

エナメル質と各種ボンディング材との接着界面における ABRZ の評価

¹東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 歯制御学分野 ²東京医科歯科大学 歯と骨の COE 拠点

○佐藤 隆明¹、高垣 智博¹、松井 七生子¹、二階堂 徹¹、田上 順次^{1,2}

Comparison of Acid-base Resistant Zone on Enamel using various bonding systems.

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

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

○Takaaki Sato¹, Tomohiro Takagaki¹, Naoko Matsui¹, Toru Nikaido¹, Junji Tagami^{1,2}

【緒言】

レジン-象牙質接着界面の耐酸性については、酸-塩基処理後に樹脂含浸層の直下に Acid-base Resistant Zone (ABRZ) が観察される。その形態にはボンディングシステムにより違いがあることが報告されている。さらに ABRZ の形成には、機能的モノマーとヒドロキシapatite との化学的な相互作用が重要な役割を果たすことが示唆されている。しかし、二次う蝕形成においてより重要な意義を持つ、レジン-エナメル質接着界面の耐酸性に対する詳細な検討は充分に行われていない。研究は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、2種の2ステップセルフエッチングシステムと、3種のワンステップシステムを用いて、エナメル質接着界面における酸-塩基処理後の接着界面の形態を比較検討した。

【材料および方法】

実験材料として2ステップシステムである Clearfil Mega Bond (MB: Kuraray Noritake Dental) と、Optibond XTR (OP: Kerr)、ワンステップシステムである Clearfil Bond SE ONE (SE: Kuraray Noritake Dental)、Adper Easy Bond (EB: 3M ESPE)、Scotchbond Universal (SU: 3M ESPE) を使用した。ヒト抜去小臼歯の頬側歯冠中央部エナメル質を #600 耐水研磨紙にて研削し、各接着システムにてメーカー指示通りの処理を行った。その後、クリアフィルムマジェスティ LV (A2, Kuraray Noritake Dental) を充填し、光重合後、37°C 水中に 24 時間保管して試料とした。Li ら (J Dent. 2010) の方法に準じて酸-塩基処理を施した後、包埋、アルゴンイオンエッチング処理(エリオニクス EIS-200ER)し、SEM 観察(JEOL JSM-5310LV)を行った。

【結果】

すべての群において ABRZ の形成が観察された。MB 群と比較して OP 群では厚みのある ABRZ が観察された。SE 群、EB 群、SU 群は MB 群とほぼ同じ厚みの ABRZ が観察された。SE 群、EB 群、SU 群においては ABRZ 直下に漏斗状の erosion が観察された。

【考察と結論】

機能的モノマーの種類が ABRZ 形成に寄与することが示唆されている(Li et al: J Dent.2010)。本実験で用いたボンディングシステムは、MB、SE、SU では MDP、EB では MHP、OP では GPDM といったリン酸エステル系モノマーを含有する。2ステップシステムである OP 群においては MB 群と比べて比較的厚みのある ABRZ が観察された。これは MB のプライマー (pH2.0) と比較して pH の低い OP のプライマー (pH1.6) がエナメル質をより深くまで脱灰し、モノマーの浸透を促進したことによるものと推察される。さらに 2ステップシステムである MB 群、OP 群においては ABRZ 直下に erosion 形成が認められなかったが、ワンステップシステムである SE 群、EB 群、SU 群では erosion 形成が観察された。このことからボンディングシステムの違いが ABRZ 直下の耐酸性に影響を与える可能性が考えられる。今後ボンディングシステムの違いと erosion 形成との関係について、さらなる研究が求められる。

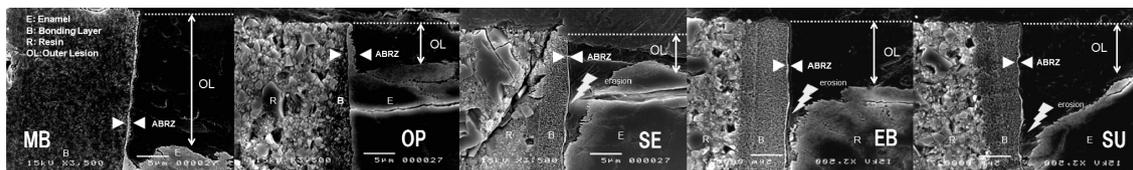


図1 各群の Acid-base resistant zone SEM 像 (3500 倍)

コンタクトキュア・デュアルキュア型コンポジットレジン接着システムにおける ボンディング材中のカタリストと未重合層が象牙質接着強さに及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院摂食機能保存学講座 歯制御学分野

○千葉彩香¹, Prasansuttiporn Taweesak¹, 關奈央子², 中島正俊¹, 田上順次^{1,3}

Compatibility between dual-cure resin composite and self-etch adhesive with or without contact-cure system

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

²Tokyo Medical and Dental University International Exchange Center

³Global Center of Excellence(GCOE) Program, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases at Tokyo Medical and Dental University

○Ayaka CHIBA, Taweesak PRASANSUTTIPORN, Naoko SEKI, Masatoshi NAKAJIMA, Junji TAGAMI

<緒言>

光照射後にワンステップボンディング材表層に形成される未重合層は、光重合型コンポジットレジンとの共重合反応に寄与することにより、象牙質接着強さが高くなると言われている。一方で化学重合型コンポジットレジンを用いた場合、ワンステップボンディング材中の酸性成分が化学重合反応を阻害し、接着強さが低下することが知られている。近年市販されたクリアフィルボンド SE ONE (クラレノリタケ社製) は、付属のデュアルキュア型コンポジットレジン (クリアフィル DC コアオートミックス ONE) を併用することで、化学重合が可能となるカタリストがボンディング材に含有されているため、ボンディング材の光照射を行わなくても使用することができる。このカタリストは、ボンディング材に光照射した場合においても、表層の未重合層とコンポジットレジンとの共重合性に影響を与える可能性がある。そこで今回、ボンディング材中のカタリストの有無と未重合層の有無が象牙質接着強さに及ぼす影響について検討した。

<材料・方法>

ヒト抜去大臼歯 32 本の咬合面のエナメル質を削除し象牙質を露出させ、高さ 2 mm、内径 8 mm の黒色プラスチックリングを固定して被着面として規定、被着面に SE ONE (カタリスト有(SE(+))), SE ONE (カタリスト無(SE(-))) (クラレノリタケ社製) を業者指示通り歯面処理し、光照射器 (Optilux 501, Kerr Courp, USA) にて 10 秒光照射した。未重合層を除去するため、試料の半数に SE ONE 光硬化後、エタノールにて表面の清拭を行い、未重合層を除去した (wipe(+))。その後、デュアルキュア型コア用コンポジットレジン (クリアフィル DC コアオートミックス ONE) をリング内に充填し、30 分間暗所保管 (化学重合)、及び 20 秒光照射 (光重合) の後、37°C の水中に 24 時間保管した。低速切断機にて接着面と垂直に 1 mm×1 mm のマイクロテンサイルテスト用ビーム状試片を作成し、クロスヘッドスピード 1 mm/min にて微小引張り接着強さを測定した。なお試料数は各実験群ともそれぞれ 16 とし、得られたデータは three-way ANOVA、Turkey にて統計処理を行った。

<結果>

接着試験の結果を以下の表に示す (Mean±SD, MPa)。

Curing Mode	Chemical cure		Light cure	
	Wipe(-)	Wipe(+)	Wipe(-)	Wipe(+)
SE(+)	31.5(4.3) ^A	25.1(3.5) ^B	50.4(5.0) ^C	50.7(5.7) ^C
SE(-)	26.3(4.2) ^B	22.1(3.2) ^B	53.1(6.7) ^C	52.7(6.3) ^C

括弧内は、標準偏差を示す。同一アルファベット間に、有意差は認めない。

<結論>

光重合群では、全ての群において接着強さに有意差は認められず、未重合層の存在やカタリストの有無の影響を受けないことが判明した。一方、光照射を行わなかった場合では、wipe(-)群において SE(+)と SE(-)間に有意差が認められた。また、SE(+)群では、Wipe(-)に比べ Wipe(+))が有意に低下したが、SE(-)群では両群間に有意差は認められなかった。以上より、デュアルキュア型コンポジットレジン化学重合で用いた場合、未重合層の存在とカタリストの有無が象牙質接着強さに影響を及ぼすことが判明した。

光重合型コンポジットレジン¹の窩底部重合促進効果

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 歯制御学分野,

² グローバル COE プログラム 歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点

○吉川孝子¹、趙 永哲¹、田上順次^{1,2}

Accelerating the curing of light-cured resin composite at the cavity floor

¹ Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ² GCOE Program; IRCMSTBD

○YOSHIKAWA Takako¹, CHO Eitetsu¹, TAGAMI Junji^{1,2}

【研究目的】

著者は、コントラスト比が増加するレジンの方が、コントラスト比が減少するレジンよりも低出力照射法 (Slow-start curing 法) を用いると窩底部レジンの重合促進効果が高いことを報告している。本研究では、実験用ランプ電圧可変型照射器 (GC) を使用し、Slow-start curing 法を用いて、各種レジンにおける窩底部レジンの重合促進効果と重合収縮応力緩和の可能性について検討した。

【材料および方法】 深さ 2mm のテフロンモールドに、Clearfil AP-X (AP、クラレノリタケデンタル)、Photo Clearfil Bright (PB、クラレノリタケデンタル) と Palfique Estelite (PE、トクヤマデンタル) の Vita シェードの A3 と B4 に対応する各々 2 種類のシェードのレジン¹を填塞し、通常の照射法と Slow-start curing 法 (10 秒照射/ インターバル 5 秒/ 50 秒照射) により重合硬化させた。すなわち、① 600 mW/cm²、60 秒の通常照射法、② 270 mW/cm² 10 秒照射、インターバル 5 秒、600 mW/cm² 50 秒の Slow-start curing 法を用いた。硬化物をモールドから取出し、その表面と底面のヌーブ硬さを照射終了直後に荷重 100g、負荷時間 15 秒の条件で測定した。硬さ測定は各 4 カ所行い、底面の硬さを表面の硬さで割った Hardness ratio を求めた。

【結果および考察】 270 mW/cm² 10 s + 5 s (interval) + 600 mW/cm² 50 s の Slow-start curing 法を行うと、深さ 2 mm のモールドに填塞された Vita シェード A3 に対応する PB と PE では、レジンの底面の硬化が表面より促進することが認められた。しかしながら、AP ではその効果は認められなかった。また、Vita シェード B4 に対応するレジンでは、AP と PB で表面と底面の硬さが同等になったが、PE ではその効果は認められなかった。照射前後のコントラスト比 (硬化前後の不透明度) が増加するレジンである PB の方が、照射に伴いコントラスト比が大きく減少するレジンである AP より窩底部レジンの重合促進効果が高いものと考えられる。

【結論】

照射に伴いコントラスト比が増加する光重合型コンポジットレジンの方が、コントラスト比の減少が大きいレジンよりも Slow-start curing 法により重合すると、窩底部レジンの重合促進効果が高く、重合収縮応力を緩和する可能性が示唆された。

Table 1 Hardness ratio=KHN of bottom surface / KHN of top surface

	600 mW/cm ²	270 / 600 mW/cm ²
AP (A3)	0.91	0.96
AP (B4)	0.97	1.00 *
PB (A3)	0.94	1.05
PB (B4)	0.94	1.01 *
PE (A3)	0.97	1.02
PE (B4)	0.92	0.89

*superscript symbol indicate no significant difference between KHN of top and bottom surfaces.

バイオフィームによる小窩裂溝う蝕の形成と SS-OCT を用いた非破壊観察

¹⁾東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科う蝕制御学分野

○上野智香¹ 島田康史¹ マティンカイルール¹ サダルアリレザ¹ 田上順次¹

Non-destructive observation of pit and fissure caries induced by biofilm using SS-OCT

¹⁾Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University,

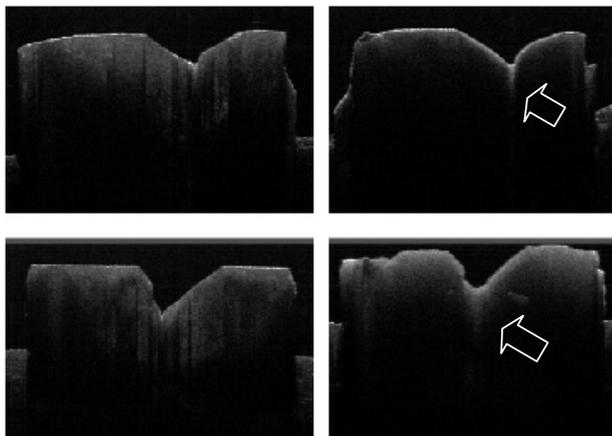
○Tomoka UENO¹ Yasushi SHIMADA¹ Khairul MATIN¹ Sadr ALIREZA¹ Junji TAGAMI¹

【目的】小窩裂溝う蝕は若年者に多くみられ、急性に進行することがあるため、発症機序の解明と適切な診断法の確立が望まれている。臨床におけるう蝕の画像診断には、エックス線写真が多く用いられている。しかしながら、エックス線写真は進行した隣接面う蝕などの検出には有用であるものの、初期う蝕の判別は困難であるとともに、放射線被曝というデメリットがあった。波長走査型光干渉断層計 (Swept-source optical coherence tomography, SS-OCT) は、非破壊的・非侵襲的な画像診断機器として注目されている。本研究は、バイオフィームを用いてヒト抜去歯の裂溝部にう蝕を形成し、SS-OCT による非破壊観察を行い、裂溝う蝕発生の機序の解明を目的としている。また、*in vitro* で形成した裂溝う蝕を SS-OCT ならびにレーザー顕微鏡にて観察・比較し、SS-OCT 観察の有用性を評価した。

【材料・方法】小窩裂溝う蝕のみられない冷凍保管したヒト抜去臼歯を本実験に使用した。なお、本実験でのヒト抜去歯の使用に関しては、東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認を受けている。小窩裂溝を含むように 5mm×5mm×3mm の大きさに歯を切断しサンプルとした。*Streptococcus mutans* MT8148 をインキュベーター内で Brain Heart Infusion 液体培地を用いて嫌気培養し、リン酸緩衝溶液 (PBS) 中で洗菌、再懸濁した細菌懸濁液を用意した。人工口腔装置 (Oral Bacteria Reactor) を用いて細菌懸濁液・スクロース含有 Heart Infusion 液体培地・PBS をサンプルに対し 20 時間滴下した。人工口腔装置にてサンプル上にバイオフィームを形成後、インキュベーター内でスクロース含有 Heart Infusion 液体培地を用いて 2 週間、4 週間あるいは 6 週間継続させてバイオフィームの培養を行った。培養前ならびに所定の期間経過後のサンプルの SS-OCT 画像を 10 μm ごとに撮影した。また、バイオフィーム除去後にサンプルをエポキシレジンにて包埋し、ダイヤモンドブレードにて切断し、研磨後の断面を走査型レーザー顕微鏡 (CLSM) にて観察した。SS-OCT ならびに CLSM の画像を比較することによって、バイオフィーム培養期間における脱灰程度の変化を観察し、裂溝う蝕の診断における SS-OCT の有用性を評価した。

【結果】バイオフィームを 2 週間作用させると、SS-OCT 画像においてエナメル質範囲内に限局した輝度の上昇が裂溝部にみられた。培養 4 週間後、6 週間後では、周囲のエナメル質の変化と比較して、裂溝部の輝度の上昇はさらに深く侵入していた。切断面の CLSM 画像では、SS-OCT 画像の結果とほぼ一致した脱灰病変が観察できた。

【考察】バイオフィームを用いた裂溝う蝕モデルを作成することにより、う蝕の進行状態を観察することができた。SS-OCT 画像では、裂溝に沿って輝度の上昇部が深く入り込んでおり、エナメル質の脱灰による微小な欠陥の形成と屈折率の変化が起きていると考えられた。



上段：培養 2 週間、下段：培養 6 週間、左：脱灰前、右：脱灰後。
裂溝部に輝度の上昇がみられる (矢印)。

照射レーザーの波長が歯質の OCT 像に及ぼす影響

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, 東京電力病院歯科³

○村山 良介¹, 飯野 正義¹, 島村 穰¹, 鈴木 英梨子¹

黒川 弘康^{1,2}, 升谷 滋行^{1,2}, 宮崎 真至^{1,2}, 岩崎 圭祐³

Influence of irradiated laser wavelength on the OCT images

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

Nihon University School of Dentistry, TOKYO Denryoku Hospital³

○MURAYAMA Ryosuke¹, IINO Masayoshi¹, SHIMAMURA Yutaka¹, SUZUKI Eriko¹

KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, MASUTANI Shigeyuki^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, IWASAKI Keisuke³

