

Rep-PCR を用いた *S. mutans* 血清型 *e* のバンディングパターンの差異について

日本大学松戸歯学部保存修復学教室
○岡田珠美、鈴木英明、藤田光、池見宅司

The differentiation of banding patterns of *S. mutans* serotype *e* in rep-PCR with ERIC primer
Department of Operative Dentistry Nihon University School Dentistry at Matsudo.
○Okada Tamami, Suzuki Hideaki, Fujita kou and Ikemi Takuji.

演者らは初期う蝕の発症に深い関わりを持っている *S. mutans* (血清型 *c, e, f*) と *S. sobrinus* (血清型 *a&g*) の遺伝子型の差異を Repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) 法を用いて調べる研究を行っている。この技術は将来において高う蝕罹患患者を識別する上での重要な技術となりえる可能性がある。gold standard であるが PFGE (pulsed field gel electrophoresis) と比較して、rep-PCR 法は操作が簡便であり、特別な機械・技術を必要とせず、安価で短期間に結果が得られるという利点がある。この rep-PCR 法に市販プライマーの ERIC プライマーを用いて *S. mutans* と *S. sobrinus* の標準株およびヒト口腔分離株に応用したところ種々のバンドを得ることができ、*S. mutans* と *S. sobrinus* の標準株ではそのバンディングパターンに差異が認められることを報告した(第 135 回)。また血清型 *f* は血清型 *c* と異なったバンディングパターンの認められることも報告した(第 134 および 136 回)。今回は異なったバンディングパターンの認められた *S. mutans* 血清型 *f* の臨床分離を株数菌株増やしそのパターンの確認を行った。さらに血清型 *e* の分離株についても同様にそのバンディングパターンの多様性の差異について検討したところ若干の知見を得たので報告する。

【材料および方法】

S. mutans 標準株数菌株(血清型 *c, e&f*)とヒト口腔より分離した数株を本実験に供した。前培養菌を BHI 液体培地を用いて一夜ローソク培養を行った(37°C)。得られた菌液より遠心分離機にて菌体を回収し、市販 DNA 抽出キット(kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen)を用いて DNA を抽出、濁度計を用いて濃度を調節した。得られた DNA を各血清型に特異的なプライマーを用いて血清型の同定を行った後、本実験に供した。市販プライマー ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') と ERIC 2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGGAGCG-3') (Integrated DNA Technologies)およびバッファーコンポーネント(EPICENTER Technologies)を用い通常に従い PCR を行った。得られた増幅産物の分離は 2%のアガロースゲル使用の電気泳動により行った。電気泳動後、エチジウムブロマイドにて染色、画像撮影を行った。得られた画像よりバンディングパターンの差異を 3 種血清型間で比較・検討した。

【結果および考察】

- 1) すべての標準株および分離株の DNA から得られたバンディングパターンは数種のバンドを有していた。
- 2) *S. mutans* 標準株血清型 *c* と比較して血清型 *f* の標準株および分離株のうちに数株のパターンは異なっていたが血清型 *e* は *c* と類似したパターンであった。
- 3) 血清型 *f* の分離株のうち数菌株と *e* 型では若干の差異は認められるが 2000bp, 1700bp, 1400bp, 1100bp, 800bp, 250bp に強く染色されるバンドが認められた。これは血清型 *c* に認められるバンディングパターンと同じであった。
- 4) これに対して血清型 *f* のうち標準株 2 菌株と分離株 4 菌株には 1700bp, 1400bp, 1100bp, 800bp, 250bp に強く染色されるバンドが認められたが、2000bp には強く染色されるバンドは認められなかった。若干の差は認められるが、この 6 菌株のバンディングパターンは類似していた。

以上の結果は、本 rep-PCR 法は *S. mutans* 血清型 *e* 株にも応用出来る事が認められた。また血清型 *f* のバンディングパターンは他の血清型と異なるパターンを有する株の割合が多い可能性が示唆された。今後より多くの血清型 *f* の分離菌株についてのバンディングパターンを調べて異なるパターンを有する株の割合を確認することとともに、この異なった血清型 *f* 株の WIG 合成能、試験管ガラス壁への固着能試験などの齶蝕原生を同じ血清型 *f* や他の血清型と比較検討する予定である。

大気圧低温プラズマのう蝕感染象牙質に対する殺菌効果
—ヒト抜去歯を用いた感染象牙質モデルでの検討—

¹⁾ 鶴見大学歯学部保存修復学講座, ²⁾ 鶴見大学歯学部口腔微生物学講座,
³⁾ 大阪府立産業技術総合研究所, ⁴⁾ 大阪大学大学院工学研究科原子分子イオン制御理工学センター
○白井エミ¹⁾, 大島朋子²⁾, 井川 聡³⁾, 北野勝久⁴⁾, 前田伸子²⁾, 桃井保子¹⁾

Sterilization effect of atmospheric pressure and low temperature plasma on the carious infected dentin
- with the infected dentin-models using extracted human teeth -

¹⁾ Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine,
²⁾ Department of Oral Microbiology, Tsurumi University School of Dental Medicine,
³⁾ Technology Research Institute of Osaka Prefecture
⁴⁾ Graduate School of Engineering, Osaka University

○ USUI Emi¹⁾, OHSIMA Tomoko²⁾, IKAWA Satoshi³⁾, KITANO Katsuhisa⁴⁾, MAEDA Nobuko²⁾, MOMOI Yasuko¹⁾

背景・目的: 日本歯科保存学会のう蝕治療ガイドライン¹⁾は、歯髄に達するような深在性う蝕においては、感染象牙質を一括完全に除去せず段階的に除去することで露髄を回避しようとしている。これは、臨床的に健康な歯髄と診断できれば、長期間覆髄剤を貼付することにより感染歯質が無菌化した再石灰化するというエビデンスに基づいた歯髄温存療法として、保険にも掲載されているが、長期間を要する待機的な治療法であるため、実際の臨床ではほとんど実施されていないのが現状である。そこで我々は、露髄を回避するため意図的に残置させた感染象牙質を、非侵襲的に1回で無菌化する新たな治療技術を模索する中で、大気圧低温プラズマによる殺菌方法^{2),3)}に着目した。この方法は液体にプラズマを照射することで産生される活性種の殺菌活性を利用するもので、*in vitro*試験では口腔微生物に対し4.7以下の低pH環境下で殺菌効果が発揮される(低pH法)^{2),3)}。そこで大気圧低温プラズマの低pH法による感染歯質の殺菌効果についてヒト歯のモデルで検討した。

材料・方法: 実験1(象牙質のディスク状試片を使用): ヒト抜去大白歯から、厚さ1mmの象牙質ディスク(Dp)を切り出し試片とした。オートクレーブ滅菌したDpに、*Streptococcus mutans* (ATCC25175, 10⁵⁻⁶ CFU/10 μ L, BHI培地で調整)を接種した。24時間培養後のDpをpH3.5もしくはpH4.5のクエン酸バッファー(1 mL)中に静置し、この試片にHeを用いた大気圧低温プラズマ装置(試作機, (株)吉田製作所)を用いて180秒間プラズマ照射した。

次いでDpをREDOX Indicator(Alamar Blue™, TREK Diagnostic Systems)添加RPMI1640培地に入れ、培養直後から2時間ごとに蛍光マイクロプレートリーダー(Cytoflour™ II, Perseptive Biosystem)を用いて蛍光値を測定後に菌数換算を行い、実験結果はKruskal Wallis検定とMann-Whitney検定($\alpha=0.05$)で統計解析した。

実験2(窩洞象牙質を使用): ヒト抜去大白歯の咬合面象牙質中に直径3mm, 深さ3mmの円柱窩洞を形成後、歯を蒸留水中に浸漬し、オートクレーブ(121°C, 15分間)滅菌した。その後、窩洞内を乳酸で2日間脱灰後*S. mutans*の菌液(10⁶⁻⁷ CFU/30 μ L, グルコース添加Tryptic Soy Brothで調整)を1週間毎日接種し、37°C湿潤下で培養した。菌液を除去後、窩洞内をpH3.5のクエン酸バッファーで洗浄した。試片は、プラズマ照射30秒群(PL30), 60秒群(PL60), 180秒群(PL180)およびプラズマ未照射(Heガスのみ)群(HE180), 照射なし群(Control)に分類した。全群pH3.5の条件下で実験し、PL180のみpH6.5の条件下でも行った。プラズマ照射前後に、スチールラウンドバーで窩洞内から象牙質を採取して、その切片片をBHI培地に懸濁し、懸濁液を寒天培地上で2日間培養しCFUを算出した。統計解析は実験1と同様に行った。

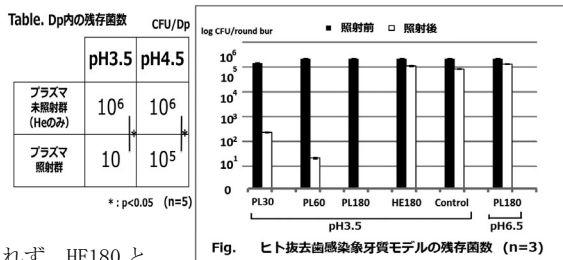
結果: 実験1: プラズマ照射群では未照射群と比較し有意に菌数が減少し、pH3.5の条件下ではpH4.5と比較し著しく菌数が減少した(Table)。実験2: pH3.5の条件下では、プラズマ照射時間依存的に有意に菌数が減少した。PL180では窩洞内象牙質の菌数は0となった。一方、HE180の照射前後とControlでは菌数に有意差はなかった。また、pH6.5の条件ではPL180に菌数の減少は認められず、HE180とControlにおいても菌数の有意な変化が認められなかった(Fig)。

結論: 大気圧低温プラズマの低pH法²⁾による感染歯質の殺菌効果について、ヒト抜去歯を用いた象牙質ディスク状試片および感染歯質モデルで検討したところ、歯質に侵入した*S. mutans*の殺菌に有効であった。今後、感染歯質を意図的に残すう蝕治療におけるプラズマ殺菌低pH法の有用性を、プラズマの生体安全性の点から検討する予定である。

参考文献: ¹⁾ 日本歯科保存学会編 う蝕治療ガイドライン, 永末書店, 京都 2009.

²⁾ IKAWA S. *et al.* Plasma Process. Polym 2010 ; 7 :33-42.

³⁾ YAMAZAKI H. *et al.* Dent Mater J 2011 ; 30(3) :384-391.



NF- κ B の阻害はラット実験的根尖性歯周炎の拡大を抑制する

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔健康科学講座 歯学分野
○山中裕介, 金子友厚, 伊藤崇史, 興地隆史

Inhibition of NF- κ B reduces the expansion of experimentally-induced rat apical periodontitis
Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
○YAMANAKA Yusuke, KANEKO Tomoatsu, ITO Takafumi, OKIJI Takashi

【研究目的】 根尖性歯周炎の拡大において, vascular endothelial growth factor (VEGF)などの血管新生因子によって活性化される nuclear factor- κ B (NF- κ B)などの転写因子は, 血管新生関連因子である B-cell lymphoma-2 (Bcl-2)および Bcl-2-associated protein (Bax)などの Bcl-2 ファミリー遺伝子の発現を調節し, 血管内皮細胞の遊走, 浸潤および管腔形成などに重要な働きを有していると考えられるが, その詳細は不明である. そこで本研究では, NF- κ B の活性を阻害することで根尖性歯周炎における血管新生が抑制可能であるか, またその結果として, 病変の拡大が抑制できるのかという仮説を検証するために, NF- κ B の転写活性を特異的に抑制するデコイ核酸をラットに投与し, 実験的根尖性歯周炎における病変の大きさ, CD31 陽性血管内皮細胞の密度, および Bax/Bcl-2 比に対する影響を検討した.

【材料および方法】 5週齢雄性Wistar系ラット(n=8)にNF- κ B デコイ核酸(Gene Design, Inc., 0.3 μ g/ml)あるいはコントロールとしてスクランブルデコイを腹腔内投与した. 24時間後に8%抱水クロラール (350 mg/kg) による全身麻酔を施し, 下顎第一臼歯を露髄させたのち, 窩洞に1 μ lのlipopolysaccharide(10mg/ml)を注入し, 水硬性セメント (Cavition, GC)にて仮封した. さらに6, 13, 20, および27日経過後に, NF- κ B デコイ核酸あるいはスクランブルデコイの追加投与を行なった. 根尖性歯周炎の誘発28日経過後に, 下顎第一臼歯を顎骨ごと摘出し, 直ちにエックス線撮影装置 (ビーナス携帯, 吉田精工)およびデジタルX線画像処理装置 (Trophy Windows, Trophy Radiologie Japan) を用いてデジタルエックス線撮影を行なったのち, 根尖部透過像の面積をImageJソフトウェア (Version 1.37v; National Institutes of Health, Bethesda, MD) を用いて測定した. また, 試料より2% periodate lysine paraformaldehyde 固定凍結切片を作成したのち, 一次抗体としてCD31 (抗血管内皮細胞), 抗Bcl-2, あるいは抗Baxを用いて酵素抗体染色を行い, 各陽性反応産物の密度を定量した. Bcl-2およびBaxについては, 陽性反応産物密度からタンパク発現におけるBax/Bcl-2比を算出した. さらに, 病変組織内のCD31陽性血管内皮細胞をレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションにて回収したのち, 全RNA抽出し, Bcl-2, Bax, あるいはGAPDH mRNAに対するリアルタイムPCR解析を行い, mRNA 遺伝子発現におけるBax/Bcl-2比を算出した. 統計学的解析には, Mann-WhitneyのU検定 (Bonferroni補正) を用いた.

【結果】 根尖部透過像の面積およびCD31 陽性血管内皮細胞の密度は, いずれもNF- κ B デコイ非投与群よりNF- κ B デコイ投与群の方が, 有意に小さかった ($p < 0.05$). 一方, タンパク発現および mRNA 遺伝子発現における Bax/Bcl-2 比は, いずれもNF- κ B デコイ投与群の方がNF- κ B デコイ非投与群より有意に大きな値を示した ($p < 0.05$).

【考察】 これまでに我々は, ラット実験的根尖性歯周炎の成立過程において, Bax 発現は, 著明な変化を示さないこと, また Bcl-2 は病変の拡大期に高レベルに発現することを報告し, Bax よりも Bcl-2 が血管新生誘導因子として病変形成に大きく関与している可能性を報告している(山中ら, 日歯保誌, 2011; Yamanaka et al., J Endod, 2012). 一方, 本実験条件では, NF- κ B の転写活性の阻害により, NF- κ B 活性化経路の下流にある Bcl-2 の発現が抑制され, そして Bcl-2 と相補関係にある Bax の発現が増強した. また, 血管内皮細胞の密度が減少し, 病変の大きさも小さくなった. これらの結果から, 根尖性歯周炎の成立には, NF- κ B から Bcl-2 ファミリーへの伝達経路が深く関与していることが推察される.

【結論】 ラット実験的根尖性歯周炎において, NF- κ B の転写活性を抑制するデコイ核酸の投与により, Bax/Bcl-2 比の上昇, 血管内皮細胞密度の減少とともに, 病変拡大の抑制が生じた.

中高齢者・若齢者におけるヒト歯髄幹細胞の歯髄再生能の比較検討

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

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

¹⁾Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, ²⁾Department of Oral and Maxillofacial Surgery, ³⁾Department of Endodontics, ⁴⁾Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
○Horibe Hiroshi^{1,2)}, Iohara Koichiro¹⁾, Murakami Masashi¹⁾, Takeuchi Norio^{1,3)}, Hayashi Yuki^{1,4)}, Yamamoto Tsubasa^{1,2)}, Kurita Kenichi²⁾, Nakashima Misako¹⁾

【研究目的】私どもは近年、若齢のイヌ根完成後の抜髄後の根管内に歯髄幹細胞を自家移植すると歯髄が再生されることを明らかにした。しかしながらヒトにおいては、抜髄処置は中高齢者に多く、臨床応用する上では中高齢者における歯髄再生治療法をさらに検討する必要がある。一方、高齢者においては、得られる歯髄組織量および幹細胞数が減少し、分化能、再生能および遊走能が低下するという報告がある。さらに、幹細胞の分取法が分化能、再生能および細胞老化に影響を及ぼすともいわれている。私どもは第136回学会にて、臨床で用いるには安全性に問題があるフローサイトメトリーに代わる、安全で有効な「新規幹細胞膜遊走分取法」による歯髄幹細胞の特徴を発表した。本研究では、さらに、この分取法を用いて中高齢者から歯髄幹細胞を分取し、その細胞形質を若齢者と比較した。ついでマウス下肢虚血モデル移植による血管新生能を検討し、さらに異所性歯移植モデルによる歯髄再生能を若齢と比較検討した。これにより中高齢者における歯髄再生治療法の有効性を検討した。

【材料と方法】

1. 中高齢者および若齢者の抜去歯から歯髄細胞を分離し、2代目で新規分取法により歯髄幹細胞を分取、増幅
2. 細胞表面マーカー発現：フローサイトメトリーにて、CD29, 31, 44, 73, 90, 105, 146, CXCR4の陽性率を比較
3. 分子生物学的解析：Real-time RT-PCRにて幹細胞マーカー、血管新生・神経栄養因子のmRNA発現を比較
4. *in vitro*における多分化能の解析（血管誘導、神経誘導、象牙質・骨誘導、脂肪誘導）
5. 遊走能および増殖能：ヒト血清および遊走因子に対する増殖能および遊走能を比較
6. 老化マーカーSA- β galや細胞老化誘導因子の発現比較
7. SCIDマウス下肢虚血モデルへの移植による血管新生能：虚血後24時間後に歯髄幹細胞 1×10^6 個
A 血流量測定：移植14日後レーザードップラー血流計にて
B 血管形成密度測定：凍結切片作製後Lectin染色を行いキーエンス蛍光顕微鏡にて観察し、統計的に解析
8. 異所性歯移植モデルへの移植による歯髄再生能：ヒト歯根6mmスライスに歯髄幹細胞 1×10^6 個を注入し、SCIDマウス腹腔内に移植。28日後、5 μ mパラフィン切片を作製し、形態学的解析（H-E染色、免疫染色、*in situ* hybridization）

【結果】6代目において、中高齢歯髄幹細胞は若齢と同様に、CD29, 44, 73, 90, 105はほぼ陽性であり、CD31, CD146はほぼ陰性であった。多分化能では、中高齢と若齢の歯髄幹細胞の差はみられなかった。また遊走能、血管新生・神経栄養因子のmRNA発現、老化マーカーや細胞老化誘導因子の発現も、両者において差はみられなかった。マウス下肢虚血モデル移植では、中高齢の歯髄幹細胞は若齢と比較して血流量や血管新生能に有意差はみられなかった。さらに、異所性歯移植においても血管新生能、歯髄再生能、象牙質再生能に両者の差はみられなかった。

【考察・結論】中高齢者から得られた歯髄幹細胞は若齢と同様の幹細胞形質を示すことが明らかとなった。また中高齢者の歯髄幹細胞は、*in vivo*においても若齢と同様の血管新生、歯髄再生能を有することが明らかとなった。よってこれらの結果より、中高齢者においても、歯髄再生治療が可能であることが示唆された。

根管・歯周組織への応用を目指した新規内視鏡の開発

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

○吉居 慎二¹、張 宇鵬²、北村 知昭¹、寺下 正道³、西原 達次⁴、植田 敏嗣²

Development of Novel Endoscopy for Root Canal and Periodontal Tissue

¹Div. of Pulp Biology, Operative Dentistry and Endodontics, Kyushu Dental University, ²Graduate School of Information, Production and Systems, Waseda University, ³Div. of Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental University, ⁴Div. of Infections and Molecular Biology, Kyushu Dental University
○YOSHII Shinji¹, YUPENG Zhang², KITAMURA Chiaki¹, TERASHITA Masamichi³,
NISHIHARA Tatsuji⁴, UEDA Toshitsugu²

【研究目的】

近年、歯科用顕微鏡・歯科用コーンビームCTなどの機器により、口腔内の複雑な解剖学的形態や微細な病変等を高精度に検出することが可能となった。しかしこれらの機器は高価で歯科医療現場に広く流通するには至っていない。また、根管内部の歯質の診断や側枝の検出、および後方臼歯歯周ポケット内の縁下歯石の確認は、現状の最新機器をもってしても困難である。我々は、グレーテッドインデックスファイバを用い歯の内部・根尖歯周組織及び歯周ポケット内に存在する微細構造を、容易かつ高解像度で検出する新しい診断用内視鏡の開発を目的としている。今回の研究では機器の先端に微細レンズを装着することで、焦点距離の延長・被写界深度の増加を計り、より口腔内の微細構造観察に適した診断機器の検討を行った。

【材料および方法】

試作した機器は、主としてグレーテッドインデックスマルチモード型のイメージファイバ、ハーフミラー、光ファイバ、C-MOS、および数種類のレンズを用いて構成した。各 부품の配置は、1本のイメージファイバで画像の取得と観察サンプルへの光照射を同時に行うことを目的として、C-MOS・両凸レンズ・プリズムビームスプリッタ・イメージファイバを直線状に配置し、光ファイバをそれらに対し直角にかつプリズムビームスプリッタの部位で接するように配置した。さらに、システム内での光の反射・散乱を抑え、画像上に現れたハレーションを取り除くことを目的に、光源用レンズの中央にマスクを付けるとともに、取得した画像のMatlabによる処理を行った。また、ファイバ先端に直径0.5mm・0.29ピッチ・焦点距離5.0mmのグリーンレンズを取り付けることで焦点距離の延長、被写界深度の増加を図った。観察条件は、グリーンレンズを装着していない場合はサンプルに接した状態で観察を行い、グリーンレンズを装着した場合はサンプル、または抜去歯根尖よりレンズ先端を5mm離れた状態で観察した。

【結果】

試作機器のC-MOS・両凸レンズ・プリズムビームスプリッタ・イメージファイバを直線状に配置するとともに光ファイバをプリズムビームスプリッタ部に配置することで、光ファイバからの照射光がプリズムビームスプリッタを介し入力され、一本のイメージファイバで光の照射と画像の取得を同時に行うことが可能となった。次に、焦点距離延長と被写界深度増加を目的に、グリーンレンズの装着状態で得られる画像と非装着状態の画像を比較した。グリーンレンズ非装着でサンプルに直接イメージファイバを接触させて観察した場合、光源用レンズにマスクを用いることでより反射の少ない画像を得る事が可能となり、かつMatlabによる画像処理を行う事で解像度10μm以下のハレーションのない鮮鋭な画像を取得することが可能となった。機器内の反射を取り除いた状態でイメージファイバ先端にグリーンレンズを装着してサンプルを観察した場合、解像度20μm以下まで観察することが可能であった。さらに、本装置を用いて実際の抜去歯根管を観察したところ、根管口からの光照射を追加で行うことで根尖まで観察することが可能であった。

【考察】

試作機器では、イメージファイバをサンプルに接した状態では解像度10μm以下の鮮鋭な画像を取得でき、ファイバ先端が接することのできる歯周ポケット等の部位には応用可能であることが示唆された。一方、根管内の観察を想定した時、ファイバを直接接触させることによる根管壁の画像取得が困難であるが、グリーンレンズ装着と根管口からの光照射を併用する事で根管内の観察が可能となったことから、本試作機器の根管内へも応用可能であることが示唆された。

【結論】

歯周ポケットおよび根管内の高解像度観察を可能にする、新しい内視鏡の臨床応用の可能性が示された。

ラット歯肉における TRPM8 陽性神経線維の分布

東北大学大学院歯学研究科¹ 歯科保存学分野² 口腔器官構造学分野³ 歯内歯周治療学分野

○矢島 健大¹ 佐藤 匡² 市川 博之² 島内 英俊³

Distribution of TRPM8-positive nerve fiber in the rat gingival

¹Division of Operative Dentistry, ²Division of Oral and Craniofacial Anatomy, ³Division of Periodontology and Endodontology, Graduate School of Dentistry, Tohoku University

○Takehiro Yajima¹ Tadasu Sato² Hiroyuki Ichikawa² Hidetoshi Shimauchi³

【研究目的】

Transient receptor potential melastatin-8 (TRPM8) は 8~28°C の冷刺激により活性化し、冷覚や痛覚をもたらすと考えられている。このセンサーは後根神経節や三叉神経節においては小型の感覚ニューロンに存在している。口腔内では、歯髄や舌に TRPM8 を含む神経線維が分布することが報告されているが、歯肉における TRPM8 の発現については知られていない。本研究では歯肉における TRPM8 含有神経線維の分布について調べ、歯髄や歯根膜などと比較した。

【材料および方法】

7 週齢の雄性 Wistar ラット (180~250g) を用いた。左側上顎骨を脱灰し、8 μ m の矢状断連続凍結切片を作製した。切片は抗 TRPM8 ウサギ血清を用いて ABC 法にて免疫染色を行った。また、痛覚の伝達物質と考えられる calcitonin gene-related peptide (CGRP) についても同様に免疫染色を行い比較した。染色後、写真撮影を行い形態分析ソフト Lumina Vision (Mitani Corp.) を用いて、歯肉・口蓋粘膜・歯髄・歯根膜における TRPM8 陽性線維の長さを計測した。また TRPM8 と CGRP との蛍光二重染色を行い、それらの共存についても調べた。

さらに TRPM8 陽性神経線維の由来を調べるために、逆行性トレーサーである Fluorogold をラット歯肉と歯髄に注入し、3 日後、三叉神経節を取り出した。8 μ m の矢状断連続凍結切片を作製し、TRPM8 と CGRP との蛍光二重染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて写真撮影を行った。

【成績】

ABC 法による免疫染色により、歯肉には TRPM8 陽性線維が存在することが明らかとなった。これらの線維は上皮下あるいは上皮内において枝分かかれし、自由神経終末を形成し、外縁上皮や歯肉稜で特に豊富であった。しかし、付着上皮には TRPM8 陽性線維は認められなかった。TRPM8 陽性神経線維は歯髄でも数多く観察されたが、歯根膜や口蓋粘膜では稀であった。また、TRPM8 陽性線維の長さを計測し、陽性線維が占める面積比を密度として比較したところ、歯肉の外縁上皮や歯肉稜における TRPM8 陽性神経線維の密度は、内縁上皮の 50-100 倍であった。一方、CGRP は付着上皮や歯髄に豊富に観察された。二重染色の結果、TRPM と CGRP を両方含む神経線維は認められなかった。

