

RC-prep[®]と NaOCl の併用により生じた皮下気腫の 1 例

鹿児島大学大学院医学総合研究科顎顔面機能再建学講座歯科保存学分野

○徳田雅行、川上克子、江本真規子、鳥居光男

A case of emphysema caused by sodium hypochlorite with RC-prep

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

○TOKUDA Masayuki, KAWAKAMI Yoshiko, EMOTO Makiko and TORII Mitsuo

【緒言】

RC-prep[®] は、EDTA と過酸化尿素の合剤で、キレート効果や潤滑作用のために根管拡大補助剤として有用である。また、NaOCl と併用すると発泡作用により根管内の切削片が浮き上がるとされており、根管治療時に使用されることが多い。今回、RC-prep[®] と NaOCl の併用により、皮下気腫が増悪したと考えられる 1 例について報告する。

【症例】

患者は 52 歳女性。主訴は左側上顎第一小臼歯部の歯肉腫脹であり、動揺度 1、軽度の打診痛を認めた。歯肉溝は 4 mm 以下であった。レントゲン写真にて根尖部に透過像を認め、瘻孔から挿入したポイントは透過像に達した。慢性根尖性歯周炎と診断した。既往歴は特記事項なし。

【経過】

主訴である歯肉腫脹の原因除去を目的に、左側上顎第一小臼歯の感染根管治療を始めた。1 日目：フルメタルクラウンおよびメタルコアを除去後、根管内に RC-prep[®] を満たして根管清掃を行いながら、ガッタパーチャポイントを除去し、根尖に達した。電気的根管長測定後、#80 まで拡大した。その後、根管洗浄および RC-prep[®] の除去を目的として、2.5 ml シリンジに 27G ブラント針を装着し、NaOCl 水溶液（アンチホルミン、和光純薬）およびスミアクリーン[®] で根管を洗浄したところ、瘻孔から NaOCl の流出を認めた。同時に、患者は根尖部から左側頬部の範囲における痛みを訴え、洗浄開始後約 2 分で顔面の腫脹を認めた。術者は気腫を疑い、口腔外科医に対診を依頼した。CT 撮影の結果、左側頬部を中心に鼻翼基部から下顎下縁相当の軟組織にかけて瀰漫性腫脹が認め、軟組織内には一部低吸収を示す陰影所見が認められ、air（ガス）の混入も疑われた。デンタル CT においては、左側上顎第一小臼歯根尖部周囲に X 線透過像が見られ、隣接する左側骨鼻空底皮質骨は一部吸収して、交通も疑われた。なお、咽頭部の狭窄、咽頭側壁の変形や偏位は見られなかった。そこで、口腔外科医の指示のもと患者に病状を説明し安静を指示後、頓服と抗生剤を 7 日分投与した。なお、根管は開放状態のままとした。2 日目：顔面の腫脹を認めたが、顔面に内出血は認めなかった。瘻孔は閉鎖していた。痛みはやや軽減した程度であった。6 日目：顔面の腫脹の軽減を認めた。痛みは消失したものの、顔面の腫脹は下顎に移行していた。根管は開放のままとした。11 日目：顔面の腫脹はやや下顎頬部に残るものの痛みは消失したため、根管洗浄後水酸化カルシウム製剤を貼葉し、テンポラリークラウンを装着した。

【考察および結論】

RC-prep[®] 使用後に、NaOCl によるシリンジ洗浄を強圧にて行ったため、左側頬部の皮下気腫を引き起こしたと考える。NaOCl は優れた殺菌効果および有機質溶解能を有しているため、根管治療に有益な薬剤である。しかし、強い生体為害性があるため、今回のように根尖が広く根尖部に透過像を認める症例では、とくに慎重な操作が必要であった。また、瘻孔が認められる場合では、根尖孔外に漏洩した薬剤が液体のみであれば、根尖部組織における停留は少ないと考えられる。しかし、本症例ではペースト状の RC-prep[®] が根尖部組織に存在した。迅速に生理食塩水で瘻孔を含めて洗浄すれば、薬剤量が減少し症状は軽減したと考えられるが、急激な痛みや腫脹が生じたため、術者にも精神的な動揺が大きく、積極的な洗浄処置が十分に行えなかった。EDTA 剤は NaOCl と化学反応し酸素ガスおよび塩素ガスが発生する。さらに RC-prep[®] の過酸化尿素と NaOCl の反応による酸素ガスの発泡が加わり、皮下気腫の症状は増悪したと疑われる。同時に、NaOCl による組織刺激反応も引き起こされていたと考察される。

下眼瞼の腫脹を伴う歯内-歯周疾患 I 型病変の一症例

福岡歯科大学 口腔治療学講座 歯科保存学分野
○牛尾悟志 阿南 壽 松本典祥 水上正彦 泉 利雄
諸富孝彦 春名千英子 福田泰子 逸見晃司 板家主祐

A case of endodontic-Periodontal Disease with a swollen eyelid

Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College
○USHIO Satoshi, ANAN Hisashi, MATSUMOTO Noriyoshi, MINAKAMI Masahiko, IZUMI Toshio,
MOROTOMI Takahiko, HARUNA Chieko, FUKUDA Yasuko, HENMI Koji, ITAYA Keisuke

【緒言】

根尖膿瘍は急性あるいは慢性根尖性歯周炎が化膿性炎に移行し、根尖周囲組織に膿瘍が形成されることにより成立する。通常、慢性根尖膿瘍では多くの場合、瘻孔が形成され内圧が開放されることにより臨床症状は緩解する。一方、広範に腫脹が認められる場合や膿瘍の原因病変の診断が困難な際には、その対応に苦慮することも多い。

今回、下眼瞼および歯肉の腫脹を認める歯内-歯周疾患に遭遇し、緊急処置および抗菌薬の静注による炎症反応の制御、歯科用コーンビーム CT (CBCT) を用いた画像診断および感染根管治療を施すことにより、破壊された歯周組織が良好な治癒傾向を示したため、その症例と治療経過について報告する。

【症例】

患者は 52 歳男性。22 に以前より時々痛みを感じていたが放置していたところ、突然 22 唇側歯肉の腫脹が認められ、同部の汚れを除去しようと歯ブラシにて擦過したところ、間もなく顔面左側眼瞼下部が腫脹したため本院を受診した。

受診時、左側眼窩下部、頬部および 22 遠心歯肉部に著明な腫脹が観察されるとともに、22 の自発痛、打診痛が認められた。また 22 は口蓋側に転移しており、32 との切端咬合により切端部歯質は欠損し、ファセットが形成されていた。歯髄電気診は陰性を示し、歯周ポケットは唇側遠心部のみ 6mm で他は 3mm であった。

【治療経過】

初診来院時、緊急処置として 22 の根尖孔を #15 の K ファイルにて穿通し、根管を開放した。根管からの滲出液はごくわずかであった。炎症が深部に拡張していることが推測されたため、CBCT 撮影後、唇側歯肉頬移行部を切開し、病変部を搔爬、排膿路確保のためドレーンを挿入した。さらに、細菌感染の制御を目的としてセフェム系抗菌剤ロセフィン (中外製薬) を点滴した。左側眼窩周囲の腫脹は徐々に軽減してきたため、ロセフィンの点滴は 4 日までとし、それ以降はセフェム系抗菌剤フロモックス (塩野義製薬) の経口投与とした。初診から 6 日後、左側眼窩下部、頬部および 22 遠心歯肉部の腫脹は著しく消退し、切開部からの排膿も消失したことからドレーンを除去した。

根管治療に移行する際、初診時のファイル挿入により根管途中から大きく彎曲していること、また事前に撮影した CBCT により根尖相当部にフェネストレーションが確認されたため、その点に留意して根管治療を行うこととした。

初診より 2 週間経過したところで 22 の自発痛は消失したが、根管内の腐敗臭・滲出液が認められたため、根管拡大後、次亜塩素酸ナトリウムと EDTA の交互洗浄によりスメア層の除去を図るとともに、ニューキノロン系抗菌剤タリビッド (第一製薬) を根管貼薬した。2 週間後、滲出液・腐敗臭ともに認められず、臨床症状が消失したため、水酸化カルシウム製剤カルシベックス (日本歯科薬品) を貼薬した。初診から約 1 カ月後、デンタリス KEZ (ネオ製薬工業) およびガッターチャポイントによる側方加圧根管充填を施した。根管充填後、歯列および咬合状態を考慮し、ファイバーポストおよびコンポジットレジンにより修復処置を施した。現在まで腫脹の再発もなく良好に経過している。

【まとめ】

下眼瞼および歯肉の著明な腫脹を認めた本症例は、CBCT を用いた画像診断によりフェネストレーションに由来する歯内-歯周疾患 I 型病変と診断された。複雑な臨床症状を示す歯内-歯周疾患の治療に際しては、的確な検査および診断を行うことで確実な原因病変への処置を行うとともに、その複雑な病態について患者に分かりやすく説明することが肝要と考えられる。破壊された歯周組織の治癒傾向については、今後も長期経過観察を行っていく予定である。

バブルリポソームと超音波併用ドラッグデリバリーシステムを利用した歯肉への遺伝子導入

¹昭和大学歯学部歯周病学講座

²モンゴル健康科学大学歯学部歯科補綴矯正学講座

○菅野真莉加¹、Mandkhai Ulziisaikhan^{1,2}、八島沙羅¹、野瀬冬樹¹、野口江美子¹、菊池真理子¹、滝口 尚¹、須田玲子¹、山本松男¹

In vivo gene transfer to gingival tissue with drug delivery system by bubble liposomes and ultrasound

¹Department of Periodontology, Showa University School of Dentistry

²Department of Prosthodontic and Orthodontic, School of Dentistry, Health Sciences University of Mongolia

○Marika Sugano¹、Mandkhai Ulziisaikhan^{1,2}、Sara Yashima¹、Fuyuki Nose¹、Emiko Noguchi¹、Mariko Kikuchi¹、Takashi Takiguchi¹、Reiko Suda¹、Matsuo Yamamoto¹

【背景および研究目的】

歯周組織の創傷治癒促進や組織再生を誘導するために、歯周組織局所における細胞増殖因子の臨床応用が検討され、いくつかは上市されるに至っている。しかし、それらはリコンビナントタンパク質が主で、対象となる組織や増殖因子によっては、生体内での安定性、半減期、送達性、さらにはコストなどの点で、さらなる最適化の余地が残されている。一方で、タンパク質をコードする遺伝子そのものの組織への導入も有力な方法として注目されている。

これまでに我々は、ナノバブルとして独自に開発してきたバブルリポソーム (Bubble liposomes; BLs) を超音波 (Ultrasound; US) と併用し、種々の生体組織において各種核酸や薬物の導入を試み、口腔領域においては、舌組織への高い遺伝子導入効果を報告した (第 135 回秋季日本歯科保存学会)。しかし、歯肉を標的とした非ウイルス性のドラッグデリバリーシステム (DDS) の報告はほとんど行われていない。そこで本研究では、歯肉組織に対して効果の高い遺伝子導入法の開発を目指し、BLs と US を併用した遺伝子導入法を用いて歯肉組織への最適条件を検討した。

【材料と方法】

麻酔下の 7-8 週齢 Wistar rat の下顎切歯唇側歯肉に BLs とプラスミドの混合溶液を注入し、直後に超音波照射を行った。プラスミドには、ルシフェラーゼ遺伝子および緑色蛍光タンパクである EGFP 遺伝子をコードした 2 種のレポータープラスミドを用いた。経時的に歯肉を剥離回収し、タンパク量当たりのルシフェラーゼ活性を測定して導入効果を評価した。また、歯肉組織に対する本法の最適な導入条件を決定するため、超音波照射強度 (0-4.0 W/cm²)、超音波照射時間 (0-120 秒) について条件検討を行った。さらに、導入部位における遺伝子発現を組織学的に評価するために、導入部位の脱灰凍結切片を作製し、顕微鏡により GFP 発現細胞の観察を行った。

【結果】

BLs+US 照射群において、BLs/US なし、BLs のみ、US のみの群に比べて、高いルシフェラーゼ活性が認められた。このルシフェラーゼの発現持続効果は経時的に減少し、導入から 3 日後にはコントロールと同程度の発現強度を示した。また、蛍光顕微鏡にて EGFP の発現を確認したところ、BLs+US 群において、超音波照射部位と一致した歯肉組織に明瞭な EGFP 発現細胞が観察された。さらに、超音波照射条件の検討により、ラット歯肉組織に対する本導入法の最適な導入条件が得られた。

【考察】

本結果より、近年 DDS ツールとして注目されている高周波超音波にナノバブルである BLs を併用することにより、ラット歯肉組織への遺伝子導入効率が上昇することが示された。しかし、マウス舌組織においては同様の方法で高い導入効果が 10 日後まで持続していたのに対し (菅野ら、第 135 回秋季日本歯科保存学会)、本結果では導入後 1 日目に発現のピークを迎え、3 日後以降ルシフェラーゼの発現は減少した。本法による導入効率は標的組織の構成細胞やターゲーター、周囲組織の状態、超音波条件などの様々な因子によって影響を受けると考えられ、歯肉に対する効果の高い DDS の確立に向けて更なる効率化を検討する必要がある。また、今後は種々の治療用遺伝子の導入も行い、その効果を評価する必要がある。

尚、本研究は、BLs を開発し、超音波と併用した薬物・核酸導入に関する基礎的研究を進めている東京薬科大学薬物送達学教室 (根岸洋一 准教授) および帝京大学薬物送達学教室との共同研究として行った。

脱分化脂肪細胞(DFAT)を用いたラット頭蓋骨欠損モデルにおける骨組織再生

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療科学専攻 顎顔面機能再建学講座 歯周病学分野
○中村利明, 迫田賢二, 谷山勝義, 篠原敬哉, 野口和行

Bone formation-using transplantation of de-differentiated fat cells in rat calvarial defects.

Department of Periodontology, Field of Oral and Maxillofacial Rehabilitation,
Advanced Therapeutic Course, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
○Toshiaki Nakamura, Kenji Sakoda, Katsuyoshi Taniyama, Yukiya Shinohara and Kazuyuki Noguchi

[研究目的]

脱分化脂肪細胞(De-differentiated fat cells: DFAT)は成熟脂肪細胞から天井培養と呼ばれる方法で体外培養することにより得られる線維芽細胞様の細胞群であるが、高い増殖能と多分化能を有し間葉系幹細胞とほぼ同等の性質を有することが示されている。このようなことから、細胞移植療法の有力なソースの一つとして考えられている。硬組織形成能に関しては、骨芽細胞への分化能を有しており、異所性の骨様組織の形成が既に報告されている。しかしながら、*in vivo*でのDFATの骨欠損における硬組織形成能については十分に検討されていない。そこで今回、歯周組織・骨組織欠損に対する応用に向けた基礎的研究として、ラットより分離・培養したDFAT(rDFAT)を用い、分化能の評価およびラット頭蓋骨欠損モデルを用いた骨形成に関する研究を行った。

[材料と方法]

1. Wister系ラットの鼠径部より採取した脂肪組織を酵素処理し、分離した脂肪細胞を天井培養し得られたrDFATを実験に用いた。またRT-PCR法にて骨・軟骨・脂肪のマーカー遺伝子の発現を確認した。
 2. rDFATの脂肪滴および石灰化物形成能を脂肪分化培地および骨芽分化培地にて培養後、Oil Red O染色およびAlizarin Red S染色にて評価した。
 3. rDFATを骨分化培地で培養後、ALP活性の測定および、各種遺伝子発現をリアルタイムPCR法にて解析した。
 4. Scaffold(GC研究用scaffoldブロック HAP+, 直径5mm)にrDFATを播種後培養3, 6日におけるscaffold内での細胞増殖をCell counting kit-8(同仁化学研究所)を用いて評価した。
 5. 麻酔下にて、トレフィンバー(直径5mm)を用いてラット頭蓋骨左右に5mmの骨欠損を外科的に作製し、骨欠損を以下の4つの実験群に分け処置を行った。
① Control群(Scaffold無し) ② Scaffoldのみ(GC研究用scaffoldブロック HAP+)
③ Scaffold + 無刺激rDFAT ④ Scaffold + 骨分化刺激rDFAT
- 8週後に屠殺し、通法に従いパラフィン切片作成後、HE染色を行い、骨形成について組織学的観察を行った。
(※本研究は鹿児島大学動物実験倫理委員会の承認の下、行われた)

[結果]

1. 分離培養したrDFATにおいて、PPAR γ , Runx2/Cbfa1, Sox9の遺伝子発現が認められた。また脂肪分化・骨分化培地にて培養したところ、脂肪滴および石灰化物の形成を認め、脂肪細胞および骨芽細胞への分化が確認された。
2. 培養6日後、ALP, BSP, OCNの遺伝子発現およびALP activityは無刺激群と比較して骨分化刺激群において上昇を認めた。
3. ScaffoldへのrDFAT播種後3日目と比較して、6日目に有意な細胞数の増加が認められた。
4. ラット骨欠損モデルにおいて、Control群, Scaffold群では骨欠損の閉鎖を認めず、Scaffold + 無刺激rDFAT群では1個体のみ骨欠損の閉鎖を認めた。一方、Scaffold + 骨分化刺激rDFAT群では良好な骨欠損の閉鎖傾向を認めた。

[考察および結論]

Scaffold内での細胞増殖の確認のもと、ラット頭蓋骨欠損に移植したところ、Scaffold + 骨分化刺激rDFAT群において良好な骨欠損閉鎖傾向を認めたことから、rDFATでは骨分化刺激後の細胞移植が骨再生に有効と考えられる。今後、*Ex vivo*でのrDFATの効率的な骨分化法およびrDFATを用いた効率的な骨組織再生法をさらに検討する予定である。

[研究協力者] 吉元剛彦 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野)

ヒト歯根膜線維芽細胞がヒト脱分化脂肪細胞の骨分化に及ぼす影響

日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座

○清水 豊, 佐藤 聡

Effect of human periodontal ligament cells to osteogenic differentiation of human dedifferentiated fat cells

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

○Shimizu Yutaka, Sato Soh

【目的】

現在、歯科領域では、骨髄間葉系幹細胞 (bone marrow mesenchymal stem cells : MSCs) を歯周組織再生に応用した研究が行われている。さらに歯根膜線維芽細胞 (periodontal ligament cells : PDLs) との共培養により、MSCs が歯根膜様の性質を示すことが報告されている。しかし MSCs は、採取する骨髄液中に含まれる割合がごくわずかであることや単離が困難であることなどの問題点が指摘されている。

一方、侵襲性の高い MSCs の採取に対して、より簡便に採取が可能となる脂肪組織より成熟脂肪細胞を単離、培養し脱分化することで幹細胞と同等の分化能を持った脱分化脂肪細胞 (dedifferentiated fat cells : DFATs) を得る方法が報告されている。DFATs は、MSCs と近似した細胞表面抗原発現パターンを有するため、MSCs に代わる再生療法の新たな細胞源として期待されており、また PDLs との共培養により歯根膜様細胞へ分化する可能性が考えられる。

本研究の目的は、ヒト脱分化脂肪細胞 (hDFATs) とヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDLs) の共培養を行い、hPDLs が hDFATs の分化に及ぼす影響について骨分化の観点から検討を行うことである。

【材料および方法】

hDFATsは、日本歯科大学新潟病院を受診した患者の同意を得て採取した脂肪組織より、Matsumotoらの方法を用いて調製した。hPDLsは、日本歯科大学新潟病院を受診した患者の歯科治療上抜去された歯より歯根膜組織を採取し、outgrowth法にて分離した。各細胞は、15% Fetal bovine serum (FBS) 含有Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)/F-12で、37°C、5%CO₂の条件下にて培養を行った。hDFATsおよびhPDLsは、それぞれ1.0 × 10⁵ cells/dishで単独培養を行い、共培養は、hDFATsおよびhPDLsをそれぞれ5.0 × 10⁴ cells/dishずつ播種し、コンフルエントに達するまで行った。

骨分化誘導は、骨誘導培地 (10%FBS含有DMEM/F-12, 100nM Dexamethasone, 10mM β-glycerophosphate, 50μM L-ascorbic acid-2-phosphate) にて、3週間培養を行った。骨分化誘導の評価は、1, 2, 3週目に4% Paraformaldehydeで固定後、Alizarin Red染色を行い、Alizarin Red陽性領域をNIHイメージソフトウェアImage Jで計測し、全領域に対する割合として算出した。

【結果および考察】

hDFATsの単独培養では、1, 2週目のAlizarin Red陽性領域はわずかであり、3週目で増加を示した。hDFATsとhPDLsの共培養では、1週目のAlizarin Red陽性領域はhDFATsの単独培養とほぼ同程度であったが、2週目のAlizarin Red陽性領域はhDFATsの単独培養と比較し増加を示し、3週目も同様であった。

hDFATsは、hPDLsとの共培養により、hPDLs様の骨分化を示した。hDFATsとhPDLsの共培養は、Alizarin Red陽性領域の割合を早期に増加させたことから、hPDLsがhDFATsの骨分化を促進する可能性が示唆された。

脂肪組織由来間葉系幹細胞移植による歯周組織再生治療の検討

日本大学松戸歯学部 1口腔微生物講座 2小児歯科学講座 3再生歯科診療学
4クラウンブリッジ補綴学講座 5(株)シームス

○平田亮太郎¹、荒井清司²、塚本亮一²、横田容子³、牧村英樹³、菊地信之³、染井千佳子³、
木村 功³、小林 平⁴、漆畑直樹⁵、長濱文雄³、和田守康³、前田隆秀²

Periodontal tissue regeneration applied by adipose-derived mesenchymal stem cells(AD-MSC)

Depts of ¹Microbiology and Immunology, ²Pediatric dentistry, ³Renasant dentistry, ⁴Crown and bridge prosthodontics,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo, ⁵Seems Inc.

○Ryoutaro HIRATA¹, Kiyoshi ARAI², Ryouichi TSUKAMOTO², Yoko YOKOTA³, Hideki MAKIMURA³, Nobuyuki KIKUCHI³, Chikako SOMEI³,
Koh KIMURA³, Taira KOBAYASHI⁴, Naoki URUSHIHATA⁵, Fumio NAGAHAMA³, Moriyasu WADA³, Takahide MAEDA²

【緒言】

現在、歯科領域における歯周組織再生治療としては骨髄由来間葉系幹細胞 (BM-MSC) を分離・培養し、各種骨芽細胞誘導因子により分化・誘導した後、歯槽骨吸収部位への細胞移植が広く研究されている。しかしながら、BM-MSC は骨髄液を採取するため患者に対する負担が非常に大きく、またその細胞を培養・増殖する際には血清を用いる必要があり、生物材料由来ウィルス感染の危険が伴っていた。

そこで今回、我々はこの欠点を持たない、同じ間葉系幹細胞の1つである脂肪由来間葉系幹細胞 (AD-MSC) に着目し、実験的 SD ラット歯周炎モデルに対して、SD-Tg(CAG-EGFP)ラット由来 AD-MSC を歯周組織にスキャホールドと共に移入し、AD-MSC の動態および歯周組織再生について検討を行ったところ興味ある知見を得たので報告する。

【方法】

1. 実験的ラット歯周炎モデルの作成

streptomycin(SM) 1mg/ml 耐性 *Actinomyces naeslundii*(A.n) を作成し供試菌株とした。3週齢 SD ラットを用い、供試菌株を感染・定着させ歯周炎を惹起させ2ヶ月間にわたり飼育し、マイクロ CT にて歯槽骨の吸収を確認した。歯槽骨吸収確認後、抗菌薬を用いて感染菌を排除し、実験的ラット歯周炎モデルとした。

2. SD-Tg(CAG-EGFP)ラット由来 AD-MSC の単離・培養

10週齢 SD-Tg(CAG-EGFP)ラットより AD-MSC を単離・培養を行った。単離・培養は(株)seems に依頼した。

3. AD-MSC の移植

実験群に対して、1週間毎に4回、ペントバルビタール腹腔内麻酔による全身麻酔のもと、スキャホールドと共に SD-Tg(CAG-EGFP)由来 AD-MSC を移入した。同様に、スキャホールドのみを移入したものをコントロール群とした。

4. マイクロ CT による歯槽骨の改善効果の検討

SD-Tg(CAG-EGFP)由来 AD-MSC を1回目移入1週間後から、2週毎に全身麻酔下にて、マイクロ CT にて歯槽骨吸収の改善効果を検討した。

5. 歯周組織再生効果病理組織学検討

SD-Tg(CAG-EGFP)由来 AD-MSC 最終移入から12週間後、炭酸ガスにて安楽死させヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色および蛍光顕微鏡において病理学的検討を行った。

【結果・考察】

マイクロ CT および病理組織学検討から、実験群においてコントロール群に比較して若干の骨増生が認められた。また、病理組織像において実験群においてコントロールと比較して骨増生が認められ、さらに炎症性細胞の減少が認められた。蛍光顕微鏡においては、移入部位での顕著な発光は認められなかった。このことから、移入細胞が直接、周辺組織へ定着・分化している可能性は少ないことが示唆された。しかし、歯槽骨の増生ならびに炎症性細胞の減少が認められたことから、歯周組織再生治療における AD-MSC の有用性が示唆された。今後、AD-MSC 移入の回数、細胞数、スキャホールド、移入方法などの更なる検討を加え、より効率的な歯周組織再生治療を確立したいと考える。

スフィンゴシン-1-リン酸が未分化間葉系幹細胞において 骨芽細胞分化および脂肪細胞分化に及ぼす影響

九州大学大学院歯学研究院 歯周病学分野

○橋本陽子、松崎英津子、濱地貴文、東 克匡、平塚俊志、小林茉莉、前田勝正

The effects of sphingosine-1-phosphate on osteoblast and adipocyte differentiation in C3H10T1/2 cells

