の処置を行うが症状が改善しないため当科初診。現症：46頬側歯肉腫脹、動揺度M2、歯周ポケット最深部5mm、根分岐部エックス線透過像+、歯髄電気診+。診断：46慢性化膿性根尖性歯周炎(I型歯内歯周病変)。治療内容：感染根管治療、全部鑄造冠。症状の変化：歯肉腫脹消失。根分岐部エックス線透過像消失。

症例2. 患者：24歳・男性。主訴：右側頬から膿が出る。右側頬部皮膚の治療歴：初診の数年前から同部にしこり発現。その後、排膿し始めたため皮膚科受診。切開・排膿、抗生剤投与により一時的に改善するが、しばらくすると症状再発。知人の紹介により当科初診。現症：右側頬部皮膚から持続的排膿。下顎右側第一大臼歯(46)インレー下に深部カリエス、動揺度M1、歯周ポケット最深部5mm、根尖部～根分岐部エックス線透過像+、歯髄電気診-。診断：46慢性化膿性根尖性歯周炎による外歯瘻。治療内容：感染根管治療、全部鑄造冠。症状の変化：頬部からの排膿停止。根尖部～根分岐部エックス線透過像消失。

症例3. 患者：72歳・男性。主訴：口臭が気になる。口臭の治療歴：初診の20年前から口臭が気になる。口臭を減らすため近医で長期間、歯周治療を受けるが改善しない。固めの歯ブラシで清掃したり、酸性食品を摂取したり自分なりに口臭除去を試みるが改善しないため当科初診。現症：官能検査スコア4(我慢できる強い悪臭)、硫化水素6.2ng/10ml mouth air、メチルメルカプタン4.6ng/10ml mouth air、ジメチルサルファイド0.7ng/10ml mouth air、上顎右側第一大臼歯(16)全部鑄造冠内部から悪臭。診断：16慢性化膿性根尖性歯周炎を原因とする口腔由来病的口臭。治療内容：感染根管治療、全部鑄造冠。症状の変化：口臭減少。

【考察】

今回報告した3症例は他の疾患と類似しているため的確な診断が行われず、長期間の治療を余儀なくされたものである。歯内病変は通常、打診痛、根尖部の腫脹や瘻孔などの典型的な症状を呈することが多く、エックス線写真でも根尖付近の透過像により原因歯を同定することが可能である。しかし、I型歯内歯周病変では根分岐部エックス線透過像などのために歯周疾患と混同されることがある。歯内歯周病変は治療が困難なこともあるが、I型の場合は歯内治療により比較的容易に改善が期待できるための確な診断と適切な歯内治療が重要である。また、外歯瘻のように原因歯と離れた部位で症状が発現することがある。この場合、患者は皮膚疾患と判断することがあるが、的確な診断が行われないと治療が長期間にわたることもあるため注意が必要である。口腔由来病的口臭の場合、歯周疾患が原因であることが多く一般歯科医も最初に歯周治療を行う傾向がある。しかし、時には歯内病変により口臭が発生することがあるため歯周治療で改善しない場合は再度の検討が必要である。このように歯内病変が原因で種々の症状が発現することがあるため慎重な診査、的確な診断が重要だと思われる。

歯髄刺激に伴う血中コルチコステロンと血糖値の動態におよぼす ナロキシンの影響

兵庫医科大学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

Effect of naloxone on tooth pulp stimulation-induced changes in blood concentrations of corticosterone and glucose

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine

○HASEGAWA Makoto, ABE Tetsuya, FUJIWARA Masanori, OHTSU Nao, HONDA Kousuke

【緒言】第 129 回本学会において、演者らは、歯髄刺激によりラット海馬血流に増加反応を生じることを報告した。このことは、歯髄刺激が何らかの情動効果を招来することを示唆する。その得られた示唆に基づいて演者らは、歯髄刺激によってストレスホルモンの遊離量が増加していることを前提に一連のテーマで研究を開始した。しかしながら、実際に研究を進めたところ、歯髄刺激を繰り返し与えると、ストレスホルモンの遊離はむしろ抑制され、また血糖値の上昇も抑制されることが明らかとなった(第 132、133 回本学会)。そこでストレスホルモン遊離抑制は、内因性オピオイドに関与した下行性疼痛抑制によるものである可能性を考え、まずカテコールアミンの遊離抑制に関して、オピオイドの拮抗薬であるナロキシンをを用いて検討した(第 134 回本学会)。今回は、引き続き歯髄の繰り返し刺激による血糖値上昇の抑制およびコルチコステロンの遊離抑制に関するメカニズムを明らかにする目的で、ナロキソン投与下における血糖値の変化および歯髄刺激時のコルチコステロン動態について調べた。

【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) 20 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。始めにオピオイドの拮抗薬であるナロキソン 1 mg/kg 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 1.5 ml の採血を行った。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。まず採血した中から 0.5 ml を用い i-STAT (扶桑薬品)により血糖値の測定を行い、その後、残りの 1.0 ml 血液から遠心分離により血漿を採取し、コルチコステロン分析を行った。そして、血糖値およびコルチコステロンに関して、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】血糖値に関しては、ナロキソン投与下において、TPS 群は Sham 群と比較して、歯髄刺激 1 時間後および 2 時間後ともに有意に増加していた。コルチコステロンに関しては、TPS 群は Sham 群と比較して、歯髄刺激 1 時間後では差を認めなかったが、2 時間後において有意に遊離が抑制されていた。

【考察】第 134 回本学会において、TPS により血糖値が低下することを報告している。血糖値は、副腎髄質から遊離するアドレナリンに依存する部分が多いので、歯髄刺激に伴うカテコールアミンの遊離動態がそのまま反映される。今回、ナロキソン投与下で、TPS により血糖値が増加したことは、歯髄刺激の繰り返しが内因性オピオイドに関連した下行性疼痛抑制であるとした第 135 回本学会における演者らの考えを裏付けるものである。但し、TPS によるコルチコステロンの遊離抑制は、ナロキソン投与下でも生じていた。この点に関しては、現段階では不明で今後さらなる検討が必要である。

