

Non-invasive cross-sectional imaging of proximal caries using swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) in vivo

¹Cariology and Operative Dentistry, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

²Global Center of Excellence (GCOE) Program, Tokyo Medical and Dental University

³Division of Oral and Dental Surgery National Hospital for Geriatric Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology

○SHIMADA Yasushi¹, NAKAGAWA Hisaichi¹, SADR Alireza², WADA Ikumi¹, NAKAJIMA Masatoshi¹, NIKAIDO Toru¹, OTSUKI Masayuki¹, TAGAMI Junji^{1,2}, SUMI Yasunori³

[Introduction]

Dental caries diagnosis on contacting proximal surfaces of posterior teeth is a challenge because of restricted access for examination. Although it is well accepted that bitewing radiography has additional benefit in the detection of non-cavitated proximal lesions, evidence for their value in epidemiological studies is still controversial. The aim of this study was to determine the diagnostic accuracy of swept-source optical coherent tomography (SS-OCT) and radiographs in detecting and estimating the depth of proximal caries in posterior teeth in vivo.

[Materials and Methods]

SS-OCT images and bitewing radiographs were obtained from 50 proximal surfaces of 30 patients. Seven examiners scored the caries lesions according to a depth scale (0-4) using SS-OCT and the radiographs. The results were compared with clinical observations obtained after the caries treatment. The sensitivity, specificity and Az value of the ROC analysis were calculated and statistically analyzed at significance level of $p = 0.05$.

[Results]

SS-OCT could detect the presence of proximal caries in tomograms that were synthesized based on the backscattered signal. SS-OCT showed significantly higher sensitivity and Az values than radiographs for the detection of cavitated enamel lesions and dentin caries (Student's t-test, $p < 0.05$). No significant differences in specificity were found between SS-OCT and radiographs in all diagnostic thresholds (Student's t-test, $p > 0.05$).

[Discussion]

In this study, proximal caries present in the patient's mouth at the clinical site were evaluated using SS-OCT. The SS-OCT images obtained from early enamel demineralization up to the deep dentin caries were examined and compared with that of the X-ray images. Our results clearly showed SS-OCT image as a superior diagnostic tool for proximal caries over the over bitewing X-ray photogram; both sensitivity and specificity of SS-OCT in all diagnostic thresholds were higher than those of the X-ray photogram.

[Conclusion]

Within the limitations of this clinical study, SS-OCT is a more reliable and accurate method than bitewing radiographs for the detection and estimation of the depth of proximal lesions in the clinical environment.

Longevity of composite resin restorations in occlusal stress-bearing and buccal non-stress-bearing cavities: a retrospective comparison

Cheol Namgung¹, Kyu-Ri Kim¹, Young-Jee Rho², ○Byeong-Hoon Cho^{2*}

¹*Department of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea*

²*Department of Conservative Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea*

I. Object: The authors performed a cross-sectional retrospective clinical study to investigate the survival estimates and prognostic variables of the restorations delivered in our department. From the data, we observed a short longevity of the occlusal composite resin restorations compared to the cervical ones. This presentation will compare the longevities of the Class I and II direct composite resin restorations subjected to occlusal stresses with the Class V restorations not subjected to occlusal stresses.

II. Materials & Methods: Patients who had received restorative treatments in the Department of Conservative Dentistry, Seoul National University Dental Hospital before July 1, 2008 and re-visited the department from July 6, 2009 to August 28, 2009, were enrolled in this study. From the 1,437 restorations from 288 participants totally, 564 cervical restorations from 131 patients and 275 occlusal restorations from 140 patients were included in the survival analysis of cervical and occlusal direct restorations, respectively. Survival analysis was performed using Kaplan-Meier survival estimates and the effect of the assumed prognostic variables was analyzed using a multivariate Cox proportional hazard model.

III. Results: Median survival time of cervical and occlusal composite resin restorations were 10.4 and 4.4 years, respectively. In the cervical restorations, the prognostic variables were the operator, tooth, and gender, and in the occlusal restorations, they were the material, tooth type, systemic disease, and cavity classification, in a descending order. Failure reasons were retention, secondary caries, marginal discoloration and marginal adaptation in the cervical restorations and secondary caries, retention, marginal discoloration and marginal adaptation in the occlusal restorations.

IV. Conclusion: Composite resin restorations in the occlusal Class I and II stress-bearing cavities showed significantly shorter survival estimates than those in the buccal Class V non-stress-bearing cavities and also showed quite different prognostic variables and failure reasons.

Cho, Byeong-Hoon

Department of Conservative Dentistry,
Seoul National University School of Dentistry,
101 Daehag-ro, Jongro-gu, Seoul, Korea 110-749
chobh@snu.ac.kr

Mussel-mimetic bio-adhesive polymers: the alternative to petroleum adhesives

○Hiraishi Noriko¹, Kaneko Daisaku², Taira Shu³, Islam Sofiqul^{1,4}, Otsuki Masayuki¹, Tagami Junji^{1,4}

1. Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
2. Frontier Research Academy for Young Researchers, Kyushu Institute of Technology
3. School of Materials Science, Japan Advanced Institute of Science and Technology
4. GCOE Program at Tokyo Medical and Dental University

Introduction: The glue secreted by marine mussels bind strongly to virtually all inorganic and organic surfaces in aqueous environments, where conventional adhesives perform poorly. Kakeno et al. has applied the properties of mussel adhesive in synthetic mimics from plant-derived sources as 3,4-dihydroxycinnamic acid (caffeic acid; DHCA) and 4-hydroxycinnamic acid (p-coumaric acid; 4HCA) to synthesize poly-(DHCA-co-4HCA) by transesterification technique (*Polymer Journal*, 2011). This novel copolymer was found to show strong adhesive characteristics, which were equivalent to conventional superglues from petroleum resources. This strong adhesive action was due to interactions between catechol groups present at the end of the polymer terminal chains and the substrate-surfaces. Further development has been made to produce another synthesis from 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid (DHHCA) and 3-(3-Hydroxyphenyl)propionic acid (3HPPA), poly-(DHHCA-co-3HPPA) (Figure 1). In this preliminary study, we report the adhesion principle of novel plant-derived adhesives and their adhesive characteristics. **Materials and Methods:** Thermoplastic poly-(DHCA-co-4HCA) and poly(DHHCA-co-3HPPA) adhesive was placed between substrates (glass, carbon and steel) for the shear adhesion test. The bonding samples were held by two fixtures near the midpoint of the sample and pulled in opposite directions. The force and the displacement of the fixture were simultaneously monitored, and the stress was defined as the force divided by the bonding area. Conventional super glue and epoxy resin served as controls. Disk-specimens of poly-(DHHCA-co-3HPPA) (5mm in diameter x 2mm in thickness) were prepared for water solubility test and were immersed in distilled water at 37 °C. At 1, 3, 6, 24, 48 and 72 hour(s) of immersion, dissolved compositions was analysed by means of fourier-transform ion cyclotron resonance-mass spectrometer (FTICR-MS). **Results and Discussion:** The result of shear adhesion test is shown in Figure 2. The shear stress of poly-(DHHCA-co-3HPPA) was higher than that of poly-(DHCA-co-4HCA), which surpassed that of epoxy resin when bonded on carbon and steel. The release of oligomeric polymers was detected for the first 24 hours; however, such a release was not observed at 72 hours. Plant-derived adhesives have their potential to inspire a novel adhesion system in dental and biomedical technology. This study was supported by New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) of Japan.

Figure 1

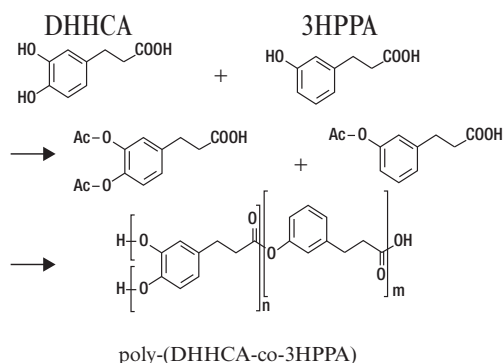
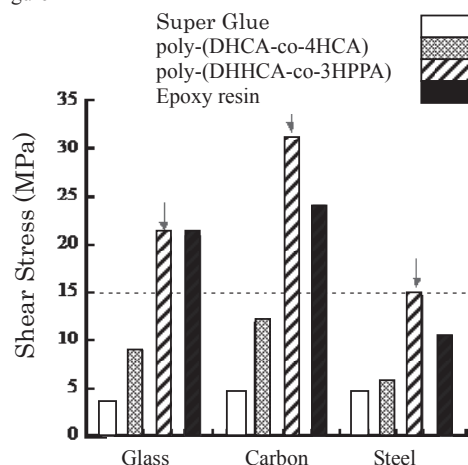


Figure 2



Effects of Dentin Phosphophoryn on Odontoblast Differentiation *In Vitro*

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

○Mohammad Ali Akbor Polan, Jia Tang, Keisuke Handa, Keijiro Hayashi, Toshiyuki Koike
and Takashi Saito

Purpose: The ultimate target of vital pulp therapy is to rapidly regenerate dentin of excellent quality by using an external agent that possesses novel properties such as biocompatibility and bioactivity. Dentin phosphophoryn (DPP), a member of small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLING) family, is the most abundant of the non-collagenous polyanionic proteins in dentin. It is known to induce hydroxyapatite formation *in vitro* and reparative dentin formation *in vivo*. The purpose of this study was to examine the effects of DPP on differentiation and mineralization of odontoblasts *in vitro* and hard tissue formation *in vivo*.

Materials and Methods: Mouse Dental Papilla Cells-23 (MDPC-23) cell line, which had been provided by Professor Nör in University of Michigan, was used in this study. The cells were cultured with DMEM supplemented with 10% FBS containing DPP at different concentrations (0, 0.1, 1, and 10 µg/ml). After that, cell- morphology and proliferation were evaluated. Furthermore, cells were analyzed for mRNA expressions of Type-I collagen, DSPP, BSP, OCN, OPN, ALP and Osteorix by conventional RT-PCR and real-time PCR. Moreover, ALPase activity was analyzed by using the Lab Assay ALP (Wako). Alizarin Red staining was performed for confirmation of mineralization induced by DPP. The number of mineralized nodules stained by Alizarin Red was counted by Image-J (NIH).

Results and Discussion: In results, it was evaluated that addition of DPP did not effect on cell- proliferation or changing cell- morphology after 1, 3 and 5 days of incubation with DPP. The mRNA expressions of DSPP, ALP and Osteorix in MDPC-23 cells were promoted by 1 µg/ml and 10 µg/ml of DPP compared to control at 3 days. The high ALPase activity in MDPC-23 cells was induced by 1 µg/ml and 10 µg/ml of DPP at 3 days. The number of mineralized nodules was higher in case of addition of 1 µg/ml and 10 µg/ml of DPP at 5 days. Previously, we reported that DPP promotes cell migration *in vitro*. Therefore, it is suggested that DPP promotes migration, differentiation and mineralization of odontoblasts, but proliferation.

Conclusion: The findings in this study suggested that DPP promotes the differentiation and mineralization of odontoblasts *in vitro*. (This study was supported by a grant-in-aid for scientific research (B) (23390436) from the Japanese Society for the Promotion of Science.)

Induction of Mineralization by Spheroid Cultured-Dental Pulp Stem Cells

○KAWASHIMA Nobuyuki^{1*}, YAMAMOTO Mioko¹, SAITO Masahiro², TAKIMOTO Koyo^{1,3},
ZHOU Mengyu^{1,3}, KOIZUMI Yu¹, SUZUKI Noriyuki¹ and SUDA Hideaki^{1,3}

¹*Pulp Biology and Endodontics, ³GCOE program*

Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

²*Tokyo University of Science, Tokyo, Japan*

I. Object: The dental pulp tissue, which is the neural crest-derived ectomesenchymal tissue and composed of odontoblasts, dental pulp fibroblasts, and other immunological, vascular and neural components, contains stem cell populations. After isolation of dental pulp stem cells, various methods were applied to induce their differentiation. Here, we report that 3-D spheroid culture with osteoblast-differentiation medium effectively induced mineralization by the dental pulp stem cells.

II. Materials & Methods: This study was approved by the Ethics Board and Animal Use Committee of Tokyo Medical and Dental University. Dental pulp tissues were obtained from impacted human third molars (n=12, 20-40 years old). Separated cells from the dental pulp tissues and also the mouse dental papilla strain cells (MDPs) that were clonal mouse dental papilla cells, were cultured in α MEM containing 10% FBS for further analyses. These cells were cultured in the 96 well PrimeSurface plate (Sumilon; 3-D spheroid culture) at a concentration of 3×10^4 cells/well for 5 days with normal or osteoblast-differentiation medium: ascorbic acid (0.2mM), beta-glycerophosphate (2mM), and dexamethasone (10^{-8} M). Human recombinant BMP2 (R&D systems, 100ng/ml) was optionally added to the culture medium. Osteoblastic- and odontoblastic-gene expression was determined by real-time PCR using specific primers, and mineralized nodules were detected by Alizarin red S staining.