【緒言】

光干渉断層画像化法 (Optical Coherence Tomography, 以後, OCT) は, 非侵襲的に組織の精密断層像を得るとともに, 他の医療用画像技術と比較しても高解像度を有していることから, 歯科臨床への応用が期待されている。これまで演者らは, 歯質表層の脱灰および再石灰化といった微細な状態変化を, 波長 1310nm の SLD を用いた OCT の信号強度分布をもとに $1/e^2$ 幅を用いて数値化, 検討を行ってきた。OCT のレーザー光源素子である SLD の波長は, 生体への透過性と為害性を考慮した近赤外領域が用いられている。そのなかでも, 1310nm の波長は, H_2O に対する吸収率が低く, 生体透過性に優れるため, 深部の観察に有利である。一方, 短波長光源の利点は, その分解能にあるため, 初期齲蝕などの表層に限局した病巣を検出する場合, 精度を向上させることが可能になると考えられる。したがって, SLD の波長を変化させることができれば, 照射レーザーの透過性を応用した深部の観察と, 分解能を応用した表層の観察が同時に可能となる。このような理由から, 今回, OCT の照射レーザーの波長を, 近赤外領域である 830nm および 1310nm の二種類に設定し, 深部および表層部の信号強度の比較, 検討を行った。

【材料および方法】

試片は, ウシ下顎前歯歯冠部唇側面中央付近の歯質を, モデルトリマーを用いて直径 4~6mm のエナメル質および象牙質で構成されたブロックとして切り出し, 調整した。次いで 37°C 人口唾液もしくは乳酸緩衝液 (pH4.7) 中に保管し, 実験期間はそれぞれ 28 日とした。OCT イメージ像の観察には OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用い, 測定用 SLD 光源の波長はそれぞれ 830nm および 1310nm とした。OCT イメージ像の変化をより客観的に把握することを目的として, それぞれの波長による測定において, 測定範囲内の任意の 20 カ所における歯質の表層から深部にわたる反射光分布の信号強度分布グラフを得ることで信号強度を解析し, ピーク値を算出した。さらに, 最大ピークを有する非対称な波形のピーク強度値から 86.5% に低下した値 ($1/e^2$ 値) におけるピーク波形の基底幅 ($1/e^2$ 幅) を求め, OCT イメージ像の経時的変化に対する変化量との関連性について検討した。

【成績および考察】

人工唾液浸漬条件において, 波長 830nm および 1310nm とともに, エナメル質表層における信号強度分布は, 浸漬期間の延長に伴って, 相対的に低下する傾向がみられた。また, 脱灰液浸漬条件における信号強度は, 波長 830nm および 1310nm のいずれにおいても相対的に増加した。これは, 人口唾液浸漬期間の延長におけるエナメル質表層の光学的性質の変化に起因するものと考えられる。すなわち, エナメル質表面での散乱光が減少したことによって, 光線の深部到達性が増し, さらには内部での光干渉性が向上したため, 信号検出が可能になったものと考えられた。 $1/e^2$ 幅の変化は, 人口唾液浸漬, 脱灰液浸漬ともに, 1310nm に比べ, 830nm では変化量が小さい傾向が得られた。これは, 波長が 830nm の SLD は, 波長 1310nm のものに比べ, エナメル質表層での散乱光が増加傾向にあるため, 深部でのシグナル検出頻度が低下したことに起因すると考えられた。これらのことは, 照射レーザーの表面での散乱は, 波長が短くなるほど増加するため, 光線の深部到達性に影響を及ぼし, その結果, $1/e^2$ 幅が変化したものと考えられる。

【結論】

本実験の結果から, OCT のシグナル強度および $1/e^2$ 幅は, 浸漬条件と期間に依存することが判明した。また, 照射波長 1310nm は 830nm に比べ, $1/e^2$ 幅変化量が大きいことが示された。これらのことから, OCT の照射レーザーの波長を選択することにより, 歯質表層の状態変化の観察が可能であることが示唆された。

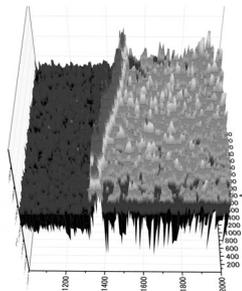


Fig. 1 OCT の三次元信号強度解析グラフ

歯質残存厚径測定への OCT の応用

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
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科小児歯科学³, 市石歯科クリニック⁴, 横須賀共済病院⁵
○飯野正義¹, 古宅真由美¹, 生形奈緒子¹, 田村ゆきえ¹, 利根川雅佳¹
黒川弘康^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 細矢由美子³, 市石芳博⁴, 宮直利⁵

Application of optical coherence tomography for monitoring residual tooth thickness

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²
Nihon University School of Dentistry, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences³
Ichiishi Dental Clinic⁴, Yokosuka Kyosai Hospital⁵
○IINO Masayoshi¹, KOTAKU Mayumi¹, UBUKATA Naoko¹, TAMURA Yukie¹, TONEGAWA Motoka¹
KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, YUMIKO Hosoya³, ICHIISHI Yoshihiro⁴, MIYA Naotoshi⁵

【緒言】

光干渉断層画像化法 (Optical Coherence Tomography, 以後 OCT) は, 他の医療用画像技術と比較してチェアサイドで簡便かつ非侵襲的に高解像度の組織精密断層像を得ることを特徴としている. 今回, OCT の臨床使用の拡大を図るための基礎的研究の一環として, 窩洞形成あるいは齶蝕除去を想定して, 歯質を削除した後の残存歯質厚径の測定への OCT の応用とその有効性について検討した. すなわち, 歯質切削時において, 残存するエナメル質あるいは象牙質厚径を正確に把握することは, 修復の予後のためにも重要となるが, チェアサイドで非侵襲的かつ簡便に利用できる歯質厚径計測装置はなく, 臨床家の多くは, 歯質の厚さの判定を自らの臨床経験に委ねているのが現状である. そこで, 残存歯質厚径の測定への, OCT を臨床応用するための基礎的検討を行った.

【材料および方法】

残存歯質厚径の測定には, 歯髓組織を有するウシ下顎前歯を用いた. 歯根部歯周組織を除去した後, 唇側を耐水性 SiC ペーパーの #2,000 まで順次研磨し平坦面を露出させ, これを測定用試片とした. 切縁からエナメル-セメント境までをエナメル質計測面, エナメル-セメント境から根尖までを象牙質計測面とし, 1mm 毎に水平断面の撮影を行った.

OCT による断層像の観察には, SLD を光源とするマイケルソン型光干渉計の応用技術によって構築された Time-Domain 型 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用いた. すなわち, 光源からの近赤外光を対象物に入射し, 屈折率の異なる構造あるいは境界面から反射してきた光を光学干渉計によって捉えることで, 測定対象の内部構造を光強度の情報として得るものである. ここでは, 歯質における屈折率の異なる構造あるいは境界を, 異なる信号強度ピークとして検出し, ピーク位置の差から光学距離を求めるとともに, 組織固有の屈折率でこの数値を除し, それを OCT 計測値とした. また, OCT 計測後の試片を, 精密低速切断機 (Ecomet 4000, Buehler) により, 計測面に対して垂直に, 1mm 間隔で切断した. それらを, 三次元レーザ走査顕微鏡 (VK-8700, キーエンス) を用い, 水平断面における歯質厚径を計測, OCT より得られた計測値と比較, 検討した. なお, これら測定用試片は, 実験期間を通じて 37°C の精製水中に保管し, 実験に供試する際に水中から取り出して使用した.

【結果および考察】

OCT による信号強度分布のピークは, エナメル表面では, 約 -50dB であり, 象牙質表面では約 -55dB であった. また, エナメル象牙質境および, 象牙質と歯髓腔の境界と思しき信号強度分布のピークはそれぞれ, 約 -60dB, -75dB であった. これらは, レーザ照射面表層から深さ方向へ移行するに従い減衰する傾向が認められたものの, 周囲の信号強度よりも相対的に高い信号強度のピークとして検出され, エナメル質表層およびエナメル象牙質境, 象牙質表層および歯髓腔の境界を類推することが可能であった. それらは, 周囲組織の光干渉性, すなわち屈折率が異なる物質の間で起こる反射および散乱を検出しているものと考えられた. また, これらの測定結果より, それぞれの境界を指し示すピーク間距離から得られた残存歯質厚径は, 3D マイクロ CT による測定値との近似性が認められ, その有用性が示された.

【結論】

今回行った実験結果より, OCT を用いた歯質の境界検出および, それを用いた残存歯質厚径測定が可能であることが示唆され, 臨床への応用が期待される.

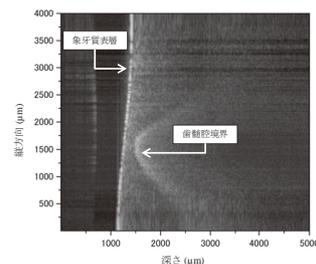


Fig.1 象牙質観察画像

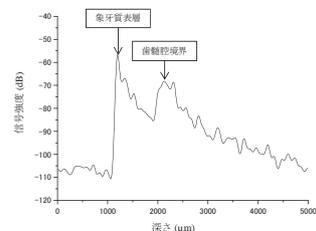


Fig.2 縦方向750μmにおける信号強度分布

Streptococcus mutans を用いた歯頸部の脱灰と SS-OCT による評価

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野

○手塚 弘樹¹, 島田 康史¹, マティン カイルール¹, サダル アリレザ¹, 田上 順次¹

Assessment of cervical tooth demineralization induced by *Streptococcus mutans* using SS-OCT

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

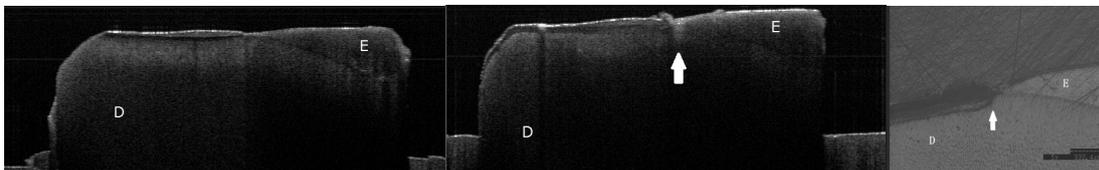
○Hiroki TEZUKA¹, Yasushi SHIMADA¹, Khairul MATIN¹, Sadr ALIREZA¹, Junji TAGAMI¹

【緒言】歯頸部う蝕は歯肉の退縮とともに増加する傾向にあり、修復後も二次う蝕に罹患しやすく、その適切な予防と治療法の確立が望まれている。生体に無害な近赤外光を用いた波長走査型光干渉断層計 (SS-OCT) は、非破壊的に組織の精密断層像を得ることができ、う蝕の診断や修復物のギャップの検査に用いることができる。本研究は、歯頸部う蝕の発症機序の解明を目的とし、ヒト抜去歯の歯頸部にバイオフィルムを形成後、*in vitro* のう蝕を作成し、脱灰の進行度を SS-OCT を用いて観察した。さらに、走査型レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察を行い、SS-OCT 画像との比較を行った。

【材料及び方法】ヒト抜去大白歯から CEJ を中心として 5.0mm×5.0mm の試片を作成した。なお、本実験のヒト抜去歯の使用に関して、東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認を受けている。供試細菌として、*Streptococcus mutans* MT8148 (*S. mutans*) を用いた。*S. mutans* を Brain Heart Infusion 液体培地 (BHI) で培養後、リン酸緩衝液 (PBS) 中で洗菌し、再懸濁した細菌懸濁液を準備した。人工口腔装置 (Oral biofilm reactor: OBR) 内に、作成した試片を固定し、上記細菌懸濁液、1%スクロース含有 Heart infusion (HI)、PBS を連続的に 20 時間滴下し、*S. mutans* による sucrose dependent のバイオフィルムを形成した。その後、試片を 1 週間、2 週間の群に分け (n=10) インキュベーターにて HI 溶液内で 37°C に保存し、バイオフィルムを培養し作用させた。それぞれの作用期間の後、歯面上のバイオフィルムを 0.25mol/l NaOH にて除去し、SS-OCT (Dental OCT System Prototype2, パナソニックヘルスケア) を用いて CEJ 周囲の歯質の脱灰状態を観察した。また比較画像として、試片をエポキシレジンにて包埋した後、ダイヤモンドブレードにて半切し、研磨後、走査型レーザー顕微鏡 (CLSM) により歯頸部の脱灰状態を観察した。

【結果】SS-OCT 画像を用いることにより、バイオフィルムを作用させた CEJ 付近のエナメル質、象牙質の変化を観察することができた。作用期間の延長によって CEJ のエナメル質と象牙質の脱灰は進行し、SS-OCT 画像の輝度の上昇部も深く拡大する傾向がみられた。CEJ 付近の輝度の上昇は、周囲のエナメル質と象牙質よりも強く観察することができた。

【考察】今回の実験では、CEJ 付近の SS-OCT 画像の輝度の上昇が強くみられたが、脱灰によるエナメル質内部の欠陥や亀裂の形成による屈折率の変化が示唆された。また CLSM 画像では、象牙質脱灰がエナメル質の下部に侵入していく様相が観察され、SS-OCT 画像の変化として表示された可能性も考えられる。今後、歯頸部の脱灰機序について、詳細な検討が必要と思われる。



脱灰前 SS-OCT 画像

E. エナメル質 D. 象牙質

1W 脱灰後 SS-OCT 画像

CEJ 付近に輝度の上昇がみられる(矢印)

脱灰後 CLSM 画像

歯頸部の脱灰している様子が分かる(矢印)

接着修復物の二次う蝕に関する研究 バイオフィームによる脱灰層の SS-OCT 評価

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯制御学分野
○堀江 圭、島田 康史、マティン カイルール、サダル アリレザ、田上 順次

Study on secondary caries at adhesive restoration
Non-destructive assessment of biofilm-induced demineralization using SS-OCT
Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University

○Kei Horie, Yasushi Shimada, Khairul Matin, Sadr Alireza, Junji Tagami

【緒言】修復物周囲の二次う蝕は、視診やレントゲン診査による初期の段階での評価が困難である。生体に無害な近赤外光を用いた波長走査型光干渉断層計 (SS-OCT) は、非破壊で組織の精密断層像を得ることができる。本研究は接着修復物周囲の二次う蝕の形成機序を解明するため、形成の経過を SS-OCT にて観察することを目的としている。in vitro で *Streptococcus mutans* 依存性バイオフィームを修復物に作用させ、周囲の変化を SS-OCT を用いて観察した。

【材料及び方法】ヒト抜去大白歯の頬側歯冠中央部を #600 耐水研磨紙にて研削し、エナメル質に皿状窩洞 (直径約 2.0 mm, 深さ約 1.5 mm) を形成した。なお、本実験でのヒト抜去歯の使用に関しては、東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認を受けている。その後、Clearfil Mega Bond (Kuraray Noritake Dental) にてメーカー指示通りに処理を行い Estelite Flow Quick (A2, Tokuyama Dental) を充填し、再度 #600 耐水研磨紙にて表面を研削し試料とした。

供試細菌として *Streptococcus mutans* MT8148 (*S. mutans*) を用い、Brain Heart Infusion 液体培地にて培養後、リン酸緩衝液 (PBS) 中で洗菌し、再懸濁した細菌懸濁液を準備した。人工口腔装置 (Oral Biofilm Reactor) 内に試片を固定し、上記の *S. mutans* 懸濁液を滴下させ、試料表面に sucrose dependent バイオフィームを 20 時間形成した。1 週間、2 週間、3 週間の群に分け、インキュベーターにてスクロース含有 Heart infusion 液体培地を用いて培養を続けた。その後 SS-OCT (Dental OCT System Prototype2, パナソニックヘルスケア) により、コンポジットレジン修復物周囲のエナメル質の脱灰状態を観察した。また比較として、試片をエポキシレジンにて包埋した後、ダイヤモンドブレードを用いて半切し、研磨後、走査型レーザー顕微鏡 (CLSM) による観察を行った。

【結果】SS-OCT 画像において、バイオフィームを作用させたコンポジットレジン修復物周囲に輝度の変化がみられ、脱灰層の形成が観察できた。また輝度の変化は、実験期間の経過にともなって増加する傾向がみられた。CLSM 画像では、SS-OCT 画像における脱灰領域にほぼ一致する脱灰部分を確認することができた。また、作用期間 1 週間と 2 週間において、歯冠側と比較し歯頸側のエナメル質の脱灰深さがやや大きい試片がみられた。

