

## 試作レジンコアシステム (TDK-03) の象牙質接着強さの経時的推移

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>,

○清水裕亮<sup>1</sup>, 古市哲也<sup>1</sup>, 鈴木英梨子<sup>1</sup>, 山路 歩<sup>1</sup>, 大塚詠一朗<sup>1</sup>,

利根川雅佳<sup>1</sup>, 坪田圭司<sup>1,2</sup>, 黒川弘康<sup>1,2</sup>, 宮崎真至<sup>1,2</sup>

### Changes in dentin bond strength of experimental core foundation system (TDK-03) as a function of time

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry<sup>1</sup>

Division of Biomaterials Science, Dental Research Center<sup>2</sup>,

○SHIMIZU Yusuke<sup>1</sup>, FURUICHI Tetsuya<sup>1</sup>, SUZUKI Eriko<sup>1</sup>, YAMAJI Ayumi<sup>1</sup>, Otsuka Eiichiro<sup>1</sup>,

TONEGAWA Motoka<sup>1</sup>, TSUBOTA Keishi<sup>1,2</sup>, KUROKAWA Hiroyasu<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>

#### 【研究目的】

抜髄あるいは感染根管処置後に、歯冠が大きく崩壊した歯に対して、コア用レジンを用いて支台築造を行う頻度が増加している。これらコア用レジンの歯質接着性については、接着操作から 24 時間以上経過した後に、接着強さ試験を行うことによって評価しているものがほとんどである。しかし、臨床においては照射直後から、支台歯形成をはじめとした多様な外力が接着界面に加わっており、その接着初期の評価も重要と考えられる。

そこで、コア用レジンの臨床術式の確立に資する研究の一環として、試作レジンコアシステム (TDK-03) を用いて、光照射初期からの象牙質接着強さの経時的推移について検討した。

#### 【材料および方法】

供試したコア用レジンには、試作レジンコアシステム TDK-03 (Tokuyama Dental, 以後 TD), DC コアオートミックス ONE (Kuraray Noritake Dental, 以後 DC) およびユニフィルコア (GC, 以後 UC) の、合計 3 製品とした。

#### 1. 被着歯面の調整

被着体は、2~3 歳齢のウシ下顎前歯の歯冠部を常温重合レジンに包埋したものをを用いた。次いで、唇面の象牙質を露出させ、SiC ペーパーの#600 まで研削し、被着歯面とした。

#### 2. 接着試験用試片の製作

被着歯面に対してアドヒーズ処理を行い、内径 4 mm, 高さ 2 mm の円筒形テフロン型を静置し、レジンペーストを型に填塞したものを接着試片とした。アドヒーズおよびコア用レジンに対する光照射条件は、照射器の光強度を 0 (照射なし) あるいは 600 mW/cm<sup>2</sup> (照射あり) に設定し、製造者指示時間で照射を行った。

#### 3. 接着試験

接着試片は、照射後ただちに 37°C 精製水中に移送し、その保管条件としては、10, 20, 30, 60 分および 6, 12 および 24 時間の合計 7 条件とした。所定の保管期間が経過した接着試片について、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いて、クロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件で剪断接着強さを測定した。

#### 4. SEM 観察

コア用レジンと象牙質との接合状態を検討するため、接着試験用試片と同様に調整した試片を、通法に従って製作し、FE-SEM (ERA-8800FE, Elionix) を用いて、その接合界面を加速電圧 10 kV の条件で観察した。

#### 【成績および考察】

TD における保管期間 24 時間後の接着強さは、照射あり条件で 16.3MPa, 照射なし条件で 13.8MPa を示し、いずれの条件においても DC および UC と比較して有意に高い値を示した。また、TD における初期接着強さの上昇傾向は、照射あり条件で 30 分以降から 24 時間、照射なし条件で 60 分以降から 24 時間までの接着強さに有意差が認められなかった。一方、DC および UC の初期接着強さは、いずれの光照射条件においても、保管期間の経過に伴って、上昇する傾向を示した。このように、製品によって 24 時間後の接着強さおよび初期接着強さの上昇傾向に違いが認められたのは、重合触媒の違いなどが関与した可能性が考えられた。TD と象牙質との接合界面の SEM 観察では、いずれの光照射条件においても、ギャップの形成は認められず良好な接合状態を示した。

#### 【結論】

本実験の結果から、試作レジンコアシステムである TDK-03 は、優れた歯質接着性を有する接着システムであることが示された。また、コア用レジンの光照射初期からの象牙質接着強さの経時的推移は、光照射の有無および製品により違いにより異なる傾向を示すことが判明した。

## 接触硬化型接着材を用いたレジンコアシステムの接着性能

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室

○門脇佳孝, 角田晋一, 川野晋平, 勝俣愛一郎, 星加修平, 中沖靖子, 池田考績, 田中享, 佐野英彦

### Bond Performance of “Touch & Cure” adhesive on resin core system

Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science,

Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

○Yoshitaka KADOWAKI, Shinich KAKUDA, Shimpei KAWANO, Aiichiro KATSUMATA, Shuhei HOSHIKA

Yasuko NAKAOKI, Takatsumi IKEDA, Toru TANAKA, Hidehiko SANŌ

#### 【研究目的】

レジンコアシステムは、歯質深部へ照射光が行き渡らず光硬化型では重合が不十分になる可能性があり、その対策として化学重合も可能な接触硬化型接着システムが採用されている。しかし、このようなデュアルキュア型のシステムでは、光照射時に比べて、化学重合のみでの硬化は不十分であると考えられる。そこで、トクヤマ社から光重合を必要としない接触硬化型接着材を使用したレジンコアシステムが開発されたため、従来のコアシステムと比較検討した。

#### 【材料および方法】

9本のヒト抜去大臼歯を実験に供した。実験には、新規レジンコアシステムである TDK-03 (TDK; トクヤマデンタル)、市販されているクリアフィル DC コア オートミックス ONE (DC; クラレノリタケデンタル)、ジーシー ユニフィルコア EM (Uni; ジーシー) を使用した。歯冠部エナメル質を歯軸に対して垂直にモデルトリマー (モリタ) にて象牙質表面を露出させ耐水研磨紙 (#600) にて研削したものを被着面とし、各接着材料を説明書に従って塗布し 4.0 mm の厚さにコア材料を築盛した。この際、暗室の安全光下で光照射は行わず室温 23°C に設定し作業を行った。築盛後、安全光は消灯し 30 分間放置した。作製された試料を 24 時間 37°C の水中に保存後、精密低速切断機 Isomet により象牙質接着界面が 1mm 四方となる角柱型ビームを作製し、万能試験機 EZ-test を用いて微小引張り試験をクロスヘッドスピード 1mm/min の条件にて行った。統計処理は一元配置分散分布と Games-Howell 検定を用いて行った ( $p < 0.05$ )。さらに走査型電子顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて破断面と接着界面の観察を行った。

#### 【成績】

微小引張り接着強さの結果を以下に示す。同じ上付き文字は有意差が無かったことを示す ( $p > 0.05$ )。

	TDK	DC	Uni
MPa (Ave.±SD)	45.7±33.2 <sup>A</sup>	14.8±6.8 <sup>B</sup>	9.1±4.4 <sup>B</sup>

超微小形態観察では、各材料で樹脂含浸層が確認された。

#### 【考察】

TDK が DC, Uni よりも有意に高い接着能を示したのは、化学重合型で接触硬化型接着材 (ELT) の性能が DC や Uni の化学重合方式よりも優れていたためと思われる。また、TDK は光重合下においても暗条件と同等な接着強さを得られることが報告されている (Kadowaki *et al.*, 2013 5th IAD, Philadelphia)。そのため、TDK はコア材料として臨床的に有用であることが示唆された。

#### 【結論】

新規レジンコアシステムの TDK-03 は、クリアフィル DC コア オートミックス ONE とジーシー ユニフィルコア EM より、暗条件において有意に高い接着強さを示した。

## 試作レジンセメントにおける接着強さの経時的変化

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>,  
○瀧本正行<sup>1</sup>, 鈴木崇之<sup>1</sup>, 野尻貴絵<sup>1</sup>, 白土康司<sup>1</sup>,  
古宅眞由美<sup>1</sup>, 市野 翔<sup>1</sup>, 升谷滋行<sup>1,2</sup>, 宮崎真至<sup>1,2</sup>

### Determination of Bond Strength of Experimental Resin Cement

Department of Operative Dentistry<sup>1</sup>, Division of Biomaterials Science Dental Research Center<sup>2</sup>,  
Nihon University School of Dentistry

○TAKIMOTO Masayuki<sup>1</sup>, SUZUKI Takayuki<sup>1</sup>, NOJIRI Kie<sup>1</sup>, SHIRATSUCI Kouji<sup>1</sup>,  
KOTAKU Mayumi<sup>1</sup>, ICHINO Sho<sup>1</sup>, MASUTANI Shigeyuki<sup>1,2</sup> and MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>

#### 【緒言】

審美性歯冠修復物に用いられるセラミックスなどの脆性材料の装着には、余剰セメントの除去あるいは咬合調整など、装着直後から様々な外力がセメントに加わるところから、歯質との強固な接着を目的としてレジンセメントが用いられている。これらレジンセメントの重合硬化方式としては、デュアルキュア型が採用されているが、光照射が不足する条件においては、その機械的性質が低下するとともに接着強さに不安が残るのが現状である。今回、操作時間の短縮および重合性の向上を目的とした試作レジンセメントが開発された。そこで演者らは、装着後の経過時間および光照射の有無がレジンセメントの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】

レジンセメントは、試作セメントとして ECD-90 (トクヤマデンタル) を用いた。対照として パナビア F2.0 (クラレノリタケデンタル) およびクリアフィルエスティックセメント (クラレノリタケデンタル) を、自己接着性レジンセメントとしてユニセム 2 オートミックス (3M ESPE) を用いた。また、レジンセメントを用いる際は、各セメント付属のプライマーを用いて製造者指示条件に従って歯面処理を行なった。

#### 1. 被着歯面の調整

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

#### 2. 接着試片の製作

内径 4 mm、高さ 2 mm の円筒形テフロン型に硬質レジンペースト (パールエステ、トクヤマデンタル) を充填、加圧成形し、2 分間光照射して重合した後、24 時間大気保管した。この試片の表面をアルミナ粒子でサンドブラスト処理した後 (0.1~0.2 MPa)、5 分間超音波洗浄した。接着試片の製作は、レジンセメントでは、サンドブラスト処理面に対してシランカップリング処理を行うとともに、被着面に対して歯面処理を行った後、練和したセメントを塗布した試片を被着面に対して荷重 0.2 N の条件で圧接しながら、マイクロブラシを用いて余剰セメントの除去を行った。一方、自己接着性レジンセメントでは歯面処理およびシランカップリング処理することなく同様の操作を行った。照射を行う条件では 2 方向から照射器の光強度をそれぞれ 600 mW/cm<sup>2</sup> に設定し、30 秒間光照射を行った。また、照射を行わない条件では、5 分間圧接したものを接着試片とした。