会員外協力者：秦 順一(社会福祉法人、枚方療育園)

本研究は、科学研究費補助金の助成のもとに行われた(基盤研究(C)、課題番号 21592438)。

Sub-MIC の緑茶カテキンが *Porphyromonas gingivalis* バイオフィームに及ぼす影響の検索

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)
○朝日陽子, 野杵由一郎, 前菌葉月, 山本れいこ, 山口幹代, 恵比須繁之

Effects of sub-MIC green tea catechin on *Porphyromonas gingivalis* biofilm

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○ASAHI Yoko, NOIRI Yuichiro, MAEZONO Hazuki, YAMAMOTO Reiko, YAMAGUCHI Mikiyo, EBISU Shigeyuki

【研究目的】

抗菌療法に抵抗する細菌バイオフィームの抑制法として、歯科臨床では機械的除去が第一選択として行われている。一方、難治性根尖性歯周炎には、根尖孔外バイオフィームが関与し、*Porphyromonas gingivalis*をはじめとするグラム陰性菌が高頻度で検出されることが明らかとなっている。このように除去が困難な部位に形成されたバイオフィームに対しては、有効な化学的コントロール法の開発が必要である。一方、細菌にはクオラムセンシングと呼ばれる自己誘導因子 (AI) を介した細胞間コミュニケーションが存在し、毒素の産生やバイオフィーム形成等に関与している。我々は、AI類似化合物の一部が、*P. gingivalis*のバイオフィーム形成に対し、抑制的に働くことを明らかにした¹⁾。一方、大腸菌において、sub-MICの緑茶カテキンはクオラムセンシングに影響を及ぼすことおよび、バイオフィームを破壊することが報告されている。また、緑茶カテキンは、*P. gingivalis*に対して抗菌活性を有することが明らかとなっている (MIC 500 μ g/ml)²⁾。今回、sub-MICの緑茶カテキンが*P. gingivalis*のバイオフィームに及ぼす影響を検索した。さらに、*P. gingivalis*のAI産生に及ぼす影響について検討を行った。

【材料および方法】

緑茶カテキンの1種であるエピガロカテキンガレート (EGCg) を用い実験を行った。

1. バイオフィームに及ぼす影響の検索: ポリスチレン製マイクロタイタープレートに*P. gingivalis* 381の培養液を播種し、48時間培養した。その後、最終濃度が1-500 μ g/mlに調整したEGCgを添加し、24時間作用させた。プレート表面に付着したバイオフィーム細菌を1%クリスタルバイオレットで染色、エタノールで抽出後、595 nmの波長を測定し、評価した。EGCg無添加のものをコントロール群とした。統計学的有意差の検討にはFisher's PLSDを用いた。また、試料の一部は、浸漬固定後、脱水、置換し、凍結乾燥を行った後、白金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡(SEM)観察に供した。3次元的観察には、マイクロタイタープレートの代わりにガラスボトムディッシュ上でバイオフィームを形成させた後、Live/Dead® Kitsにて染色し、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察を行った。

2. AI-2産生に及ぼす影響の検索: AI-2のレポーター株である *Vibrio harveyi* BB170 を AB 培地で一晚培養した。これを、5000 倍に希釈したものに、EGCg を作用させた *P. gingivalis* の上清を添加し 30°C で培養した。一定時間後の培養液の発光をルミノメーターで測定し、EGCg が *P. gingivalis* の AI-2 産生に及ぼす影響を評価した。

【成績】

1. 300, 400, 500 μ g/mlのEGCgを添加した群において、コントロール群と比較し有意にバイオフィーム量が低下した ($p < 0.001$)。SEM 観察においては、いずれの群も菌体外マトリックスに覆われたバイオフィームが観察され、微細形態学的な変化は認められなかった。共焦点レーザー顕微鏡観察では、EGCg を 300, 400, 500 μ g/ml 添加した群において、バイオフィームの厚みの減少および死菌が認められた。

2. 1~25 μ g/mlの低濃度のEGCg作用群においてはコントロール群との間で、*P. gingivalis*のAI-2産生に減少傾向を認めた。

【考察および結論】

緑茶カテキンの主要成分であるEGCgは、MIC以下の濃度で*P. gingivalis*のバイオフィームを抑制することが明らかとなった。また、*P. gingivalis*のAI-2産生に影響を及ぼすことから、*P. gingivalis*バイオフィームとともに病原性をコントロールする可能性が示唆された。

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

2) *BioSci Biotech Biochem*, 60(5), 745-9, 1996

茶カテキンはLPS誘導性の歯周ポケット形成および歯槽骨吸収を抑制した

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 展開医療科学講座 歯周病学分野
○吉永泰周, 鶴飼 孝, 藏本明子, 中村弘隆, 吉永美穂, 白石千秋, 吉村篤利, 野口恵司,
高森雄三, 原 宜興

Green tea catechin suppressed the LPS-induced periodontal pocket formation and alveolar bone resorption

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
○YOSHINAGA Yasunori, UKAI Takashi, KURAMOTO Akiko, NAKAMURA Hirotaka, YOSHINAGA Miho,
SHIRAIISHI Chiaki, YOSHIMURA Atsutoshi, NOGUCHI Satoshi, TAKAMORI Yuuzou, HARA Yoshitaka

【研究目的】

歯周炎は、プラーク由来の細菌によって誘導される慢性炎症性疾患であり、臨床的特徴は歯周ポケット形成と歯槽骨吸収である。茶カテキンは抗酸化作用、抗菌作用、抗炎症作用、抗癌作用など様々な生物学的活性を示すが、歯周炎に対する作用はよくわかっていない。そこで今回我々は、LPS誘導性ラット歯周炎モデルを用いて、茶カテキンの歯周ポケット形成及び歯槽骨吸収に与える影響について検討した。

