

高出力 LED 照射器が デュアルキュア型レジンセメントの硬さに与える影響

新潟大学大学院 歯学分野¹, きたしろ歯科診療所², 東京医科歯科大学大学院 部分床義歯補綴学分野³,
新潟大学歯科総合診療部⁴, 新潟大学大学院生体材料学分野⁵, 新潟大学大学院口腔保健学分野⁶
○渡部平馬^{1,2}, 浅井哲也¹, 金谷史夫², 風間龍之輔³, 石崎裕子⁴, 渡辺孝一⁵, 福島正義⁶, 興地隆史¹

Effect of high intensity light-emitting diode (LED) unit on the hardness of dual-cured resin cement

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Graduate School, Niigata University¹, Kitashiro
Dental Office², Removable Partial Denture Prosthodontics, Graduate School, Tokyo Medical and Dental
University³, General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University⁴, Division of Biomaterial Science,
Niigata University⁵, Division of Oral Science for Health Promotion, Niigata University⁶
○WATANABE Heima^{1,2}, ASAI Tetsuya¹, KANAYA Fumio², KAZAMA Ryunosuke³,
ISHIZAKI Hiroko⁴, WATANABE Koichi⁵, FUKUSHIMA Masayoshi⁶, OKIJI Takashi¹

【目的】 CAD/CAM セラミック修復物を口腔内で長期間安定して保持するためには、フィラーを含有したレジンセメントで歯質と一体化させる必要がある。そのため、デュアルキュア型レジンセメントを用いる際は、光照射により十分に硬化させる必要がある。近年、プラズマ照射器と同等の出力を持つ高出力型 LED 光照射器が開発されており、光重合レジン硬化時間の短縮が期待されているが、これらを用いたセラミックスを介して光照射した場合のレジンセメントの硬化度を検討した報告は少ない。そこで本研究では、CAD/CAM 用マシーナブルセラミック材を介してデュアルキュア型レジンセメントに光照射を行い、照射器の種類や照射時間がセメントの硬さに与える影響を検討した。

【材料と方法】 高出力型 LED 照射器として Demi (Kerr : 以下 DE), PenCure 2000 (Morita : 以下 PC)および Valo (Ultradent : 以下 VL) を、また QTH (ハロゲン) 照射器として Jetlite 3000 (Morita : 以下 JL) を用いた。

長石系セラミックブロック (Vita Mark 2 : A2, Vita Zahnfabrik) を硬組織切断機にて切断後、表面を耐水研磨紙 #1000 で研磨して 12.0×10.0×2.0 mm のセラミック試片を作製した。次いで、デュアルキュア型レジンセメント (クリアフィルエステティックセメント ユニバーサル, クラレメディカル) を内寸 12.0×2.0×2.0mm のステンレス金型に充填し、透明ポリエチレンフィルムおよびセラミック試片の介在するあるいは非介在下で、各照射器を密着させて光照射を行った。照射条件は、DE、JL ではハロゲン照射器に対するメーカー指定照射時間(20 秒)およびその 2 倍 (40 秒)、また、PC、VL では最大出力下でプラズマ照射器に対するメーカー指定照射時間 (5 秒)およびその 2 倍 (10 秒)とした。全ての試料は暗室中で 37℃蒸留水に 24 時間浸漬保管後、耐水研磨紙#1500 まで研磨を行い、微小硬度計 (MVK、明石製作所; 荷重 50g, 荷重保持時間 15 秒) を用いて、光照射側から 100 μm の位置で 3 カ所ヌーブ硬さを計測して平均値を求めた。得られたデータは二元配置分散分析および Tukey の多重検定により統計処理を行った (P = 0.05)。

また、セラミック試片 (厚さ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mm) 介在下あるいは非介在下における各照射器の光強度を、Radiometer (Demetron) にて測定した。

【結果および考察】 メーカー指定照射時間では、ヌーブ硬さは全群ともセラミック試片介在下で有意に低下した (P<0.05)。また、照射時間をメーカーの 2 倍とした場合は、JL のみセラミック試片介在下で有意な硬さの低下が生じ (P<0.05)、DE、VL は JL に比較して有意に高い値を示した (P<0.05)。光強度はセラミック試片介在により大幅に減弱し、厚さ 2 mm のセラミック試片を介在させた場合約 1/5 以下に減弱した。

以上の結果から、オールセラミック修復物をデュアルキュア型レジンセメントで接着する場合、メーカー指定の照射時間ではセメントの硬化度が低下すること、および、高出力型 LED 照射器で照射時間を 2 倍とすることにより、セメント硬化度の低下が回避されることが示唆された。高出力型 LED 照射器は、オールセラミック修復物装着時にデュアルキュア型レジンセメントの硬化度の向上、照射時間の短縮の両面で有用と考えられた。

【結論】 今回の実験条件においては、高出力型 LED 照射器では、メーカー指定の 2 倍の照射時間でデュアルキュア型レジンセメントを重合させた場合、マシーナブルセラミックスの介在によるセメント硬さの低下はみられなかった。

ブリーチング法を利用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化戦略 —表層下脱灰病巣に結合した唾液タンパク質の化学的変化—

神奈川県立歯科大学 口腔治療学講座 保存修復学分野¹
神奈川県立歯科大学 生体機能学講座 生化学・分子生物学分野²
○飯塚純子¹, 向井義晴¹, 高垣裕子², 寺中敏夫¹

Remineralization strategy for enamel subsurface lesions utilizing bleaching therapy

- Chemical alteration of human salivary proteins in subsurface enamel lesions -

Department of Oral Medicine, Division of Restorative Dentistry, Kanagawa Dental College¹

Department of Functional Biology Division of Biochemistry and Molecular Biology, Kanagawa Dental College²

○IIZUKA Junko¹, MUKAI Yoshiharu¹, TAKAGAKI Yuko², TERANAKA Toshio¹

【研究目的】 エナメル質表層下脱灰病巣を形成している表層にはサブミクロンレベルの孔や裂溝が存在し、病巣体部に侵入したタンパク質等の有機物が着色の原因となるのみならず再石灰化の進行を妨げている可能性が報告されている。我々はエナメル質表層下脱灰病巣に侵入している有機物を分解し効果的な再石灰化を誘導するための手段の一つとしてオフィスブリーチング剤の有効性を検討し、134回本学術大会において、安静時唾液から抽出した唾液タンパク質に対しHiLite処理を模した条件下で30%過酸化水素水を作用させると特定のタンパク質が断片化される一方で高分子量の新たな反応物が生成されることを報告した。しかしながら、表層下脱灰病巣部に侵入していると考えられる唾液タンパク質に対するブリーチング剤の作用は未だ不明である。そこで本研究では、ウシエナメル質に表層下脱灰病巣を作製し、安静時唾液中に浸漬することで唾液タンパク質を侵入させ、HiLite処理の有無による病巣侵入唾液タンパク質の変化を検討した。

【材料および方法】 ウシ下顎中切歯よりエナメル質片を切り出し、3×4mmの平坦な面を作製し、耐水研磨紙2,000番で研磨を行った。耐酸性パーニッシュにて試験面を2×3mmに規定し、エナメル質片を脱灰溶液(0.1M acetic-acid, 1.5mM CaCl₂, 0.9mM KH₂PO₄, pH 4.6)に37°Cで4日間浸漬し表層下脱灰病巣を作製し、以下に示す2群(n=12)に分けた。1) Lesion群: エナメル質片に表層下脱灰病巣を作製した後、氷冷下にて採取した自己安静時唾液(0.02% NaN₃添加)に37°Cで5日間浸漬した。また、1日1回新鮮な唾液と交換した。2) HiLite群: Lesion群と同様に病巣を作製後、安静時唾液中に浸漬した。その後、HiLiteを9回適応した。これらの処理後、試料表面に付着した唾液やHiLiteにより変性したタンパク質等を取り除くため氷冷リン酸ナトリウム緩衝液(20 mM PB, pH 6.8)にて洗浄した。洗浄後、0.15 M NaCl含有PBSおよび0.4 M PB (pH6.8)をそれぞれ試験面に5μlずつ2回滴下して病巣内のタンパク質を順次抽出した。以上の抽出操作後も残存したタンパクを得るため、1N HClを同様に滴下し回収した。これらの抽出液を透析、濃縮後、SDS sample bufferに溶解し、94°C、5分熱変性処理した。回収されたタンパク質はSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後、Gel Code Blue Stain (Thermo SCIENTIFIC社製)にて染色し、安静時唾液中のタンパク質と比較した。

【結果】 安静時唾液中に浸漬した表層下脱灰病巣から抽出した試料は、安静時唾液中のタンパク質のパターンと比較すると、低分子量のタンパク質に限られていた。またLesion群とHiLite群を比較すると、HiLite群ではタンパク質成分が大幅に消失・減少していることが確認された。

【考察】 安静時唾液中に浸漬した表層下脱灰病巣から抽出した試料と、安静時唾液中のタンパク質試料の電気泳動パターンを比較すると、類似性はあるものの、主として低分子画分が回収されたことから、表層下脱灰病巣内には選択的に唾液タンパク質が結合していると考えられた。また、Lesion群と比べ、HiLite群では大幅にタンパク質が消失・減少した(図1参照)ことから、表層下脱灰病巣内に侵入した唾液タンパク質はHiLite処理により変性・断片化されたと考えられた。

【結論】 表層下脱灰病巣には選択的に唾液タンパク質が結合し、オフィスブリーチング剤であるHiLiteを作用させると、特定のタンパク質が断片化されることが示された。

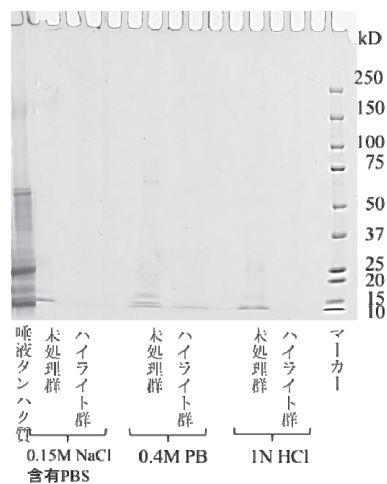


図1 唾液および表層下脱灰病巣内のタンパク質 SDS電気泳動像

ラット実験的根尖歯周炎における血管新生関連遺伝子の発現

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
○山中裕介, 金子友厚, 興地隆史

Angiogenic factor expression in rat experimental apical periodontitis

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
○YAMANAKA Yusuke, KANEKO Tomoatsu, OKIJI Takashi

【研究目的】

我々は、血管内皮細胞において血管新生関連遺伝子 CXCR2 mRNA および CXCL1 mRNA の発現が根尖性歯周炎の拡大期である露髄開放 14 日経過例において上昇し、慢性期である 28 日経過例において減少することを、第 134 回保存学会において報告し、血管内皮細胞における血管新生関連遺伝子発現の変化が根尖性歯周炎の成立に関与している可能性を示唆した。そこで、本研究では、病変が慢性期に入り安定化する露髄開放 56 日経過例まで検索期間を延長し、血管内皮細胞とその周辺組織における血管新生関連遺伝子の発現が病変の成立・慢性化に果たす役割を、免疫レーザーキャプチャーマイクロディセクション (immune-LCM) を用い分子生物学的に検索することを目的とした。

【材料および方法】

5 週齢雄性 Wistar 系ラットにセボフルレン麻酔後、8% 抱水クロラルの腹腔内投与 (350mg/kg) による全身麻酔を施した。次いで、電気エンジンに装着したラウンドバー (#1/2) にて下顎第一臼歯を露髄させたのち開放のまま放置し、14, 21, 28, 56 日経過後 (n = 各 4) の根尖歯周組織を検索対象とした。灌流固定後、被験歯を顎骨ごと摘出し、EDTA にて低温脱灰後、連続浮遊切片とした。CD31 (抗血管内皮細胞) 抗体を一次抗体として ABC 法により酵素抗体染色を施した。14, 21, 28, 56 日経過後において、CD31 陽性血管内皮細胞および CD31 陰性の血管内皮細胞周囲組織を、それぞれ LCM を用いて採取した。また、病変が完成し安定化している 56 日経過後においては、根尖膿瘍周囲と病変外周部の血管内皮細胞および血管内皮細胞周囲組織を、それぞれ別々に LCM を用いて採取した。採取したそれぞれの組織から total RNA 抽出後、real time PCR を用い Be1-2, CXCL1 及び CXCR2 mRNA に対する遺伝子発現の定量解析を行った。

【結果】

血管内皮細胞およびその周囲組織における Be1-2, CXCL1 及び CXCR2 mRNA 発現は、病変の拡大期である 14 日経過例で有意に高く、以後 56 日経過後まで減少傾向を示した。

56 日経過例において、病変外周部と根尖膿瘍周囲と分割して検索を行ったところ、病変外周部において太く長く発達した CD31 陽性の血管が光学顕微鏡下で観察された。根尖膿瘍周囲の血管内皮細胞における Be1-2, CXCL1 及び CXCR2 mRNA 発現は、病変外周部の血管内皮細胞と比較して有意に増加していた。また、根尖膿瘍周囲の周囲組織における Be1-2, CXCL1 及び CXCR2 mRNA 発現も、病変外周部の周囲組織と比較して有意に増加していた。

【考察】

血管内皮細胞およびその周囲組織における血管新生関連遺伝子 Be1-2, CXCL1 及び CXCR2 mRNA の発現増強が病変の拡大期である 14 日経過で認められ、以後 56 日経過例まで減少したことは、血管新生関連遺伝子が病変の形成に関与している可能性が示唆された。

56 日経過例において、根尖膿瘍周囲の血管内皮細胞および周囲組織で、血管新生関連遺伝子 Be1-2, CXCL1 及び CXCR2 mRNA の発現増強が認められたことから、根尖膿瘍周囲において、血管新生が旺盛であることが示唆された。一方、病変外周部において、太く長い成熟した血管が多く観察され、また血管新生関連遺伝子の発現も下方制御されていたことから、病変の慢性化に伴った遺伝子発現状況をよく反映していた。以上の結果より、病変の安定化した 56 日経過例においては、血管内皮細胞およびその周囲組織が、病変の部位により異なった発現を示し、血管新生を調節することで病態の安定化に関与していることが示唆された。

【結論】

血管内皮細胞とその周囲組織が、慢性根尖性歯周炎の成立過程および成立後の病変の部位 (根尖膿瘍周囲・病変外周部) により血管新生関連遺伝子の発現を変化させることで、慢性根尖性歯周炎病態の成立・安定化に関与している可能性が示唆された。

赤外線サーモグラフィを用いた歯根破折診断法の開発

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)¹,
大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部², 神戸大学大学院工学研究科機械工学専攻³,
滋賀県立大学工学部機械システム工学科⁴, 大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建講座 (歯科理工学教室)⁵
○松下真美¹, 三浦治郎², 竹重文雄², 岩見行晃¹, 阪上隆英³, 和泉遊以⁴, 林 美加子¹, 今里 聡⁵, 恵比須繁之¹
A study on diagnostic method of root fracture with infrared thermography
Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry¹,
Division for Interdisciplinary Dentistry, Osaka University Dental Hospital²,
Department of Mechanical Engineering, Kobe University Graduate School³,
Department of Mechanical Systems Engineering, The University Of Shiga Prefecture⁴,
Department of Biomaterials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry⁵
○MATSUSHITA Manami¹, MIURA Jiro², TAKESHIGE Fumio², IWAMI Yukiteru¹, SAKAGAMI Takahide³, IZUMI Yui⁴,
HAYASHI Mikako¹, IMAZATO Satoshi⁵, EBISU Shigeyuki¹

【研究目的】

歯根に生じる破折や微小な亀裂は歯科臨床において深刻な病態のひとつであるが、それらの診断法は確実性に乏しく、特に微小亀裂の正確な確定診断を下すには不十分である。本研究では、ヒト抜去歯を用いた歯根亀裂モデルを新たに作成し、超音波振動により亀裂部分に生じた摩擦熱を赤外線サーモグラフィで計測するVibroIR法 (Sakagami et al. JSME Vol. 46-1, 93-98, 2003) を用いた歯根亀裂診断法の開発を試みた。さらに歯根亀裂の検出条件を調べるために、試料の亀裂幅と検出時間の関係についての検討を行った。

【材料および方法】

1. 歯根亀裂モデルの作成

本研究の趣旨に同意した患者 (大阪大学 研究倫理審査委員会 承認番号 H22-E3) の抜去歯の根管拡大を行い、根管内にシリコン印象材を満ちし、エポキシレジンに包埋した。硬化後、印象材を除去し、実体顕微鏡で観察しながら、テーパー付き圧子で根管内に荷重負荷をかけて亀裂を発生させた。

2. 赤外線サーモグラフィ解析

歯科用超音波治療器に超音波チップ (直線型チップ) を取り付け、37°C の環境下で、亀裂から 0°、30°、45°、60°、90° 離れた部位 (超音波負荷部位) の根管壁に、出力 0.43W、0.63W、0.80W、0.89W、1.18W、1.48W の超音波振動を与えて亀裂面に生じた摩擦熱を、赤外線サーモグラフィにて記録した。結果をもとに、歯科用超音波治療器の最適出力および超音波チップ先端の位置における亀裂の検出時間を、一元配置分散分析と Scheffe 法 (危険率: 5%) を用いて検定した。

3. 赤外線サーモグラフィ解析に用いた試料の亀裂幅の測定

赤外線サーモグラフィ解析後の試料をエポキシレジンに包埋し、硬化後、マイクロカッターにて厚さ約 60 μm の切片を作成し、光学顕微鏡を用いて亀裂幅の測定を行った。

【結果】

1. 今回用いた亀裂作成法により、4~78 μm の亀裂幅を持つ歯根亀裂モデルを作成することができた。
2. 超音波負荷部位が 0°、30°、45°、60° のいずれにおいても、出力が増加すると検出時間が短くなる傾向があり、出力 0.80W 以下と 0.89W の間で検出時間に有意差が認められた。また、超音波負荷部位が 90° では亀裂の検出が不可能であった。
3. 亀裂幅 4~35.5 μm では赤外線サーモグラフィ解析による亀裂の検出が可能であった。

【考察および結論】

VibroIR 法を用いた方法で亀裂を検出する際の条件設定として、歯科用超音波治療器の出力 0.89W、超音波負荷部位の角度間隔は 45° 以下 (根管周囲を 90° ごとに 4 回計測) が適切であることが明らかになった。本研究の結果から、今までマイクロスコープやデンタル X 線写真では検出が困難である亀裂幅 35.5 μm 以下の歯根亀裂の検出に対し、VibroIR 法を用いた歯根亀裂診断は、有効であることが示唆された。

***Porphyromonas gingivalis* 感染マウスモデルにおける炎症応答への NKT 細胞の関与**

新潟大学 超域学術院¹, 新潟大学 大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野²,
新潟大学 大学院医歯学総合研究科 口腔保健学分野³, 新潟大学 医歯学総合病院 歯科総合診療部⁴,
The University of California, San Diego⁵
○青木由香莉^{1,2,3}, 中島貴子^{1,4}, 宮下博考^{1,2,3}, 宮内小百合^{1,2,3}, 宮沢春菜^{1,2,3}, 高橋直紀⁵, 前川知樹^{1,2},
多部田康一¹, 山崎和久^{1,3}

The effect of NKT cells in the inflammatory response in *P. gingivalis*-infected Mice

Center for Transdisciplinary Research, Niigata University¹, Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences², Division of Oral Science for Health Promotion, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences³, General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital⁴,
The University of California, San Diego⁵

○AOKI Yukari^{1,2,3}, NAKAJIMA Takako^{1,4}, MIYASHITA Hirotaka^{1,2,3}, MIYAUCHI Sayuri^{1,2,3}, MIYAZAWA Haruna^{1,2,3}, TAKAHASHI Naoki⁵, MAEKAWA Tomoki^{1,2}, TABETA Koichi¹, YAMAZAKI Kazuhisa^{1,3}

【目的】 Natural-killer T (NKT)細胞は、CD1d 分子に結合した糖脂質リガンドを認識するユニークなリンパ球であり、活性化に伴って多くのサイトカインを短時間で大量に産生する。Th1 タイプのサイトカインである IFN- γ と Th2 タイプのサイトカインである IL-4 の両方を産生することから、その免疫調節機能が注目されている。我々はこれまでに、ヒト歯周炎組織において NKT 細胞の浸潤が増加していることを報告している。しかしながら、歯周炎病因論における NKT 細胞の役割は明らかではない。そこで、今回我々は、*Porphyromonas gingivalis* を経口感染させたマウスモデルにおける NKT 細胞の役割について検討することとした。

【材料と方法】 6 週齢の C57BL/6 マウスに 3 日ごとに計 10 回、*P. gingivalis* W83 株を経口感染させた。同時に、NKT 細胞欠損モデルとして CD1d^{-/-}マウス、および NKT 細胞活性化モデルとして α -Galactosylceramide (α -GC)を週に 1 回計 5 回、腹腔投与した群も同様に経口感染させ、各種解析を行った。歯周炎の指標としての歯槽骨の吸収量は、実体顕微鏡による第一臼歯舌側の歯根面積をもって表した。血清中 SAA レベルは ELISA 法にて測定した。超音波破砕抗原を用いて、抗 *P. gingivalis* W83 抗体価 (IgM, IgG whole, IgG1, IgG2a, IgG2b)を ELISA 法にて測定した。さらに、感染終了後のマウスの脾細胞数を測定後、*P. gingivalis* W83 超音波破砕抗原にて再刺激し、培養 6 日後の上清中のサイトカイン産生量を ELISA 法にて測定した。

【結果と考察】 *P. gingivalis* 感染による歯槽骨吸収は、NKT 細胞の活性化により促進され、NKT 細胞が欠損すると歯槽骨吸収が起こらないことが示された。すなわち、NKT 細胞が *P. gingivalis* 特異的な歯槽骨の吸収に促進的に作用することが示唆された。全身の炎症性マーカーである、血清中の SAA レベルは、コントロール群において感染による上昇が認められたが、NKT 細胞活性化マウスではさらなる上昇がみられ、それに対し NKT 欠損マウスでは感染による上昇が認められなかった。口腔内からの *P. gingivalis* 感染が局所だけでなく、全身の炎症性マーカーに影響を及ぼすことが示され、さらに NKT 細胞によって炎症が促進されている可能性が示唆された。血清中の IgM および IgG 抗体価レベルもまた感染による上昇がみられたが、NKT 細胞の活性化によりさらなる上昇が認められた。IgG サブクラス別に測定した結果、Th2 に関連して産生される IgG1 の産生が NKT 細胞の活性化の影響を受けていることが示された。また、すべてのサブクラスにおいて NKT 細胞の欠損マウスでは感染による抗体価の上昇が抑制されていた。すなわち、B 細胞による抗体産生にも NKT 細胞が大きく影響していることが示された。次に、感染後のマウスの脾臓から得られた細胞数を測定したところ、NKT 細胞活性化群において脾細胞数の増加が認められた。さらに、これらの脾細胞を、超音波破砕した *P. gingivalis* 抗原にて再刺激し、上清中のサイトカインレベルを測定したところ、コントロール群において、感染により IFN- γ 産生が優位に上昇し、NKT 細胞欠損群においては感染による上昇が認められなかった。しかし予想に反して、NKT 細胞活性化群においても IFN- γ レベルは低下していた。これに対し、IL-4, IL-6, IL-10 産生は、NKT 細胞活性化群における感染で産生量が有意に上昇した。 α -GC 投与による NKT 細胞の活性化が、サイトカインバランスを Th2 優位に調整し、その結果抗体産生が上昇したと考えられる。

【結論】 マウスにおいて *P. gingivalis* 感染は NKT 細胞のサイトカイン産生プロファイルを modulate し、局所においては歯槽骨吸収を促進するとともに、全身的には炎症状態を亢進させることが明らかになった。

Fusobacterium nucleatum が早産に関与するメカニズム

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野

○立石ふみ, 中村 梢, 中村利明, 野口和行

The possible mechanism by which *Fusobacterium nucleatum* is involved in preterm birth.

Department of Periodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○TATEISHI Fumi, HASEGAWA-NAKAMURA Kozue, NAKAMURA Toshiaki, NOGUCHI Kazuyuki

【目的】歯周病と早産・低体重時出産との関連についてこれまで多くの報告があるが、歯周病が早産・低体重児出産に関与するメカニズムは未だ解明されていない。そこで本研究は、歯周病が出産に及ぼす影響のメカニズムを解明するために、正常出産妊婦及びハイリスク妊婦における歯周組織の状態と、出産時に得られた子宮内組織での歯周病原細菌の存在の有無を調べた。さらに、培養ヒト絨毛膜由来細胞を用いて、歯周病原細菌である *Fusobacterium nucleatum*(Fn)刺激による分娩関連サイトカインである IL-6 の産生と、出産開始時期の決定に関与するホルモンである corticotrophin-releasing hormone(CRH)の産生への影響を検討した。

【材料および方法】1. 被験者は正常出産妊婦 15 名、及び早産のリスクの高い(ハイリスク)妊婦 24 名とした。インフォームドコンセント取得後、出産前に歯周組織検査及び口腔内サンプル(唾液及び歯肉縁下プラーク)を採取し、出産時に子宮内組織(卵膜)を採取した。採取したサンプルから DNA を抽出し、Fn の検出を PCR 法を用いて行った。2. 卵膜より分離培養した絨毛膜由来細胞を、polymyxinB 存在下または非存在下で heat-killed Fn を用いて刺激した。その後、TLR-2 及び TLR-4 の遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて解析し、培養上清中の IL-6 量を ELISA 法にて定量した。3. 絨毛膜由来細胞または、siRNA により toll-like receptor(TLR)-2 または TLR-4 の遺伝子発現を抑制した絨毛膜由来細胞を、Fn LPS で刺激し、TLR-2 及び TLR-4 の遺伝子発現、培養上清中の IL-6 及び CRH 量を定量した。(本研究は鹿児島大学医学部・歯学部付属病院及び鹿児島市立病院倫理委員会において承認された)

【結果】1. ハイリスク妊婦は正常出産妊婦と比べて有意に plaque index が高く、歯周パラメータ(probing pocket depth, clinical attachment level, bleeding on probing)も有意に悪化していた。2. 24 名のハイリスク妊婦のうち、全ての妊婦の口腔内サンプルと 7 名の妊婦の卵膜サンプルより Fn が検出された。正常出産妊婦 15 名のうち 12 名の口腔内サンプルから Fn が検出されたものの卵膜サンプルからは検出されなかった。3. 絨毛膜由来細胞を heat-killed Fn で刺激すると、培養上清中の IL-6 レベルが有意に亢進したが、polymyxinB を加えるとその IL-6 レベルは有意に減少した。4. 絨毛膜由来細胞を Fn LPS で刺激すると培養上清中の IL-6 及び CRH レベルと、TLR-2 の遺伝子発現が有意に上昇した。5. Fn LPS 刺激により上昇した IL-6 及び CRH レベルは、TLR-2 及び TLR-4 遺伝子発現を抑制することで有意に減少したが、TLR-2 遺伝子抑制下と比較して TLR-4 遺伝子抑制下で有意に産生が抑制された。

【考察および結論】本研究により、ハイリスク妊婦は正常出産妊婦と比べて歯周組織の状態が悪化しており、約 29% のハイリスク妊婦の卵膜組織で Fn が検出されることが明らかになった。絨毛膜由来細胞において heat-killed Fn は IL-6 の産生と、TLR-2 の発現を上昇させるが、その反応は polymyxinB で抑制されることから、Fn の作用は主に LPS によるものであることが示された。Fn LPS は IL-6 及び CRH の産生を誘導し、その経路は TLR-2 及び TLR-4 を介していることが示された。これらのことから、子宮内組織に定着した Fn の構成成分である LPS が、TLR-2 及び TLR-4 を介して分娩の開始に関わるサイトカインやホルモンの発現上昇を促すことにより、妊娠維持機構に影響を及ぼし、出産に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究協力者：大貝悠一、小松澤均(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 口腔微生物学分野)

川俣和弥、堂地勉(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 生殖病態生理学分野)

波多江正紀(鹿児島市立病院 産婦人科)

抗 Dkk1 抗体の Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介した 骨形成促進メカニズムの解析

九州大学大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野

○小林茉莉, 松崎英津子, 濱地貴文, 平塚俊志, 前田勝正

Anti-Dkk1 antibody induces bone formation through the Wnt/ β -catenin signaling pathway

Periodontology Section, Division of Oral Rehabilitation,
Faculty of Dental Sciences, Kyushu University

○KOBAYASHI Mari, MATSUZAKI Etsuko, HAMACHI Takafumi, HIRATSUKA Shunji, MAEDA Katsumasa

【研究目的】

Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路は、骨芽細胞の分化に重要な役割を果たしている。Dickkopf1 (Dkk1) は、骨組織に多く発現するこのシグナルのアンタゴニストで、共働受容体 low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) 5/6 のリガンドとして機能することにより Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を阻害することが知られている。近年、溶骨性の病変を示す多発性骨髄腫において、Dkk1 は骨髄腫細胞によって過剰に産生され、Dkk1 の中和抗体である抗 Dkk1 抗体が骨破壊を抑制することが示されている。しかしながら、正常な骨組織において、抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞分化に及ぼす影響ならびに抗 Dkk1 抗体が骨再生に及ぼす影響については、未だ明らかとなっていない。我々はこれまでに、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の転写因子である TCF の結合部位を含むヒトアルカリフォスファターゼ (ALP) プロモーター領域 (-1059/+249bp) を組み込んだベクターを作製し、ALP が Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子であることを報告している。そこで今回、抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞分化に及ぼす影響について、特に ALP プロモーター活性に着目して詳細に検討を行った。また、ラット脛骨骨欠損部において、抗 Dkk1 抗体が骨再生に及ぼす影響についても検討した。

【材料および方法】

実験には MC3T3-E1 (マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株) 細胞を使用した。まず、抗 Dkk1 抗体の骨芽細胞分化への影響を検討するため、ALP 活性を測定した。次に、抗 Dkk1 抗体の骨芽細胞分化マーカー (ALP、オステオカルシン) の発現に及ぼす影響について検討した。mRNA 発現はノーザンブロット法および定量的 RT-PCR 法、タンパク質発現はウエスタンブロット法を用いて解析した。抗 Dkk1 抗体が骨芽細胞の石灰化に及ぼす影響について、von Kossa 染色を用いて検討した。また、抗 Dkk1 抗体が、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路に及ぼす影響を、 β -カテニンのタンパク質発現、TCF/LEF 転写活性について検討した。さらに、抗 Dkk1 抗体が TCF 結合部位を含むヒト ALP プロモーター活性に及ぼす影響を、ルシフェラーゼアッセイを用いて解析した。Dkk1 の siRNA 導入により、Dkk1 の発現を抑制した細胞への抗 Dkk1 抗体の効果も検討した。また、*in vivo* における抗 Dkk1 抗体の骨再生への効果を検討するために、ラット脛骨に作製した骨欠損部に、抗 Dkk1 抗体を添加して、 μ CT を用いた新生骨の解析を行った。

【結果および考察】

1. MC3T3-E1 細胞において、抗 Dkk1 抗体は、①ALP 活性、②ALP、オステオカルシンの mRNA・タンパク質の発現、③石灰化結節の形成、を増加させ、骨芽細胞分化ならびに石灰化を促進することが示唆された。また、その効果は Wnt-3a と同程度であった。
2. 抗 Dkk1 抗体は、 β -カテニンのタンパク質発現および TCF/LEF の転写活性を増加させ、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して骨芽細胞の分化を促進することが明らかとなった。
3. 抗 Dkk1 抗体は、TCF 結合部位を含む ALP プロモーター領域を組み込んだレポーターベクターの転写活性を増加させたことから、抗 Dkk1 抗体による ALP 発現の増加は、TCF/LEF 結合部位を介していることが示唆された。
4. Dkk1 の siRNA の導入により、Dkk1 をノックダウンしたところ、Wnt-3a 添加による ALP プロモーター活性の増加は影響を受けなかったが、抗 Dkk1 抗体添加によるプロモーター活性の増加は抑制された。
5. ラット脛骨に作製した骨欠損部に対して、抗 Dkk1 抗体を局所投与すると、コントロールと比較して、新生骨の添加が多く認められ、骨形成を促進することが明らかとなった。

本研究の一部は、科学研究費補助金 (20791616) を用いて、実施された。

齲蝕原因菌に対するコエンザイム Q10 の抗菌効果

日本大学松戸歯学部 保存修復学講座¹, 日本大学松戸歯学部 公衆予防歯科学講座²
○鈴木英明¹, 有川量崇², 鈴木義純¹, 三田 肇¹, 熱田 互¹, 並木泰次¹, 岡田珠美¹, 池見宅司¹

Antibacterial effects of Coenzyme Q10 against cariogenic bacteria

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo¹,
Department of Preventive and Public Oral Health, Nihon University School of Dentistry at Matsudo²
○SUZUKI Hideaki¹, ARIKAWA Kazumune², SUZUKI Yoshizumi¹, MITA Hajime¹,
ATSUTA Wataru¹, NAMIKI Yasuji¹, OKADA Tamami¹, IKEMI Takuji¹

【研究目的】

Coenzyme Q10 (以下、CoQ10) は体内の ATP 産生の過程で要となる働きを果たすことや、活性酸素やフリーラジカルから防御する抗酸化物質であることが明らかになっている。また、CoQ10 の摂取により AIDS 患者の IgG が増加し、癌患者においては副作用が生じることなく延命効果が得られたこと、乳癌の消失に有効であったこと、初期のパーキンソン病に改善効果があったことなどが報告されている。

口腔疾患に関しては、CoQ10 の摂取量が歯周疾患の罹患率に影響があることが報告されており、また我々の研究ではシェーグレン症候群などドライマウス患者が CoQ10 によって改善することも明らかになっている。

今回我々は、医療分野で頻用されている CoQ10 に着目した。CoQ10 に関する歯科治療に関する研究は数多くなされているにもかかわらず、齲蝕予防に関する研究はほとんど行われていない。そこで、本研究は、CoQ10 を用い、齲蝕抑制効果の有無を *in vitro* において検討した。

【材料および方法】

1) 供試菌株および試薬

日本大学松戸歯学部口腔微生物学講座から供与された *Streptococcus mutans* PS-14 株 (以下 *S. mutans*)、*Streptococcus sobrinus* 6715 株 (以下 *S. sobrinus*)、*Actinomyces viscosus* ATCC19246 株 (以下 *A. viscosus*) を本実験に使用した。CoQ10 は Bio Q10 (三菱ガス化学社製) を使用した。

2) 最小発育阻止濃度の計測

使用培地は BHI 培地 (Difco 社製) を用い、2 倍段階法にて最小発育阻止濃度の計測を行った。各菌体を 37°C、24 時間培養後、 1×10^7 cells/ml に調整して接種し、48 時間培養後に発育の有無を判定した。

【成績】

CoQ10 を用いた最小発育阻止濃度の結果は、*S. mutans*、*S. sobrinus* に対して 500 µg/ml、*A. viscosus* に対しては 250 µg/ml であった。菌種間において若干の差はあるものの、これらの菌に対して抗菌力を有することが認められた。

【考察および結論】

本実験の結果、CoQ10 は *S. mutans*、*S. sobrinus*、*A. viscosus* 全てに対して抗菌作用を有することが確認され、齲蝕抑制物質として有用であることが示唆された。

Er:YAG レーザー照射が象牙質ゼラチナーゼ活性に及ぼす影響

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体機能再生・再建学講座 歯科保存修復学分野¹
愛知学院大学歯学部 保存修復学講座²

○西谷佳浩¹, 星加知宏¹, 山田三良², 富士谷盛興², 千田 彰², 吉山昌宏¹

Effects of Er:YAG laser irradiation for activation of dentin gelatinase

Department of Operative Dentistry, Field of Study of Biofunctional Recovery and Reconstruction, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences¹

Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Aichi Gakuin University²

○NISHITANI Yoshihiro¹, HOSHIKA Tomohiro¹, YAMADA Mitsuyoshi², FUJITANI Morioki², SENDA Akira², YOSHIYAMA Masahiro¹

【研究目的】

近年, Minimal intervention の概念に基づいたレーザー歯科治療の新たな試みが着目されている. 歯科用レーザーの中でも歯の硬組織が切削可能な Er:YAG レーザーは, 歯科治療において応用範囲が広くう蝕治療にも広く応用されている. 演者らは, コンポジットレジン修復の際に行うセルフエッチングプライマー処理直後においては, 被着面の象牙質コラーゲン分解酵素活性が増加することを報告した¹⁾. しかしながら, レーザー照射後の象牙質内因性ゼラチナーゼ活性については不明な点が多い. 本研究では, Er:YAG レーザーの照射が象牙質ゼラチナーゼ活性に及ぼす影響について検討を行った.