【考察】バイオフィームを作用させたコンポジットレジン修復物周囲にみられる輝度の上昇は、修復物周囲に脱灰層が形成され、その領域において微小な欠陥が生じ、また屈折率が変化することによってレーザーが散乱した結果によるものと考えられる。歯冠側と比較して歯頸側のエナメル質がやや深く脱灰される試片がみられたことから、エナメル質の部位の違いが脱灰深さに影響する可能性が示唆された。

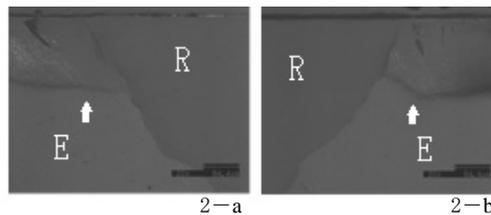
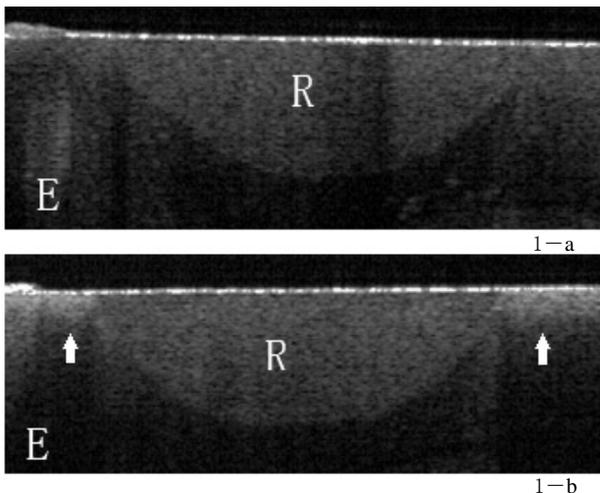


図 1: OCT 画像 (1 週間)

1-a, 脱灰前 1-b, 脱灰後
脱灰後、輝度の上昇がみられる (矢印)

図 2: 図 1 の CLSM 画像 (1 週間)

2-a, 歯冠側 2-b, 歯頸側
歯頸側にてやや脱灰が深くなっている (矢印)

R: コンポジットレジン E: エナメル質

Formation of hypermineralized zone below dentin lesion body induced by topical fluoride in vitro

○Sahar Jameel KHUNKAR¹, Sachiko Utaka¹, Syozi Nakashima¹, Toru Nikaido¹, Junji Tagami^{1,2}

¹ Cariology 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

Introduction: It is well known that fluoride application to sound dentin inhibits the demineralization through formation of CaF₂-like material, and also the application to incipient dentin lesion leads to the remineralization or lesion arrestment. Furthermore several studies reported that hypermineralization was observed at the lesion surface under the presence of fluoride. However, formation of hypermineralization *below dentin lesion body* (ie, in sound dentin region: hereinafter Hyp-S) induced by topical fluoride is new finding to our knowledge. This study reports Hyp-S after 2- and 4-week remineralization. The authors presume the fluoride-induced hypermineralization is a factor for the lesion arrestment. **Materials and Methods:** Bovine root dentin specimens were demineralized for 1 week in demineralizing solution (1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 50 mM acetic acid, 3.08 mM NaN₃, pH 4.7) at 37 °C. Next, topical fluoride application (NaF group: 2% NaF neutral pH, APF group: 2% NaF in 0.1M H₃PO₄) was done, and then exposed to remineralization solution (1.0 mM CaCl₂, 3.0 mM KH₂PO₄, 100 mM NaCl, 3.08 mM NaN₃, pH 6.5) for 2 and 4 weeks. Control group was remineralized without fluoride application. Also, undemineralized (sound) dentin specimens were treated by the fluoride solutions and remineralized in the same way (Sound group). The specimens were sliced to 210 μm for TMR analysis. Photo microscopic observation of the specimens was performed to compare with TMR image.

Results and Discussion: Analysis of the TMR images of NaF, APF and Control groups after the remineralization revealed mineral gain at the lesion body in all the specimens, and 8 of 10 specimens in NaF group and 9 of 10 specimens in APF group indicated the clear zone of Hyp-S after 4 week remineralization (Fig. 1), but not in Control group. However no hypermineralization was observed at the lesion surface. For the Hyp-S, the average mineral densities were 57.1 (52.8 - 60.7vol%) and 54.7 (50.8 - 59.0vol%) for NaF and APF groups, respectively: and average of the zone distance 275μm and 231μm for NaF and APF group, respectively. Whereas Sound group treated by NaF did not show Hyp-S, although very thin layer of hypermineralization over the dentin surface (TLH) was noted in a few specimens (Fig. 2). This study suggested that for the Hyp-S formation, initial demineralization might be necessary. Photo microscopic image looked brighter in Hyp-S region than in the deeper region beneath the Hyp-S region, and the brighter region was corresponding to Hyp-S region. Present authors presume that the newly formed deposits in Hyp-S consist of fluoride-rich and acid resistant apatite, and block acid diffusion into the sound region, resulting in lesion arrestment.

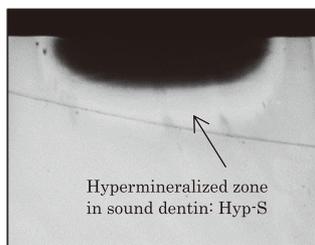


Fig. 1a. TMR image of NaF group, showing Hyp-S below the lesion body

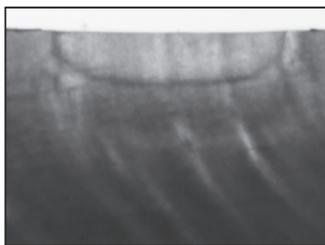


Fig. 1b. Photo image of NaF group, showing Hyp-S below the lesion body

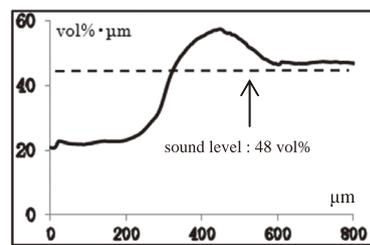


Fig. 1c. TMR profile of NaF group, showing Hyp-S below the lesion body



Fig. 2a. TMR image of sound group treated by NaF, showing TLH at the top surface

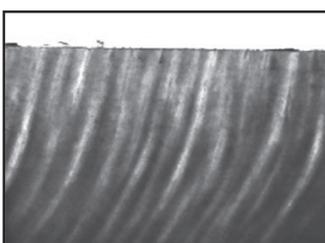


Fig. 2b. Photo image of sound group treated by NaF. Presence of TLH is not clear

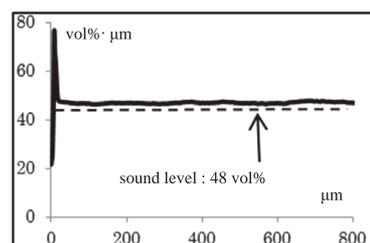


Fig. 2c. TMR profile of sound group treated by NaF, showing TLH at the surface

Porphyromonas gingivalis 感染が関節リウマチ発現に及ぼす影響についての実験的解析

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 歯周病態学研究室
○山川真宏 應原一久 加治屋幹人 橋高瑞穂 藤田 剛 柴 秀樹 栗原英見

Experimental analysis of *Porphyromonas gingivalis* infection affected the expression of rheumatoid arthritis
Department of periodontal medicine, division of frontier medical science, Hiroshima University graduate school
of biomedical sciences.

○Masahiro Yamakawa, Kazuhisa Ouhara, Mikihiro Kajiyama, Kittaka Mizuho, Tsuyoshi Fujita,
Hideki Shiba, Hidemi Kurihara

<目的>

歯周炎は、*Porphyromonas gingivalis* (*Pg*)を主とした歯周病原細菌による感染症であり、糖尿病や動脈硬化症といった様々な全身疾患との関連が報告されている。一方、関節リウマチ(RA)は、滑膜の肥厚を特徴とする有病率の高い自己免疫性疾患であるが、その病因論に依然として不明な点が多い。近年、抗環状シトルリン化タンパク(CCP)抗体の陽性化が RA 診断に重要なマーカーになっている。この抗体が認識するシトルリン化タンパクは *Pg* の Peptidylarginine deiminase によって生成されるという報告がある。そこで本研究では、*Pg* 感染と RA の関連を明らかにするために、*in vitro* でヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)の構成タンパクが *Pg*によってシトルリン化されるか検討した。また *in vivo* では、SKG マウスを用いて、*Pg* 感染が RA 発症にどのように影響するかについて検討した。

<材料と方法>

供試菌：*Pg* W83 を実験に供した。

シトルリン化タンパクの検出：HGF を通法に従い confluent になるまで培養後、*Pg*(10^8 CFU/ml)と共培養し、HGF を破砕後、構成タンパクのシトルリン化を Western blotting 法にて解析した。

RA 発症マウスモデルにおける *Pg* 感染の影響：RA モデルとして SKG マウス(CLEA Japan, 6-8 週齢)を用いた。野生型として、Balb/c(CLEA Japan, 6-8 週齢)を用いた。RA は、SKG マウスに Laminarin (1 mg/g/mice)を腹腔内投与することで誘導した。実験群は、① *Pg* (4.0×10^5 CFU/g/mice)と Laminarin (1 mg/g/mice)を腹腔内に同時に投与した群 (*Pg*+LA 群)、② Laminarin (1 mg/g/mice)のみ腹腔内投与した群 (LA 群)、とした。対照群は、③ PBS のみを腹腔内投与した群 (PBS 群)、とした。関節炎の評価は、坂口らの Arthritis score を用いて 7 日ごとに関節腫脹を評価した。投与してから 14 日後に尾静脈血より血清を採取し、*Pg* に対する血清抗体価と、CCP およびリウマチ因子(RF)に対する抗体価を ELISA 法にて解析した。また頸部リンパ節から T 細胞、脾臓から抗原提示細胞として単球系の細胞をそれぞれ分離し、*Pg* (10^7 CFU/ml)と 72 時間共培養した後、T 細胞の増殖を BrdU を用いた ELISA 法にて解析した。

<結果>

HGF 構成タンパクは *Pg* W83 によってシトルリン化され、シトルリン化は 30 分以内に検出された。

① *Pg*+LA 群は、③ PBS 群と比較して Arthritis score の有意な上昇がみられた。*Pg* に対する血清抗体価は *Pg* で免疫してから 14 日後に上昇が認められた。また、CCP および RF に対する抗体価は、① *Pg*+LA 群および② LA 群と③ PBS 群を比較すると、有意に上昇が認められた。しかし、① *Pg*+LA 群および② LA 群の間に有意な差は認められなかった。また、① *Pg*+LA 群における T 細胞の増殖は、③ PBS 群に比べて有意に上昇した。

<考察および結論>

本研究から、*Pg* W83 は HGF 由来タンパクをシトルリン化した。また SKG マウスに *Pg* W83 を感染させると、関節炎病態の増悪が認められた。このことから、*Pg* は歯周組織局所のタンパクのシトルリン化を介して、RA を誘導または増悪に関与することが示唆された。

P. gingivalis 感染が心肥大に与える影響

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野

²東京大学先端臨床医学開発講座

³東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科循環制御内科学分野

○金子 誠¹、鈴木 淳一²、青山 典生¹、始平堂 由佳¹、磯部 光章³、和泉 雄一¹

The effect of *P. gingivalis* infection on pressure-overload induced cardiac hypertrophy

¹Department of Periodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ²Department of Advanced Clinical Science and Therapeutics, University of Tokyo,

³Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

○Makoto Kaneko¹, Jun-ichi Suzuki², Norio Aoyama¹, Yuka Shiheido¹, Mitsuaki Isobe³, Yuichi Izumi¹

【目的】

歯周病はグラム陰性嫌気性菌である歯周病原細菌感染による慢性炎症性疾患であり、特に中高年齢において罹患率の高い感染症である。*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は歯周病に大きく関与している主要な歯周病原細菌である。近年、歯周病原細菌感染と全身疾患との関わりが多く報告されている。心肥大は高血圧や大動脈の狭窄による圧負荷に対して心機能を補償する適応反応であるが、その反応が高度になると死に至る。また心臓血管疾患罹患患者の心臓血管より *P. gingivalis* が高頻度に検出されている。そこで、本研究では歯周病原細菌である *P. gingivalis* の感染が心肥大へ与える影響をマウスを用いて検討した。

【材料および方法】

7週令の C57BL/6J オスマウスの背部皮下に歯科矯正用ワイヤを直径 5mm、長さ 10mm のコイル状にした物を植え込み、細菌感染用のスペースとした。コイル埋入 2 週間後、抱水クロラルによる腹腔内麻酔下で開胸して上行大動脈を 6-0 絹糸にて血拮し大動脈を狭窄させ、圧負荷による心肥大モデルを作製した。感染群では、 10^8 CFU/ml の *P. gingivalis* の懸濁液 0.1ml を大動脈結紮後から毎週 1 回、4 週間投与した。対照群では、同じタイミングにて PBS を投与した。手術後 1 週および 4 週で心エコーを測定した。手術後 4 週で心臓を採取し、心体重量比を計測した。病理組織学的分析としてヘマトキシリン-エオジン染色による心筋細胞の肥大の程度の観察、またマロリー染色により組織の線維化を観察した。免疫組織学的分析を行いマトリックスメタロプロテアーゼの局在を観察した。

【結果および考察】

感染群では、心エコーにおいて左室内径短縮率が減少する傾向にあった。一方、対照群ではその減少は感染群に比べ緩やかであった。対照群と比べると感染群において心体重量比がより増加する傾向にあった。病理所見として、ヘマトキシリン-エオジン染色で感染群において心筋細胞の肥大が観察された。一方で対照群では肥大はしていたが、その程度が感染群に比べ小さかった。マロリー染色では感染群で心筋全体および血管周囲組織の線維化の亢進が観察された。本研究結果より、歯周病原細菌である *P. gingivalis* の感染が心肥大を悪化させる事が示唆された。

歯肉溝滲出液(GCF)における Hemoglobin(Hb)検査を用いた PPD・BOP 検査精度の検証

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座¹⁾, 日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター・アイソトープ研究施設²⁾, 岩手医科大学歯学部口腔機能保存学講座歯周病学分野³⁾, 日本大学 松戸歯学部 歯周治療学講座⁴⁾, 東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 生体支持組織学系専攻 生体硬組織再生学講座 歯周病学分野⁵⁾, 徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 再生修復医歯学部 顎口腔病態制御学講座 歯周歯内治療学分野⁶⁾

○伊藤 弘¹⁾, 沼部幸博¹⁾, 戸田智幸²⁾, 橋本修一²⁾,
八重柏隆³⁾, 小方頼昌⁴⁾, 和泉雄一⁵⁾, 永田俊彦⁶⁾

Accuracy of PPD & BOP by hemoglobin inspection in GCF

Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo¹⁾,
Dental Research Institute, Radio Isotope Center, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry Tokyo²⁾,
Department of Conservative Dentistry and Oral Rehabilitation, Division of Periodontology, School of Medicine,
Iwate Medical University³⁾, Departments of Periodontology, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University⁴⁾,
Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Graduate School of Medical and Dental Science,
Tokyo Medical and Dental University⁵⁾, Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health
Biosciences, The University of Tokushima Graduate School⁶⁾
○Hiroshi Ito¹⁾, Yukihiro Numabe¹⁾, Toshiyuki Toen²⁾, Shuichi Hashimoto²⁾, Takashi Yaegashi³⁾, Yorimasa Ogata⁴⁾,
Yuichi Izumi⁵⁾, Toshihiko Nagata⁶⁾

【目的】

歯周病の診断ツールとして PPD・BOP は必要不可欠であり、歯周病の診断・治療計画の立案/変更に関与するものの、手技が繊細であり熟練が要求される。我々は、BOP 検査の限界について示唆し、PPD・BOP に GCF における Hb 検査を加えることでその精度が担保できる可能性を報告した。そこで、複数もしくは 1 人の歯周病専門医で行う PPD・BOP 検査結果それぞれに対する Hb 検査結果を比較し、改めて PPD・BOP 検査の精度に関し検討を行なった。

【材料と方法】

被験者は非喫煙者の SPT 期患者 184 名とし、複数の歯周病専門医により歯冠修復物のない上下顎前歯部 401 部位から GCF を採取した。検査項目は、臨床パラメータとして、PII, GI, CAL, PPD, BOP を評価した。同様に 1 人の歯周病専門医により SPT 期患者 48 名の歯冠修復物のない上下顎前歯部 115 部位から GCF を採取した。採取した GCF は、出血反応に対する指標として Hb 測定を行ない、その測定には immuno-chromatography (IC) 法を用いた。BOP 検査と IC 法を用いた検査 (Hb 検査) 結果を (-)と(+)に分け、感度・特異度を求めた。さらに、健常部位と歯周ポケット GCF 中の蛋白質については SDS-PAGE を用いた銀染色にて観察した。さらに、GCF 中の Hb を Hb 抗体を用いた western blotting にて検出した。