III. Results: 3-D spheroid culture induced a higher expression of osteoblastic- and odontoblastic- markers both in human dental pulp stem cells and MDPs. 3-D spheroid culture of human dental pulp stem cells and MDPs with osteoblast-differentiation medium induced mineralized nodule formation, which was further enhanced in the presence of BMP2. However, 3-D spheroid culture with normal medium for 5 days failed to induce mineralized nodule formation.

IV. Conclusion: Mineralization was induced by 3-D spheroid culture with the osteoblast-differentiation medium in dental pulp stem cells.

Nobuyuki Kawashima

Pulp Biology and Endodontics, Department of Oral Health Sciences,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
1-5-45 Yushima Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549 Japan
E-mail: kawashima.n.endo@tmd.ac.jp

Effect of Degraded Dentin Matrix Proteins induced by Matrix Metalloproteinase Molecules on Pulp Cells Function

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Yusuke TAKAHASHI, Motoki OKAMOTO, Seisuke YOSHIOKA, Mikako HAYASHI

【Objectives】

Extra cellular matrix (ECM) has been reported to be degraded by some kinds of enzymes or acids and degraded ECM might have promoting effects on cell functions in some organs. Dentin matrix proteins (DMPs) can be also degraded by acids produced by caries associated bacteria or intrinsic proteinases. Such degraded DMPs potentially have positive effects on the healing process of dentin-pulp complex. We reported the effects of degraded DMPs induced by acids on proliferation, chemotactic activity and mineralization of pulp cells. In the present study, we investigated the effects of degraded DMPs induced by intrinsic matrix metalloproteinase (MMP) molecule on pulp cell function.

【Methods】

1. SDS-PAGE

Human DMPs were treated by recombinant human MMP molecule at 37°C for 24 hours. The profile of degraded DMPs was evaluated using SDS-PAGE. Intact DMPs were served as control.

2. Effect of degraded DMPs on pulp cell proliferation

After pre-incubation of odontoblast-like cells KN-3 in alpha-MEM supplemented with 10% FBS, 0.01 to 1 µg/ml of degraded DMPs were added in the media. WST-1 assay was performed after 24 hours incubation to evaluate the cell proliferation.

3. Effect of degraded DMPs on pulp cell differentiation

After KN-3 was incubated with 0.01 to 1 µg/ml degraded DMPs containing 50 µg/ml ascorbic acid and 10 mM beta-glycerophosphate up to 7 days, the differentiation of the cells was evaluated by measurement of ALP activity.

【Results】

1. MMP1 breakdown products showed a visible change in the protein profile compared to undegraded DMPs by SDS-PAGE.

2. Degraded DMPs induced significantly higher proliferation to odontoblast-like cells compared with control ($p < 0.05$, Mann Whitney U test)

3. ALP activity was significantly enhanced by degraded DMPs than that of control ($p < 0.05$)

【Conclusions】

DMPs can be degraded by MMP molecule and degraded DMPs may enhance the proliferation and the mineralization of the odontoblast-like cells.

We are planning to investigate the other MMP molecules which one is the most effective on pulp repair. Furthermore, more detailed proteomic analysis will help us to elucidate the critical protein for the regeneration of dentin-pulp complex.

This study was supported in part of JSPS KAKENHI Grant No. 24390425, 24792021, 23792170.

Innate Immune Response Contribute to the Dental Pulp Tissue Regeneration

○N. Mutoh, N. Tani-Ishii

Department of Endodontics, Kanagawa Dental College, Yokosuka, Japan

Aims.

Toll-like receptors (TLRs) are important factors in innate immune responses because they mediate signals from bacterial cell wall components during inflammatory reactions. However, the roles of TLRs in dental pulp, which is bounded by hard tissues, are little understood. The present study investigated TLRs expression cells in inflamed pulp to elucidate the dental pulp tissue regenerative mechanism.

Methods.

Twenty-four 7-week-old female BALB/c mouse were used in this study. Experimental pulpitis was induced by oral microorganism infection. The expression of TLR-2 and TLR-4 in pulpitis was investigated by immunohistochemistry used with cryo- frozen sections. Experimental teeth were obtained on days 1, 3, 5, 7, 14, and 21 after pulp exposure. TLR-2, TLR-4 and Nestin positive cells (odontoblast) were investigated with immunohistochemistry.

Results.

Odontoblasts show pseudo-stratified features in root pulp. The pulp chamber is accumulated by inflammatory cells, including polymorphonuclear cells and macrophages. Numerous capillaries could be observed along the apical side of the root canal pulp. polymorphonuclear cells and macrophages also infiltrate around the capillaries in the periapex.

TLR-4-positive cells in sections of a whole tooth and the periapex at 1, 5 and 7 days after cavity preparation.

TLR-2,4-immunoreactive cells gathered mainly in the periapical tissue. The principal cells expressing TLR-2 and TLR-4 were osteoblasts, osteoclasts and polymorphonuclear cells. Numerous polymorphonuclear cells and macrophages infiltrated in pulp exposure are on day 1, and TLR-4 positive cells presented in periapical tissue and alveolar bone marrow until 7 days. The healing response of pulp tissue was observed by the regeneration of the odontoblast layer and TLR-4 positive cells under pulp exposure area on days 21.

Conclusions.

These results suggested that dental pulp tissue and dentin regeneration to pulp infection relate to the possible role of TLR-4 presenting cells in dental pulp and alveolar bone marrow.

Calcium silicate based cement: physical properties, biocompatibility, mineralization effect

○Yun-Chan Hwang

Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Chonnam National University, Gwangju, Korea

I. Object: Mineral trioxide aggregate (MTA) is a root end filling material and also used in wide area in endodontics such as pulp capping, perforation repair, apexification, since 1995. MTA has good sealing ability, superior biocompatibility, and superior antimicrobial activity. However, it is expensive, has a delayed setting time, and cause a discoloration. Recently, calcium silicate based cement was developed such as Bioaggregate and Biodentin. In this study, properties of calcium silicate based cement were investigated.

II. Materials & Methods: Setting time and compressive strength test was performed for the physical property. Biocompatibility was tested using XTT assay. Mineralization effect was tested using PCR and Alizarin red staining.

III. Results: Bioaggregate shows a good biocompatibility. Biodentin shows a fast setting time. Bioaggregate and Biodentin show a proper compressive strength and moderate mineralization effect.

IV. Conclusion: Calcium silicate based cement might be a possible substitute for MTA in clinical usage after further testing.

Yun-Chan Hwang

Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Chonnam National University
Yongbong-ro 33, Bukgu, Gwangju, Korea, 500-757
ychwang@chonnam.ac.kr

**Effect of ultrasonic irrigation with citric acid
on removing calcium hydroxide and apical seal.**

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

○Taro Washizu, Tsutomu Sugaya, Masamitsu Kawanami

【Introduction】

Calcium hydroxide (Ca(OH₂)) has been generally used for root canal dressing, but remnants of it will lead to the degradation of the sealing ability of an adhesive resin-based-sealer.

We reported the most effective removing method of Ca(OH₂) from root canal and sealing with 4-META/MMA-TBB resin sealer (SBS) at 136th JSCD meeting (Ginowan). The method is the combination of 60s irrigation with 10% citric acid and 3% ferric chloride compound solution and 30s irrigation with 10% sodium hypochlorite solution.

The aim of this study was to evaluate the efficacy of our method on removing Ca(OH₂) and root canal sealing, with new root canal models with narrow mechanically inaccessible groove by root canal instrument.

【Materials and Methods】

Extracted bovine roots were used in this study. Root canal patency was verified by placing #80 K-File through the apical foramen. The working length established by subtracting 1mm from this length. Each root was split longitudinally into halves. Two grooves 300 μm in width were made in the apical part of the root canal dentin of the halves. After these preparations, those were reconstituted and fixed. The reassembled root canal were filled with Ca(OH₂), stored for 1 week at 37°C in 100% humidity. After storing, we irrigated root canal with ultrasonic file #50: (1) Group W: irrigating with distilled water for 60s (2) Group G+N: irrigating with 10% citric acid and 3% ferric chloride for 60s and 10% sodium hypochlorite for 30s. (3) Group C: no root canal dressing, no irrigation. Root canals were filled with single gutta-percha point and SBS. Dye penetration distances were measured from apical foramen using 0.5% solution of basic fuchsin. Adhesive interface was observed by SEM.

【Results】

Dye penetration from apical foramen of group G+N ($394.8 \pm 141.7 \mu\text{m}$) was significantly less than that of group W ($2578.4 \pm 782.2 \mu\text{m}$) and was not significantly different from group C ($369.4 \pm 110.3 \mu\text{m}$). Hybrid layer and resin tags were observed at adhesive interface by SEM.

【Discussion】

The results show that the ultrasonic irrigation with Group G+N may be effective on removing Ca(OH)₂ from the root canal and sealing of an apical foramen with the narrow groove difficult to access mechanically by root canal instruments such as irrigators or files.

However, over demineralization dentin reduced durability of adhesion, further consideration will be needed.

【Conclusion】

The results suggested that combination of 10% citric acid and 3% ferric chloride for 60s and 10% sodium hypochlorite for 30s is also the most effective on removing Ca(OH₂) from root canal and apical sealing with 4-META/MMA-TBB resin sealer with new root canal model.

Long-Term Outcome of Endodontic Microsurgery

Minju Song, ○Euseong Kim*

Microscope Center, Department of Conservative Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea

I. Object:

The purpose of this study was to evaluate the outcomes, up to 10 years, of the cases that were classified as successes in the previous study.

II. Materials & Methods:

The 172 cases that were considered to have successful outcomes in the previous study were included. Patients were followed up every 6 months for 2 years and every year up to 10 years. On every follow-up visit, clinical and radiographic evaluations were performed according to same criteria as in the original study by the same two examiners.

III. Results:

A follow-up rate of 60.5% (104 of 172 cases) was obtained. Of the 104 followed-up cases, 97 cases were included in the successful group: 91 with complete healing and 6 with incomplete healing. The overall maintained success rate was 93.3%. The failure group, which meant a reversal to disease, included 7 cases with unsatisfactory healing.

IV. Conclusion:

In this study, 93.3% of endodontic microsurgery cases that were considered healed in a prior 5-year study, remained healed after more than 6 years.

Euseong Kim

Microscope Center, Department of Conservative Dentistry,
Yonsei University
50 Yonsei-ro, Seodaemun-gu, Seoul
120-752, Korea
andyendo@yuhs.ac

Sphingosine-1-phosphate activates the canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway and induces osteoblast differentiation

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

○Etsuko Matsuzaki, Shunji Hiratsuka, Takafumi Hamachi, Mari Kobayashi,
Yoko Hashimoto, Katsumasa Higashi, and Katsumasa Maeda

I. Objectives

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is well known for the signaling sphingolipid and the bioactive lipid mediator that impacts migration, proliferation, and survival in diverse cell types. Most of the biological effects of S1P are mediated by PI3K/Akt/GSK-3 β signaling through the cell surface G-protein-coupled S1P receptors. Recently, it has been reported that S1P stimulates osteoblast migration and survival. Furthermore, S1P has been shown to inhibit osteoclast differentiation and bone resorption. However, the effects of S1P on osteoblast differentiation and bone formation are still unknown.

In this study, we investigated the effect of S1P on osteoblast differentiation. We particularly paid attention to the possible involvement of the Wnt/ β -catenin signaling pathway because this signaling pathway plays a major role in bone metabolism by controlling differentiation of osteoblast and osteoclast.

II. Materials & Methods

SaOS-2, MC3T3-E1 cells, osteoblast-like cell lines, were used for this study. mRNA levels were determined by real-time quantitative RT-PCR. Protein levels were analyzed by western blotting and ELISA. To examine the effect of S1P on the Wnt/ β -catenin signaling pathway, immunofluorescence staining and reporter gene assay were carried out. The effect of S1P on osteoblast differentiation was monitored by alkaline phosphatase (ALP) activity. Alizarin red S staining was performed to detect osteoblast-mediated mineralization.

III. Results

Because S1P has been shown to activate the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) signaling pathway, we first examined the effects of S1P on this signaling pathway. S1P activated Akt, and inhibited GSK-3 β , suggesting that S1P activated the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway in osteoblast-like cells.