歯肉および歯髄を支配する神経細胞のうち、三叉神経節においてはそれぞれ 4.7% と 6.0% のものが TRPM8 を発現していた。これらの神経細胞に CGRP は見られなかった。

【考察】

TRPM8 陽性線維が歯肉や歯髄で数多く認められたことから、これらの組織において TRPM8 が冷刺激を感知するセンサーとして働いていると考えられた。特に、歯肉においては TRPM8 陽性線維が付着上皮では全く観察されず、外縁上皮や歯肉稜で豊富であった。一方、CGRP 陽性線維は付着上皮で豊富に観察された。さらに、蛍光二重染色によっても TRPM8 と CGRP を含む神経線維の分布が異なっていることが明らかとなった。以上の結果から、これらの神経線維の機能が異なる可能性も示唆された。

【結論】

TRPM8 は歯髄と同様に、歯肉においても冷覚や冷痛覚に関与している可能性が示唆される。なお、本研究は会員外の京都大学・細川浩先生と九州保健福祉大学・近藤照義先生との共同研究である。

歯肉上皮において Smad2 は integrin 発現を促進する

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

○ 本郷昌一¹⁾, 山城圭介¹⁾, 山本直史¹⁾, 高知信介¹⁾, 下江正幸¹⁾,
富川和哉²⁾, 鶴川祐樹¹⁾, 前田博史¹⁾, 高柴正悟¹⁾

Overexpression of Smad2 Enhances Integrin Expression in Gingival Epithelium

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

²⁾ Division of General Oral Care, Kyushu University Hospital

○ Shoichi HONGO¹⁾, Keisuke YAMASHIRO¹⁾, Tadashi YAMAMOTO¹⁾, Shinsuke KOCHI¹⁾, Masayuki SHIMOE¹⁾,
Kazuya TOMIKAWA²⁾, Yuki UGAWA¹⁾, Hiroshi MAEDA¹⁾, Shogo TAKASHIBA¹⁾

【緒言】

歯周炎は細菌感染によって歯周組織に生じる炎症性破壊性疾患であり、細菌感染に対する防御機構である歯と歯肉接合上皮との付着が破壊されることにより炎症は深部へと波及していく。歯周炎の進行や重症化を防ぐには、接合上皮の歯面への付着を早期に修復し、強固にすることが重要と考える。歯肉接合上皮は歯面との間でヘミデスマゾーム結合によって接着しており、この結合には細胞接着分子である integrin が深く関与し、また integrin は TGF- β による発現調節を受けることが知られている。しかしながら、硬組織と隣接するという特殊な環境に位置する歯肉上皮において、TGF- β が integrin に及ぼす作用や、その詳細なシグナル伝達経路に関しては不明な点が多い。我々は近年、TGF- β のシグナル伝達分子 Smad2 が歯肉上皮細胞の接着能を制御することを明らかにした。そこで、本研究では、TGF- β -Smad2 シグナルによる細胞接着に関わるメカニズム解明のために、ヒト培養歯肉上皮とマウス歯肉上皮組織切片を用いて、Smad2 過剰発現による細胞接着能と integrin 発現への影響を検討した。

【材料および方法】

1. 歯肉上皮細胞の分離・培養: 健康な歯周組織を有するドナーの歯肉から分離・培養したヒト歯肉上皮細胞を Simian virus 40 (SV40) を用いて形質転換し、不死化上皮細胞株を樹立した。
2. Smad2 過剰発現細胞の確立: 上記細胞株に Smad2 発現ベクター (Nakao, *J Biol Chem*, 1997) をリポフェクション法にて遺伝子導入し、24 時間後に種々の濃度の TGF- β 1 で刺激して、過剰発現した Smad2 のリン酸化を図った。
3. 細胞接着能試験: 上記 2 の細胞を細胞数調整のため再播種し、Cellomics ArrayScan VTI (Thermo Fischer Scientific) を用いて、プレート上の接着細胞数を経時的に測定した。
4. Integrin 発現の解析: 上記 2 の細胞を調製した 24 時間後に、INTEGRIN 発現をリアルタイム RT-PCR 法にて定量解析した。また、Cellomics ArrayScan VTI を用いて INTEGRIN 発現を免疫蛍光染色にて定量解析した。
5. *In vivo* での integrin 発現の解析: Smad2 を keratin14 プロモーター制御下で上皮特異的に過剰発現させたトランスジェニックマウスの歯肉上皮組織切片において、INTEGRIN 発現を免疫蛍光染色法にて調べた。

【結果】

1. Smad2 過剰発現細胞は、対照と比較して有意に接着細胞数が増加した。
2. Smad2 過剰発現細胞において、INTEGRIN (α 2, α 5, β 4, β 6) の発現が増加し、同時にそれらの翻訳物である INTEGRIN の発現も増加した。
3. Smad2 トランスジェニックマウスの歯肉上皮では、野生型と比較して INTEGRIN (α 5, β 6) の発現が強かった。

【考察および結論】

歯面にある内側基底の細胞外基質との接着に integrin は必須の分子である。本研究では、歯肉上皮細胞において、Smad2 過剰発現は細胞接着能を促進するとともに、integrin サブユニットの発現を促進することが明らかになった。特に、INTEGRIN (α 5, β 6) の *in vivo* における発現増加は、歯肉内縁上皮の接着に重要な役割を果たすと考えられる。近年我々は、TGF- β -Smad2 シグナルが創傷治癒における再上皮化を抑制することを明らかにした (Tomikawa, *J Dent Res*, 2012)。すなわち、TGF- β -Smad2 シグナルは歯肉上皮の増殖と遊走を抑制し、かつ、歯肉接合上皮の歯面への接着を亢進するという、歯周組織再生にとって重要な上皮の深行増殖を抑制するシグナル伝達と考えられる。

CAD/CAM 用ブロックの機械的性質について

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

○坪田圭司^{1,2}, 白土康司¹, 古市哲也¹, 石井 亮¹, 高見澤俊樹^{1,2},
大塚詠一朗¹, 升谷滋行^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 佐藤幹武^{1,3}

Mechanical Property of Resin Composite Block for CAD/CAM

¹Department of Operative Dentistry, ²Division of Biomaterials Science, Dental Research Center,
Nihon University School of Dentistry, ³Sato Dental Clinic

○Tsubota Keishi^{1,2}, Shiratsuchi Koji¹, Furuichi Tetsuya¹, Ishii Ryo¹, Takamizawa Toshiki^{1,2},
Otsuka Eiichiro¹, Masutani Shigeyuki^{1,2}, Miyazaki Masashi^{1,2}, Sato Mikitake³

【研究目的】

近年、患者の審美的要求の高まりからコンポジットレジンあるいはセラミックを用いた修復が多く行われている。一方、Digital Dentistry も飛躍的に向上していることから、CAD/CAM を応用した審美修復も頻度が高くなっている。また、金属価格の高騰という背景もあり、今後も CAD/CAM を応用した修復の重要性は増すものと予測される。現在の CAD/CAM 用ブロックとしては、コンポジットレジンあるいはセラミックを用いたものが市販、臨床応用されている。最近、3M ESPE からナノテクノロジーを応用したコンポジットレジンブロック LAVA Ultimate が製品化された。しかし、この LAVA Ultimate に関する研究は少なく、その詳細に関しては不明な点が多いのが現状である。そこで演者らは、本材料の詳細について検討するために、摩耗試験、ヌーブ硬さ試験および曲げ強さ試験を行うとともに電子顕微鏡観察を行うことで検討した。

【材料および方法】

供試した CAD/CAM 用コンポジットレジンブロックは LAVA Ultimate (LU) であり、対照としてセラミックブロックの CEREC Blocs (CB, Sirona)、ハイブリッドセラミックの Gradoa Forte (GF, GC) および Estenia C&B (EC, Kuraray Noritake Dental) の合計 4 製品である。物性試験にあたっては、CAD/CAM 用ブロックは切り出しを行って調整したものを、ハイブリッドセラミック素材においては製造者指示条件で作製したものを試片として用いた。

1. 摩耗試験：摩耗試験は 3 体摩耗試験である Leinfelder-Suzuki の方法で行った。SiC ペーパー#4,000 まで調整した試料の表面を球状ステンレス製アンタゴニストが、垂直負荷荷重 80 N で試片に接触してから、そのまま 30° の水平回転運動を 2 Hz の条件で滑走する動作を 400,000 回繰返した。試験後の試片は、非接触式レーザー測定装置 Proscan 2000 (Scantron Industrial Product) および付属のソフトウェアシステムを用いて、最大摩耗深さおよび摩耗量を求めた。
2. 光沢度の測定：光沢度の測定には、光沢計 (GM-26D) を用い、歯ブラシ摩耗試験前および後の光沢度を測定角 60° の条件で測定した。歯ブラシ摩耗試験は鏡面研磨した試片に対して 1 Hz で 12,000 回、負荷荷重 2.5 N、ストローク幅 50 mm の条件で行った。
3. ヌーブ硬さの測定：ヌーブ硬さの測定は微小硬さ測定器 (DMH-2) を用い、表面を SiC ペーパー#4,000 まで調整した試片に対し荷重 0.25 N、荷重保持時間 30 秒の条件で行った。
4. 曲げ強さ試験：曲げ強さ試験は、ISO 6872 に準じて行った。試片を 4 × 1 × 15 mm になるように調整した後、万能試験機 (Instron 5500R) を用いて、支点間距離 10 mm の条件で 3 点曲げ強さ試験を行った。
5. 電子顕微鏡観察：走査電子顕微鏡 (SEM, ERA-8800 FE, Elionix) を用い、通法に従って表面性状の観察を行った。

【成績および考察】

3 体摩耗試験の成績は、最大摩耗深さおよび摩耗量において CB が他と比較して有意に低い値を示した。LU の最大摩耗深さはハイブリッドセラミックと同程度であったものの、摩耗量は小さくなる傾向を示した。歯ブラシ摩耗試験後の光沢度の成績は、LU で他のハイブリッドセラミック製品と比較してその低下傾向は小さく、これにはフィラーの大きさあるいは形状が影響しているものと考えられた。ヌーブ硬さの成績は、CB, ES, LU および GF の順でヌーブ硬さは高い値を示した。また、曲げ強さ試験の成績は、CB が他の材料と比較して低い値を示した。

【結論】

LAVA Ultimate の機械的物性はハイブリッドセラミックと比較して同程度であり、歯ブラシ摩耗試験後の光沢度では、他の製品と比較して優れた成績を示すことから臨床における有用性が示唆された。

超音波ダイヤモンドチップを使用した窩洞形成 — 研削効率と研削耐久性 —

神奈川県立歯科大学口腔治療学講座保存修復学分野

○竹田 仁一, 菅原 剛志, 高島 志保, 菊池 隼介, 椎谷 亨
大橋 桂, 田中 博隆, 二瓶 智太郎, 向井 義晴, 寺中 敏夫

Study on the ultrasonic preparation using diamond tips - Efficacy and Grinding durability -

Div. of Restorative Dentistry, Dept. of Oral Medicine, Kanagawa Dental College

○TAKEDA Jinichi, SUGAHARA Tsuyoshi, TAKASHIMA Shiho, KIKUCHI Shunsuke, SHIYA Toru
OHASHI Katsura, TANAKA Takahiro, NIHEI Tomotaro, MUKAI Yoshiharu and TERANAKA Toshio

【目的】

超音波を利用した初期う蝕治療, MI レストレーション, 根管治療にまで使用できる新しい超音波インスツルメンテーションシステムがナカニシより発売された. 超音波チップ先端は小さいため, 十分な視野の確保が可能となり, 臼歯部遠心面や頬側部へのアクセスも容易なことから, 罹患歯質のみを選択的に研削し, 健全歯質を最大限に残すことが可能である. また, 歯肉縁に近い歯頸部う蝕の処置に対しても, 軟組織に損傷を与えず出血や歯肉溝滲出液を最低限に抑えることができることから, その後の充填処置を容易に行えることが利点である. この超音波システムは, 一般臨床で頻用されているタービンなどの回転切削器具とは異なり, チップ先端の微振動により対象面を研削する独特な研削器具である.

本研究では, ダイヤモンドコーティングされたう蝕除去用チップを用いて, その研削効率と研削耐久性について検討することを目的とした.

【材料および方法】

実験には神奈川県立歯科大学附属病院で抜去され, チモール水溶液に永年保管された永久抜去歯を用いた. Varios 970 (ナカニシ) にダイヤモンドコーティングされた初期う蝕除去用チップ V-TIP SYSTEM (V30, V-G70; ナカニシ) を装着し使用した.

研削効率については, 上下顎大白歯歯根部を普通石膏にて包埋後, 歯冠咬頭部より咬合面と平行にアイソメットを用いて切断して象牙質を露出させ試料とした. 象牙質試料は耐水研磨紙により #2,000 まで研磨した後, 脱イオン水中で 30 分間超音波にて洗浄した. その後, 超音波システム Varios 970 に初期う蝕除去用 V-TIP SYSTEM (V30, V-G70) を装着し, パワーレンジ G, パワーモードを 1 から 6 まで変化させ, それぞれ 5 秒間研削した. 研削圧は約 30g とし, 研削後, 象牙質試料を脱イオン水中で 30 分間超音波洗浄し, 研削した象牙質面をデジタルマイクロスコープ (VHX-1000; キーエンス) にて, パワーモードの違いによる研削状態を観察した.

研削耐久性については, Varios 970 に初期う蝕除去用 V-TIP SYSTEM (V30, V-G70) を装着し, 抜去永久歯の健全エナメル質のみを選択的に 15 秒, 30 秒, 60 秒, 90 秒および 120 秒間同一方向から連続研削した. 術者は臨床経験 2 年目の 4 人の医局員とし, 研削圧は約 30g, パワーレンジとパワーモードは G6 とした. 研削後のチップは 30 分間超音波にて洗浄後, チップのダイヤモンドコーティングの状態をデジタルマイクロスコープにて観察した. 術者による研削感と研削後のチップ先端の観察によりダイヤモンドコーティングの状態から耐久性を検討した. また, それぞれの術者がエナメル質のみを選択的に研削し続け, 研削感が失われるまでの時間とその時のダイヤモンドコーティングの状態も同様に検討した.

【結果および考察】

研削効率: パワーを上昇させていくに従い研削面積は増加傾向にあることが確認され, パワーモードの上昇に伴い振幅が増したことにより, 研削面積が増加したものと考えられた. 研削耐久性: エナメル質に対しては研削時間を延長するとチップ表面にコーティングされたダイヤモンドがより多く剥がれて研削感は失われ, 連続 60 秒を超えるとダイヤモンドコーティングが完全に剥がれた像が観察された. また, エナメル質の研削感が失われた時間の術者 4 人の平均は 146 秒であった. また, 回転切削具の使用に慣れた術者は超音波インスツルメンテーションシステムの特徴を理解し訓練した上で臨床に用いなければ, その有用性を活かすことが困難であると思われた.

以上の結果より, 超音波システムを利用した窩洞形成は, 耐久性の観点から, エナメル質の開拡は通法に従いタービンなどの高速切削器具で行い, 窩縁の整理やう蝕罹患象牙質の除去を適切なパワーで行うべきであると考えられた.

Er,Cr:YSGG レーザーの歯質切削に関する研究

－ ウォータースプレーの水と空気の相対比率がエナメル質の切削効率に及ぼす影響 －

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

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

Basic Studies on the Er,Cr:YSGG Laser Ablation for Tooth Substance

－ The effects of the relative rate of water and air on the efficiency of ablation for tooth enamel －

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

○TAKADA Mayo¹, SHINKAI Koichi², ARITA Shoko¹, KAWASHIMA Satoki¹, KATO Chikage²,
SUZUKI Masaya², TAIRA Yoshihisa³

【研究目的】

Er,Cr : YSGG レーザーは歯質を効率的に切削することが可能であるが、非接触であるため回転切削器械と比べて窩洞形成のコントロールが難しい。切削メカニズムの詳細を解明してコントロールを良くするには、歯質切削に適したレーザー光の出力、ウォータースプレーの水と空気の相対比率、照射光の方向性、ハンドピースの動かし方などを検討する必要がある。レーザー光がウォータースプレーとともに照射されると照射された歯面で微小水蒸気爆発が生じ、エナメル質小柱が破壊されて切削が生じることをこれまでの研究で確認している。そこで本研究では、ウォータースプレーの水と空気の各相対比率がエナメル質の切削効率に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

ヒト抜去上顎前歯を使ってエナメル質を含む直径約5mmの歯片を作製し、耐水研磨紙#600、#800および#1500を用いて平坦なエナメル質面を形成した(n=10)。Er,Cr : YSGG レーザー (Waterlase MD) を用いて下表の切削条件でエナメル質平坦面を切削した。切削面に対する照射光の入射角度を90度、照射距離を3mmに設定し、各歯片のエナメル質平坦面に対して各々切削条件を変えながら9箇所を約1秒間ずつ切削した。各切削時の状況をハイスピードビデオカメラ(動き解析マイクロスコプ)で撮影した。ビデオクリップ画像上でモニタリングを行い、切削中に生じた水蒸気爆発の回数をカウントした。切削されたエナメル質の深さは表面粗さ測定器(Surfcom 470A)で測定した。得られた結果から1Hzあたりの切削深度を算出した。対応のある2元配置分散分析を用いて統計学的解析を行い、ウォータースプレーの水と空気の各相対比率が切削深度に与える効果を検定した(p<0.05)。実体顕微鏡を用いてレーザー切削面を観察し、各実験群の代表例について微細構造をSEM観察した。

【結果ならびに考察】

ビデオクリップ画像上では各実験群の切削状況に関して大きな差は認められなかった。すべての実験群において一定の間隔で微小水蒸気爆発が発生している状況が明瞭に観察された。各実験群における測定結果を表に示す。Group 2の切削深さが最も低く、Group 4の切削深さが最も高い値を示した。2元配置分散分析の結果、ウォータースプレーの水と空気の各相対比率は切削深度に有意な効果を与えないことが明

実験群	W	Hz	% Air	% Water	切削深さ(μm):±SD
Group 1	3.0	20	70	60	10.38 ± 2.7
Group 2				70	10.51 ± 3.3
Group 3				80	9.77 ± 2.6
Group 4			80	60	9.24 ± 2.5
Group 5				70	9.68 ± 1.2
Group 6				80	8.50 ± 1.2
Group 7			90	60	9.64 ± 2.8
Group 8				70	10.22 ± 3.5
Group 9				80	9.90 ± 3.5

統計学的有意差なし(p<0.01)

らかとなった(p>0.05)。したがって、レーザーの照射出力を3.0Wに固定した上でウォータースプレーの水の相対比率を60~80%、空気の相対比率を70~90%の範囲に設定した場合、これらの切削条件はエナメル質の切削効率に有意な影響を及ぼさないことが明らかとなった。

試作 SS-OCT を用いた楔状欠損窩洞における各種修復材料の窩洞適合性の評価

昭和大学 歯学部 歯科保存学講座 美容歯科学部門¹⁾、歯科理工学部²⁾、歯科放射線学講座³⁾、
株式会社 吉田製作所⁴⁾

○水上英子¹⁾、後閑由香¹⁾、谷 千尋¹⁾、真鍋厚史¹⁾、千田真弓⁴⁾、鹿熊秀雄⁴⁾、橋本絵美³⁾、荒木和之³⁾、岡野友宏³⁾、
宮崎 隆²⁾

Evaluation of Experimental swept-source Optical Coherence Tomography (SS-OCT) on Cervical Defect Restorations
Division of Aesthetic Dentistry and Clinical Cariology¹⁾, Division of Oral Biomaterials and Technology²⁾,
Department of Conservative Dentistry and Department of Radiology²⁾, Showa University School of Dentistry, The
Yoshida Dental MFG. Co., LTD³⁾

○Eiko Mizukami¹⁾, Yuka Gokan¹⁾, Chihiro Tani¹⁾, Atsufumi Manabe¹⁾, Mayumi Chida⁴⁾, Hideo Kakuma⁴⁾, Emi Hashimoto³⁾,
Kazuyuki Araki³⁾, Tomohiro Okano³⁾ and Takashi Miyazaki²⁾

【研究目的】

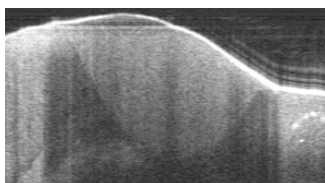
生体組織に対し透過性を持つ近赤外線を使用した光干渉断層画像装置 (Optical Coherence Tomography : OCT) は撮影対象物に侵襲を加えることなく断層画像を撮影することができる装置であり、眼科領域を中心に広く臨床応用されている。我々は株式会社吉田製作所で開発されたレーザー光源の発振波長を連続的に挿引しながら時間的にフーリエ分析する方法を採用する試作波長走査型光干渉断層画像装置 (swept-source Optical Coherence Tomography : SS-OCT) を用いて、窩洞に充填したコンポジットレジン修復部位の撮影を行った結果、コントラクションギャップの発生部位に反射光の強い像が観察出来ることで、修復物の部分脱離部位の特定が可能であることを確認し、報告した (第 136 回 日本歯科保存学会 春季学術大会)。今回我々は、試作 SS-OCT 装置の臨床応用をする目的で、ヒト抜去歯唇側面に形成した楔状欠損に対し、各種修復法を用いて充填した修復物の窩洞適合性について、SS-OCT と μ -CT を用いて観察、検討を行った。

【材料および方法】

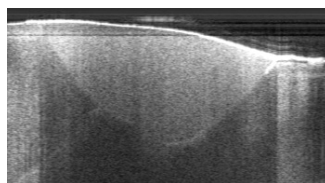
本研究では被着対象としてヒト抜去犬歯および小白歯を用い、唇・頬側面の歯頸部に長軸方向の幅約 5.0 mm、最深部の深さ約 2.0 mm、それぞれの窩壁のなす角度を 90° となるように楔状欠損窩洞を形成した (昭和大学 歯学部 医の倫理委員会 承認番号 ; 2011-016 号)。形成の完了した試片に対し、All-in-One タイプの接着システム (Xeno V[®], Densply-Sankin, Japan) を用いたコンポジットレジン修復、セルフエッチングプライマータイプの接着システム (Clearfil MegaBond, KURARAY-Noritake Dental, Japan) を用いたコンポジットレジン修復、マルチステップタイプの接着システム (E-Lize system + E-Lize Bond, Pentron, Japan) を用いたコンポジットレジン修復、および従来型グラスアイオノマーセメント (Fuji I, GC, Japan) を各々業者指示に従って用い、充填操作を完了した。コンポジットレジンを充填した試片群には Kuraray Medical 社製 Clearfil Majesty LV (A3) を用いた。試片の窩縁を形態修正および研磨操作後、24 時間室温水中に保管した。修復の完了した試片は SS-OCT を用いて中心波長 1310nm、深さ方向の分解能 13 μ m の条件下で試片の断層撮影を行った。また、同部位を島津製作所社製 卓上型マイクロフォーカス X 線 CT システム inspeXio SMX-90CT を用いて 40 kV、60 μ A の条件で同じく断層撮影を行い、SS-OCT 画像との比較検討を行った。

【成績および考察】

マルチステップタイプの接着システムを用いたコンポジットレジン修復を行った試片群では、修復物と窩壁とが密着している像が観察され、窩縁のどの部位においても反射光の変化は認められなかった。しかしながら、All-in-One タイプの接着システムを用いてコンポジットレジン修復を行った試片群では、唇・頬側窩縁部および窩洞の最深部付近で修復物と窩壁とが剥離していることを示す反射光の強い像が観察された。これらの結果より、試作 SS-OCT 装置を臨床に用いることで修復後の状態、特に象牙質接着の不備等の場所が容易に特定することができることから部分的な早期発見が可能となり、MI の基本理念とも一致していると思われ、補修修復を行う際の診断に有効であると考えられた。



マルチステップタイプ



All-in-One タイプ

防湿方法の違いが口腔内温度および相対湿度に及ぼす影響

東京歯科大学千葉病院総合診療科

○春山亜貴子, 浅見政子, 杉山節子, 杉山利子, 野呂明夫, 近藤祥弘, 亀山敦史

Influence of different dry-field technique on intraoral temperature and relative humidity.

Division of General Dentistry, Tokyo Dental College Chiba Hospital

○Akiko Haruyama, Masako Asami, Setsuko Sugiyama, Toshiko Sugiyama,
Akio Noro, Yoshihiro Kondoh, Atsushi Kameyama.