【材料および方法】

- 1) **実験スケジュール** : 9週齢雄性Lewis系ラットを用いて実験を行った。すべてのラットは、*E. coli*由来LPSを Freund's complete adjuvant とともに腹腔内投与し、28日後に再度LPSを Freund's incomplete adjuvant とともに腹腔内投与を行うことにより免疫感作を行った。2回目の腹腔内投与後、上顎両側第一臼歯の口蓋側歯肉溝にLPSを30分間(5分おきに $3\mu\text{l}$ ずつ)24時間毎に滴下した群をLPS群、LPSと茶カテキンを混合した溶液を滴下した群をカテキン群とした。両群ともに10、20回滴下した24時間後に屠殺し、上顎骨を摘出、固定、脱灰、パラフィン包埋後、 $4\mu\text{m}$ の組織切片を作成し、HE染色、RANKLの免疫染色を行った。コントロールとして無滴下の感作ラットを用いた。
- 2) **血清抗体レベルの測定** : LPSによる免疫感作の状態を確認するために、2回目のLPS腹腔内投与後、1、6、11、21日後に各ラットの眼窩下静脈から血液を採取、血清を分離し、ELISA法により*E. coli*LPSに対するIgG抗体レベルを吸光度にて評価した。
- 3) **炎症の評価および形態学的評価** : HE染色を行った切片を用いて、接合上皮(JE)周囲結合組織またはJE内へ浸潤した炎症性細胞数を光学顕微鏡下にて計測し、炎症性細胞浸潤について評価した。さらに歯周ポケット形成の評価としてアタッチメントロスすなわちセメント・エナメル境(CEJ)から根面に接したJEの歯冠側端までの距離を、さらに骨吸収の評価としてCEJから骨頂部までの距離をPCソフトImage Jにて測定した。
- 4) **骨面周囲のRANKL陽性細胞数** : RANKL免疫染色を行った切片を用いて、RANKL陽性細胞の分布を確認し、骨面周囲のRANKL陽性細胞数を光学顕微鏡下にて計測した。

【結果】

血清抗体価は、LPS群、カテキン群ともに2回目の免疫感作6日後には上昇し、実験期間中その上昇は維持され、実験期間中両群間に有意な差は認められなかった。JE内およびJE周囲の結合組織へ浸潤した炎症性細胞数、アタッチメントロス、歯槽骨吸収は、コントロール群と比べてLPS群で有意に増加していた。しかしながら、カテキン群ではLPS群と比べて10日、20日ともに有意に減少していた。骨面周囲のRANKL陽性細胞数は、10日、20日ともにコントロール群と比べてLPS群で増加していたが、10日目においてカテキン群の方がLPS群と比べて有意に減少していた。

【結論および考察】

本実験の結果より、茶カテキンは炎症性細胞浸潤を抑制し歯周ポケット形成を減少させ、さらにRANKL産生を抑制することによりLPS誘導性の歯槽骨吸収を抑制することが示唆された。これらの茶カテキンの作用は、臨床的に応用することにより歯周病の予防および治療に有用であると考えられる。

炭酸ガスレーザー照射は骨移植後の治癒を促進する

奥羽大学歯学部歯科保存学講座保存修復学分野

○中 貴弘, 横瀬敏志

Carbon Dioxide Laser Irradiation Induces Bone Healing After Bone Transplantation
Division of Operative Dentistry, Department of Conservative Dentistry,
Ohu University, School of Dentistry.
○NAKA Takahiro, YOKOSE Satoshi

【研究目的】炭酸ガスレーザー照射は、歯科診療において応用頻度が高いが、その効果に対する科学的根拠は多くない。特に骨代謝領域に対する検討は少ない。炭酸ガスレーザー照射はメカニカルフォース（機械的刺激）の一つであり、メカニカルフォースの受容体が骨細胞であると考えられていることから、我々はこれまで、炭酸ガスレーザー照射と骨細胞の関係について研究報告を行ってきた。今回、骨移植後の治癒に対して、炭酸ガスレーザー照射がどのような影響を及ぼすかについて動物実験モデルを応用することにより解析を行ったので報告する。

【材料および方法】本実験は、奥羽大学実験動物委員会の承認を得た上で行った。10週齢メスSDラット（35匹）を使用し実験を行った。ラットは、骨片供給群、A群およびB群の3群に分類した。A・B両群のラットに対し、麻酔後に脛骨を露出させ、バーにて1mm×3mmの骨欠損を形成し、骨移植片を埋入した。移植片は、骨片供給群のラット脛骨を皮質骨のみとし、1mm×3mmの小片に加工し、埋入まで冷却したPBS溶液中で保管したものと炭酸ガスレーザー照射を行ったものを準備した。炭酸ガスレーザー照射は、出力0.5w、照射距離3cm、照射時間30秒、トータルエネルギー密度132.3 J/cm²とした。AB両群のラットに対し、右側脛骨埋入窩に未処理の骨片（A-Control群あるいはB-Control群）を、左側にはレーザー照射した骨片（A-Laser群あるいはB-Laser群）を埋入した。骨片移植後、B群にのみ炭酸ガスレーザー照射を、埋入直後、1日、3日、5日、7日後の計5回、皮膚面上から出力0.5w、照射距離3cm、照射時間30秒、トータルエネルギー密度132.3 J/cm²にて行った。試料採取は、埋入後10日と20日に実施し、軟エックス線写真撮影後、EDTAにて脱灰を行なった後にパラフィン包埋し、連続切片を作製した。切片を用いて、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ（TRAP）染色およびSOSTに対する免疫組織学的染色を施した。