Next, we investigated the effect of S1P on the Wnt/ β -catenin signaling pathway. This signaling pathway is activated by the inhibition of GSK-3 β and the subsequent translocation of β -catenin into the nucleus. S1P increased not only nuclear localization of β -catenin, but TCF transcriptional activity. Furthermore, S1P increased osteoprotegerin (OPG) and c-Myc expressions in osteoblast-like cells, which are the target genes of the Wnt/ β -catenin signaling pathway. These results indicated that S1P activated this signaling pathway.

In addition, S1P increased ALP activity and induced the osteoblast-mediated mineralization.

IV. Conclusion

These results suggest that S1P activates the PI3K/Akt/GSK-3 β , and Wnt/ β -catenin signaling pathway. As a result, S1P induces osteoblast differentiation.

The mechanism of S1P and Wnt interaction shown here also highlights the possibility of exploring new therapeutic agent to treat bone diseases such as periodontitis.

レジンコーティング後の象牙質透過性の経時的変化

¹東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯制御学分野 ²東京医科歯科大学 歯と骨の COE 拠点
○喬 華^{1, 2}、高橋礼奈¹、中嶋省志¹、二階堂 徹¹、田上順次^{1, 2}

Change of dentin permeability in different storage media after resin coating

¹Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

²Global COE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases,
Tokyo Medical and Dental University

○QIAO Hua^{1, 2}, TAKAHASHI Rena¹, NAKASHIMA Syozi¹, NIKAIIDO Toru¹, TAGAMI Junji^{1, 2}

[Background and Objectives]

Exposure of the dentinal tubules is inevitable during cavity or crown preparations. Once the tubules are opened, they act as channels that transmit mechanical, chemical, and bacterial stimuli to the pulp, causing tooth sensitivity and pulpal inflammation. Therefore, optimal sealing of the prepared dentin is important for protecting the pulp tissue. The barrier-like film layer created by the resin-based adhesive system, so called “resin coating technique”, has the potential to minimize pulpal irritation and postoperative sensitivity. On the other hand, the selection of the storage media for the specimens may influence the dentin permeability in the *in vitro* study. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the effects of the resin coating strategy and the storage media on change of dentin permeability.

[Materials and Methods]

Thirty-six bovine incisors were used in this study. Dentin disk specimens were prepared using a slow-speed diamond saw (Isomet, Buehler) under water cooling. The surface of the disk was ground flat with #600-grit SiC papers to standardize the smear layer. The smear layer was then removed by ultrasonic agitation for 3 min. Subsequently, dentin permeability was measured using a fluid filtration system working under liquid pressure of 6.9 KPa (70.3 cm H₂O). The dentin disks were then divided into the following three groups: dentin surface was left uncoated (control), coated with an adhesive (Clearfil SE Bond, Kuraray Noritake Dental) (SE), and coated with a combination of an adhesive (SE) and a flowable composite (Clearfil Protect Liner F, Kuraray Noritake Dental) (SE+PLF). Furthermore, the specimens were divided into two sub-groups according to the storage media: deionized water (Milli-Q water) and artificial saliva (CaCl₂: 1.0 mM, KH₂PO₄: 3.0 mM, NaN₃: 3.08 mM, NaCl: 100 mM, pH6.5). Dentin permeability of each specimen was measured after the immersion periods of 1 day and 1 month for the control groups. The reduction rates of dentin permeability were calculated in percentage for the resin coating groups.

[Results]

In the control groups, the dentin permeability of the specimens stored in artificial saliva was significantly reduced after 1 month ($p < 0.05$), while the dentin permeability of the specimens stored in deionized water was unstable. The resin coating groups of SE and SE+PLF had a significant effect on the reduction of dentin permeability in both deionized water and artificial saliva for each storage period ($p < 0.05$). However, the reduction rates of dentin permeability tended to decrease over storage time.

[Conclusions]

The resin coating technique had the prominent advantage in decrease of dentin permeability. In addition, storage in the media had a significant effect on the dentin permeability.

支台築造法の違いが歯冠修復失活歯内部の応力分布に及ぼす影響

¹ 東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野

² 東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 部分床義歯補綴学分野

³ 歯と骨の GCOE

○貝ノ瀬公典¹ 中島正俊¹ 若林則幸² 田上順次^{1,3}

The influence of post-and-core materials and dimensions on stress distribution of crown restored tooth

¹ Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

² Removable Partial Prosthodontics, Tokyo Medical and Dental University

³ Global COE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone diseases

○Kimisuke Kainose¹, Masatoshi Nakajima¹, Noriyuki Wakabayashi², Junji Tagami^{1,3}

【目的】

根管治療を行った失活歯に見られる歯根破折などのトラブルは、支台築造方法の種類および歯質との接着強度に密接に関係すると考えられる。演者らは、代表的な支台築造法であるメタルコアとファイバーポストを用いたレジンコアで修復した歯根内部の応力分布を、完全接着を想定した力学モデルにより分析した。本研究の目的は、歯根、コア材料、さらに両者の接着界面に生じるそれぞれの最大応力を基に、支台築造歯の破損リスクの評価を行うことである。

【方法】

根管治療後の第一小臼歯歯根、歯根膜、歯槽骨、根管充填材、ポストコアおよびセラミッククラウンからなる三次元ポリウムを製作した。各部は接着していると仮定し、各部の弾性係数とポアソン比は報告されている実験値を引用した。ポストと築造体は鋳造によるメタルコア、またはファイバーポストとコンポジットレジンによるレジンコアを用いた。歯根の長さは 15mm、フェルールはなし、歯冠の長さは 6mm, 7mm, 8mm, ポストの長さは 4mm, 6mm, 8mm, 10mm の計 24 種類のモデルを構築した。各モデルを六面体要素により分割し、収束試験で安定性が確認された節点数約 140000、要素数約 100000 で解析を行った。骨の底面を固定し、歯軸方向から頰側に 30°傾斜した 400N の荷重をクラウン頰側咬頭頂に負荷し、ポストコア内部の主応力、歯根のミーゼス応力、および歯根とポストコアの接着界面における剪断応力を算出した。また、それぞれの最大応力を各部の曲げ強さで除し、各部の破損リスクとした。

【結果】

- 1) ポストコア：ポストコア自体の破折を生じるコア内部の最大応力は、メタルコアでは主にポスト中央、レジンコアでは主に歯頸部近くの築造部に集中した。最大応力はメタルコアがレジンコアより大きく歯冠が長いほど増加したが、ポストの長さには関係なくコア破折のリスクはレジンコアの方が大きくなった。
- 2) 歯根：歯根破折を引き起こす歯根内部の最大応力は、いずれの材料でもポスト先端部に接する歯根内面に見られた。ポスト長が 8mm 以上であればメタルコアとレジンコアの歯根破折のリスクは同等であったが、ポストが短いほどメタルコアの最大応力は大きくなり、6mm 以下ではメタルコアが顕著にレジンコアより大きな破折リスクを示した。
- 3) 接着界面：コアの剥離と脱落を示唆する界面の剪断応力は、レジンコアで荷重側と反対側の歯頸部近くに見られ、ポスト長には影響されなかったが、歯冠が長いほど大きかった。メタルコアではポスト先端部とポストの基部の 2 か所に集中し、前者ではポスト長が短くなるにしたがい顕著に大きくなり、後者ではポスト長にはほとんど影響されなかった。

【考察と結論】

本研究の解析モデルでは、歯質とコアが完全に接着していることを想定し各部の応力を算出した。この条件下では、ポストコアの破折リスクはポスト長に関係なく、レジンコアの歯頸部において大きいことが確認された。一方、歯根破折のリスクはポストが十分に長ければ、レジンコアとメタルコアは同等であるものの、ポスト長が短くなるにしたがい、メタルコアの方が大きくなった。またメタルコアは、レジンコアより接着界面に生じる剪断応力が顕著に高く、これにはポスト長による影響が強く現れ、短いポストでは特にポスト基部とポスト先端部で高い剪断応力が確認され、接着の剥離するリスクが高くなると考えられる。このため、歯根や材料が破折するリスクと併せ、これらの微小領域で接着が剥離した後に生じる新たな応力分布を考慮して、歯根破折のリスクを評価すべきであることが示唆された。今後、非線形解析を用いて各部の接着界面が破壊された場合における歯根破折のリスクを検討する必要がある。

被根管処置レジンコアシステム併用コンポジットレジン 2 級直接修復における 窩洞内象牙質窩壁の接着信頼性に及ぼす繰り返し動的荷重の影響

日本歯科大学 生命歯学部 歯科保存学講座¹ 接着歯科学講座²
○小川信太郎^{1,2}, 勝海一郎¹, 柵木寿男², 奈良陽一郎²

Effect of dynamic cyclic load on bonding reliability of intra-cavity dentin wall of endodontically treated class 2 direct resin composite restoration with resin core system

¹Department of Endodontics, ² Department of Adhesive Dentistry,
School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

○OGAWA Shintaro^{1,2}, KATSUUMI Ichiroh¹, MASEKI Toshio², NARA Yoichiro²

【目的】 近年、根管処置歯への修復に際し、レジンコアシステム併用によるコンポジットレジン直接修復は、患者・術者が共に願う歯質補強と歯質保存とを両立させる低侵襲性審美修復として臨床応用されている。この様な症例では、C-factor による影響が推察でき、窩洞内壁の接着実態やその信頼性について事前に把握理解して施術に臨むことが大切である。そこで本研究では、被根管処置歯髓床底を窩底とするレジンコアシステム併用 2 級 MO 直接修復を想定し、窩洞内象牙質窩壁の接着信頼性に及ぼす繰り返し動的荷重の影響を明らかにすることを目的に評価検討を行った。

【材料および方法】 被験歯には、本学部研究倫理委員会の承認を得てヒト抜去健全下顎第一大臼歯 60 本を用いた。はじめに、被験歯に対し透明レジンによる咬合面再現用コアの作製を行った後、通法に従い髓腔開拓、根管充填を行った。湿ボックス 24 時間保管後、被験歯の近心頬・舌側咬頭頂と遠心頬側咬頭頂とによって決定される平面が植立用規格化円筒モールド底面と平行になるよう被験歯を植立した。ついで規格化窩洞形成器と基準窩洞模型の併用により、Fig.1 に示す髓床底を窩底とする規格化 2 級窩洞を形成した。その後、2 種レジンコアシステム、すなわち Clearfil DC Bond と Clearfil DC Core Automix (以後 DC, Kuraray Noritake Dental)、ならびに Clearfil Bond SE ONE と Clearfil DC Core Automix ONE (以後 SE, Kuraray Noritake Dental) を用いて製造者指定の歯面処理、髓腔内窩底部から 5 mm 上縁までのコア材一層塗布を経た 2 層の分割充填を行った。そして咬合面再現用コア併用の Clearfil AP-X (Kuraray Noritake Dental) による 2 層の分割充填を施した。試料は湿ボックス 24 時間保管後に形態修正・研磨を行い、動的荷重負荷(S+)群と非負荷(S-)群に区分し、S+群に対しては複合機能試験機を用いて 37°C 水中、16kgf × 30 万回(90 回/分)の繰り返し動的荷重を負荷した。その後、両試料群から、歯肉側象牙質(G 壁)、髓床底象牙質(P 壁)、歯冠部軸側象牙質(CA 壁)、髓腔部軸側象牙質(PA 壁)における断面 1.0×1.0mm の角柱状試料(n=15)を切り出し調整後、微小引張接着強さ(μ-TBS)値を測定し、平均値の差の検定の後に、メジアンランク法によるワイブル分析によって接着信頼性の評価を行った。

【成績ならびに考察】 G 壁/P 壁/CA 壁/PA 壁における μ-TBS 値(MPa (s.d.)) は、DC では S- : 16.8(5.2)/11.4(7.7)/7.0(4.5)/10.1(5.7), S+ : 14.5(4.9)/6.3(4.6)/5.2(3.5)/9.4(4.7)、一方、SE では S- : 24.3(6.1) /16.2(5.5) /14.7(6.8) /13.3(6.7), S+ : 20.4(4.6) /8.3(5.1)/11.7(4.7)/12.9(6.0) であった。分析の結果、G 壁値はレジンコアシステムの違いならびに動的荷重の有無にかかわらず、他の窩壁値より有意に大きな値を示した。また、動的荷重の負荷は、レジンコアシステムの違いにかかわらず、P 壁値のみを有意に減弱させた。Fig.2 に、2 種レジンコアシステムの S-/S+条件下における各窩壁の μ-TBS 値に対する累積破壊確率に関するグラフを示す。G 壁/P 壁/CA 壁/PA 壁に対する μ-TBS 値に基づくワイブル係数(m 値)は、DC では S- : 2.94/1.68/1.47/1.58, S+ : 2.77/1.62/1.61/1.84、一方、SE では S- : 4.22/3.15/2.39/1.93, S+ : 4.76/1.74/2.71/2.17 であった。分析の結果、両レジンコアシステムの G 壁 m 値は、動的荷重の有無にかかわらず、他の窩壁値より有意に大きく、窩壁固有の接着強さ獲得に際し信頼性に優れることが判明した。これは、歯軸に垂直かつ P 壁より咬合面側にある G 壁が、歯軸に平行な CA 壁 / PA 壁より歯面処理時の乾燥状態や照射による重合の確実さに長け、さらに象牙質の成熟度、細管走向などに起因すると考えられる。また、動的荷重の負荷は、SE の P 壁 m 値のみを有意に減弱させた。これは、他の窩壁条件下では良好な接着信頼性が得られていないことに加え、S-条件下で優れた P 壁の接着信頼性が獲得できている SE であっても、動的荷重の負荷によって、髓床底近接の根管充填材の存在がグリフィスクラックのように働き、信頼性の低減に至ることが考えられた。以上から、接着信頼性の向上には、レジンコアシステムの改善に加え、術者によるレジン重合収縮への配慮、歯面処理時のエアブロー法、照射方法などに注意を払い、システム性能を最大限に引き出す対応が重要である。本研究は学術研究助成基金助成金(課題番号 23592815)の一部支援を受けた。