【結果】

PPD・BOP 検査と Hb 検査を比較すると、複数の検査者と 1 人の検査者では BOP が(-)であり Hb が(-)である特異度は同等であったものの、BOP が(+)であり Hb が(+)である感度は 1 人の検査者のほうが高かった。SDS-PAGE 後の銀染色により Hb 単量体と思われる場所に濃染される蛋白質バンドが認められ、さらに western blotting によりこの蛋白質が Hb であることが確認された。

【考察】

BOP 検査と Hb 検査との整合性は、1 人の歯周病専門医で行うほうが、複数の歯周病専門医で行う場合と比べ高かった。これは、PPD・BOP 検査は非常に繊細であり、プロービング圧が低くなる傾向を示唆することとなった。こうした PPD・BOP 検査の齟齬を補正する手段として GCF における Hb 検査の意義が示唆された。従って今後、PPD・BOP 検査に Hb 検査を併用することが必要と考えられる。

本研究は、文部省科学研究費助成金：基盤研究 C，課題番号：20592437，平成 24 年度日本歯科大学研究プロジェクトの助成を受けて行われた。また、倫理委員会の承認（承認番号 2111）のもと遂行された。

骨髄液内で硬化させた 4-META/MMA-TBB レジン表面への硬組織形成

北海道大学 大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室
○洲崎 真希, 菅谷 勉, 中塚 愛, 柳澤 剛, 川浪 雅光

Hard tissue formation on the surface of 4-META/MMA-TBB resins cured in bone marrow
Periodontology and Endodontology, Department of Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine
○Maki Sunosaki, Tsutomu Sugaya, Megumi Nakatsuka, Gou Yanagisawa, Masamitsu Kawanami

【緒言】

4-META/MMA-TBB レジンは優れた接着性と生体親和性を有することから、歯根端切除術や再植術時の root-end sealing, 垂直歯根破折の接着治療、髄床底穿孔部の封鎖に応用してきた。しかし、レジン上にセメント質は形成されないのが現状である。一方、4-META/MMA-TBB レジンは大気中より血液中で硬化させた方が、炎症の発生は少なくなることが報告されている。そこで本研究では、4-META/MMA-TBB レジンを骨髄腔内で硬化させた場合のレジン表面への骨の形成に及ぼす影響を評価した。

【材料と方法】

スーパーボンド (クリア、以下 SB) をポリプロピレン製チューブ内で硬化させ、直径 1mm, 長さ 5mm の円柱形試料を作製した。10 週齢ウィスター雄性ラットの左右大腿骨骨髄腔に穿孔し、次の 3 つの条件で試料を骨髄腔に埋植した。①骨髄液中硬化群：試料表面に SB を塗布した直後に埋植した。②空気遮断硬化群：試料をそのまま埋植した。③空气中硬化群：試料表面に SB を塗布して空气中で硬化させた後に埋植した。術後 2, 8 週で脱灰薄切標本を作製して H-E 染色し、試料周囲の骨形成状態を光学顕微鏡で観察し、骨形成率、骨接触率等を計測した。

さらに SB を 5mm×5mm のディスク状に硬化させた試料に、次の 3 つの条件で骨髄液に浸漬した。①骨髄液中硬化群：SB を塗布した直後に浸漬した。②空気遮断硬化群：試料をそのまま浸漬した。③空气中硬化群：試料表面に SB を塗布して空气中で硬化させた後に浸漬した。骨髄液への浸漬時間はいずれも 10 分とした。その後 20 分超音波洗浄し、乾燥後、レジン表面と縦断面の SEM 観察及び FT-IR 分析を行った。

【結果と考察】

骨髄腔内に埋植した試料周囲には、2 週後にすべての群で新生骨が形成されていた。2, 8 週とも骨形成量は $75.7 \pm 17.6 \sim 83.8 \pm 12.9\%$ で 3 群間に有意差はなく、各群の 2 週後と 8 週後を比較しても有意差はなかった。さらに、経時的な新生骨の緻密化や、層板骨の増加、骨細胞の扁平化、骨表面の細胞の扁平化などは 3 群とも同様であったことから、骨の成熟に大きな差はなかった。一方、試料と骨の接触率は、2 週後には $0 \sim 5.8 \pm 13.0\%$ で試料と骨が直接接している部分はほとんどなく、3 群間に有意差はなかった。しかし、8 週後は試料と骨が直接接している部位がみられ、接触率は骨髄液中硬化群では $15.4 \pm 8.0\%$ 、空気遮断硬化群では $4.9 \pm 6.0\%$ 、空气中硬化群では $1.9 \pm 2.9\%$ で、骨髄液中硬化群は他の 2 群に比較して有意に高かった。したがって、骨髄液中で硬化させることは、試料周囲への骨形成量は増加しないが、骨基質と試料が直接接する面積を増加させるのには有効であると思われた。

ディスク状に硬化させた試料に SB を塗布し、直後に骨髄液に浸漬した骨髄液硬化群の試料では、SEM でレジン表面に厚さ 2~3 μm の粗造な層が観察され、この層とレジンとの界面には、境界が不明瞭な部位が一部に認められた。FT-IR 分析では、骨髄腔中硬化群のレジン表面にタンパク質を含む骨髄成分の付着が認められた。

【結論】

4-META/MMA-TBB レジンを骨髄液中で硬化させると、レジン表面にタンパク質を含む骨髄成分が付着し、レジンと骨との直接接触が高まる可能性が示唆された。

レジン系シーラーの種類と根管乾燥法の違いによる根尖封鎖性への影響

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座

○中澤 篤史、菅谷 勉、川浪 雅光

Influence of different resin sealers and root canal drying methods on apical seal.

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

○Atsushi Nakazawa, Tsutomu Sugaya, Masamitsu Kawanami

【緒言】

根尖孔が大きく加圧根管充填のための根管形成が十分に行えない症例では、接着性レジンシーラーを用いた単一ポイント法で高い封鎖性が得られると報告されている。しかし、根管形態が扁平や槌状の場合にはシーラーが厚くなる部位が生じて、重合収縮により根管壁との間にギャップが生じたり、気泡が混入しやすくなったり、乾燥が不十分な部位が生じて接着が障害される危険性などがある。そこで本研究では、接着性シーラーのみで根管充填を行って、根管の乾燥方法、シーラーの種類が根尖封鎖性に及ぼす影響を検討した。

【材料と方法】

ヒト抜去単根歯 70 本を根尖孔サイズ #140 まで拡大形成し、スティッキーワックスで根尖部を被覆した。根管充填にはスーパーボンド根充シーラー (SBS)、スーパーボンド混和ラジオペーク (SBR)、リアルシール SE シーラー (RS) の 3 種類を用いた。根管の乾燥方法は、エアードライする方法とペーパーポイントで乾燥する方法の 2 つを行った。RS の乾燥は、本材料の接着機構を考慮してペーパーポイント法のみを行った。SBS と SBR の根管充填は、メーカー指示に従ってモノマー液とポリマー粉末を混和し、混和泥をシリンジで充填した。RS では付属の混和ノズルから直接根管内に充填した。24 時間水中保管後に色素侵入試験を行い、根尖部 3mm を 0.5mm 間隔で歯軸に垂直に切断して 6 枚の標本を作製し、①色素侵入距離 (色素侵入が認められた最歯冠側の標本と根尖との距離)、②色素侵入率 (色素侵入長さ/根管外周)、③根管充足率 (根充材面積/根管面積)、④根管壁空隙率 (根管壁に接した空隙面積/根管面積)、⑤根充材内部空隙率 (根充材内部の空隙面積/根管面積) を計測し、さらに SEM 観察を行った。

【結果及び考察】

SBS と SBR をそれぞれ根管乾燥方法で比較すると、色素侵入距離は 0~0.5mm、色素侵入率は 0~22.0%、根管充足率は 83.9~90.7%、根管壁空隙率は 0.6~6.8%、根充材内部空隙率は 6.7~13.6% で、いずれも有意差はなかった。一方、根管壁空隙率は SBS を用いた場合にはエアードライよりペーパーポイント乾燥の方が有意に大きな値を示した。

SBS、SBR、RS で比較すると、色素侵入距離はそれぞれ 0.15 ± 0.11 mm、0mm、 1.3 ± 0.26 mm、色素侵入率は 2.27 ± 1.83 %、0%、 75.11 ± 9.1 % で、RS が SBS と SBR に比較していずれも有意に大きかった。根管充足率は 83.3~90.7%、根充材内部空隙率は 6.7~16.0% でいずれも 3 群間に有意差はなかったが、根管壁空隙率は 6.8 ± 1.0 %、 0.6 ± 0.4 %、 0.7 ± 0.2 % で SBS が他の 2 群に比較して有意に高い値を示した。

SEM 観察では、SBS と SBR はエアードライを行うと長いレジクタグがみられたが、ペーパーポイント乾燥ではレジクタグが短く侵入が不十分な部分が認められた。また、SBS と SBR を用いた場合は根管壁付近に空隙がみられても、気泡と根管壁との間には一層レジンが認められる部分が多かったが、RS では根管壁とレジンの間に空隙が認められた。これは RS が重合収縮で空隙が生じるのに対して、SBS と SBR が根管壁から重合が開始されるために空隙が生じにくいからと思われる。

【結論】

本研究結果により、太い根管などで接着性レジンシーラーが厚くなる場合でも、スーパーボンド混和ラジオペークを用いることで、良好な封鎖性が得られることが示唆された。

CT画像にみられる根管充填剤による歯根破折様アーチファクトについて

¹東北大学大学院歯学研究科 口腔診断学分野、

²鶴見大学歯学部 口腔顎顔面放射線 画像診断学講座、

³愛知学院大学歯学部 歯科放射線学講座

○¹飯久保 正弘、¹西岡 高志、²小林 馨、³有地 榮一郎、¹笹野 高嗣

Root fracture-like artifacts due to the gutta-percha point in the imaging of the CT

¹Department of Oral Diagnosis, Tohoku University Graduate School of Dentistry,

²Department of Oral and Maxillofacial Radiology and Diagnosis, Tsurumi University School of Dental Medicine,

³Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Aichi-Gakuin University School of Dentistry

○¹Masahiro Iikubo, ¹Takashi Nishioka, ²Kaoru Kobayashi, ³Eiichiro Ariji, ¹Takashi Sasano

[目的]

永久歯抜歯の原因疾患として、齶蝕や歯周病に比較して歯根破折の占める割合が増加している。そこで、平成23年度歯科医学会プロジェクトとして、「歯の破折の診断・治療に関するプロジェクト研究」が公募され、NPO法人日本歯科放射線学会として申請した「歯根破折歯の画像診断ガイドライン作成のためのプロジェクト研究」が採択された。我々は既に、昨年の第136回日本歯科保存学会シンポジウムにおいて、歯科用コーンビームCT (CBCT) でみられる根管充填剤によるアーチファクトが、歯根垂直破折の診断において偽陽性率を高める可能性があることを報告している。しかしながらこれまで、根管充填剤のアーチファクトに関して、その発生方向や程度について詳細に検討した報告はみられない。そこで、今回我々は、根管充填した上顎前歯と下顎小白歯に対してCBCTおよびマルチディテクタヘリカルCT (MDCT) 撮影を行ない、アーチファクトの発生方向および程度について比較検討を行なった。

[対象と方法]

口内法撮影練習用ファントムの上顎骨と下顎骨を外し、上顎前歯と下顎小白歯を抜歯した。上顎前歯と下顎小白歯の抜去歯(各9歯)に対し、抜歯窩に歯根の2/3以上が収まる様に歯根形態を整えた後に、Kファイルを用いて50号まで根管拡大を行ない、50号のガッタパーチャポイント(GPP)を挿入した。抜去歯を抜歯窩に挿入し、上下顎を咬合させ、咬合平面が床と平行になるように水槽に入れ、頸椎と一緒にCBCT(朝日レントゲン、Alphard VEGA)を撮影した。撮影は管電圧80kV、管電流7mAで、FOVが直径102mm、高さ102mm、ボクセルサイズが0.2mmのI-modeで行なった。また、MDCT(Siemens、SOMATOM Plus)については、咬合平面が床と垂直になるように水槽に入れ、管電圧120kV、管電流70mA、Slice thickness 0.5mmで撮影した。なお、GPPのない状態もコントロールとして撮影し、評価の参考とした。評価画像は、歯根軸に垂直な横断像とし、評価部位は、歯頸部、歯頸側3分の1、根尖側3分の1の3スライスとして、歯を8分割した方向に対するアーチファクトの見え方について、資料作製者と画像撮影者を除く7人の歯科放射線専門医が視覚的に評価した。評価方法は、0:全くアーチファクトはない、1:僅かなアーチファクトがみられる、2:明らかなアーチファクトがみられる、3:アーチファクトにより歯が断裂してみられる、の4段階とした。

[対象と方法]

CBCTで撮影した上顎前歯部では、近心頬側、近心舌側、遠心舌側、および遠心頬側方向にアーチファクトがみられ、特に近心頬側と遠心舌側に強くみられた。また、下顎小白歯部では、頬舌方向や近遠心方向にアーチファクトがみられ、特に近遠心方向へ強くみられた。さらに、これらアーチファクトは、根尖側断面に比較して歯頸部断面で強くみられた。一方、MDCTで撮影した上顎前歯部および下顎小白歯部は、ともにCBCTと同様の方向にアーチファクトがみられたが、いずれもCBCTに比較してその見え方は弱かった。

[結論]

CBCTで見られる根管充填剤のアーチファクトはMDCTに比較して強く現れ、その発生方向は部位により違いがあることが明らかとなった。

Resveratrol がヒト歯肉上皮細胞の炎症性応答に及ぼす影響

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔保健学分野¹, 歯周診断・再建学分野²
新潟大学医歯学総合病院 歯科総合診療部³,
大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学分野⁴
○皆川 高嘉^{1,2}, 奥井 隆文², 中島 貴子³, 多部田 康一², 村上 伸也⁴, 山崎 和久¹

Effects of resveratrol on inflammatory responses in human gingival epithelial cells

Laboratory of Periodontology and Immunology, Division of Oral Science for Health Promotion¹, Division of Periodontology²,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital³
Department of Periodontology, Division of Oral Biology and Disease Control, Osaka University Graduate School of Dentistry⁴
○Minagawa T^{1,2}, Okui T², Nakajima T³, Tabeta K², Murakami S⁴, Yamazaki K¹

[研究目的]

Resveratrol は、赤ワインやピーナッツに多く含まれる、抗酸化作用を有するポリフェノールの1つであり、糖尿病や動脈硬化症などの老化関連性疾患の発症を遅らせること、また炎症性応答を制御することが報告されているが、その詳細なメカニズムはわかっていない。Resveratrol の作用メカニズムの1つとして、Sirtuin 1 (SIRT1)の活性化が挙げられる。SIRT1はNicotinamide adenine dinucleotide (NAD)依存性ヒストン脱アセチル化酵素に属する蛋白質であり、ヒストンや細胞機能に重要な蛋白を脱アセチル化して、それらの機能を制御していることが知られている。SIRT1はまたNF-κBの活性化を抑制して炎症性応答を制御することが報告されている。歯周炎は歯周病原細菌に対する宿主の炎症性応答により、歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患である。歯周組織を構成する細胞の中で歯肉上皮細胞は物理的なバリアーとして機能するだけでなく、歯周病原細菌に対して炎症性サイトカインやケモカインを産生して歯周炎の病態形成に重要な役割を果たすため、その炎症性応答を制御するような物質は歯周炎の進行抑制に有効である可能性がある。本研究ではResveratrolの歯肉上皮細胞の炎症性応答に対する影響を解析すること、及びそのシグナル経路を解析することを目的とする。

[材料および方法]

歯肉上皮細胞はヒト歯肉不死化細胞株 epi4 (大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学分野 村上伸也教授より供与)をSupplement S7 添加 Epilife 培地にて培養し、以下の実験を行った。

- (1) epi4 に対する Resveratrol の細胞毒性について MTT assay (12h) を用いて確認した。
- (2) Resveratrol または SIRT1 阻害剤である Sirtinol で前処理した epi4 を *Porphyromonas gingivalis* 菌体(生菌又は加熱死菌)で刺激し、4時間後の炎症性サイトカイン(IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1)発現変動を real-time PCR 法により解析した。
- (3) SIRT1 siRNA により SIRT1 をノックダウンした epi4 を用いて(2)と同様の実験を行った。

[結果]

