

Aggregatibacter actinomycetemcomitans および抗菌薬添加が ヒト歯肉上皮細胞の細胞接着因子に及ぼす影響

¹岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態学分野
²現 九州大学病院 口腔総合診療科

○高知 信介¹, 山城 圭介¹, 山本 直史¹, 本郷 昌一¹, 下江 正幸¹,
富川 和哉^{1,2}, 鶴川 祐樹¹, 前田 博史¹, 高柴 正悟¹

Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection and administration of antibiotic affects cell adhesion molecules in human gingival epithelial cells

¹Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

²Current: General Oral Care, Kyushu University Hospital

○KOCHI Shinsuke¹, YAMASHIRO Keisuke¹, YAMAMOTO Tadashi¹, HONGO Shoichi¹, SHIMOE Masayuki¹,
TOMIKAWA Kazuya^{1,2}, UGAWA Yuki¹, MAEDA Hiroshi¹, TAKASHIBA Shogo¹

【緒言】

歯肉上皮は、歯面とヘミデスマゾーム結合で接着しており、歯周病原細菌の感染に対する物理的バリアーとして機能している。しかし、ひとたび歯周炎に感染すると、歯肉上皮と歯面の接着は破壊され、さらなる歯周病の進行につながる。その一方で、感染源が除去されると、歯肉上皮と歯面は再び接着してバリアー機能を回復する。

これまでに我々は、歯肉上皮細胞と、歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 (Aa) との共培養を行い、サイトカイン、接着因子、および細胞外基質の遺伝子発現量について比較検討をした。その結果、Aa との共培養によって複数の接着因子の遺伝子発現量は減少し、歯肉上皮細胞の接着能が低下したことを示した。

本研究では、歯肉上皮細胞と Aa との共培養時に遺伝子発現量が減少した接着因子および細胞外基質が、細菌を除去した後に変化する状況を観察することで、歯周治療後の歯肉上皮の接着が変化する機序を考察した。

【材料及び方法】

1. 歯肉上皮細胞と AaY4 との共培養：健康なドナーから歯肉上皮細胞を採取後、継代培養した。コンフルエントに達した後に、multiplicity of infection (MOI) が 10 となるように Aa を添加し、12 および 24 時間培養したものを共培養群とした。そして、Aa を添加していないものを対象群とした。また、Aa を添加して 12 時間後にペニシリン/ストレプトマイシンの入った培地に交換して、12 時間培養したものを抗菌薬添加群とした。
2. 細胞接着分子、細胞外基質、サイトカインの遺伝子発現の定量：上記条件で培養した歯肉上皮細胞から、全 RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、リアルタイム PCR 法を用いて以下の 12 遺伝子の発現変化の定量を行った。サイトカイン：Transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1), Transforming growth factor-beta 3 (TGF- β 3), Interleukin-8 (IL-8)；接着因子：Integrin α 2, Integrin α 3, Integrin α 5, Integrin β 4, Integrin β 6；細胞外基質：Tenascin C, Fibronectin-1, Versican；増殖関連：Proliferation cell nuclear antigen (PCNA)

【結果】

1. IL-8, TGF- β 1, および Integrin α 5 の遺伝子発現量は、共培養群では増加したが、共培養後に抗菌薬を添加するとその発現は減少した。一方、TGF- β 3, および PCNA の遺伝子発現量の変動は、その逆であった。
2. Integrin β 4, Integrin β 6, および Fibronectin-1 の遺伝子発現量は、共培養群と抗菌薬添加群でともに減少した。
3. Integrin α 2, Integrin α 3, Tenascin C, および Versican の遺伝子発現量は、ほとんど変動しなかった。

【考察及び結論】

本研究の実験結果を俯瞰的に見ると、IL-8, TGF- β 1, TGF- β 3, Integrin α 5, および PCNA は、歯肉上皮細胞と Aa を共培養すると、それぞれの遺伝子発現量は変動した。そして、培養の途中から抗菌薬を添加すると、これらの遺伝子発現量は回復して対照群のものに近づいた。しかし、抗菌薬を添加しても、Integrin β 4 と Integrin β 6 などの接着因子と細胞外基質である Fibronectin-1 の遺伝子発現量は変化しなかった。既知の報告によると、TGF- β 類は炎症や細胞外基質の制御に関与しており、Integrin α 5 は細菌感染後の細胞内シグナル伝達の役割に関与している。以上のことから、歯周組織の感染源を除去すると、TGF- β 1, TGF- β 3, そして Integrin α 5 の遺伝子発現量が変化して組織の修復が開始され、これらに遅れて Integrin β 4 と Integrin β 6 などの接着因子と細胞外基質である Fibronectin-1 が変化してくると考えられる。今後は、もっと長時間でのこれらの変化と接着能の回復とを合わせた検討が必要である。

塩化亜鉛曝露による口腔細菌構成の変化

¹⁾福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野

²⁾日本大学歯学部 化学

³⁾福岡歯科大学 口腔医療センター

○鈴木奈央¹⁾、中野善夫²⁾、畑野優子¹⁾、米田雅裕³⁾、横瀬勝美²⁾、桑田文幸²⁾、廣藤卓雄¹⁾

Change of oral microbiota by zinc chloride-exposure

¹⁾Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College

²⁾Department of Chemistry, Nihon University School of Dentistry

³⁾Center for Oral Diseases, Fukuoka Dental College

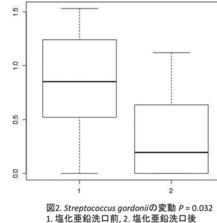
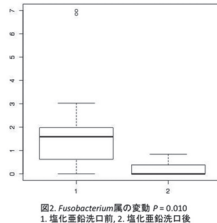
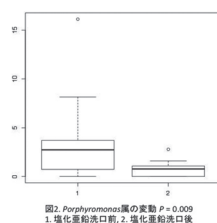
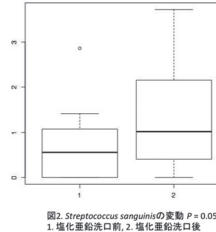
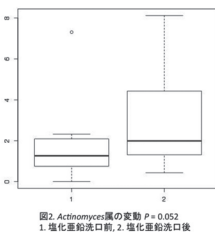
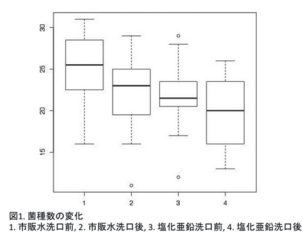
○Suzuki N¹⁾, Nakano Y²⁾, Hatano Y¹⁾, Yoneda M³⁾, Yokose K²⁾, Kuwata F²⁾, Hirofuji T¹⁾

【研究目的】塩化亜鉛は洗口剤の口臭抑制成分として利用され、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 産生を阻害すると考えられている。またこれまでに、亜鉛イオンが *Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* 等の歯周病原細菌に対してすぐれた抗菌作用を示すことが確認されており、これらの VSC 産生菌を抑制することによっても塩化亜鉛は口臭のコントロールに寄与すると考えられる。しかしながら、塩化亜鉛による連続的な洗口が口腔細菌の構成にどのような影響をもたらす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、次世代シーケンサーを用いて唾液中の口腔細菌構成の網羅的解析を行い、亜鉛洗口の口腔内細菌叢への影響を調べた。

【方法】福岡歯科大学歯学部学生 21 名を対象に、市販水で 3 日間洗口、続いて 3 日間のウォッシュアウト期間を挟んで、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 を抽出し 16S rRNA 遺伝子を利用した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。分析では検出率 0.3%未満の菌種を解析対象外とした。

【結果と考察】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、塩化亜鉛溶液による洗口前後の構成菌種数を調べたところ (図 1)、市販水洗口で統計学的に有意な減少がみられ (1→2, $p = 0.000$)、インターバル前後では変化がなく (2→3, $p = 0.352$)、塩化亜鉛溶液による洗口で統計学的に有意な減少がみられた (3→4, $p = 0.009$)。市販水洗口での菌種数減少の理由として、臨床実験参加にともなう口腔清掃習慣などの行動変容が考えられる。その後菌叢は安定したため、塩化亜鉛溶液による洗口での有意な菌叢の単純化は亜鉛単独の影響であると考えた。次に塩化亜鉛溶液による洗口前後の菌の変動を調べたところ、18 菌種が増加、18 菌種が減少した。顕著に増加した菌種は *Actinomyces* 属や *Streptococcus* 属などであり、細菌構成の単純化に伴ってこれらの口腔常在菌が増加したと考えられる (図 2)。 *Porphyromonas* 属や *Fusobacterium* 属などの VSC 産生菌は統計学的に有意に減少し、塩化亜鉛洗口が口臭のコントロールに有用であることが示された。また *P. gingivalis* との凝集関係が知られる *S. gordonii* も有意に減少した。亜鉛イオンは *P. gingivalis* のタンパクと結合することによって *P. gingivalis* と *S. gordonii* の共凝集を阻害するという研究報告があり、亜鉛イオンが菌叢変動に間接的にも作用している可能性が示唆された。

【結論】塩化亜鉛溶液による連続した洗口によって口腔細菌の構成が単純化し、口腔常在菌の増加や歯周病原細菌の減少などの菌種の変動が起こることが示唆された。



光誘導蛍光システムによる口腔内細菌の評価

昭和大学歯学部総合診療歯科

○伊佐津克彦、國井 麻依子、高島 英利、長谷川篤司

Evaluation of Oral Microbacteria by a light-induced fluorescence system

Dept. of Comprehensive Dentistry, Showa University School of Dentistry

○Katsuhiko Isatsu, Maiko Kunii, Hidetoshi Takashima, Tokuji Hasegawa

【目的】

近年、デンタルプラークに起因する歯周病と糖尿病や動脈硬化などの全身疾患との関連や、デンタルプラークを構成している細菌を誤嚥することによる肺炎についての報告が多く認められている。したがって、デンタルプラーク除去の基本である本人あるいは介助者などによる機械的関与のためには、プラーク付着部位を視覚的に正しく認識することは、治療効果を最大限に引き出すカギとなる。言い換えるなら、口腔および全身の健康維持のためにはプラークの量、付着部位、そして活動性を定期的に正しく認識することが必須である。

従来、付着しているプラークの評価は染めだし液などを用いて行うのが一般的であるが、高齢者や在宅看護の受診者では染色後の清掃が決して容易ではない。そこで、近年、染め出しなしにプラークの蛍光特性を利用するプラーク認識システムが開発、市販に至っている。我々は第 132 回大会で、この光誘導蛍光システムによるプラークの検出は、プラーク染めだし液に比較し鋭敏でないものの、質的評価の可能性について発表し、第 135 回大会では、光誘導蛍光システムによるプラークの質的評価の可能性について発表した。

本研究では、光誘導蛍光システムによるプラークの質的評価の基礎的データを確立する目的で、光誘導蛍光システムを利用して各種口腔内細菌の蛍光部分を画像管理ソフト DB SW I N 上で評価した。

【材料と方法】

対象細菌：通法に従い血液寒天培地上で下記の細菌を培養し、その菌体を試料とした。

Streptococcus mutans, *Streptococcus sobrius*, *Streptococcus gordonii*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*

光誘導蛍光システムを利用した細菌の評価：

光誘導蛍光システムとしてビスタカム P (Dürr 社)を採用した。ビスタカム P システムは計測専用準備した PC (Intel®Core™2Duo CPU P8600 2.4GHz RAM 2.0GB) にハンドピース、フットスイッチを USB 接続して構成される。寒天培地上で培養した各細菌のコロニーを採取しレジンブロック上に静置し、CCD カメラで撮影し、得られた画像データを画像管理ソフト DB SW I N 上で蛍光部分を評価した。

【結果および考察】

1) 歯周病原性細菌である *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* では、ビスタカム P システムにより、プラークで見られたのと同様の赤色蛍光が認められた。

2) 細菌の培養期間により、蛍光の強度に差が見られた。

以上より、ビスタカム P を利用して口腔内細菌を単独での評価したところ、数種の細菌より蛍光を検出し、口腔内のプラークの質的評価に利用する可能性を示したが、今後、多種の細菌で形成されたバイオフィーム形成時の各種口腔内細菌に対する *in vitro* での詳細な検討が必要であると考えられた。

**Lactobacillus salivarius WB21 株配合錠菓の口臭抑制効果についての臨床研究
～ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験～**

¹⁾福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野

²⁾福岡歯科大学 口腔医療センター

³⁾たなべ保存歯科

○藤本暁江¹⁾, 鈴木奈央¹⁾, 米田雅裕²⁾, 田邊一成³⁾, 山田和彦¹⁾, 岩元知之¹⁾, 榊尾陽介¹⁾, 伊波幸作¹⁾, 廣藤卓雄¹⁾

**Effect of *Lactobacillus salivarius* WB21-containing Tablet on Oral Malodor
-A Double-blind, Randomized, Placebo-controlled Crossover Clinical Trial-**

¹⁾Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College

²⁾Center for Oral Diseases, Fukuoka Dental College

³⁾Tanabe Clinic for Preservative Dentistry

○Fujimoto A¹⁾, Suzuki N¹⁾, Yoneda M²⁾, Tanabe K³⁾, Yamada K¹⁾, Iwamoto T¹⁾, Masuo Y¹⁾, Iha K¹⁾, Hirofujii T¹⁾

【研究目的】乳酸桿菌 *Lactobacillus salivarius* WB21 株 (Ls WB21) は、口腔環境を改善するプロバイオティクスとしての有用性が期待されている。これまでに、ボランティアを対象にした Ls WB21 配合錠菓 (販売元: わかもと製菓株式会社) の摂取試験で、喫煙者における歯周病の症状改善、歯肉縁下プラークの全菌数と歯周病原細菌 *Tannerella forsythensis* の減少が確認されている^{1,2)}。我々は Ls WB21 配合オイルを作製し、歯周病患者を対象にランダム化二重盲検プラセボ比較試験を実施し、Ls WB21 単独の歯周組織に対する作用を評価した³⁾。その結果、実験群ではプラセボ群に比較して、プロービング時出血 (bleeding on probing: BOP) と唾液中の全菌数が有意に減少した。口臭に関しては、Ls WB21 配合錠菓を用いた非盲検試験を行ったところ、Ls WB21 摂取によって口臭の改善、BOP の減少、唾液量の増加がもたらされた⁴⁾。そこで本研究では、Ls WB21 配合錠菓が口臭と口臭関連因子にもたらす影響を明らかにする目的でランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験を実施した。

【対象および方法】本研究は、福岡歯科大学・福岡医療短期大学倫理委員会承認を得て実施した。口臭を主訴として福岡歯科大学医科歯科総合病院口臭クリニック科を受診した真性口臭症患者 26 名に対して、ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験を行った。被験者を 2 群 (A 群および B 群) に無作為に割り付けし、第 1 期として A 群には Ls WB21 配合錠菓 (2×10^9 CFU/day) を B 群には無配合錠菓を連続して 2 週間 1 日 3 粒摂取した。その後 2 週間の休薬期間を経て、第 2 期として、A 群にはプラセボを、B 群には Ls WB21 配合錠菓を 2 週間摂取した。錠菓は口腔内に行き渡るよう噛まずに舐めるように指示した。両摂取期間の前後に、口臭検査と口腔内診査を実施し、検査当日は、起床時より飲食、歯面清掃、喫煙などの口腔活動を禁止した。

【結果と考察】実験期間中に脱落した者 1 名と抗菌薬を服用した者 2 名を分析対象外とし、23 名 (男性 4 名、女性 19 名、平均年齢 44.3 ± 11.6 歳) について比較分析を行った。両群ともに Ls WB21 配合錠菓摂取期間はプラセボ摂取期間と比較して、揮発性硫黄化合物濃度 (volatile sulfur compound: VSC) と歯周ポケット平均値に有意な減少を認めた。VSC を 3 成分に分類し Ls WB21 摂取期間とプラセボ摂取期間を比較した結果、硫化ジメチル濃度に違いはみられなかったが、Ls WB21 摂取期間のほうが硫化水素濃度とメチルメルカプタン濃度において有意な減少が観察された。硫化水素とメチルメルカプタンは口腔由来の主要な口臭成分であり、硫化ジメチルは全身由来の口臭と関係があると云われており、Ls WB21 が口腔由来の口臭に対して抑制作用を示すことが示唆された。次に、歯周ポケットを 4 ミリ以上、5 ミリ以上、6 ミリ以上の部位数にわけて Ls WB21 摂取期間とプラセボ摂取期間を比較した結果、Ls WB21 摂取期間では 6 ミリ以上のポケット数において有意な減少、5 ミリ以上のポケット数においても減少傾向を示した。一方、4 ミリ以上のポケット数においては両期間ともに改善がみられた。プラセボ摂取期間における浅いポケットの改善の理由として、試験参加に伴う口腔清掃習慣などの行動変容や錠菓中のキシリトールの影響などが考えられる。官能検査、BOP、舌苔付着量、唾液流出量においても両期間ともに改善し、両者間に統計学的な違いがみられなかった。La WB21 摂取で深いポケットの改善と口臭の抑制がみられたことから、今後 VSC を産生する歯周病原細菌への作用について検討を重ねたい。

【結論】乳酸菌 Ls WB21 配合錠菓の摂取は、VSC レベルの減少、特に口腔由来の口臭として重要な硫化水素とメチルメルカプタンの減少、5 ミリ以上の歯周ポケットの減少をもたらす、口臭予防や口臭治療の一助となる可能性が示唆された。

参考文献

1. Shimauchi H et al. J Clin Periodontol 2008;35:897-905.
2. Mayanagi G et al. J Clin Periodontol 2009;36:506-513.
3. Suzuki N et al. J Breath Res 2012;6:017106.
4. Iwamoto T et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010;110:201-208.

口臭関連細菌に対する銀コロイドの効果

1) 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯周病学講座, 2) 医療法人社団 玉翔会 玉澤歯科医院,
3) アサヒバイオフーズ株式会社, 4) 日本医科大学千葉北総病院歯科, 5) 医療法人 社団 潤泉会 中島歯科医院
○織田洋武¹⁾, 坪川瑞樹¹⁾, 玉澤賢²⁾, 堀内健次³⁾, 鴨井久博⁴⁾, 中島茂⁵⁾ 佐藤聡¹⁾

Effect of Colloidal Silver on relation microbiology of oral malodor

1) Department of Periodontology School of Life Dentistry at Niigata The Nippon Dental University,
2) Gyokushoukai Medical Juridical Person Tamazawa Dental Office, 3) ASAHI Bio Foods Ltd,
4) Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital, 5) Iryouhoujin Syadan Junsenkai Nakajima Dental Clinic
○Hirotake Oda¹⁾, Mizuki Tsubokawa¹⁾, Ken Tamazawa²⁾, Kenji Horiuchi³⁾, Hisahiro Kamoi⁴⁾, Shigeru Nakajima⁵⁾, Soh Sato¹⁾

【目的】

口腔内の主要な疾患であるう蝕と歯周病は、歯の周囲に沈着するデンタルプラークが原因である。プラークは形成される部位により、歯肉縁上に形成される歯肉縁上プラークと歯周ポケット内に形成される歯肉縁下プラークに分けられ、細菌叢はプラークの形成される部位により大きく異なる。特に歯肉縁下プラークは歯周病と口臭に大きく関与し、プラークの除去により歯周病の病態と口臭が改善することがわかっている。

銀は一般家庭において除菌、抗菌、脱臭などの目的で高頻度で使用されている。銀コロイド溶液は、銀を電気分解して精製される無色透明の溶液であり、銀イオンよりも安定した状態で殺菌力を持つことで注目されている。また、銀コロイドは、特殊イオン交換体の相乗作用により殺菌、抗菌、脱臭の効果が増強することが報告され、食品の消毒や医療分野への転用が期待されている。本研究は銀コロイド溶液の口臭関連細菌に対する殺菌効果について *in vitro* にて検証した。

【方法】

殺菌試験は、*Porphyromonas gingivalis* (W83, ATCC33277)、*Prevotella intermedia* (ATCC25611) *Fusobacterium nucleatum* (ATCC25586) の4菌種を使用した。各細菌を洗浄後、滅菌蒸留水で希釈した銀コロイド溶液 (1.5ppm, 3ppm, 30ppm) にて1分間処理した。その後連続段階希釈を行い、寒天培地に塗抹後、*P.gingivalis*、*P.intermedia*、*F. nucleatum* は72時間嫌気培養を行い、評価は Colony Forming Units (CFU)で行った。

【結果】

30ppmの銀コロイド溶液は *P. gingivalis* (W83, ATCC33277)、*P. intermedia* (ATCC25611)、*F. nucleatum* (ATCC25586) の4菌種に対して完全な殺菌効果を示した。3ppmの銀コロイド溶液は *P. gingivalis* (W83, ATCC33277)、*F. nucleatum* に対して完全な殺菌効果を示し、*P. intermedia* においても有意な殺菌効果を示した。また、1.5ppmの濃度においては4菌種共に有意な細菌の殺菌効果を示した。

【結論】

本研究において、銀コロイド溶液は1.5ppm以上で口腔内細菌に対する強力な殺菌能が認められ、*F. nucleatum* に対する強い殺菌効果も認められた。*F. nucleatum* は口臭と関連が報告されており、銀コロイド溶液を用いた口腔含嗽は歯周病、さらには口臭も含めた化学的プラークコントロールの有効性が示唆された。

口腔内歯周病原細菌および病的口臭に対する BFR(ブラッシング+フロッシング+リンス)の効果

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野
○藤岡陽介、両角俊哉、久保田健彦、吉江弘正

Effect of BFR (Brushing, Flossing and Rinsing) for periodontopathic bacteria in oral cavity and halitosis

Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science, Course for Oral Life Science, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Yosuke Fujioka, Toshiya Morozumi, Takehiko Kubota, Hiromasa Yoshie

【背景・目的】

近年、従来の機械的歯面清掃法であるブラッシングやフロッシングにマウスリンスを組み合わせることで臨床効果が増大することが報告されている(Sharma et al. 2004)。また、Zimmerら(2006)はブラッシングとマウスリンスの組み合わせが歯間部の歯垢減少に効果的であることを明らかにしている。これらエビデンスに基づき、ADA(米国歯科医師会)はこれからの口腔ケア法として BFR(ブラッシング+フロッシング+リンス)を推奨している。この方法は歯面や歯周ポケットのみならず、口腔内全体のケアとしてもその有効性が期待される。

歯周病患者においては、多くの歯周病原細菌、とりわけ *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*)や *Prevotella intermedia* (*P.intermedia*)、*Tannerella forsythia* (*T.forsythia*)といった主要細菌が、歯周ポケット以外の様々なニッチ(舌、粘膜)に定着していることが報告されている(Danser et al. 1994, Cortelli et al. 2008)。舌苔は舌背表面に堆積する細菌性バイオフィルムの一つであり、その付着量の変化は口腔内の総細菌数の変動を反映すると考えられている(Danser et al. 2003)。また、口臭の主要原因成分である揮発性硫黄化合物(VSCs)濃度は舌苔付着量との関連が強く、その発生には嫌気性菌が深く関与していることが示唆されている(Roldán et al. 2003)。

そこで、本研究において我々は、BFR が舌や口蓋扁桃部といったニッチ部分を含めた口腔内各部位の細菌数や口臭値に及ぼす影響を調べ、比較検討した。

【材料と方法】

藤の丘歯科医院(富山県砺波市)に来院した中等度～重度の広汎型慢性歯周炎患者 40 名を無作為に 2 群(対照群: N=20、実験群: N=20)に分けた。縁上スクレーリングの 2 週後、口臭測定および専用器具による試料採取(口蓋扁桃拭い液、舌苔、歯周ポケット内プラーク)を行った(ベースライン)。その後、対照群は通常の口腔清掃(ブラッシングのみ)を、実験群は BFR 清掃(ブラッシング+フロッシング+リンス)を 4 週間継続した。清掃器具や洗口液は特定のもの支給して頂いた(リーチ®歯周病対策アルファ、リーチ®デンタルフロスワックス、薬用リステリン®、フレッシュミント)。4 週後、再び口臭測定および試料採取を行った。得られた試料から PCR-インベーター法により、総細菌数及び *P.gingivalis* 数、*P.intermedia* 数、*T.forsythia* 数を定量した。口臭はガスクロマトグラフィー(オーラルクロマ)により硫化水素、メチルメルカプタン、ジメチルサルファイドのガス濃度を測定した。これら結果より、口腔内各部位における細菌量および VSCs 濃度の変化を評価した。統計解析にはウィルコクソン符号付順位和検定(群内比較)およびマン・ホイットニー検定(群間比較)を用いた。

【結果】

1. 群内比較: 実験群では口蓋扁桃拭い液中細菌の総菌数($p<0.05$)および *P.intermedia* 数($p<0.01$)、*T.forsythia* 数($p<0.05$)が有意に減少した。また、歯周ポケット内細菌の総菌数および *T.forsythia* 数も有意に減少した($p<0.05$)。口臭測定ではメチルメルカプタン値が有意に減少した($p<0.01$)。対照群ではいずれの項目においても有意な変化は示さなかった。
2. 群間比較: メチルメルカプタン値は 4 週後の実験群において有意に低かった($p<0.01$)。

【結論】

BFR は口蓋扁桃や歯周ポケット内の細菌数や口臭値を有意に減らすことが示唆された。とりわけ、口臭値の減少に有用である可能性が高い。

Porphyromonas gingivalis によるヒト歯肉上皮細胞からの interleukin-33 発現誘導

国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部¹⁾、東北大学 大学院歯学研究科 歯内歯周治療学分野²⁾
○多田 浩之¹⁾、島内 英俊²⁾、松下 健二¹⁾