#### 3. 接着強さの測定

照射あり条件では照射終了直後から、照射なし条件では被着面に対して接着試片を圧接した直後から、37±1℃、相対湿度 90±5% の条件で試片を保管し、10、20、30 分および 1、6、12 および 24 時間経過後、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いて剪断接着強さを測定した。なお、各条件における試片数は 10 個とした。また、各保管時間での歯質とレジンセメントとの接合界面および接着試験後のセメント側破断面について SEM 観察を行った。

#### 【成績および考察】

試作セメントの接着強さは、照射あり条件では 13.1~18.5 MPa および照射なし条件では 6.7~13.1 MPa を示した。また、24 時間経過後の接着強さを基準とした場合の接着強さの到達率は、10 分経過後で照射あり条件で 71% および照射なし条件で 51% と安定した値を示した。このように高い接着強さを示した理由としては、セメントの組成や接着性モノマーおよび重合開始剤の特性によるものと考えられた。

#### 【結論】

試作セメントの接着強さは経時的に上昇するものの、他の製品と比較して接着初期から安定した接着強さを示した。また、試作セメントの接着強さは照射なし条件で低下するものの、他の製品と比較して光照射の影響は小さいものであった。

## 乾燥および湿潤した歯面に有効な all-in-one 接着システムの開発

虎の門病院・歯科<sup>1)</sup>，鶴見大学歯学部教育探索寄附講座<sup>2)</sup>  
○宇野 滋<sup>1)</sup>，阿保備子<sup>1) 2)</sup>，陶山雄司<sup>1)</sup>，森上 誠<sup>1)</sup>，杉崎順平<sup>1)</sup>，山田敏元<sup>1)</sup>

### Development of an all-in-one adhesive available for dry/moist tooth surfaces

Toranomon Hospital, Department of Dentistry<sup>1)</sup> and

Tsurumi University School of Dental Medicine, Department of Translational Research<sup>2)</sup>

○Shigeru UNO<sup>1)</sup>，Tomoko ABO<sup>1) 2)</sup>，Yuji SUYAMA<sup>1)</sup>，Makoto MORIGAMI<sup>1)</sup>，Jumpei SUGIZAKI<sup>1)</sup>，Toshimoto YAMADA<sup>1)</sup>

【研究目的】被着面の乾燥状態は接着性を左右する重要な要因である。口腔内において被着面の乾燥状態を実験室と同様に規定することは困難である。本研究は、乾燥あるいは湿潤状態でも有効な all-in-one 接着システムを開発することを目的として行った。

【材料と方法】本目的のために、試作 all-in-one 接着システム(ユーデント社、千葉)を考案した。試作品の主成分はリン酸エステル系モノマーと Bis-GMA であり、溶媒としてエタノール、アセトンおよび水が配合されている。

1) ウシ歯質に対する引張接着強さ：ウシ下顎前歯を#600 の耐水研磨紙を用いてエナメル質あるいは象牙質平面を作製した。この面を強圧で 5 秒間エアブロー乾燥した場合（乾燥）と、さらに唾液汚染水溶液 0.05  $\mu$ l にて湿潤させた場合（湿潤）の 2 条件を設定した。試作接着材を各被着面に塗付し 10 秒間静置後 5 秒間中圧にてエアブローし、10 秒間光照射した。この上にコンポジットレジンを築盛し 30 秒間光照射した。24 時間水中保存後、ジグを固定し引張接着強さを計測した。各群ともに 6 試料を用いた。

2) ヒト歯質との接合界面の SEM 観察：ヒト大臼歯歯冠部を#1000 の耐水研磨を用いて平坦とし被着面とした。上記と同様に 2 条件下で接着試料を作製した。試料を半切後エポキシレジンに包埋し、切断面を鏡面研磨した。アルゴンイオンエッチングを施した後、白金蒸着し接合界面を FE-SEM にて観察した。

【結果】引張接着強さは、乾燥条件ではエナメル質 21.6 $\pm$ 3.8 MPa および象牙質 20.3 $\pm$ 2.0 MPa であり、湿潤条件ではエナメル質 21.6 $\pm$ 1.8 MPa および象牙質 21.0 $\pm$ 6.1 MPa であった。この 4 群間に統計学的有意差は認められなかった ( $p>0.05$ )。SEM 観察では、乾燥および湿潤条件において同様な界面像が得られ、エナメル質および象牙質に対して緊密な接合状態を示していた。

【まとめ】試作 all-in-one 接着システムは乾燥および湿潤双方の条件下においても有効であると示唆された。また、溶媒としてエタノール、アセトンおよび水の 3 種を適切な割合で使用することにより、その接着性が歯面の湿潤状態に影響されづらいことが判明した。

## 白金ナノコロイドを加えた酸処理が試作 1 ステップボンド (KUB-100) の 象牙質接着強さに及ぼす効果

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室

○勝俣愛一郎、門脇佳孝、川野晋平、星加修平、池田考績、田中享、佐野英彦

### The effect of etchant with colloidal platinum nanoparticles on micro-tensile bond strength to dentin using a new 1-step bonding (KUB-100)

Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine

○A. Katsumata, Y. Kadowaki, S. Kawano, S. Hoshika, T. Ikeda, T. Tanaka, H. Sano

【目的】白金ナノコロイドは白金の微粒子によって形成されたコロイドであり、健康食品や化粧品などに広く応用されている。その特徴として低アレルギー性や、高い還元作用と触媒機能を持ち、活性酸素を抑える働きがあることが報告されている。私たちはナノテクノロジーの歯質接着領域への応用として、白金ナノコロイドが4-META-MMA/TBBレジンに対して象牙質接着強さの向上が期待できるという結果を本学会で報告した。しかし、他の接着システムに関しては一定の結果が出ていない。そこで今回、白金ナノコロイドが試作 1 ステップボンディング材(KUB-100)の象牙質接着強さに与える影響を微小引張り試験にて検討した。

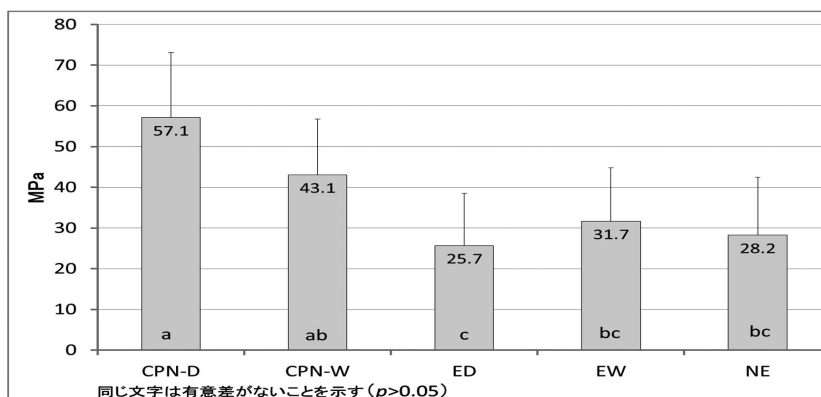
【材料および方法】接着材としてクラレ/リタケデンタル社の試作ボンディング材 KUB-100 (以下 KUB)、充填材として同社のクリアフィル AP-X(以下 AP-X)、表面処理材として同社の K エッチャント GEL (以下 Ech)とアプト社から提供された白金ナノコロイド原液とリン酸を混和して 35%リン酸としたもの(以下 CPN)をそれぞれ用いた。

健全ヒト抜去歯の歯冠部中央を歯軸に対して垂直に精密低速切断機(Isomet)を用いて切断し、象牙質面を露出させた後に研磨紙#600 で研削・水洗したものを被着面とした。歯面処理は以下(1)から(5)の方法で行った。

- (1) NE:KUBを塗布 10 秒、乾燥 5 秒、光照射 10 秒(メーカーの指示どおり:コントロール)
- (2) CPN-D:CPN15 秒塗布、5 秒水洗してエアブロー、KUBをNEと同様に使用
- (3) CPN-W:CPN-Dと同様の操作だが、CPN 塗布・水洗後エアブローなし
- (4) ED:Ech 15 秒塗布、5 秒水洗、エアブロー、KUBをNEと同様に使用
- (5) EW:EDと同様の操作だが、エッチング・水洗後エアブローなし

上記各処理後に AP-X を約4mm の高さに積層充填し、37°Cの水中に保管した。24 時間後 Isomet により象牙質接着界面が1 mm<sup>2</sup>となる角柱型ビームを作製し、小型卓上試験機 EZ-test (島津製作所)を用いて微小引張り試験をクロスヘッドスピード 1mm/min の条件にて行った。統計処理は一元配置分散分析と Tukey 検定を用いて有意水準 5%にて行った。

【結果および考察】各条件における微小引張接着強さは、NE が 28.2±14.2(MPa)、CPN-D が 57.1±16.0(MPa)、CPN-W が 43.1±13.8(MPa)、ED が 25.7±12.8(MPa)、EW が 31.7±13.2(MPa)であった。CPN-D は、ED および NE と比べて有意に高い接着強さを示した。CPN を用いていない ED、EW と NE 間に有意差は認められなかった。このことから今回用いた KUB に対して CPN は接着強さを向上したが、その効果は被着象牙質面の潤滑状態により影響を受ける可能性が示された。今後は他の 1 ステップボンディング材に対する効果についても検討予定である。



## クエン酸・酒石酸配合 BO 試薬におけるスマア一層除去効果向上への検討

昭和大学歯学部歯科保存学講座歯内治療学部門

<sup>1</sup>奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯内療法学分野

<sup>2</sup>昭和大学歯学部歯科保存学講座歯科理工学部門

○山田嘉重, 増田宜子, 木村裕一<sup>1</sup>, 藤島昭宏<sup>2</sup>, 宮崎隆<sup>2</sup>

### Evaluation on the improvement of smear layer removal by the BO reagent with citric acid or tartaric acid

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

<sup>1</sup>Division of Endodontics, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry

<sup>2</sup>Division of Oral Biomaterials and Technology, Department of Conservative Dentistry, Showa University School of Dentistry

○YAMADA Yoshishige, MASUDA Yoshiko, KIMURA Yuichi<sup>1</sup>, FUJISHIMA Hiroaki<sup>2</sup>, MIYAZAKI Takashi<sup>2</sup>

#### 【緒言】

これまで我々は化学的・機械的齶蝕除去剤としてプロメライン酵素とオレンジオイルを主成分とした生体に安全な成分で構成された BO 試薬を開発し、これまで日本歯科保存学会を含む複数の学会でその成果を報告した。本試薬は齶蝕象牙質除去に大変有効であるが、窩洞内のスマア一層除去効果はほとんどなく、コンポジットレジン充填前にはスマア一層除去のため EDTA 等による象牙質の処理が必要である。一般的にスマア一層の除去には EDTA の他にリン酸、クエン酸などが使用されているが、我々はこれまで酒石酸もスマア一層除去効果を有することを確認している。酒石酸、クエン酸はともに生体組織に有害性の少ない酸であることが知られている。本研究では BO 試薬にクエン酸や酒石酸を配合することで、齶蝕除去時間およびスマア一層除去効率が向上するかどうか、またその後のコンポジットレジン充填の接着性に影響を与えるかを検討することを目的とした。