MTT assay より Resveratrol は 15μM よりも低い濃度では細胞毒性を示さなかった。*P. gingivalis* 菌体(生菌)刺激によって epi4 における IL-1β, IL-6, IL-8 の遺伝子発現が増加したが、Resveratrol 前処理はそれらを抑制した。*P. gingivalis* 菌体(加熱死菌)刺激によって epi4 の IL-1β, IL-6, IL-8, MCP-1 の遺伝子発現が増加したが、Resveratrol 前処理は IL-8 以外のサイトカインの増加を抑制し、Sirtinol 前処理はすべてのサイトカインの増加を抑制した。SIRT1 siRNA を用いた実験に関しては現在データを解析中である。

[考察]

今回の研究から Resveratrol は *P. gingivalis* 菌体(生菌又は加熱死菌)刺激による歯肉上皮細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制することが明らかとなった。このメカニズムについては明らかではないが、Sirtinol を用いた実験結果からは、SIRT1 の関与は低いことが示唆された。今後 SIRT1 の関与をさらに解析するとともに他の分子の関与やシグナリングの解析を行っていく予定である。

ヒト歯根膜細胞の老化により誘導される SASP の解析

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)

○池上久仁子、山下元三、山羽聡子、中村友美、森健太、栗田敏仁、柳田学、北村正博、村上伸也

Analysis of SASP (Senescence-associated secretory phenotype) in aged HPDL cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Satoko Yamaba, Tomomi Nakamura, Kenta Mori,

Toshihito Awata, Manabu Yanagita, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami

[研究目的]

体細胞において分裂回数が限界に到達すると、細胞死あるいは細胞老化が誘導される。老化細胞は増殖停止の状態体内に蓄積されることから、個体レベルの老化への関与が注目されている。近年、慢性炎症・幹細胞能の維持・発がん等に関連する炎症性サイトカイン・ケモカイン・細胞外マトリックス分解酵素等の様々な分泌蛋白を、老化細胞が高産生する現象(SASP)が明らかとなっている。歯周病は加齢に伴い病状が進行する慢性炎症性疾患であり、その過程において歯周組織構成細胞は細菌感染・メカニカルストレス・活性酸素等の細胞老化誘導刺激に暴露されている。そこで本研究では、*in vitro*のヒト歯根膜細胞老化モデルを構築し、老化により誘導される SASP の解析を行った。

[材料と方法]

1. ヒト老化歯根膜細胞誘導系の樹立

ヒト初代培養歯根膜細胞を3日毎に30代以上の継代培養を行うことで、複製老化を誘導した。継代ごとの細胞増殖能についてはPDL (Population doubling level) を算出することで評価した。老化誘導した細胞の形態は、蛍光標識 Phalloidin 抗体を用いて蛍光顕微鏡にて観察した。老化細胞に特徴的な細胞の肥大は、フローサイトメトリーによりFSC/SSCを計測し、細胞の大きさ・タンパク含有量を解析することで評価した。

2. 老化が誘導されたヒト歯根膜細胞における老化マーカーの発現

SA-β GAL (Senescent-associated β-galactosidase) 活性は、酵素特異的基質を用いた染色法にて評価した。細胞内の活性酸素 (ROS) の蓄積についてはCM-H2CFFDA (Invitrogen)を用いて蛍光染色し、蛍光顕微鏡ならびにフローサイトメトリーにて発現解析を行った。またG1/S期の制御については細胞周期調節タンパクであるp15、p16、p53、Rbの発現をWestern blot法にて検討した。老化ストレスにより誘導されるストレス応答性タンパクの活性については、Phospho-MAPK array (R&D)を用いて解析した。

3. 老化ヒト歯根膜細胞の分泌タンパク質 (SASP) のプロファイルの同定

ヒト歯根膜細胞からtotal RNAを採取し、IL-6、IL-8、TNF α に代表される炎症性サイトカインや、MCP-1などのケモカイン、並びにMMPs、TIMPs等のマトリックス分解酵素群のmRNAの発現をqPCR法にて検討した。また、培養上清中に産生された分泌タンパク量については、ELISA法にて定量解析を行った。

[結果および考察]

歯根膜細胞は継代数35代付近で増殖能が低下し、細胞形態の肥大と核のSAHF (老化特異的ヘテロクロマチン構造)が観察された。同細胞内におけるSA-β GAL活性とROS活性は増強しており、p16、Rbの蛋白レベルでの発現上昇が認められ、G1/S期において増殖抑制状態にあることが認められた。以上のことより、ヒト初代培養歯根膜細胞からの*in vitro*老化モデルの樹立が確認された。ヒト老化歯根膜細胞は、炎症性サイトカイン、ケモカインやマトリックス分解酵素をmRNAレベルで高発現しており、培養上清中の蛋白IL-6、IL-8について高産生が認められた。

[結論]

歯周組織においては、加齢により老化歯根膜細胞からの炎症性サイトカイン、ケモカインやマトリックス分解酵素等の分泌 (SASP) 蛋白が増大し、自然炎症状態を誘導することで、組織恒常性の破綻や高齢者の歯周病の重篤化に関与していることが示唆される。

米ペプチド CL の歯周病原細菌内毒素活性の抑制効果

東京歯科大学歯周病学講座¹, 化学研究室²
○高山沙織¹, 大久保信貴¹, 加藤哲男², 齋藤淳¹

Inhibitory effect of a rice peptide on cytokine induction by periodontopathic bacterial LPS

Departments of Periodontology¹, Chemistry², Tokyo Dental College
○TAKAYAMA Saori¹, OKUBO Nobuki¹, KATO Tetsuo², SAITO Atsushi¹

【研究目的】

歯周病原細菌の内毒素は宿主細胞からの炎症性サイトカイン産生を誘導し、炎症反応を引き起こすことで、歯周病の発症や進行に深く関与している。近年、従来の薬剤に耐性をもつ細菌に対し増殖を阻止する抗菌物質として、天然由来の抗菌タンパク質や抗菌ペプチドが関心を集めている。米タンパク質(Cyanate lyase)由来プロテアーゼ阻害ペプチド CL(14-25)は 12 残基のアミノ酸からなり、これまでに歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の増殖阻害やバイオフィルム形成阻害効果が報告されてきた。

そこで本研究では、CL(14-25)の抗炎症効果を評価する目的で、グラム陰性細菌内毒素がもつヒト培養細胞からの炎症性サイトカイン誘導能に対する抑制効果を検討した。また、CL(14-25)のヒト培養細胞に対する毒性の有無を評価した。

【材料および方法】

米タンパク質由来の合成ペプチド CL(14-25)を実験に用いた。歯周病原細菌内毒素として *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) Y4 LPS を用い、加えて *Escherichia coli* (*E. coli*) O55:B5 LPS, *E. coli* J5 LPS, *E. coli* R515 lipid A も用いた。48 ウェルプレートにて培養したヒト大動脈内皮細胞 (HAECs) (培地 HuMedia-EG2, KURABO)の培養液に、CL(14-25) (0.014 ~ 0.14 mM)および各内毒素 (100 ng/ml)、もしくは内毒素のみを添加し、17 時間培養後の細胞上清中のサイトカイン IL-6 量を ELISA キットにより測定した。

また、細胞毒性を検討するため、96 ウェルプレートにて培養した HAECs の培養液に CL(14-25) (0.07 ~ 0.35 mM)、または毒性をもつ物質として 1%もしくは 5%エタノールを添加し、4 時間後および 24 時間後に XTT assay にて評価した。

【成績】

供試した全ての *A. actinomycetemcomitans* および *E. coli* 内毒素の添加により HAECs から産生される IL-6 量は増加したが、CL(14-25)を同時に、またはあらかじめ内毒素と反応させてから添加することで産生 IL-6 量に有意 ($p < 0.05$)な抑制がみられ、その抑制は濃度依存的であった。

また、HAECs の培養液に CL(14-25)を添加した上で培養しても、細胞毒性を示す結果はみられなかった。

【考察】

内毒素と CL(14-25)とを細胞培養液に添加する以前に反応させておくか、または両者を同時に添加しないと抑制効果がみられなかったことから、本 IL-6 産生抑制効果は CL(14-25)が内毒素に結合し、内毒素の細胞への結合を阻害することに起因すると考えられる。さらに、lipid A に対しても同様の効果がみられたことから、CL(14-25)が内毒素の活性中心に作用していることが示唆された。同様のタイプの lipid A を有する歯周病原細菌に対しても抑制効果を示すことが予想されるため、CL(14-25)は歯周治療・予防に有効である可能性が高い。

CL(14-25)に細胞毒性は無いと考えられることから、今後ヒト臨床試験に向け検討していく予定である。

ゼラチンハイドロゲル徐放化多血小板血漿の歯周組織再生効果

鶴見大学歯学部歯周病学講座¹⁾、日本医科大学付属病院再生医療科²⁾、
経済産業省大臣官房情報システム厚生課厚生企画室³⁾、京都大学再生医科学研究所⁴⁾
○金指幹元¹⁾、宮本正章²⁾、日下輝雄³⁾、長野孝俊¹⁾、田畑泰彦⁴⁾、五味一博¹⁾

The effects of Controlled Release of Platelet-Rich Plasma Impregnated in Biodegradable Gelatin Hydrogel on Periodontal Regeneration.

Tsurumi University¹⁾、Nippon Medical School Hospital²⁾、Ministry of Economy, Trade and Industry³⁾、
Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University⁴⁾
○M. Kanazashi¹⁾、M. Miyamoto²⁾、T. Kusaka³⁾、T. Nagano¹⁾、Y. Tabata⁴⁾、K. Gomi¹⁾

【緒言】

近年、軟組織損傷や、骨折治癒過程において、血小板中に最も多く含まれる α 顆粒と呼ばれる粒状構造物中から、脱顆粒により PDGF (Platelet derived growth factor)、TGF- β (transforming growth factor)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、EGF (epithelial growth factor) などの増殖因子群が組織再生に重要な役割を示す事が明らかになってきた。多血小板血漿 (Platelet-rich plasma: 以下 PRP) は、自己血を遠心分離して得られる血小板を濃縮した血漿であるため、PRP 中には自己血液中のサイトカインが大量に含まれている。我々はすでに 2002 年より PRP を用いた歯周組織再生療法を実施し良好な臨床成績を報告している。

本研究の目的は、自己血から得られる PRP を薬物伝送システムであるゼラチン粒子にまぜ、それを失われた歯周組織の部分へ移植することにより、持続的に PRP 中の有効成分を放出 (徐放化) させることで、その歯周組織再生効果を検討する臨床研究を実施し、その有効性、安全性を検討することにある。

本臨床研究は「薬物送達システム徐放化多血小板血漿の歯周組織再生効果および安全性の検討」で、鶴見大学歯学部倫理審査委員会の審査と承認 (受付番号: 906 号) を得たのち、大学病院医療情報ネットワーク (UMIN000006594、薬物送達システム徐放化多血小板血漿の歯周組織再生効果) に登録済みである。

【症例】

患者: 52 歳 女性 **主訴:** 上顎右側臼歯部の歯の動揺

口腔内所見: 全顎にわたる歯間乳頭歯肉腫脹をみとめ、主訴である 25 近心には 5~6mm の歯周ポケットが存在した。

X線所見: 全顎的に軽度歯槽骨吸収を、さらに主訴である 25 近心には垂直性歯槽骨吸収像を認めた。

臨床診断: 限局性・慢性歯周炎

歯周外科処置: PRP の調整は 2 回法を用いた。450G で 6 分間遠心後、血漿と赤血球の境目から下 1mm 程度のところまで buffy coat を含む血漿成分を採取、15mL のファルコンチューブに移した。これを 1600G で 5 分間遠心し PRP と PPP とを分離した。

得られた PRP は 2 wt%塩化カルシウム溶液と混合し「PRP 活性化溶液」とした。最後にゼラチンハイドロゲルに活性化 PRP を含浸させるため、37°C で 1 時間 incubation したものを移植体とした。

局所麻酔下にて術野を展開し、歯周病に罹患した感染部位を可能な限りデブライドメントし、汚染セメント質の除去後に移植体で歯周骨欠損部を満たし縫合で終了とした。

【経過】

現在外科処置後 6 ヶ月経過した。従来の GTR 法、エナメルタンパク質 (Emdogein®Gel) に比較して 3 ヶ月経過時から X線写真上で歯槽骨再生が観察できたので、有効性についてさらに臨床パラメーターを計測しているところである。

【考察】

本研究で用いたゼラチンハイドロゲルは、その分解過程で 2 週間にわたり成長因子を徐放させることが判明しているため、歯周骨内欠損部位でも PRP 中の各成長因子を徐放することで組織再生が生じたと考えられる。

【結論】

歯周骨内欠損にゼラチンハイドロゲル徐放化 PRP を適用することで、従来の歯周組織再生療法に比べより短期間で歯周組織再生が期待できることが示唆された。

【謝辞】

本研究は公益財団法人・臨床薬理研究振興財団・平成 23 年度研究奨励金の補助を受けて実施中である。

間葉系幹細胞由来軟骨細胞を用いた歯周組織の再生

株式会社ジーシー
○山中 克之, 熊谷 知弘

Periodontal tissue regeneration using mesenchymal stem cell derived chondrocyte
GC Corporation
○Katsuyuki Yamanaka, Tomohiro Kumagai

【研究目的】

幹細胞を用いた組織の再生では、その移植方法が重要である。我々は機能性 scaffold に骨髄由来間葉系幹細胞（以下 MSC）を播種し、体外で三次元的に培養し、組織化させてから移植する手法が有効であると考え、検討を進めてきた。ラット大腿骨全周性骨欠損モデルの再生試験では三次元的に播種した間葉系幹細胞を軟骨分化させた組織体（以下 MSC-DCs ; Mesenchymal Stem Cell Derived Chondrocyte）が骨の再生に有用であることを見出し、その結果について報告している（原田紀子ら、日整会誌 86, 2012）。本研究では歯科領域における MSC-DCs の有用性を確認する事を目的とし、ラット頭蓋骨および上顎歯槽骨上での組織再生能について評価したので報告する。また、大腿骨における MSC-DCs 移植による組織再生との様式の違いについても検討し、考察する。

【材料および方法】

4週齢F344ラット大腿骨・脛骨から採取した骨髄を10 %FBS, 3 ng/ml FGF-2含有 α MEM培地でMSCを増殖させ（Tsutsumi S et al. BBRC., 2001）、PLGA scaffold (LA:GA=75:25, MW.120,000, 気孔率80%, 平均孔径500 μ m, 圧縮強度0.5 MPa) に播種した後、軟骨分化誘導を行い、頭蓋骨用 ϕ 9 \times 2 mm, 上顎骨用3 \times 3 \times 1 mmの3次元培養 MSC-DCs移植体を作製した。10週齢の同系ラットを2群に分け、頭蓋骨骨膜下、および上顎歯槽骨第一臼歯頰側骨膜下に前述の移植体を移植する群とした（各群N=3）。比較対照としてscaffoldのみを移植する群（各群N=3）を設定し、2, 4, 8週後にラットを安楽死させた後、頭蓋および上顎を回収し、 μ CTおよび組織学的（H&E染色）検索を行った。

【結果】

μ CTによる評価ではCT値1000以上の領域を石灰化組織として抽出したところ、頭蓋骨、上顎歯槽骨の両試験群において、MSC-DCs移植体は移植後2週という早期から石灰化領域を認め、移植後8週では、母床から連続性のある石灰化組織の形成を認めた。石灰化組織内部には一部非石灰化組織が観察され、その割合が70 %程度であった。H&E染色像から外周部および内部の石灰化組織は骨組織であり、内部の非石灰化組織は血管が豊富に侵入した骨髄組織であることが確認された。骨形成部ではscaffoldはほぼ吸収され、再生した骨、骨髄組織のみが残存した。MSC-DCs移植群での再生骨の厚さは骨髄領域も含めると、頭蓋骨骨膜下において母床（厚さ約400 μ m）の8倍以上となる3 mm, 上顎歯槽骨骨膜下では母床（厚さ約600 μ m）の約2倍の1 mm以上であった。移植後8週では新生骨が成熟し、上顎歯槽骨移植部では新生骨と歯根の境界に方向性が不均質で幼弱な歯根膜組織の形成も観察された。一方で比較対照群は全例において石灰化組織を認めず、組織学的検索においても骨組織は観察されず、線維性組織の形成が確認された。