Expression of interleukin-33 induced by *Porphyromonas gingivalis* in human gingival epithelial cells

¹Department of Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology

²Department of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry

○Hiroyuki Tada¹⁾, Hidetoshi Shimauchi²⁾, Kenji Matsushita¹⁾

【緒言】 粘膜組織において、上皮細胞は細菌、アレルゲンや寄生虫に対して物理的バリアとして機能するだけでなく、これらの刺激に応答して interleukin (IL)-33, IL-25 ならびに thymic stromal lymphopoietin (TSLP)などを生産することが近年明らかにされている。これら上皮性サイトカインは、肥満細胞、好塩基球や Th2 細胞などの標的細胞を刺激することによりアレルギー性炎症の誘導に係わることが注目されている。IL-33 は IL-1 や IL-18 と相同性の高い IL-1 ファミリーに属するサイトカインであり、IL-33 により眼、鼻や気道などの粘膜上皮に炎症が誘導されアレルギーの増悪に係わる可能性が示唆されているが、歯周炎の病態形成における IL-33 の関わりについては明らかにされていない。

歯周炎関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* (以下、*P. g*)から生産されるトリプシン様システインプロテアーゼ (ジンジパイン)は、同細菌の歯周組織への感染や宿主防御機構の回避に重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、ジンジパインにより歯肉上皮細胞から IL-33 が誘導される可能性について検討した。

【材料と方法】

- (1) 供試細胞：ヒト歯肉扁平上皮癌細胞株である Ca9-22 細胞を 10% FBS 添加 E-MEM 培地にて継代培養し供試した。
- (2) *P. gingivalis* および菌体成分: *P. g* W83 株凍結乾燥全菌体、同培養上清、*P. g* 381 株精製 fimbriae、*P. g* 合成リポペプチド (PGTP-2)および *P. g* LPS を実験に供試した。
- (3) IL-33, IL-25 および TSLP mRNA 発現: 各種菌体成分にて刺激した Ca9-22 細胞の IL-33, IL-25 および TSLP mRNA 発現について、定量性 RT-PCR 法により測定した。また、IL-33 mRNA 発現誘導がジンジパインにより担われる可能性について、*P. g* 全菌体を FPR-cmk (アルギニン特異的ジンジパイン阻害剤)ならびに KYT-36 (リジン特異的ジンジパイン阻害剤)で前処理し細胞に刺激した。*P. g* による IL-33 亢進作用が mitogen-activated protein (MAP) kinase によるシグナル伝達を介する可能性について、PD98059 (ERK 阻害剤)、SP600125 (JNK 阻害剤)、SB203580 (p38 阻害剤)をそれぞれ前処理した細胞により検討した。
- (4) 細胞内 IL-33 蛋白発現: *P. g* 全菌体による Ca9-22 細胞の細胞内 IL-33 蛋白発現について、抗ヒト IL-33 モノクローナル抗体にてウェスタンブロット法および免疫染色法により検討した。

【結果と考察】 1. Ca9-22 細胞を *P. g* 全菌体で刺激すると、刺激 48-72 時間後において IL-33, IL-25 および TSLP mRNA 発現が著明に亢進した。また、*P. g* 全菌体により刺激 4 日後をピークとして細胞内 IL-33 蛋白発現が亢進した。2. IL-33 誘導活性を示す菌体成分について、同細胞を全菌体、培養上清、fimbriae、PGTP-2 ならびに *P. g* LPS で刺激した結果、全菌体と培養上清の刺激により IL-33 mRNA 発現が著明に亢進されたのに対して、fimbriae、PGTP および *P. g* LPS 刺激による IL-33 亢進作用はみられなかった。3. *P. g* による IL-33 mRNA 亢進作用は、全菌体を FPR-cmk ならびに KYT-36 で前処理することにより抑制されたことから、同活性はジンジパインにより担われる可能性が示唆された。4. Ca9-22 細胞を全菌体で刺激すると p38 のリン酸化が検出され、同細胞を p38 阻害剤で前処理すると *P. g* による IL-33 mRNA 発現誘導は著明に抑制された。

【結論】 *P. g* により歯肉上皮細胞から IL-33, IL-25 および TSLP 発現が亢進されることが示された。本細菌による IL-33 亢進活性はジンジパインによって担われ、MAP キナーゼ p38 を介することが明らかにされた。成人性歯周炎において、歯肉上皮細胞から生産される IL-33, IL-25 および TSLP などの作用により、歯周組織にアレルギー性炎症が誘導されることが病態形成に関与する可能性が示唆される。(会員外研究協力者) 小川知彦

ニコチンが破骨細胞の分化と無機質溶解に及ぼす影響について

日本大学歯学部衛生学教室¹⁾, 日本大学総合歯学研究機能形態部門²⁾, 日本大学大学院歯学研究科³⁾
○田中秀樹¹⁾, 田邊奈津子^{1), 2)}, 川戸貴行^{1), 2)}, 中井久美子³⁾, 前野正夫^{1), 2)}

**The effect of nicotine on osteoclast differentiation and bone resorption
in RAW264.7 cells.**

Department of Oral Health Sciences, Nihon University School of Dentistry¹⁾, Division of Functional Morphology,
Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry²⁾, Nihon University Graduate School of Dentistry³⁾
○Hideki Tanaka¹⁾, Natsuko Tanabe^{1), 2)}, Takayuki Kawato^{1), 2)}, Kumiko Nakai³⁾, Masao Maeno^{1), 2)}

【目的】

喫煙は、歯周病の進行および治療効果の低下に深く関与している。当教室では、喫煙が歯槽骨代謝に及ぼす影響を *in vitro* で検討し、煙草の主要成分であるニコチンが、骨芽細胞のアルカリフォスファターゼ活性と骨基質タンパク発現の低下を介して石灰化物形成を抑制することを報告した (Tanaka et al. Life Sci, 2005)。そこで本研究では、破骨細胞前駆細胞 (RAW264.7: RAW 細胞) をニコチンで刺激し、破骨細胞への分化、ニコチン受容体、プロトン (H⁺) 産生を担う炭酸脱水酵素 II 型 (CA II), H⁺の細胞外放出を担う vacuolar-type H⁺-ATPase (V-ATPase), 骨基質タンパク分解を担う cathepsin K と matrix metalloproteinase (MMP)-9 発現, 骨吸収領域の低 pH 維持に関与する actin belt 形成および無機質溶解に及ぼすニコチンの影響を調べた。

【方法】

RAW 細胞は 50 ng/mL RANKL 存在下で培養した。細胞を刺激する際のニコチン濃度は 0 (コントロール), 10⁻⁵, 10⁻⁴ および 10⁻³ M とした。ニコチン受容体アンタゴニストには 10⁻³ M D-tubocurarine を用いた。破骨細胞への分化は TRAP 染色法, ニコチン受容体 (α 1-5, 7, 9, 10), CA II, V-ATPase, cathepsin K および MMP-9 の遺伝子発現は real-time PCR 法, タンパク発現は Western blotting 法で調べた。また, actin belt 形成は免疫染色法, 無機質溶解は骨吸収活性評価キットを用いてリン酸カルシウム溶解量を測定して調べた。

【結果】

RAW 細胞は、上記のすべてのタイプのニコチン受容体を発現し、このうち α 7 受容体発現はニコチンの濃度依存的に増加した。破骨細胞数はコントロールに比べて 10⁻⁴ および 10⁻³ M ニコチン添加で有意に増加したが、細胞の面積は 10⁻³ M ニコチン添加で有意に減少した。CA II 発現は、10⁻⁴ および 10⁻³ M ニコチン添加で有意に増加した。一方、V-ATPase, cathepsin K および MMP-9 発現, 総破骨細胞数に占める actin belt 陽性細胞の割合は、10⁻⁴ および 10⁻³ M ニコチン添加で有意に減少した。D-tubocurarine は、ニコチン添加による CA II 発現増加, V-ATPase, cathepsin K および MMP-9 の発現低下を完全にブロックした。リン酸カルシウム溶解量にはニコチンの影響は認められなかった。

【考察および結論】

ニコチンが骨芽細胞による石灰化物形成を抑制したという上記の Tanaka らの報告と本研究結果から、ニコチンは骨形成と骨吸収の両方を抑制し、歯槽骨の turnover を低下させる可能性が示唆された。

結論として、ニコチンは破骨細胞分化と CA II 発現を誘導して H⁺産生を増加させるが、V-ATPase 発現と actin belt 形成を低下させることで H⁺の細胞外への放出と波状縁形成を抑制するため、破骨細胞による無機質溶解には影響を及ぼさないことが明らかになった。またニコチンは、cathepsin K と MMP-9 発現を低下させて破骨細胞による骨基質タンパク分解を抑制することが示唆された。

スフィンゴシン-1-リン酸がヒト歯肉上皮細胞の炎症反応に及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科 分子病態口腔科学専攻 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)
○三木康史、柳田 学、森 健太、久保田実木子、伊山舜吉、
竹立匡秀、山下元三、山田 聡、北村正博、村上伸也

Effects of sphingosine-1-phosphate on inflammatory responses of human gingival epithelial cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Koji Miki, Manabu Yanagita, Kenta Mori, Mikiko Kubota, Mitsuyoshi Iyama,
Masahide Takedachi, Motozo Yamashita, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami

【目的】

上皮細胞は生体の最前線に位置しており外来刺激からの物理的防御壁として機能しているだけでなく、immuno-modulator として免疫反応に積極的に関与している事が明らかにされている。歯周病の発症進行過程においても歯肉上皮細胞が重要な役割を担っていると考えられる。一方、歯周炎病変部における様々な炎症メディエーターの関与が解析されているが、脂質に関する研究について十分にはなされていない。血小板から産生される生理活性リゾリン脂質の一つであるスフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は免疫系・血管系において、その生物学的活性の重要性が認識されている。

また近年、壊死細胞から放出される内因性分子群：ダメージ関連分子パターン (DAMPs) は、周囲組織に影響を及ぼすことが明らかとなっている。そのパターン認識受容体の一つである Toll 様受容体 3 (TLR3) は細胞損傷や壊死により細胞外に放出される mRNA をはじめとする内在性分子に対する受容体であることが報告されている。そこで本研究では、炎症メディエーターとしての S1P と、細胞損傷により放出される内在性分子の刺激により、歯肉上皮細胞がどのような炎症免疫反応を惹起するか検討した。なお、本研究では TLR3 によって認識される分子として二本鎖 RNA ウィルス類似構造体 Poly(I:C) を用いた。

【材料及び方法】

1. ヒト歯肉上皮不死化細胞株 epi4 より RNA を抽出し、リアルタイム-PCR 法を用いて S1P 受容体の発現について、これまで特に報告の多いサブユニットである S1P1/S1P2/S1P3 に注目して検討した。
2. S1P 単独あるいは Poly(I:C) との共刺激により epi4 から産生される IL-8 産生量を ELISA 法にて測定した。
3. S1P1 特異的アゴニストである SEW2871 存在下で産生される IL-8 産生量を ELISA 法にて測定した。
4. S1P 刺激により誘導される IL-8 発現に対する S1P 受容体の関与を検討するため、S1P1/S1P2/S1P3 特異的 siRNA を用いて epi4 における S1P 受容体 mRNA 発現を knockdown した。その後、各 S1P 受容体 knockdown-epi4 を用いて、2. と同様の実験を行った。

【結果】

1. epi4 における今回検討した S1P 受容体サブセットである S1P1・S1P2・S1P3 全ての mRNA 発現を認めた。しかしながら、S1P2、S1P3 と比較し S1P1 mRNA は低発現であった。
2. S1P あるいは Poly(I:C) 刺激により epi4 から IL-8 産生が誘導された。さらに、S1P・Poly(I:C) 共刺激により IL-8 産生量は相乗的に増加した。
3. S1P1 特異的アゴニストである SEW2871 存在下での Poly(I:C) 刺激による epi4 からの IL-8 産生は、Poly(I:C) 単独刺激した実験群と比較して、特に変化を認めなかった。
4. S1P 単独あるいは S1P・Poly(I:C) 共刺激によって誘導される IL-8 産生は、S1P2/S1P3 knockdown-epi4 において抑制された。しかしながら、S1P1 knockdown-epi4 においては control 群と比較して IL-8 発現抑制効果は認めなかった。

【考察及び結論】

S1P・Poly(I:C) の共刺激によりヒト歯肉上皮細胞は炎症性サイトカインの発現を増加することから、炎症時に血小板から産生される生理活性脂質 S1P や DAMPs は歯肉上皮細胞に対して起炎因子として機能する可能性が示唆された。また S1P 存在下で増強される IL-8 発現には S1P2/S1P3 が関与していることが示唆された。

培養歯根膜由来上皮-間葉間相互作用によるマラッセの上皮遺残細胞のアポトーシス誘導

東北大学病院 総合歯科診療部

○王 鋭、 下西 充、遠藤 直樹、 高橋 健、 渡辺 弘淳、 斉藤 修

Epithelial-mesenchymal interactions induce apoptosis in the epithelial cells of Malassez *in vitro*

Division of Comprehensive Dentistry, Tohoku University Hospital,

○WANG Rui, SHIMONISHI Mitsuru, ENDOU Naoki, TAKAHASHI Ken, WATANABE Hiroatsu, SAITO Shu

(研究目的)

これまで、当教室ではヒト歯根膜組織片から上皮細胞および同由来線維芽細胞を同一シャーレ内で培養し、その細胞間相互作用に関する研究を行ってきた。線維芽細胞と上皮細胞を混培養すると、線維芽細胞の増殖能が上がり、最終的に上皮細胞は排除されてしまう。この過程で、上皮細胞はエナメルマトリックスプロテインのアメロゲン、アメロプラスチンおよびそれらを分解するエナメルマトリックスプロテアーゼの MMP-20、KLK 4 の誘導がみられることが確認されている (第 135 回日本保存学会にて発表)。アポトーシスはプログラム細胞死の一種で、遺伝的に細胞の自殺を引き起こす。現在、アポトーシスは様々な分野で研究され、生物個体において発生や恒常性の維持のみならず疾患の予防にも重要な役割を果たしていることがわかってきた。歯科分野でもマラッセの上皮遺残のアポトーシスは数例報告されていることから、アポトーシスがセメント質の石灰化に関与し、マラッセの上皮遺残はアポトーシスによって歯根膜の恒常性を保っている可能性があると考えられる。

本研究では、混培養した上皮細胞のアポトーシスを確認するため、アポトーシスの促進因子である Bax と抑制因子である Bcl-2 の発現に関する検討を行った。

(材料及び方法)

東北大学病院口腔外科外来で抜去した第三大臼歯より歯根膜組織を採取し、無血清混合培地により同一組織片から上皮細胞および線維芽細胞の初代培養を行った。プロナーゼ溶液により細胞を回収し、再度、上皮細胞および線維芽細胞を同一ディッシュに播種し、混培養した。広範囲のサイトケラチンを認識する AE1/AE3 にて上皮細胞の存在を確認した後、サンプルとして実験に用いた (以下 Co-culture cells)。TUNEL 法にて上皮細胞のアポトーシス発生の有無、BrdU の取り込みにより増殖細胞の同定、および免疫染色法、半定量的 RT-PCR 法にて Bax、Bcl-2 の発現を解析した。また、コントロールとして、上皮細胞のみのサンプル (以下 Control cells) を用いた。

(結果)

位相差顕微鏡像にて Co-culture cells は上皮細胞と線維芽細胞の境界が明瞭ではなく、シャーレ全体に上皮細胞と線維芽細胞が混在して確認された。TUNEL 法では、Co-culture cells の上皮細胞に強い陽性を示した。また同時に、Co-culture cells の上皮細胞に BrdU の取り込みが観察され、細胞増殖が確認された。免疫染色法では、Co-culture cells は Bax に関しては上皮細胞に強く観察されたが、線維芽細胞には観察されなかった。Bcl-2 は上皮細胞、線維芽細胞両方に観察された。Control cells では Bax、Bcl-2 両方とも観察された。半定量的 RT-PCR 法では、Bax に関しては Co-culture cells の mRNA が Control cells に比較して有意的に強く発現した ($p < 0.01$)。Bcl-2 に関しては Co-culture cells と Control cells の間に有意的な差は認められなかった。

(考察)

当教室はこれまで細胞間相互作用によって歯の石灰化に関与するアメロゲン、アメロプラスチン、MMP-20 および KLK4 を報告してきた。今回、TUNEL 法では混培養した上皮細胞に強い陽性を示したことから、アポトーシスの関与が確認された。また、Co-culture cells は Bax、Bcl-2 共に発現がみられたが、Bax の方が上皮細胞で強く発現したことから、混培養した細胞間相互作用により上皮細胞のアポトーシスが誘導されたと考えられる。また、一方、BrdU の取り込みが上皮細胞に強く確認されたことにより、上皮細胞の cell turnover が活性化し、石灰化を強く誘導することが示唆された。

羊膜上培養歯髓由来細胞シートの免疫組織化学的検討

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

○ 山本俊郎¹, 本城賢一^{1, 2}, 市岡宏顕^{1, 2}, 山本健太^{1, 2}, 赤松佑紀¹,
足立圭司¹, 大迫文重¹, 雨宮傑¹, 喜多正和², 金村成智¹

Immunohistochemical analysis of a pulp-derived cells cultured on human amniotic membrane sheet

Department of ¹Dental Medicine and ²Immunology, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

○ Yamamoto Toshiro¹, Honjo Kenichi^{1, 2}, Ichioka Hiroaki^{1, 2}, Yamamoto Kenta^{1, 2}, Akamatsu Yuki¹, Adachi Keiji¹, Oseko Fumishige¹, Amemiya Takeshi¹, Kita Masakazu², Kanamura Narisato¹

【研究目的】

我々は、抗炎症作用・感染抑制作用等を有した羊膜に注目、羊膜を細胞培養基質として用いた再生医療の研究を実施している。これまでに、羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮細胞シートの作成方法を確立、当科において各種口腔粘膜上皮欠損患者に対して臨床応用を行い、拒絶反応等の異常なく良好な結果を得ている。これより羊膜が細胞培養の基質として適し、また新たな再生医療として有用かつ有効であることを報告している。さらに、この細胞培養系を歯根膜由来細胞の培養に応用したところ、歯根膜由来細胞が羊膜上で増殖し、デスマゾームやタイト結合といった強固な細胞間接着装置が存在、培養歯根膜シートの作成に成功するとともに、*in vivo*で自家移植を行う技術を開発した。次に、第135回秋季学術大会にて我々は幹細胞ソースとしても近年着目されている歯髓細胞に注目し、羊膜を基質とした培養歯髓由来細胞シートの作成が可能であることを報告した。そこで今回、我々は羊膜上培養歯髓由来細胞シートに免疫組織化学的検討を加えたので報告する。

【材料および方法】

便宜抜歯により抜去された智歯をセメントエナメル境で横断、歯髓組織のみを無菌的に採取した。歯髓組織を細分した後、10%ウシ胎仔血清(FBS)と抗菌薬を添加したDMEMを用い初代培養を行った。その後3~4継代培養、羊膜上にこれら歯髓由来細胞を播種。約2週間培養後、vimentin、Ki-67、Zo-1、CD44、CD105、CD146について免疫組織化学的検討を行った。なお、当研究の実施および歯髓組織と羊膜の利用については、該当患者に対して本研究の内容ならびに安全性の説明を行い、同意を得た上で実施した。また、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の許可を得ている(RBMR-C-772)。

【成績】

歯髓由来細胞は、羊膜上で層状構造を示し、シート状の培養が可能であった。また、羊膜上歯髓由来細胞は間葉系細胞マーカーであるvimentin、細胞増殖マーカーであるKi-67陽性であり、細胞間には細胞間接着マーカーであるZo-1が発現していた。さらに、間葉系幹細胞マーカーであるCD44、CD105、CD146陽性細胞の局在も認めた。

【考察】

歯髓由来細胞は、発生学的に歯根膜と同じ間葉系組織で分化能と表面抗原が類似する。歯の内部に位置するために有害刺激が少なく、酸素濃度が低いために遺伝子への影響が少ない。従来、抜歯後に医療廃棄物として処理されていた乳歯、智歯などの永久歯から比較的簡便に入手が可能で、かつ、歯根膜と比べて細胞増殖能が高く、細菌感染の機会が少ないためにシート作成の再現性が高い。再生医療の領域では、歯髓由来細胞を用いた骨再生に関する報告は数多く存在するが、培養シートに関する報告はみられない。本結果から、歯髓由来細胞は羊膜上で増殖し、タイト結合といった強固な細胞間接着装置が存在しており個々の細胞ではなく、羊膜上にて一枚の細胞シートを形成しているものと考えられた。さらにシート中に幹細胞の存在が確認され、これら幹細胞の多分化能・自己複製能による新たな歯周組織再生療法の開発へと繋がる可能性が示唆された。

【結論】

羊膜は歯髓由来細胞の培養に適当な足場として機能しており、歯髓由来細胞は個々の細胞ではなく、羊膜上にて一枚の細胞シートを形成していた。さらにシート中に幹細胞が存在している可能性が示された。

ヒト歯肉上皮細胞における interleukin (IL)-17 と IL-17 受容体の発現

新潟大学研究推進機構超域学術院¹, 新潟大学医歯学総合研究科 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
○宮内 小百合^{1,2,3}, 本田 朋之^{1,2}, 奥井 隆文^{1,2}, 中島 貴子^{1,4}, 多部田 康一¹, 山崎 和久^{1,3}

Gene expressions of IL-17 and IL-17 receptor family in human gingival epithelial cells

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
○Miyauchi S^{1,2,3}, Honda T^{1,2}, Okui T^{1,2}, Nakajima T^{1,4}, Tabeta K¹, Yamazaki K^{1,3}

【背景および目的】

Interleukin (IL)-17 は歯周炎の病態形成に関連していることが示唆されている。我々もこれまでに T helper 17 cell (Th17) に関連するサイトカインの遺伝子発現は歯肉炎組織に比較して歯周炎組織で上昇していることを報告した (Honda T *et al.*, Clin Chim Acta. 2008)。また、ヒト歯肉上皮細胞において IL-17A/F は MAPK 依存的に NF- κ B を活性化して IL-8 の産生を誘導することを報告した (Takahashi N *et al.*, Eur J Oral Sci. 2011)。

IL-17 は A, B, C, D, E, F のファミリー、IL-17 受容体 (IL-17R) は A, B, C, D, E のファミリーから構成される。近年、細菌感染によって腸管粘膜上皮より IL-17C が産生され、自然免疫の活性化および炎症応答の増強に働くことが報告された。歯肉上皮における IL-17C を含む IL-17 ファミリーの産生に関してはこれまでに報告されておらず、また、IL-17C のレセプターとされる IL-17RE の発現やそれにより誘導される応答について明らかでない。本研究の目的は、歯肉上皮細胞における IL-17 および IL-17R ファミリーの遺伝子発現およびその機能について解析することである。

【材料および方法】

歯肉上皮細胞はヒト歯肉不死化細胞株 epi4 (大阪大学大学院歯学研究科口腔治療学教室 村上伸也教授より供与) を Supplement S7 添加 Eplife 培地にて培養し、以下の実験に供した。

(1) IL-17R ファミリーの発現解析

epi4 における未刺激時の IL-17R ファミリーの遺伝子発現を RT-PCR 法により確認した。

(2) IL-17 ファミリーの発現解析

epi4 における未刺激時の IL-17 ファミリーの遺伝子発現を RT-PCR 法により確認した。

(3) 各種抗原刺激による IL-17 ファミリー発現誘導の解析

epi4 を各種抗原 (*P. gingivalis* 菌体 (live or heat-killed), *P. gingivalis* LPS, *E. coli* LPS, Pam3CSK4, IL-1 β , TNF- α) で刺激を行い、4, 8 時間後の IL-17 ファミリーの遺伝子発現変動を real-time PCR 法にて解析した。

(4) Recombinant IL-17 (A, C) に対する応答性の解析

epi4 を recombinant IL-17A, IL-17C で刺激し、4, 8, 12 時間後の IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, HBD2 の遺伝子発現変動を real-time PCR 法にて解析した。

【結果】

RT-PCR 解析により、ヒト歯肉上皮細胞においてすべての IL-17 受容体 (IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE) が恒常的に発現していることが確認された。また、IL-17C, IL-17D, IL-17E は恒常的な発現レベルが高いが、IL-17A は恒常的には発現していないことが明らかとなった。*E. coli* LPS, Pam3CSK4, IL-1 β , TNF- α 刺激により IL-17C の遺伝子発現が上昇したが、IL-17A, B, D, E, F の遺伝子発現はいずれの抗原刺激においても変動しなかった。Recombinant IL-17A 刺激により IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, HBD2 の遺伝子発現が上昇し、IL-17C 刺激では IL-6, MCP-1 の遺伝子発現が上昇した。

【考察】

抗原刺激により IL-17C の遺伝子発現が上昇したことから、歯肉上皮において細菌等の感染により IL-17C が産生され、歯周炎の病態形成に関与することが示唆された。IL-17A および IL-17C 刺激により IL-6, MCP-1 の遺伝子発現は共通して上昇したことから、IL-17C には IL-17A と共通するシグナリング経路が存在することが考えられる。しかし異なる挙動を示す点は、それぞれの異なる役割を示唆する。ヒト歯肉上皮における IL-17C の働き、およびその受容体である IL-17RE 下流のシグナリングの解明を含め、さらなる検討が必要であると考えられる。