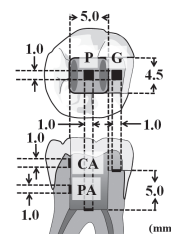


Fig. 1 Dimension of standardized core cavity and μ-TBS measuring area

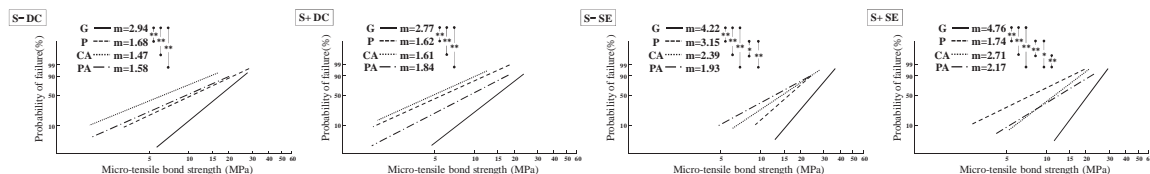


Fig. 2 Difference in the Probability of failure against μ-TBS among four dentin walls

フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントに関する基礎的研究(第1報)

—フッ化ナトリウム配合量が反応生成物に及ぼす影響について—

日本大学歯学部歯科保存学第II講座¹, 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門²,
米国国立標準技術院パッフェンバーガー研究所³

○尾形英大¹, 林 誠^{1,2}, 高木章三³, Laurence C.CHOW³, 小森規雄^{1,2}, 小木曾文内^{1,2}

Fundamental study of Fluorapatite-forming Calcium Phosphate Cements

-Effect of the amount of sodium fluoride on fluorapatite-forming reaction-

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

○Hidehiro OGATA¹, Makoto HAYASHI^{1,2}, Shozo TAKAGI³, Laurence C.CHOW³,
Norio KOMORI^{1,2}, Bunnai OGISO^{1,2}

【研究目的】

近年、リン酸カルシウムセメントを主成分とした多種の骨補填材が臨床に広く使用されている。これらのなかに1985年にBrownとChowによって開発されたCalcium Phosphate Cement (CPC)がある。このセメントは、Dicalcium Phosphate Anhydrous (CaHPO₄:DCPA)とTetracalcium Phosphate (Ca₄(PO₄)₂O:TTCP)の等モル比からなり、水分の介在により硬化し最終産物がHydroxyapatite (HA)になることで知られている。一方、フッ化物(F)の存在するHAは骨構造を強化するとの報告がある。このことから、演者らはフルオロアパタイト(FA)置換型CPC(FA-forming CPC)を試作し、物理学的特性を第135回秋季保存学会で報告した。そこで本研究では、FA-forming CPCのフッ化ナトリウム配合量が反応生成物に及ぼす影響について検討を行った。

【材料および方法】

CPC粉末にフッ化ナトリウム配合量を各5段階(F/Ca=0(control)、0.05、0.1、0.2(FAの化学量論比)、0.4)に変化させたセメントを試作し、0.5Mのリン酸溶液を用いてP/L=2.5になるように混和した。その後、ステンレスの型(直径6mm、厚さ3mm)に充填し、2枚のフリットガラス版で挟み、37°C、湿度100%の環境下のインキュベータ内で4時間保管した。セメント硬化後、試料をステンレス型から外し、同様の環境下でPhysiologic-like solution(PLS)(1.15M CaCl₂、133mM NaCl、1.2mM KH₂PO₄、50mM HEPES、pH=7.4)(10mL/disc)に20時間浸漬した。PLSに溶出した未反応F量とCaF₂のF量はHClO₄を用いて、反応生成物であるCaF₂のF量は1M KOHを用いて、同じく反応生成物であるFA量は最終的に試料に残っているF量より定量した。測定結果はt-testを用いて、P<0.05にて統計処理を行った。

【成績】

フッ化ナトリウム配合量F/Ca=0.05では、反応生成物はFAだけであったが、0.1、0.2および0.4と増加するに従い、PLSに溶出した未反応F量とCaF₂のF量は有意に増加した。また、F/Ca=0.1、0.2および0.4におけるFA量に有意差は認められなかったが、F/Ca=0.05と比較して有意に高い値を示した。

【考察および結論】

以上の結果より、F/Ca \geq 0.1のFA量に有意差が認められなかったことからFAの形成量はすでにプラトーに達していることが考えられた。これは、FAがTTCPの表面を覆ってしまったことにより、TTCPの溶解が抑制され、FやDCPAとの反応が減少し、未反応のF量とCaF₂のF量が増加したものと推察される。今後は骨補填材としての臨床応用することを鑑みて本材の生物学的影響についてもさらに検討を要すると考えられた。

慢性う蝕の進行状態の評価におけるう蝕歯質の硬さ測定の有用性

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)
○岩見行晃, 山本洋子, 林 美加子

Validity of the knoop hardness measurement of carious dentin on the evaluation of carious progress in chronic carious lesions

Department of Restorative Dentistry and Endodontology,
Osaka University Graduate School of Dentistry
○IWAMI Yukiteru, YAMAMOTO Hiroko, HAYASHI Mikako

【目的】

Minimal Intervention の概念に基づいて慢性う蝕病巣に対する処置方針の決定と具体的な処置を行う際、臨床的には病巣内のう蝕の進行状態をう蝕歯質の色や硬さで評価しているが、慢性う蝕病巣におけるう蝕歯質の硬さと病巣内のう蝕の進行状態との関係は、臨床的なう蝕除去中に歯質の硬さを測定することが困難であったことから、必ずしも明確ではない。一方、最近、う蝕硬さ測定器カリオテスター (三栄エムイー) が発売され、口腔内でのう蝕除去中に歯質のヌーブ硬さが簡便に測定できるようになった。また、市販のレーザーう蝕診断器 DIAGNOdent (KaVo) による評価結果は、病巣内の細菌や細菌代謝物からの蛍光強度を数値化しているため、細菌検出率と密接に関連しており^{1,2)}、う蝕の進行状態を数値的に表していると考えられる。

そこで、本研究では、DIAGNOdent による評価結果を Gold Standard として、慢性う蝕病巣におけるう蝕歯質の硬さととの関係を調べ、慢性う蝕病巣でのう蝕の進行状態の評価に対するう蝕歯質の硬さ測定の有用性を検討した。

【材料および方法】

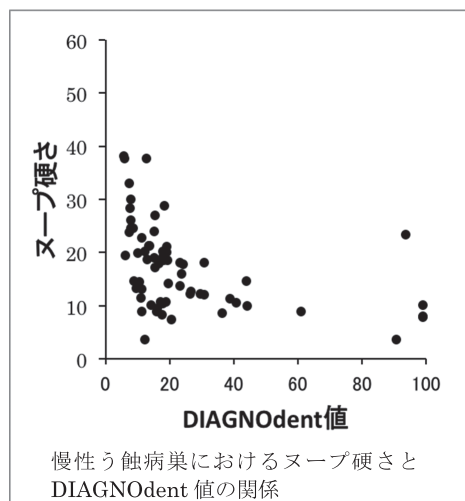
黒色または茶褐色でう蝕検知液 (Caries Detector, クラレメディカル) に不染なう蝕病巣を持つヒト抜去大白歯についてエナメル質う蝕部分を回転研磨器 (EcoMet 3000, Beuhler) で削除し、規格窩洞形成器 (伊藤エンジニアリング) に装着した。その後、象牙質の着色が認められなくなるまで歯髄方向に $150\mu\text{m}$ ほどの象牙質う蝕病巣の削除を繰り返した。この際、歯質削除ごとに、削除面の歯質について、DIAGNOdent による評価とカリオテスターによるヌーブ硬さ測定を行った。

【結果】

慢性う蝕病巣においてう蝕象牙質表層から深部に向かうほど、ヌーブ硬さは大きくなり、DIAGNOdent 値は小さくなる傾向が認められた。また、慢性う蝕病巣におけるう蝕歯質のヌーブ硬さと DIAGNOdent 値の間では、逆数回帰が可能であり、決定係数は 0.399 であった。

【考察および結論】

演者らが第 135 回本学会で報告した急性う蝕病巣におけるう蝕歯質のヌーブ硬さと DIAGNOdent 値との逆数回帰における決定係数 (0.688) と比較して、慢性う蝕病巣における決定係数は小さかった。したがって、慢性う蝕病巣では、急性う蝕病巣と比較してう蝕の進行状態の評価におけるう蝕歯質の硬さ測定の有用性が低いことが示唆された。



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

歯科用エアスケーラーによる根管治療
髄腔開拓から根管形成そして根管洗浄について

日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座

日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

○明石俊和 林 誠 小木曾文内

Sabasonic Vibration for Access Cavity and Root Canal Preparation and Irrigation

Department of Endodontics , Nihon University School of Dentistry

Toshikazu Akashi Makoto Hayashi Bunnai Ogiso

【はじめに】

切削チップを可聴域領域で振動させる方式の切削装置は根管拡大・形成・根管洗浄に使用できる。とくに、可聴域切削チップの種類を目的別に使用することにより根管治療時の各種操作が行なえる。

すなわち、可聴域切削チップは感染歯質、髄腔開拓に始まり側壁や髄角除去、根管口明示、根管形成を行なうことができる。また、可聴域切削チップを注水下で使用することにより可聴域切削チップ振動による攪拌とそれに伴う還流により根管口探索、根管内容物除去、再根管治療時の汚物除去、根管洗浄、拡大形成後の根管清掃に使用できる。そこで可聴域振動装置であるナカニシ社製ティーマックス S970 エアスケーラーに各種可聴域切削チップを装着し、髄腔開拓から根管口明示、根管形成、そして、根管系の洗浄・清掃について検討したので報告する。

【材料及び方法】

ティーマックス S970 エアスケーラーと専用可聴域切削チップ V-S51D, V-S51, V-G71, V-G77 と試作可聴域切削チップ V-NA1, V-NA2, V-NA3, V-NA4 を使用する。

A) ティーマックス S970 による根管形成手順と可聴域切削チップ

- | | |
|---------------------------------------|--------------------------------------|
| 1) 髄室開拓と根管口明示 (V-G71, V-NA1, 2, 3, 4) | 2) ストレートラインアクセスの確保 (V-G77, V-NA3, 4) |
| 3) 作業長の決定 (#10 手用K型ファイル) | 4) 根管のガイドグループ形成 (#10～#20K型ファイル) |
| 5) 根管上部 1/3 の根管形成 (V-S51D, V-NA3) | 6) 根中央部 1/3 の根管形成 (V-S51D) |
| 7) 根尖部 1/3 の根管拡大・形成 (V-S51D) | 8) アピカルシート形成 (#35K型ファイル) |

B) ティーマックス S970 による洗浄と可聴域切削チップ

- | | |
|---|-----------------|
| 1) 髄室の洗浄 (V-G71, V-NA1, 2) | 2) 根管洗浄 (V-S51) |
| 3) 根管壁清掃 (V-G71, V-G77, V-NA1, 2, 3, 4) | |

【結果および考察】

- 1) 髄室開拓、根管口明示が可能、2) 根管口上部 1/3 の根管形成が可能、3) 根中央部 1/3 の根管形成が可能、4) 根尖部 1/3 の根管形成が可能、5) 根管洗浄が可能、

歯科用回転切削による髄腔開拓から根管口明示にいたる操作は過剰な歯質切削や偶発的穿孔の危険があり、細心の注意が必要である。しかし、可聴域切削チップによる歯質切削はヘッド部が小さく患部の視野確保が容易であり、大白歯部の根管治療でも容易に操作することが出来る。すなわち可聴域切削チップを交換すれば感染歯質、髄腔開拓、髄角部、側壁除去、根管口の漏斗状拡大、エンド三角等の除去が行える。また、回転切削より切削効果が劣ることにより過剰切削が予防できる。