[研究目的]

臨床において、コンポジットレジンによる修復時には確実な防湿処置が必要である。しかし、隣接面を含む2級、3級、4級窩洞への修復では接触点の回復が必要なため、防湿を行う際に隣在歯を含めた複数歯の露出が必要である。本研究では、防湿方法の違いが口腔内環境にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることを目的とした。

[材料および方法]

東京歯科大学歯科衛生士専門学校に在学中の女性から、全身状態が健康で特に口腔乾燥感などなく、また下顎左側臼歯部(34~37番歯)に欠損を認めない5名(20~21歳)を対象とした。なお、本研究は東京歯科大学倫理委員会により研究内容の審査を受けた上で実施された(承認番号323号)。

測定に先立ち、測定室内の温度および相対湿度をデジタル温湿度計(Model CTH-1100, カスタム, 東京)を用いて測定し、記録した(実験前)。本研究では、以下の3群を設定した。I群(コントロール): 36番歯の頬舌側にコットンロールをそれぞれ1つずつ挿入した。II群(36番歯露出): ウレタン系シート(Roeko Flexidam non latex, Coltene/Whaledent, Langenau, Germany)にラバーダムパンチ(YDM)で穿孔し、アイボリー#56ラバーダムクランプ(YDM)および専用フレーム(Coltene/Whaledent)を用いてシートを固定した。III群(34~37番歯露出): ウレタン系シート(Roeko Flexidam non latex)にラバーダムパンチ(YDM)で4箇所穿孔し、37番歯にアイボリー#56ラバーダムクランプ(YDM)を固定後、34番歯から37番歯までの4本を露出させ、専用フレーム(Coltene/Whaledent)を用いてシートを固定した。

各群防湿開始直後にデジタル温湿度計のプロープ先端(センサー部)を口腔内に挿入、36番歯の咬合面直上1cm付近に手指で固定し、装着5分後の口腔内温度および相対湿度の計測を行った。なお、各被験者とも同日中にすべての群を行った。得られたデータは一元配置分散分析の後、TukeyのHSD Testを用いて実験前ならびに3群間の比較を行った($p<0.05$)。

[成績および考察]

測定室内の温度は $25.1\pm 0.8^{\circ}\text{C}$ であった。これに対し、口腔内で測定した群はいずれも室内温度に比べ有意に高い値を示した($p<0.05$)。なお、I~III群間には有意差を認めなかった($p>0.05$)。

測定室内の相対湿度は、 $50.7\pm 2.6\%$ であった。I群は、室内環境での相対湿度に比べ有意に高い値を示した($p<0.05$)。これに対し、II群とIII群は室内環境での相対湿度と有意差を認めなかった(II群 $p=1.000$, III群 $p=0.309$)。また、II群とIII群との間には有意差を認めなかった($p=0.276$)が、それぞれ被験者間でのばらつきが大きかった。

本研究では、防湿法の違いによる口腔内温度および相対湿度の影響を検討した。口腔内温度は室内環境より高くはなるが、防湿法の違いによる影響はないことが明らかになった。これに対し、相対湿度はI群では100%を示し、防湿効果がないに等しく、コンポジットレジンによる接着性修復に影響を及ぼすことが示唆された。複数歯の連続露出では被験者間でのばらつきが非常に大きかった。これは、露出歯が多くなることで歯とラバーシートとの隙間が増大し、結果として防湿効果が単独歯露出に比べやや低くなったものと思われた。

[結論]

本研究結果から、コットンロールによる簡易防湿には相対湿度を低下させる効果、すなわち「防湿」効果は期待できないことが明らかとなった。一方、ラバーダム防湿は室内環境に近似した相対湿度を口腔内に整備することが可能であるが、口腔内温度を低下させる効果は認められなかった。また、臼歯部に複数歯露出でラバーダム防湿を行った場合、単独歯露出の場合と同様に明らかな防湿効果が期待できるものの、その効果にはばらつきが生じる可能性があることが示唆された。

充填材料の接着における唾液混入の影響

*日歯大・生命歯・小児歯, **東京都立小児総合医療センター・歯科
○島津貴咲*, 小方清和*,**, 荻部洋行*

Influence of saliva contamination on adhesion of luting materials

*Department of Pediatric Dentistry, The Nippon Dental University School of Life Dentistry and
**Division of Dentistry, Tokyo Metropolitan Children's Medical Center
○Kisaki Shimazu*, Kiyokazu Ogata*,**, and Hiroyuki Karibe*

【目的】

歯冠修復において、唾液等が患部へ侵入するのを防ぐためにラバーダム防湿が有用である。しかし、萌出途上の歯や歯冠崩壊の著しい歯、あるいは口呼吸患者や障害者、高齢者を対象とした場合など、日常臨床では防湿が困難なケースが多い。本研究では、唾液が混入した歯面にコンポジットレジン (CR) とガラスアイオノマーセメント (GIC)、およびレジン強化型ガラスアイオノマーセメント (RMGIC) を応用し、接着強さと微小漏洩への影響について比較検討を行った。

【対象と方法】

以下の3条件で実験を行った：人工唾液未使用 (条件 I, コントロール)、人工唾液を滴下後に軽く乾燥 (条件 II)、人工唾液の液滴が残っている状態 (条件 III)。充填材料として、CR はクリアフィル AP-X (クラレノリタケデンタル) を用い、CR の接着処理材はトータルエッチングシステムのオブチボンドソロプラス (OBS ; Kerr) とセルフエッチングシステムのトライエスポンド (TSB ; クラレノリタケデンタル) の2種類を使用した。また、GIC はフジ IX GP エクストラカプセル (ジーシー)、RMGIC はフジ II LC カプセル (ジーシー) を用いた。

1) 接着強さ試験

包埋・表面研磨した牛歯のエナメル質と象牙質に、歯面処理と人工唾液による処理を施した後、CR を適応する歯には各接着処理を行った。次いで、シリコン型を用いて各充填材料を直径 2.38mm、高さ 4.0mm に築盛し、硬化後、各試料を 37°C の蒸留水に 24 時間保存した。なお、歯面処理や光照射は、必要に応じて各材料の指示書に従い行った。剪断接着強さは万能試験機を用いて、クロスヘッドスピード 1mm/1min の条件で測定した (n=10)。統計分析は、3 条件間の接着強さの比較に一元配置分散分析を用い、多重比較には Tukey の HSD 法を用いた。

2) 微小漏洩試験

牛歯に直径 3.0mm、深さ 1.5mm の窩洞を形成した。接着強さ試験に準じて歯面・唾液処理、接着処理、充填、硬化後、37°C の蒸留水に 24 時間保存した。次いで、各試料にサーマルサイクル負荷 (5-55°C、2000 回) を施した後、0.1%メチレンブルー溶液に 20 時間浸漬し、包埋・切断を行った。色素侵入の定量化は、ISO/TS 11405: 2003 に従って、スコア 0 (色素侵入無し) からスコア 3 (色素侵入が窩洞の髄室床に及ぶ) の4段階で評価した (n=7)。

【結果】

GIC と RMGIC では、エナメル質と象牙質の双方とも、唾液の混入による接着力の低下は認められなかった。一方、CR (OBS) では、エナメル質に対しては接着力の低下が認められなかったものの、象牙質に対してはコントロール (条件 I) と比較して顕著な低下を示した (条件 II、III とも $P < 0.001$)。また、CR (TSB) では、エナメル質に対しては条件 III で接着力が低下し ($P < 0.01$)、象牙質に対しては、条件 II、III ともに有意に低下した (両条件とも $P < 0.001$)。

微小漏洩試験の色素侵入中央値は、GIC と RMGIC において、すべての条件で CR (OBS, TSB) と比較して低い値を示した。最も唾液混入の多い条件 III における中央値を比較すると、GIC と RMGIC はスコア 1 (色素侵入がエナメル質に及ぶ) であるのに対し、CR (OBS, TSB) ではスコア 2 (色素侵入が象牙質に及ぶ) であった。

【結論】

GIC や RMGIC は、唾液が混入する条件でも安定した接着力を示し、口腔内環境を想定したサーマルサイクル負荷を施しても微小漏洩が少ないことが明らかとなった。ガラスアイオノマーは高いフッ素徐放能をもち、生体親和性も優れているといわれている。現在、臨床においてコンポジットレジン充填が主流であるが、防湿が困難な場合の接着力低下や、微小漏洩による二次カリエスなどを考慮し、ガラスアイオノマー充填が有用であると考えられる。

ESR 評価法によるコンポジットレジンの照射後重合 -LED 照射器の照射時間による影響-

朝日大学歯学部歯科理工学分野
○亀水秀男, 駒田裕子

**ESR study on post-polymerization of composite resin
-Effect of exposure time with LED unit-**
Department of Dental Material Science, Asahi University School of Dentistry
○KAMEMIZU Hideo, KOMADA Yuko

【研究目的】

電子スピン共鳴法 (ESR 法) は、重合に関与するラジカルを直接検出でき、その経時的な変化も観察し易い。また、非破壊的な分析も可能で、測定感度が非常に高いという利点がある。さらに、ESR スペクトルの各種パラメータから、ラジカルの定性・定量だけでなく、ラジカル周囲の状態 (レジンの硬化状態等) も解析することも可能である。我々は、光照射によってレジン中に発生する長寿命のポリマーラジカルを指標として、そのラジカル量 (濃度) から、炭素-炭素二重結合の反応率を算定する方法を検討してきた。今回、この ESR 評価法によりコンポジットレジンの照射後重合に関して、特に LED 照射器を使用したときの照射モードと照射時間による影響について検討した。

【材料および方法】

光重合型コンポジットレジンとしてクリアフィル AP-X (A2, クラレ, 以下 CR とする) を、LED 照射器としてブルーショット (松風) を使用した。CR ペースト (13.0~13.5 mg) を填入したテフロンチューブ (外径 3.0 mm, 内径 1.5 mm, 高さ 3.0 mm) を金型に挿入後、LED 照射器により 2 種類の照射モード (ノーマルとハイモード) で、所定の時間 (10, 20, 30, 40 秒間) 光照射した。光照射後、37°C の恒温槽に保管 (光遮断) した。各時間経過後 (10 分間後, 1 時間後, 24 時間後, 1 週間後) で再度光照射 (二次照射: ノーマルモード 140 秒間, ハイモード 90 秒間) して ESR 測定を行った。光照射によって増加したスペクトル強度から残留している未反応の二重結合量を算定した。光照射は、ライトガイド照射口をテフロンチューブ口から 6 mm 離して行った。照射直後の二重結合の反応率は、照射時のラジカル発生量/ラジカル最大発生量の百分率で、未反応二重結合の残留率は、二次照射によるラジカル発生量/ラジカル最大発生量の百分率で算定した。なお、ラジカル量は、ESR スペクトル (微分波形) の重積分から求めるが、ラジカル量 $\propto W^2 \cdot h$ (W : スペクトル線幅, h : スペクトル強度) において、スペクトル線幅が一定の場合、直接スペクトル強度から求めることができる。今回は、スペクトル強度から未反応二重結合の残留率の経時的変化 (後重合) について比較検討した。

【結果】

10 秒間照射の場合、光照射直後ではノーマル、ハイモードとも低い反応率 (64.9, 72.0%) を示した。このことから照射直後では、かなり多くの未反応二重結合が残留していることがわかった。未反応二重結合の残留率は、時間の経過とともに低下した。残留率の低下は後重合が進行していることを意味しており、照射後 10 分間で後重合がかなり進行していることもわかった。ただし、10 分後でもかなり未反応二重結合が残留しており、照射後 24 週間後、1 週間後でも後重合が進行していることがわかった。20 秒間照射の場合、反応率はノーマルモード、ハイモードでそれぞれ 76.6%, 85.8% だった。10 秒照射に比べて、後重合の進行程度は少なかった。30 秒間照射の場合、反応率はノーマルモード、ハイモードでそれぞれ 90%, 95.4% を、40 秒間照射の場合、それぞれ 93.8%, 98.1% を示した。すでに高い反応率であったため、後重合は少なかった。

【考察】

ESR 法によって得られた二重結合の反応率は、照射時に発生したラジカル量から直接評価しているため、試料調整の間や測定時間の間に起こる後重合の影響を受けず、本来の照射時または照射直後の値を示している。また、ESR 法は、照射直後の経時的な後重合の挙動を詳細に追跡することが可能な方法であることが示唆された。

リペア修復におけるトクヤマユニバーサルプライマーの接着性

株式会社トクヤマデンタル つくば研究所¹, 株式会社トクヤマデンタル 事業推進部²
○百々海歩¹, 平田広一郎¹, 木村幹雄², 山本博将¹

Adhesive properties of the Tokuyama Universal Primer in prosthetic repair

Tsukuba Research Laboratory, Tokuyama Dental¹,

Corporate Marketing Department, Tokuyama Dental²

○Ayumi Dodomi¹, Koichiro Hirata¹, Mikio Kimura², Hiromasa Yamamoto¹

【目的】トクヤマデンタルは、2012年7月各種被着体（貴金属・卑金属・セラミックス・フィラー含有レジン）に対して接着性を向上させる新規補綴物プライマー「トクヤマユニバーサルプライマー（UP）」を開発・上市した。

ポーセレン前装冠の破折修復や歯肉退縮による前装冠マージ部の修復（リペア修復）では、ポーセレン、金属、歯質の混合面にコンポジットレジンを接着させる。このような場合、これまでの各被着体の専用プライマーでは、混合被着面の各種材料に対するプライマーを何度も同じ場所に塗布しなくてはならず、操作が煩雑であった。これに対しUPは、一回の処理で各種被着体への接着性を向上させることができるメリットから、前記課題の解決が期待される。そこで本研究では、UPのリペア修復への応用の可能性を探るため、UP及び既存の専用プライマーである「メタルタイト（MT）：トクヤマデンタル」、「トクソーセラミックスプライマー（TCP）：トクヤマデンタル」と、1液1ステップボンディング材「トクヤマボンドフォース（BF）：トクヤマデンタル」を組み合わせた場合の接着強度の比較を行った。また、ボンディング材の種類による影響を確認するために、UPと各種ボンディング材（2液1ステップボンディング材「ワンナップボンドFプラス（OBF）：トクヤマデンタル」、3液2ステップボンディング材「トクソーマックボンド2（MB2）：トクヤマデンタル」、ウェットボンディング材「excite F（EF）：ivoclar vivadent」）を組合せた場合の接着強度を評価した。

【材料と方法】被着体として、金バラ（キャストマスター12S：トクヤマデンタル）、床用コバルトクロム（アイクローム：トクヤマデンタル）、ハイブリッド硬質レジン（パールエステ：トクヤマデンタル）、歯科用陶材（VMK68：VITA）、ジルコニア（TZ-3Y-E：東ソー株式会社）及び、ウシ下顎前歯のエナメル質と象牙質を使用した。

各種被着体を#600の耐水研磨紙で研削し水洗した。次に、直径3mmの両面テープを貼付し、UPの推奨方法に従い、又は、重ね塗りした場合を想定しTCP処理後にMT処理（TCP→MT）した。次いで、BF、OBF、MB2、EFの推奨方法に従い被着体を処理し照射した。その後、直径8mmのワックスシートを両面テープに貼付し、そこにエステライトΣクイック（トクヤマデンタル）を充填後照射し硬化させた後、ワックスシートを取り外し、エステライトΣクイックの硬化体上に直径8mmのアタッチメントをビスタイト2（トクヤマデンタル）で接着させたものを接着試験サンプルとした。これら試験サンプルは37℃水中に24時間保管後に、万能試験機を用いてクロスヘッドスピード1.0mm/minの条件で引張り試験を行った（n=8）。

【結果と考察】各被着体に対しUPはTCP→MTと比較し同等以上の接着強さを示した。一方、各種ボンディング材との組合せによる接着強さの評価から、UPはいずれのボンディング材に対しても高い接着強さが得られており、ボンディング材の種類による接着への影響は低いと考えられた（図1）。

【結論】各種ボンディング材との組合せにおいて各種被着体に対し高い接着性を示す材料であるUPは、リペア修復における補綴物用のユニバーサルプライマーとして使用できる材料であり、各種混合被着面を一括処理できるため接着のテクニクエラーが少なくなり、臨床において有用な材料であると言える。

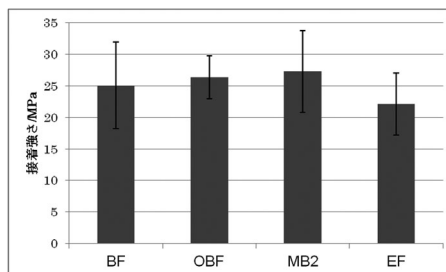


図1. 各種ボンディング材とUPを組合せた接着強さ（被着体：歯科用陶材）

ワンステップボンディング材の歯質脱灰能に関する研究

日本大学松戸歯学部保存修復学講座¹, 日本大学松戸歯学部生体材料学講座²
○藤田(中島)光¹, 岩井仁寿¹, 岡田珠美¹, 鈴木英明¹, 西山典宏², 池見宅司¹

Etching Efficacy of Tooth Component by one step-bonding adhesives
Department of Operative Dentistry¹, Department of Dental Biomaterials²,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○FUJITA (NAKAJIMA) Kou¹, IWAI Hiroto¹, OKADA Tamami¹, SUZUKI Hideaki¹, NISHIYAMA Norihiro²,
IKEMI Takuji¹

【目的】

近年、接着操作の簡便化を図る目的で、ワンステップボンディング材が開発され、臨床応用されている。また、それ以上の確実な接着性能を発揮させるために改良も進められている。しかし、ボンディング材に配合されている酸性モノマーと歯質との相互作用の詳細については不明な点が多い。

本研究では、ワンステップボンディング材に配合されている酸性モノマーと歯質との相互作用の詳細について検討することを目的とし、3種類のワンステップボンディング材とハイドロキシアパタイトあるいは象牙質とを相互作用させ、ボンディング材の上澄み液の¹³C NMR スペクトルを測定し、ハイドロキシアパタイトまたは象牙質のカルシウム塩の生成量がエナメル質および象牙質のレジンの圧縮剪断接着強さに及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

カルシウム塩の生成量の測定: 各種ワンステップボンディング材(クリアフィルトライエスボンド(クラレ), G-BOND PLUS (GC), BOND FORCE(トクヤマデンタル))に2.00 g中にハイドロキシアパタイト粉末(HA200, 太平化学)または切削したウシ歯冠象牙質粉末を0.40 gを懸濁し、10分間振盪・攪拌した。その後、これらの懸濁液を遠心分離し、ボンディング材上澄み液の¹³C NMR スペクトルを測定した。なお、NMRの測定にはEX 270 スペクトロメーター(日本電子)を用いた。得られたNMRスペクトルから、ボンディング材にリン酸エステル系モノマーとして添加されているモノマーのビニル基メチレンカーボンに帰属されるNMRピークとTEGDMA(トリエチレングリコールジメタクリレート)分子内ビニル基メチレンカーボンのNMRピークに対する相対強度を求め、その強度変化から歯質成分の脱灰により生成されたカルシウム塩の生成量を算出した。

接着試験: ウシ前歯抜去歯の唇側エナメル質を#1000シリコーンカーバイトペーパーにて研磨し、新鮮なエナメル質および象牙質を露出させた後、試料片を埋没した。内径3.2 mmの穴の開いた両面テープを貼付け、その内面をワンステップボンディング材で20秒間処理後、3秒間強圧エアブローを行い、10秒間光照射し、内径3.2 mmのシリコーンリングを固定し、コンポジットレジンを充填し光照射(20秒間)を行い、試験体を作製した。その後、24時間37℃水中保管後、インストロン型万能試験機で、クロスヘッドスピード1.0 mm/minにて圧縮剪断接着強さを測定した。

【結果および考察】

各種ワンステップボンディング材の¹³C NMRスペクトル溶液を測定した結果、¹³C NMRピークは、クリアフィルトライエスボンドおよびG-BOND PLUSにハイドロキシアパタイトまたは象牙質を添加し、両者を相互作用させると、MDPのビニル基メチレンに帰属されるNMRピークの相対強度は減少し、その減少率はハイドロキシアパタイトで16.3-22.0%、象牙質では63.5-66.0%であった。これは、MDPが歯質アパタイトを脱灰し、ボンディング材に不溶性のカルシウム塩を生成して析出したためと考えられる。またMDPはハイドロキシアパタイトより象牙質を強く脱灰することがわかった。それに対しBOND FORCEは、¹³C NMRスペクトル上、ビニル基メチレンに帰属されるNMRピークに変化は見られなかった。

エナメル質接着試験において、クリアフィルトライエスボンドおよびG-BOND PLUSのカルシウム塩の生成量がBOND FORCEより増加しても接着強さは約16MPaと同じ値を示し、象牙質接着は、カルシウム塩の生成量の多いクリアフィルトライエスボンドおよびG-BOND PLUSは約16MPa、BOND FORCEの接着強さは、約12MPaを示した。

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

ピロリドンカルボン酸による象牙質コラーゲンの分解抑制、 および象牙質の脱灰抑制に関する検討

ライオン株式会社 研究開発本部 オーラルケア研究所
○藤川晴彦、井上志磨子、竹内祥訓、福田 康、山本高司

Effects of pyrrolidone carboxylic acid on collagen degradation and demineralization
Oral Care Research Laboratories, Research & Development Headquarters, Lion Corporation
○FUJIKAWA Haruhiko, INOUE Shimako, TAKEUCHI Yoshikuni, FUKUDA Yasushi, YAMAMOTO Takashi

【背景・目的】

近年、歯周病罹患や加齢により歯肉が退縮し、その結果露出する歯根面のう蝕増加が懸念されている。歯根面う蝕の発症部位である象牙質には、コラーゲンを主とする有機質が約20%含まれており、物理/化学的に脆弱な象牙質の脱灰に加え、口腔内のコラゲナーゼが象牙質コラーゲンを分解することにより、歯根面う蝕が進行すると考えられている。従って、歯根面う蝕の予防には、象牙質コラーゲンの保護と、象牙質の脱灰抑制の両面が重要である。本研究では、グルタミン酸の分子内縮合化合物であるピロリドンカルボン酸（以下、PCA）の象牙質コラーゲンの分解抑制および象牙質の脱灰抑制効果を評価し、PCAの歯根面う蝕予防に関する有用性を検討した。

【材料および方法】

<実験1：象牙質コラーゲンの分解抑制評価（n=6/群）>

- 1) 材料：脱灰液浸漬によりコラーゲンを露出させた牛歯根象牙質切片（処置面：約2mm×220 μ m）
- 2) 処置剤：歯磨剤（950ppmF含有の市販歯磨剤にPCAを0、1、2、3、5%配合）の水3倍希釈液
- 3) 方法：以下、①②③順でpHサイクル試験を3サイクル実施
①象牙質切片を処置剤で3分浸漬後に水洗浄、②2U/mlコラゲナーゼ配合再石灰化液に16h浸漬、③脱灰液に5h浸漬
- 4) 評価：顕微鏡観察による消失コラーゲン深さ（ μ m）、TMR法によるミネラル損失量（vol%× μ m）・脱灰深さ（ μ m）
- 5) 解析：抑制効果に対するPCAの濃度依存性をWilliams多重比較検定（有意水準5%）

<実験2：象牙質の脱灰抑制評価（n=5/群）>

- 1) 材料：ヒト臼歯の象牙質ディスク（処置面：約2mm×2mm）
- 2) 処置剤：歯磨剤（950ppmF、3000ppmF、950ppm+PCA5%）の水3倍希釈液
- 3) 方法：象牙質ディスクを処置剤で3分浸漬・水洗浄（2回/日）し、再石灰化液に3日間浸漬後、脱灰液に6h浸漬
- 4) 評価：原子吸光度法による脱灰液への溶出Caイオン量（ μ g/ml）
- 5) 解析：950ppmF群に対する脱灰抑制効果をDunnett多重比較検定（有意水準5%）

【結果および考察】

<実験1>PCA 0、1、2、3、5%配合群の消失コラーゲン深さは、55.4、50.5、46.4、43.0、41.2（ μ m）、ミネラル損失量は、3012、2811、2417、1889、1973（vol%× μ m）、脱灰深さは、178.5、167.2、88.0、65.0、53.2（ μ m）であった。3評価項目いずれもPCA配合濃度が2%以上で有意に減少し（ $p<0.05$ ）、PCAによるコラーゲン分解抑制効果および、それに伴う脱灰抑制効果が認められた。PCAにより保護されたコラーゲンが象牙質内部への酸浸透を抑制、又は象牙質内部で溶解したミネラルイオンの外部拡散を抑制したことが要因と推察する。

<実験2>象牙質ディスクから溶出したCaイオン量（ μ g/ml）は、A（950ppmF）群 51.1、B（3000ppmF）群 40.3、C（950ppmF+PCA5%）群 42.6であった。PCAを配合したC群では、高濃度Fを含有するB群と同様に、A群と比較してCaイオン溶出量が減少した（ $p<0.05$ ）。従って、PCAが脱灰抑制効果を有することが明らかとなった。

【結論】

PCAは、歯根面のう蝕予防に重要な象牙質コラーゲンの分解抑制効果と象牙質の脱灰抑制効果を併せ持つことが明らかになった。今後、歯根面う蝕予防剤への応用が期待される。

NaF と APF の根面象牙質に対する脱灰抑制効果の in vitro での比較

¹ 鶴見大学歯学部保存修復学講座, ² 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科摂食機能保存学講座 歯制御学分野
○菅原豊太郎¹, 中嶋省志², 田上順次², 桃井保子¹

In vitro comparison of NaF and APF regarding the inhibitory effect on root dentin demineralization

Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine, Cariology and Operative Dentistry, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

○SUGAWARA Toyotaro, NAKASHIMA Syozi, TAGAMI Junji, MOMOI Yasuko

【緒言】 エナメル質う蝕の予防の場合と同様に, 専門家用の高濃度フッ化物塗布剤が根面う蝕を予防することが期待される¹⁾. エナメル質の場合, フッ化物歯面塗布には中性フッ化ナトリウム(以降 NaF)とリン酸酸性フッ化ナトリウム(以降 APF)が最も広く使用されている. しかし根面う蝕において, どのフッ化物塗布剤が脱灰抑制に効果が高いのか, また塗布時間や回数などについて何も基準が定められていないようである. そこで本研究では, NaF と APF を単純に 1 回塗布した場合の脱灰抑制効果を経時的に TMR (Transversal Micro Radiography) 法で評価し, 両フッ化物の効果と比較することとした.

【材料および方法】 ウシ歯根面象牙質ブロックを樹脂包埋し, その表面を研磨して被験象牙質面(1.5×3.0 mm)を設定した. フッ化物として, NaF (フッ化ナトリウム液ネオ[®], ナルコム, 2%NaF) と APF (フルオール液歯科用[®], ビーブランドメディコ, 2%NaF) を用い, 塗布時間はメーカー指示に準じ 5 分間とした. その後, 塗布した試料を, 一定期間 (1, 3, 7, 14, 21 日間) 脱灰液 (2.2 mM: CaCl₂, 2.2 mM: KH₂PO₄, 50 mM: 酢酸, 3.08 mM: NaN₃, pH5.0) に浸漬し, 脱灰液は週 1 回新しい液に交換した. 各脱灰日数後に試料を脱灰液から取り出し, TMR 法にて脱灰深さ (LD: μm) とミネラル喪失量 (ΔZ : vol% $\cdot\mu\text{m}$) を評価した. またフッ化物を塗布しない試料 (コントロール群) についても同様に脱灰した. 各脱灰日数に対し, 10 試料を用いた. 脱灰日数と ΔZ と LD との関係は決定係数(R²)で検討した. また, ΔZ と LD をボンフェローニ多重比較 (p<0.05) で分析した.