ヒト歯肉線維芽細胞における TNF- α 誘導性の MMP-1 産生に対するインクレチン関連薬の影響

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 顎顔面再建学講座 歯科保存学分野

○徳田 雅行, 作田 哲也, 小山 徹, 梶原 武弘, 達山 祥子, 川上 克子, 森元 陽子, 江本 真規子, 藤澤 真理, 宮下 桂子, 藤島 慶, 鳥居 光男

Effects of incretin related-drugs on TNF- α -induced MMP-1 production in human gingival fibroblasts

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, field of Oral and Maxillofacial Rehabilitation, Kagoshima University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Masayuki TOKUDA, Tetsuya Sakuta, Tohru Oyama, Takehiro Kajihara, Syouko Tatsuyama, Yoshiko Kawakami, Yoko Morimoto, Makiko Emoto, Mari Fujisawa, Keiko Miyashita, Kei Fujishima, Mitsuo Torii

【研究目的】

Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 は線維芽細胞や軟骨細胞から分泌され、I 型、II 型、III 型や X 型コラーゲン等の細胞外マトリックスを分解し、組織破壊や組織の再構築に関与している。歯肉炎や成人性歯周炎の患者では健常人と比べて歯肉組織における MMP-1 の発現が亢進し、また、MMP-1 プロモーター領域の polymorphism が重症の慢性歯周炎のリスクファクターとなることが報告されている。

インクレチンは腸管由来のインスリン分泌刺激因子であり、主として、Glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide-1 (GLP-1) があり、それぞれ、十二指腸に存在する K 細胞と下部小腸や大腸に存在する L 細胞から分泌される。インクレチンは食事摂取により分泌が促進され、膵臓の β 細胞に作用しインスリンの分泌を促進する。また、インクレチンは血中の dipeptidyl peptide-4 (DPP-4) および中性エンドペプチダーゼによって速やかに分解される。現在、インクレチン関連薬として、DPP 阻害薬と GLP-1 受容体作動薬が糖尿病治療薬として使用されている。インクレチン関連薬は膵臓に対する作用以外に、1) 食欲抑制作用 2) 心保護作用 3) 血管拡張作用 4) マクロファージにおける抗炎症作用 5) 骨吸収抑制作用など多彩な膵外作用を示すが、歯肉線維芽細胞における役割については十分には明らかになっていない。そこで本研究ではヒト歯肉線維芽細胞において腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- α ; TNF- α) の誘導する MMP-1 産生に GLP-1 受容体作動薬が与える影響について検討した。

【実験方法】

- ①GLP-1 受容体作動薬: liraglutide (Victoza®, Novo Nordisk Pharma), exenatide (Byetta®, Eli Lilly Japan)
②リコンビナントヒト TNF- α (Wako)、培地は 10% FBS を含む D-MEM を用いた。
- MMP-1 産生量の測定:ヒト歯肉線維芽細胞を、24 穴プレートに 2.8×10^4 個播種した。GLP-1 受容体作動薬 and/or TNF- α を含む培地で 24 時間もしくは 48 時間刺激し、培養上清を回収した。培養上清中の MMP-1 の濃度は ELISA (Quantikine)を用いて測定した。
- ヒト歯肉線維芽細胞の生存能の測定:ヒト歯肉線維芽細胞を 96 穴プレートに 3.5×10^3 個播種した。種々の濃度の GLP-1 受容体作動薬を含む培地で刺激し、MTT アッセイ法により生存能の評価を行なった。
測定結果に対して Mann-Whitney U-test を用いて危険率 5%で統計処理を行なった。

【結果】

- ヒト歯肉線維芽細胞において TNF- α は MMP-1 の産生を誘導した。
- TNF- α が誘導する MMP-1 の産生に対して、exenatide は影響を与えなかったが、liraglutide は MMP-1 の産生を有意に増強した。
- GLP-1 受容体作動薬はヒト歯肉線維芽細胞の生存能に影響を与えなかった。

【考察】

本研究では、同じ GLP-1 受容体作動薬である liraglutide と exenatide が、TNF- α の誘導する MMP-1 産生において異なった作用を示した。2者の血中における半減期を比較すると、liraglutide の方が約8倍ほど半減期が長い。このことから培地中における2つの作動薬の安定性の違いが、MMP-1 産生の誘導において影響を与えたのかもしれない。

TNF- α は歯肉上皮細胞において TNF I 型受容体-PKA シグナリングを介して RANKL 発現を誘導する

昭和大学歯学部歯周病学教室

○藤原亮一 白井通彦 西井浩介 塚本康巳 山本松男

TNF- α induces RANKL expression in gingival epithelial cells through PKA signaling
○Ryoichi Fujihara, Michihiko Usui, Kousuke Nishii, Yasumi Tsukamoto, Matsuo Yamamoto

【目的】

歯周炎において歯周病原菌の侵襲により TNF- α や IL-1 などの炎症性サイトカインが産生され、歯周組織が破壊される。歯槽骨の吸収は破骨細胞によって引き起こされ、その分化には RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) が必須である。近年、歯周炎に罹患した患者の歯肉溝内浸出液中で RANKL の量が増加し、その decoy 受容体である osteoprotegerin の量は減少していることが明らかとなった。歯肉溝は歯肉上皮組織で構成されているにも関わらず、歯肉上皮細胞における RANKL の発現については十分に知られていない。本研究では、歯肉上皮組織における RANKL の発現と歯肉上皮細胞においてどのような因子が RANKL 発現を制御しているのかを検討した。

【方法】

ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 は DMEM(FBS10%)、HO1- μ -1 は RPMI/MEM(FBS10%)、初代培養ヒト口腔内上皮細胞 (HOK) は OKM(FBS10%)にて培養し、各種 assay に使用した。遺伝子発現は RT-PCR 法ならびにリアルタイム PCR 法、タンパク質発現は western blot 法を用いて検出した。また、生後 4 週齢の雌の ICR マウスを用いて免疫組織化学染色を行い、歯肉上皮組織における TNF- α 、RANKL 発現を検証した。

【結果】

Ca9-22、HO1- μ -1、HOK 細胞から RNA を抽出し RT-PCR 法にて RANKL mRNA 発現の有無を調べたところ、全ての上皮細胞から RANKL の発現を確認することができた。western blot 法を用いたタンパク質発現においても全ての上皮細胞において、RANKL タンパク質の発現を確認することができた。次に、マウス歯肉上皮組織に免疫染色を行い RANKL タンパク質の発現を調べた結果、骨芽細胞や歯根膜細胞だけではなく付着上皮、歯肉溝内上皮、口腔歯肉上皮にもその発現を観察することができた。TNF- α は歯根膜細胞において RANKL の発現を増加させる炎症性サイトカインとして知られている。そこで TNF- α の歯肉上皮組織における発現を免疫染色によって検証したところ、付着上皮および口腔歯肉上皮に TNF- α の発現が確認できた。さらに、歯肉上皮細胞を TNF- α で刺激したところ、Ca9-22 と HOK において RANKL の発現が対象群と比較して有意に増加した。TNF- α に TNF 受容体 I 型および II 型に対する中和抗体を加え 24 時間培養したところ、TNF 受容体 I 型中和抗体を加えた群において RANKL の発現が有意に減少した。最後に、TNF- α が RANKL の発現を誘導する経路を調べるために、PKA シグナルの役割を検証した。その結果、TNF- α によって増強された RANKL mRNA および RANKL タンパク質の発現は PKA シグナル阻害剤 (H89, PKI) によって有意に減少し、PKA シグナル活性化因子 (Forskolin) はその発現を有意に増加させた。

【考察】

本研究の結果より、TNF- α は歯肉上皮細胞において TNF I 型受容体-PKA シグナルを介して RANKL の発現を誘導することが示された。このシグナル経路を介して歯肉上皮細胞から産生された RANKL が破骨細胞形成および、歯槽骨破壊に関与する可能性が示唆された。

歯根膜細胞の石灰化過程における TGF- β 誘導性の I 型コラーゲン代謝機構
大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)
○河原貴展、山下元三、梶川哲宏、前田憲一郎、北垣次郎太、山田 聡、北村正博、村上伸也

TGF- β regulates collagen synthesis in the course of periodontal ligamental cell calcification

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Takanobu Kawahara, Motozo Yamashita, Tetsuhiro Kajikawa, Kenichiro Maeda,
Jirota Kitagaki, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami

【研究目的】

TGF- β (Transforming Growth Factor beta) は広汎な組織で発現が認められ、細胞の増殖分化、遊走、接着、アポトーシス、細胞外基質産生といった多様な高次機能発現を通じて組織の発生のみならず、再生、創傷治癒を制御することが明らかにされているサイトカインである。歯周組織においては歯胚の発生や分化誘導に際し TGF- β を介した細胞内シグナルが発生・分化にとって重要であることが明らかにされている。しかしながら、歯根膜細胞に対して TGF- β シグナルが果たす役割は未だ十分に解明されていない。そこで本研究においては、歯周組織再生の中心を担う歯根膜細胞の恒常性維持に果たす TGF- β シグナルの生理的意義を解明する為に、TGF- β I 型受容体阻害剤を用いて内在性 TGF- β シグナルを遮断し、歯根膜細胞の硬組織形成過程に与える影響に注目して解析を行った。

【材料と方法】

マウス歯根膜細胞株 (MPDL22) およびヒト初代培養歯根膜細胞をアスコルビン酸および β -グリセロリン酸を含む石灰化誘導培地中で長期培養を行った。その際、BMP-2、TGF- β として FGF-2 としたサイトカインおよび TGF- β I 型受容体阻害剤 (SB431542、LY364947、Inhibitor II) を時期特異的に添加し、石灰化物形成に及ぼす影響をアルカリフォスファターゼ活性の測定およびアリザリン染色で、また骨芽細胞分化遺伝子の発現を real-time PCR 法により検討した。歯根膜細胞におけるコラーゲン代謝は *van Gieson* 染色を行い、細胞増殖については *BrdU* (5-bromo-2'-deoxyuridine) 取り込み試験にて検討を行った。

【結果と考察】

TGF- β I 型受容体阻害剤 SB431542 を用いて内在性 TGF- β シグナルを遮断することで、MPDL22 の増殖は抑制された。MPDL22 の石灰化誘導長期培養下に SB431542 を添加すると、BMP-2 誘導性のアルカリフォスファターゼ活性および石灰化物形成の著しい亢進を認め、骨芽細胞分化遺伝子である *Runx2* や *osterix* の mRNA 発現上昇が認められた。また、歯根膜細胞の石灰化誘導長期培養モデルにおいて SB431542 処理を培養期間の初期のみに行った際、石灰化物形成は増強された。一方、SB431542 処理によりコラーゲン産生の低下が認められた。当教室において樹立した 3 種類の初代培養ヒト歯根膜細胞株においても、SB431542 を用いて TGF- β シグナルを遮断することで、BMP-2 誘導性の石灰化物形成の亢進が認められた。また異なる化学構造の小分子化合物である TGF- β I 型受容体阻害剤 LY364947 や Inhibitor II を石灰化誘導培地中で長期培養に添加した場合においても、BMP-2 誘導性の石灰化物形成の亢進を認めた。

以上より、TGF- β シグナルは歯根膜細胞において初期の分化段階では抑制的に作用する一方、石灰化の成熟過程においては誘導している可能性が示唆された。これは TGF- β が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への各分化過程に特異的に作用しており、TGF- β により誘導されるコラーゲンの代謝産生は歯根膜細胞の硬組織形成能を有する前駆細胞への分化過程ではなく、硬組織形成細胞の成熟過程における細胞外基質産生にとり重要であることを意味する。本研究で得られた知見は歯周組織再生過程における歯根膜細胞の特性を理解するうえで重要な情報であり、時期特異的な TGF- β シグナルの遮断に基づいたコラーゲン代謝産生の調節が歯周組織再生治療へと応用できる可能性を示唆するものと考えられる。

ヒト歯根膜細胞の増殖，接着，遊走能に対する EMD 由来合成ペプチドの影響

¹大阪歯科大学 歯周病学講座, ²大阪歯科大学, ³大阪歯科大学 口腔病理学講座
○高橋幸達¹, 田口洋一郎¹, 富永和也³, 小正聡², 安井菜津希¹, 奥田麻貴子¹, 田中昭男³,
梅田誠¹

Effects of oligopeptides derived from enamel matrix derivatives
on proliferation, adhesion and migration of human periodontal ligament cells
Osaka Dental University, ¹Department of Periodontology, ³Oral Pathology
○Saitatsu Takahashi¹, Yoichiro Taguchi¹, Kazuya Tominaga³, Satoshi Komasa², Natsuki Yasui¹, Makiko Okuda¹, Akio Tanaka³
Makoto Umeda¹

【目的】

近年、歯周組織再生療法の普及によって、幼若ブタの歯胚から抽出されたエナメルマトリックスデリバティブ（以下、EMD と略す）が現在広く臨床応用され、先進医療として認知されている。しかし、EMD は生物由来材料であるため、未知の病原体の問題点を払拭できず患者からの拒否感があるのも事実であり、生物に由来しない合成ペプチドの開発が望まれていることから、EMD の基礎研究から得た成果を基に新規合成ペプチドを作製した。我々はこの新規合成ペプチドを用い、SD 系ラットの骨髄細胞の硬組織分化誘導に対する評価、同ラットに対する動物実験での評価から、新規合成ペプチドが骨形成を促進し、セメント質様の硬組織を形成する知見を得た。

今回、ヒト歯根膜細胞（HPLFC）を実験に使用し、歯周組織再生療法に不可欠である未分化間葉細胞の一つである歯根膜細胞に対する新規合成ペプチドの影響について、細胞の増殖、接着および遊走の観点から比較・検討した。

【材料と方法】

ヒト歯根膜細胞として、HPLFC を実験に使用した。HPLFC の増殖、接着および遊走に対する新規合成ペプチドの影響を検討するために、HPLFC を、10%FBS と抗菌薬を含む Dulbecco's modified Eagle medium を用いて継代培養し 3 代目を実験に供した。合成ペプチドを 100 ng/mL の各濃度の合成ペプチドを培地に溶解させ HPLFC に応用したものを、実験群とした。また、合成ペプチドを含まない培地で培養した群を対照群とした。細胞増殖に関しては、96 well プレートに 4×10^4 個/mL ずつ播種し 1, 3, 24, 72 時間培養し、Promega 社製 CellTiter-Blue™ Cell Viability Assay kit を用いて測定した。細胞接着に関しては、96 well プレートに 4×10^4 個/mL ずつ播種し 1 時間後の細胞接着を Invitrogen 社製 PicoGreen® dsDNA Quantitation Assay Reagent Kit を用いて測定した。細胞遊走に関しては Boyden chamber 法を改良して行った。すなわち、細胞を Molecular Probes 社製 Calcein^{AM} にて蛍光染色を施し Beckton Dickson 社製 FALCON™ Fluoroblok Insert System を用いて、1, 4, 8 時間後の細胞遊走を測定した。対照群として合成ペプチドを作用させない培養細胞を用いた。各々の実験について 3 回行い、student の t 検定を用いて統計分析を行い、有意水準を 5% 以下にした。

【結果】

細胞増殖は、培養開始 1, 3, 72 時間における実験群では対照群に比べて有意に高かった。培養開始 24 時間では、統計学的有意差は認めなかったものの、実験群で対照群と比較して高い値を示した。また、増殖は経時的に増殖傾向を示した。細胞接着、遊走ともに実験群では対照群と比較して各側定時で有意に高い値を示した。

【考察】

今回の実験結果から EMD 由来の合成ペプチドは、HPLFC の細胞増殖、接着および遊走を促進させたので、歯周組織の再生をもたらす可能性の一端を示したことになり、歯周組織再生療法に有用であることが示唆された。

羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞による歯周組織再生に関する検討

京都府立医科大学大学院医学研究科 歯科口腔科学
○熊本園子, 雨宮 傑, 本城賢一, 足立圭司, 西垣 勝, 大迫文重, 山本俊郎, 金村成智

Tissue engineering by Transplantation of Periodontal Ligament-derived Cells Sheet Cultivated on Amniotic Membrane.

Dental Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine
○KUMAMOTO Sonoko, AMEMIYA Takeshi, HONZYO Ken-Ichi, ADACHI Keiji, NISHIGAKI Masaru,
OSEKO Fumishige, YAMAMOTO Toshiro, and KANAMURA Narisato.

【研究目的】

歯周組織の再生には新生歯根膜が重要とされる。近年、歯根膜組織を採取し *in vivo* にて培養・増殖し得られた歯根膜由来細胞を移植することで、有意に歯周組織が再生するとの報告を散見する。羊膜は抗炎症・感染抑制作用等を有し、様々な細胞の培養基質として適していることがわかっている。これまでにわれわれは、羊膜上に歯根膜由来細胞の培養を行ったところ、歯根膜としての性質を保持し、強固な細胞間接着装置と基底膜を有した1枚の羊膜上培養歯根膜由来細胞シートが作成可能であることを報告した(2010年度秋季学術大会(133回))。

今回われわれは、臨床応用可能な羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞の作成を念頭に、上記にて得られた培養シートの *in vivo* における細胞動態について検討を加え、歯周組織再生の可能性について若干の知見が得られたので報告する。

【材料および方法】

羊膜は、帝王切開時の胎盤より採取し、洗浄後、羊膜上皮細胞を除去したものを研究に供した。また歯根膜組織は、抜去した智歯より採取し初代培養後、3~4代継代して得られた歯根膜由来細胞を羊膜上に約3週間の培養を行った。作成した羊膜上培養歯根膜由来細胞は、クエン酸処理した象牙質切片上に羊膜ごと静置し、実験動物(BALB/cヌードマウス)の腎被膜下への移植を行った。移植2週間にて培養シートと象牙質切片を摘出、H-E染色ならびに間葉系細胞マーカーの vimentin に対する抗体を用いて免疫染色を行った。

なお、当研究の実施および歯根膜組織、象牙質片、羊膜の利用については、該当患者に対し本研究内容、安全性の説明を行い、同意を得た上で実施した。また、京都府立医科大学医学倫理審査委員会(RBMR-R-21)ならびに、京都府立医科大学動物実験委員会(M22-152)の承認を得た上で実施した。

【結果】

歯根膜由来細胞は象牙質片上に付着しており、4~5層の紡錘形の歯根膜様細胞が層状に認められた。象牙質切片周囲に vimentin 陽性細胞の局在が認められた。

【考察および結論】

歯周組織欠損の再生に重要な要素として、増殖因子・細胞・基質が必要とされ、これまでに歯根膜由来細胞の培養にさまざまな基質を用いた報告されているが、理想的な歯周組織の再生のための基質はまだ開発されていない。われわれが渉猟した限り、歯根膜由来細胞の培養基質に羊膜を用いた研究報告はこれまでになく、また羊膜上歯根膜由来細胞の *in vivo* の環境下での細胞動態については未知の部分が多い。よって今回われわれは、羊膜上培養歯根膜由来細胞の実験動物への移植を行い、細胞の遊走増殖についての検討を行った。培養細胞の移植方法としては、実験動物の歯周欠損モデルへの移植が散見されるが、生着組織の均一化や特定が困難であること、また極めて狭小な部位への細胞移植であり、安定した再現性が得られないことが予測されたため、培養細胞を一箇所に着床させることが可能であり免疫寛容が高い腎被膜下への細胞移植を実施した。

結果、羊膜上培養歯根膜由来細胞は、羊膜を基質とすることで細胞の足場を形成され、象牙質切片と接着し歯根膜様細胞の新生が見られたものと考えられた。また、間葉系細胞マーカー(vimentin陽性細胞)が確認され、移植後においても、歯根膜としての性質を保持していることが示された。今後さらなる検討が必要と思われるが、羊膜上培養歯根膜由来細胞は、歯周組織を再生する可能性が示唆された。

本研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金(No.22792000)の助成を受けたものである。

ラット臼歯歯根発生過程における、 咬合によるヘルトヴィッヒの上皮鞘細胞数の変化

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野
○中曽根 直弘、石田 光平、横山 智子、岡田 萌、小松 康高、吉江 弘正

Changes of the number of Hertwig's epithelial root sheath cells by occlusion during root development in rat molars

Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
○Naohiro Nakasone, Kohei Ishida, Tomoko Yokoyama, Moe Okada, Yasutaka Komatsu, Hiromasa Yoshie

【背景】

これまで我々は、ラット臼歯発生過程における増殖細胞分布を解析し(Nakasone N et al, 2006)、歯根形成期に起こる急激な増殖活性の低下は咬合の影響が大きいと推測した。そこで我々は萌出前の臼歯の対合歯を抜去することで、咬合を完全に排除する実験系を確立した。その研究において、ラット臼歯歯根発生過程において開始される咬合が、根尖部歯髄および歯周組織の細胞増殖活性を減少させ、歯根長に影響を与えることが明らかとなった(Nakasone N and Yoshie H, 2011)。

ヘルトヴィッヒの上皮鞘(Hertwig's epithelial root sheath: HERS)は、歯冠形成後に内外エナメル上皮により構成され、歯根発生において主役を演じる。これまで、正常発生した臼歯の HERS 細胞数や HERS 長の計測といった形態学的解析が行われてきたが、まだ不明な点も多い。咬合が歯根長に影響を与えることを考えると、咬合の有無により HERS に形態的变化が生じている可能性は高い。そこで本研究では、咬合が HERS の形態にどのような変化をもたらすかを HERS 細胞数に着目して解析した。

【材料と方法】

15 日齢 Wistar 系ラットの未萌出下顎第一臼歯を深麻酔下にて抜去した。10 日および 15 日後にアルデヒド系固定液にて灌流固定した。尚、無処置歯をコントロール群とした。また、正常歯根発生過程での HERS の形態を観察するために、15、18、21 日齢の無処置歯もサンプルとした。EDTA 脱灰後、パラフィン切片を作製し、H-E 染色を行った。H-E 切片上で HERS 細胞数を計測した。

【結果】

15 日齢群(P15)から咬合開始前の 21 日齢群(P21)まで、HERS を構成する内層および外層の細胞数は経時的に減少した。咬合開始直後の 25 日齢群では、コントロール群(P25)は HERS の内層および外層細胞数は P21 よりも有意に減少したが、実験群(E25)では有意な減少は見られなかった。また P25 と E25 間では HERS の内層、外層細胞数に有意な差が認められた。30 日齢になると、実験群(E30)およびコントロール群(P30)共に、HERS の内層および外層細胞数に有意な差は認められなかった。

【考察】

本研究により、咬合開始直後(25 日齢)に HERS の内層、外層共に細胞数が有意に減少することが明らかとなった。したがって、初期咬合が発生過程の歯根における HERS に重要な影響を与えることが示唆された。

歯周骨欠損部に移植した培養ヒト歯髄細胞の組織学的評価

鶴見大学歯学部歯周病学講座
○保母浩児, 金指幹元, 五味一博

Histological study of cultured dental pulp cells transplanted in the periodontal bone defect

Tsurumi University, School of Dental Medicine, Department of Periodontology
○Koji Hobo, Mikimoto Kanazashi, Kazuhiro Gomi

【研究目的】

最近、新たな歯周組織再生療法として組織工学的手法を用いた臨床研究が行われており、再生に用いる細胞源として歯根膜細胞や骨髄由来間葉系幹細胞を用いた臨床研究が開始されている。しかしながら細胞の採取には問題が残る。そこで我々は口腔内から採取でき歯根膜細胞あるいは骨髄細胞に代わる歯周組織再生に有効な細胞源として歯髄細胞に着目した。これまで研究よりヒト歯髄組織中に幹細胞が存在することが示している。今回、我々はヒト歯髄細胞 (HDPC) を basic Fibroblast Growth factor (b-FGF) 添加培地で培養し、細胞の基本特性を確認した上でアテロコラーゲンゲルを担体として歯髄細胞との複合体を作製し、ヌードラットに形成した人工骨欠損部へ移植し歯周組織の再生の可能性について組織学的に検討した。

【材料および方法】

本実験は鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認 (第 103 号) をうけ、鶴見大学歯学部実験動物指針に従って行った。本実験の目的と内容を説明し同意が得られた患者 (25 歳、女性) の矯正治療上の必要性から抜歯された小臼歯より HDPC を得た。実験には継代 4 代目の細胞を用いた。これまでの我々の研究より b-FGF を 50ng/ml 濃度で添加することで STR01 の比率が高くなることを示していることから、本研究においても b-FGF をこの濃度で添加した。得られた HDPC を用い alkaline phosphatase (ALP) 活性および骨系の遺伝子マーカーとして osteopontin (OPN), osteocalcin (OC), bone sialoprotein (BSP) を、象牙質のマーカーとして dentin sialophosphoprotein (DSPP) の遺伝子発現を用いて評価した。また、表面抗原を造血幹細胞マーカーである CD34, CD45 および間葉系幹細胞マーカーである CD44 と CD90 の発現をフローサイトメーターにより各抗体の発現解析を行った。次いでアテロコラーゲンゲルを担体として培養 HDPC との複合体を作製し、ヌードラット第 1 臼歯口蓋側に形成した人工骨欠損部に移植し組織学的に評価した。

【結果】

b-FGF 添加において ALP 活性が上昇し、骨の分子マーカーである OPN, OC, BSP および象牙質の分子マーカーである DSPP の遺伝子発現が上昇することを示した。さらに、b-FGF 添加下で培養した HDPC の表面抗原を CD34, 45, 44, 90 について調べたところ造血細胞マーカーである CD34, CD45 はネガティブであり、間葉系幹細胞マーカーである CD44 と CD90 はポジティブであった。この培養 HDPC を、コラーゲンゲルを担体としてヌードラットに形成した人工歯周骨欠損部に移植したところ、コラーゲンゲルのみの移植を行ったコントロール群では結合組織性の付着および骨の再生を認めなかったが、細胞を含む実験群では結合組織性の付着が認められた。