回転切削や K 型ファイルによる根管拡大は随時太い拡大用ファイルに取替える必要がある。しかし、可聴域切削チップによる根管形成は咬み込みによる切削ではなく振動による歯質破壊による。そのため可聴域切削チップ交換は必要なく 1 種類 1 本で根管形成が完了する。また、可聴域切削チップ振動時には超音波振動装置では発生するキャビテーションが発生しないが攪拌、還流作用により髄腔、根管の洗浄が可能であった。

【結論】

ティーマックス S970 エアスケーラーと各種可聴域切削チップにより髄腔開拓から根管口明示、そして、根管形成・根管洗浄の操作が可能である。

Er:YAG レーザーコンタクトチップ形状変化に関する研究
第1報 —マイクロCTによる観察—

日本大学歯学部小児歯科学講座¹, 埼玉医科大学総合医療センター歯科口腔外科², 篠木歯科³

○高森一乗¹, 那須大介^{1,2}, 篠木 毅³, 白川哲夫¹

The study of morphological alteration in Er:YAG laser irradiation tip by using Micro CT

Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry¹

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Saitama Medical Center, Saitama Medical University²

Shinoki Dental Clinic³

【目的】

Er:YAG レーザーは歯冠修復, 歯内, 歯周疾患, 外科処置など歯科の多方面で応用されており, 従来の治療法にない効果やその有効性が報告されている。

レーザー照射の効果や効率を考えた場合, 対象組織に合わせた照射条件設定も重要であるが, 被照射体に接するコンタクトチップ(以下チップとする)の先端形状も重要と考えられる。

Er:YAG レーザーのチップは石英またはサファイヤガラスが用いられているが, 使用するにつれ先端形態が変化することが知られており, 硬組織切削用チップにおいてはそれに伴って出力の低下が報告されている¹⁾。

実体顕微鏡はチップ形状の変化を簡易に観察, 把握することは可能だが, 立体的な記録や比較などは困難である。

一方走査電子顕微鏡は詳細な形状把握は可能であるが, 立体形状の比較や観察試料の作成の必要性より形状変化の経時的観察には適さない。

そこで今回我々は, チップ先端形状を立体的に把握し, かつその形状変化を経時的に比較することを目的に, マイクロCTを用いてチップの形状を検討したところ, その有用性が認められたので報告する。

【試料ならびに方法】

測定対象として硬組織切削用に適した形状を持つ未使用ならびに使用済みのチップ C400F ならびに C600F (モリタ) を選択した。

マイクロCTは R_mCT (株式会社リガク) を用い, 管電圧 90kV, 管電流 100, 200 μ A, スライス厚ならびに間隔 0.16, 0.08 mm, 2 分間撮影を行った。撮影された画像は i-VIEW (株式会社モリタ) にて立体構築ならびに解析を行った。

【結果ならびに考察】

未使用チップにおいては, チップ形状がマイクロCTにより精細に描出された。使用済みチップは, 表面が平面的に変化するものばかりではなく, 凹面になる, 辺縁部が欠けるなど, 多様な形状変化が観察された。

以上の結果よりマイクロCTにより Er:YAG レーザーのチップの形状変化が立体かつ経時的に把握出来ることが明らかとなった。今後, チップ形状の変化がレーザーの出力, またその照射プロファイル (照射方向や広がり) にどのような影響を与えるのか検討する予定である。

【会員外共同研究者】

岡上吉秀 (モリタ製作所 第二研究開発部 研究開発グループ)

【文献】

1) Eguro T, Aoki A, Maeda T *et al.*, Lasers Surg and Med 41, 595–604, 2009.

BO 試薬を用いた根管処置の有効性に関する基礎的研究

¹昭和大学歯学部歯科保存学講座歯内治療学部門,

²昭和大学歯学部歯科保存学講座歯科理工学部門

³奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯内療法学分野

○山田嘉重¹, 増田宜子¹, 鈴木重紀¹, 宮崎 隆², 木村裕一³

Basic Research on the effectiveness of root canal treatment by the BO reagent

¹Division of Endodontology, Department of Conservative Dentistry, Showa University School of Dentistry

²Division of Oral Biomaterials and Technology, Department of Conservative Dentistry, Showa University School of Dentistry

³Division of Endodontics, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry

○YAMADA Yoshishige¹, MASUDA Yoshiko¹, SUZUKI Shigenori¹, MIYAZAKI Takashi², KIMURA Yuichi³

【緒言】

根尖性歯周炎の症状改善させるためには根管内に残存している細菌に感染している象牙質や感染源となる物質を機械的・化学的に除去し、根管内を無菌の状態に近づけることが重要である。現在、歯科臨床において根管拡大・形成時に次亜塩素酸ナトリウム製剤や EDTA 製剤の使用が普及している。これらの薬剤は根管治療を遂行する際には有効な薬剤ではあるが、根管拡大・形成においてより安全で補助効果の高いものが望まれる。演者らは第 135 回日本歯科保存学会学術大会において齶蝕象牙質除去剤として試作した BO 試薬が感染根管処置においても有効である可能性を発表した。本研究では、前回得られた結果をさらに詳細に検討し、感染根管処置に BO 試薬が新たな根管治療薬のひとつとなりうるかを評価することを目的とした。

【材料および実験方法】

実験 I として BO 試薬による湾曲根管内の汚染有機質の除去効果を検討した。湾曲を有する 20 本の透明根管模型の根管を K-ファイルにて 35 号まで拡大を行い根管内に人工有機質を添加した。その後 BO 試薬を含むさまざまな薬剤を用いて人工有機質の除去を比較検討した。各グループ 5 本ずつの人工歯において BO 試薬(グループ 1), EDTA 製剤として RC プレップ (グループ 2), 次亜塩素酸ナトリウム製剤として AD ゲル (グループ 3) をそれぞれ根管に塗布した後に K-ファイルを用いて有機質の除去を施行し、グループ 4 は薬液未塗布で除去操作を行った。有機質除去には適宜 3%過酸化水素水で洗浄操作を併用した。その際の有機質除去に要した時間や過酸化水素水を使用した回数などを記録した。実験 II として各種薬剤の根管充填用シーラー除去効果の差異を検討した。透明歯根を有する下顎大臼歯人工歯 12 本の各根管を 40 号まで拡大後、根管充填用シーラーとしてチャンネルを添加後 37°C 恒温器で 1 週間保管した。根管内でチャンネルが硬化した後に各人工歯を 3 本ずつ 4 グループに無作為に選出し分類した。グループ 5 (BO 試薬), グループ 6 (RC プレップ), グループ 7 (AD ゲル) をそれぞれ根管内に塗布後、K-ファイルによる根管拡大を行った。グループ 8 は対照グループとして薬剤無使用下において K-ファイル単独でチャンネルの除去を行いチャンネル除去に要した時間と除去に際して各薬剤の作用における差などについて記録した。実験 III として根管内に存在している細菌に対する BO 試薬の作用を検討した。本研究の使用に同意を得ている急性化膿性根尖性歯周炎に罹患している患者の根管内より滅菌ペーパーポイントを用いて細菌を採取した。グループ 9 は採取後そのまま培養液に浸漬し、グループ 10 は根管内から細菌採取後のペーパーポイントを少量の BO 試薬に短時間浸漬した後に 37°C の恒温器で 1 週間培養して 2 グループ間における細菌の増殖状況を比較・検討した。

【結果】

実験 I の結果として有機質の除去に対して BO 試薬を使用したグループ 1 が最も除去時間が短く、RC プレップ、AD ゲル、未処置の順であった。シーラー除去を検討した実験 II の結果においても BO 試薬使用グループの除去効果は RC プレップ、AD ゲル使用グループに比較して顕著に短い時間で除去が可能であった。一方 RC プレップと AD ゲルに明確な差は認められなかった。根管内に存在する細菌の抗菌効果を検討した実験 III の結果において、グループ 9 の培養液では細菌の顕著な増殖が観察されたのに対して、BO 試薬を浸漬したグループ 10 においては細菌の増殖が抑制されることが確認された。

【考察】

本研究結果より BO 試薬は根管内の有機質や根管充填用シーラーの除去効果が高いことが確認された。また根管内部細菌に対する適度な抗菌効果も認められたことから、BO 試薬は感染根管の根管拡大・形成処置における補助剤として使用できる可能性が示唆された。

MTA 填塞後のコンポジットレジン修復時期について

¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野

²日宇歯科医院

³日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

⁴長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生体材料学分野

○辻本真規,^{1,2} 辻本恭久,³ 白石孝信,⁴ 渡邊郁哉,⁴ 林 善彦¹

Proper timing in composite resin restoration after Mineral Trioxide Aggregate application

¹Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, ²Hiu Dental Clinic Institute ³Department of Endodontics, Nihon Univ. Sch. of Dent. at Matsudo, ⁴Department of Dental and Biomedical Materials Science

○Tsujiimoto Masaki, ^{1,2} Tsujiimoto Yasuhisa, ³ Shiraishi Takanobu, ⁴ Watanabe Ikuya, ⁴ Hayashi Yoshihiko¹

I. 研究目的

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は歯内療法の分野で広く使われているが、MTA 填塞後のコンポジットレジン (CR) 修復時期に関する研究は少ない。Mente らによると、MTA による直接覆髄の予後にもっとも影響を与える因子として最終修復の時期を挙げ、「直接覆髄処置後二日以上経過してからの最終修復」は極力回避するべきだとしている。また、MTA は薬剤の影響で表面性状の変化や微小硬度の変化が起こることも知られている。そこで今回、MTA 填塞後の適切な CR 修復の時期を明らかにするため、SEM 観察およびピッカース微小硬度から検討した。

II : 材料と方法

MTA をメーカーの指示に従い練和し、直径 4mm、高さ 5mm のシリコン製チューブに高さ 3 mm になるように充填した。同様な試料を各グループ (コントロール、グループ 1 ~ 6) 5 個ずつ作製した。コントロール: MTA 填塞後に MTA 上にウエットペレットを置き、厚さ 2mm のルミコンテンポラリーシーラーホワイト (以下ルミコン、Heraeus, Germany) で仮封をし、湿度 100% 中で 21 日間保管。グループ 1: MTA を練和から 10 分後にクリアフィルムジェスティー LV (A3) (クラレノリタケデンタル株式会社) を MTA 上にシリコン製チューブ内で高さ 2mm になるように充填、ペンキュアー照射器 (楸モリタ) で 60 秒間光重合を行った。その後、37°C、相対湿度 100% 中で 21 日間保管した。グループ 2: MTA を練和から 10 分後にクリアフィルムガボンドプライマー (クラレノリタケデンタル株式会社) 及び、クリアフィルムガボンド (クラレノリタケデンタル株式会社) を説明書に従い塗布、乾燥、光重合を行った。続いて、グループ 1 と同様に CR 充填を行い、37°C、相対湿度 100% 中で 21 日間保管した。グループ 3、5 は MTA 填塞後に MTA 上にウエットペレットを置き、厚さ 2mm のルミコンで仮封をし、相対湿度 100% 中で保管した。MTA 填塞から 1 日、7 日後にルミコンを除去し、エアブローで表面の破片を取り除き、グループ 1 と同様に CR 充填を行い、37°C、相対湿度 100% 中で練和から 21 日後まで保管した。グループ 4、6 は MTA 填塞後に MTA 上に水綿球を置き、厚さ 2mm のルミコンで仮封をし、相対湿度 100% 中で保管した。MTA 填塞から 1 日、7 日後にルミコンを除去し、エアブローで表面の破片をエアブローで取り除き、グループ 2 と同様に CR 充填を行い、37°C、湿度 100% 中で練和から 21 日後まで保管した。すべてのグループは MTA 練和から 21 日経過後にチューブから取り出され、エポキシ樹脂 (スペシフィックス 20、ストルアス社、デンマーク) を用いて包埋した。その後、一週間室温で保存し、試料を縦 2 分割になるように Isomet™ (Buehler Ltd, Illinois, USA) で切断し、切断面を耐水研磨紙で研磨し、DW で表面を 1 分間洗浄、水分をキムワイプで除去した。その後、通法により、SEM 観察と CR に近接する MTA 断面のピッカース微小硬度を計測した。

III. 結果

SEM によるギャップの測定でグループ 5 は、他のグループと比較して有意に大きなギャップを示した。また、グループ 3 は、MTA から CR が全て脱離していた。ピッカース微小硬度は MB-群では、1 日後が 10 分後、7 日後、コントロールに比べ有意に低い数値を示した。また、7 日後はコントロールに比べ有意に低い数値を示した。MB+群では、1 日後が 10 分後、7 日後、コントロールに比べ有意に低い数値を示した。