【考察および結論】

MSC-DCs移植により形成された新生骨組織は長管骨の骨端で多く見られるような海綿骨様の構造体であった。これは、大腿骨全周性骨欠損へのMSC-DCs移植で見られる様な、内部が造血機能を有した骨髄で満たされた活動性の高い骨組織と同様であり、頭部ではあまり見られない形態を示した。つまり、MSC-DCsは移植部位に関係なく、骨髄の多い海面骨様組織を再生する可能性が示された。MSC-DCsは未分化MSCと比較して虚血に強く、血行不全状態でも壊死に至りにくいため、本法は大型の骨を再生する新しい治療法となりえる。MSC-DCsによって再生した骨は、その活性の高さから咬合による荷重などの外的刺激に早期に応答してリモデリングされ、その場で求められる形状へと修正される事が予想されることから、三次元培養MSC-DCsは新しい歯周領域の再生材料として有用であると考えられる。

歯内-歯周病変 ClassⅢに対して歯周組織再生療法を行った一症例

大阪歯科大学歯周病学講座

○高橋 貫之・河野 智生・梅田 誠

A Case report of periodontal regeneration for class III periodontal lesions combined with endodontic lesions

Department of Periodontology ,Osaka Dental University

○Tsurayuki Takahashi, Tomoo Kouno, Makoto Umeda

【はじめに】

歯内-歯周疾患症例では、十分な診査や治療を行っても予後不良となる場合が多いが、その一方で適切な鑑別診断と治療を行うことによって症状が改善し、長期的な歯の保存が可能となる症例が存在するの事実である。

今回、感染根管処置・歯周組織再生療法を行うことにより良好な結果が得られ症例を報告する。

【初診】

患者：39歳 女性 初診：2008年3月20日

主訴：左下臼歯部の歯肉の腫脹および排膿を主訴として来院。

近医では継続的に投薬処置のみで、根本的な治療はなく不安になり当大学病院に来院した。

【診査・検査所見】

全顎にわたるプラークが歯頸部に付着しており PCR は 54.3%であった。36 の頬側中央部に 10mm の深い歯周ポケットが存在し 2 度の根分岐部病変であった。また咬合性外傷が認められ、ブラキシズムの自覚もあった。

【診断】軽度慢性歯周炎（一部重度）、咬合性外傷

【治療計画】

歯周基本治療（プラークコントロール、咬合調整、感染根管処置、SRP、ナイトガード装着）、再評価、歯周外科治療（36部にGTR法）、再評価、SPT。

【治療経過】

2008年3月から7月：歯周基本治療、2009年2月36歯周組織再生療法（GTR法）、2009年4月メンブレン除去、2009年10月最終補綴、2009年12月以降SPT。

【考察・まとめ】

当初、歯内-歯周病変の分類のクラスⅡと診断し、根管治療し経過観察していたが分岐部病変が改善せず、歯周組織再生療法を行った。また、36部にエナメル突起および垂直性骨欠損が認められた。エナメル突起の分類は3度であり、直視では困難なためマイクロスコープを用いてオドントプラスティール・GTR法を行い現在に至るまで安定した状態を維持している。分岐部病変の治療では、十分な診査や治療を行ってもエナメル突起の見落としが多く、その結果、予後不良となることもある。今後は、SPTによる徹底したプラークコントロールおよびブラキシズムに対する継続的な対応をして、炎症をコントロールしていくことが重要と思われる。

レジンコーティングが CAD/CAM セラミックアンレー修復の窩洞適合性に及ぼす影響

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座¹⁾・ 歯科保存学講座²⁾
○前野 雅彦^{1,2)}, 山田 正¹⁾, 中村昇司¹⁾, 柵木 寿男¹⁾, 奈良 陽一郎¹⁾

Effect of resin coating on cavity adaptation of CAD/CAM ceramic onlay restoration

Department of Adhesive Dentistry¹⁾, Department of Endodontics²⁾,
School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

○Maeno Masahiko^{1,2)}, Yamada Tadashi¹⁾, Nakamura Shoji¹⁾, Maseki Toshio¹⁾, Nara Yoichiro¹⁾

【研究目的】近年の目覚ましい Digital Dentistry の発展によって、CAD/CAM を用いた歯冠修復が臨床において普及し、次世代の歯科医療を担う治療法として再認識されている。また、メタルフリー修復は審美性・低侵襲性の観点から望ましい修復法であり、特に間接修復を選択する際には、歯質との接着一体化、象牙質面保護、術後痛予防のため、象牙質レジンコーティングの併用が望まれる。しかし、CAD/CAM 歯冠修復に際してのレジンコーティングによる影響は不明な点が多い。そこで本実験では、チェアサイド CAD/CAM を用いたセラミックアンレー修復におけるレジンコーティングが窩洞適合性に及ぼす影響について評価検討を行った。

【材料および方法】被験歯には本学部研究倫理委員会の承認を得て、ヒト抜去健全上顎第一大臼歯 16 本を用いた。被験材料には、最新の歯科用チェアサイド CAD/CAM システム CEREC (CEREC AC および MC XL, SIRONA Dental Systems) ならびに CAD/CAM 用セラミックスである VITABLOCS Mark II (Shade:A3C, VITA) を選択した。まず、被験歯の咬頭頂を利用した規格化植立を行い、形態コピー用光学印象を行った後、レジンコーティング群 (R+群) および非コーティング群 (R-群) に区分した。R+群に対しては、フラットエンドダイヤモンドポイント (FG103) を用いて、Fig. 1 に示す MODP 窩洞を形成後、クリアフィル ボンド SE ONE とクリアフィル プロテクトライナー F (Kuraray Noritake Dental, 以下、K 社) を用いて象牙質レジンコーティングを施した。R-群に対しては、ラウンドエンドダイヤモンドポイント (FG107RD) にて Fig. 1 に示す窩洞形成を行った。その後、両群試料の光学印象を行い、形態コピー用光学印象データに基づく MODP アンレーを製作した。合着操作に際し、R+群ではレジンコーティング相当部に Clearfil Ceramic Primer (K 社) を、エナメル質切削部に Clearfil ED Primer II (K 社) を用いて処理し、R-群では窩洞全体を Clearfil ED Primer II で処理した。一方、アンレー体内面に対しては、リン酸処理後に Clearfil Ceramic Primer 処理を行い、接着性レジンセメント (Clearfil Esthetic Cement, K 社) で合着後に、湿ボックス中に 1 時間保管した。全試料は、歯軸 (植立軸) に平行かつ頬側壁窩縁に直交する面によって 2 回の縦切断を行い、中心窩直下の髄側壁象牙質被着面を含む、厚さ 2.0mm の板状試料を得た。ついで、残存した近遠心部 2 試料の歯軸および頬側壁窩縁に平行する面によって 2 回の近遠心的切断を行い、中心窩直下相当部の近・遠心軸側壁象牙質被着面を含む、厚さ 2.0mm の板状試料 2 片を得た。その後、切り出した計 3 片の切断研磨面から、Fig. 2 に示す 23 計測点における適合状態を Nikon Measure Scope MM-11 (測定精度 1 μm) で計測した。得られたデータは Student の t 検定によって統計学的分析を行った。

【成績】統計学的分析の結果、Fig. 2 の○付数字で示す 5 計測点において、R+群は R-群より有意に小さい値を示し、それ以外の 18 計測点では両群間に有意差は認められなかった。また、R-群と同等または優れた窩洞適合状態を示した R+群であっても、そのセメントスペースは、窩縁部で約 50~100 μm、窩洞内部で約 100~250 μm を示した。

【考察ならびに結論】最新の CEREC システムを用いたセラミックアンレー修復では、レジンコーティングによって窩洞適合性が低下することは皆無であり、歯肉側壁、軸側髄側線角部の適合性を向上させることが明らかになった。これは、凹隅角の窩洞内形状がレジンコーティングの有無によって明瞭な違いを示さなかったことから、特に凸隅角である髄側軸側線角のレジンコーティングによるラウンド化が寄与しているものと考えられる。また、計測した窩縁部のセメントライン幅は 80~100 μm であり、経年的な臨床的变化としてのクレビス形成や当該部の変色・着色に留意すべきと考えられる。さらに、事前の形態コピー用光学印象データに基づき作製した R+群のアンレー体は、窩縁より約 50~100 μm 突出した状態となっていることは臨床的に興味深い。

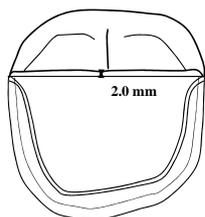


Fig.1 Standardized MODP cavity

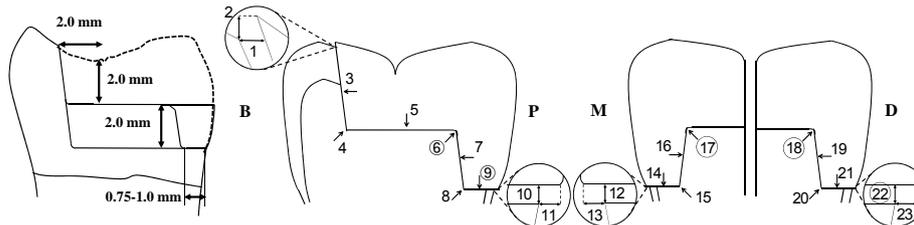


Fig.2 Measured points for restorative-cavity adaptation

噴霧注水における Er:YAG レーザー照射の除去効率について

大阪歯科大学歯科保存学講座

○横田啓太, 岩田有弘, 保尾謙三, 吉川一志, 山本一世

Removal efficiency of Er:YAG laser irradiation with pouring water of fog-form

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University

○YOKOTA Keita, IWATA Naohiro, YASUO Kenzou, YOSHIKAWA Kazushi, YAMAMOTO Kazuyo

【緒言】

近年、歯科用レーザーの応用が進み、臨床においても様々な分野で使用されるようになってきた。歯牙硬組織切削では、Er:YAG レーザーは特に優れた効果を示し、臨床応用されている。しかしながら、高速回転切削器具には除去効率では到底及ばず、治療時間の延長など問題となっている。除去効率を向上させるため、先端出力や繰り返し速度（パルス数）を上げる試みがされてきているが、歯髄への影響など様々な問題を抱えている。

我々の研究グループは注水装置に着眼し、より効率よく歯質除去を行うために従来の注水機構ではなく、霧状に噴霧注水できる装置を利用し、モリタ製作所の協力の下、注水方式を霧状に改良した試作チップを作製し、象牙質に対する除去効率について実験を行い、第129回秋季本学会にて発表した。

今回、この試作チップを用いてエナメル質に対する除去効率について検討を行ったので報告する。

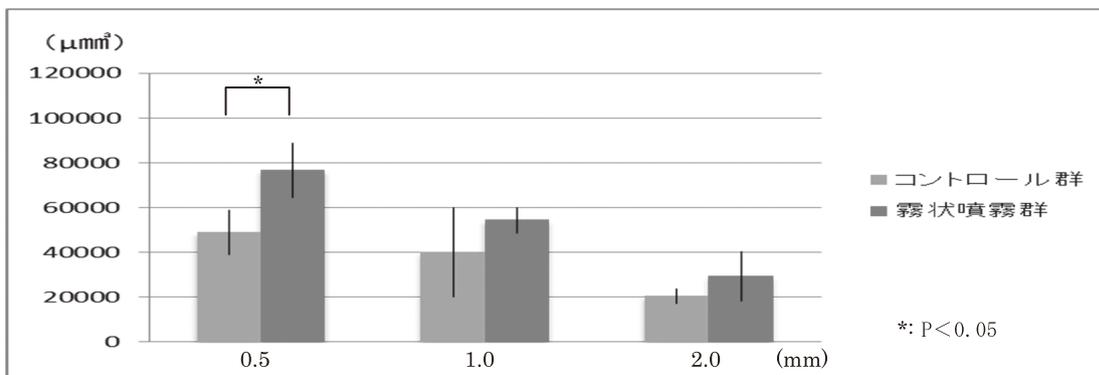
【材料および方法】

Er:YAG レーザー発振装置として Erwin[®] Adver1 (モリタ製作所、以下レーザー) を用いた。照射条件を 100mJ とし、繰り返し速度は 10pps とした。照射チップは C600F と注水方式を霧状の改良した試作チップを使用した。また先端出力は出力測定器 LaserMate-P (COHERENT) にて計測し、規定した。

被験歯として牛歯を用い、エナメル質をモデルトリマーにて面出しを行い、耐水紙 #2000 まで研磨を行った後、1 cm/s でムービングステージを移動させ、レーザー照射を行った。レーザー照射は試料までの距離を 0.5、1.0 および 2.0mm に規定した。C600F にてレーザー照射を行った群をコントロール群、試作チップにてレーザー照射を行った群を霧状噴霧群とした。各試料はレーザーマイクロスコープ (KEYENCE, 倍率×100) にて観察を行い、断面積量を計測した (n=5)。なお、測定結果は一元配置分散処理および Tukey の検定により統計処理を行った (P<0.05)。

【結果および考察】

断面積量の結果を下図に示す。



距離 0.5mm では霧状噴霧群はコントロール群よりも有意に高い値を示し、除去効率の向上に有効であることが示唆された。距離 1.0 および 2.0mm では有意な差は認められなかったが、チップ先端から試料までの距離が大きくなるにつれ照射エネルギーも減弱するため、除去効率に大きな差が生じにくくなったためと考えられる。今後は照射エネルギーや繰り返し速度を変化させるなど、臨床における様々な状況においても研究を進めていく予定である。

酸化チタンナノチューブの歯の漂白への応用：基礎特性評価① 光触媒特性評価

1)大阪歯科大学歯科保存学講座, 2)東北大学多元物質科学研究所

○小松首人¹⁾, 西田尚敬¹⁾, 鈴木康一郎¹⁾, 魯 灵¹⁾, 古澤一範¹⁾ 河村昌哲¹⁾
関野 徹²⁾, 山本一世¹⁾

Application of titanium oxide nanotubes to tooth bleaching : Fundamental evaluation① Evaluation of their photocatalyst ability

1) Osaka Dental University, 2) Tohoku University

○Obito KOMATSU¹⁾, Hisataka NISHIDA¹⁾, Koichiro SUZUKI¹⁾, Lu Ling¹⁾, Kazunori FURUSAWA¹⁾
Masaaki KAWAMURA¹⁾, Tohru SEKINO²⁾, Kazuyo Yamamoto¹⁾

【緒言】

昨今、二酸化チタン含有低濃度過酸化水素水が漂白剤として開発され、消毒用過酸化水素水と同程度の3.5%に濃度が抑えられている。そして、酸化チタンの光触媒作用により低濃度の過酸化水素水でも優れた漂白効果が引き出せることで注目されている。歯の漂白は、過酸化水素水を用い触媒の作用により発生したラジカルが色素を酸化、分解し無色にすることで漂白効果が得られていると考えられる。1998年に中部電力の春日らによって、比較的低温での化学反応により酸化チタンナノチューブ(TNT)をテンプレートなど一切用いずに合成する方法が開発された[1]。この材料は、特異的なナノチューブ構造とチタニア結晶の持つ多様性との共生により優れた光触媒能や物理化学的機能を示すことが報告されている。

そこで、本研究では歯科用漂白剤への応用展開を想定した基礎的研究の一環として、TNTの光触媒特性におけるラジカルの発生量を検討した。

【材料および方法】

出発原料として、TiO₂粉末(P-25, 日本アエロジル社)を用いた。まず化学合成プロセスを用いてTNTを作製した。TiO₂粉末を10M NaOH水溶液に加え、110°Cで24時間攪拌還流させた。得られた白色のスラリーにイオン交換水を加えてよく攪拌し、ろ過により固液分離を行った。この洗浄を70 μS/cm以下になるまで繰り返した。この生成物に0.1M塩酸を加え、再び洗浄作業を5 μS/cm以下になるまで行い乾燥させ、TNT粉末を得た。

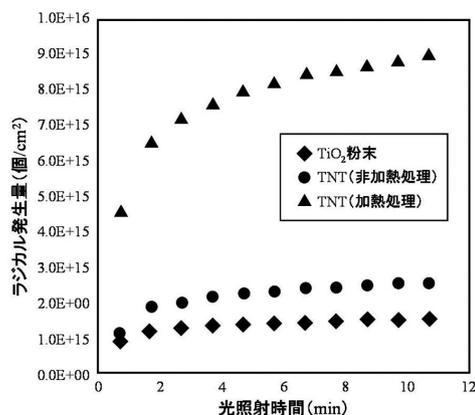
TNTにおいては非加熱処理と加熱処理を行ったものを用意した。加熱処理は、大気中にて400°C、2hの条件で行った。準備した3種類(TiO₂粉末、TNT、TNT(加熱処理))の試料を、それぞれUV照射下において電子スピン共鳴法(ESR法)にて、1分おきに10分間、ラジカルの定量測定を行った。UV照射装置には超高压水銀灯(ウシオ電機)を用いた。また、ラジカルの測定にはESR装置(ESP350E, BRUKER社)を用いた。

【結果】

UVランプ照射下において、未処理TNTからTiO₂粉末よりもやや多いラジカル発生量がみられた。また、加熱処理を行ったTNTからは未処理のTNTと比較して、大幅なラジカル発生量の増加が認められた。

【考察】

UVランプ照射時にTNTからもラジカルが発生することが明らかとなった。また、TNTからTiO₂粉末よりもやや多いラジカルが認められ、さらに、加熱処理を行うことでラジカルの発生量を増加させることが可能であることがわかった。これは、加熱処理によりXRDでみられるTNTのピークからアナターゼのピークに近づくという報告もあり、熱処理により結晶化が向上したためと考えられる。今回の実験により、TiO₂粉末よりも優位性があることが確認でき、さらに機能化することで応用展開が拡大されることが示唆された。



References

[1] T. Kasuga, K. Hiramatsu, T. Sekino, and K. Niihara. Adv. Mater. 11, 1307 (1999).