【材料および方法】

新鮮抜去ヒト大白歯からエナメル質, セメント質, 軟組織を取り除いた歯根象牙質を液体窒素で凍結後に粉碎して得られる象牙質粉末(直径 150~300 μ m)を象牙質試料とした. Er:YAG レーザーはアーウィン アドベール(モリタ)を使用した. エネルギー密度を一定(24 mJ/cm²)として, 異なる照射時間(0~40 秒間)で注水を行わず, レーザー照射した象牙質粉末をよく攪拌した後, 96 穴マイクロプレート中に 10 mg 採取した. これらの試料をゼラチン(Enzchek Gelatinase/Collagenase Assay Kit, Molecular Probes, Eugene, USA)と 24 時間反応させた後に, ゼラチン分解量を蛍光マイクロプレートリーダー(Gemini XPS, Molecular Devices)で測定した.

【成績】

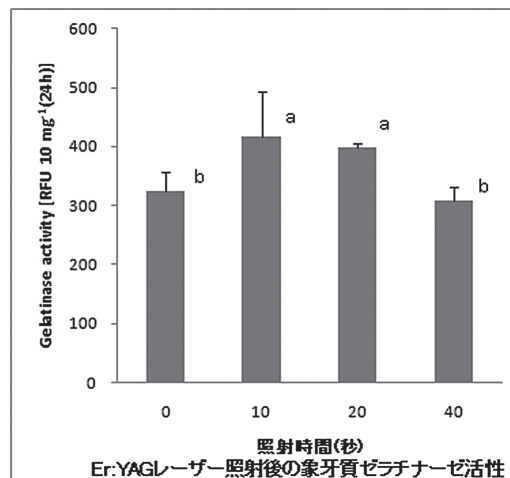
各照射条件下でのゼラチナーゼ活性値を図に示す. コントロール(照射時間 0 秒)の活性値 323.6[RFU 10mg-1(24h)]に対して, 10 秒間および 20 秒間照射した場合にゼラチナーゼ活性は有意に高かった. 40 秒間照射した場合には有意な差がなかった.

【考察および結論】

レーザー照射により象牙質表層部が蒸散されることによって, コラーゲン中に存在するゼラチナーゼがより多く露出することから, コントロールに比べて高いゼラチナーゼ活性を示したと考えられる. しかしながら, 照射時間の延長により, 露出したゼラチナーゼが熱変性することから, 40 秒間照射した場合には活性値に差が無かったと考えられる. Er:YAG レーザー照射後の象牙質コラーゲン分解酵素活性は照射の影響を受け, さらにそれは照射時間により異なることが判明した.

【参考文献】

1) Nishitani Y, Yoshiyama M, Wadgaonkar B, Breschi L, Mannello F, Mazzoni A, Carvalho RM, Tjäderhane L, Tay FR, Pashley DH: Activation of gelatinolytic/collagenolytic activity in dentin by self-etching adhesives; Eur J Oral Sci. 114, 160-166, 2006.



本研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費基盤研究(A)課題番号 21249091 にて遂行された.

歯科用可視光線照射器による光照射の血管平滑筋に対する影響

神奈川歯科大学学生体管理医学講座薬理学分野¹
神奈川歯科大学口腔治療学講座歯内療法学分野²
○吉野文彦¹, 吉田彩佳¹, 西村知子², 石井信之², 李 昌一¹

Effect of irradiation using the dental curing light on vascular smooth muscle

Division of Pharmacology, Department of Clinical Care Medicine, Kanagawa Dental College¹
Division of Endodontics, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College²
○YOSHINO Fumihiko¹, YOSHIDA Ayaka¹, NISHIMURA Tomoko², TANI-ISHII Nobuyuki², LEE Masaichi¹

【研究目的】現在、歯科医院のチェアサイドにおいてコンポジットレジン (CR) 修復や歯の漂白処置に歯科用可視光線照射器による光照射が広く行われている。とくに近年、CR 修復のために開発された歯科用可視光線照射器は、オフィスブリーチングにも応用されるようになり、従来の CR 修復に用いられる照射時間と比較し長時間照射されるようになってきた。そして、光照射の際には目に対する悪影響 (黄斑変性症等) を回避する目的で、フィルターで目の保護を行っているにも関わらず、口腔、とくに微小循環を有する歯髄に与える光の影響についての検証はこれまでほとんど行われてない。したがって、我々は今回摘出血管を用い歯科用可視光線照射器による光照射の影響を評価したので報告する。

【方法】Wistar rat (♂, 8 週令) をペントバルビタール麻酔下にて大動脈を摘出後、らせん状標本を作製し、スーパーフュージョンバス内に懸垂し、95% 酸素・5% 二酸化炭素ガスを通気した Krebs-Ringer 溶液を表面還流し、歯科用可視光線照射器により光照射を行い、血管張力変化を測定した。また、この張力変化に対する活性酸素種 (ROS) の影響を各種抗酸化剤 (superoxide dismutase; SOD, dimethyl sulfoxide; DMSO, L-histidine) および α 受容体拮抗薬 (Phentolamine) を用いて検討を行った。

【成績】歯科用可視光線照射器による光照射群はコントロール群 (非照射群) と比較し、有意な血管張力の増大を認めた。そして、この張力変化は、Phentolamine, および各種抗酸化剤である SOD, DMSO, L-histidine 添加において抑制された。

【考察】ノルアドレナリン (NA) 受容体拮抗薬である Phentolamine によって光照射による血管収縮が抑制されたことより、シナプス終末より遊離される NA が α 受容体を介し血管収縮を誘導した可能性が示唆された。さらに、光照射により生成されることが考えられるスーパーオキシドや一重項酸素などの ROS の関与を検討するため、各種抗酸化剤を用いた結果、用いたすべての抗酸化剤は血管収縮を抑制した。これら以上の結果より、光照射による血管平滑筋の収縮は、血管神経終末において生成された ROS が NA 遊離を誘導し、放出された NA が血管平滑筋収縮に関与する可能性が示唆された。

【結論】歯科用可視光線照射器による光照射は、歯髄血管内で ROS を生成し、血管平滑筋を収縮させるため、長時間または複数回の光照射は歯髄血管収縮を介した歯髄虚血—再灌流を誘導する可能性があり、また ROS は生体のエイジングを加速させるため、光照射を用いる処置前に抗酸化剤を投与することでこれらの影響を回避できる可能性が示唆される。

VSCによる金銀パラジウム合金の変色防止について

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯冠修復学分野¹, 歯科理工学分野²
○藤井和夫¹, 玄 太裕¹, 野田陽子¹, 土井 豊², 堀田正人¹

Prevention of discoloration with VSC in Au-Ag-Pd alloy

Department of Operative Dentistry¹, Dental Materials²,
Division of Oral Functional Science and Rehabilitation,
Asahi University School of Dentistry

○FUJII Kazuo¹, GEN Taiyuu¹, NODA Yoko¹, DOI Yutaka², HOTTA Masato¹

【緒言】

口腔内揮発性硫化物 (VSC) が金銀パラジウム合金の変色に関連しているという報告がある。一方で「ゼオライト A」, 「ハイドロタルサイト」が VSC の吸着除去の素材として検討されている。そこで, メチルメルカプタン (CH₃SH) および硫化水素 (H₂S) を多量に産生する微生物である偏性嫌気性菌 3 種を用い, 金銀パラジウム合金の変色に与える影響と, VSC の吸着除去素材がその変色を減少させられるかどうか検討した。

【材料および方法】

1. 試料の作製

試料は 1.0×1.5 cm の金銀パラジウム合金 (トクリキキンパラエース 12S) を 700°C にて熱処理し, 自動研磨機にて研磨後, ルージュにて艶出しを行った。さらに超音波洗浄器を用い, 蒸留水にて 3 分間ずつ 2 回洗浄を行った。

2. 培養条件

今回使用した偏性嫌気性菌は, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (Pg), *Prevotella intermedia* ATCC 25611 (Pi), *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 (Fn) である。

BHI 培地を用い, 48 時間培養した各菌液 2 ml と含硫アミノ酸 (L-Cysteine) を加えた 12 well 培養用マルチウェルプレート (2.5×2.5 cm) に試料と, それぞれ「吸着素材なし」と, 「ゼオライト A」, 「ハイドロタルサイト」を加え 37°C, 7 日間嫌気培養を行った。培養後消毒用エタノール液に 5 分間浸漬し, 滅菌蒸留水にて 2 回洗浄した後, 新たに BHI 培地に入れ, 同様に嫌気培養を行った。この操作を 4 回繰り返す (4 週間), 測定試料とした。測定試料は, 条件ごとに 5 つずつ作製した。また, コントロールは同様の条件で菌を加えないものとした。

3. 変色の測定および分析方法

各試料は培養の前後に光沢度および色彩の測定を行った。光沢度は光沢度計 (光沢計 VG7000、日本電色工業) を用い, 60° 鏡面光沢度で測定した。色彩は色彩計 (高速分光光度計 CMS-35FS、村上色彩技術研究所) を用い, L*, a*, b* 表色系にて数値化し, 培養前後の各試料間の色差 ΔE*ab を求めた。

【結果および考察】

1. 光沢度は各菌液とも培養前後で有意に低下したが, 吸着素材の有無で有意差は認められなかった。
2. 色彩変化は各菌液とも培養前後で色差値 3.5~6.8 (平均) を示し, 変色していた。また, Pg 菌のみ「吸着素材なし」の色差が 6.3 (平均), 「ゼオライト A」が 3.5 (平均), 「ハイドロタルサイト」が 4.1 (平均) と吸着素材を混入したものの色差が小さかった。しかし, Pi 菌, Fn 菌では大きな差はなかった。

今後は, 今回使用した菌から発生する VSC の量を数値化し, 修復材料の変色にどのように関わっているのか検討していきたいと考えている。

共同研究者 (日本歯科保存学会会員以外)

横川善之 (大阪市立大学大学院工学研究科)

村上幸孝, 長谷川義明 (朝日大学歯学部口腔微生物学分野)

超音波透過法を用いたセルフアドヒーズセメントの初期硬化挙動測定

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, 松崎デンタルオフィス³
○石山智恵美¹, 瀧本正行¹, 田久保周子¹, 利根川雅佳¹,
渡邊孝行¹, 黒川弘康^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 松崎辰男³

Determination of Setting Behavior of Self-Adhesive Cements by use of an Ultrasonic Device
Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry, Matsuzaki Dental Office³
○ISHIYAMA Chiemi¹, TAKIMOTO Masayuki¹, TAKUBO Chikako¹, TONEGAWA Motoka¹,
WATANABE Takayuki¹, KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, MATSUZAKI Tatsuo³

【緒言】

欠損部が比較的大きい症例に対する審美性歯冠修復処置として、間接法を用いた処置が増加している。これらの審美性修復物の装着には、機械的強度および接着性の観点からレジンセメントが多く用いられてきた。一方、レジンセメントは、とくに余剰セメントの除去に関する困難性が指摘されており、装着材としての機械的性質を維持しながら、容易な除去性を有する特性の具備が望まれている。一方、臨床操作ステップの簡略化を目指して開発されたセルフアドヒーズセメントは、歯質とともに修復物への前処理を不要としたセメントである。しかし、このセメントに関しては、装着後の除去性に関する臨床的要求を満たしているかについての検討はなされていない。

そこで演者らは、非破壊試験である超音波測定装置を用いて、光線照射条件の違いがセルフアドヒーズセメントの初期硬化挙動に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

セルフアドヒーズセメントとして、クリアフィル SA セメントオートミックス (クラレメディカル), G-ルーティング (ジーシー), マックスセム (sds Kerr) およびユニセム 2 オートミックス (3M ESPE) の、合計 4 製品を用いた。

超音波伝播時間の測定には、超音波送受信装置であるパルサーレーザー (Model 5900, Panametrics), 探触子として縦波用トランスデューサー (V112, Panametrics) およびオシロスコープ (Wave Runner LT584, Lecroy) を使用した。各製造者指示に従って練和したセメント泥を、試料台に静置した内径 5 mm, 高さ 2 mm の透明型に填入し、ラッピングフィルムを介してトランスデューサーを接触させ、超音波の伝播時間を経時的に測定し、測定された試片の厚さから超音波の縦波音速を算出した。

セメントの初期硬化挙動の測定は、照射を行わない、あるいは 600 mW/cm² および 200 mW/cm² の条件で 30 秒間照射を行う 3 条件で行った。照射を行わない条件では、練和開始から 3 分まで 10 秒毎に、その後 15 分まで 30 秒毎に測定した。照射を行う条件では、照射中は 5 秒毎に、照射終了後 15 分まで 10 秒毎に測定した。また、1 および 24 時間経過した試片についても測定を行った。なお、超音波伝播時間の測定は 23 ± 1°C, 相対湿度 50 ± 5% の恒温恒湿室で赤色ランプ照明下に行うとともに、試片の数は各条件につき 3 個とした。

【成績および考察】

いずれのセメントにおいても、硬化が進行するに伴って音速の伝播速度は高くなるものの、その傾向は照射条件で異なるものであった。とくに、照射を行わない条件では音速の変化は練和開始 3 分後までは緩徐であった。一方、照射を行なった条件では、光強度の違いにより硬化挙動に違いが認められるものの、照射を行わない条件と比較して照射開始から短時間で音速が上昇し、照射終了後も継続する傾向を示した。また、その上昇傾向は光線照射によって音速が急激に速くなるもの、あるいは比較的緩徐に進行するものなど、製品によって異なるものであった。これは、各セメントの組成や重合開始剤の特性が異なることによるものと考えられた。

【結論】

セルフアドヒーズセメントの初期硬化反応の進行には、光線照射条件が影響するとともに、その傾向はセメントの種類によって異なることが判明した。したがって、セメントの硬化特性を把握するとともに、デュアルキュアタイプのセメントであっても光線照射を行うことが、初期硬化反応をスムーズに進行させるためには重要であることが示された。

新規充填用セルフアドヒーズレジンモディファイドグラスアイオノマーセメントの吸水膨張について

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室

○橋本直樹, 小松久憲, 大木彩子, 福山麻衣, 川野晋平, 松田康裕, 付 佳楽, 佐野英彦

Hydroscopic expansion of newly developed self adhesive resin-modified glass ionomer cement

Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

○HASHIMOTO Naoki, KOMATSU Hisanori, OKI Saiko, FUKUYAMA Mai, KAWANO Shinpei, MATSUDA Yasuhiro, FU Jiale, SANO Hidehiko

【緒言】 グラスアイオノマーセメントはフッ素徐放性, 歯質接着性, 抗菌性などの大きな利点があるが, 硬化初期の感水性, 機械的強度の不足などの問題があった. その後ハイドロキシエチルメタクリレート (HEMA) などのレジン成分を添加したレジンモディファイドグラスアイオノマーセメントが開発され, この欠点であった初期感水性, 機械的強度や操作性などの諸性質が向上したが, HEMA などのレジン成分の吸水性が問題となり吸水膨張が大きくなることが報告されている. そこで本研究では HEMA フリー組成となっている新規充填用セルフアドヒーズレジンモディファイドグラスアイオノマーセメント (SI-R21001, 松風) の吸水膨張について従来型のレジンモディファイドグラスアイオノマーセメントと比較し評価した.

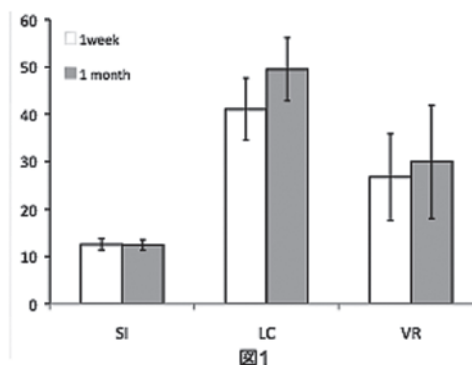
【材料と方法】 使用材料を表 1 に示す. 対照として従来型である Fuji 2 LC Improved (LC), Vitremer R (VR) の 2 種類のセメントを選択した. 吸水膨張を評価するためにセメントをテフロン性窩洞 (内径 5mm, 深さ 4mm) に充填, 硬化, 研磨した後, 表面の断面曲線を水中浸漬前後に計測し, その差を求めることで評価した. 手順を以下に記す. 窩洞内にセメントを深さ 2mm まで填入し, 光照射器 (JETLITE 1000, モリタ社製) を用いて 20 秒間照射を行い, さらにセメントを填入, ガラスプレートをを用い圧接後, ガラスプレートの上より 40 秒間照射を行った. ガラスプレートを除去した後, 試料を相対湿度 100%中に保存し, セメント練和開始 1 時間後に注水下で #600 耐水研磨紙を用いてテフロン表面と同一平面になるよう表面を調整した. 表面荒さ形状測定機 (サーフコム 130A, 東京精密社) を用いて試料体表面の断面曲線の測定を行いベースラインとした. 測定した試料を 37°Cの脱イオン水中に 7 日間浸漬させた後, 水中より取り出し再度表面の断面曲線の測定を行い再び 37°C脱イオン水に保存, 30 日経過後にも表面の断面曲線の計測を行った. 膨張量は 7 日間あるいは 30 日間水中浸漬後とベースラインとの差 (μm) を得られたチャート紙より算出した. 一元配置分散分析, Tukey 多重比較 ($P < 0.05$) にて統計分析を行い評価した. なお, 試料は各セメントについて 7 個とした.

【結果】 結果を図 1 に示す. 水中浸漬 7 日で全セメントに吸水膨張を認め, 30 日間では LC, VR で膨張量の増加を示したが有意差はなかった. 材料間の比較では両期間共に膨張量に有意差があり, SI が最も低い値となった.

【考察】 今回の研究での吸水膨張量の計測は表面の断面曲線を計測, 比較したが, 従来の重量を計測することによる吸水試験よりもより臨床的であると考えられる. HEMA フリー組成となっている SI で低い膨張量となったことは親水性モノマーである HEMA の含有がないことが一因として考えられる. 臨床的に吸水膨張量が低いことは, 体積膨張による前歯舌面, 臼歯咬合面での干渉や隣接部における鼓形空隙の形態変化によるブラークの堆積などが起こりにくくなることが考えられ, 充填材料としての有用性が高くなっていることが示唆される.

表 1

材料	製造者	略号	粉液比 (P/L)(g/g)	ロット番号
SI-R21001	松風	SI	4.5/1.0	P: 101221D-P L: 101221D-L1
Fuji 2 LC Improved	GC	LC	3.2/1.0	P: 1011291 L: 1012161
Vitremer R	3M	VR	2.5/1.0	P: N201859 L: N190949



ボンドフィル SB の乳歯に対する微小引張接着強さ

サンメディカル株式会社 研究開発部¹

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻 展開医療科学講座 小児歯科学²

○横山武志¹, 抜井康浩¹, 荒田正三¹, 細矢由美子²

Micro-tensile bond strength of BondfillSB to sound primary tooth

Sun Medical Co., Ltd. Research and development department¹

Department of Pediatric Dentistry, Course of Medical and Dental Sciences,

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences²

OYOKOYAMA Takeshi¹, NUKII Yasuhiro¹, ARATA Masami¹, HOSOYA Yumiko²

【緒言】

乳歯は永久歯と比較して形態学的構造や化学組成的な相違を有しており、酸処理剤で脱灰されやすいと言われている。細矢らは、レジン・象牙質接着界面部のバイオメカニカルな性状と微細構造の総合的観察¹⁾や two-step および one-step self-etch 接着性レジン材の乳歯に対する微小引張接着強さ²⁾を行い、接着性レジン材種によってはその接着性能が永久歯と異なるだけでなく、脱灰部へのレジンの浸透が不十分であることを報告してきた。

2011年2月に4-META/MMA-TBBレジンの接着機構を応用した化学重合型自己接着性充填材『ボンドフィル SB』が開発された。付属の歯面処理材『ティースプライマー』は、エナメル質・象牙質兼用のマイルドな脱灰特性を有する処理材で、本特性は臨床的局所から乳歯への接着に好適に作用すると考えられる。

そこで我々は、ボンドフィル SB の乳歯に対する接着性能を評価するべく、微小引張接着強さ(MTBS)試験、並びに走査電子顕微鏡(SEM)による観察を行い、永久歯への接着性能と比較したので報告する。

【材料及び方法】

抜去後生理食塩水中に冷凍保存した健全乳犬歯 6 歯と健全第三大臼歯 6 歯を用いた。注水下にて、乳犬歯は唇側面、大臼歯は咬合面を耐水エメリー紙#180 でそれぞれ研削し、平坦なエナメル質若しくは象牙質を露出させた。メーカー指示書に従い、ティースプライマーを各研削歯面に 20 秒間作用させた後にエアブローを行い、ボンドフィル SB を筆積み法にて積層した。37°C、24 時間水中浸漬した後、Isomet(ビュラー)にて歯軸方向に厚さ約 0.7mm の間隔で切断し、断面積が 1mm²になるようダンベル型にトリミングした。これらの接着試験サンプルを、小型卓上試験機 EZ-Test(島津製作所)を用いてクロスヘッドスピード 1mm/min にて MTBS を測定した。一方、SEM 観察サンプルは、上記同様の接着操作を施し、スライスした試料を鏡面研磨後に、エナメル質は 6N 塩酸に浸漬・水洗し、象牙質においては先述及び 1%次亜塩素酸ナトリウム水溶液にそれぞれ浸漬・水洗を施した。これらのサンプルをデンケーター内に 1 晩放置、乾燥させ白金蒸着後、走査電子顕微鏡 JSM-5610LV(日本電子)を用いて接着界面の観察を行った。

【結果及び考察】

MTBS 試験の結果、乳歯エナメル質 19.4±1.5MPa、象牙質 22.5±7.6MPa であったのに対して永久歯ではエナメル質 19.2±3.3 MPa、象牙質 29.8±8.0MPa を示しエナメル質、象牙質ともに乳歯-永久歯間に有意な差は認められなかった(p>0.05)。また微小引張り接着強さ試験後の破断面においても双方に差はなく、何れの被着体に対しても破壊形式はレジンの凝集破壊が大勢を占めた。一方、接着界面の SEM 観察ではエナメル質、象牙質ともに接着界面に空隙は認められず、良好な接合状態を示していた。

以上のように、これらの結果はトリ-n-ブチルボラン(TBB)の作用により確実に接着界面から硬化させ、更には適度な柔軟性を有したボンドフィルSBの性能特性によるものである事が示唆され、複雑な応力が掛かる部位や修復方法に悩む症例に対しても簡便で確実な修復ができる接着性充填材として期待できると考える。

【結論】

ボンドフィル SB の接着性能はティースプライマーを用いたマイルドな脱灰であるにも関わらず高い接着強度を維持し、乳歯-永久歯間で差は認められなかった。

【参考文献】

- 1) Hosoya Y: Hardness and elasticity of bonded carious and sound primary tooth dentin; *J Dent* 34, 164-171, 2006.
- Uekusa S, Yamaguchi K, Miyazaki M, Tsubota K, Kurokawa H, Hosoya Y: Bonding efficacy of single-step self-etch systems to sound primary and permanent tooth dentin; *Oper Dent* 31, 569-576, 2006

フッ素含有材料周囲う蝕エナメル質におけるストロンチウム分布の測定

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室¹
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²
○船戸良基¹, 小松久憲¹, 山本洋子², 小島健太郎¹, 松田康裕¹,
奥山克史¹, 木地村太基¹, 佐野英彦¹

Measurement of strontium distribution in carious enamel around fluoride-containing materials

Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine¹
Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Division of Oral Infection and Disease Control,
Graduate School of Dentistry Osaka University²
○FUNATO Yoshiki¹, KOMATSU Hisanori¹, YAMAMOTO Hiroko², KOJIMA Kentaro¹, MATSUDA Yasuhiro¹,
OKUYAMA Katsushi¹, KIJIMURA Taiki¹, SANO Hidehiko¹

【緒言】

フッ素含有材料のう蝕抑制効果を評価するために、う蝕を想定した pH サイクルを行い[1]、人工う蝕エナメル質を作製し、マイクロ PIGE/PIXE を用い歯質内へのフッ素の取り込みについて検討してきた[2]。ある種のフッ素含有材料では、ストロンチウムがカルシウムの代わりあるいは X 線不透過性を高めるために添加されている。このストロンチウムは水中に溶出することから、う蝕抑制効果が期待される。本研究では、ストロンチウムの標準試料を作製し、ストロンチウム・フッ素含有材料周囲人工う蝕エナメル質でのストロンチウムの濃度分布測定を試みた。

【実験方法】

ストロンチウム・フッ素含有材料として、PRG バリアコート (松風社製) および Fuji IX_{GP} Extra (GC 社製) を用いた。本研究ではヒト抜去小白歯を使用したが、前処理として 2.0mol/l 過塩素酸に 30 秒間浸漬、脱灰させ、フッ素濃度の高い最表層エナメル質を除去し、使用歯のフッ素含有量の相違を少なくした。前処理後頬側面をアルミナ懸濁液で光沢が出るまで研磨し、V 級窩洞形成、指示書に従い、充填を行った。24 時間後、歯軸に平行に窩洞部を含むように切断し、厚さ約 170 μm の試料を作製した。

脱灰溶液 (0.2mol/l 乳酸, 3.0mmol/l CaCl₂, 1.8mmol/l KH₂PO₄, pH4.0) と再石灰化溶液 (0.02mol/l HEPES, 3.0mmol/l CaCl₂, 1.8mmol/l KH₂PO₄, pH7.0) を用い、1 日 6 回脱灰溶液と再石灰化溶液を交互に還流させ連続 5 週間 pH サイクルを行い、材料周囲エナメル質に人工う蝕を作製した。

人工う蝕エナメル質でのストロンチウムの濃度分布は、高崎量子応用研究所のマイクロ PIGE/PIXE 装置を用い、窩洞から 100 μm 以上離れたう蝕表層から深部を選び、ストロンチウムとカルシウムを測定し求めた。なお、う蝕部最表層を健全歯質の Ca 量の 5%を示した部位と規定した。ストロンチウム標準試料として、炭酸ストロンチウムと水酸化アパタイトの混合物を加圧、成型後、焼成したものを作製、使用した。

【結果および考察】

使用材料中のストロンチウムは、PRG バリアコートで 9.1±2.9%、Fuji IX_{GP} Extra で 8.0±2.7%であることが本測定で確認できた。人工う蝕エナメル質でのストロンチウムの濃度分布は、測定試料による相違が認められた。Fuji IX_{GP} Extra では検出できなかったが、PRG バリアコートでは、測定試料 6 個中 4 個に、明確なエナメル質表層でのストロンチウムの浸透、拡散が認められた。両材料の相違が認められたことは、今後、ストロンチウムの材料からの溶出を検討する必要があると思われた。エナメル質表層でのストロンチウムの存在は、脱灰・再石灰化の過程で、カルシウムの代わりにストロンチウムが歯質に取り込まれた可能性を示すものと考えられる。さらに、材料からのストロンチウムの溶出は歯質の再石灰化に関与することが期待される。今後、PRG バリアコートにおける測定試料間での相違を検討することにより、ストロンチウムが歯質に取り込まれる機序をある程度予測できるものと思われた。

[1] Y.Matsuda et al., Dent. Mater. J. 24 (2006) 280.

[2] H.Komatsu, et al., Nucl. Instr. and Meth. B 267 (2009) 2136.