【結果および考察】

脱灰日数の平方根に対する LD(図 1), ΔZ (図 2) の関係を示す. 両者とも, いずれの群においても LD と ΔZ は経時的に増加し, 強い直線性を示した (R²:0.8557~0.9776). コントロール群と比べて, フッ化物塗布群で LD および ΔZ は有意に小さかった. 21 日目においてコントロール群に対する各塗布群の脱灰抑制率を算出したところ, NaF では LD で 25.4%, ΔZ で 39.2%, APF では LD で 69.4%, ΔZ で 82.0% で

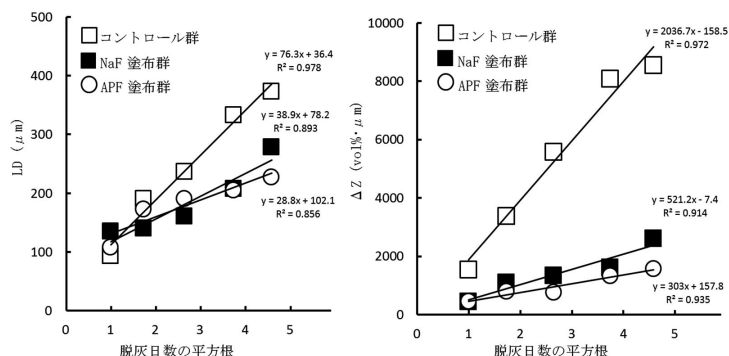


図1 LDと脱灰日数の平方根

図2 ΔZ と脱灰日数の平方根

あった. 過去のエナメル質におけるものよりも高い脱灰抑制効果があらわれたのは, 象牙質の空隙率(約 20%)がエナメルと比較して高いこと, 象牙質アパタイトが F イオンと反応しやすいことによる推察された. また, NaF, APF のミネラルプロファイルについて経時的推移を評価したところ, 脱灰日数が増加するとともに, 表層のミネラル密度が上昇し, 典型的な表層下脱灰のプロファイルが認められた. しかしながら, そのような表層下脱灰の形成はコントロール群では認められなかった. 今後このような基礎実験を積み重ね, 根面う蝕の予防に関するフッ化物塗布法の確立の一助とする.

【結論】 APF および NaF に高い脱灰抑制効果が認められ, NaF より APF では脱灰抑制率が大きくなる傾向にある. また両塗布剤とも, 21 日間という過酷で連続的な脱灰条件でも高い脱灰抑制効果を維持したことから, 1 回塗布でも効果が持続する可能性が示唆された.

【参考文献】 1) 日本歯科保存学会編: う蝕治療ガイドライン 永末書店 京都 2009

Er:YAG レーザー照射象牙質におけるレジン接着に関する研究
第1報 レジン添加型グラスアイオノマーセメントの接着強さについて

愛知学院大学歯学部保存修復学講座

○鶴田あゆみ、成橋昌剛、福田秀光、中野健二郎、山田三良、佐藤かおり、富士谷盛興、千田 彰

Study of Resin Bond to Er:YAG-lased Dentin

Part 1 Bond Strength of Resin-modified Glass-ionomer Cement

Aichi Gakuin University, Department of Operative Dentistry

○TSURUTA Ayumi, NARUHASHI Masayoshi, FUKUDA Hidemitsu, NAKANO Kenjiro

YAMADA Mitsuyoshi, SATOH Kaori, FUJITANI Morioki, SENDA Akira

【緒言】

レーザーを用いた無痛的う蝕除去のためには、低出力照射が望まれる。ところが、低出力でレーザー照射された象牙質面には、構造欠陥や熱変性層が形成される。そのため、レジンの接着性が阻害され、回転切削器具で形成された象牙質面におけるレジンと同等の初期接着性や接着耐久性を期待するには問題がある(第108、109回日本歯科保存学会)。そこで、低出力照射後、中出力で同一部位にフィニッシング照射すると、構造欠陥や熱変性層が除去され低下していたレジンの接着性が有意に回復することを見出した(第19回日本レーザー歯学会, 2007)。一方、Er:YAG レーザー照射された象牙質面に対するレジン添加型グラスアイオノマーセメント(RMGIC)の接着性は良好であることが報告されている(峯ら、第17回日本レーザー歯学会, 2005)。しかし、出力の違いによる接着強さの変化や破壊形態を含めたレジンの接着性の詳細な検討はなされていない。そこで本研究は、低出力レーザー照射象牙質における安定したレジンの接着性獲得を目的とし、フィニッシング照射された象牙質面に対するRMGICの接着強さについて検討した。

【材料および方法】

新鮮抜去ウシ前歯の唇側歯頸部に平坦面(#600)を調製し、先端出力50mJ(低出力照射)、150mJ(中出力照射)および50mJ照射後150mJで追加照射(フィニッシング照射)の照射条件にてEr:YAGレーザー(アーウィンアドバール、モリタ)を照射し(1パルス、接触照射、注水下)、レーザー照射面とした。また、レーザー非照射象牙質をコントロール(Cont)とした。これらの面に、①G群:Gボンドプラス(ジーシー)、②FL群:セルフプライマー(ジーシー)/フジライニング(ジーシー)および③FLB群:セルフプライマー/フジライニングボンドLC(ジーシー)の各処理を施し、クリアフィルAP-X(クラレノリタケデンタル)を充填して、37°C蒸留水中24時間保管後、各群の接着強さを微小引張り試験により検討した。得られた測定値はStudent's *t*-testを用いて統計処理($p=0.05$)を施した。また、破断面の破壊形態を実体顕微鏡にて観察し、さらに、同様に調製された試片を用い、接合界面のSEM観察を行った。

【結果および考察】

いずれの群においても、低出力照射された象牙質に対するレジンの接着強さは、Contに比し有意に低い値を示した。一方、G群では、中出力照射あるいはフィニッシング照射した場合の接着強さは、低出力照射の場合に比し有意に高かったが、Contと比較すると有意に低かった。ところが、FL群およびFLB群の中出力照射あるいはフィニッシング照射した場合の接着強さは、Contに比し有意差はなかった。破壊形態については、G群では、界面剥離およびレジンと象牙質の混合破壊がほぼ同数認められ、一方FL群およびFLB群では、RMGICと象牙質の混合破壊が多かった。また、接合界面のSEM像では、レジンと象牙質の接合状態はいずれの群においてもすべて良好であったが、界面直下の象牙質には構造欠陥および熱変性層が認められた。これらの結果より、レーザー照射された象牙質面に対するレジンの接着性は、充填された材料の機械的諸性質ならびにレーザー照射により生じた構造欠陥や熱変性層の影響を大きく被ることが明らかとなった。したがって、低出力レーザー照射された象牙質面における安定したレジンの接着性を獲得するためには、フィニッシング照射などによりこれらを完全に除去する必要性のあることが明らかとなった。

【結論】

Er:YAGレーザーにより低出力照射された象牙質面に対するRMGICの接着強さは、非照射象牙質面におけるそれより有意に低かったが、中出力照射ならびにフィニッシング照射した象牙質面においては非照射象牙質面とほぼ同等の接着強さを示すことが判明した。低出力レーザー照射象牙質面における安定したレジン接着性獲得のためには、生じた構造欠陥や熱変性層などを除去する必要性が示唆された。

市販 EDTA 処理剤を用いた象牙質スメア一層の除去効果
昭和大学 歯学部 歯科保存学講座 美容歯科学部門¹⁾ 歯科理工学部門²⁾
○後閑 由香¹⁾、水上 英子¹⁾、谷 千尋¹⁾、真鍋 厚史¹⁾、宮崎 隆²⁾

Effect of Removing the Dentin Smear Layer by using Commercial EDTA Conditioner
Division of Aesthetic Dentistry and Clinical Cariology¹⁾, Division of Oral Biomaterials and
Technology²⁾, Department of Conservative Dentistry, Showa University School of Dentistry
○Yuka Gokan¹⁾, Eiko Mizukami¹⁾, Chihiro Tani¹⁾, Atsufumi Manabe¹⁾ and Takashi Miyazaki²⁾

【研究目的】

コンポジットレジン修復の完全な窩洞適合性を獲得するためには、ボンディング材の塗布に先立ち、エナメル質窩壁ではリン酸処理のみが要求されるのに対して、象牙質窩壁ではスメア一層の除去とプライミングの2段階の処理が必要となる。これらの前処理によって象牙質とエナメル質は近似した物理化学的な性状に整えられ、デンティンボンディング材は一つの窩洞でエナメル質、象牙質双方の窩壁に同一のメカニズムに基づいて接着すると推測することができる。通常、齶蝕除去を行った歯面はスメア一層に覆われており、これらはコンポジットレジン歯質に接着する際に阻害因子として働くことが確認されている。我々はこれまでに、象牙質においてはこれらスメア一層に対し、0.5mol/L、pH7.4に調整されたEDTAを用いることで歯質内のCa濃度を低下させることなく確実に除去することが可能であると報告してきた。このほど、Ultradent社より根管治療時に石灰化の進行した根管壁を軟化する目的で18%濃度のEDTA処理剤が市販された。今回我々はこの市販EDTA処理剤をコンポジットレジン修復時に歯面を覆っているスメア一層の除去に応用した際の歯面処理効果について、走査型電子顕微鏡による処理面の微細構造の観察を行い、従来からデンティンコンディショナーとして用いられている市販EDTA溶液と比較検討を行った。

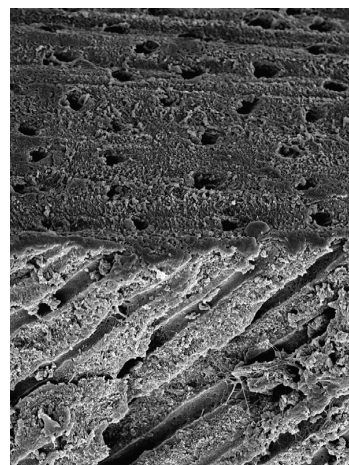
【材料および方法】

本研究は昭和大学 歯学部 医の倫理委員会(承認番号; 2011-016号)の承認を得て行った。ヒト抜去臼歯隣接面エナメル質を除去し象牙質平面を露出させ、耐水研磨紙600番を用いて象牙質平面にスメア一層の形成を行った。対象歯面に対し、Ultradent社製18%EDTA処理剤を60秒間適用し、処理を行った。EDTA処理後、水洗乾燥し、室温水中に24時間浸漬した。処理の完了した試片は、処理面に対し垂直に切断し、通法に従いアルコール上昇系列で脱水後、臨界点乾燥および白金パラジウムを用い試片の蒸着を行った。調整の完了した試片を日立社製走査型電子顕微鏡(S-4700, HITACHI, Japan)を用いて、EDTA処理面および切断面にみられる象牙細管内のスメア一層除去の状態を微細構造とともに観察を行った。また、コントロールとして完全なスメア一層除去効果を有する市販コンディショナー(E-Lize Conditioner, Pentron, Japan)を業者指示の通りに用いて処理を行った試片を調整した。

【結果および考察】

走査型電子顕微鏡で観察した結果、E-Lize Conditionerを用いてスメア一層を除去した試片では、象牙質表層を覆っているスメア一層は完全に除去されている像が観察された。また、細管内のスメア一層については一部残存している像が観察された。18%濃度のEDTA処理剤を用いてスメア一層を除去した試片では、象牙質表層のスメア一層が完全に除去されている像が観察された。また、細管内のスメア一層についても、殆どの細管で除去されている傾向が確認できた。

今回用いた市販歯面処理剤は、いずれも歯面表層を覆っているスメア一層の除去が完全に行えることが確認できた。18%濃度のEDTAについては根管形成時に石灰化した歯質を軟化する為に用いられているが、コンポジットレジン修復時にも応用する事が出来る可能性が示唆された。今後、処理面に対するコンポジットレジンの接着性能を含め、詳細に検討を行っていく予定である。



18% EDTA 処理を行った試片

う蝕象牙質硬さ測定システムを用いた感染象牙質の除去

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⁾

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座²⁾

○日下部修介¹⁾, 玄 太裕¹⁾, 細川好美¹⁾, 杉浦貴子¹⁾, 清水明彦²⁾, 堀田正人¹⁾

Removal of Infected Dentin Measured by Hardness Testing System for Carious Dentin

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

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine²⁾

○KUSAKABE Shusuke¹⁾, GEN Taiyu¹⁾, HOSOKAWA Yoshimi¹⁾, SUGIURA Takako¹⁾,
SHIMIZU Akihiko²⁾, HOTTA Masato¹⁾

【研究目的】

現在の齲蝕治療は、エアータービンにて齲窩を開拡した後、硬さ、着色、齲蝕検知液による染色性等を指標として齲蝕象牙質の感染層を低速のラウンドバーやスプーンエキスカベーターで除去している。齲蝕治療の教育においても、学生に齲蝕象牙質の感染層を残存させるべきではないことは周知徹底しているが、学生にとって理解することは難しく、歯科医師でも除去時の硬さや着色だけで判断することがあり、客観性に欠ける。う蝕象牙質硬さ測定システム・カリオテスターは圧子を一定の荷重(150gf)で齲蝕象牙質に押し込み、その距離(μm)を計測し、ヌープ硬さに換算するものであり、齲蝕象牙質の硬さを数値化し、チェアサイドでも応用できるシステムである。そこで今回、C₂程度の齲蝕を有するヒト抜去歯を用い、エキスカベーター、ラウンドバーを使用し、齲蝕検知液を併用して感染象牙質を除去した場合の象牙質の硬さをカリオテスターにて測定し、歯学部学生と医員が行った場合を比較検討したので報告する。

【材料および方法】

1. 被験者および実験前準備

被験者は保存修復学基礎実習を終了した朝日大学歯学部3年生の学生7名と臨床経験が3年～5年の医員7名である。

実験を行う前に、医員および学生に対してカリオテスターについての説明を行い、適切に使用できるように、特に適切な荷重150gfをかけることができるように秤を用いて練習を行った。また、学生に対しては授業の復習として齲蝕の概要についての講義を行った。

2. 実験材料

予めエアータービンにてう窩の開拡を終了させたC₂程度の齲蝕を有するヒト新鮮抜去歯を用いた。本実験で使用した抜去歯は、朝日大学歯学部倫理委員会の承諾(受付番号23112)を得たものである。齲蝕象牙質の硬さの測定にはカリオテスター(三栄エムイー)を使用した。

3. 実験方法

まず齲蝕象牙質除去前の硬さを測定した[コントロール]。その後、術者(学生および医員)の主観により齲蝕象牙質の感染層を除去し、その時の硬さを測定した[A群]。また、齲蝕検知液(カリエスチェック、ニシカ)を用いて齲蝕象牙質を染色し、メーカーの指示通り検知液が染まらなくなるまで感染層を除去し、硬さを測定した[B群]。これらの操作は、①エキスカベーターのみ使用、②ラウンドバーとエキスカベーターを併用して使用し、1人の術者が10か所の齲蝕象牙質に対して行った。なお、齲蝕表層部などでヌープ硬さが6以下に軟化した象牙質においては、硬さが表示されず、圧子の押し込み深さのみの表示となるので、本研究では押し込み深さ(μm)で比較することとし、必要に応じてヌープ硬さ(KHN)に換算した。得られた値から平均値を求め、二元配置分散分析(ANOVA)と多重比較検定(FisherのPLSD)を用いて有意差検定(p<0.05)を行った。

【結果および考察】

押し込み深さの平均値は、コントロールは①では学生が224.0μm、医員が223.1μm、②では学生が212.0μm、医員が、210.1μm、A群は①では学生が66.7μm、医員が34.2μm、②では学生が47.3μm、医員が29.3μm、B群は①では学生が35.3μm、医員が26.1μm、②では学生が29.4μm、医員が23.3μmであった。

分散分析の結果、医員と学生間および齲蝕象牙質の感染層の除去方法の違い(エキスカベーターのみとラウンドバーとエキスカベーターの併用および齲蝕検知液を併用)で有意差が認められた。また交互作用は認めなかった。多重比較検定の結果、コントロールは学生と医員の間に有意差は認められず齲蝕象牙質前の硬さに違いはなかった。学生の①および②においてA群とB群に有意差が認められたものの、医員では①および②のA群とB群に有意差は認められなかった。②のA群およびB群において医員と学生に有意差は認められなかったが、①のA群において医員と学生に有意差が認められた。さらにB群の医員および学生において①と②に有意差は認められなかったが、A群の学生において①と②に有意差が認められた。

なおカリオテスターにおける齲蝕象牙質の感染層の除去の指標は硬さ20KHN以上(距離32μm以下)とされているが、ヌープ硬さに換算すると、A群の平均値は①が学生:7KHN、医員:18KHN、②が学生:11.5KHN、医員:23KHN、B群の平均値は①が学生:17.5KHN、医員:27KHN、②が学生:23KHN、医員:32KHNであった。

以上のことから、医員の方が学生よりも有意に自分の主観で感染象牙質を多く除去できるものの、感染していない齲蝕象牙質の硬さを自分の判断で除去することは医員にとっても困難であり、齲蝕検知液を使用することにより確実に感染象牙質が除去されることが確認された。またラウンドバーを用いた方がエキスカベーターのみの場合よりも有意に感染象牙質を多く除去でき、再発齲蝕の原因となる感染象牙質を残す確率は少なくなる。しかし、齲蝕検知液を用いても完全に感染齲蝕象牙質の除去を行うことが困難な学生が存在しており、学生によってカリオテスターの圧子を押し込む際の力加減、スピード等に差があるのではないかと推測している。以上より、カリオテスターは齲蝕象牙質の感染していない、再石灰化する可能性のある軟化象牙質の硬さを理解、経験するのに有用な器械であり、今後の臨床実習や歯科治療の際に役立つと思われる。

ナノシール塗布後の象牙質に対する各種修復材料の接着効果

岩手医科大学歯学部歯科保存学講座う蝕治療学分野
○岡田 伸男, 志賀 華絵, 千葉 史子, 山本 槇子, 青島 久, 工藤 義之, 野田 守

Dentin Bond Strength in Nanoseal Methods with Resin Composite and Glass-Ionomer Cement

Division of Operative Dentistry and Endodontics, Department of Conservative Dentistry,
School of Dentistry, Iwate Medical University
○Okada Nobuo, Shiga Hanae, Chiba Fumiko, Yamamoto Makiko, Aoshima Hisasi, Kudo Yoshiyuki,
Noda Mamoru

【緒言】

象牙質知覚過敏症は、齶蝕を伴わない露出した象牙質に軽微な外来刺激が加わった際に生じる一過性の誘発痛を特徴とし、日常臨床では発現頻度の高い疾患である。現在まで、象牙細管を被覆する、あるいは封鎖する方法や象牙細管内の石灰化を促進する方法が試みられてきた。今回、開発されたナノシールは簡単な操作で、歯質と反応して効果を発現し、歯肉に対して為害性がない操作性に優れた象牙質知覚過敏抑制材である。しかしながら、このナノシールによる知覚過敏症治療後に対するコンポジットレジンなどの修復処置を検討した報告は少ない。

そこで、今回我々は、ナノシール塗布後の接着効果について着目し、ナノシール塗布後の歯面に対する各種修復材料の接着力について比較検討を行った。

【材料および方法】

接着試料としては、コンポジットレジンに MI ローフロー、ソラーレ(GC)、グラスアイオノマーセメントはFuji 9 GP Extra Capsule(GC)を使用した。シェードはすべてA3とした。

被着体は、抜去後冷凍保存したウシ永久下顎前歯から採取した象牙質を耐水研磨紙#600まで研磨し、リン酸エッチングを15秒間行ったものを使用し、業者指示書に従ってナノシール(NISHIKA)を塗布した群と塗布しない群とした。

各種レジンに内径4mm高さ3.5mmのステンレスモールドを用いて積層充填し照射は40秒間行った。グラスアイオノマーセメントは、同ジグを使用、填塞し、セルロイドストリップスを介して2分30秒間圧接した。

37°Cで各24時間、3、7日水中保管および100%湿潤保管し、クロスヘッドスピード0.5mm/minにて引っ張り試験(INSTRON 4204)にて接着強さを測定した。各群の試料数は12とし、得られた値はOne-way ANOVA Student-Newman-Keuls testとt-testを用いて有意水準5%で統計学的分析を行った。

【結果】

ナノシール塗布の有無に対するコンポジットレジンとグラスアイオノマーセメントの引っ張り強さを図に示す。

各時間において、グラスアイオノマーセメントは、コンポジットレジンに比べ、有意に低い値を認めた。ナノシール塗布の有無に関しては、各時間において統計学的な有意差を認めなかった。

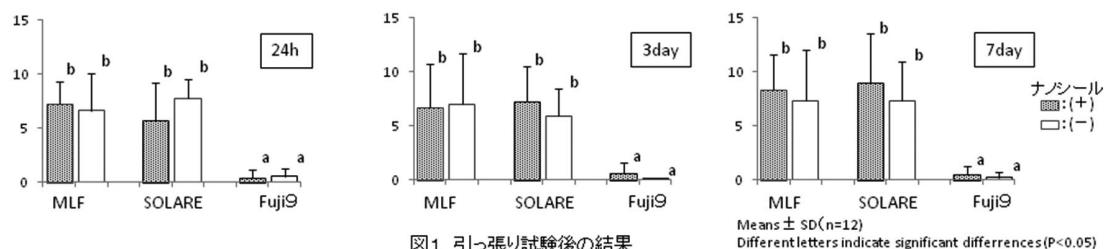


図1 引っ張り試験後の結果

【考察】

今回の結果より、ナノシールを塗布することで、コンポジットレジンおよびグラスアイオノマーの接着に変化を生じることはなかった。このことより知覚過敏症に対する治療の後に再度、新鮮象牙質を露出するような割合や処理することなく接着することが示唆された。

各種象牙質知覚過敏抑制材の象牙質透過抑制に関する研究

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体機能再生・再建学講座 歯科保存修復学分野
○清水裕久, 西谷佳浩, 星加知宏, 吉山昌宏

Study of the inhibition of dentin permeability of the dentin desensitizers
Department of Operative Dentistry, Field of Study of Biofunctional Recovery and Reconstruction
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University
○Shimizu H, Nishitani Y, Hoshika T, Yoshiyama M

【緒言】

現在、象牙質知覚過敏症の発症機構のひとつである動水力学説をもとに開発された材料で象牙細管封鎖機構が異なる2種類、つまり1液性ボンディング材の象牙質接着機構を応用し象牙細管を封鎖するレジン系材料と、シュウ酸成分と歯質に存在するカルシウム成分とから生成される結晶物により象牙細管を封鎖するシュウ酸系材料について研究・検討を行っており、象牙質知覚過敏症を模した象牙質面を作製し、その象牙質面に対して歯髄側から歯冠側へ象牙細管内に蒸留水を通過させることで各種象牙質知覚過敏抑制材を評価した内容を第59回日本歯科理工学会学術講演会で報告した。今回、象牙細管内に模擬体液(Simulated Body Fluid, 以下 SBF)を通過させることで、象牙細管内を通過する液体の違いが象牙質知覚過敏抑制材の透過抑制効果におよぼす影響を検討した。

【材料および方法】

〈象牙質知覚過敏モデル作製〉う蝕のない健全なヒト抜去大白歯をモデルトリマーおよび耐水研磨紙(#600)にて咬合面から研削し、象牙質の平坦面を作製後、その平坦面から歯根側へ低速ダイヤモンドカッター(Isomet, Buehler)にて厚さ3mmに切り出すことで象牙質板を作製した。象牙質板の歯髄側から残存する歯髄腔をガイドとして、深さ2mmの窩洞をエアタービンにて注水下で形成した。その窩洞内のスマイヤ層除去を目的として、表面処理材レッド(サンメディカル)にて30秒間エッチングを行った。エッチング後、象牙質表面のスマイヤ層除去を目的として、30分間超音波洗浄を行った。

〈使用材料〉歯科用シーリング・コーティング材であるハイブリッドコートII(サンメディカル, 以下 HC2), 歯科用知覚過敏抑制材料であるトクヤマシールドフォースプラス(トクヤマデンタル, SFP), MSコートONE(サンメディカル, 以下 MSO), スーパーシール5秒(Phoenix Dental, Inc., 以下 SS5)を使用した。

〈象牙質透過性測定〉Pashleyらが報告した象牙質透過性測定装置を作製した。処置を施していない象牙質面に、歯髄側から歯冠側へ静水圧20cmH₂Oで象牙細管内にSBFを通過させることで単位時間当たりの流量を測定した。静水圧がかかった状態で同一象牙質面上記材料をメーカー指示通りに処置し、同様の手順で流量を測定した。処置前後の流量から象牙質透過抑制率(%)を算出した。得られた結果はtwo-way ANOVA および Tukey 法を用いて有意水準5%で統計処理を行った。

【結果】

蒸留水又はSBFにおける象牙質透過性測定の結果を表1に示す。4つの材料全てにおいて、象牙細管を通過する液体の種類に関係なく象牙細管内液の移動を抑制した。蒸留水における象牙質透過抑制率は、SS5で有意に低かったが、SBFにおいては、いずれの材料においても有意差は確認されなかった。

表1. 象牙質透過抑制率 Mean(±SD)(%)

	HC2	SFP	MSO	SS5
蒸留水	68.8(10.7)Aa	60.8(5.3)Aa	61.8(23.4)Aa	39.3(17.3)Ab
SBF	63.3(15.7)Aa	51.5(12.9)Aa	65.7(18.1)Aa	54.8(23.0)Aa

大文字のアルファベットは、各列内の数値間の有意差を、
小文字のアルファベットは、各行内の数値間の有意差を表し、
同文字間には有意差がないことを表す(p>0.05)。

【考察】

全ての象牙質知覚過敏抑制材において、蒸留水およびSBF間に有意な差は確認されなかったが、レジン系材料よりもシュウ酸系材料のほうがSBFにより象牙質透過抑制の効果が高くなる傾向が見られた。この傾向は、歯質からのカルシウムイオン成分だけでなく、SBFに含まれる金属イオン成分とシュウ酸との反応物による象牙細管封鎖によるものと考えられる。

知覚過敏抑制材の象牙質透過性に及ぼす影響
東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座歯科保存学分野¹
口腔生物学講座歯内歯周治療学分野²
○山口純世¹ 兼平正史¹ 石幡浩志² FINGER W.J.¹

Effect of multiple application of dentin desensitizing agents on dentin permeability
Division of Operative Dentistry, Department of Restorative Dentistry¹, Division of Periodontology and Endodontology²,
Tohoku University Graduate School of Dentistry

○YAMAGUCHI Sumiyo¹, KANEHIRA Masafumi¹, ISHIHATA Hiroshi², FINGER Werner J.¹

Introduction

Dentin hypersensitivity (DH) is characterized by short, sharp pain arising from exposed dentin in response to tactile, evaporative, chemical or thermal stimuli. The mechanism of pain transmission from dentin to the pulp is not fully understood. According to Brännström's hydrodynamic theory external stimuli cause rapid fluid flow in the dentinal tubules, activate mechanoreceptors at the pulp-dentin interface, and provoke pain. Common strategy for DH treatment is occlusion of the patent tubules. Recently, new desensitizing agents were introduced to the Japanese market, aiming at blocking tubules by precipitation of calcium- or silicate phosphate crystals, or by precipitation of artificial hydroxyapatite.