新生児ラット頭蓋骨からの骨細胞様細胞の分離培養法

奥羽大学歯学部歯科保存学講座保存修復学分野

○門倉弘志、山崎崇秀、和田康弘、菊井徹哉、西村 翼、渡邊 崇、横瀬敏志

Establishment of culture method of osteocyte-like cell from rat newborn calvalia

Division of Operative dentistry, Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Ohu University

○Kadokura Hiroshi, Yamazaki Takahide, Wada Yasuhiro, Kikui Tetsuya,

Nishimura Tubasa, , Watanabe Takashi, Yokose Satoshi

【研究目的】

骨にメカニカルフォースが加わると、骨に埋入された骨細胞はこのメカニカルフォースを認識するメカノセンサーとして働き、細胞突起や骨細管を介して骨芽細胞や破骨細胞へシグナルを伝達し、骨代謝を調節するという重要な機能があることが最近の研究でわかってきた。しかし、硬組織に覆われた特殊な環境のため、骨細胞の機能の詳細な解析については未だ不明な点が多い。骨細胞の培養法についての報告はいくつかあるが、骨細胞としての機能を詳細に検索している報告は未だ少ないのが現状である。このような背景から本研究は、骨細胞の機能をさらに解析することを目的として、骨組織から骨細胞様細胞を分離培養する方法の確立を目的とした。

【材料と方法】

動物は5日齢の新生児SDラットを使用した。頭蓋骨を摘出し骨膜を除去し、骨表面の細胞を死滅させるために70%エタノールに15秒間浸漬した。細切した骨組織片にコラゲナーゼ酵素液とEDTA脱灰液を交互に処理する方法を用いて細胞を分離した。分離した細胞は10%牛血清を含んだ α -MEMを用いて37°C、5%CO₂環境の下、14日間の培養を行った。細胞の解析としてAlikaline phosphatase(ALP)染色、抗Sclerostin抗体を用いた免疫組織化学的染色、real time PCRを用いた、Osteocalcin, E11, Destrin, DMP-1, FGF23, SclerostinのmRNA発現を調べた。

【結果と考察】

培養7日目の細胞のALP染色では、細胞の集団の中に細胞突起を有したALP陰性の細胞が認められた。これら細胞には免疫組織化学的染色法により、骨細胞の特異的マーカーであるSclerostinの局在が認められた。Real time PCRの結果では、骨細胞に特有に発現するOsteocalcin, E11, Destrin, DMP-1, FGF23, SclerostinのmRNA発現が認められた。

以上の結果から骨組織から分離した細胞は、骨細胞特有の細胞突起を有する形態を示し、骨細胞特有の遺伝子発現を示すことが確認された。

【結論】

本実験の骨組織からの細胞の分離培養方法は骨細胞を研究する上で有用な方法であることが示唆された。

グラフェンおよび酸化グラフェンフィルムに対する生体反応

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
○金山 和泉¹, 宮治 裕史¹, 西田 絵利香¹, 辻 妹井子², 井上 加菜¹, 井原 朝子¹, 川浪 雅光¹

Biomedical response to the films of graphene and graphene oxide.

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

²Mitsubishi Gas Chemical Company, Inc.

○KANAYAMA Izumi¹, MIYAJI Hirofumi¹, NISHIDA Erika¹, TSUJI Maiko²,
INOUE Kana¹, IBARA Asako¹, KAWANAMI Masamitsu¹

【研究目的】

グラフェン (G) は厚さ 1 nm 以下の炭素の単層ナノシート (図) で, これまでに優れた理工学的特性が報告されている。G を官能基で修飾すると分散性を持つ酸化グラフェン (GO) となり, GO を還元処理すると官能基が除去され, 分散性も失われ G に戻る性質がある。本研究では, グラフェンシートの生体応用を目指して, G および GO が生体に及ぼす効果を検討するために, G フィルムおよび GO フィルムの生物学的特性を調べた。また, コラーゲンスキャフォールドを G および GO フィルムでコーティングした場合の特性変化を評価した。



nanoGRAX®の模式図

【材料および方法】

GO 分散液として nanoGRAX (R) (1wt%, 三菱ガス化学, 東京) を用いた。GO 分散液で培養用ディッシュをコーティング後, 乾燥して GO フィルムとした。また GO フィルムを 10% アスコルビン酸溶液, あるいは 2% ハイドロサルファイドナトリウム溶液を用いた化学的還元処理を行うことで G フィルムとした。還元性の評価として G および GO フィルムの色調変化を観察, 電気抵抗値を計測した。生物学的特性の評価として, G および GO フィルムに MC3T3-E1 細胞を播種, 24 時間後の細胞形態を SEM にて観察した。次に 24 穴プレートに G および GO フィルムを作製後, E1 細胞をフィルム上に播種, 培養 7, 14 日後の DNA 量と ALP 活性を測定した。また, 同様にフィルム作成後, 各フィルムを培地に浸漬してフィルム上へのカルシウム析出量を計測した。各評価のコントロールにはコーティングしていないプレートを用いた。

次に GO 分散液 (0.1wt%) を用いてコラーゲンスキャフォールド (6×6×3mm, テルダームス (R), オリパステルモバイオマテリアルより提供) をコーティングして GO スキャフォールドとした。またこれを化学的還元処理して G スキャフォールドとした。これらを SEM にて観察, 圧縮強度を測定した。また, ラット背部皮下に埋入して 10 日後に組織標本作製, 顕微鏡観察を行い, スキャフォールドに ingrowth した組織の面積を計測した。

【結果と考察】

GO フィルムは肉眼的に茶褐色であったが還元処理によって黒変した。電気抵抗測定から GO フィルムはほぼ絶縁であったが G フィルムは良好な通電性を示し, 還元処理が十分に行われたと考えられた。SEM 観察において G と GO フィルムの表面構造に差はなかった。培養試験において各フィルム上に細胞の付着伸展を認めたが, GO フィルムでは付着後の伸展が不十分な細胞も観察された。DNA 量は G および GO フィルムともにコントロールの 60~70% 程度の量で, 増殖は抑制された。一方, ALP 活性は G フィルム上の E1 細胞に強く発現し, 逆に GO フィルムでは有意に低かったことから, G フィルムは骨芽細胞の分化レベル上昇に効果的であると考えられた。カルシウム量は G フィルムで GO フィルムの約 1.5 倍の析出量を測定, コントロールでは検出されなかった。

コラーゲンスキャフォールドはコーティング処理によって一様にフィルムに覆われ, 圧縮強度はコントロールに比較して G スキャフォールドで約 2.7 倍, GO スキャフォールドで約 1.7 倍に上昇した。組織学的観察では G, GO コーティングによる生体親和性の低下は認めず, スキャフォールド内への線維芽細胞, マクロファージ等の侵入を観察した。組織侵入面積は G スキャフォールドで最も高い値であった。

【結論】

G フィルムを用いた場合の生体反応とスキャフォールドの特性変化は, GO フィルムよりも効果的であった。

海馬血流増加反応による歯髄痛評価の妥当性

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座
○長谷川誠実、阿部徹也、藤原正識、本田公亮

Tooth pulp stimulation induced hippocampal blood flow responses provide a useful approach for research into relationship between tooth pulp stimulation and function of hippocampus

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine
○HASEGAWA Makoto, ABE Tetsuya, FUJIWARA Masanori, HONDA Kousuke

【目的】

第 129 回日本歯科保存学会において、歯髄の電気刺激によって海馬血流に増加反応を認めることを報告して以来、歯髄痛と海馬活動の関連について研究を進めてきた。現在までに、歯髄の電気刺激により、極めて早期に短時間のピークをもって遊離した微量 ATP が分解し、アデノシンとなり、アデノシンが血管平滑筋に作用し血流の増加に至ること、また、歯髄の電気刺激は繰り返し与えることで、内因性のオピオイドに関与したストレス鎮痛を生じることから、歯髄痛は侵害性と報酬系の両面を有することについて報告してきた (第 130~137 回日本歯科保存学会)。現段階に至るまで、演者は一貫して、歯髄刺激の観点から海馬活動を検討してきた。そこで今回は、海馬活動から歯髄刺激を検討することとし、海馬活動評価が歯髄刺激研究上有用な手段であるのかについて調べた。

【実験材料と方法】

実験には雄性ウイスター系ラット (10 週齢、体重 320~380 g) 20 匹を使用した。ラットは、すべて 20%ウレタン (1.2 g / kg) 腹腔内投与と全身麻酔を施した。まず、ラット下顎両側切歯歯冠部を切断除去し、歯髄腔を露出させ、ステンレス針電極を挿入し、歯髄刺激電極とした。同時に前肢に 10 mm 間隔でステンレス針電極を挿入し前肢刺激電極とした。さらに、右側頸動脈にカテーテルを挿入し、血圧測定装置に接続し、動脈圧測定に使用した。また、右側大腿静脈にもカテーテルを挿入し、実験中の補液のための静脈路とした。次に、ラットを脳定位固定装置に固定し、開頭し、左側海馬内に血流測定用プローブを挿入した。血流測定用プローブは、ドップラー血流計 (TBF-LN1、ユニークメディカル社)、歯髄刺激電極および前肢刺激電極は、電気刺激装置 (PSS-410、ユニークメディカル社) にそれぞれ接続した。電気刺激のパラメーターとして、従来の研究に用いた、duration 0.5 ms、100 Hz、interval 10 s を用い、歯髄および前肢電気刺激を与えた。刺激強度の設定は、歯髄刺激および前肢刺激に伴い生じる動脈血圧の上昇を基準として刺激閾値とした。そして、それぞれ閾値の 1.5、2、3 および 5 倍の刺激を与えた時の海馬血流を測定した。得られたデータの整理は、刺激前の血流に対して刺激後の血流の変化率を算出することで行い、刺激前と刺激後で比較検討した。統計学上の解析には、Student's *t*-test を使用した。

【結果】

前肢の電気刺激では、血圧上昇の閾値の 1.5 倍および 2 倍では、海馬血流に変化は認めなかった。3 倍および 5 倍の刺激において海馬血流に増加反応を認めた。しかし、増加率は 3 倍と 5 倍の間に差はなかった。歯髄刺激においては、血圧上昇の閾値の 1.5、2、3 および 5 倍ともに海馬血流増加反応を認め、さらに刺激強度に応じて増加率が増加した。

【考察および結論】

前肢の電気刺激は、血圧上昇を指標とした閾値の 3 および 5 倍で海馬血流に増加反応を認めたが、刺激強度との相関がなかった。この現象は、閾値の 3 から 5 倍という極めて強い刺激に対して応答としての海馬血流増加、すなわち痛み強度に対する応答と考えられる。それに対して、歯髄刺激では、閾値の 1.5 倍ですでに海馬血流増加反応を生じ、さらに刺激強度に相関した応答であることが分かった。この結果から、海馬血流増加反応は歯髄痛と密接に関係した海馬活動であることが示唆され、海馬活動が歯髄痛研究の指標として有用であることが示された。また、同時に歯髄痛は大脳辺縁系に直ちに關与する特異な痛みであることが分かった。

本研究は平成 24 年度兵庫医科大学教員助成金により行われた。

本研究は、兵庫医科大学実験動物倫理委員会承認 (承認番号: B11-205 号) の上遂行された。

炎症惹起における NAF1 の分子機構解析

大阪大学大学院 歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)¹⁾
大阪大学大学院 生命機能研究科 医学系研究科 免疫フロンティア研究センター免疫発生学研究室²⁾
○板東 秀典^{1) 2)}, 小椋 英樹²⁾, 村上 正晃²⁾, 伊藤 祥作¹⁾, 林 美加子¹⁾

The analysis of inflammation mechanism from the perspective of NAF1 molecule

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry¹⁾
Laboratory of Developmental Immunology, JST-CREST, Osaka University Graduate School of Frontier Biosciences, Graduate school of Medicine, and WPI Immunology Frontier Research Center²⁾
○BANDO Hidenori^{1) 2)}, OGURA Hideki²⁾, MURAKAMI Masaaki²⁾, ITOH Shousaku¹⁾, HAYASHI Mikako¹⁾

【研究目的】

慢性根尖性歯周炎や歯周病などの炎症性疾患は、新規ヘルパーT細胞サブセットであるTh17細胞などの炎症性細胞浸潤による恒常性の破綻が原因であると考えられている。我々はこれまでに慢性炎症の誘導機構として遊走因子ケモカインの過剰産生機構“炎症アンブ”を同定し、解析してきた。炎症アンブは線維芽細胞、血管内皮細胞などの非免疫系細胞にて転写因子NF κ BとSTAT3が同時に活性化すると、大量のケモカインを産生し、局所に細胞浸潤を誘導し、恒常性を破綻させる。我々は、炎症アンブの慢性的な活性化が慢性炎症であることを証明してきた。炎症アンブの強力なNF κ B刺激因子としては、新規ヘルパーT細胞サブセットTh17細胞が発現するIL-17Aであること、さらに、IL-6はSTAT3活性化を誘導する炎症アンブの重要因子であることが分ってきた。近年、我々は炎症アンブの正の制御遺伝子をゲノムワイドに検索して1000以上の遺伝子を同定した。これら遺伝子群から、脂質代謝に関連する1つの酵素遺伝子をNF κ B Activating Factor 1(NAF1)と名付けて検討し、新たな知見が得られたので報告する。

【材料と方法】

1) 実験には、マウス大腿骨皮質由来内皮細胞株であるBC-1細胞株を用いた。BC-1に対して、NAF1のshRNAを搭載するレンチウイルスを感染させた後、ピューロマイシンを添加した10%FCS含有D-MEM培地にて培養した。こうして得られたNAF1遺伝子ノックダウンBC-1細胞株を用いて以下の実験を行った。

(1) タンパク質レベルでの機能解析

NAF1ノックダウン細胞株をIL-6とIL-17Aの共刺激、またはTNF- α にて単独で刺激し、24時間血清無添加のD-MEM培地にて培養した後で、NF κ BのターゲットであるIL-6の産生をELISA法にて検討した。

(2) 遺伝子発現レベルでの機能解析

上記の培養系からmRNAを抽出し、NF κ Bのターゲットである各種ケモカイン、IL-6、さらにSTAT3のターゲットであるSocs3の発現をリアルタイムPCR法にて検討した。この検討の際、発現量の比較のためハウスキーピング遺伝子であるHPRTの発現量をコントロールとした。

2) 最後に、NF κ B経路活性化に対するNAF1の機能解析を行った。この解析において、BC-1を10%FCS含有D-MEM培地にて24時間培養し、その後TNF- α にて刺激をしてから0、15、30分でのNF κ B分子の核内移行を抗p65抗体にて免疫染色した後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。

【結果】

NAF1ノックダウンBC-1細胞株では、IL-6とIL-17Aの共刺激およびTNF- α 単独刺激後において、IL-6の産生量が有意に減少していた。同様にリアルタイムPCR法による解析の結果、ケモカイン、IL-6のmRNAレベルでの発現量の減少を認めた。一方で、IL-6-STAT3シグナル伝達経路のターゲットであるSocs3発現には減少をみとめなかった。さらに、NAF1ノックダウンBC-1細胞株では、TNF- α 刺激後のNF κ Bの核内移行が有意に抑制された。

【結論】

以上の結果より、NAF1はNF κ Bを制御する炎症アンブの正の制御遺伝子であることが判明した。今後、この遺伝子の炎症アンブにおける働きを詳細に解析することで、慢性炎症性疾患の治療に向けた創薬につながることを期待される。

DPP4 阻害薬 SK-0403 はマクロファージ共培養における脂肪細胞の炎症性遺伝子の発現を抑制する

広島大学病院 健康増進歯学
○新城尊徳、永安慎太郎、岩下未咲、山下明子、西村英紀

DPP4 inhibitor SK-0403 suppresses inflammatory genes expression in adipocyte under co-culture condition with macrophage.