#### 【材料および実験方法】

本研究には BO 試薬に 5%酒石酸, 5%クエン酸, 10%酒石酸, 10%クエン酸をそれぞれ配合した 4 種類の試薬を新たに試作した。歯頸部に齶蝕を有するヒト抜去歯 40 本を無作為に 8 本ずつ 5 グループに分類し、上記新規 4 試薬と BO 試薬をそれぞれ齶蝕窩洞面に塗布してから 30 秒後に齶蝕除去を施行し、齶蝕除去時間を測定した。齶蝕除去法とその判定法は過去の発表に準じて行った。齶蝕除去終了後、各グループから 3 本ずつを選出して、窩洞表層の状態を確認するため走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。各グループ残り 5 本はセルフエッチングプライマーで処理後コンポジットレジン充填を行った後にサーマルサイクリングを 2 万回施行後、辺縁漏洩試験を行った。

#### 【結果】

齶蝕除去時間はクエン酸、酒石酸を配合した場合には BO 試薬単独の場合に比較して処置時間の短縮傾向を示した。SEM の結果では BO 試薬単独でスマア一層により象牙細管は閉鎖していたが、クエン酸と酒石酸を配合した試薬では、部分的にスマア一層が除去され象牙細管が開いているのが確認された。クエン酸と酒石酸の配合の違いにおけるスマア一層の除去の程度の差異は明確にされなかったが、クエン酸配合、酒石酸配合ともに 5%配合より 10%配合において明らかに象牙細管が開いている割合が広範囲に確認された。辺縁漏洩試験の結果では BO 試薬単独に比較してクエン酸、酒石酸処置した場合に漏洩状態は減少していた。特に酒石酸、クエン酸ともに 10%配合により漏洩状態の減少が顕著に観察された。

#### 【考察】

BO 試薬に各種酸を配合することでスマア一層の除去効果が認められたこと、辺縁漏洩の程度が減少したことより、BO 試薬に、クエン酸や酒石酸を配合することは、齶蝕除去後の窩洞とコンポジットレジンとの接着性の向上に有効であるものと推測される。しかし、その効果は 5%配合では十分ではなく、10%以上の配合が必要であると考えられる。またクエン酸、酒石酸を配合することで、齶蝕除去時間の短縮傾向が認められたことなどからクエン酸、酒石酸は BO 試薬の効果を阻害することなく、齶蝕除去効果を向上させることができることが確認された。しかし、今回使用した試作試薬においてもスマア一層の除去効果や漏洩防止効果は十分ではないことから、さらなる検討が必要であると思われる。

#### 【結論】

本研究結果により、BO 試薬にクエン酸や酒石酸を配合することでスマア一層の除去効果が期待でき、その結果コンポジットレジンの接着性が向上することが確認された。またその効果はクエン酸、酒石酸において明確な違いは確認されなかったが、5%配合より 10%配合においてその効果が顕著に認められることが確認された。

## セルフエッチングプライマーを用いたボンディングシステムを用いた 歯頸部レジン修復物の長期臨床成績

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  
○遠藤 達雄、青沼 哲、笹崎 弘己、齋藤 正寛

### Long Term Clinical Assessment of Cervical Resin Restorations using self-etching type Bond system

Division of Operative Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

○ENDO Tatsuo, AONUMA Satoshi, SASAZAKI Hiromi and SAITO Masahiro

**【研究目的】** 近年の歯質へ接着させる接着システムの進歩により、4-META-MMA-TBB 系のボンディングシステムや酸処理後プライマーおよびボンディング材を適用する 3step 型ボンディングシステムの開発で、歯質への接着は飛躍的に改善された。しかし、これらの接着システムは操作性に煩雑な点があるため、より簡便な操作性を持つ接着システムへの改善が求められていた。これらの問題を解決するために、酸処理とプライマー処理を一体化することにより操作性を改善したセルフエッチングプライマーシステムが開発されたが、その長期安定性に関しては報告されていない。そこで本研究では、USPHS criteria に準じた評価基準を用いて、セルフエッチングプライマーシステムの長期臨床成績を明らかにすることを目的に、4-META-MMA-TBB システムおよび 3step 型システムをコントロールとし、歯頸部レジン修復合計 126 症例について最長 18 年までの臨床評価を比較検討した結果を報告する。

#### 【実験材料および方法】

##### 1. 対象症例

外来患者に事前に十分なインフォームドコンセントを行い、了解が得られた後に歯頸部に WSD もしくは C2 程度のウ蝕を有する患者に対して修復を行った。なお、当研究は東北大学歯学部附属病院倫理委員会で承認を得ている。(承認番号 22-10)

##### 2. 実験に用いた材料

セルフエッチングプライマーを用いるボンディングシステムとして Liner bond II (Kuraray ; 以下 LB II と略記)を用いた。従来型のボンディングシステムとして、4-META-MMA-TBB 系の Super bond C&B (Sun medical ; 以下 SB と略記)および 3step 型の D liner (Sun medical ; 以下 DL と略記)を用いた。SB 使用群では窩洞内面に適用後 10 分間静置してからコンポジットレジンで充填した。LB II 使用群では低粘度レジン Protect liner (Kuraray)を適用後、コンポジットレジンで充填した。

##### 3. 臨床成績の評価方法および統計処理

充填後定期的にリコールし、臨床成績の評価およびレプリカ法を用いて辺縁部の SEM 観察を行った。問題のない症例を Alpha、わずかに欠陥があるものの臨床的には問題なしと判定された症例を Bravo、再修復の必要ありと判定された症例を Charlie として分類した。Alpha と Bravo の合計残存率について各群間の比較を行ない、残存率の差の検定を generalized Wilcoxon, Cox-mantel, Longrank および Mantel-Haenszel test を用いて行った。

#### 【結果及び考察】

1. 各群間の残存率の差の検定結果 (危険率 5%)は、SB 群と LB II 群間に有意差が無く、DL 群は他の 2 種に比較して有意に短いという結果であった。セルフエッチングプライマーを用いるボンディングシステムは 3step 型ボンディングシステムに比較するとより簡便な操作性を有するにもかかわらず、長期臨床成績は優れていた。

2. SB 群においては、84 ヶ月以降コンポジットレジンの脱落が増え、216 ヶ月後には 36 症例中 32 症例で脱落が観察された。脱落したすべての症例において、歯面に SB が残存していたため、SB とコンポジットレジン間の接着が長期的に劣化するものと考えられた。これに対して LB II 群では、脱落は 45 症例中 4 症例のみであり、10 年を超えるような長期になるとより安定性に優れているものと考えられる。

3. 長期残存症例では、臨床的不快症状はみられず、肉眼的には辺縁部の適合性に問題がなかったものの、SEM 観察を行うと辺縁部にステップの存在が観察された。肉眼的な観察には限界があるものと考えられた。

**【結論】** セルフエッチングプライマーを用いるボンディングシステムの臨床成績は、長期にわたり歯質に対して非常に良好な接着を示し、その成績は 4-META-MMA-TBB 系のボンディングシステムと同等であった。

## 歯頸部修復に対するフロアブルレジンの有用性

日本歯科大学生命歯学部

<sup>1</sup> 歯科保存学講座, <sup>2</sup> 接着歯科学講座

○丸山沙絵子<sup>1,2</sup>, 河合貴俊<sup>2</sup>, 原 学<sup>2</sup>, 柵木寿男<sup>2</sup>, 奈良陽一郎<sup>2</sup>

## Availability of flowable resin composite for cervical restoration

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

○MARUYAMA Saeko<sup>1</sup>, KAWAI Takatoshi<sup>2</sup>, HARA Manabu<sup>2</sup>, MASEKI Toshio<sup>2</sup>, NARA Yoichiro<sup>2</sup>

**【研究目的】** 歯頸部は、齲蝕症や摩耗症の好発部位であり、審美的要求度も高い部位といえる。さらに、咀嚼力や咬合力の応力集中によって二次齲蝕や褐線の発現をきたしやすいことから、修復頻度が高い部位となっている。したがって、修復を必要とする症例では、審美的なコンポジットレジン接着修復によって対応することが現状となっている。また今日では、歯頸部修復に際し、従前のユニバーサルレジンに加え、フロアブルレジンが多用されるようになってきている。しかし、材料学的特性の異なるこれらコンポジットレジン応用による接着挙動の違いや有用性については、未だ明確とはなっていない。そこで本研究では、フロアブルレジンとユニバーサルレジンによる歯頸部修復に対し口腔内環境を想定した複合ストレスを負荷することにより、辺縁封鎖性、窩洞内微小引張接着強さ( $\mu$ -TBS) および接着信頼性の観点から評価検討を行った。

**【材料および方法】** 被験歯には、本研究倫理委員会の承認を得てヒト抜去健全下顎小白歯 30 本を用いた。材料には、修復用レジンとしてフロアブルレジンの Filtek Supreme Ultra Flow(F: 3M ESPE)、ユニバーサルレジンの Filtek Supreme Ultra(U: 3M ESPE)を用い、接着システムとしてエッチアンドリンシステム Adper Single Bond Plus(3M ESPE)を使用した。はじめに被験歯に対し、歯頂側壁がエナメル質と象牙質によって、歯肉側壁が象牙質のみによって構成される歯頸部規格化 V 字状窩洞を形成した。ついで、製造者指定の歯面処理後、窩洞試料を F 群と U 群に区分し、それぞれ F または U による窩洞一塊填塞を施し、照射を行った。その後、37°C 湿ボックス中の 24 時間保管を経て、Soflex® XT(3M ESPE)による一連の研磨を行った。修復試料は複合ストレス、すなわち 5°C/55°C 間 (各 20 秒間浸漬)200 セットのサーマルサイクリングと 12kgf × 1 万回(90 回/分)の繰り返し荷重による同時負荷を加えた。負荷後の試料は、直ちに 37°C 1%メチレンブルー水溶液中に 1 時間浸漬し、ついで全試料は歯軸と平行に窩洞中央部で半切研磨後、色素浸透状態の評価を行い、一修復試料から得た近心・遠心両試料結果のうち、色素浸透がより進行した試料のスコアを代表値(n=15)として採択した。なお、漏洩試験結果は Kruskal-Wallis の検定と Wilcoxon の符号付順位検定による分析を行った。その後、近心・遠心 2 試料それぞれから厚さ 1.0mm の板状切片を切り出し、歯肉側壁中央部の象牙質面に対する  $\mu$ -TBS 値測定のために、被着面積 1.0mm<sup>2</sup>、最狭窄部幅・厚さ・平行部長さ各 1.0mm の規格化ダンベル状試料に調製後、テストスピード 1.0mm/min 下における測定(n=30)を行った。得られた  $\mu$ -TBS 値に対して、一元配置分散分析およびメジアンランク法によるワイブル分析によって統計学的解析を行った。

**【成績】 漏洩評価:** Fig. 1 に微小漏洩結果を示す。歯頂側壁・歯肉側壁共に、F は U より有意に(p<0.01・p<0.05)小さい漏洩を示した。また、F の歯肉側壁漏洩は歯頂側壁漏洩より有意(p<0.01)に大きく、一方、U においては窩壁の違いによる差は認められなかった。 **$\mu$ -TBS 値評価:** F と U の平均  $\mu$ -TBS 値(s.d.)はそれぞれ 30.1(12.4) / 24.4(14.3) MPa であり、有意差を認めなかった。Fig. 2 に F と U 間の  $\mu$ -TBS 値に対する累積破壊確率の違いを示す。ワイブル係数(m 値)は F: 2.9, U: 1.2 であり、F は U より有意(p<0.01)に大きい値を示した。また、累積破壊確率 10%における推定破壊応力値について、F 値は U 値より有意(p<0.01)に大きい値を示した。