【考察】

HDPC を b-FGF 添加下で培養することにより、ALP 活性の上昇と骨系遺伝子の発現が上昇した。また、間葉系幹細胞マーカーである CD44 と CD90 がポジティブであった。以上のことから今回移植に用いた HDPC は間葉系細胞を含むと考えられる。本細胞の人工骨欠損部への移植により歯根との間に結合組織性の付着は認められたが、明らかなセメント質および骨の新生は認められなかった。これは今回用いたヌードラットは免疫不全ラットであるが、HDPC に対しては免疫反応を示したことが考えられる。しかし、コントロールでは結合組織性付着が認められないこと、炎症反応等が認められないことから HDPC の歯周組織再生の可能性が示されたと考えた。

【結論】

b-FGF 添加下で培養した HDPC は歯周組織を再生する可能性があると考えられる。

なお、実験の遂行に際し、終始ご指導頂いた鶴見大学歯学部 RI 研究センター川本忠文先生に感謝申し上げます。

内側性骨欠損の血管新生および骨再生に対する bFGF の効果

1) 日本大学大学院歯学研究科 歯学専攻応用口腔科学分野 2) 日本大学歯学部 保存学教室歯周病学講座

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

○木上理紗¹, 佐藤秀一^{2, 3}, 宇田川麻美¹, 土屋紀子¹, 吉巻友裕¹, 汐見登², 新井嘉則⁴, 伊藤公一^{2, 3}

Effect of bFGF on bone regeneration and angiogenesis in rat calvarial bone defect

1) Division of Applied Oral Science, Nihon University Graduate School of Dentistry, Tokyo, Japan

2) Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

3) Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

4) Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

○Risa Kigami¹, Shuichi Sato^{2, 3}, Asami Udagawa¹, Noriko Tsuchiya¹, Tomohiro Yoshimaki¹, Noboru Shiomi²,
Yoshinori Arai⁴, Koichi Ito^{2, 3}

【目的】

細胞増殖因子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor: 以下 bFGF と略す) は, 細胞増殖を促進するだけでなく, 強力な血管新生作用をもつサイトカインである。近年, bFGF の血管新生作用や骨形成促進作用に着目し, 歯周組織再生に関する研究が行われている。そこで, 本研究ではラット頭蓋骨に内側性骨欠損を作製し bFGF を含浸させたコラーゲンスポンジを設置し, 血管新生と骨再生に対する影響について, 血管造影およびマイクロ CT を用いて観察した。

【材料および方法】

F344/jcl 7 週齢のラット 40 匹にイソフルランによる吸入ガス麻酔後, ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内に注射し, 全身麻酔を行った。ついで, 頭蓋骨に 2% 塩酸リドカイン (1:80,000 アドレナリン含有歯科用キシロカインカートリッジ) 約 0.5ml を用いて局所麻酔を施し, 頭部皮下に切開を加えた。皮膚骨膜弁を作製し, 頭頂骨を露出させた。そして, 矢状縫合を避けるように, 両側に直径 5.0 mm の臨界内側性骨欠損をトレファインバーにて作製した。実験側には, 0.1% および 0.3% に調整した bFGF を含浸させたコラーゲンスポンジを内側性骨欠損部に設置し, それぞれ 0.1% bFGF 群と 0.3% bFGF 群とした。一方, 対照側には, 生理食塩水を含浸させたコラーゲンスポンジを設置し, 皮膚骨膜弁を復位し縫合した。in vivo マイクロ CT (R_mCT, 理学メカトロニクス, 東京) を用いて, 術直後を 0 週とし, CT 撮影を行った。ついで, 1 週から 4 週まで毎週 5 匹ずつ CT 撮影および血管造影を行った。血管造影法は, 全身麻酔後に CT 撮影を行った後, ラットの腹部に 2% 塩酸リドカイン約 1.0ml を用いて局所麻酔を施し, ラットの心臓を剖出させた。還流固定と同じ方法を用いて, 生理食塩水で脱血させ安楽死させた後, 10% 中性緩衝ホルマリン溶液を使用して固定した。ついで, 血管造影剤 (イオパニロン注 370 パイエル薬品株式会社, 大阪) 20 ml を自動注入機を用いて毎分 1.25 μ l の速度で全身に注入した後, 2 度目の CT 撮影を行い, 血管新生と骨再生を評価した。

【結果】

マイクロ CT 観察から実験側と対照側ともに, 術後 2 週から 4 週まで継続的に新生血管の増加を認めた。また, 実験側で有意に新生血管の増加を認め, とくに, 0.1% bFGF 群よりも 0.3% bFGF 群の方が有意に多くなった。一方, 新生骨様組織は, 実験側で術後 3 週以降から内側性骨欠損の辺縁に認められ, 0.3% bFGF 群では辺縁の全周に認められた。

【考察および結論】

血管造影法を用いたマイクロ CT 撮影により, 血管新生を認めた部位に, 骨再生が認められた。このことから, 骨再生において血管新生が先行し, それに続いて骨が形成されることが示された。

ヒト歯根膜由来細胞群および FGF-2 と BMP-2 との併用による組織再生

北海道医療大学歯学部 口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野,
○上與那原 朝秀, 日高 竜宏, 白井 要, 門 貴司, 長澤 敏行, 古市 保志

Potential of periodontal ligament derived cells implanted with FGF-2 and BMP-2 in tissue regeneration

Health Sciences University of Hokkaido, School of Dentistry,
Division of Periodontology and Endodontology,

○Tomohide Ueyonahara, Tatsuhiro Hidaka, Kaname Shirai, Takashi Kado,
Toshiyuki Nagasawa, Yasushi Furuichi

歯周病は成人が歯を喪失する主な原因となる疾患であり、一度損傷を受け失われた歯周組織の再生能は限られている。歯周病により失われた歯周組織の再構築には歯根膜細胞の存在が有用であると報告されている。また近年、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) や骨形成タンパク (BMP-2) などのサイトカインが歯周組織再生療法において注目されている。FGF-2 の局所応用は歯周病により破壊された歯周組織の再生に有効であると、臨床応用が期待されている。一方、BMP-2 は、欧米でサイナスリフトやインプラントのための骨増大に臨床応用されている。FGF-2 や BMP-2 は動物実験において歯根膜中の細胞増殖と分化を促進し、歯周組織の再生に関与することが報告されている。しかし、ヒト歯根膜細胞群 (HPDL 細胞群) において FGF-2 及び BMP-2 の相互作用に関する知見は少ない。そこで本研究では FGF-2、BMP-2 及びその併用が HPDL 細胞群において異所性の組織再生、特に血管組織形成や骨様組織形成にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

北海道医療大学歯科内科クリニックを受診した患者において、治療上抜歯が必要と判断し抜去した 3 本の歯の歯根膜組織から outgrowth 法にて増殖させ、3 細胞群を採取し、それぞれ HPDL1、HPDL2、HPDL3 とした。この実験計画は北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会の承認を得ている。採取した HPDL 細胞群および無細胞群、ヒト抜去歯を粉砕して得られたヒト凍結乾燥脱灰象牙質顆粒 (DeminerIALIZED Dentin Matrix : DDM) からなる埋植体それぞれに成長因子として①無添加群、②FGF-2 群、③BMP-2 群、④FGF-2+BMP-2 併用群の 4 条件を添加し、ヌードマウス背部皮下に埋植した。埋植 4 週後に屠殺し、摘出物から通法に従い切片を作製し、H-E 染色を施し、光学顕微鏡で組織学的に観察し、血管数と新生骨形成割合を計測した。また、新生組織の由来を確認するために免疫組織化学染色として、抗ヒト vWF ポリクローナル抗体を用いて血管内皮細胞の観察を行い、さらに移植した HPDL 細胞群が生着しているか検討するために摘出した組織の一部を用いた RT-PCR によってヒト GAPDH mRNA の発現の確認を行った。

ヒト GAPDH mRNA の発現を調べた結果、HPDL1、HPDL2、HPDL3 の成長因子無添加群から摘出した組織の全てから、ヒト GAPDH mRNA の発現がみられた。しかし DDM のみからなる無細胞無添加群では、ヒト GAPDH mRNA の発現はみられなかった。同様に、免疫組織化学染色の結果、HPDL1、HPDL2、HPDL3 の成長因子無添加群から摘出した組織の全てから、ヒト由来の血管内皮細胞がみられたが、DDM のみからなる無細胞無添加群では、ヒト由来の血管内皮細胞がみられなかった。このことより、ヌードマウス背部皮下に移植した HPDL 細胞群を含む埋植体中には HPDL 細胞群は生着しており、HPDL 細胞群に由来する血管新生が生じる可能性が示唆された。また、摘出した埋植体の組織学的所見および分析観察から、HPDL 細胞群を含む FGF-2 群では無添加群と比較して有意に血管数が増加していた。また、HPDL 細胞群を含む BMP-2 群では有意に新生骨形成割合が増加していた。さらに、HPDL 細胞群を含む FGF-2+BMP-2 併用群では、血管数は無添加群や BMP-2 群と比較して有意に増加した。また FGF-2 群と比較しても同程度の血管数であった。一方、同様の条件において、新生骨形成割合は BMP-2 群と比較して有意に減少したものの、HPDL 細胞群を含む無添加群と比較すると有意に増加した。HPDL1、HPDL2 を含む FGF-2+BMP-2 併用群では血管を取り囲むように新生骨の形成がみられた。

以上のことから、ヒト歯根膜細胞および FGF-2 と BMP-2 との併用が歯周組織再生に有用である可能性が示された。

凍結乾燥多血小板血漿を含む創傷被覆材による創傷治癒促進効果

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯科基礎移植・再生学分野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
○中島悠^{1,2}, 川瀬知之¹, 奥田一博², 吉江弘正²

A WOUND-DRESSING COATED WITH FREEZE-DRIED PLATELET-RICH PLASMA: ITS POTENT POSITIVE EFFECTS ON WOUND-HEALING

¹ Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University,
² Division of Periodontology, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University,
○Yu Nakajima^{1,2}, Tomoyuki Kawase¹, Kazuhiro Okuda², Hiromasa Yoshie²

【背景・目的】

歯周再生治療のみならず広範囲の創傷治療や再生治療において、PRPの有効性は証明されている。しかし、PRPが液体であることから、局所適用において、速やかな拡散・吸収・分解や低い操作性が課題とされてきた。ウシトロロンビンやカルシウムを添加することによってゲル化させる方法が広く採用されてきたが、最近では遠心力だけでゲル化させた Platelet-rich fibrin (PRF)に注目が集まっている。しかし、このPRFにも血小板の濃縮度や偏在という点で欠点が指摘されるようになってきている。われわれは、これらの課題を解決すると同時に、緊急時への対応も可能とする「第3のPRP」を開発した。生分解性 Polyglactin 910 mesh (Johnson & Johnson)をPRPの担体として採用し、この複合体を凍結乾燥して創傷被覆材とした。本研究では、この複合化被覆材の有効性を *in vitro* および *in vivo* で検証した。

【方法】

- 1) PRPメッシュの作製と基本性状解析：本学倫理委員会で承認されたプロトコールにしたがって、同意のもと健康なボランティアから採血を行い、通法に従って作製したPRPに生分解性メッシュ (Vicryl Mesh)を室温で3分間浸漬した後、-75°Cにて30分間急速凍結した。凍結サンプルを凍結乾燥してPRPメッシュを作製した。表面微細構造はSEMにて観察した。PRPメッシュに含まれる増殖因子の検出には抗体アレイ (Ray Biotech)を用いた。
- 2) *in vitro*細胞増殖試験：C57BL/6Jclマウス皮膚より採取した初代培養線維芽細胞を用い、Cell-culture insertにより非接触状態でPRPメッシュ(4°Cにて3-4週間保存、5 x 5 mm大にトリミング)を作用させ、WST-8により細胞数を評価した。
- 3) *in vivo*創傷治癒実験：糖尿病モデルマウス(BKS.Cg-*Leprdb*/*Leprdb*Jcl, 雌, 6週齢)の背部に作成した10×10 mmの全層欠損にPRPメッシュを貼付し、その治癒過程を病理組織学的・免疫組織学的に観察した。

【結果】

- 1) 構造的には、担体の線維表面には多数の血小板が偏在することなく吸着し、それを血漿が覆った状態で凍結乾燥されていた。
- 2) PRPメッシュには多数の増殖因子が検出され、単位タンパク量で比較する限り凍結PRPに含まれる増殖因子と有意差は認められなかった。
- 3) *in vitro*において、PRPメッシュは添加枚数に依存してマウス線維芽細胞の増殖を促進した。
- 4) *in vivo*において、PRPメッシュは、12日目において創傷部のαSMA陽性の線維芽細胞の増殖とコラーゲン産生・沈着を促進し、さらに血管新生(CD146陽性)も促進したことから、結果的に肉芽組織形成を顕著に促進した。また、これを追うようにして上皮組織の再生も進み、20日目において有意な開放創の縮小が認められた。逆に、肉芽組織内のαSMA陽性細胞の数は顕著に減少した。
- 5) *in vitro* および *in vivo* のいずれの実験においても、未処理メッシュは有意な効果を示さなかった。

【考察】

*in vitro*での細胞増殖試験および*in vivo*での創傷治癒試験を通して、われわれが開発したPRPメッシュの有効性が証明された。これは、PRPメッシュ中に多数の血小板と血漿成分が保存されていることによるものと思われる。また、本研究では、作製後から使用まで3-4週間の冷蔵保存期間を設けた。この状態でも、PRPメッシュの生理活性が良好に維持されていたことから、緊急時への対応も可能であることが示唆された。現在、さらに高密度に血小板を吸着保持できる担体に代えて、より高い生理活性を維持したPRPメッシュを試作中である。

Platelet-rich fibrin との複合化によるヒト培養骨膜シートの機能向上

新潟大学 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 医歯学総合研究科 顎顔面再建学講座 歯科基礎移植・再生学分野²,
○堀水慎¹, 久保田健彦¹, 川瀬知之², 奥田一博¹, 富田尊志¹, 両角俊哉¹, 吉江弘正¹

The potential of human alveolar bone-derived periosteal sheet as an osteogenic grafting material : Complex with platelet-rich fibrin

Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science, Niigata University Graduate school of Medical and Dental Sciences, Niigata, JAPAN¹,

Division of Pharmacology and Oral Bioengineering, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Niigata University Graduate school of Medical and Dental Sciences, Niigata, JAPAN²

○Horimizu Makoto, Kubota Takehiko, Kawase Tomoyuki, Nagata Masaki, Okuda Kazuhro,
Tomita Takayuki, Morozumi Toshiya, Yoshie Hiromasa

【背景と目的】

我々は、過去5年間において、歯周再生治療に自家培養骨膜シートを応用し顕著な治療成績を残してきた。しかし、6週間という長い培養期間と検体ごとの *in vitro* での石灰化活性のばらつきが課題である。この問題を解決するため、我々はヒト末梢血由来の Platelet-rich fibrin (PRF) との複合化を着想した。PRF は第二世代の PRP とも呼ばれるもので、高密度の血小板と高濃度の血小板由来の増殖因子を含んだフィブリンゲルといわれている。したがって、骨膜シート形成において、増殖・分化を促進する液性因子の提供のみならず、良好なスキャホールドとしての役割を果たすことが期待される。本研究では、骨膜シートを PRF 上で培養し、その増殖と分化が受ける影響について検討した。なお本研究は新潟大学倫理審査委員会の承認を得て行われた。

【材料および方法】

- 1) 本研究について十分な説明の上インフォームドコンセントを得て、下顎埋伏智歯抜歯の患者の下顎骨頰側部から骨膜を採取し 2×2 mm 大にトリミングし、Medium199 培地 (10% FBS, 25μg/ml アスコルビン酸含む) で 14 日間組織片培養した。
- 2) 同じく同意を得たうえで、採血した末梢静脈血 10 mL を 2,400~3,000 rpm で 13 分間遠心し、PRF を調製し、血小板が局在している傍赤血球層側を 8×8 mm 大にトリミングした。
- 3) 直径~10 mm に成長した骨膜シートをスクレーパーで剥離し PRF 上に移植した。さらに 14 日間培養した後、組織標本作製し、細胞密度、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性、コラーゲン沈着、石灰化の程度を評価した。
- 4) 28 日間培養した培養骨膜シートを PRF とともにヌードマウス背部皮下、あるいは頭蓋骨に作製した骨欠損に移植した。28 日後に摘出し、μCT による石灰化量の評価、さらに病理組織学的な新生骨量、細胞密度、コラーゲン沈着の評価に供した。

【結果】

- 1) PRF 上に移植した骨膜片と PRF との界面領域は、細胞密度が高く、ALP 陽性を呈した。
- 2) PRF 内部には骨膜細胞がフィブリン線維を分解しながら浸潤・増殖しており、細胞周囲にはコラーゲン線維沈着が認められた。局所的に細胞が高密度に集積した箇所もあり、そこには石灰化物の沈着が認められた。
- 3) ニードマウス背部皮下への移植では、分解・吸収により PRF の断片化が進んでいた。また移植した複合体の周囲には顕著なコラーゲンの沈着を認めた。
- 4) 頭蓋骨骨欠損部への移植では、培養骨膜と PRF 複合体移植した群で、有意な新生骨の形成を認めた。

【考察】

骨膜細胞の遊走と三次元的な細胞の重層化において、PRF は有効なスキャホールドとして機能していることが証明された。また、特に骨膜片と PRF との界面領域において、骨膜細胞の濃縮化と骨芽細胞への分化を示唆する所見が得られたが、これは骨膜二層のうちの骨形成層(cambium layer)の発生・形成過程によく似た現象ではないかと考えている。この可能性については、さらに深く検討を進めていきたい。以上の結果から、PRF との複合化は、骨膜シートの細胞増殖と分化の両方にとって有効に機能しており、技術的な改良を加えることによって、比較的短期間のうちに厚みがあり、機能的に向上した骨膜シートを形成できる可能性が示唆された。

***Porphyromonas gingivalis* 口腔感染マウスモデルにおける小胞体ストレスの誘導**

新潟大学研究推進機構超域学術院¹, 新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔保健学講座²,
新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野³, 新潟大学医歯学総合病院 歯科総合診療部⁴
○土門久哲¹ 宮内小百合^{1,2,3} 宮沢春菜^{1,2,3} 中島貴子^{1,4} 多部田康一¹ 山崎和久^{1,2}

Up-regulation of endoplasmic reticulum stress in orally *Porphyromonas gingivalis*-infected mice

Center for Transdisciplinary Research, Niigata University¹
Division of Oral Science for Health Promotion, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences²
Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences³
General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital⁴
○Domon H¹, Miyauchi S^{1,2,3}, Miyazawa H^{1,2,3}, Nakajima T^{1,4}, Tabeta K¹ and Yamazaki K^{1,2}

【研究目的】

小胞体は新規に合成された分泌タンパクおよび膜タンパクの修飾や立体構造を整える場である一方、異常な高次構造をもったタンパクの分解機構も存在する。このバランスに変化が生じ、小胞体内に高次構造の異常なタンパクが蓄積した状況は小胞体ストレスと呼ばれる。それに対し細胞は翻訳の抑制、小胞体シャペロンの誘導、異常タンパクの分解等の小胞体ストレス応答により小胞体の機能を維持する。小胞体ストレスは神経変性疾患、糖尿病、虚血性脳疾患、動脈硬化など、様々な疾患の病態に深く関与していることが報告されている。近年、歯周炎も上記の疾患の一部を含む様々な全身疾患との関連が報告されている。我々はこれまで小胞体ストレス関連遺伝子発現が、歯周炎罹患者の歯肉組織において有意に上昇していることを報告したが、そのメカニズムについての詳細は不明である。そこで今回我々は、歯周炎の病態形成における小胞体ストレス応答の役割を解明する第一段階として、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 口腔感染マウスモデル歯肉における小胞体ストレス関連遺伝子の発現を比較検討した。また、小胞体ストレス応答の観点から歯周病と全身疾患との関連の可能性を検討するため、同マウス肝臓における小胞体ストレス関連遺伝子発現を解析した。

【材料および方法】

6週齢のC57BL/6マウスに10⁹ CFUの*P. gingivalis* W83株を週2回、計6回口腔感染させた。その後上顎臼歯部周囲歯肉と肝臓を採取して全RNAを抽出し、逆転写酵素にてcDNAを合成した。BiP, XBP1, ATF4, CHOPの各小胞体ストレス関連遺伝子発現についてReal-time PCR法にて遺伝子発現定量解析を行った。

【成績】

歯肉組織中におけるBiP, ATF4, CHOPの遺伝子発現が*P. gingivalis*口腔感染群において有意に上昇していた。全XBP1遺伝子発現は減少したが、活性型XBP1遺伝子発現に有意差はみられなかった。一方、肝臓におけるBiPとCHOPの遺伝子発現が*P. gingivalis*口腔感染群において有意に上昇した。

【考察と結論】

*P. gingivalis*口腔感染により歯肉組織中における小胞体ストレス関連遺伝子発現が有意に上昇することがマウスモデルにおいても確認された。ATF4の遺伝子発現が上昇した一方でXBP1に有意差がなかったことから、これまで3種類報告されている小胞体ストレスセンサーのうち、PERKを介した経路の活性化が考えられる。小胞体ストレスが歯周炎の病態形成に与える影響は今後さらに解析していく予定である。また近年、肝臓での小胞体ストレスがインスリン抵抗性や脂質代謝の変化をもたらすと報告されており、*P. gingivalis*口腔感染による肝臓での小胞体ストレス関連遺伝子発現の上昇が歯周炎と全身疾患とを関連付ける因子となる可能性もあるが、詳細なメカニズムについては今後さらなる解析が必要である。

LPS の全身的な感作後の LPS 歯肉溝内投与はアタッチメントロスを誘導する

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病学分野

2) 花王株式会社 パーソナルヘルスケア研究所

○吉永泰周¹⁾, 中津 晋¹⁾²⁾, 藏本明子¹⁾, 鶴飼 孝¹⁾, 金子高士¹⁾, 市村育久²⁾,
押野一志²⁾, 矢納義高²⁾, 原 宜興¹⁾

Topical application of lipopolysaccharide into gingival sulcus induces periodontal attachment loss in rats immunized with LPS

1) Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

2) Global R&D - Personal Health Care, Kao Corporation

○Yasunori Yoshinaga¹⁾, Susumu Nakatsu¹⁾²⁾, Akiko Kuramoto¹⁾, Takashi Ukai¹⁾, Takashi Kaneko¹⁾,
Ikuhisa Ichimura²⁾, Kazushi Oshino²⁾, Yoshitaka Yano²⁾, Yoshitaka Hara¹⁾

【研究目的】

歯周炎は細菌と宿主免疫系の相互作用によって生じると考えられているが、歯周炎の発症や進行に宿主免疫系がどのように関与しているかについてはよくわかっていない。以前の研究で我々は、抗原 (LPS) とその特異抗体を歯肉溝内へ投与して、歯肉溝内における免疫複合体形成が歯周組織破壊を誘導することを示した。今回は、LPS 感作により血清抗体産生を誘導し、抗原のみを歯肉溝内へ投与した場合の歯周組織破壊について病理組織学的に調べた。

【材料および方法】

- 1) **実験スケジュール**: 36 匹の雄性 Lewis 系ラットを 2 つのグループに分けた。一方の群は、*E. coli* 由来 LPS を Freund's complete adjuvant とともに腹腔内投与し、28 日後に再度 LPS を Freund's incomplete adjuvant とともに腹腔内投与を行った (感作群)。もう一方の群には、PBS と adjuvant を混合したものを感作群と同じスケジュールで腹腔内に投与した (非感作群)。両群ともに 2 回目の腹腔内投与後、上顎両側第一臼歯の口蓋側歯肉溝に LPS (50mg/ml) を 30 分間 (5 分おきに 3ul ずつ)、24 時間毎に滴下した。0、5、10 回滴下した 24 時間後に、両群のラットを屠殺して上顎骨を摘出し、脱灰後 AMeX 法を用いてパラフィン包埋を行い、病理組織標本を作製した。
- 2) **血清抗体レベルの測定**: LPS 感作の状態を確認するために、LPS を 0、5、10 回滴下した 24 時間後に各ラットの眼窩下静脈から血液を採取、血清を分離し、ELISA 法により *E. coli* LPS に対する IgG 抗体レベルを測定した。
- 3) **形態学的評価および病理組織学的観察**: HE 染色を行った切片を用いて、セメント・エナメル境 (CEJ) から根面に接した接合上皮 (JE) 歯冠側端までの距離 (アタッチメントロス) を、さらに歯槽骨吸収の状態を確認するために CEJ から歯槽骨頂部までの距離 (ABL) を PC ソフト Image J にて測定した。また RANKL と免疫複合体の存在を確認するために C1qB を、抗 RANKL 抗体および抗 C1qB 抗体を用いた免疫組織学的染色を行った。

【結果】

抗 LPS 血清抗体レベルは、非感作群では実験期間中に上昇を認めなかった。しかし感作群では 5 日目ですでに上昇しており、10 日目でも高い値を維持していた。

両群 0 日目では、JE 内および上皮下結合組織にほとんど炎症性細胞浸潤を認めず、JE も CEJ に位置していた。5 日目では両群ともに JE の根尖側移動を認めたが、アタッチメントロスは観察されなかった。10 日目では、非感作群にはアタッチメントロスを認めなかったが、感作群ではアタッチメントロスを認め、歯槽骨頂部骨表面は不規則な形態となっていた。そして感作群の JE 内および上皮下結合組織に C1qB が検出された。