Aim of this in vitro investigation was to evaluate the effects of two new desensitizing agents after single or multiple applications on reduction of dentin permeability.

Material and Method

Nanoseal[®] (Nano: NISHIKA) and Teethmate[®] Desensitizer (TMD: Kuraray) were investigated. Coronal dentin slices (1.4 mm) were cut from third molars and cleaned with EDTA. The desensitizer components were mixed and applied for 1 min on the occlusal side of the slices (Nano-N, TMD-N). In a second group specimens treated as above were rinsed and received 9 subsequent additional coatings (Nano-10, TMD-10). Dentin permeability was determined using a split chamber chemiluminescence method. Upon pressurizing an activator liquid from the apical side, the solution may pass through the discs to an illuminant-containing chamber and produce a luminescence reaction. The photo signal is recorded with a photomultiplier tube detector.

Permeability was determined twice under 2.5 kPa liquid pressure for 2 min and 13 kPa for 1 min, respectively, after 1 hour storage at 100% r.h. and then after 1 day, 1 week and 1 month storage in water. The area under the output voltage line during pressurizing was integrated (mV•s) and served as measure of permeability. Statistical evaluation: ANOVA and multiple comparisons at $\alpha \leq 0.05$.

Two representative specimens from each material group were fractured, Pt-sputtered and inspected by SEM.

Results

After one application, there was no or moderate reduction in permeability with both products. In contrast, repeated application of both desensitizing agents showed significantly reduced permeability. SEM photographs after single application showed opened tubuli (Nano-N), whereas TMD-N group specimens displayed a thin surface layer, bridging the tubular entrances. After 10 coatings with each desensitizer the dentin surfaces were uniformly covered (approx. 1 μ m), and plugs were detected in the tubular orifices.

Discussion and Conclusion

Single application of the suspensions is insufficient to occlude the open dentin tubuli and to reduce permeability. Ten subsequent coatings showed however significantly less permeability due to thicker precipitation layers. Element analyses on specimens cut perpendicular through the coated surface are in progress and might give a clue to understanding of the phenomena. Further trials will show, whether two or three coats only would have an appreciable permeability reducing effect.

極薄アパタイトシートを用いた象牙細管の封鎖効果についての検討

近畿大学生物理工学部¹, 大阪歯科大学歯科保存学講座²

○以西新¹, 山本衛¹, 加藤暢宏¹, 西川博昭¹, 吉川一志², 山本一世², 本津茂樹¹

Examination on sealing effect of dentinal tubule using the ultrathin hydroxyapatite sheet

Kinki University¹, Osaka Dental University²

○ISAI Arata¹, YAMAMOTO Ei¹, KATO Nobuhiro¹, NISHIKAWA Hiroaki¹, YOSHIKAWA Kazushi²,
YAMAMOTO Kazuyo², HONSTU Shigeki¹

【研究目的】

現在、象牙質知覚過敏症の治療にはレジン塗布法やレーザー照射法が用いられているが、前者は有機成分によるアレルギー反応の問題や生体への親和性の問題があり、後者はレーザーの照射出力の設定が難しく、高エネルギーだと患部の炭化が起り、低エネルギーだと効果が認められないという問題がある。象牙質知覚過敏症の理想の治療は象牙質上にハイロドキシアパタイト(HAp)で人工エナメル質を形成することが望ましいが、象牙質上にエナメル質を形成することは不可能とされ、歯科分野での永遠の課題とされてきた。我々は柔軟性を持つ極薄 HAp シートを開発し、歯質の修復・保存をオールアパタイトで行うことを試みている。本研究では、エナメル質の喪失により生じる象牙質知覚過敏症の HAp シートによる治療の実現の第一歩として、極薄 HAp シートの象牙細管の封鎖効果について検討を行ったので報告する。

【材料および方法】

石英基板上にレジンを塗布したものを HAp 薄膜作製用の基材とした。この基材上にパルスレーザーデポジション(PLD)法を用いて、これまで報告した成膜条件と同条件[1]で HAp 薄膜を成膜した。次に、薄膜と基板の中間層となるレジンを有機溶剤により溶解させ HAp 薄膜を極薄シートとして回収した。一方、ヒト抜去歯はレジンで包埋した後、歯根歯冠境界部で切断して、象牙質を露出させ#2000の耐水研磨紙で研磨した。塩酸により pH を 2.0 に調整したリン酸カルシウム水溶液を用いて HAp シートを象牙質上に貼付し、シートとエナメル質の界面を一度脱灰させた。その後、30分後と1日ごとに人工唾液を塗布して界面の再石灰化を行った。また、シートを貼付した象牙質は、象牙細管内に常に水分が供給させている状態で保管した。HAp シートの象牙質に対する固着応力は、3φの引張り治具を用いた引張り試験法により評価した。HAp シートとエナメル質との界面状況は走査型電子顕微鏡(SEM)により観察した。なお、ヒト抜去歯の使用については大阪歯科大の倫理委員会の承認を得た。

【結果および考察】

得られた HAp シートは透明かつ柔軟性があった。図 1 に象牙質上に貼付した HAp シートの 1 日後における光学写真を示す。図より、象牙質上にシートが固着している様子がわかる。図 2 にシート貼付 6 日後における固着強度を引張り試験法により測定した結果を示す。HAp シートの象牙質に対する固着応力は 3.2MPa であった。図 3 に HAp シート/象牙質界面の断面 SEM 観察結果を示す。図より HAp シートが再石灰化層を介して象牙質に隙間なく付着していることがわかる。この再石灰化層が象牙質に対して良好な接合界面として働き、象牙細管を封鎖し、象牙質知覚過敏症の治療に有用な手段になると思われる。



図 1. 象牙質上に貼付した HAp シート(1日後)

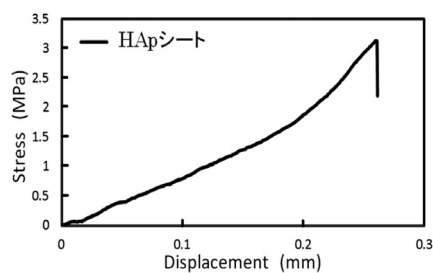


図 2. 象牙質上に貼付した HAp シートの引張り試験結果(6日後)

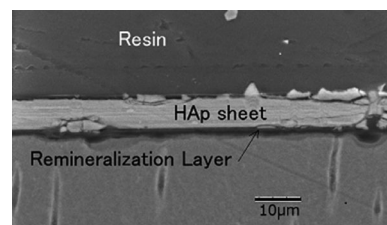


図 3. 象牙質上に貼付した HAp シートの断面 SEM 観察結果(6日後)

References

[1]S.Hontsu et al. *Key Engineering Materials*, 494-494 (2011) 615

新規モノマーCMET配合シーリングコート材の象牙質接着性への影響

北海道医療大学歯学部 口腔機能修復・再建学系 う蝕制御治療学分野
○伊藤 修一、甕 富美子、Nahid Al NOMANN、斎藤 隆史

Effect of sealing coat material including newly developed adhesive monomer CMET
on Dentin bond strengths

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

○ITO Shuichi, MOTAI Fumiko, Nomann Nahid Al, SAITO Takashi

[諸言]

レジ系知覚過敏抑制は広く使用されているが、その長期耐久性には問題がある。これまでに、歯面処理後の脱灰象牙質コラーゲンにボンディング材が浸透しないナノスペースが存在し、経時的に露出コラーゲン及びそれに接するボンディング材の加水分解が起り、接着界面の崩壊が引き起こされることが報告されている。そこで、象牙質再石灰化誘導活性を有するモノマーを配合した修復材料を開発し、それによりナノスペースが石灰化物で封鎖され、修復材料の耐久性が向上することを期待した。

本研究では、新規モノマーである 4MET-Ca (calcium 4-methacryloxyethyl trimellitate ; 以下 CMET) をハイブリッドコート (サンメディカル, 以下 HC) に配合したシーリング・コート材を試作し、その接着性及び石灰化の可能性について検討した。

[材料と方法]

1. 微小引張試験 ヒト抜去大白歯16本を用いた。歯冠部中央を歯軸に対して垂直に切断し、象牙質を露出させ研磨、洗浄を行った。HCに0%, 1.5%CMET を配合したものをそれぞれ歯面処理し、コンポジットレジンで築盛、硬化させて試料を作成した (HC群, CMET群)。得られた試料を切り出し、37°C水中保管した。24時間後、3ヶ月後、6ヶ月後、2年後にランダムに選択した15個の試料を用い、万能試験機 (EZ-test, Shimazu) を用いて微小引張接着強さの測定を行った。測定値は Mann-Whitney検定を用い、有意水準5%にて統計処理を行った。

2. 粘弾性の測定 HC の光重合未配合品、及びそれに CMET を 1.5%添加したものを作成し、アセトンを留去して静置し、下層を試料とした (HC 群, CMET 群)。これらの試料を HAAKE MARKIII (Thermo Scientific) を用いて、ずり速度 0.01~1rad にて粘弾性を測定した。

[結果および考察]

CMET 群における接着強さは 24 時間後 41.8±4.0MPa, 3 ヶ月後 34.0±7.8MPa, 6 ヶ月後 27.9±7.0MPa, 2 年後 22.6±8.2MPa であり、HC 群は 24 時間後 30.9±8.7MPa, 3 ヶ月後 28.7±7.9MPa, 6 ヶ月後 19.8±10.1MPa, 2 年後 13.5±7.4MPa であった。24 時間後、6 か月後、2 年後において CMET 群が有意に高い値を示した ($p<0.05$)。

粘弾性の測定において、HC に CMET を加えることにより、粘弾性が上昇した。また、HC 群はずり速度を上げて粘弾性がほとんど上昇せず、CMET 群は 0.05rad まではあまり変化が認められないが、その後急激に粘弾性が低下した。また、CMET 群の 2 回目の測定では、1 回目に比べて粘弾性が低下した。歯面へのボンディング材の通常操作にはエアブローが必須であるが、粘弾性の向上は塗布、エアブロー後の歯面へのボンディング材の残留量に影響を及ぼした可能性がある。また、CMET は予備実験で、4MET にカルシウムが分子内で結合している場合と、CMET 同士がカルシウムを介して弱い分子間結合をしている場合が混在することがわかっている。CMET 群は低剪断領域で粘度変化の少ない領域が確認された。また、CMET 群の繰り返し測定を行った場合、1 回目に比べて 2 回目は粘弾性が低下した。このことは、CMET が分子間で弱い網目構造を形成しており、低変位では網目構造は壊れないが、高変位では壊れたのではないかと推察された。

HC に CMET を加えることにより、粘弾性が上昇し、象牙質接着性が向上したと推察された。

[結論]

CMET 配合コート材は象牙質接着界面の耐久性に優れ、長期に渡り象牙質知覚過敏抑制作用を発揮する可能性が示唆された。

**石灰化促進作用を有する機能性フィラー含有レジン系覆髄材の開発
—機能性フィラー含有量がレジン系覆髄材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
○川嶋里貴¹⁾、鈴木雅也²⁾、有田祥子¹⁾、高田真代¹⁾、加藤千景²⁾、平賢久³⁾、新海航一²⁾

**Development of a new pulp-capping adhesive resin contained calcification promoting filler
- The effect of filler contents on the dentin bond strength of a new adhesive resin -**

○KAWASHIMA Satoki¹⁾, SUZUKI Masaya²⁾, ARITA Shoko¹⁾, TAKADA Mayo¹⁾, KATO Chikage²⁾, TAIRA Yoshihisa³⁾, SHINKAI Koichi²⁾

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

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

³⁾Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital

【研究目的】

S-PRG フィラーは、多機能性ガラス、グラスアイオノマー相および表面改質層の3層からなり、Na、Al、Si、F、Sr および B の6種類のイオンを徐放するという性質がある。Sr や B は石灰化促進作用を有することから、S-PRG フィラーを配合した接着性レジンに直接覆髄材として応用できる可能性がある。本実験では、試作したデュアルキュア型ワンステップアドヒーズシステムの S-PRG フィラー含有量が象牙質の微小引張接着強さに及ぼす影響について評価した。

【実験方法】

ヒト抜去大白歯の咬合面に、耐水研磨紙 #120～#600 を用いて平坦な象牙質面（各実験群につき5歯）を形成し、透明アクリルチューブ（内径6mm、高さ3mm）を固定した。使用材料と実験群を表1に示す。S-PRG フィラーの含有量が異なる4種類のボンドA（S-00A、S-13A、S-27A、S-40A）とボンドBを各1滴ずつ混和皿に採取し、マイクロブラシで十分に攪拌後、被着面に塗布した。20秒間放置後エアブローを行い、キャンデラックス（morita）を用いて10秒間光照射を行った。コントロールとしてフルオロボンドシェイクワン（shofu）を用いた。その後、ビューティフィル フロープラス F03（A3、shofu）を厚さ約1mm塗布し、20秒間光照射、次いでビューティフィルII（A3、shofu）を約2mm積層し40秒間光照射を行った。接着試料は、恒温恒湿器中（37℃、相対湿度95%）に24時間保管後、アイソメット（buehler）により象牙質接着界面の断面積が1mm²となる角柱型ビームを作製した（n=20）。ビームは微小引張試験用治具（Bencor-multi-T 試験器：Danville Engineering）に取り付け、小型卓上試験機 EZTest 500N（shimadzu）を用いて、クロスヘッドスピード0.5mm/minで微小引張接着試験を行った。得られたデータは一元配置分散分析後、Tukey法による多重比較検定で実験群間の有意差を検定した（p<0.05）。また、各試料の接着破壊様式を実体顕微鏡 EZ4D（leica）にて判定し、走査型電子顕微鏡 S-800（hitachi）を用いて接着界面を観察した。

【結果および考察】

微小引張接着強さの測定結果を表1に示す。試作接着性システムのなかでは、S-PRG フィラー含有量が最も多い Group 4 が最も高い接着強さを示した。Group 2 のみ、コントロールより有意に低い象牙質接着強さを示した（p=0.012）。

【結論】

S-PRG フィラー含有量の異なる試作デュアルキュア型ワンステップアドヒーズシステムを用いて微小引張接着強さ試験を行った結果、Group 2 を除いて Control と同等の微小引張接着強さを示したことから、S-PRG を40%含有する Group 4 がレジン系覆髄材として最も有効と考えられる。

表1 微小引張接着強さ

実験群	接着システム	MPa (mean±SD)
Group 1	S-00 A (S-PRG : 0%) + ボンド B	13.5±5.0 ^{ab}
Group 2	S-13 A (S-PRG : 13%) + ボンド B	12.8±3.7 ^a
Group 3	S-27 A (S-PRG : 27%) + ボンド B	14.2±4.0 ^{ab}
Group 4	S-40 A (S-PRG : 40%) + ボンド B	15.1±6.1 ^{ab}
Control Group	シェイクワン ボンド A+ボンド B	17.6±3.5 ^b

同一文字は有意差なし（p>0.05）

S-PRG フィラー配合試作レジンセメントのフッ素徐放性

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 生体機能再生・再建学講座 歯科保存修復学分野
○横山章人、塩出信太郎、山路公造、西谷佳浩、吉山昌宏

Fluoride release of experimental resin cement containing S-PRG filler

Department of Operative Dentistry, Field of study of Biofunctional Recovery and Reconstruction,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science
○Akihito Yokoyama, Shintaro Shiode, Kozo Yamaji, Yoshihiro Nishitani and Masahiro Yoshiyama

【研究目的】

Surface reaction-type Pre-Reacted Glass-ionomer (S-PRG)フィラーは各種イオンの徐放性を有することが知られており、合着用セメントへ配合することで二次う蝕の抑制が期待される。その一方で、S-PRG フィラーを構成するガラスアイオノマー相は水和ゲルとなっており、S-PRG フィラーの配合量が増加することによりレジンセメントの機械的性質の低下が危惧される。そこで本研究では、S-PRG フィラー配合レジンセメントを試作し、S-PRG フィラーが最も効果的に作用する配合率を検討することを目的として、S-RPG フィラーの配合率によるフッ素徐放性への影響をフッ素徐放量、フッ素リチャージ量の測定により評価することとした。

【材料および方法】

試作レジンセメントとしてフルオロアルミノシリケートガラス(FASG)フィラーを 68.5wt%含有した UDMA ベースのレジンセメント及び FASG フィラーを S-PRG フィラーで 5、10、15、20、25、30wt% ずつ置換したものを作製し、S-PRG フィラーが含まれていないものを RCPRG-0、以降配合量が少ないものから RCPRG-1,2,3,4,5,6 とした。

フッ素徐放量の測定は、高さ 1mm、直径 15mm の円盤状の試料を作製し、この試料を 37℃、2ml の脱イオン水に浸漬し、1、2、3、7、14 以降 7 日ごとに 6 ヶ月間新しい脱イオン水と交換し、浸漬液中に溶出したフッ素イオン量を測定した。フッ素リチャージ量の測定は、同様に作製した試料を 1、2、3、4、5、6、7 日目に浸漬液の交換とフッ素イオン量の測定を行った。7 日目のフッ素イオン量の測定後、試料を 1,000ppm のフッ化ナトリウム水溶液中に 5 分間浸漬し、脱イオン水中で洗浄し脱イオン水中に浸漬した。再び 8、9、10、11、12、13、14 日目にフッ素イオン濃度を測定した。上記の方法で測定した群をリチャージ(+)群とし 7 日目のフッ素リチャージをしなかった群をリチャージ(-)群とした。リチャージ(+)群のフッ素イオン量の総和とリチャージ(-)群のフッ素イオン量の総量の差をリチャージ量とした。統計分析は、フッ素徐放量の測定では one-way ANOVA と tukey's test を用いた。フッ素リチャージ量の測定では回帰分析を用いた。

【結果および考察】

フッ素徐放量は S-RPG フィラーの配合率の増加に伴い増加した。最初の 14 日間で 6 ヶ月間に徐放されたフッ素のうち RCPRG-0 では 24%、RCPRG-6 では 43%のフッ素イオンが徐放していた。S-PRG フィラー配合率と徐放されたフッ素イオン量の間には強い相関が認められた($R=0.97$)。RCPRG-0 と比較し RCPRG-3、4、5、6 で有意に多くのフッ素を徐放した($p<0.05$)。フッ素リチャージ量は、S-RPG フィラーの配合率の増加に伴い増加した。S-RPG フィラーの配合率の増加とフッ素リチャージ量の間には相関が認められた($R=0.92$)。

S-PRG フィラーはガラスアイオノマー相を含んでおり、この相には多機能ガラスから溶出してきた各種イオンがポリカルボン酸のカルボキシル基とキレート結合することでトラップされた状態で存在している。このため、S-PRG フィラーは初期に各種イオンを FASG よりも多く徐放することができることが考えられた。また、試作レジンセメント周囲のフッ素ナトリウム水溶液に存在する高濃度のフッ素イオンをキレート結合によりトラップし、そしてこのトラップされたイオンを徐放することが考えられた。

以上のことから、15%以上の S-PRG フィラーの配合によりレジンセメントのフッ素徐放量の増加を見込めること、S-PRG フィラーの配合はフッ素の徐放だけでなくリチャージについても有効であることが示唆された。

S-PRG フィラー配合試作レジンセメントの象牙質接着性

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 生体機能再生・再建学講座 歯科保存修復学分野
○塩出信太郎、山路公造、伊澤俊次、星加知宏、西谷佳浩、吉山昌宏

An adhesive property of experimental resin cement incorporated S-PRG filler
Department of Operative Dentistry, Field of study of Biofunctional Recovery and Reconstruction,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science
○Shintaro Shiode, Kozo Yamaji, Shunji Izawa, Tomohiro Hoshika, Yoshihiro Nishitani
and Masahiro Yoshiyama

【研究目的】

接着技術は歯科臨床において重要なものとなっており、間接法での修復において合着用セメントの機械的性質は修復物の予後を決める大きな要因である。歯質との接着が弱い場合やセメントの機械的性質が低い場合は修復物が脱離したり、歯質の二次う蝕の発生の原因となりうる。二次う蝕の抑制のために合着用セメントへフッ素を添加することが注目されている。松風より修復材料へのフッ素添加のためにガラス粒子表面にガラスアイオノマー相が形成された Surface reaction type Pre-Reacted Glass-ionomer filler (S-PRG フィラー)を配合することが試みられている。S-PRG フィラーはフッ素のリリースおよびリチャージ能に優れていることが知られている。しかしながら、S-PRG フィラーはガラスアイオノマー相を含んでいることから、S-PRG フィラーを配合するとレジン系材料の機械的性質が低下する可能性が考えられる。当教室では第 136 回日本歯科保存学会にて S-PRG フィラーが 20wt%以下配合されているときに圧縮強さ、曲げ強さが低下しないことを発表した。そこで本研究では、S-PRG フィラーを配合した試作レジンセメントの歯質接着性を象牙質微小引張接着試験を行うことにより評価することとした。

【材料および方法】

試作レジンセメントとしてフルオロアルミノシリケートガラス(FASG)フィラーを 68.5wt%含有した UDMA ベースのレジンセメント及び FASG フィラーを S-PRG フィラーで 5wt%、10wt%、15wt%、20wt%、25wt%、30wt% ずつ置換したものを作製し、S-PRG フィラーが含まれていないものを RCPRG-0、以降配合量が少ないものから RCPRG-1,2,3,4,5,6 と名付けた。新鮮ヒト抜去大白歯の咬合面を平坦に研削した後、試作プライマーで歯面処理し、硬質レジン(セラマージュ、松風)に試作レジンセメントを塗布し両者を圧接した。4方向から 20秒ずつ光照射(Blue shot、松風)した。24時間 37°Cで水中保管した後、接着界面に垂直で断面が 1×1mmの角柱になるように精密低速切断機(Isomet、Buehler)でトリミングした。小型卓上試験機(EZ test、島津)を用いて微小引張接着試験を行った(24時間群)。また、24時間の水中保管後 2万回のサーマルサイクル負荷時の微小引張接着試験も行った(TC群)。

【成績および考察】

測定した各条件における微小引張試験の結果を示す。

	RCPRG-0	RCPRG-1	RCPRG-2	RCPRG-3	RCPRG-4	RCPRG-5	RCPRG-6
24時間群	22.5±5.9	22.6±3.8	23.9±3.0	23.3±6.2	24.1±5.8	22.8±6.4	23.4±6.6
TC群	20.5±8.0	20.8±7.4	21.0±3.6	20.9±6.6	18.9±7.0	17.7±5.5	18.8±6.7

有意差なし (one-way ANOVA, tukey's test, $p>0.05$), (t-test, $p>0.05$)

象牙質微小引張接着強さは、24時間群のすべての S-PRG フィラー配合率で有意差が認められなかった。TC群でもすべての S-PRG フィラー配合率で有意差が認められなかった。また、サーマルサイクル負荷の有無で比較しても同じ S-PRG フィラー配合率の試料では有意な差は認められなかった。本試作レジンセメントは象牙質プライマーを前処置として用いている。このことにより、プライマーが象牙質へ浸透し、樹脂含浸層を形成して、象牙質と強固に接着することができたと考えられた。また、破壊形態もセラマージュの凝集破壊が多数観察され、良好な象牙質接着性を有していた。

以上のことから、S-PRG フィラーを配合しても象牙質との接着性に影響を与えることはなく、また長期間接着性を維持できることが示唆された。

新規 S-PRG フィラー含有レジン系仮封材が ポリマイクロバイアルバイオフィーム形成におよぼす影響

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, 飯塚純子¹, 倉持江里香¹, 寺中文字¹, 渡辺清子², 熊田秀文²,
浜田信城², 寺中敏夫¹

Antimicrobial effect of S-PRG filler containing resin based temporary filling material on the formation of polymicrobial biofilms

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, IIZUKA Junko¹, KURAMOCHI Erika¹,
TERANAKA Ayako¹, WATANABE Kiyoko², KUMADA Hidefumi², HAMADA Nobushiro², TERANAKA Toshio¹

【目的】 レジン系仮封材は操作の簡便性などから形成窩洞の仮封に広く用いられている一方で、封鎖性に問題があることも指摘されており、除去後に窩洞内の汚染や軽度の脱灰が認められることも報告されている。このような問題を克服するため、surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラー含有レジン系仮封材が新規開発された。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、歯質の脱灰抑制のみならず抗菌活性などを示すことが報告されており、う蝕予防を目的としたコンポジットレジン、歯面コート材や予防填塞材などに広く使用され、有用な歯科材料として注目されている。今回我々は、ポリマイクロバイアルバイオフィームモデル (Exterkate RAM ら, Caries Res., 2010) を用い、多種病原細菌を含むバイオフィームの形成能に対する S-PRG フィラー含有レジン系仮封材の効果を検討した。