【結果】レーザー照射を行った移植骨片では、骨細胞の形態的变化が認められた。移植後10日のA群においては、明確な移植骨と周囲皮質骨の癒合は確認できなかったが、B群のラットでは癒合が促進されている所見が認められた。TRAP染色の結果でも、有意な陽性細胞数の増加が認められた。免疫組織化学的解析の結果は、Sclerostinの発現が、移植後10日の時点でB群において多く認められた。移植後20日のB群においては、さらに周囲骨との癒合が認められる所見が得られた。一方、移植前にレーザー照射を行った群と行っていない群では、治癒に対する差は認められなかった。

【考察】炭酸ガスレーザー照射が、骨移植後の代謝に与える影響を検討した結果、B群ではA群と比較して骨代謝が亢進され、移植骨と周囲骨の癒合が促進された。これは、骨細胞が炭酸ガスレーザーの刺激をメカニカルフォースとして感知し、骨細胞が産生するシグナル伝達が亢進することで、結果として骨代謝が亢進され、移植骨周囲の治癒が促進されたものと考えられる。今後は、メカニカルフォースに反応した骨細胞が、どのようなシグナルを産生することで骨代謝が亢進されるのかを解析していく予定である。

【結論】炭酸ガスレーザー照射は、骨移植後の治癒を促進することが示唆された。

フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントの物理的特性

日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座¹, 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門², 米国国立標準技術院パッフェンバーガー研究所³

○尾形英大¹, 林 誠^{1,2}, 小森規雄¹, 鈴木裕介¹, 高木章三³, CHOW Laurence³, 小木曾文内^{1,2}

Physical properties of Fluorapatite-forming Calcium Phosphate Cements

Departments of Endodontics¹ division of Advanced Dental Treatment², Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, ADA Foundation Paffenbarger Research Center, National Institute of Standards and Technology³

○OGATA Hidehiro¹, HAYASHI Makoto^{1,2}, KOMORI Norio¹, SUZUKI Yusuke¹, TAKAGI Shozo³, CHOW Laurence³, OGISO Bunnai^{1,2}

【研究目的】

近年、リン酸カルシウムセメントを主成分とした多種の骨補填材が臨床に広く使用されている。これらのなかに1985年にBrownとChowによって開発されたCalcium Phosphate Cement (CPC)がある。このセメントは、Dicalcium Phosphate Anhydrous (CaHPO₄: DCPA)とTetracalcium Phosphate (Ca₄(PO₄)₂O: TTCP)の等モル比からなり、水分の介在により硬化し最終産物がHydroxyapatite (HA)になることで知られている。

一方、フロライド (F) の存在するHAは骨構造を強化するとの報告がある。このことから、演者らはフルオロアパタイト置換型CPC (FA-forming CPC)を試作し、物理学的特性を調べる一環として、硬化時間、Diametral tensile strength (DTS)、気孔率、X線回析について検討を行った。

【材料および方法】

CPC粉末にフッ化ナトリウム配合量を各5段階 (F/Ca=0 (control), 0.05, 0.1, 0.2 (FAの化学量論比), 0.4)に変化させたセメントを試作し、0.5Mのリン酸溶液とP/L=2.5になるように混和した。その後すぐに、ステンレスの型 (直径6 mm、厚さ3 mm)に充填し、2枚のフリットガラス版で挟み、37°C、湿度100%の環境下のインキュベータ内で4時間保管した。セメント硬化後、試料をステンレス型から外し、同様の環境下でPhysiologic like solution (PLS) (1.15M CaCl₂, 133mM NaCl, 1.2mM KH₂PO₄, 50mM HEPES, pH=7.4) (10mL/disc)に20時間および1週間浸漬した。

硬化時間の測定はGilmore needle methodを用いた。DTSはINSTRON 5500R Testing Machineを用い、速度は10mm/minとして算出した。気孔率は被検材料を1日乾燥させて後、密度より算出した。X線回析は、vertically-mounted diffractometer system (D/MAX 2000, Rigaku, Danvers, MA)を用いた。測定結果はTwo-way ANOVAを用いて、 $P < 0.05$ にて統計処理を行った。

【成績】

フッ化ナトリウム配合量を増加させた場合、硬化時間はcontrolと比較し、F/Ca=0.05、0.1、0.2は有意に低い値を示し、F/Ca=0.4は有意に高い値を示した。DTSは、controlと比較し、すべてのグループで有意に低い値を示した。気孔率は、controlと比較し、F/Ca=0.05、0.1で有意差は無く、F/Ca=0.2、0.4は有意に高い値を示した。X線回析では、20時間PLSに浸漬した場合、controlと比較し、すべてのグループにおいてTTCP量の増加が見られた。また、1週間PLSに浸漬した場合、20時間浸漬後と比較し、すべてのグループにおいてHA量の増加が見られた。

【考察および結論】

以上の結果より、FA-forming CPCの物理学的特性は、骨補填材として臨床応用できる可能性が示唆された。F/Ca=0.4では、X線回析パターンがTTCPと類似していたため、FAがTTCPの表面を覆ってしまったと考えられる。このことにより、他のグループと比較し、硬化時間の延長、気孔率の増加、およびDTSが低下したものと推察された。

魚コラーゲンの物理・化学的性質

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野
○山本耕平, 池田 毅, 山田志津香, 林 善彦
Physicochemical Properties of Fish Collagen
Department of Cariology, Nagasaki University
Graduate School of Biomedical Sciences

○YAMAMOTO Kohei, IKEDA Takeshi, YAMADA Shizuka, HAYASHI Yoshihiko

【緒言】再生医療において不可欠な3要素、細胞、足場、栄養素のうち、われわれは足場材に関して種々検討を加えている。キトサンの足場材としての特性に関して、キトサンスポンジを試作しすでに報告を行ってきた(第134回日本歯科保存学会学術大会)。残念ながら、キトサンはイヌなどの大動物の歯髄への応用で初期に急性炎症を惹起させる欠点を有している。そこで、人獣共通感染症の対象とならない魚コラーゲンについて足場材としての検討を開始している。その物理・化学的性状について報告する。

