

象牙細管内の動水力学的水圧に対する象牙芽細胞膜の歪みについて

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

○池田英治, 李 穎, 須田英明

Deformation of Odontoblast Membrane in Response to the Hydrodynamic Pressure

Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences,

Tokyo Medical and Dental University

○IKEDA Hideharu, LI Ying, SUDA Hideaki

【研究目的】

象牙芽細胞は歯髄最外層に整列し、単極性の長い突起を象牙細管内に伸ばしている。我々はこれまでに、象牙芽細胞が個々ではなく、電気カップリングを介して機能複合体として働くことを証明した。感覚神経終末を変形させるとされている象牙細管内の動水力学的水圧に対して、象牙芽細胞の体積や形状も変化することが推測される。しかしこの詳細を明らかにした研究はほとんどない。また、あらゆる細胞には体積膨張に対して体積を調節し、生存していくための機能がある。

この研究で我々は象牙芽細胞膜に存在する、機械的刺激に対する体積・形態調節能力を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

矯正治療の一環として抜歯された4本の小臼歯を用いた。130 μ m以上の単極性突起と局在性の楕円形の核を有する細胞を抜歯後30分以内に単離し、3時間以内に以下の実験に用いた。細胞膜への機械的刺激は、先端を丸めたガラス微小ピペットを用い、圧コントロール式高感度マニピュレーターに装着して行った。細胞外液の浸透圧と温度を調節し、単一チャンネル記録法と化学的穿孔法を用いて、象牙芽細胞の細胞膜表面に存在するイオンチャンネルの動態を記録した。

なおこの研究は、患者(11-14歳)とその保護者からの研究に歯を使用することへの同意と、東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の認可を得て行われた。

【成績】

- ①単一チャンネル記録法から、細胞膜の伸展に応答するMg²⁺感受性の非選択的陽イオンチャンネルが存在することが明らかになった。
- ②化学的穿孔法を用いた記録から、陽イオン性電流が観察され、この電流は浸透圧変化に伴う細胞膨張時に増大した。

【考察】

象牙芽細胞膜には細胞膜伸張感受性あるいは膨張感受性の陽イオンチャンネルが存在することが明らかにされた。このチャンネルは、細胞外の機械的変形をエネルギー変換するだけでなく、細胞容積調節にも重要な働きをしていると推測される。この機能は、細胞の変形や体積変化を起こす傷害を受けた際、象牙芽細胞が生存するために重要であると考えられる。

【結論】

象牙芽細胞は、その細胞膜に存在するMg²⁺感受性のある張力感受性イオンチャンネルを介し、細胞膜の歪みを検知して、細胞膜形態および容積を調節していると考えられる。

スクロースによる高浸透圧刺激下における象牙芽細胞の応答

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 歯科保存学分野
○藤澤真理, 徳田雅行, 山下(森元)陽子, 宮下桂子, 鳥居光男

The responses of odontoblast cells under hyperosmotic stress by sucrose

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

○FUJISAWA Mari, TOKUDA Masayuki, YAMASHITA(Morimoto)Yoko, MIYASHITA Keiko, TORII Mitsuo

[研究目的]

我々は以前より、様々な刺激のなかでも浸透圧に着目し、象牙芽細胞へ及ぼす影響について調べている。常に細胞内外の浸透圧の変化を感知している腎臓・肺・角膜などの組織においては、高・低浸透圧下での細胞応答が報告されているが、象牙芽細胞に対する浸透圧の直接的な影響はほとんど解明されていない。

そこで我々は、高浸透圧刺激物質として、甘味痛の原因と考えられるスクロースを用い、高浸透圧刺激が象牙芽細胞に及ぼす影響について検討を行った。

[材料と方法]

<象牙芽細胞の培養と浸透圧刺激の条件>

マウス歯胚から分離培養した odontoblast-lineage cell line; OLC (Arany S. et. al: Biochem. Biophys. Res. Commun. 342:718-724, 2006) を、10% FBS 添加 D-MEM で培養した。実験には 5 ~15 代までの細胞を用いた。

通常培地 (浸透圧 (330 mOsm)) を 1M スクロースにて、500~1000 mOsm に調整したものを刺激用培地とした。

<高浸透圧刺激下での細胞応答の検討>

1) 生存率…高浸透圧下での、0, 1, 3, 6, 12, 24 時間後までの生存率を MTT assay にて検討した。

また、MAPKs inhibitor を添加した場合の、浸透圧刺激後の生存率の変化も検討した。

2) 細胞形態の変化…高浸透圧刺激後 3 時間の細胞形態を光学顕微鏡下で観察した。

3) アクアポリン (AQP) の発現…水チャネルである AQP2, 5 の発現をウェスタンブロット法、免疫蛍光染色にて確認し、AQP の inhibitor である HgCl₂ を用いて、生存率の変化を MTT assay にて検討した。

4) シグナル伝達…高浸透圧刺激後、細胞から総タンパクを回収し、MAPKs (p38, JNK, ERK) のリン酸化をウェスタンブロット法にて解析した。

5) 細胞死…高浸透圧刺激 3 時間後に DAPI を用いて核染色を行い、蛍光顕微鏡にて核の形態を観察した。また、高浸透圧刺激 3 時間後に、総タンパクを回収し、cleaved caspase-3 の活性化をウェスタンブロット法にて解析した。さらに細胞死の程度を Flow cytometry を用いて解析した。

[結果]

- ・高浸透圧刺激後 3 時間より、浸透圧 600 mOsm 以上では急激に生存率が低下し、細胞形態、核形態も変化した。
- ・AQP のインヒビターである HgCl₂ を添加することで、生存率の低下が有意に抑制された。
- ・活性型 caspase-3, 各種リン酸化 MAPKs は 500 mOsm で発現量の上昇を認めた。
- ・p38, JNK に対する inhibitor を作用させると、700 mOsm で生存率の低下が有意に抑制された。

[考察]

これらの結果より、スクロースは浸透圧を介して象牙芽細胞の細胞死を誘導することが明らかとなった。またこれには、AQP や MAPKs 及び caspase-3 の関与が示唆された。以上から、スクロースによる高浸透圧刺激は、象牙芽細胞に対して様々な細胞応答を促すことが示された。

実験的歯髄炎に対する PRG バリアコートの効果に関する研究

神奈川県歯科大学 口腔治療学講座 歯内療法学分野
○渡部弘隆, 佐藤武則, 武藤徳子, 石井信之

The effect of pulp tissue response to PRG Barrier Coat on rat
Department of Oral Medicine, Division of Endodontics, Kanagawa Dental College
○WATABE Hirotaka, SATO Takenori, MUTO Noriko, TANI-ISHII Nobuyuki

【目的】

窩洞形成後の歯髄組織は、象牙質切削刺激により、切削面直下に位置する象牙芽細胞の変性と毛細血管の拡張が生じ、歯髄炎を引き起こす。また、象牙質切削面には象牙細管の開口により容易に口腔常在菌の感染が起きやすいため、歯髄鎮痛消炎療法や間接覆髄法によって象牙質切削面を保護することが、健康歯髄を維持、回復するために重要である。間接覆髄等に使用するセメントの使用が審美歯科修復における接着性レジン接着性の低下を引き起こすことが危惧されてきたことから、セメント材料に替わる象牙細管封鎖作用を持つ歯面コーティング材が必要とされている。

本実験は新規歯面コーティング材を用いて、開口象牙細管の封鎖効果と象牙質切削刺激による炎症性歯髄反応の抑制効果を検討することを目的とした。

【材料および方法】

4 週齢の♀Wistar ラットに深麻酔を施し、上顎第一臼歯近心歯頸部を歯科用顕微鏡下でグループ状に窩洞形成を施した。実験群として、窩洞形成面に新規歯面コーティング材である PRG バリアコート(松風株式会社)(Coat 群)を通法に従い、乾燥後薄く塗布し、LED 照射器を用いて 10 秒間照射、光重合により硬化させた。対照群としてエッチング処理群と未処理群に分類した。

実験終了 3 日後および 7 日後に灌流固定を行い、顎骨を採取し、脱灰、パラフィン包埋し連続薄切切片を作成後、HE 染色ならびに抗ネスチン抗体を用いた免疫染色を施し、エッチング処理群と未処理群をコントロール群として比較し、病理組織学的検索を行った。

【結果】

病理組織変化の解析において、実験終了 3 日後の結果は、エッチング処理群では切削面の象牙細管内に多数の細菌の侵入が認められた。切削象牙質直下では、毛細血管の拡張、象牙芽細胞の変性が生じ、多形核白血球を中心とした炎症性細胞の集積が認められた。未処理群では、切削面に細菌の侵入が認められるもののエッチング処理群で認められた炎症性細胞の浸潤は顕著に認められなかった。Coat 群では切削後の象牙細管内への細菌侵入は抑制されており、実験終了 3 日後では、象牙芽細胞の変性は認められるものの象牙芽細胞層下への炎症性細胞の波及はほとんど見られず、実験終了 7 日後ではエッチング処理群と比べて象牙芽細胞の再配列傾向が認められる結果であった。さらにエッチング処理群では、切削象牙質直下には修復象牙質形成が顕著にみられた。

【考察】

本実験の結果から、歯面コーティング材を用いた窩洞形成後の象牙細管封鎖は、象牙細管を經由した歯髄組織への口腔細菌の侵入を阻止するだけでなく、窩洞直下の象牙芽細胞層内で炎症性反応をとどめることで、早期に健康歯髄に回復することが示される。歯面コーティング材である PRG バリアコートは窩洞形成後の歯髄組織の炎症反応を最小限に抑える有用な材料であることが示された。

象牙質マトリックスタンパク質 1 (DMP1) 由来合成ペプチド (pA, pB) による ラット露髄面の直接覆罩効果

—増粘剤を添加したプライマーによる創傷部の長期的観察—

日本歯科大学新潟生命歯学部歯科保存学第2講座¹, 日本歯科大学新潟病院総合診療科²

○鈴木雅也¹, 平賢久², 加藤千景¹, 山内淳一¹, 新海航一¹

Direct Pulp Capping Effect with Synthetic Peptide Derivatives (pA, pB) of Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) on Exposed Pulp in Rat

—Long-term Study on Wound Healing Effect of Nano-filler Containing Primer—

Department of Operative Dentistry, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University¹,

Niigata Hospital, Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University²

○SUZUKI Masaya¹, TAIRA Yoshihisa², KATO Chikage¹, YAMAUCHI Junichi¹, SHINKAI Koichi¹

【研究目的】硬組織誘導効果を持つ機能性接着性レジンシステムの開発を目的として、当講座ではCaCl₂添加プライマー、象牙質マトリックスタンパク質 1 (DMP1) 由来合成ペプチド (pA, pB) 添加プライマー、hydroxyapatite 添加ボンディング材から構成されるシステムを用いてラット露髄面に直接歯髄覆罩すると、術後 14~28 日で特異な層状構造を呈する修復性象牙質を形成して創傷治癒に至ることを報告した^{1, 2)}。しかし、これらの修復性象牙質は露髄面から離れた比較的深部に形成される傾向がみられ、また、各層の間には歯髄組織が介在していた。この層状形成はCaCl₂ 添加プライマーが歯髄組織内へ一気に浸透・拡散しやすいことが原因であることが、これまでの一連の研究から推測された。そこで、第 134 回日本歯科保存学会において、増粘剤を添加してプライマーの粘性を増加させてCaCl₂ の徐放機能を持たせた結果、いわゆる層状構造は少なくなり均一で密度の高い新生象牙質が誘導される傾向にあることを報告した。今回はより長期の観察結果を追加報告する。

【材料と方法】8~9 週齢の雄性 SD 系ラットの上顎第一臼歯近心咬頭頂部を露髄し、創面を AD Gel (クラレメディカル) で 5 分間処理、6%NaClO と 3%H₂O₂ による交互洗浄を行った後、直接歯髄覆罩を行った。覆罩に用いた試作接着性レジンシステムは Clearfil Mega bond (MB: クラレメディカル) を基本組成としている。試作プライマーは、MB プライマー (MBP) に CaCl₂ を 5wt% 添加 (P1)、MBP に pA, pB を 5wt% 添加 (P2)、P1 に増粘剤として nano-filler (Aerosil 380, 比表面積が約 380m²/g の hydrophilic fumed silica: 日本アエロジル) を 10wt% 添加 (PIF) の 3 種類、ボンドは MB ボンド (MBB) に hydroxyapatite (OHAp) 粉末を 10wt% 添加 (MB2) の 1 種類を準備した。試作システム群は、Group 1: P1→P2→MB2, Group 2: P1F→P2→MB2, Group 3: P1→P1F→P2→MB2 とした。それぞれの使用法は P1 と P1F: 20 秒処理→エア乾燥, P2: 20 秒処理→エア乾燥→光照射 10 秒, MB2: 塗布後光照射 10 秒である。対照群 (Control Group) には水酸化カルシウム製剤 Dycal (DY: デンツプライ三金) を用いた。窩洞は Clearfil AP-X (APX: クラレメディカル) で修復、光照射は Candelux (モリタ) で行った。観察期間 2, 4, 8, 16 週後に屠殺、4%PFA 溶液で固定した。摘出試料は 10%EDTA 溶液にて脱灰し、通法にてパラフィン連続切片標本を作製した。H-E 染色, Hucker-Conn 組織細菌染色, NF 銀染色, 免疫組織化学染色を行い観察した。

【結果ならびに考察】本システムによる新生象牙質形成の概要は、はじめに露髄面から少し離れた歯髄組織に楕円形で円内側に歯髄組織を含む硬組織を形成した (14 日)。その楕円形の硬組織は経時的に成長を続け、最終的に象牙質橋状の形成に至ったが、円内側に歯髄組織を介在しているためトンネル状構造の存在が示唆された (28 日)。これと同時に露髄部直下では別途新生象牙質の形成が見られ、楕円形の硬組織との間に歯髄組織が存在した。本研究では、各修復性象牙質間に介在する歯髄組織は経時的に減少する傾向がみられたが、観察期間 56~112 日においても完全に硬組織化されることはなかった。しかしながら、介在歯髄組織量は Group 1 に比べて PIF を用いた Group 2 と Group 3 の方がより少なく、CaCl₂ 添加プライマーの粘性増加は密度の高い修復性象牙質の形成には効果的であった。Control Group では、一定の厚みがある象牙質橋を形成した試料から不均一な試料まで様々であり、とくに DY が歯髄組織に押し込まれるように貼葉された試料で修復性象牙質の形成量が少なく、象牙質橋が形成されない試料も存在した。

【参考文献】

1) 加藤喜郎, 他: 象牙質マトリックスタンパク質 (DMP1) 由来合成ペプチド (pA, pB) によるラット露髄面の直接覆罩効果, 日歯保存誌 50 (秋季特別号), P12, 2007.

2) Yoshihisa Taira & others: Direct Pulp Capping Effect with Experimentally Developed Adhesive Resin Systems Containing Dentin Promoting Agents on Rat Pulp -Mixed Amounts of Additives and Their Effect on Wound Healing-, Odontology, 2011, in press.