Department of dental science for health promotion, Hiroshima University
○Takanori Shinjo, Shintaro Nagayasu, Misaki Iwashita, Akiko Yamashita, Fusanori Nishimura

【背景】

新規糖尿病治療薬 DPP4 阻害薬は、投与経路や副作用の面で患者への負担が少ない経口治療薬として大いに注目されている。糖尿病患者では歯周炎に対するリスクが亢進していることから今後、本薬剤を投与されている糖尿病合併歯周病患者に遭遇する機会が増えるものと想定される。一方近年、種々の炎症性病変において DPP4 の発現が上昇していることが報告された。さらに、メタボリックシンドロームの定義の一つである肥満状態においては、主に脂肪細胞からの可溶性 DPP4 の発現・放出が上昇することも報告された。すなわち、DPP4 が一連の炎症反応において重要な役割を果たすことが考えられた。

我々は重度歯周炎による炎症反応が脂肪組織（門脈系）を介して増幅され、結果的に糖尿病や動脈硬化の進行を促進する可能性について検討を進めてきた。そこで、DPP4 が脂肪組織における慢性炎症においてオートクリン・パラクリン的に影響を及ぼしているものと仮定し、その阻害薬が脂肪組織における炎症反応に及ぼす影響について検討した。

【目的】

肥満状態における慢性炎症は、脂肪組織におけるマクロファージの浸潤が大きな役割を果たしている。そこで、DPP4 阻害薬である SK-0403（三和化学研究所）が脂肪組織の炎症反応へ及ぼす影響を、マクロファージ並びにマクロファージと脂肪細胞を共培養するシステムを用いて検討することにした。

【材料および方法】

マクロファージ単独に対する SK-0403 の抗炎症作用について、マウスマクロファージ由来細胞（RAW 細胞）に 10ng/ml の E.coli 由来 lipopolysaccharide(LPS)刺激と SK-0403 を 100 μ M、10 μ M、1 μ M 濃度で添加して 24 時間後に回収し、炎症性サイトカインの mRNA 発現の変化をリアルタイム PCR 法によって検討した。また、RAW 細胞において LPS 刺激時の NF- κ B プロモーター活性化に対する SK-0403 添加による影響をルシフェラーゼアッセイ法によって検討した。次に脂肪組織におけるマクロファージの浸潤を想定した *in vitro* のモデルとして、トランスウェルシステム（Corning）を用いた。12 ウェルプレートで通常に従い成熟脂肪細胞へ十分に分化誘導させたマウス繊維芽細胞（3T3-L1 細胞）と、RAW 細胞をトランスウェル内に播種して互いの液性因子がメンブレンを介して交通できるようにした状態で培養した。この条件下で、LPS 刺激ならびに SK-0403 を 100 μ M、10 μ M、1 μ M 濃度で添加を行い 24 時間作用させた後、3T3-L1 細胞を回収し炎症性サイトカインの mRNA 発現をリアルタイム PCR 法によって検討した。

【結果および考察】

LPS 刺激によって、RAW 細胞においては TNF α 、IL-1 β 、IL-6、IL-12 が、RAW 細胞と共培養した 3T3-L1 細胞では、TNF α 、IL-6、IL-12、MCP-1、RANTES の mRNA 発現量が顕著に上昇した。これに対し、SK-0403 を同時に添加しておくこと、SK-0403 の濃度依存的に炎症性サイトカインの発現が抑制された。経口投与時に得られる血中濃度に近い 10 μ M 濃度においても RAW 細胞では 4 種すべての炎症性サイトカインの、また共培養下 3T3-L1 細胞では TNF α 、IL-6、IL-12、MCP-1 の mRNA 発現低下が見られた。以上の結果より、DPP4 阻害薬 SK-0403 が、腸管ホルモン（インクレチン）分解遷延効果以外に、マクロファージやマクロファージの浸潤した脂肪細胞の炎症性遺伝子の発現に対し抑制的な作用を果たすことが示唆された。すなわち、SK-0403 はインスリン分泌作用のみならず、インスリン感受性に対してもある程度の改善作用を発揮する可能性が示唆された。歯周炎症によって亢進する可能性のある門脈系の炎症反応が本阻害剤により制御される可能性が示唆された。さらに、グラム陰性菌による感染症である歯周病の進行そのものに対しても抑制的に作用する可能性が示唆された。

虎の門病院歯科における新患の主訴に関する調査

虎の門病院歯科

○森上 誠, 陶山雄司, 杉崎順平, 宇野 滋, 山田敏元

The survey on chief complaints of the first appointment patients at Department of Dentistry, Toranomom Hospital

Department of Dentistry, Toranomom Hospital

○MORIGAMI Makoto, SUYAMA Yuji, SUGIZAKI Jumpei, UNO Shigeru, YAMADA Toshimoto

【研究目的】

我々はこれまでも、歯科外来において診療に従事しながら、歯科を新規に受診した患者（新患）における歯頸部欠損の臨床調査や接着性レジン修復の症例調査、各種歯科処置が歯科医の処置時間に占める割合についての調査を実施し、学会発表・論文投稿を行ってきた。これまで、新患の主訴に関する報告はほとんどみられないことから、今回、虎の門病院歯科を受診した新患の主訴について調査を行い、考察を試みた。

【方法】

平成23年7月1日から平成24年6月29日までの1年間に、虎の門病院歯科を初めて受診した患者（外来患者および入院患者）の年齢・性別・主訴を記録した。主訴については、検診希望（他科担当医からの依頼含む）、除石・クリーニング希望、歯周病（歯の動揺・Perico含む）、う蝕（歯牙破折・WSD・他院での治療途中含む）、修復物・補綴物の脱離（Tec含む）、義歯（新作希望・不調・破損含む）、Br（新作希望・不調・破損含む）、インプラント（希望・不調・相談含む）、Ext（希望・相談・他院からの依頼含む）、顎関節症（痛み・開口障害・ナイトガード希望含む）、知覚過敏（う蝕除く）、口腔粘膜疾患（口内炎・舌の異常など含む）、睡眠時無呼吸症候群、ホワイトニング希望、外傷、セカンドオピニオン希望、その他の17項目に分類した。さらに、入院患者については入院中の科名および疾患名も記録した。調査終了後、各項目につき集計を行った。

【結果および考察】

今回の調査対象となった新患は、男性が684名（54.2%）、女性が579名（45.8%）であり、総計1,263名であった。

年齢別では、1-9歳が13名（1.0%）、10-19歳が14名（1.1%）、20-29歳が98名（7.8%）、30-39歳が120名（9.5%）、40-49歳が139名（11.0%）、50-59歳が207名（16.4%）、60-69歳が325名（25.7%）、70-79歳が234名（18.5%）、80-89歳が99名（7.8%）、90-95歳が14名（1.1%）であり、20歳以上の成人が新患全体の97.8%を占め、50歳以上が新患全体の2/3以上を占めた。

主訴に関しては、検診希望が284名（22.4%）、除石・クリーニング希望が36名（2.8%）、歯周病が209名（16.5%）、う蝕が230名（18.1%）、修復物・補綴物の脱離が108名（8.5%）、義歯が155名（12.2%）、Brが15名（1.2%）、インプラントが12名（0.9%）、Extが73名（5.8%）、顎関節症が36名（2.8%）、知覚過敏が10名（0.8%）、口腔粘膜疾患が39名（3.1%）、睡眠時無呼吸症候群が1名（0.1%）、ホワイトニング希望が2名（0.2%）、外傷が6名（0.5%）、セカンドオピニオン希望が4名（0.3%）、その他が48名（3.8%）であった。新患全体に占める割合が10%以上であった項目は、検診希望、歯周病、う蝕、義歯の4項目であり、これら4項目で全体の69.2%を占めることが明らかとなった。また、主として歯科保存学領域の処置が必要になると思われる除石・クリーニング希望、歯周病、う蝕、知覚過敏、ホワイトニング希望の5項目で全体の38.4%を占めることが明らかとなった。

また、新患のうち、外来患者が757名（59.9%）、入院患者が506名（40.1%）であった。入院患者の疾患で多くみられた疾患名は、白血病（91名）、食道がん（55名）、骨髄異形成症候群（30名）、肺がん（27名）、悪性リンパ腫（24名）などであった。

【結論】

虎の門病院歯科の新患を1年間にわたり調査した結果、検診希望、歯周病、う蝕、義歯の4項目で全体の約7割を占めることが明らかとなった。また、主として歯科保存学領域の処置が必要になると思われる除石・クリーニング希望、歯周病、う蝕、知覚過敏、ホワイトニング希望の5項目で全体の約4割を占めることが明らかとなった。

う蝕病変の発生頻度および重症度に影響を与えるリスク要因の解析

大阪大学歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)

○永井 真澄、伊藤 中、林 美加子

Analyses of influential factors on frequency and development of primary and secondary caries in adults

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

○Masumi NAGAI, Ataru ITOU, Mikako HAYASHI

臨床の現場において患者個々のカリエスリスクに応じた予防および治療計画を立案し、実施することが求められている。しかし、各種カリエスリスク要因がう蝕病変の発生に与える影響の重みや、成人のカリエスリスクについては、未だ十分に検討されているとは言えない。

【目的】本研究の目的は、一般開業歯科医院の来院患者の臨床データの統計学的分析を通じて、初発または二次う蝕病変の発生頻度および重症度に影響を与える因子を同定すること、またデータマイニングの手法を使用してう蝕病変発生頻度のローリスク患者およびハイリスク患者を分別することである。

【方法】伊藤歯科クリニック(大阪府茨木市)における最終来院日が2008年2月9日以前で、データベースに臨床データが登録されている初診時年齢が20歳以上64歳以下の患者のうち、初診日から365日以内にカリエスリスク検査を実施した442名(男性130名、女性312名)を分析対象とした。

初診時DMFT、mutans streptococci数(以下SM)、Lactobacilli数(以下LB)、唾液分泌量、唾液緩衝能、メンテナンスに対するコンプライアンスを説明変数として用い、修復を要する初発および二次う蝕病変の1年あたりの発生頻度に影響を与える因子を重回帰分析によって検索した。さらに、重回帰分析で統計的に有意であった因子を用いてClassification and regression trees (CART)を作成し、う蝕病変発生頻度のハイリスク患者とローリスク患者を分別した。

また、442名のうち観察期間中(1417.6±52.1日)に新たに初発病変が発生した受診者82名に対して重回帰分析を行い、う蝕病変の重症度に影響を与える因子を同定した。説明変数には上記と同じものを用い、重症度はう蝕病変が歯髓腔に到達したか否かで分類した。

【結果および考察】修復を要するう蝕病変の発生頻度を目的変数とすると、説明変数として、初発病変ではSM($p=0.0373$)とLB($p=0.0633$)が、二次う蝕病変では初診時DMFT($p=0.0003$)、SM($p=0.0014$)、LB($p=0.0131$)が統計的に有意であった。またCARTによって、初発または二次う蝕の発生頻度のハイリスク患者、ローリスク患者に分別することができた。初発病変に関してはSMが 10^6 CFU/ml未滿かつLBが 10^5 CFU/ml未滿の患者群は、SMが 10^6 CFU/ml以上の患者群に比較し統計的に有意に発生頻度が低い($p=0.0012$)ことが示された。二次う蝕病変に関しては初診時DMFTが22未滿かつSMが 5×10^5 CFU/ml未滿の患者群は、初診時DMFTが22以上の患者群に比較し統計的に有意に発生頻度が低い($p<0.0001$)ことが示された。

う蝕病変の重症度に影響を与える因子としてメンテナンスに対するコンプライアンス($p=0.0105$)のみが有意であった。メンテナンスに対するコンプライアンスが不良な患者群は良好な患者群に比較し、初発う蝕病変が歯髓腔に達している比率が統計的に有意に高かった($p=0.0094$)。

これらの結果から、より少ないパラメータで患者の初発および二次う蝕病変の発生頻度を予測できる可能性が示された。また、う蝕病変の重症化を抑制することにメンテナンスが有効であることが示された。

低出力パルス超音波のマウス筋芽細胞の分化に対する影響

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯冠修復学¹⁾

中部インプラントアカデミー²⁾

武庫川女子大学健康運動科学研究所³⁾

○玄 太裕¹⁾、下出 輝¹⁾、梶本 忠保^{1),2)}、山添 光芳³⁾、堀田 正人¹⁾

Effect of Low-intensity pulsed ultrasound on differentiation of C2C12 cells

Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation,

Asahi University School of Dentistry¹⁾ Chubu Implant Academy²⁾ Mukogawa Women's University³⁾

○GEN Taiyu¹⁾, SHIMODE Akira¹⁾, KAJIMOTO Tadamori^{1),2)}, YAMAZOE Mitsuyoshi³⁾, HOTTA Masato¹⁾

【研究目的】

低出力パルス超音波 (low-intensity pulsed ultrasound:以下LIPUSと略す) は組織再生を促進すると考えられ、臨床の分野で応用されている。しかし口腔内には様々な組織があり、それぞれの細胞においてLIPUSの影響があるかどうかは詳細に報告されていない。どのような細胞の分化過程に影響があるかわかれば今後LIPUSが再生医療の一助となるかもしれない。そこで今回筋肉細胞へ分化する過程におけるLIPUSの作用に着目した。

【材料と方法】

マウス筋芽細胞株C2C12 (以下C2C12細胞) をDMEM培地 (非働化した牛胎児血清10%を含む) を用いて37°C、炭酸ガス濃度5%にて培養した。筋細胞への分化誘導は5%馬血清を含むDMEM培地で行った。LIPUS照射には伊藤超短波製BRソニック-Proを使用した。プローブ (直径約1.8cm) の上にゲルを塗布し、その上に12穴マルチウェルプレートに乗せ固定した。照射は15分間行った。

1. C2C12細胞の生存率に対する影響 C2C12細胞を播種して1日培養した後、分化誘導用の培地に交換し、翌日LIPUSを照射した。非照射群をコントロールとし、照射群は3MHz、5MHzの周波数で3段階の出力(45mW/cm²、70mW/cm²、90mW/cm²)で照射し、生存率を評価した。

2. C2C12細胞の分化誘導に対する影響 C2C12細胞を播種して1日培養し翌日分化誘導を行った後、1日培養し翌日LIPUSを照射した。照射は周波数3MHz出力70mW/cm²ないし90mW/cm²で1日15分ずつ7日間照射し、その後7日間培養を継続した。分化誘導をかけた日を0日目とし、7日目と14日目の形態を位相差顕微鏡にて観察した。次に分化に要する刺激回数を知るために1回~8回まで異なる回数で連日照射した。分化誘導をかけた日を0日目とし8日目から形態の変化を位相差顕微鏡にて観察した。

3. 筋細胞分化における遺伝子発現の検討 LIPUSは筋分化過程の初期段階で働く遺伝子に影響を及ぼすことが予想されたので、これらの遺伝子の発現を解析した。播種し1日培養した後、分化誘導用の培地に交換し、翌日LIPUSを周波数3MHz出力70mW/cm²で照射した。1時間後、24時間後に全RNAを抽出しリアルタイムPCRで遺伝子の発現量を測定した。

【結果】

C2C12細胞の生存率への影響は全ての出力において認められなかった。分化誘導に対する影響では照射群は7日目で細胞融合が多く観察され、14日目においては分化した筋管細胞様の束になり、一方向に整列している像が観察された。また、1回だけのLIPUS照射でも十分に分化促進作用があることがわかった。

遺伝子発現では筋細胞分化誘導によってERK5、Klf4、Spl、Cdh15、p21、MyoD、Myogenin、MEF2a、BMP2、Cot/Tp12、ERK2、Runx2の発現量が増大した。またLIPUS照射によってMyoD、BMP2の転写が1時間後に有意に増強したが24時間後では抑制された。

【考察と結論】

3MHzのLIPUS照射ではC2C12細胞の分化が有意に促進された。この促進効果は1回だけの照射でも十分であったことから、LIPUSは分化誘導の初期段階の遺伝子発現に影響を及ぼすことが予想された。C2C12細胞に筋分化への誘導をかけると筋分化のマーカーであるMyoD以外に骨分化のマーカーであるBMP2の転写量が増加している。BMP2が骨への分化だけでなく、筋への分化に関与している可能性がある。周波数3MHzのLIPUSはマウス筋芽細胞の分化を促進することが分かった。したがってLIPUS照射により未分化な細胞が減少し、分化に必要な時間も短縮されることが考えられる。よってLIPUSは再生医療の一助となる可能性が示唆された。