新規1液型ボンディング材 MTB-200 の吸水特性と歯質接着性能

クラレメディカル株式会社
○雛元 愛, 西垣直樹, 武井 満

Water Absorption and Microtensile Bond Strength of Newly Developed One-step Adhesive MTB-200

Kuraray Medical Inc.
○CHINAMOTO Ai, NISHIGAKI Naoki, TAKEI Mitsuru

【研究目的】

近年の歯質修復治療において、操作の簡便性から1液型ボンディング材が臨床に広く受け入れられている。1液型ボンディング材の設計においては歯質への浸透性を確保するために親水性成分を配合しているが、歯質接着性の観点からは硬化後の吸水特性は抑制することが望ましい。新たに開発した1液型ボンディング材 MTB-200 では、親水性を損なわずに硬化後の吸水特性を抑制すべく、新規光重合触媒、多官能親水性モノマーおよび撥水性モノマーを導入した。今回、MTB-200 の吸水特性および歯質接着性能について、クリアフィル トライエスボンドとの比較評価を行った。

【材料および方法】

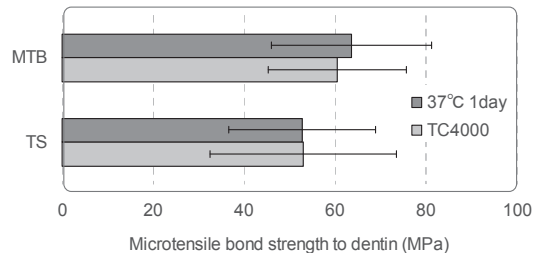
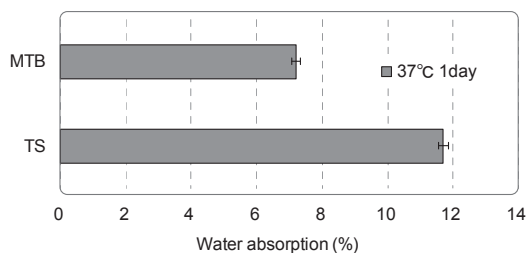
- 1) 材料: 本研究に使用した1液型ボンディング材は、MTB-200 (クラレメディカル、以後 MTB) およびクリアフィル トライエスボンド (クラレメディカル、以後 TS) とした。また、コンポジットレジンとしてクリアフィル AP-X (クラレメディカル) を使用した。
- 2) 吸水率の測定: 2種の1液型ボンディング材にエアブローを施し、重量変化が認められなくなるまで溶媒を蒸散させた。続いて、ポリエステルフィルムの上に置いた直径10mm x 高さ1mmのテフロン製の型に溶媒を蒸散させた2種のボンディング材を填塞し、ポリエステルフィルムを被せて上下各面より10秒ずつ照射して硬化させた。作製した試料を37°Cの水中にそれぞれ24時間保管した後、水分を拭き取り、重量を測定した(重量A)。続いて、試料を90°Cの恒温器で3時間乾燥した後、乾燥後の重量を測定し(重量B)、次の式により吸水率を算出した。

$$\text{吸水率} = (\text{重量A} - \text{重量B}) / \text{重量B} \times 100$$

- 3) 微小引張接着強さの測定: 健全ヒト抜去大白歯の象牙質を露出させ、#600の耐水研磨紙で研磨し、被着面とした。続いて2種の1液型ボンディング材を適用し、コンポジットレジンを積層築盛した。これらの試料から被着面積1mm x 1mmの角柱状の試験片を作製し、37°Cの水中に24時間保管(37°C 1day群)後、あるいは24時間保管後にサーマルサイクル試験機にて、4°C-60°C(浸漬時間1分)を1サイクルとする熱負荷を4,000回負荷した(TC4000群)後、EZ Test (島津製作所)を用いてクロスヘッドスピード1mm/minにて接着強さを測定した。

【結果および考察】

- 1) 吸水率: MTBはTSと比較して低い吸水率を示した。
- 2) 微小引張接着強さ: MTBとTSを比較した結果、37°C1日後および熱負荷後においてMTBはTSよりも高い微小引張接着強さを示した。
- 3) MTBの高い歯質接着性は、新たに導入された新規光重合触媒、多官能親水性モノマーおよび撥水性モノマーの効果によって硬化後の吸水率が低減された結果と考えられる。



【結論】

MTB-200 は、その硬化物の吸水率が低いこと、および優れた歯質接着性能を有することが確認された。

新規 1 液型象牙質接着材の長期耐久性の検討

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室¹
クラレメディカル株式会社²

○角田晋一¹, 付 佳楽¹, 武井 満², 西垣直樹², 雛元 愛²,
福岡杏里¹, 中沖靖子¹, 池田考績¹, 田中 享¹, 佐野英彦¹

Long Term Durability of Newly Developed One Bottle Type Dentin Adhesive System

Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science,
Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University¹
Kuraray Medical Inc.²

○KAKUDA Shinichi¹, FU Jiale¹, TAKEI Mitsuru², NISHIGAKI Naoki², HINAMOTO Ai²,
FUKUOKA Anri¹, NAKAOKI Yasuko¹, IKEDA Takatsumi¹, TANAKA Toru¹, SANOHIDEHICO¹

【緒言および目的】

象牙質接着材は、う蝕の MI 的処置にとって重要な材料であるが、水中での長期保存の影響により接着材層の劣化が進むと考えられている。今回比較研究を行った新規 1 液型象牙質接着材は、接着材層の強度および耐水性を高めることを目的に光重合触媒、多官能親水性モノマーおよび撥水性モノマーを新たに導入しており、高い初期接着強さのみならず長期経過による接着材層の劣化を抑制することも期待される。

本研究では、これら技術の導入が接着材層の劣化に及ぼす影響を考察するため、新規象牙質接着材と市販されている 2 種類の 1 液型接着材について、初期接着強さと長期接着強さの比較検討を行った。

【材料および方法】

2 名の術者 (Op1, Op2) が実験を行った。接着材として新規象牙質接着材 MTB-200 (MTB: クラレメディカル)、ならびに現行の Tri-S Bond (TriS: クラレメディカル) と BeautiBond (BB: 松風) を本研究に用いた。ヒト抜去大白歯の歯冠象牙質をモデルトリマーと #600 の耐水研磨紙を用い、注水下で 60 秒間研磨し平坦な被着象牙質表面を作製した。各接着材は、製造者の指示に従って歯面処理し、コンポジットレジン (クリアフィル AP-X A3, クラレメディカル) を築盛し、被着面より高さ 5 mm になるよう積層した。光照射には JETLITE 3000 (J Morita USA) を使用した。試料は 37°C の水中に 24 時間浸漬させた後、接着界面に対し垂直な角柱 (断面 1 × 1 mm) にトリミングした。

得られた試料は 5°C/60 秒と 55°C/60 秒を 1 サイクルとするサーマルサイクルを 20,000 回 (TC20k) 行った。サーマルサイクルでは角柱試料を PCR チューブ内の脱イオン水中に浸漬し、プログラムした PCR サーマルサイクラー (Mastercycler gradient, eppendorf) を用いた。また、初期接着強さの試料では、サーマルサイクルを行わずに 37°C の水中に 24 時間浸漬しただけの試料 (TC0) も作製した。

それぞれのサーマルサイクル後、角柱試料 (n = 14~15) の微小引張り強さを測定した (EZ-Test, 島津製作所)。得られた測定値は、Games-Howell 法 ($p < 0.05$) を用いて統計分析を行った。

【結果および考察】

右表に微小引張り強さの平均値と標準偏差を示す (同じ文字は有意差がないことを示す)。

全ての条件において MTB は BB よりも有意に高い接着強さを示した。また、MTB と TriS では長期の加速負荷後も接着強さが有意に低下しなかったのみならず、術者間の結果にも有意差は認められなかった。

		微小引張り接着強さ (mean ± SD)		
条件	術者	MTB	TriS	BB
TC0	Op1	72.2 ± 19.6 A	56.8 ± 12.8 AB	20.4 ± 10.7 DE
	Op2	72.8 ± 15.1 A	72.7 ± 10.9 AB	41.7 ± 15.7 BC
TC20k	Op1	75.8 ± 21.5 A	59.9 ± 11.7 AB	17.9 ± 7.2 E
	Op2	65.2 ± 17.9 A	58.4 ± 11.1 A	36.5 ± 14.2 CD

一方で、標準偏差を平均値で除した値、すなわち変動係数は、TC0BBOp1 (0.53), TC20kBBOp2 (0.43), TC20kBBOp1 (0.40), TC0BBOp2 (0.38), TC20kMTBOp1 (0.29), TC0MTBOp1 (0.27), TC20kMTBOp2 (0.26), TC20kTriSOp1 (0.23), TC0TriSOp1 (0.23), TC20kTriSOp2 (0.21), TC0MTBOp2 (0.21), TC0TriSOp2 (0.15) となった。すなわち、1 例を除き同じ術者、同じ材料において、変動係数は TC20k > TC0 となり、長期の加速負荷後には接着強さのばらつきが大きくなる傾向が認められた。長期耐久性に対する新規技術の導入効果を明らかにするためには、より長期の加速負荷試験を行う必要があることが示唆された。

市販オールインワン接着材の接着強さに対するスミヤー層の影響について

北海道大学大学院歯科研究科口腔講座歯科保存学教室

○付 佳楽, 潘 峰, 丁 世俊, 角田晋一, 川野晋平, 橋本直樹, 福岡杏里,
松田康裕, 川本千春, 中沖靖子, 池田考績, 井上 哲, 田中 享, 小松久憲, 佐野英彦

The effect of different dentin smear layers on three commercial all-in-one adhesives
Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science Hokkaido University,
Graduate School of Dental Medicine

○FU Jiale, PAN Feng, TING Shih-chun, KAKUDA Shinichi, KAWANO Shinpei, HASHIMOTO Naoki, FUKUOKA Anri,
MATSUDA Yasuhiro, KAWAMOTO Chiharu, NAKAOKI Yasuko, IKEDA Takatsumi, INOUE Satoshi, TANAKA Toru,
KOMATSU Hisanori, SANNO Hidehiko

Objective: The objective of present study was to evaluate the effect of dentin smear layers on three commercial all-in-one adhesives.

Methods: Eighteen human third molars were used in this study and every six teeth were randomly assigned to each adhesive system with two teeth in one group. The adhesives employed were three all-in-one adhesive systems: BB (BeautiBond, Shofu), BF (BondForce, Tokuyama Dental) and EB (Easy Bond, 3M). After removal of crown segment, the 240-grit, 600-grit, and 2000-grit Sic paper was employed to polish the dentin surface under running the water for three groups in each system respectively. The adhesives were used under the instruction of each manufacture and followed by the resin composite build-up. After storage in 37°C distilled water for 24 hours, the specimens were sectioned into the beam sticks with the cross sectional area 1.0 mm² for the micro-tensile bond strength (MTBS) test at cross head speed of 1mm/min. The obtained data were expressed as MPa and statistically analyzed with one-way ANOVA and Games-Howell test or Tukey test.

Results: The mean±SD of MTBS of three systems were showed in the table followed. According to statistical analysis, BB was showed no significant difference within three Sic papers ($p > .05$). On the other hand, both BF and EB in 240-grit group showed significant lower bonding performance than 2000-grit group ($p < .05$), but there is no significant difference between 600-grit and 2000-grit group neither in BF nor EB ($p > .05$).

Conclusion: Different dentin smear layers could effect on bonding performance on all-in-one adhesives.

Table of mean±SD of MTBS of three systems

	#240	#600	#2000
BB	40.02±25.72 ^a	33.46±12.61 ^a	35.92±20.80 ^a
BF	18.32±12.28 ^{AC}	21.12±12.69 ^{BC}	28.18±13.72 ^B
EB	67.83±18.49 ^{XZ}	88.08±20.03 ^{YZ}	89.62±22.22 ^Y

The same letter means no statistical difference ($p > .05$).

新規 1 ステップボンド (MTB-200) とデュアルキュア型レジンコア材料 (NDC-100) の象牙質接着強さ

鶴見大学歯学部保存修復学講座
○常盤珠美, 秋本尚武, 大森かをる, 英 將生, 宮内貴弘, 桃井保子

Dentin Bond Strength of a Newly Developed Dual-cured Resin Core Material (NDC-100) with One-step Bond (MTB-200)

Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine
○TOKIWA Tamami, AKIMOTO Naotake, OHMORI Kaoru, HANABUSA Masao, MIYAUCHI Takahiro, MOMOI Yasuko

【研究目的】

コンポジットレジンの機械的性質及びボンドの接着性能が向上し, 歯質保存の考えから支台築造にもコンポジットレジンが多用されるようになってきた. 根管内に充填されるレジンコア材は, 光が十分に届かなくても重合するようデュアルキュアシステムになっている. これまでレジンコア用接着材として用いられてきたセルフエッチング接着材は, デュアルキュアレジンに対応するため 2 液を混和する 2 ボトル 1 ステップボンドが一般的に用いられてきた. 今回クラレメディカルは, コンポジットレジン修復用接着材である 1 ステップボンド (MTB-200) を用い, 光重合のみならず化学重合でも臨床使用可能な新規デュアルキュア型レジンコア材料 (NDC-100) によるシステムを開発した. そこで, 本研究では MTB-200 と NDC-100 を用いた支台築造システムとこれまでに市販されているレジンコアシステムの象牙質接着強さを剪断接着試験により比較検討した.

【材料と方法】

1. 被着歯面の調整

被着体として冷凍されたウシ下顎切歯を常温に解凍して用いた. 歯冠部が露出するように常温重合レジン (オストロン II, ジーシー) を用いて包埋した後, 唇側面の象牙質を露出させ, 耐水研磨紙 #600 で研削後, 超音波洗浄を行ったものを被着面とした. 接着面積は直径 4mm に規定した.

2. 試料の作製と接着試験

試験材料として用いた支台築造システムは, 1) MTB-200 と NDC-100 (クラレメディカル), 2) Unifil Core EM (ジーシー), 3) ESTELITE-CORE QUICK (トクヤマデンタル) の 3 種類である. メーカー指示に従って被着面に接着処理を行った後, 内径 4mm のテフロンモールドを設置し, 接着面積を規定した. テフロンモールド内に各レジンコア材料を填塞し, 光照射した. 37°C 蒸留水中に 24 時間浸漬後, 剪断接着試験機 (日計電測社製 M-451) を用いてクロスヘッドスピード 1.0mm/min にて剪断接着強さを測定した. なお, 試料は各条件につき 10 個とし, 得られたデータは一元配置分散分析後, Turkey 多重比較 ($\alpha=0.05$) にて統計処理を行った.

3. 破断面の観察

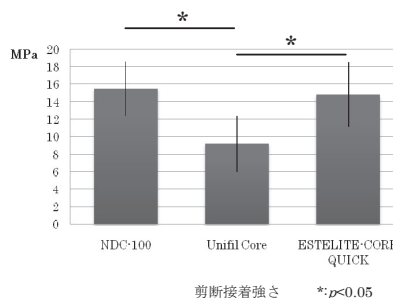
接着試験後の試料の破断面の様相を実体顕微鏡にて観察した.

4. SEM 観察

各試料の象牙質接着界面における超微構造を走査型電子顕微鏡 (JSM-5600LV, JOEL) にて観察した.

【結果ならびに考察】

剪断接着試験の結果を右図に示す. 1 ステップボンド (MTB-200) とデュアルキュア型レジンコア材料 (NDC-100) の接着強さは, ESTELITE-CORE QUICK と比較して有意差は認められなかったのに対し, Unifil Core EM と比較すると有意に高い値を示した. 結果より, 新たに開発された 1 ボトル 1 ステップボンド MTB-200 とデュアルキュア型レジンコア材料 NDC-100 を用いたレジンコアシステムの象牙質接着強さは, 従来のシステムと同等かそれ以上であることから, 臨床における有用性が示唆された.



1 ステップ接着システムの象牙質スマヤー層の除去能

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座保存修復学教室¹

北海道大学病院歯科診療センター口腔総合治療部²

○福澤尚幸¹, 福岡杏理¹, 井上 哲², 佐野英彦¹

Ability of one-step self-etch adhesives to remove the dentin smear layer
Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science, Hokkaido University
Graduate School of Dental Medicine¹

Division for General Dentistry, Hokkaido University Hospital²
○FUKUZAWA Naoyuki¹, FUKUOKA Anri¹, INOUE Satoshi², SANO Hidehiko¹

【目的】1 ステップ接着システム (1-SEAs) は現在多くの製品が市場に出ており、臨床応用されている。このシステムはセルフエッチングシステムに分類され、ユーザーフレンドリーな材料であるが、いくつかの問題が指摘されている。その一つが、窩洞形成中に生じるスマヤー層の存在である。超マイルドタイプの 1-SEAs はいわゆる 'nano-interaction zone' を形成し象牙質と接着するが、スマヤー層は、窩洞形成に使用されるバーの種類によって厚さが異なるとされ、超マイルドな 1-SEAs ではスマヤー層を十分に除去できず短長期的接着性能に影響を及ぼすことが危惧されている。

本研究ではスマヤー層の除去能に着目し、研削条件すなわちスマヤー層の厚さが異なる 2 種類の研削象牙質表面を、6 種の市販 1 ステップ接着システムで処理した後、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察し、象牙質スマヤー層除去の程度を比較検討した。

【材料と方法】健全ヒト抜去大白歯歯冠部をモデルトリマー (MT-7D、モリタ) にて歯軸に垂直に切断し、平坦な歯冠中央象牙質面を得た。その面をレギュラーダイヤモンドポイント (Diamond Point FG、#104R、松風、以下レギュラー) あるいは SiC ペーパー (#2000、マルトー、以下#2000) を用い、レギュラーでは弱圧下で 10 往復研削、#2000 では 60 秒間研削を行い、可及的平坦な研削象牙質面を得た (各 21 本)。その後、レギュラーにて根部を切断し、研削面の厚みが 2mm 程度残るように根面側からスリットを形成した。それらの研削面を 6 種の 1-SEAs、すなわちクリアフィルトライエスボンド (クラレメディカル、S3)、アブソリュート 2 (デンツプライ三金、AB)、ハイブリッドコート II (サンメディカル、HC)、G-ボンドプラス (ジーシー、GP)、ボンドフォース (トクヤマデンタル、BF) およびビューティボンド (松風、BB) を用い、指示書通りに処理した後、光照射を行わず、30 秒間アセトン洗浄した (各研削面および材料につき 3 本ずつ計 36 本)。1-SEA 処理を行わないものを対照とした (各研削面につき 3 本ずつ計 6 本)。エタノール系列脱水と室温での 24 時間乾燥後、スリットに合わせ割断した。割断試料の一片で研削面を、もう一片で割断面の観察を行えるよう試料台に配置し、Au-Pd 蒸着後 SEM (S-4000、日立製作所) にて観察した。

【結果】未処理のレギュラーおよび#2000 研削面はいずれもスマヤー層で覆われていた。象牙細管上のスマヤー層はレギュラー研削面ではひび割れていたが、#2000 研削面では象牙細管と管間象牙質との区別がつかず、一様にスマヤー層で覆われていた。割断面でも、象牙質表面はスマヤー層で覆われ、細管中にはスマヤープラグが認められた。

S3 ではレギュラー研削面はスマヤー層で覆われており、細管のひび割れ様の像が観察された。割断面の象牙質表面はスマヤー層で埋まり、細管内にはスマヤープラグが認められた。これに対し、#2000 研削面ではスマヤー層は除去され象牙細管が観察されたが、割断面の細管中にはスマヤープラグが残存しているものが認められた。同様の像が HC、GP、BF および BB でのレギュラーおよび#2000 の研削面、割断面両方において観察された。すなわち、いずれの材料でも#2000 で研削した際のスマヤー層の方がその残留が少なかった。一方、AB では、いずれの研削面においてもスマヤー層は除去され、象牙細管は開口し、スマヤープラグは認められなかった。特に細管開口部が漏斗状に広がっており、管周象牙質が脱灰されていた。

【考察】AB の pH は 1.8 と低く、他の材料よりも脱灰作用がやや「ストロング」なためこのような結果になったと思われる。ただし、GP の pH は 1.5 であるものの、スマヤー層の除去に関しては他のマイルド (BF、BB) や超マイルド (S3、HC) な材料と同様の像を示した。その理由として処理時間や構成成分の違いなどが影響したと考えられた。

電子スピン共鳴法 (ESR) によるワンステップボンディング材のラジカル発生挙動の測定

岡大病院・総合歯科

○武田宏明, 塩津範子, 桑山香織, 河野隆幸, 鳥井康弘

Measurement of radical generating behavior of one-step self-etch adhesive using electron spin resonance spectroscopy (ESR)

Okayama University Hospital, Comprehensive Dental Clinic

○TAKETA Hiroaki, SHIOTSU Noriko, KUWAYAMA Kaori, KONO Takayuki, TORII Yasuhiro

【研究目的】

ワンステップボンディング材は一液でエッチング, プライミング, ボンディングという多機能を発現させるために多種の成分が混合されるが, 酸として機能させるためには水の配合は必須である. 一方, 歯面処理後のボンディング材の乾燥の程度や方法が接着強さに影響すると報告されており, 溶液中の水の蒸散は歯質接着に重要なステップとなると思われる. そこで本研究では, ワンステップボンディング材の歯質接着機構解明の一環として, 今回, 乾燥の時間を変化させたワンステップボンディング材中のラジカル発生量を電子スピン共鳴法 (ESR) で経時的に測定し, 乾燥とラジカル発生量の関係を検討した. また, 牛歯エナメル質, 象牙質にボンディング材塗布後に同様の方法で乾燥させた場合の接着強さについても調べた.

【材料および方法】

ワンステップボンディング材は, Bis-GMA(Aldrich Chemical Co.), HEMA (Aldrich Chemical Co.), MDP(クラレメディカルより供与), カンファーキノン(東京化成), 4-ジメチルアミノ安息香酸エチル(東京化成), 無水エタノール(丸石製薬), 精製水を用いて調整した. これをガラス練板に滴下し, それぞれ20秒, 40秒, 60秒, 120秒間エア- (Z-283 AIR DUSTER, ホーザン) にて乾燥させた後, それぞれを直径2mm, 高さ1mmのテフロン製チューブに充填した. 充填後, 照射器 (Luxor-4000, ICI) を用いて10秒間照射し, 直ちにESR試料管 (NEW Era Enterprises) に投入して電子スピン共鳴装置 (JES-FR30, 日本電子) でラジカル発生量を測定した. また, 他成分は一定のまま, 水を含有させずエタノールの分量を変化させたボンディング材も供試した. なお, 照射開始時点を重ね開始として時間経過ごとに測定を行った. さらに, 各乾燥時間における牛歯エナメル質, 象牙質に対する引っ張り接着強さを, オートグラフ (AG-20 kNX, 島津製作所) を用いて測定した.

【成績】

発生したラジカルは時間経過とともに減衰傾向を示した. また, 乾燥時間が長い程, ラジカル初期発生量が多くなる傾向が認められた. 水を含有しないボンディング材では, 含有するものと比べラジカル初期発生量が多かった. 象牙質に対する引っ張り強さでは, 20秒間乾燥させた場合では15.7MPa, 120秒間乾燥させた場合では18.6Mpaであった.

【考察】

本研究の結果から, 水の存在でラジカルの初期発生量が減少することが示唆された. 一方, 十分な乾燥により水を蒸散させた場合には, レジンのモノマー成分が濃縮されラジカルの発生が促進されたと考えられる. ラジカル量が多いことはモノマーの重合反応がより急激に進展していることを意味し, 乾燥によってボンディング材の重合反応が促進され接着が早期に確立されるものと考えられる.

【結論】

ボンディング材中の水の存在によりラジカル初期発生量が抑制されるため, 乾燥の程度はボンディング材の重合反応に影響を及ぼし, 接着強さの増減に関与することが示唆された.

【謝辞】

本研究をご指導頂いた岡大院医歯薬・生体材料, 鈴木一臣前教授 (現特命教授) に感謝致します.

象牙質に対する市販 All-in-one システムの接着性能

昭和大学 歯学部 歯科保存学講座
○後閑由香, 水上英子, 谷 千尋, 久光 久

Bonding efficacy of commercial all-in-one adhesive system in dentin

Department of Clinical Cariology, Showa University School of Dentistry
○GOKAN Yuka, MIZUKAMI Eiko, TANI Chihiro, HISAMITSU Hisashi

【研究目的】完全な象牙質窩洞適合性を獲得するためには、齶蝕除去時に被着面に形成されるスメア一層を過不足無く除去し、ボンディング処理に先立ってプライマーを用いて歯面を前処理することが重要である。近年、これらの臨床術式を簡略化する目的でボンディング処理までのすべての歯面処理を一括で行う All-in-one システムが多数市販されている。このほど Dentsply-Sankin より、長期保存性と臨床操作性を改良した Xeno JP および Xeno V+ が市販された。今回我々は、これら 2 種類の市販 All-in-one システムの接着性能について、コントラクションギャップの計測および接着界面の微細構造の観察による評価を行った。

【材料および方法】ヒト抜去大白歯隣接面エナメル質を削除し象牙質平面を作成し、直径 3.0mm 深さ 1.5mm の円柱窩洞を形成した。窩洞に 2 種類のボンディングシステムをメーカーの指示書通り使用し、市販光重合型コンポジットレジン (Palfique Estelite, Tokuyama Dental) を填塞硬化させた。10 分間の水中保管後、窩縁を露出および研磨し、窩縁に生じるコントラクションギャップの計測を光学顕微鏡下で行った。値は窩洞直径に対する百分率で表した。試片は各群 10 個、合計 20 本調整した。また、計測の完了した試片に臨界点乾燥および白金パラジウム蒸着を行い、走査電子顕微鏡を用いて接着界面の観察を行った。

Brand	Manufacture	Lot No.	w-t-w Contraction Gap
Xeno JP	Dentsply-Sankin, Japan	470-004	0.091 ± 0.062 (2)
Xeno V+	Dentsply-Sankin, Japan	1012000752	0.066 ± 0.048 (3)

【結果および考察】Xeno JP のコントラクションギャップの値は、 $0.091 \pm 0.062\%$ となり、2 本の試片で完全な窩洞適合性が確認できた。また、Xeno V+ では $0.066 \pm 0.048\%$ となり、3 本の試片で完全な窩洞適合性が確認できた。走査電子顕微鏡による接着界面の観察では、これまでの All-in-one システムに観察されたような厚いボンディング材層は観察されず、コンポジットレジンと窩壁とが近接した界面が観察された。今回用いた 2 種類の市販システムは、歯面処理を一括で行うことにより臨床操作性が向上し、加水分解による長期保存性に問題が生じる可能性のある 2-HEMA を含まず、保管方法の制限等について改善した製品であるが、窩洞適合性においては改善の余地があると結論づけられた。

新規ワンステップボンディング材の開発に関する研究 (2)

日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻¹,
日本大学松戸歯学部保存修復学講座², 日本大学松戸歯学部歯科生体材料学講座³
○岩井仁寿^{1,2}, 藤田(中島)光², 根本章吾^{1,2}, 周 秦^{1,2}, 岩井啓寿², 西山典宏³, 池見宅司²

Development of Novel All-in-one Adhesive (2)

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo¹,
Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo²,
Department of Dental Biomaterials, Nihon University School of Dentistry at Matsudo³
○IWAI Hitoshi^{1,2}, FUJITA(NAKAJIMA) Kou², NEMOTO Shogo^{1,2}, ZHOU Qin^{1,2}, IWAI Hirotohi², NISHIYAMA Norihiro³,
IKEMI Takuji²

[目的]

本研究では、MDPの添加量の異なる試作ワンステップボンディング材を調製し、歯質アパタイトと相互作用させ、MDPの添加量がMDPのCa塩の生成量に及ぼす影響および歯質へのレジンの接着強さに及ぼす影響について検討した。

[材料および方法]

1. 材料 ワンステップボンディング材の調製: UDMA、TEGDMAをそれぞれ10 g、4-METAを9.4 g、MDPを0、3、6、10、15 g添加した後、水を11.2 g、アセトンを69.3 g添加してMDPの添加量の異なる5種類の4-META含有ボンディング材 (MCボンディング材: MC-0、MC-3、MC-6、MC-10、MC-15) を調製した。さらに、光増感剤としてカンファーキノン、重合促進剤として

-ジメチルアミノ安息香酸エチルをこれらの混合モノマーにそれぞれ1 wt%添加した。
2. 方法 MDPのCa塩の生成量: ワンステップボンディング材1.000 g中にエナメル質あるいは象牙質粉末を0.200 g添加し、10分間攪拌した後、遠心分離して上澄み液を得た。この上澄み液の¹³C NMRスペクトルを測定し、UDMAのビニル基メチレンカーボンに対するMDPのビニル基メチレンカーボンの相対強度を求めた。つぎに、歯質成分添加前後における相対強度の変化からMDPの減少率を求め、この減少率からMDPのCa塩の生成量を算出した。

接着試験: ウシ前歯抜去歯の唇側エナメル質を#1000シリコンカーバイトペーパーにて研磨し、新鮮エナメル質または象牙質を露出させた。この研磨面をMCボンディング材で20秒間処理した後、5秒間強圧エアブローを行い、可視光線を10秒間照射した。直ちにコンポジットレジンを充填して光照射 (20秒間) を行い、試験体を作製した。その後、24時間37°C水中に保管し、インストロン型万能試験機を使用してクロスヘッドスピード1.0 mm/minにて圧縮剪断接着強さを測定した。なお、試料数はそれぞれの実験群で15個とし、照射器はXL 3000 (3M ESPE) を用いた。

[結果および考察]

MDPのCa塩の生成量および残留量を表1に、MDPのCa塩の生成量が接着強さに及ぼす影響を図1に示す。MDPの添加量が増加するとMDPのCa塩の生成量は増加した。MDPのCa塩の生成量の増加に伴い接着強さは増加し、MDPのCa塩の生成量がエナメル質の場合37.0 mg、象牙質の場合39.0 mgのときに最大接着強さが得られ、その後、MDPのCa塩の生成量の増加に伴い接着強さは低下した。本研究の一部は、平成22-24年度日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究(C)、課題番号22592128) および日本大学松戸歯学部口腔科学研究所総合研究プロジェクトにより行われた。

表1 MDPのCa塩生成量と残留量

	MDP 総量	エナメル質		象牙質	
		Ca 塩生成量	残留量	Ca 塩生成量	残留量
MC-0	0	0	0	0	0
MC-3	26.6	14.7	11.9	18.0	8.6
MC-6	51.8	37.0	14.8	39.0	12.8
MC-10	83.4	48.5	34.9	60.4	23.0
MC-15	120.1	79.4	40.7	101.2	18.9

(MCボンディング材1.000 g中のMDPの量、単位: mg/g)

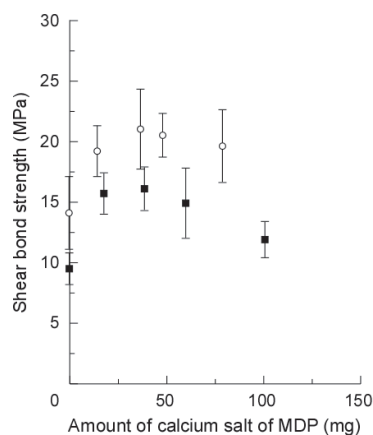


図1 MDPのCa塩生成量が接着強さに及ぼす影響

○: Enamel ■: Dentin

新規オールインワン接着システムの歯頸部辺縁封鎖性に及ぼす 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
○秋山沙絵子¹、前野雅彦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、Dogon. I. L.²

Effect of combination stress simulating intra-oral environment on cervical marginal sealing of a latest 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
○AKIYAMA Saeko¹, MAENO Masahiko¹, OGAWA Shintaro¹, YAMADA Tadashi¹, HARA Manabu¹,
MASEKI Toshio¹, NARA Yoichiro¹, KATSUUMI Ichiroh¹, DOGON I. L.²

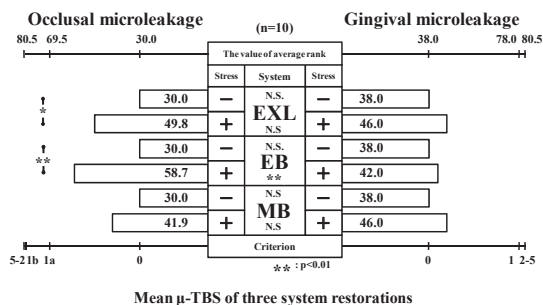
【研究目的】 コンポジットレジン修復に際し使用するオールインワン接着システムは、簡便な操作に加え、高次元の歯質接着性を有していることから広く臨床に普及している。一方、コンポジットレジンと歯質との接着は口腔内の多様かつ苛酷なストレス環境下においても堅固な接着性の担保が求められる。特に辺縁封鎖性の良否は、経時的な接着強さ減弱の直接的要因であると同時に、外来刺激、口腔内細菌、色素の窩洞内接合界面への侵入の指標であり、臨床的な予後予測に寄与する。そこで本実験では、新規オールインワン接着システムの辺縁封鎖性に及ぼす口腔内環境想定複合ストレスの影響を客観的に明らかにすることを目的に、歯頸部修復に対する色素浸透試験による微小漏洩の評価によって検討を行った。

【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。被験材料として用いたレジン接着システムは、新規オールインワン接着システム：EXL759 (EXL, 3M ESPE)、対照として現在市販のオールインワン接着システム：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)とした。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填塞、光照射を行い、37°C 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°C/60°C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。その後、両群試料は 37°C 1%メチレンブルー水溶液中に 1 時間浸漬し、窩洞中央部を歯軸と平行に半切研磨後、色素浸透状態の評価を行い、一修復試料から得た近心・遠心両試料結果のうち、色素浸透がより進行した試料のスコアを代表値(n=10)として採択した。なお、漏洩試験結果は、Kruskal-Wallis の順位検定と Wilcoxon の符号付順位検定による分析を行った。

【成績】 下図に、3 修復システムの微小漏洩結果を示す。分析の結果、歯頂側壁漏洩では、EXL と EB において+S 群が−S 群より有意に大きな漏洩を示し、MB では同等であった。一方、歯肉側壁漏洩では、システムにかかわらず、+S 群と−S 群との漏洩は同等であった。また、3 修復システム間の漏洩は、複合ストレスの有無、窩壁の違いにかかわらず同等であった。さらに、歯頂側壁と歯肉側壁間の漏洩は、−S 群においてシステムにかかわらず同等であったものの、+S 群では EXL と MB は同等であり、EB の歯頂側壁漏洩は歯肉側壁漏洩より有意(p<0.01)に大きかった。

【考察および結論】 新規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によって、エナメル質を窩縁とする歯頂側の辺縁封鎖性が侵襲を受けるものの、その程度は EB・MB と同等の軽微なものであった。一方、象牙質を窩縁とする歯肉側の封鎖性は、複合ストレスによる侵襲が生じにくく、EB・MB と同等の優れた封鎖性を維持することが判明した。また、複合ストレスが負荷された場合、システムの違いにかかわらず漏洩の平均順位値は歯頂側壁値が歯肉側壁値と同等または大きいことが確認できた。この理由としては歯頂側壁部に働く圧縮・引張応力値は、ずれ応力値より大きく、一方、歯肉側壁部に働くずれ応力値は圧縮・引張応力値より大きく、これら応力が歯肉側壁よりも小さい歯頂側壁に作用することが一因として考えられる。

以上から、今回検討した新規システム EXL759 は、現在市販されている先行システムならびに安定した接着性能を有するとの容認を受けているセルフエッチングプライマーシステムと同等の辺縁封鎖性を有し、口腔内の多様かつ苛酷なストレス環境下においても堅固な接着性の保持に貢献し、良好な予後獲得が期待できるシステムのひとつと考える。



ワンステップボンディング材の劣化に関する研究

日本大学松戸歯学部保存修復学講座¹, 日本大学大学院松戸歯学研究科歯学専攻²,
日本大学松戸歯学部生体材料学講座³
○藤田(中島) 光¹, 岩井仁寿², 岡田珠美¹, 西山典宏³, 池見宅司¹

Degradation of one step-bonding adhesives
Department of Operative Dentistry¹, Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo²
Department of Dental Biomaterials³, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○FUJITA (NAKAJIMA) Kou¹, IWAI Hiroto², OKADA Tamami¹, NISHIYAMA Norihiro³, IKEMI Takuji¹

【目的】

市販されているワンステップボンディング材は、長時間の保管や高温での保管により、歯質に対するレジン接着強さが低下する傾向がある。そこで本研究では、ワンステップボンディング材で処理した歯質に対するレジンの接着強さが低下する原因を検討することを目的として、ワンステップボンディング材に含まれているモノマーの変質に及ぼす影響を接着強さと核磁気共鳴法 (¹³C NMR 法) を用いて検討した。

【材料および方法】

1. ワンステップボンディング材の保管

ワンステップボンディング材として G-BOND PLUS (GC) を使用した。機能性モノマー(4-MET, メタクリル酸エステル)が主成分であるボンディング材を 40°C の恒温槽中に保管した。保管時間は 0, 1, 3, 7 および 14 週間とした。

2. ¹³C NMR 法によるワンステップボンディング材の解析

所定時間保管したワンステップボンディング材 300mg とジメチルスルホキシド(DMSO) 250mg を NMR 管に精秤し、振盪・攪拌して NMR の試料とした。また、¹³C NMR の測定は EX 270 スペクトロメーター (日本電子) を用いた。

3. 歯質に対するコンポジットレジンの圧縮せん断接着強さの測定

新鮮ウシ抜去歯のエナメル質および象牙質を被着面(#1000)とし、G-BOND PLUS を指示書に従って作用させ、コンポジットレジン(クリアフィル APX)を填塞し、試験体とした。試験体を 37°C 水中に 24 時間浸漬し、万能試験機 (TG-5KN, ミネベア社) を用いてクロスヘッドスピード 1mm/min の条件で、エナメルおよび象牙質に対する接着強さを測定した。

【結果および考察】

G-BOND PLUS のエナメル質の接着強さは、保管時間 0 日(コントロール)の場合 17.2MPa であったが、保管時間が長くなるにつれて接着強さは低下し、保管時間が 14 週間では 10.9MPa と大きく低下した。また象牙質では、保管時間 0 日(コントロール)の場合 15.4MPa であったが、保管時間が 14 週間では 11.6MPa と、接着強さは低下した。

レジンの接着強さが低下した原因を調べるために、40°C の恒温槽中に保管したワンステップボンディング材の ¹³C NMR スペクトルを測定した。その結果、G-BOND PLUS 水溶液の ¹³C NMR のスペクトルは、4-MET 分子内ベンゾイルエステル基が加水分解し、HEME とトリメリット酸に加水分解されることがわかった。

以上の結果から、ボンディング材を長期間保管すると、ワンステップボンディング材に含まれる機能性モノマーが加水分解して変質し、その結果、レジンの接着強さが低下することが明らかとなった。

本研究は、平成 22-24 年度日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 (C), 課題番号 22592129) により行われた。

3種の市販オールインワンセルフエッチングシステムの接着強さについて

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室

○丁 世俊, 付 佳楽, 潘 峰, 角田晋一, 中沖靖子, 池田考績, 田中 享, 佐野英彦

Bonding performance of three commercial self-etching all-in-one systems

Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Department of Restorative Dentistry

○TING Shih Chun, FU Jiale, PAN Feng, KAKUDA Shinichi,
NAKAOKI Yasuko, IKEDA Takatsumi, TANAKA Toru, SANO Hidehiko

【Objective】

The purpose of this study was to evaluate the bonding performance of three commercial self-etching all-in-one systems by using μ TBS (Micro-tensile bond strength).