ABL は、10 日目で非感作群と比べて感作群で有意な増加を認めた。さらに歯槽骨頂部周囲の RANKL 陽性細胞数は、5 日、10 日目に感作群で有意に増加していた。

【考察および結論】

血清抗体レベルが上昇している感作群における LPS 歯肉溝内投与は、アタッチメントロスを誘導した。感作群の JE 内および上皮下結合組織における C1qB の発現から、LPS 感作によって血清および歯肉溝浸出液中に出現した特異抗体と LPS とが免疫複合体を形成したことが、アタッチメントロス誘導に促進的に関与したと考えた。

咬合性外傷は実験的歯周炎におけるアタッチメントロスを促進する

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 歯周病学分野¹⁾
花王株式会社 パーソナルヘルスケア研究所²⁾

○中津晋^{1,2)}, 吉永泰周¹⁾, 吉永美穂¹⁾, 白石千秋¹⁾, 市村育久²⁾, 押野一志²⁾, 矢納義高²⁾, 原宜興¹⁾

Occlusal trauma accelerates attachment loss in experimental periodontitis in rats
Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences¹⁾
Global R&D – Personal Health Care, Kao Corporation²⁾

○Susumu Nakatsu^{1,2)}, Yasunori Yoshinaga¹⁾, Miho Yoshinaga¹⁾, Chiaki Shirashi¹⁾, Ikuhisa Ichimura²⁾,
Kazushi Oshino²⁾, Yoshitaka Yano²⁾, Yoshitaka Hara¹⁾

【目的】

歯周炎は部位特異的な歯周ポケット形成および歯槽骨吸収を特徴とし、発症と進行には細菌と宿主免疫系が関与すると考えられている。我々はこれまでに、LPS 感作により免疫系を活性化したラットの歯肉溝に高濃度 LPS を滴下することによって、部位特異的な歯周ポケット形成および歯槽骨吸収を示す実験的歯周炎モデルを確立した。また、ラットの歯肉溝に LPS および抗 LPS IgG を交互滴下することにより、免疫複合体の形成が歯周組織破壊を誘導することを報告した。一方、咬合性外傷は歯周炎を増悪させる修飾因子と考えられているが、炎症が存在する場合に咬合性外傷が歯周炎活動期の組織破壊、特に歯周ポケット形成に関してどのように影響するのかわからない。本研究の目的は、実験的歯周炎モデルに外傷性咬合を加えた時の歯周組織の変化について明らかにすることである。

【材料および方法】

48 匹の 9 週齢 Lewis 系雄性ラットに *E.coli* 由来 LPS (150 μ g/0.3 mL) を Complete Freund's adjuvant とともに腹腔内投与し、28 日後に再度 LPS を Incomplete Freund's adjuvant とともに腹腔内投与した。ラットを歯周炎の誘発と咬合性外傷の組み合わせにより、炎症誘発群 (I 群)、外傷誘発群 (T 群)、外傷・炎症併発群 (T+I 群) および対照群 (Cont 群) に割付け、以下の処置を施した。T 群および T+I 群には外傷力を与えるため、2 回目の LPS 腹腔内投与の 1 日後、下顎右側第一臼歯咬合面に 1 mm 径のインレーを接着性レジンにて装着した。I 群および T+I 群には歯周炎を誘発させるため、2 回目の LPS 腹腔内投与の 1 日後、上顎右側第一臼歯口蓋側歯肉溝に LPS(50 μ g/ μ L)を 3 μ L \times 6 回 (5 分毎に 30 分間) 滴下投与した。一方、Cont 群および T 群には PBS を同様に滴下投与した。この滴下投与を 24 時間毎に繰り返し行い、5 日目または 10 日目の滴下 1 時間後にラットを屠殺し右側上顎骨を摘出した。固定・脱灰後にパラフィン包埋したのち病理組織学的検討を行った。また、免疫複合体の局在を調べるために補体成分 C1qB の免疫染色を行った。

【結果】

- ・滴下 5 日目において、Cont 群および T 群では上皮性付着が正常に保たれており、炎症性細胞浸潤はほとんど認めなかった。I 群は僅かなアタッチメントロスを認めるブロックと全く認めないものがある一方で、T+I 群では全ての標本にアタッチメントロスを認め、平均ポケット深さは I 群と比較して有意に大きかった。
- ・滴下 10 日目において、Cont 群および T 群ではやはり上皮性付着が正常に保たれており、炎症性細胞浸潤はほとんど認められなかった。I 群および T+I 群にアタッチメントロスを認め、両群を比較すると T+I 群の方が有意に大きかった。また、T+I 群においてのみ口蓋側歯槽骨表面が粗造となり多数の TRAP 陽性破骨細胞が認められた。
- ・C1qB は Cont 群および T 群ではほとんど検出されなかったが、I 群において接合上皮および近接した結合組織に局限して検出された。T+I 群においては接合上皮および結合組織において広範囲にわたり C1qB が検出された。

【結論および考察】

本結果より、外傷単独では歯周ポケット形成を認めなかったが、炎症と外傷を併発させると歯周ポケット形成は促進した。また、I 群と比較して T+I 群で C1qB が広範囲に検出される傾向がみられたことから、外傷により接合上皮や骨縁上の結合組織に変化が生じ、LPS が深部へ浸透して免疫複合体形成の範囲が広がった可能性が考えられる。したがって、外傷によって抗原の歯周組織への浸透および免疫複合体形成が生じやすい環境となり、炎症が共存する場合には急速かつ重篤な歯周ポケット形成および歯槽骨吸収が誘導される可能性が示唆された。

東日本大震災被災者の血圧および唾液アミラーゼ活性の変動

岩手医科大学歯学部口腔機能保存学講座 歯周・歯内治療学分野

○佐々木大輔, 村井治, 藤原英明, 金澤智美, 大川義人, 伊東俊太郎,
諏訪渚, 阿部公人, 須和部京介, 成石浩司, 八重柏隆

Changes of blood pressure and salivary amylase in the Great East Japan Earthquake victims

Department of Conservative Dentistry and Oral Rehabilitation, Division of Periodontics and Endodontics,
School of Dentistry, Iwate Medical University

○Daisuke Sasaki, Osamu Murai, Hideaki Fujiwara, Satomi Kanazawa, Yoshito Okawa, Shuntaro Ito,
Nagisa Suwa, Kimito Abe, Kyosuke Suwabe, Koji Naruishi and Takashi Yaegashi

【研究目的】

2011年3月11日に発生した東日本大震災の被災者は、強いストレス環境に置かれていた。そのため被災者は高血圧などの慢性疾患が悪化しているとの報告が多い。被害規模が大きい岩手県内の5市町で住民の約6割の人の収縮期血圧が140 mmHgを超えていたとの報告がある。また他の同様な調査では、ストレスを要因とする胃潰瘍、十二指腸潰瘍の患者発生数が増大していることが報告されている。被災者の置かれた環境とストレスの状況について、実態を把握し対策を講じることが現時点での急務とされている。今回我々は、東日本大震災で被災し、当科を受診した歯周病患者について、震災前後の血圧、唾液アミラーゼ活性測定によるストレス調査を実施したので報告する。

【検索対象と方法】

本研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認後、実施した。調査研究目的と内容を説明し、同意が得られた東日本大震災被災者10名(男性5名, 女性5名: 平均年齢53.3歳)を検索対象とし、岩手医科大学附属病院歯科医療センター保存科歯周病診療室を受診時に、血圧と唾液アミラーゼ活性について測定した。被験者は東日本大震災発生以前より当科に通院しており、被災前の血圧データを把握している者を検索対象とした。検索項目の血圧、唾液アミラーゼは共に日内変動が見られるため、来院日はなるべく同一の時間帯とし、治療開始前にそれぞれ測定を実施した。

【結果】

全ての被験者において震災後の収縮期血圧の値は、震災前と比較して有意に上昇していた。唾液アミラーゼ活性を震災前に測定した被験者4名は、震災前後で比較すると、両者共に震災後に唾液アミラーゼ活性は有意に上昇していた。その内1名は、震災11ヶ月後の時点で血圧、唾液アミラーゼ活性ともに震災前のレベルに低下したが、残り3名は、約1年経過した現在も血圧、唾液アミラーゼ共に高値のまま、低下しない状態が継続していた。

【考察および結論】

東日本大震災による被災者への身体的影響はマスコミ報道で広く知られている。またこれまでに、被災者の血圧の上昇について多くの報告がなされている。その要因として、避難生活による塩分摂取量の増加、栄養価の高い支援物資による肥満、運動不足等が挙げられているが、今回、我々が行った被災者を対象とした震災前後の血圧および唾液アミラーゼ活性の変動についての調査より、被災者の血圧の上昇は身体的影響に加え、心理的ストレスによる影響も強く関与していることが示唆された。また口腔内においては、急性歯周炎、ブラキシズムといった具体的な口腔内所見として認められる場合もあったが、歯肉の違和感等の不定愁訴として訴える患者も多く認められた。今回調査した被災者の多くは、震災後の時間の経過とともに血圧および唾液アミラーゼ活性において改善傾向が認められたが、降圧剤服用にもかかわらず高血圧の改善が認められない、また全身疾患(腸内ポリープ、メニエール病)の発症を認められた患者も存在することから、震災後の継続的な心理的ストレスの影響が強く認められることより、今後とも継続的な調査の必要性が示唆された。

電子スピン共鳴法を応用した唾液抗酸化作用による歯周病評価法の可能性

神奈川歯科大学学生体管理医学講座薬理学分野
○吉野文彦, 吉田彩佳, 李 昌一

Possibility of periodontal assessment with salivary antioxidant activity using electron spin resonance spectroscopy

Division of Pharmacology, Department of Clinical Care Medicine, Kanagawa Dental College
○YOSHINO Fumihiko, YOSHIDA Ayaka, Lee Masaichi-Chang il

【研究目的】近年全身の状態評価のため唾液の機能性に注目が集まってきており、さらに、口腔状態と唾液との関連性についていくつかの報告がされてきている。Chappleらは歯周病の患者は唾液の総抗酸化活性が高いことを示しているが、このデータは活性酸素種 (ROS) に対する特異的な抗酸化作用を測定したものではない。したがって、この実験の目的は、ROS を特異的に測定可能な電子スピン共鳴 (ESR) 法を用いて、歯周病とさまざまな ROS に対する抗酸化能との関係を解析し、歯周病の状態評価に応用可能かを検討するものである。

【方法】Wistar rat (♂, 4週令) に対し、培養した *Porphyromonas gingivalis* (Pg: ATCC 33277) を5%カルボキシメチルセルロースに懸濁し、口腔内に3回播種し、歯周病モデル動物を作成した。32週令において、イソプロテレノールおよびピロカルピンを腹腔内投与し、刺激唾液を回収後、1,500g, 5分間遠心分離し、上澄みを唾液試料とした。また、神奈川歯科大学倫理委員会により承認されたプロトコールを用いインフォームドコンセントが得られた、全身疾患を有さないヒトボランティア (男性10名, 女性10名, 平均年齢39.6±5.5) より安静時唾液を採取し、同様に唾液試料とした。なお、安静時唾液回収時に、歯周病検査として、probing pocket depth (PPD), およびbleeding on probing (BOP) を測定した。これら唾液試料を ESR 法により ROS である、スーパーオキシド ($O_2^{\cdot-}$) およびヒドロキシルラジカル (HO^{\cdot}) に対する抗酸化作用を測定し、PPD および BOP と唾液抗酸化作用の相関性について検討を行った。加えて、ESR 法により $O_2^{\cdot-}$ の抗酸化酵素である superoxide dismutase (SOD) 活性 との相関性についても検討を行った。

【成績】歯周病モデル動物の $O_2^{\cdot-}$ に対する唾液抗酸化作用は、Pg 感染により有意に増加したが、 HO^{\cdot} に対する唾液抗酸化作用に変化は認められなかった。また、ヒト唾液を用いた場合も、動物実験と同様に、歯周病罹患程度が重篤な程 $O_2^{\cdot-}$ に対する唾液抗酸化作用の増加が観察された。しかしながら、 HO^{\cdot} に対する唾液抗酸化作用と歯周病の各パラメータとの相関性は認められなかった。またこの増加は、PPD に対しとくに強い相関 ($r=0.88$) が認められた。加えて、唾液 SOD 活性と PPD とおよび $O_2^{\cdot-}$ に対する抗酸化作用との相関性には弱い相関 ($r=0.46, r=0.37$) が認められた。

【考察】今回の研究において我々は、唾液の $O_2^{\cdot-}$ に対する消去作用は歯周病に罹患することで有意に増加することを示した。また、 $O_2^{\cdot-}$ に対する消去作用と PPD には強い相関が認められた。この結果は、長期間歯周原因菌の感染により $O_2^{\cdot-}$ に対する抗酸化作用の亢進を誘導する可能性を示唆する。さらに、SOD 活性と PPD または $O_2^{\cdot-}$ 消去にも相関が認められた。これらの結果は、 $O_2^{\cdot-}$ に対する抗酸化作用の主役は SOD であり、SOD 活性レベルの増加は炎症により誘導されたスーパーオキシドや TNF- α や IL-1 β の様なサイトカインの関与の可能性を示唆した。

【結論】これまで、唾液を用いた歯周病検査、とくに抗酸化作用に注目したものは報告されているが、ROS 特異的に評価したものはない。したがって、ESR 法を応用し、ROS を選別して唾液抗酸化能を測定することで、従来見られない客観的な歯周病評価が可能になるかもしれない。また、唾液は血液由来であり、全身状態を評価するため現在も様々な研究が行われている。今後、歯周病の非侵襲的で客観的な評価法の確立のため歯周治療による評価を行いさらなるデータの蓄積をする必要があるであろう。

歯周炎罹患部位歯肉組織における toll-like receptor signaling pathway 関連遺伝子の上昇

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野
○阿部大輔、久保田健彦、両角俊哉、中曽根直弘、清水太郎、吉江弘正

Upregulated toll-like receptor (TLR) signaling pathway genes in periodontitis-affected gingival tissues
Division of Periodontology, Department of Oral Biological Sciences, Course for Oral Life Science, Niigata University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Daisuke Abe, Takehiko Kubota, Toshiya Morozumi, Naohiro Nakasone, Taro Shimizu, Hiromasa Yoshie

【背景・目的】

歯周炎罹患部位歯肉局所における遺伝子発現はその病因に関連しており、組織破壊と歯周炎感受性において極めて重要な役割を果たす。我々はこれまで、歯周炎の病態を解明するため、歯周炎罹患部位歯肉組織においてマイクロアレイを用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、leukocyte transendothelial migration pathway の発現上昇と cell communication pathway の発現低下を報告してきた (Abe et al. *J Periodont Res*, 2011)。この度、Pathway 解析によって歯周炎罹患部位歯肉組織において有意に上昇した生物学的経路の一つとして、Toll-like receptor (TLR) signaling pathway に着目した。本研究の目的は、TLR signaling pathway に含まれる 5 個の遺伝子に関して quantitative reverse transcription real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) 解析を行い、Pathway 解析の結果を検証する事を目的とする。

【材料と方法】

重度慢性歯周炎患者 3 名より歯周炎罹患部位歯肉組織及び健常部位歯肉組織を採取した。各サンプルより Total RNA を抽出し、GeneChip® Human Genome U133 Plus 2.0 Array® (Affymetrix) を用いて、マイクロアレイ解析を行った。Comparison, Gene Ontology 及び Pathway 解析を含むデータマイニング解析を行い、歯周炎に関連すると考えられる生物学的経路を同定した。その中で、TLR signaling pathway に含まれる 5 個の遺伝子 Cluster of differentiation 14 (CD14), Lymphocyte antigen 96 (MD-2), Interleukin-1 beta (IL-1β), Interleukin 8 (IL-8), Chemokine ligand 9 (CXCL-9) に関して qRT-PCR 解析を行い、Mann-Whitney U-test を行い、 $p < 0.05$ を有意差とみなした。qRT-PCR 解析のサンプルは 14 名の慢性歯周炎患者、14 名の健常者より採取された。

【結果】

Comparison 解析によって歯周炎罹患部位歯肉組織において遺伝子発現が 2 倍以上有意に上昇した 15 個の遺伝子、2 倍以上有意に低下した 13 個の遺伝子を同定した。Pathway 解析では、歯周炎罹患部位歯肉組織において遺伝子発現が 2 倍以上有意に上昇した leukocyte transendothelial migration pathway を含む 15 個の Pathway 及び、2 倍以上有意に低下した cell communication pathway を含む 5 個の pathway が同定された。qRT-PCR 解析によって TLR signaling pathway に含まれる 5 個の遺伝子 MD-2 $P > 0.0082$, CD14 $P > 0.0322$, IL-1β $P > 0.0126$, IL-8 $P > 0.0438$, CXCL-9 $P > 0.0325$ の遺伝子発現が有意に上昇を示した。この結果は Pathway 解析の結果と一致していた。

【結論】

本研究は、Comparison, Gene Ontology, Pathway 解析を含むマイクロアレイ解析にて歯周組織における遺伝子発現を網羅的に解析、qRT-PCR 解析にて検証した研究である。我々は、健常部位歯肉組織と比較して歯周炎罹患部位歯肉組織において TLR signaling pathway 中の MD-2 の遺伝子発現が上昇していることを初めて同定した。CD14 は微生物の LPS を認識するレセプターとして働き、TLR-4 と MD-2 が結合することにより、Interleukins や Chemokine などを産生、免疫反応を促進・調節し、結果として歯周組織破壊をもたらすと考えられる。よって、これらの遺伝子群は TLR signaling pathway を活性化することにより、歯周病の病因に関連するかもしれない。

シリコンゴム歯間ブラシのプラーク除去効果

¹日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座 ²日本歯科大学新潟短期大学

³日本歯科大学新潟病院総合診療科 ⁴株式会社ジャックス

○両角祐子¹ 宮崎晶子² 高塩智子³ 土田智子² 筒井紀子²

原田志保² 菊地ひとみ² 今出昌一⁴ 佐野 晃⁴ 佐藤 聡¹

Plaque Removal Efficacy of Silicon Interdental Toothbrush

¹Department of Periodontology, The Nippon Dental University School of life Dentistry at Niigata

²The Nippon Dental University College at Niigata

³Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital, ⁴Jacks Co.,Ltd

○Yuko Morozumi¹, Akiko Miyazaki², Tomoko Takashio³, Satoko Tsuchida², Noriko Tsutsui²,

Shiho Harada², Hitomi Kikuchi², Shoichi Imade⁴, Akira Sano⁴ and Soh Sato¹

【緒言】

歯周病の予防、治療にプラークコントロールは最も重要である。しかし、歯ブラシのみで歯間隣接面のプラークを除去することは困難であり、歯間ブラシ、デンタルフロスなどの歯間隣接面清掃用具が必要となる。歯間ブラシは、種々の大きさの歯間に対応できるようなサイズも豊富で、使用方法も比較的簡便なため、歯間部清掃用具では使用される頻度が高い。しかし、歯間ブラシの誤用は、歯肉の損傷、歯質の摩耗をきたす可能性がある。本研究は、ワイヤーに刷毛を巻きつけ製作される従来の歯間ブラシとは異なり、シリコンゴムで製作したシリコンゴム歯間ブラシを使用し、プラーク除去効果を検討した。

【材料および方法】

1 使用歯ブラシ

最小通過径 0.9 mm のシリコンゴム歯間ブラシ (株式会社ジャックス) を使用した。対照として、シリコンゴム歯間ブラシと同等の最小通過径の刷毛タイプの歯間ブラシ (株式会社ジャックス) を使用した。

2 刷掃試験機を用いたプラーク除去効果

実験には、歯列模型 (500H-1, 株式会社ニッシン) を用いた。被験歯面に人工プラーク (株式会社ニッシン) を塗布した後に実験を行った。部位は、下顎両中切歯、下顎左右側切歯と犬歯の 3 歯間 6 歯面とした。刷掃条件はストローク 10 mm, 1 歯間 5 回とし、刷掃試験機に歯列模型を固定し、歯間ブラシを被験歯の隣接面に歯軸に対して垂直方向から挿入した。刷掃試験前後の歯面を撮影し、画像解析により、プラーク除去率を算出した。

3 臨床効果

対象は、日本歯科大学新潟短期大学 1 年生 12 名とし、対象部位は下顎前歯部 5 歯間部 10 歯面とした。試験開始 24 時間前から口腔清掃を中止し、刷掃前後に口腔内写真を撮影し、プラーク除去率をプラニメーター (Ushikata) で測定した。刷掃回数は 1 歯間 5 回とした。使用後に、アンケート調査を行った。

本研究は、日本歯科大学新潟短期大学倫理審査委員会の承認を得て行った。

【結果】

1 刷掃試験機を用いたプラーク除去効果

平均のプラーク除去率は、シリコンゴム歯間ブラシ 16.4±2.7%、刷毛タイプの歯間ブラシ 15.7±3.9%であり、両歯間ブラシに有意な差は認められなかった。

2 臨床効果

平均のプラーク除去率は、シリコンゴム歯間ブラシ 23.5±9.1%、刷毛タイプの歯間ブラシ 21.6±3.6%であり、両歯間ブラシに有意な差は認められなかった。

アンケート結果においては、シリコン歯間ブラシの方が使用感がよいと回答したものが多かった。

【考察】

本研究において、シリコンゴム歯間ブラシは、従来の刷毛タイプの歯間ブラシと同等のプラーク除去効果が模型試験、臨床試験において示された。また、アンケート結果においては、シリコンゴム歯間ブラシの使用感がよく、歯間ブラシを使用した経験の少ない場合でも、抵抗なく使用されることが示された。

航空自衛隊大滝根山分屯基地における口腔衛生指導

奥羽大学口腔衛生学講座
○車田文雄、長岡正博、廣瀬公治

Oral Hygien guidance for JASDF Ohtakineyama Sub Base

Dept. Preventive Dentistry OHU University School of Dentistry

○Fumio KURUMADA、Masahiro NAGAOKA、Kimi haru HIROSE

【 緒 言 】

現在、演者は陸上自衛隊歯科医官のOBであり、福島県内駐屯地の部外カウンセラーとして、当該隊員および技官・事務官のカウンセリングをおこなっている。一連の部隊衛生、特に健康管理について「防衛衛生学会」にて発表してきた。そこで今回、航空自衛隊第27警戒群大滝根山分屯基地の隊員等の職場における集団口腔健康管理の目的で、齶蝕活動性を調べる機会を得たので、その知見を報告する。

【 方 法 】

先ず、今回の上記主旨に賛同して頂ける隊員等のインフォームドコンセントを取った後、以下のとおりの齶蝕活動性試験を実施した。

1. カリオスタット (検体:歯垢) …歯垢の酸産生能テスト

① 綿棒にて被験者の上顎歯頸部全体を4~5回拭き、歯垢を採取。② 歯垢採取綿棒をカルオスタットアンプルに投入後、インキュベーター (37±2℃) で保温。③ 48時間後、カルオスタットアンプルの色と色見本を比較し判定。

2. CAT21バフ (検体:唾液) …唾液リスクテスト

① チューイングペレットを3分間噛みながら、唾液を採取用カップに採取し、分泌量をカップの目盛りから読み取る。② 唾液採取のカップの中から唾液を1ml テストチューブに入れ蓋をして、底の試薬 (赤) が完全に溶けるまで良く振る。③ 試薬が完全に溶け気泡がなくなりしだい、判定色見本とチューブ内の液色を比べ、結果を判定表にチェック。

3. ミューカウント (検体:唾液) …ストレプトコッカスミュータンス簡易菌測定テスト

① MSB broth (培地) の調整。② 上記唾液採取カップより適量取り、良く攪拌後、直ちに使用。③ スポイトで採取した唾液1mlを取り、MSB brothに接種後、ゴムキャップをする。④ 本培地を反復倒立させ、唾液を均一に混合。その後、インキュベーター (37±2℃) にて、18~24時間、斜面培養する。⑤ 培養後、判定写真により判定。

【 成績判定 】

1. カリオスタット … 青 (-): 口腔清掃は従来とおり。緑 (+): 間食後の口腔清掃の必要性。黄緑 (++) : 間食における糖分摂取の制限要指導。黄 (+++) : 食生活全体から糖分摂取の制限要指導。

2. CAT21バフ … ① 唾液流出量 5ml以上: 口腔内は齶蝕になりにくい状態。2~5ml未満: 口腔内は齶蝕になりやすい状態。2ml未満: 非常に齶蝕になりやすい状態。② 唾液緩衝能 (指導は上記同様) 赤 (安全-)、橙 (注意+)、黄 (危険++)。

3. ミューカウント … (-): 管壁付着が認められないもの。(+) : 1~10のコロニー様付着確認。(++) : 10以上のコロニー様付着確認。(+++): 管壁一面に細かなコロニー様付着確認。同時に大きなコロニー様付着も確認。

【 考察および結論 】

現在、最終データ処理中のため、3種類の齶蝕活動性試験における本人の口腔衛生に対する意識 (動機づけ) 等の詳細は当日の学会にて発表する。

培養骨膜シートを用いた歯周組織再生療法の5年予後

新潟大学大学院医歯学総合研究科、¹⁾摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野、
²⁾顎顔面再建学講座 歯科基礎移植・再生学分野
○奥田一博¹⁾、川瀬知之²⁾、吉江弘正¹⁾

Five-year results of tissue engineered cultured periosteal sheet application to periodontal regeneration