【材料および方法】

- 1) 魚コラーゲン; テラピアの皮膚からペプシン可溶化し1、2%に調整されたタイプIアテロ化コラーゲン(5mM酢酸溶液、0.45 μ mフィルター濾過済)は、(株)ニッピ バイオマトリックス研究所から提供を受けた。
- 2) 変性温度計測; 各種濃度の魚コラーゲン溶液の変性温度はゲル化の前後で示差走査熱量計(エスアイアイ・ナノテクノロジー EXSTAR DSC6000)によって計測した。
- 3) 物性試験; 魚コラーゲンを凍結乾燥して得られた円柱状のサンプルをPBS緩衝液に浸漬し濡れた状態で、床置型オートグラフ(島津オートグラフAG-X)にて静的引張試験を行い、応力-ひずみ曲線により強度、柔軟性を評価した。
- 4) エンドトキシン含有量; 上記スポンジを1時間浸漬したPBS緩衝液から検体を採取し、反応液を添加後マイクロプレートリーダー(コロナSH-1000)内にて、カイネティック比色法により吸光度(405nm)の経時的変化率(mAbs/min)を測定し、エンドトキシン含有量(EU/ml)を算出した。
- 5) 形態観察; 各濃度の溶液から凍結乾燥によって調整したスポンジ体を、デジタルマイクロスコープ(キーエンスVHX-1000)で観察した。

【結果】今回使用したコラーゲンのアミノ酸組成から、プロリンの水酸化率は43%と比較的高かった。コラーゲンの物性に影響する変性温度は、0.5、1、2%のいずれの濃度でも約35 $^{\circ}$ Cであった。またゲル化後は40 $^{\circ}$ C程度に上昇することが確認できた。

1、2%の魚コラーゲンから作製したスポンジは、PBS緩衝液で濡れた状態で、0.1MPa以上の引張強度を示し、1%以下のものと比べて強度の増加が顕著であった。

エンドトキシン析出量の結果については、0.01EU/ml程度となり、いずれも日常の临床上多用されている注射用蒸留水の目安規格値である0.25EU/ml以下であった。

作製したスポンジは、形態的にはメッシュ状構造をとっており、孔径は100~200 μ m程度であった。

【まとめ】魚コラーゲンは、すでに報告したキトサンスポンジと比べて同等以上の物性を有していた。魚コラーゲンは一般に変性温度が低いため臨床への応用には、制約があるとされていたが、今回の結果から、熱帯域の魚であるテラピアでは予想された以上の高い変性温度が確認できたので、今後は、ゲル化、架橋化の調整によって生体への応用の可能性が示唆された。現在歯髄、歯槽骨組織内における足場材として不可欠な特性は生体親和性および生分解性である。埋入後の組織反応、生体内分解動態など検討を加える予定である。

【参考文献】

- 1 ; Hayashi Y: Application of chitosan oligosaccharide and glucosamine in dentistry. In *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*, ed. Se-Kwon Kim, CRC Press- Taylor & Francis Group, 447-460, 2010.
- 2 ; Hayashi Y, Yamada S, Ikeda T, Yanagiguchi K: Fish collagen and tissue repair. In *Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects*, ed. Se-Kwon Kim, CRC Press- Taylor & Francis Group, in press, 2011.

ペリオスチンによる骨芽細胞分化制御

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯髄生物学分野¹, 口腔病理学分野²,
東京工業大学大学院生命理工学研究科³

○川島伸之¹, 周 夢宇¹, 須田英明¹, 工藤 明³, 勝部憲一²

Regulation of osteoblast differentiation by periostin

Pulp Biology and Endodontics¹, Section of Oral Pathology²,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
Department of Biological Information, Tokyo Institute of Technology³
○KAWASHIMA Nobuyuki¹, ZHOU Mengyu¹, SUDA Hideaki¹, KUDO Akira³, KATSUBE Ken-ichi²

【研究目的】

ペリオスチン (Postn) は osteoblast specific factor と呼ばれ、骨芽細胞分化において重要な働きを担っている。Postn が欠損したマウスにおいては、骨に負荷をかけることにより、その構造に質的な異常が生じることが報告されている。Postn の主要な機能はコラーゲンの三次元構造の成熟にあるといわれているが、他の機能については未だ詳細が不明である。ところで、Postn は非石灰化組織である歯根膜に強く発現しており、歯根膜のマーカー遺伝子のひとつでもある。このことは、Postn が単に骨芽細胞の分化誘導以上の機能を有している可能性を示唆する。さらに我々は、骨芽細胞への分化傾向の強いマウス骨髄間質細胞 Kusa-A1 と、同じ組織由来で分化傾向の低い Kusa-O との間で遺伝子発現を比較検討したところ、特に Kusa-O 細胞に発現が高かった遺伝子の一つが Postn であった。今回、Postn が骨芽細胞分化を抑制的に制御している知見が得られたのでここに報告する。

【材料および方法】

<Postn 発現誘導および抑制>

Postn を強制発現させるために、Kusa-A1 に Postn 発現ベクターをトランスフェクションし、シングルコロニーを抗生剤により選別して安定発現株を作製した。他方、Postn 発現を抑制するために、Kusa-O に Postn RNAi (Silencer® Select Pre-Designed and Validated siRNA, Applied Biosystems) をトランスフェクションした。

<機能解析>

1. 石灰化結節形成

石灰化誘導培地(10%FBS, 5mM β -glycerophosphate, 0.2mM ascorbic acid 含有 α -MEM 培地)にて細胞を培養し、形成された石灰化結節をアリザリンにて染色した。

2. 骨芽細胞マーカー発現

骨芽細胞マーカー発現をリアルタイム PCR (rPCR)にて解析した。すなわち、培養細胞より RNA を抽出 (QuickGene Mini80, 富士フィルム) し、抽出された RNA (300ng) より cDNA を合成 (RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo) し、その cDNA をテンプレートに骨芽細胞マーカー特異的プライマーを用いて rPCR (GoTaq™ qPCR Master Mix, Promega, CFX96, BioRad) を行った。