IV. 考察

今回の結果から、10 分後に CR を充填しても MTA 硬化に問題はなく、また、グループ 2 では MB と MTA が混ざった部分が認められたが、ギャップはなく、硬化にも問題を生じてないと考えられることから、MTA 練和から 10 分後の CR 修復が可能であることが示唆された。また、MTA 練和から 1 日後、7 日後では境界部の微小硬度はコントロール群に比べて有意に低い数値を示したため、修復処置時のエアブローによる MTA 表面の水分の蒸発による養生阻害が生じていることが推察され、間隔において CR 修復を行う場合にはこの点を配慮する必要がある。

Mineral Trioxide Aggregate によるマウス iPS 細胞の分化への影響

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野
○吉澤 祐、杉本浩司、石崎秀隆、辻本真規、林 善彦

Mineral Trioxide Aggregate affects differentiation of mouse iPS cells
Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
○Yoshizawa Yu, Sugimoto Kouji, Ishizaki Hidetaka, Tsujimoto Masaki, Hayashi Yoshihiko

I : 研究目的

現在、医科、歯科領域において再生医療に関する様々な基礎研究、臨床応用が行われている。再生療法に用いられる細胞ソースは、以前では主に骨髄から採取される骨髄液より分離された細胞などを用いてきた。しかし従来の細胞ソースでは骨髄液採取の際に大きな侵襲を伴うなど課題も多かった。iPS 細胞はそのような問題を解決し、再生医療の発展に寄与することが期待されている。我々の教室では、骨欠損部に補填する材料に、従来用いられている骨補填剤に代わる新たな生体材料の検討を加えている。今回は、iPS 細胞を細胞ソースとして用いた場合の種々他の要因による影響を検討している。そこで、本研究では歯根端切除術における逆根管充填材、穿孔封鎖材及び直接覆髄剤などに広く用いられるようになってきた歯内治療用セメント Mineral Trioxide Aggregate (MTA) のマウス iPS 細胞に与える影響について *in vitro* の系で実験を行った。

II : 材料と方法

MTA (ProRoot、DENTSPLY) をメーカーの指示通りに練和、調整し、37℃、湿度 100% で 24 時間硬化させたのち実験に用いた。細胞は、理研 CELL BANK より購入したマウス iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17、iPS-MEF-Ng178B-5) を用いた。MEF を播種した径 10cm の Dish 上にマウス iPS 細胞を 5 日間、FBS、2-Mercaptoethanol、NEAA、mouseLIF、penicillin/streptomycin、 β FGF 添加 DMEM で培養した。継代後、 2.0×10^6 cell/cm² の密度で径 60mm の Lipidure-Coat Dish (日油株式会社) に播種し、Embryoid Body(胚葉体、以下 EB 体) 形成を行った。EB 体形成後、コラーゲンコート dish に播種、接着確認の後、MTA をセルカルチャーインサート上に静置し、培養を行った。コントロール群、実験群それぞれを骨分化誘導培地に交換のち、1、3、5、7、14 日後に分化状態の確認を行った。細胞の分化状態の確認には通法通り、Alizarin-Red 染色にて判定を行った。1、3、5、7、14 日後にサンプル回収、Real-Time PCR によって骨分化マーカー (Runx2、オステオカルシン、オステオポンチン) の発現の解析を行なった。

III : 結果

iPS 細胞に MTA を作用させた群においてコントロール群に対して分化確認のアリザリン染色において差が認められた。また 7 日目において骨分化マーカーの発現に差が認められた。

IV : 考察

今回の結果から MTA はマウス iPS 細胞の硬組織分化能に影響を与えることが示唆された。一般に、MTA は高いミネラル濃度を有しており、今回の結果も含有するミネラルによってもたらされたものと推測されている。しかし、具体的に MTA のどの成分が影響しているかは、今回の実験のみでは確認できないので、今後の課題と考えている。

イメージファイバーを用いた根管・歯周組織の高精度観察システムの検討

九州歯科大学齶蝕歯髄疾患制御学分野¹, 早稲田大学大学院情報生産システム研究科²,
九州歯科大学総合診療学分野³, 九州歯科大学感染分子生物学分野⁴

○吉居慎二¹, 張宇鵬², 北村知昭¹, 西野宇信¹, 寺下正道³, 西原達次⁴, 植田敏嗣²

Root Canal and Periodontal Tissue Observing System Using Image Fiber for High precision
Diagnosis

¹Div. of Pulp Biology, Operative Dentistry and Endodontics, Kyushu Dental College, ²Graduate School of Information, Production and Systems, Waseda University, ³Div. of Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental College, ⁴Div. of Infections and Molecular Biology, Kyushu Dental College
○YOSHII Shinji¹, LI Huiying², KITAMURA Chiaki¹, NISHINO Takanobu¹, TERASHITA Masamichi³, NISHIHARA Tatsuji⁴, UEDA Toshitsugu²

【研究目的】

近年、歯科治療では歯科用顕微鏡・歯科用コーンビーム CT などの診断機器により歯の複雑な解剖学的形態や骨折等を高精度に検出することが可能となったが、歯の根管内部の歯質の診断や側枝の検出・歯周ポケット内の縁下歯石は通常の診断法では難しく、感覚に頼っているのが現状である。本研究は、歯の内部・根尖歯周組織および歯周ポケット内に存在する微細構造を高解像度で検出する新しい診断装置の開発を目的としている。今回の研究では、イメージファイバーで取得した画像に現れる反射を光源用レンズの改良・画像処理により削減し、鮮鋭な画像の取得を試みた。

【材料および方法】

実験には微細径イメージファイバ、ライトソース、イメージングシステム、モニターおよび観察試料台微調整装置を使用した。イメージファイバーはフジクラ製グレーデッドインテックス型マルチモードファイバ (FIGH-10-500N) を、観察試料としてはガラス表層にクロム薄膜をスパッタリング法で作成後、格子状の等しい間隔のラインとスペースを Focused Ion Beam (FIB) を用いて形成したものをを用いた。

プローブ径を小さくし鮮明な画像を取得するため、1本のイメージファイバーで画像の取得と観察サンプルへの光の照射を同時に行える機器を作成した。C-MOS イメージセンサ・レンズ・プリズムビームスプリッタ・イメージファイバを順に直線状に配置し、光ファイバをそれらに対し直角にかつプリズムビームスプリッタの部位で接するように配置した。イメージファイバー・観察サンプル間を実際の使用条件に合うよう水で、界面での光反射防止のため、イメージファイバー・プリズムビームスプリッタ間、光ファイバ・プリズムビームスプリッタ間をグリセリンで満たした。さらに光源用レンズの中央に 2.5 mm のマスクを付ける事でシステム内での光の反射・散乱を抑え、かつ画像上に現れたハレーションを Matlab により画像処理することにより取り除いた。

【結果】

光源用レンズにマスクを用いない場合には、全体に光の反射した像が見られサンプルの鮮鋭な像を取得出来なかった。対して光源用レンズにマスクを用いた場合にはより反射の少ない画像を得る事が可能となった。しかしながら画像の中央・辺縁にハレーションが残ってしまった。そこで Matlab を用い、オリジナルの画像からハレーションのみの画像を差し引く事でハレーションのない鮮鋭な画像を取得する事が可能となった。

【考察】

1本のイメージファイバーで画像の取得と観察サンプルへの光の照射を同時に行うことで、画像に光の反射の像が反映されたが、光源用レンズの改良・Matlab による画像処理により、安価で簡便に精度の高い鮮鋭な画像の取得が可能となった。

【結論】

ファイバーをサンプルに接した状態では光源用レンズの改良・Matlab による画像処理によりサンプルの鮮鋭な画像を取得出来、口腔内でもファイバー先端が接する事の出来る歯周ポケット等の部位には応用可能であることが示唆された。今後この結果を踏まえ、画像処理を併用しながらファイバー先端にレンズを接続し被写体間距離を延長し画像の取得を行う予定である。

ラット海馬における歯髄刺激時の ATP 遊離におよぼすナロキシンの影響

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座

○長谷川誠実、阿部徹也、藤原正識、大津奈央、本田公亮

Effect of naloxone on release of ATP during tooth pulp stimulation in the hippocampus of rats

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo college of medicine

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

【緒言】

歯髄痛の情動記憶メカニズムを検討するべく、歯髄刺激による海馬血流増加反応を明らかにして以来(第129回本学会)、演者は、歯髄刺激による海馬血流増加反応とアデノシンの関係(Hasegawa et al., J. Neurosci. Res., 2009)、さらにシクロオキシゲナーゼ2との関係(Hasegawa et al., Neurosci. & Med., 2011)、また、その際のアデノシン遊離の特性を報告し(第131回本学会)、さらに第132、133、134、135回本学会において、歯髄刺激が侵害刺激であると同時に、繰り返し与えることで内因性オピオイドが関与した下行性疼痛抑制も生じる可能性を報告した。第136回本学会では、歯髄痛に対する情動反応に関する研究視点を海馬内生理活性物質に変え、歯髄刺激時の海馬内 ATP 遊離をリアルタイムに測定し、歯髄刺激直後にわずかに遊離した ATP が分解しアデノシンになり海馬内血管拡張を生じることを示唆した。そこで今回は、歯髄刺激による ATP 遊離と下行性疼痛抑制の間に何らかの関連が存在するのかについて知る目的で、内因性のオピオイド抑制下における歯髄刺激時の ATP 遊離リアルタイム測定を行った。

【実験材料と方法】

実験には、10週齢雄性ウイスター系ラット(280~300g)20匹を用いた。ラットは全て、20%ウレタン(1.2g/kg)による全身麻酔を施して、実験に供した。ラット右側の大腿静脈にカテーテルを挿入し、薬剤投与の静脈路確保とした。次に、下顎両側歯の歯冠部を切断除去後、両歯髄腔内にステンレス針電極を挿入し、電極固定用レジンで固定し、歯髄刺激電極とした。その後、ラットを脳定位固定装置に固定し、右側海馬内に ATP バイオセンサー対側海馬内に Null センサー(Sarrisa社製)を挿入した。歯髄刺激電極には本実験専用開発した歯髄刺激装置 PSS-410(ユニークメディカル社製)、バイオセンサーにはマルチチャンネルポテンシオスタット・脳内生理活性物質測定装置(プライムテック社製)を接続した。ナロキシソン(第一三共)1mg/kgを静脈内投与し、15分後に歯髄刺激を開始した。歯髄刺激パラメーターは、従来の報告と同様に確実に海馬血流増加反応を惹起する intensity 3.3 mA(歯髄刺激に対する海馬血流増加反応閾値の5倍)、duration 0.5 ms、interval 10 ms からなる pulse train 10 s とし、刺激は 20 s 毎に 30 回連続して与えた。ATP の測定は、同一ラットの海馬内で 2 箇所(脳表面から 2.5mm および 3.5mm の深さ)の測定、またそれぞれ刺激極性を代えて行った。

【結果】

ナロキシソンによる内因性オピオイド抑制下における歯髄刺激に対して、ATP 遊離が測定されたのは全例 1 回目の刺激に対してのみであった。2 回目以後の刺激で ATP 遊離を認めたものはなかった。測定部位の違いは認めなかった。また、刺激極性による違いはなかった。

【考察】

今回の結果から、歯髄刺激に対する ATP の遊離は、ナロキシソン投与の影響を受けない、すなわち内因性オピオイドの無関係の遊離であることが分かった。このことから、歯髄刺激により遊離する ATP は、歯髄刺激直後に認められるのみで、刺激の 2 回目以降に認められない現象は、内因性オピオイドとは関わり無く、歯髄刺激による海馬内 ATP 遊離の特性であることが、考えられた。

ヒト歯根膜線維芽細胞を用いた MGO 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 MGOsealer on the behavior of human periodontal ligament fibroblasts 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。これまで MGO シーラーの刺激に関する研究から生体親和性が高いということが示唆された。今回の実験ではより詳細な検討を加えるため、歯根膜細胞が刺激を受けた時に最も発現するといわれている起炎物質としてサイトカイン IL-6 を ELISA 法にて検出し、シーラーの細胞傷害性について評価した。

【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 SCBM™(LONZA)に 10%FBS, 1%ペニシリン、ストレプトマイシン添加したものを使用した。また実験には MGO シーラー(以下 MGO 群)の他に AHplus(以下 AH 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 SCBM™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 SCBM™にて 10%、1%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 SCBM™を用いた。

③サイトカイン発現

HPDL を 96well plate 中に 1×10^4 個/well 播種し 3 日間培養後、それぞれのシーラー抽出液と交換した。1, 2, 3 日後に上澄みへのサイトカイン発現を ELISA 法(IL-6)にて測定した。