**【考察および結論】** 漏洩評価の結果から、フロアブルレジンの選択応用はユニバーサルレジンより優れた辺縁封鎖性の獲得に有用であることが推察できた。一方、 $\mu$ -TBS 値評価の結果から、平均値には差を認めないものの、フロアブルレジンの選択応用はユニバーサルレジンより、m 値増大で確認できるとおり接着信頼性を向上させ、また臨床的意義が高いと考えられる累積破壊確率 10%の推定破壊応力値においても、強大な破壊値を必要とすることから、優れた接着耐久性の獲得に有用となることが推測できた。これら結果は、コンポジットレジンの重合収縮率・弾性率・熱膨脹率などに代表される材料学的特性が寄与していると考えられる。以上から、歯頸部修復に対するフロアブルレジンの選択応用は、ユニバーサルレジンに比べ優れた辺縁封鎖性、接着信頼性・耐久性が獲得できる有用性をもつことが示唆された。

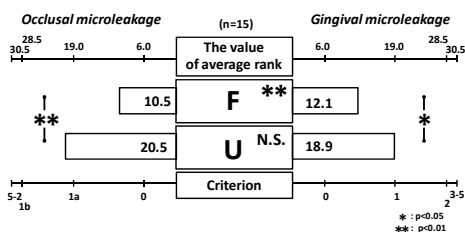


Fig.1 Difference in microleakage between F and U restorations

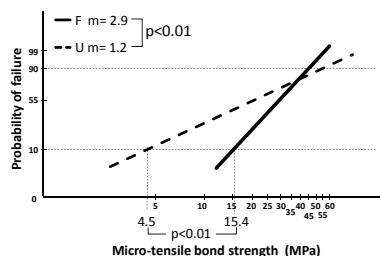


Fig.2 Difference in bonding reliability between F and U restorations



## 各種バルクフィル用コンポジットレジン照射後 24 時間の重合収縮応力

鶴見大学歯学部保存修復学講座  
○山本雄嗣, 林 応璣, 田崎達也, 桃井保子

**Polymerization Stresses of Bulk Fill Resin Composites for 24 h after Irradiation**  
Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine  
○YAMAMOTO Takatsugu, HAYASHI Oki, TASAKI Tatsuya, MOMOI Yasuko

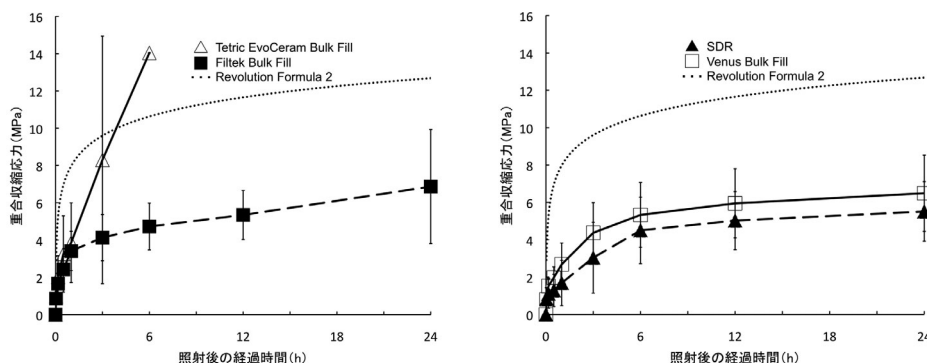
【緒言】近年, 2 級窩洞のような深い窩洞への一挙充填を可能とするコンポジットレジンが, バルクフィル用コンポジットレジンと称して紹介されている. 一挙充填では重合するレジン量が増加することから, 重合収縮応力への影響が懸念される. 本研究では, 数種類のバルクフィル用コンポジットレジンの照射後 24 時間までの重合収縮応力を測定し, 比較検討した.

【材料と方法】下表の 4 種バルクフィル用コンポジットレジン(ペーストタイプ:1 種, フロアブルタイプ:3 種)を使用した.

商品名	メーカー	フィラー含有率	タイプ	ロット番号
Tetric EvoCeram Bulk Fill	Ivoclar Vivadent	60 vol.%	ペースト	R04686
Filtek Bulk Fill	3M ESPE	42.5 vol.%	フロアブル	N370958
SDR	Dentsply	45 vol.%	フロアブル	120204
Venus Bulk Fill	Heraeus	38 vol.%	フロアブル	010032

中央に直径 3 mm の円柱窩洞を有する直径 12 mm, 厚径 2 mm のソーダガラスディスクを測定用のモールドとして用いた. 窩縁から 0.3 mm および 0.5 mm 離れたガラス面にピッカーズ圧子でき裂を導入した. 圧子圧入荷重および時間は 9.8 N, 15 秒とした. 窩洞内面をシランカップリング処理(松風ポーセレンプライマー, 100°C, 5 分)した後, 測定顕微鏡(STM-UM, オリジナル)でき裂長さを測定した. 窩洞にコンポジットレジンを充填し, 光照射(540mW/cm<sup>2</sup>, 45 秒)した. 試料(n=5)は遮光の室温デシケーターに保管し, 照射後 2, 10, 30 分, 1, 3, 6, 12, 24 時間経過時に再びき裂長さを測定した. き裂長さ, き裂位置およびガラスの物性からレジン-ガラス接着界面での応力を求め, 二元配置分散分析と Tukey の多重比較で統計処理した( $\alpha=0.05$ ).

【結果および考察】各レジンの重合収縮応力を下グラフに示した. 左が Tetric EvoCeram Bulk Fill と Filtek Bulk Fill, 右が SDR と Venus Bulk Fill である. 以前に同じ方法で測定した, 重合収縮応力が低いコンポジットレジンの Revolution Formula 2 の回帰曲線( $r^2>0.9$ )もグラフ内に示した.



全てのレジンで照射後の応力増加が認められた. Tetric EvoCeram Bulk Fill では, 3 時間後に 2 個, 6 時間後では残りのガラスモールドが応力によって破折したため, その時点で測定中止となった. Filtek Bulk Fill では 24 時間後に 1 試料が破折した. このガラスは約 14MPa で破折するため, これ以上の応力が発生したこととなった. 統計処理は Tetric EvoCeram Bulk Fill を除いた 3 種レジンを対象に行なった. 二要因(レジンの種類, 経過時間)は有意に応力に影響した. この 3 種レジンが発生する応力は Revolution Formula 2 の半分程度で, 中でも SDR は有意に小さい応力を示した.

【結論】本実験で評価した 4 種バルクフィル用コンポジットレジンのうち, 3 種の重合収縮応力は従来のコンポジットレジンより低かったが, 1 種では過大な応力が発生した. これはバルクフィル用コンポジットレジンの使用に際して留意すべき点と思われた.

### バルクフィルコンポジットレジンの機械的性質

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>,

○辻本暁正<sup>1,2</sup>, 生形奈緒子<sup>1</sup>, 竹中宏隆<sup>1</sup>, 石井 亮<sup>1</sup>,

田村ゆきえ<sup>1</sup>, 井上直樹<sup>1</sup>, 高見澤俊樹<sup>1,2</sup>, 宮崎真至<sup>1,2</sup>

#### Mechanical properties of newly developed bulk-fill resin composites

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry<sup>1</sup>,

Division of Biomaterials Science, Dental Research Center<sup>2</sup>,

○TSUJIMOTO Akimasa<sup>1,2</sup>, UBUKATA Naoko<sup>1</sup>, TAKENAKA Hirotaka<sup>1</sup>, ISHII Ryo<sup>1</sup>,

TAMURA Yukie<sup>1</sup>, INOUE Naoki<sup>1</sup>, TAKAMIZAWA Toshiki<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>

#### 【研究目的】

近年, コンポジットレジンの臨床応用範囲の拡大を目的として, 耐摩耗性, 重合収縮および硬化深度の改善あるいは向上が材料開発の方向性となっている。このうち硬化深度は, 光重合型コンポジットレジンの避けられない欠点とされるものの, その応用範囲の拡大に伴って, 大型窩洞に対して一括で充填できるコンポジットレジンの臨床的要求も増加している。そのため, その硬化深度の向上を図ったバルクフィルコンポジットレジが開発, 市販されているものの, その基本的諸性質の詳細については, 不明な点が多いのが現状である。

そこで演者らは, バルクフィルコンポジットレジンの機械的性質について, 市販されているコンポジットレジと比較, 検討した。また, コンポジットレジ硬化物のフィラー形状について SEM 観察を行い, その考察資料とした。

#### 【材料および方法】

供試したバルクフィルコンポジットレジンは, Tetric N-Ceram Bulk Fill (Ivoclar Vivadent, 以後 TB) および SDR (Dentsply Caulk, 以後 SD) の, 合計 2 製品とした。また, ユニバーサルタイプのコンポジットレジとして Tetric N-Ceram (Ivoclar Vivadent, 以後 TC) および Esthet X HD (Dentsply Caulk, 以後 EH), フロアブルレジとして Tetric N-Flow (Ivoclar Vivadent, 以後 TF) の合計 3 製品を, バルクフィルコンポジットレジの対照として用いた。

##### 1. 無機質フィラー含有量 (wt %)

無機質フィラー含有量の測定は, 熱重量測定装置 (TG/DTA 6300, Seiko Instrument) を用い, レジンペーストを試料皿に移送し, 25 ~ 800°Cまで昇温速度 10 Cel/min の条件で加熱して, 残存重量を求めた。無機質フィラー含有量は, 熱負荷前の重量と残存量とから減量 (wt %) を求め, 100 - 減量 (wt %) として算出した。

##### 2. 熱膨張係数

熱膨張係数の測定は, 熱機械分析装置 (TMA/SS 6300, Seiko Instrument) を用い, 硬化したレジペーストを 25 ~ 130°Cまで昇温速度 2 Cel/min の条件で加熱し, 30 ~ 80 °Cにおける平均熱膨張係数を求めた。

##### 3. 曲げ強さおよび曲げ弾性率

通法に従って, 万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いて, 3 点曲げ強さの測定とともに弾性率を算出した。

##### 4. 体積重合収縮率 (vol %)

体積変化の測定は, ガラス管内の水位変化によって求めるディラトメーターを用いて行った。得られた体積変化量から, 重合硬化に伴って生じた体積変化率 (vol %) を算出し, これを体積重合収縮率とした。