ヒト歯髄培養細胞におけるエンドサイトーシスを介した MMP-3 による CTGF/CCN2 発現調節

日本大学松戸歯学部 歯内療法学講座¹
日本大学生物資源科学部 獣医生化学研究室²
日本大学口腔科学研究所³

○室町幸一郎¹, 神尾直人¹, 成田貴則², 神尾素代¹, 杉谷博士², 松島 潔^{1,3}

Regulation of MMP-3-induced CTGF/CCN2 expression via endocytosis in human dental pulp cells

Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan¹
Department of Veterinary Biochemistry, College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan²
Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan³

○MUROMACHI Koichiro¹, KAMIO Naoto¹, NARITA Takanori², ANNEN-KAMIO Motoyo¹, SUGIYA Hiroshi², MATSUSHIMA Kiyoshi^{1,3}

【目的】

私たちの研究グループでは MMP-3 のヒト歯髄培養細胞に対する効果を明らかにする目的で研究を行い、CTGF/CCN2 発現がヒト歯髄培養細胞において MMP-3 により促進され、細胞遊走および石灰化に関与することを報告した (第 134 回日本歯科保存学会)。ラット歯髄を断髄後に MMP-3 で覆髄すると血管新生および硬組織形成が促進され歯髄の創傷治癒を促進することが報告されており、我々は CTGF/CCN2 がその機序に加担する因子のひとつになり得ると仮定しているが、詳細なシグナル伝達の経路は未だ明らかでない。本研究では MMP-3 が CTGF/CCN2 発現を調節する際のシグナル経路の解明を目的とし、細胞が細胞外の物質を取り込む過程であるエンドサイトーシスに着目して CTGF/CCN2 発現を指標に検討を行った。

【材料および方法】

- 1) 細胞培養：矯正治療目的で抜歯予定の患者に研究のインフォームドコンセントを行い、同意を得た後に抜去された歯から歯髄を分離した後、5～7代継代培養した細胞をヒト歯髄培養細胞として実験に用いた。
- 2) CTGF/CCN2 タンパク質の検出：western blotting 法を用い、MMP-3 刺激による CTGF/CCN2 タンパク質の発現を検索した。
- 3) CTGF/CCN2 発現に対する dynasore の効果：dynamamin 阻害剤である dynasore を用いて MMP-3 刺激による CTGF/CCN2 発現に対する効果を検討した。
- 4) CTGF/CCN2 発現に対する NNGH の効果：MMP-3 阻害剤である NNGH を用いて MMP-3 刺激による CTGF/CCN2 発現に対する効果を検討した。
- 5) MMP-3 刺激時の細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 動態：蛍光色素 Fura 2-AM を用い 2 波長蛍光測定法により MMP-3 刺激時のヒト歯髄培養細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 動態を測定した。

【結果】

- 1) ヒト歯髄培養細胞において、MMP-3 刺激による CTGF/CCN2 タンパク質発現は dynasore により濃度依存的に抑制された。
- 2) MMP-3 刺激による CTGF/CCN2 タンパク質発現は NNGH により抑制されなかった。
- 3) MMP-3 刺激によるヒト歯髄培養細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 動態の変化は認められなかった。

【考察】

ヒト歯髄培養細胞において、MMP-3 は dynamamin 依存性のエンドサイトーシスにより CTGF/CCN2 タンパク質の発現を調節し、MMP-3 のプロテアーゼ活性は関与しないことが示唆された。Dynamamin は GTPase ドメインを有する 100 kDa のタンパク質で、エンドサイトーシスにおける出芽した被覆小胞のくびれ部分に結合しその切り離しに関与していると考えられている。ヒト軟骨細胞様細胞株において蛍光標識し投与した MMP-3 が核内から検出されたとの報告もあることから、MMP-3 は従来考えられていたプロテアーゼとしての働きのみならず自身が細胞内シグナル伝達因子として振る舞い CTGF/CCN2 発現を誘導する能力を持つことが推察された。また、プロテアーゼ活性は必要でないことから MMP-3 の特定のドメインが認識され細胞内に取り込まれる可能性が考えられた。以上の結果より、ヒト歯髄培養細胞において MMP-3 はエンドサイトーシスを介して CTGF/CCN2 発現を調節することが明らかになった。

本研究は、平成 22 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C) No. 20592239)、(若手研究 (B) No. 22791846) により行った。

OCT を用いた歯質断層像の解析について—状態変化と OCT イメージの関連性

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,
日野浦歯科医院³, モリタ東京製作所⁴
○黒川弘康^{1,2}, 島村 穰¹, 村山良介¹, 安藤 進^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 日野浦光³, 釜口昌平⁴, 三畑幸則⁴

Analysis of Tooth Tomographic Images by OCT - Relationship between Morphological Changes and OCT Images

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science Dental Research Center², Nihon University School of Dentistry,
Hinoura Dental Clinic³, J. Morita Tokyo Mfg. Corp⁴
○KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, SHIMAMURA Yutaka¹, MURAYAMA Ryosuke¹, ANDO Susumu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2},
HINOURA Ko³, KAMAGUCHI Syohei⁴, MIHATA Yukinori⁴

【緒言】

光干渉断層画像法 (Optical Coherence Tomography, 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 の歯科領域への導入を目指して, OCT の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, 多方面からの検討を行ってきた。これらの研究によって得られたデータを考察すると, OCT は歯質の微細な状態変化を客観的に捉えるのに有効であるものの, X 線画像診断とは画像構築原理が異なることから, OCT を用いた歯質の断層像の解析については, これに適した読像法が必要であり, これによって, 歯質の状態変化と OCT イメージ像の変化の関連性を把握することが可能になると考えられた。

そこで, 口腔内環境をシミュレートした pH サイクルに歯質を適用した場合の状態変化を, OCT イメージ像および信号強度グラフによって解析するとともに, レーザ顕微鏡観察を行うことによって歯質の状態変化とイメージ像との関連性について検討した。

【材料および方法】

ウシ下顎前歯歯冠部唇側面を, モデルトリマーを用いて直径 4~6 mm のエナメル質が得られるように研削した。この研削面を耐水性 SiC ペーパーの# 2000 を用いて平坦面が露出するように調整し, これを測定用試片とした。これらの試片を, 0.1M 乳酸緩衝液に 10 分間, 1 日 2 回浸漬し, その後 37°C 人工唾液あるいは精製水に保管する 2 条件を設定し, OCT を用いて経時的に観察した。

OCT による断層像の観察には, SLD を光源として, 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 Time-Domain 型 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用いた。すなわち, SLD から発せられる近赤外線を試片に照射し, 試片内部から反射あるいは散乱してくる物体光と参照鏡から反射してくる参照光を干渉させることで 2 次元断層像をイメージ化するとともに, 歯質の表層から深層にわたる反射光分布の信号強度を解析することで, その関連性について検討した。

OCT による断層像の観察時期としては, 実験開始前および実験開始 1, 7, 14, 21 および 28 日経過後とし, あわせて, 形状測定レーザマイクロスコープ (VK-9710, キーエンス) を用いて歯質の表面性状を観察した。

【成績および考察】

乳酸緩衝液に浸漬後, 37°C 精製水に保管した条件での, 実験開始前および開始 7 日後における OCT のエナメル質断層像からは, 表層付近にシグナルが観察され, 実験期間の延長に伴いシグナルの強度および幅の増加が認められた。また, 信号強度を解析したグラフからは最大ピークが検出され, イメージ像上のシグナルの変化とほぼ一致するように, ピーク幅の拡大および位置の深さ方向への移動が確認され, イメージ像の変化との関連性を示した。一方, レーザ顕微鏡による観察からは, 観察期間の延長に伴って歯質表面が粗糙になる傾向が認められた。

OCT は照射光線の透過性の違いによって内部構造をイメージ化することから, 歯質の変化による光線透過性の変化がイメージ像上のシグナルおよび信号強度ピークの変化として表れたものと考えられた。

【結論】

OCT を用いた歯質断層像の解析においては, 歯質が脱灰することによって生じた基質的变化が光線透過性に影響を及ぼすことによって, OCT イメージ像の変化として表れた。さらに, A スキャンモードにおける信号強度で検出されるピークの幅あるいは位置を検討することによって, より詳細な解析が可能であることが示された。

う蝕病巣におけるう蝕歯質の硬さと DIAGNOdent による評価との関係

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)

○岩見行晃, 山本洋子, 林 美加子, 恵比須繁之

Relationship between the knoop hardness of carious dentin and the evaluation by DIAGNOdent in carious lesions

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

○IWAMI Yukiteru, YAMAMOTO Hiroko, HAYASHI Mikako, EBISU Shigeyuki

【目的】

う蝕病巣の除去に際しては, う蝕歯質の色と並んでう蝕歯質の硬さも病巣内のう蝕の状態を知る有力な指標である. しかしながら, う蝕病巣におけるう蝕歯質の硬さと病巣内のう蝕の進行状態との関係は必ずしも明確ではない. 最近, う蝕象牙質硬さ測定器カリオテスター (三栄エムイー) が発売され, 口腔内でのう蝕除去中に歯質のヌーブ硬さが簡便に測定できるようになった. また, 口腔内でう蝕病巣の診断を行う機器として市販されているレーザーう蝕診断器 DIAGNOdent (KaVo) は, 病巣内の細菌や細菌代謝物からの蛍光強度を数値化している可能性が報告され, それによるう蝕歯質の評価結果は, 細菌検出率と密接に関連している^{1, 2)}. このため, DIAGNOdent による評価結果は, う蝕の進行状態を数値的に表していると考えられる.

そこで, 本研究では, DIAGNOdent による評価結果をう蝕の進行度の Gold Standard として, カリオテスターを用いて測定したう蝕病巣におけるう蝕歯質の硬さととの関係を調べた.

【材料および方法】

う蝕検知液 (Caries Detector, クラレメディカル) で明瞭に染色されるう蝕病巣を持つヒト抜去大白歯のエナメル質う蝕部分を回転研磨器 (EcoMet 3000, Beuhler) により削除し, 規格窩洞形成器 (伊藤エンジニアリング) に装着した. その後, う蝕検知液による象牙質の着色が認められなくなるまで歯髄方向に 150 μm ほどのう蝕病巣の削除を繰り返した. この際, 歯質削除ごとに, 削除面の歯質について, う蝕検知液による染色と DIAGNOdent による評価, カリオテスターによる硬さ測定を行った.

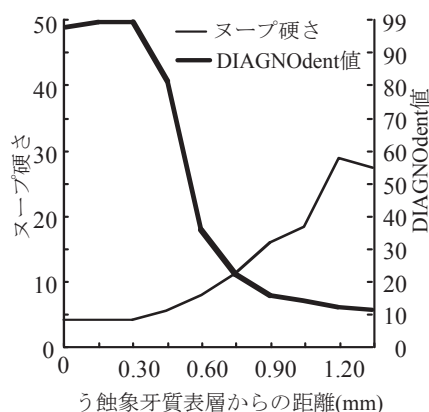
【結果】

う蝕病巣においてう蝕象牙質表層から深部に向かうほど, ヌーブ硬さは大きくなり, DIAGNOdent 値は小さくなる傾向が認められた. また, 象牙質う蝕病巣におけるヌーブ硬さと DIAGNOdent 値との間では, 非線形回帰が可能であった.

【考察および結論】

象牙質う蝕病巣におけるヌーブ硬さとう蝕の進行度との間には密接な関係が認められ, ヌーブ硬さがう蝕除去の際の目安になる可能性が示唆された.

- 1) Iwami Y *et al.* Relationship between bacterial Infection and evaluation using a laser fluorescence device, DIAGNOdent; Eur J Oral Sci 112, 419-423, 2004.
- 2) Iwami Y *et al.* Relationship between laser fluorescence and bacterial invasion in arrested carious lesions; Lasers Med Sci 26, 439-444, 2011.



う蝕象牙質表層からの距離とヌーブ硬さ及び DIAGNOdent 値との関係

SS-OCT を用いた脱灰象牙質の再石灰化度の推定(TMRとの比較)

東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野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, Sadr Alireza^{1,3}, 島田康史¹, 夏目悠子¹, 角保徳², 田上順次^{1,3}

Estimation of dentin lesion remineralization by SS-OCT in comparison with TMR

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, 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 Alireza^{1,3}, SHIMADA Yasushi¹, NATSUME Yuko¹, SUMI Yasunori², TAGAMI Junji^{1,3}

【研究目的】人工的に作製した脱灰象牙質を各期間再石灰化し、その期間ごとにSS-OCT (Swept Source Optical Coherence Tomography) にて病変の断層画像を取得し、一方で同一病変のTMR (Transverse Microradiography) 画像から再石灰化の進行度(脱灰深さ、ミネラル損失量など)を計測し、両者の比較からSS-OCT にて再石灰化の進行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を18日間脱灰し、これらを6群に分けそれぞれ一定期間(2~11週間)再石灰化させた(以下、これをサンプル)。同時に、SS-OCT (HSL-2000®, Santec, 波長1260-1360nm) にて、脱灰前後と再石灰化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、ミネラル溶出量と推定される面積値の差($\Delta R = R_{\text{demin}} - R_{\text{remin}}$; R: dB \times boundary までの深さの積分値)も算出した。一方、再石灰化の終了後、サンプルからTMR用の薄切片を作製し、病変のデジタル画像を取得後(図3)、解析ソフトにて脱灰パラメータ(脱灰深さ、脱灰量: ΔZ)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相関性を認めた(図4. Pearson係数: 0.587, $p=0.007$)。2) ΔR 値と ΔZ との間にも同様に相関性を認めた(図5. Pearson係数: 0.540, $p=0.02$)。3) 再石灰化後において多様な断層プロファイルが認められ、脱灰深さや再石灰化表層の形成や厚さと関連するような「特徴(ピークや屈曲点など)」は確認できなかった。

【考察】boundary深さとTMR深さ、および ΔR 値と ΔZ の間に相関性を認めたが、いずれも必ずしも相関係数は高くはなかった。一方、断層プロファイルにて、脱灰深さや再石灰化表層の形成や厚さと関連する「特徴」の確証は得られなかった。これらのことは、脱灰/再石灰化後において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)が複雑に絡み合っていることによると考えられた。

【結論】脱灰象牙質の再石灰化過程において、OCT画像からその脱灰深さの変化および断層プロファイルからは ΔZ を推定できる可能性が示唆されたが、推定の確かさを向上させるため更なる検討が必要である。

図1. 再石灰化前のOCT画像

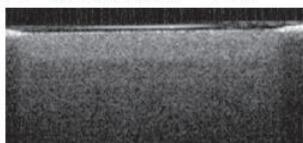


図2. 11週間再石灰化後のOCT画像

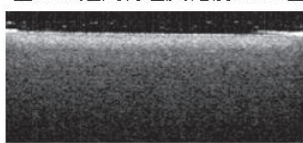
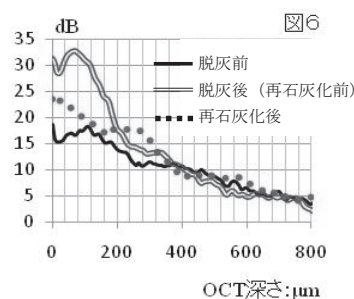
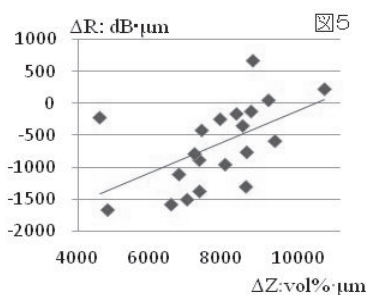
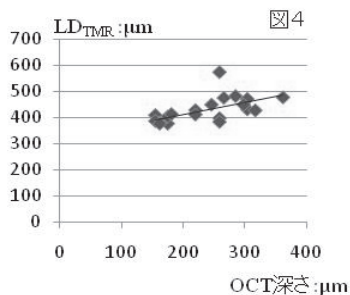
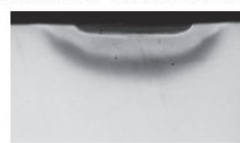


図3. 11週間再石灰化後のTMR画像



OCT を用いた I 級窩洞のフロアブルレジンベースのリアルタイム 2 次元断層画像撮影

東医歯大院・歯と骨の GCOE・う蝕制御¹

東医歯大院・う蝕制御²

国立長寿医療センター³

○サダル アリレザ¹, 島田康史², 田上順次¹, 角 保徳³

Real-time two-dimensional tomographic imaging of flowable resin base placement in Class I cavities using OCT

Cariology and Operative Dentistry, Global COE, Tokyo Medical and Dental University¹

Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University²

National Center for Geriatrics and Gerontology³

○SADR Alireza¹, SHIMADA Yasushi², TAGAMI Junji¹, SUMI Yasunori³

[Objectives] Polymerization stress of flowable composites in a deep cavity with high C-factor may affect the adaptation and longevity of restorations. The aim of this study was real-time tomographic assessment of resin-dentin interface during placement of flowable resin composites as base into a class I cavity.