Department of Periodontology, Faculty of Dental Sciences, Kyushu University

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

【研究目的】

血漿中に多く存在するスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、脂質メディエーターの一つであり、種々の細胞に対し、増殖、運動・形態調節、分化など多彩な作用を及ぼす。骨組織においては、S1P が破骨細胞前駆細胞に作用し、骨吸収を抑制することが報告されている。また我々は、骨芽細胞において、S1P による Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の活性化と、骨形成促進作用の可能性を見出した (第 136 回日本歯科保存学会 2012 年度春季学術大会)。

Wnt シグナル伝達経路は、初期発生、形態形成、出生後の細胞の増殖・分化・運動、がんなどを制御する。Wnt/ β -カテニン経路が標準経路として知られているが、この経路は、骨芽細胞分化・骨形成にも重要な役割を果たしている。また、未分化間葉系幹細胞の分化において、 β -カテニン経路の活性化は、骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現増加と、それに伴う脂肪細胞分化マーカー遺伝子の発現抑制を引き起こす。一方、 β -カテニン経路の不活性化により、骨芽細胞への分化は抑制され、脂肪細胞への分化が促進されるという報告もある。

本研究では、マウス未分化間葉系幹細胞である C3H10T1/2 細胞に骨芽細胞および脂肪細胞への分化誘導を行い、S1P が未分化間葉系幹細胞の分化に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

実験には、マウス未分化間葉系幹細胞である C3H10T1/2 を用いた。試薬として、S1P (0.1-1.0 μ M, BIOMOL) を用いた。骨芽細胞分化誘導には、デキサメタゾン (和光純薬)、アスコルビン酸 (ナカライテスク)、 β -グリセロリン酸 (和光純薬) を、脂肪細胞分化誘導には、AdipoInducer Reagent (タカラバイオ) を用いた。

mRNA 発現については、real-time RT-PCR 法を用いて検討した。また、石灰化および脂肪化については、それぞれ Alizarin red 染色法および Oil red O 染色法を用いて検討した。

【結果および考察】

S1P は、骨芽細胞分化誘導を行った C3H10T1/2 細胞において、骨芽細胞の分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (ALP) およびオステオカルシン (OC) の mRNA 発現を増加させ、石灰化を促進した。一方、脂肪細胞への分化誘導を行った場合、S1P は、脂肪細胞の分化マーカーである PPAR γ 、FABP4 (α 2) mRNA の発現を濃度依存性に減少させ、脂肪滴の形成を抑制した。

以上の結果から、未分化間葉系幹細胞である C3H10T1/2 細胞において、S1P は骨芽細胞への分化を促進し、脂肪細胞への分化を抑制することが示唆された。ALP や OC は Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の標的遺伝子であることから、S1P の添加によるこれらの遺伝子発現の増加は、Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介している可能性があるが、S1P の作用メカニズムに関しては、さらなる研究が必要である。

【結論】

未分化間葉系幹細胞 C3H10T1/2 において、S1P は、脂肪細胞分化を抑制し、骨芽細胞分化を促進させる可能性が考えられる。

CTGF が未分化なヒト歯根膜細胞株の骨芽細胞様分化に及ぼす影響

¹九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野
²九州大学病院歯内治療科, ³大阪大学大学院医学系研究科分子病態生化学
○祐田明香¹, 前田英史², 藤井慎³, 門野内 聡¹, 山本直秀¹, 和田尚久², 郡 勝明¹, 河野清美²,
寺松陽子¹, 濱野さゆり¹, 長谷川大学¹, 赤峰昭文^{1,2}

The effect of Connective Tissue Growth Factor on osteoblast-like differentiation of an undifferentiated Human Periodontal Ligament Cell Line

¹Department of Endodontology and Operative Dentistry, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University,

²Department of Endodontology, Kyushu University Hospital,

³Department of Molecular Biology and Biochemistry, Graduate School of Medicine, Osaka University

○ Asuka Yuda¹, Hidefumi Maeda², Shinsuke Fujii³, Satoshi Monnouchi¹, Naohide Yamamoto¹, Naohisa Wada², Katsuaki Koori¹, Kiyomi Kono², Yoko Teramatsu¹, Sayuri Hamano¹, Daigaku Hasegawa¹ and Akifumi Akamine^{1,2}

【目的】 Connective Tissue Growth Factor (CTGF) は、増殖、運動、分化促進など、多様な生物学的活性を持つタンパク質であることが知られている。近年、Transforming Growth Factor-beta1 (TGF-β1) は歯根膜細胞におけるCTGFの発現を促進し (Takeuchi et al., 2009)、また、CTGF は骨髄間葉系幹細胞の骨芽細胞分化及び石灰化を促進することが報告されている (Wang et al., 2009)。しかしながら、CTGF が未分化な歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響に関しては十分な解析はなされていない。そこで本研究では、ヒト歯根膜組織におけるCTGFの発現とCTGFが未分化なヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化に及ぼす影響について解析した。

【材料及び方法】 (1) ヒト歯根膜細胞におけるTGF-β1添加後のCTGF遺伝子発現解析: 健全歯の抜歯を目的として本院を受診した2名の患者様(21歳女性及び24歳男性)より歯根膜組織を採取し、3-5継代培養した細胞(HPDLC)、ならびに当研究室にて樹立した未分化なヒト歯根膜細胞株(1-11細胞株: Fujii et al., 2008)を本研究に供した。細胞は10%Fetal Bovine Serum含有α-MEM(10%FBS/α-MEM)中で培養した。これらの細胞にTGF-β1(1ng/ml)を添加し、定量的RT-PCR法にてCTGF遺伝子発現について解析した。なお本研究は、九州大学大学院歯学研究院倫理委員会規定の認可を得て患者様の同意の上で行われた。

(2) 歯根膜組織におけるCTGF発現の免疫組織化学的解析: 雄性SDラット(5週齢)上顎第一臼歯部の組織切片を作製し、抗CTGF抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いて免疫組織化学的染色を行った。

(3) ヒト歯根膜細胞におけるCTGF添加後の骨関連遺伝子発現解析: 1-11細胞株を、石灰化誘導培地(2mM beta-glycerophosphate および50μg/ml ascorbic acid含有10%FBS/α-MEM)中にCTGF(0, 1, 10, 100ng/ml)を添加し、1~3週間培養後、定量的RT-PCR法にて骨関連遺伝子(alkaline phosphatase (ALP), bone sialoprotein (BSP), osteopontin (OPN), osteocalcin(OCN))の遺伝子発現の解析を行った。

【結果】 (1) HPDLCならびに1-11細胞株においてTGF-β1添加後、CTGF遺伝子発現が有意に上昇した。また発現量の比較を行った結果、1-11細胞株よりもHPDLCで高い発現が認められた。(2) 抗CTGF抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った結果、歯根膜組織全体にわたり陽性反応が認められた。(3) 1-11細胞株においてCTGF 100ng/mlにて1週間刺激を行った結果、無刺激群と比較し、ALPは約2.1倍、BSPは約1.7倍、OPNは約1.4倍、OCNは約1.4倍に発現が有意に上昇した。また、CTGF 10ng/mlにて3週間刺激を行った結果、無刺激群と比較し、BSPが約1.5倍、CTGF 100ng/mlではOCNは約1.6倍に発現が有意に上昇した。

【考察】 以前私達は、歯根膜組織全体においてTGF-β1が強発現することを報告しており(Fujii et al., 2010)、さらに今回、TGF-β1はHPDLCにおいて1-11細胞株よりもCTGFの遺伝子発現を強く促進することが明らかになった。またCTGFは歯根膜組織全体に発現が観察された。以上のことから、歯根膜細胞はTGF-β1を発現しautocrineまたはparacrineに働いてCTGFを発現することが示唆された。一方、1-11細胞株においてCTGF刺激を行った結果、骨関連遺伝子が上昇したことから、歯根膜細胞より分泌されたCTGFが未分化な歯根膜細胞に働き骨芽細胞分化を誘導することが示唆された。しかしながら、歯根膜組織は石灰化を起こさないことから、CTGFによる未分化な歯根膜細胞の骨芽細胞分化を抑制する因子が存在する可能性が考えられた。現在私達はその因子についても探索を行っている。

【結論】 CTGFは歯根膜組織中に局在し、またTGF-β1は歯根膜細胞におけるCTGFの発現を促進した。さらにCTGFは1-11細胞株の骨芽細胞様分化を促進することが明らかになった。

β2 アドレナリン受容体の非作動薬である Propranolol がヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響

¹九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野、²九州大学病院歯内治療科
○濱野さゆり¹、前田英史²、友清 淳²、山本直秀¹、門野内 聡¹、和田尚久²、河野清美²、郡 勝明¹、寺松陽子¹、
長谷川大学¹、祐田明香¹、赤峰昭文¹²

The effect of beta2-adrenergic receptor antagonist, propranolol on osteoblast-like differentiation of human periodontal ligament cells

¹Department of Endodontology and Operative Dentistry, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University, ²Department of Endodontology, Kyushu University Hospital
○Sayuri Hamano¹), Hidefumi Maeda²), Atsushi Tomokiyo²), Naohide Yamamoto¹), Satoshi Monnouchi¹), Naohisa Wada²), Kiyomi Kono²), Katsuaki Koori¹), Yoko Teramatsu¹), Daigaku Hasegawa¹), Asuka Yuda¹), Akifumi Akamine¹⁾²)

【研究目的】アドレナリン受容体(AR)は体内における神経伝達物質であるノルアドレナリンおよびストレスホルモンであるアドレナリンが作用する受容体である。その中でもβ2 アドレナリン受容体(β2-AR)を介したシグナルは骨のリモデリングに深く関わっており、β2-AR の非作動薬をマウスに投与することで骨形成が促進されるという報告がある(Yirmiya et al., 2006)。しかしながら現在のところ、β2-AR の非作動薬がヒト歯根膜細胞(HPDLCs)においてどのような影響を与えるのかについては解明されていない。そこで本研究では、(1)HPDLCs におけるβ2-AR の発現、ならびに(2) β2-AR の非作動薬である Propranolol (PRL)がHPDLCs に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】矯正治療を目的に本院を受診し、本研究に同意を得られた 5 名の患者様より抜去歯牙を得たのち歯根膜組織を採取し、10%Fetal Bovine Serum 含有のα-MEM(10%FBS/ α-MEM)にて4-7 継代培養した細胞をHPDLC-2G(30 歳女性)、-2H(22 歳女性)、-2I(14 歳男性)、-3Q(21 歳女性)、-3S(23 歳男性)として本研究に用いた。(1)これらを用いて、半定量的 RT-PCR 法にて9 種類のAR(α1A, α1B, α1D, α2A, α2B, α2C, β1, β2, β3)の発現について比較検討した。次にHPDLCs に0%、8%または20%の伸展刺激を与え、β2-AR の遺伝子発現について解析した。また、正常ラット(5 週齢、雄性、SD ラット)の下顎臼歯部の組織切片を用いてβ2-AR 抗体による免疫組織化学的染色を行った。(2)HPDLCs をPRL(0, 10⁻⁷ ~10⁻⁵ M)の存在下で石灰化誘導培地(β-glycerophosphate, ascorbic acid 含有 10%FBS/ α-MEM)にて培養後にALP 活性、Alizarin red 染色ならびに半定量的 RT-PCR 法にて骨関連遺伝子(BMP2, OPN, OCN)発現について解析した。なお本研究は九州大学大学院歯学研究院倫理委員会の許可を得て、患者様の同意の上で行った。

【結果】(1)HPDLCs における各種AR の遺伝子発現を解析した結果、β2-AR の遺伝子発現が最も強かった。一方で、HPDLCs におけるα1D およびβ1-AR の遺伝子発現は認められなかった。また、0%の伸展刺激と比較して、8%の伸展刺激ではβ2-AR の遺伝子発現の上昇は認められなかったが、20%の伸展刺激では遺伝子発現が有意に上昇した。さらに、β2-AR 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った結果、歯根膜組織全体に陽性反応が認められたが、特に根尖付近のセメント芽細胞および骨芽細胞において強い陽性反応が観察された。(2)PRL 存在下の石灰化誘導培地にて1 週間培養したHPDLCs では、刺激群全てにおいてALP 活性の有意な上昇が認められた。また同培地にて3 週間培養後には、PRL10⁻⁵M 刺激にて最も強いAlizarin red 陽性反応が認められ、さらにBMP2, OPN, OCN の遺伝子発現も有意に上昇した。

【考察】HPDLCs では、9 種類のAR の中でもβ2-AR が、アドレナリンおよびノルアドレナリンのシグナル伝達に関与していると推察された。また8%の伸展刺激では変化がなかったが、20%の伸展刺激でβ2-AR の遺伝子上昇が認められたことから、HPDLCs への機械的刺激の増幅に応じてβ2-AR の発現が上昇すると考えられた。さらに、PRL はHPDLCs において骨芽細胞分化を促進することが示唆された。以上より、HPDLCs ではアドレナリンおよびノルアドレナリンがβ2-AR を介して骨芽細胞分化を調整する可能性があると考えられた。またマウスの肝細胞でβ2-AR を過剰発現させることにより作動薬と同様の効果が得られたという報告(Ghosh et al., 2012)があることから、HPDLCs におけるβ2-AR の上昇は作動薬の働きを増強させると思われる。したがって、今後はHPDLCs におけるβ2-AR の作動薬の影響についても検討が必要であると考えている。

【結論】(1)ヒト歯根膜細胞ではβ2-AR の遺伝子発現が最も高く、20%の伸展刺激によってその遺伝子発現は上昇した。また歯根膜組織の細胞はβ2-AR を発現し、さらに根尖付近のセメント芽細胞および骨芽細胞に、より強く発現することが分かった。(2)PRL はヒト歯根膜細胞の骨芽細胞分化を誘導することが分かった。

分化能の異なるヒト歯根膜細胞クローンの単離及びキャラクタライゼーション

¹九州大学病院 歯内治療科、²九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、

³大阪大学大学院医学系研究科 分子病態生化学研究分野

○長谷川大学²、和田尚久¹、前田英史¹、藤井慎介³、郡 勝明²、友清 淳¹、門野内 聡²、
河野清美¹、山本直秀²、寺松陽子²、濱野さゆり²、祐田明香²、赤峰昭文^{1,2}

The isolation and characterization of multi-potential and low-differential potential clonal populations of human periodontal ligament cell line.

¹Department of Endodontology, Kyushu University Hospital,

²Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University,

³Department of Molecular Biology and Biochemistry, Graduate School of Medicine, Osaka University

○Daigaku Hasegawa², Naohisa Wada¹, Hidefumi Maeda¹, Shinsuke Fujii³, Katsuaki koori²,
Atsushi Tomokiy¹, Satoshi Monnouchi², Kiyomi Kono¹, Naohide Yamamoto², Yoko Teramatsu²,
Sayuri Hamano², Asuka Yuda², Akifumi Akamine^{1,2}

【研究目的】

近年、歯周組織再生の手段として歯根膜幹細胞が有用であるということが報告されているが、いまだその実用化には至っていないのが現状である。その理由の一つとして、歯根膜幹細胞に特異的なマーカー分子に関する報告が少ないため、歯根膜幹細胞を効率よく分離あるいは誘導する方法が確立されていないことが挙げられる。そこで、歯根膜幹細胞に特異的なマーカー分子の同定および機能解析に有用なヒト歯根膜細胞クローンの樹立を目的として、不死化した歯根膜細胞から得られた各細胞クローンのキャラクタライゼーションを行った。

【材料および方法】

1. 分化アッセイ系(骨芽細胞、脂肪細胞および軟骨細胞分化誘導)を用いた分化能の比較検討

当研究室にて樹立したヒト不死化歯根膜細胞 (Fujii et al., 2006) から限外希釈法により単離した 22 個のクローン細胞株を各々石灰化誘導培地、脂肪誘導培地、軟骨誘導培地にて 4 週間培養し、それぞれアリザリンレッド染色法、オイルレッド O 染色法、アルシアンブルー染色法にて石灰化物、脂肪滴、軟骨様組織の形成能を比較した。

2. 定量的 RT-PCR 法およびフローサイトメトリック分析法を用いた幹細胞マーカー発現の比較検討

各分化アッセイにおいて分化能を示した細胞クローン群と分化能を示さなかった細胞クローン群について、幹細胞マーカー因子 (OCT4, NANOG, N-cadherin, endoglin[CD105]) および神経堤細胞マーカー因子 (SLUG, CD49D, p75NTR) の発現を定量的 RT-PCR 法にて比較した。さらに、フローサイトメトリック分析法を用いて間葉系幹細胞表面抗原マーカー (CD73, CD90, CD105, CD146, CD166) の発現を比較した。

【結果】

1. 各種分化アッセイの結果、全ての分化実験において石灰化物、脂肪滴および軟骨様組織の形成を示した“多分化能を有する細胞クローン”と、いずれにおいても形成を示さなかった“分化能が低い細胞クローン”に分類することができた。その中で特に顕著な結果を示したクローンをそれぞれ 2 種類ずつ計 4 種類、抽出した。
2. 上記 4 種類の細胞クローンの幹細胞マーカーの発現を比較した結果、多分化能を有する細胞クローンにおける OCT4, NANOG, N-cadherin, endoglin, SLUG, CD49D, p75NTR の発現量が、分化能が低い細胞クローンよりも有意に多いという結果を得た。さらに、間葉系幹細胞表面抗原マーカー発現比較の結果、多分化能を有する未分化な細胞クローン 2 種類において CD73, CD90, CD105, CD146, CD166 の発現強度が、分化能の低い細胞クローン 2 種類と比較して有意に高いことが認められた。

【考察および結論】

今回の結果から、ヒト歯根膜細胞株の中には“多分化能を有する未分化な歯根膜幹細胞クローン”や“分化能が著しく低い歯根膜幹細胞クローン”など分化ステージの異なる細胞が混在していることが明らかになった。今後、この 2 種類の歯根膜幹細胞クローンの遺伝子あるいはタンパク発現量の差を網羅的に解析していくことにより、歯根膜幹細胞集団に特異的なマーカー分子の同定および機能解析を行うことができると推察される。一方、“分化能が著しく低い歯根膜幹細胞クローン”は、その分化能が低い特徴を利用することにより、様々な因子を用いた分化誘導実験等に有用なツールになり得ると思われる。

グラフェンおよび酸化グラフェンによる象牙質コーティング法の検討

¹北海道大学大学院歯学研究科歯周・歯内療法学教室

²三菱ガス化学株式会社

○西田絵利香¹, 宮治裕史¹, 辻 妹井子², 田中佐織¹, 金山和泉¹, 川浪雅光¹

Evaluation of dentin coating condition using graphene and graphene oxide

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

²Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc

○NISHIDA Erika¹, MIYAJI Hirofumi¹, TSUJI Maiko², TANAKA Saori¹, KANAYAMA Izumi¹, KAWANAMI Masamitsu¹

【研究目的】

近年、ナノ材料のバイオマテリアルへの応用が進んでいる。グラフェン(G)および酸化グラフェン(GO)はカーボンの単層ナノシートであり、官能基の有無や導電性の違いがある。また近年、抗菌性や細胞付着性、タンパク吸着性などの多様な特性があることが報告されている。したがって、GまたはGOで歯根面をコーティングすることができれば、新しい歯科治療法につながる可能性がある。そこで本研究では、GおよびGOを用いて象牙質表面のコーティングを行い、コーティング状態を評価した。

【材料および方法】

GO分散液には nanoGRAX (R) (1wt%, 三菱ガス化学株式会社, 東京) を用いた。原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて GO の単層性を確認した。GO 分散液を 35mm 培養用ディッシュに塗布し乾燥させ GO フィルムを作製した。またそれを 2% ハイドロサルファイド溶液で還元処理して G フィルムとした。G および GO フィルムの通電性を評価した。

牛歯健全象牙質ブロックを作製後、研磨して 10%EDTA にて表面を清掃した。GO 分散液を蒸留水または有機溶剤であるメチルピロリドン (NMP) にて 10 倍希釈したコーティング液を作製して、象牙質ブロックをコーティング処理し、それぞれ GO/水、GO/NMP 試料とした。またコーティング処理後に還元処理したものを作製して G/水、G/NMP 試料とした。それぞれについて肉眼的観察および SEM 観察を行った。また、コーティングの安定性を評価するために、コーティング後に各試料を蒸留水中にて超音波洗浄 (20 秒) した後に SEM 観察した。

【結果と考察】

AFM 観察から酸化グラフェンフィルムの厚みは 0.4-0.8 nm であった。また GO は還元処理を行うと分散性を失い凝集した。通電性は G のほうが良好で GO はほぼ絶縁状態であった。

象牙質のコーティングの結果、G および GO によるコーティングは非常に薄く、G コーティングでは象牙質が若干黒変したが GO では象牙質の色調変化をほとんど認めなかった。コーティング後の SEM 観察の結果、GO/水および G/水では象牙質表面にフィルムの形成を認め、象牙細管も完全に封鎖されたが、超音波洗浄によって除去された。特に G/水の試料ではほとんど除去されたことを観察した。一方、GO/NMP では GO/水コーティングに比較して皸も少なく、きれいにフィルムが定着したのを認め、象牙細管も封鎖された。さらに、超音波洗浄後の除去量も少なく、象牙細管も封鎖されたままであった。これは NMP の強い浸透性によって、コーティングの深度が大きいためと考えられた。G/NMP では GO/NMP と同様にコーティングされていたが、超音波洗浄によって一部のフィルムが除去されているのが観察され、象牙細管の開口も認めた。還元処理によって象牙質上のグラフェンが強く凝集し、付着性に変化を与えたものと考えられた。

【結論】

G および GO によって象牙質表面をコーティングすると、象牙質表面にフィルムが形成され象牙細管が封鎖された。GO/NMP でコーティングを行うと超音波洗浄による除去量も少なく、安定したコーティングが得られた。

S-PRG 溶出液と S-PRG 配合歯面研磨剤の口腔バイオフィーム形成への影響

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

○榊尾陽介¹、鈴木奈央¹、米田雅裕²、安 忠大¹、仲西宏介¹、藤本暁江¹、伊波幸作¹、瀬野恵衣¹、
山田和彦¹、岩元知之¹、廣藤卓雄¹

Effects of S-PRG eluate and S-PRG-containing prophylactic paste on oral biofilm-formation

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

²Center for Oral Diseases, Fukuoka Dental College

○Masuo Y¹、Suzuki N¹、Yoneda M²、Yasu T¹、Nakanishi K¹、Fujimoto A¹、Iha K¹、Seno K¹、Yamada K¹、
Iwamoto T¹、Hirofuji T¹

【研究目的】界面機能性ガラス surface pre-reacted glass-ionomer (S-PRG) はデンタルプラークに強い歯科材料として注目されている。われわれはこれまでに S-PRG 溶出液を利用して、口腔内細菌の付着能や酵素活性、細菌間の共凝集に及ぼす影響について検討を加えてきた。そのなかで口腔内細菌の付着能に対しては、S-PRG 溶出液にう蝕原因菌 *Streptococcus mutans* の付着能に対して阻害作用があること、その他の細菌については種類によって多様性がみられることがわかった。本研究では、デンタルプラーク形成過程における S-PRG 溶出液および S-PRG 配合歯面研磨剤 (PRG イオンサブライ) の影響を調べるために、唾液中の細菌を利用したバイオフィームモデルを使って *in vitro* で検討した。

【対象および方法】

1.S-PRG 溶出液がバイオフィーム形成に与える影響

反応液中の S-PRG 濃度が 0%、20%、40%、60%、80% となるようにリン酸緩衝液で調製し、安静時唾液 : S-PRG 溶液 = 1 : 10 の割合で反応液を作製した。反応は 96 マイクロウェルプレートで行い、37°C で嫌氣的 24 時間反応後、上清を除去し、PBS で洗浄後、0.25% サフラニンで 15 分間染色し、再度 PBS で洗浄後、99% エタノールで抽出し、吸光度 (492 nm) を測定した。

2.PRG イオンサブライがバイオフィーム形成に与える影響

PRG イオンサブライについては、持続的なイオン放出効果を評価するために、長期的にバイオフィーム形成を行った。まず、PRG イオンサブライ 0 (0%)、1-1 (1%)、1-5 (5%)、1-30 (30%) を滅菌綿棒で 96 マイクロウェルプレートに均一に塗布し、人口唾液で洗浄後、安静時唾液 : 人工唾液 = 1 : 10 の割合で反応液を作製し、嫌氣的条件 37°C で一日 2 回人工唾液を交換し、72 時間後に形成されたバイオフィームを 0.25% サフラニンで染色して評価した。

3.口腔内細菌に対する抗菌作用

安静時唾液を塗布した寒天培地に直径 6 mm の穴を開け、段階希釈した S-PRG 溶出液ならびに PRG イオンサブライ 0、1-1、1-5、1-30 を加えた後、37°C で好氣的 24 時間、嫌氣的 48 時間培養し、阻止円を観察した。また、1 と同条件の反応液の上清と懸濁液を寒天培地に塗布し、37°C で嫌氣的に 48 時間培養後、コロニーカウントを行った。

【結果と考察】S-PRG 溶出液のバイオフィーム形成に与える影響については、濃度依存的にバイオフィーム形成が抑制され、いずれの反応液も 0% のコントロールに比較して有意に低い値であった (図 1)。PRG イオンサブライについても濃度依存的にバイオフィーム形成阻害がみられ、特に 1-5 (5%) と 1-30 (30%) は S-PRG 無配合 PRG イオンサブライ 0 と比較して統計的に有意な阻害作用を認めた (図 2)。口腔内細菌に対する抗菌力の評価では、好氣的・嫌氣的いずれの条件においても S-PRG 溶出液は阻止円を作らなかった。PRG イオンサブライでは無配合の 0 も阻止円を作ったが阻止円の大きさは 0 < 1-1 < 1-5 = 1-30 であった。24 時間反応後の生菌数の評価では、上清、懸濁液いずれにおいても S-PRG 濃度依存的にコロニー数が減少した。このことから、口腔内には S-PRG に対して感受性の低い菌種も存在するが、全体的には S-PRG 濃度依存的に反応液中の細菌数が減少しており、S-PRG によるバイオフィーム形成阻害は、S-PRG の抗菌作用やこれまでに報告した *S. mutans* の付着や歯周病細菌の共凝集に対する阻害作用などが関与して起こることが推測される。