【Materials and Methods】

Six human third molars were randomly divided into three groups with each two teeth for one group and each group applied by one of the three systems: G-aenial Bond (GaB, GC), Easy Bond (EB, 3M) and BeautiBond (BB, SHOFU).

After removal of crown segment, the 600-grit SiC paper was employed to polish the dentin surface under running the water for 60 seconds. The adhesives were used under the instruction of each manufacture and followed by the resin composite build-up. After storage in 37°C water for 24 hours, each bonded specimen was sectioned into 15 beams per tooth (cross-sectional area: 1 mm²) using an Isomet diamond saw. μ TBS test was carried out using a portable test machine (EZ Test, SHIMADZU, Kyoto, Japan) at a crosshead speed of 1 mm/min. μ TBS was expressed in MPa, and all data were analyzed by the Games-Howell test ($n = 30$; $p < 0.05$).

Featured surface on dentin side was observed by SEM.

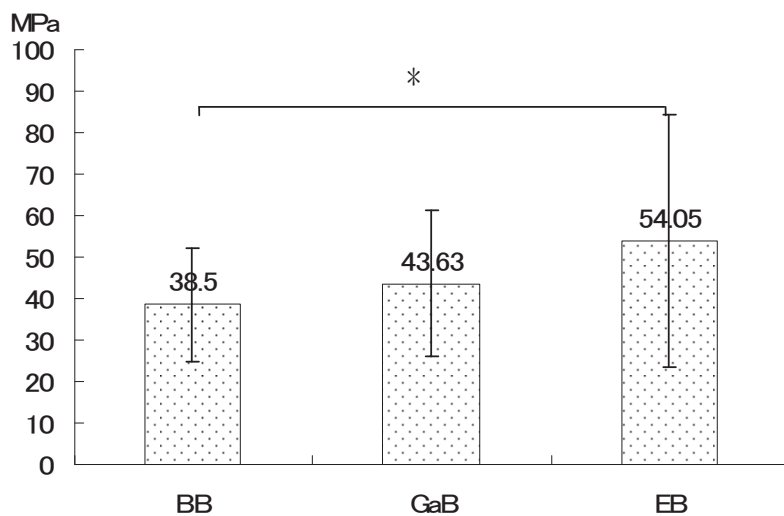
【Result】

The result of three systems were GaB(43.63±13.54), BB(38.50±17.54), EB(54.65±30.38). In statistical analysis, EB showed significant higher bonding performance than BB.

GaB showed no significant difference compares with BB nor EB ($p < 0.05$).

【Conclusion】

EB could have higher bonding performance in present study.



* Asterisk means significant difference ($p < 0.05$).

術者の違いがセルフエッチングシステムの接着強さに及ぼす影響について

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室

○潘 峰, 付 佳樂, 丁 世俊, 角田晋一, 中沖靖子, 池田考績, 福山麻衣, 橋本直樹, 田中 享, 佐野英彦

Effect of operator's variability on bonding performance of self-etching systems

Department of restorative Dentistry, Division of Oral Health Science, Hokkaido University,
Graduate School of Dental Medicine

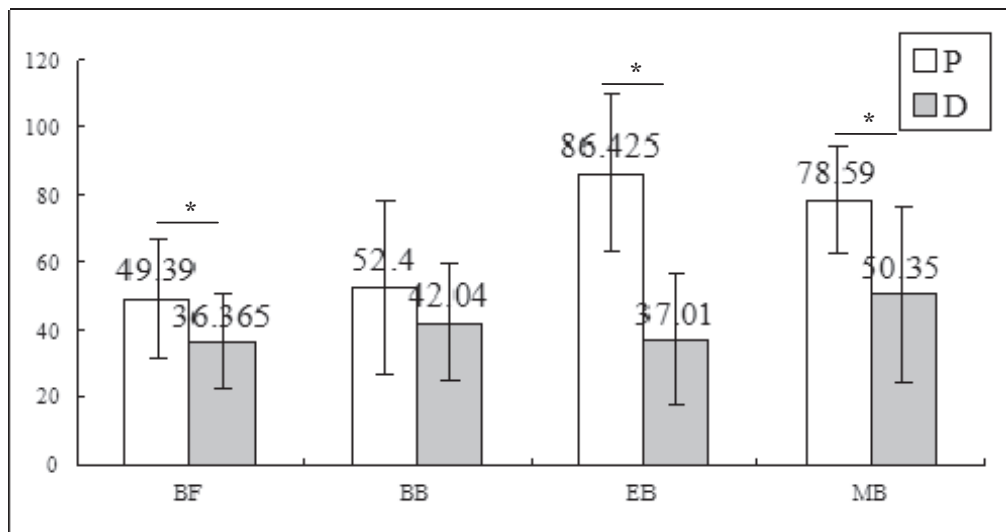
○PAN Feng, FU Jiale, TING Shihchun, KAKUDA Shinichi, NAKAOKI Yasuko, IKEDA Takatsumi, FUKUYAMA Mai,
HASHIMOTO Naoki, TANAKA Toru, SANO Hidehiko

Objective: This study was to evaluate the operator's variability on bonding performance of self-etching systems between the different operators.

Materials and Methods: In this study, four self-etching adhesives were employed for this experiment: BondForce (BF, Tokuyama Dental); BeautiBond (BB, SHOFU); Easy Bond (EB, 3M); and MegaBond (MB, Kuraray), depending on the material suppliers. The operators of this study were D and P who was the first and second year of PhD. education of Graduate School on Dental Medicine Hokkaido University respectively. Sixteen third molars were used in this study, and every eight teeth were equally divided into four systems. Two operators finish this experiment independently. Then the adhesives were used under the instruction of each manufacture and followed by the resin composite build-up. After storage in 37°C distilled water for 24 hours, each specimen was sectioned into 15 beams with the cross sectioned area 1.0mm² for the micro-tensile bond strength test (MTBS) at cross speed of 1mm/min. The obtained date was expressed as MPa and statistically analyzed with Independent-Samples t-Test. The dentin side of the fractured surfaces was observed by SEM.

Result: The results of 4 self-etching systems of P tended to show higher bond strength than that of D. But, in statistical analysis, only BB showed no statistically significant difference between the results of two operators ($p < 0.05$).

Conclusion: Operator's variability could effect on bonding performance of the most self-etching systems.



Asterisk means there is significant difference ($p < 0.05$)

TCD ウレタンモノマー配合コンポジットレジン の照射後 24 時間の重合収縮応力の変化

鶴見大学歯学部保存修復学講座
○久保田 祐, 山本雄嗣, 桃井保子

Change in polymerization contraction stress of a resin composite containing TCD-urethane monomer for 24 h after light-irradiation

Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine
○KUBOTA Yu, YAMAMOTO Takatsugu, MOMOI Yasuko

【緒言】

コンポジットレジンの重合収縮応力は、レジン・歯質の変形や辺縁部の間隙形成を起こしうる。この重合収縮応力の減少を目的として、新規モノマーを配合したコンポジットレジンが開発されている。当講座の西出ら¹⁾は、DX-511モノマーを含有する KALORE (GC)の応力を照射後 24 時間測定し、KALORE の収縮応力は、コントロールの低収縮応力を示す Revolution Formula 2 (Kerr)よりも低かったと報告した。そこで今回、重合収縮力が小さいとされる新規モノマー(tricyclodecane-urethane monomer)²⁾を含有するコンポジットレジン(Charisma[®] Diamond, Heraeus Kulzer)の重合収縮応力を、亀裂評価法を用いて照射後 24 時間測定し、前述の KALORE と比較した。

【材料および方法】

中央に $\phi 3$ mm \times 2 mm の円柱窩洞を有する $\phi 12$ mm のドーナツ型ガラス円盤(破壊靱性値: 0.61 MPam^{0.5})をモールドとした。まず、窩縁から 200, 300, 400, 500 μ m 離れたガラス平面にビッカース圧子で亀裂を導入し、その長さを測定した。次いで、窩壁にシラン処理(Clearfil Porcelain Bond Activator + Megabond Primer)を施してから、窩洞内に CHARISMA を一挙填塞し、照射を行なった(540 mW/cm² \times 45 秒)。照射後 2 分, 10 分, 30 分, 1 時間, 12 時間, 24 時間経過時に亀裂長さを再度計測し、亀裂先端周囲に発生した応力を算出し、その値から接着界面での応力値を求めた¹⁾。応力値は二元配置分散分析および Tukey の多重比較を用いて、有意水準 5%にて統計学的比較を行った。なお、KALORE の応力値は西出らの報告¹⁾の値を引用した。

【結果および考察】

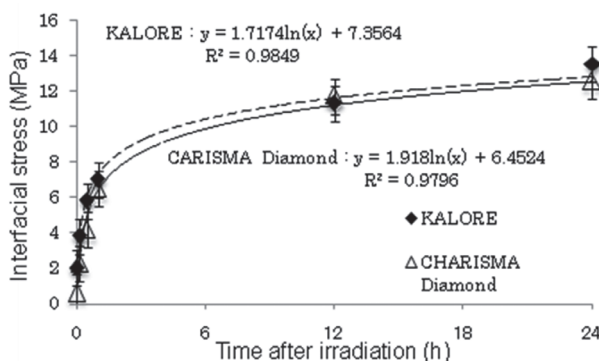


図1 接着界面における重合収縮応力

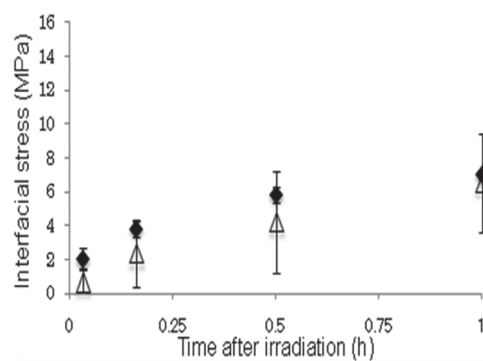


図2 照射後 1 時間後までの重合収縮応力

各経過時間での界面応力値を図 1,2 に示した。図 2 は、図 1 の照射 1 時間後までを拡大したものである。回帰分析では $R^2 > 0.97$ と高い決定係数を示した。両レジンの界面応力は二要因(材料, 時間)に有意に影響を受けた。CHARISMA の応力値は、有意差は示さなかったものの、照射 30 分後まで KALORE よりも低い傾向にあった。また両レジンの応力は 24 時間経過時まで増加し続ける傾向を示した。CHARISMA は KALORE と同等の低い収縮応力を示し、特に重合初期の応力が低いことから、収縮応力に起因する術後不快症状の出現防止に有効であることが示唆された。

1)西出明史, 山本雄嗣, 桃井保子: コンポジットレジンの重合収縮応力-照射 24 時間後までの変化-; 第 133 回日本
歯科保存学会秋季学術大会 演題番号 P24

2) A. UTTERODT et al: Evaluation of compatibility of a new nano-hybrid composite to adhesives; IADR/AADR/CADR 87th
General Session and Exhibition 1810

ブラシ研磨による歯科用純チタンの精密研磨

東京都市大学大学院 工学研究科 機械工学専攻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, 東京技研³, 東北大学大学院歯学研究科 口腔生物学講座歯内歯周治療学分野⁴

○田中大資¹, 佐藤秀明¹, 佐藤秀樹², 石戸谷重晴³, 石幡浩志⁴, 小松正志²

Precision Polishing of Purity Titanium for Dental Material by Brush Tool

Tokyo City University Graduate School of Engineering¹, Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry², Tokyo Giken³, Division of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry⁴

○TANAKA Daisuke¹, SATO Hideaki¹, SATO Hideki², ISHIDOYA Shigeharu³, ISHIHATA Hiroshi⁴, KOMATSU Masashi²

[緒言]

近年, 歯冠修復用金属材料は, 優れた生体親和性を有することが要求されており, それらの要求を満たすため, 種々の歯冠修復用金属材料が開発されている. その中でも, チタン系材料は, 特に金属アレルギーの発生が極めて少ないことから, 難削材であるにも関わらず, 多く使用され始めている. 現在, チタン系材料の歯冠修復物の, 溝部等の複雑な形状を, 軸付き砥石により目標の表面粗さまで研磨するには, 工程が多く, 多大な時間を要している. ところで, ブラシ研磨は, 溝部の凹面の研磨に適しており, 冠などの咬合面の複雑な形状の仕上げ研磨に適している. そこで, 本研究においては, ブラシ研磨による, 純チタンの仕上げ研磨の可能性について検討する.

[材料および方法]

試験片の材料は, JIS2 種純チタン(神戸製鋼所 KS50)である. 図1に, ブラシ形状を示す. ブラシの外径は約φ6mm, フィラメントはナイロン製で, その径(毛の1本の太さ)は, φ0.1mm, φ0.2mm およびφ0.3mm, ブラシの長さは約5mmである. フィラメント本数は, それぞれ, 約1700, 約580 および約260本である. 研磨剤は, 粒度番号#8000(平均粒径1.2μm)のWA またはGC 砥粒(糊フジミンコーポレーテッド)に, PVP(ポリビニルピロリドン)を混入させ, 水道水を加えて, 十分に攪拌する. これを静置し, 上澄み液を除去し, ペースト状の研磨剤を製作し, これを用いた.

図2に, ブラシ研磨装置(株東京技研製)の概略を示す. ブラシはモータからベルト車を介して3800rpmで回転する. ブラシ軸は, 主軸より0.5mm 偏心しており, ブラシ軸は自転しながら, 同じ回転数で公転している. 試験片をバイスに固定し, 研磨剤を約1g 試験片の上に塗布する. ブラシの先端を接触させ, 軸方向にブラシを約0.2mm 押付ける. 次に, 試験片を手動で約2秒毎に1往復(1ストローク30mm)の摺動を行い, 150秒間研磨を行った. 試験片の初期粗さは, Bollenら⁽¹⁾が示す歯冠修復物の理想的な表面粗さの値(Ra=0.2μm 以下)を参考に, 粒度番号#240 および#320のGC 砥粒の耐水研磨紙を用いて, 表面粗さを約Ra=0.2μm に調整研磨した. 表面粗さは, 触針式表面粗さ計を用いて, 算術平均粗さRa および最大高さRzを測定した.

[結果]

図3に, 150秒研磨後におけるフィラメント径と算術平均粗さRaの関係を示す. 砥粒の種類に関係なく, フィラメント径が大きくなると, Raは小さくなっていく. Kruskal-Wallisテストによる結果, フィラメント径がφ0.1mmの場合は, WAとGC砥粒の算術平均粗さRaとの間には, 有意差が見られなかったが, φ0.2mm およびφ0.3mmの場合は, 有意差があり, その差が大きくなった. これは, フィラメント径が大きくなると, 砥粒の押付け力が大きくなるが, フィラメント径がφ0.1mmの場合, 押付け力が小さく, WAとGC砥粒の性能の差が表れにくかったためだと考えられる. また, フィラメント径がφ0.2mm およびφ0.3mmの場合においては, 表面粗さが小さくなり, 十分に光沢のある滑沢面が得られた.

参考文献 (1) Curd M. L. Bollen, Paul Lambrechts, Marc Quirynen, Dental Materials, 13(1997), 258-269.

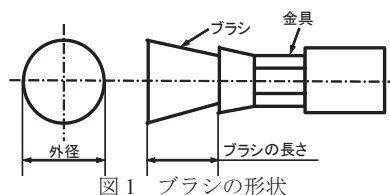


図1 ブラシの形状

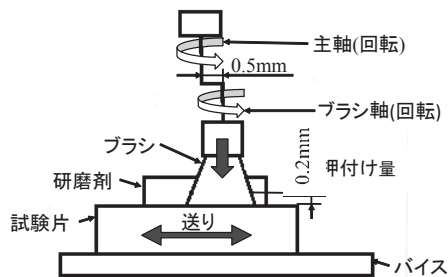


図2 ブラシ研磨装置

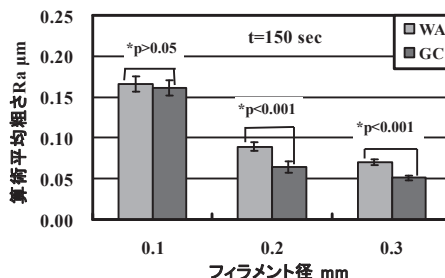


図3 150秒研磨後における算術平均粗さRa

水酸化カルシウム直接覆髄後の被蓋硬組織形成過程

—ラット臼歯における免疫組織化学的研究—

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

○重谷佳見, 吉羽邦彦, 鞍立桃子, 吉羽永子, 山中裕介, 興地隆史

Reparative dentinogenesis in rat molars after direct pulp capping with calcium hydroxide : an immunohistochemical study

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

○SHIGETANI Yoshimi, YOSHIBA Kunihiko, KURATATE Momoko, YOSHIBA Nagako, YAMANAKA Yusuke,
OKIJI Takashi

【研究目的】

水酸化カルシウムは、直接覆髄剤のゴールドスタンダードとして広く用いられており、優れた被蓋硬組織形成能を有する反面、強アルカリのため直下の健全歯髄組織の広範な壊死を招くことが指摘されている。しかしながら、その硬組織形成機構は、未だ完全に解明されていない。

本研究では、水酸化カルシウムによる直接覆髄後の硬組織形成過程について、新生象牙芽細胞様細胞の分化過程と非コラーゲンタンパクの局在変化との関連に着目して免疫組織化学的に観察した。

【実験方法】

実験動物として、8週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。全身麻酔下で上顎第一臼歯を#1 ラウンドカーバイドバー（直径 0.8mm）で咬合面より露髄させ、洗浄・止血後、水酸化カルシウムによる直接覆髄処置を施した。窩洞は光硬化型ガラスイオノマーセメント（Vitrebond, 3M）充填を行った後に、フロアブルレジジン（FiltekFlow, 3M）で被覆した。観察期間は術後 6、12 時間、1、3、5、7、14 日とし、所定期間経過後に 4%パラホルムアルデヒド液にて灌流固定したのち脱灰パラフィン切片を作成し、HE 染色ならびに象牙芽細胞の分化マーカーである nestin、また石灰化組織に関連する非コラーゲンタンパクである osteopontin (OPN)および dentin matrix protein 1 (DMP-1) に対する酵素抗体染色を行った。

【結果】

術後 6 時間から 1 日で覆髄部直下に変性層が認められ、その下層に炎症性細胞浸潤が観察された。3 日では露髄部近傍の一部で円柱状の細胞配列が確認され、5 日では覆髄部直下に線維性基質形成が観察された。7 日後には薄い被蓋硬組織が形成され、さらに 14 日後では細管構造を示す象牙質様基質が認められた。

Nestin 陽性反応は術後 3 日から変性層下に出現し、5 日後では nestin 陽性細胞が線維性基質直下に配列するとともに、その下層にも分布していた。7 日、14 日後では被蓋硬組織直下に nestin 陽性の象牙芽細胞様細胞の配列が観察された。OPN および DMP-1 陽性反応は 6 時間から歯髄変性層直下に認められ、5 日後では線維性基質とほぼ一致して強い反応が確認された。また 7 日、14 日後では被蓋硬組織の表層に陽性反応が認められたが、細管を有する象牙質様基質では反応が観察されなかった。

【考察】

水酸化カルシウムと歯髄組織との界面部において、nestin 陽性細胞の出現に先立ち OPN および DMP-1 陽性反応が認められたことから、OPN および DMP-1 が象牙芽細胞様細胞の分化および被蓋硬組織形成過程の発動に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

【結論】

水酸化カルシウムによる直接覆髄後の修復過程では、露髄部に OPN および DMP-1 の沈着が生じた後、その直下に nestin 陽性細胞が出現し、被蓋硬組織形成が進行することが示された。

【謝辞】

本研究は、新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座硬組織形態学分野 大島勇人教授との共同研究である。

血管内皮細胞がラット培養歯髄細胞へ与える影響について

昭和大学歯科病院・歯内治療科¹, 昭和大学歯学部・口腔生化学教室²
○増田宜子¹, 山田嘉重¹, 宮本洋一², 上條竜太郎²

Effect of the endothelial cells on rat cultured dental pulp cells

Showa University, Dental Hospital, Endodontics¹, Showa University, School of Dentistry, Dept of Biochemistry²
○MASUDA Yoshiko¹, YAMADA Yoshishige¹, MIYAMOTO Yoichi², KAMIJO Ryutaro²

(目的) 第131、133回の本学会において我々は、培養血管内皮細胞にレーザーによって無菌的に広範囲に損傷を与え、遊走した歯髄細胞を含む血管内皮細胞においてのみ早期に TGF-β1 遺伝子の発現が認められることを報告した。今回刺激を加えない血管内皮細胞と歯髄細胞とをフィルターを介して共培養もしくは、直接共培養し、血管内皮細胞が歯髄細胞へ与える影響を調べるため、歯髄細胞における TGF-β1 遺伝子の発現を調べることにした。

(材料と方法) 5週齢の雄性 Wister ラット4匹の下顎切歯より歯髄組織を摘出し、Collagenase、trypsin、EDTA を含む酵素液にて細胞を分離し 5%CO₂ 条件下にて α-MEM 培地に 10% FBS を加え培養した。一方ラット大動脈内皮細胞(凍結細胞)(旭硝子)をラット内皮細胞成長培地(旭硝子)にて培養した。血管内皮細胞がコンフルエントになったら 1 x 10⁴ cells/cm² の濃度で 6 well plate (Transwell®, Corning Inc.) の下段に継代し7日後に、コンフルエントになった歯髄細胞を上段に継代した。

上段の底は直径 8.0 μm の孔のポリカルボネートの膜で覆われている。37°C、5%CO₂ にて培養し14日後に下段の血管内皮細胞、上段の歯髄細胞の Total RNA を調整し cDNA を合成し TGF-β1 の遺伝子の発現を RT-PCR によって調べた。一方、血管内皮細胞を下段に継代した7日後に直接歯髄細胞を下段に継代しポリカルボネートの膜を介さない共培養も行った。コントロールとして上段に歯髄細胞を培養しない下段の血管内皮細胞と下段に血管内皮細胞を培養しない上段の歯髄細胞の培養を行い同様に測定した。

(結果) 14日後の RT-PCR の結果、血管内皮細胞と歯髄細胞をポリカルボネートの膜を介さず共培養したもので強く TGF-β1 遺伝子の発現が認められた。下段に血管内皮細胞を培養した上段の歯髄細胞においても TGF-β1 遺伝子の発現が認められた。コントロールの上段に歯髄細胞を培養しない血管内皮細胞と下段に血管内皮細胞を培養しない歯髄細胞では TGF-β1 遺伝子の発現はほとんど認められなかった。

(考察及び結論) 血管内皮細胞と歯髄細胞とを共培養すると歯髄細胞において TGF-β1 遺伝子の発現が認められた。細胞が接触することによってよりそれぞれの細胞において発現が増加するのか血管内皮細胞と歯髄細胞の発現が合わさって増加したように見えるのかについて発現量の定量化を行う必要がある。また、培地の α-MEM (FBS) に β-Glycerophosphate、Ascorbic acid を加えて培養した場合においても血管内皮細胞と歯髄細胞を共培養した場合の歯髄細胞の発現する遺伝子の変化をさらに検討していく予定である。

NF- κ B 阻害剤は BMP による骨形成を促進する

九州歯科大学口腔治療学講座齶蝕歯髓疾患制御学分野¹, 医療人間形成学講座総合診療学分野²,
福岡歯科大学口腔治療学講座歯科保存学分野³
○平田志津¹, 諸富孝彦³, 寺下正道², 北村知昭¹

NF- κ B Inhibitor Enhances BMP2-Induced Bone Formation
Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics¹,
Division of Comprehensive Dentistry², Kyushu Dental College
Section of Operative Dentistry and Endodontology, Fukuoka Dental College³
○HIRATA Shizu¹, MOROTOMI Takahiko³, TERASHITA Masamichi², KITAMURA Chiaki¹

【目的】

重篤な根尖性歯周炎では炎症が根尖部歯槽骨まで達し大きな骨欠損を伴う。骨欠損の再生には適切な歯内治療を行っても長期間を要することが多い。強力な骨誘導作用を持つ BMP は、Smad と呼ばれる細胞内情報伝達分子依存性・非依存性に細胞分化亢進等の様々な生理活性作用を有し、骨組織再生因子として注目されている。一方、転写因子 NF- κ B は Rel Homology domain を共有する 5 つの転写因子 (p50, p52, p65, cRel, RelB) の総称で、炎症反応、免疫応答、発生や癌化等に関与する。そこで NF- κ B シグナルと BMP/Smad シグナルのクロストークの可能性について検討した。

【材料と方法】

胎生 13.5 日齢の野生型 (WT)、p65 欠損 (p65^{-/-})、および p50 欠損 (p50^{-/-}) 各マウス胎仔から線維芽細胞 (MEF) を調製した。WT および p65^{-/-} MEF を BMP2 (100 ng/ml) で刺激し、骨芽細胞の初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定と染色による観察を行った。また、WT と p65^{-/-} MEF に BMP2 (100 ng/ml) を刺激後、骨芽細胞の後期分化マーカー遺伝子としてオステオカルシンのプライマーを用いて PCR を行った。次に、WT および p65^{-/-} MEF を BMP2 刺激し、抗リン酸化 Smad1/5/8 抗体を用いてウェスタンブロット法により Smad1/5/8 リン酸化を分析した。さらに、WT と p65^{-/-} MEF を BMP2 で刺激後、クロマチン免疫沈降法と BMP Response Element のプローブを用いたゲルシフトアッセイを行い、p65 の BMP 刺激による Smad の DNA 結合への影響を検討した。また、文献上で p65 の機能に關与すると知られている領域の欠失変異体を作製し、BMP シグナルにおよぼす影響を BMP の標的遺伝子である Id1 ルシフェラーゼ遺伝子を用いて検討した。次に、p65 は Smad1/5/8 または Smad4 のどちらと結合するのかを免疫沈降法にて検討した。さらに、BMP による異所性骨化におよぼす NF- κ B の阻害剤の効果の検証をするために、BMP (2 μ g) のみ、BMP+ NF- κ B の選択的阻害剤である BAY11-7082 (20 μ g) をコラーゲンペレットに含有し、凍結乾燥したペレットを 4 週間、マウスの背部筋膜下に埋め、軟 X 線写真および μ CT 撮影にて骨形成量の比較検討をした。また組織切片を作製し、H-E 染色および酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。

【結果・考察】

WT、p65^{-/-}、および p50^{-/-} MEF を BMP2 で刺激すると、WT MEF と比較して p65^{-/-} MEF では BMP2 刺激による著明な ALP 活性上昇と多数の ALP 陽性細胞が誘導された。また、WT MEF と比べ p65^{-/-} MEF では、BMP2 刺激の早い段階から、オステオカルシンの発現の増加がみられた。しかし、WT および p65^{-/-} MEF を BMP2 で刺激しても Smad1/5/8 のリン酸化に有意な差は認められなかった。p65^{-/-} MEF に WT の p65 を過剰発現させると BMP 刺激による Id1 の転写活性が著しく抑制されたが、428 番目以降欠失させた変異体では、抑制が解除された。また、p65 は Smad1 ではなく、Smad4 と結合することがわかった。さらに in vivo の結果、軟 X 線写真、 μ CT および骨密度測定で、BMP のみと比較して、BMP+ BAY11-7082 のペレットで骨形成量の増加が認められた。また H-E 染色で、BMP のみ、BMP+ BAY11-7082 のどちらの切片からも、正常な骨組織が形成されていることが確認された。さらに、TRAP 染色において、双方に著しい違いは認められなかった。

【結論】

NF- κ B シグナルは、p65 が Smad4 と結合することで Smad の DNA 結合を阻害し、BMP シグナルを抑制していることが示唆された。またその抑制効果は、p65 の C 末端側に依存する可能性が高い。さらに、NF- κ B の阻害剤は BMP による骨形成において、よい補助薬になる可能性が示唆された。

ヒト歯髓由来線維芽細胞の MMP-3 産生に及ぼす MAP kinase の影響

大阪歯科大学 口腔治療学講座¹, 生化学講座², 歯科保存学講座³

○加藤 侑¹, 合田征司², 小正玲子³, 竹内 摂³,
山本一世³, 池尾 隆², 林 宏行¹

Effects of MAP kinase on the Production of MMP-3
in Human Dental Pulp Fibroblast Like Cell

Department of Endodontics, Osaka Dental University¹
Department of Biochemistry, Osaka Dental University²
Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University³

○KATO Yu¹, GODA Seiji², KOMASA Reiko³, TAKEUCHI Osamu³,
YAMAMOTO Kazuyo³, IKEO Takashi², HAYASHI Hiroyuki¹

【目的】

う蝕の進行に伴い歯髓組織では炎症性サイトカインである TNF- α が産生され炎症が惹起される。また、歯髓炎ではう蝕歯質の細菌層を除去することにより正常な歯髓へと回復することが可能な場合がある。そのため歯髓細胞における TNF- α と炎症に深く関わる酵素である MMPs との関係を解明することは歯髓保存のために重要である。

【方法および結果】

1) 本研究に参加同意を得た患者 (大歯医倫 100505) の抜去歯より歯髓組織を採取・培養し、3~10 世代目を本実験に使用した。2) ヒト歯髓由来線維芽細胞を TNF- α 存在下で 24 時間培養後、上清中の MMPs の発現を Gelatin zymography, Western Blotting で確認した。MMP-3 の産生は TNF- α 濃度依存的に増強したが、MMP-2 の発現には影響はなかった。3) TNF- α 刺激による ERK1/2 のリン酸化について Western Blotting で検討した結果、ERK1/2 のリン酸化は濃度依存的・経時的に変化した。4) 次に TNF- α 刺激時の MEK 阻害剤 U0126 の影響について検討した結果、TNF- α 刺激により増強した MMP-3 の産生と ERK1/2 のリン酸化は U0126 により抑制された。

【結論】

ヒト歯髓由来線維芽細胞において、TNF- α 刺激による MMP-3 産生経路には ERK1/2 が関与することが示唆された。

単層培養法と三次元培養法における歯髄細胞の象牙芽細胞分化について

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

○山本弥生子, 川島伸之, 須田英明

Odontoblastic differentiation of dental pulp cells under monolayer and three dimensional cultures

Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University

○YAMAMOTO Mioko, KAWASHIMA Nobuyuki, SUDA Hideaki

【研究目的】

単層培養法では、培養した細胞が二次元的に培養皿底面に付着し、立体構造をとる生体環境とは大きく異なることが知られている。そこで近年、生体により近い環境で培養する方法として、三次元培養法に関する多くの研究がなされている。三次元培養法には、コラーゲンゲルや合成ポリマーなどのスキャフォールドを用いる方法や、細胞が接着しないよう加工された培養皿上で培養することで細胞を凝集させ、多細胞の集合体を形成するスフェロイド法などがある。歯髄細胞をスフェロイド法で培養し、その性質を研究したという報告は少ない。今回、簡便に三次元培養できるスフェロイド法に着目し、ヒト歯髄細胞を用いて、単層培養法と三次元培養法における象牙芽細胞および骨芽細胞マーカーの発現を比較検討した。