【結果および考察】

Kusa-A1 細胞は骨芽細胞への強い分化能を示し、石灰化誘導培地中にて石灰化結節を容易に形成する。Postn 安定発現株においては、石灰化結節形成が抑制される傾向を示した。またオステオカルシンをはじめとする骨芽細胞マーカーの発現も抑制されていた。一方、Kusa-A1 と同じ組織由来でありながら骨芽細胞への分化傾向が弱い Kusa-O において Postn 発現を抑制したところ、石灰化が亢進する傾向が認められた。さらに骨芽細胞マーカー発現も亢進していた。以上の知見は、Postn 発現の増強が骨芽細胞分化および石灰化を抑制することを示唆している。

【結論】

Postn 発現の増強は、骨芽細胞の分化および成熟を負の方向に向かわせると考えられた。

Dentin sialophosphoprotein の骨芽細胞分化誘導作用並びにそのメカニズムの解析

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 顎口腔頸部医科学講座 健康増進歯学研究室

○鈴木茂樹, 小武家誠司, 西村英紀

Dentin sialophosphoprotein induction of osteoblastic differentiation and the analysis of its cleavage into two functional proteins

Department of Dental Science for Health Promotion Division of Cervico-Gnathostomatology Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences
OSUZUKI Shigeki, KOBUKE Seiji, NISHIMURA Fusanori

<研究目的> 歯の支持組織である象牙質は Type I collagen が豊富に存在する骨に似た組織であり、コラーゲン以外に多量に存在する非コラーゲンタンパクが協調的に作用し硬組織を形成する。Dentin phosphoprotein (DPP) 及び Dentin Sialoprotein (DSP) は、象牙質に最も多量に存在する非コラーゲンタンパクであり、それぞれ象牙質石灰化に必須の役割を果たすと考えられている。DSP はプロテオグリカンとして、DPP は高度にリン酸化されたタンパクとして象牙質に沈着する。DSP と DPP は *Dentin sialophosphoprotein (DSPP)* という 1 遺伝子が合成された後、DSPP precursor protein が開裂されることにより DSP と DPP となり象牙質に沈着する。これまでに当研究室では、正常 DSPP または開裂抵抗性 DSPP を発現する細胞株を作製したことを報告してきた。そこで本研究では、これら樹立した細胞を用いて、DSPP の硬組織形成分化に対する影響を検討するとともに、DSPP 開裂の意義とメカニズムの解明を試みた。

<材料および方法> **1.** DSP 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により細胞上清中の DSP (DSPP) のサイズや発現量の検討を行った。**2.** MC3T3 (マウス前骨芽細胞株) DSPP 過剰発現細胞株を石灰化誘導培地で長期に培養し、アルカリフォスファターゼ活性並びにアリザリン染色にて硬組織分化に対する影響を検討した。**3.** 更に、正常 DSPP 過剰発現株を石灰化誘導培地で培養の際、細胞膜透過性 Furin Inhibitor I を 10、20、50、100 μ g/ml の濃度で上清に加え、Furin Inhibitor I が DSPP の開裂を抑制するか否かを検討し、その硬組織形成分化に対する影響についても検討した。**4.** 培養 3 日ごとに細胞数を血球計測板にてカウントし、正常 DSPP または開裂抵抗性 DSPP 過剰発現が細胞増殖に与える影響についても検討した。

<結果> **1.** MC3T3 細胞株では、正常 DSPP、開裂抵抗性 DSPP、コントロールそれぞれ 3 種のクローン用安定発現株を、C3H/10T1/2 ではそれぞれ 2 種の安定発現株を作製した。これら細胞上清中の DSP のタンパクサイズ並びに量を DSP 特異抗体によるウエスタンブロッティングにて解析した結果、MC3T3、C3H/10T1/2 共に正常 DSPP では 100kDa 以下にスミアに広がるバンドを認めた。開裂抵抗性 DSPP では 100kDa 以上に強いバンドを認め、100kDa 以下には全くバンドを認めなかった。コントロールではバンドを認めなかった。**2.** 石灰化誘導時のアルカリフォスファターゼ活性は培養 0、3、6、9、12 日において、正常 DSPP 過剰発現株では開裂抵抗性 DSPP 過剰発現株並びにコントロールと比較して有意に高いことが明らかとなった。開裂抵抗性 DSPP 過剰発現株とコントロール間には有意な差は認められなかった。また、石灰化ノジュール形成は正常 DSPP 過剰発現株では培養 9 日目から明らかになるのに対し、開裂抵抗性 DSPP 並びにコントロールでは培養 18 日以降にアリザリン陽性染色像が認められた。**3.** Furin Inhibitor I で細胞を刺激することにより、正常 DSPP 過剰発現株上清に認められる DSPP は非開裂型の割合が増え、50 μ g/ml 刺激でほぼすべての DSPP の開裂が抑制された。更に、Furin Inhibitor I 刺激で、早期分化マーカーである *msx1* や後期分化マーカーである *osteocalcin* 遺伝子の発現低下が認められた。**4.** 細胞増殖速度は正常 DSPP 過剰発現株では、開裂抵抗性 DSPP 並びにコントロールと比較して有意に遅いことが明らかとなった。開裂抵抗性 DSPP とコントロール間では有意な差は認められなかった。

<考察及び結論> 以上の結果より、DSPP の開裂抑制はその細胞外分泌を抑制しないだけでなく、更に開裂抵抗性 DSPP では正常 DSPP より強いバンドシグナルを認めることが明らかとなった。正常 DSPP の過剰発現は骨芽細胞の硬組織形成分化を促進するが、開裂抵抗性 DSPP では促進が認められなかったことから、DSPP は象牙質に沈着する細胞外基質としてのみではなく、積極的に硬組織形成細胞分化を促進させる分子であることが明らかとなった。更に、その機能発現には DSPP の DSP 及び DPP への開裂が必須であることが明らかとなった。