【結果】

- 1) 対照群の IL-6 は 2 日目に減少し、3 日目には増大した値を示した。
- 2) 希釈濃度 100%: MGO 群,AH 群の IL-6 はわずかに検出された。また両群とも同等の値を示し、観察期間中の明らかな変化は認められなかった。
- 3) 希釈濃度 10%: MGO 群,AH 群は対照群と比較して増大傾向を示し、経時的にも変化が認められた。
- 4) 希釈濃度 1%: MGO 群,AH 群ともに 1 日目、3 日目には対照群と値が近似した結果を示した。

加齢による象牙質の形態変化と微小亀裂伸展の観察

大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部
○久保美寿穂、三浦治郎、木下可子、西藤三紀子、長島 正、竹重文雄

Dentinal microcrack propagation and structural modification with aging

Division for Interdisciplinary Dentistry, Osaka University Dental Hospital
○KUBO Mizuho, MIURA Jiro, KINOSHITA Yoshiko, NISHIFUJI Mikiko, NAGASHIMA Tadashi, TAKESHIGE Fumio

【研究目的】

象牙質の構造が加齢により変化することはよく知られている。しかし、微小亀裂と象牙質の加齢変化についての報告したものは少なく、その観察も走査型電子顕微鏡による亀裂の表面を観察した報告が多く、透過型電子顕微鏡で観察した報告はない。これは亀裂の状態を保持したまま超薄切片を作成することが難しいためと考えられる。本研究では象牙質内における亀裂観察の手法を確立し、加齢と微小亀裂の伸展様相を形態学的に透過型電子顕微鏡を用いて評価することを目的とした。

【材料および方法】

被験歯としてヒトの抜去歯を使用した。試料を歯軸に対し垂直方向に1mmの厚さにダイヤモンドソーにて切り出した。セメントエナメル境により歯冠部と歯根部の象牙質に分け、歯冠部の歯髄側とエナメル質側、歯根部の歯髄側とセメント質側の4つのグループに分けた。試料を2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒドにて固定処理を行い、アルコール脱水後エポキシ樹脂(Quetol812:日新EM)にて覆い、楔状の圧子で負荷をかけることで亀裂を人工的に作製した。実体顕微鏡で亀裂の有無を確認した後、再度エポキシ樹脂にて試料全体の包埋を行った。1回目のエポキシ樹脂包埋は亀裂発生時に試料の形態を保持するために、2回目は亀裂保存のために行われた。試料を、亀裂を中心に約0.5mm角にトリミングを行い、超薄切片のために再度エポキシ樹脂にて包埋した。ウルトラマイクローム(UltrameV:LKB社製)及びナノトーム(酒井電子顕微鏡応用研究所)にて100nm厚の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡(H800:Hitachi)および超高压電子顕微鏡(H3000:Hitachi)にて観察を行った。

【結果】

今回用いた亀裂作製法により人工的に亀裂を作製することができた。また、エポキシ樹脂にて各ステップの包埋を行うことで、亀裂の形態を維持したまま超薄切片を作製し透過型電子顕微鏡による観察を行うことが可能であることが確認できた。若年者では亀裂は象牙細管に達すると細管に亀裂が交通し、進入方向の反対側から亀裂が再度広がっていくのに対し、高齢者の象牙質においては加齢により厚くなった管周象牙質をまわりこむように進む像が多く観察された。

【考察および結論】

エポキシ樹脂包埋を亀裂作製、亀裂包埋、切片作製の各ステップにおいて用いることで、亀裂の構造を破壊せずに透過型電子顕微鏡での観察が可能となった。これにより透過型電子顕微鏡による観察が亀裂の伸展と象牙質の構造の加齢変化との関連の解明に有効な手段であることが示唆された。亀裂の伸展様相の違いは、若年者では管周象牙質が薄いため亀裂の伸展を妨げる要因にならず、亀裂は象牙細管をつなぐように断続的に伸展していると考えられる。しかし、高齢者の場合には、管周象牙質が厚く石灰化度も高いため亀裂の伸展は妨げられ、亀裂は管周象牙質を避けるように連続的に進む傾向にある。これらのことから亀裂の伸展に加齢により変化する管周象牙質が関連していることが示唆された。本手法を用いることで、亀裂伸展様相が、象牙質内部においても観察できるようになり、亀裂評価における超微細形態観察の有用性を示すことができた。

本研究は、平成24年度文部科学省科学研究補助金若手研究(B)22791831の補助および「文部科学省ナノテクノロジーネットワークプロジェクト(阪大複合機能ナノファウンダリ)」の支援を受けて実施されました。

Dentin sialophosphoprotein の開裂がその機能発現に及ぼす影響の検討

広島大学大学院医歯薬学総合研究科
顎口腔頸部医科学講座 健康増進歯学研究室
○小武家誠司、鈴木茂樹、藤井理史、西村英紀

The influence of dentin sialophosphoprotein cleavage on its function

Department of Dental Science for Health Promotion,
Division of Cervico-Gnathostomatology,
Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences
○Seiji Kobuke, Shigeki Suzuki, Masashi Fujii, Fusanori Nishimura

〈研究目的〉 Dentin phosphoprotein (DPP) は象牙質に豊富に存在する非コラーゲン性タンパク質であり、そのアミノ酸配列中央にセリン-セリン-アスパラギン酸の長い繰り返し配列を持ち、配列内のセリンは高度にリン酸化されている。DPP は Dentin sialophosphoprotein (DSPP) が BMP-1 ファミリーのプロテアーゼにより開裂されて発現する。近年、DPP が細胞外基質としてだけでなく、そのインテグリン結合配列 RGD を介して、間葉系幹細胞の分化を誘導することが明らかとなってきている。更に生体内では DSPP はすべて開裂されるのではなく、DSPP としてある一定量存在することも明らかとなってきている。しかし、DSPP の存在意義や、DPP と DSPP の機能の差異については未だに不明のままである。そこで本研究では、開裂抵抗型 DSPP を過剰発現させた細胞株及び DSPP と DPP の組み換えタンパクを作製し、DSPP の開裂がその機能発現に及ぼす影響について検討を行った。

〈材料および方法〉 1. 正常および開裂抵抗性 DSPP 安定発現細胞株の樹立: 開裂抵抗性 DSPP cDNA は正常 DSPP cDNA の中央に位置するプロテアーゼ認識配列を置換することで作製した。その後、レトロウイルスを用いて C3H10T1/2 (未分化間葉系細胞) 細胞及び MC3T3-E1 clone 4 (前骨芽細胞) 細胞に遺伝子導入を行い、抗生剤選択培養により安定発現株を獲得した。これら細胞株を硬組織誘導培地中で長期に培養し、経目的にアルカリフォスファターゼ活性、関連遺伝子発現の差異を解析し、最終分化はアリザリン染色にて比較検討した。2. DPP 及び DSPP 組み換えタンパク質の作製: DPP cDNA 及び開裂抵抗性 cDNA を N 末端 6xHis タグ付き組み換えタンパク作製用 vector に導入し、293EBNA 細胞を用いて発現させた。それぞれの組み換えタンパクを含む培養上清から Sepharose Q カラムによる粗精製及び cobalt カラムによる 6xHis タグ精製を行った。3. 組み換え DPP 及び DSPP タンパクの MAPK リン酸化に対する影響の検討: サブコンフルエントの細胞を 1% 血清で 20 hr 時間静置後、組み換え DPP 及び DSPP タンパクにて刺激を行い、刺激後 15 min から 180 min の細胞内シグナル変動を MAPK に対するリン酸化特異的抗体で解析した。4. DPP 及び DSPP の細胞接着及び分化への影響の検討: 無処理培養ディッシュを DPP または DSPP (2.5 µg/ml) でコートし、細胞播種後 48 hr に RNA を回収し遺伝子発現差異を qPCR にて検討した。

〈結果〉 正常型 DSPP を過剰発現する MC3T3-E1 clone 4 ではコントロール株と比較して、*Osterix*, *Osteocalcin*, *Type I collagen* などの硬組織形成細胞分化マーカーの発現上昇を認め、象牙質特異マーカーである *Dspp*, *Nestin* の恒常的な発現上昇も認めた。一方、開裂抵抗性 DSPP を過剰発現する細胞株ではコントロールと同程度であった。DPP をコートした培養ディッシュ上の培養により、MC3T3-E1 clone 4 では *Dspp*, *Nestin* の有意な発現上昇を認めたが、DSPP をコートしたディッシュではコントロールと比較して明らかな差は認めなかった。更に、DPP 刺激の細胞では MAPK の中で ERK1/2 のリン酸化が刺激後 3 hr でも継続しているものの、DSPP 刺激では刺激後 1 hr で通常レベルに戻っていた。また、DPP をコートした培養ディッシュ上の培養により誘導された象牙質特異マーカーの発現は、ERK1/2 のインヒビター添加で著明に減少し、MEK1/2 及び p38 インヒビター添加でわずかに減少を認め、反対に、JNK インヒビター添加では上昇を示した。

〈結論〉 DSPP 開裂による DPP タンパクの発現は、細胞刺激因子としての機能発現に必須であることが明らかとなった。また、DPP はインテグリンを介して ERK1/2 を選択的に活性化し、その結果、細胞分化を誘導することが示唆された。

脳由来神経栄養因子のヒト歯肉上皮細胞に与える影響

広島大学医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座 歯周病態学分野
○柏井 桂 加治屋幹人 藤田 剛 松田真司 武田克浩 柴 秀樹 栗原英見

The effect of Brain-derived neurotrophic factor on human gingival epithelial cells

Department of periodontal medicine, division of frontier medical science, Hiroshima University
graduate school of biomedical sciences.

○Kei Kashiwai, Mikihiro Kajiya, Tsuyoshi Fujita, Shinji Matsuda, Katsuhiro Takeda,
Hideki Shiba, Hidemi Kurihara

<目的>

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は神経細胞のみならず、様々な細胞の増殖、分化に関与することが知られている。これまでに、BDNF が歯周組織再生に有用であることを、*in vivo*, *in vitro* の研究において明らかにしてきた (Takeda et al, 2005, Kajiya et al, 2008, Matsuda et al, 2012)。歯周組織再生はシャーピー繊維の埋入を伴った新生セメント質と歯槽骨、及び歯周靭帯を再構築することであるが、歯肉上皮の侵入はこれらの組織の再構築の場を占有し、歯周組織再生を阻害する。ビーグル犬の根分岐部病変Ⅲ級モデルを用いた実験では、BDNF による歯周組織再生過程で歯肉上皮の侵入は認められなかった。BDNF を安全で確実性の高い歯周組織再生療法として臨床応用するためには、この重要な知見をより詳細に分子レベルで理解し、再生のメカニズムを解明する必要がある。そこで、本研究では BDNF の歯肉上皮細胞に対する影響を明らかにするため、歯肉上皮細胞の増殖、またその増殖に関わるシグナル伝達経路に着目し、実験を行った。

<材料と方法>

- 1 供試細胞は、ヒト歯肉上皮細胞 (human gingival epithelial cells, HGEC) と、ヒト歯周靭帯細胞 (human periodontal ligament cells, HPL cells) を用いた。
- 2 BDNF の細胞増殖に及ぼす影響: HGEC を KB 2 で、HPL cells を DMEM で培養した。subconfluent に達した時点で、BDNF (0, 10, 50, 100, 200 ng/ml) を作用させ、48 時間後の生細胞数を MTS assay を用いて測定することにより評価した。
- 3 trkB および p75 の発現: BDNF に対する受容体である trkB と p75 の発現を、Western blotting 法によって検討を行った。
- 4 リン酸化 ERK およびリン酸化 JNK の検出: BDNF 刺激によるリン酸化 ERK とリン酸化 JNK の発現を BDNF (0, 10, 50, 100, 200 ng/ml) 刺激後、Western blotting 法によって分析した。

<結果>

- 1 BDNF 刺激は、HPL cells の増殖を促進したが、HGEC の増殖には影響を与えなかった。
- 2 HPL cells および HGEC は trkB, p75 を発現していた。
- 3 BDNF 刺激は、HPL cells の trkB のリン酸化を促進したが、HGEC の trkB のリン酸化を促進には影響を与えなかった。
- 4 BDNF 刺激は、HPL cells の ERK のリン酸化を促進したのに対し、HGEC の ERK のリン酸化の促進には影響を与えなかった。一方、HPL cells の JNK のリン酸化の促進には影響を与えなかったのに対し、HGEC の JNK のリン酸化を促進した。

<考察および結論>

本研究から、BDNF は歯肉上皮細胞において、歯根膜細胞とは異なり、trkB-ERK カスケードではなく、p75 受容体を介した JNK シグナル伝達経路が優位に働いている可能性が示唆された。このことが、BDNF が歯周組織再生過程において歯肉上皮の深部増殖が観察されない理由であると考えられる。