¹⁾Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science and ²⁾Division of Oral Bioengineering,
Department of Tissue Regeneration and Reconstruction,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences.
○Kazuhiro Okuda¹⁾, Tomoyuki Kawase²⁾ and Hiromasa Yoshie¹⁾

【目的】

これまでに、培養骨膜(CP)シート+多血小板血漿(PRP)+ハイドロキシアパタイト(HA) 顆粒複合体の移植が、歯周骨内欠損の治療に有効であること (*J Periodontol*, May 2008)、およびその3年予後について良好な状態が維持されていることを報告した。今回5年の予後が得られた症例についてその成績を報告する。尚、本研究は新潟大学歯学部倫理委員会の承認済みで患者には書面をもって説明し、自発的同意を得た。

【材料と方法】

(1)対象：新潟大学医歯学総合病院に通院する慢性歯周炎患者のうち、歯周基本治療を完了して同意の得られた22名を被験者とした。6mm以上のポケット(PD)と6mm以上の付着レベル(CAL)、規格エックス写真より3mm以上の骨内欠損を示す22部位を被験部位とした。

(2)CPシートおよびPRP+HA顆粒複合体作製法：CPシートについては、患者の下顎大白歯頬側部の付着歯肉下の骨表面より、骨膜小片を採取後、直ちにウシ胎児血清、抗生物質、アスコルビン酸を含むMedium199にて培養シャーレ上で6週間培養してシート状構造物を得た。PRP+HA顆粒複合体の調整については、患者末梢血8.5mlから2回の遠心分離により、0.6mlのPRPを調整し、このうちPRP0.3mlにつき、0.1gのアルギン酸ナトリウムを添加して活性化し、0.5mgのHA顆粒と混和させた。

(3)評価項目：炎症評価としてブラーク指数(PI)、歯肉炎指数(GI)、プロービング時の出血(BOP)を測定し、臨床評価としてPD、CAL、エックス線写真から計測した骨欠損深さ(IBD)を計測した。評価は、ステントおよびバイトブロックを用いて半規格化して測定した。

(4)術式：歯肉溝切開による全層弁を形成・剥離後、徹底して病巣を搔爬して骨欠損を明示した。骨欠損部にPRP+HA顆粒複合体を填入しその上からCPシートを被覆するように設置して緊密に縫合した。

(5)予後：術後10日目に抜糸を行い3か月までは2週ごとに専門的清掃を行い、6か月目以降は1か月に1回のメインテナンス治療を継続した。術後1年目と3年目、5年目に炎症評価および臨床評価を行った。評価ポイント間で統計学的に比較を行った。危険率5%未満をもって有意差ありと判定した。

【結果】

炎症評価によると観察期間中を通して良好なブラークコントロールレベルが維持されていた。GIおよびBOPに関してはベースラインと1年後で有意に改善を示し、その状態が5年目まで継続された。

臨床評価について、ベースラインではPDは平均7.6mm、CALは平均8.0mm、IBDは平均4.6mmであった。1年目では、PDは平均2.9mm、CALは平均4.8mm、IBDは平均1.4mmと統計学的に有意に改善した。3年目ではPDは平均3.0mm、CALは平均4.7mm、IBDは平均0.5mmで、PDとCALについては1年目で得られた値を維持しており、IBDは更なる改善が認められた。5年目においてPDは平均2.9mm、CALは平均4.6mm、IBDは平均0.2mmで、PDとCALについては1年目および3年目で得られた値を維持しており、IBDは3年目で得られた値より更なる改善が認められた。

【結論と考察】

術後1年目で得られた効果は5年経過しても安定して維持されていた。とくに1年目から5年目にかけて骨欠損深さが改善しているのは、Heijl(1997)らの言う機能的な付着のあとに生じる“真の再生”であることを示している。CPシートはアルカリホスファターゼ活性が陽性で、その発現部位と一致して石灰化物の沈着がみられること、マウス背部皮下への移植で異所性の石灰化がみられること、骨髄幹細胞に発現している分子マーカーと一致した表面抗原が認められることから骨原性能力を有しており、この性状がPRPとHAの複合体の効果に相乗的に作用したものと思われる。

骨縁下欠損に対するエナメルマトリックスタンパク質を応用した歯周組織再生療法 5年経過症例の臨床的検討

¹⁾愛知学院大学歯学部歯周病学講座, ²⁾松本歯科大学歯科保存学第一講座

○三谷章雄¹⁾, 高須英成¹⁾, 吉成伸夫²⁾, 伊藤正満¹⁾, 川瀬仁史¹⁾, 相野誠¹⁾, 林潤一郎¹⁾, 稲垣幸司¹⁾, 黒須康成¹⁾, 三輪晃資¹⁾, 石原裕一¹⁾, 福田光男¹⁾, 野口俊英¹⁾

Five-year clinical results following treatment of intrabony defects with an enamel matrix derivative.

¹⁾Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University,
and ²⁾Department of Periodontology, Matsumoto Dental University

○Akio MITANI,¹⁾ Hidenari TAKASU,¹⁾ Nobuo YOSHINARI,¹⁾ Masamitsu ITO,¹⁾ Hitoshi KAWASE,¹⁾ Makoto AINO,¹⁾ Junichiro HAYASHI,¹⁾ Koji INAGAKI,¹⁾ Yasunari KUROSU, Koji MIWA,¹⁾ Yuichi ISHIHARA,¹⁾ Mitsuo FUKUDA¹⁾ and Toshihide NOGUCHI¹⁾

【目的】エナメルマトリックスタンパク質(EMD)の応用は1990年代より、予知性のある歯周組織再生療法として国内外で認知されている。フラップ手術(FOP)とEMDの比較は、現在まで数多く報告されているが、その多くは術後1年以内の報告であり、長期経過の報告はわずかしかない。そこで本研究では、FOPとEMDについて手術施行後5年経過時における臨床評価を行った。

【被験者および方法】本研究では、愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科を受診し、以下の条件を満たした歯周炎患者16名を対象に、後ろ向き研究を行った。

- ①歯周基本治療後において5mm以上のProbing Depth (PD)を有する患者。
- ②臨床検査とデンタルX線写真により骨縁下欠損を有すると診断される患者(根分岐部病変は除く)。
- ③侵襲性歯周炎、および中等度から高度の慢性歯周炎の患者。

これらのうち8名8部位はFOPのみの歯周外科療法、その他の8名10部位はEMDを適応した歯周組織再生療法を施行した。臨床パラメーターとして、術前と比較した術後5年経過時での、PDの減少量、付着の獲得量、および歯肉退縮量 ([術後CAL-術後PD]-[術前CAL-術前PD])について比較検討した。また、両群間の有意差の統計解析には、Mann-Whitney U-testを用いた。なお本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認を受けて行った(承認番号:230)。

【結果】術前のCALおよびPDは、それぞれFOP群7.0±1.1mm, 5.9±1.2mm, EMD群7.6±2.7mm, 5.9±1.1mmであり、両群に有意な差は認められなかった。各歯周外科処置後5年経過した状態において、PDの減少量はFOP群1.0±1.6mm, EMD群1.8±1.6mmであり、両群に有意な差を認めなかった。しかしながら、歯周外科処置後5年経過した状態における付着獲得量は、FOP群-0.3±1.8mm, EMD群2.9±3.4mmであり、EMD群が有意な($P<0.05$)付着獲得量を示した。また、歯周外科処置後5年経過時の歯肉退縮量はFOP群1.3±1.2mm, EMD群-1.1±3.1mmであった。すなわち、EMD群はFOP群に比べ有意に($P<0.05$)小さく、術前に比べ歯肉退縮の改善傾向が見られた。

【考察】術後5年時において、臨床的付着の獲得と歯肉退縮量で、EMD群がFOP群に比べ有意に良好な結果であった。PD減少量には両群間に有意な差は認められなかった。2005年のコクラン・レビューでは、術後1年においてEMDはコントロールに比べ、臨床的付着の獲得量とPD減少量について有意に良好であると報告されているが、長期経過については検討されていない。Sculeanらは、5年経過症例に関する検討を行い、EMDはFOPに比べて、術後1年においては、臨床的付着の獲得量とPD減少量が良好であるが、術後5年では両群に有意な差はなかったと報告している[§]。本研究の結果は、異なるものであるが、対象患者の術前CALやPDがSculeanらの報告よりも小さいなどの条件の違いによるものと考えられる。本研究においては、EMDによる歯周組織再生療法において、長期予後においても、優れた臨床的な付着獲得および歯肉退縮抑制を示す可能性が示唆された。しかしながら、被験者数および被験歯数が少なく、今後、さらなる検討を行う必要がある。

[§] Sculean A. et. al, *J Clin Periodontol.* 2004, 31: 545-549.

上顎洞底に近接した部位における歯の移植症例

松本歯科大学歯科保存学第一講座¹⁾、松本歯科大学歯科保存学第二講座²⁾、
松本歯科大学歯科放射線学講座³⁾

○武藤昭紀¹⁾、窪川恵太¹⁾、海瀬聖仁¹⁾、三木 学¹⁾、佐藤徳志¹⁾、内山真紀子²⁾、内田啓一³⁾、
山本昭夫²⁾、田口 明³⁾、吉成伸夫¹⁾

A Case of teeth transplantation in the area in proximity to the maxillary sinus.

Department of Periodontology¹⁾, Department of Endodontics and Operative Dentistry²⁾, Department of
Oral and Maxillofacial Radiology³⁾, School of Dentistry, Matsumoto Dental University
○Muto Akinori¹⁾, Kubokawa Keita¹⁾, Kaise Kiyohito¹⁾, Miki Manabu¹⁾, Sato Noriyuki¹⁾, Uchiyama Makiko²⁾,
Uchida Keichi³⁾, Yamamoto Akio²⁾, Taguchi Akira³⁾, Yoshinari Nobuo¹⁾

緒 言：歯の移植は、非機能歯を活用でき、義歯を回避できる等の利点がある。さらに、移植後に歯根膜組織を維持できれば、移植歯は正常な歯周組織をもつ歯として機能し、周囲組織との調和もとれることから、欠損部を補う方法として有用な治療法の一つとして適用されてきた。このような歯の移植術は、良好な経過の症例報告が多いが、受容側の残存骨量から制限を受け、下顎に移植した報告が多く、上顎への移植症例は少ない。そこで今回、上顎洞底と近接した両側第一大臼歯部に対して、下顎第三大臼歯を移植することにより義歯の使用を回避できた症例を報告する。

症 例：患者は61歳の女性。上顎右側第一大臼歯の咬合痛、および上顎左側第一大臼歯の動揺を主訴に来院した。全身状態として2型糖尿病（HbA1c：6.5）に罹患しており、インシュリンの自己注射により維持、管理している。初診時に上顎右側第一大臼歯は高度の歯周病進行により保存不可能と診断、抜歯処置を受けた。歯周組織検査の結果、上顎左側第一大臼歯も歯根破折のため保存不可能と判断したが、患者は義歯の使用に対して強い嫌悪感を示したため、インプラント治療を視野に入れた術前検査を行なった。その結果、上顎洞底までの距離が短く、インプラント埋入のためには上顎洞底挙上術が必要と診断したが、患者は慢性上顎洞炎に罹患しており、洞底粘膜の肥厚が認められることから、上顎洞底挙上術を伴うインプラント治療の選択を断念した。そこで、歯周基本治療終了後、上顎両側第一大臼歯部に下顎両側第三大臼歯の自家移植術を行うことを計画した。通法の歯周基本治療後、48歯を16歯部に移植した。歯槽骨頂部より切開を加え、トレフィンバーにて移植窩を切削後、歯根膜を傷つけないように鉗子のみにて48歯を抜き、上顎洞底までの距離と歯根形態を考慮して、近遠心方向を逆に埋入し、縫合した。歯髄が失活した3週間後より根管治療を開始、移植後3ヶ月で暫間被覆冠を作製した。上顎右側移植歯6ヶ月後に移植歯の安定を確認後、38歯を26歯部に移植した。移植後2週間後より根管治療を開始し、根管治療終了後、暫間被覆冠を作製した。上顎右側部移植後2年5ヶ月、上顎左側部移植1年10ヶ月、歯周組織の安定を確認した後、最終補綴物の作製に移行した。

考 察：歯の自家移植は、移植後の骨性癒着や、歯根の炎症性吸収などの問題が報告されている。しかし、歯根膜を保存したまま移植する現在の術式では、長期にわたり良好な経過をたどることが報告されている。本症例では高度の歯槽骨吸収をきたした部位への移植のため、歯槽骨の高さが懸念されが、コーンビームCTにより、上顎洞底までの距離や歯槽骨の厚みを三次元的に診断することにより可能であると判断した。近年、あらゆる部位に対してインプラントを埋入することができるようになった。しかし、インプライトが歯根膜様組織の機能を保持するには至っておらず、あくまで、骨との嵌合により固定される。本症例では、上顎洞底挙上を行うのが困難な症例に対して、骨造成を行わず自家移植を行なった。通法では、インプラント埋入が困難な骨量部に対して、移植が成功した要因としては、歯根膜の存在が大きいと考えられる。移植の成否を決める要因として、移植時に歯根膜の損傷による歯髄の感染、骨性癒着の有無が決まることは明らかである。また、埋入位置を歯根膜附着部位にまで留めたことも、最小限の移植窩の切削で成功した点であると考えられる。現在移植後2年以上経過しているが、炎症性吸収などは認められず良好な経過を経ており、今後も経過を追っていく予定である。

結 論：今回の症例により、上顎洞底挙上を行うのが困難な症例に対しても、義歯による欠損補綴を回避することができる可能性を示した。

糖尿病患者の歯周病罹患状態と糖尿病合併症との関係

慶應義塾大学医学部 歯科・口腔外科学教室¹⁾

サンスター株式会社²⁾

○太田 淳也¹⁾・深谷 千絵¹⁾・笠井 俊輔¹⁾・赤松真也子¹⁾・森川 暁¹⁾・穂坂 康朗¹⁾・

田子森 順子²⁾・江口 徹²⁾・中川 種昭¹⁾

Relationship between periodontal disease and diabetic complications

Department of Dentistry and Oral Surgery, School of Medicine, Keio University¹⁾

Sunstar Inc.²⁾

○Junya Ota¹⁾・Chie Fukaya¹⁾・Shunsuke Kasai¹⁾・Mayako Akamatsu¹⁾・Satoru Morikawa¹⁾・Yasuo Hosaka¹⁾・
Junko Tagomori²⁾・Toru Eguchi²⁾・Taneaki Nakagawa¹⁾

【研究目的】

現在、日本では糖尿病患者あるいは境界型が増加しており、平成19年糖尿病実態調査にて、糖尿病が強く疑われる人は、約890万人、糖尿病の可能性を否定できない人を合わせると約2210万人にのぼると報告されている。糖尿病は、喫煙と並んで歯周病の2大危険因子であり、また歯周病は腎症、網膜症、神経障害、末梢血管障害、大血管障害に次いで、第6番目の糖尿病合併症とされています。

従来の報告より、糖尿病患者には歯周病罹患者が多く、血糖コントロールの不良な場合には、重篤な骨吸収を伴う歯周病を示す例が認められる。一方では、歯周炎部位に多く存在する歯周病原細菌由来の内毒素がTNF- α などのインスリン抵抗性を惹起させるサイトカインを増加させることも報告され、歯周治療を行うことで血糖コントロールが改善された報告もある。これまで、糖尿病による合併症と歯周病罹患状態との関連性についての報告は散見されるものの、いまだ一定の見解が得られていない。

そこで、今回われわれは糖尿病患者の歯周病罹患状態と糖尿病合併症の関係を検討した。

【被験者および方法】

被験者は、2010年7月から2011年12月までに慶應義塾大学病院腎臓・内分泌・代謝内科に入院した糖尿病患者85名と、外来患者9名(平均年齢54.3 \pm 11.8歳、男性56名、女性34名)とした。

本研究では、糖尿病関連検査として、年齢、体格指数(BMI)、糖尿病罹患期間、グリコヘモグロビン(HbA1c)、随時血糖値、血中CPR、総コレステロール、中性脂肪などの血液検査を測定した。口腔内診査は現在歯数、プロービングポケット深さ(PD)、およびプロービング時の出血(BOP)歯率を測定した。また、比較対照として平成19年歯科疾患実態調査報告を用いた。

【結果】

本研究の被験者のHbA1cは平均9.1 \pm 1.8%、血糖値は平均214.7 \pm 115mg/dl、BMIの平均は27.3 \pm 7.1と標準値よりかなり高い値を示した。また、合併症は94名中44名(46.8%)に認められた。その中で単純網膜症は12名(12.8%)、前増殖網膜症は7名(7.4%)、増殖網膜症は5名(5.3%)、腎症は20名(21.3%)、神経障害は26名(27.7%)に認められた。その中で増殖性網膜症を有する患者の4mm以上のPDが30%以上は30%以上と高い値を示した。

また本研究では、4mm以上の歯周ポケットを有する患者は93.5%であり、歯科実態調査報告では38.8%と比較して有意に高かった。また、25.5%ではより本格的な歯周治療を必要としていることがわかった。

【結論】

以上のことにより、今回の結果から糖尿病患者の歯周病罹患度は高く、スケーリング・ルートプレーニング以上の本格的な歯周治療の必要性も高いことが改めて確認された。また、糖尿病合併症である網膜症の進行と平行して歯周病の病態が悪化していると考えられたが、その他の合併症とは有意な差はなく、現在のところ関連性は認められない。今後はさらに内科主治医らと緊密に情報を交換し、患者の糖尿病と歯周疾患に関する情報を共有しながら治療を行っていく必要があると考えられる。

α-TCP/Te-CP セメントの覆髄剤への応用

2) セメント硬化体のエックス線回折及び SEM による評価

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野¹⁾ 歯科理工学分野²⁾

○武田進平¹⁾、河野 哲¹⁾、神山智佳子¹⁾、長谷川智哉¹⁾、土井 豊²⁾、吉田隆一¹⁾

Application of α-TCP/Te-CP Cement to Pulp Capping Materials

2) Evaluation of Set Cement with X-Ray Diffraction and SEM

Department of Endodontics¹⁾, Department of Dental Materials Science²⁾,
Division of Oral Functional Science and Rehabilitation, Asahi University School of Dentistry

○TAKEDA Shinpei¹⁾, KAWANO Satoshi¹⁾, KAMIYAMA Chikako¹⁾, HASEGAWA Tomoya¹⁾, DOI Yutaka²⁾, YOSHIDA Takakazu¹⁾

【目的】

現在、直接覆髄剤として主に用いられている水酸化カルシウムは早期に被蓋硬組織を形成し、その形成量も多い。一方で pH12.5 の強アルカリ性のため歯髄刺激が強く、場合によっては歯髄の広範囲な壊死を生じたり、被蓋硬組織との間に死腔が生じ、強度が低く、封鎖性もないことから、辺縁漏洩による感染の危険性などの問題点も指摘されている。リン酸カルシウムが主成分である α-TCP/Te-CP セメントは、生体親和性が高く、硬組織を誘導するため、近年医科および歯科領域で注目されている。我々は第 135 回日本歯科保存学会において、α-TCP/Te-CP セメントの各種練和液による硬化時間、pH、圧縮強度への影響を検討した結果、α-TCP/Te-CP セメントは練和液によりその性質を変化させることが出来ることを報告した。今回は、α-TCP/Te-CP セメントの更なる工学的性質を明らかにするため、エックス線回折 (XRD)、走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行い、覆髄剤としての有用性について検討した。

【材料および方法】

1. α-TCP/Te-CP セメント粉末の作製

炭酸カルシウムと第二リン酸カルシウム二水塩をモル比 5:6 で機械混合したものを、1500°C で 5 時間加熱し、得られた焼結塊を粉砕してセメント粉末とした。

2. 練和液および練和条件 (粉液比)

① 1M 正リン酸水溶液 P/L1.5、② 1M リン酸二水素ナトリウム水溶液 P/L1.5、③ 1M リン酸二水素ナトリウム水溶液 P/L2.0、④ 2M リン酸二水素ナトリウム水溶液 P/L1.5、⑤ 2M リン酸二水素ナトリウム水溶液 P/L2.0、⑥ 1M クエン酸水溶液 P/L2.0、⑦ 1M クエン酸水溶液 P/L2.5、⑧ 2M クエン酸水溶液 P/L1.5 以下の実験は①～⑧の条件で行った。

3. XRD 解析

各種条件で練和したセメントをアクリル型に填入し、練和開始から 2 分後に 37°C、相対湿度 100% の恒温器中に移した。練和開始から 60 分後に恒温器から取り出し、37°C の疑似体液中に 24 時間および 72 時間浸漬した。その後凍結乾燥し、粉砕して XRD 解析した。

4. SEM 観察

3 と同様にして作製した凍結乾燥試料を切断し、オスミウムコーティング後、その破断面を SEM 観察した。

【結果および考察】

XRD 解析では、いずれの条件においても練和開始から 72 時間まででは原材料としての α-TCP 及び Te-CP 由来の回折ピークを認めるものの、練和条件①②③④⑤ではそれら回折ピーク強度は経日的に低下し、一部アパタイトに移行 (条件①では第二リン酸カルシウム二水塩も生成) する様相を呈した。一方、条件⑥⑦⑧では殆ど変化は認められなかった。SEM 観察では、①②③④⑤は練和開始から 24 時間後、72 時間後ともに薄片状の結晶構造が観察された。⑥⑦は練和開始から 24 時間後では α-TCP/Te-CP セメント粉末の粒子がほぼ原形のまま凝集しているような像を呈し、72 時間後ではその表面に微細な結晶の析出が観察された。⑧は練和開始から 24 時間後、72 時間後ともに α-TCP/Te-CP セメント粉末の粒子は原形を留めず、一塊の平滑な像が観察された。

今回の結果から、α-TCP/Te-CP セメントは弱酸性溶液で練和するとアパタイト単相を形成しながら硬化することが示唆された。今後は、動物実験により α-TCP/Te-CP セメントの覆髄剤としての有用性を検討していく予定である。

ラット臼歯における Mineral Trioxide Aggregate による直接覆髄後の
マクロファージ系細胞の動態解析

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座 歯学分野
○武井絵梨花、重谷佳見、吉羽邦彦、日向 剛、吉羽永子、興地隆史

Distributional changes of macrophage subpopulations after direct pulp capping
with mineral trioxide aggregate in rat molars

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

○TAKEI Erika, SHIGETANI Yoshimi, YOSHIBA Kunihiko, HINATA Go, YOSHIBA Nagako, OKIJI Takashi

【研究目的】

歯髄を可及的に保存することが歯の保存のためには有利とされており、従来より水酸化カルシウムなどさまざまな材料が覆髄材として用いられている。Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は直接覆髄材として近年使用されている材料であり、硬組織形成を誘導することが報告されているが、その機序は未だ十分解明されていない。一方、マクロファージは創傷治癒の初期過程で壊死組織の貪食や成長因子の産生などの役割を演じることが知られているが、歯髄の創傷治癒過程におけるマクロファージの挙動については知見に乏しい。

そこで本研究では、MTA 適用後の歯髄創傷治癒過程におけるマクロファージの関与の可能性を追究することを目的として、MTA で直接覆髄されたラット臼歯歯髄における各種マクロファージ系細胞の経時的動態を、免疫組織化学的に観察した。

【材料および方法】

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 0.8 mm) で咬合面より露髄させ、洗浄、止血後、MTA による直接覆髄を施した。窩洞はフロアブルレジン (FiltekFlow、3M) で被覆した。観察期間は術後 1、2、3、5、7、14 日とし、所定期間経過後に PLP 溶液にて灌流固定を行い、摘出した試料を 10%EDTA にて脱灰後、凍結切片を作成し、H-E 染色ならびにモノクローナル抗体 ED1 (抗ラットマクロファージ、樹状細胞)、ED2 (抗ラット常在性マクロファージ) および OX6 (抗 MHC class II 分子) を用いた酵素抗体染色による観察を行った。

【成績】

術後 1、2 日では覆髄部直下に変性層の形成が認められた。術後 3 日には覆髄部近傍の一部に円柱状の細胞が配列し、術後 5 日には覆髄部直下に線維性基質の形成が観察された。術後 7 日には薄い被蓋組織が形成され、術後 14 日には一部細管構造を示す象牙質様基質が認められた。

ED1 陽性細胞および ED2 陽性細胞は、術後 1 日より変性層直下に集積し始め、術後 2 日では顕著な集積像を呈した。術後 3 日では ED1 陽性細胞の集積は著明であったが、ED2 陽性細胞の集積は不明瞭となる傾向を示した。以後、ED1 陽性細胞も集積像が徐々に不明瞭となり、術後 2 週では、ED1 陽性細胞、ED2 陽性細胞とも歯髄内に概ね均一に分布しており、集積像は観察されなかった。一方、OX6 陽性細胞は、術後 3 日以降、歯髄内に若干の増加傾向を示したが、観察期間中、覆髄部への明らかな集積像は認められなかった。

【考察】

ED1 は常在性マクロファージと滲出性マクロファージの両者が発現するが、ED2 の発現は常在性マクロファージに限定されることが知られている。従って、本研究の結果から、MTA による直接覆髄後の歯髄創傷部では、術後早期にいち早く常在性マクロファージが集積したのち、徐々に滲出性マクロファージが優位となることが示唆された。一方、OX6 陽性細胞の覆髄部直下への集積像が観察されなかったことから、MTA の封鎖性により直接覆髄後の抗原侵襲が微弱に保たれていること、あるいは MTA との接触により形成された変性層の抗原性は低いことが示唆された。