【材料および方法】

本研究は東京医科歯科大学倫理審査委員会の許可(第442号)を得て、患者の同意の上で行われた。本学歯学部附属病院口腔外科外来にて抜去されたヒト第三大臼歯より歯髄細胞を採取し、5継代したものを実験に使用した。培養液として α -MEM (10%FBS添加)を用いた。単層培養には96ウェル平底マルチプレート(グライナナー)、三次元培養には96ウェルNanoCulture Plate (SCIVAX)を使用した。播種細胞数は1ウェルあたり 3×10^4 個とし、細胞を播種した翌日を0日目と設定した。実験群は、単層培養群と三次元培養群の2群用意し、3日間培養を行った。なお、単層培養の0日目の細胞を対照群とした。0日目および3日目の時点で、細胞よりRNAを抽出し、cDNAを合成後、象牙芽細胞あるいは骨芽細胞に特異的なプライマー(DSPP、ALP、Col I、OC)を用いてリアルタイムPCRを行った。結果はTukey-Kramer ($p < 0.05$)にて統計学的解析を行った。

【結果および考察】

- DSPP発現：単層培養群と比較して三次元培養群において有意なDSPP発現の亢進を認めた。
- ALP発現：対照群と比較して単層培養群においては、大きな変動を認めなかったが、三次元培養により有意にALP発現が亢進した。
- OC発現：対照群と比較し、単層培養群においてOC発現が亢進していたが、三次元培養ではさらにOC発現が亢進していた。
- Col I 発現：対照群と比較し、単層培養群・三次元培養群ともに統計学的に有意な発現の低下を認めた。単層培養群と三次元培養群の間には有意差を認めなかった。

以上の結果より、歯髄細胞の培養において単層培養で維持した場合、骨芽細胞マーカーのうちOCを除いてほとんどのマーカーが抑制されていた。一方、三次元培養を行った結果、象牙芽細胞および骨芽細胞マーカーの発現が誘導され、より分化が進展している可能性が高いことが推察された。

【結論】

ヒト歯髄細胞を三次元で培養したところ、単層培養と比較して象牙芽細胞・骨芽細胞マーカーであるDSPP、ALP、OCの発現が有意に亢進した。

ブタ乳歯歯根膜から得た上皮細胞を用いた三次元再構成培養組織の 移植後における免疫組織学的観察

日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学¹

日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第1講座²

○山田理絵¹, 新井恭子², 北島佳代子², 松田浩一郎¹, 五十嵐 勝²

Immunohistochemical observations of engrafted three-dimensional culture using epithelial cells and fibroblasts derived from porcine PDL

Advanced Operative Dentistry · Endodontics, Graduate School of Life Dentistry at Niigata,
The Nippon Dental University¹

Department of Endodontics, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University²

○YAMADA Rie¹, ARAI Kyoko², KITAJIMA Kayoko², MATSUDA Koichiro¹, IGARASHI Masaru²

【諸言】

コラーゲンをを用いた三次元再構成培養法では、一度バラバラに分散された細胞をコラーゲン内に三次元的に播種することにより、新しく立体構造体を再生することができる。三次元培養では、細胞がもつ組織形成能を顕在化することができるとともに、より生体に近い単純化された組織として多様な実験を行うことが可能である。生体において一度組織が失われると周囲組織から細胞が分化し組織を再生するが、欠損の大きさにより治癒の経過は異なる。そこで *in vitro* で再生した組織が生体に生着するか否かの確認と、その後の組織変化の過程を知ることは重要なこととなる。

本研究では、抜去歯根面に付着している歯根膜から上皮細胞を分離培養し、線維芽細胞を用いて三次元構成組織を作り、ヌードマウス皮下組織に移植し、その後の組織変化を観察したので報告する。

【材料および方法】

生後6カ月のブタ下顎骨を入手し、下顎第二乳臼歯を分割除去後、Penicillin, Streptomycin, Amphotericin B を通常の2倍含むPBSで洗浄し、実体顕微鏡下で歯根の中央部歯根膜組織を採取した。DMEMとHam's F12 (Sigma) を3:1で混合し、Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, Gibco) 100 units/ml, hydrocortisone (Sigma) 400ng/ml, epidermal growth factor 10ng/ml, cholera toxin (Sigma) 8.4ng/ml, bovine insulin (Intergen) 5ng/ml, adenine (Sigma) 18.2ng/ml, および10% (v/v) FBS を添加した上皮細胞培養液FADを使用し、feeder layerとしてMitomycin処理した3T3 (ATCC, #CCL92) を加えて共培養を行った。コラーゲン内培養には2~3継代の線維芽細胞を用い、コラーゲン液にDMEMを添加後1N-NaOHで中和し、10% (v/v) FBSと線維芽細胞 1.0×10^5 /wellを加えた。37°C CO₂下で20分間インキュベートし、2~3継代した上皮細胞を 8×10^5 /wellゲル表面に播種し、24時間後にナイロンシート上に移し気相培養を行った。

次に、5週齢のヌードマウス (n=20) (日本SLC) にエーテルにて全身麻酔を施し、背部にφ1cmの開窓を作製した。その後に露出した皮下組織に、気相培養1週例の三次元培養組織を移植した。移植片は皮下組織に密着するように置き、その上部にエチレンオキサイドガスにて滅菌を行ったφ14.5mmのポリスチレン製半球型キャップを載せ、周囲を接着剤 (アロンアルファ, 東亜合成) で皮膚に貼り付けた。なお、開窓後キャップのみを応用したものをコントロールとした。移植1, 3, 7, 14日後に移植片と皮下組織を一塊として取り出し、10%中性ホルマリンに浸漬固定した。その後厚さ6μmの連続パラフィン切片を作製し、HE染色および免疫染色を行い顕微鏡にて観察した。

【結果および考察】

ブタ歯根膜の初代培養14日後に線維芽細胞が外生し、30日後に上皮細胞様の敷石状を示す外生細胞がみられた。移植1, 3日後のコントロールでは、HE染色所見で炎症性細胞浸潤がみられなかったが、三次元培養組織を移植した実験群では移植1日後で、移植した三次元培養組織の表層は数層の上皮細胞より成る上皮層がみられ、三次元培養組織に接している皮下組織に炎症性細胞浸潤がみられた。実験群3日後では背部皮下組織と三次元培養組織との境界は不明瞭となり、皮下組織に炎症性細胞浸潤がみられなかったが、三次元培養組織内に著しい炎症性細胞浸潤がみられた。移植7日後のコントロールは1, 3日目と同様に炎症性細胞浸潤はみられなかった。一方、実験群は移植後3日目よりもさらに背部皮下組織と三次元培養組織との境界は不明瞭となった。

【結論】

歯根膜から得られた上皮細胞と線維芽細胞を用いた三次元再構成培養組織は移植後、短期では境界域に炎症反応を示すものの、経時的に消退して生着することが示された。

新しく開発されたバイオガラス配合セメントの特徴

九州歯科大学口腔治療学講座齶蝕歯髄疾患制御学分野¹

医療人間形成学講座総合診療学分野²

○鷲尾絢子¹, 寺下正道², 北村知昭¹

Properties of Newly-Developed Bioglass Cement

Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Department of Cariology and Periodontology¹, Division of Comprehensive Dentistry, Department of Clinical Communication and Practice², Kyushu Dental College

○WASHIO Ayako¹, TERASHITA Masamichi², KITAMURA Chiaki¹

【目的】 生体組織の適切な創傷治癒・再生誘導を目的とした歯髄保護処置や歯内療法において使用されるセメントは、象牙質・歯髄、あるいは歯根膜・骨組織と直接接触することになる。そのため、良好な封鎖性を獲得するための組織との融合、および生体親和性や硬組織形成誘導能などの所要性質を有することが期待されており、現在までに様々なセメントが開発され臨床応用されている。我々のグループは、組織融合性や生体親和性、硬組織誘導能などを示すセメントを企業とともに共同で研究を行っており、新しくバイオガラス配合セメント（開発コード：NSY-222）を開発した。今回、NSY-222を用い、セメント硬化体の表面性状、およびセメント周囲のpHに与える影響を検討した。また、実際の生体内への影響を想定して、象牙芽細胞の特徴を有する象牙芽細胞様細胞株（KN-3細胞）に対するNSY-222の影響を検討した。

【材料と方法】

<試験片の作成> 新しく開発されたバイオガラス配合セメントNSY-222は2つのペーストを練和することにより作成される。実験に用いた試験片は、2つのペーストを練和後に定型の鋳型内（内径6mm、高さ12mm）に埋入し、擬似体液（SBF）内に4日間および7日間浸漬することで硬化させ精製水で洗浄して作成した。コントロールとしては精製水のみ浸漬したものを使用した。

<試験片の表面性状> 作成した試験片を試料台に固定後、白金蒸着を施し、電界放出型電子顕微鏡（FE-SEM）を用いて表面観察を行った。また、粉末エックス線回折装置を用いて、試験片の表面観察および結晶構造の解析・同定を行った。

<pHの変化> 温度37℃、相対湿度100%のチャンバー内に24時間静置した試験片、SBFに4日間および7日間浸漬した試験片をそれぞれ1個につき40mLの精製水中に静置し、経時的に精製水のpHの変化を測定した。

<細胞への影響> 培養用ディッシュ中央に、SBFに浸漬して作製した試験片を静置後、通法に従ってKN-3細胞を播種し、試験片が浸漬されるまで培養液を追加した。播種後3日目に位相差顕微鏡下で細胞の変化を観察した。

【結果】 FE-SEMの解析結果から、SBFに浸漬したNSY-222試験片の表面には網状の結晶構造が析出しているのが観察された。網状結晶構造は、粉末エックス線回折による解析結果からハイドロキシアパタイト（HAP）と同等のものが同定された。pHについて、練和直後のペーストを精製水に浸漬するとpH10.1と高アルカリ性を示すものの、予めSBF中に7日間浸漬しておいた硬化体については、中性に近い値を示すことが明らかとなった。さらに、KN-3細胞へのセメントの影響を位相差顕微鏡で観察したところ、セメントに直接接触する位置まで細胞が増殖しているのが観察された。また、セメントの存在しない場合と比較して細胞突起が伸長している細胞も観察された。

【考察】 今回、新しく開発されたセメントNSY-222の表層に析出した結晶がHAPと同等のものであること、将来的にセメント硬化後のpHが中性域で安定すること、またセメントが細胞に有害性を与えず良好な影響を示すことが明らかとなった。以上の結果は、バイオガラス配合セメントNSY-222は生体親和性の非常に高いセメントであることを示している。

【結論】 新しく開発されたバイオガラス配合セメントは、覆髄や歯内療法、穿孔部封鎖などに応用されるセメントとして期待される。

フォスフォフォリン-コラーゲン誘導性ラット修復象牙質の微細形態学的研究

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯蝕制御治療学分野

○小池俊之, 半田慶介, 林 敬次郎, Polan Mohammad Ali Akbor, Jia Tang, 斎藤隆史

Micro morphological study of reparative dentin induced by Phosphophoryn-collagen composite in rats

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation,

School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

○KOIKE Toshiyuki, HANDA Keisuke, HAYASHI Keijiro, POLAN Mohammad Ali Akbor,

TANG Jia, SAITO Takashi

【目的】

我々は生体親和性を有し積極的に象牙質形成を誘導する歯髄保存療法剤の開発を最終目標としている。これまでに我々は、象牙質に特異的な石灰化誘導性リントランパク質であるフォスフォフォリンと、I型コラーゲンとの複合体がラット直接覆髄実験において高い修復象牙質形成能を有することを示唆してきた。本研究の目的は、フォスフォフォリン-I型コラーゲン複合体と一般的な覆髄剤である水酸化カルシウム製剤によって誘導される修復象牙質の微細構造を観察し、詳細に分析することである。

【方法】

ブタ抜去歯から抽出、精製したフォスフォフォリン (以下 PP)20mg と I型コラーゲン(新田ゼラチン;以下 COL) 10mg を EDC(1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, Dojindo)にて架橋結合させて PP-COL 複合体を作製した。全身麻酔を施した 8 週齢ウィスター系雄性ラットの上顎第一臼歯に人工露髄面を形成し、1) PP-COL 複合体、2) COL、3) 水酸化カルシウム製剤(MultiCal, Pulpdent : 以下 CA)を覆髄材料として直接覆髄を施した。術後 2、4 週で歯を顎骨ごと摘出し、固定後、回転式研磨機(ECOMET 3, Buehler)にて頬側面から切削することで試料を作成した。メチレンブルー染色にて修復象牙質の緻密さを肉眼的に観察した後、走査型電子顕微鏡(SSX-550, 島津製作所)にて修復象牙質の形態学的観察を行い、各々の覆髄材料における修復象牙質の微細構造を比較・検討した。

【結果および考察】

術後 2 週の PP-COL 群では、露髄面を封鎖する緻密な修復象牙質形成が認められ、修復象牙質の歯髄側には細管構造が認められた。一方、CA 群によって誘導された修復象牙質は露髄面を完全に封鎖しておらず、その構造は多孔性であり、メチレンブルー色素の通過が確認された。

術後 4 週の PP-COL 群では、さらに緻密な修復象牙質によって露髄面が完全に封鎖されており、修復象牙質の歯髄側には明瞭な細管構造が認められた。これは、生体親和性に優れるコラーゲンによって覆髄直後から露髄面が保護され、フォスフォフォリンの持つ強力なアパタイト誘導能によって早期に修復象牙質が誘導されたものと考えられる。一方、CA 群においても誘導された修復象牙質によって露髄面がほぼ封鎖されていたが、多くの報告にあるように、その構造は粗糙であり裂隙が多数認められた。水酸化カルシウム製剤による直接覆髄では歯髄に壊死層が形成され、その直下には血餅などの血液凝固物が多く存在するため、それが硬組織形成の阻害因子として作用するためと考えられる。

【まとめ】

フォスフォフォリン-I型コラーゲン複合体によるラット直接覆髄によって誘導された修復象牙質のSEM観察を行った結果、明瞭な細管構造を有する緻密な修復象牙質の誘導を確認した。このことからフォスフォフォリンは強力な修復象牙質再生能を有することが実証された。

高周波・電磁波照射による骨芽細胞の Growth Factor の発現・産生誘導

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 発達予防医歯学部門 健康長寿歯科学講座
歯科保存学分野¹, 医療法人とみなが歯科医院²,
○湯本浩通¹, 富永敏彦^{1,2}, 平尾功治¹, 高橋加奈子¹, 松尾敬志¹

Induction of Expression and Production of Growth factors in Osteoblastic cells by Electro-Magnetic-Wave Irradiation

Department of Conservative Dentistry, Institute of Health BioSciences, The University of Tokushima Graduate School¹, Tominaga Dental Clinic, Matsudo²
○YUMOTO Hiromichi¹, TOMINAGA Toshihiko^{1,2}, HIRAO Kouji¹, TAKAHASHI Kanako¹, MATSUO Takashi¹

【研究目的】

感染根管治療では、根管系の形態が非常に複雑であることから、完全に病原細菌や感染歯質を除去する事は困難であり、通常の治療に反応せずに予後不良の場合には抜歯せざるを得ない場合もある。さらに近年、根管系のみならず根尖孔外の歯根表面に病原細菌が Biofilm を形成し、これが持続的な慢性炎症を惹起し、難治性の炎症性疾患を形成している事が示唆されている。しかしながら、複雑な根管系から病原細菌や感染歯質を除去する方法としては、根管治療器具やレーザー等を改良したという報告をみるのみであり、その除去効果や器具到達領域に限界がある事から改善の余地は大きく残されている。そこで我々は、病原細菌の消毒及び治癒促進に応用されている高周波治療に着目し、第 131 回秋季本学会において高周波・電磁波照射の口腔内細菌に対する殺菌効果について、また第 134 回春季本学会において大きな根尖病変を有する歯の根尖孔外及び根尖部根管内に高周波・電磁波照射を行い、良好な治癒を示した症例について報告した。本研究では、高周波・電磁波照射が歯周組織に及ぼす影響について、骨芽細胞様細胞における遺伝子発現変化と蛋白産生量について検討した。

【材料および方法】

1. 高周波・電磁波照射器と能動電極： 周波数は 500 kHz~1,000 kHz に設定し、通電時間は 1 秒間・5 回に規定し、能動電極は Mani 社製 K-file (K-file #10 号) を使用し、通電による蓄熱現象も検討するため、CUSTUM CT-1300 Type K (CUSTUM Corp.) を用いて培地の温度変化をモニタリングした。
2. 電磁波・高周波照射のマウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の細胞増殖に対する効果の解析： 48-well plate に播種した MC3T3-E1 に、高周波・電磁波を照射し、TetraColor One (生化学工業) を用いて、経日的に細胞増殖に対する効果を解析した。
3. 電磁波・高周波照射による MC3T3-E1 での遺伝子発現変化の解析： 高周波・電磁波(500 kHz)照射 1 日と 3 日後に、MC3T3-E1 から抽出・精製した total RNA を用いて、Microarray (Affimetrix) により遺伝子発現を網羅的に解析した。
4. 電磁波・高周波照射による MC3T3-E1 での遺伝子発現と蛋白産生の定量： Microarray による遺伝子発現解析結果に基づいて、高周波・電磁波(500 kHz)照射後に、MC3T3-E1 から抽出・精製した total RNA と培養上清を用いて、real-time PCR と ELISA により遺伝子発現と蛋白産生の定量解析を行った。

【結果および考察】

1. 高周波・電磁波(500, 750, 1,000 kHz)照射後 3 日目より、未照射群と比較して、MC3T3-E1 細胞に有意な細胞増殖が認められた。
2. Microarray による遺伝子発現解析結果、500 kHz での高周波・電磁波照射 1 日後に、未照射群と比較して、Platelet Derived Growth Factor (PDGF) α 及び β , Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) や Connective Tissue Growth Factor (CTGF) 等の遺伝子発現が顕著に増強(2.26~4.02 倍)していた。
3. real-time PCR による PDGF や TGF- β 1 の遺伝子発現変化は、Microarray の結果と一致し、それらの培養上清中の蛋白量も ELISA 法にて高周波・電磁波照射 3 日後まで顕著に増加している事が認められた。また、Osteopontin の遺伝子発現と蛋白産生の増強も認められた。

これらの結果より、高周波・電磁波照射は、骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)に対して、細胞増殖能を活性化させ、さらに Growth Factor 等の遺伝子発現を誘導する事が示され、治癒促進に応用されている高周波治療や電磁波照射を非外科的歯内療法に応用できる可能性が示唆された。

異なる MPC ポリマー濃度による MC3T3-E1 の増殖に関する研究

東京歯科大学歯科保存学講座

○副島寛貴, 間 奈津子, 伊藤幸太, 渡邊浩章, 手銭親良, 中川寛一

Research on proliferation of MC3T3-E1 with different density of MPC polymer

Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College

○SOEJIMA Hiroataka, AIDA Natsuko, ITO Kota, WATANABE Hiroaki,

TEZEN Chikara, NAKAGAWA Kan-ichi

[目的]

本研究では、生体親和性ポリマー(MPC ポリマー)のマウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (MC3T3-E1) に対する影響を細胞形態ならびに濃度依存性および細胞毒性の観点から比較検討した。

[材料と方法]

細胞には、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (MC3T3-E1) (RIKEN BioResource Center) を、培養液は α -MEM に L-Ascorbic Acid と β -Glycerophosphate を添加した骨芽細胞分化誘導培地 (OBM) を使用した。被験材の生体親和性ポリマーとして重合度の異なる 2 種類の MPC ポリマー (mf3、cf72) を使用した。

① 実験開始時において細胞と MPC ポリマーを混和した群 (以下 A 群) と細胞を播種 24 時間後、MPC ポリマーを混和した群 (以下 B 群) の 2 群で細胞形態を観察し比較検討した。各群において 6well-dish に mf3 と cf72 の 2 種類の MPC ポリマーを 100 μ l と 1000 μ l に OBM 培地を 3ml 混和した。また細胞は 5×10^5 cell/well で播種した。そして Inverted Microscope System TE300 (Nikon) を使用し、10 倍率にて 7 日目に形態観察を行った。

② 6well-dish にそれぞれ 500 μ l、600 μ l、700 μ l、800 μ l、900 μ l の MPC ポリマー mf3 と cf72 を塗布し細胞毒性を観察した。細胞は 5×10^5 cell/well で播種し、2、3、7 日後に細胞形態を観察し、7 日目の細胞総数と生細胞数を計測した。そして Inverted Microscope System TE300 (Nikon) を使用し、10 倍率にて行った。0.25%トリプシン溶液 (Invitrogen) で細胞剥離後、0.4%トリパンブルー (和光純薬) と細胞浮遊液を 1:1 で混合した。細胞総数と生細胞数の計測は、色素に染色されない細胞を生細胞とし血球計算板を用い算定、比較検討した。

[結果および考察]

① A 群において、100 μ l の mf3、cf72 混和では付着しなかった細胞数は増加したが、細胞の付着は得られることが認められた。しかし、cf72 に比較し mf3 では細胞生着、増殖が低いことが認められた。また、1000 μ l の mf3、cf72 では、ほぼ全ての細胞が生着せず浮遊していることが分かった。B 群において、100 μ l の mf3、cf72 混和では A 群と同様に、cf72 に比較し mf3 で細胞増殖が低いことが観察された。また 1000 μ l の mf3、cf72 では、ほぼ全ての細胞が浮遊し、生着しなかった。しかし、その細胞形態は A 群とは異なり、一度細胞接着が起こった後 dish から剥離された形態であることが観察された。また、mf3、cf72 共に A 群に比べ B 群で細胞増殖、生着が強いことが認められた。

② mf3 では、500 μ l、600 μ l 塗布した場合、細胞総数に比較し生細胞の減少は著しいが、細胞の生着は認められた。しかし、700 μ l 以上の塗布ではほぼ細胞生着は認められなかった。また、cf72 では 700 μ l 塗布以上で細胞総数が減少したが、細胞総数と生細胞の差はあまり認められなかった。

このことから、mf3 に比較し cf72 は、細胞増殖能は減少するが細胞生着能に影響は与えないと考えられた。また、細胞生着と増殖は MPC ポリマーに対して濃度依存性であることが示され、培養方法との関連も示唆された。

歯髄細胞が産生する因子のゲノミクス、プロテオミクス解析

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 健康増進歯学分野

○小武家誠司, 鈴木茂樹, 米廣純子, 半井英雄, 藤井紗貴子, 西村英紀

Genomics and proteomics analysis of secreted proteins by pulp cells

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

○KOBUKE Seiji, SUZUKI Shigeki, YONEHIRO Junko, NAKARAI Hideo, FUJII Sakiko, NISHIMURA Fusanori

<研究目的>

可逆性歯髄炎の病態成立において、マクロファージや樹状細胞といった自然免疫細胞が重要な役割を果たすことが報告されている。すなわち、この時期に適切に炎症を制御することは、歯髄炎が不可逆性に移行することを回避する上で極めて重要と考えられる。

我々はこれまで歯髄炎を想定した「歯髄細胞とマクロファージの共培養系」の確立に取り組み、細胞非接着型共培養系において、LPS 刺激時の interleukin (IL)-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES), tumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカイン産生性が相乗的に亢進することを明らかにしてきた。つまり、マクロファージは歯髄細胞が産生する液性因子を介した相互作用により炎症を惹起すると考えられ、そこにはある種のサイトカインネットワークが存在すると想定される。また、興味深いことに、歯肉線維芽細胞または歯根膜線維芽細胞を用いた同様の共培養系では、歯髄細胞使用時に見られるような相乗的サイトカイン産生性の亢進は見られない。つまり、歯髄細胞から産生される特異的液性因子が存在し、マクロファージの炎症性サイトカイン産生亢進に寄与すると考えられるが、未だその因子の同定には至っていない。そこで本研究ではマクロファージのサイトカイン産生性亢進を誘導する歯髄細胞特異的液性因子の同定を目的として、培養歯髄細胞のゲノミクス解析並びに培養歯髄細胞上清のプロテオミクス解析を行った。

<材料および方法>

本研究では以下の細胞を用いた。歯髄細胞: ヒト歯髄細胞株 (DP-1) ヒテロメレース逆転写酵素 (hTERT) およびヒトパピローマウイルス (HPV) の E6, E7 遺伝子導入により不死化した細胞である。培養歯髄細胞 広島大学病院において、矯正便宜抜歯による抜去歯牙から研究協力者の同意の上で歯髄組織を採取し、培養皿上で outgrowth してきた細胞を歯髄細胞とした。歯肉線維芽細胞: 当院内の協力者から採取した歯肉組織を培養し outgrowth してきた細胞である。歯根膜線維芽細胞: 同様に当院内の協力者から採取した便宜抜歯による抜去歯牙から歯根膜組織を剥離し、培養皿上で outgrowth してきた細胞である。歯髄細胞培養上清の回収: 歯髄細胞特異的液性因子同定のため、DP-1 細胞を 10%血清存在下でサブコンフルエントになるまで培養した。その後、PBS で十分に洗浄後、血清非存在下で 48 時間培養した。培養上清は 24 時間毎に交換・回収した。その後、回収した培養上清をカラムにて濃縮した。歯髄細胞上清の網羅的タンパク質同定: MS/MS によるペプチド質量の測定及びデータベース検索によりタンパク質の同定を行った。更に、同定したタンパク質について、その遺伝子に対する特異的 PCR プライマーを作製した。上記で述べた歯髄細胞、歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞から mRNA を抽出し、cDNA を用いて PCR を行い、その遺伝子発現の歯髄細胞における特異性を比較検討した。

<結果>MS/MS 解析により約 1000 種のタンパク質を歯髄細胞培養上清から同定した。その中で、MS/MS 解析の信頼度の高い上位 20 種のタンパク質について、遺伝子発現を比較した結果、複数の遺伝子では、歯髄細胞において歯肉線維芽細胞や歯根膜細胞と比較して高い発現を認めることが明らかとなった。

<考察及び結論>以上の結果から、我々が歯髄細胞培養上清から同定したタンパク質の中で、その遺伝子が歯髄細胞に高く発現するものを認めた。これらタンパク質のサイトカイン産生性への影響は今後の検討課題である。また、我々が当初期待したような、歯髄細胞のみに高発現するような因子の同定には至っていない。現在、さらに同定されたタンパク質の遺伝子発現解析数を増やし、歯髄細胞特異的因子の探索を行っている。

破壊された根尖孔でのセメント質形成に及ぼす Emdogain®gel の効果の解明

福岡歯科大学 口腔治療学講座 歯科保存学分野

○松本典祥, 水上正彦, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 柴田太郎,
春名千英子, 國本俊雄, 福田泰子, 牛尾悟志, 阿南 壽

The effect of Emdogain®gel on cementogenesis within open root apex
Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College
○MATSUMOTO Noriyoshi, MINAKAMI Masahiko, IZUMI Toshio, MATSUURA Hiroshi,
MOROTOMI Takahiko, EIDA Tarou, HARUNA Chieko, KUNIMOTO Toshio,
FUKUDA Yasuko, USHIO Satoshi, ANAN Hisashi

【目的】

日常の臨床において、根尖孔の破壊された症例の根管治療に苦慮することがよくある。このような際の治療法としては、水酸化カルシウムによるアペキシフィケーションが推奨されているが、更にセメント質をはじめとする根尖部歯周組織の再生を促進させ、破壊された根尖孔やその周囲の組織を再生することができれば、根管治療のあり方に大きく貢献できるものと考えられる。我々は Emdogain®gel (EMD) を根尖部歯周組織に応用することで、硬組織の再生を促進させ生物学的なアペキシフィケーションを促すことができるのではないかと考えた。今回、根尖孔を破壊したラット根尖病変モデルを用いて、EMD の生物学的なアペキシフィケーションを惹起する可能性について検討した。

【材料および方法】

実験には 5 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。麻酔下にて下顎第一臼歯の髓腔を開拓し、根尖孔を穿通、開放することにより根尖病変の成立を計った。実験 1 では 1 週間後 (急性期) に、実験 2 では 4 週間後 (慢性期) にそれぞれ根管を清掃し、ラットを 2 群に分けた。その後、EMD あるいは EMD の溶解液であるプロピレングリコールアルジネート (PGA) を貼薬し、1、2、4 週目にそれぞれ標本を採取し、試料は固定完了後、28-56 日間脱灰して OCT compound に凍結包埋した。標本は縦断切片 (厚さ 5 μm) 作製後、HE 染色およびトルイジンブルー染色を行い、病理組織学的に鏡検した。また、抗ラット ED1 抗体、抗 TGF-β1 抗体を一次抗体として、シンプルステイン MAX-PO (MULTI) キットあるいはシンプルステイン MAX-PO (G) キットを用いた酵素標識ポリマー法により免疫染色を行い、検討した。

【結果】

実験 1 および実験 2 の EMD 群では根尖部に新生セメント質の添加が認められた。特に 4 週目において、EMD 群では PGA 群と比較して厚い新生セメント質が形成され、根尖直下の歯根膜幅は有意に低い値を示した。また EMD 貼薬後 1 週目において、TGF-β1 陽性細胞が病変中に多数観察された。

【考察】

EMD の硬組織形成能にはアメロゲニンの作用に加えて、多種類のサイトカインが関与することが報告されている。今回、実験 1 および実験 2 ともに EMD 群は PGA 群と比較して厚い新生セメント質が根尖部に形成されていることが観察され、根尖直下の歯根膜幅は有意な減少を示した。これらのことから、EMD は根尖性歯周炎が惹起された根尖部においても新生セメント質の産生を促進させる可能性が推測された。また、その作用は炎症の異なる時期でも認められる可能性が示唆された。

酸化チタン含有試作合成 MTA セメントによる MC3T3-E1 細胞の分化促進作用

奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯内療法学分野¹, 口腔機能分子生物学講座口腔生化学分野²

○今井啓全¹, 前田豊信², 山田真義¹, 木村裕一¹, 齋藤高弘¹, 天野義和¹

Differentiation-promotive action of experimentally synthetic MTA cement containing titanium oxide on MC3T3-E1 cells

Division of Endodontics, Department of Conservative Dentistry¹, Division of Biochemistry, Department of Oral Function and Molecular Biology, Department of Oral Medical Science², Ohu University School of Dentistry

○IMAI Hiroaki¹, MAEDA Toyonobu², YAMADA Masayoshi¹, KIMURA Yuichi¹, SAITO Takahiro¹, AMANO Yoshikazu¹

【目的】

現在, 逆根管充填材として Mineral Trioxide Aggregate (MTA) セメントが主に使用されている。硬化後, MTA セメントは良好な封鎖性があるが, 硬化時間が 2 時間以上もかかることから, 硬化中にセメントから溶出されるさまざまな微量金属元素や炎症による局所的な環境の変化によって MTA セメントが骨芽細胞に対して影響を及ぼす可能性がある。そこで, 今回は, 骨芽細胞に及ぼす影響を調べることを目的として MTA セメントと類似した組成の合成セメントとこれに酸化チタンを加えたセメントを作成し, これらのセメントを使用し骨芽細胞様細胞の MC3T3-E1 細胞を用いて骨形成について比較検討した結果, 興味ある知見を得たので報告する。

【材料および方法】

材料として合成 MTA セメント, 酸化チタン含有合成 MTA セメントを用いた。ポートルランドセメント 75%, 酸化ビスマス 20%, 石膏 5% を配合したセメントを合成し, 1 g あたり滅菌蒸留水 0.35 ml を加えてコントロールの合成 MTA セメントとして使用した。酸化チタン (IV) (アナターゼ型, 粒径 5 μm, 純度 99.9%) (和光製薬) を合成 MTA セメント 1 g あたり 3.3% になるように配合し, 滅菌蒸留水 0.35 ml を加えて酸化チタン含有合成 MTA セメントとして使用した。骨芽細胞様細胞の MC3T3-E1 細胞の ALP, BMP-2, 4, Col-1, osteocalcin, bone sialoprotein の mRNA 量の測定を行った。各種合成 MTA セメントを 1 分間練和し, 直径 10.0 mm (約 0.1g) になるようにディスクを調整し, 14 日間滅菌蒸留水中に保管し完全硬化後に取出し試料として使用した。コントロールとして MC3T3-E1 細胞だけを入れた 6 ウェルのプレートと MTA ディスクと酸化チタン含有 MTA ディスクをそれぞれ MC3T3-E1 細胞と一緒に入れた 6 ウェルのプレートに α -MEM+10%FBS+アスコルビン酸+ β -グリセロリン酸の培地と一緒にコンフルエント後, 14 日間, 37°C, 5.0%CO₂ 存在下でインキュベートした後, total RNA を抽出し RT-qPCR にて解析 (house keeping gene として β -アクチンを使用) し, mRNA 量を測定した。統計処理は多重比較検定の Tukey-Kramer 法を用い危険率 5% で判定した。

【結果および考察】

ALP と BMP-2, 4, osteocalcin および bone sialoprotein は合成 MTA セメント群とコントロール群は有意差がなく, 酸化チタン含有 MTA セメント群だけに有意差が認められた。Col-1 は合成 MTA セメント群はコントロール群より mRNA 量が減少し, 酸化チタン含有 MTA セメント群では mRNA 量の増加が認められた。

以前の我々の報告では Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) 測定の定量分析によると 1 日目の合成 MTA セメント群のカルシウム溶出量は酸化チタン含有 MTA 群より多く溶出していたが, 1 週目以降からは酸化チタン含有 MTA 群の方が多かったが, 2 週目には合成 MTA セメント群, 酸化チタン含有 MTA セメント群ともにチタンの溶出が認められている。この溶出したチタンが本研究の分化促進作用に関与したことが考えられる。