【材料及び方法】 1. 試料作製: ガラス円板の両面に粒径 50 μm のアルミナでサンドブラスト処理を行った後、超音波洗浄し、高圧蒸気滅菌 (121°C, 15 分) した。各試料の両面に次に挙げる仮封材を約 1mm の厚さで塗布後、30 分間室温で放置し、バイオフィーム形成用の試料とした。実験群は 1) 0%24h 群: S-PRG フィラー非含有レジン系仮封材を塗布後、24 時間培養, 2) 20%24h 群: 20% S-PRG フィラー含有レジン系仮封材を塗布後、24 時間培養, 3) 0%72h 群: S-PRG フィラー非含有レジン系仮封材を塗布後、72 時間培養, 4) 20%72h 群: 20% S-PRG フィラー含有レジン系仮封材を塗布後、72 時間培養の、4 群とした (n=6)。

2. ポリマイクロバイアルバイオフィームの培養: ポリマイクロバイアルバイオフィームシステムには 1 被験者から採取した刺激唾液を用いるポリマイクロバイアルバイオフィームモデルを使用した。培養液は buffered McBain 2005 (0.2%スクロース, 50 mM PIPES 含有) を用い、培養液の交換を 20%24h 群および 0%24h 群では 10 時間で 1 回, 20%72h 群および 0%72h 群では毎日 10 時間および 14 時間で 2 回行ない、嫌気培養 (CO₂: 10.0%, H₂: 10.0%, N₂: 80.0%, 37.0°C) をそれぞれ 24 時間および 72 時間行なった。

3. 生菌数の測定 (CFU/ml): 培養開始から 24 時間後と 72 時間後、2 ml PBS 中に各試料を浸漬して 90 秒間超音波処理させて試料からバイオフィームを剥離・分散させた。Cysteine Peptone Water を用いて段階希釈し、血液寒天培地で 4 日間嫌気培養後、CFU/ml を算定した。算定値の統計処理は有意水準 5% で *t* 検定により行った。

【結果および考察】 各仮封材を塗布後、ポリマイクロバイアルバイオフィームを 24 時間および 72 時間培養して生菌数を比較した結果、0%24h 群と 20%24h 群間、および 0%72h 群と 20%72h 群間で共に有意差は認められず ($p>0.05$)、ポリマイクロバイアルバイオフィームの形成は抑制されなかった (0%24h = 1.07×10^8 , 20%24h = 9.83×10^7 , 0%72h = 1.11×10^9 , 20%72h = 1.19×10^9)。S-PRG 含有市販コンポジットレジンや S-PRG 溶出液には *S. mutans* の単一浮遊菌に対して抗菌効果を示すとの報告があるが、本実験のようなポリマイクロバイアルバイオフィームシステムを用いた場合はその効果が十分ではないことが示唆された。しかしながら、仮封材で問題となるのは辺縁漏洩により生じる窩壁と仮封材との間隙に形成されるバイオフィームであり、本実験のような自由表面ではない。辺縁漏洩のような狭い間隙では S-PRG フィラー含有レジン系仮封材から溶出されるイオンは、当然ながら、高濃度となり、望ましい抗菌性を示す可能性は高い。したがって、仮封材の抗菌性を検討するには微小な間隙内に形成されるバイオフィームの形成阻害を定量的に測定できる実験系を構築する必要があると考えられた。

各種修復材料と多目的接着システムとの接着

1) 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
2) さくデンタルクリニック

○岡崎 愛¹⁾, 小竹宏朋¹⁾, 望月久子¹⁾, 作誠太郎^{1,2)}, 日下部修介¹⁾, 堀田正人¹⁾

Tensile Bond Strength of Multipurpose Adhesion Systems to Restorative Material

Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation, Asahi University, School of Dentistry¹⁾, Saku Dental Clinic²⁾

○OKAZAKI Ai¹⁾, KOTAKE Hiroto¹⁾, MOCHIZUKI Hisako¹⁾, SAKU Seitaro^{1,2)}, KUSAKABE Shusuke¹⁾, HOTTA Masato¹⁾

【研究目的】

Minimal Intervention Dentistry の概念により、修復物周囲の二次齲蝕の治療が再修復から補修復へと移行している。これは、歯質だけでなく金属、コンポジットレジン、セラミックスなど、さまざまな被着体に接着する各種プライマーが開発されたことにより実現された。これらのプライマーは被着体の種類ごとに製品が存在し、被着体が複数ある場合に操作手順が複雑になり問題視されている。最近、歯質だけでなく金属、コンポジットレジン、セラミックスに接着する多目的接着システムが開発され各社から発売されているが、これら多目的接着システム間で接着強さを比較した研究は少ない。そこで今回、3種類の多目的接着システムを用い、金属、コンポジットレジン(硬化体)、セラミック、ジルコニアに対して補修復に用いられるフロアブルコンポジットレジンとの引張り接着強さ試験を行った。

【材料および方法】

多目的接着システムとして、スコッチボンドユニバーサルアドヒーズブ(SUA, 3M ESPE), ユニバーサルプライマー+ボンドフォース(UP, トクヤマデンタル), ビューティボンドマルチ+PR プラス(BBM, 松風)を用いた。被着体としてキンバラエース12S(金属, トクリキ), クリアフィルAP-X(CR, クラレメディカル), CEREC Blocs(セラミック, シロナデンタルシステムズ), ナノジルコニア(ジルコニア, パナソニックヘルスケア)を用いた。これらの表面を耐水ペーパー#800まで研磨し、アルミナサンドブラスト処理(50 μm, 0.4MPa)を5秒間行い、表面を粗造化し被着面とした。その後メーカーの指示に従って表面処理を行い、内径3.0mm, 深さ2.0mmのテフロンモールドを固定し、ビューティフィルフロープラスF00(松風)を填入し、光照射して硬化させたものを接着試験用試片とした。試料数は各20個とし、作製試料片は、37°C蒸留水中に24時間浸漬後、引張り試験用アダプターに固定し、万能試験機(EZ Graph, SHIMADZU)にて、クロスヘッドスピード0.5mm/minの条件で引張り、破断時の値を単位面積当たりに換算し引張り接着強さとした。測定データは一元配置分散分析とSchefféの多重比較検定(p<0.05)を行った。

【結果および考察】

図1に、引張り接着強さ試験の結果を示す。金属、CR、セラミックにおいて、UPはSUA、BBMに比較して有意に大きい接着強さを示した。ジルコニアではUP、SUA、BBM間に有意差は認められなかった。

各修復材料によって接着強さは異なっており、CR>(セラミック, ジルコニア)>金属の順であり、金属に対する接着強さを向上させる必要があると思われる。また、もっとも接着強さが大きかった多目的接着システムはUPであった。

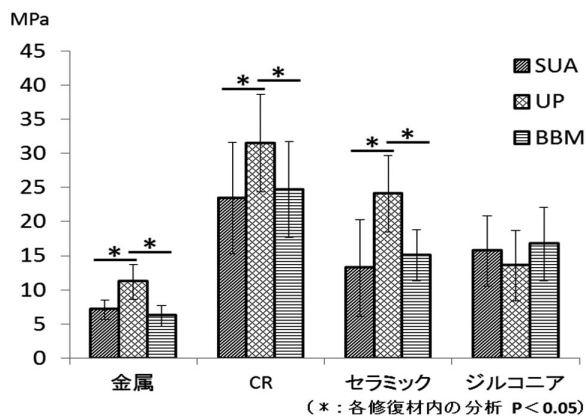


図1 引張り接着強さ試験

S-PRG フィラー配合歯磨剤のポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する抗菌活性

神奈川歯科大学 口腔治療学講座 保存修復学分野¹, 神奈川歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野²
○倉持江里香¹, 向井義晴¹, 富山 潔¹, 熊田秀文², 椎谷 亨¹, 飯塚 純子¹, 三宅 香¹, 長谷川晴彦¹,
渡辺清子², 浜田信城², 寺中敏夫¹

Antibacterial effect of the S-PRG filler containing tooth paste on the polymicrobial biofilms

¹Div. of Restorative Dent, Dept. of Oral Medicine, ²Div. of Microbiology, Dept. of Infection Control,
Kanagawa Dental College
OKURAMOCHI Erika¹, MUKAI Yoshiharu¹, TOMIYAMA Kiyoshi¹, KUMADA Hidefumi², SHIYA Toru¹, IIZUKA Junko¹,
MIYAKE Kaori¹, HASEGAWA Haruhiko¹, WATANABE Kiyoko², HAMADA Nobushiro², TERANAKA Toshio¹

【研究目的】

口腔を清潔で健康な状態に保つことで口腔疾患の予防のみならず、高齢者における主要な死亡原因となっている誤嚥性肺炎などの呼吸器感染症を抑制することが、かなりの率で可能であると考えられている。到来する超高齢社会に対応するために、高齢者の口腔の健康を維持・増進する対策の構築は歯科界喫緊の重要課題である。surface pre-reacted glass ionomer (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、歯質の脱灰抑制のみならず、口腔細菌に対して抗菌活性を示すことが報告されており、プラークの機械的清掃が十分には行えない患者、あるいは清掃しにくい部位においても S-PRG フィラーから溶出されるこれらイオンが口腔の健康状態を良好に保つ一助となる可能性がある。本研究の目的は、ポリマイクロバイアルバイオフィルムモデル (Exterkate *et. al.*, Caries Res, 2010) を用いて S-PRG フィラーを含有する歯磨剤および S-PRG フィラーからの溶出成分がバイオフィルム形成に与える影響を検討することである。

【材料および方法】

ポリマイクロバイアルバイオフィルム形成用基質にはφ12 mm のガラス試片を用いた。1 被験者から採取した刺激唾液を液体培地の buffered McBain 2005 (0.2% スクロース, 50 mM PIPES 含有, pH 7.0) に混入して嫌気培養 (CO₂: 10.0%, H₂: 10.0%, N₂: 80.0%, 37°C) し、初期のバイオフィルムを形成した。培養液の交換は培養 10, 24, 28 時間に行った。培養 24, 28 および 32 時間において次の各種処理液に 10 分間浸漬してバイオフィルムを処理し、以下の 4 群 (n= 6) に分けた。C 群: 脱イオン水 (DW; 対照), P 群: 粒径 1 μm の S-PRG フィラーを 5% 含有する歯磨剤の DW 3 倍希釈液 (松風), V 群: S-PRG 非含有歯磨材の DW 3 倍希釈液 (松風), E 群: S-PRG 溶出液 (松風)。なお、E 群の S-PRG 溶出液は、S-PRG フィラーを DW に 24 時間攪拌して得た上清である。各種処理の後、試料を Cysteine Peptone Water (CPW) で十分洗浄した。使用済みの培養液の pH は培養 10, 24, 28 および 32 時間で測定 (9618-10D, F-71, Horiba) した。32 時間における処理および洗浄後に各試料を 2 ml PBS に浸漬して 90 秒間超音波振動させて試料から細菌を剥離し、CPW を用い段階希釈、血液寒天培地に塗抹し 4 日間嫌気培養後、総生菌数 (CFU/ml) を算定した。データの統計分析は One-way ANOVA および Tukey の検定により有意水準 5% で行なった。

【結果および考察】

培養後の培地の pH は、培養期間中 pH 6.2~7.0 であったことより、buffered McBain 2005 培地は中性領域の良好な緩衝作用を示した。C 群の CFU は 7.00×10^8 であったのに対し V 群は 1.14×10^8 、および P 群は 8.57×10^7 であり、両群とも有意に低値を示したが (p<0.05)、E 群 (8.53×10^8) との間には有意差が認められなかった (p>0.05)。また、P 群は V 群に比較して減少傾向は示したが、統計学的有意差は認められなかった (p>0.05)。P 群の CFU が C 群に比較して有意に低いのにに対し E 群の CFU が同等であったのは、S-PRG フィラー粒子がバイオフィルムに吸着する可能性、ならびに歯磨剤に含まれる界面活性剤がバイオフィルム内に拡散する、あるいは S-PRG 溶出イオンの拡散を促進する可能性を示唆するものであり、さらなる検討が必要である。さらに、実際のプラーク内では pH が 4.0 付近まで低下すると報告されているため、耐酸性細菌種が優勢になる unbuffered McBain 2005 培地による検討も必要と思われる。

S-PRG フィラー含有試作歯磨剤がウシ象牙質におよぼす影響

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, 日野浦歯科医院³

○竹中宏隆¹, 村山良介¹, 瀧本正行¹, 遠藤 肇¹,
安田源沢¹, 黒川弘康^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 日野浦 光³

Influence of S-PRG Filler Containing Dentifrice on Bovine Dentin

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry,
HINOURA Dental Clinic³

○TAKENAKA Hiroataka¹, MURAYAMA Ryouyuke¹, TAKIMOTO Masayuki¹, ENDO Hajime¹,
YASUDA Genta¹, KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2} and HINOURA Ko³

【研究目的】

Minimal Intervention という治療概念の普及に伴い、臨床においても齶蝕リスクを低減化させることに焦点が置かれている。とくに、高齢者においては歯肉退縮に伴う根面齶蝕の増加が考えられるが、実質欠損を伴う根面齶蝕は環状に進行し隣接面に及ぶ場合も多く、修復操作は極めて困難となる。したがって、広範囲な実質欠損となる前の初期段階で積極的に再石灰化療法を行うことで根面齶蝕の進行を抑制することが重要となる。一方、高齢者においては全身的な問題などから治療に制限を受けることも多く、フッ化物配合歯磨剤などホームケア製品を応用することで齶蝕リスクをコントロールすることが行なわれている。しかし、これらのホームケア製品の効果は、患者個人の実行性やブラッシングの手技に大きく影響を受けるとともに、歯磨剤に含まれるフッ化物濃度にも制限があるのが現状である。そこで演者らは F 以外にも Si あるいは Sr などの石灰化に関与するイオンを徐放する S-PRG フィラーを含有する試作歯磨剤に着目し、この歯磨剤を象牙質に適用させた際の状態変化を、超音波パルス法を用いて検討した。また、レーザー顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて観察することで考察資料とした。

【材料および方法】

1. 超音波測定用試片の作製

ウシ抜去下顎前歯歯根部象牙質をブロックとして切り出した後、耐水用 SiC ペーパーの#2000 まで順次研し、4×4×1 mm の大きさに調整したものを超音波測定試片とした。

2. pH サイクルの設定

超音波測定用試片に対して、以下の pH サイクルを 1 日 2 回、28 日間適用した。

- 1) EDTA (pH4.75) で 10 分間脱灰した後、37°C 人工唾液に 12 時間保管 (Control 群)
- 2) EDTA で 10 分間脱灰した後、S-PRG 含有歯磨剤希釈液に 10 分浸漬後、37°C 人工唾液に 12 時間保管 (PRG 群)
- 3) EDTA で 10 分間脱灰した後、フッ化物含有歯磨剤希釈液 (フッ素イオン濃度 900 ppm) に 10 分間浸漬後、37°C 人工唾液に 12 時間保管 (F 群)

3. 超音波伝搬時間の測定およびレーザー顕微鏡観察

超音波測定装置 (Model 5900, Panametrics) を用いて超音波の伝播時間を測定、縦波音速を求めることで、象牙質の状態変化を経時的かつ非破壊に測定した。なお、超音波の伝播時間の測定時期としては、実験開始前および実験開始 1, 7, 14, 21 および 28 日経過とし、あわせてレーザー顕微鏡を用いて象牙質の表面性状を観察した。

4. SEM 観察および元素組成分析

実験期間の終了した試片に対して、FE-SEM (ERA8800-FE, Elionix) を用いて試片の断面を観察するとともに、元素分析 (EDAX Genesis, Elionix) を併せて行った。

【成績および考察】

Control 群では、縦波音速は実験開始前と比較して、実験期間を通じて低下する傾向を示した。一方、PRG 群および F 群では、実験期間の延長に伴い縦波音速が上昇する傾向が認められるものの、その上昇程度は異なるものであった。このように、PRG 群および F 群で縦波音速が上昇した原因としては、歯磨剤に含まれるイオンが、象牙質の脱灰あるいは再石灰化に影響を及ぼしたためと考えられた。

【結論】

pH サイクルに適用した象牙質試片の音速を、超音波パルス法を用いて測定した結果、S-PRG フィラー含有歯磨剤は象牙質の脱灰抑制および再石灰化に影響を及ぼす可能性が示された。

近年の歯科用貴金属の価格推移について

王喜歯科医院
○小西 秀和

Recent Changes of the Precious Metal Prices for Dental Treatment
Ouki Dental Clinic
OKONISHI Hidekazu

【研究目的】

近年、わが国における歯科用の貴金属価格は軒並み上昇傾向を続けており、ここ2~3ヶ月は政府の政権交代による政策転換の影響もあり(円安・株価高)、貴金属価格が高止まりの傾向を示している。一方、現在のわが国の保険診療報酬体系は十分に貴金属の価値を担保したものとは言い難く、今後消費税増税の可能性も高いことから、ほとんどの地域の個人開業の歯科診療所でも医療経営上の死活問題となっている。

そこで本研究では、近年の歯科用貴金属の価格推移について調査を行い、わが国の歯科医療における危機的状況を乗り切る手段について、筆者なりに考察を加えた。

【材料および方法】

各種貴金属の価格推移のデータを閲覧できるホームページ(HP)にアクセスし、特に歯科用貴金属として頻用されている金・白金(プラチナ)・パラジウム・銀の四種類に関して、各金属1gあたり(銀は100gあたり)の最近3ヵ年分の価格推移について調査し、さらに12%金銀パラジウム合金(略称一金パラ)に関しても、合金30gあたりの最近3ヵ年分の価格推移について調査を行った。

【結果】

- ・金—3年前は1gあたり約3500円で、その後徐々に上昇傾向を示し、現在1gあたり約4800円となっている。
- ・白金(プラチナ)—3年前は1gあたり約5000円で、その後徐々に下降傾向を示すも昨年から上昇傾向に転じ、現在1gあたり約4800円となっている。
- ・パラジウム—3年前は1gあたり約2300円で、その後徐々に下降傾向を示すも昨年から上昇傾向に転じ、現在1gあたり約2250円となっている。
- ・銀—3年前は100gあたり約9000円で、その後上昇・下降を示すも現在ほぼ横ばい傾向である。
- ・金パラ—3年前は30gあたり約28000円で、その後上昇・下降を示すも最近は上昇傾向が強まり、現在30gあたり約33000円となっている。
(現在とは、本学会抄録を作成していた平成25年3月1日当時をさしている。)

【考察】

歯科用貴金属の使用が不可欠なケース(咬合圧のかかる保険の歯冠修復・補綴物、ならびにロングスパンのブリッジなど)を除いては、患者の金属アレルギー等の存在も考慮し、可及的にメタルフリー修復(コンポジットレジン修復やファイバーポスト築造、あるいは硬質レジン、ポーセレン、ジルコニア材の応用など)を心がけることで、個人開業の歯科診療所の経営に対しても安定感をもたらす可能性が示唆された。

口腔内内視鏡システムの臨床応用のための in vitro 試験

昭和大学歯学部歯科保存学講座総合診療歯科学部門¹⁾

長田電機工業 (株)²⁾

○長谷川篤司¹⁾、勝又桂子¹⁾、伊佐津克彦¹⁾、池田哲¹⁾、高島英利¹⁾、長田将治²⁾

In vitro study for clinical application of the Dental endoscope system

Department of Conservative dentistry, Division of Comprehensive Dentistry,

Showa University School of Dentistry¹⁾, Osada Electronic Co., LTD²⁾

○HASEGAWA Tokuji¹⁾, KATSUMATA Keiko¹⁾, ISATSU Katsuhiko¹⁾,

IKEDA Satoshi¹⁾, TAKASHIMA Hidetoshi¹⁾, OSADA Masaharu²⁾

【目的】

1990年代後半から歯科用顕微鏡が幅広く臨床応用されるようになり、特に歯内治療領域でその有用性が数多く報告され、高い評価を得ている。これら歯科用顕微鏡の有効性としては①高拡大下での観察による診察、診断精度の向上、②観察下での精密な治療だけでなく③安定的な診療姿勢と十分な視認性能による歯科医の健康維持にも寄与するなどが挙げられる。

一方、歯科用顕微鏡は①機器が高価、②機器が大きい、という導入に関するハードルが高いだけでなく、③術者には専門的な教育とトレーニングが求められ、④場合によっては介助者が必須となる可能性が普及を遅らせているとも考えられる。さらに、歯科用顕微鏡の視点が口腔外の対物レンズ先端にあるため、治療器具と術者の手指が術野を遮らないように対象物と接眼レンズの間に介入しなければならないことも高い施術技能が求められる要因になっていると考えられる。他方、ファイバースコープを応用した内視鏡はすでに医療で幅広く応用されており、視点がスコープ先端となるため、術野を確認しながら治療器具を動作させられる可能性や口腔外からの直線的な視線では視認できない部位を観察できる可能性などを秘めているにもかかわらず歯科界ではあまり報告がない。

オサダ社製オーラルスコープOOS-1はハンドピース、制御用PC、フットスイッチで構成される歯科用ファイバースコープである。先端ファイバースコープ部は直径0.9mm、約4cmで金属性チューブで被覆保護され、モノアングルのカーブが与えられている。円柱状ハンドピースは直径約20mm、全長約205mm〔ファイバースコープ部を含む〕、約75gであり、USBケーブルでPCと接続して管理用ソフト (Osada Oral Scope Viewer Ver. 1.0.1) で制御している。本研究では口腔内内視鏡オーラルスコープOOS-1を口腔内に応用するために観察の特性と精度を確認したので報告する。

【材料および方法】

ニッシン社製歯根付人工歯列模型 (i2D-400C) の下顎第1小臼歯の歯頸部マージンラインを描記し、これを参考に歯肉縁下2mm、歯肉縁下4mmの線を描記した。この線上に電気エンジンに装着した球形スチルバー #1/2 でいくつかの大きさの球形窩洞を形成し、窩洞内を根管と想定した根管観察用試片とした。

ニッシン社製抜髄練習用人工歯で通法通り抜髄術式を行ったのち、電気エンジンに装着した球形スチルバー #1/2、#1、#2で髓床底部にいくつかの大きさの球形窩洞を形成した。次に窩洞内をニッシン社製歯石作成レジンセット (Dental Calculus Set) で充填し、硬化後表面を鎌形スクレーパーで仕上げて歯周 (歯垢、歯石) 観察用試片とした。

オーラルスコープOOS-1は管理ソフト立上げ後に、規定の焦点補正シート (フォーカスチェッカー) でキャリブレーションを行ってから使用した。

【成績】

オーラルスコープOOS-1は歯肉縁下4mmの部位でも直径約0.3mmの根面充填物を明瞭に視認でき、これの1/10以下の大きさでも十分に視認できると考えられた。

【考察および結論】

口腔内内視鏡システム (オーラルスコープOOS-1) は適切な解像度を有し、根管の観察、歯肉縁下の観察にも対応できると考えられる。さらに、内視鏡治療に発展できる可能性を十分に持ったシステムである事が明らかとなった。

足場材としての魚コラーゲンの安全性試験
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 齶蝕学分野
○池田 毅, 吉澤 祐, 柳口嘉治郎, 山本耕平, 山田志津香, 林 善彦

Bio-safety Properties of Fish Collagen
Department of Cariology, Nagasaki University
Graduate School of Biomedical Sciences
○Ikeda Takeshi, Yoshizawa Yuu, Yanagiguchi Kajiro, Yamamoto Kohei,
Yamada Shizuka, Hayashi Yoshihiko

【緒言】再生医療において不可欠な3要素、細胞、足場、栄養素のうち、我々は足場材に関して種々検討を加えている。キトサンの足場材としての特性に関して、キトサンスポンジを試作しすでに報告を行った(第134回日本歯科保存学会学術大会)。残念ながら、キトサンはイヌなどの大動物の歯髄への応用で初期に急性炎症を惹起させる欠点を有していることが判明したため、この点を克服するために人獣共通感染症の対象とならない魚コラーゲンを用いた足場材を考案し物理・化学的性状について報告した(第135回日本歯科保存学会学術大会)。そこで今回魚コラーゲンの生物学的特性について検討したので報告する。

【材料と方法】1) 魚コラーゲン: テラピアの皮膚からペプシン可溶化し0.1、0.2%に調整されたタイプIアテロ化コラーゲン(5mM酢酸溶液、0.45 μ mフィルター濾過済)を(株)ニッピバイオマトリックス研究所より供与された。
2) 魚コラーゲングル内における細胞保存について: 実際の臨床での応用を前提として、魚コラーゲンベッド内における細胞の生育状況について骨芽細胞(NOS-1)を使って検討した。

2) 魚コラーゲンの組織反応について: 従来より当教室で歯髄貼薬剤の組織反応を検討する場合に用いている動物(ラット)実験モデル系を使って、切歯露髄面に貼薬した魚コラーゲンによる歯髄組織反応を病理組織学的に検討した。

3) 安全性試験

①細胞毒性試験: ISO規格に準じ、V79細胞を用いた直接法による細胞毒性試験を実施した。

②感作性試験: ISO規格に準じ、モルモットにおける感作性試験を実施した。

③皮内埋入試験: 0.1%魚コラーゲン20-30 μ lをラット背部皮内へ埋入し、術後1週目に病理組織学的に観察した。

【結果】

ゲル内にて細胞の生育が可能な条件(PBS(-)に溶解0.1%魚コラーゲン)が確認できた。なお、この条件で1か月程度の冷蔵保存が可能であることも判明した。

歯髄内反応として、術後1日目には軽度の炎症反応が観察されたが、術後1日目には炎症反応も消退していた。術後7日目には歯髄内へ拡散したコラーゲンの消失が顕著であった。術後7日間をとおして、コラーゲンに対する異物反応は見られなかった。

細胞毒性試験はコロニー形成率が対象群と変わらず細胞毒性はないと判定した。また感作性試験においても、惹起終了後48時間までの投与部位における異常は認められなかった。