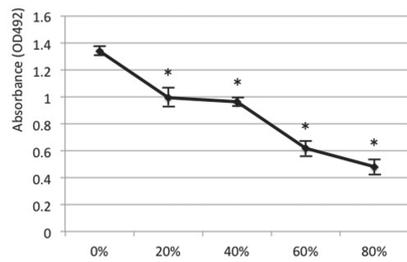


図1. S-PRG溶出液のバイオフィーム形成阻害能
* P < 0.05 vs. 0%

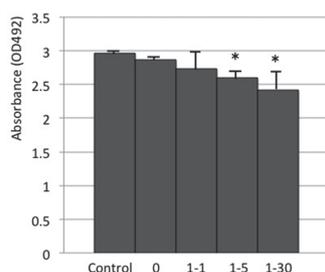


図2. PRGイオンサブライのバイオフィーム形成阻害能
* P < 0.05 vs. PRGイオンサブライ0

歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* 感染が肝臓糖代謝に及ぼす影響

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野¹, 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
口腔保健教育学分野², 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯科保存学分野³,
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔微生物学分野 日本学術振興会特別研究員 PD⁴
○石川真琴¹, 吉田賀弥², 藤原奈津美¹, 細川義隆³, 細川育子⁴, 尾崎和美¹

Effects of *Porphyromonas gingivalis* infection on hepatic glycogen synthesis

Department of Oral Health Care Promotion¹, Oral Health Care Education², Conservative Dentistry³,
The University of Tokushima Graduate School, Department of Oral Microbiology,
The University of Tokushima Graduate School, JSPS Research Fellow⁴

○Makoto Ishikawa¹, Kaya Yoshida², Natsumi Fujiwara¹, Yoshitaka Hosokawa³, Ikuko Hosokawa⁴, Kazumi Ozaki¹

【研究目的】

近年, *Porphyromonas gingivalis* の慢性感染が発症の重要因子の一つである歯周炎が, 様々な全身疾患の発症あるいは増悪に関連することが示唆されている。また, 口腔由来の *P. gingivalis* が肝臓や卵管など遠隔臓器に形成された膿瘍から検出されることが報告されている。*P. gingivalis* 感染による遠隔臓器の変化, 特に糖尿病と歯周炎の関連性という観点から肝臓糖代謝調節について解析することは, 臨床的にも意義深いと考えられる。そこで本研究では, *P. gingivalis* 感染の肝臓糖代謝に及ぼす影響を *in vivo* ならびに *in vitro* で検討した。

【材料および方法】

1. SNAP26b 発現 *P. gingivalis* 形質転換株 (以下, *Pg*-SNAP) の作製: 歯周病モデルマウスの作製に用いる *Pg*-SNAP は Nicolle らの方法 (Nicolle et al. FEMS Immunol Med Microbiol, 2010) に準じて作製した。
2. 歯周病モデルマウスの作製および解析: 6~8 週齢の Balb/c マウスに 2%カルボキシメチルセルロースを含む PBS で調製した *Pg*-SNAP の菌液 (10⁹CFU/ml) を 3 日毎に 10 回, 経口的に感染させることで歯周病モデルマウスを作製した。感染前後の歯槽骨吸収を X 線マイクロ CT で計測すると共に, 感染終了時に摘出した肝臓を出発材料として DNA 抽出および nested PCR を行い *Pg*-SNAP の存否を検索した。
3. *Pg*-SNAP 感染 HepG2 細胞 (ヒト肝癌由来樹立細胞株) の作製および各種解析: FBS 添加 D-MEM (抗生剤無) で培養した HepG2 に *Pg*-SNAP を添加し 2~6 時間培養した。一部の HepG2 には培養途中で Insulin (100nM) を添加した。培養終了後にタンパク質を抽出し, ウェスタンブロットによって Akt/GSK-3 β シグナル経路上で機能する各種情報伝達分子の発現を解析すると共に, PAS 染色で *Pg*-SNAP 感染 HepG2 のグリコーゲン合成量を検索した。また *Pg*-SNAP あるいは野生型 *Pg* (*Pg*-WT) の HepG2 への侵入能を, Invasion assay および三次元培養モデルを用いた電子顕微鏡的解析を行った。

【結果および考察】

1. 歯周病モデルマウスを用いた解析において, *Pg*-SNAP 感染による歯槽骨吸収が認められると共に, 摘出した肝臓から *Pg*-SNAP 由来の DNA (*SNAP26b gene*) を検出した。
2. HepG2 を用いた Invasion assay ならびに電子顕微鏡的解析から, HepG2 への *Pg*-SNAP あるいは *Pg* WT の侵入が示唆された。また, Insulin 刺激による HepG2 の Akt ならびに GSK-3 β のリン酸化は *Pg*-SNAP を感染させることによって共に阻害された。一方, *Pg*-SNAP の感染により HepG2 細胞における GS (Glycogen synthase) のリン酸化レベルが上昇することが確認された。さらに PAS 染色により, Akt/GSK-3 β シグナル経路の各種情報伝達分子の発現変化を反映した HepG2 細胞のグリコーゲン合成量の減を確認した。

以上の結果から, *P. gingivalis* 経口感染による肝臓への translocation ならびに肝細胞内への侵入の可能性が示唆されると共に, 糖代謝調節に関わる細胞内シグナル伝達経路に影響を与えることが示された。今後は, 肝臓糖代謝と密接に関連し, かつ歯周炎との関連性という観点から肝細胞の脂質代謝への影響についても検討していく予定である。

[会員外共同研究者] 岡村裕彦 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔組織学分野)

Adrenomedullin が樹状細胞の Th17 関連サイトカイン産生に関与する cell signaling に及ぼす影響

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔微生物学分野 日本学術振興会特別研究員 PD

²⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯科保存学分野

³⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野

○細川育子¹⁾、細川義隆²⁾、尾崎和美³⁾、松尾敬志²⁾

The effect of adrenomedullin on Th17-related cytokines production from human dendritic cells

¹⁾Department of Oral Microbiology, The University of Tokushima Graduate School, JSPS Research Fellow,

²⁾Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School,

³⁾Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School

○Ikuko Hosokawa¹⁾, Yoshitaka Hosokawa²⁾, Kazumi Ozaki³⁾, and Takashi Matsuo²⁾

【研究目的】

近年、新規ThサブセットであるTh17細胞の存在が明らかにされ、関節リウマチといった炎症性疾患における骨吸収に関与していることが報告されている。また、歯周炎病態形成においても、Th17細胞の分化および増殖を制御するサイトカインの存在も明らかにされており、Th17細胞の関与が示唆されている。一方、Adrenomedullin(AM)は、血管拡張を介した降圧作用をはじめとした多くの生理活性を有することが知られるペプチドであるが、近年、抗炎症作用をもった内在性の免疫調節因子として作用することが報告されている。我々は、これまでにAMがTh17細胞の分化、活性化および増殖に関わることが報告されているサイトカインに着目し、TLR-4 ligand (LipidA)刺激により誘導されたヒト末梢血由来樹状細胞からのIL-23、IL-6およびIL-1 β 産生はCCLR/RAMP2の複合体レセプターを介したAMにより抑制されることを本学会（第131回秋季学術大会）にて報告した。そこで、今回これらのサイトカイン産生抑制に関わるシグナル伝達機構に関する検討を加えたので報告する。

【材料および方法】

健康人末梢血より単核球を遠心分離後、磁気ビーズ(MACS)を用いてCD14陽性細胞を分離した。このCD14陽性細胞をGM-CSF(50ng/ml)およびIL-4(50ng/ml)存在下において10%FBSを含むRPMI1640培地にて5%CO₂、37°Cの条件下で7日間培養し、未成熟樹状細胞へ分化させ実験に用いた。未成熟樹状細胞をAM存在下あるいは非存在下においてTLR-4 ligand (Lipid A) で刺激し、IL-23、IL-6およびIL-1 β 産生をELISA法にて、cAMP産生はEIA法にて、樹状細胞内のAkt、JNKおよびI κ B- α のリン酸化についてはWestern blot法を用いて解析した。

【成績】

Lipid A 単独刺激では、ヒト末梢血単核球由来樹状細胞内の cAMP の産生は認められなかったが、AM 単独あるいは AM および Lipid A の共刺激では、細胞内 cAMP の産生が認められた。また、AM が抑制した Lipid A により誘導された IL-23、IL-6 および IL-1 β 産生は、Protein kinase A (PKA)阻害物質である Rp8Br-cAMP により回復した。

Lipid A 刺激による IL-23 産生は、Akt および NF- κ B の阻害物質で、IL-6 および IL-1 β 産生は Akt、JNK および NF- κ B の阻害物質で抑制された。また、Lipid A 刺激により、Akt、JNK および I κ B- α のリン酸化が認められ、さらにAMを加えることにより、60分後においてこれらのリン酸化すべてが抑制された。さらに、Lipid A による刺激から 60 分後の AM に抑制された I κ B- α のリン酸化は PKA 阻害物質により活性化されたが、AM に抑制された Akt および JNK のリン酸化には変化が認められなかった。

【考察および結論】

これらの結果より、AM は Akt および I κ B- α のリン酸化を抑制することにより Lipid A が誘導するヒト末梢血単核球由来樹状細胞の IL-23 産生を、また Akt、JNK および I κ B- α のリン酸化を抑制することにより、IL-6 および IL-1 β 産生を抑制することが明らかとなった。さらに、AM は Lipid A により誘導された IL-23、IL-6 および IL-1 β 産生を cAMP/PKA の経路を介して抑制しており、cAMP/PKA の経路を活性化した AM は、I κ B- α のリン酸化を阻害することにより、これらのサイトカイン産生を抑制している可能性が示唆された。また、cAMP/PKA の経路を介せずに AM が Akt および JNK のリン酸化を阻害している可能性も示唆された。これらのことより、AM がこれらのシグナル伝達経路を介して、末梢血単核球由来樹状細胞からの Th17 細胞への分化および増殖を抑制している可能性が示唆された。

糖尿病ラットの実験的歯周炎における歯周組織破壊とオステオポンチンの局在

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野
○堀部ますみ、稲垣裕司、中島由紀子、生田貴久、木戸淳一、永田俊彦

Periodontal Tissue Destruction and Osteopontin Localization in Experimental Periodontitis Induced in Diabetic Rats

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences,
University of Tokushima Graduate School
○HORIBE Masumi, INAGAKI Yuji, NAKAJIMA Yukiko, IKUTA Takahisa, KIDO Jun-ichi and
NAGATA Toshihiko

【研究目的】

糖尿病患者は歯周病に罹患しやすく重症化しやすい。糖尿病関連性歯周炎では著しい歯肉の炎症、多発性膿瘍、重度の歯槽骨吸収が特徴的である。歯周炎の重症化の原因として免疫能や組織修復能の低下が上げられるが詳細については不明な点が多い。オステオポンチン(OPN)は骨基質蛋白の一つであり、種々の組織で発現し、骨代謝のほか、炎症、創傷治癒、免疫反応、癌転移、細胞接着などに多彩な機能を発揮している。例えば、大腸炎では血中 OPN 量が上昇し、石灰化動脈硬化巣からは OPN が検出され、肥満マウスの脂肪細胞では OPN が過剰発現するなど、OPN と各種病態との関連が指摘されている。糖尿病患者では、血中 OPN 濃度が上昇するだけでなく、リポ多糖が誘導する炎症において OPN はインスリン抵抗性の指標になるという興味ある知見が報告されている。一方、歯周炎における OPN の関与と役割についての研究報告は少なく、当教室では歯肉溝滲出液中に OPN が存在し炎症指標と関連することを報告したが(Kido *et al.* J Periodont Res, 2001)、大きな進展に至っていない。本研究では、糖尿病ラットの臼歯結紮による実験的歯周炎モデルを用いて形態観察を行い、歯周組織の破壊および OPN の局在について検討した。

【材料および方法】

遺伝的に 2 型糖尿病を発症する OLETF ラット (以下、糖尿病群) 15 匹および対照となる LETO ラット (以下、対照群) 9 匹は大塚製薬研究所 (徳島) より供与された。実験的歯周炎を誘発させるために上顎第二臼歯歯頸部を絹糸で結紮し、結紮後 3、7、20 日後の形態観察を行った。なお、上顎の左右対称部位を非結紮部位とし、同一個体内での比較も行った。歯槽骨の変化はマイクロ CT 装置を用いて観察し、マイクロ CT 画像からセメントエナメル境-歯槽骨頂の距離を測定して歯槽骨吸収率を数値化した。引き続き、上顎骨の組織切片を作製して OPN 抗体を用いた免疫染色を行った。

【結果】

糖尿病群は対照群に比較して、体重、空腹時血糖値およびヘモグロビン A1c(HbA1c)値が有意に高かった。マイクロ CT 分析の結果、糖尿病群および対照群の両群とも、結紮後の日数経過とともに歯槽骨吸収量が増加することが示された。歯槽骨吸収率は糖尿病群が対照群より高値を示し、20 日目の歯槽骨吸収率は糖尿病群で非結紮側の 3.5 倍、対照群で非結紮側の 2.5 倍であり、両群の吸収率の間には有意差が認められた。組織分析では、両群とも結紮 3 日後から歯周組織の破壊が始まり、日数経過とともに組織破壊が進行したが、その程度は糖尿病群で著しかった。OPN は両群の歯周組織破壊部位に局在しており、3、7、20 日目のすべてに認められ、7 日目および 20 日目では糖尿病群で OPN の著明な局在が認められた。

【結論】

糖尿病ラットの実験的歯周炎部位では、著しい歯槽骨吸収が認められ、歯周組織の高度な破壊と OPN の強い局在が認められた。以上の結果から、糖尿病における歯周炎の重症化に OPN が何らかの役割を果たしている可能性が示された。

β-クリプトキサンチンが LPS 刺激に対する歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生に与える影響

¹京都府立医科大学大学院医学研究科 歯科口腔科学
²京都府立心身障害者福祉センター附属リハビリテーション病院 歯科
³国保京丹波町和知歯科診療所
⁴宇治徳洲会病院歯科口腔外科
⁵京都府立医科大学大学院医学研究科 免疫学
○大迫文重¹, 山本俊郎¹, 赤松佑紀², 西垣 勝¹, 雨宮 傑¹, 坂下敦宏³, 中村 亨⁴, 喜多正和⁵, 金村成智¹
β-cryptoxanthin influences cytokine production of human gingival fibroblasts in response to LPS
¹Department of Dental Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine
² Department of Dentistry, Kyoto Prefectural Rehabilitation Hospital for the Disabled
³ Kokuho Kyotambacho Wachi Dentistry Medical Office
⁴ Department of Oral Surgery and Dentistry, Ujitokushukai Hospital
⁵ Department of Immunology, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine
○OSEKO Fumishige, ¹YAMAMOTO Toshiro, AKAMATSU Yuki, ¹NISHIGAKI Masaru, ¹AMEMIYA Takeshi, ³SAKASHITA Nobuhiro, ⁴NAKAMURA Toru,
⁵KITA Masakazu, and ¹KANAMURA Narisato

【緒言】

β-クリプトキサンチン (β-cryptoxanthin 以下、β-cry) は、温州みかんに豊富に含有されているカロテノイドで、日本人における血中濃度が外国人と比較して高いことが知られている。近年、数多くの研究からβ-cry の健康増進作用は、発がん抑制作用や抗酸化作用、糖尿病や骨粗鬆症の予防、体脂肪低減効果や美容効果が明らかになった。また、歯科領域においてβ-cry は歯槽骨吸収を抑制する作用があると報告されている。我々は過去に、β-cry がメカニカルストレスに対する歯根膜のサイトカイン産生に与える影響について検討した。その結果、β-cry は歯根膜からの炎症性サイトカイン産生を抑制し、抗炎症作用を有することを示唆してきた。しかし、歯肉に対するβ-cry の影響については検討に至っていなかった。

そこで、β-cry が *Porphyromonas gingivalis* (以下、*P. gingivalis*) 由来 LPS 刺激に対するヒト歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生に与える影響について検討を行った。

【対象および方法】

実験にはヒト正常歯肉線維芽細胞株 (以下 Gin-1) を用いた。Gin-1 を 10%FBS/DMEM で満たしたプレートに播種し、コンフルエントに達した後に、1 μg/ml *P. gingivalis* 由来 LPS で刺激した。また、β-cry は DEMSO (dimethyl sulfoxide) を用いて溶解し 1×10⁻⁷ M に調整し用いた。

P. gingivalis 由来 LPS 刺激前にβ-cry を添加した群を予防群とした。一方、*P. gingivalis* 由来 LPS 刺激後にβ-cry を添加した群を治療群とした。また、Gin-1 に対して *P. gingivalis* LPS 刺激のみの群を LPS 刺激群、刺激をしていない群をコントロール群とした。

次に、炎症性サイトカインであるインターロイキン (以下、IL) -1β、IL-6、IL-8、腫瘍壊死因子 (以下、TNF) -α について、real time PCR 法を用い遺伝子発現を解析した。Gin-1 の細胞形態は、位相差顕微鏡を用いてコントロール群・LPS 刺激群・予防群・治療群の形態学的変化について鏡検を行い、検討を加えた。

【結果】

real time PCR において予防群が LPS 刺激群に比べ、IL-1β・IL-6・IL-8 mRNA 発現が減少した。一方、治療群は LPS 刺激群に比べ、IL-1β mRNA で発現が減少した。また、コントロール群・LPS 刺激群・予防群・治療群において Gin-1 の形態学的変化はなかった。

【考察および結論】

P. gingivalis 由来 LPS 刺激前にβ-cry を添加した群が LPS 刺激群にくらべて、炎症性サイトカインの発現が減少した事により、歯周病に対する予防効果がある可能性が示唆された。一方、*P. gingivalis* 由来 LPS 刺激後にβ-cry を添加した群において IL-1β mRNA のみ減少した。これは、β-cry は歯周病において治療効果より予防効果を期待できる可能性が示唆された。今後、*in vivo* についても検討を加えて行く予定である。

本研究の一部は JSPS 科研費 24792358 の助成を受けた。

歯科診療室内の空气中ホルムアルデヒド濃度測定

JA 秋田厚生連平鹿総合病院歯科
¹東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野
²東北大学環境保全センター
○寺田林太郎、¹井川資英、²進藤 拓、¹島内英俊

The Measurement of Formaldehyde Vapor in a Dental Clinic

Dentistry, Hiraka General Hospital

¹Div. of Periodontology and Endodontology, Dept. of Oral Biology, Tohoku Univ. Graduate School of Dentistry

²Environment Conservation Research Institute, Tohoku University

○Rintaro TERATA, ¹Motohide IKAWA, ²Taku SHINDOH, ¹Hidetoshi SHIMAUCHI

[研究目的]

ホルマリン・グアヤコール (FG) はホルマリン製剤で、根管消毒剤として広く普及している。ホルムアルデヒドは従来、労働安全衛生法施行令 (昭和 47 年政令第 318 号) の特定化学物質障害予防規則 (特化則) により特定化学物質の第 3 類に分類されていたが、平成 20 年 3 月 1 日に施行令の一部が改正され第 2 類へと分類変更され、使用場所におけるホルムアルデヒドの管理濃度 (空气中濃度基準値) は 0.25ppm から 0.1ppm と引き上げられた。

本研究の目的は、FG をユニット上に常設している環境下での歯科診療室内のホルムアルデヒド濃度を測定し、併せて診療室の全体換気がホルムアルデヒド濃度に及ぼす効果について検討することである。

[材料および方法]

測定は JA 秋田厚生連平鹿総合病院歯科において行った。診療室は 4 台のユニットがあり、各ブラケットテーブル上に FG の薬瓶がおかれ、歯内療法時の貼薬は綿花とブローチ針を用い貼薬用綿栓を作成しこれに FG (「ネオ」、ネオ製薬工業) を貼薬して行っている。この環境下での 5 日間の診療時間内のホルムアルデヒドを DNPH 捕集管 (DNPH パッシブガスチューブ、柴田科学) によって捕集した。測定は、歯科医師および歯科衛生士の胸に装着したホルダーバッジ、ならびに静止場所として診療室中央部キャビネットテーブル、歯科ユニット No.1 ブラケットテーブルおよび受付カウンター台の合計 5 点で行った。捕集管に吸着させたホルムアルデヒドは、その後アセトニトリルで溶出させ、高速液体クロマトグラフィー (HPLC LC-10ADVP、島津製作所) を用いて濃度を測定した。

測定は 2012 年 7 月の第 1 週および第 2 週の月曜日から金曜までのそれぞれ 5 日間の 9 時から 17 時までの 8 時間とした。診療室内には、中央管理換気の排気口が 1 ヲ所、供給口が 2 ヲ所あり、診療室内の全体換気が病院内の中央管理で 8 時から 19 時まで行われている。また、開閉できる窓が 6 ヲ所と手元操作できる換気扇が 1 つある。このうち、診療室の窓の開閉・換気扇の稼働を利用して、全体換気を調節した。第 1 週の月曜日から金曜日までは、診療室内の 6 ヲ所の窓のうち診療に支障がない 5 ヲ所を明け、換気扇も稼働させ、診療室内の全体換気を行った。第 2 週は、窓をすべて閉めた状態で、換気扇も稼働させず、全体換気を行わなかった。

[結果]

5 日間のホルムアルデヒドの平均濃度は、全体換気を行った週では歯科医師 0.0070 ± 0.0008 ppm、歯科衛生士 0.0080 ± 0.0014 ppm、診療室中央部 0.0065 ± 0.0011 ppm、歯科ユニット No.1 0.0080 ± 0.0015 ppm、受付 0.0098 ± 0.0023 ppm、(平均±標準偏差、n=5) であった。一方、全体換気を行わなかった週では歯科医師 0.0113 ± 0.0026 ppm、歯科衛生士 0.0126 ± 0.0033 ppm、診療室中央部 0.0095 ± 0.0007 ppm、歯科ユニット No.1 0.0097 ± 0.0015 ppm、受付 0.0143 ± 0.0020 ppm、(平均±標準偏差、n=5) であった。全体換気を行った週と全体換気を行わなかった週との各測定部間のホルムアルデヒド濃度には統計学的な有意差が認められた (Two-way repeated measures ANOVA, $p < 0.01$)。

[考察]

いずれの測定部位でもホルムアルデヒド濃度は特化則で定められた管理濃度以下であった。歯科医師および歯科衛生士のみならず、受付や診療ユニットでも同程度の濃度のホルムアルデヒドが測定されたことは、ホルムアルデヒドが広い範囲に蒸散していたことを示している。診療室の窓開けや換気扇の使用は、室内のホルムアルデヒド濃度の低減に有用であることが示唆された。

歯科用 CAD/CAM ソフトウェアのバージョンアップが研修歯科医の CAD/CAM による修復処置の意識に与える影響

1. 東京医科歯科大学歯学部附属病院歯科総合診療部
2. 東京医科歯科大学大学院歯科医療行動科学分野
3. 東京医科歯科大学歯学部附属病院回復系診療科

○鈴木允文¹, 新田 浩², 梅森 幸¹, 礪波健一¹, 飯田浩司¹, 秀島雅之³, 小田 茂¹, 俣木志朗²

Effect of new version of dental CAD/CAM software on treatment option for dental restoration using CAD/CAM system in postgraduate clinical trainee

1. Oral Diagnosis and General Dentistry, University Hospital of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
2. Behavioral Dentistry, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University
3. Clinic for Oral and Maxillofacial Rehabilitation, University Hospital of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

○Suzuki Takafumi¹, Nitta Hiroshi², Umemori Sachi¹, Tonami Kenichi¹, Iida koji¹, Hideshima Masayuki³, Oda Shigeru¹, Mataki Shiro²

【研究目的】近年、歯科用 CAD/CAM は、歯科臨床の様々な場面で広く臨床応用されており、そのソフトウェアも年々進歩してきている。東京医科歯科大学歯学部附属病院歯科医師臨床研修プログラムでは、平成 23 年度から歯科用 CAD/CAM による修復処置の研修を取り入れた。そして、平成 24 年度はその CAD/CAM ソフトウェアのバージョンアップを行った。本研究の目的は CAD/CAM 研修に参加した平成 23 年度（ソフトウェアバージョンアップ前）および平成 24 年度（バージョンアップ後）の研修歯科医を対象にした CAD/CAM に関するアンケート調査の結果を比較し、ソフトウェアのバージョンアップがその結果に与える影響について検討することである。

【材料および方法】講義ならびに実習からなる歯科用 CAD/CAM による修復処置の研修を平成 23 年度と平成 24 年度の東京医科歯科大学歯学部附属病院の研修歯科医それぞれ 35 人、29 人を対象に行った。歯科用 CAD/CAM システムとして CEREC AC(シロナデンタルシステムズ株式会社)を、CAD/CAM ソフトウェアとして、平成 23 年度は CEREC Software ver.3.8、平成 24 年度はそのバージョンアップ版である CEREC Software ver.4.0 を用いた。研修終了後、参加した研修歯科医を対象に 11 項目のアンケート調査を行い、その結果を比較検討した。