【結論】

MTA による直接覆髄後、早期に覆髄部変性層直下へのマクロファージ系細胞の集積が観察され、その後被蓋硬組織が形成されることが示された。

Mineral Trioxide Aggregate に多血小板血漿を併用した 直接覆髄法による歯髄組織反応と早期治癒の可能性

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座 歯科保存学分野

○山田 麻衣子, 関根 源太, 森 春菜, 堀 雅晴, 長谷川 智哉, 吉田 隆一

Possibility of Application of Mineral Trioxide Aggregate with Platelet Rich Plasma in Direct Pulp Capping of Rat Molars

Department of Endodontics, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation,
Asahi University School of Dentistry

○YAMADA Maiko, SEKINE Genta, MORI Haruna, HORI Masaharu, HASEGAWA Tomoya, YOSHIDA Takakazu

[緒言]

Mineral Trioxide Aggregate (MTA)は、封鎖性と強度が高く、また硬化反応過程で生成する水酸化カルシウム徐放作用が抗菌効果や歯髄再生を示すことが知られている。そこで、本研究ではラットで直接覆髄後に残存した歯髄細胞を組織幹細胞として扱えるかどうか、MTAを足場に多血小板血漿 (Platelet rich plasma, PRP) を加えた治癒促進の可能性を試みた。

[材料と方法]

生後8週齢のWistar系雄ラット48匹の左右上顎第一臼歯咬合面にラバーダム防湿下で露髄させ、別の健全な同系ラット全採血から得たPRPとMTA PRO ROOT® (三金) の混和したもの (MTA+PRP)、滅菌精製水とMTAを混和したもの (MTA)、Dycal (三金, CH) の3種類を用いて直接覆髄を行った。実験期間は1時間、3日、7日、ならびに14日とし、歯髄再生の評価を行った。Dentin bridge (DB) の石灰化密度はマイクロフォーカスCT (μ CT, Scan Xmate RX-series, Comscan Techno) を用いTriBon 3D (Ratoc System Engineering) で解析した。さらに、未分化間葉細胞の増殖をKi-67による免疫染色で、象牙芽細胞分化とDBの構造をHE染色ならびにNestinとDMP1による免疫染色で組織学的に検索した。また、早期におけるDMP1のmRNA発現をReal time PCR法で測定した。

[結果と考察]

①BMD μ CT ならびにVBMD 値からみたDB形成

3日では、いずれの材料でもBMD μ CTで明らかな硬組織形成とみなすVBMD値はみられず、7日、14日では、CH<MTA<MTA+PRPの密度差を示した。また、CHの材料中には不均一性を示した。

②形態学的ならびに免疫組織化学的にみた歯髄再生とDB形成

CHでは3日、7日、14日とも壊死層を認めたが象牙芽細胞の分化は認められなかった。MTAでは3日で壊死層直下に歯髄細胞層を認め、7日では細顆粒状の層とこれに移行する細管構造とこれを象牙芽細胞が裏打ちする様相を認めたが歯髄全面を覆うことはなかったが、14日では、明瞭な細管構造を示すDB形成を認めた。MTA+PRPでは、3日でMTAと同様の所見を呈し、7日で細顆粒状層が厚く、これに移行するように歯髄全面を覆う明瞭な細管構造と裏打ちする象牙芽細胞を認め、14日でも同様の所見であった。免疫染色では、CHではKi-67の陽性数が少なく、MTA、MTA+PRPでは多くのKi-67陽性を認めた。CHではNestinで、実験期間全てNestin陽性の象牙芽細胞を認めず、MTA、MTA+PRPでは7日、14日ともDB直下の象牙芽細胞にNestin陽性を認めた。MTAの7日、14日ともDBと裏打ちする象牙芽細胞にDMP1陽性を認めたが、MTA+PRPでは7日、14日ともDBには陽性を示し、象牙芽細胞には陰性を示した。

③処置1日後と3日後におけるDMP1 mRNA発現量の変化

いずれの覆髄剤でも、覆髄処置による歯髄傷害により1時間後のDMP1 mRNA発現量は正常の歯より少なく、また3日後ではCHに比べてMTA単独が高く、さらにMTA+PRPではMTA単独よりも高い発現を示した。

以上の結果からMTAやMTA+PRPがCHよりも優れた歯髄再生能を有することが得られた。

[結論]

MTAは、CHよりも優れた露髄面封鎖性と歯髄再生能を促し、さらにMTAにPRPを加えると、早期における象牙芽細胞の分化を促進し、DBの形成に貢献できる。

MTAの硬化と裏層剤と接着について

昭和大学歯科病院・歯内治療科¹⁾、昭和大学 歯学部 歯科理工学講座²⁾
○大塚 玲美¹⁾、増田 宜子¹⁾、山田 嘉重¹⁾、高林 正行¹⁾、宮崎 隆²⁾

Effect of hardening MTA on adhesive of lining matering

Showa University, Dental Hospital, Endodontics¹⁾.

Showa University, School of Dentistry, Department of Oral Technology²⁾.

○OTSUKA Reimi¹⁾, MASUDA Yoshiko¹⁾, YAMADA Yoshishige¹⁾, TAKABAYASHI Masayuki¹⁾, MIYAZAKI Takashi²⁾

【緒言】 Miral trioxide aggregate (MTA)は直接覆髄剤として、大変有用であると報告されているが、裏層剤との接着や辺縁漏洩についての報告はあまりされていない。

【目的】 今回我々は、MTAの硬化と一般的な裏層剤である、グラスアイオノマーセメント及びグラスアイオノマー系セメントとの接着や辺縁漏洩について検討することにした。

【方法】 試料には、MTA (ProRoot MTA[®], デンツプライ三金), レジン強化型グラスアイオノマーセメント イオノタイト F[®](トクヤマデンタル), グラスアイオノマーセメント CX(松風), Fuji IX GI (GC)を用いた。直径7 mm、高さ3 mmのチューブに、下から1.5mmまで試料を指示書に従って練和し挿入した。それぞれの試料はMTAを4時間以上硬化、MTAにCaCl₂を10%添加し練和後4時間以上硬化、MTAを10分硬化、MTAに10%CaCl₂を添加し練和後10分硬化したもの それぞれの上に、グラスアイオノマーセメント及び、グラスアイオノマー系セメントを接着させた。常温にて硬化を確認後、接着した試料は1%ローダミン B 液に半日漬け 辺縁漏洩のレベルを観察し、ストレートのハンドピースに円形状のディスクを用いて接着面を縦に切断した。得られた試料は70、80、90、100%エタノール上昇系列で脱水・乾燥し、t-ブタノール凍結乾燥装置 (VFD-21S、真空デバイス) を用い凍結乾燥を行った。15mA、60秒の条件下でイオンスパッター(E-1030、日立)にて白金パラジウム蒸着した後、SEM (走査電顕) (JSM-T220A、日本電子) で試料表面の形状を500倍、3000倍で観察した。

【成績】 試料硬化後、接着をしていたのは、MTAに10%CaCl₂を添加し練和後4時間以上硬化したものとイオノタイト、MTAに10%CaCl₂を添加し練和後10分硬化したものとイオノタイト、CX、Fuji IX GIであった。その他のものは接着せず分離した。又接着した試料もディスクにて切断の際に分離した。

【結果】 MTAとグラスアイオノマーセメント及び、グラスアイオノマー系セメントは接着しなかった。しかし、SEMにて表面を観察した結果、MTAを4時間以上硬化させたものとイオノタイト、Fuji IX GI、MTAを10分硬化させたものとイオノタイト、CX、Fuji IX GI、MTAに10%CaCl₂を添加し練和後10分硬化したものとイオノタイト、CX、Fuji IX GIの表面にはMTAの結晶構造が認められた。

【考察】 直接覆髄剤にMTAを用いて裏層剤にグラスアイオノマーセメント及び、グラスアイオノマー系のセメントを用いる際には接着しない為、辺縁漏洩を考慮しなければならない。又、根管の穿孔部にMTAを充填し根管洗浄剤からの影響を減らす為充填剤でMTAを被覆する際もグラスアイオノマーセメント及び、グラスアイオノマー系のセメントを用いると辺縁漏洩が生じるので根管洗浄剤による影響を考慮していかなければならない。

MTAと各種ボンディング剤を用いたコンポジットレジンとの接着について

昭和大学歯科病院・歯内治療科¹⁾、昭和大学 歯学部 歯科理工学講座²⁾
○高林 正行¹⁾、増田 宜子¹⁾、山田 嘉重¹⁾、大塚 玲美¹⁾、宮崎 隆²⁾

The effect of MTA on adhesion of composite resin

Showa University, Dental Hospital, Endodontics¹⁾.

Showa University, School of Dentistry, Department of Oral Technology²⁾.

○TAKABAYASHI Masayuki¹⁾, MASUDA Yoshiko¹⁾, YAMADA Yoshishige¹⁾, OTSUKA Reimi¹⁾, MIYAZAKI Takashi²⁾

【目的】 Miral trioxide aggregate (MTA)は直接覆髄剤として、大変有用であると報告されているが、コンポジットレジンとの接着や辺縁漏洩についての報告はあまりされていない。今回我々は、MTAと各種ボンディング剤を用いた際のコンポジットレジンとの接着や辺縁漏洩について検討することにした。

【材料と方法】 試料には、MTA (ProRoot MTA[®], デンツプライ三金), コンポジットレジンにはエステライトフロー クイック ハイフロー (トクヤマ)、ボンディング剤として2ステップセルフエッチング剤のメガボンドFA (クラレ)、1ステップセルフエッチング剤のボンドフォース (トクヤマ) およびウェットボンディング法として2種類のボンディング剤 (アブソリュート2 : デンツプライ、フルオロボンドシェイクワン : 松風) を用いた。直径7mm、高さ3mmのチューブに、下から1.5mmまで試料を指示書に従って練和し挿入した。試料はMTAを4時間以上硬化、MTAにCaCl₂を10%添加し練和後4時間以上硬化、MTAを10分硬化、MTAに10%CaCl₂を添加し練和後10分硬化したもの さらにそれぞれの上に4種類のボンディング処理をそれぞれ施しコンポジットレジン接着させた。常温にて硬化を確認後、接着した試料は1%ローダミンB液に半日漬け 辺縁漏洩を観察し、ストレートのハンドピースに円形状のディスクを用いて接着面を縦に切断した。得られた試料は70、80、90、100%エタノール上昇系列で脱水・乾燥し、t-ブタノール凍結乾燥装置 (VFD-21S、真空デバイス) を用い凍結乾燥を行った。15mA、60秒の条件下でイオンスプッター (E-1030、日立)にて白金パラジウム蒸着した後、SEM (走査電顕) (JSM-T220A、日本電子) で試料表面の形状を300倍、1000倍、3000倍で観察した。

【成績】 試料硬化後、剥がれてしまったものは、MTA練和後4時間以上硬化したものとメガボンドFA、MTA練和後10分硬化したものとメガボンドFA、フルオロボンドシェイクワン、アブソリュート2、MTAに10%CaCl₂添加したものを練和後10分硬化したものとメガボンドFA、ボンドフォースであった。その他のものは切断の際も分離しなかった。辺縁漏洩試験はMTAに10%CaCl₂添加したものを練和後4時間以上硬化させたものの群が一番漏洩が少なかった。MTAとCRはボンディング剤により接着するものと接着しないものが見られた。接着せず剥がれてしまった物もSEMにて表面を観察した結果CRの表面にはMTAの結晶、もしくは切削片と思われる粒子が観察された。

辺縁漏洩試験においてはMTAに10%CaCl₂添加したものを練和後4時間以上硬化させたものが一番漏洩が少なかった。

【考察および結論】 MTA練和後10分硬化させたもの、MTAに10%CaCl₂添加したものを練和後10分硬化したものに関してはウェットボンディング法の2種が接着の成績がよかった。それに対しメガボンドFAが接着していたのはMTAに10%CaCl₂添加したものを練和後4時間以上硬化させた物のみだった。これは硬化促進剤を添加していないものや、添加しても初期硬化 (硬化10分で表面処理)のものに対しては、処理面の水分の存在が接着の阻害を起こしたのではないかと推測される。直接覆髄や、穿孔部の封鎖にMTAを用いた後CRを充填する際は硬化促進剤を添加するしないにかかわらず、4時間以上硬化させた上でウェットボンディング法のボンディング処理を行いCRを用いるのが適切と思われる。さらに低速精密切削装置 (Isomet, Buehler, USA) を用い接着面の状態を検討する予定である。

試作 MTA とフロアブルコンポジットとの接合性

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 齶蝕学分野¹
長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 生体材料学分野²,
○辻本 真規¹, エイド・アシュラフ², 林 善彦¹, 渡邊 郁哉²

Evaluation of the bonding between flowable resin composite and experimental mineral trioxide aggregate at different application times

Department of Cariology, Course of Medical and Dental Science, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences¹
Department of Biomaterial, Course of Medical and Dental Science, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences²
○Masaki Tsujimoto¹, Ashraf A. Eid², Yoshihiko Hayashi¹, Ikuya Watanabe²

Objective

The purpose of this study was to evaluate the effect of the time of application of resin composite on the shear bond strength between resin composite and experimental root repair material.

Materials and Methods

-MTA Plus root repair material (Prevest DenPro, Jammu, India) was mixed according to the manufacturer's instructions and applied to 30 acrylic rings 6 mm in diameter and 2 mm in depth. Clearfil Majesty LV flowable composite resin (Kuraray, Tokyo, Japan) was applied either immediately (group 1), 24 hrs (group 2) or 7 days (group 3) after application of the root repair material as follows:

- 1- Clearfil primer (Kuraray, Tokyo, Japan) was applied on the MTA surface, left for 20 seconds, then air dried. Clearfil Bond was applied next and cured for 10 seconds.
- 2- The bonding area was standardized using double-stick tape with a 4 mm hole positioned at the center of MTA surface.
- 3- 4 mm wide x 2 mm long cylindrical plastic rings were attached over MTA-filled blocks and Clearfil Majesty LV flowable composite was applied to the rings and cured for 20 seconds.

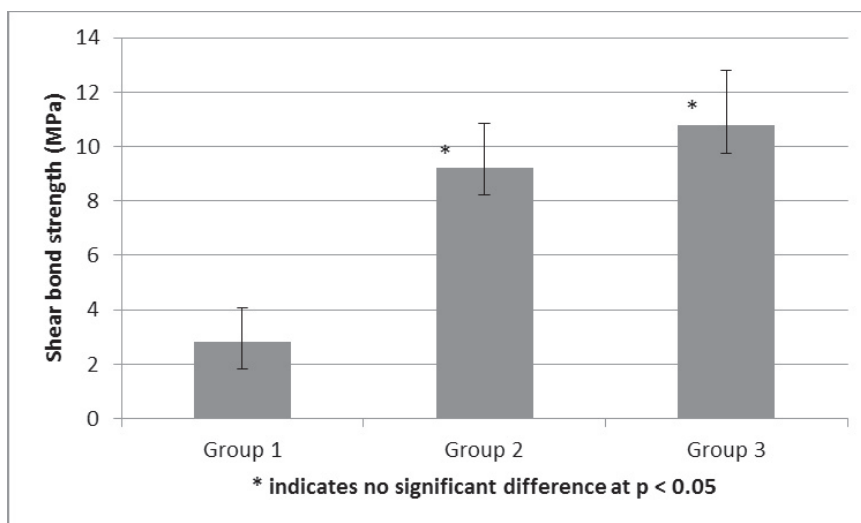
-After 24 hours of composite application, the samples were embedded in acrylic blocks, secured in a holder placed on the platen of universal testing machine (Instron, Norwood, MA) and then sheared at a cross-head speed of 1.0 mm/min until the bond between the composite and MTA failed. Shear bond strength in was calculated from the peak load at failure divided by the designated bonding area. The mean bond strengths of the experimental groups were compared using one way ANOVA and Tukey's post hoc test (significance level ≤ 0.05).

Results

The lowest bond strength values were that of group 1, and were significantly lower than groups 2 and 3 ($p < 0.001$). Group 3 had the highest bond strength values, but the differences between groups 2 and 3 were insignificant.

Conclusion

The bond strength between MTA Plus and resin composite is affected by the time of resin composite application.



強化型酸化亜鉛ユージノールセメントの粉液比が逆根管充填の封鎖性に及ぼす影響

鶴見大学歯学部歯内療法学講座

○湯本琴美、吉田拓正、鈴木一範、堀井皓典、森戸亮行、甲田 智、細矢哲康

Effects of the powder liquid ratio of reinforced zinc oxide eugenol cement
on the sealing ability of retrograde filling
Department of Endodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine
○YUMOTO Kotomi, YOSHIDA Takumasa, SUZUKI Kazunori, HORII Akinori,
MORITO Akiyuki, KODA Satoshi, HOSOYA Noriyasu

【目的】

根尖切除術はマイクロスコープの応用や確実な逆根管充填により極めて良好な成績を収めるようになった。これまで、専用材料のない逆根管充填には、アマルガム合金や酸化亜鉛ユージノールセメントなどの様々な材料が流用されてきたが、近年では、アマルガム合金の組織為害性や歯肉変色などの理由から、臨床成績に優れる強化型酸化亜鉛ユージノールセメント (EBA セメント) が使用される頻度が増加している。しかしながら、暫間充填や合着用に開発された EBA セメントを逆根管充填材料として流用した場合の材料学的な報告は少なく、操作性を重視した粉液比で用いられることが多いようである。

本研究の目的は、EBA セメントを逆根管充填材料として使用した場合の至適粉液比を検索するために、種々の粉液比で練和した EBA セメントをヒト抜去歯に形成した逆根管充填窩洞へ充填し、色素侵入試験によって辺縁封鎖性に関して観察し比較検討を加えた。

【材料及び方法】

被験歯として、生理食塩水中に保管された根管未処置のヒト抜去前歯 40 本を用いた。歯頸部で歯冠を切除後、根管の拡大形成を行い、#50 ガッターパーチャーポイント (GC) ならびに酸化亜鉛ユージノール系シーラー (日本歯科薬品) を併用してシングルポイント法にて根管充填を行った。その後、被験歯は 37°C、相対湿度 100% で 7 日間保管した。根面ならびに歯頸部切除面にネイルパーニッシュを塗布後、歯軸に垂直に根尖部 3mm を切除した。続いて、切除面より歯軸に平行に 2~3 mm の深さの逆根管充填用窩洞を形成し、窩洞を生理食塩水で十分に洗浄後、ペーパーポイントを 5 秒間挿入して窩洞内を乾燥した。被験試料には、Super EBA® (Bosworth) の Fast set (F 群) ならびに Regular set (R 群) を使用した。両群をさらに 4 群に分け以下のような粉液比を設定した。1 群 0.20 (L/P)、2 群 0.15 (L/P)、3 群 0.12 (L/P)、4 群 0.10 (L/P)。各条件 5 本ずつ練和開始から 5 分間で逆根管充填を行い、練和開始から 5 分後にフィッシャーバーでセメントの形態修正を行った。被験試料を直ちに 37°C、6% ローダミン B 水溶液中に浸漬し 7 日間保管した。色素液から取出した試料は、逆根管充填材の中心部から歯軸に平行に歯根を近遠心的に分割した。実体顕微鏡を用いて被験試料と根管壁間に侵入した色素液の状態を観察し、切除面からの侵入距離を計測した。得られた結果から、各条件間において Student-*t* test を用いて統計学的検索を行った。

【結果】

Fast set 群においては、1 群と 2 群間ならびに 3 群間に統計学的有意差が認められたが、Regular set 群においては、粉液比による差は認められなかった ($p < 0.05$)。また、粉液比 2 群ならびに 3 群においては Fast set 群が有意に優れた封鎖性を示した ($p < 0.05$)。

【考察】

本研究では、硬練和群と軟練和群との間での差は少なかったが、これは臨床で頻繁に行われる充填後のパニッシングをせずに切削による形態修正を行ったためと考えられる。また、軟練和の状態では色素液浸漬直前の形態修正時に十分な硬化が得られていなかった群もあり、封鎖性を低下した理由と考えられる。今後、臨床実態を十分に反映した状態での比較を追加する予定である。

【結論】

本研究により、逆根管充填材として Super EBA® を応用する場合は、Fast set を粉液比 0.10~0.15 (L/P) で使用することで良好な辺縁封鎖性が得られることが示唆された。

酸化亜鉛ユージノール系シーラーのレジン重合阻害に関する研究

— 未重合レジンの分子構造解析 —

神奈川県立歯科大学歯学部 口腔治療学講座 歯内療法学分野¹

神奈川県立歯科大学歯学部 口腔治療学講座 保存修復学分野²

○鈴木二郎¹, 岡田周策², 田中隆博², 寺中敏夫², 石井信之¹

A Study on Polymerization Inhibition of Zinc Oxide-Eugenol Root Canal Sealers on Resin Materials

—Molecular Structure Analysis of Non-polymerization Resin—

Department of Oral Medicine, Division of Endodontics¹, Division of Restorative Dentistry²,
Kanagawa Dental College

OSUZUKI Jiro¹, OKADA Shusaku², TANAKA Takahiro², TERANAKA Toshio², TANI-ISHII Nobuyuki¹

【研究目的】

酸化亜鉛ユージノール系 (ZOE) シーラーは国内外で多用され、根管充填後の支台築造には Minimal Intervention 治療概念により接着性レジンセメントやコア用レジンを用いる症例が増加している。われわれは ZOE シーラーの完全硬化 (24 時間) 後、製造業者指示に従って光照射して作製したコア用レジンの表面ブリネル硬さは、非 ZOE シーラーと有意差が認められないことを報告したが、支台築造に使用するレジンに対し ZOE シーラーによるラジカル重合阻害の可能性を解析するため、ZOE シーラーと接触したレジン材料表面の分子構造解析を FT-IR 法にて解析することを目的とした。

【材料および方法】

実験には、市販の各種 ZOE シーラー (キャナルス 昭和薬品化工, ニシカキャナルシーラー 日本歯科薬品) および対照として非 ZOE シーラー (キャナルス N 昭和薬品化工) を用い、レジン材料としてコア用レジン (クリアフィル DC コア オートミックス ONE クラレメディカル, ユニフィルコア EM ジーシー) および接着性レジンセメント (リライエックス ユニセム 2 オートミックス 3M ESPE, レジセム 松風) を供試した。試料作製はガラス板上に PET フィルムを敷き、シーラーを直径 12mm, 高さ 3mm 型枠内に充填、37°C 100%RH で 24 時間経過後、シーラー硬化体表面の PET フィルムを除去、ボンディング処理や光照射の必要な材料は製造者指示に従いレジン材料を充填、37°C 100%RH で 24 時間放置した。対照群はシーラー硬化体を使用せず PET フィルムに直接型枠を載せ上記と同様に作製し、各レジン硬化体表面をフーリエ変換赤外分光光度計 (AIM-8800) 顕微反射法にてスペクトル測定を行い、残存二重結合量 [RDB (%)] を求めた。また重合前の試料における二重結合のピークを求め、これを RDB100%とした。

【成績】

ZOE シーラーに接触したレジン硬化体表面の RDB は、コントロールに近似した値となりキャナルスが最も高値を示した。

【考察および結論】

ZOE シーラーを用い、シーラーの完全硬化 (24 時間) 後、製造者指示に従い作製したレジン表面低重合層中の残存二重結合量は、ZOE シーラーと接触することなく作製したコントロールに近似した値となった。根管充填後の根管内にレジン材料を用いて支台築造を行う場合、使用材料あるいは ZOE シーラーの硬化時間に比例して、レジン重合硬化に及ぼす影響は減少する可能性が示された。

粉液比がオレイン酸、ユージノールおよび酸化亜鉛を主剤とした 新規根管充填用シーラーの物性に及ぼす影響

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座, 共同利用研究センターRI 研究室*

○前田宗宏, 橋本修一*, 石塚克巳, 勝海一郎

Influence of powder/liquid ratio on physical properties of the new root canal sealer contained with oleic acid, eugenol and zinc oxide

Department of Endodontics & Operative Dentistry,
Section of Radioisotope Research, Research Center for Odontology*,
Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo

○Maeda M, Hashimoto S*, Ishitsuka K and Katsuumi I

【はじめに】

第132～135回の本学会において、従来の酸化亜鉛ユージノール系シーラーに比べて含有ユージノール量を低減させた試作根管充填用シーラーの物性、シーラーからのユージノール遊離などについて報告した。今回は、臨床応用時に想定される粉液比 (g/ml) の違いがシーラーの物性に及ぼす影響について検討を行った。

【材料および方法】

1. 新規根管充填用シーラーの組成

粉 剤 (1g 中) : 酸化亜鉛 (堺化学工業) 0.4g、ロジン (荒川化学工業) 0.4g、その他 0.2g

液 剤 (1ml 中) : オレイン酸 (日油) 0.75ml、ユージノール (日本粉末薬品) 0.15ml、その他 0.1ml

2. 新規根管充填用シーラーの粉液比

粉剤 1g に対して液剤を 0.45ml、0.50ml、0.55ml、0.60ml (粉液比 ; 2.22、2.00、1.82、1.67) の割合に変化させ、ガラス練板上で 30 秒間練和した。

3. 硬化開始時間

23℃の室内で練和直後のシーラーを練板上で観察し、稠度に変化しはじめた時間を練和開始点から起算して硬化開始時間とした。

4. 崩壊度試験

練和直後のシーラーを内径 6mm、高さ 5 mm のシリコンチューブに填塞後、37℃、100%湿度の恒温恒湿器に 24 時間静置した。試料を取り出し、重量を電子天秤で計測した。ビーカーに蒸留水を 50ml 加え、試料を懸垂し 24 時間 37℃で保管した。試料をビーカーから取り出し、ビーカー内の水を恒温器内で蒸発させた。放冷後、実験前後のビーカーの重量差を浸漬前の練和物重量で除し、崩壊率 (%) とした。測定は各シーラーにつき 3 練和物ずつ行った。