皮内試験の結果、1週間後の肉眼所見として完全に周囲皮膚と区別ができないほど異物・炎症反応は認められなかった。また、病理組織学的にも正常皮膚の組織像を呈していた。

【まとめ】魚コラーゲンは病理組織学的に歯髄組織における生体親和性および生分解性に優れた生体材料であることが明らかにできた。また、今回実施した3つの安全性試験においても、為害性のない素材であることが確認できたため、臨床応用へ向けた検討をさらに加速させたいと考えている。

【謝辞】本研究の一部は平成24年度長寿医療研究開発費で実施した。

【参考文献】

1. Hayashi Y: Application of chitosan oligosaccharide and glucosamine in dentistry. In *Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications*, ed. Se-Kwon Kim, CRC Press- Taylor & Francis Group, 447-460, 2010.
2. Hayashi Y, Yamada S, Ikeda T, Yanagiguchi K: Fish collagen and tissue repair. In *Marine Cosmeceuticals: Trends and Prospects*, ed. Se-Kwon Kim, CRC Press- Taylor & Francis Group, in press, 2011.
3. Hayashi Y, Ikeda T, Yamada S, Koyama Z, Yanagiguchi K, The application of Fish Collagen to The Dental and Hard Tissue Regenerative Medicine. In *Advances in Seafood Processing By-Products: Trends and Applications*, ed. Se-Kwon Kim, Springer, in press

インターフェロン- γ 依存性の細胞内侵入病原体排除における オートファジー関連タンパク質の役割の解明

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

大阪大学微生物病研究所 感染病態分野²

大阪大学免疫学フロンティアセンター 免疫寄生虫学研究室³

○大嶋 淳^{1,2,3}, 笹井美和^{2,3}, 山本雅裕^{2,3} & 林 美加子¹

A role for autophagy proteins in IFN- γ -mediated elimination of intracellular pathogen

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry,

²Department of Immunoparasitology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

³Laboratory of Immunoparasitology, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University

○Jun OHSHIMA^{1,2,3}, Miwa SASAI^{2,3}, Masahiro YAMAMOTO^{2,3} & Mikako HAYASHI¹

【研究目的】

口腔内にはう蝕や歯周病の原因となる細菌を含め 700 種類にもものぼる多様な細菌が生息し、きわめて複雑な細菌叢を形成している。近年、リステリア菌やサルモネラ菌に代表される細胞内寄生性細菌以外にも、これまで細胞外でのみ増殖すると考えられていた多くの病原微生物が宿主細胞内に侵入可能であることが報告されており、それらの菌の細胞内動態の解明は急務となってきている。一方、細胞侵入した細菌に対し、宿主はオートファジーと呼ばれる自食作用を含む大規模な細胞内分解システムを利用してこれらを効率的に排除することがよく知られているが、オートファジー関連タンパク質の 1 つである Atg5 は自食作用のみならず、インターフェロン- γ (Interferon-gamma : IFN- γ) 誘導性 GTP 分解酵素を介して細胞内寄生性細菌の殺傷に関与することも示唆されている。そこで本研究では、特に IFN- γ 依存性の病原体排除についてよく調べられている細胞内寄生性病原体トキソプラズマ (*Toxoplasma gondii*) をモデルに、IFN- γ 誘導性殺傷能における複数のオートファジー関連タンパク質の関与を検討した。

【材料および方法】

オートファジーに必須のタンパク質である ATG7、ATG16L1、ATG9a、ATG14 のそれぞれの欠損マウスから得た胎児線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast : MEF) に、ルシフェラーゼを恒常的に発現しているトキソプラズマを感染させて実験を行った。各遺伝子欠損マウス由来の MEF を 6 穴プレートに 5×10^5 / well の濃度で播種し、IFN- γ 10 ng / ml を含む、もしくは含まない 10 % FBS 添加 DMEM 培地にて 37 °C、5 % CO₂ 下で 24 時間培養したのち、 5×10^5 のトキソプラズマに感染させてさらに 24 時間培養後、全細胞を回収・溶解しルシフェラーゼ・アッセイにてトキソプラズマの存在量を比較検討した。また同様に、MEF を 2.5×10^5 ずつ播種して IFN- γ 10 ng / ml にて刺激したのち、24 時間後に 5×10^5 のトキソプラズマを感染させ、感染 6 時間後に 3.7 %ホルムアルデヒド含有 PBS にて固定し、標本を得た。それぞれの標本に対して、代表的な IFN- γ 誘導性 GTP 分解酵素である Irgb6・GBPs ならびにトキソプラズマに特異的な抗体を用いて共染色を行い、共焦点蛍光顕微鏡を用いて各オートファジー関連遺伝子欠損 MEF におけるトキソプラズマとそれらの GTP 分解酵素との共局在について解析を行った。

【結果】

野生型の細胞と比較して、ATG7 および ATG16L1 を欠損した細胞では IFN- γ 刺激によるトキソプラズマへの殺傷能が著しく抑制され、顕微鏡観察においても IFN- γ 誘導性 GTP 分解酵素と共局在するトキソプラズマの割合は有意に低下していた。一方、ATG9a および ATG14 欠損細胞では、IFN- γ によるトキソプラズマ殺傷能に野生細胞との差はなく、顕微鏡観察における IFN- γ 誘導性 GTP 分解酵素とトキソプラズマとの共局在化についても変化は認められなかった。

【結論】

今回の結果から、必須オートファジー関連遺伝子群の中でも、ATG7 / ATG16L1 は IFN- γ 依存的な細胞内寄生性病原体の排除機構に大きく関与している一方、ATG9a / ATG14 の有無はそれほど影響しないことが明らかとなった。このことから、ATG ファミリーの中には自食作用のみならず IFN- γ 誘導性 GTP 分解酵素を介した細胞内寄生性病原体の排除に関与するものとそうでないものが存在することが示唆された。

MTI-II が示す骨芽細胞への影響 -抗炎症剤としての可能性の検討-

¹九州歯科大学齶蝕歯髓疾患制御学分野

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 MTI-II on Osteoblastic Cells -Possibility as an Anti-inflammatory Drug-

¹Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Kyushu Dental University

²Clinical Proteomics and Molecular Medicine, St.Marianna University Graduate School of Medicine

³Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental University

○HIRATA-TSUCHIYA Shizu¹, OKAMOTO Kazuki², TERASHITA Masamichi³, KITAMURA Chiaki¹

【目的】近年、代謝性疾患、発癌、動脈硬化性疾患の発症における「慢性炎症」の関与がクローズアップされている。根尖歯周組織疾患においても、難治症例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容易に想像できる。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。今回、直接的に炎症の主たるシグナル伝達経路である NF- κ B シグナルを抑制するステロイド受容体コアクチベーターの 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 MG-63 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 (MMP) のプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、MMP-2, 9 の発現を分析した。

【結果】MG-63 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、形態の特徴や細胞増殖能に有意差は認められなかった。一方、MG-63 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 で刺激しても、MMP-2 の発現に変化はあまり認められず、MTI-II を過剰発現させた細胞でも MMP-2 の発現変化は認められなかった。一方 MMP-9 は、TNF α の刺激によって発現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。

【考察】

今回の結果は、ステロイド受容体コアクチベーターである MTI-II が、骨芽細胞様細胞の形態や増殖能に影響を及ぼすことなく、TNF α 刺激による NF- κ B の転写活性を抑制することで、炎症を抑制することを示している。このことから、MTI-II がステロイド剤などと同様に抗炎症剤として有効であることが示唆された。

【結論】

MTI-II は、NF- κ B シグナルを阻害することで骨芽細胞様細胞が示す TNF α 刺激による炎症を抑制する。

特許番号：4874798 (日本、査定済)、US 7932226 (米国、査定済)、05755776.1 (EU、査定中)

プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの歯根膜細胞の石灰化制御

¹大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周分子病態学 (口腔治療学教室)

²大阪大学歯学部附属病院 近未来歯科医療センター 「口の難病」プロジェクト

○北垣次郎太^{1,2}、謝成婕¹、中村友美¹、栗田敏仁¹、森健太¹、久保田実木子¹、阪下裕美¹、山本智美¹、池上久仁子¹、小笹匡雄¹、竹立匡秀¹、柳田学¹、山下元三¹、山田聡¹、村上伸也¹

Effect of proteasome inhibitor bortezomib on the periodontal ligament cell calcification

¹Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

²Osaka University Dental Hospital, Challenge to Intractable Oral Diseases

○Jirouta Kitagaki^{1,2}, Chengjie Xie¹, Tomomi Nakamura¹, Toshihito Awata¹, Kenta Mori¹,

Mikiko Kubota¹, Hiromi Sakashita¹, Satomi Yamamoto¹, Kuniko Ikegami¹, Masao Ozasa¹,

Masahide Takedachi¹, Manabu Yanagita¹, Motozo Yamashita¹, Satoru Yamada¹ and Shinya Murakami¹

[研究目的]

ユビキチン修飾系は、エネルギー依存的タンパク質分解系の一部として発見されたタンパク質翻訳後修飾系であり、細胞周期・アポトーシス・シグナル伝達・転写調節といった多様な生命現象を制御しており、近年、硬組織形成を制御している可能性が示唆されている。ユビキチン化タンパクを分解するプロテアソームの阻害剤ボルテゾミブが悪性骨髄腫の治療薬として臨床応用されていることや、ボルテゾミブが BMP-2 や Runx2 の分解を阻害することにより骨芽細胞の分化を誘導する結果、マウス頭蓋骨の骨量を増加させることなどから、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの硬組織研究へのさらなる応用が期待されている。そこで本研究では、ボルテゾミブの歯根膜細胞の硬組織形成過程に与える影響を検討した。

[材料と方法]

高い硬組織形成能を有するマウス歯根膜細胞株 (MPDL-22) を、アスコルビン酸およびβ-グリセロリン酸を含む石灰化誘導培地中で長期培養を行った。プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブの MPDL-22 に対する効果を検討するために、以下の各種実験を行った。

1. MPDL-22 に作用させるボルテゾミブの至適濃度の検討

ボルテゾミブ (1-100 nM) を添加し、抗ユビキチン抗体を用いて Western blotting を行い、至適濃度を検討した。

2. 歯根膜細胞の石灰化物形成、および石灰化物形成時に誘導される遺伝子発現に対するボルテゾミブの影響

ボルテゾミブ存在下にて MPDL-22 の長期培養を行い、同細胞における石灰化ノジュール形成をアリザリン染色で検討した。同時に、石灰化物形成時に MPDL-22 に誘導される各種石灰化関連遺伝子発現を real-time PCR 法を用いて検討した。

3. BMP-2 誘導性の石灰化に対するボルテゾミブの効果

ボルテゾミブにて前処理された MPDL-22 に BMP-2 を添加して培養を行い、BMP-2 誘導性の石灰化に対するボルテゾミブの効果を実験室 PCR 法にて検討した。

[結果および考察]

ボルテゾミブ 10 nM 以上の添加により、MPDL-22 におけるタンパク質分解阻害作用が認められた。石灰化誘導培地における MPDL-22 の長期培養系へのボルテゾミブ添加により、石灰化ノジュール形成ならびに石灰化物形成時に誘導される骨シアロタンパクの遺伝子発現量の上昇が認められた。また、ボルテゾミブにて MPDL-22 を前処理することにより、BMP-2 誘導性のオステオカルシンの発現が亢進されることが明らかとなった。

[結論]

本研究結果から、ボルテゾミブを用いてプロテアソームを介するタンパク質分解作用を阻害することにより歯根膜細胞の石灰化を *in vitro* で誘導できることが明らかとなった。また、ボルテゾミブは BMP-2 誘導性の歯根膜細胞の石灰化を増強することから、その作用機序として、BMP シグナル下流のシグナル伝達タンパク群が標的である可能性が示唆された。

象牙質・幹細胞複合体の骨再生への応用

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⁾

Application of dentin-stem cell complex to bone regeneration

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ハイドロキシアパタイト (HA)、 β -リン酸三カルシウム (β -TCP)、焼成した牛骨などがあり、自家骨を使用する場合もある。しかし、人工材料や牛骨を用いる場合、組織再生後も残存する場合や何らかの異物反応が生じる可能性がある。また自家骨を用いる場合は採取のための外科的処置が必要となり患者の負担を無視できない。そこで我々は生体材料として供給可能な象牙質に注目した。本研究では象牙質を患者由来の幹細胞の足場として使用し、象牙質・幹細胞を凝集させた複合体として骨補填材への応用を目的としている。そして象牙質・幹細胞凝集塊の作成条件を検討し、第137回日本歯科保存学会 (P96) で発表した。今回は既存の骨補填材である HA や β -TCP を比較対照に凝集塊の形状の観察、細胞数、アルカリホスファターゼ (ALP) 活性について検討した。

【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、矯正治療のために便宜的に抜去される歯、埋伏智歯など口腔内で審美的、機能的に保存不可と診断された歯から齶蝕のない歯を選択し、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。
2. ヒト象牙質の顆粒の作成：抜去歯から象牙質を抽出・粉碎後、粒径 106~212 μ m の顆粒のみに整粒しその後オートクレーブを用いて滅菌した。
3. 細胞塊の作製：滅菌したヒト象牙質顆粒、HA、 β -TCP でコートした 96 ウェルのプレート上で (4.0~0.008mg/ウェル)、ヒト歯髄幹細胞 (ALLCELLS 社、以下 hDPSC) を 7 日~14 日間培養し、4%PFA 固定して ALP 基質染色を行った。
4. 細胞塊の観察：3 で作製した hDPSC の細胞塊を走査型電子顕微鏡 (S4500 : HITACHI 社、以下 SEM) で観察を行った。
5. 細胞塊中の細胞数測定：3 で作製した hDPSC の細胞塊を細胞溶解液を用いて細胞を抽出し、細胞数を調べた。

【結果】

細胞数を変えて細胞塊作成条件を検討した結果 $4 \times 10^4 / \text{cm}^2$ の密度で播種した場合、播種後 3~5 日で凝集し始め、細胞塊が形成されることが示された。細胞塊を固定し、ALP 染色を行ったところ HA は濃染されたが象牙質、 β -TCP ではほとんど染色されなかった。SEM 観察を行うと、象牙質顆粒を用いた細胞塊では、多数の細胞が顆粒を被包しているのが観察された。さらに細胞塊中の細胞数を比較すると、象牙質顆粒の細胞塊では細胞増殖が顕著でありコントロールと比較して有意差を認めた。しかしながら HA ではコントロールに比べ細胞数は減少していた。

【結論および考察】

hDPSC は今回すべての材料とともに細胞塊を形成し、骨補填材への応用の可能性が示唆された。象牙質を用いた場合は細胞増殖が促進されており、HA を用いた場合 ALP 活性の上昇がみとめられることから、未分化幹細胞のマーカーや骨芽細胞あるいは象牙芽細胞の分化マーカーを用いて細胞の性状を明らかにする必要がある。今後は細胞塊から mRNA を抽出しマーカー遺伝子の発現解析を行うとともに細胞塊を各種マーカーの抗体を用いて免疫染色を行い細胞の性状を明らかにするとともに、実験動物の皮下への細胞塊移植実験等を行い、骨誘導能についても評価し検討していく予定である。

培養幹細胞に対する象牙質顆粒の機能解析

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

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

Possible roles of dentin particles on the stem cell activities

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

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

【研究目的】

我々は象牙質を粉碎して得た顆粒を根尖封鎖材として応用すべく研究を行ってきた。そして、象牙質が根尖部で凝塊を形成し dentinal plug を形成することを動物実験にて示した。しかし、象牙質顆粒填入後の周囲組織の応答については不明点が多い。そこで本研究は象牙質存在下での細胞応答を様々な組織由来の幹細胞(ヒト歯髄由来幹細胞(hDPSC)、ヒト骨髄由来幹細胞(hBMSC)、ヒト脂肪由来幹細胞(hASC))を用いその有用性を検討した。そして象牙質顆粒は hDPSC の細胞増殖を添加量依存的に促進することを見出し第 137 回日本歯科保存学会 (P30) で報告した。今回は人工骨として応用されているハイドロキシアパタイト(HA)やβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)を比較対照に細胞播種後の初期接着、増殖、アルカリホスファターゼ(ALP)活性の変化について解析した。

【材料および方法】

1. 抜去歯の保存：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)を得て使用した。朝日大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、智歯周囲炎のため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℃で凍結保存した。
2. 象牙質、β-TCP、HA 顆粒の作製：抜去歯から象牙質のみを取り出した。その後ボーンミル(YDM社)にて粗砕し、アルミナ乳鉢および乳棒を用いて微粒化し、自動ふるい機にて粒径106~212μmと粒径38μm以下に整粒した。β-TCPおよびHAはアルミナ乳鉢および乳棒で粉碎して微粒化し、象牙質顆粒と同様に整粒した。
3. hDPSC、hBMSC、hASC の培養：3種の幹細胞を、オートクレーブ滅菌したヒト象牙質顆粒4.00mg/cm²でコートした培養プレート上で12時間、48時間、および7日間培養した。象牙質顆粒非存在下で培養した細胞群をコントロールとした。
4. 細胞応答の検討：それぞれの細胞を播種後12時間、または48時間でLysis bufferを用いて回収し、Hoechst染色を行って蛍光強度をプレートリーダー(infinite M200PRO, テカンジャパン社)で測定し、既知の細胞数を同様に処理して得た検量線から細胞数を算出した。7日間培養した細胞はLabAssay™ALP(和光純薬工業)を用いてALP活性を測定した。得られた結果はMann-WhitneyのUの検定を用いて統計処理を行った。

【結果】

象牙質顆粒、HA、β-TCPに対する細胞の初期接着を評価するため播種後12時間経過した細胞数を検討した結果、3種ともコントロールに比べ細胞数は減少傾向であったが有意な差は認められなかった。次いで細胞増殖について検討した結果、象牙質顆粒はコントロールおよび他の2種の材料と比較して3種の幹細胞の増殖を有意に促進した。HA β-TCPでは細胞増殖促進は認められなかった。ALP活性についてはHAが有意に活性上昇を促進したが象牙質顆粒およびβ-TCPには有意な促進効果は認められなかった。

【結論および考察】

今回用いた材料は細胞接着を顕著に阻害するものではなかった。そして細胞増殖においては、象牙質顆粒は比較的用いた人工材料よりも有意に促進効果を示した。しかしながらALP活性には促進効果は認められず、未分化な状態で増殖を促進する基材として有望であることが示唆された。今後は培養後の細胞の性状をさらに詳細に検討するため、mRNAを抽出して遺伝子発現解析を行っていく予定である。

iPS 細胞由来象牙芽細胞において炎症性サイトカイン誘導 MMP-3 は細胞増殖と抗アポトーシス作用を制御する

○ 山口秀幸¹, 尾関伸明¹, 川合里絵¹, 田中 毅¹, 檜山太希¹, 中田和彦¹, 茂木眞希雄², 中村 洋¹
¹愛知学院大学歯学部歯内治療学講座, ²愛知学院大学薬学部生体機能化学講座

Proinflammatory cytokine-induced matrix metalloproteinase (MMP) -3 modulated cell proliferation and anti-apoptosis in odontoblast-like cell derived from iPS cells

○ Hideyuki Yamaguchi¹, Nobuaki Ozeki¹, Rie Kawai¹, Tsuyoshi Tanaka¹,
Taiki Hiyama¹, Kazuhiko Nakata¹, Makio Mogi², and Hiroshi Nakamura¹
¹Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
²Department of Medicinal Biochemistry, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University

【研究目的】

MMP-3は線維芽細胞や滑膜細胞, 軟骨細胞から分泌されるタンパク分解酵素で, コラーゲンやプロテオグリカン, エラスチンなどから成る細胞外マトリックスの分解をはじめとし, 細胞表面に発現するタンパク質の分解, 生理活性物質のプロセッシングなどその作用は多岐にわたる. 本酵素は歯髄幹細胞の増殖と血管内皮細胞の増殖および遊走を促進し, 歯髄の炎症時や創傷治癒過程に発現が増加するとの報告がある. 本研究では, 新規に確立したiPS細胞由来象牙芽細胞を用いて炎症性サイトカイン誘導MMP-3の生理的役割を明らかにするため, MMP-3 siRNA を用いて検討をおこなった.

【材料および方法】

マウス iPS 細胞(京大・山中研より分与)を新規に確立した象牙芽細胞分化誘導法を用いて, 象牙芽細胞に分化誘導させた後, 炎症性サイトカインとして, マウス IL-1 β , TNF- α , IFN- γ (PeptoTech) からなるサイトカインミクスチャー (CM) を添加し, RT-PCR 法と Western-blots 法により MMP-3 の発現を評価した. サイトカインによる細胞増殖は WST-1 法 (Roche), アポトーシス細胞死は BrdU 標識 DNA fragment を ELISA (Roche) にて評価した. さらに培養液中の MMP-3 活性を ELISA 法 (AnaSpec) により評価した. MMP-3 siRNA (Santa Cruz) を用いたノックダウンにより, サイトカインによる細胞増殖とアポトーシス細胞死の評価をおこなった.

【結果】

CM 添加 (1, 3 U) において, MMP-3 の遺伝子, タンパク質発現と細胞増殖が統計学的有意 (**P < 0.01) に認められたが, アポトーシス細胞死は惹起されなかった. さらに, 同濃度の CM 処理にて統計学的有意な MMP-3 活性上昇が観察された. しかしながら, CM 添加 (5U) の条件下では, MMP-3 の発現が認められず, 細胞増殖の低下とアポトーシス細胞死が統計学的有意に惹起された (**P < 0.01). MMP-3 siRNA により, CM 添加群 (1, 3 U) で, 細胞増殖の抑制とアポトーシス細胞死が惹起され, コントロールと比較して統計学的有意差が認められた.

【考察】

iPS 細胞由来象牙芽細胞において, IL-1 β , TNF- α , IFN- γ からなる炎症性サイトカインにより誘導された MMP-3 を MMP-3 siRNA を用いてノックダウンすることにより, 細胞増殖が統計的有意に抑制され, アポトーシス細胞死が惹起されたことから, MMP-3 が炎症時における象牙芽細胞の細胞増殖と抗アポトーシス作用を調節する可能性が示唆された.

genistein の石灰化誘導メカニズムの解析

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学分野
○林 敬次郎、半田 慶介、小池 俊之、Mohammad Ali Akbor Polan、Jia Tang、斎藤 隆史

Analysis of the mechanisms by genistein-induced calcification

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

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

【目的】

天然成分である大豆イソフラボンはフラボノイドに分類され、食品添加物やサプリメントとして摂取されている健康食品であり、様々な生理活性効果が期待されている。また、その構造がエストロゲンと類似しているためエストロゲン様作用を有し、特に骨組織で優位に発現するエストロゲンレセプターβ (Estrogen receptor β; ERβ)と高親和性をもつことから、骨粗鬆症の予防や改善に有効であるとされている。我々はこれまでに、大豆イソフラボンのひとつである genistein が、*in vitro* におけるラット歯髄細胞 (Rat Dental Pulp Cells; RDP) の増殖・分化誘導能、および *in vivo* における修復象牙質形成能を有することを報告してきた(第 134・137 回大会)。しかし、genistein による RDP の分化および石灰化機構に関する詳細は解明されていない。そこで本研究では、genistein がラット歯髄細胞の分化・石灰化にどのように関係するか調べるため、各種遺伝子発現およびオステオカルシン(Osteocalcin; OCN)タンパク産生について検討することとした。

【材料および方法】

12 週齢 Wistar 系雄性ラットの両側下顎中切歯から歯髄組織を採取し、細菌性コラゲナーゼにて段階的に酵素消化することにより RDP を得た。RDP は 4×10^5 cell/dish の濃度で 60mm dish に播種し 10% FBS を含む DMEM で 37°C、5%CO₂ 存在下にて 24 時間培養後、以下の実験に供した。

1. RDP に genistein を 0.01、0.1、1、10μM (以下 G0.01、G0.1、G1、G10)添加し 10 日および 17 日間培養した。その後、各サンプルの total RNA を抽出し Dentin matrix protein 1 (DMP-1)、Dentin sialophosphoprotein (DSPP)、Runt-related transcription factor 2 (Runx2)、Bone sialoprotein (BSP)、Osteopontin (OPN)、OCN、Alkaline phosphatase (ALPase)、Transforming growth factor-β receptor (TGF-βR)1、TGF-βR2、ERα および β の mRNA 発現量を Real time PCR 法により定量した。

2. 各種濃度の genistein 添加培地で 20 日間培養後に RDP から培養液中に放出された総 OCN タンパク量を ELISA 法によって測定した。Rat Gla-Osteocalcin High Sensitive EIA Kit (TaKaRa)を用いて、マイクロプレートリーダーにより 450 nm の吸光度で測定し算出した。得られた測定値は、細胞に含まれる単位タンパク量当たりの OCN タンパク量として評価した。

【結果】

genistein 添加群では DMP-1、DSPP、Runx2、BSP、OPN、OCN、ALPase、TGF-βR1、ERβ の mRNA 発現量が genistein 未添加群と比較して有意に増加しており、特に G1 では 5~6 倍に発現量が上昇していた。一方、ERα および TGF-βR2 mRNA はすべての群で発現量に大きな変化はみられなかった。OCN タンパク量の定量では、genistein 添加群において産生量が顕著に増加していた。

【考察および結論】

Real time PCR 法の結果より、DMP-1、DSPP、Runx2 などの石灰化関連遺伝子群の発現が 10 日目以降に上昇していた。また OCN タンパク量の定量では、遺伝子発現後の 20 日目に産生量の増加が確認された。このことから、genistein 添加により TGF-βR1 を介して Smad1、5、8 および p38 のリン酸化活性を亢進させ、象牙芽細胞の分化成熟過程で発現する Runx2 および分化マーカーである ALPase の遺伝子発現を誘導し、さらに下流の DMP-1、DSPP、BSP、OPN、OCN の遺伝子発現を上昇させることで RDP を石灰化に導いたと考えられる。また、genistein は ERβ を介して p38 のリン酸化活性を亢進し、細胞周期を制御する cyclin D1、cyclin A の活性を阻害することで細胞増殖を抑制させることが考えられる。以上より、genistein は RDP を象牙芽細胞に分化させ、石灰化へと導く可能性が示唆された。

ラット培養歯髄細胞の石灰化へ血管内皮細胞培養上清が与える影響について

昭和大学歯科病院・歯内治療科¹、昭和大学歯学部・口腔生化学教室²
○増田 宜子¹、山田 嘉重¹、宮本 洋一³、上條 竜太郎³、宮崎 隆

Effects of the cultured medium of the endothelial cells on calcification of rat cultured dental pulp cells.