【結果および考察】平成 23 年度には 35 人、平成 24 年度には 29 人の研修歯科医が本研修に参加し、それぞれ同数のアンケート結果を得た。講義後に行ったアンケート結果では「講義前とイメージが変わったか」との質問に対し「変わった」と回答したものはバージョンアップ前(平成 23 年度)が 74.8%、バージョンアップ後(平成 24 年度)が 86.2%と CAD/CAM 治療に対する興味に対する質問の回答は同程度に肯定的であり、各年度の研修歯科医のモチベーションには大きな差はないと考えられる。しかしながら実習終了後に行なった「CAD/CAM は修復治療法のひとつと考えるか」との質問への回答ではバージョンアップ前は 71.0%の研修歯科医が肯定的(「考える」を選択)であったのに対し、バージョンアップ後は 100.0%の研修歯科医が肯定的と飛躍的に向上した。また「自分自身は CAD/CAM の治療を希望するか」との質問に対しても、バージョンアップ前は肯定的な回答(「希望する」を選択)をしたものは 28.8%であったのに対し、バージョンアップ後は 69.0%と肯定的な回答が上昇し同様の傾向が認められた。以上よりバージョンアップによる CAD/CAM の精度向上が術者の臨床応用への期待を高めている可能性が示唆された。一方、教育的な観点から行なった「CAD/CAM 実習を卒前教育に正式な実習として組み込まれるべきか」との質問には、肯定的な回答(「組み込むべき」を選択)をしたものは平成 23 年度で 41.9%、平成 24 年度で 41.4%と同程度で、バージョンアップによる影響は認められなかった。このことから多少の臨床経験のある研修歯科医の時期においても卒前に CAD/CAM 実習を行うことに関してはバージョンアップによる CAD/CAM の精度向上以外の要素が関与していると考えられ、例えば形成技術、接着システムの理論的な理解度に対する不安が影響を与えているのではないかと推察された。

【結論】CAD/CAM ソフトウェアのバージョンアップは歯科用 CAD/CAM による修復処置の臨床応用への実施に対する術者のモチベーションを高めた。

ナノインデントーによるエナメル質の物理的評価

¹昭和大学歯学部歯科保存学講座美容歯科学部門

²昭和大学歯学部保存学講座歯科理工学部門

○田中玲奈¹、柴田 陽²、真鍋厚史¹、宮崎 隆²

Nanomechanical evaluation of human enamel

¹ Department of Conservative Dentistry Division of Aesthetic Dentistry and Clinical Cariology, ² Division of Biomaterials and Technology, Showa University School of Dentistry

○TANAKA Reina¹, SHIBATA Yo², MANABE Atsufumi¹, MIYAZAKI Takashi²

【研究目的】

天然歯はバルク試験のサンプル形状に加工することが難しく、ナノスケールの物理試験により歯冠修復材料と比較することが適当である。本実験では、球状圧子を用いたナノインデンテーションを行い、エナメル質の応力ひずみ曲線を求めた。

【材料および方法】

矯正治療のため便宜抜去した小臼歯から、自動精密切削器を用いてエナメル質を切り出し、エポキシ樹脂にて包埋した。包埋したエナメル質を小柱方向に垂直に鏡面研磨した。また、均一材料である熔融石英を標準試料として用いた。熔融石英に直径 0.5 μ m と 1.0 μ m の球状圧子を用いて、最大荷重 10mN、データポイント 33 のパーシャルローディングを行い、圧子接触深さの実測値 h_c および Contact Stiffness (S) を算出した。熔融石英データに基づく圧子形状の校正を行った。圧子接触半径 a_1 を $a_1 = (1 + 12) * (S) / 2 / (69.5e+9)$ によって求め、実測値 h_c と a_1 の関係をプロットした。圧子校正から求められた曲率の係数 C0~C5 および任意の h_c による圧子接触半径

$a_2 = ((C0 * h_c^2 + C1 * h_c + C2 * h_c^{1/2} + C3 * h_c^{1/4} + C4 * h_c^{1/8} + C5 * h_c^{1/16}) / \pi)^{1/2}$ をプロットした曲線を求めた。エナメル質試料において同様にパーシャルローディングを行い、接触深さが実測値 h_c の時の a_2 を求め、ひずみを $2 * \pi * a / B$ によって求めた。B は以下の式から計算した。 $B = 2 * C0 * h_c + C1 + (1/2) * C2 * h_c^{1/2} + (1/4) * C3 * h_c^{1/4} + (1/8) * C4 * h_c^{1/8} + (1/16) * C5 * h_c^{1/16}$

以上より、平均接触面積に対する圧力 (Hardness) とひずみから応力ひずみ曲線を求めた。

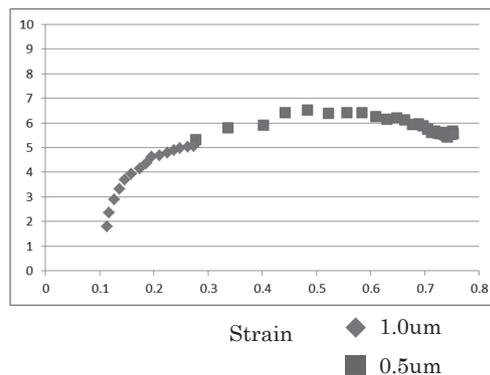
【成績】

熔融石英の実測値 h_c と a_1 による曲線および任意の h_c と a_2 による曲線は近似していた。

Hardness とひずみから得られたエナメル質の応力ひずみ曲線図を右に示す。

二つの球状圧子による応力ひずみ曲線は連続した曲線を示した。

Hardness (GPa)



【考察】

本実験により得られたエナメル質の応力ひずみ曲線は

比例限、弾性限が明らかである。荷重に対する接触面積の大きい直径 1.0 μ m の圧子で弾性領域を測定し、接触面積の小さい直径 0.5 μ m の圧子で塑性領域を測定したところ、直径 0.5 μ m および 1.0 μ m の球状圧子による接触面積が連続していることから、圧子の接触深さに対して連続したひずみが与えられていた。以上より、エナメル質においてナノスケールで応力ひずみ曲線が適用できることが明らかになった。

【結論】

球状圧子を用いたナノインデンテーションによって求められたエナメル質の応力ひずみ曲線により、エナメル質と修復材料の物性を直接比較することができる。

フッ化物含有材料から歯質へのフッ化物取り込みの経時的変化

¹北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室

²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

³若狭湾エネルギー研究センター研究開発部

○奥山克史¹、小松久憲¹、山本洋子²、安田啓介³、船戸良基¹、木地村太基¹、佐野英彦¹

Change of fluoride uptake from fluoride-containing materials into tooth by storage period

¹Department of Restorative Dentistry, Hokkaido University Graduate School of Oral Medicine

²Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

³The Wakasa Wan Energy Research Center

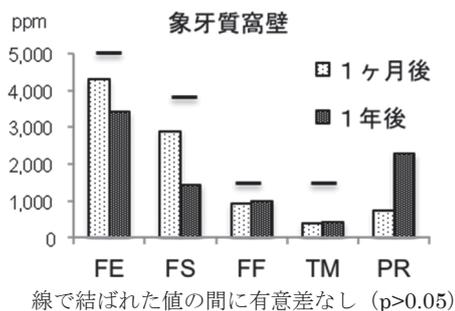
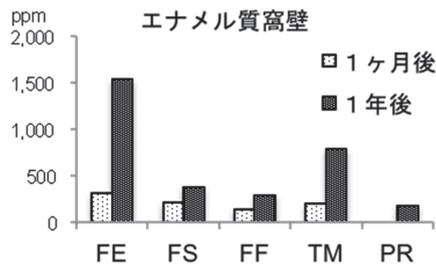
○OKUYAMA Katsushi¹, KOMATSU Hisanori¹, YAMAMOTO Hiroko², YASUDA Keisuke³

FUNATO Yoshiaki¹, KIJIMURA Taiki¹ and SANO Hidehiko¹

【緒言】フッ化物含有材料によるう蝕抑制効果の要因として、材料から歯質へ移行したフッ化物による歯質のフッ化物イオン濃度上昇と、材料から溶出されるフッ化物イオンが再石灰化を促進させること考えられている。演者らは第132回本学会で、若狭湾エネルギー研究センターに設置されているPIGE/PIXE装置を用い、充填1年後における各種フッ化物含有材料から窩洞周囲歯質へのフッ化物の取り込み量について報告した。本研究では、充填1ヶ月後における窩洞周囲へのフッ化物取り込み量を測定し、1年後の結果と比較することで、フッ化物取り込みの経時的変化を検討した。

【材料と方法】使用した材料はグラスアイオノマーセメントの、Fuji IX EXTRA (FE: GC)、Fuji VII (FS: GC)、Fuji IX GP FAST CAPSLE (FF: GC)、さらにフッ化物含有シーラントのTeethmate F-1 (TM: クラレメディカル) およびイオン徐放性歯面コート材である、PRGバリアコート (PR: 松風) を用いた。ヒト抜去歯にV級窩洞を形成し、メーカー指示に従い各材料を充填した。材料から水中へ溶出するフッ化物の歯質への取り込みを減らすため、500ml脱イオン水中に37°Cで保存した。試料の保存期間は1ヶ月とし、保存期間中は定期的に脱イオン水を交換した。水中保存終了後各試料を、窩洞部を含むように頬舌的に切断、厚さ約150 μ mに研磨調製した。窩洞部のフッ化物濃度分布を、若狭湾エネルギー研究センターのPIGE/PIXE装置を用い、フッ化物とカルシウム濃度測定により算出した。測定領域は窩洞部を含む1000 x 1000 μ mの範囲とし、窩洞から離れた健全歯質のカルシウム量の90%を示した部位を窩壁辺縁と規定した。各群のフッ化物取り込み量は、窩壁から200 μ mまでの平均値を用いた。エナメル質、象牙質それぞれについて、各材料における1ヶ月後と1年後との比較にはt検定 ($p>0.05$) を用いた。

【結果および考察】図にエナメル質および象牙質窩壁におけるフッ化物取り込み量を示した。エナメル質窩壁について、全ての材料で1年後の群が1ヶ月後の群よりも多い取り込み量を示した。材料から徐放されたフッ化物の累積量が多くなる分取り込まれるフッ化物の量も多くなったということが考えられる。一方象牙質窩壁については、PRでは1年後の群が1ヶ月後の群よりも多い値を示したが、その他の群では1年後の群と1ヶ月の群の間に大きな差を認めなかった。この期間による取り込み量の変化の違いは、材料と窩壁との界面の状態の違いや材料の組成がフッ化物の浸透に影響を及ぼしていることが考えられるが、使用した歯の相違が原因とも考えられる。このような材料間の相違を明確にするためにも、PIGE/PIXE装置のさらなる活用が重要になる。



線で結ばれた値の間に有意差なし ($p>0.05$)

新規セラミックプライマーを用いた歯科用ジルコニアに対する レジンセメントの接着強さ

¹サンメディカル株式会社 研究開発部

²岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体機能再生・再建学講座 生体材料学分野

○宮森沙耶香¹, 荒田正三¹, 入江正郎², 松本卓也²

Bonding Strength of resin cements to Dental Zirconia using newly developed ceramic primer

¹ Sun Medical Co., Ltd. Research and development department

² Department of Biomaterials, Field of Study of Biofunctional Recovery and Reconstruction,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

○MIYAMORI Sayaka¹, ARATA Masami¹, IRIE Masao², MATSUMOTO Takuya²

【緒言】

近年の歯科治療における審美性の要求や金属アレルギーの問題等の社会的背景から、金属を使用しないメタルフリーの治療が普及してきている。耐変色性、耐着色性や生体親和性に優れるオールセラミックスを用いた修復は、審美性の高い治療が可能であり、中でもジルコニアは高強度・強靱性の物性で、金属より光透過性の高い特長を有している。これらオールセラミックスのセットにはレジンセメントが用いられ、良好に接着するためにサンドブラスト等の表面処理やプライマーの塗布が行われる。この度、ジルコニアやポーセレン用の前処理材としてセラミックプライマー（開発コード：ZL-1）を新たに開発した。ZL-1 は 2 液を混合し、補綴物に塗布することでレジンセメントの高い接着強さと耐久性を引き出す前処理材である。

本研究では、新規開発品 ZL-1 を用いて、ジルコニアの表面粗さがレジンセメントの接着耐久性に及ぼす影響について評価を行ったので報告する。

【材料および方法】

被着体として、歯科用ジルコニアの Lava (3M ESPE, 以下 Lava), Procera AllZircon (Nobel Biocare, 以下 Procera), BruxZir (Glidewell, 以下 Brux) および Cercon (Dentsply, 以下 Cercon) の 4 種を用いた。各ジルコニアの被着面は、表面粗さの影響を確認するため、①耐水研磨紙にて#600 まで研磨後サンドブラスト処理を施したもの（以下、サンドブラスト処理群）および②耐水研磨紙にて#2000 まで研磨したもの（以下、#2000 研磨群）の 2 条件とした。各被着面をφ4.8mm に規定し、規定面に新規セラミックプライマー（以下、ZL-1）またはポーセレンライナーM（サンメディカル、以下 PLM）を塗布し、乾燥させた。その後、スーパーボンド C&B（サンメディカル）を用いて被着面とサンドブラスト処理した SUS 棒を接着させた。各試料は、スーパーボンド C&B の硬化を確認後、5℃と 55℃の温度条件下で各々 20 秒浸漬を 1 サイクルとしたサーマルサイクルを 5,000 回行った。サーマルサイクル試験後の各試料は、万能試験機（オートグラフ AG-1S, 島津製作所）を用いて、クロスヘッドスピード 2.0mm/min で引張試験を行った。得られた結果は、one-way ANOVA および多重比較として Tukey 法を用いて有意水準 5% で統計処理を行った。

【結果および考察】

各試料のサーマルサイクル試験 5,000 回後の接着強さにおいて、同一の前処理材および表面処理条件のジルコニア種類間による有意差は何れの条件においても確認されず、ジルコニアの種類による接着強さへの影響は無いことが確認された。また、各ジルコニアにおける前処理材および表面処理条件による接着強さは、#2000 研磨-PLM 塗布群に対して、ZL-1 塗布の 2 群は有意に高い接着強さを示した。対して、サンドブラスト処理-PLM 塗布群に対して、ZL-1 塗布の 2 群は有意差が認められなかった。これらの結果は、何れのジルコニアにおいても同様であった。よって、ZL-1 はサンドブラスト処理の有無に関わらず、従来のサンドブラスト処理に PLM を塗布する方法と同等の接着強さを有していることが確認された。このことから、ZL-1 は表面処理によるテクニカルエラーが軽減されることが期待できる。

【結論】

新たに開発されたセラミックプライマー ZL-1 をジルコニア表面に塗布後、スーパーボンド C&B を接着させたところ、各種ジルコニアに対して良好な接着強さを示した。また、従来のサンドブラスト処理後に PLM を塗布した場合と比較して、ZL-1 は表面粗さに関わらず同等の接着強さを有していることが示唆された。

マイルドな酸処理の併用がオールインワンアドヒーズの象牙質接着強さに及ぼす影響

¹日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科硬組織機能治療学専攻

²日本歯科大学新潟生命歯学部歯科保存学第2講座、³日本歯科大学新潟病院総合診療科

○有田祥子¹、高田真代¹、川嶋里貴¹、加藤千景²、鈴木雅也²、新海航一²、平賢久³

Effects of pre-treatment with a mild etchant on the dentin bond strength of all-in-one adhesive system

¹Advanced Operative Dentistry, The Nippon Dental University Graduate School of Dentistry at Niigata

²Department of Operative Dentistry, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata

³Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital

○ARITA Shoko¹, TAKADA Mayo¹, KAWASHIMA Satoki¹,

KATO Chikage², SUZUKI Masaya², SHINKAI Koichi², TAIRA Yoshihisa³

【研究目的】

オールインワンアドヒーズの象牙質接着強さは、2ステップセルフエッチシステムより低いという研究報告が多くみられる。その要因の一つとして不十分なスミア層の除去が指摘されている。そこで、本研究では、ヒト象牙質切削面に対してマイルドな酸歯面処理を行った後にオールインワンアドヒーズを用いて作製した接着試料の剪断接着強さを測定し、マイルドな酸処理の併用がオールインワンアドヒーズの象牙質接着強さに及ぼす影響について検討することを目的とした。

【実験方法】

耐水研磨紙 #120 と #600 を用い、ヒト抜去大白歯の頬側面と舌側面に平坦な象牙質面を形成した後、歯根を切除してから近遠心的に2分割して接着試験用歯片を作製し、即時重合レジンを用いて試料固定用リングに歯片を固定した。固定する際、リング底面と象牙質平坦面が平行になるように調整した。象牙質面に透明アクリルチューブ (内径 3mm、高さ 2mm) を固定し、下記の各実験群について接着試料を作製した。各接着処理後、各フロアブルレジンをアクリルチューブ内に満たし、40 秒間光照射を行った。接着試料は恒温恒湿器中に 24 時間保管後アクリルチューブを除去、小型卓上試験機 EZ Test 500N (Shimadzu, Japan) にてクロスヘッドスピード 1.0mm/min で剪断接着試験を行った (n=10)。

得られたデータは ANOVA と Tukey HSD 検定による統計学的解析を行い、実験群間の有意差の検定を行った (p<0.05)。各試料の接着は海面に関して実体顕微鏡を用いて観察し、接着面破壊様式を判定した。また、各実験群の代表例について接着破壊面の微細構造を SEM 観察した。

【結果および考察】

実験群	酸処理剤	接着システム	フロアブルレジン	剪断接着強さ
DB	デンチンコンディショナー	ビューティボンドマルチ	ビューティフィルフロー	14.0±2.7 (MPa)
SB	スーパーボンド・グリーン液			17.2±4.0
AB	アクセル			13.1±4.3
NB	なし			17.6±4.3
DP	デンチンコンディショナー	プライムフィルプライマー	プライムフィル	12.2±5.6
SP	スーパーボンド・グリーン液			14.9±3.8
AP	アクセル			11.2±3.4
NP	なし			20.8±5.4

酸処理剤と接着システムを主因子として二元配置分散分析を行った結果、接着システム間に有意差は認められなかった (p=0.50) が、酸処理剤において有意差 (p<0.01) が認められた。また酸処理剤に関して Tukey HSD により分析した結果、デンチンコンディショナー使用群と非酸処理群、およびアクセル使用群と非酸処理群の間に有意差 (p<0.01) が認められ、オールインワンアドヒーズ応用前にマイルドな酸処理を併用した実験群の方が、酸処理を併用しなかった実験群よりも象牙質接着強さが低くなる傾向がみられることが明らかとなった。

したがって、マイルドな酸処理といえども、処理後の象牙質面はスミア層の溶解除去だけでなく、象牙質基質の脱灰も生じており、脱灰最深部までオールインワンアドヒーズが拡散しなかったことが推察される。

コンポジットレジンへのカーボンナノチューブコーティング技術の応用

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

○田中佐織¹, 宮治裕史¹, 西田絵利香¹, 古月文志², 川浪雅光¹

The application of carbon nanotube coating to the composite resin

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

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

○TANAKA Saori^{1*}, MIYAJI Hirofumi¹, NISHIDA Erika¹, FUGETSU Bunshi², KAWANAMI Masamitsu¹

【研究目的】

コンポジットレジンとは齲蝕歯の充填や支台築造のほか、歯根端切除術の逆根管充填材や穿孔部の封鎖材など生体材料としての応用が期待されている。一方、カーボンナノチューブ (CNT) はグラフェンシートを円筒状にした直径数十nmの構造物であり、細胞の付着性や増殖性、タンパク吸着性などの様々な生物学的特性があることが報告されている。近年優れた分散技術とコーティング技術によってCNTの網目状フィルム (CNTネット) が作成できるようになった。したがってコンポジットレジン表面にもCNTネットコーティングできれば、レジン表面にCNTの特性が追加され、生体材料として効果的に応用できる可能性がある。本研究ではコンポジットレジンの表面にCNT分散液を用いてコーティングを行い、コーティング状態を観察するとともに細胞親和性について評価した。

【材料と方法】

Multi-wall CNT (NC7000, Nanocyl S.A., ベルギー) を用いて、コール酸ナトリウム (0.2wt%) を分散剤として、CNT分散液 (0.5wt%, 溶媒: N-メチルピロリドン) を作製した。コンポジットレジン (ビューティフルフロープラス、シェードA2, 松風) を光照射20秒で硬化させ (φ3mm×1mm), #600の耐水研磨紙を用いて研磨、超音波洗浄を行った後、CNT分散液を用いてコーティング処理を行った。コーティング時間は20, 60, 180秒に設定した。洗浄・乾燥した後にコンポジットレジン表面のコーティング状態についてSEM観察を行った。次に、60秒コーティング処理を行った試料にMC3T3-E1細胞を 1×10^4 個播種、24, 72時間後にSEMにて細胞付着性を観察し、細胞数をカウントし、CNTコーティングを行わないレジン試料をコントロールとして比較を行った。

【結果と考察】

CNTコーティングを行ったコンポジットレジンとは、肉眼的観察では薄褐色に着色していた。SEM観察において、コーティング時間20秒の試料はレジン上にCNTが散在しているのが認められ、CNTは付着しているもののネット形成は不十分であった。60および180秒の試料ではレジンマトリックス、およびファイラー上の両方に、薄いCNTネットが形成されていることが確認された。培養試験において、CNTコーティングレジンに付着した細胞はコントロールに比較して細胞伸張が良好であった。細胞は突起を伸ばしてCNTネットに付着しているのが観察された。また72時間後においてCNTコーティングレジンへの付着細胞数は大幅に増加していた。細胞数カウントの結果、CNTコーティングした試料への付着細胞数は培養24時間後でコントロールの約2倍、72時間後ではコントロールの約3倍であった。以上の結果から、CNTコーティングレジンの細胞親和性は良好であると考えられた。

【結論】

CNTコーティング処理によってコンポジットレジンの表面にCNTネットが形成され、細胞親和性が向上した。

光照射器の長時間使用による照射光量の変化

東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存分野
○遠藤達雄、笹崎弘己、小松正志

The change of light-cure unit's intensity after using long times.

Division of Operative Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry
○ENDO Tatsuo, SASAZAKI Hiromi and KOMATSU Masashi

【研究目的】

一般歯科臨床において最も高頻度に行われる治療の一つであるコンポジットレジン修復において必須の診療器具である光照射器の照射光量の低下は、コンポジットレジン修復の予後に大きな影響を与える因子の一つであるコンポジットレジンと歯質間の接着に影響を与える可能性がある。第129回学術大会において、東北大学病院保存科外来で長期間に渡って使用されたハロゲンタイプの光照射器の多くで照射光量の低下を示していたことを報告した。本研究において光照射器の長時間使用による光量低下の有無について調べ、さらに光照射器の消費電力量についても測定を行った。

【材料および方法】

1. 照射光量変化

照射光量計としてDENTSPLY社製Cure Rite™を用いた。光照射器としてハロゲンタイプ(Grip Light II; Shofu)およびLEDタイプ(G-Light; GC)各1台の光照射器を用いた。照射器使用開始時に照射光量を測定し、その後2000秒ごとに測定を繰り返して照射光量を初期値と比較した。ハロゲンタイプでは、バルブ切れ時にバルブ交換を行った。測定回数は各群5回とした。

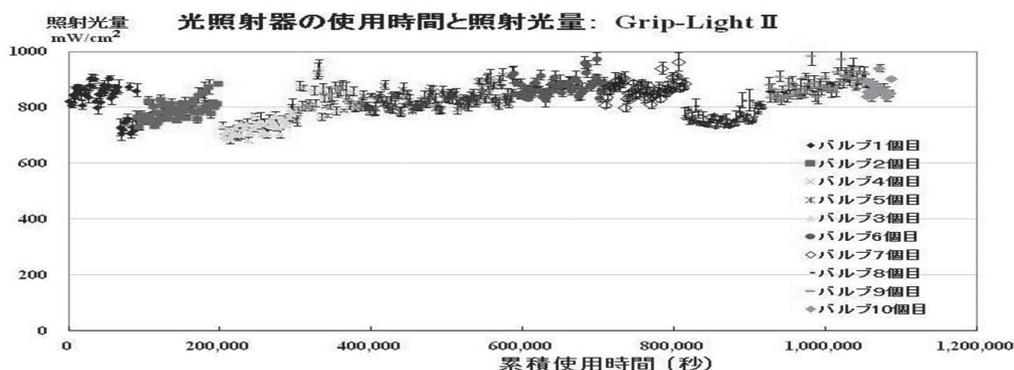
2. 消費電力測定

ハロゲンおよびLEDタイプそれぞれの1窩洞あたりの消費電力を測定し、比較した。測定にはカスタム社製EC-03を用い、1窩洞あたりの照射時間をハロゲンタイプでは70秒、LEDタイプでは50秒として消費電力量を比較した。

【結果および考察】

1. 長時間使用後の照射光量の変化

照射光量は、使用開始時点ではハロゲンタイプで $824 \pm 7 \text{ mW/cm}^2$ 、LEDタイプで $1455 \pm 11 \text{ mW/cm}^2$ を示した。1,085,160秒(301.4時間)使用後のハロゲンタイプで途中バルブ交換による変動はあるものの $852 \pm 12 \text{ mW/cm}^2$ 、900,000秒(250時間)使用後のLEDタイプで $1476 \pm 5 \text{ mW/cm}^2$ を示していずれも長時間使用後の照射光量の低下は認められなかった。



2. 1窩洞あたりの消費電力量

1窩洞あたりの消費電力量はハロゲンタイプで2.21Wh、LEDタイプで0.21Whを示し、その比は10.6倍であった。省エネルギーを考慮すると、LEDタイプの使用が望ましいものと考えられた。

【結論】

- 今回の使用時間の範囲内(ハロゲンタイプで301.4時間、LEDタイプで250時間)では、長時間の光照射器使用による照射光量の低下は認められなかった。
- 1窩洞あたりの消費電力量は、ハロゲンタイプがLEDタイプと比較して10.6倍を示した。

コンポジットレジン修復物リペアにおける接着操作がエナメル質、象牙質及びコンポジットレジンへの接着強さに与える影響

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座 う蝕制御学分野、²GCOEプログラム歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点

○ママニー ティーラポン¹、高橋真広¹、中島正俊¹、田上順次^{1, 2}

The effect of repairing procedure of one-step self-etch adhesives on bond strength to enamel, dentin and resin composite in the combined situation

¹Cariology and Operative Dentistry, Department of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ²GCOE Program: International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases

○MAMANEE Teerapong¹, TAKAHASHI Masahiro¹, NAKAJIMA Masatoshi¹, TAGAMI Junji^{1, 2}

Background and purpose: Consistent with the promotion of minimal invasive dentistry, defective resin composite restoration should be repaired using silane coupling agent rather than completely removed and replaced. In the repaired cavity, bonding substrates are composed of enamel, dentin and resin composite. Recently, one-step self-etch adhesives have been developed, however their repairing bonding procedures have still remained problem to be dissolve in the combined situation of the bonding substrates. The purpose of this study was to evaluate the effect of repairing procedure of one-step self-etch adhesives on bond strength to enamel, dentin and resin composite in the combined situation.