##### 5. レジン硬化物のフィラー形状の SEM 観察

通法に従って試片を製作し, FE-SEM (ERA-8800FE, Elionix) を用いて, 加速電圧 10 kV の条件で観察した。

#### 【成績および考察】

供試したコンポジットレジンの無機質フィラー含有量は, 60.3 ~ 77.5 wt % の範囲を示し, TF で最も低く, TB で最も高い値を示した。熱膨張係数は, 38.0 ~ 52.2 × 10<sup>-6</sup>/°C の範囲を示し, TF で最も高く, HD で最も低い値を示した。また, コンポジットレジンの曲げ強さは, 110.7 ~ 131.4 MPa, 曲げ弾性率は, 3.3 ~ 13.0 GPa であった。一方, 照射開始から 180 秒後のコンポジットレジンの体積重合収縮率は, 1.82 ~ 4.73% であり, TN で最も低い値を示した。このことは, 無機質フィラー含有量の多寡あるいはベースレジンの組成に起因するものと考えられた。

#### 【結論】

本実験の結果から, 供試したコンポジットレジンの機械的性質は, 製品によって異なることが判明した。したがって, 臨床使用に際しては, それぞれのコンポジットレジンの基本的諸性質に留意する必要性が示唆された。

## 歯髄再生治療法に用いる最適な遊走因子の検討

<sup>1)</sup> 愛知学院大学歯学部 歯内治療学講座、<sup>2)</sup> 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、<sup>3)</sup> 愛知学院大学歯学部 小児歯科学講座、<sup>4)</sup> 愛知学院大学歯学部 顎口腔外科学講座  
○竹内 教雄<sup>1,2)</sup>、庵原 耕一郎<sup>2)</sup>、村上 真史<sup>2)</sup>、林 勇輝<sup>2,3)</sup>、堀部 宏茂<sup>2,4)</sup>、中村 洋<sup>1)</sup>、中島 美砂子<sup>1,2)</sup>

### Most efficient migration factor for stem cell therapy for pulp regeneration

<sup>1)</sup> Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, <sup>2)</sup> Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, <sup>3)</sup> Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Aichi Gakuin University  
<sup>4)</sup> Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Aichi Gakuin University,  
○Takeuchi Norio<sup>1,2)</sup>, Iohara Koichiro<sup>2)</sup>, Murakami Masashi<sup>2)</sup>, Hayashi Yuki<sup>2,4)</sup>, Horibe Hiroshi<sup>2,3)</sup>, Nakamura Hiroshi<sup>1)</sup>, Nakashima Misako<sup>1,2)</sup>

### 【目的】

私どもはこれまで、抜髄後の根管内に歯髄幹細胞を移植する歯髄再生治療法を開発しており、イヌの抜髄後の根管内に、歯髄幹細胞を遊走因子、SDF-1 あるいは G-CSF とともに移植することにより歯髄組織が再生されることを明らかにした (第 136 回春季歯科保存学会)。また、歯髄再生治療の臨床で用いる最適な遊走因子を検討するために、薬事認可されている bFGF と G-CSF の作用を *in vitro* において比較検討し、ともに遊走促進、増殖促進、抗アポトーシス効果、血管誘導促進作用、神経突起伸長促進作用を有することを確認した (第 137 回秋季歯科保存学会)。そこで、今回は、ブタ同一個体由来の歯髄幹細胞、bFGF、G-CSF を各々ブタ歯根に医療用コラーゲンと共に注入後、異所性に SCID マウスに皮下移植し、*in vivo* における遊走因子の有用性を検討した。

### 【材料と方法】

1. 歯髄幹細胞の分取：ブタの歯を抜去し、歯髄細胞を分離、培養した。2 代目において膜分取法を用いて歯髄幹細胞を分取し増幅させた。
2. 再生歯髄様組織解析：歯根内に歯髄幹細胞、bFGF、G-CSF を注入し、SCID マウスに皮下異所性移植後 28 日で解析
  - 1) 歯髄再生量：HE 染色
  - 2) 血管新生密度：RECA1 による免疫染色、lectin 染色
  - 3) 象牙芽細胞：DSPP による *in situ* hybridization
  - 4) 再生組織が歯髄であることの証明：TRH-DE による免疫染色

### 【結果】

遊走因子のみで移植すると、細胞のみで移植したものと比較して再生量は少ないものの、血管新生及び象牙芽細胞の存在が認められ、歯髄組織が再生した。

### 【結論】

これらの結果より、G-CSF と bFGF は、ともに、*in vivo* にて歯髄再生促進作用を有することから、歯髄再生治療法の臨床で用いる遊走因子として有効である可能性が示唆された。

## ラット臼歯における Mineral Trioxide Aggregate による直接覆髄後の M2 マクロファージの動態

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

Distributional changes of M2 macrophages after direct pulp capping  
with mineral trioxide aggregate in rat molars

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

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

**【研究目的】** Mineral Trioxide Aggregate (MTA) による直接覆髄後に高率に硬組織形成を誘導することが報告されている。一方、近年、活性化マクロファージに数種の亜群が存在し、機能に応じて生体防御修復機構に関与することが注目されている。すなわち、主として炎症に関与する古典的活性化 (M1)マクロファージのみならず、組織修復等に関与する創傷治癒 (M2) マクロファージの存在が知られている。歯髄の創傷治癒過程においてもこれらの亜群がさまざまな局面で役割を演じると考えられるが、この方面の知見は乏しい。そこで本研究では、歯髄創傷治癒過程におけるマクロファージ亜群、特に M2 マクロファージの挙動の実態を追究することを目的として、MTA で直接覆髄されたラット臼歯歯髄における各種マクロファージ系細胞の経時的動態を、免疫組織化学的に観察した。

**【材料および方法】** 実験動物として、8 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。全身麻酔下で上顎第一臼歯を # 1 ラウンドカーバイドバー (直径 0.8 mm) で咬合面より露髄させ、洗浄、止血後、MTA による直接覆髄を施したのちフロアブルレジジン (FiltekFlow, 3M) で被覆した。術後 1、2、3、5、7、14 日 (各 n=6) に PLP 固定液で灌流固定を行い、摘出した試料を 10%EDTA にて脱灰後、凍結切片を作成し、H-E 染色ならびに CD68 (汎マクロファージマーカー)、CD163 (常在性マクロファージ、M2 マクロファージのマーカー)、CD204 (抗ラットマクロファージスカベンジャー受容体; M2 マクロファージマーカー) を用いた酵素抗体染色を行った。さらに、歯髄を覆髄部から 3 領域に分け (0 μm-100 μm、100 μm-300 μm、300 μm-400 μm)、それぞれの単位面積あたりの陽性細胞数を計測し、3 領域それぞれにおける経時変化および 3 領域間での細胞数について統計学的分析を行った。

**【成績】** 術後 1、2 日では覆髄部直下に変性層の形成が認められた。術後 3 日には覆髄部近傍の一部に円柱状の細胞が配列し、術後 5 日には覆髄部直下に線維性基質の形成が観察された。術後 7 日には薄い被蓋組織が形成され、術後 14 日には一部細管構造を示す象牙質様基質が認められた。CD68 陽性細胞、CD163 陽性細胞および CD204 陽性細胞は、術後 1 日より変性層直下に集積し始め、術後 2 日では顕著な集積像を呈し、特に 0 μm-100 μm の領域において他領域よりも有意に増加した。術後 3 日では CD68 陽性細胞および CD204 陽性細胞は 0 μm-100 μm の領域において他領域よりも有意に増加したが、CD163 陽性細胞の集積は不明瞭であった。以後、CD68 陽性細胞および CD204 陽性細胞も集積像が徐々に不明瞭となり、術後 14 日では、各陽性細胞とも 3 領域間で有意差はなかった。

**【考察】** マクロファージは創傷治癒の初期過程で壊死組織の貪食や成長因子の産生などを行うことにより、組織修復の進行に役割を演じると考えられている。本研究より、MTA による直接覆髄部直下には M2 マクロファージマーカー (CD163 および CD204) を強く発現する細胞の一時的な集積が認められることが示された。M2 マクロファージは抗炎症性サイトカイン産生、血管新生促進などの様々な働きをしていることが報告されており、MTA を用いた直接覆髄後の創傷治癒過程において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

**【結論】** MTA による直接覆髄後、早期に覆髄部変性層直下への M2 マクロファージマーカー陽性細胞の集積が観察され、その後被蓋硬組織が形成されることが示された。

塩化リチウムによる  $\beta$ -catenin のリン酸化阻害がラット象牙芽細胞分化と ectodin 発現に及ぼす影響について

奥羽大学歯学部歯科保存学分野保存修復学分野、<sup>1)</sup> 歯周病学分野

<sup>2)</sup> 明海大学歯学部機能保存回復学講座歯内療法学分野

○門倉弘志、山崎崇秀、和田康弘、西村 翼、菊井徹哉、高橋慶壮<sup>1)</sup>、横瀬敏志<sup>2)</sup>、

**Effects of the Inhibition of  $\beta$ -Catenin Phosphorylation by LiCl  
on Differentiation and Ectodin Expression in Rat Odontoblast-like Cells**

Division of Operative Dentistry, <sup>1)</sup>Division of Periodontology, Department of Conservative Dentistry, Ohu  
University School of Dentistry,

<sup>2)</sup> Division of Endodontics, Department of Restorative and Biomaterials Sciences, Mikai Univ. School of Dentistry

○KADOKURA Hiroshi, YAMAZAKI Takahide, WADA Yasuhiro, NISHIMURA Tsubasa

KIKUI Tetsuya, <sup>1)</sup>TAKAHASHI Keiso and <sup>2)</sup> YOKOSE Satoshi

【目的】歯髄組織が損傷を受けた場合には、歯髄組織に存在する未分化外胚葉性間葉細胞が象牙芽細胞に分化して修復象牙質を形成する。この未分化外胚葉性間葉細胞から象牙芽細胞への分化機構の解明は、歯科保存治療における vital pulp therapy のさらなる発展に極めて有用であると考えられる。近年、歯髄の創傷治癒過程において、分泌型糖タンパク質である Wnt ファミリーが各種細胞の分化に重要な働きをしていることが注目され、歯の発生過程のみならず、修復象牙質の形成も Wnt によってコントロールされていることが分った。Wnt signal の伝達経路の canonical 経路は、その情報伝達の機構が詳細に解明されており、細胞に塩化リチウム (LiCl) を作用させると GSK3 $\beta$  の活性が阻害され  $\beta$ -catenin の核内へ集積がおこり、canonical 経路の擬似的な活性化が生じることが報告されていることから、Wnt の作用を調べるために LiCl は多くの細胞に応用されている。これらの背景から本研究の目的は、LiCl を歯髄培養細胞に応用し、未分化外胚葉性間葉細胞から象牙芽細胞への分化過程において canonical 経路にどのような役割があるのかを調べることにした。

【材料と方法】歯髄培養細胞に LiCl を作用させ象牙質様結節形成に対する影響を形態学的に解析し、象牙芽細胞の各種分化マーカーおよび ectodin の発現についてリアルタイム PCR 法にて解析した。また、 $\beta$ -catenin のリン酸化に対する LiCl の作用を western blot により解析した。

【結果】歯髄培養細胞に LiCl を作用させると  $\beta$ -catenin のリン酸化が抑制され、象牙芽細胞分化ならびに象牙質様石灰化結節形成が抑制された。さらに LiCl の添加によって Wnt と BMP のアンタゴニストである ectodin の発現が亢進した。

【考察および結論】以上の研究結果から canonical 経路は象牙芽細胞分化ならびに象牙質形成を調節し、そのメカニズムには ectodin が関わっていることが示唆された。また、canonical 経路には ectodin を介した negative feedback 機構が存在することが示唆された。