Showa University, School of Dentistry, Dept. of Conservative Dentistry, Division of Endodontology¹, Division of Oral Biomaterials and Technology², Dept. of Biochemistry³

○MASUDA Yoshiko¹, YAMADA Yoshishige¹, MIYAMOTO Yoichi³, KAMIJO Ryutarō³, MIYAZAKI Takashi²

(目的) 第 136 回の本学会において我々は、血管内皮細胞と歯髄細胞との膜を介した共培養と直接接した共培養とで TGF- β 1、Osteocalcin 遺伝子の発現に時期や発現量においてそれぞれ異なる影響が認められ、細胞間の距離によって遺伝子発現に相違があることを発表した。今回、歯髄細胞での Osteocalcin 遺伝子の発現の変化が血管内皮細胞が分泌する培養上清中の液性成分によるものなのかを血管内皮細胞の培養上清を用いて歯髄細胞を培養し Osteocalcin 遺伝子の発現の変化を調べることによって検討することとした。

(材料と方法) 5 週齢の雄性 Wister ラット 4 匹の下顎切歯より歯髄組織を摘出し、Collagenase、trypsin、EDTA を含む酵素液にて細胞を分離し 5%CO₂ 条件下にて α -MEM 培地に 10% FBS を加え培養した。

一方ラット大動脈内皮細胞(凍結細胞)(旭硝子)をラット内皮細胞成長培地(旭硝子)にて培養した。コンフルエントになった歯髄細胞を 1×10^4 cells/cm² の濃度で 6 well plate (Transwell[®], Corning Inc.) に継代した。

37°C、5%CO₂にて培養し、歯髄細胞へ培地 2/3、1/2、1/3 の割合で血管内皮細胞培養上清を混ぜて 2 日毎に交換した。7 日後に歯髄細胞の Total RNA を調整し cDNA を合成し Osteocalcin 遺伝子の発現を RT-PCR によって調べた。

(結果) 7 日後の RT-PCR の結果、歯髄細胞へ培地 2/3、1/2、1/3 の割合で血管内皮細胞培養上清を混ぜた場合血管内皮細胞の培養上清の割合が減るに従い Osteocalcin 遺伝子の発現も減少していた。

(考察及び結論) 血管内皮細胞の培養上清を 2/3、1/2、1/3 の割合で培地と混ぜ、歯髄細胞を培養すると培養上清の量が多くなる程 Osteocalcin 遺伝子の発現が増加したことから歯髄細胞の Osteocalcin 遺伝子の発現を増加させる因子が血管内皮細胞の液性成分に由来する可能性が示唆された。他の TGF- β 1 遺伝子や Dspp 遺伝子の発現や、血管内皮細胞から分泌される成分に関して検討していく予定である。

スフェロイド培養による歯髄細胞の特性変化の検討

¹東京医科歯科大学大学院医学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野

²東京理科大学 基礎工学部 生物工学科

○ 山本弥生子¹、川島伸之¹、鈴木規元¹、小泉悠¹、瀧本晃陽¹、齋藤正寛²、須田英明¹

Evaluation of pulpal cell properties by spheroid culture

¹Pulp Biology and Endodontics, Department of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

²Department of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science

○YAMAMOTO Mioko¹, KAWASHIMA Nobuyuki¹, SUZUKI Noriyuki¹, KOIZUMI Yu¹, TAKIMOTO Koyo¹, SAITO Masahiro², and SUDA Hideaki¹

【研究目的】

通常の平面培養法は、培養細胞が二次元的に配列し、立体構造を形成する生体環境とは異なることが知られている。一方、スフェロイド培養では、培養細胞同士が放出された細胞外基質とともに凝集体を形成し三次元構造を形成することから、細胞の機能を長時間維持することが可能となり、より生体に近い培養法と考えられている。これまで我々は、ヒト歯髄細胞をスフェロイド培養したところ、平面培養と比較して象牙芽細胞・骨芽細胞マーカーである *Dspp*, *Alp*, *Oc* の発現が有意に亢進したことを報告した (第 135 回日本歯科保存学会秋季学術大会)。本実験では、象牙芽細胞への分化能を有するマウス株化歯乳頭細胞を用い、スフェロイド培養が歯髄細胞に与える影響について、さらに詳細に分子生物学的・免疫組織学的解析を行った。

【材料および方法】

実験には、マウス株化歯乳頭細胞 (mouse dental papilla cells : MDP細胞) を使用した。スフェロイド培養では、MDP細胞を96穴PrimeSurface (住友ベークライト) に、 3×10^4 cells/well播種し、1, 3, 7, 14日間培養した。3日に1回メディアウム交換を行った。平面培養として、6穴マルチプレート (グライナナー) に同数播種したMDP細胞を使用した。各種染色用として、スフェロイド培養では、スフェロイドコロニーを4% paraformaldehyde (PFA) にて室温30分間固定後、phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄したものをO. C. T. コンパウンドに包埋し、厚さ $7 \mu\text{m}$ の凍結切片を作製した。平面培養では、細胞を24穴セルデスクLF1 (住友ベークライト) に 1×10^4 cells/well播種し、3日間培養後、4%PFAにて室温15分間固定、PBSにて洗浄したものを染色に用いた。

・象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカーのmRNA発現：細胞よりRNAを抽出し、cDNAを合成後、象牙芽細胞あるいは骨芽細胞に特異的なプライマー (*Dspp*, *Dmp*, *Alp*, *Oc*, *Bmp2*) を用いてリアルタイムPCRを行った。

・HE染色・ALP染色・免疫組織化学染色：作製した切片を使用し、HE染色、ALP染色を行った。また抗DMP-1, 抗p-FAK, 抗p-paxillin抗体を使用して免疫組織化学染色を行った。

【結果および考察】

スフェロイド培養したMDP細胞は、平面培養したものより有意に象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカーの発現の亢進が認められた。また、HE染色にて、スフェロイド培養の期間が長くなる程、コロニー外層部に細胞が層状に集合する様子が観察された。さらに、ALP染色および抗Dmp-1抗体を使用した免疫組織化学染色の結果、この外層部の細胞は、中心部の細胞と比較し、各種マーカーの発現が高いことが確認された。また、スフェロイド外層部の細胞においてインテグリンシグナル分子であるFAK, paxillinのリン酸化が亢進していた。以上の結果より、スフェロイド培養したMDP細胞は、インテグリンシグナルを介して象牙芽細胞・骨芽細胞への分化誘導が亢進されたと推察された。

【結論】

スフェロイド培養はMDP細胞の象牙芽細胞・骨芽細胞の分化誘導を促進し、その作用は特にスフェロイドコロニー外層部に認められた。

ヒト歯髄幹細胞の三次元培養による象牙芽細胞・骨芽細胞マーカーの変動

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 歯髄生物学分野

○ 川島伸之、山本弥生子、瀧本晃陽、小泉悠、鈴木規元、須田英明

Odonto-/osteoblast marker expression of human dental pulp stem cells in 3-D culture

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

○KAWASHIMA Nobuyuki, YAMAMOTO Mioko, TAKIMOTO Koyo, KOIZUMI Yu, SUZUKI Noriyuki and SUDA Hideaki

【研究目的】

未分化間葉組織である歯髄組織中に存在する歯髄幹細胞は、神経、脂肪、骨、軟骨といった多様な細胞に分化する能力を有しているが、ES細胞あるいはiPS細胞と異なり、体性幹細胞としてのオリジナルの特性をも維持している。すなわち、歯髄幹細胞は歯髄組織内においては象牙芽細胞のソースとして機能しており、硬組織形成細胞への分化能を有している。しかし抜去歯より分離された歯髄幹細胞は、通常の平面培養を経るうちに一般的な線維芽細胞へと変化していく。一方、三次元培養においては、より生体環境に近い状態で細胞を培養することができるため、よりオリジナルの特性を維持あるいは誘導することが可能であると推察される。今回、ヒト抜去歯より分離した歯髄幹細胞を三次元（スフェロイド）で培養し、その象牙芽細胞・骨芽細胞マーカー発現について検討した。

【材料および方法】

抜去歯の歯髄組織より歯髄幹細胞を採取し実験を行うことについて、患者に十分に説明し理解を得たうえで抜去歯を研究に供した（東京医科歯科大学歯学部倫理審査承認番号 第442番）。歯髄幹細胞の分離は、間葉系幹細胞分離法に準じて行った。すなわち、抜去歯より摘出した歯髄組織をメスにて細切後、コラゲナーゼI（2mg/ml）処理（37度、振とう、1h）を行い、セルストレーナー 40 μ m（BD Falcon 352340）フィルターにて濾過することで単細胞に分離し、 1×10^5 cells/cm²で細胞培養ディッシュに播種した。パッセージ3-4の細胞を、 4×10^4 cells/wellの濃度にて96穴PrimeSurface（住友ベークライト）あるいは6穴マルチプレート（グライナー）に播種し、3-7日間培養を行った。その後、サンプルよりRNAを抽出し、象牙芽細胞・骨芽細胞特異的マーカーのmRNA発現をリアルタイムPCRにて検討した。またアスコルビン酸および β グリセロリン酸を添加して石灰化誘導を行い、石化化物をアリザリン染色にて検討した。

【結果および考察】

三次元（スフェロイド）培養した歯髄幹細胞は、平面培養したものと比較し、有意に象牙芽細胞・骨芽細胞分化マーカーの発現の亢進が認められた。これは平面培養においては、細胞は隣在する細胞とのみ接触するが、三次元培養することにより細胞はより多くの細胞と立体的に接触し、その緊密な接触により誘導されたシグナル（インテグリンシグナル）が、歯髄細胞としての特性を特に強く誘発したと推察される。また石灰化誘導培地での培養により、三次元培養した歯髄幹細胞において、平面培養したものと比較してアリザリン陽性の石灰化物の沈着がより早期に認められた。三次元培養により象牙芽細胞・骨芽細胞分化能が維持および増強された結果として、石灰化が誘導されたと推察される。

【結論】

三次元培養は歯髄幹細胞の象牙芽細胞・骨芽細胞への分化誘導能および石灰化能を促進した。

微酸性電解水の *Enterococcus faecalis* に対する殺菌効果に与える作用温度の影響

鶴見大学歯内療法学講座、口腔微生物学講座

○中野雅子、小澤寿子、池野正典、高尾亞由子、前田伸子、細矢哲康

Influence of reaction temperature on antibacterial effect of slightly acidic electrolyzed functional water against *Enterococcus faecalis*

Department of Endodontology, Oral Microbiology, Tsurumi University, School of Dental Medicine

○NAKANO Masako, OZAWA toshiko, IKENO Masanori, TAKAO Ayuko,

MAEDA Nobuko, HOSOYA Noriyasu

【目的】

歯科用チェアユニットの流路に形成されるバイオフィルムの防止と除去は、歯科感染対策における重要な課題である。鶴見大学歯学部附属病院では、生体や環境への安全性と高い殺菌消毒効果が期待できる微酸性電解水（以下 SAW）を常時供給する歯科用チェアユニットを 2010 年 7 月に設置した。以降の継続した微生物学的検査から、本ユニットにおいてはバイオフィルム形成防止が認められている。われわれは SAW の効果を確認する目的で、水由来従属栄養細菌に対する殺菌効果を第 134 回日本歯科保存学会春季学術大会で、感染根管から分離される菌種 *Enterococcus faecalis*（以下 Ef）に対する殺菌効果を第 136 回日本歯科保存学会春季学術大会にて発表した。

今回は、SAW の至適使用条件を知る一環として、液温と Ef に対する殺菌効果との関係を検討した。

【材料と方法】

SAW（有効塩素濃度：10～30ppm、pH6.3～6.8）を、電解水生成装置を搭載した歯科用チェアユニット（SPACELINE EMCIA III型、(株)モリタ製作所）のコップ給水部より採取、直ちに実験に用いた。96 穴マイクロプレートに Ef を 37℃5 日間、好気または嫌気培養後、培養上清を除去した。附着菌を PBS 洗浄し、滅菌水または SAW を作用させた。反応温度は 4℃、20℃、37℃とし、1 分間（交換無しと 20 秒毎に液交換）、または 5 分間（交換無しと 1 分毎に液交換）経過後、チオ硫酸ナトリウム液で液を中和、ウェルを PBS で洗浄した。Alamar Blue(以下 AB)-Tryptic Soy Broth 混合液を添加して 37℃で培養し、蛍光強度変化（励起波長：530nm, 蛍光検出波長 590nm）により代謝活性を、さらにウェルをクリスタルバイオレット(以下 CV)染色した後の吸光度からバイオフィルム量を評価した。

【結果・考察】

作用液を交換しない場合は、SAW の液温が高いほどバイオフィルムの代謝活性が低下した。一方、液を交換した場合は、SAW は温度条件が 20℃以上であれば 1 分で十分な殺菌効果を示した。CV 染色によるバイオフィルム量の測定では、蒸留水に比較して有意な減少は認められず、バイオフィルム自体の破壊は期待できないことが示唆された。

SAW は Ef 浮遊菌に対し、15 秒で殺菌効果を示し（第 136 回日本歯科保存学会春季学術大会にて報告）、頻りに液を交換することでバイオフィルムの代謝活性も低下させることが可能である。一方でバイオフィルム自体の除去は困難と予想されることから、バイオフィルムの化学的または物理的除去方法を併用することが推奨される。すなわち、臨床での使用を想定した場合、多量の流水とともに超音波洗浄機器を介して行なう根管洗浄で、SAW をユニット水として使用するメリットが特に高いと考えられる。

また、SAW は浮遊状態の歯周病菌や齶蝕菌に殺菌効果を示すことが報告されているので、歯周ポケット洗浄やスクレーピング、歯面清掃、窩洞形成など日常の歯科診療において、口腔内の殺菌消毒効果において水道水と置き換えるメリットがあると思われる。

【結論】

SAW は Ef の実験的バイオフィルムに対し、20℃以上、かつ頻回交換で有効性を示すが、バイオフィルム自体の除去は困難であった。この特性を踏まえて、根管洗浄に用いるべきである。

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa* および *Enterococcus faecalis*
に対するイオン導入法の薬剤と通電法の影響に関する検討

鶴見大学歯学部・口腔微生物学講座
○小山隆夫、前田伸子

In-vitro Evaluation for Microbicidal Effects of Iontophoresis and a Relationship with medicines and electrical resistance against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*.

Department of Oral bacteriology, Tsurumi Univ. School of Dental Medicine
○Takao Oyama, Nobuko Maeda

【目的】

難治性根尖性歯周炎の原因は、根尖部における微生物の残存であることが、今日まで明らかにされてきた。同時に、多くの種類の微生物の検出が報告されている。

我々は、根尖性歯周炎実験モデルを用いて、いくつかの微生物に対する根管消毒剤やイオン導入法の抗菌効果について検討し、薬剤への反応は微生物種によって多種多様であることを、これまでの日本歯科保存学会で報告した。今回我々は根管モデルを用いて、イオン導入法における各薬剤の通電性と抗菌効果、さらに通電なし、陽極通電および陰極通電の影響について検討した。

【方法】

被検微生物株として *Escherichia coli* ATCC25922 株、*Pseudomonas aeruginosa* 27853 株および *Enterococcus faecalis* ATCC19433 株を用いた。被検微生物は Tryptic Soy 寒天培地上で培養後、およそ 10^6 cfu/ml となるよう調整した。

根管モデルを用いた根尖部病巣モデルは、根尖部病巣に相当する腔に、滅菌生食寒天 $30 \mu\text{l}$ 、被検微生物含有羊脱繊維血添加寒天 $30 \mu\text{l}$ 、滅菌生食寒天 $70 \mu\text{l}$ の順に重層し、実験的根尖部病巣とした。

イオン導入はカントップ・ジュニアを用いて、陽極通電および陰極通電した場合と、貼薬のみの場合で、それぞれの薬剤を比較検討した。イオン導入には、薬剤は 38% フッ化ジアンミン銀溶液 (DSF)、アンモニア銀溶液 (ASH)、カントップ用ヨード・ヨード亜鉛液 (IZI) を用いて、それぞれ 1mA の定電流で一定時間 (5 分・10 分・25 分・50 分) 作させた。

イオン導入後、あるいは貼薬後に根尖部病巣モデルから被検微生物を回収し、適宜希釈後コロニー数 (log CFU/ml) を測定した。また通電性については、電圧計にて 1 分間隔で電圧を測定し、抵抗値 (Ω) を算出した。

【結果と考察】

通電性に関しては、IZI がもっとも優れていた。IZI は、陽極および陰極通電の双方においても通電性は良好であった。抗菌性に関しては、*E. faecalis* をのぞいて、*E. coli* および *P. aeruginosa* に抗菌効果が認められた。さらに、陽極通電と陰極通電では、その抗菌性に違いが認められた。

DSF においては、陽極通電と陰極通電で通電性に違いがみられた。陽極通電で、*E. coli* および *P. aeruginosa* に抗菌性が認められた。しかし *E. faecalis* に対しては、必ずしもその抗菌性は十分といえず、さらに陽極通電と陰極通電で、その抗菌性に差が認められた。

ASH は、陽極通電では通電直後数分で抵抗値が上昇し、それと共に通電が不能になった。*E. coli*、*P. aeruginosa* および *E. faecalis* に対する ASH の抗菌効果が十分認められない原因として、薬剤および電極の分極が影響していることが示唆された。ところが、陰極通電では抵抗値上昇はわずかで、*E. coli*、*P. aeruginosa* および *E. faecalis* に対する抗菌効果が認められた。

以上、イオン導入法の抗菌効果に関して、各薬剤の通電性、さらに陽極通電および陰極通電が関与している可能性が考えられる。

【結論】

イオン導入法の抗菌性において、通電性さらに陽極通電あるいは陰極通電選択が関与することが示唆された。

根管洗浄剤としてのキトサン含有クエン酸溶液の抗菌効果：基礎的研究

昭和大学歯学部 歯科保存学講座 歯内治療学部門¹

昭和大学歯学部 歯科保存学講座 歯科理工学部門²

○鈴木重紀¹, 山田嘉重¹, 増田宜子¹, 宮崎隆²

The bactericidal effect of citric acid with chitosan oligomer as a root canal irrigant :in vitro

Division of Endodontology, Department of Conservative Dentistry, Showa University School of Dentistry¹

Division of Oral Biomaterials and Technology, Department of Conservative Dentistry, Showa University School of Dentistry²

○Shigenori Suzuki¹, Yoshishige Yamada¹, Yoshiko Masuda¹, Takashi Miyazaki²

<研究目的>

根管治療において、複雑な根管形態を機械的操作のみで全て清掃することは困難である。そこで、良好な根管治療の予後を獲得するためには化学的洗浄を組み合わせて使用することが一般的である。現在、根管洗浄剤として主に次亜塩素酸ナトリウムが用いられているが、その抗菌効果、有機質溶解作用の有効性が評価される一方で生体への有害性が報告されている。そこで、本実験では軽度の抗菌効果とスメアー層除去効果をもつクエン酸と、齶蝕抑制・歯周病予防に应用されているキチン・キトサンを使用し、生体への有害性の低い根管洗浄剤を作製し、*Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* に対するの抗菌効果について検討することを目的とした。

<材料及び方法>

①キトサン溶液の作製：pH3.5の10%クエン酸緩衝液にキトサンオリゴマー (COS-YS 焼津水産化学工業株式会社) を加え4.0%のキトサン溶液を作製した。

②抗菌効果の判定

実験群：未処理群 (供試した菌をPBSで希釈した群)、クエン酸緩衝液群 (10%クエン酸をNaOHにてpH3.5に調整した群)、キトサン溶液群 (前述のクエン酸緩衝液にキトサンオリゴマーを添加した群)

抗菌効果判定に供試した細菌は *Streptococcus mutans* (菌株：UA159)、*Enterococcus faecalis* (菌株：4532D) を使用した。この2菌種を、BHI液体培地 (Becton Dickinson, USA) を使用し嫌氣的条件下 (N₂ ; 80%, H₂ ; 10%, CO₂ ; 10%) において37℃で培養した。24時間培養した2菌種を試薬に30分間作用させた後、リン酸緩衝食塩水 (PBS) にて希釈し、BHI寒天培地に塗抹し、48時間後に生菌数 (CFU/ml) を求めて未処理群と比較し抗菌効果を判定した。

その後、1元配置分散分析とTurkey検定にて統計学的に有意差検定を行った。

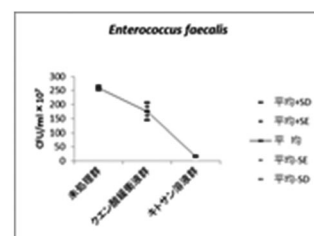
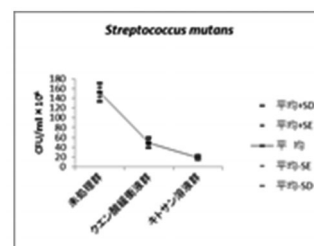
<結果>

供試した2菌種に対して、キトサン溶液群において生菌数 (CFU/ml) は有意に減少し最も抗菌効果が認められた。

また、*Streptococcus mutans* はクエン酸緩衝液群に、*Enterococcus faecalis* はキトサン溶液群に対し生菌数 (CFU/ml) が有意に減少したことから試薬に対する感受性に相違が認められた。

<考察・結論> 過去に、クエン酸の抗菌効果が *Streptococcus mutans* に対して高い抗菌性を示す一方で *Enterococcus faecalis* ではあまり有効でないことが報告されている。このことが、本実験においてクエン酸緩衝液群の2菌種の抗菌効果の差に反映されたと考えられる。また、キトサンオリゴマーには抗菌効果があることが既に報告されている。本実験で、キトサン溶液群はクエン酸緩衝液群よりも抗菌効果を認めた。このことからクエン酸緩衝液へのキトサンオリゴマーの添加が抗菌効果の作用を増強させたと考えられる。従来、クエン酸の抗菌効果の判定は、pH1.2~1.8・濃度10%~50%の条件下で行われてきた。その中でクエン酸の抗菌効果は、pH・濃度に影響されることが報告されている。本実験では、生体有害性を考慮し弱酸性 (pH3.5) に調整したクエン酸緩衝液を用いた。

このことから、従来よりもクエン酸による抗菌効果は期待できないが、キトサンオリゴマーを添加することで、その効果を補うことが出来たものと考えられる。以上の事から、本実験で作製したキトサン溶液の有効性が示唆された。



1%有意

ウォータージェットポンプを用いたスミア層除去に関する検討 — 噴射時間の影響について —

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座
○小倉陽子 前田宗宏 勝海一郎

Removal of Smear Layer Using Water Jet Pump, Effect of Machining Time.
Department of Endodontics, Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo.
○Ogura Y., Maeda M. and Katsuumi I.

【目的】

本学会の第 136 回学術大会において、ウォータージェットポンプを用いたスミア層の除去効果について報告した。今回は、ウォータージェットの噴射時間の影響について検討を行った。

【材料および方法】

実験には、象牙質に齶蝕のないヒト単根抜去歯 9 本を使用した。ダイヤモンドポイントを用いて咬合面中央部の象牙質内に縦 2 mm×横 2 mm×深さ 2 mm の窩洞を形成したのち、歯を 3 本ずつ 3 群に分けた。噴射洗浄用器具として、直径 0.1 mm の噴出口を持つウォータージェットポンプ装置（キャピタル工業株式会社）を使用し、噴射口が象牙質窩底部から垂直的に 10 mm の位置になるよう試料を固定後、水圧 5 MPa にて洗浄を行った。噴射条件は 3 分間 (Group 1) および 6 分間 (Group 2) とし、未噴射のものをコントロール (Group 3) とした。

噴射洗浄後の窩底の象牙質の状態を、走査電子顕微鏡 (SEM) で撮影した。窩底部内の任意の点 (5 カ所) を 1000 倍で撮影し、得られた観察画像をもとに象牙細管の開閉状態の判定を行った。判定は、歯内療法を専門とする研究者 3 名が Takeda¹⁾らの基準に基づき行った。

判定基準

- 0 : スミア層なし。細管は開口し、スミア層は完全に除去されている。
- 1 : 象牙細管の輪郭が観察可能であり、部分的なスミア層の除去を認める。
- 2 : 薄いスミア層による表面の被覆。象牙細管の位置はクラックにより示されるが、輪郭の確認は困難である。
- 3 : 分厚いスミア層による被覆。象牙細管の輪郭の確認は不可能である。

統計学的解析は、Kruskal Wallis による差の検定および、Tukey HSD による多重比較を行った。

【結果および考察】

いずれの群においてもスミア層が完全に除去されたものはなかった。Group 1 では切削片などの汚れはなく、象牙細管の状態はクラックによりその輪郭がわかるものが多かったが、細管が開閉しているものはなかった。Group 2 ではクラックによって象牙細管の輪郭が確認でき、部分的に開口が見られるものもあるが、分厚いスミア層で被覆されたものもあり、ばらつきが見られた。Group 3 では切削片などの汚れは少なく、象牙細管はクラックにより位置が示されているものの、輪郭が確認できるものは少なかった。スコアの平均値は Group 1; 2.29 (±0.69), Group 2; 2.33 (±0.70), Group 3; 2.45 (±0.59) であり、各群間に差は認められなかった ($p>0.05$)。

今回の結果から、スミア層除去を目的としてウォータージェットポンプ装置を用いて水圧 5MPa にて窩底部の洗浄を行った場合、切削片等の汚物は除去できるものの、スミア層の除去効果に対する噴射時間の影響は少ないことが示唆された。切削片は象牙細管内に侵入しスミア層の除去を困難にしていることが考えられ、今後、更に詳細に検討を行う予定である。

1) Takeda FH, Harashima T, Kimura Y, Matsumoto K : A comparative study of the removal of smear layer by three endodontic irrigants and two types of laser; Int Endo J 32, 32-39, 1999.