Materials and methods: Two one-step self-etch adhesives with silane coupling agent were used in this study (Clearfil SE One/ Porcelain Bond Activator; Kuraray Noritake Dental Inc and Beautibond Multi/ Beautibond Multi PR Plus; Shofu). Clearfil SE One system recommended to apply mixing solution of adhesive with silane coupling agent to bonding substrate (mixing application method), while Beautibond Multi system recommended to apply the adhesive to bonding substrate followed by application with silane coupling agent (separate application method).

Flat enamel and dentin surface from extracted molars were exposed and polished with wet 600 grit SiC paper, and applied with one of the adhesives according to manufacturers' instruction. Additionally, resin composite (Clearfil AP-X, Kuraray Noritake Dental Inc) discs were aged in distilled water for one week, at which point the surface was polished with 600 grit SiC paper under water coolant and applied with the adhesive with silane coupling agent according to manufacturers' instruction. (Control group)

In extracted human molars, a cavity (size 2 x 2 x 3 mm) was prepared at CEJ area and filled with Clearfil AP-X. After aged in distilled water at 37 °C for one week, the composite-filled teeth were sectioned parallel to longitudinal axis of the teeth, and enamel, dentin and resin composite were exposed and polished in an identical surface. (Combined group) The adhesive procedures were collectively performed to the combined surface of enamel, dentin and resin composite using mixing or separate application method.

Before the adhesive was light-cured, a plastic tube (height 0.5 mm, internal diameter 0.8 mm) was placed on each bonded substrate. Then, adhesive was light-cured and Clearfil AP-X was filled into the tube followed by light-curing for 40 seconds. After removing the tube and storing in distilled water at 37 °C for 24 h, the specimens were then subjected to micro-shear bond test at a crosshead speed of 1mm/min. Data were analyzed using One-way ANOVA with post hoc and the independent t-test at the significance level of 0.05.

Result:

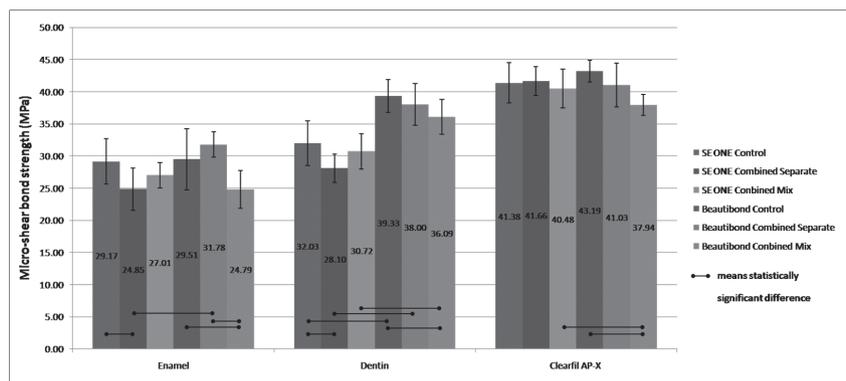


Figure 1. Mean Micro-shear bond strength \pm SD

Conclusion: Micro-shear bond strengths to enamel, dentin and aged resin composite were dependent upon the adhesive material with the application method of silane coupling agent.

異なる波長の LED 光源が過酸化水素と酸化チタン光触媒による漂白に及ぼす影響

¹東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野, ²東京医科歯科大学大学院歯と骨の GCOE

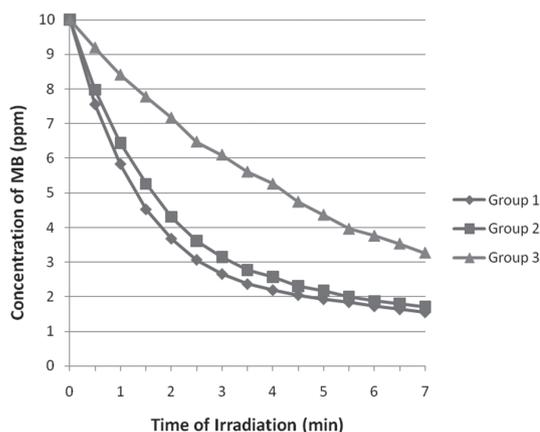
○コン カリヤン¹, 草薙彩花¹, 大槻昌幸¹, 田上順次^{1,2}

Effect of different LED lights on bleaching with hydrogen peroxide and titanium dioxide photocatalyst

1. Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 2. GCOE program, Tokyo Medical and Dental University

○Kalyan Kong¹, Ayaka Kusanagi¹, Masayuki Otsuki¹, Junji Tagami^{1,2}

Objective: An office bleaching material (Pyrenees, Mitsubishi Gas Chemical) contains low concentration hydrogen peroxide (H_2O_2) in combination with visible light activating titanium dioxide photocatalyst (VL-TiO₂). VL-TiO₂ works with specific wavelength of visible light. The objective of this study was to evaluate the effect of the wavelength and the exposure of LED lights on the bleaching with H_2O_2 and VL-TiO₂. **Materials and methods:** The experimental solution was prepared with H_2O_2 , VL-TiO₂, methylene blue (MB) and pure water. The solution contained 3.5% H_2O_2 and 10 ppm MB. An LED light unit (Pencure 2000, J.Morita) was employed in this study. The experimental solution of 3 ml in a quartz cell was irradiated by either Group 1; Violet LED at 350 mW/cm², Group 2; Violet LED at 238 mW/cm² or Group 3; Blue LED at 1,230 mW/cm² for 7 min. At every 30 sec during the light exposure, the light absorbance of the solution at 660 nm was measured using a spectrophotometer (Mini Photo 5; Sanshin). The concentration of the remaining MB in the solution was determined using a standard curve by plotting the known concentrations of MB. For each group, the experiment was repeated three times (n=3). Obtained data was statistically analyzed by two-way ANOVA and Tukey HSD test. **Results and discussion:** Results was shown in the graph. In all experimental groups, the increase in irradiation time gradually decreased the MB concentration statistically. There was no interaction between light sources and exposure time. There was significant difference among three experimental groups. The violet LED showed higher bleaching effect compared with the blue LED which is higher intensity than the violet LEDs. The higher intensity violet LED showed higher effect than the lower one. For tooth bleaching using H_2O_2 and VL-TiO₂, the suitable light source and exposure condition must be selected. **Conclusion:** It was concluded that the different wavelength and output power of the LED light sources affected the bleaching effects with H_2O_2 and VL-TiO₂. This work was partially supported by Japan Society for the Promotion of Science, Grant-in-Aid for Scientific Research (C) 21592414 and GCOE Program, "International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases".



Comparison in Change of MB Concentration

新規デュアルキュア型接着システムに関する研究
— 重合方式が異なる2種類のコンポジットレジンとの歯質接着強さ —

¹日本歯科大学新潟生命歯学部歯科保存学第2講座, ²日本歯科大学新潟病院総合診療科
○高田真代¹, 加藤千景¹, 有田祥子¹, 川嶋里貴¹, 鈴木雅也¹, 平賢久², 新海航一¹

Studies on a new dual-cured adhesive system

- Shear bond strengths with two different polymerization type composite resins to tooth substance -

¹Department of Operative Dentistry, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata

²Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital

○TAKADA Mayo¹, KATO Chikage¹, ARITA Shoko¹, KAWASHIMA Satoki¹, SUZUKI Masaya¹,
TAIRA Yoshihisa², SHINKAI Koichi¹

【研究目的】

レジンコア築造システムでは、照射光が届かない部位でも化学重合の働きにより重合率を高くするデュアルキュア型接着システムを用いるのが一般的である。しかしながら、光量が十分に到達する歯冠部の築造に光重合型のコンポジットレジンを使用することもある。新規デュアルキュア型接着システム「Beauti Dual Bond」を用いた場合、デュアルキュア型コア用レジンの象牙質接着強さは光照射の有無による有意差を認めず、安定した接着性を示すと報告されている。しかし、新規化学重合触媒の採用により光重合型レジンとの接着性への影響は明らかではない。そこで本研究は、ヒト抜去歯のエナメル質ならびに象牙質に対して Beauti Dual Bond 応用後、デュアルキュア型コア用レジンあるいは光重合型レジンを経々接着させ、両者の剪断接着強さについて比較検討することを目的とした。

【材料および方法】

ヒト抜去大白歯の頬側面と舌側面に対し、耐水研磨紙#120~#600を用いて平坦なエナメル質面あるいは象牙質面を形成し、歯頸部で歯軸に対して垂直に切断して歯根を除去、さらに頬舌的に中央の位置で歯軸方向に歯冠を切断した。このようにして抜去歯1本から平坦面を有する接着用歯片2個を作製し、1つの実験群について抜去歯5本を使用して接着用歯片10個を作製した(n=10)。得られた歯片を試料固定用リングに入る大きさにトリミングし、リング底面と歯片の平坦面が平行になるように調整しながら常温重合レジンを用いて試料固定用リングに歯片を固定した。次いで、円形の開窓部(直径2mm)を有した両面テープで透明アクリルチューブ(内径3mm、高さ3mm)を平坦なエナメル質面あるいは象牙質面の中央部に固定した。

新規デュアルキュア型接着システムとしてBeauti Dual Bond (BDB、松風)、デュアルキュア型コア用レジンとしてBeauti Core Flow Paste (BC、松風)、光重合型レジンとしてBeautiful Flow Plus F03 (BF、松風)を各々用いた。BDBはA液とB液を等量採取し5秒間混和、歯面に5秒間塗布後、10秒間放置した。その後、5秒間エアブローを行い、10秒間照射した。各コンポジットレジン(BCあるいはBF)をアクリルチューブ内に約1.0mm充填し、40秒間照射し、さらに2mm積層充填し、40秒間照射を行った。照射器はCandelux(モリタ)を用いた。

試料を37°C恒温恒湿器中に24時間保管後、アクリルチューブを除去してから小型卓上試験機・EZ Test 500N(島津)を用いて、クロスヘッドスピード1.0 mm/minで剪断接着強さを測定した。得られた結果はANOVAとTukeyHSD検定による統計学的解析を行い、実験群間の有意差検定を行った(p<0.05)。測定後に実体顕微鏡を用いて接着破壊面を観察し、破壊様式の判定を行った。また、各実験群の代表例について接着破壊面の微細構造をSEM観察した。

【結果ならびに考察】

各実験群における剪断接着強さの測定結果を下表に示す。Group 3の接着強さが最も高く、Group 2が最も低い接着強さを示した。また、Beauti Dual Bondのエナメル質および象牙質に対する接着強さは、光重合型レジンを用いた場合よりデュアルキュア型レジンを用いた場合の方が高くなる傾向を示したが、いずれも統計学的有意差は認められなかった。したがって、光重合型レジンにもデュアルキュア型レジンと同程度の接着強さが得られることが判明した。

実験群	被着面+被着レジン	接着強さ MPa: mean ± SD
Group 1	象牙質+BC	18.9 ± 7.1 ^a
Group 2	象牙質+BF	15.4 ± 3.9 ^a
Group 3	エナメル質+BC	20.1 ± 4.7 ^b
Group 4	エナメル質+BF	19.5 ± 5.7 ^b

同一文字は有意差なし (p>0.05)

分割積層充填した光重合型コンポジットレジン修復物の内部気泡の評価 —マイクロCTを用いた非破壊的観察—

¹日本歯科大学新潟生命歯学部歯科保存学第2講座,

²日本歯科大学新潟病院総合診療科, ³日本歯科大学新潟生命歯学部先端研究センター

○川嶋里貴¹, 鈴木雅也¹, 有田祥子¹, 高田真代¹, 加藤千景¹, 平賢久², 新海航一¹, 青柳秀一³

Assessment of internal voids in light cured composite restoration with incremental filling technique —nondestructive observation using micro-CT—

¹Department of Operative Dentistry, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata

²Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital

³Advanced Research Center, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata

○KAWASHIMA Satoki¹, SUZUKI Masaya¹, ARITA Shoko¹, TAKADA Mayo¹, KATO Chikage¹,

TAIRA Yoshihisa², SHINKAI Koichi¹, AOYAGI Hidekazu³

【研究目的】

光重合型コンポジットレジン修復において填塞と重合硬化を繰り返して行う分割積層充填法は、深い窩洞で光照射器からの光量が十分に到達せず充填したレジンの深部重合率に影響を及ぼすと考えられる場合、より自然な色調および形態を再現するために各種シェードをレイヤリングする場合等、臨床において頻繁に行われる手技である。また、分割積層充填法はコントラクションギャップやホワイトマージンの発生を抑制する操作法でもあるが、積層したレジンとレジンの界面に気泡を巻き込む可能性があるると推測される。そこで本研究では、フロアブルレジンとユニバーサルレジンの2種類の材料を用いて積層充填したときの内部気泡について、マイクロフォーカスエックス線CTシステムを用いて非破壊的に観察および検討した。

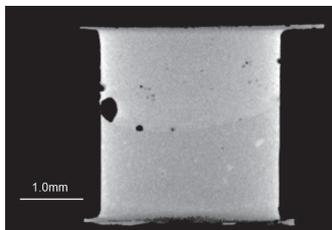
【材料および方法】

アクリル円板(直径7mm、厚さ5mm)上に直径3mmの穴を開けた両面テープを貼付し、アクリルチューブ(内径3mm、高さ3mm)を固定して模擬窩洞とした。窩洞内にBond Force(トクヤマデンタル)を塗布後20秒間放置し、弱圧5秒間、中圧～強圧5秒間のエアブローを行った後、Candelux(モリタ)を用いて10秒間光照射した。実験群は、Estelite Flow Quick(以後EFQ、フロアブルレジン、トクヤマデンタル)を窩底部に約1mm充填し40秒間光重合後、Estelite Σ Quick(以後EQ、ユニバーサルレジン、トクヤマデンタル)を円柱状充填器で加圧しながら積層充填し40秒間光重合を行ったものをFU群、EFQを窩底部に約1mm充填し40秒間光重合後、再度EFQを積層充填し40秒間光重合を行ったものをFF群とした(各n=5)。全試料をマイクロフォーカスエックス線CTシステム(以後マイクロCT、SMX-100CT-SV、島津製作所)を用いて撮影した。撮影条件は管電圧48kV、管電流24μA、ピクセルサイズ512×512、厚さ0.5mmのAlフィルターを設置、X線源と被写体との距離(source to object distance; SOD)は17.5mm、X線検出器と被写体との距離(source to image intensifier distance; SID)は207mmに設定した。得られたデータから、1試料につき500μm間隔の垂直断面像5枚と三次元立体構築画像(TRI/3D-Bon、ラトックシステムエンジニアリング)を作製し、修復物内部の気泡を観察した。

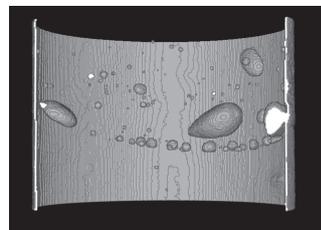
【結果ならびに考察】

FU群では、レジン内部や窩洞側壁に多くの気泡を観察した。レジン内部には、填塞時に充填器によって巻き込まれたと思われる小さい気泡が無数に存在した。窩洞側壁に入る気泡は、数は少ないものの体積の大きい気泡を認めた。積層界面では数は少ないものの小さい気泡を観察した。FF群では、全体的な気泡の数は少なかった。レジン内部や窩洞側壁の気泡はほとんどなかったが、側壁と窩底の隅角付近に大きな気泡を観察した。積層界面では非常に小さい気泡が多数散在した。マイクロCTを用いたレジン修復物の内部気泡の観察に関しては、材料の造影性や窩洞の大きさなどについて考慮しながら鮮明な画像を得られるための照射条件の検索が重要である。また、垂直断面像と三次元立体構築画像から客観的データとして内部気泡の総面積あるいは総体積を算出するにあたり、画像上で明確に検出できない気泡が存在することから、マイクロCTを用いた評価方法については今後さらに検討していく予定である。

試料 No. FU-5
垂直断面像



試料 No. FU-5
界面部の
三次元立体構築画像



S-PRG フィラーの生理活性分子による高機能化

奥羽大学歯学部 歯科保存学講座 保存修復学分野
○菊井徹哉、西村 翼、横瀬敏志

Fictionalization of S-PRG by bioactive molecules

Division of Operative Dentistry, Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Ohu university

○KIKUI Tetsuya, NISHIMURA Tsubasa and YOKOSE Satoshi

目 的：

歯科治療において歯髄組織の保存は治療効果に大きな影響を与える。歯髄組織の保護・再生を目的とした治療法の開発には生体親和性の高い材料の開発および歯髄保護材に対する作用メカニズムの解析が不可欠である。著者らはこれまでにラット切歯から分離した培養歯髄細胞を使用して dentinogenesis の解析を行い多くの知見を得てきた。vital pulp therapy では細胞の分化や機能を活性化することが可能な biomaterial が必要なことから S-PRG フィラーに着目した。

本研究では S-PRG フィラーを生理活性分子により修飾して直接覆髄材への応用を検討した。

方 法：

実験は7～8週齢のSDラットを用いた。試作S-PRGセメント硬化体にポリカルボン酸液を作用させカルボキシル基を増加させ、さらにN-ヒドロキシコハク酸イミドを結合することにより生理活性分子(b-FGF)を結合させた。ペントバルビツールナトリウム(Somnopenyl、共立製薬)麻酔下にて腹腔内にb-FGF修飾S-PRG硬化体を埋入、4週後に標本を回収、Plank Rychio method脱灰液により急速脱灰を行い5%硫酸ナトリウムで中和後、通法に従い脱水・パラフィン胞埋して組織標本作製した。歯髄の変化はH・E染色により観察・比較した。実験は①S-PRG硬化体、②S-PRG+b-FGF、③S-PRG+カルボン酸、④S-PRG+カルボン酸+b-FGFの4群で行い、S-PRG硬化体周囲の組織構造を比較した。

結果および考察：

S-PRGはフルオロボロアルミノシリケートガラス表面を予めポリアクリル酸で処理してglass-Ionomer相を形成し、その表面をシラン処理した構造の界面機能性ガラスである。S-PRGからはSi, B, Al, Sr, Fなどが溶出する。溶出成分B, Srは硬組織の形成促進作用を期待できる成分である。これまでの実験においてラット歯髄培養細胞ではS-PRGフィラーを添加した場合歯髄細胞の足場となり培養早期に象牙芽細胞への分化が誘導され、象牙質様の石灰化物質が形成されることが示された。

今回の実験ではラット腹腔においてb-FGF修飾S-PRG硬化体を直接覆髄材として埋入し、生体内での組織反応を検索した。①対照であるS-PRG群では硬化体の周囲に薄いフィブリン膜が形成されているが細胞成分はほとんど観察されなかった。②カルボン酸処理S-PRGでは対照群に比較して繊維成分の増加が観察され、硬化体表面の粗さが増加したことにより細胞付着が促進されたことが考えられた。③b-FGF浸透S-PRGでは繊維被膜が厚い傾向が観察された。④b-FGF修飾カルボン酸処理S-PRGでは繊維性被膜は③に比較して薄い傾向があるが繊維による被包化が観察された。

結 論：

b-FGFで修飾したS-PRGは周囲に繊維増殖を誘導した。

コンポジットレジンの重合収縮応力
-ダイナミック硬さと弾性率との関係について-

日本大学松戸歯学部 保存修復学講座

○神谷直孝、神谷昌宏、岩井啓寿、福嶋千春、大場志保、池見宅司

Shrinkage Stress of Composite Resin during Hardening
- Relations with the dynamic hardness and elastic modulus -

Department of Operative Dentistry, School of Dentistry at Matsudo

○KAMIYA Naotaka, KAMIYA Masahiro, IWAI Hirotooshi, HUKUSHIMA Chiharu, OOBA Shiho, IKEMI Takuji

【研究目的】

保存修復処置のファーストチョイスとしてコンポジットレジン修復が行われるようになり、使用されるコンポジットレジンも多数の製品が開発され臨床に供されてきた。そのいずれも修復材料の要件である機械的物性や審美性などは臨床上ほぼ問題ない域に到達しているが、唯一重合収縮応力の問題に関して根本的な解決はなされていない。材料の選択肢が増えるとともに、それぞれの製品の性質を理解し、適応症例を考慮しなければならない。本研究の目的は、現在臨床で使用されている3種類の異なる性質を付与された充填用コンポジットレジンの重合収縮応力、ダイナミック硬さ、弾性率を測定し、各製品の特性を把握し使用上の注意点を再認識することである。

【材料および方法】

前・臼歯共用コンポジットレジンとして、1994年の発売からその高い強度により現在も使用されているクリアフィル[®]APX (AP)、審美性と色調適合性を重視したクリアフィル[®]マジスティ[®] (MJ)、高フィラー配合型フロワブルレジンのクリアフィル[®]マジスティ[®]LV (LV)の3種類(すべてクラレメディカル)を供した。

重合収縮応力の測定：サーボ駆動式重合収縮応力測定装置にセットされた内径6mm、深さ3mm(C-Value=3)の黄銅製円筒形モールドにコンポジットレジンを一括充填し、窩洞上端1mmの距離からLED光照射器(ペンキュア、モリタ)で40秒間光照射した。光照射開始時から光照射後24時間の変動を経時的に記録し、光照射終了時(40s)と1時間後(1h)の重合収縮応力を測定した(n=5)。

ダイナミック硬さと弾性率の測定：試料は重合収縮応力測定時と同一条件で作製した。すなわち、内径6mm、深さ3mmの黄銅製円筒形モールドにコンポジットレジンを一括充填し、窩洞上端1mmの距離からLED光照射器(ペンキュア、モリタ)で40秒間光照射した試料の表面(Surface=S)と底面(Base=B)の両面について、ダイナミック超微小硬度計(DUH-211、島津)を使用して最大荷重196.10mN、負荷速度13.32mN/秒、荷重保持時間10秒の条件下にて得られた荷重-押し込み深さ線図より算出した(n=5)。

【成績】

重合収縮応力は40秒間の光照射終了時はAPが最も大きく、ついでLV、MJの順で小さくなった。光照射1時間後の最大値も同様であった。試料表面の硬さと弾性率はAPが最も大きく、ついでLV、MJの順で小さくなった。試料底面の硬さと弾性率も同様であった(下表)。

※クラレ公表値

	発売時期※	フィラー含有率(wt%)※	重合収縮率(vo1%)※	重合収縮応力40s(MPa)	ダイナミック硬さS	弾性率(GPa)
AP	1994年3月	85	1.9	5.9±0.3	71.8±10.9	18.9±2.1
MJ	2006年2月	78	1.9	3.2±0.3	37.1±5.1	9.4±0.7
LV	2007年2月	81	2.5	4.1±0.6	48.4±5.8	12.5±1.5

【考察】

一般的にそのフロー特性と低い弾性率により収縮応力が低いと考えられているフロワブルレジンのLVがペーストタイプ MJ より大きい収縮応力を示した。LVは硬さと弾性率がMJより高い上に重合収縮率はMJよりも大きい。LVは流動性と強度を両立させるため、希釈モノマーの割合を高くしフィラー含有率を向上させていることが考えられ、フィラー充填率、硬さおよび弾性率が低い他のフロワブルレジンと異なる性質を持つことが示唆された。

【結論】

ダイナミック硬さと弾性率が高いコンポジットレジンには、付与された流動性の有無に関わらず重合収縮応力が大きい可能性があり、一般的な認識に囚われずに使用材料の性質を把握して適応症例を考慮すべきである。

ブラシ研磨による歯科用純チタンおよび Ti-Ag 合金の精密研磨

東京都市大学大学院 工学研究科 機械工学専攻¹, 東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座
歯科保存学分野², 東京技研³, 東北大学大学院歯学研究科 口腔生物学講座歯内歯周治療学分野⁴,
東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座歯科生体材料学分野⁵
○田中大資¹, 佐藤秀明¹, 佐藤秀樹², 石戸谷重晴³, 石幡浩志⁴, 小松正志², 高橋正敏⁵

Precision Polishing of Purity Titanium and Ti-Ag Alloys for Dental Materials by Brush Tool

Tokyo City University Graduate School of Engineering¹, Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry², Tokyo Giken³, Division of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry⁴, Division of Dental Biomaterials, Tohoku University Graduate School of Dentistry⁵

○TANAKA Daisuke¹, SATO Hideaki¹, SATO Hideki², ISHIDOYA Shigeharu³,
ISHIHATA Hiroshi⁴, KOMATSU Masashi² and TAKAHASHI Masatoshi⁵