[Methods] A swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) system with laser center wavelength of 1310 nm (Santec, Japan) was used to record tomographic movies at a resolution of 2001 x 1019 pixels and 30 FPS video frame rate during bulk placement and light-polymerization of four commercially available flowable resin materials: SDR (Dentsply Sankin), PALFIQUE ESTELITE LV (Tokuyama Dental), MI FLOW (GC) and Metafil Flo (Sun Medical). The composites were bulk filled into 1.7-mm-deep standard cylindrical class I dentin cavities 3mm in diameter, treated by an all-in-one adhesive system (Xeno V, Dentsply Sankin). The tomographic movies were used to monitor the placement and polymerization procedures up to 2 min after photo-activation. Single fine shots were used to investigate the interfacial gap resulting from polymerization shrinkage, dimensional contraction, and structural voids in a central cross section of the restored cavity. The specimens were then sectioned and analyzed using a confocal laser scanning microscope (CLSM) to confirm the SS-OCT findings.

[Results] Interfacial gaps, which appeared as sharp bright lines along interface under SS-OCT, were generated due to the polymerization shrinkage in all groups except for SDR. The final shot of each tomographic video are presented below. Metafil Flo resulted in the largest dimensional changes, followed by MI Flow and PALFIQUE ESTELITE LV. SDR exhibited a self-leveling feature before polymerization, with little visible changes at the interface during polymerization. In the groups where gaps were formed at the cavity floor, the gap initiated a few seconds after start of light-curing from the line angles, and propagated towards the center of cavity floor. Metafil Flo showed the fastest propagation rate, followed by MI FLOW. In 3D scans obtained 2 min after light-curing, Voids or bubbles within the composite were occasional observed in all groups.

[Conclusions] Polymerization shrinkage volume, rate of modulus development and stiffness of the composite affected the outcome of bulk placement of flowable composite as a base in a cavity. SDR may have the potential to decrease the stresses developed due to polymerization shrinkage by its flexible resin matrix. SS-OCT is capable of providing real-time high-speed high-resolution images suitable for non-destructive cross-sectional assessment and monitoring of dental composite resins and the surrounding hard tissues, a useful tool for dental materials research. This study was supported by GCOE program at TMDU, manufacturers provided materials used.



MI (Minimal Intervention) 治療法について再考すべきこと—慢性 GVHD を発症した慢性骨髄性白血病患者における多発性う蝕を経験して—

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座
○大津奈央, 長谷川誠実, 本田公亮

Reevaluation of caries management based on the concept of "Minimal Intervention": A case study
Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine
○OHTSU Nao, HASEGAWA Makoto, HONDA Kousuke

【諸言】

我々は慢性骨髄性白血病 (CML) の造血幹細胞移植手術前スクリーニングを行った患者において、継続管理の中断を余儀なくされたことから、多発性う蝕に罹患した症例を経験した。近年、保存修復の治療コンセプトとして MI (Minimal Intervention) が提唱されている。しかしながら利点の多くは主張されるものの MI の持つ欠点が着目され論じられることはほとんどないように感じる。本症例は MI の治療コンセプトを基にふり返り、全身疾患を有する患者を通じて MI の留意すべき点において臨床的視点から検討した。

【症例および経過】

患者: 39 歳、男性。既往歴: 脳水腫。家族歴: 特記事項無し。平成 15 年慢性骨髄性白血病にて造血幹細胞移植予定となり当院血液内科より移植手術前スクリーニング目的に同年 9 月当科初診となる。初診時の診断にて右側第 3 大臼歯う蝕ならびに智歯周囲炎より抜歯術施行。その他感染巣ならびにう蝕を認めないことから、ブラッシング指導および全顎スケーリングを行い、同年 10 月に当科略治となり、同年 12 月血液内科より造血幹細胞移植が施行された。平成 16 年 5 月 Chronic graft versus host disease (慢性 GVHD) 診断目的に血液内科より LipBiopsy 依頼にて来科。病理診断にて軽度から中等度の慢性 GVHD との診断を得、血液内科に逆紹介となった。平成 19 年 5 月口腔内全体の歯肉の痛み、多数歯にわたる冷水痛および自発痛を主訴に来科。口腔粘膜の委縮および重度の口腔乾燥が認められた。また全歯牙が隣接面う蝕ならびにう蝕症第 1 度から第 4 度のいずれかに罹患しており、順次う蝕処置ならびにブラッシング指導を行い、現在も継続治療中である。

【考察】

MI の定義として 2009 年う蝕ガイドラインより 5 つの項目が提唱された。1) 口腔内の細菌叢の改善、2) 患者教育、3) エナメル質および象牙質のう蝕でまだう窩を形成していないう蝕の再石灰化、4) う窩を形成したう蝕への最小の侵襲、5) 欠陥のある修復物の補修がそれらに該当する。しかし臨床において MI 提唱項目の中で最小の侵襲のみが注目され、他項目を置き去りに独り歩きしているのではないだろうか。今回の症例において、当初歯科的立場として重要であったのは造血幹細胞移植手術直前における感染巣の検索であるが、移植後の GVHD による口腔乾燥の出現による自浄性の低下などを十分に評価し、その後の継続管理のあり方について適切に再評価ならびに患者教育が成されていれば全顎的にう蝕に罹患することを回避できた可能性がある。この症例を通じ、口腔内の環境変化が及ぼす影響の大きさを感じた。すなわち現在う蝕治療の根本のようにとりあげられる MI を実践する上において、十分な免疫拡大のなされていない MI であればこそ、継続管理の重要性を再認識すべきであると考え。MI の最小の侵襲に重点を置くことに問題は無いが、継続管理こそが MI 治療法を成功させる大前提であることを主張したい。全身疾患を有する患者においてはなおさらで、基礎疾患に続発する症状ならびに常用薬、症状に合わせて変更や追加される薬など、様々な場面での口腔内リスクを見直す再評価が重要であり、同時にそれらの場面に応じたガイドラインも必要であると考え。

Establishment of artificial caries-affected dentin model for interfacial remineralization study

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, 歯と骨のGCOE²

○ホヴェス ヘラルド¹, 井上 剛¹, 中嶋省志¹, 二階堂 徹¹, 田上順次²

Establishment of artificial caries-affected dentin model for interfacial remineralization study

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University¹, GCOE Program; International

Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases²

○JOVES Gerardo¹, INOUE Go¹, NAKASHIMA Syozi¹, NIKAIDO Toru¹, TAGAMI Junji²

(Introduction) According to minimal invasive concept, caries-affected dentin should be left after removal of caries infected dentin. Sattabanasuk created caries lesions and reported a maximum depth of 134 μm measured by SEM. Zanchi created artificial caries-affected dentin with bacteria and obtained a significant decrease in bond strength. many previous studies reported that bond strength of dentin bonding systems to caries-affected dentin is lower than intact dentin. Sunago demonstrated a discrepancy in the mineral density between natural and artificially produced remineralized lesions using Transverse Microradiography (TMR). However, Tay reported remineralization of human dentin with Portlan cement. Therefore, in terms of remineralization of the adhesive interface, the bonding performance should be improved. The purpose of this study was to establish an artificial caries-affected dentin model in order to use it as a bonding substrate. (Materials and Methods) Caries-infected human dentin was used to know the mineral profile with TMR. Carious dentin was removed using a steel bur. The teeth were cut into 100-240 μm thickness. Caries-free human teeth were trimmed and polished. The surround enamel was cut with a diamond blade using an inclination of 45° at low speed. Nail varnish was applied on the surround surface to leave only the dentin surface exposed. Specimens were immersed in a demineralizing solution (pH 4.5) for 7 days to obtain a lesion depth around 400-500 μm confirmed by Optical Coherence Tomography (OCT). Specimens were polished to obtain the smear layer. Specimens were cut into 12 slices and submitted to TMR analysis. To observe the morphology of both dentins, SEM was performed. The data was analysed using SPSS 16.0. T-test. (Results) The results were listed in table 1. Significant differences in lesion depths between natural caries-affected dentin (NCAD) and artificial caries-affected dentin (ACAD) model were observed ($P < 0.05$). Mineral density at different depths between NCAD and ACAD did not show significance differences ($P > 0.05$). ACAD could be seen as more porous than the natural one. (Conclusion) Morphological similarity between natural and ACAD was confirmed using TMR and SEM.

Table 1. Mean values of Natural and Artificial Caries Affected Dentin. T-test values (1-tailed). Sig, < 0.05

Type of CAD	Lesion Depth (LD)	Mineral Density at 0 μm	Mineral Density at 50 μm	Mineral Density at 100 μm	Mineral Density at 150 μm
Natural Caries Affected Dentin	249.19 \pm 138.21 ^a	7.91 \pm 3.63 ^c	27.76 \pm 9.27 ^c	35.42 \pm 7.44 ^c	40.20 \pm 6.13 ^c
Artificial Caries Affected Dentin	194.18 \pm 30.45 ^b	8.30 \pm 3.60 ^c	27.37 \pm 5.61 ^c	36.43 \pm 3.84 ^c	42.32 \pm 1.80 ^c
(1-tailed) Significance	0.037	0.358	0.432	0.284	0.062

Same letters mean no significance difference. Different letters mean significance values.

歯面上に成膜したシリカ薄膜の耐酸性

神奈川県立歯科大学口腔治療学講座保存修復学分野¹, 総合歯科学講座²,
コンタミネーション・コントロール・サービス³
○田中隆博¹, 山口益司¹, 原 めぐみ², 小泉忠彦², 進藤豊彦³, 寺中敏夫¹

Acquired acid resistance of enamel by silica film coating

Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Medicine¹, Dept. of Comprehensive Dent²,
Kanagawa Dental College, Contamination Control Services³

○TANAKA Takahiro¹, YAMAGUCHI Masuji¹, HARA Megumi², KOIZUMI Tadahiko², SHINDO Toyohiko³,
TERANAKA Toshio¹

【研究目的】

エナメル質の抗齶蝕性を向上させることは齶蝕予防の観点から重要であり、歯面を水素イオンの透過を遮断できるようなシリカ薄膜でコーティングできれば優れた抗齶蝕性を期待できる。我々は、これまでに日本歯科保存学会学術講演会にてエナメル質に塗布したペルヒドロポリシラザン (PHPS) に過酸化水素水 (H₂O₂) を滴下し、炭酸ガスレーザーを照射すると低温でシリカ薄膜を形成が可能であり、母材のウシエナメル質に比較して有意に優れた耐摩耗性を有することを報告した。

本研究では、耐摩耗性以外にも耐酸性などの優れた特性も有していると報告されている PHPS シリカコーティング材でウシエナメル質を被覆して耐酸性試験を行い、本シリカ薄膜の耐酸性能を評価した。

【材料および方法】

ウシ歯冠部エナメル質 (7×7 mm) は、#2,000 耐水研磨紙および 1 μm ダイヤモンドスラリーにて研磨、超音波洗浄を 15 分間行った。コーティング材には PHPS 溶液 (AZ エレクトロニックマテリアルズ) を用いた。シリカコーティング方法は、エナメル質表面に PHPS を塗布、5 分間自然乾燥後、3% H₂O₂ を 40 ml 滴下し、炭酸ガスレーザー (OPELASER 03S, ヨシダ製作所) を 1.0 W, 照射距離 10 mm で 1 分間照射した。ポジティブコントロールとしてレジシン系表面滑沢硬化材のジーシーG-コート (ジーシー) を業者指示に従いエナメル質表面に塗布、光照射を 20 秒間行った。また、ネガティブコントロールは非処理エナメル質とし、各群試料表面に直径 3 mm の窓を規定し、窓以外の部分をすべてネイルバーニッシュで被覆した。バーニッシュ乾燥後、各試料を 0.1 mol/l HCl 溶液 10 ml が入ったスチロール製サンプル瓶中に吊り下げて 30 分間浸漬し、エナメル質表面から HCl 溶液中に溶出した Ca および P 量をそれぞれアルセナゾ III (分析波長 660 nm), バナドモリブデン酸アンモニウム (分析波長 420 nm) による吸光光度法により測定した。なお、試料は各群 6 個とし、得られた結果から平均値および標準偏差を求め、一元配置分散分析を用いて危険率 5% にて検定を行った。

【結果および考察】

表には各種処理後の Ca, P の溶出量を示した。シリカコーティング群および G-コート群は、非処理エナメル質群と比較し、Ca, P ともに有意に低い溶出量を示した。また、シリカコーティング群はポジティブコントロールである G-コート群と同等の Ca, P の溶出量であった。

以上より、本シリカコーティング法はエナメル質に対して耐摩耗性のみならず、優れた耐酸性を付与することが示された。

表 各種処理群のCa, P溶出量

	Ca	P
シリカコーティング	0.002(0.001) ^a	0.015(0.009) ^b
G-コート	0.005(0.003) ^a	0.023(0.020) ^b
非処理エナメル質	2.345(0.709)	0.175(0.048)

単位 : mmol/l n=6

謝辞 : 本研究の遂行に当たりご協力いただきました、神奈川県立歯科大学自然科学講座歯科生体工学分野 藤原努博士に深謝いたします。

エナメル質初期う蝕最表層部における POs-Ca およびフッ素配合ガム咀嚼後の微小硬さ変化ならびにフッ素分布

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 GCOE プログラム歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点², 東京医科歯科大学歯学部附属歯科技工士学校³, 江崎グリコ株式会社健康科学研究所⁴