FGF-2 刺激による歯根膜細胞からの CXCR4 の誘導

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)
○久保田実木子、柳田 学、森 健太、兒嶋由子、三木康史、山下元三、
野崎剛徳、山田 聡、北村正博、村上伸也

FGF-2 induces CXCR4 expression by periodontal ligament cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Mikiko Kubota, Manabu Yanagita, Kenta Mori, Yuko Kojima, Koji Miki, Motozo Yamashita,
Takenori Nozaki, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura, and Shinya Murakami

【目的】

サイトカインや細胞増殖因子を治療薬として局所応用することにより歯周組織欠損部の組織再生を誘導する試みがなされている。当研究室では、FGF-2の局所投与が歯周組織再生を有意に促進すること、また FGF-2 による歯周組織再生誘導の機序として歯根膜細胞の増殖・遊走の促進に加えて、投与部位における血管新生促進・細胞外基質産生制御といった微小環境の整備が重要であることを示してきた。しかしながら、FGF-2の局所投与により誘導される血管新生の詳細な機序に関しては十分に明らかにはなっていない。我々はイヌ FGF-2 投与モデルを用いた予備的研究において、FGF-2 投与群では歯周外科的処置のみを施した群と比較して血管新生に関与すると考えられているサイトカイン・ケモカイン群の発現が上昇することをマイクロアレイ法にて観察した。血管新生に関わるケモカインとその受容体の中でも CXCL12-CXCR4 系は、それらの遺伝子欠損マウスにおいて重篤な血管形成不全を認めることや、CXCL12 が虚血後の骨髄由来血管内皮前駆細胞が関与する血管新生を促進し、治療に応用できるとの報告がなされていることから、歯周組織再生時の血管新生においても重要な役割を果たしていることが考えられる。本研究ではマウス歯根膜細胞に FGF-2 刺激を加えた際の CXCL12-CXCR4 発現を軸に、歯周組織再生における FGF-2 の血管新生に対する影響について検討を行った。

【材料および方法】

- ① 2.5 週齢の BALB/c マウスの下顎大白歯の歯根表面より採取して得られた細胞を、FGF-2 存在下で限界希釈法にてクローニングすることにより樹立したクローンから、最も Alkaline Phosphatase 活性の高いクローン (MPDL22) を得た。MPDL22 は、100ng/ml FGF-2 を添加した 10%FCS 含有 α -MEM 培地にて継代を行った。
- ② 6cm dish に 5×10^5 個播種した MPDL22 を 0、1、5、10、25、50、100 (ng/ml) と濃度を振り分けた FGF-2 にて 24 時間または 48 時間刺激を与え、total RNA を抽出した。その後 real time PCR 法によって CXCR4 の mRNA 発現量を検討した。
- ③ 6cm dish に 5×10^5 個播種した MPDL22 を 0、1、5、10、25 (ng/ml) と濃度を振り分けた FGF-2 にて 48 時間刺激を与え、フローサイトメトリー法によって CXCR4 の発現量を測定した。
- ④ 6cm dish に 6×10^5 個播種したマウス血管内皮細胞株 b.End5 を 0、1、5、10、25 (ng/ml) と濃度を振り分けた FGF-2 にて 24 時間刺激を与え、total RNA を抽出した。その後 real time PCR 法によって CXCR4・CXCL12 の mRNA 発現量を検討した。
- ⑤ FGF-2・CXCL12 刺激によって誘導される MPDL の遊走能について検討した。すなわち、中央にポアサイズ $8 \mu\text{m}$ の透過膜を搭載したチャンバー (Boyden chamber) を用い、チャンバー上部に 5×10^4 個の MPDL22 を播種し、チャンパー下部に FGF-2、CXCL12 添加培地を加え、24 時間後に透過膜下面に遊走・付着した細胞数を測定した。

【結果および考察】

マウス歯根膜細胞において、FGF-2 刺激により CXCL12 の受容体である CXCR4 の発現が誘導されることが明らかとなった。また、マウス血管内皮細胞において FGF-2 刺激により CXCL12・CXCR4 の発現が誘導されることが明らかとなった。すなわち、FGF-2 局所投与により誘導される歯周組織再生過程において、血管内皮細胞から発現誘導される CXCL12 により、FGF-2 刺激により CXCR4 の発現を増強させた歯根膜細胞が血管内皮細胞近傍に遊走することが亢進され、血管新生を伴う局所環境の整備に歯根膜細胞が関与している可能性が示された。

ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドの作製と骨再生療法への応用

¹北海道大学大学院歯学研究科歯周・歯内療法学教室

²北海道大学大学院地球環境科学研究院統合環境科学部門

○井原朝子¹, 宮治裕史¹, 古月文志², 井上加菜¹, 光銭裕太¹, 金山和泉¹,
吉田 崇¹, 菅谷 勉¹, 田中佐織¹, 川浪雅光¹

Preparation and application of nano beta-TCP/collagen scaffold for bone tissue engineering

¹Department of Periodontology and Endodontology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine

²Integrated Environmental Science, Hokkaido University Faculty of Environmental Earth Science

IBARA Asako*, MIYAJI Hirofumi¹, FUGETSU Bunshi², INOUE Kana¹, KOSEN Yuta¹, KANAYAMA Izumi¹,
YOSHIDA Takashi¹, SUGAYA Tsutomu¹, TANAKA Saori¹, KAWANAMI Masamitsu¹

【研究目的】

組織再生における重要な要素の一つである再生の場の構築のために、スキャフォールドの開発が進められている。 β -三リン酸カルシウム (β -TCP) は骨誘導性を有し、骨補填材として臨床応用されている。 β -TCP 顆粒をナノサイズ粒子にすることで、表面積が拡大され生体内における様々な活性が上昇すると考えられる。そこで本研究では、 β -TCP 粒子をナノサイズに粉碎して分散後にコラーゲンスポンジに配合したスキャフォールドを作製し、物性および生体親和性を評価した。また、ラットの頭蓋骨上に埋入した場合の組織反応を病理組織学的に評価した。さらに、線維芽細胞増殖因子 (FGF2) との併用による効果についても検討した。

【材料と方法】

β -TCP (粒径 5~30 μ m, 富田製薬) をナノ粒子に粉碎し、胆汁酸エタノールにて分散液を作製後、粒径分布分析を行った。6×6×3 mm に成形したコラーゲンスポンジ (4%FC-HAC, オリンパステルモバイオマテリアルより提供) を分散液に 24 時間浸漬後、エタノール脱水を行った。その後、スポンジを凍結乾燥して、ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドとした。

コラーゲン線維へのナノ β -TCP 粒子の付着状態を SEM, TEM 観察および EDX 分析にて評価した。また作製したスキャフォールドの圧縮強度を測定した。さらに、細胞親和性評価のために、MC3T3-E1 細胞を播種して 24 時間培養を行い、細胞付着性を評価した。次にラットの頭蓋骨上にナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールド、および FGF2 (50 μ g, フィブラストスプレー, 科研製薬) を添加したスキャフォールドを埋植した。コントロールとしてコラーゲンスポンジ埋植を行った。術後 10 日および 5 週後に組織学的観察および計測を行った。

【結果と考察】

ナノ β -TCP の粒径は 100~200nm であり、コラーゲンスポンジの中心部においても線維に付着していることが認められた。圧縮強度はナノ β -TCP の添加によりコラーゲンスポンジよりも約 2 倍に上昇し、スキャフォールドとしての性質がより良好であると考えられた。細胞付着性試験では細胞の良好な伸展と付着を確認し、細胞親和性は良好であると考えられた。埋植後 10 日目の組織学的観察では、ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールド周辺への炎症性細胞の浸潤は少なく、内部に線維芽細胞様細胞が侵入増殖しており、良好な生体親和性を有すると考えられた。また、 β -TCP 粒子の周りにマクロファージの出現を認めた。5 週目において、ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドの埋植によって骨増生高さが有意に増加した。また吸収性もコラーゲンスポンジに比較して良好で、ほとんど残存を認めなかった。ナノ β -TCP の添加が骨増生とマテリアルの吸収を促進したと考えられた。さらに、FGF-2 を添加すると早期から内部に大量の細胞が侵入し、マテリアルの吸収と骨増生が促進され、FGF2 添加ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドの埋植で最も高い骨増生が得られた。

【結論】

ナノ β -TCP 配合コラーゲンスキャフォールドは骨再生用スキャフォールドとして有効であることが示された。

「細胞外マトリックス補充療法」による結合組織疾患改善効果の解析

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

○齋藤正寛^{1, 2}、辻 孝^{1, 2, 3}

Improvement of connective tissue disease by extracellular matrix administration therapy.

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

Masahiro SAITO^{1, 2}, Takashi TSUJI^{1, 3, 4},

【研究目的】

コラーゲンおよびマイクロフィブリルを含む線維性の細胞外マトリックスは、結合組織における組織強度の維持において重要な役割を果たしている。一方、エラスターノス症候群、マルファン症候群などの先天的に細胞外マトリックスの機能不全が起こる結合組織疾患では、組織強度が低下するため歯周炎を含む様々な疾患のリスクが高まることが報告されている。そのため、結合組織疾患の新規治療技術として、細胞外マトリックスを再構築する技術開発が求められている。これまで私たちは歯根膜をモデルに、マイクロフィブリルの重合を促進する ADAMTSL6 β の局所投与により、結合組織の創傷治癒を促進できることを見出した。そして、この技術を「細胞外マトリックス補充療法」として、細胞移植療法、サイトカイン療法に次ぐ第 3 の歯周病治療技術として提唱してきた。そこで本研究では、ADAMTSL6 β による「細胞外マトリックス補充療法」の慢性炎症を伴う結合組織疾患に対する有効性を解析するため、腹部大動脈瘤モデルにおける効果を解析した。

【材料および方法】

1. ADAMTSL6 β transgenic mice の作製

ADAMTSL6 β の結合組織におけるマイクロフィブリル形成に及ぼす影響を解析するために、全身で過剰発現を誘導出来る CAG プロモーターを用いて ADAMTSL6 β を過剰発現する transgenic mice (TSL6 β -TG) を作出した。マイクロフィブリル形成能力の判定は、抗 ADAMTSL6 β 抗体および抗 fibrillin-1 抗体を用いて判定した。

2. 腹部大動脈瘤誘導モデル

腹部大動脈瘤を誘発するため、吉村らの方法に従い (Yoshimura et al, Nature Medicine 2005) 0.5M CaCl₂ をマウス腹部大動脈周囲に作用させ、慢性炎症を誘導する腹部大動脈瘤モデル (AAA) 実験を行った。

3. ADAMTSL6 β による大動脈瘤改善効果の解析

腹部大動脈瘤モデルにおける ADAMTSL6 β の改善効果を解析する目的に、TSL6 β -TG に AAA モデル実験を施した。CaCl₂ 処理後 6 週間後に大動脈を摘出し、抗 ADAMTSL6 β 抗体および抗 fibrillin-1 抗体を用いてマイクロフィブリル形成に及ぼす影響を解析した。

【成績】

ADAMTSL6 β の大動脈におけるマイクロフィブリル形成能を解析した結果、TSL6 β -TG では野性型マウスと比較して大動脈の弾性版周囲に抗 fibrillin-1 抗体、抗 ADAMTSL6 抗体陽性のマイクロフィブリル形成の促進が観察された。定量解析した結果、野性型マウスと比較して TSL6 β -TG ではマイクロフィブリルの形成量が 2 倍増加していた。この結果より ADAMTSL6 β は大動脈を含む結合組織のマイクロフィブリル形成を促進することが明らかになった。次に ADAMTSL6 β によるマイクロフィブリル強化が腹部大動脈瘤を予防できるかを解析するため、AAA モデルに対する予防効果を解析した。TSL6 β -TG に CaCl₂ 処理を施し、6 週間後に腹部大動脈を観察した結果、弾性板の一部は崩壊はされたが、野性型と比較して TSL6 β -TG では約 4 倍のマイクロフィブリル形成促進が観察された。この結果より、ADAMTSL6 β は腹部大動脈瘤発症過程においてマイクロフィブリルを再構築する事が判明した。

【考察】

近年の研究結果より、腹部大動脈瘤モデルで誘発される慢性炎症は大動脈の細胞外マトリックスの代謝異常を引き起こし、組織崩壊を促進することが明らかにされた。本研究結果より、ADAMTSL6 β は腹部大動脈瘤発症過程においてマイクロフィブリルを再構築することで、細胞外マトリックスの代謝異常を是正し、腹部大動脈瘤を予防する可能性が示された。

【結論】

ADAMTSL6 β を用いた「細胞外マトリックス補充療法」は、歯根膜の創傷治癒のみならず腹部大動脈瘤発症も予防できる可能性が示された。