新規幹細胞集団における硬組織再生能の評価

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)
○伊藤祥作, 松下健太, 池田 峻, 山本由美子, 恵比須繁之

The evaluation of the differentiation capacity of the novel stem cell population
Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○ITO Shousaku, MATSUSHITA Kenta, IKEDA Shun, YAMAMOTO Yumiko, EBISU Shigeyuki

【研究目的】

未分化間葉系幹細胞は、骨芽細胞・脂肪細胞・軟骨芽細胞に分化しうる幹細胞として定義されている。そして、歯内・歯周組織を構成する骨芽細胞・線維芽細胞・象牙芽細胞・歯髓細胞などは、未分化間葉系幹細胞由来であると考えられている。我々はマグネティックビーズを用いた簡便な精製法により未分化間葉系幹細胞の濃縮に成功したことを本学会 2009 年度秋季学術大会 (第 131 回) にて報告した。今回、我々は新規幹細胞集団 (Hip0P: Highly purified osteoprogenitors) の硬組織再生能について解析し、新しい知見が得られたので報告する。

【材料と方法】

- 1) マウス骨髄 (C57BL/6J および 129-Tg (ACTB-EYFP) 7AC5Nagy/J) から骨髄細胞を調整し、10%FBS 含有 α MEM 中で培養する。培養 3 日目に PBS にて浮遊細胞を除去する。2 週間培養の後、トリプシン・EDTA 処理により付着細胞を回収する (骨髄ストローマ細胞)。
- 2) 回収した骨髄ストローマ細胞と、血球系細胞のマーカー分子に対する抗体 (抗 CD5、抗 CD45、抗 CD11b、抗 Gr-1、抗 7-4、抗 Ter-119、抗 CD45R) を結合したマグネティックビーズとを反応させる。反応後、細胞をマグネティックカラムに注入し、カラムから流出してきた細胞を回収する。
- 3) マグネティックビーズ法により精製した新規細胞集団について以下の方法にて評価を行った。
 - (1) 移植片中における移植細胞の局在の評価: 129-Tg (ACTB-EYFP) 7AC5Nagy/J から調整した新規細胞集団を ICR nude マウスに移入する。約 8 週後に移植片を摘出し、脱灰および固定ののち凍結切片を作製した。抗 CD34 抗体を用いて免疫化学組織染色をおこない移植細胞の局在を評価した。
 - (2) in vivo における硬組織再生能についての評価: C57BL/6J から調整した様々な細胞数 (1.0×10^5 個、 2.5×10^5 個、 7.5×10^5 個、 1.0×10^6 個、 1.5×10^6 個、 2.0×10^6 個) の新規細胞集団を ICR nude マウスに移入する。約 8 週後に移植片を摘出し micro-CT にて硬組織量を計測した。

【結果】

- 1) 移植細胞が分化して形成された移植片は、皮質骨用硬組織によって囲まれ (egg shape)、その中には、骨梁や骨髄などの組織が観察された。移植片のすべての領域において YFP 陽性細胞が観察され、移植細胞により再構成されていることが明らかとなった。抗 CD34 抗体による免疫化学組織染色では、YFP 陽性血管内皮細胞の周囲に多数の CD34 陽性が認められ骨髄 niche の形成が観察された。
- 2) 移植細胞数と硬組織産生量は、正の強い相関関係が認められた ($r=0.97$)。

【結論】

新規幹細胞集団 (Hip0P) により再生する硬組織は、移植する細胞数と相関することが明らかとなった。

ラット象牙芽細胞の分化におよぼす β -catenin の作用について

奥羽大学歯学部歯科保存学講座保存修復学分野
○門倉弘志, 和田康弘, 和田隆史, 中 貴弘, 横瀬敏志

Effects of β -catenin on odontoblast differentiation in rat dental pulp cells

Division of operative dentistry, Department of conservative dentistry, Ohu university school of dentistry
○KADOKURA Hiroshi, WADA Yasuhiro, WADA Takashi, NAKA Takahiro, YOKOSE Satoshi

【研究目的】

個体発生や形態形成の場において Wnt ファミリーは分泌シグナル因子として様々な器官、組織、細胞に作用し、複数からなる Wnt シグナル伝達経路を介して細胞の増殖や分化をコントロールしている。歯の発生過程においても Wnt ファミリーは歯胚にその発現が認められ、歯数や歯の形態等の決定に重要な働きがあることが報告されている。しかし、歯髄組織および象牙質形成における Wnt ファミリーの作用は未だ不明な点が多く、さらなる研究が望まれている。今回、我々は象牙芽細胞分化における Wnt シグナルの作用を調べることを目的として、Wnt シグナル伝達経路の一つである canonical Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路に注目し、ラット培養歯髄細胞を用いて実験を行ったので報告する。

【材料と方法】

5 週齢の雌ラットの下顎切歯から歯髄組織を摘出し、細切後にコラーゲン-トリプシン酵素液にて分離した細胞を実験に用いた。培地は 10%CS α MEM に 1.5mM の β グリセロリン酸と 50 μ g/ml のアスコルビン酸を添加して使用した。 β -catenin の核内への集積の為に GSK-3 β の阻害薬として塩化リチウムを加えた群 (LiCl 添加群)、を実験群とし、対照群と比較した。培養 20 日目において ALP 染色法および象牙質様石灰化結節の解析の為に、Von Kossa 染色法を行った。実験群および対照群について、象牙芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP)、DSP、オステオカルシン (OCN) mRNA の発現をリアルタイム PCR 法により解析した。また Wnt シグナルのアンタゴニストであり、硬組織形成に関わるシグナル因子である SOST mRNA の発現について LiCl 群、対照群、そして遺伝子導入により培養歯髄細胞の β -catenin を knock down した群 (β -KD 群) においてリアルタイム PCR 法により解析した。