5. 色素浸透試験

内径 5mm、長さ 50mm のガラス管に練和直後の練和物を 20mm 填塞後、37℃、100%湿度の恒温恒湿器に 24 時間静置後、1%メチレンブルー水溶液中に浸漬した。24 時間後のガラス辺縁への色素浸透距離をノギスで測定し、辺縁封鎖性を比較した。測定は各シーラーにつき 3 練和物ずつ行った。

6. シーラー硬化度の測定

内面を粗造にした内径 8 mm、長さ 5 mm のガラス管をガラス板上に置き、練和したシーラーを填塞後、37℃、100%湿度の恒温恒湿器に 24 時間静置した。先端径 1 mm、長さ 100 mm の測定針を装着したテクスチャーアナライザ (EZ Test、島津製作所) の試料台上に、固定装置を用いて試料の上面が測定針に接触するように固定し、測定針が試料の中央部に進入するように調整した。1 mm/sec の速度で測定針が試料に進入する際の荷重変化を専用データ処理ソフト (TRAPEZIUM、島津製作所) で記録した。なお、測定は各条件につき 3 試料ずつ行った。

【結果および考察】

- 硬化開始時間は粉液比の違いによりほとんど変化しなかった。
- 崩壊度は粉液比が小さくなるにつれてわずかに増加する傾向がみられた (0.27 → 0.36%)。
- 辺縁封鎖性は良好であり、粉液比の違いによる影響を受けなかった。
- 硬化度は粉液比が小さくなるにつれ低下する傾向が認められた (12.5 → 16.6N)。

臨床応用時のシーラーの粉液比には一定の基準があり本研究では粉液比 2.00 に相当するが、2.22～1.67 の粉液比変化においては、シーラーの物性に大きな影響を及ぼすことはなかった。

酸化マグネシウムを基材とする根管シーラーに対する生物学的検討

東京歯科大学歯科保存講座

○ 山村啓介, 齋藤健介, 小林鉄也, 森永一喜

Biological evaluation of magnesium oxide-based root canal sealer in vitro

○ Keisuke Yamaura, Kensuke Saito, Tetsuya Kobayashi, Kazuki Morinaga

Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College

【研究目的】: 根管シーラーは硬化後も根尖周囲組織に接触し、根尖部の封鎖や周囲組織の治癒に影響を及ぼすことから、優れた組織親和性が求められる。なかでも近年臨床応用されているレジン系シーラーは特に生体親和性が高いとされている。当講座では生体親和性を重視し、かつ操作性に優れた根管シーラーの開発を企画し、酸化マグネシウムを基材とする硬化型根管充填用シーラーを処方した。本研究ではヒト培養歯根膜細胞に対するシーラーの組織親和性を、細胞生存率と形態変化から比較検討した。

【材料と方法】

①根管シーラー・細胞

培養細胞としてヒト歯根膜線維芽細胞 (HPDL) を用いた (3~5 継代)。培養液には α -MEM (10%FBS, 1%ペニシリン、ストレプトマイシン添加) を使用した。また実験には試作根管シーラー (以下 MGO 群) の他に AHplus (以下 AH 群)、エンドシーラー (以下 ES 群) を用いた。

②シーラー抽出液の濃度の調整

練和直後のシーラー 3g を α -MEM 15ml 中に添加し、70°C にて 24 時間静置した。その後 Millipore Filter (0.22 μ m) を用いて濾過滅菌を行った。抽出液原液と α -MEM にて 10% に希釈したものをシーラー抽出液として使用した。対照群には α -MEM を用いた。

③細胞生存率

HPDL を 96well plate 中に 5×10^3 個/well 播種し 24 時間培養後、それぞれのシーラー抽出液と交換した。1, 2, 3 日後に WST-1 (Roche 社) を用いて呈色反応を行いその後、波長 450nm にて吸光度を測定し、細胞生存率を算定した (n=8)。

④形態観察

ヒト培養歯根膜細胞を 6well plate 中に 1×10^5 個/well 播種し 37°C、5% CO₂ 下に 24 時間培養した。シーラー抽出液と交換後、1, 2, 3 日までの形態変化を観察した。

【結果】

- 1) 対照群の WST-1 の値は経時的に増加し、形態観察からは細胞の増殖と細胞突起の伸長が確認された。
- 2) 希釈濃度 100%: MGO 群, ES 群の WST-1 の値は最も低く観察期間中の変化は認められなかった。また細胞形態も円形を呈しており、ほとんどの細胞がプレートから剥離していた。一方 AH 群では 1 日目には他の実験群より有意に高い値を示したが 2 日目以降からは他群と同様の低い結果となった。
- 3) 希釈濃度 10%: MGO 群は全ての計測時間において対照群と近似した結果を示した。ES, AH 群の WST-1 の値は対照群および MGO 群と比較し有意に低い値を示した。細胞形態は対照群と比較し ES 群では明らかな変化は認められなかったが、AH 群では細胞突起の伸長が弱く細胞間にもわずかな間隙が認められた。

以上のことから低濃度の酸化マグネシウムを基材とした根管シーラーは培養歯根膜細胞に対し生体親和性を有すると考えられた。

化学的表面処理後の根管象牙質とスーパーボンド根充シーラーの接着

北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室
○本間啓史, 菅谷勉, 川浪雅光

Adhesion between root canal dentin and Super-Bond SEALER after chemical surface treatment

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

○HOMMA Keishi, SUGAYA Tsutomu, KAWANAMI Masamitsu

【研究目的】

根管治療では、まず根管を機械的に拡大して感染歯質を除去するとともに、根管充填に必要なスペースを形成することが重要である。しかし扁平な根管や種状根、イスムスを有する根管などでは機械的に根管を拡大することが難しい。このような根管では薬剤により化学的に根管壁を溶解して拡大する方法が有効ではないかと考えた。

本研究は、酸と次亜塩素酸ナトリウムによる根管拡大を検討する目的で、象牙質面の脱灰速度、表面形態、接着性シーラーの接着性を評価した。

【材料と方法】

実験 1. 38%リン酸および 10%クエン酸/3%塩化第二鉄水溶液による象牙質脱灰深度の測定：ヒト抜去歯の象牙質面を次の 4 つの条件で処理し、SEM で脱灰深度を測定した。①38%リン酸 5 分、②38%リン酸 5 分、10%NaOCl (以下 NC) 2 分、③10-3 溶液 (10%クエン酸 3%塩化第二鉄：表面処理剤グリーン) 5 分、④10-3 溶液 5 分、NC 2 分。

実験 2. 38%リン酸あるいは 10%クエン酸/3%塩化第二鉄水溶液処理後の次亜塩素酸ナトリウム処理時間と象牙質面の形態変化：被験面をリン酸または 10-3 溶液を用いてそれぞれ次の 6 つの条件で処理を行った。

①38%リン酸または 10-3 溶液 5 分、NC0 秒 ②38%リン酸または 10-3 溶液 5 分、NC60 秒 ③38%リン酸または 10-3 溶液 5 分、NC90 秒 ④38%リン酸または 10-3 溶液 5 分、NC120 秒 ⑤38%リン酸または 10-3 溶液 5 分、NC2 分、芳香族スルフィン酸塩 (アクセル) 10 秒、10-3 溶液 10 秒、⑥38%リン酸または 10-3 溶液 10 秒

各処理終了後、SEM 観察を行った。

実験 3. 象牙質片による色素侵入試験と微小引張試験：ヒト抜去歯の象牙質面を次の 2 つの条件で処理し、接着性を評価した。化学的処理群：10-3 溶液 5 分、NC 2 分、アクセル 10 秒、10-3 溶液 10 秒。対照群：10-3 溶液 10 秒のみ。両群とも水洗、乾燥後、SBS (スーパーボンド根充シーラー) を塗布、硬化後に色素侵入試験と微小引張り試験を行った。

【結果】

実験 1. 脱灰深度は① $29.7 \pm 6.5 \mu\text{m}$ ② $31.4 \pm 4.9 \mu\text{m}$ ③ $22.8 \pm 4.7 \mu\text{m}$ ④ $22.7 \pm 4.0 \mu\text{m}$ で、象牙質表面構造の変化は 10-3 溶液よりリン酸の方が著しかった。

実験 2. リン酸処理後に NC 処理を行なった場合、象牙細管は大きく開口し著しい凹凸が生じたが、10-3 溶液処理後に NC 処理を行なうと、リン酸を用いた場合より象牙質面の凹凸は少なかった。

実験 3. 化学的処理群の色素侵入率は、 $25.5 \pm 7.3\%$ 、対照群は、 $23.0 \pm 6.7\%$ 、微小引張り強さは、それぞれ $17.5 \pm 2.7\text{MPa}$ 、 $20.4 \pm 4.7\text{MPa}$ で両群間に有意差はなかった。

【考察】

38%リン酸と 10-3 溶液では、象牙質の脱灰深度に大きな差はなく、5 分でファイル約 1 サイズ分 (0.05 mm) の拡大が可能であり、象牙質表面の構造変化から、化学的拡大には 10-3 溶液の方が適していると考えられた。また、象牙質面を 10-3 溶液と NaOCl で化学的拡大後の象牙質面と SBS との接着は、対照群と有意差のない色素侵入率や接着強さを示したことから、機械的拡大が困難な根管では、酸および次亜塩素酸ナトリウム、芳香族スルフィン酸塩、10%クエン酸 3%塩化第二鉄溶液によって化学的拡大と表面処理して接着性シーラーを用いることにより、高い封鎖性が得られる可能性が示唆された。

【結論】

10-3 溶液と NaOCl で根管壁を溶解後、アクセルを併用することで、対照群と有意差のない色素侵入率や接着強さが得られた。

生理食塩水による各種根管充填シーラーの表面形態変化の観察

日本大学松戸歯学部 歯内療法学講座

○ 川島 正、馬場俊晃、上田幾大、富田 敬、三浦孝司、辻本恭久、松島 潔

Observation of surface form of each root canal sealer by interaction with physiologic saline

Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○ KAWASHIMA Tadashi, BABA Toshiaki, UEDA Ikuo, TOMITA Takashi,
MIURA Takashi, TSUJIMOTO Yasuhisa, MATSUSHIMA Kiyoshi

【研究目的】

根管充填は通常ガッタパーチャポイントとシーラーを用いて行っている。シーラーの目的はガッタパーチャと根管壁を接着または合着させること、ガッタパーチャとガッタパーチャの隙間を埋めること、さらにガッタパーチャとともに根尖孔を封鎖することによって根尖周囲病変の治癒を促進することなどがあげられる。根管充填後のエックス線写真においてシーラーが根尖孔外に溢出したり、側枝、分岐から周囲組織に溢出しているのがよくみられる。このシーラーは根尖周囲組織または組織液に直接接しており、その状態で硬化するのを待つことになり、その後も組織液の影響を受け続けることになる。演者らは根周囲に溢出したシーラーが組織液の影響によりどのような変化を受けるかを形態学的に観察した。

【材料および方法】

実験に用いたシーラーは ZOE シーラーのキャナルス (CA)、非 ZOE シーラーのキャナルス N (CN)、4-META/MMA-TBB レジン系シーラーのスーパーボンド根充シーラー (SB)、4-META を含むデュアルキュアタイプのセルフエッチングシーラーの MetaSEAL を用いた。製造業者指示通りに練和し、練和直後に生理的食塩水に 1 週間浸漬した。MetaSEAL は光照射を行わなかったもの (MS) と、20 秒照射したもの (MSL) とした。コントロールは空気中で硬化させた。試料を蒸着後、表面形態を走査型電子顕微鏡 (日立社製 S-2700 : SEM) にて観察した。

【成績】

CA : 表面の溶解がみられ、約 1μ の不定形の粒子が観察された。

CN : 表面の溶解がみられ、直径 $3\text{-}5\mu$ の小穴が観察された。

SB : 球状フィラーとみられる構造物以外の部分に $3\text{-}4\mu$ の球状粒子が沈着し、互いに癒合し表面を覆っているのが観察された。

MS : $2\text{-}3\mu$ の球状粒子が互いに癒合して表面を覆っているのが観察された。

MSL : 結晶物等の沈着物はなく、粒子形態に変化が認められなかった。

【考察】

今回は組織液として細胞外液と同じ浸透圧の生理食塩水を用いた。シーラーは生体内で組織液と接しながら硬化し、その後も組織液と接している環境で生体内に存在するので形態的に影響を受けると考えられる。CA、CN では表面の溶解がみられたがこれは硬化前にすでに溶解したものと思われた。またレジン系の SB、MS では組織液に溶解しないことがわかり、さらにシーラー成分との結晶構造物の沈着が観察された。A,E.Kaplan らや Reza B.Kazemi らは水中でのシーラーの崩壊、吸水を報告しており、今回の実験により、光重合で硬化した MSL 以外のシーラーが生理食塩水に影響を受けることがわかった。今後、浸漬液を変え、経時的变化や沈着物の分析、溶出物の分析を行っていく。

【結論】

CA、CN は表面の溶解がみられ、SB、MS は表面に球状の結晶構造物が癒合して沈着していたのが観察された。MSL は沈着物はなく、粒子形態に変化が認められなかった。

形状記憶ポリマーの根管充填材への応用 —2次元軸対称有限要素法による応力解析—

鹿児島大学 医学部・歯学部附属病院 成人系歯科センター 保存科¹

鹿児島大学 理工学研究科 情報生体システム工学専攻²

○金丸憲一¹ 塚田岳司¹ 久保翔平² 川崎俊明² 徳田雅行¹ 鳥居光男¹ 加藤龍蔵²

Application of shape memory polymer to root canal filling material

- Stress analysis by the two-dimensional axial symmetry finite element method -

Kagoshima University Medical and Dental Hospital Restorative Dentistry and Endodontology¹

Kagoshima University Graduate school of Science and Engineering Department of Information Science and Biomedical Engineering²

○Norikazu KANEMARU, Gakuji TSUKADA, Syohei KUBO, Toshiaki KAWASAKI, Masayuki TOKUDA, Mitsuo TORII, Ryuzo KATO

【研究目的】

我々は、形状記憶ポリマーを用いて根管充填用ポイントを試作し、新しい根管充填法の開発を試みている。この根管充填法は、ポイントに備わった形状記憶機能の働きによりポイントの形状を根管の形状へと適合させて根管の封鎖を図ろうというものであるが、その際には、根管充填材～歯牙～歯周組織に発生する応力が相互に複雑に影響し合うと予想され、それらを考慮したより緻密な材料設計を行うことが必要となる。そこで、今回は、これらの一連の系を軸対称として2次元系でモデル化し、有限要素法を用いてシミュレーションを行い、実際の口腔内で起こりうる現象の予測を行ったので報告する。

【研究方法】

解析に使用する2次元軸対称歯牙・歯周モデルは、根管拡大後、形状記憶ポリマーを用いて根管充填した上顎中切歯の歯根とその周囲の歯周組織を図1のようにモデル化した。軸対称モデルでは、材料の変形が軸方向(Z方向)と動径方向(R方向)になるので変形の自由度はR-Z面内の2次元となり、軸対称という制約はあるが、立体の変形を2次元系の解析として求めることができる。このモデルでは、3角形要素で要素分割し、節点数 31736 個、要素数 62624 個である。歯牙については、中心軸から外側に10層に分割し、象牙質のヤング率を根管側から外側に向かって大きくなるよう段階的に変化させた。境界条件として、Z軸(中心軸)上の節点をR(動径)方向に固定して変位拘束した。R軸上の接点は、Z軸方向に固定し、皮質骨、海面骨の最外面上の接点は、R方向に固定し変位拘束した。荷

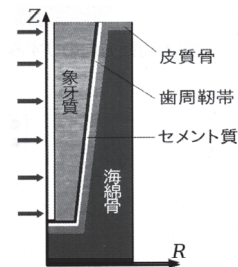


図1 解析モデルの構造

重条件は、根管の内側から動径方向に均一な外力を負荷した。負荷する外力は、人工根管を用いた封鎖性試験の結果において、良好な封鎖が得られた試料の実測値より近似的に求めた値の0.80 MPaを用いた。有限要素法による解析は、Fortran90を用いてプログラムを作成してシミュレーションした。

【結果と考察】

動径方向のひずみは、根管充填材の最下部の接する根尖部の象牙質に集中した。図2のように、根尖部の象牙質には応力の集中がみられ、象牙質 - セメント質の境界で0.06 MPaを示すが、歯周靭帯 - 皮質骨の境界では0.02 MPaに減少し、歯周靭帯による応力の緩和がみられた。今回、構築したモデルに基づいた解析では、歯牙は、根管側から外側に向かう応力に対して強い耐性をもつ構造であることが分かった。また、Z軸方向へ向かう応力も、象牙質の外側へむかうにつれて減少した。以上の結果から、形状記憶ポリマー製の根管充填材が歯牙に与える応力は、根管近傍における象牙質の破壊応力を大きく下回り、安全に使用できる可能性が高いことを明らかにした。今後は3次元、あるいは非線形のモデルの構築を行い、欠陥も考慮した応力解析を行っていく予定である。

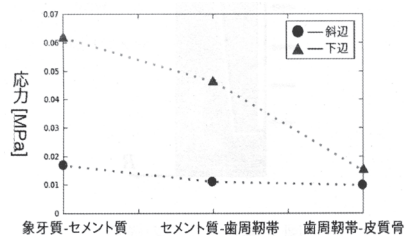


図2 動径方向の応力

根管形成用ファイル試験機を使用した GT Series X Rotary File の使用回数による比較

東京歯科大学歯科保存学講座

○吉澤 佑世、月野和 隆、山田 雅司、間 奈津子、森永 一喜

Comparison of Repeatedly Used GT Series X Rotary Files Using Torque Testing Device

Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College

○Yuusei Yoshizawa, Takashi Tsukinowa, Masashi Yamada, Natsuko Aida and Kazuki Morinaga

【目的】

GT Series X Rotary File (DENTSPLY SANKIN、東京) は、M-Wire を用いた新世代の NiTi ロータリーファイルシステムであり、M-Wire を用いたことにより従来の材料に比較して周期性疲労に強く、破折抵抗性の向上が一つの特徴として挙げられる。そこで今回、GT Series X Rotary File (以下、GTX) を用いて、30 度の湾曲根管模型 (ENDO-TRAINING-BLOC A0177、DENTSPLY SANKIN、東京) を拡大、形成するために根管形成用ファイル試験機 (シー・アイ・エス、神奈川) を用い、GTX を繰り返し使用した際の最終形成時のトルク値の変化、形成前後の根管模型の形態変化、ならびにファイル表面の状態について検討した。

【材料および方法】

30 個の湾曲根管模型を用意し、作業長を 16.0 mm とし、GTX 使用前にステンレス製手用 K ファイル (25 mm, Zipperer, Germany) にて #15 まで拡大した。さらに模型をあらかじめ GTX. 08/#30、.06/#30 の順で根管上部をクラウンダウン法にて拡大しておき、それぞれの最終形成を GTX. 06/#20 とし 1 回目使用、2 回目、3 回目、4 回目、5 回目、6 回目 (以下、1~6 群) と繰り返し使用して形成した根管模型を 6 つの群とし、各群 5 本ずつ形成した (n=5)。形成時には RC-Prep (Medical Products Laboratories、アメリカ) を満たした状態で使用し、形成ごとに洗浄用シリンジ (Endo-Eze Irrigator Tips, ULTRADENT、東京) を用いて洗浄した。最終形成は 21 mm GTX. 06/#20 を根管形成用ファイル試験機に装着して 300rpm にて行い、この時に発生した最大トルクの平均値を求めた。また、形成後に根管を染色し、デジタル画像撮影を行い形成前後の形態変化を観察、比較した。未使用、1、3、4、6 群のファイル表面の状態を走査型電子顕微鏡 (SU6600、日立、東京) にて観察した。統計処理には Tukey 法を用い、有意水準は 5% とした。

【結果】

最終形成時の最大トルクの平均値は 1 群で 4.01 ± 1.20 N/cm、2 群で 4.81 ± 3.29 N/cm、3 群で 4.90 ± 1.70 N/cm、4 群で 6.37 ± 2.02 N/cm、5 群で 4.47 ± 0.65 N/cm、6 群で 3.11 ± 1.70 N/cm であった。1 群から 6 群までファイルの破折は認められなかった。形成前後の重ね合わせ画像では、すべての群において根尖部付近の拡大形態はいずれも根管の変位は認められず、拡大・形成において大きな相違点は認められなかった。走査型電子顕微鏡 (以下、SEM) によるファイル表面の観察では、未使用のものと比較して 1 群はラジアルランド上に微小な損傷が認められ、3 群ではラジアルランド上にカッティングエッジに直行した亀裂が認められ、4 群では亀裂がさらに拡大していた。6 群ではカッティングエッジ自体の欠損が認められた。

【考察および結論】

最終形成時の最大トルクの平均値において、すべての群間で有意差は認められなかった。このことは 6 回目の使用まではファイルの切削能力に大きな低下は認められず、それがトルク値に反映されたと考えられる。また、形成前後の根管模型の形態変化の観察結果から、6 回目までの使用では外、内湾側の根管形成、拡大において大きな相違点が認められなかったのは、顕著な切削能力の低下がおきていないということを示している。しかし、SEM での観察結果からは使用回数を重ねることによりファイル自体の劣化が観察され、破折のリスクが増加していることが示唆された。

今回、根管形成用ファイル試験機を使用し同一条件でのファイルを使用することにより、ファイルの自体の切削効率等、機能的な変化は認められないが繰り返し使用によるファイル表面の疲労を確認することができた。

GT Series X Rotary File を用いた根管形成用ファイル試験機の評価

東京歯科大学歯科保存学講座

○月野和 隆、吉澤 佑世、山田 雅司、森永 一喜

Evaluation of Torque Testing Device Using GT Series X Rotary Files

Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College

○Takashi Tsukinowa, Yuusei Yoshizawa, Masashi Yamada, Kazuki Morinaga

【目的】

NiTi ロータリーファイルは柔軟性に優れるとともに根管追従能力が日々進化しており、主に湾曲根管における拡大・形成に臨床応用されている。そこでわれわれは、NiTi ロータリーファイルの性能の比較を規格化して行うために、根管形成用ファイル試験機（シー・アイ・エス、神奈川）を作製した。今回、NiTi ロータリーファイルによる根管拡大、形成時の条件の違いによるトルク値の変化、ならびに形成前後の根管模型の形態変化の結果から、本機器の有用性を検討した。

【材料および方法】

18 個の湾曲根管模型（ENDO-TRAINING-BLOC A0177、湾曲度 30°、DENTSPLY SANKIN、東京）を用意し、作業長を 16.0 mm として、ステンレス製手用 K ファイル（Zipperer, Germany）にて #15 までガイドパスを行った。さらに模型をあらかじめ GT Series X Rotary Files（DENTSPLY SANKIN、東京、以下 GTX）.08/#30、.06/#30 の順で根管上部を拡大した群（Crown down 群、以下 CD 群）と拡大していない群（Single Preparation 群、以下 SP 群）の 2 群に分け、各群 9 本ずつとした（n=9）。各群ともに最終形成は GTX.06/#20 を根管形成用ファイル試験機に装着し、モーター回転数 300rpm に設定して行い、この時発生した最大トルクの平均値を求めた。形成時には RC-Prep（Medical Products Laboratories、アメリカ）を満たした状態で行い、形成ごとに洗浄用シリンジ（Endo-Eze Irrigator Tips、ULTRADENT、東京）を用いて 5% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液と蒸留水で洗浄した。また、形成後に根管内を染色しデジタル画像撮影を行い、形成前後の根管模型の形態変化を観察、比較した。統計処理には Mann-Whitney の U 検定を用い、有意水準は 1% とした。

【結果】

最終形成時の最大トルクの平均値は CD 群で 8.42 ± 2.15 N/cm、SP 群で 20.42 ± 1.50 N/cm であった。CD 群においてファイルの破折は認められなかったが、SP 群では 2 本認められた。拡大前後の重ね合わせ画像では、CD 群の根尖部付近の拡大形態はいずれも外湾側、内湾側共に拡大され、根管の変位は認められなかったが、SP 群においてすべての模型で根管口部から中央部にかけて切断面に荒れが認められ、根尖部付近においては外湾側を多く切削していた。

【考察および結論】

最終形成時の最大トルクの平均値において、CD 群は有意に SP 群よりも小さな値を示した（ $p < 0.01$ ）。このことは根管上部の規制を減らし、歯冠側から順に根尖側に向かってクラウンダウン法にすることで、M-Wire を用いた NiTi ロータリーファイルにおいても破折のリスクとなりうる負荷を減弱することができたと考えられる。SP 群でのみファイルの破折が認められたことから、ファイルにとって過度な負荷がかかっていたと考えられる。また、形成前後の根管模型の観察結果から、根管上部を拡大することで形成後も本来の解剖学的形態から逸脱しない、良好な根管形成が行うことが可能であると考えられる。

各群における形成前後の形態に大きな差は認められないことから、本機器により形成方法に左右されない規格形成が可能であることが示された。今回、根管形成用ファイル試験機を使用することで回転数、形成速度、位置関係などを規格化することができ、異なる条件の 2 群間のトルク値の計測とその比較が行えるという本機器の有用性が示された。