酸化チタンは骨芽細胞様細胞の MC3T3-E1 細胞に対して骨分化に関わる種々の遺伝子発現量を多くすることや, チタンが生体内で酸化膜を形成したあと, 生体内タンパク質が酸化チタンの表面に吸着することも示唆されている。酸化チタンを応用することにより, 酸化チタン含有 MTA セメントは合成 MTA セメントに酸化チタンを加えることにより, チタン酸カルシウム, 酸化チタンビスマス, 酸化チタン鉄, 酸化チタンマグネシウムなどの化合物で存在していると考えられる。酸化チタン含有 MTA の表面に BMP が吸着することが考えられるが, 酸化チタン含有 MTA セメントから溶出されるチタンも BMP の産生を増加させる要因の一つであると考えられる。

以上の結果より, 酸化チタン含有合成 MTA セメントは MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞への分化促進作用があると考えられる。しかし, 今後は酸化チタンの含有量と酸化チタンの溶出量および酸化チタン含有 MTA の表面の状態についても検討する必要があると考えられる。

MTA の骨芽細胞分化促進作用は溶出する Ca^{2+} を介する

日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座¹, 日本大学歯学部生化学教室²,
日本大学歯学部衛生学教室³, 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門⁴,
日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門⁵

○岩田桜子¹, 林 誠^{1,4}, 武市 収^{1,4}, 清水康平^{1,4}, 鈴木直人^{2,5}, 前野正夫^{3,5}, 小木曾文内^{1,4}

The Ca^{2+} released from MTA promotes osteoblastic differentiation

Departments of Endodontics¹, Biochemistry², Oral Health Sciences³, Nihon University School of Dentistry,
Divisions of Advanced Dental Treatment⁴, Functional Morphology⁵, Dental Research Center, Nihon University
School of Dentistry

○IWATA Sakurako¹, HAYASHI Makoto^{1,4}, TAKEICHI Osamu^{1,4}, SHIMIZU Kohei^{1,4}, SUZUKI Naoto^{2,5},
MAENO Masao^{3,5}, OGISO Bunnai^{1,4}

【研究目的】

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は歯根端切除術における逆根管充填材、穿孔封鎖材および直接覆髄剤など歯内治療用セメントとして広く応用されている。MTA の臨床的有用性を裏付ける多くの研究が行なわれており、特に硬組織形成促進作用が着目されている。実際の生体内では、未分化間葉系細胞が硬組織形成細胞に分化・増殖すると考えられる。これまでに演者らは、MTA が未分化間葉系細胞の骨芽細胞および軟骨細胞への分化を促進することを第133回本学会で報告したが、MTA の未分化間葉系細胞の分化に及ぼす作用については未だ不明な点が多い。そこで今回演者らは、MTA から溶出する Ca^{2+} がヒト歯髄由来細胞の増殖を促進するとして瀧田らの報告(第122回本学会)を受けて、MTA の骨芽細胞分化促進作用にも Ca^{2+} が関与している可能性があると考え、C2C12 細胞の分化に及ぼす Ca^{2+} の影響について検討した。

【材料および方法】

〈被験材料〉

被験材料として MTA (Pro Root, DENTSPLY) を用いた。材料は製造者指示通りに混和後、直径 9.0 mm, 厚さ 3.0 mm に調製し、37°C, 湿度 100% で 24 時間硬化させ、その後 DMEM 培地中に 3 日間浸漬したものをを用いた。

〈細胞培養〉

未分化間葉系細胞のモデル細胞である C2C12 細胞を 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した DMEM 培地で 37°C, 湿度 100%, 0.5% CO_2 存在下で培養した。C2C12 細胞を 6 穴プレートに 2×10^4 /well となるように播種し、2 日間後に FBS 濃度を 5% にし、C2C12 細胞の筋芽細胞への分化を誘導した。被験材料をメンブレンフィルター (Cell culture insert, BD Falcon) を介して静置し、 Ca^{2+} キレート剤であるグリコールエーテルジエチルアミン四酢酸 (EGTA) を非添加および添加して 7 日間培養した。また細胞膜に存在する L 型 Ca^{2+} チャネルブロッカー剤の一つである verapamil (10 μM /well) を非添加および添加して培養した。

〈分化マーカーの遺伝子発現〉

C2C12 細胞の分化の指標となるマーカーの遺伝子の発現を real-time PCR 法で調べた。すなわち、C2C12 細胞を前述の方法で培養し、骨芽細胞分化マーカー (Runx2, Osterix), 軟骨細胞分化マーカー (Sox9), 脂肪細胞分化マーカー (lipoprotein lipase; LPL) および筋芽細胞分化マーカー (MyoD) の mRNA 発現を、培養 1, 3, 5 および 7 日目の細胞を用いて解析した。統計分析は、一元配置分散分析法を用いて、各々有意水準 5% にて統計学的検定を行った。

【成績】

MTA によって増加した Runx2, Osterix および Sox9 発現は、EGTA 添加によって有意に減少した。一方、MTA によって減少した LPL および MyoD 発現は、コントロールレベルまで増加した。また、verapamil は、MTA によって増加した Runx2, Osterix および Sox9 発現を減少させるとともに、減少した LPL および MyoD 発現を増加させた。

【考察】

以上の結果から、MTA の未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化促進作用には、MTA から溶出する Ca^{2+} が深く関与していることが示唆された。

Mineral Trioxide Aggregate の生体内組成変化：ラット皮下移植による検討

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
○吉羽邦彦, 重谷佳見, 山中裕介, 武井絵梨花, 吉羽永子, 興地隆史

Compositional Changes of Mineral Trioxide Aggregate Subcutaneously Implanted in Rats

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

○YOSHIBA Kunihiko, SHIGETANI Yoshimi, YAMANAKA Yusuke, TAKEI Erika,
YOSHIBA Nagako, OKIJI Takashi

【研究目的】 Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は逆根管充填, 直接覆髄・断髄, 穿孔封鎖, アペキシフィケーションなど様々な用途に臨床応用されるとともに, 良好な封鎖性, 抗菌性, 生体適合性, 硬組織誘導能を有することが報告されており, 生体機能性材料として注目されている。MTA は水和反応による硬化過程で水酸化カルシウムを生成するとともに, その溶解等によるカルシウムイオンの持続的放出とこれに伴う表層析出物の形成から本材の生物学的作用の一端が説明されている。

本研究では, MTA の生体内での挙動を検索する目的で, 本材をラット皮下組織内に移植し, 組織-MTA 界面部近傍での各種元素の分布状況の変化を観察するとともに, 移植体周囲結合組織を TEM にて微細構造学的に観察した。

【材料および方法】 被験材料として, White ProRoot MTA (Dentsply Tulsa Dental) を, また実験動物として生後 4 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。内径 2mm, 長さ 5mm のテフロンチューブに混和した MTA を充填し, ラット背部皮下組織内に移植した。1, 2, 4 週後に移植体を周囲結合組織とともに取り出し, カコジル酸緩衝 2.5% グルタルアルデヒドにて 24 時間固定した。移植体表層部の観察には, 5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液にて周囲結合組織を溶解し, 脱水, 樹脂包埋後, 試料を長軸方向に切断し, Ca, P, Si, Al の各元素分布について, 波長分散型エックス線マイクロアナライザー (WDX-EPMA1601, 島津) にて分析を行った。また, 一部の試料は試料表面の微細構造を SEM にて観察した。一方, 移植体周囲結合組織の微細構造学的観察には, 移植体より剥離した結合組織をオスmium酸にて後固定, 脱水後, エポキシ樹脂に包埋し, 超薄切片作成後, TEM にて観察を行った。

【結果】 移植後 1 週例の切断試料の元素マッピング像では, MTA 表層に幅 60-70 μm 程度のカルシウム溶脱層が観察された。その最表層には比較的 Ca 濃度の高い層が認められ, この層に一致して P の集積像が観察された。一方, Si および Al はカルシウム溶脱層に一致して高濃度を示したが, 最表層では低濃度層が観察された。移植後 2-4 週例では, カルシウム溶脱層の厚みが 150-250 μm 程度に増加して観察されたが, 元素マッピング像では 1 週例と同様の元素分布を示していた。また, 試料表面の SEM 観察の結果, 移植後 1 週例から顆粒状あるいは立方状ないし板状の結晶様構造物が確認され, 2-4 週例ではさらに集積して観察された。

移植後 1 週例の周囲結合組織の TEM 観察では, 球状あるいはコラーゲン細線維に沿った電子密度の高い針状結晶様構造物が集積して観察された。

【考察】 生体内においても *in vitro* と同様, MTA 表層部におけるカルシウム溶脱層の形成と Si および Al の集積が生じるとともに, MTA 表面では結晶様構造物の析出が観察された。MTA を蒸留水に浸漬するとその表面に炭酸カルシウムおよび水酸化カルシウムが, また PBS 中に浸漬すると無定形リン酸カルシウムや炭酸アパタイトが析出することが報告されている。本研究で観察された結晶様構造物の性状は不明であるが, これらが MTA に対する生体組織の反応に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。一方, 周囲結合組織中にも針状結晶様構造物が観察され, コラーゲン性石灰化が惹起されている可能性が示唆された。

【結論】 MTA をラット皮下組織内に移植すると, MTA 表層部におけるカルシウム溶脱層の形成と Si, Al の集積, および MTA 表面における結晶様構造物の沈着が生じた。さらに, MTA 周囲の結合組織中では針状結晶様構造物の形成が確認された。

量子ドットを使ったD-グルコサミンの細胞内移行のナノイメージング解析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野¹, (株) ケア・フォー バイオ事業部²,
産業技術総合研究所 生産計測技術研究センター³

○川久保 敦¹, 藤原 守¹, 井川一成¹, 謝 明芳², 大庭英樹^{2,3}, 林 善彦¹

Nano-imaging analysis for the intracellular transportation of D-glucosamine using quantum dot

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate school of Biomedical Sciences¹, Biotechnology Division of
Care four Company Ltd.², Measurement Solution Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science
and Technology³

○KAWAKUBO Atsushi¹, FUJIWARA Mamoru¹, IGAWA Kazunari¹, XIE Ming-Fang², OHBA Hideki^{2,3},
HAYASHI Yoshihiko¹

はじめに

D-グルコサミン (MW:約 215) はキチンの完全加水分解物で、変形性関節炎に効果があるとされており、欧米を含め世界的に利用されている。キトサンの中で健康食品として、最も販売量の多いタイプとされている。当教室では、キチン/キトサンに関して 10 年以上にわたり基礎的、臨床的研究をおこなってきた。初期炎症反応が弱く、かつ創傷治癒作用の優れた D-グルコサミンに注目している。

そこで、D-グルコサミンの細胞内への移行および細胞内での動態について興味をもち、検討を行っている。すなわち、細胞内に取り込まれた低分子量の生理活性物質 (今回は D-グルコサミン) の細胞内動態を量子ドットイメージングというナノテクノロジーを応用して解明するものである。

材料と方法

1) D-グルコサミンと量子ドットの結合

0.1g D-グルコサミンを 1mL の PBS に溶解し、4°C で一晩静置する。15nm のカルボキシル化量子ドット (セレン化カドミウム、CdSe 粒子、コロイド法によって作製) 50 μ L を加えて攪拌後、さらに 0.1M EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩) 溶液 100 μ L を加え静かに混ぜた。

2) 培養細胞の調整

NOS-1 細胞 (株化ヒト骨肉腫由来骨芽細胞) をガラスボトムカルチャーディッシュ (World Precision Instruments, Ltd., FD35-100) に 1.6x10⁵ 個程度となるように播種した (10%FBS 添加 α -MEMを使用)。細胞は、顕微鏡ステージ CO₂ (5%) 培養器 (okalab) 内で通常どおり培養を行った。

3) D-グルコサミン結合量子ドットの取り込み

量子ドットの細胞への取り込みは、D-グルコサミン濃度が 0.1%程度となるよう調整した培地で継代直後から培養した場合と、細胞が培養皿へ付着した 2 日目以降に結合量子ドット含有培地で培養した場合の 2 とおとした。

4) 観察

量子ドットの観察は、細胞播種後 10-12 時間後に共焦点レーザー顕微鏡 (ライカ TCS SL) にて行った。蛍光観察の条件は、励起波長 385nm、最大蛍光波長 525nm とした。

結果

量子ドットは緑色の蛍光 (FITC に近似) として培地に添加 6 時間で細胞内に明瞭に観察された。量子ドットの NOS-1 細胞への取り込みは、継代直後から培地に添加した方が良好であった。同一視野内の細胞で、量子ドットを取り込んでいる細胞と、取り込んでいない細胞の 2 種類が確認できた。また、今回 12 時間後までの観察では、核内への移行、細胞外への排出は観察できなかった。

まとめ

今回、初めて D-グルコサミンの取り込みが、量子ドットを介してイメージングできた。量子ドット単体では細胞への取り込みはないことはすでに確認されている。また、量子ドットとの結合は、カルボキシル基とアミノ基との結合であり細胞内へ入っても解離することはないので、今回の観察は D-グルコサミンの細胞膜内への移行を表していることとなる。

今後は、膜内通過時間、状況ならびに細胞内小器官への分布状況、さらには細胞外への排出状況などを検討する必要がある。さらに、同一視野において量子ドットの入っている細胞と入っていない細胞が見られたこと、また継代直後から添加した方が細胞内への移行が良好な所見も得られたので、細胞膜の状況によって取り込まれ方がこととなると推察されたので、この点も検討していく必要がある。

文献

大庭英樹、謝 明芳: 蛍光性量子ドットの合成と生命科学・医療への応用の可能性について。レーザー研究 38(6): 433-439, 2010.

マウス骨芽細胞様細胞における炎症性サイトカイン誘導 ADAM28 は 骨吸収因子 MMP-13 の発現を制御する

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座

○尾関伸明, 川合里絵, 田中 毅, 折本 愛, 中田和彦, 中村 洋

Inflammatory cytokine induced ADAM28 controls expression of bone-resorbing factor MMP-13 on mouse osteoblast-like cells

Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○OZEKI Nobuaki, KAWAI Rie, TANAKA Tsuyoshi, ORIMOTO Ai, NAKATA Kazuhiko, NAKAMURA Hiroshi

【研究目的】

さまざまな細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素として知られるマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)ファミリーに属する MMP-13 は、骨芽細胞などで発現が認められ、炎症性病変や骨吸収を伴う病変に関与すると報告されている。近年、MMP の近縁遺伝子ファミリーでメタロプロテアーゼと細胞接着因子(インテグリン)の相互作用を有する ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリーに属する ADAM28 が、メタロプロテアーゼの活性作用により骨破壊に関与することが示唆されているが、そのメカニズムは未だ明らかにされていない。そこで本研究では、炎症性サイトカイン誘導 ADAM28 による MMP-13 の発現制御について検討をおこない、根尖病変における新たな骨吸収のメカニズムを明らかにすることを研究目的とした。

【材料および方法】

理研 BRC より入手したマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を通法に従い培養し、3 継代以内の細胞を実験に用いた。炎症性サイトカインとして、Peprotech 社製の IL-1 β 単独と 1U あたり 1 ng/ml の IL-1 β , TNF- α , IFN- γ からなるサイトカインミクスチャーを添加し、RT-PCR 法により ADAM28 と MMP-13 の遺伝子発現を評価した。サイトカイン刺激による細胞増殖は MTT アッセイの簡便法である WST-1 で評価した。さらに、アポトーシス細胞死の評価は、BrdU 標識 DNA fragment の検出を ELISA 法による定量化でおこなった。Santa cruz 社製の ADAM28 short interfering RNA (siRNA) を用いて、ADAM28 遺伝子のノックダウンをおこない、MMP-13 の発現動態について検討をおこなった。

【結果および考察】

MC3T3-E1 において、IL-1 β (0.25 ng/ml) とサイトカインミクスチャー (1U) 添加群で、ADAM28 と MMP-13 の遺伝子発現が観察された。また、同群で細胞増殖が有意に認められ、アポトーシス細胞死は観察されなかった。さらに、ADAM28 siRNA によるノックダウンにより、MMP-13 の遺伝子発現が有意に抑制され、細胞増殖とアポトーシス細胞死に変化は認められなかった。

【結論】

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 において、炎症性サイトカインにより誘導された ADAM28 をノックダウンすることにより、MMP-13 の遺伝子発現が有意に抑制されたことから、ADAM28 が MMP-13 の発現を制御していることが示唆された。つまり、根尖病変の成立過程において、炎症性サイトカインの刺激により骨芽細胞が ADAM28 を発現し、MMP-13 の発現を制御することで骨吸収に関与し、根尖病変の拡大に関与している可能性が示唆された。

S-PRG 溶出液が歯周病原性細菌のプロテアーゼ活性および共凝集活性におよぼす影響

福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野

○榎尾陽介, 米田雅裕, 鈴木奈央, 山田和彦, 岩元知之, 藤本暁江, 伊波幸作, 廣藤卓雄

Effect of S-PRG eluate on protease and coaggregation activities of periodontopathogens

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

○MASUO Yosuke, YONEDA Masahiro, SUZUKI Nao, YAMADA Kazuhiko,
IWAMOTO Tomoyuki, FUJIMOTO Akie, IHA Kousaku, HIROFUJI Takao

【緒言】

界面機能性ガラス surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) はデンタルプラークに強い歯科材料として注目されており、これまでに S-PRG 配合レジンの抗プラーク作用や、S-PRG 含有根管充填剤の抗菌作用が報告されている。その有効因子のひとつとして、S-PRG による種々のイオン徐放性が示唆されている。今回は歯周病原性細菌のプロテアーゼ活性 (Bz-Arg-pNA 塩酸塩 (以下 BAPNA) 分解、ゼラチン分解および共凝集活性に及ぼす影響について検討した。

【材料と方法】

S-PRG 溶出液 (Lot. 080217) は、株式会社 松風より提供された (pH7.3)。

1. *P. gingivalis* のプロテアーゼ活性 (BAPNA 分解活性) に対する作用

P. gingivalis ATCC 33277 株の超音波抽出物 (*P. g* SE) を調製し、BAPNA を基質に用いた発色反応を行った。S-PRG を添加した場合としない場合で、5 分ごとに 30 分間、吸光度の変化を調べた。

2. *P. gingivalis* のゼラチン分解活性に対する作用

P. g SE に滅菌蒸留水 (dw) または S-PRG 溶出液を加え段階希釈した。ゼラチンコーティングしたエックス線フィルム (Kodak Ultraspeed) に 20 μ l ずつスポットし、湿度 100% の状態で 37°C、2 時間インキュベートした。フィルムを流水下で水洗後、スポットした表面が剥離した場合をゼラチナーゼ活性ありと判定した。

3. *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集に対する作用

P. gingivalis ATCC 33277 株と *F. nucleatum* ATCC25585 株を液体培養し共凝集バッファーで洗浄した。滅菌蒸留水または S-PRG 溶出液で希釈した共凝集バッファーに懸濁し、両者を混合した。凝集結果の判定は S. A. Kinder らの方法に準じて行った。

【結果】

1. *P. gingivalis* のプロテアーゼ活性 (BAPNA 分解活性) に対する作用

低濃度の *P. g* SE を用いた場合、S-PRG 溶出液は BAPNA 分解活性を抑制する傾向が見られた。

P. gingivalis の 2 つの株 (ATCC33277 株、381 株) について同様の結果が得られた。

2. *P. gingivalis* のゼラチン分解活性に対する作用

反応液に S-PRG 溶出液を 40% 以上加えると、*P. g* SE のゼラチナーゼ活性が抑制された。

3. *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集に対する作用

共凝集バッファー希釈時に滅菌蒸留水を S-PRG 溶出液に替えると *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集が抑制された。

【考察】

S-PRG 溶出液は *P. gingivalis* のプロテアーゼ活性 (BAPNA 分解活性) を抑制した。本抑制効果は二つの菌株について同様であった。そのメカニズムは不明であるが、プロテアーゼと金属イオンの結合を S-PRG 溶出液中の各種イオンが競合阻害している可能性が考えられる。また、S-PRG 溶出液は *P. gingivalis* のゼラチン分解活性も抑制した。ゼラチン分解活性は修復物の脱離に関係すると考えられており、S-PRG 含有材料は修復治療の長期予後を良好にする可能性が期待できる。凝集の抑制についても S-PRG 溶出液中の各種イオンが関与している可能性がある。今後、酵素活性や共凝集の抑制メカニズムを解明する必要がある。

歯肉溝滲出液(GCF)を用いた歯周病罹患部位の診断と治療効果のモニタリングの有用性
-歯周病迅速診断キット開発に向けて- (第三報)

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座¹,

日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター・アイソトープ研究施設²,

岩手医科大学歯学部口腔機能保存学講座歯周病学分野³, 日本大学松戸歯学部歯周治療学講座⁴,
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体支持組織学系専攻生体硬組織再生学講座歯周病学分野⁵,
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⁶

○伊藤 弘¹, 沼部幸博¹, 関野 愉¹, 村樫悦子¹, 井口一美¹, 戸円智幸², 橋本修一², 佐々木大輔³,
八重柏 隆³, 國松和司³, 高井英樹⁴, 目澤 優⁴, 小方頼昌⁴, 渡邊 久⁵, 萩原さつき⁵, 和泉雄一⁵,
廣島佑香⁶, 木戸淳一⁶, 永田俊彦⁶

Utility of diagnostic methods for periodontal disease and monitoring therapeutic gain using GCF

-Development of kit for rapid diagnosis of periodontitis -part3

Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo¹,

Dental Research Institute, Radio Isotope Center, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry Tokyo²,

Department of Conservative Dentistry and Oral Rehabilitation, Division of Periodontology, School of Medicine,

Iwate Medical University³, Departments of Periodontology, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University⁴,

Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Graduate School of Medical and Dental Science,

Tokyo Medical and Dental University⁵, Department of Periodontology and Endodontology,

Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School⁶

○ITO Hiroshi¹, NUMABE Yukihiro¹, SEKINO Satoshi¹, MURAKASHI Etsuko¹, IGUCHI Hitomi¹,

TOEN Tomoyuki², HASHIMOTO Shuichi², SASAKI Daisuke³, YAEGASHI Takashi³, KUNIMATSU Kazushi³,

TAKAI Hideki⁴, MEZAWA Masaru⁴, OGATA Yorimasa⁴, WATANABE Hisashi⁵, HAGIWARA Satsuki⁵,

IZUMI Yuuichi⁵, HIROSHIMA Yuka⁶, KIDO Jun-ichi⁶, NAGATA Toshihiko⁶

【目的】

歯周治療後における歯周組織の維持・安定には、質の高いSPTの継続と医療従事者による病状把握が重要である。GCFにおけるエラスターゼ活性とAST活性は歯肉炎症との相関が報告されており、臨床パラメータとの併用により、精度の高い診断が期待される。しかし、その評価方法はGCF総量もしくは濃度と、統一は図られていない。今回、GCF総量・濃度との酵素活性を統計学的に比較し、歯周病診断ツールとしての評価方法に対する有用性の検討を行った。

【材料と方法】

被験者は非喫煙者のSPT期患者184名とし、歯冠修復物のない上下顎前歯部401部位からGCFを採取した。検索項目は、臨床パラメータとして、PII, GI, CAL, PPD, BOP, GCF量を行い、同部位におけるGCFの生化学的検索項目としてエラスターゼ活性, AST活性, そして蛋白質量とした。GCF量は、ペリオトロン8000を用いて採取・定量した。統計学的検索は、Mann-Whitney U検定, Kruskal Wallis 検定, そしてROC曲線とYouden indexからカットオフ値の作成を行った。なお、本研究は倫理委員会の承認(承認番号2111)のもと遂行された。

【結果】

BOPの有無とPPD4mm以下と5mm以上を基準とした各臨床的カテゴリーでの比較は、Mann-Whitney U検定, Kruskal Wallis 検定を用いた解析では、蛋白質濃度のみが、すべての各臨床的カテゴリーにおいて統計学的有意差を認めなかった。カットオフ値を用いた検討では、濃度測定と比較して総量測定では、AUC(area under the curve)と正診率がエラスターゼ活性, AST活性, そして蛋白質量共に高かった。

【考察】

酵素および細胞を含む蛋白質およびペプチドの濃度である蛋白質は、各臨床的カテゴリーにおいて有意差が認められないことから、GCF中では一定の蛋白質濃度が維持されていることが示された。また、AUCと正診率から臨床的評価との整合性はGCF総量での評価が有効であると示され、GCF総量による評価の妥当性が示された。

本研究は、文部省科学研究費助成金：基盤研究C, 課題番号：20592437, 日本歯科医師会・新医療機器・医療技術産業ビジョンプロジェクトの助成を受けて行われた。

歯肉溝滲出液中のバイオマーカーと歯周炎罹患部位の関連

新潟大学大学院医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野
○島田靖子, 杉田典子, 吉江弘正

Association between biomarkers in the gingival crevicular fluid and periodontitis
Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
○SHIMADA Yasuko, SUGITA Noriko, YOSHIE Hiromasa

【研究目的】歯肉溝滲出液 (GCF) 中のバイオマーカーの定量は歯周炎が有する部位特異性を解析する上において最も有用な手段の一つであるが、採取できうる検体量が非常に少量であるため同一部位における多項目の解析は困難であった。一方、近年開発されたマルチプレックスサスペンションアレイシステム法は細胞の表面の特定抗原タンパク質を、蛍光でラベル化されたビーズを用いた特殊なフロー法による蛍光検出システムにより自動的に検出する方法で、微量のサンプルから同時に多項目のタンパク質を定量することを可能にした。本研究においては同一部位における GCF 中の 40 項目のバイオマーカーをマルチプレックスサスペンションアレイシステム法を用いて測定し、この測定方法が GCF に応用可能かを評価すること、ならびに歯周炎の臨床パラメーターと比較することを目的とした。

【方法】新潟大学医歯学総合病院 歯周病診療室において歯周病安定期治療 (SPT) 中の慢性歯周炎患者 11 名を対象とした。それぞれの被験者より健康部位 (Pd \leq 3mm) 1 部位、歯周炎罹患部位 (Pd \geq 5mm) 2 部位の計 3 部位より GCF を、また歯周炎罹患部位より縁下プラークを採取した。GCF 中の 40 項目のバイオマーカーはマルチプレックスサスペンションアレイシステム法を用いて測定し、また歯周炎罹患部位の *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) はリアルタイム PCR 法にて測定した (いずれも外部委託)。健康部位と歯周炎罹患部位、歯周炎罹患部位における *P. gingivalis* の陽性部位と陰性部位のそれぞれの群間比較は Mann-Whitney test を用いて解析した。なお本研究は新潟大学歯学部倫理委員会の承認を得ている。

【結果】本研究の測定系においては 40 測定項目のうち、27 項目がマルチプレックスサスペンションアレイシステム法にて測定可能であり、また 6 項目は高濃度、7 項目は低濃度のため一部もしくは全て測定不可能であった。測定可能であった 27 項目について健康部位と歯周炎罹患部位を比較したところ、17 項目のバイオマーカーは統計学的有意に歯周炎罹患部位で高いことが認められた (MMP-1, MMP-3, PAI-1, IL-1 β , IL-8, IL-21, MCP-1, MCP-3, RANTES, IP-10, ICAM-1, VCAM-1, sE-selectin, PlGF-1, VEGF-A, Trail, CRP)。また歯周炎罹患部位のうち *P. gingivalis* の陽性部位と陰性部位を比較したところ、IL-1 β ($p = 0.018$) と IP-10 ($p = 0.03$) に統計学的有意差を認めた。

【考察および結論】マルチプレックスサスペンションアレイシステム法により 40 項目中 27 項目 (67.5%) の GCF 中のバイオマーカーの測定が可能であり、6 項目についても希釈により可能であることから、本測定方法が GCF にも応用可能であることが明らかとなった。また SPT 中も残存する歯周ポケットに *P. gingivalis* が存在すると、代表的な炎症性サイトカインである IL-1 β ならびに IP-10 (Interferon inducible protein-10; インターフェロン誘導性タンパク質-10) の GCF レベルが上昇することが認められた。今後はサンプル数を増やした経時変化についても検討することにより、将来的には歯周炎局所の現時点での炎症状態ならびに予知性を反映するバイオマーカーの設定への応用を検討している。

本研究において IL-1 β ならびに IP-10 は歯周ポケットの進行度、*P. gingivalis* の存在を反映するバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

歯周病原性細菌 *P. g* 感染が血球新生に及ぼす影響

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学講座)
○前田憲一郎, 久保田実木子, 大原廣之, 伊山舜吉, 沢田啓吾, 竹立匡秀,
山下元三, 北垣次郎太, 市川朋生, 北村正博, 村上伸也

Effects of *Porphyromonas gingivalis* infection on hematopoiesis

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○MAEDA Kenichiro, KUBOTA Mikiko, OOHARA Hiroyuki, IYAMA Mitsuyoshi, SAWADA Keigo,
TAKEDACHI Masahide, YAMASHITA Motozo, KITAGAKI Jirouta, ICHIKAWA Tomoo,
KITAMURA Masahiro, MURAKAMI Shinya

[研究目的]

歯周病の病巣に由来する宿主の炎症関連因子や歯周病原性細菌およびその菌体成分が、血流を介して組織・全身の臓器に運ばれることで、種々の全身疾患のリスク因子になっている可能性が示唆されている。一方、免疫を司るリンパ球やマクロファージ等の血球系細胞は骨髄内に存在する造血幹細胞に由来し、その分化や増殖が厳密に制御されることにより、全身の免疫恒常状態が保たれている。そして興味深いことに、その制御機構は白血病や急性炎症のみならず慢性炎症により影響を受けることが近年報告されている。しかしながら現在にいたるまで歯周病が骨髄内の造血幹細胞への増殖や分化に及ぼす影響については検討されていない。そこで本研究では歯周病モデルマウスにおける骨髄中の血液細胞を解析し、歯周病罹患が骨髄内での血球分化に対する影響を解析した。

[材料と方法]

1. 歯周病モデルマウスの作成

歯周病モデルマウスの作成はBakerらの方法(Baker et al. *Infect Immun.* 2000) に準じて行った。感染開始13日前から10日間 Sulfamethoxazole 0.8mg と Trimethoprim 0.16mg を投与し、感染3日前から抗生剤を休止した。その後歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* W83 菌株 (*P.g*) をメチルセルロースにマウス1匹あたり 1×10^9 CFU となるように溶解した菌液を3日に1回投与し、計10回感染を行った。非感染群はメチルセルロースのみを投与した。マウスは8週令のC57BL/6を使用した。

2. 歯周病罹患マウスの骨髄中の血球解析

10回の*P.g*感染後、感染および非感染群のマウスの大腿骨と脛骨を採取し、骨髄内を洗浄して内部の細胞を回収した。回収した細胞数を確認後リンパ球であるB細胞のマーカー CD19 とミエロイド系細胞のマーカーである Mac-1 (CD11b) を用いて解析した。さらにプリミティブな分化ステージでの変化を観察するために骨髄内の血液幹細胞および前駆細胞である Hematopoietic Stem Cell (HSC), Multi Potent Progenitor (MPP), Common Lymphoid Progenitor (CLP), Common Myeloid Progenitor (CMP) の分布割合および細胞数の計測を行い、感染と非感染群のマウスと間にて比較した。これらの前駆細胞は成熟した血球細胞のマーカー(NK1.1, CD3, CD8, CD19, B220, Mac-1, Gr1, TER-119)がネガティブであり (Lineage negative cells)、それらを c-kit, Sca-1, IL-7 receptor (IL-7R), Flt3 のマーカーを用いて同定を行った。Lineage negative cells のうち、HSC は c-kit^{hi}, Sca-1^{hi}, Flt3⁻, MPP は c-kit^{hi}, Sca-1^{hi}, Flt3⁺, IL-7R⁻ CLP は c-kit^{lo}, Flt3⁺, IL-7R⁺, CMP は c-kit^{hi}, Sca-1⁻にて同定し、これらの表現型解析はフローサイトメーターを使用した。

[結果および考察]

歯周病原性細菌 *P.g* 感染群において骨髄中の血球数の減少が見られ、さらに骨髄内でのリンパ球への血球分化の減少が認められた。またこの抑制はよりプリミティブな血球の前駆細胞においても確認され、*P.g* の感染が骨髄中の血球分化に影響を及ぼすことが示唆された。

唾液検査と自覚症状の質問紙調査を組み合わせた歯周病スクリーニング法の検討

(公財)ライオン歯科衛生研究所¹, 愛知学院大学歯学部保存修復学講座²,
愛知学院大学歯学部口腔衛生学講座³

○森田十誉子¹, 山崎洋治¹, 湯之上志保¹, 石井孝典¹, 富士谷盛興², 千田 彰², 中垣晴男³

A Study on the screening method of periodontal disease that combined saliva test and self-reported items of subjective symptom

The LION Foundation for Dental Health¹, Department of Operative Dentistry², Department of Preventive Dentistry and Dental Public Health³, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○MORITA Toyoko¹, YAMAZAKI Yoji¹, YUNOUE Shiho¹, ISHII Takanori¹, FUJITANI Morioki², SENDA Akira², NAKAGAKI Haruo³