【緒言】

純チタンは、優れた生体親和性を有し、金属アレルギーの発生が極めて少ないことから、難削材であるにも関わらず、歯科用金属材料として、多く使用され始めている。さらに、抗菌性を有するチタン合金として、Ti-Ag 合金が新たに開発された。現在、チタン系材料製の歯冠修復物の、溝部等の複雑な形状を、軸付き砥石により目標の表面粗さまで研磨するには工程が多く、多大な時間を要している。ブラシ研磨は、溝部の凹面の研磨に適しており、冠などの咬合面の複雑な形状の仕上げ研磨に適している。そこで、本研究においては、ブラシ研磨による、純チタンおよび Ti-Ag 合金の仕上げ研磨の可能性について検討する。

【材料および方法】

試験片には、JIS2 種純チタン(神戸製鋼所 KS50)と、スポンジチタン (>99.8%)と銀粒(>99.99%)から、アルゴンアーク溶解炉を用いて溶製した Ti-Ag 合金(Ti-20mass%Ag)を使用した。図 1 に、ブラシ形状を示す。ブラシの外径は約 ϕ 18mm、毛はナイロン製で、太さは ϕ 0.2mm、ブラシの長さは約 9mm である。研磨剤は、粒度番号 #8000(平均粒径 1.2 μ m)の GC 砥粒に、PVP(ポリビニルピロリドン)を混入させ、水道水を加えて、十分に攪拌する。これを静置して、上澄み液を除去し、ペースト状の研磨剤として用いた。図 2 に、ブラシ研磨装置の概略を示す。ブラシ軸は、主軸から、0.6mm 偏心して公転するが、ブラシ自体は自転しない。試験片を送り装置に固定し、研磨剤を約 1g 試験片の上に塗布する。次に、ブラシの先端を接触させ、軸方向にブラシを約 0.2mm 押付け、次に、試験片を、1 秒間あたり 22mm の送り速度で左右に摺動させ、150 秒間研磨を行った。

試験片の初期粗さは、Bollen ら⁽¹⁾が示す歯冠修復物の理想的な表面粗さの値($Ra=0.2\mu$ m 以下)を参考に、GC 砥粒の耐水研磨紙を用いて、表面粗さを約 $Ra=0.2\mu$ m に調整した。表面粗さは、触針式表面粗さ計を用いて、30 秒毎に算術平均粗さ Ra および最大高さ Rz を測定した。

【結果】

図 3 に、研磨時間 t と算術平均粗さ Ra の関係を示す。材料の種類に関係なく、回転数が大きくなると、 Ra は小さくなった。回転数が一定の場合、Ti-Ag 合金の Ra は、純チタンの Ra よりも小さくなった。これより、Ti-Ag 合金のほうが、被削性が良いといえる。

図 4 に研磨面の写真を示す。目視による観察の結果、両材料とも研磨面にくすみが無く、十分に光沢のある平滑面が得られ、歯冠修復物の最終仕上げ面として使用できると考える。また、Ti-Ag 合金のほうが、より光沢があった。これより、Ti-Ag 合金のほうが、純チタンよりも、研磨しやすく、扱いやすい材料といえる。

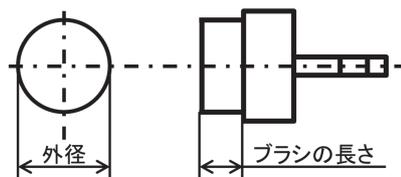


図 1 ブラシ形状

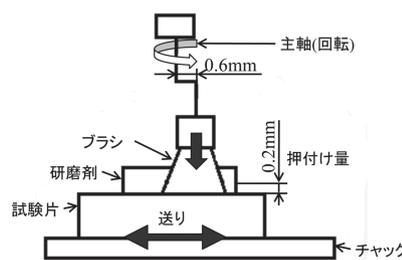


図 2 ブラシ研磨装置の概略

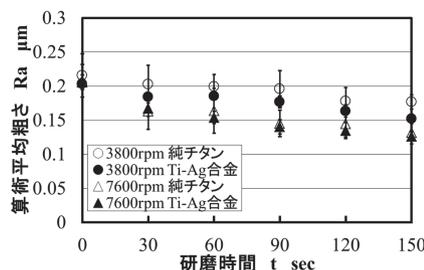


図 3 研磨時間 t と算術平均粗さ Ra の関係

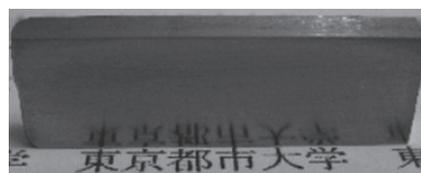


図 4 チタン銀合金を 7600rpm で研磨した面

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

OCT を用いた上顎前歯部におけるラミネートベニア修復

独立行政法人 国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター 歯科口腔先端診療開発部
○ 桐原浩輔、兼原優希、平識善大、小澤総喜、角 保徳

Evaluation of Laminate Veneer preparation with Swept-Source OCT.

Department of Advanced Dental Research, Center for Advanced Medicine for Dental and Oral Disease, National Center for Geriatrics and Gerontology

○ KIRIHARA Kousuke, KANEHARA Yuki, HESHIKI Yoshihiro, OZAWA Nobuyoshi, SUMI Yasunori

【研究目的】

生体に無害な近赤外光を用いた光干渉断層画像診断法(Optical Coherence Tomography : 以下 OCT)は、組織の内部を高解像度に断層像として評価可能であり、眼科領域をはじめ各種医療分野で広く開発競争が行われている。国立長寿医療研究センターにて産官学共同開発を進める歯科用 OCT (波長走査型 OCT : SS-OCT) は、世界的にも最先端の波長走査光源 (特許技術) による波長走査 OCT 技術を用いており、精密断層画像が撮影可能である。

一方、ラミネートベニア修復は、舌側面の削除を行わないことによりアンテリアガイダンスを変化させずに、審美性を回復することが可能であることから、MI に基づいた治療法として補綴学的にも歯科医学的にも有効な審美的修復法とされる。その形成はエナメル質内に留める事が原則とされているが、臨床現場ではエナメル質と象牙質の硬さや色調などの違い及びエナメル質の組織学的な厚さの標準値を頼りにして歯質削除量の目測が行われており、客観性に乏しいという問題がある。以上の背景をもとに、本研究では歯科用 OCT のラミネートベニア修復における有効性を確認する事を目的とし研究を行った。

【材料および方法】

国立長寿医療研究センターにて産官学共同開発を進める歯科用 OCT 画像診断装置 (光源 : 分析用近赤外レーザー $\lambda = 1300\text{nm}$ 帯域) を用い、上顎前歯抜去歯 (形成前、形成途中、形成後) の精密断層像を撮影し評価を行った。なお、本研究は国立長寿医療研究センター倫理委員会 (承認番号 No. 375) による承認下にて行った。

【結果】 歯科用 OCT において、エナメル質、EDJ、象牙質を全例確認可能であった。形成中の歯牙においても、同様にエナメル質の残量の確認が客観的に可能であった。

【考察】

近年の歯牙硬組織接着システムによる辺縁封鎖性は高い予期性を有しており、その効果を最大に得るためには窩洞辺縁をエナメル質の範囲に設定する事が必要とされる。過去の報告から形成時の削除が歯根象牙質まで及んだ場合、ラミネートベニア修復物の破折強度および辺縁封鎖性が低下することが報告されており、臨床的な条件が整っている場合は原則としてエナメル質での辺縁設定が望ましい。OCT の欠点である撮影深度の問題は、歯牙表層のエナメル質を切削の対象とするポーセレンラミネートベニア修復においては問題とならず、極めて客観性の高い評価法と成りえる。

【結論】

歯科用 OCT は、非破壊的に歯牙の断層像を高解像度にリアルタイムで観察可能であり、その断層イメージではエナメル質、EDJ、象牙質の判別が可能であった。本歯科用 OCT を用いるベニア修復法は、従来の方法と比較し高い客観性が得られ、治療精度の向上と高い予期性が期待された。

自己接着性セメントの初期接着挙動

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

○石山智恵美¹, 生形奈緒子¹, 瀧本正行¹, 岩佐美香¹,
渡邊孝行¹, 黒川弘康^{1,2}, 宮崎真至^{1,2} 山形哲則³

Determination of Setting Behavior of Self-Adhesive Cements by use of an Ultrasonic Device

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

Nihon University School of Dentistry

HANAZONO Dental Clinic³

○ISHIYAMA Chiemi¹, UBUKATA Naoko¹, TAKIMOTO Masayuki¹, IWASA Mika¹,

WATANABE Takayuki¹, KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2} and YAMAGATA Tetsunori³

【緒言】

臨床操作ステップの簡略化を目指して開発された自己接着性セメントは、歯質とともに修復物の前処理を不要としたセメントである。臨床的には、この自己接着性セメントは、硬化の初期から強固な接着性を示すことが要求される。しかし、これらセメントはその開発から間もないこともあり、とくに初期における接着性に関しては不明な点が多い。そこで、自己接着性セメントの初期接着性について検討した。

【材料および方法】

自己接着性セメントとして、クリアフィル SA セメントオートミックス (クラレメディカル)、ビューティーセム SA (松風)、ユニセム 2 オートミックス (3M ESPE) および試作セメントである GAM-200 (ジーシー) の合計 4 種類を用いた。

1. 被着歯面の調整

ウシ下顎前歯歯冠部を常温重合レジンに包埋し、直径 6~8 mm の象牙質が得られるよう、モデルトリマーを用いて唇側中央部を研削した。この研削面を耐水性 SiC ペーパー# 600 を用いて露出面が平坦となるよう調整し、象牙質被着面とした。

2. 接着試験用試片の製作

内径 4 mm、高さ 2 mm の円筒形テフロン型に硬質レジンペースト (セラマージュ、松風) を充填、加圧成形し、3 分間光照射して重合した後、24 時間大気保管したものをレジン試片とした。このレジン試片の表面をアルミナ粒子でサンドブラスト処理した後 (0.1~0.2 MPa)、水洗、乾燥した。次いで、サンドブラスト処理面に練和したセメントを塗布、被着面に圧接し、荷重 0.2 N の条件で加圧した。余剰セメントをマイクロブラシを用いて除去した後、2 方向から照射器の光強度をそれぞれ 600 mW/cm² に設定し、30 秒間光照射を行う、あるいは照射することなく 5 分間 37±1°C、相対湿度 50±5% の条件で放置したものを接着試片とした。

3. 接着強さの測定

接着試片を 37±1°C、相対湿度 90±5% の条件で 30 分および 1, 6, 12 および 24 時間保管した後に測定する 5 条件を設定し、所定の保管時間が経過後、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用い、クロスヘッドスピード毎分 1.0 mm の条件で、剪断接着強さを測定した。なお、各条件における試片数は 10 個とした。

4. 走査電子顕微鏡観察

接着試験後のセメント側破断面について、通法に従って臨界点乾燥、金蒸着を施した後、フィールドエミッション走査電子顕微鏡 (ERA-8800FE, エリオニクス) を用いて、加速電圧 10 kV の条件で観察した。

【成績および考察】

自己接着性セメントの象牙質接着強さは、照射なし条件で接着強さが有意に低下する製品および照射の有無によって影響を受けないものに分類された。また、いずれのセメントにおいても初期接着強さは経時的に上昇する傾向を示すものの、その程度は製品によって異なるものであった。

このように、製品によって初期接着性に違いが認められた原因としては、各セメントの組成や接着性モノマーおよび重合開始剤の特性が異なることによるものと考えられた。

【結論】

自己接着性セメントの初期接着性は光線照射条件が影響するとともに、その傾向はセメントの種類によって異なることが判明した。

自己接着性セメントの初期硬化挙動

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門²,
協立病院³, 東京電力病院歯科⁴

○生形奈緒子¹, 石山智恵美¹, 田久保周子¹, 村山良介¹,
安田源沢¹, 黒川弘康^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 長谷川 賢³, 岩崎圭祐⁴

Determination of Setting Behavior of Self-Adhesive Cements

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

KYORITSU Hospital³, TOKYO Denryoku Hospital⁴

○UBUKATA Naoko¹, ISHIYAMA Chiemi¹, TAKUBO Chikako¹, MURAYAMA Ryosuke¹,
YASUDA Genta¹, KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, HASEGAWA Ken³ and IWASAKI Keisuke⁴

【緒言】

臨床操作ステップの簡略化を目指して開発された自己接着性セメントは、歯質とともに修復物の前処理を不要としたセメントである。脆性材料であるセラミクスなどの装着においては、破折を防止するためにも硬化直後から装着に用いられるセメントの機械的強度が必要となるが、自己接着セメントがその臨床的要求を満たしているかについては不明な点が多い。そこで、自己接着性セメントの初期硬化挙動について超音波測定装置を用いて検討した。

【材料および方法】

自己接着性セメントとして、クリアフィル SA セメントオートミックス (クラレメディカル), ビューティーセム SA (松風), ユニセム 2 オートミックス (3M ESPE) および試作セメントである GAM-200 (ジーシー) の合計 4 種類を用いた。

1. 超音波伝播時間の測定

超音波伝播時間の測定には、超音波送受信装置であるパルサーレーザー (Model 5900, Panametrics), 探触子として縦波用トランスデューサー (V112, Panametrics) およびオシロスコープ (Wave Runner LT584, Lecroy) からなるシステムを使用した。

23°Cあるいは37°Cに設定したサンプルステージに、内径5 mm, 高さ2 mmの透明ビニール型を静置し、これに各製造者指示に従って練和したセメント泥を填入、ラッピングフィルムを介してトランスデューサーを接触させ、超音波の伝播時間を経時的に測定し、測定された試片の厚さから縦波音速を算出した。

2. 初期硬化挙動の測定

セメントの初期硬化挙動の測定は、照射を行わないあるいは600 mW/cm²の条件で30秒間照射を行う、2条件で行った。照射を行わない条件では、練和開始から3分まで10秒毎に、その後15分まで30秒毎に測定した。照射を行う条件では、照射中は5秒毎に、照射終了後15分まで10秒毎に測定した。また、1, 6, 12および24時間経過した試片についても測定を行った。なお、各条件における試片数は3個とした。

【成績および考察】

自己接着性セメントの縦波音速はいずれの製品においても練和開始からの時間経過に伴って速くなるものの、その上昇傾向は照射条件および環境温度によって異なるものであった。すなわち、縦波音速の変化が照射条件および環境温度に影響を受けず、練和開始から短時間で上昇するもの、照射を行わないおよび環境温度が低い条件で比較的緩徐に進行するもの、あるいはいずれの照射条件および環境温度においても緩徐に進行するものなど、製品によって異なるものであった。このように、製品によって硬化特性に違いが認められた原因としては、各セメントの組成や重合開始剤の特性が異なることによるものと考えられた。

【結論】

自己接着性セメントの初期硬化特性は、光線照射条件が影響するとともに、その傾向はセメントの種類によって異なることが判明した。

隣接面のプラークコントロールに関する研究

第1報 デンタルフロスによる人工歯隣接面のプラーク除去効率について

鶴見大学歯学部 保存修復学講座¹ 鶴見大学歯学部附属病院 歯科衛生士部²

○ 大塚良子¹, 植松裕美², 中野正寛¹, 齋藤 渉¹, 山口貴央¹, 桃井保子¹

Study on plaque control in interproximal area

Part 1 For plaque removal efficiency of dental flosses in interproximal area

Department of Operative Dentistry, Tsurumi University school of Dental Medicine¹

Division of Dental Hygienists, Tsurumi University Dental Hospital²

○ OTSUKA Ryoko¹, UEMATSU Hiromi², NAKANO Masahiro¹, SAITO Wataru¹,
YAMAGUCHI Takao¹, MOMOI Yasuko¹

【緒言】

隣接面のプラークコントロールを行うことは、う蝕や歯周病の発症予防や進行抑制にきわめて重要である。平成 23 年歯科疾患実態調査によると、我が国において 1 日 1 回以上ブラッシングをおこなう人は 90%以上である。一方で、平成 22 年国民健康・栄養調査によれば、デンタルフロスの使用についてみると全体でわずかに 12.5%であり、その使用が広く浸透していない。近年、使用感の良さやプラーク除去効率が良いことをうたった製品が各社より発売されているが、デンタルフロスのプラーク除去効率を比較した研究は少ない。そこで今回我々は、市販されている各種デンタルフロスでは、プラーク除去効率に違いがあると仮説をたて、隣接面におけるプラーク除去効率を比較検討することとした。

【材料と方法】

1 隣接面のプラーク除去評価

実習用顎模型の着脱式メラミン歯(ニッシン)、下顎左側第一大臼歯の近心面に、人工プラーク(ニッシン)を塗布したものをファントムに設置した状態で同一術者がフロッシングを実施した。フロッシングには 4 社 6 種のデンタルフロス、Waxed floss (Johnson&Johnson)、Unwaxed floss (Johnson&Johnson)、Rucello floss mintwaxed (GC)、Rucello floss unwaxed (GC)、e-floss(ライオン)、flourfloss(オーラルケア)を用い、フロッシングはランダムに各フロスにつき 5 歯ずつ行った。あらかじめ、メラミン歯にはフロッシング領域(被験面)を設定した。

その後、デジタルカメラ(Nikon D100)を用い、メラミン歯の被験面を撮影し、画像分析ソフト Adobe photoshop CS5 を使用してプラーク除去面積を算出した。データの解析はダンカンの多重比較にて行った。

2 デンタルフロスの形態学的観察

走査電子顕微鏡(SEM)を用い、各デンタルフロスについて、フィラメント、表面の状態を観察した。

【結果と考察】

フロッシング後のプラーク除去効率を右図に示す。各フロスのプラーク除去率の平均値は、e-floss と Rucello floss unwaxed($p<0.01$)、e-floss と Unwaxed floss($p<0.01$)、e-floss と flourfloss($p<0.05$)の間で有意差を認めた。

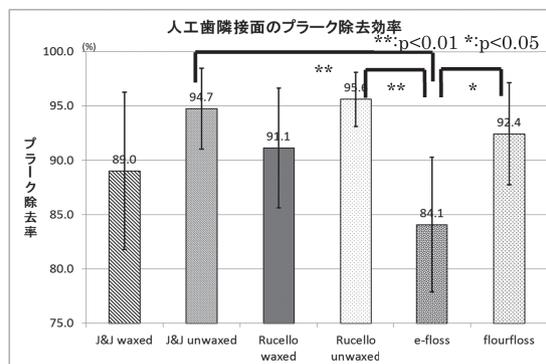
隣接面の清掃効果にはデンタルフロスの繊維そのものの形状やより具合、ワックスの含有量が関わってくるものと思われる。今回は in vitro の設定で使用したので、特に口腔内で膨潤することを期待するエキスパンションタイプは実際に口腔内で使用した状態とは異なると思われる。

我々の行った歯ブラシのみによる予備実験では、接触点より歯肉側の範囲へブラシの毛先を到達させることは比較的困難であり、隣接面のプラーク除去率は 80%前後を示した。今回の実験結果では、84%~95%を示したことから、隣接面、特に接触点の清掃にデンタルフロスは有効である。

【まとめ】

各種デンタルフロスはプラーク除去効率に違いがあった。

同一社の waxed と unwaxed フロスでは、統計学的に有意差は認めなかったものの、unwaxed フロスの方がプラーク除去効率がよい傾向を示した。



LD光源を応用した試作う蝕象牙質認識・除去システムについて

¹昭和大学歯学部歯科保存学講座総合診療歯科学部門

²長田電機工業(株)

○長谷川篤司¹、伊佐津克彦¹、池田 哲¹、高島英利¹、藤森朋奈²

Effect of the experimental laser-induced fluorescence aided caries dentin removal system

¹ Department of Conservative dentistry, Division of Comprehensive Dentistry,
School of Dentistry, The Showa University

² Osada Electronic Co., LTD

○HASEGAWA Tokuji¹, ISATSU Katsuhiko¹, IKEDA Satoshi¹, TAKASHIMA Hidetoshi¹, FUJIMORI Tomona²

【研究目的】

我々は、う蝕罹患歯質の定性、特にう蝕罹患象牙質と健全象牙質の識別には405nm付近にピークを持つ励起光の照射によって発現する両者の励起蛍光の違いを利用する方法が有効である(第131~133回日本歯科保存学会)事を報告した。さらに、この概念を基に405nmのLEDランプを外付け光源として装備するう蝕象牙質認識除去システムを試作したところ、市販う蝕染色液なしにう蝕罹患歯質部分を識別しながら除去することができ、かつ、市販う蝕染色液に匹敵するう蝕罹患歯質識別能力を有することを確認して報告した(第134回本学会)。本研究では当該システムをより臨床応用可能な仕様に近付けるために、外付けLED光源を廃してシステム内で光源を供給できるよう改良した新規う蝕象牙質認識除去システムを試作したので報告する。なお、波長約405nmの十分な光量を確保するためにLD光源を採用した。

【材料および方法】

新規試作う蝕歯質認識・除去システムは、多目的超音波治療器 ENAC (OSADA 社) をベースに発光部とハンドピースに改良を加えて試作した。すなわち、本体とハンドピース(SE-10L)を接続する専用ホースのハンドピース側先端にレーザー光源(LD)を内蔵させ、ここから照出される波長405nmのレーザー光をハンドピース内部グラスファイバーで導光して術野に供給できるようにした。LD出力は本体に別途接続したLASER制御器(OSADA社)にて制御できる仕様とした。冷却水は給水用ボトル内から水道水を供給した。

ヒト新鮮抜去歯は抜去後直ちに水道水中に保管され、2週間以内に実験に供された。抜去歯を歯列模型内に即時重合レジジン(UNIFAST III:GC社)で固定した後、マネキン顎内に設置し、ラバー製頬粘膜を装着した。

遊離エナメル質を含めたう蝕罹患歯質除去のためにハンドピース先端に試作球形ダイヤモンドポイントを装着し、十分な注水下で赤く蛍光した部分をう蝕罹患歯質として削除した。

削除後、切削表面を青色カリエスチェック(ニシカ社)およびう蝕検知液(クラレ社)で染色して観察した。

LASER制御器の最大出力は90mWであったが、試験時には出力を80mWとし、使用時には術者、介助者などは保護メガネ(山本光学)を着用した。

【成績】

LD光源の照射により、口腔内程度の暗視野内で赤く蛍光する齶蝕罹患部と考えられる歯質を識別できることが確認できた。また、出力80mWのLD光源を照明とする術野は十分に明るく、保護メガネ装着時にも他の照明を使用せずに齶蝕罹患歯質除去を適切に実施できた。

【考察および結論】

本試作システムの光源が外付け光源から内部光源に仕様変更できたことで、臨床応用により近づいたものと考えられる。今後、本システムで罹患歯質除去した後の切削面のさらに詳細な検討が必要と考えている。

マイクロコスムバイオフィームによる PRG バリアコートの 脱灰抑制能および抗菌効果の検討

神奈川歯科大学 口腔治療学講座保存修復学分野¹, 感染制御学講座微生物学分野²
○長谷川晴彦¹, 向井義晴¹, 富山 潔¹, 椎谷 亨¹, 三宅 香¹, 菊池隼介¹,
熊田秀文², 浜田信城², 寺中敏夫¹

Evaluation of anti-demineralization and antimicrobial effects of PRG barrier coat using microcosm biofilm model

¹Div. of Restorative Dentistry, Dept. of Oral Medicine, ²Div. of Microbiology, Dept. of Infection Control,
Kanagawa Dental College

○HASEGAWA Haruhiko¹, MUKAI Yoshiharu¹, TOMIYAMA Kiyoshi¹, SHIYA Toru¹, MIYAKE Kaori¹
KIKUCHI Shunsuke¹, KUMADA Hidefumi², HAMADA Nobushiro², TERANAKA Toshio¹

【目的】

S-PRG フィラーは、フッ化物、ストロンチウムおよびホウ酸などのイオンを放出し、歯質の脱灰抑制および抗菌活性などの抗齲蝕作用を示すと報告されており、有用な歯科材料物質として注目されている。そこで、今回我々は口腔内バイオフィームに非常に近似した環境を再現できるマイクロコスムバイオフィームモデル (Exterkate RAM ら, 2010) を用い、バイオフィーム環境下における PRG バリアコートの脱灰抑制能と抗菌効果を検討した。

【材料及び方法】

① 試料作製：ウシ下顎中切歯の歯根部から直径 6 mm 厚さ 1.5 mm の円盤状象牙質を切り出し、試料 2 枚の表面が両側となるように耐熱性の接着剤にて貼り付け、オートクレーブ滅菌後、バイオフィーム形成用試片とした。これらの試片を 6 試料ずつ 2 群、すなわち (1) Control 群 (S-PRG フィラー未配合のバリアコート)、(2) PRG 群 (PRG バリアコート, 松風) に分け、表面半分それぞれにそれぞれの材料を指示書通りに塗布・照射後、未重合層を除去した。また、スタンダード群として(3) Glass 群を加えた。② 培養：バイオフィームの培養には、1 被験者から採取した刺激唾液を用いたマイクロコスムバイオフィームモデルを使用した。すなわち、培養は McBain 2005 (0.2% スクロース含有) を用い、培養液の交換を 10 時間、14 時間の間隔で 1 日 2 回行なう連続嫌気培養を 8 日間行なった。③ pH 測定：培養 24 時間、48 時間、72 時間、144 時間、168 時間および 192 時間後、各々の培養液の pH を測定した。④ 生菌数測定 (CFU/ml)：培養終了後、2 ml PBS 中に各試料を浸漬して 90 秒間超音波振動させ、試料から剥離した細菌数を算出した。生菌数測定用の希釈液は Cysteine Peptone Water を用い、血液寒天培地で 37°C、4 日間嫌気培養後、CFU/ml を求めた。⑤ Transversal Microradiography (TMR) 撮影および分析：細菌を超音波で剥離した後、各象牙質試料から厚さ 300 μm の薄切切片を作製し、管電圧 25kV、管電流 15 mA、照射時間 20 分にて TMR 撮影(PW3830)を行い、分析用ソフト(TMR2000)を用いてコート材端部から 100 μm 離れた象牙質のミネラル喪失量及び病巣深度を測定した。