## MMP 分子により分解された象牙質基質タンパクがラット歯髓細胞に与える影響

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)  
○岡本基岐, 高橋雄介, 小道具吾, 林美加子

### Effects of Degraded Dentin Matrix Proteins by MMP molecules on Rat Pulp Cell Function

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

#### 【研究目的】

細胞外基質 (Extracellular Matrix: ECM) は酸や酵素によって分解され、分解された ECM は様々な組織において細胞機能を活性化させるという報告がある。う蝕環境下において、象牙質に存在する基質タンパク (Dentin Matrix Proteins: DMPs) も酸や酵素によって分解を受けると考えられるが、分解された DMPs は象牙質-歯髓複合体の創傷治癒を促進する可能性がある。われわれはこれまでに酸によって分解された DMPs が歯髓細胞の機能を促進することを報告してきたが、象牙質中に存在している Matrix Metalloproteinase (MMP) によっても DMPs は分解されると考えられる。そこで本研究では、MMP 分子によって分解された DMPs がラット歯髓初代培養細胞 (Rat Pulp Primary Cells: RPPCs) に与える影響について検討した。

#### 【方法】

本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認下で実施した (承認番号: 動歯 23-005-0)。ヒト DMPs と各種 MMP 分子 (MMP1, MMP2, MMP3, MMP9 および MMP13) を 37°C で 24 時間反応させて分解 DMPs を作製し、6 週齢 Wistar 系雄性ラット切歯より回収した RPPCs を用いて以下の実験を行った。

##### 1) 細胞増殖能の評価

RPPCs を 10,000 cell/well で播種し、0.01~1 µg/ml の分解 DMPs 存在下で、1%FBS 含有 α-MEM 中で 5 日間培養し、細胞増殖能を評価した。コントロールとして、DMPs を含まない RPPCs を用いた。

##### 2) 石灰化能の評価

20,000 cell/well で播種した RPPCs を 0.01~1 µg/ml の分解 DMPs 存在条件下で、50 µg/ml アスコルビン酸と 10 mM β-グリセロリン酸および 10%FBS 含有 α-MEM 中で 14 日間培養し、石灰化能を評価した。

##### 3) 細胞遊走能の評価

RPPCs をコンフルエントに達するまで培養し、10 mg/ml mitomycin-C を含む α-MEM を 1 時間作用させた後、0.1~1 µg/ml の分解 DMPs 存在下で、1%FBS 含有 α-MEM 中で 36 時間培養後に顕微鏡下にて観察、画像解析を行った。統計学的有意差検定には、One-way ANOVA および Dunnett 検定を用いた。

#### 【結果および考察】

- 1) MMP1、MMP9 もしくは MMP13 によって分解された DMPs 存在条件下における細胞増殖能は、コントロールと比較して有意な上昇が観察された。
- 2) MMP1 もしくは MMP13 によって分解された DMPs 添加条件下において、RPPCs の石灰化能は有意に促進された。
- 3) MMP1、MMP3 もしくは MMP9 によって分解された DMPs 存在下において、細胞遊走能はコントロールと比較して有意な促進が確認された。

#### 【結論】

本研究結果より、MMP 分子によって分解を受けた DMPs は RPPCs に対して細胞増殖、石灰化能および遊走能を促進することが明らかとなり、分解された DMPs が象牙質-歯髓複合体の治癒に寄与している可能性が示唆された。

(本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (25462958, 29390425) の補助の下に行われた)。

## ヒト歯髓由来線維芽細胞における MMP-3 産生に及ぼす small G protein の影響

大阪歯科大学 1) 歯科保存学講座 2) 生化学講座

○小正 玲子<sup>1)</sup>, 合田 征司<sup>2)</sup>, 吉川 一志<sup>1)</sup>, 竹内 撰<sup>1)</sup>, 堂前 英資<sup>2)</sup>, 三木 秀治<sup>1)</sup>, 小正 紀子<sup>1)</sup>,  
池尾 隆<sup>2)</sup>, 山本 一世<sup>1)</sup>

### Effects of small G protein on the production of MMP-3 in human dental pulp fibroblast like cells

Department of 1) Operative Dentistry, 2) Biochemistry Osaka Dental University

○Reiko KOMASA<sup>1)</sup>, Seiji GODA<sup>2)</sup>, Kazushi YOSHIKAWA<sup>1)</sup>, Osamu TAKEUCHI<sup>1)</sup>, Eisuke DOMAE<sup>2)</sup>,  
Hideji MIKI<sup>1)</sup>, Noriko KOMASA<sup>1)</sup>, Takashi IKEO<sup>2)</sup>, Kazuyo YAMAMOTO<sup>1)</sup>

#### 【研究目的】

歯髓は常時、物理・化学的刺激下のもと歯を維持するために、象牙質への栄養補給、修復象牙質の形成などの役割を果たしている。う蝕の進行に伴い、歯髓では白血球やマクロファージが浸潤し、う蝕細菌の食害が行われる。その過程において、歯髓組織では tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ )などの炎症性サイトカインが産生され、歯髓炎が惹起される。また、刺激を受けた歯髓組織では細胞外マトリックス分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) が産生され、歯髓組織を破壊し病態が進行する。可逆性歯髓炎は原因を除去することにより正常な歯髓に回復し得るため、歯髓に存在する細胞における炎症の発症機序や進行過程を解明することは歯髓の保存のために重要であると考えられる。また small G protein は、炎症に深く関わっているタンパク質で知られている。そこで今回、ヒト歯髓由来線維芽細胞における TNF- $\alpha$  刺激による MMPs 産生に対する small G protein の関与について検討した。

#### 【方法】

本研究に参加同意を得た患者の抜去歯(大歯医倫 110751号)より歯髓組織を採取・培養し、3~10 世代目をヒト歯髓由来線維芽細胞として本研究に使用した。ヒト歯髓由来線維芽細胞を 24 well plate に  $5.0 \times 10^5$  cells/well になるよう播種し、24 時間培養後、TNF- $\alpha$  を各種各条件下で加え、刺激終了後、上清中の MMPs の産生を western blotting , gelatin zymography にて検討した。次に、ヒト歯髓由来線維芽細胞を 24 well plate に  $5.0 \times 10^5$  cells/well になるよう播種し、TNF- $\alpha$  100 ng/ml を各タイムコースで加え、Rac1 のリン酸化について western blotting にて検討した。Rac1 阻害剤である NSC23766 を各種各条件下で加え、刺激を行い、上清中の MMPs の産生を western blotting , gelatin zymography にて検討した。次に、NSC23766 を刺激した場合の Rac1 の下流である ERK1/2, p-38 のリン酸化について western blotting にて検討した。

#### 【結果】

- 1) ヒト歯髓由来線維芽細胞における TNF- $\alpha$  刺激が MMP-3, 2 産生におよぼす影響について western blotting , gelatin zymography にて検討した結果、MMP-3 の産生は濃度依存的に増強したが、MMP-2 の産生に変化は認められなかった。
- 2) TNF- $\alpha$  刺激による Rac1 のリン酸化について western blotting にて検討した結果、Rac1 のリン酸化は経時的に変化した。
- 3) TNF- $\alpha$  刺激時の Rac1 阻害剤である NSC23766 の影響について western blotting にて検討した結果、NSC23766 は MMP-3 の産生を濃度依存的に増強した。
- 4) TNF- $\alpha$  刺激により増強した ERK1/2 のリン酸化は、NSC23766 を加えても変化はしなかった。
- 5) TNF- $\alpha$  刺激により増強した p-38 のリン酸化は、NSC23766 により増強した。

#### 【結論】

ヒト歯髓由来線維芽細胞において TNF- $\alpha$  刺激によりコラゲナーゼ群である MMP-3 の産生は濃度依存的に上昇した。また、ゼラチナーゼ群である MMP-2 の産生は無刺激時においても産生は確認され、TNF- $\alpha$  刺激による影響は認められなかった。Rac1 がリン酸化していること、Rac1 阻害剤により MMP-3 の産生が上昇したことにより、ヒト歯髓由来線維芽細胞における TNF- $\alpha$  刺激による MMP-3 産生に対して small G protein の Rac1 が関与していることが示唆された。

薬液を応用した NiTi ファイル破折片の除去に関する研究  
—腐食溶解時間の短縮についての検討—

明海大学歯学部 機能保存回復学講座 歯内療法学分野  
○鈴木英子, 小林健二, 高橋哲哉, 中村裕子, 小谷依子, 井出祐樹, 藤原ひかり, 松下知裕, 横瀬敏志

Study of Removal for fragments of NiTi files using Chemical Solutions  
— Investigations of reducing time for corrosion of the fragments —

Division of Endodontics, Department of Restorative and Biomaterials Sciences,  
Meikai University School of Dentistry  
OSUZUKI Eiko, KOBAYASHI Kenji, TAKAHASHI Tetsuya, NAKAMURA Yuko, KOTANI Yoriko, IDE Yuki,  
FUJIWARA Hikari, MATSUSHITA Tomohiro, YOKOSE Satoshi

【緒言】根管内で破折した NiTi ファイルの除去法は未だ確立されていないのが現状である。我々は、根管内から NiTi ファイル破折片を容易に除去する方法の確立を目的として、薬液により破折片を腐食させる基礎的研究を行ってきた。これまでに、2種類の薬液を NiTi ファイル破折片に作用させた場合、3～24 時間の浸漬によって破折片は腐食溶解を示し、薬液温度の上昇により腐食溶解に要する時間は短縮することを報告してきた(第 131 回日本歯科保存学会)。今回、臨床応用を考えた上で、更なる腐食溶解時間の短縮を目的として、NiTi ファイル破折片の腐食メカニズムについて分析することにより、2種類の薬液を組み合わせさせた浸漬方法が、腐食溶解時間にどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。

【材料および方法】NiTi ロータリーファイルは、ProTaper®(DENTSPLY Maillefer) #25/F2 を使用した。ファイルは全て未使用のものを用い、それぞれ先端から 5mm の部位をバイスで固定し、回転破断させたものを試料とした。浸漬薬液には 10%(w/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液に 19%(w/v) 塩化ナトリウムを加えて調製したもの(以下 NCN)と、2%(w/v) フッ化ナトリウム溶液に正リン酸を加えて pH4.5 に調整したもの(以下 APF)を 60℃の恒温槽中に 2 時間保管して使用した。試料を APF と NCN に浸漬後、37℃の恒温槽で保管し、15 分間隔で薬液交換を行い、合計 3 時間薬液に浸漬した。その後試料はエックス線マイクロアナライザーにより反射電子像を撮影し元素マッピングを行うとともに、EPMA により Ni と Ti の定性定量分析を行った。その結果から、2種類の薬液を用いた浸漬方法を、1. APF のみに浸漬(A 群)、NCN のみに浸漬(N 群)、NCN に浸漬後 APF に浸漬(NA 群)、APF に浸漬後 NCN に浸漬(AN 群)の 4 群に設定した。それぞれの条件で浸漬させた試料は、腐食溶解の判定基準として電子天秤にて重量変化を計測して重量減少率を算出した。