○北迫勇一¹, Sadr Alireza^{1,2}, 池田正臣³, 小林隆嗣⁴, 田中智子⁴, 釜坂 寛⁴, 田上順次^{1,2}

Effect of chewing gum containing POs-Ca and fluoride on nanohardness and fluoride mapping of superficial enamel subsurface lesions *in situ*
Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences¹, Global COE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases², Dentistry School for Dental Technology, Tokyo Medical and Dental University³, Institute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., LTD⁴

○KITASAKO Yuichi¹, SADR Alireza^{1,2}, IKEDA Masaomi³, KOBAYASHI Takatsugu⁴,
TANAKA Tomoko⁴, KAMASAKA Hiroshi⁴, TAGAMI Junji^{1,2}

[研究目的]

演者らは、第 131 回日本歯科保存学会にて、リン酸化オリゴ糖カルシウム(POs-Ca)およびフッ素配合ガムを摂取することにより、エナメル質初期う蝕の再石灰化が促進されること、さらにミネラル密度回復は、ハイドロキシアパタイト結晶量の回復である可能性を示唆した。また、第 133 回学会では、エナメル質初期う蝕の 10 μ m 深さ別ミネラルならびに微小硬さ変化について検証した結果、表層 10 μ m において、POs-Ca ガムと比較して POs-Ca +フッ素配合ガムの方が高い硬さ回復率を示したものの両者間に有意差が認められないことを報告した。そこで今回、ガム咀嚼後のサンプル最表層部における、1 μ m 深さ別の微小硬さ変化 (深さ 20 μ m まで) およびフッ素分布 (深さ 80 μ m まで) について追加検討を加えたので報告する。

[材料と方法]

POs-Ca ガム, POs-Ca および緑茶抽出物由来フッ素配合 (フッ素として 0.024 mg) ガムのいずれかを二重盲検下にて 1 日 3 回 14 日間摂取させた。微小硬さ変化については、超微小硬さ測定器 (ENT-1100a, Elionix) を用い、荷重 10mg にて、各種ガム咀嚼後のエナメル初期う蝕最表層部 (深さ 20 μ m まで) における 1 μ m 深さ別の微小硬さ測定および最表層部全域の硬さ回復率 (Hardness recovery rate (%))=(再石灰化部硬さ-脱灰部硬さ)/脱灰部硬さ \times 100) を算出し (n=5), *t* 検定を用い危険率 5%にて有意差検定をおこなった。また、飛行時間二次イオン質量分析計 (Time-of-flight secondary ion mass spectrometer: TOF-SIMS) を用い、POs-Ca およびフッ素配合ガム咀嚼後のエナメル初期う蝕最表層部 (深さ 80 μ m まで) におけるフッ素分布についてイオン質量分析を行った。

[結果および考察]

POs-Ca ガム, POs-Ca およびフッ素配合ガム咀嚼後の、エナメル質初期う蝕表層より 20 μ m における 1 μ m 深さ別の硬さプロファイルを図 1 に、POs-Ca およびフッ素配合ガム咀嚼後の脱灰・再石灰化領域の代表的な TOF-SIMS 画像を図 2 に示す。微小硬さ回復率は、POs-Ca ガムでは 17.4 \pm 4.3%, POs-Ca およびフッ素配合ガムでは 31.3 \pm 2.2%を各々示し、両群間において有意差を認めた ($p < 0.05$)。また、両群における硬さプロファイル曲線は同様な挙動を示したものの、再石灰化部の表層 5 μ m 付近において、その最大微小硬さ値が異なった。さらに、TOF-SIMS 画像より、POs-Ca およびフッ素配合ガム咀嚼後の再石灰化部において、脱灰部では認められないフッ素分布が観察された。以上より、*in situ* 環境下、短期間フッ素配合ガム摂取において、ガム由来フッ素がエナメル質初期う蝕最表層部に取り込まれ、同最表層部の微小硬さ変化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

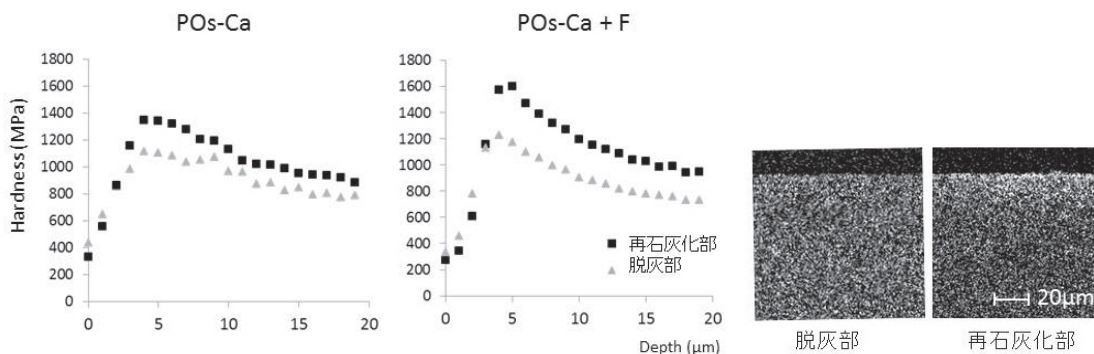


図1

図2

PRG バリアコートのエナメル質脱灰抑制・再石灰化促進効果

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

近藤歯科医院³、福石歯科医院⁴

○村山良介¹、島村 穰¹、飯野正義¹、砂田識敦¹

黒川弘康^{1,2}、安藤 進^{1,2}、宮崎真至^{1,2}、近藤 貢³、吉野弘三⁴

Effect of PRG barrier coat Application on Remineralization of Tooth Substrate

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

Nihon University School of Dentistry, Kondo Dental Clinic³, Fukuishi Dental Clinic⁴

○MURAYAMA Ryosuke¹, SHIMAMURA Yutaka¹, IINO Masayoshi¹, SUNADA Noriatsu¹

KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, ANDO Susumu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, KONDO Mitsugu³, YOSHINO Kohzo⁴

【緒言】

近年、齲蝕リスクの低減化あるいは脱灰と再石灰化という動的平衡をコントロールすることの重要性が喧伝されている。このような観点から、歯質の積極的な再石灰化あるいは脱灰抑制を目的として、多種のイオンを徐放する PRG フィラーを含有したコーティング材が市販された。そこで演者らは、PRG フィラー含有コーティング材 (PRG バリアコート、松風) を歯質に塗布し、歯質に生じた脱灰あるいは再石灰化という変化を、非破壊的に物質の状態変化を測定可能である Optical Coherence Tomography を用いて検討した。さらにレーザ顕微鏡を用いて歯質を観察し、これを考察資料とした。

【材料および方法】

1. 測定用試片の製作

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

2. 保管方法および PRG フィラー含有歯質コーティング材の塗布

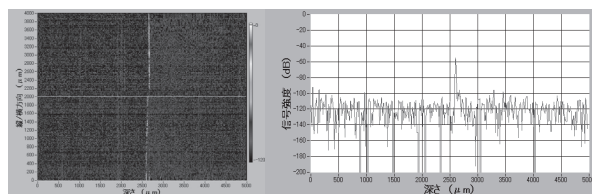
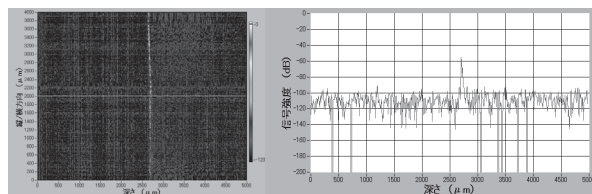
試片の表面に対して、PRG バリアコートを塗布したもの (以後、AP 群)、あるいは塗布を行わないもの (以後、NA 群) の 2 条件を設定した。その後 37°C 人工唾液 (pH 7.0)、あるいは精製水中に 30 日間浸漬保管した。

3. OCT およびレーザ顕微鏡観察

保管中の試片については、試作 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用い、その経時的変化を観察した。所定の保管期間が終了した試片については、PRG バリアコートを探針にて除去し、レーザ顕微鏡 (VK-8700, KEYENCE) を用いてコート材除去後の表面性状の観察を行った。

【成績および考察】

人工唾液保管群の PRG バリアコート塗布直後および 4 日後の OCT 画像を示す (図 1, 2)。塗布直後の画像からは、塗布面表層とその下方に強度分布を示す画像が得られた。その信号強度を解析したグラフからは、最大ピークのほかに、信号の増幅部が検出された。一方、4 日後の画像からは、コート面表層でのシグナルは減少し、その部位での信号解析からは、そのピーク幅の拡大が認められた。また、非コート面の歯質は、塗布直後に比べ、表層でのシグナルは増加し、そのグラフ解析より、信号強度は増幅していることがわかった。



【結論】

本実験の結果から、PRG バリアコートは、歯質に生じる脱灰を抑制し、再石灰化を促進する可能性を有することが示された。

新規歯面処理材によるエナメル質表層下脱灰病変の再石灰化効果

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
東京医科歯科大学 歯と骨の GCOE 拠点²
○半場秀典^{1,2}, 井上 剛¹, 二階堂 徹¹, 田上順次^{1,2}

Effect of enamel remineralization by a bioactive agent

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University¹
Global COE program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone
Diseases, Tokyo Medical and Dental University²
○HAMBA Hidenori^{1,2}, INOUE Go¹, NIKAIDO Toru¹, TAGAMI Junji^{1,2}

【研究目的】初期う蝕、いわゆる表層下脱灰病変に対するアプローチとしてミネラルの再石灰化療法が期待されている。Ca や P をいかに病変部に浸透させ、健全な歯質へと再石灰化させるかが課題である。新規歯面処理材である知覚過敏抑制材ナノシール(日本歯科薬品)は Al-Ca-F-SiO₂ ガラスの分散媒とリン酸を等量混和し、塗布することで効果的に歯質表層へ浸透し、沈着、被覆することを特徴としている。エナメル質表層下脱灰病変への再石灰化効果について 2010 年 JADR 学術大会(第 58 回)にて報告した。そこで、本研究ではその効果について更に検討するために、含有成分である Si, F を配合調整した試作材料を用いて再石灰化効果を解析することを目的とした。解析には非破壊的に同一試料の経時的観察および解析を行うことができる高解像度マイクロ CT 装置を用いた。

【材料および方法】ヒト第三大臼歯を精密低速切断機(Isomet, Buehler)にて歯冠歯根部で切断した。エナメル質側面を耐水研磨紙にて平坦に研削後、1 x 4 mm の処理面をネイルバーニッシュにて規定した。試料は脱灰液(17.8 mM Ca, 8.8 mM P and 100 mM lactic acid, pH 4.3)に 6 日間浸漬し、約 150 μm の表層下脱灰病変を作成した。各群の試料数は 6 個とし、以下の 4 種の材料を塗布した。すなわち、ナノシール(NS 群)、ナノシール(F なし)(F0 群)、ナノシール(Si/Al 比 0.7 に調整(NS 群は比 1.0))(SiLow 群)、コントロール(蒸留水)(DW 群)を用いた。各群エナメル質処理面に 20 秒間中に 3 回の塗布を行った。塗布後、水洗および乾燥を行い、人工唾液(1.5 mM Ca, 0.9 mM P, 130 mM KCl, and 20 mM HEPES, pH 7.0)に 1 週間浸漬した。以上の期間で、脱灰後、塗布後、再石灰化 1 週後に試料を取り出し、高解像度マイクロ CT 装置(SMX-100CT, 島津製作所)にて撮影した。得られた脱灰部の 3D 解析には 3D 骨梁構造計測ソフト(TRI/3D-BON, RATOC)を用いた。得られた CT スケール値は基準濃度のハイドロキシアパタイト体を用いて、BMD(Bone Mineral Density)値に変換し、表層からの深さ方向へのミネラル密度プロファイルを算出した。脱灰後と再石灰化後のミネラル密度プロファイルから再石灰化率を求めた。得られた測定値は一元配置分散分析後、有意水準 5%にて統計処理を行った。

【結果および考察】ミネラル密度プロファイルの結果から、表層下脱灰病変は再石灰化後にすべての群で回復が認められた。NS 群は病変底部のミネラル回復率が最大であり、F なしの F0 群は病変最表層のミネラル回復率が最大であった。再石灰化率では、NS 群の再石灰化率が最大であった。NS 群と F0 群は DW 群と比較して有意に高い再石灰化率を認めた。一方、Si の配合率を低くした SiLow 群の再石灰化率は DW 群に対して有意差を認めなかった。以上から、本実験において、F に比べて Si の配合比増加によってエナメル質表層下脱灰病変の効果的な再石灰化を示すことが示唆された。

【結論】新規歯面処理材(ナノシール)はコントロールに比べてエナメル質表層下脱灰病変の再石灰化効果を促進すること、および本材中に含有する F よりも Si 成分の配合比が再石灰化効果に影響する可能性が示唆された。

本研究の一部は、東京医科歯科大学 歯と骨の GCOE 拠点によって遂行された。

TWEAK がヒト歯肉線維芽細胞の IL-1 β 誘導 CCL20 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, 中江英明¹, 松尾敬志¹

The effect of TWEAK on CCL20 production on IL-1 β -stimulated human gingival fibroblasts

Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School¹, Department of Oral Microbiology, The University of Tokushima Graduate School, JSPS Research Fellow², Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School³

○HOSOKAWA Yoshitaka¹, HOSOKAWA Ikuko², OZAKI Kazumi³, NAKAE Hideaki¹, MATSUO Takashi¹

【研究目的】

Tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis (TWEAK)はTNF superfamilyに属するサイトカインであり、マクロファージなどから産生されることが明らかとなっている。我々はすでにヒト歯周炎組織にTWEAKが存在し、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) のIL-8産生を誘導する事を報告している。(Clin Exp Immunol, 146, 540-9, 2006) また、CCL20はCCR6をレセプターとするケモカインであり、炎症性骨吸収への関与が示唆されているTh17細胞の遊走に関わっている事が明らかとなっている。我々はすでにIL-1 β 刺激によりHGFsからのCCL20産生が誘導される事を報告している。(Clin Exp Immunol, 142, 285-91, 2005) しかしながら、TWEAKがHGFsのCCL20産生に与える影響に関しては不明である。本研究では、TWEAKがIL-1 β 刺激HGFsのCCL20産生に与える影響に関して検討を行った。

【材料および方法】

HGFsは智歯抜歯時に正常歯肉組織よりout growth法により分離し、10%FBSを含むDMEM培地にて培養し実験に用いた。まず、HGFsをIL-1 β およびTWEAKで刺激しCCL20産生をELISA法により解析した。さらにIL-1 β とTWEAKで刺激したHGFs内の細胞内シグナル伝達分子 (MAPKs, Akt, I κ B- α) のリン酸化をwestern blot法にて解析を行った。また、IL-1 β とTWEAKが誘導するCCL20産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにシグナル伝達阻害物質にて前処理後、刺激を行いCCL20産生をELISAを用い確認した。