【研究目的】

集団健診における歯周病のスクリーニングには、通常、C P I が用いられているが、検査に時間を要し、受診者の負担も大きいことから、歯周病の簡易な検査法が求められている。演者らは、唾液を用いて歯周病を簡易に判定できる検査法を検討しており、ヘモグロビン、白血球が歯周病と関連していることから、唾液中からこれらを検出することでその判定が出来るものと考えた。しかし、喫煙習慣があると歯周病が進行していても唾液中の炎症成分が低値になることが報告されており(木林ら, 2008)、唾液検査だけでは歯周病罹患を見逃す可能性がある。一方、進行した歯周病のスクリーニングには自覚症状から成る質問紙調査が有効であることが報告されている(小山ら, 2008)。そこで、唾液検査と自覚症状から成る質問紙調査との組み合わせによる歯周病スクリーニング法を検討した。

【対象および方法】

対象は、某事業所の歯科健診を受診した成人のうち、本試験への参加に同意が得られた477名(平均年齢36.7歳、男性367名、女性110名)とした。唾液検査指標の評価に用いた試料は、3mlの蒸留水を口にふくみ、10秒間軽く洗口した後の吐出液とした。唾液検査指標はヘモグロビン、蛋白質、白血球および濁度とした。ヘモグロビン、蛋白質および白血球は、検査紙(アークレイ社製)を用いて反射率により測定した。濁度は660nmの吸光度により求めた。質問紙調査項目としては、自覚症状(歯茎から血がでることがある、歯茎が赤っぽい、食べ物がはさまりやすい、口の中が乾く感じがする、ぐらぐらする歯がある、固いものが噛みにくいなど12項目)および喫煙習慣、年齢とした。歯周病の診査はC P I測定により行い、歯周ポケット有りと無しに分類した。各唾液検査指標については、t検定により歯周ポケット有無との関連性を検討し、さらに、ROC曲線から感度、特異度を算出して検出感度の高い唾液検査指標を選択した。自覚症状の項目についてはカイ二乗検定により、歯周ポケット有無と関連がある項目を選択した。さらに、唾液検査と質問紙調査を組み合わせたときの感度、特異度を算出することにより、最適組み合わせを検討した。解析ソフトはJMPを用い、有意水準は5%とした。本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認(承認番号197)を受け遂行された。

【結果】

1. 唾液検査指標ではヘモグロビン、蛋白質、白血球、濁度のいずれにも歯周ポケット有無と有意な関連性が認められ、ヘモグロビンが最も高い検出感度を示した。2. 自覚症状では、「歯茎から血が出ることがある」、「歯茎が赤っぽい」、「食べ物がはさまりやすい」、「ぐらぐらする歯がある」、「固いものが噛みにくい」の5項目に歯周ポケット有無との有意な関連性が認められ、5項目を組み合わせることにより高い検出感度が認められた。さらに、喫煙習慣、年代を加えることにより検出感度は高まった。3. 唾液検査と質問紙調査の組み合わせでは、ヘモグロビンが陽性または、自覚症状5項目、喫煙習慣、年代のうち4項目以上該当の場合に陽性と区分した時に最も高い検出感度を示した。

【考察】

歯周病のスクリーニング法として、唾液検査と自覚症状項目を組み合わせることにより高い検出感度が得られた。自覚症状の中で、血がでることがある、ぐらぐらする歯がある、噛みにくい、という質問項目は、歯周病と関連することが報告されている(Genco, 2007, Dietrich, 2007)。唾液検査のみでは、喫煙などの影響により歯周病に罹患していても陰性になることがあるが、自覚症状と組み合わせることにより、歯周病の検出感度が高まったと考えられる。

【結論】

唾液検査と自覚症状の質問紙調査との組み合わせは、産業歯科活動の現場で活用できる簡易な歯周病のスクリーニング法として有用であることが示唆された。

会員外共同研究者：細久保和美、武儀山みさき

東京歯科大学水道橋病院総合歯科における歯周外科手術の概要

東京歯科大学口腔健康臨床科学講座¹, 歯周病学講座²

○早川裕記¹, 井田 篤¹, 大田 恵¹, 古澤成博¹, 槇石武美¹, 齋藤 淳²

Surgical periodontal therapy at General Dentistry, Tokyo Dental College Suidobashi Hospital:
A statistical profile in 2010

Department of Clinical Oral Health Science¹, Department of Periodontology², Tokyo Dental College
OHAYAKAWA Hiroki¹, IDA Atsushi¹, OTA Kei¹, FURUSAWA Masahiro¹,
MAKIISHI Takemi¹, SAITO Atsushi²

【研究目的】

歯周外科治療は、主に歯周基本治療では十分な改善が得られなかった症例、解剖学的な形態異常や審美障害が認められる症例に行われる。実施においては適切な診断のもと、症例や適応症を選択することが求められる。今回、我々は所属診療科における歯周外科治療の現状を把握することを目的とし、実施状況について検討した。

【材料および方法】

東京歯科大学水道橋病院総合歯科において、2010年4月から2011年3月までの期間に行われた歯周外科治療を対象に調査を行った。調査は、1. 症例基本情報 2. 歯周外科の種類 3. 手術部位 4. 初診時および基本治療後の歯周パラメーターの項目を含む記録用紙を使用し、歯周外科治療を行う毎に術者が記載し、自己申告する方法で行った。データは単純集計を行い、同一患者に複数回手術を行った場合、別症例として集計した。

【結果】

合計69名の患者(男性28名, 女性41名)に対し歯周外科治療が行われ、症例総数は112であった。手術時の患者年齢は、平均51.4歳(男性50.8歳, 女性52.4歳)であった。すべて全身状態は良好であったが、基礎疾患として高血圧、糖尿病、甲状腺疾患を有する者が含まれていた。喫煙者は、男性5名, 女性2名であり、全体の10.1%であった。手術は合計17名(臨床経験2年~23年)の術者により行われた。主な手術部位の初診時のプロービングデプス(PD)(最深部)は平均7.3mmであり、歯周基本治療後は平均6.6mmであった。初診時にプロービング時の出血(BOP)が認められた部位は平均83%であったが、歯周基本治療後には43%であった。口腔清掃状態は、初診時において平均PCR46%であったが、基本治療後は31%であった。手術部位(歯)の動揺度は平均0.6であり、37%は根分岐部病変を伴っていた。手術の内訳は、フラップ手術79例, 歯周組織再生療法27例, 歯周形成外科6例であった。歯周組織再生療法としては、エナメルマトリックスメドセラピー(EMD)または骨移植が選択されていた。手術対象部位は上下顎前歯部が全体の80%で、下顎前歯部は最も少なく9%だった。

【考察】

歯周外科治療は、上下顎前歯部に多く行われており、これらの部位は解剖学的に複雑で、前歯と比較して基本治療後に歯周ポケットが残存しやすいことが再確認された。3mm以上の歯周ポケットへのSRPは、歯石が残存する可能性が報告されている。深い歯周ポケットに対し歯周外科を行う必要性があり、前歯部への適応が大部分を占めた。また、歯周基本治療によって炎症は軽減したが、口腔清掃状態への対応には改善の必要性が示された。今後、再評価の結果も含めて検討を行う予定である。

Er: YAG レーザーによる SRP 治癒効果および菌血症予防効果の検討

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野¹
新潟大学医歯学総合病院 歯科総合診療部²

○小松康高¹, 両角俊哉¹, 小林哲夫², 阿部大輔¹, 岡田 萌¹, 奥田一博¹, 中曾根直弘¹,
吉江弘正¹

Effects of Er: YAG laser on prevention of bacteremia caused by scaling and root planning
Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences¹
General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital²
○KOMATSU Yasutaka¹, MOROZUMI Toshiya¹, KOBAYASHI Tetsuo², ABE Daisuke¹, OKADA Moe¹,
OKUDA Kazuhiro¹, NAKASONE Naohiro¹, YOSHIE Hiromasa¹

【目的】

歯周基本治療の scaling root planning (SRP)においては、出血の際に細菌が血液中に混入することで頻繁に一過性の菌血症が生じる。一方、このことが感染性心内膜炎リスク患者などに対して重篤な影響を及ぼすことがある。本研究は、Er: YAG レーザーと従来の手用スケーラーによる臨床治癒効果および菌血症の発生頻度を比較検討することを目的とした。

【材料および方法】

対象は新潟大学医歯学総合病院歯周病診療室を受診し、インフォームドコンセントの得られた以下基準を満たす全顎的に中等度～重度慢性歯周炎患者 20 名 (レーザー群: 10 名、ハンド群: 10 名) とした。

- ① 残存歯数 18 本以上、1/4 口腔に pd=5mm 以上の歯が 3 本以上あること。
- ② プラークコントロールが確立されており、縁上スケーリングまで終了していること。
- ③ 全身疾患、妊娠がないこと。
- ④ 3 ヶ月以内に歯周治療の既往がなく、抗菌薬を内服していないこと。

ベースライン時に歯周ポケット内細菌検査(*Streptococcus*, *P.intermedia*, *P.gingivalis*, *T.forsythensis*, *T.denticola*, *F.nucleatum*)、臨床パラメーター (残存歯数、PPD、CAL、%BOP、PCR) 評価と採血を行った。各群とも局所浸潤麻酔下にて、レーザー群は Er: YAG レーザー (Erwin AdvEr[®], モリタ社, パネル設定=100mJ, 10pps)、ハンド群は手用スケーラー (Gracey curette, original standard, Hu-Friedy) 各々単独にて SRP を行った。また、SRP 開始 6 分後に採血し、菌血症発生頻度について調べた。1 ヶ月後、再び歯周ポケット内細菌検査および臨床パラメーター再評価を行なった。P<0.05 を有意水準とした。

【結果】

臨床パラメーターは両群とも、術前に比較し術後で有意に改善が見られたが、ハンド群で%BOP のみ有意差が認められなかった。ポケット内細菌検査では、レーザー群では総菌数と *F.nucleatum* 以外の全ての細菌で減少傾向を示し、また *P.intermedia* の有意な減少が認められた (P=0.02)。一方、ハンド群では *P.gingivalis* のみで減少傾向が認められ、その他で有意差は認められなかった。培養検査の結果、菌血症の発生頻度はハンド群: 80%(8/10 人)、レーザー群: 0% (0/10 人) であった。主な検出細菌は α -streptococcus, *Fusobacterium* などであった。

【考察】

Er: YAG レーザーによる SRP の臨床効果については、日本歯周病学会ポジションペーパーにも記載されており、比較的コンセンサスが得られている。一方、本研究においてレーザー群で一過性の菌血症の発症が抑制されたが、①歯周ポケット底での組織損傷の抑制 ②レーザーによる歯肉縁下細菌に対する殺菌効果が考えられる。すなわち、Er: YAG レーザーでの SRP はチップ先端がポケット底上皮に触れず、また熱エネルギーによる殺菌効果が期待できたことによると思われる。

【結論】

以上より、Er: YAG レーザーによる SRP は従来の手用スケーラーによる方法と比較し、同等の臨床的効果が期待でき、菌血症予防に有効なことが示唆された。

グレイシースクレーラーによるヒト象牙質の搔爬試験 (切れ刃のすくい角と表面粗さの関係)

東京都市大学大学院工学研究科 機械工学専攻¹
 東北大学大学院歯学研究科 口腔生物学講座歯内歯周治療分野²
 ○石澤知寛¹, 佐藤秀明¹, 石幡浩志², 島内英俊²

Scratch test of Human Dentin by Gracey Curette
 (Relationship between Rake Angle of Cutting Edge and Surface Roughness)

Graduate School of Engineering, Tokyo City University¹, Division of Periodontology and Endodontology, Tohoku
 University Graduate School of Dentistry²
 ○ISHIZAWA Tomohiro¹, SATO Hideaki¹, ISHIHATA Hiroshi², SHIMAUCHI Hidetoshi²

[緒言]

歯周治療には、炎症の消退および組織再生のため、歯周組織との付着を喪失した歯根面の清掃および平滑化が必須である。多くの研究者が、鋼製スクレーラーによるスケリングについて報告しているが、スクレーラーが手指による把持のため、切れ刃に作用する荷重や、切れ刃のすくい角を一定に保てなかった。本研究においては、グレイシースクレーラーを保持し、固定するジグを製作した。搔爬における、垂直荷重およびすくい角を一定にし、搔爬条件を規格化し、ヒト象牙質表面を搔爬するシミュレーションを実施した。これより、グレイシースクレーラーの切れ刃のすくい角が、搔爬面性状に及ぼす影響について検討した。

[方法]

搔爬を実施する象牙質試験片として、ヒト抜去歯を歯軸に沿って切断、ヒト象牙質の平滑面を製作し、この平滑面を用いた。次に、この面をGC 砥粒の耐水研磨紙の#600 および#1200を用いて研磨し、初期粗さを $Ra \approx 0.25\mu\text{m}$ 以下にした。この試験片に対し搔爬試験を行う際、切れ刃のすくい角 α (図1)を一定に保持するジグを製作した。このジグには、搔爬中に刃部に加わる垂直荷重によるたわみによって、すくい角 α が変化することを防止するための支柱を付加し剛性を高めた。搔爬には、特型平面摩耗試験機(東洋精機製作所社製)を用いた。グレイシースクレーラーは#G7(YDM 社製)を用いた。搔爬試験の際に、スクレーラーに、一定の垂直荷重 F を加えた。 F は、 $F=2.0\sim 4.9\text{N}$ 、搔爬回数 N は、 $N=5\sim 20$ 回、搔爬距離 L は $L=3\text{mm}$ 、すくい角 α は $\alpha=6^\circ\sim 14^\circ$ 、平均搔爬速度 V を $V=6\text{mm/s}$ とした。試験は各条件にて 10 回ずつ行った。搔爬面の表面粗さは、触針式表面粗さ計(ミツトコ社製 サーフテスト SJ-400)にて算術平均粗さ Ra 、最大高さ Rz を計測した。また、搔爬面性状は、デジタルマイクロSCOPE(キーエンス社製 VH-5000)により観察した。本研究においては、搔爬痕最大深さ Δh は、 Rz の値を用いた。

[結果と考察]

デジタルマイクロSCOPEにより、グレイシースクレーラーの搔爬面は掬い取られたような面が観察された。これはグレイシースクレーラーは、切れ刃が直線ではなく、わずかに円弧を描いているため、その形状が転写されたと考えられる。また、図2の結果より、 Ra および Δh は、すくい角 α の増加に伴い、減少していく傾向がある。これより、切れ刃のすくい角によって、切削量および表面粗さの調整が可能になるものと思われる。

[結論]

これまでのスケリングの研究においては、手指による把持で実験が行われてきたため、実験結果に対する定量評価が困難であったが、本研究においては専用ジグと搔爬試験器を用いたことで、スケリング実験の再現性を確保し、実験結果の定量評価を行うことができた。本研究の結果を用いれば、最適な根面滑沢を得るための、トレーニングに応用できるとと思われる。

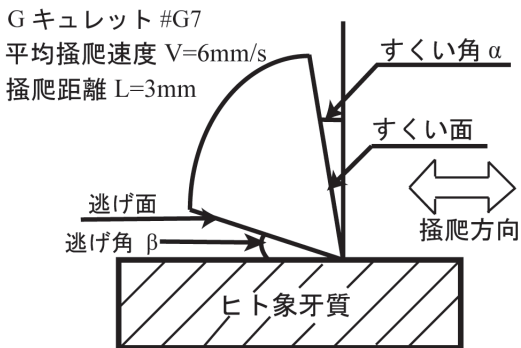


図1 グレイシースクレーラーおよび試験片

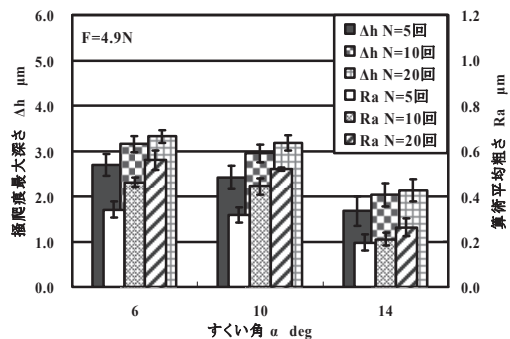


図2 すくい角 α と Ra , Δh の関係

歯肉に炭素ローラーが与える影響

京都府立医科大学大学院医学研究科 歯科口腔科学¹, 京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫学²
宇治徳洲会病院歯科口腔外科³, 国保京丹波町和知歯科診療所⁴

○本城賢一^{1,2}, 山本俊郎¹, 山本健太^{1,2}, 市岡宏顕^{1,2}, 西垣 勝¹,
中村 亨^{1,3}, 坂下敦宏^{1,4}, 喜多正和², 金村成智¹

Effect of carbon roller for human gums

Department of Dental Medicine¹, Department of Immunology², Kyoto Prefectural University of Medicine
Graduate School of Medical Science, Department of Oral Surgery and Dentistry, Uji Tokusyukai
Hospital³,

Kokuho Kyotambacho Wachi Dentistry Medical Office⁴

○HONJO Kenichi^{1,2}, YAMAMOTO Toshiro¹, YAMAMOTO Kenta^{1,2}, ICHIOKA Hiroaki^{1,2}, NISHIGAKI Masaru¹,
NAKAMURA Toru^{1,3}, SAKASHITA Nobuhiro^{1,4}, KITA Masakazu², KANAMURA Narisato¹

【研究目的】

歯周病の予防には、歯周病原因子の影響を直接受ける歯肉を健康な状態に維持することが重要であり、歯肉へのマッサージ効果に関する報告が散見される。また等方性超高密度炭は遠赤外線放射効率がが高く、近年、様々な医療機器への応用が期待されているが、これまでに歯肉に対する影響を検討した報告はみられない。そこで今回我々は、ヒト正常歯肉線維芽細胞株である Gin-1 に対する等方性超高密度炭で作製された炭素ローラーの効果について検討を行った。

【材料および方法】

Gin-1 を 24 穴プレートに 2×10^4 cells/dish 播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 10% FBS/DMEM にて培養。コンフルエントに達した後、炭素ローラーに温熱(37°C、42°C)ならびに振動機能を備えたマッサージローラー(GUM-ROLLER、大木工藝、滋賀)を用い、炭素ローラー単独(3分)群、炭素ローラー単独(5分)群、炭素ローラー+温熱(37°C)(3分)群、炭素ローラー+温熱(37°C)(5分)群、炭素ローラー+温熱(42°C)(3分)群、炭素ローラー+温熱(42°C)(5分)群、炭素ローラー+振動(3分)群、炭素ローラー+振動(5分)群、炭素ローラー+温熱(37°C)+振動(3分)群、炭素ローラー+温熱(37°C)+振動(5分)群、炭素ローラー+温熱(42°C)+振動(3分)群、炭素ローラー+温熱(42°C)+振動(5分)群を作製した。なお、同条件で培養した Gin-1 に炭素ローラーを使用しない群を control 群とした。その後、RNA を抽出し、Real time RT-PCR 法を用いて線維芽細胞増殖作用をもつ Fibroblast growth factor (FGF) および細胞修復促進作用をもつ Nerve growth factor (NGF) の発現について検討を行った。また、全ての群において位相差顕微鏡による Gin-1 の形態学的変化、WST assay による細胞活性を評価した。

【成績】

FGF および NGF mRNA 発現は、control 群と比較して炭素ローラー単独群と炭素ローラー+温熱群において増加傾向を認めたが、振動を併用した群において変化は認めなかった。また、Gin-1 の形態学的変化や細胞活性の変化は本研究で検討を行った全ての群で認めなかった。

【考察】

FGF、NGF は本研究において炭素ローラーにより歯肉線維芽細胞から誘導され、それぞれ線維芽細胞増殖作用、細胞修復促進作用を有することから、炭素ローラーが歯肉の創傷治癒能力の向上に寄与する可能性が示唆された。さらに、その効果は温熱刺激を併用することで増大する可能性が考えられた。炭素ローラーが歯肉に与えるその他の効果も検討するために、今後更なる実験が必要である。

【結論】

FGF、NGF は炭素ローラーにより歯肉線維芽細胞から誘導され、歯肉の創傷治癒能力向上に寄与する可能性が示唆された。さらに、その効果は温熱刺激を併用することで増大する可能性が考えられた。

各種レーザーによるメラニン色素除去効果の比較

松本歯科大学 歯科保存学第1講座¹

松本歯科大学 歯科放射線学講座²

○西田英作¹, 武藤昭紀¹, 窪川恵太¹, 海瀬聖仁¹,
三木 学¹, 小松 寿¹, 内田啓一², 吉成伸夫¹

Comparison of the Degree in Gingival Depigmentation by Laser Treatments

Department of Periodontology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University¹

Department of Oral-Radiology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University²

○NISHIDA Eisaku¹, MUTO Akinori¹, KUBOKAWA Keita¹, KAISE Kiyohito¹,
MIKI Manabu¹, KOMATSU Toshi¹, UCHIDA Keiichi², YOSHINARI Nobuo¹

【研究目的】口腔領域の審美障害のうち、メラニンに代表される歯肉の色素沈着、特に前歯部歯肉における色素沈着を主訴とする患者が増加している。歯肉における着色は、歯肉の健康に対してなんら影響を及ぼさないが、審美的主訴をもつ患者（ホワイトニング前後や、審美性に富む前歯部の補綴物装着）においては、除去が必要不可欠となってくる。従来より、歯肉着色の除去方法は、レーザーによる歯肉の蒸散、カーボランダムを用いた歯肉上皮の機械的削除、薬品による歯肉の腐食などがある。この中で、カーボランダムポイントを用いる方法は、局所麻酔下で行わなければならない、術後疼痛が生じるといった患者への負担がある。レーザーによる処置では、Er: YAG レーザーは表面で100%反応が起こるため、歯肉にチップを接触させる必要がある。一方、炭酸ガスレーザーのエネルギーは表層下0.2mm程度まで到達するため、非接触下にて対応できるといった、レーザーごとに特徴がある。これまで、レーザーを用いた歯肉着色の除去にはさまざまな報告があるが、今回、喫煙患者における著明なメラニン色素沈着に対する除去効果を数値化し、術前、術後で比較した。同一口腔内、同一施術者によって着色除去を行うことにより、レーザーによるメラニン色素の除去効果において興味深い結果を得たので、報告する。

【方法】患者は37歳男性で、1日15本、16年間の喫煙習慣がある。上下顎第一小臼歯間の唇側歯肉に著明なメラニン色素沈着を認めた。色素沈着は黒褐色で左右対称的に境界明瞭であり、特に付着歯肉や歯間乳頭部で著明であった。口唇や口角の皮膚にも着色や乾燥が認められた。また、全顎の歯面に着色が見られ、特に下顎前歯部舌側、上顎右側臼歯部に強く認められた。色素沈着の著しい部位は、上下顎ともに犬歯遠心間であったため、処置部位を上顎右側、上顎左側、下顎左側、下顎右側の4ブロックに分割し、患者の同意のもと、上顎右側をカーボランダムポイントで、上顎左側をEr: YAGレーザーで、下顎左側は未処置、下顎右側は炭酸ガスレーザーにて2週間に一度、処置を行った。歯科用レーザー装置はEr: YAGレーザー (Erwin AdvErL, 株式会社モリタ、東京)、炭酸ガスレーザー (OPELASER Lite, 株式会社ヨシダ、東京) を使用した。また、カーボランダムポイントは、No13、24、28 (松風CA, 株式会社松風、京都) を使用した。規格写真として、患者を水平位にし、頭部正面観から45度側方に傾斜させ、術前術後の口腔内写真を撮影した。撮影場所、撮影者は全て同一術者にて行った。各装置のメラニン着色の効果はImage J (ver1.44, NIH, Bethesda) を使用し、算出した。術者と患者が満足した歯肉の色調をもって処置終了とした。

【結果および考察】Er: YAGレーザーでは、1回目から3回目までほとんど着色除去はできなかった。しかし、4回目以降より着色除去率が高くなり、10回目で患者の満足いく歯肉の色調になった。患者は、わずかな術中の痛みを感じた。炭酸ガスレーザーは2回目までほとんど着色除去はできなかったが、3回目以降より着色除去率が高くなり、10回目で患者の満足いく歯肉の色調になった。炭酸ガスレーザー処置では術中に疼痛の発現はなかった。カーボランダムポイントでは、施術2回目で患者の満足いく歯肉の色調になった。歯科用レーザーにおける歯肉のメラニン色素沈着の除去効果は、Er: YAGレーザーと炭酸ガスレーザー間で差はなかった。また、レーザー蒸散によるメラニン色素症の処置は、カーボランダムポイントによる機械的削除より患者に苦痛を与えることが少なかった。今後、色素沈着の後戻りに対する効果も比較検討する予定である。

【結論】色素沈着症の処置は、痛みや施術回数を踏まえ、患者のニーズに合わせた方法を選ぶべきである。

エア・ポリッシング後の象牙質に対する *Streptococcus mutans* の付着

日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座
○多田和弘, 織田洋武, 稲富道知, 佐藤 聡

Streptococcus mutans adhesion on air-polishing dentin

Department of Periodontology, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata
○TADA Kazuhiro, ODA Hirotake, INATOMI Michitomo, SATO Soh

【研究目的】デンタルプラークは、歯肉炎や歯周炎の主な原因であり、Professional mechanical tooth cleaning (PMTC) は、歯肉縁上、縁下に存在するデンタルプラークを機械的に除去し、歯質表面を滑沢にすることを目的としている。現在 PMTC には、キュレットや超音波スケーラー、ラバーカップ、さらにエア・ポリッシングなどが使用されている。エア・ポリッシングの利点は、プラークの除去におけるキュレット、超音波スケーラー、ラバーカップの使用に対する高い効率性といえる。エア・ポリッシングで使用されている微粒子は、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) 粒子と、近年開発されたグリシン粒子の2種類である。 NaHCO_3 粒子を使用して、エア・ポリッシングを行った試料表面は、ラバーカップを使用した後の試料表面と比較して粗さが増加し、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) の付着量の増加が認められたとの報告がある。グリシン粒子は、 NaHCO_3 粒子と比較して、水溶性が高く、モース硬度が低い。グリシン粒子を使用したエア・ポリッシングは、 NaHCO_3 粒子を使用したエア・ポリッシングと比較し、有意に象牙質表面の破壊が少ないとの報告がある。しかし、 NaHCO_3 粒子とグリシン粒子を使用した後の、象牙質表面の規格化された粗さに対する、*S. mutans* の付着を検討した報告は少ない。本研究の目的は、エア・ポリッシング後の、象牙質表面の規格化した粗さに対する、*S. mutans* の付着を検討することである。

【材料および方法】象牙質ブロック (4×4×1mm) は、ラバーカップと研磨粒子を併用し、低速回転で5秒間の研磨を行った (コントロール)。エア・ポリッシングの条件は、エア・ポリッシャー (AIR-FLOW® SII, EMS, Nyon, Switzerland) のノズル先端と象牙質面間距離を6mmとし、象牙質面に対して45°の角度で、3種類の粒子を噴射条件毎に6歯に対して5秒間噴射した。粒子は、粒子径が65 μm の NaHCO_3 粒子 (CLASSIC)、粒子径が25 μm のグリシン粒子 (PERIO)、粒子径が65 μm のグリシン粒子 (SOFT) の3種類を使用した。エア・ポリッシング後の象牙質表面の粗さは、レーザ顕微鏡 (VK-8500, Keyence, Tokyo, Japan) を使用し、平均粗さ (Ra) にて評価した。象牙質表面に対する *S. mutans* の付着は、獲得被膜を付着させた象牙質のブロックを、*S. mutans* を培養した1%スクロース含有 Brain Heart Infusion (BHI) 溶液内に4時間浸漬させ、*S. mutans* の付着を行った。象牙質表面に付着した *S. mutans* の菌数測定は、Alamar Blue を用いたミトコンドリア活性による還元染色にてその吸光度を測定し、比較・検討を行った。

【結果および考察】粒子の種類における象牙質表面の平均粗さ (Ra) の比較では、CLASSIC を使用したエア・ポリッシングは、コントロール、PERIO、SOFT を使用したエア・ポリッシングと比較し、平均粗さが増加し、統計学的有意差が認められた ($p < 0.01$)。SOFT を使用したエア・ポリッシングは、コントロールと比較し有意な平均粗さの増加が認められたが ($p < 0.01$)、PERIO を使用したエア・ポリッシングは、コントロールと比較し、統計学的有意差が認められなかった。象牙質表面に付着した *S. mutans* 菌数の比較では、CLASSIC を使用したエア・ポリッシングは、コントロール、PERIO、SOFT を使用したエア・ポリッシングと比較し、象牙質表面に付着した *S. mutans* の菌数増加が認められた。PERIO、SOFT を使用したエア・ポリッシングは、コントロールと比較し、象牙質表面に付着した *S. mutans* 菌数に変化は認められなかった。この結果から、グリシン粒子を使用したエア・ポリッシングは、粒子の大きさに関係なく、 NaHCO_3 粒子を使用したエア・ポリッシングと比較し、象牙質の粗さが減少し、*S. mutans* の付着が生じにくいことが示唆された。

歯周治療における抗菌薬の費用と効果についての検討

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座

○加藤智崇, 関野 愉, 沼部幸博

Comparative study on the cost and efficacy of systemic antimicrobials in periodontal therapy

Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Tokyo, Nippon Dental University

○KATO Tomotaka, SEKINO Satoshi, NUMABE Yukihiro

【研究目的】

歯周基本治療において抗菌薬の併用療法が有用であるという報告があり、我が国でも抗菌薬の全身投与が歯周病患者者に使用されている。しかし、日本での歯周治療は保険診療が大半を占めており、歯周治療に使用できる抗菌薬は限られている。この保険制度に沿った歯周治療における抗菌薬の使用について、その費用と効果についての詳細な検討は少ない。そこで我々は、保険制度に沿った歯周治療における抗菌薬の費用と効果について検索した。

【材料および方法】

Medline(PubMed)と医中誌を用いて過去の論文から抗菌薬の歯周治療における評価を検索した。「スケーリング・ルートプレーニングと抗菌薬の併用療法」と「スケーリング・ルートプレーニングのみ」の2群におけるアタッチメントレベルの差から抗菌薬の効果について評価した。抗菌薬の選択は我が国の保険制度で歯周治療に使用できる薬剤に限定した。抗菌薬を使用した場合の副作用、耐性菌の発生等にかかる費用について、今回の研究では組み込まなかった。

【結果・考察】

我が国の歯科臨床で頻用されているセフェム系抗菌薬において歯周治療の研究は乏しく、速やかにセフェム系抗菌薬の歯周治療の評価が必要であることがわかった。

歯科臨床においてもジェネリック薬品の使用頻度が増加してきているが、ジェネリック薬品を用いた歯周治療の研究は見当たらなかった。ジェネリック薬品の効果が先発薬品と同様の効果を得られるならば、費用対効果はジェネリック薬品が優れている。

個々の研究における抗菌薬の効果に違いがあるため、歯周治療における抗菌薬の使用は慎重に用いるべきである。

【結論】

我が国の保険制度に沿った歯周治療における抗菌薬の使用について、その費用と効果について検索した。その結果、現在、臨床で頻用されている抗菌薬の一部において歯周治療の評価が乏しいため、更なる研究が必要である。

塩化亜鉛溶液を用いた洗口による口腔常在フローラの変化

福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野¹

日本大学歯学部 化学²

○鈴木奈央¹, 中野善夫², 畑野優子¹, 米田雅裕¹, 横瀬勝美², 桑田文幸², 廣藤卓雄¹

Change of oral microflora by washing mouth with zinc chloride-solution

Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College¹

Department of Chemistry, Nihon University School of Dentistry²

○SUZUKI Nao¹, NAKANO Yoshio², HATANO Yuko¹, YONEDA Masahiro¹, YOKOSE Katsumi², KUWATA Fumiyuki², HIROFUJI Takao¹

【研究目的】

口臭は口腔より発せられる不快な臭気である。市販の洗口剤には口臭対策を目的とするものも多く、口臭物質の中和や臭気の隠蔽の役割を担っている。塩化亜鉛は、洗口剤の口臭抑制成分として利用され、亜鉛の口臭抑制作用は、口臭の主な原因物質である揮発性硫黄化合物 (volatile sulfur compound, VSC) と直接結合し VSC 産生を阻害することであるとされている。また亜鉛イオンは、微生物の解糖系を阻害し抗菌作用を示すことによっても VSC 産生の抑制に貢献すると考えられている。しかしながらこれまでに *Porphyromonas* 属や *Fusobacterium* 属等の、ごく一部の細菌種の変動しか調べられておらず、細菌叢全体にどのような影響をもたらすのかは明らかになっていない。そこで本研究では、塩化亜鉛溶液による洗口実験を実施し、唾液中の口腔常在フローラの変動を調べた。

【方法】

福岡歯科大学歯学部学生 21 名を対象に、市販水で 3 日間、続いて 0.1%塩化亜鉛溶液で 3 日間洗口を行った。洗口は一日 3 回、5 mL 液で 1 分間実施した。洗口開始前日と 3 日目の終業後、3 日目は昼食後の洗口から 5 時間後に、刺激唾液を採取した。唾液サンプルから抽出した細菌 DNA について、16S rRNA 遺伝子を利用した terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 法および高速シーケンス解析法によって細菌構成の決定を行った。

【結果と結論】

分析対象者 20 名 (男性 14 名、女性 6 名、平均年齢 24.4 ± 2.2 歳) について、市販水による洗口前後と塩化亜鉛溶液による洗口前後の細菌構成の変化を T-RFLP 法を用いて比較した。その結果、塩化亜鉛溶液による洗口後は T-RF ピーク数の減少がみられ、細菌叢がより単純化することが示唆された。次に高速シーケンス法を用いて、塩化亜鉛溶液による洗口前後で変化する細菌種を同定したところ、表に示す細菌種の増減がみられた (出現頻度が 3 サンプル以上の菌種に限定)。菌叢が単純化するため、常在菌と呼ばれる *Streptococcus salivarius* などの *Streptococcus* 属細菌の割合が上がるのがわかった。他に、*Rothia* 属、*Prevotella* 属細菌で上昇がみられた。一方、*Porphyromonas* 属細菌などが減少したが、特定の種が特異的に除去されるというほど顕著な変化はみられなかった。塩化亜鉛溶液による継続した洗口によって口腔常在フローラが単純化し、構成する菌種の変動が起こることが示唆された。