【結果】エックス線マイクロアナライザーによる反射電子像と元素マッピング、および EPMA による定性定量分析結果より、APF 及び NCN では異なる腐食溶解様相を呈することが明らかになった。非腐食面と比較し、腐食面において、APF への浸漬では Ti の重量%が減少し、NCN への浸漬では Ni の重量%が減少した。また、重量変化においては、A 群では約 91.6%、N 群は約 89.4%、NA 群は約 93.9%、AN 群は約 77.4%に減少した。AN 群の試料は他の群の試料と比較し重量の減少が著しく、有意水準 1% で有意差が認められた。

【考察】NCN への浸漬では、ファイルの破断時の応力により金属の結晶構造に歪が生じたと思われる部位から、Ni が薬液中に沈殿物として溶出し、顕著な崩壊像を呈し、直接的に腐食が進行する溶解様相が認められた。これまでの研究結果から NCN による腐食は高濃度の Cl<sup>-</sup>によって Ni がクロロ錯体となって溶出するものと考えており、今回の結果はこれを裏付けるものであった。これに対し、APF への浸漬では、F が配位子となり Ti に作用してフルオロ錯体を形成し薬液中に溶出し腐食が進行するものと推察された。一方、Ti は水溶液中では不動態性が安定していることが知られている。したがって、APF に浸漬後 NCN に浸漬した試料が、他条件の試料と比較し重量の減少が著しいのは、APF による浸漬で Ti の溶出が最初に起こり、次いで NCN による Ni の溶出が効果的であったためではないかと考えられる。

【結論】今回、腐食溶解時間の短縮を目的として、APF と NCN を組み合わせさせた浸漬方法により検討した結果、APF に浸漬後 NCN に浸漬することにより効果的に腐食溶解時間の短縮が図られた。



## 各種 Ni-Ti ファイルの周期疲労破折に影響する物性の特徴に関する検討

長崎学大学院医歯薬学総合研究科 齶蝕学分野

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 生体材料学分野

○辻本 真規<sup>1</sup>, 入船 由宇<sup>1</sup>, 渡邊 郁也<sup>2</sup>, 林 善彦<sup>1</sup>

### A study on the characteristics of the physical properties that affect the Cyclic Fatigue fracture of various Ni-Ti Rotary Files

Department of Cariology, Course of Medical Dental Science, Nagasaki University of Biomedical Science<sup>1</sup>

Department of Biomaterial, Course of Medical Dental Science, Nagasaki University of Biomedical Science<sup>2</sup>

○Masaki Tsujimoto<sup>1</sup>, Yu Irihune<sup>1</sup>, Ikuya Watanabe<sup>2</sup>, Yoshihiko Hayashi<sup>1</sup>

1988年Waliaらによって超弾性Ni-Tiファイルが根管治療に導入された。疲労性クラックの開始は作業部位表面のハイストレスエリアの、特に表面の欠陥部から起こることが示されている。このように背景から、Ni-Tiファイルは製造法が改良され、日々進化している。しかし、進化型Ni-Tiファイルと従来型Ni-Tiファイルとを比較した研究はまだ少ないようである。本研究の目的は、実験的に各種Ni-Tiファイルの周期疲労破折に影響する物性の特徴を検討することである。

材料と方法:2種の従来型超弾性Ni-Tiファイル: Profile #25/0.04 taper, #25/0.06 taper (Dentsply Maillefer, Switzerland, 以下PF), K3 #25/0.04 taper, #25/0.06 taper (SybronEndo, USA, 以下K3)}と3種の進化型Ni-Tiファイル{Profile Vortex #25/0.04 taper, #25/0.06 taper (Dentsply Tulsa, USA, 以下PV), Vortex Blue #25/0.04 taper, #25/0.06 taper (Dentsply Tulsa, USA, 以下VB), K3 XF #25/0.04 taper, #25/0.06 taper (SybronEndo, USA, 以下XF)} (n=8)が試験に用いられた。K3とPFは従来の超弾性wire, PVはM-wire, XFはR-phase Ni-Tiで, VBは表面に青色の酸化チタン層をもったBlue Technologyファイルである。はじめに、各グループの2本の新しいファイルのマシーングループと表面性状は電子顕微鏡(S-3500N; Hitachi Ltd, Tokyo, Japan)で観察された。さらに、各ブランド2本の未使用Ni-Tiファイルは示差走査熱量測定(DSC: Differential Scanning Calorimetry, 島津示差熱量計DSC-60, JAPAN)を行い、各Ni-Tiの相変態の温度領域を検討した(測定条件-100°C~100°C)。周期疲労テストは、今回の実験のために作製された人工根管で行った。人工根管は全長25mm, 根管口部より10mmの部位から半径3mm, 60°の角度で湾曲している。各インストゥルメントはインストロンマシン(5566S, インストロン)に固定された電気モーター(ENDO-MATE DT; NAKANISHI, JAPAN)を使用して、一定の速度とトルク(500rpm, 5.0Ncm)で回転した。インストゥルメントと金属の根管の間の摩擦を減らすために、合成オイル(CRC インダストリー, 呉工業, JAPAN)が模擬根管にスプレーされた。器具先端は人工根管に記されたマーク(19mm)と一致させられ(再度同じ状況にポジショニングできるように)ファイルはセットをされた。ストップウォッチとタイミングをシンクロさせて回転を開始した。インストゥルメントは破折するまで自由に回転が許され、音と視覚的に破折が確認されたタイミングで計測をストップされた。時間は破折までの回転数に変換(1秒間で8.33回転)され、NCF(Number of Cyclic Fatigue)として表した。また、破折片の長さを計測した。各グループから2本のファイルがランダムに選ばれ、破折片は破折形態の観察のためSEMステージに破折面が上になるようにリマウントされた。破折したNi-Tiファイルの側面像は種々の倍率で観察された(破折片はSEM観察前におよそ120秒無水アルコールで超音波洗浄された)。各グループの破折までの回転数は統計ソフト(Statview-J5.0)を使い一元配置分散分析が行われ、Scheffe検定によって各グループの有意差を検討した(有意水準は95%)。

結果および考察:未使用ファイルのSEM観察:各ファイルの先端形状、および表面形態は様々であった。今回実験に使用したファイルは、全て削り出して作製されたもので、ファイル表面にはメカニカルグループが明瞭に認められ削り出しの状況を確認できた。その他の形態的な特徴として、PFは他のファイルと比べ表面のメカニカルグループは不明瞭で、また、XFの表面にはメカニカルグループの他に無数のくぼみを認め、破折との関連が推測された。DSC:ファイルによって相転移温度の違い(-20~65°C程度)が認められ、表面性状とともに破折への影響が示唆された。Cyclic Fatigue:各ブランドで0.04テーパーが0.06テーパーに比べ有意に多いNCFを示した。また、0.04テーパーではPV, VBが有意に高いNCFを示し、PV, VB間に有意差は認められなかった。PFはK3, XFと有意差が認められず、XFはK3に比べ有意に高いNCFを示した。0.06テーパーではPF, PV, VB間, K3, XF間に有意差は認められず、PF, PV, VBはK3, XFに比べ有意に高いNCFを示した。破折後ファイルのSEM観察:各ファイルでメカニカルグループに沿ったクラックが認められた。PF, K3に比べてXF, PV, VBはクラックの伸展が短いことが認められた。PFではUシェイブ部に、PV, VBではカッティングエッジ部で、K3, XFではラジアルランド部でクラックが認められた。以上のことから、表面性状および材質の物性と破折には関連性が認められた。

サイドベントニードル使用時における根管洗浄液の挙動解析  
- Apical Negative Pressure Irrigation Technique と Conventional Irrigation Technique との比較 -

東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野  
○古畑和人、和達礼子、須田英明

Behavior Analysis of Root Canal Irrigant Using a Side Vent Needle  
-Comparison of Apical Negative Pressure Irrigation Technique  
with Conventional Irrigation Technique-

Pulp Biology and Endodontics, Department of Oral Health Sciences,  
Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
Tokyo Medical and Dental University  
○FURUHATA Kazuto, WADACHI Reiko, SUDA Hideaki

【研究目的】

根管洗浄を安全かつ効果的に行うため、現在までにさまざまな方法・器材が開発されてきた。特に近年では、根尖付近に吸引針を留置し根管内を陰圧に保つことで、根管洗浄液の流れをコントロールしながら根管洗浄を行うApical Negative Pressure Irrigation Technique (ANPIT)が注目されている。我々は世界に先駆けて、iNPニードルと電気的根管長測定器とを組み合わせた根管内吸引洗浄法を開発した。この方法では、電気的根管長測定器を吸引針に接続し、洗浄液の到達性を把握しながら根管洗浄を行うことができる。我々は既にiNPニードル、EndoVacシステムのマイクロカニューレ、さらに28Gのプラント針を使用し、手でシリンジから根管内へ洗浄液を送り込む従来法

(Conventional Irrigation Technique: CIT) とANPITとを比較し、それぞれについて根管洗浄液の挙動を数値流体力学 (Computational Fluid Dynamics: CFD) の手法を用いて解析し、報告してきた。これらの洗浄針のほかにサイドベントニードルがあり、安全性が高いとされているが、サイドベントニードルについてANPITとCITによる洗浄液の挙動を比較した報告は見当たらない。本研究の目的は、サイドベントニードルを用いてANPITおよびCITで根管洗浄を行い、その際の洗浄液の挙動を解析することである。

【材料および方法】

根管洗浄用サイドベントニードルとして、30Gのチャンネルクリーンニードル (ペントロンジャパン、東京) を採用した。対象の根管は、根尖孔径0.4 mm、根管長15 mm、テーパ-0.06の設定とした。ニードル先端を根尖孔から1 mm離れた根管内に設置してモデリングを行い、CFDソフトウェアOpenFOAM (SGI, California, USA)を用いて定常状態での流体の数値解を算出した。結果は可視化ソフトウェアParaView (Kitware Inc. New York, USA)で表示し、洗浄液の挙動特性を比較検討した。

【成績】

ANPITを用いた根管洗浄では、洗浄液がニードルのベント開口部の歯冠側端から吸引され、根尖付近では洗浄液の動きが確認されなかった。一方、CITではベントから根尖へ向かう、一定の速度を持った根管洗浄液の流れが確認され、ニードル先端付近でも洗浄液の動きが確認された。

【考察】

サイドベントニードルに限らず、ANPITでは吸引針の開口部の歯冠側端で多くの根管洗浄液が吸引される。このため、サイドベントニードルのような歯軸に沿ったスリット状の吸引孔では、開口部全体を有効に利用することができない。一方、CITによる洗浄では、ニードルから流出した根管洗浄液は根尖方向のみならず根管壁方向のベクトルも有しているため、すみやかに根管壁に衝突して流れが分散する。その結果、根尖孔外へ洗浄液を逸出するリスクはプラント針に比べて小さくなる。また、ANPITとCITとを比較すると、根管洗浄液の挙動範囲に1.2 mm程度の差があり、CITでは根尖付近でも根管洗浄液の流れが確認されたことから、サイドベントニードルを用いる場合は、ANPITよりもCITのほうが効果的であると考えられた。