【結果】

1) 培養液の pH：実験期間中、スタンダードとして用いた Glass 群は他の 2 群と比べてすべての期間で低い pH を示した。また、PRG 群は Control 群と比較して 144 時間以外で有意に低い値となった (Glass 群：pH4.0~4.2, Control 群：pH4.7~5.3, PRG 群：pH4.5~5.0, One-way ANOVA & Tukey, p<0.05)。2) TMR 撮影像およびミネラルプロファイル：PRG 群では表層下脱灰病巣が形成されていたが、Control 群では表層の形成は認められず表面に若干の erosion が観察された。3) ミネラル喪失量及び病巣深度：ミネラル喪失量、病巣深度共に各群間で有意差は認められなかった (t 検定, p>0.05)。4) CFU：PRG 群は Control 群と比較すると有意に低い値となった (One-way ANOVA & Tukey, p<0.05)。

【考察】

酸性溶液を使用した *in vitro* の実験と比較した場合、マイクロコスムバイオフィーム環境下では PRG バリアコートに顕著な脱灰抑制効果は確認できなかった。これは S-PRG フィラーから放出されたフッ化物等のイオンが培養液中のタンパク質や細菌に取り込まれ、脱灰抑制に十分な濃度を保てなかった可能性が示唆された。実際の口腔内においてもこのような可能性は否定できないと思われるが、塗布方法などをさらに検討していく必要があるものと思われる。一方、CFU では Control 群に比べて PRG 群が有意に少ない生菌数を示した。これは歯面コーティング材の表面にマテリアルフィルム層が形成され、細菌の付着及び増殖を抑制している可能性、あるいは S-PRG フィラーから放出されるホウ酸イオン等により抗菌効果が得られたためであると考えられた。

口腔連鎖球菌による歯根象牙質う蝕の誘発

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科¹ 生体機能再生・再建学講座 歯科保存修復学分野、
²国際環境科学講座 口腔微生物学分野
○大原直子¹、田中久美子¹、澁谷和彦¹、西谷佳浩¹、大原直也²、吉山昌宏¹

Induction of root dentin caries by oral *Streptococci in vitro*

¹Department of Operative Dentistry, Field of Study of Biofunctional Recovery and Reconstruction,

²Department of Oral Microbiology, Field of Study of Global Health and Environmental Sciences,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

○OHARA Naoko¹, TANAKA Kumiko¹, SHIBUYA Kazuhiko¹, NISHITANI Yoshihiro¹,
OHARA Naoya², YOSHIYAMA Masahiro²

【目的】

歯根象牙質う蝕は、細菌により産生される酸による脱灰とともに、マトリックスメタロプロテアーゼによる有機質の崩壊が病変の進行に関与しているとされている。試験管内における歯根面う蝕誘発モデルの確立を目的とし、口腔連鎖球菌の菌種および培養条件の相違が初期根面う蝕の誘発に与える影響を検討したので報告する。

【材料および方法】

ヒト抜去前歯の解剖学的歯頸部に近い歯根象牙質部の平坦面を露出後、中央部(3mm×3mm)を除いた全ての歯面をネイルバーニッシュでコーティング後、24時間ガス滅菌を行い被験歯とした。う蝕誘発実験では、供試菌として口腔連鎖球菌の *Streptococcus mutans* GS-5、*S. mutans* MT8148、*Streptococcus sobrinus*、*Streptococcus salivarius*、*Streptococcus sanguis* を用いた。供試菌をスクロース含有 BHI 培地に調整した菌液に、被験歯を 37°C 3日間あるいは 7日間浸漬、反応させることにより実施した。培地中のスクロースの添加濃度および、タイプ IV コラゲナーゼの添加の条件を変えて、それらの効果を検討した。う蝕の程度を判定するため、露出根面を垂直に切断し、切断面をう蝕検知液(カリエスチェック、日本歯科薬品)にて染色した。デジタル顕微鏡(VH-5500、キーエンス)において露出面から歯髄方向へ赤染した距離を計測した。また、ヌーブ硬さおよび反応菌液の pH を測定した。

【結果および考察】

S. mutans GS-5 群は染色深度が最も深く 7 日目で 120 μ m を示した。*S. mutans* MT8148 群、*S. sobrinus* 群、*S. salivarius* 群、*S. sanguis* 群の順に減少した。BHI 培地へ添加したスクロース濃度の検討では、0%の場合にはわずかに染色されたのみだが、1%添加した場合には著明な増加が認められ、5%、20%添加でも同様の効果が認められた。このことから、スクロースの添加が細菌の糖代謝を促進したことが予測される。コラゲナーゼの添加ではいずれの菌群でも染色深度が増加した。酵素による象牙質コラーゲンの分解が、う蝕の進行を促進したことが考えられる。ヌーブ硬さでは、いずれの菌群においても 20KHN 以下であった。反応菌液の pH は、コントロール群が 7.0 に対し、*S. mutans* GS-5 群は 3 日目で 3.9、7 日目で 3.6 に低下しており、*S. sanguis* 群では 3 日目で 4.5、7 日目で 4.1 であった。これらは象牙質の脱灰臨界 pH5.5 よりも低い値であり、菌が培養液中に放出した酸によって歯根象牙質の脱灰が生じたことを示している。

【結論】

口腔連鎖球菌培養液への浸漬による歯根象牙質人工う蝕の誘発について検討した結果、う蝕の誘発能は、酸産生能および耐酸性の高い菌種で高く、スクロースおよびコラゲナーゼの添加は人工う蝕の進行に効果的であることが示された。

齧蝕原因菌に対するピロロキノリンキノンの抗菌効果

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

Antibacterial effects of Pyrroloquinoline against cariogenic bacteria

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

【研究目的】

ピロロキノリンキノン (以下、PQQ) は酸化還元酵素の補酵素の1つであり、水溶性のキノン化合物である。野菜、納豆、緑茶等にも含まれ、ヒト体内にも存在し、特にヒト母乳中に多く含まれ、14番目のビタミンである可能性が報告されている物質である。また、PQQには神経保護作用、神経成長因子の増強作用、抗酸化作用を有することが明らかになっている。また、*in vivo* 動物実験において、記憶能力や識別能力の向上などの脳機能改善作用に効果があることが報告されており、新規健康食品素材として期待されている物質である。

今回我々は、医療分野で有用視されているPQQに着目した。PQQに関する口腔領域に関する研究はもちろん、齧蝕予防に関する研究は行われていない。そこで、本研究は、PQQを用い、齧蝕抑制効果の有無を*in vitro*において検討した。

【材料および方法】

1) 供試菌株および試薬

日本大学松戸歯学部口腔微生物学講座から供与された *Streptococcus mutans* PS-14 株 (以下 *S. mutans*)、*Streptococcus sobrinus* 6715 株 (以下 *S. sobrinus*)、*Actinomyces naeslundii* ATCC19246 株 (以下 *A. naeslundii*) を本実験に使用した。PQQ は Pyrroloquinoline Quinone Na₂ Salt (三菱ガス化学社製) を使用した。

2) 最小発育阻止濃度の計測

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

【成績】

PQQを用いた最小発育阻止濃度の結果は、*S. mutans*、*S. sobrinus* に対して 750 µg/ml、*A. naeslundii* に対しては 1,000 µg/ml であった。菌種間において若干の差はあるものの、これらの菌に対して抗菌力を有することが認められた。

【考察および結論】

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

植物由来成分によるコラーゲン保護効果の In Vitro 評価

○イスラムソフィクル^{1,2}, 平石典子¹, 曾野良平³, 大槻昌幸¹, 田上順次^{1,2}

¹東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野;²東京医科歯科大学大学院歯と骨のGCOE;³サンスター株式会社
研究開発部

In Vitro Evaluation of Plant-derived Agents to Preserve Dentin Collagen

○Islam Sofiqu^{1,2}, Hiraishi Noriko¹, Sono Ryohei³ Otsuki Masayuki¹, Tagami Junji^{1,2}

¹ Cariology and Operative Dentistry, Oral Restitution Department, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University; ²Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases at Tokyo Medical and Dental University; ³R&D Center, Sun star Inc.

Objective: This study was aimed to investigate the effect of various plant-derived agents (hesperidin, proanthocyanidin, epigallocatechin gallate and genipin) on the stability of dentin collagen matrix to resist collagenase degradation.

Methods : The dentin specimens were treated with 0.5 % test solution and subjected to ultimate tensile strength (UTS) and swelling ratio measurements. Demineralized human dentin powder was incubated with 0.02 %, 0.1 % and 0.5 % of each test agent and followed by bacterial collagenase digestion. The extent of collagen degradation was investigated using hydroxyproline assay.

Result : The UTS and swelling ratio measurements revealed that the mechanical property of dentin was improved by the use of these natural agents (Figure 1). The greatest reduction in collagen degradation was shown following the use of hesperidin, proanthocyanidin, and epigallocatechin gallate at 0.5% (Figure 2).

Conclusion : The use of hesperidin, proanthocyanidin, and epigallocatechin gallate could improve the mechanical properties of collagen and resist enzymatic degradation, leading to functional repair of pathological dentin lesion.

Acknowledgements : This work was supported by the grant from the Japanese Ministry of Education, Global Center of Excellence (GCOE) program, International Research Center for molecular Science in Tooth and Bone Diseases.

Figure 1

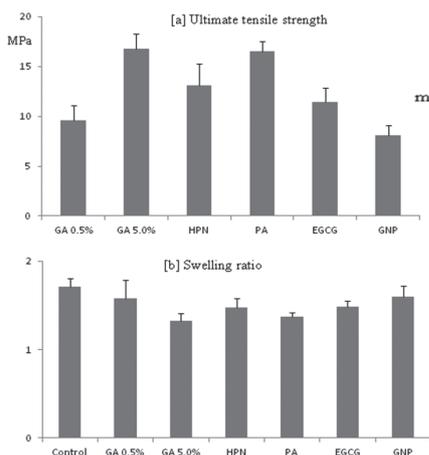
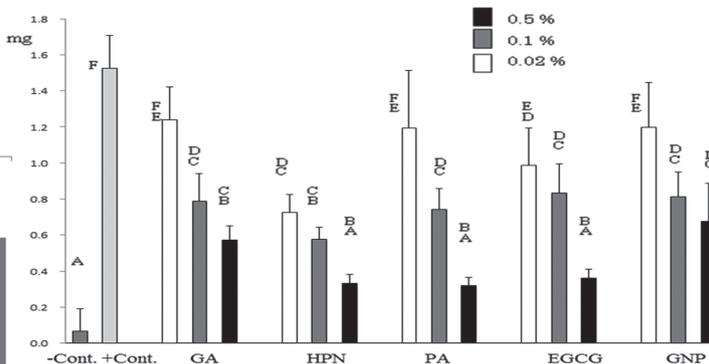


Figure 2



根面う蝕に關与する唾液中のバイオマーカーの加齢による変化

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座, う蝕制御学分野;

²東京医科歯科大学大学院歯と骨の GCOE;

○ナッサル モハンナド^{1,2}, 平石典子¹, イスラム ソフィクル^{1,2}, 大槻昌幸¹, 田上順次^{1,2}

Age-related Changes in Saliva and their Effect on Root Caries

¹Cariology and Operative Dentistry, Department of Oral Health Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ²Global Center of Excellence (GCOE) Program, International Research Center of Molecular Science in Tooth and Bone Diseases at Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan.

○NASSAR Mohannad^{1,2}, HIRAISHI Noriko¹, ISLAM Md.Sofiqul^{1,2}, OTSUKI Masayuki¹, TAGAMI Junji^{1,2}

Introduction: Dental practitioners will provide dental care for more elderly patients in the future. With age more gingival recession (GR) occurs where the root surface is exposed to oral environment, leading to root caries development which is a significant dental problem among elderlies. Salivary factors play an important role in root caries etiology.

Objectives: The objectives of this study were (i) to compare salivary factors (saliva flow rate [SFR], pH, buffering capacity, collagenase type-1, Calcium [Ca], matrix metalloproteinase-8 [MMP-8], α -amylase, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 [TIMP-1], reduced-glutathione/oxidized-glutathione [GSH:GSSG]) and oral-hygiene factors (oral-hygiene index [OHI-S], calculus index [CI-S], debris index [DI-S]) between elderlies and young adults; and (ii) to detect any correlation between salivary factors, root caries index (RCI) and DMFT index.

Methodology: After obtaining informed consents, 20 patients of each elderly and young adult were examined clinically for the presence of coronal and root caries, calculus, debris, missing and restored teeth. Unstimulated saliva was collected with the patient drooling in a collection tube for 5 minutes. SFR, pH and buffering capacity of saliva were measured, followed by centrifuging; supernatant was collected and stored in -80°C until further analysis. RCI was calculated according to the formula: (number of filled root surfaces [FR]+decayed root surfaces [DR])/100/(number of root surfaces with GR+FR+DR). CI-S was measured by detecting calculus on buccal or lingual surfaces of certain teeth and a score was given depending on the amount of calculus covering these surfaces, CI-S is the sum of the scores divided by the number of surfaces. The method for scoring debris was the same as that applied for calculus. DMFT index was recorded for each patient.

Statistical Analysis: To compare the average values between the two groups, variables were compared using Student's t-test. To assess the correlation between quantitative variables, Pearson's coefficient was used.

Results: Elderly patients showed statistically significant higher DMFT, collagenase and MMP-8 values when compared to young adults ($p<0.05$). Young patients showed statistically significant higher SFR and Ca values when compared to elderlies ($p<0.05$). There was no statistical significant difference between the two age groups regarding pH, buffering capacity, α -amylase, TIMP-1 and GSH:GSSG ($p>0.05$). A significant positive correlation was found between DMFT and collagenase ($p<0.05$, $R^2=0.469$), DMFT and MMP-8 ($p<0.05$, $R^2=0.162$), α -amylase and Ca ($p<0.05$, $R^2=0.313$), collagenase and MMP-8 ($p<0.05$, $R^2=0.174$), α -amylase and TIMP-1 ($p<0.05$, $R^2=0.369$) while a significant negative correlation between SFR and collagenase was detected ($p<0.05$, $R^2=0.239$).

Conclusion: Elderly patients had lower SFR and Ca levels, but higher DMFT, MMP-8 and collagenase levels when compared to young adults. We found lower GSH:GSSG in elderlies but the difference was statistically insignificant when compared to young adults. A positive correlation was detected between α -amylase and Ca. A positive correlation was also found between DMFT, collagenase and MMP-8; however this correlation was not observed with RCI which reflects the multifactorial etiology of root caries that includes dietary and oral hygiene habits, microbial and salivary factors.

Acknowledgments: This work was supported by a grant from the Japanese Ministry of Education and Global Center of Excellence (GCOE) program, "International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases".

歯質を変色させない乳歯齲蝕進行抑制法の開発 (第2報)

¹長崎大学大学院医歯薬学総合研究科小児歯科学 ²日本大学歯学部保存修復学講座
○細矢由美子¹、村山良介²、宮崎真至²

Novel arresting caries treatment for primary teeth without discoloration (Report 2)

¹Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Medical and Dental Sciences, Department of Pediatric Dentistry ²Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry
○YUMIKO Hosoya¹, RYOSUKE Murayama², MASASHI Miyazaki²

【研究目的】

本邦では、齲蝕進行抑制を目的にフッ化ジアンミン銀塗布が行われる場合がある。本材による変色は、感染歯質のみならず、再石灰化可能な健全歯質の一部にまで及び、切削以外に変色を除去する方法はない。審美性の破壊は、患者の精神衛生上問題であり、切削不要な部位にまで及ぶ広範囲な切削は、minimal interventionの概念に反する。

そこで、フッ化ジアンミン銀の銀成分をシリカに置換したフッ化ジアミンシリケート： $(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6$ 溶液を脱灰後の乳歯エナメル質に塗布し、塗布面の組成変化を分析し、本材の人工齲蝕部への影響を観察した。

【材料および方法】

抜歯後に生理食塩水中に冷凍保存した健全上顎乳犬歯(長崎大学歯学部倫理委員会認証) 16 歯を使用した。唇面を正中で2分し、切削側と非切削側とした。35%正リン酸 gel で3分間 etching 後に水洗と乾燥を行う操作を2回繰り返した。フッ化ジアミンシリケート(AHF)塗布の有無と1週間の人工唾液浸漬の有無別に4群を設けた(A群：AHF-・人工唾液-、B群：AHF-・人工唾液+、C群：AHF+・人工唾液-、D群：AHF+・人工唾液+)。AHF塗布は、小綿球で歯面に3分間すりこむように行った。人工唾液は、2日おきに交換した。人工唾液浸漬群では試料を水洗後に、その他の群では水洗せずに試料を固定液中に1時間浸漬後、自然乾燥させた。歯軸に平行に試料を分割し、エナメル質表面直下(計測点1)から10 μm 間隔に30 μm 下方(計測点3)までSEM/EDS分析とSEM観察を行った。

統計処理にはANOVA Fisher's PLSD ($\alpha=0.05$)を用いた。

【成績】

<SEM観察>：切削エナメル質並びに非切削エナメル質ともに、1). AHF塗布なしのA群とB群では、リン酸により脱灰されたエナメル質が全面に観察された。脱灰の程度は、人工唾液中に浸漬したB群は人工唾液浸漬なしのA群より弱く、B群ではエッチング形態が不鮮明な部分もあった。A群では、エナメル質全面に明瞭なエッチングパターンが観察された。2). AHF塗布ありのC群とD群では、エナメル質表面全体が細かい粒状の構造物で密に被われていた。

<SEM/ED分析>：Three-way ANOVA (切削・非切削、A・B・C・Dの4群、計測点)による分析結果(Mass%)；

1). エナメル質が切削と非切削の比較：すべての元素について、有意差は見られなかった。2). 4群間の比較：FはD群が他の3群より有意に高く、NaとSiは、C群が他の3群より有意に高く、MgはC群がA群とD群より有意に高く、PはC群が他の3群より有意に低かった、CaはC群とD群がA群とB群より有意に高かった。Ca/Pは、C群とD群がA群とB群より有意に高く、C群はD群より有意に高かった。3). 計測点別比較：F, Ca, O, Pについては、計測点1が他の計測点よりも有意に低かった、Na, Mg, Si, Ca/Pについては、計測点1が他の計測点よりも有意に高かった。

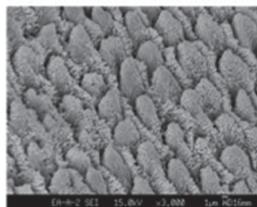
【考察】

強度に脱灰したエナメル質表面にAHFを塗布すると、粒状構造を含む密な1層が形成され、人工唾液浸漬後も残存していた。AHFを塗布したC群とD群ではCa%とCa/PがAHF塗布なしの群より有意に高かった。しかし、Si, MgとCa/Pは、D群がC群より有意に低かった事より、AHFは口腔内で一定の期間は脱灰エナメル質に付着しているが、唾液により次第に溶解すると思われる。D群のF%が他の3群よりも有意に高かったのは、人工唾液中のNaFによると思われる。また、B群の脱灰程度がA群よりも弱かった理由も、人工唾液による影響と推察される。

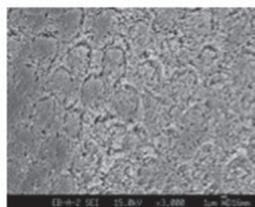
【結論】

AHFは、歯質を変色させることなく、乳歯エナメル質の齲蝕進行を抑制する可能性が観察された。

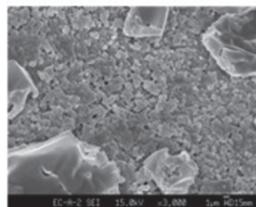
切削乳歯エナメル質



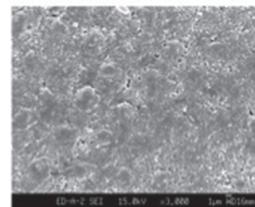
A群 (AHF-, 人工唾液-)



B群 (AHF-, 人工唾液+)



C群 (AHF+, 人工唾液-)



D群 (AHF+, 人工唾液+)

凍結保存されたヒト歯髄細胞における幹細胞関連遺伝子の発現解析

日本大学松戸歯学部¹ 再生歯科治療学講座² 小児歯科学講座³ 口腔微生物講座
○横田容子¹、染井千佳子¹、荒井清司²、平田亮太郎³、菊地信之¹、牧村英樹¹、木村 功¹、
長濱文雄¹、前田隆秀²、和田守康¹

Stem cell-related gene expression in cryopreserved human healthy dental pulp cells

Departments of ¹ Renascent Dentistry, ² Pediatric Dentistry, ³ Microbiology and Immunology,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○Yoko YOKOTA¹, Chikako SOMEI¹, Kiyoshi ARAI², Ryoutaro HIRATA³, Nobuyuki KIKUCHI¹,
Hideki MAKIMURA¹, Koh KIMURA¹, Fumio NAGAHAMA¹, Takahide MAEDA², Moriyasu WADA¹

【研究目的】

再生医療とは、疾患で冒された組織や臓器を自分自身の幹細胞を用いて元の形態や機能を回復、再生することで、現在胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS)など様々な研究が行われているが、安全性や倫理面での課題が多く残る。骨髄や臍帯血にも幹細胞は存在するが、採取する際の負担が大きい。

一方、近年、歯の凍結保存による再生治療が報告されているが、未解明な部分が多い。

そこで今回我々は、長期凍結保存された歯から歯髄を採取、培養し、間葉系幹細胞のマーカーとされている CD146 および神経のマーカーとされている CD271 の抗体を用いて分離し、幹細胞に関与する遺伝子を解析、検討をしたので報告する。

【材料および方法】

長期間凍結保存したヒトの歯から歯髄を採取、培養を行い Miltenyi Biotec auto MACS™ 用いて CD146、CD271 抗体にて幹細胞を分離した。そして、Real-time RT-PCR を用いて CD146(+)CD271(+)細胞、CD146(-)CD271(-)細胞、コントロール細胞(未処理)における幹細胞関連遺伝子の mRNA 発現を比較した。

【結果】

CD146(+)CD271(+)細胞において、転写制御因子である ASCL2、PAX6 の発現が上昇し、正確な軸索誘導などで重要な役割をもつ TUBB3 でも同様であった。また、細胞接着因子に関連する NCAM1 でも CD146(+)CD271(+)細胞において上昇した。さらに、幹細胞の自己複製マーカーである NEUROG2 の mRNA の発現も上昇した。

【考察】

転写制御因子、細胞接着因子、さらには自己複製に関わる遺伝子の上昇から幹細胞の存在が示唆された。長期間凍結した歯においても幹細胞が存在し、歯の凍結保存の効率良い理由の一助になると考えられる。

幹細胞識別マーカーを用いたヒト歯根膜内上皮細胞の分離と培養コロニーの形態観察

¹⁾日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第1講座

²⁾日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学
○北島佳代子¹⁾、山田理絵²⁾、新井恭子¹⁾、五十嵐 勝¹⁾

Isolations of stem cell marker positive cells derived from human PDL and morphologic observations of cell colonies after cell culture

¹⁾Department of Endodontics, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

²⁾Advanced Operative Dentistry・Endodontics, Graduate School of Life Dentistry at Niigata,
The Nippon Dental University

○Kitajima Kayoko ¹⁾, Yamada Rie ²⁾, Arai Kyoko ¹⁾ and Igarashi Masaru ¹⁾

【目的】歯根形成誘導に関与するヘルトウィッチ上皮幹細胞や歯根嚢胞形成に関わるマラッセ上皮残渣などの上皮系細胞は、多能性を有する細胞とも考えられている。その性質を詳細に検討することは、歯根形成のメカニズムと根尖性歯周疾患成立のメカニズムの解明、ならびにその治療法の確立において大きな意義を有し、さらには組織再生療法にも多大な効果をもたらすことが期待される。本研究は、歯根膜内の上皮細胞を幹細胞識別マーカーで分離し、分離した細胞群の培養後の形態的特徴を比較することを目的としている。

【材料および方法】日本歯科大学新潟病院口腔外科に来院し、本研究の目的に合意して協力が得られた患者(20歳、女性)から、下顎左側歯根未完成埋伏智歯抜去歯を得た(倫理承認番号 院 146, ECN-ID-201)。実体顕微鏡下で歯根中央 1/3 の歯根膜組織を採取し、feeder layer として Mitomycin 処理した 3T3 細胞(ATCC, #CCL92)を加えて DMEM-FAD にて初代培養し、敷石状コロニーを形成する上皮細胞を得た。継代した上皮細胞に ALDEFLUOR(VERITAS 社製, 以下 ALD)の Assay Buffer を加えて懸濁し、抗 CD31 抗体を加えて、Flowcytometry (FCM)を Vantage SE (Becton・Dickinson 社製)にて行った。回収した CD31⁺/ALD⁺ 細胞群と CD31⁻/ALD⁺ 細胞群を再度継代培養し、細胞数を確保した。次に、各々の細胞群を ALD の Assay Buffer で懸濁し、抗 CD44 抗体を加え、再度 FCM を行った。得られた細胞群をさらに培養し、CD31⁺/ALD⁺/CD44⁺ 細胞群(A 群)、CD31⁺/ALD⁺/CD44⁻細胞群(B 群)、CD31⁻/ALD⁺/CD44⁺細胞群(C 群)、CD31⁻/ALD⁺/CD44⁻細胞群(D 群)のコロニーと細胞の形態を顕微鏡にて観察し、特徴を比較検討した。

【結果】ALD と CD31 の FCM の結果、両者ともコントロールと比較して細胞集団全体が陽性にシフトした。CD31⁺/ALD⁺画分は 2.22% (細胞数 0.87×10^5)、CD31⁻/ALD⁺画分は 5.12% (細胞数 2.2×10^5)であった。CD31⁺/ALD⁺細胞群ならびに CD31⁻/ALD⁺細胞群についての ALD と CD44 の FCM の結果は、A 群 8.15% (細胞数 8.5×10^5)、B 群 2.23% (細胞数 2.7×10^5)、C 群 5.77% (細胞数 1.8×10^5)、D 群 0.27% (細胞数 0.2×10^5)であった。継代培養時のフラスコからの剥離状態は、A 群、B 群では堅固であったが、C 群、D 群は脆弱であった。A~D 群の培養結果は、ともに培養 2~3 日目にコロニー形成の開始が観察され、経時的にコロニーの大きさが増大した。典型的な holoclone は少数しか観察されず、paraclone 様の不規則な外形を示すコロニーが次第にネットワーク状構造を形成した。C 群ではネットワーク状構造の形成が遅く、培養 5 日目頃より細胞の集まった球状構造が散見されるようになり、1 週後には大きさ、数ともに増大した。

【考察】ALD は、幹細胞性遺伝子の制御に関わる Aldehyde Dehydrogenase (ALDH)を指標とし、primitive な細胞と mature な細胞、生細胞と死細胞あるいは脆弱な細胞を分別し同定できる試薬であり、幹細胞や前駆細胞のみをソーティングすることができる。また ALD は上皮幹細胞マーカー CD133 を含むとされ、従って、A~D 群は上皮系幹細胞や前駆細胞を含む細胞集団であると考えられる。さらに、血管内皮細胞マーカー CD31 でソーティングした細胞群を除外した C 群と D 群は、血管系以外の上皮幹細胞集団と考えられる。CD44 は、無制御に自己複製能と多分化能を獲得した悪性腫瘍の発現初期に増加するとされるが、C 群にみられた球状構造物が、頭頸部悪性腫瘍幹細胞集団にみられる球状構造物に類似した特異な形態を示したことは興味深い。今後、三次元培養や免疫染色等により自己複製能や多分化能について詳細に分析する予定である。

【結論】ヒト歯根膜から得た細胞を ALDH、CD44、CD31 を指標としてソーティングし、各細胞分画の特徴を観察したところ、CD31⁺/ALD⁺/CD44⁺細胞群の継代培養において、特異な球状構造物が観察された。歯根膜には血管内皮細胞以外の上皮幹細胞集団が存在し、これらに自己複製能、多分化能を有する細胞が含まれる可能性が示唆され、ヘルトウィッチ上皮幹細胞やマラッセ上皮残渣との関連が注目された。

本研究の一部は科学研究費基盤研究(C) (21592435)および日本歯科大学新潟生命歯学部研究推進補助金(NDUF-08-13)の助成を受けたものである。

脂肪由来幹細胞を用いたイヌ歯根膜の変化

1. 日本大学松戸歯学部 小児歯科学講座 2. 再生歯科治療学講座
3. 口腔微生物学講座 4. クラウンブリッジ補綴学講座 5. 株式会社シームス
○荒井清司¹、塚本亮一¹、横田容子²、平田亮太郎³、木村 功²、小林 平⁴、漆畑直樹⁵、
和田守康²、前田隆秀¹

Effect of Adiposed-derived stromal stem cells on periodontal healing mechanism after tooth replantation

1. Nihon University School of Dentistry at Matsudo Department of Pediatric dentistry 2. Department of Renascent dentistry 3. Department Microbiology and Immunology 4. Crown and bridge prosthodontics 5. SEEMS Inc.