【成績】

TWEAK単独刺激はHGFsのCCL20産生を誘導しなかったが、IL-1 β が誘導したCCL20産生はTWEAK濃度依存的に増強された。また、p38 MAPK, ERK, AktおよびNF- κ Bのシグナル伝達阻害物質はIL-1 β とTWEAKが誘導したHGFsのCCL20産生を抑制した。さらに、IL-1 β とTWEAKの共刺激は単独刺激と比較しERK, AktおよびI κ B- α のHGFs内のリン酸化が増強された。

【結論】

今回の結果より、TWEAKはIL-1 β が誘導したHGFsのCCL20産生を増強し、その増強効果にはERK, AktおよびNF- κ Bを介した経路が関与している事が明らかとなった。また、これらの結果よりTWEAKは歯周炎変局所でCCL20産生を増強することによりTh17細胞の歯周炎局所への浸潤を促し、歯周組織の炎症性骨吸収に関与している事が示唆された。

ADAMTSL6 β による TGF- β シグナル抑制効果に関する研究

東京理科大学・基礎工・生物工¹, 東京理科大・総合研究機構², 株)オーガテクノロジーズ³

○黒河みさ紀¹, 荻野光明¹, 辻 孝^{1,2,3}, 齋藤正寛^{1,2}

ADAMTSL6 β negatively regulates TGF- β signaling

Tokyo University of Science Faculty of Industrial Science and technology¹, Research Institute for Science and technology², Organ Technologies Inc.³

○KUROKAWA Misaki¹, OGINO Komei¹, TSUJI Takashi^{1,2,3}, SAITO Masahiro^{1,2}

【研究目的】マルファン症候群(MFS)は *Fibrillin-1* (*Fbn-1*) のミスセンス変異により引き起こされるマイクロフィブリルの断裂化による機械的外力の低下と、TGF- β の病的な活性化により組織崩壊が進行する遺伝性の結合組織疾患である。私たちは、本学会にて (第 132 回) 新規細胞外マトリックスである ADAMTSL6 β が MFS の歯根膜においてマイクロフィブリル形成不全を改善し、組織修復を誘導することを報告してきた。また、MFS モデルマウスの歯根膜創傷治癒モデルに組み換え ADAMTSL6 β の局所注入を行った結果、マイクロフィブリルの再構築を伴う歯根膜の創傷治癒の促進効果と共に、TGF- β シグナルを抑制したことから、ADAMTSL6 β が TGF- β シグナルに対して抑制的に調節している可能性が示唆された。そこで本研究では、ADAMTSL6 β の分子機能を解析する目的に、TGF- β シグナル抑制機構を解析することを目的とした。

【材料および方法】

1. 遺伝子導入型歯胚を用いた ADAMTSL6 β の機能解析: アデノウイルス発現系を用いて ADAMTSL6 β を帽状期歯胚に遺伝子導入し、ADAMTSL6 β 遺伝子導入型歯胚を作製した。その後、ADAMTSL6 β 遺伝子導入型歯胚の器官培養にて分化誘導を行った。次に TGF- β に及ぼす影響を解析するため、その標的遺伝子である *periostin* の発現を *in situ* hybridization あるいは realtimePCR にて解析を行った。
2. MFS 由来ヒト歯根膜細胞を用いた解析: MFS 由来ヒト歯根膜細胞 (MHPDL) にレンチウイルス発現系を用いて ADAMTSL6 β を強制発現し、*periostin* の発現に及ぼす影響を realtimePCR にて解析を行った。また *periostin* の発現量を正常者由来歯根膜細胞 (HPDL) と比較検討した。
3. Pull down assay: ADAMTSL6 β と TGF- β の結合能を解析のため、組み換え ADAMTSL6 β を 293free style を用いた発現系を用いて作製し、TGF- β の結合を magnet beads を用いた Pull down assay にて評価した。
4. TGF- β に対する機能的抑制能の解析: 不死化マウス歯小囊細胞(MDF)を 0.1%FBS を含む DMEM 培地に、TGF- β 添加あるいは TGF- β + 組み換え ADAMTSL6 β を添加し、48 時間培養した後に total RNA を採取した。その後、*periostin* の発現を realtimePCR 法にて解析し、TGF- β シグナルに対する抑制効果を評価した。

【成績】ADAMTSL6 β 遺伝子導入型歯胚を作製し、TGF- β の標的遺伝子である *periostin* の発現を解析した結果、歯小囊部位でその発現が顕著に低下することが分かった。次に、MHPDL における *periostin* の発現を解析すると、HPDL より高いことが確認された。しかし ADAMTSL6 β の過剰発現により MHPDL での *periostin* の発現が HPDL と同レベルにまで減少することが判明した。そこで ADAMTSL6 β と TGF- β が結合するかを pull down assay で検証したところ、組み換え ADAMTSL6 β は TGF- β と濃度依存的に結合していることが判明した。ADAMTSL6 β の TGF- β シグナルに対する抑制効果を MDF 細胞を用いて解析した結果、TGF- β により誘導される *periostin* の遺伝子発現を濃度依存的に抑制することが確認された。

【考察】近年の MFS の研究成果より、TGF- β シグナルを抑制することで MFS の死因である大動脈瘤を予防できることが報告されている。本研究において ADAMTSL6 β は、MFS の発症原因であるマイクロフィブリルの形成不全を改善するばかりでなく、症状の悪化を引き起こす TGF- β シグナルも抑制することが判明した。ADAMTSL6 β と TGF- β との関係は不明な点は残されているが、同分子は *Fbn-1* の重合と TGF- β シグナルを調整することで、結合組織形成を調整している可能性が示唆された。これらの結果より、ADAMTSL6 β は MFS の予防・治療薬として開発出来る可能性が示された。

【結論】ADAMTSL6 β は歯根膜形成過程において、TGF- β シグナルを抑制的に制御していることが示された。

酪酸による酸化ストレス誘導時に放出される HMGB1 の解析

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¹, 硬組織病態生化学分野², GCOE プログラム³

○江部典子¹, 横山三紀², 寺澤和恵², 柳下正樹^{2,3}, 和泉雄一^{1,3}

Analyses of HMGB1 under butyric acid-induced oxidative stress

Department of Periodontology¹, Department of Biochemistry², GCOE Program³,

Graduate School of Medical & Dental Science, Tokyo Medical & Dental University

○EBE Noriko¹, HARA-YOKOYAMA Miki², TERASAWA Kazue², YANAGISHITA Masaki^{2,3}, IZUMI Yuichi^{1,3}

【研究目的】

組織障害により細胞死を起こした細胞からは「死の信号分子 (alarmin)」が細胞外に放出されて組織修復や免疫応答を引き起こす。High-mobility group box 1 (HMGB1) は核タンパク質で、転写因子としての機能をもつ一方、代表的な死の信号分子としても知られている。しかし過剰に HMGB1 が放出されると炎症を増悪化する。このような疾患として敗血症や脳梗塞、関節リウマチが挙げられ、抗 HMGB1 抗体を投与することで疾患の改善が見られる。

歯周病患者の歯肉溝滲出液中の HMGB1 濃度は健康者の場合よりも高いことが報告されており、歯周病の進行における HMGB1 の関与が示唆されている [Morimoto et al, (2008)]。また私達は、これまでに免疫組織化学染色により歯肉ポケット上皮における HMGB1 の核局在が低下していることを報告している [Ebe et al, (2011)]。HMGB1 の生理的作用は翻訳後修飾 (特に酸化) により制御されることが知られているので、本研究では歯肉上皮細胞のモデルとして現在入手可能な細胞株である Ca9-22 細胞 (ヒト歯肉癌由来細胞) を用いて、酸化ストレスにともない放出される HMGB1 タンパク質の酸化状態について解析した。酸化ストレス誘導には、多くの歯周病原細菌の代謝産物である酪酸を用いた。

【材料および方法】

Ca9-22 細胞は JCRB 生物資源バンクより入手した。酪酸刺激による活性酸素産生はジヒドロエチジウムを用いたフローサイトメトリーにより解析した。内在性 HMGB1 の放出は HMGB1 ELISA キット (SHINO-TEST) を用いて測定した。また HMGB1 の酸化状態の変化を検出するために N 末端に FLAG タグを付加した HMGB1 (FLAG-HMGB1) を Ca9-22 細胞に導入し、安定発現株を作成した。細胞に酪酸刺激を行った後、非還元状態の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により酸化型と還元型の FLAG-HMGB1 を分離し、抗 FLAG モノクローナル抗体を用いたイムノブロットによる検出を行った。

【成績】

酪酸刺激により Ca9-22 細胞の活性酸素の産生が引き起こされた。このとき内在性 HMGB1 および FLAG-HMGB1 の放出がみとめられた。FLAG-HMGB1 は非還元状態の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において移動度の異なる分子種として検出され、酪酸により誘導された酸化ストレスにより酸化型 HMGB1 が放出されたことが示唆された。

【考察】

HMGB1 は細菌感染に関与する Toll-like receptor (TLR) を介したシグナル誘導を引き起こし、リポポリサッカライドの TLR 活性化へも影響を与える。また HMGB1 の酸化状態は TLR との相互作用を制御することが報告されている。本研究に歯周病に罹患した組織において歯周病原細菌代謝産物の酪酸刺激により HMGB1 の放出とその酸化状態が影響を受ける可能性が示唆された。歯周病原細菌によって誘導される炎症により、歯周組織が酸化状態になっている可能性もあり、今後解析する必要がある。

【結論】

Ca9-22 細胞の酪酸の刺激により、時間・濃度依存的に酸化された HMGB1 放出が認められた。

Amphotericin B はヒト歯肉上皮細胞の IL-8 発現を制御する

広島大学大学院医歯薬総合研究科先進医療開発講座 歯周病態学講座

○今井遥香, 藤田 剛, 應原一久, 松田真司, 内田雄士, 宮川剛史, 柴 秀樹, 河口浩之, 栗原英見

Amphotericin B regulates IL-8 expression in human gingival epithelial cells

Department of Periodontal Medicine, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Science
○IMAI Haruka, FUJITA Tsuyoshi, OUHARA Kazuhisa, MATSUDA Shinji, UCHIDA Yushi, MIYAGAWA Tsuyoshi,
SHIBA Hideki, KAWAGUCHI Hiroyuki, KURIHARA Hidemi

【目的】抗真菌薬である amphotericin B は、ポリエン系抗生物質で、真菌の細胞膜のエルゴステロールと結合し、膜に小孔を作ることで殺菌作用を示す。近年、amphotericin B が歯周治療の治療薬として一部で利用されているが、真菌が歯周病の原因であるプラークを構成しているという報告はなく、有用性及び、その科学的根拠は未だ解明されていない。歯周病は歯周病原細菌感染に対する宿主の免疫応答の結果として歯周組織が破壊される疾患であることから、amphotericin B が寄生体である歯周病原菌ではなく、宿主の応答に影響を与えている可能性がある。歯肉上皮細胞は歯周病原性細菌の侵入に対して、物理的なバリアーとして、あるいは抗菌ペプチドなどを産生することによって防御的に機能する。一方で、上皮細胞は細菌刺激に対して炎症性サイトカインを産生し炎症の惹起に関与している。したがって歯肉上皮細胞の機能制御は、歯周病における炎症の抑制に関与する可能性がある。本研究では amphotericin B の歯肉上皮細胞に対する抗炎症作用を解明するために、歯周病原細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* または tumor necrosis factor (TNF)- α 作用下の歯肉上皮細胞に対する amphotericin B の IL-8 発現とそのシグナル経路に対する影響を検討した。

【材料および方法】

ヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) は健康な歯肉組織から酵素消化法によって分離し、3-4 代継代培養したものを実験に使用した。培地は Hu-mediaKB2 に insulin, transferrin, 2-mercaptoethanol, sodium selenite, bovine pituitary extract を添加したものを用いた。 *A.actinomycetemcomitans* は 1%ホルマリンで 4°C、12 時間処理し、死菌としたものを用い、TNF- α は RSD 社の human recombinant TNF- α を用いた。HGEC をコンフルエントの状態まで培養し、 *A.actinomycetemcomitans* (1×10^8 cell/ml) または TNF- α (50 ng/ml) を添加する 30 分前に amphotericin B (50 μ M、500 μ M) または ERK 阻害剤である PD98059 (50 μ M) を作用させ、12 時間後に total RNA を回収した。IL-8 mRNA 発現は、real-time PCR 法で解析した。さらに、amphotericin B が ERK カスケードに及ぼす影響を検討するために、HGEC をコンフルエントになるまで培養し、amphotericin B (50 μ M) を作用させた後に、 *A.actinomycetemcomitans* (1×10^8 cell/ml) または TNF- α (50 ng/ml) を 15 分間、または、30 分間作用させ、回収した。ERK のリン酸化について Western blotting を用いて分析した。また、HGEC をコンフルエントの状態まで培養し、amphotericin B (5 μ M、50 μ M、500 μ M、5 mM、50 mM) を作用させ細胞毒性について MTS assay を用いて検討した。

【結果および考察】 *A.actinomycetemcomitans* 刺激によって HGEC の IL-8 の mRNA 発現が増加したが、amphotericin B または ERK 阻害剤はその発現促進を抑制した。さらに *A.actinomycetemcomitans* 刺激によってヒト歯肉上皮細胞の ERK のリン酸化は促進したが、amphotericin B によってリン酸化が抑制された。また、TNF- α でも同様の結果が得られた。また、amphotericin B は 5 mM よりも低い濃度では細胞毒性を示さなかった。このことから、抗真菌薬 amphotericin B は *A.actinomycetemcomitans* や TNF- α 刺激によって誘導される炎症性サイトカインの発現を ERK を介して制御することが示唆された。

脳由来神経栄養因子 (BDNF) の血管内皮細胞透過性に及ぼす影響についての研究

広島大学医歯薬学総合研究科歯周病態学分野

○松田真司, 藤田 剛, 武田克浩, 橘高瑞穂, 今井遥香, 柴 秀樹, 河口浩之, 栗原英見

The effect of BDNF on permeability of endothelial cells

Department of Periodontal Medicine Division of Frontier Medical Science Hiroshima University
Graduated School of Biomedical Science

○MATSUMIDA Shinji, FUJITA Tsuyoshi, TAKEDA Katsuhiko, KITAKA Mizuho, IMAI Haruka,
SHIBA Hideki, KAWAGUCHI Hiroyuki, KURIHARA Hidemi

研究目的：これまでに脳由来神経栄養因子 (BDNF) がビーグル犬の歯周炎モデルにおいて、上皮の侵入を抑制し、歯周靭帯及び歯槽骨の再生を促進することを報告してきた。*In vitro* において BDNF は歯周靭帯細胞の分化、増殖及びセメント芽細胞の分化を促進し、さらに上皮細胞の増殖には影響を及ぼさなかった。また、血管内皮細胞の増殖、遊走を促進し、組織再生に必要な血管新生を促進させた。近年、歯周組織再生治療の分野では様々なサイトカイン療法の開発がさかんに進められている。歯周組織再生過程において炎症は不可避であるが、過剰な炎症反応は組織再生を阻害する。このことから、歯周組織再生療法に応用するサイトカイン自体に組織再生能の他に抗炎症作用を持つことが望ましいと考えられる。炎症過程においては様々な炎症性サイトカインの影響で血管内皮細胞の透過性が亢進する。血管透過性の亢進は再生組織内に浮腫を起こす可能性や、再生過程に必要な血管新生を阻害する可能性がある。そこで本研究では、BDNF の歯周組織再生のメカニズム解明のため、再生過程における BDNF の抗炎症作用に着目して以下の実験を行った。