【結果と考察】

対照群では培養 20 日目には ALP 陽性細胞の周囲に象牙質様石灰化結節の形成が認められたが、LiCl 添加群では対照群と比較して象牙質様石灰化結節は減少した。ALP、DSP、OCN mRNA の発現は対照群に比較して LiCl 添加群では抑制された。以上の結果から canonical Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路は象牙芽細胞の分化を抑制することが示唆された。さらに SOST mRNA の発現を解析したところ、対照群と比較して LiCl 添加群ではその発現は亢進していた。一方、 β -KD 群では SOST 発現の亢進は認められなかった。SOST の遺伝子産物である sclerostin は Wnt シグナルのアンタゴニストであり、SOST 遺伝子のノックアウトマウスでは骨の過形成が起こる。また、sclerostin は骨芽細胞の骨形成を抑制することが報告されている。さらに骨と象牙質の形成には共通の遺伝子発現や同様の石灰化機構があると考えられている。これらのことから sclerostin が骨芽細胞におよぼす作用と同様のメカニズムにより、本実験での象牙芽細胞の分化の抑制が起こった可能性が示唆された。また、LiCl 添加群において SOST mRNA の転写活性が上昇したことから、Wnt シグナルに対して sclerostin の negative feedback loop が存在する可能性が示唆された。

【結論】

Canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway はラットの象牙芽細胞分化を調節していることが示唆された。

最終糖化産物(AGEs)がラット培養歯髄細胞の石灰化物形成と抗菌ペプチド発現に及ぼす影響

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯周歯内治療学分野

○中島由紀子, 稲垣裕司, 板東美香, 廣島佑香, 木戸淳一, 永田俊彦

Advanced Glycation End-products Affects Calcification and Antimicrobial Peptide Expression in Cultured Rat Dental Pulp Cells

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

○NAKAJIMA Yukiko, INAGAKI Yuji, BANDO Mika, HIROSHIMA Yuka, KIDO Jun-ichi, NAGATA Toshihiko

【研究目的】 糖尿病患者では動脈硬化が合併症として現れるが、近年 AGEs の蓄積が血管の石灰化に重要な役割を担っていることが明らかになった。一方、糖尿病患者の歯髄では高頻度で歯髄腔の狭窄や不定形の石灰化物の形成が認められる。我々の研究室では、糖尿病ラットの歯髄で病的石灰化物の増加やその周囲で骨基質タンパク質の発現が上昇していることを報告した (*J Endod* 36, 1014-20, 2010)。また第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会で、①糖尿病ラットの歯髄組織では AGEs 受容体 (RAGE) や骨基質タンパク質である OPN, OCN の mRNA 発現が増強していること、②ラットの歯髄細胞培養系に AGEs を添加すると石灰化骨様結節の形成量、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、OPN 産生量が増加することを明らかにし、糖尿病ラットの歯髄の石灰化に AGEs が関与していることを示した。そこで本研究では、AGEs の影響が歯髄細胞に特徴的であるかどうかを検証するために、ラットの歯肉線維芽細胞培養系に AGEs を添加し、その石灰化誘導について歯髄細胞培養系と比較した。また、動脈硬化巣では炎症の亢進とともに抗菌ペプチドで Ca²⁺結合能を有する S100A8, S100A9 の発現増加が報告されている。そこで歯髄でも同様の現象が認められるかどうかを検証するために、ラット歯髄細胞培養系に AGEs と LPS を添加し、S100A8, S100A9, IL-6 および IL-1 α の mRNA 発現について調べた。

【材料および方法】 実験材料には 6 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いた。AGEs としては、Takeuchi らの方法に従い AGE-BSA を作製し実験に用いた。歯肉線維芽細胞は Kataoka らの方法に従い下顎臼歯部の歯肉より採取してコンフルエントになるまで培養した後、50 μ g/ml アスコルビン酸、2mM β -グリセロリン酸および 10%ウシ胎児血清含有 DMEM 培地に AGE-BSA を 200 μ g/ml または 1mg/ml 添加して細胞培養を行った。なお同濃度の BSA を添加した群を対照群とした。最長 28 日まで細胞培養を継続し、ALP 活性の測定およびプレートに形成された石灰化骨様結節に対して von Kossa 染色を行い、歯肉線維芽細胞と歯髄細胞の石灰化指標の変化を比較した。歯髄細胞は Kasugai らの方法に従い上顎切歯より採取してコンフルエントになるまで培養した後、10%ウシ胎児血清含有 EMEM 培地に 1mg/ml AGE-BSA と 1 μ g/ml LPS を添加し、3, 6, 24, 48 時間後に RNA を抽出した。なお同濃度の BSA を添加した群を対照群とした。引き続き S100A8, S100A9, IL-6 および IL-1 α について RT-PCR を行い、mRNA の発現の変化について調べた。

【結果】 ラット歯肉線維芽細胞培養系において AGE-BSA 添加群では何れの添加濃度においても石灰化骨様結節は形成されず、ALP 活性はラット歯髄細胞培養系と比較して極めて低い値を示した。またラット歯髄細胞培養系において AGE-BSA と LPS を添加すると、AGE-BSA 添加群では対照群と比較して、S100A8, S100A9, IL-6 および IL-1 α の mRNA の発現が増強した。

【考察と結論】 ラット歯肉線維芽細胞培養系に AGE-BSA を添加しても、石灰化指標にほとんど変化が認められなかった。この結果より、AGE-BSA 添加によるラット歯髄細胞培養系の石灰化亢進が、歯髄細胞に特有な反応であることが示された。また、AGE-BSA と LPS の添加により抗菌ペプチドや炎症性サイトカインの mRNA の発現が増強したことから、糖尿病ラットの歯髄では AGEs の蓄積により炎症反応が亢進する可能性が示された。以上より、歯髄細胞培養系に AGEs を添加すると石灰化と炎症の両方の指標が増加することが明らかになった。