亜鉛洗口後に割合の増加した菌種 (≥2)	亜鉛洗口後に割合の増加した菌種 (≥1)	亜鉛洗口後に割合の減少した菌種 (1>)
<i>Campylobacter concisus</i>	<i>Streptococcus mitis</i> bv 2	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
<i>Rothia mucilaginos</i>	<i>Streptococcus parasanguinis</i> II	<i>Neisseria flavescens</i>
<i>Streptococcus vestibularis</i>	<i>Granulicatella adiacens</i>	<i>Capnocytophaga</i> sp.
<i>Streptococcus cristatus</i>	<i>Prevotella histicola</i>	<i>Gemella haemolysans</i>
<i>Actinomyces</i> sp.	<i>Veillonella atypica</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Granulicatella adiacens</i> [para-adiacens]	<i>Porphyromonas</i> sp.
<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	<i>Leptotrichia</i> sp.
<i>Rothia</i> sp.	<i>Streptococcus infantis</i>	<i>Gemella morbillorum</i>
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	<i>Solobacterium moorei</i>	<i>Terrahaemophilus aromaticivorans</i>
<i>Gemella sanguinis</i>	<i>Streptococcus</i> sp.	
<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	
<i>Streptococcus peroris</i>	<i>Streptococcus australis</i>	
TM7 [G-1] sp.		
<i>Prevotella melaninogenica</i>		
<i>Abiotrophia defectiva</i>		
<i>Veillonella parvula</i>		
<i>Prevotella</i> sp.		
<i>Corynebacterium durum</i>		
<i>Streptococcus parasanguinis</i> I		
<i>Streptococcus salivarius</i>		

鑄造ポストの除去方法に関する基礎的検討
—従来型ポストコアリムーバーと改良型ポストコアリムーバーの比較—

王喜齒科医院
○小西秀和

Basic Investigation for Removing Method of Cast Posts
—To Compare a standard-type Post and Core Remover
with an improved-type Post and Core Remover—

Ouki Dental Clinic
○KONISHI Hidekazu

【研究目的】

歯科医療において、鑄造ポストの除去処置は困難で、除去後に歯根破折などのトラブルが起こるケースが少なくない。このことから患者に快適で安全・安心な歯科医療を提供するためには、修復物除去の時間短縮 (Speedy)、除去の確実性 (Sure)、患者への最小限の侵襲および安全性 (Safe) を考慮する必要があると考えられる (3S)。そこで本研究では、より容易に 3S をクリアできる鑄造ポストの除去方法について、抜去歯からのメタルコア (鑄造ポスト) の除去を行い、これまでのポストコアリムーバー (以下 PR, YDM) とその改良型を用いて臨床的有用性の比較検討を行った。

【材料および方法】

鑄造ポストの装着されているヒト抜去歯 32 本を 2 群に分け、鑄造ポストを従来型 PR で除去した群を R 群、改良型 PR (従来型 PR に把握力を緩衝調節できる板バネを一枚のみ付与した構造の試作品) で除去した群を RS 群と定義した。R 群および RS 群両群とも、FG ジェットカーバイドバー #1970 (松風) を用いて、唇 (頬) 側面と舌 (口蓋) 側面のコアの金属マージン部にポストに達する深さまで切れ込みを入れた。さらに二種類の PR の先端の嘴部を、おのおのこの二カ所の切れ込みに適合させ、鑄造ポストの方向 (歯の中心方向) へ少しずつ PR の把握力を加えながら、ポストを脱離させて除去した。その際に、鑄造ポスト除去に要した時間やポスト部の長さの測定を行い、さらにニシカ カリエスチェック (日本歯科薬品) を用いて、ポスト除去部の歯質の染め出しをすることにより、歯根破折線の有無およびその長さなどを評価した (色素浸入試験)。

【結果および考察】

ヒト抜去歯の鑄造ポストの除去は、上記のいずれかの方法を用いてもすべて 5 分以内に除去できた [R 群:16/16, RS 群:16/16(単位:本)]。PR の種類別の鑄造ポストの除去時間の平均は、R 群 120±70 秒、RS 群 103±76 秒であり、RS 群は R 群に比較して除去時間の平均がやや短い傾向にあったものの、両群間で有意差はなかった (Mann-Whitney *U* test, $P \geq 0.05$)。除去した鑄造ポストの長さの平均は、R 群 6.1±1.5mm、RS 群 6.1±1.4mm であり、両群間で有意差はなかった (Mann-Whitney *U* test, $P \geq 0.05$)。また、最小の太さの FG ジェットカーバイドバー #1970 を用いたことから、鑄造ポスト除去時の歯質の削除による侵襲を可及的に小さくできていた。さらに、鑄造ポストの除去に二種類の PR を用いたことによる除去歯の歯根破折は、色素浸入試験においてほとんど観察されなかった。

【結論】

以上のことから、二種類の PR はともに迅速・確実・安全 (3S) に鑄造ポストを除去できる可能性が示唆された。さらに、改良型 PR の方が従来型 PR に比較して、除去時間が短い傾向にあることが経験された。

(研究協力者: 株式会社 YDM 営業部 土屋秀昭氏)

永久歯に内部吸収のみられた歌舞伎メイキャップ症候群の1例

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¹,
東北大学大学院歯学研究科 口腔機能形態学講座 口腔器官構造学分野², 国立成育医療センター³
○小林洋子¹, 金田一孝², 金田一純子³, 小松正志¹

A case of Kabuki make-up syndrome with internal resorption in permanent teeth

Division of Operative Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry¹, Division of Oral and Craniofacial Anatomy, Tohoku University Graduate School of Dentistry², National Center for Child Health and Development³
○IWAMATSU-KOBAYASHI Yoko¹, KINDAICHI Koji², KINDAICHI Junko³, KOMATSU Masashi¹

【研究目的】

歌舞伎メイキャップ症候群は、新川ら、黒木らによって1981年に初めて報告された新しい症候群であり、特異な顔貌、骨格異常、皮膚紋理異常、精神発達遅滞、発育不良の5主徴を有する。この5主徴のうち顔貌、特に目に特徴があり、切れ長眼裂、下眼瞼の外反、アーチ型の眉といった日本伝統芸能である歌舞伎役者のメイキャップに似ていることから名づけられている。近年、常染色体性優性遺伝(818q-)であるとの報告もある。

本症候群は、以上の5主徴の他に口唇口蓋裂が41-71%で合併し、側切歯欠損の報告もある。今回、我々は本症候群の1例において、両側上顎中切歯が内部吸収を起こし、そのうち破折したため抜歯に至った左側中切歯を組織学的に検討したので報告する。

【材料および方法】

歌舞伎メイキャップ症候群と診断された13歳4カ月女子の上顎左側中切歯が破折したため抜歯した。抜歯した歯は、4%パラホルムアルデヒドにて固定、EDTAにて脱灰後、パラフィン切片を作製した。H-E染色を施し、光学顕微鏡(キーエンスBZ-9000)にて観察した。

【結果】

本症例の中切歯は、両側ともに外傷の既往はなく、短根歯であった。肉眼的にピンク色を呈し、レントゲンのには内部吸収が認められた。

破折のため抜歯となった左側中切歯を組織学的に観察したところ、象牙質の吸収が広範囲において認められ、吸収窩には多核の破歯細胞が観察されることもあった。また、吸収窩に置換性の骨様組織が観察されることもあった。骨様組織はときに層板構造を呈することもあった。

【考察】

これまで、歌舞伎メイキャップ症候群における歯の内部吸収に関する報告はない。本症例では、両側上顎中切歯にレントゲンのに内部吸収が認められたが、外傷や矯正治療等の既往はなかった。左側が破折したために抜歯となり、組織学的に観察したところ、広範囲に象牙質の吸収が認められ、同部において破歯細胞や置換性骨様組織が観察された。内部吸収の発生機序と歌舞伎メイキャップ症候群との関係はまだ不明であるが、今後も注意深く経過を観察する必要があると思われる。

【結論】

歌舞伎メイキャップ症候群の1例にみられた内部吸収をおこした永久歯について組織学的に検討したところ、広範囲に象牙質の吸収が認められ、同部において破歯細胞や置換性骨様組織が観察された。

新規開発した酸化マグネシウム系 MgO Sealer に対するマウス皮下組織の反応

松本歯科大学 歯学部 歯科保存学第二講座¹, 同大学院 歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座²

○佐藤将洋¹, 山本昭夫^{1,2}, 笠原悦男¹

Subcutaneous Tissue Reactions to Newly-Developed MgO Sealer in Mice

Department of Endodontics and Operative Dentistry, School of Dentistry¹, Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine², Matsumoto Dental University

○SATO Masahiro¹, YAMAMOTO Akio^{1,2}, KASAHARA Etsuo¹

【目的】新規に開発した酸化マグネシウム系 MgO Sealer (MS ; ネオ製薬) について, ISO10993-6 (Biological evaluation of medical devices: Part 6. Test for local effects after implantation) に準拠した皮下埋入試験を実施し, その皮下組織反応から生体への安全性を検討した.

【材料と方法】 被検検体は新規に開発した酸化マグネシウム系シーラー-MgO Sealer で, 既製品の Finapex APC (FP: 京セラ), Sealapex (SP: Kerr) と AH Plus (AH: Dentsply) を対照として用いた. これらを直径約 10mm, 厚さ 0.1~1 mm の円盤状にその形態を成型した. 埋入に先立ち, イソフルランの吸入による全身麻酔を施し, 術台上に載せた. 背部の手術野を電気バリカンで剃毛, 酒精で拭掃した後, 正中を挟み左右 2ヶ所の埋入部皮膚にピクリン酸飽和エタノールで目印 (大きな×印) を付けた. なお, このマーキングは経時的消失を防ぐ為適宜繰り返して行った. 各検体は埋入部から約 10 mm 離れた部にメスにて切開を加え, そこから挿入し, 目印部直下の皮下組織内に留め置いた. 傷口は縫合糸にて一針縫合するとともに, 外科用瞬間接着剤の塗布処理を施した. 埋入期間の 1 週および 12 週経過時に検体埋入部位を周囲組織と共に一塊として摘出し病理組織学的に評価した.

【結果と考察】 マウスの背部皮下に埋入し 1 週経過した標本では, 埋入部の被検材料 MS は多少崩壊し, 標本上では黒褐色の粒子状構造物の集塊として観察され, その部にエオシン好染の無構造物質が交じり合っている部もあった. その一部は標本上から脱落していた. 周囲に一層の壊死層が形成され, これはエオシンに比較的均質に染色され観察された. 下層部には, 線維芽細胞が多数増殖して肉芽組織を形成していた. 増殖した肉芽組織の一部には多少の出血巣が認められた. 埋入 12 週の標本では, 被検材 MS 周囲の一層の壊死層を境に増殖した肉芽組織の主たる構成細胞はマクロファージで, その胞体内に顆粒状の構造物を多量に容れており, 同細胞は被検材料 MS の崩壊成分を活発に貪食していることが確認できた. 一方対照の FA, SP と AH についてもほぼ同様な組織反応であった. MS の 12 週の標本においては比較的線維化した被膜が形成されていたが, その初期においては材料の成分である酸化マグネシウムによると考えられる傷害性刺激による組織反応, すなわち組織の壊死等が若干引き起こされていた. しかし, これは, 水酸化カルシウムのような強力なものではなかった. その結果として 12 週の標本において被膜形成が確認されたのであろう. なお, 対照として検討した同じ酸化マグネシウムを含有する他社製品である FP の組織反応と比較すると組織反応に類似性があったが, 若干炎症性細胞浸潤の消滅の遅延傾向があった. これは共に酸化マグネシウムを含有しているが, FP が次炭酸ビスマス含有しているのに対し, MS は酸化ビスマスで, この成分の相違によるものと思われる.

【結論】今回開発した酸化マグネシウム系 MgO Sealer は, 被包を形成する初期の肉芽組織に若干の炎症性細胞浸潤があったが, 12 週ではそのほとんどが消失していた. これらの組織反応は, この材料は比較的組織傷害性が弱く安全に使用できることを示唆している.

【会員外共同研究者】中野敬介, 富田美穂子, 松浦幸子, 川上敏行 (松本歯科大学大学院歯学独立研究科)

BMS 患者における唾液中コルチゾルの評価
福岡歯科大学口腔治療学講座歯科保存学分野

○春名千英子, 泉 利雄, 松浦洋志, 諸富孝彦, 柴田太郎, 松本典祥, 國本俊雄, 福田泰子,
水上正彦, 牛尾悟志, 阿南 壽

Association between salivary cortisol levels and BMS
Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of odontology, Fukuoka Dental College
○HARUNA Chieko, IZUMI Toshio, MATSUURA Hiroshi, MOROTOMI Takahiko, EIDA Taro, MATSUMOTO Noriyoshi,
KUNIMOTO Toshio, FUKUDA Yasuko, MINAKAMI Masahiko, USHIO Satoshi, ANAN Hisashi

【背景】

Burning mouth syndrome(BMS)とは口腔粘膜に明らかな病変が認められないにもかかわらず、舌や唇などに灼熱感や痛みを伴う不快な疾病状態をいう。BMSの病因はいまだ不明であり、身体的には局所の微小粘膜障害や神経損傷、全身性の栄養障害や内分泌疾患、精神的には心気神経症、うつ病などの病態が考えられる。一般的な検査では症状を説明するだけの所見が認められないことが多いため、患者の訴える症状を説明する局所の機能的変化や、病態を裏付ける中枢性の変化を解明する必要がある。そこで本研究では、ストレス性内分泌ホルモンであるコルチゾルの変化に着目し、BMSの病態との関係を調べた。

【対象と方法】

81名のBMS患者と年齢および性別をマッチングさせた33名のコントロール群の比較を行った。ケース群は、症状の重症度によって2群に分けた。

BMS1 (41名) : 口腔内の灼熱感および舌のピリピリを時々感じる。

BMS2 (40名) : 口腔内の灼熱感および舌のピリピリをいつも感じる。

本研究に関する十分な説明を行い、文書による同意を得た後、口腔および全身に関する問診、口腔内診査、唾液流量検査などを行った。唾液は、唾液収集用チューブを用いて、ガム法による唾液流出量を測定し、-30℃で保存した。唾液中コルチゾルおよびクロモグラニンAの測定にはそれぞれCortisol ELISAキット(Salimetrics社)、CgA ELISAキット(矢内原研究所)を用いた。統計解析には、SPSS Ver. 11.0 for Windowsを用いた。

【結果】

81名のBMS患者において、コルチゾル値はコントロール群に比べて有意に高い値を示した。次に、BMS1およびBMS2の両群とコントロール群とを比較した結果、それぞれコルチゾル値の有意な上昇を認めた。また、BMS1とBMS2を比較したところ、BMS2においてコルチゾル値の有意な上昇を認めた。多変量解析により、年齢、性別および服用薬の補正を行っても有意性は保たれた。

【考察】

本研究の結果から、BMSと唾液中コルチゾルとの関連性が示唆された。

歯科領域において急増している非歯原性疼痛を訴える患者に対しては、安易に咬合調整や歯牙研磨などの不可逆的な治療のみを行うのではなく、患者の訴えを否定せず良く聞き共感(受容)、良くなることを伝え(支持)、実際に良くなっていることを客観的な検査結果の提示によって説明する(保証)という手続きを踏むことが重要と考えられる。安心感を与え治療を行う簡易精神療法を行うにあたって、唾液中のストレス性内分泌ホルモンの評価は患者対応の一助となる可能性が示唆された。

マウスガードの臨床的使用期間を設定するための基礎的研究

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面機能再建学講座 歯科保存学分野¹
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面機能再建学講座 歯科生体材料学分野²
○富田浩一¹, 蟹江隆人², 徳田雅行¹, 鳥居光男¹

The basic study for clinical using period of mouthguards

Department of Restorative Dentistry and Endodontology¹, Biomaterials Sciences²,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
○TOMITA Kouichi¹, KANIE Takahito², TOKUDA Masayuki¹, TORII Mitsuo¹

(研究目的)

歯科用軟質材料として定義され、口腔内である期間にわたって使用される材料として、軟質裏装材やマウスガードがあげられる。このうち、マウスガードは、歯科医院で作製するカスタムメイドタイプとスポーツ店等で販売されている既製タイプ(ストックタイプ、加熱タイプ)のものが多く、これらの材料の適応と使用法に関しては、基礎的データに乏しく経験的に使われているものが多い。マウスガードに使用されている材料は、アクリル系、シリコン系、ポリオレフィン系、ポリウタレン系、エチレン酢酸ビニル系等広範囲にわたっており、どの材料も程度の差はあっても吸水することが知られている。このことは、使用が長期にわたると材料表面に水分子だけではなく、口腔内の細菌も付着する可能性があると考えられる。細菌の付着が阻害されることについては、細菌自体の増殖が阻害される場合と抗菌剤の薬理作用などにより付着が阻害される場合が考えられる。中には、機械的性質が劣化する前に、細菌の付着量が多くなる材料が存在する可能性も推測されるが、これらに関する研究はほとんど見受けられない。本研究では、マウスガードとして使用されるエチレン酢酸ビニル系カスタムタイプの市販軟質材料について、機械的性質と細菌付着性を経時的に測定して、その使用限界を検討することを目的とした。

(研究方法)

バイオプラスチック (SCHEU-DENTAL) : BP、キャプチャーシート (松風) : CS、MG-21 (CGK) : MG、インパクトガード (GC) : IG の 4 種類を準備し、100°C に加熱して軟化させたものを直径 12mm 高さ 10mm の孔を持つ金型中で、上下からガラス板で加圧成形したものを試料として使用した。これら 4 個の試料について、37°C 水中 3 時間振盪-乾燥-除菌スプレー洗浄-大気中保管 21 時間を 1、7、30、90 および 180 日繰り返す。圧縮弾性率とショア A 硬さおよび表面粗さを経時的に測定した。さらにその後、各試料への細菌付着量を測定するため、*S. mutans* UA159 野生株 (1×10^7 CFU/ml) 5ml あるいは、*C. albicans* 標準株 (1×10^4 CFU/ml) 10ml の懸濁液に 24 時間浸漬した。浸漬終了後、まず試料に付着していない菌を取り除くために洗浄を行い、次に試料に付着している菌を回収し各々の CFU を測定するために、*S. mutans* については、各試料を 5 秒間攪拌して菌液を BHI 寒天培地へ播種し、*C. albicans* については、各試料に 1% トリトン X-100 を 10 分間作用させてクロモアガー・カンジダ培地へ菌液を播種した。塗布 24 時間後の各々の CFU を測定し、細菌付着量を測定した。

(研究結果)

機械的性質に関しては、4 試料間の弾性率が 180 日後に 26~40%、表面硬さが 1.3~6.2% の増加であり、差は小さかった。細菌付着量に関しては、*S. mutans* は、IG 以外の 1 日後と CS と IG の 90 日後に細菌の付着が認められた。*C. albicans* は、1 日後に多くの付着がみられ、7 日後に一度付着が減少し、その後付着量が増加した。

(結論)

マウスガードは、洗浄や乾燥など管理をしっかりと行うことにより、長期にわたり比較的安定した特性を維持できると考えられる。

(謝辞)

本研究に関して、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 口腔顎顔面センター 口腔外科 上川善昭、ならびに鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療科学専攻 生体機能制御学講座 永山知宏、両先生には多大なる御協力をいただいたことを感謝いたします。

なお、本研究は、日本歯科医学会プロジェクト研究費により助成されている。

ヒト歯髄幹細胞の特徴化の中高齢者・若年者による比較検討

国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部¹, 愛知学院大学 歯学部
顎口腔外科学講座², 愛知学院大学 歯学部 歯内治療学講座³, 愛知学院大学 歯学部 小児歯科学講座⁴
○堀部宏茂^{1,2}, 庵原耕一郎¹, 村上真史¹, 竹内教雄^{1,3}, 石坂 亮^{1,4}, 栗田賢一², 中島美砂子¹

Characteristics of human dental pulp stem cells from middle and old age compared with those from young age

Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute¹, Department of Oral and Maxillofacial Surgery², Department of Endodontics³, Department of Pediatric Dentistry⁴, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
○HORIBE Hiroshi^{1,2}, IOHARA Koichiro¹, MURAKAMI Masashi¹, TAKEUCHI Norio^{1,3}, ISHIZAKA Ryo^{1,4}, KURITA Kenichi², NAKASHIMA Misako¹

【研究目的】私どもは新しい蝕・歯髄炎治療法として、歯髄幹細胞を用いた歯髄・象牙質再生治療法を開発してきた。まず、ヒト永久歯歯髄より、多分化能および高い遊走能・増殖能を有する CD105⁺ 細胞を分取し、マウス下肢虚血モデルおよび脳梗塞モデル移植による血管・神経再生促進作用を明らかにした。また、イン根完成後の抜髄後の根管内に移植すると歯髄が完全に再生された。よって、歯髄 CD105⁺ 細胞は高い血管新生・神経再生能及び歯髄再生能を有することが示された。しかしながら、抜髄処置は 40 歳後半をピークとするため、自家移植を考えると、中高齢者のヒトの歯髄組織から歯髄幹細胞を分取し、その幹細胞の特徴を明らかにする必要がある。よって本研究では、中高齢および若年のヒト歯髄組織から歯髄幹細胞を分取し、細胞の形質および特徴化を進め、継代による形質の変化を未分取の total 歯髄細胞とも比較し、中高齢者における自家歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療の有用性を推察した。

【材料と方法】

- ①中高齢者および若年者の患者から文書で同意を得た後、抜去歯から total 歯髄細胞を分離し、2代目で歯髄幹細胞の分取を行った。6代目および12代目において、それぞれ、以下の幹細胞の形質の比較を行った。
- ②細胞表面マーカー発現：フローサイトメトリーにて、CD29,31,44,73,90,105,146,CXCR4 の陽性率を比較した。
- ③分子生物学的解析：Real-time RT-PCRにて幹細胞マーカー、血管新生・神経栄養因子の mRNA 発現を比較した。
- ④in vitro における多分化能
 1. 血管誘導能：matrigel 上で三次元培養し、4時間後、管腔形成能を比較した。
 2. 神経誘導能：neurosphere 形成誘導および神経誘導を行い、28日後免疫組織学的および分子生物学的に比較した。
 3. 象牙質・骨誘導能：BMP2 添加 28日後、Alizarin Red 染色にて比較した。
 4. 脂肪誘導能：28日後 Oil Red O 染色にて脂肪誘導能を比較した。
- ⑤遊走能：TAXIScan-FLにて遊走因子に対する遊走能を比較した。
- ⑥増殖能：ヒト血清および遊走因子に対する細胞増殖能を比較した。

【結果】若年者の total 歯髄細胞 2代目では CD105 陽性率は約 10%であったが、中高齢者の total 歯髄細胞 2代目では約 1%であり、幹細胞の割合が低いことが示唆された。6代目において、中高齢者歯髄幹細胞は若年者と同様に、CD29,44,73,90 は 95%以上であり、CD31, CD146 はほぼ陰性であった。多分化能では、中高齢者歯髄幹細胞は若年者歯髄幹細胞と同様に、血管、神経、象牙質・骨、脂肪誘導能においてすべて、中高齢と若年との差はみられなかった。また遊走能、増殖能や血管新生・神経栄養因子の mRNA 発現も両者において発現の差はみられなかった。また、12代目においても、中高齢および若年とも、6代目と比べて形質の顕著な変化はみられなかった。

【考察・結論】中高齢者は若年と比べて、total 歯髄細胞における歯髄幹細胞の割合が低く、歯髄組織に含まれる歯髄幹細胞の割合が低いことが示唆されたが、分取した歯髄幹細胞の増殖能には有意な差がみられなかった。12代まで増幅させても、若年と同様に、多分化能を有し、未分取の total 歯髄細胞と比べて有意に遊走能が高く、血管誘導因子・神経栄養因子の発現が高かった。よって、中高齢者由来の歯髄幹細胞は若年と比較して細胞形質や幹細胞の特徴の差がみられないことから、若年者と同様に歯髄再生治療に用いることができる可能性が示唆された。

う蝕リスク診査を取り入れた学校歯科健診 —健診と生活習慣との関係—

鶴見大学歯学部保存修復学講座¹, 株式会社ジーシー², 鶴見大学歯学部探索歯学講座³
○深谷芽吏¹, 近藤愛恵¹, 齋藤 渉¹, 大森かをる¹, 石原容子², 花田信弘³, 桃井保子¹

Dental examination and caries risk evaluation for middle-and high school students —Relation between daily habits and DMF tooth rate—

Department of Operative Dentistry Tsurumi University School of Dental Medicine¹
GC CORPORATION²

Department of Translational Research Tsurumi University School of Dental Medicine³

○FUKAYA Meri¹, KONDO Yoshie¹, SAITO Wataru¹, OMORI Kaoru¹, ISHIHARA Yoko², HANADA Nobuhiro³, MOMOI Yasuko¹

【緒言】

近年、児童のう蝕は減少傾向にあり、平成 22 年度学校保健統計調査速報において 12 歳児のう蝕の本数は、1.29 本と報告され、10 年前の 2.92 本から半減している。しかし、このう蝕状況はその年齢以降急激に悪化し、15~19 歳においては 4.4 本にまで急増する（平成 17 年度歯科疾患実態調査）。すなわち、中学・高校時代のう蝕のコントロールは大変重要ということになる。先般、鶴見大学附属中学・高等学校長から大学歯学部校医を通じ、「歯学部に付属することのメリットを生かした、一步踏み込んだ歯科健診の実践」について依頼があったことから、歯科健診時に、従来の健診内容に加え唾液中の「う蝕原生細菌」である *S.mutans* の菌数を測定することとした。さらに、健診時に、歯みがきや飲食などの生活習慣と、歯の色や歯並びなどへの意識についてアンケート調査を行った。健診結果と生活習慣との関連についても調査することで、多方面からのう蝕予防の指導を行う事が出来ると考えた。

【材料と方法】

本健診は、臨床研究を含むところから、鶴見大学歯学部倫理審査委員会承認のもと実施されている（承認番号：813）。

1. 対象：健診の対象は、鶴見大学附属中学・高等学校の生徒 800 人（中学生 300 人、高校生 500 人）である。
2. 健診：鶴見大学歯学部保存修復学講座に所属する歯科医師で行われ、従来の学校歯科健診に加え、中学・高校 1 年生には唾液検査を行い、健診項目においては、処置歯は金属色修復と歯冠色修復を見分けられるようにした。
3. アンケート：生活習慣に関する質問 10 項目と審美に関する質問 11 項目についてのアンケート調査を実施した。
4. 統計：データの分析は、健診結果(DMF 歯率)とアンケート結果それぞれを中学生、高校生の 2 グループに分け、アンケートの回答のグループごとに DMF 歯率の平均値、標準偏差を求め、統計処理は一元配置分散分析 ($\alpha = 0.05$)を用いた。

【結果および考察】

1 人平均 DMF 歯数は、中学生 1.2、高校生 2.4 といずれも全国平均（平成 17 年度歯科疾患実態調査）より低い値であった。唾液 1 mL 中の *S.mutans* の数(CFU)は、中学生では 50 万以上 0 人、10~50 万 15 人、10 万未満 107 人、高校生では、50 万以上 6 人、10~50 万 28 人、10 万未満 99 人であり、唾液中に多くの細菌を持つ生徒の割合は、中学生より高校生で高かった。また、処置歯に対する金属色修復と歯冠色修復の割合は、どちらも歯冠色修復が 70%以上であることが分かった。アンケート調査からは、就寝前に歯磨きをする生徒は 90%、歯磨き時間は 1~10 分と幅があり、中学生から歯並びや歯の色に関心を持っている生徒が多いことなどが分かった。また、それぞれの項目において中学生と高校生との間に大きな差はなかった。

健診結果とアンケート結果との関係に関する統計結果から、中学生では生活習慣に関する質問 10 項目中 3 項目（習慣的に飲んでいる飲み物について、歯磨き習慣について）、審美性に関する質問 11 項目中 3 項目（口元や歯の形、歯肉の色についての意識について）において有意差があった。高校生では、生活習慣に関する質問において 1 項目（就寝時間について）、審美性に関する質問は 2 項目（口元や歯並びについての意識）のみ有意差があった。このことより、生活習慣と口腔内環境、審美性に関する意識と口腔内環境には関係があり、特定の因子がより強く関わっていることが示唆された。今後は、唾液中の *S.mutans* と口腔内環境、または生活習慣についての関係についても調査し、中高生のう蝕発生に大きく関わる因子を追求して行きたい。

神経障害性疼痛発症における脊髄抑制性グリシン神経の変調機序に関する研究

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 (健康増進歯学分野)
○本山直世, 西村英紀

Mechanisms of dysfunction of inhibitory neuronal regulation of pain signal transduction may be relevant to the development of neuropathic pain

Department of Dental Science for Health Promotion, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences
○MOTOYAMA Naoyo, NISHIMURA Fusanori

[緒言]

末梢または脊髄神経の損傷に起因する神経障害性疼痛は難治性で、従来の鎮痛薬は奏効せず、新しい治療法・治療薬の開発が待たれている。私達は、抑制性グリシン神経に注目し、細胞外グリシン濃度の調節に重要な役割を果たすグリシントランスポーター(GlyT)阻害薬が長期間持続性の鎮痛作用を有することを見出し、その機序に脊髄グリシン神経シナプスで蓄積したグリシンがグリシン受容体(GlyR) $\alpha 3$ を活性化して、抑制性グリシン神経伝達の増強が関与することを報告してきた(第129回日本歯科保存学会秋季学術大会・第134回日本歯科保存学会春季学術大会)。神経障害性疼痛の開始、形成、維持過程には複雑なメカニズムが関わっている。本研究では神経障害性疼痛の発症と維持機序におけるグリシン神経の役割と、その機序の解明について詳細に検討した。

[方法]

実験には ddY 系雄性マウスを用い、坐骨神経部分結紮モデルを使用した。薬物は人工脳脊髄液(ACSF) 5 μ l に溶解し第5、第6腰椎間から脊髄腔内投与(i.t.投与)または静脈内投与(i.v.投与)した。脊髄機能分子ノックダウンマウスは、該当遺伝子の特異的配列から siRNA を設計し、i.t.投与することにより作製した。疼痛関連反応は、ペイントブラシによる軽い触覚刺激に対するアロディニアスコアと von Frey hairs フィラメントによる足趾刺激に対するマウス後足の逃避反射閾値より評価した。

[結果ならびに考察]

GlyTs 阻害薬を神経損傷 12 時間前、同時、術後 2 日目に投与しても術後 3 日間は抗アロディニア作用がみられず、4 日目以降に発現した。脊髄 GlyTs ノックダウンマウスでも同様の現象を認め、GlyTs 阻害はアロディニア発症には影響せず、形成されたアロディニアを寛解することが明らかとなった。対照的に GlyR 阻害薬および GlyR $\alpha 3$ ノックダウンでは術後 3 日までアロディニアは発症せず、4 日目以降に発現し、神経損傷後 3-4 日に作用逆転のクリティカルポイントが存在した。同様の逆転現象は GABA_A 受容体作用薬および GABA_A 受容体阻害薬においても認められた。アロディニア形成の早い時期においては脊髄における抑制系が消失しており、アロディニアの形成と維持のメカニズムが根本的に異なることを明確にした。この逆転現象はアロディニア機序解明の有益なツールとなることが示唆される。

グリシンや GABA_A 受容体は Cl⁻透過性のイオンチャネルを構成している。これら受容体が刺激されると Cl⁻イオンが細胞内に流入し、過分極して細胞が抑制される。神経損傷初期における抑制系消失に細胞内外の Cl⁻勾配がシフトしている可能性が示唆される。神経細胞内 Cl⁻濃度は、細胞から Cl⁻を汲み出す KCC2 と取り込む NKCC1 により維持されている。そこで、脊髄における KCC2 と NKCC1 の発現について検討した。KCC2 発現量は神経損傷後 12 時間から 2 日後まで著しい減少を認め、3 日以降漸次回復した。これはグリシンの作用逆転の時間経過とよく一致していた。NKCC1 については、KCC2 発現量の減少より少し遅れて増加した。従って、KCC2 や NKCC1 の発現変化が Cl⁻勾配のシフトに関係する可能性が考えられる。KCC2 の発現量低下は脊髄 BDNF ノックダウンおよび BDNF 受容体である TrkB ノックダウンにより消失し、ミクログリアの活性化を阻害するミノサイクリンの投与によってもリバースされた。神経損傷による KCC2 の発現量低下にミクログリア活性化、BDNF および TrkB の関与が示唆された。正常動物の脊髄腔内に KCC2 阻害薬 R-DIO を i.t.投与すると、用量依存的なアロディニア応答を惹起し、さらに脊髄 KCC2 ノックダウンや BDNF の i.t.投与でも長期間持続したアロディニアを惹起すること、脊髄 BDNF 或いは TrkB をノックダウンにより初期のアロディニア発現は抑制されること等を見出した。

これら一連の結果は、神経損傷の初期におけるミクログリアの活性化がこれら機能分子を介して Cl⁻勾配の逆転に寄与しており、結果としてグリシン作動性抑制系を変調(脱抑制)し、アロディニア発症に関係することが示唆された。