材料と方法：①ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC、CAMBREX 社) は 5 代継代培養した細胞を実験に使用した。

②血管内皮細胞の細胞間透過性の検討・・・HMVEC を Transwell plate の Type1 collagen でコーティングした upper chamber (pore size 0.4 μ m) に confluent になるまで培養し、BDNF (25 ng/ml) を IL-1 β を添加する 12 時間前に作用させた。24 時間後に FITC-conjugated dextran (3000 kDa) を 100 μ g/ml 添加。4 時間後に lower chamber の吸光度を測定した。

③HMVEC の VE-cadherin の発現・・・細胞間接着の adherence junction の構成タンパク質である vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) の発現を解析した。6 well plate で confluent になるまで HMVEC を培養した後、BDNF (25 ng/ml) を IL-1 β を添加する 12 時間前に作用させた。IL-1 β 添加 24 時間後に細胞の回収を行った。解析は Western blotting で行った。

結果：①IL-1 β による lower chamber の dextran の吸光度の上昇が BDNF によって抑制された。

②IL-1 β は HMVEC の VE-cadherin の発現を濃度依存的に減少させた。BDNF は IL-1 β による VE-cadherin の発現の減少を回復した。

考察：BDNF は炎症性サイトカインである IL-1 β による血管透過性の亢進を抑制した。また BDNF は IL-1 β による血管内皮細胞の VE-cadherin の発現減少を回復した。これらのことから BDNF は血管内皮細胞の VE-cadherin を介し、IL-1 β による血管透過性の亢進を制御していることが考えられる。以上のことから、BDNF が歯周靭帯細胞やセメント芽細胞の分化や増殖の促進などのほかに、歯周組織再生過程の環境整備の一端として、抗炎症作用を持つことが示唆された。このことから、BDNF は再生組織内の炎症制御することができれば、BDNF を安全で確実性の高い歯周組織再生療法として応用できる可能性がある。

実験的歯周病モデルを用いた
脂肪組織由来未分化間葉系幹細胞の移植による歯周組織再生

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)¹
科研製薬株式会社²

○沢田啓吾¹, 竹立匡秀¹, 小笹匡雄¹, 岩山智明¹, 野崎剛徳¹, 市川朋生¹, 前田憲一郎¹,
田内拓史¹, 三木康史¹, 大原廣之¹, 伊山舜吉¹, 安齋 純², 北村正博¹, 村上伸也¹

Periodontal tissue regeneration by transplantation of
adipose-tissue derived stem cells in experimental periodontitis model

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry¹
Kaken Pharmaceutical Co.Ltd²

○SAWADA Keigo¹, TAKEDACHI Masahide¹, OZASA Masao¹, IWAYAMA Tomoaki¹,
NOZAKI Takenori¹, ICHIKAWA Tomoo¹, MAEDA Kenichirou¹, TAUCHI Takushi¹, MIKI Kouji¹,
OOHARA Hiroyuki¹, IYAMA Mitsuyoshi¹, ANZAI Jun², KITAMURA Masahiro¹, MURAKAMI Shinya¹

【目的】

我々の研究室では、脂肪組織中の未分化間葉系幹細胞 (ADSC) に着目し、細胞移植による新規歯周組織再生療法の確立を目指して、*in vitro*, *in vivo* の両面から解析を重ねてきた。これまでに、ADSC の硬組織形成細胞への分化能を確認し、さらにその安全性についても報告した。また、ビーグル犬歯周病モデルを用いた解析から、ADSC の移植が、骨・セメント質の新生を伴う歯周組織の再生を誘導することを報告してきた。本研究では、今後のヒトでの臨床応用を考慮し、基材としてボルヒール®を用いるとともに、本基材に混合可能な最大細胞数を用いて、歯周組織再生効果の検討を行った。実験モデルとしては、ビーグル犬 2 級根分岐部歯周病モデルおよび 2 壁性骨欠損モデルを用いた。

【材料および方法】

(1) ビーグル犬脂肪組織からの ADSC 単離

ビーグル犬の腹部内臓脂肪 (大網) より脂肪組織を採取し、細切後、1 時間のコラゲナーゼ処理を行った。コラゲナーゼ処理後、HISTOPAQUE®を用いた比重遠心により血球成分を除去し、プレートに播種した。24 時間の培養後、プレートに付着している細胞を EDTA 処理により回収し、得られた細胞を ADSC とした。

(2) ビーグル犬を用いた実験的歯周病モデルの作製および ADSC の移植

1. 2 級根分岐部歯周病モデル: ビーグル犬 5 頭を用い、全身麻酔および局所麻酔下にて、脂肪組織を採取すると同時に、第三前臼歯、第四前臼歯の頬側根分岐部に、頬舌径 3mm、深さ 4mm の 2 級根分岐部骨欠損モデルを作製し、シリコン材を填入した。4 週後、左右の欠損部位を無作為に試験側と対照側に振り分け、試験側には ADSC+ボルヒール®を、対照側にはボルヒール®のみを移植した。移植 6 週後に屠殺し、組織学的計測による歯槽骨再生の評価を行った。

2. 2 壁性骨欠損モデル: ビーグル犬 5 頭を用い、全身麻酔および局所麻酔下にて、脂肪組織を採取すると同時に、左右両側の下顎第四前臼歯の抜去を行った。3 ヶ月後、第一後臼歯の近心部歯槽骨に、頬舌径 3mm、近遠心径 5mm、深さ 4mm の 2 壁性骨欠損を作製し、左右の欠損部位を無作為に試験側と対照側に振り分け、試験側には ADSC+ボルヒール®を、対照側には、ボルヒール®のみを移植した。移植 6 週後に屠殺し、レントゲン写真による骨塩量の評価とマイクロ CT による歯槽骨再生の評価を行った。

【結果】

2 級根分岐部歯周病モデルにおいて、組織学的計測により、対照側と比較し、ADSC 移植側における有意な歯槽骨の新生が認められ、癒着等の異常所見は認められなかった。2 壁性骨欠損モデルにおいて、レントゲン写真を用いた骨塩量解析により、対照側と比較し、ADSC 移植側における有意な歯槽骨の骨塩量増加が認められた。また、マイクロ CT を用いた解析により、対照側と比較して、ADSC 移植側における有意な歯槽骨の新生が認められた。

【考察】

ボルヒール®を基材として ADSC を移植することにより、癒着等の組織学的異常所見を認めることなく、歯槽骨の再生が誘導された。このことは、歯周組織欠損部位への「ADSC-ボルヒール®複合体」の移植が、歯周組織再生を誘導することを強く示唆するものであり、今後のヒトでの臨床応用につながる情報が得られたと考えられる。

ナノハイドロキシアパタイトが BMP-2 による硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響

北海道大学歯学部大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

○玉川博貴, 西尾啓英, 中澤篤史, 菅谷 勉, 川浪雅光

Effect of nano-hydroxyapatite on BMP-2 induced hard tissue formation and dentin resorption

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

○TAMAGAWA Hiroki, NISHIO Takahide, NAKAZAWA Atsushi,
SUGAYA Tsutomu, KAWANAMI Masamitsu

【研究目的】

これまでに我々は、象牙質表面をキャリアーとして BMP-2 を結合組織内に移植すると、象牙質表面にセメント質様硬組織が形成されるとともに、象牙質吸収が認められること、さらに硬組織形成と象牙質吸収の比率は、BMP-2 濃度と BMP-2 塗付前の象牙質表面の脱灰方法の違い、すなわちキャリアーの違いにより大きく影響を受けることなどを報告してきた。一方 BMP-2 のキャリアーであるコラーゲン膜にナノハイドロキシアパタイトを複合化すると、硬組織誘導能が高められる可能性が認められた。そこで本研究では、コラーゲン膜にナノハイドロキシアパタイトを複合化して BMP-2 のキャリアーとした場合の、象牙質面上への硬組織形成と象牙質吸収に及ぼす影響について組織学的に検討した。

【材料及び方法】

ナノハイドロキシアパタイト複合化コラーゲン膜 (H 群) およびコラーゲン膜 (C 群) を 100 および 400 $\mu\text{g/ml}$ の rhBMP-2 に 10 分間浸漬し、H100, H400, C100, C400 の 4 群とした。ラット象牙質から試験片 ($2 \times 2 \times 0.3\text{mm}$) を作製し、EDTA で象牙質表面を 3 分間脱灰した。各群の膜を貼付して、ウィスター系ラット (10 週齢) の大腿筋内に移植した。2, 4 週後、HE 重染色を行って、象牙質上に形成された硬組織の形成率と象牙質吸収率を計測した。

【成績と考察】

2 週後、H100, H400 の硬組織形成率は、C100, C400 と比べて有意に高かった ($p < 0.05$)。象牙質吸収率は、H100 が C100 よりも有意に大きかった ($p < 0.05$)。

4 週後、硬組織形成率は、H100 が C100 より有意に大きかった ($p < 0.05$) が、H400 と C400 は差がなかった。象牙質吸収率は、C400 は C100 に比べて有意に大きかった ($p < 0.05$) が、H100 と C100、H400 と C400 の間に有意差はなかった。

BMP-2 は骨芽細胞だけでなく破歯細胞も活性化するが、ナノハイドロキシアパタイトは BMP-2 の破歯細胞活性化作用より骨芽細胞活性化作用を高めると考えられた。

【結論】

ナノハイドロキシアパタイト複合化コラーゲン膜を BMP-2 のキャリアーとして用いることで、低濃度の BMP-2 で象牙質吸収を増加させずに早期に多量の硬組織を誘導できることが明らかとなった。

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石灰化調整

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
○高橋 健¹, 下西 充¹, 渡邊弘淳¹, 遠藤直樹¹, 斎藤 修¹, 小松正志²

Epithelial-mesenchymal interactions regulate mineralization in human periodontal ligament *in vitro*

Division of Comprehensive Dentistry, Tohoku University Hospital¹,

Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry²

○TAKAHASHI Ken¹, SHIMONISHI Mitsuru¹, WATANABE Hiroatsu¹, ENDOU Naoki¹, 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。われわれはヒト歯根膜組織より上皮細胞および線維芽細胞を境界が明瞭な状態で初代培養し (IEF cells)、エナメルマトリックスプロテインの Amelogenin H72、Ameloblastin およびエナメルマトリックスプロテアーゼの Kallikrein-4 (KLK4) の mRNA の誘導を確認した (第 134 回日本歯科保存学会にて発表)。本研究では、IEF cells をプロナーゼにて回収し、再度、同一シャーレ内に播種、混培養し (MEF cells)、その細胞間相互作用による Amelogenin、Ameloblastin、MMP-20 および KLK4 の mRNA 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た。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 (IEF cells)、プロナーゼにて細胞を回収し、再度、同一シャーレ内に播種、混培養した。広範囲のサイトケラチンを認識する AE1/AE3 にて上皮細胞の存在を確認した後、サンプルとして実験に用いた (MEF cells)。細胞は、通法に従い *In situ* hybridization 法、半定量的 RT-PCR 法にて Leucine-rich amelogenin peptide (LRAP)、Ameloblastin、MMP-20 および KLK4 の mRNA の発現を解析した。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 (PE cells)。

(結果)

位相差顕微鏡像にて MEF cells は IEF cells のように上皮細胞と線維芽細胞の境界が明瞭ではなく、シャーレ全体に上皮細胞と線維芽細胞が混在して確認された。 *In situ* hybridization 法では、MEF cells の上皮細胞に Amelogenin exon6、Ameloblastin および KLK4 の mRNA の発現が強くみられた。また、MMP-20 の mRNA の発現も観察された。一方、IEF cells および PE cells に MMP-20 の mRNA の発現は観察されなかった。半定量的 RT-PCR 法では、MEF cells に LRAP、Ameloblastin、MMP-20 および KLK4 の mRNA が IEF cells および PE cells に比較して有意に強く発現した ($P < 0.01$)。一方、IEF cells は Ameloblastin および KLK4 の mRNA が PE cells に比較して有意に強く発現した ($P < 0.05$)。

(考察)

われわれはこれまで IEF cells の上皮細胞と線維芽細胞の境界部において基底膜の成分である Type IV コラーゲンおよびラミニン、また、それを破壊する MMP-2 の誘導を確認し、増殖する上皮細胞に対して恒常性を保とうとする働きがあることを報告してきた。基底膜を介さない細胞間相互作用によって歯の石灰化に関与する LRAP、Ameloblastin、MMP-20 および KLK4 の誘導は、マラッセの上皮遺残がセメント質のリモデリングに関与することを示唆するものとなった。

バブルリポソームと超音波を利用した効率的薬物・核酸導入システムの口腔組織への応用に向けた基礎的検討

昭和大学歯学部歯周病学教室¹, 北海道医療大学歯学部小児歯科学分野²,
北海道医療大学歯学部臨床口腔病理学分野³, モンゴル健康科学大学歯学部マイデント歯科トレーニングクリニック⁴
○菅野真莉加¹, Guruudivaa Enkhzaya^{1,4}, 齊藤正人², 安彦善裕³, 榎本拓哉¹, 野瀬冬樹¹, 鶴見亜有子¹, 宮園あがさ¹,
白井通彦¹, 滝口 尚¹, 須田玲子¹, 鈴木基之¹, 山本松男¹

Application of drug and gene delivery system with bubble liposome and ultrasound to oral tissue

Department of Periodontology, Showa University School of Dentistry¹
Department of Pediatric dentistry, Health Sciences University of Hokkaido School of Dentistry²
Department of Oral Pathology, Health Sciences University of Hokkaido School of Dentistry³
'My dent' Dental Teaching Clinic of School of Dentistry, Health Sciences University of Mongolia⁴
○SUGANO Marika¹, GURUUDIVAA Enkhzaya^{1,4}, SAITO Masato², ABIKO Yoshihiro³, ENOMOTO Takuya¹, NOSE Fuyuki¹, TSURUMI Ayuko¹,
MIYAZONO Agasa¹, USUI Michihiko¹, TAKIGUCHI Takashi¹, SUDA Reiko¹, SUZUKI Motoyuki¹, YAMAMOTO Matsuo¹