○Kiyoshi Arai, Ryoichi Tsukamoto, Yoko Yokota, Ryoichiro Hirata, Koh Kimura, Taira Kobayashi, Naoki Urushihata, Moriyasu Wada, Takahide Maeda

【研究目的】

歯科臨床において、完全脱臼を伴う外傷に遭遇することが多い。完全脱臼した歯を再植した場合、再植歯の予後は左右するのは再植歯周囲の歯根膜細胞の状態である。我々は、イヌ外傷モデルの確立を行い、再植に伴う外部吸収のメカニズムの解析を行ってきた。今回 *in vivo* マイクロ CT で同一イヌ個体を経時的に観察し、脂肪由来幹細胞 (Adipose tissue Derived Mesenchymal Stem Cell: 以下 Ad-MSC) をイヌ外傷モデルに応用し、新たな知見を得たので報告する。

【材料および方法】

1. 動物実験

生後3年齢のビーグル犬8匹(雄, 約10kg)を実験2週間前に全顎的な歯石除去した後、実験に供した。1%プロポフォルにて静脈内鎮静を行い、2%キシロカインにて局所麻酔後、抜歯した。抜歯後、以下の6群に分けた。

1. 乾燥 (抜歯後45分で再植) 2. 乾燥 (抜歯後60分で再植) 3. 牛乳 (抜歯後45分間牛乳浸漬後再植) 4. 牛乳 (抜歯後60分間牛乳浸漬後再植) 5. Ad-MSC+牛乳 (抜歯後45分間牛乳浸漬 Ad-MSCを歯根周囲に塗布後再植) 6. Ad-MSC+牛乳 (抜歯後60分間牛乳浸漬 Ad-MSCを歯根周囲に塗布後再植) として再植した。

再植後、スプリントとコンポジットレジンにて再植歯の固定を行った。

2. *in vivo* マイクロ CT 撮影

同一個体のビーグルにおける再植後の経時変化は、R_mCT (Rigaku 社製) を用いて検討した。*in vivo* マイクロ CT 撮影は術前、術直後、術後1週、術後2週、術後4週、術後8週に行った。*in vivo* マイクロ CT 撮影条件は、90 kv, 88 mA の撮影条件下で行った。画像再構成ソフトには i-view (モリタ製作所社製) を使用した。

3. 組織学的評価

屠殺後、通法に従い HE 重染色および免疫染色を行った。

今回使用した Ad-MSC は、実験2週間前に歯石除去の際、各イヌそれぞれの腹部より採取した脂肪を株式会社シームス (東京) に依頼し、脂肪幹細胞に分離、培養した細胞を実験に供した。今回の実験は日本大学松戸歯学部動物倫理委員会の承認 (承認番号 05-0003) を得て行った。

【成績】

乾燥群では、45分、60分群ともに外部吸収がマイクロ CT および病理組織像から確認された。牛乳群は乾燥群と比較して60分群において外部吸収された面積は有意に少なかった ($p < 0.05$)。Ad-MSC 群においては乾燥群、牛乳群と比較して外部吸収された面積は、有意に少なかった ($p < 0.05$)。免疫染色結果から Ad-MSC 群は乾燥群、牛乳群と比較して外部吸収のマーカーである TRAP 染色したところ破歯細胞の発現が有意に少なかった ($p < 0.05$)。

【考察】

外傷における再植術を行う場合、再植までの時間が重要な条件となる。乾燥させた状態や牛乳に浸漬した状態であっても60分経過すると歯根の外部吸収が生じるが、Ad-MSC の抗炎症作用により外部吸収が抑制されると考えられる。

【結論】

再植後、乾燥群と牛乳群ではマイクロ CT および病理組織において外部吸収像が確認された。Ad-MSC を使用した群では、外部吸収像が確認されなかった。以上のことからイヌ外傷モデルにおいて Ad-MSC の有用性が示唆された。

本研究は科研費 MEXT/JSPS 23792448 の助成を受けたものである。

象牙質顆粒と幹細胞を用いた骨再生療法の開発

1) 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野

2) 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔生化学分野

○田中雅士¹⁾ 小栗健策¹⁾ 森 春菜¹⁾ 川木晴美²⁾ 近藤信夫²⁾ 吉田隆一¹⁾

Development of new bone regenerative therapy using dentin particles and stem cells

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

2) Department of Oral Biochemistry, Division of Oral Structure, Function and Development,
Asahi University School of Dentistry

○Tanaka Masashi¹⁾ Oguri Kensaku¹⁾ Mori Haruna¹⁾ Kawaki Harumi²⁾ Kondoh Nobuo²⁾ Yoshida Takakazu¹⁾

【研究目的】

現在、骨再生療法の現場では様々な材料が開発、使用されている。代表的な補填材として HA、 β -TCP、焼成した牛骨などが知られ、最近では象牙質も用いられている。本研究では補填材と細胞を応用した再生療法の開発を目的とし、その操作性も考慮して、上記の材料と共に歯髄および脂肪組織由来幹細胞の細胞塊形成を試み、細胞塊形成に有利な材料を検討した。

【材料および方法】

1. 抜去歯の採取

実験に用いた抜去歯は患者の同意のもと、朝日大学歯学部倫理委員会の承認（第 23111 号）を得て採取した。朝日大学附属病院口腔外科を受診した患者の中から、矯正治療の為に便宜抜歯が必要とされたもの、智歯周囲炎の為に抜歯が必要とされたもののうち、う蝕のない歯を選択し、抜歯直後に -80°C で凍結保存した。

2. ヒト象牙質の粉碎および顆粒の粒径を分別

抜去歯からエナメル質、歯根膜、セメント質、歯髄を除去し、根尖から 3mm で切断した。次に象牙質を粉碎し、粒径 $212\mu\text{m}$ 以上の象牙質顆粒を作製した。

3. 滅菌

2 で作製した顆粒をオートクレーブを用いて滅菌した。

4. 細胞の培養

歯髄幹細胞ならびに脂肪幹細胞を、ヒト象牙質顆粒でコートした 96 ウェルのプレート上で、2 週間培養を行った。

5. 細胞塊の形態観察

歯髄幹細胞、脂肪幹細胞を用いて形成された細胞塊を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、その後、凍結切片を作成し、HE 染色を行った。

【結果】

歯髄幹細胞はすべてのウェルで象牙質を凝集させ、細胞塊を形成した。細胞塊周囲には膜状の構造物が認められた。一方、脂肪幹細胞はいくつかのウェルで象牙質を凝集させたが、歯髄幹細胞の方が凝集する傾向が強かった。さらに SEM を用いた観察では、象牙質の周囲に膜状の細胞自身が分泌した細胞外基質が覆っているのが認められ、HE 染色像では象牙質の周囲に細胞や線維成分が認められ、象牙質が隙間なく詰まっているのではなく、基質成分が介在して、顆粒と顆粒の間に細胞が十分遊走していけるスペース ($100\sim 200\mu\text{m}$) が観察された。

【結論および考察】

歯髄幹細胞と脂肪幹細胞は細胞塊を形成し、再生療法への応用の可能性が示唆された。歯髄幹細胞の方が象牙質との細胞塊形成に適していたが、脂肪幹細胞の方が細胞源として有利であり、その有用性についての検討が必要である。今後は、様々な大きさの象牙質顆粒を用いて動物実験を行い、細胞塊形成だけではなく、動物の骨欠損部に移植し、骨に置換するのに有利なサイズや滅菌方法を検討するなど、骨の増殖、分化、誘導能についても評価し検討していく予定である。

ステロイドコアクチベーターMTI-IIによる骨芽細胞様細胞への影響

¹九州歯科大学齶蝕歯髄疾患制御学分野、²聖マリアンナ医科大学 大学院 疾患プロテオソーム・分子病態治療学、³九州歯科大学総合診療学分野
○平田-土屋志津¹、岡本一起²、寺下正道³、北村知昭¹

Effects of steroid-coactivator MTI-II on osteoblastic cells

¹Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Kyushu Dental College
²Clinical Proteomics and Molecular Medicine, St.Marianna University Graduate School of Medicine
³Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental College
○HIRATA-TSUCHIYA Shizu¹, OKAMOTO Kazuki², TERASHITA Masamichi³, KITAMURA Chiaki¹

【目的】 難治性根尖歯周組織疾患では、十分にコントロールされていない「慢性炎症」が根尖部に持続していることが考えられる。根尖歯周組織に生じた骨欠損の再生を確実にするためには、感染制御と再生療法技術に加え、慢性炎症制御が重要と言える。これまでに我々は、骨組織再生療法の確立を目的として、炎症反応時の主たるシグナル伝達経路であるNF- κ BシグナルとBMPシグナルの相互作用に着目し、それらの相互作用について報告してきた。今回、ステロイドコアクチベーターであるMacromolecular Translocation Inhibitor II (MTI-II)に着目し、骨芽細胞様細胞における炎症応答抑制効果と骨芽細胞分化への影響について検討した。

【材料と方法】 骨芽細胞様細胞であるヒト骨肉腫細胞MG63にMTI-II発現プラスミドを遺伝子導入後、位相差顕微鏡下で細胞形態を観察するとともにWSTアッセイにより細胞増殖能を測定し遺伝子導入による影響を検討した。次に、MTI-II発現プラスミドおよびNF- κ Bルシフェラーゼ発現プラスミドを同時に遺伝子導入し、炎症性サイトカインTNF α (10 ng/ml)で12時間刺激後にルシフェラーゼ活性を測定し、NF- κ Bの転写活性を分析した。さらに、MTI-II発現プラスミド導入細胞をTNF α で刺激後、全RNAを調整し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、NF- κ B標的遺伝子としてMatrix metalloproteinaseのプライマーを用いてリアルタイムPCRを行い、MMP-9の発現を分析した。また、マウス筋芽細胞株C2C12細胞をTNF α (10 ng/ml)で前処理した後、BMP4 (10 ng/ml)で刺激し、骨芽細胞の初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)活性を測定した。

【結果】 MG63細胞にMTI-II発現プラスミドを遺伝子導入し、位相差顕微鏡で観察したところ、コントロールの細胞と比べて、形態的特徴や細胞増殖能に有為差は認められなかった。一方、MG63細胞をTNF α で刺激すると、NF- κ Bの転写活性が著しく上昇した。しかし、MTI-IIを過剰発現させるとMTI-II濃度依存的にNF- κ Bの転写活性の上昇が解除・抑制された。また、細胞をTNF α で刺激すると、MMP-9の発現の増加が認められたが、MTI-IIを過剰発現させた細胞では、MMP-9の発現増加が解除・抑制された。さらに、C2C12細胞にTNF α を刺激すると、BMPによるALP活性が抑制されるが、MTI-IIを過剰発現させるとMTI-II濃度依存的にALP活性の抑制が解除された。

【考察】

今回の結果は、ステロイドコアクチベーターMTI-IIがMG63細胞の形態や増殖能に影響を及ぼすことなく、TNF α 刺激に対するMG63細胞の炎症応答を抑制することを示している。また、TNF α 刺激によるBMP誘導性骨芽細胞分化の抑制をMTI-IIが解除しており、以上の結果は、MTI-IIが難治性根尖性歯周炎等に対する抗炎症剤と骨形成促進剤としての可能性を示唆している。

【結論】

MTI-IIは、骨芽細胞様細胞が示すTNF α 刺激に対する炎症応答を抑制するとともに、骨芽細胞分化へも影響を及ぼす。
特許番号：4874798 (日本、査定済)、US 7932226 (米国、査定済)、05755776.1 (EU、査定中)

LIF-STAT3-SOCS3 シグナル伝達経路は骨芽細胞分化を抑制する

¹大阪大学大学院 歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)
○松下健太¹、伊藤祥作¹、池田 峻¹、山本由美子¹、山内由香子¹、林 美加子¹、恵比須繁之¹

LIF-STAT3-SOCS3 signal pathway suppresses osteoblast differentiation

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology,
Osaka University Graduate School of Dentistry
○MATSUBITA Kenta¹, ITOH shousaku¹, IKEDA Shun¹, YAMAMOTO Yumiko¹, YAMAUCHI Yukako¹,
HAYASHI Mikako¹, EBISU Shigeyuki¹

【研究目的】

骨髄ストローマ細胞は、分化誘導培地にて培養することにより様々な種類の細胞へ分化誘導することができる。これは、骨髄ストローマ細胞には未分化間葉系幹細胞が含まれているからである。そして、この骨髄ストローマ細胞は、骨芽細胞・線維芽細胞・象牙芽細胞などの歯・歯周組織に関連する細胞へ分化しうる細胞であるとも考えられている。我々はこれまでも IL-6-gp130 シグナル伝達経路の骨髄ストローマ細胞から骨芽細胞への分化における機能解析を行い、そのメカニズムの一端を明らかにしてきた。しかしながら、IL-6 ファミリーに属する Leukemia Inhibitory Factor (LIF) の骨芽細胞分化に対する働きについては、未だ明らかとなっていない。そこで今回、我々は骨髄ストローマ細胞から骨芽細胞への分化における LIF の働きについて、シグナル伝達経路の観点からその制御機構のメカニズムの一端を明らかにしたので報告する。

【材料と方法】

1. C57BL/6J マウスの大腿骨と頸骨から骨髄細胞を調整し、10%FBS 含有 α -MEM 中で培養した。培養 3 日目に PBS にて浮遊細胞を除去した。そして 2 週間培養後、この付着細胞を骨髄ストローマ細胞とした。10%FBS 含有 α -MEM と 50 μ g/ml ascorbic acid、10mM β -Glycerophosphate、 10^{-8} M Dexamethasone にて 骨芽細胞分化誘導培地を調整し、これに LIF を含むものと含まないものを作成した。骨髄ストローマ細胞をこれらの培地中で 3 週間培養したのち ALP 染色および von Kossa 染色を行い、CFU-0 (Colony-forming units-osteoblast) 数を計測し、石灰化能を評価した。
2. 上記の LIF 含有、非含有骨芽細胞分化誘導培地にて骨髄ストローマ細胞を培養した。2 週間培養後、セパゾールを用いて RNA を回収し逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。この cDNA に対して骨芽細胞分化マーカーである *ALP*、*BSP*、*Col1a*、*OCN*、*Runx2*、*Osx* の各プライマーを用いて real-time PCR を行い各マーカーの mRNA の発現量を比較検討した。
3. 骨髄ストローマ細胞を LIF (100ng/ml) にて刺激し、タンパクを回収しウエスタンブロッティング法にてリン酸化 STAT3 タンパクおよび SOCS3 タンパクの検出をおこなった。
4. sh-SOCS3 にて SOCS3 をノックダウンした骨髄ストローマ細胞を用いて 1. と同様の培養を行い CFU-0 数を計測した。

【結果】

1. LIF を含む骨芽細胞分化誘導培地にて培養した骨髄ストローマ細胞の CFU-0 数は、LIF を含まない骨芽細胞分化誘導培地にて培養した骨髄ストローマ細胞の CFU-0 数に対して有意に減少していた。
2. すべての骨芽細胞分化マーカーの発現量は、LIF の添加によりその発現量が抑制されていた。
3. LIF 刺激により、リン酸化 STAT3 と SOCS3 の発現量が増加した。
4. SOCS3 ノックダウン骨髄ストローマ細胞において、LIF 刺激による CFU-0 数の有意な減少は観察されなかった。

【結論】 以上の結果から LIF は JAK-STAT3 シグナル伝達経路により SOCS3 の発現を誘導し、骨芽細胞への分化および石灰化を抑制することが明らかとなった。

(本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金 (若手研究 (B) 24792021) の補助の下に行われた)

新規バイオガラス配合セメントが骨芽細胞様細胞に及ぼす影響

¹九州歯科大学口腔治療学講座齶蝕歯髄疾患制御学分野

²医療人間形成学講座総合診療学分野

○中川愛加¹、鷺尾絢子¹、平田-土屋志津¹、寺下正道²、北村知昭¹

The Effects of New Bioglass Cement of Osteoblast Like Cells.

¹Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics,

²Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental College

○NAKAGAWA Aika¹, WASHIO Ayako¹, HIRATA-TSUCHIYA Shizu¹, TERASHITA Masamichi², KITAMURA Chiaki¹

【研究目的】

我々の研究グループは、生体組織の適切な創傷治癒・再生誘導を目的として、組織融合性や生体親和性、硬組織誘導能などを示すセメントの開発を企業とともに進めている。今回、共同研究の成果として、バイオガラスを配合した新しいセメント（開発コード：NSY-222）を開発した。NSY-222に配合されているバイオガラスは、新生骨を形成し骨伝導能を有するバイオマテリアルとして整形外科領域において既に臨床応用されている。骨欠損を伴う根尖性歯周炎の歯内治療において使用するセメントにバイオガラスを応用すれば、根尖部における良好な硬組織形成誘導が期待される。今回、NSY-222、およびバイオガラスではなくフッ素非含有アルミノシリケートガラスが配合されたセメント（NSK-12）がマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞（MC3T3 E-1細胞）に及ぼす影響を検討するとともに、細胞応答とバイオガラスとの関連性を検討した。

【材料と方法】

<試験片の作成>

NSY-222 および NSK-12 は 2 つのペーストを練和することにより作成される。実験に用いた試験片は、2 つのペーストを練和後に定型の鋳型内（内径 6 mm、高さ 12 mm）に埋入し、擬似体液（SBF）内に 4 日間浸漬することで硬化させ PBS で洗浄して作成した。

<細胞への影響>

培養用ディッシュ中央に、SBF に浸漬して作製した試験片を静置後、通法に従って MC3T3-E1 細胞を播種し、試験片が浸漬されるまで培養液を追加した。一定時間（12、24、36、および 48 時間）経過後に位相差顕微鏡下で細胞の形態変化を観察するとともに、トリパンブルー染色により細胞生存率を測定した。

また、試験片に対する細胞の接着状態を明らかにするため、DMEM 培地中に 1 日間浸漬した試験片上に細胞を播種後、ヘキスト染色および DAPI 染色を行い、落射型蛍光顕微鏡にて観察した。

【結果】

セメント周囲の細胞を位相差顕微鏡で観察したところ、NSK-12 周囲では多くの細胞死が観察されたが、NSY-222 周囲では試験片に直接接触する位置まで細胞が増殖しているのが観察され、高い細胞生存率を示していた。また、ヘキストおよび DAPI 染色で細胞の接着状態を観察したところ、試験片上に細胞が良好に接着している様子が観察された。

【考察】

今回、新規バイオガラス配合セメント NSY-222 は MC3T3-E-1 細胞に為害性を与えず良好な影響を示すことが明らかとなった。また、細胞応答には配合されたバイオガラスの影響が大きいことが示唆された。

【結論】

新規バイオガラス配合セメントは、歯内療法、穿孔部封鎖などに応用されるセメントとして期待される。

歯根肉芽腫における midkine と chemokine 遺伝子発現

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、
○羽鳥啓介¹、武市 収^{1,2}、牧野公亮¹、小林 寛¹、兼坂絵理奈¹、鶴町 保^{1,2}、小木曾文内^{1,2}

Gene expression of midkine and chemokine in human periapical granulomas

Department of Endodontics¹ and Division of Advanced Dental Treatment², Dental Research Center,
Nihon University School of Dentistry

○Keisuke Hatori¹, Osamu Takeichi^{1,2}, Kosuke Makino¹, Hiroshi Kobayashi¹, Erina Kanesaka¹,
Tamotsu Tsurumachi^{1,2}, Bunnai Ogiso^{1,2}

【背景】

midkine はヘパリン結合性成長因子であり、様々な腫瘍で発現し、細胞の分化や成長などを促進していることが知られている。さらに、炎症局所で免疫担当細胞の遊走などを促進することにより、関節リウマチなどの慢性炎症の惹起に深く関与していることが報告されている。一方、chemokine である CXCL12、CXCL13、CX3CL1 は midkine と同様に、T リンパ球、B リンパ球、マクロファージなど免疫担当細胞の遊走への関与が報告されている。

演者らは、歯根肉芽腫における midkine と chemokine タンパク発現および midkine 遺伝子発現を確認し、歯根肉芽腫中の血管内皮細胞が中心的な役割となっており、歯根肉芽腫の発生や成長に深く関与している可能性を見出し、それぞれ第 131 回、132 回本学会で報告した。

【研究目的】

歯根肉芽腫および健常歯肉組織での chemokine 遺伝子発現を検索し、比較検討する。また、炎症性サイトカインがヒト臍帯静脈血由来血管内皮細胞 (HUVEC) による midkine および chemokine 遺伝子発現に及ぼす影響を検索することによって、炎症中での細胞遊走への関連の解明することを目的とした。

1. 被験材料

口腔内診査ならびに根尖部エックス線診査にもとづき、慢性根尖性歯周炎と診断された患者のうち、歯内外科処置または抜歯処置が適応と診断された患者 60 名を被験者として、根尖病巣組織を採取した。また、健常歯肉組織は完全水平埋伏智歯の抜歯ならびにインプラントの 2 次手術の際に 5 例採取した。なお被験者には採取した組織を本研究に用いることを説明し、文書にて同意を得た(倫許 2007-24)。

2. 試料の調製および病理学的検索

採取した組織は、ただちに OCT コンパウンドで包埋し、ドライアイス・アセトンを用いて凍結し、クリオスタットを用いて、7 μm の凍結切片を作製した。通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色を行ったところ、全根尖病巣組織のうち、54 例が歯根肉芽腫であることを確認した。

3. 細胞培養

HUVEC を 4 代から 6 代まで継代培養を行った後、リコンビナントヒト TNF-α および IFN-γ で刺激し、2 時間、8 時間、12 時間、24 時間、48 時間および 72 時間後に細胞の回収を行った。

4. Real time PCR

各組織および培養細胞の midkine と chemokine 遺伝子の発現を検索するために、Trizol を用いて RNA を回収し、Takara Prime Script を用いて cDNA を作製した。その後、Smart Cycler にて、real time PCR 分析を行った。その際、GAPDH 遺伝子により、遺伝子発現レベルを標準化した。

【成績】

1. 歯根肉芽腫の chemokine 遺伝子の発現量は健常歯肉組織での発現量よりも有意に高かった。
2. 刺激した HUVEC ではコントロール群に比べ、有意に高い midkine 遺伝子発現を認めた。
3. 刺激した HUVEC でコントロール群に比べ、有意に高い CX3CL1 遺伝子発現を認めた。その他の chemokine 遺伝子も発現を認めた。

【考察】

以上の成績から、慢性炎症である歯根肉芽腫中の血管内皮細胞で midkine および chemokine が発現し、その病態に何らかの形で関与していることが示唆された。