【背景および研究目的】 口腔疾患に対する薬物療法は、副作用や耐性菌の問題などから、全身的な長期連続投与でなく、病変部周囲への局所投与が現実的である。しかし、現在までの局所投与は、持続性や組織深達性が十分ではない。そのため、標的組織に効率的に薬物を送達させ、局所浸透性を向上させる新たなドラッグデリバリーシステムの開発が必要不可欠である。このような観点から、病変部位に対する低侵襲かつ効率的な先進的治療として、口腔疾患に対しても薬物・核酸導入法の応用が期待される。しかし、口腔領域への薬物・核酸導入に関する報告は極めて少なく、臨床応用に向けて今後の発展性が求められる。近年、物理的エネルギーとして超音波 (US) を利用した薬物・核酸導入法に、超音波造影剤である微小気泡 (マイクロバブル) を併用すると、導入効率が著しく増強することが報告され、標的組織における低侵襲かつ効率的な薬物・核酸導入法として注目されている。共同研究者である根岸らは、既存のマイクロバブルの問題点である大きさ、安定性、安全性、標的指向性の欠如などを改善したバブルリポソーム (BL) を開発し、*in vitro/in vivo* の両方において高い導入効果を示してきた。そこで、本研究では口腔組織における BL と US を併用した薬物・核酸導入法の有用性を明らかにするために、遺伝子導入効率の高い骨格筋により構成される舌組織を標的とした基礎的検討を行った。

【材料と方法】 舌組織への本導入法の有用性を評価するために、ルシフェラーゼおよび緑色蛍光タンパクである EGFP 遺伝子をコードした 2 種のレポータープラスミドを用いた。ICR マウスを麻酔後、口腔外に牽引した舌に BL とプラスミドの混合溶液を直接注入し、直後に超音波照射を行った。5 日後に舌を回収し、タンパク量当たりのルシフェラーゼ活性の測定と、蛍光顕微鏡による GFP 発現細胞の組織学的観察を行った。また、舌組織に対する最適な導入条件を決定するために、投与するプラスミド量 (0.2-20 μg)、超音波照射強度 (0-4.0 W/cm^2)、超音波照射時間 (0-180 秒) について条件検討を行った。さらに、本法による組織障害性を評価するために、エバンスブルーの非特異的細胞内取り込み量を蛍光顕微鏡にて観察した。また、機能タンパク質の発現を評価するために、抗菌ペプチドの 1 つであるヒト β -ディフェンシン 3 (hBD3) および血管新生因子であるヒト塩基性線維芽細胞増殖因子 (hbFGF) を候補とし、マウス舌組織に対する最適条件下でプラスミドの導入を行い、発現を解析した。

【結果および考察】 BL+US 照射群において、BL/US なし、BL のみ、US のみの群に比べて、有意に高いルシフェラーゼ活性が認められ、従来の導入法と比較して導入効果が長期に維持されていた。また、蛍光顕微鏡にて EGFP の発現を確認したところ、BL+US 群において、舌骨格筋組織に明瞭で多数の EGFP 発現細胞が観察された。さらに、導入効率と障害性の評価から、マウス舌に対する本導入法の適切な導入条件が得られた。また、同条件によって hBD3 および hbFGF のマウス舌組織における発現が確認された。

本結果より、BL と US を併用した薬物・核酸導入法がマウス舌組織においても有用であることが示され、口腔組織への持続性と組織深達性を改善した新たなドラッグデリバリーシステムとなることが示唆された。今後、標的組織の拡大のため、本導入法を舌組織以外の他の口腔組織にも応用し、その有用性を評価していく必要がある。また、今回は基礎的検討として高分子化合物であるプラスミドを用いたが、導入分子としてペプチド、薬物や siRNA などの応用も可能である。そのような低分子導入では、より深部組織への効率的な導入効果が期待されることから、本法が口腔疾患に対する新しい治療法として有効なツールとなることが示唆される。

尚、本研究は、BL の開発や超音波を利用した薬物・核酸導入に関する基礎的研究を進めている東京薬科大学薬物送達学教室 (根岸洋一 准教授) および帝京大学生物薬剤学教室との共同研究として行った。

IL-1Ra 欠損マウスの破骨細胞形成能と実験的歯周炎について

愛知学院大学 歯学部 歯周病学講座

○石原裕一, 水谷大樹, 伊澤有郎, 三谷章雄, 黒須康成, 川瀬仁史, 稲垣幸司, 野口俊英

Osteoclast formation and experimental periodontitis in IL-1Ra knockout mice

Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University

○ISHIHARA Yuichi, MIZUTANI Hiroki, IZAWA Ario, MITANI Akio, KUROSU Yasunari,
KAWASE Hitoshi, INAGAKI Koji, NOGUCHI Toshihide

【研究の目的】歯周疾患の発症と進行には局所で産生される、炎症性サイトカインが深く関与していることが明らかとなっている。その中でもインターロイキン-1 (IL-1) は単球・マクロファージから産生され、歯槽骨吸収に直接関与することが基礎的・臨床的研究により報告されている。一方、IL-1 レセプターアンタゴニスト (IL-1Ra) は IL-1 インヒビターとして IL-1 活性調節に働くことから、すでにリウマチ治療薬として海外では使用されている。しかし、歯周疾患において IL-1Ra が歯槽骨吸収抑制に直接働いているかどうかを調べた研究はまだない。そこで IL-1Ra 欠損マウス腹腔 Mφ を歯周病関連細菌の一つである *A. actinomycetemcomitans* (*A. a.*) LPS で刺激した際の炎症性サイトカイン産生と造血幹細胞の破骨細胞分化と骨吸収活性を調べること、また *A. a.* 感染による実験的歯周炎モデルを IL-1Ra 欠損マウスに惹起し、歯周組織を野生型マウスのそれと形態学的に比較することにより、歯周炎の進行における IL-1Ra の役割を調べることを目的とした。

【材料および方法】チオグリコレート培地で誘導した腹腔 Mφ を LPS で刺激し、得られた培養上清中の炎症性サイトカイン量を ELISA 法により測定した。またその培養上清を骨髄細胞培養系に添加することにより破骨細胞形成能を調べた。さらにマウス頭蓋冠にこの上清を添加した場合の骨吸収活性を IL-1Ra 欠損マウスと野生型マウス間で測定し比較検討した。次に *A. a.* (ATCC29524 株) 菌体浮溶液 (1×10^{10} CFU/ml) を IL-1Ra 欠損と野生型マウス口腔内に 9 日間投与し実験的歯周炎を惹起させ、45 日後に屠殺し、HE 染色にて比較検討した。IL-1Ra 欠損と野生型マウス由来骨芽細胞を *A. actinomycetemcomitans* 生菌で刺激した際の RANKL, OPG 発現は qPCR にて比較した。

【結果】14 週齢 IL-1Ra 欠損マウス腹腔 Mφ 培養上清中の IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , RANKL 産生量は IL-1Ra 欠損マウスが野生型マウスに比べ有意に高く、IL-1Ra は野生型マウスでのみ産生されていた。破骨細胞形成数も野生型マウスに比べ IL-1Ra 欠損マウスで有意に多く、頭蓋冠での骨吸収活性も IL-1Ra 欠損マウスの方が高い傾向が観察された。6 週齢マウスで惹起された実験的歯周炎をマイクロ CT 画像上で形態計測したところ、下顎左側第二臼歯近心根の歯槽骨吸収率は野生型マウス (14.2%) に比べ IL-1Ra 欠損マウス (25.7%) の方が有意に高かった。HE 染色において IL-1Ra 欠損マウスでは付着上皮と歯肉固有層への炎症性細胞浸潤、付着の喪失および歯槽骨吸収が形態学的に観察された。IL-1Ra 欠損マウス由来骨芽細胞における RANKL 発現と RANKL/OPG 比は野生型マウスに比べ高い傾向を示した。

【考察】今回 IL-1Ra 欠損マウス腹腔 Mφ から産生される炎症性サイトカインは IL-1Ra 欠損により、その産生が亢進されたが、このことは IL-1 の活性調節が IL-1 以外の炎症性サイトカイン産生をも間接的に制御していることを示唆している。また IL-1Ra は骨髄細胞培養系における破骨細胞分化や器官培養における骨吸収活性においても重要な働きをしていることが推察された。さらに、どちらのマウスでも骨髄細胞培養系にインドメタシンを添加することで破骨細胞形成が抑制され、今回の破骨細胞形成は COX-2 を介したものであることが明らかとなった。以上のことから IL-1Ra は炎症性サイトカイン産生、骨芽細胞の骨関連遺伝子発現、破骨細胞の分化・活性化と歯周炎の発症から進行まですべての過程に強く関与している事が示唆され、このことにより IL-1Ra 欠損により付着の喪失を伴う実験的歯周炎が観察されたと考えられた。したがって、IL-1Ra にはリウマチ治療薬としてだけでなく、今後、歯周病治療薬として開発される可能性があることが示唆された。

【結論】*A. actinomycetemcomitans* 単独感染において IL-1Ra 欠損マウスの方が野生型マウスに比べ有意に進行した実験的歯周炎を惹起しており、歯周病の発症と進行に IL-1Ra が深く関与していることが明らかとなった。

JP2 型 leukotoxin promoter を有する *A. actinomycetemcomitans* 菌の分離と解析

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野
○長澤敏行, 清水伸太郎, 日高竜宏, 門 貴司, 加藤幸紀, 森 真理,
古市保志

Isolation and characterization of *A. actinomycetemcomitans* with JP2 type leukotoxin promoter
Division of Periodontology&Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido
○NAGASAWA Toshiyuki, SHIMIZU Shintaro, HIDAKA Tatsuhiro, KADO Takashi, Kato Satsuki, MORI Mari,
FURUICHI Yasushi

【研究目的】

A. actinomycetemcomitans 菌は侵襲性歯周炎の病巣から比較的高頻度に検出される歯周病原細菌であり、主要な病原因子として白血球の細胞死や赤血球の溶血をおこす leukotoxin が知られている。*A. actinomycetemcomitans* 菌の JP2 株は haemoglobin-binding protein A 遺伝子 (hbpA) に変異があり、栄養源として hemoglobin から鉄を得ることができない事、leukotoxin 遺伝子のプロモーター領域に 530bp の欠失があるために leukotoxin を多量に産生し、病原性が高い事が報告されている。JP2 株はアフリカからヨーロッパ、南北アメリカで分布が報告されているものの、アジアではこれまで存在が確認されていない。本研究では北海道における *A. actinomycetemcomitans* 菌の特徴を検討することを目的として、北海道医療大学歯科内科クリニックで分離された臨床分離株の leukotoxin 遺伝子と hbpA 遺伝子を検討した。

【材料および方法】

1. 北海道医療大学歯科内科クリニックに来院した 22 人の歯周炎患者、12 人の軽度歯肉炎・健常者を対象とし、混合唾液と歯肉縁下プラークを採取した。唾液及び歯肉縁下プラークサンプル中の *A. actinomycetemcomitans* 菌の有無を PCR 法で検討した。
2. PCR 法で *A. actinomycetemcomitans* 菌が認められた被験者の歯周ポケット 2 箇所から同菌を培養した。各部位からそれぞれ 2 コロニーを分離・培養し、得られた臨床分離株から DNA を分離して leukotoxin 遺伝子プロモーター領域の変異を検討した。
3. 臨床分離株の中から被験者ごとに 1 株を選択して hbp 遺伝子のシーケンスを行って配列を決定した。同様に JP2 株の hbpA 遺伝子のシーケンスを行い、臨床分離株と配列の比較を行った。

【成績】

PCR 法により 22 人の歯周炎患者のうち 7 名から *A. actinomycetemcomitans* 菌が検出され、健常者 12 人からは検出されなかった。7 名の *A. actinomycetemcomitans* 菌陽性患者の歯周ポケットより 28 株の臨床分離株を得た。28 株の臨床分離株のすべてにおいて JP2 と同様な leukotoxin 遺伝子プロモーターの欠失が認められた。hbpA 遺伝子の配列を比較した結果、臨床分離株は JP2 株の持つ hbpA 遺伝子の変異を持たないことが明らかとなった。

【考察】

これまで日本及び東アジアで報告されている *A. actinomycetemcomitans* 菌とは異なり、本研究で得られた臨床分離株では leukotoxin 遺伝子のプロモーター領域に JP2 株と同じ欠失が認められた。しかし hbpA 遺伝子は JP2 株と異なることから、JP2 株とは異なる性質を持つことが示唆された。今後はこの *A. actinomycetemcomitans* 菌がどの地域のどのような個体に分布しているのか、JP2 と比較してどの程度の病原性が認められるのかなどについて詳細な検討が必要であると思われる。

【結論】

本研究により JP2 様の leukotoxin promoter を持ちながら hbpA が JP2 と異なる *A. actinomycetemcomitans* 菌が北海道に分布していることが明らかとなった。

Porphyromonas gingivalis LPS が microRNA 発現に及ぼす影響

新潟大学 超域学術院¹, 大学院医学総合研究科 歯周診断・再建学分野², 口腔保健学分野³,
医学総合病院 歯科総合診療部⁴

○本田朋之^{1,2}, 高橋直紀^{1,2}, 奥井隆文¹, 宮内小百合^{1,2}, 中島貴子^{1,4}, 多部田康一¹, 山崎和久^{1,3}

The effect of *Porphyromonas gingivalis* LPS on microRNA expression

Center for Transdisciplinary Research, Niigata Univ.¹, Div. Periodontology²,
Div. Oral Science for Health Promotion³ Niigata Univ. Graduate School of Medical and Dental Sciences,
General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata Univ. Medical and Dental Hospital⁴

○HONDA Tomoyuki^{1,2}, TAKAHASHI Naoki^{1,2}, OKUI Takafumi¹, MIYAUCHI Sayuri^{1,2}, NAKAJIMA Takako^{1,4},
TABETA Koichi¹, YAMAZAKI Kazuhisa^{1,3}

【研究目的】

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は、宿主の免疫応答を制御しその排除機構から逃れ、歯周炎という慢性病態の成立に関与していると考えられる。我々はこれまでに、*P. gingivalis* がマクロファージあるいは歯肉上皮細胞に対して TLR シグナル伝達系における負の制御因子 IRAK-M を増強し、免疫応答が抑制されることを報告した (Domon *et al.*, J Leukoc Biol, 2008, Takahashi *et al.*, J Periodont Res, 2010)。近年、新たな遺伝子制御分子として microRNA の存在が注目され、TLR シグナル伝達系への関与も報告されている。*P. gingivalis* による免疫制御に microRNA が関わっている可能性が考えられる。そこで今回我々は、*P. gingivalis* LPS の microRNA 発現に及ぼす影響および microRNA のサイトカイン産生に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

ヒト単球系細胞株 THP-1 に対して、*P. gingivalis* LPS, *E. coli* LPS および Pam₂CSK4 にて刺激後 (1 μg/mL, 8h), 通常に従い total RNA を抽出した。同細胞の未刺激サンプルをコントロールとして、Human miRNA マイクロアレイ (アジレント・テクノロジー社, Release 12.0) を用いて刺激による microRNA の発現変化を網羅的に検索した。発現変動のみられた microRNA に関してはこれに特異的なプライマーを用いた Real-time PCR 法にてさらに検証した。

変動のみられた microRNA の機能的関与を明らかにするため、PMA によりマクロファージ様細胞に分化させた THP-1 に対して、microRNA に特異的な inhibitor または precursor をトランスフェクトし、ノックダウン・強制発現させた。上記同様に刺激後、microRNA のターゲット候補分子の発現変化を Real-time PCR 法, Western Blot 法にて確認し、炎症性サイトカイン産生の変化を Real-time PCR 法, ELISA 法にて確認した。

【結果】

マイクロアレイ解析の結果、THP-1 において *P. gingivalis* LPS 刺激により未刺激に比較して 2 倍以上の発現変動を認めた microRNA は 10 種類検出され (上昇: 8 種類, 減少: 2 種類), その中で miR-146a のみ有意な上昇が認められた。*P. gingivalis* LPS による miR-146a 発現上昇率は、同濃度の *E. coli* LPS 刺激の場合に比較して高い傾向が認められたが、両刺激間に有意差は認められなかった。

miR-146a は、TLR シグナル分子である IRAK-1 および TRAF6 が候補ターゲットとして報告されている (Taganov *et al.*, PNAS, 2006)。miR-146a のノックダウンにより、IRAK-1, TRAF6 発現, サイトカイン産生に関していずれも変化は認められなかった。一方、miR-146a の強制発現により、IRAK-1, TRAF6 発現に関して変化は認められなかったが、炎症性サイトカイン (TNF-α, IL-6) 産生は有意に低下した。

【考察】

P. gingivalis LPS により大きな発現変動を示す microRNA は miR-146a のみであった。miR-146a の強制発現により、IRAK-1, TRAF6 を直接的に介さず刺激時のサイトカイン産生を抑制することが今回示された。しかしながら、これは刺激による発現上昇レベルを超えた非生理的レベルにまで強制発現させて得られる作用であり、miR-146a のサイトカイン産生に及ぼす影響はわずかであると考えられる。microRNA の実際の歯周炎病態形成における関与を明らかにするためには今後さらなる検討が必要である。

【結論】

P. gingivalis LPS により miR-146a の発現上昇が認められたが、miR-146a のサイトカイン産生に及ぼす影響はわずかであることが示唆された。

Aggregatibacter actinomycetemcomitans がヒト歯肉上皮細胞の細胞接着因子に及ぼす影響

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態学分野¹
社団医療法人里仁会 興生総合病院 歯科・口腔外科²

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

Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection affects cell adhesion molecules in human gingival epithelial cells

Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences¹
Rijinkai Medical Foundation Kousei General Hospital, Division of Dentistry and Oral Surgery²

○KOCHI Shinsuke¹, YAMASHIRO Keisuke¹, YAMAMOTO Tadashi¹, HONGO Shoichi¹, SHIMOE Masayuki^{1,2},
TOMIKAWA Kazuya¹, UGAWA Yuki¹, MAEDA Hiroshi¹, TAKASHIBA Shogo¹

【緒言】

歯肉上皮は、細胞間および歯面との接着によって、歯周病原細菌の感染に対する物理的バリアーとして機能している。細胞表面受容体であるインテグリンは、ヘミデスモゾーム結合を構成する重要な細胞接着因子であり、細胞外基質と特異的に結合することによって組織間の接着を強固にしている。歯周病によって上皮の組織破壊が起こる際のインテグリンや細胞外基質の発現を制御するメカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、培養ヒト歯肉上皮細胞と歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 (Aa Y4) の共培養時の、歯肉上皮細胞におけるインテグリン、細胞外基質、さらにサイトカインに着目して、これらの遺伝子発現の量的変化について検討した。

【材料及び方法】

1. 歯肉上皮細胞の分離と培養：健康な歯肉を採取し、歯肉上皮細胞を 3 mg/mL collagenase type I および 4 mg/mL dispase で分離して、10 cm 培養皿に播種した。その後、Keratinocyte-Serum Free Medium (Invitrogen) を用いて、37 °C, 5 %CO₂ 存在下で、1 週間培養した。
2. 歯肉上皮細胞と AaY4 との共培養：Trypticase Soy Broth で 16 時間培養した Aa を遠心分離し、上清を吸引後、抗生剤が含まれていない Keratinocyte-Serum Free Medium で懸濁した。歯肉上皮細胞を継代培養し、10 cm 培養皿でコンフルエント (4×10⁵ 個) に達した時に、実験群には上記の Aa を multiplicity of infection (MOI) が 10 および 100 となるよう添加し、24 時間培養した。
3. 細胞接着分子、細胞外基質、サイトカインの遺伝子発現の定量：上記条件で培養した歯肉上皮細胞から、全 RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、リアルタイム PCR 法を用いて以下の 11 遺伝子の発現変化の定量を行った。サイトカイン：Transforming growth factor-beta 1 (TGF-β1), Interleukin-8 (IL-8)；接着因子：Integrin α2, Integrin α3, Integrin α5, Integrin β4, Integrin β6；細胞外基質：Tenascin C, Fibronectin, Versican；増殖関連：Proliferation cell nuclear antigen (PCNA)

【結果】

1. IL-8 の遺伝子発現量は著しく増加し、TGF-β1 の遺伝子発現量はわずかに増加した。
2. Integrin α2, Integrin α3, Integrin β4, そして Integrin β6 の遺伝子発現量は減少した。しかし、Integrin α5 の遺伝子発現量は増加した。
3. Versican の遺伝子発現量は増加した。しかし、この条件での Tenascin C および PCNA は減少した。

【考察及び結論】

歯肉上皮細胞に Aa が感染することによって、TGF-β1 と炎症性サイトカインである IL-8 の遺伝子発現が増加し、細胞接着因子の遺伝子発現が減少した。TGF-β1 は、インテグリンの発現と深く関わっていることが報告されているが、それ以外にも細胞間接着因子の減少や、細胞外基質の増加、そして間葉細胞への形質転換にも関わっていることが報告されている。一方、Aa の感染によって遺伝子発現が増加した Integrin α5 と Versican は間葉細胞のマーカーでもあることから、Aa の感染によって歯肉上皮細胞は、その細胞の性質を変化させている可能性がある。今後 TGF-β1 による細胞接着の制御メカニズムをさらに検討することは、歯周病による上皮破壊解明の一助になると考えられる。

(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)

歯槽骨吸収における *Actinomyces naeslundii* ペプチドグリカンの役割

神奈川歯科大学 口腔治療学講座 歯内療法学分野

○ 佐藤武則, 石井信之

The role of peptidoglycan from *Actinomyces naeslundii* in alveolar bone resorption

Department of Oral Medicine, Division of Endodontics, Kanagawa Dental College,

○SATO Takenori, TANI-ISHII Nobuyuki

【研究目的】歯槽骨吸収はプラーク中の細菌により産生された毒素がマクロファージを刺激して炎症性サイトカインを誘導し、破骨細胞を活性化させることにより生じることが知られている。歯周炎局所においては偏性嫌気性グラム陰性菌が優位に分離されることから、細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS) が歯槽骨破壊に関与する主たる細菌学的因子として数多く報告されており、細菌の細胞壁には歯槽骨吸収に関与する生物学的活性が存在するものと考えられている。一方、グラム陽性菌についてはグラム陰性菌の定着や増殖の足場となりプラーク形成に重要な働きを示していることは明らかにされているが、細胞壁成分と歯槽骨吸収の関連性については明らかにされていない。このことからグラム陽性菌の歯槽骨吸収因子の解析は歯周炎予防と健全な口腔環境の維持に役立つものと考えられる。本研究では、まず根尖病変や歯周疾患から多く検出されるグラム陽性菌、*Actinomyces naeslundii* 生菌をラット口腔内に投与する実験的歯周炎により歯槽骨吸収への影響を評価した。次いで、本菌の細胞壁主要構成成分であるペプチドグリカンを用いて破骨細胞分化誘導能と骨吸収能の解析、炎症性サイトカイン産生能について検討した。

【材料および方法】供試菌と培養条件：*A. naeslundii* T14V と *P. gingivalis* ATCC 33277 を BHI 培地により 37°C, 18 時間嫌気培養した。
1. 実験的歯周炎：実験動物は 3 週令 Sprague-Dawley 系ラット雄 (n=18) を用いた。スルファメトキサゾールとトリメトプリムの合成抗菌薬により口腔常在菌を減少させた後、ラット口腔内に 5%カルボキシルメチルセルロース(CMC)で調整した供試菌 (3.0×10^{11} CFU/ml) を 1 日おきに 0.5 ml ずつ 5 回接種した。非感染群は CMC のみを接種した。実験開始から 42 日後に屠殺して上顎骨を採取後に歯槽骨吸収量を測定した。2. 破骨細胞分化誘導能と骨吸収能：BALB/c マウス骨髄細胞と破骨細胞分化支持細胞 (MC3T3-G2/PA6) を共培養し、ペプチドグリカン添加群、*E. coli* LPS 添加群と無添加群 (コントロール) に分けて比較した。破骨細胞分化誘導能は 1 週間培養後の TRAP 陽性細胞数をカウントし、骨吸収能は骨片入りプレート上で培養して骨吸収窩を測定した。3. 炎症性サイトカイン産生能：チオグリコロート培地を接種した BALB/c マウス腹腔内よりマクロファージを回収し、RT-PCR 法によりペプチドグリカン添加群、*E. coli* LPS 添加群とコントロールにおける炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, TNF- α) の発現を比較解析した。

【成績】1. 実験的歯周炎：*A. naeslundii* 接種群は *P. gingivalis* 接種群と同等の骨吸収を示し、非感染群と比較して有意な骨吸収を認めた ($p < 0.01$)。2. 破骨細胞分化誘導能と骨吸収能：ペプチドグリカン添加群 (10 μ g/ml) は *E. coli* LPS 添加群 (1 μ g/ml) と同等の TRAP 陽性細胞の分化誘導と骨吸収が認められ、コントロールに比べて有意な破骨細胞の活性化が認められた ($p < 0.01$)。3. 炎症性サイトカイン産生能：ペプチドグリカン添加群 (10 μ g/ml) と *E. coli* LPS 添加群 (1 μ g/ml) はコントロールに比べて炎症性サイトカインの発現が強く認められた。

【考察および結論】実験的歯周炎の結果より、*A. naeslundii* は歯槽骨吸収を惹起させる細菌であることが示唆された。また、ペプチドグリカンを添加することにより *E. coli* LPS と同等の破骨細胞分化誘導と骨吸収能が認められ、さらに炎症性サイトカインである IL-1 β と IL-6, TNF- α が発現されたことから *A. naeslundii* のペプチドグリカンが歯周炎の病原因子として歯槽骨吸収に関与することが明らかにされた。

【研究協力者】神奈川歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野：遠山歳三, 渡辺清子, 熊田秀文, 浜田信城

コンポジットレジン修復物の辺縁部におけるエア・ポリッシングの影響

日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座¹, 日本歯科大学新潟病院総合診療科²

○清水 豊¹, 多田和弘¹, 関 秀明², 鴨井久博¹, 佐藤 聡¹

Effect of air polishing to resin composite-dentin interface

Department of Periodontology, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata¹,

Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital²

○SHIMIZU Yutaka¹, TADA Kazuhiro¹, SEKI Hideaki², KAMOI Hisahiro¹, SATO Soh¹

【目的】エア・ポリッシングは、圧縮空気と水、微粒子を歯面に噴霧することによりプラークやステインを除去する治療法で、臨床において幅広く応用されている。また、キュレットや超音波スケーラー、ラバーカップの使用と比較し、容易かつ迅速に細部のプラークやステインを除去できることが数多く報告されている。しかし、微粒子を歯面に高压で噴霧するため、歯質や修復物の破壊が懸念されている。以前の研究で、エア・ポリッシングは、象牙質やコンポジットレジンに対する有意な破壊が認められるが、成熟エナメル質に対する破壊が少ないことが報告された。われわれは、これまでにエア・ポリッシングが与える象牙質の破壊程度を検討し、微粒子の種類 (NaHCO₃, グリシン) と噴射角度により象牙質破壊程度が異なることを報告した。しかし、コンポジットレジンと象牙質の境界部に対するエア・ポリッシングの影響は検討しておらず、他の報告もみられない。本研究では、コンポジットレジンと象牙質の境界部におけるエア・ポリッシングの影響を観察し、異なる硬度の微粒子と噴射角度による破壊深度、破壊体積の検討を行った。

【材料および方法】ヒト抜去歯 54 歯を清掃、乾燥後、一辺 6mm の象牙質ブロックを作製し、エポキシ樹脂に包埋した。その後、象牙質表面の半側に 2mm×3mm×2mm の窩洞を形成し、2 ステップ型ボンディング材 (クリアフィル メガボンド, クラレメディカル) を使用しメーカー指示書に従って接着処理を行い、コンポジットレジン (クリアフィル マジェスティ, クラレメディカル) の充填を行った。水中に 48 時間保管した後、コンポジットレジンの研磨を行った。エア・ポリッシングは、エア・ポリッシャー (AIR-FLOW S II, EMS) のノズル先端と試料面間の距離を 3mm に固定し、コンポジットレジンと象牙質の境界部に対して、90°、象牙質側から 45°、コンポジットレジン側から 45° の角度条件で、噴射条件毎に 6 歯に対して 5 秒間行った。ポリッシングパウダーは、平均粒径が 65 μm の NaHCO₃ 粒子 (AIR-FLOW CLASSIC, EMS)、平均粒径が 25 μm のグリシン粒子 (AIR-FLOW PERIO, EMS)、平均粒径が 65 μm のグリシン粒子 (AIR-FLOW SOFT, EMS) の 3 種類をそれぞれ使用した。エア・ポリッシング後の試料表面の破壊深度と破壊体積の解析は、測定顕微鏡 (STM6, OLYMPUS) を用いて行った。

【結果および考察】粒子の違いにおける試料表面の破壊は、NaHCO₃ 粒子と比較しグリシン粒子で小さく、統計学的有意差が認められた。平均粒径の異なるグリシン粒子間では、25 μm のグリシン粒子と比較し、65 μm のグリシン粒子で試料表面の破壊が小さい傾向が認められた。噴射角度の違いにおける試料表面の破壊深度の比較では、象牙質側から 45° の角度条件で噴射した群で最も深い破壊深度が認められた。コンポジットレジンと象牙質の境界部に対して 90° の角度条件で噴射した群とコンポジットレジン側から 45° の角度条件で噴射した群の比較では、コンポジットレジン側から 45° の角度条件で噴射した群に破壊深度が浅い傾向が認められた。噴射角度の違いにおける試料表面の破壊体積の比較では、コンポジットレジンと象牙質の境界部に対して 90° の角度条件で噴射した群と象牙質側から 45° の角度条件で噴射した群は、コンポジットレジン側から 45° の角度条件で噴射した群と比較し、破壊体積が大きい傾向が認められた。この結果から、コンポジットレジンと象牙質の境界部に対するエア・ポリッシングは、象牙質と比較し硬度が高いコンポジットレジン側からノズルを向けて噴射することにより、境界部の破壊を最小限に抑えることが可能であることが示唆された。

【結論】本研究より、エア・ポリッシングのコンポジットレジンと象牙質の境界部における破壊が最も小さいのは、平均粒径が 65 μm のグリシン粒子を使用し、コンポジットレジン側から 45° の角度条件で噴射した場合であることが示唆された。