【結論】

サイドベントニードルの場合、ANPITよりもCITで用いるほうが根尖部まで根管洗浄液を供給しやすい。またANPIT、CITとも、根尖部では根尖へ向かう根管洗浄液の流れがほぼ認められず、サイドベントニードルの安全性が示唆された。

## Er:YAG レーザーを用いた抜髄法に関する基礎的研究

<sup>1)</sup>九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野, <sup>2)</sup>九州大学病院歯内治療科  
○吉嶺嘉人<sup>1)</sup>、松本妃可<sup>1)</sup>、佐藤浩美<sup>2)</sup>、新井裕基<sup>1)</sup>、木原智子<sup>1)</sup>、赤峰昭文<sup>1)</sup>

### A preliminary study on Er:YAG laser-assisted pulpectomy

<sup>1)</sup>Dept. of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dentistry, Kyushu University, <sup>2)</sup>Dept. of Endodontology, Kyushu University Hospital  
○YOSHIMINE Yoshito<sup>1)</sup>, MATSUMOTO Himeka<sup>2)</sup>, SATO Hiromi<sup>2)</sup>,  
ARAI Yuki<sup>1)</sup>, KIHARA Tomoko<sup>1)</sup>, AKAMINE Akifumi<sup>1)</sup>

#### 【研究目的】

今日の抜髄法は、髓腔開通後に根管切削器具を用いて拡大・形成を行う「機械的清掃」と、次亜塩素酸ナトリウム溶液等の薬液を用いて歯髄などの軟組織および象牙質切削片などのデブリを洗い流す「化学的清掃」を併用する方法に基づいている。しかしながら、根管切削器具による方法には、根管壁へのスミヤ層の形成、亀裂の発生などの問題点のあることが知られている。本研究では、新しい抜髄法としてレーザーを用いた抜髄および洗浄操作後の根管壁の超微構造を観察し、さらに根管内でレーザーを照射した際の歯根表面の温度変化を測定することで、レーザー抜髄法の臨床応用の可能性に関する予備的データを収集することを目的とした。

#### 【材料および方法】

##### 1) 歯髄組織の蒸散と根管内の洗浄

矯正治療を目的に抜歯されたヒト健全小臼歯を使用した。エナメル質・セメント質境で切断した後に、K-ファイル(#15)を根管内に挿入し、根尖孔からファイル先端が見える長さから2 mm を作業長に設定した。レーザー抜髄法では、Er:YAG レーザー装置 (Erwin AdvErl:モリタ) を用いて、次の3つのステップで照射 (30 mJ・20 pps) を行った。①作業長の位置まで石英ファイバーチップ (R135T:モリタ) を挿入し、注水下での10秒間の静止照射、②作業長の位置までチップを挿入し、根管の4方向に沿わせてゆっくりと引き上げながらの照射 (4回)、③NaOCl を根管内に満たし、作業長の位置からゆっくりと引き上げながらの照射 (4回)。最後に、シリンジに容れた蒸留水で根管を洗浄した。

##### 2) 根管壁の超微構造の観察

①10秒間の静止照射 ②4方向の引き上げ照射 ③4回のレーザー洗浄照射の各ステップ後の試料の根管壁面を走査型電子顕微鏡 (JEM-5400LV:JOEL) で観察した。

##### 3) 歯根表面の温度変化の測定

作業長の位置までレーザーチップを挿入し、①10秒間の静止照射 ②引き上げ照射 ③レーザー洗浄の各ステップ時の歯根表面の温度変化を赤外線サーモグラフィ (TVS-2000ST:日本アビオニクス) を用いて測定した。

#### 【結果】

10秒間の静止照射後のSEM像では、解剖学的根尖から約2 mm上方の位置で根管壁は拡大されていた。根管壁には一部に開口した象牙細管を認めるが、大部分は歯髄組織で覆われていた。4方向の引き上げ照射後の根管壁には、象牙細管が開口した領域と軟組織で覆われた領域が観察された。前者では、歯髄組織はほぼ除去され、レーザーによる蒸散に特徴的な象牙細管が開口した像が観察された。レーザー洗浄後の根管壁の全領域において歯髄組織は消失し象牙細管は開口していた。強拡大像では球形の凹凸構造を持つ石灰化球様の構造が認められた。一方、10秒間の静止照射時のサーモグラフィ観察では、照射開始とともにチップ先端相当部で徐々に温度上昇を認めたが、5℃以下の上昇に留まった。

#### 【考察】

レーザー抜髄法では歯根に亀裂を生じる危険性がなく、また、スミヤ層が形成されないためEDTA製剤の使用による歯の脆弱化を防止できる、など従来からの金属製切削器具を用いた抜髄法にはない特長があると考えられる。

#### 【結論】

Er:YAG レーザーを応用した抜髄法は、根管壁の清掃効果が高く、熱による為害性の可能性も低いことから、今後の実用化が期待される。

## Er:YAG レーザーを用いた根管洗浄時に生じる根尖孔外の圧力 -照射距離による影響-

○佐竹和久<sup>1</sup>, 八尾香奈子<sup>1</sup>, 市川勝<sup>1</sup>, 渡辺聡<sup>1</sup>, 安生智郎<sup>1</sup>, 海老原新<sup>1</sup>, 小林千尋<sup>2</sup>, 須田英明<sup>1</sup>

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

2. 東京医科歯科大学歯学部附属病院 歯科総合診療部

Effect of Lasing Distance on Periapical Pressure Generated by Er:YAG Laser-activated Root Canal Irrigation

OSATAKE Kazuhisa<sup>1</sup>, YAO Kanako<sup>1</sup>, ICHIKAWA Masaru<sup>1</sup>, WATANABE Satoshi<sup>1</sup>, ANJO Tomoo<sup>1</sup>, EBIHARA Arata<sup>1</sup>, KOBAYASHI Chihiro<sup>2</sup>, and SUDA Hideaki<sup>1</sup> 1. Pulp Biology and Endodontics,

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

2. Oral Diagnosis and General Dentistry, Dental Hospital, Tokyo Medical and Dental University

### 【目的】

根管洗浄時に洗浄液が根尖周囲組織へ溢出することによる為害性が懸念されており、根管洗浄時において根尖孔外へ加わる圧力を検討した報告等がある。通常はシリンジを使用する根管洗浄 (conventional irrigation, 以下「CI」) が用いられているが、近年 Er:YAG レーザーを用いた根管洗浄 (laser-activated irrigation, 以下「LAI」) の有効性が報告されている。しかしながら、LAI によって根尖孔外へ加わる圧力を測定した報告はほとんどない。本研究では、LAI によって根尖孔外に加わる圧力を検討することを目的とした。

### 【材料および方法】

作業長 15 mm, 40 号 0.06 テーパーに調整したプラスチックピペットチップ (10 μm ロングチップ, 深江化成) を模擬根管として用いた。LAI 群では、Er:YAG レーザー装置 (Erwin AdvErL, モリタ製作所) および付属チップ (R200T, 同) を使用し、根管模型の底から 2, 5, 10 mm 手前にチップ先端を設置し、模擬根管内に満たした蒸留水を 70 mJ 10 pps の出力条件にて各 20 秒間作用させた (LAI2, 5, 10 群)。CI 群では、27G 洗浄針およびシリンジ (ニプロブランド針, ニプロシリンジ, ニプロ) を用い、模擬根管の底から 2, 5, 10 mm 手前に洗浄針先端を設置し、蒸留水 1 ml で各 20 秒間根管洗浄した (CI2, 5, 10 群)。根尖孔外に生じた圧力は、ビニールチューブを介して圧力計測装置 (AP-12S, キーエンス) に接続し、各群それぞれ 10 回ずつ計測した。また、統計学的解析には一元配置分散分析および Games-Howell 検定を用い、有意水準を 5% とした。

### 【結果】

CI2 群は他の群と比較して大きな根尖孔外の圧力を生じていた ( $p < 0.05$ )。LAI2 群で生じた最大圧力の平均値は CI5 群と同程度であり ( $p > 0.05$ )、CI10, LAI5 および LAI10 群よりも大きな圧力を生じていた ( $p < 0.05$ )。CI 群, LAI 群とも、根尖孔外の圧力は照射距離間で有意差を認めなかった ( $p > 0.05$ )。

### 【考察】

LAI は根管内にキャビテーション、高速の水の流れ、衝撃波を発生させるといわれており、洗浄液が根尖孔外へ溢出する距離は従来法よりも大きいという報告もあるが、本実験条件下では根尖孔外に生じる圧力は従来法よりも小さかった。臨床では歯周組織圧が存在し、その値はヒト中心静脈圧 (5.88 mmHg) に近似するという報告がある。歯周組織圧は根管洗浄時の圧力に抗すると考えられるが、LAI2 および CI2, 5 群では上記の値を超える試料もあった。なお、CI 群において根尖孔外に生じる圧力は、従来の報告と同程度であった。

### 【結論】

本実験条件下では、Er:YAG レーザーを用いた根管洗浄法 (LAI) は従来法 (CI) よりも根尖孔外に生じる圧力が小さかった。しかしながら、根尖孔外へ洗浄液が溢出する可能性は残されており、LAI の臨床応用に際しては更なる検討が必要である。

## 脳由来神経栄養因子はヒト歯肉上皮細胞のアポトーシスカスケードを活性化する

広島大学医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 歯周病態学研究室  
○柏井桂 加治屋幹人 藤田剛 松田真司 武田克浩 柴秀樹 栗原英見

### BDNF induces apoptotic cascade of human gingival epithelial cells.

Department of periodontal medicine, division of applied life science, Hiroshima University graduate school of biomedical sciences.

○Kei Kashiwai, Mikihito Kajiya, Tsuyoshi Fujita, Shinji Matsuda, Katsuhiko Takeda, Hideki Shiba, Hidemi Kurihara

#### <目的>

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は神経細胞のみならず、様々な細胞の増殖、分化に関与することが知られている。これまでに、BDNF が歯周組織再生を促進することを、*in vivo, in vitro* の研究において明らかにしてきた (Takeda et al, 2005, Kajiya et al, 2008, Matsuda et al, 2012)。歯周組織再生はシャーピー繊維の埋入を伴った新生セメント質と歯槽骨、及び歯周靭帯を再構築することであるが、歯肉上皮の侵入はこれらの組織の再構築の場を占有し、歯周組織再生を阻害する。ビーグル犬の根分岐部病変Ⅲ級モデルを用いた実験では、BDNF による歯周組織再生過程で歯肉上皮の侵入は認められなかった。BDNF を安全で確実性の高い歯周組織再生療法として臨床応用するためには、この重要な知見をより詳細に分子レベルで理解し、再生のメカニズムを解明する必要がある。前回、日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会において、歯肉上皮細胞において BDNF が JNK カスケードを活性化することを報告した。JNK はアポトーシスシグナルを司ることが知られている。そこで、本研究では BDNF が JNK を介したアポトーシスカスケードを活性化すると仮説を立て、実験を行った。

#### <材料と方法>

細胞は、大阪大学村上教授から分与いただいた不死化ヒト歯肉上皮細胞株 (OBA9)、及び広島大学高田教授から分与いただいた不死化ヒト歯周靭帯細胞株 (HPL cells) を供試した。

- (1) OBA9 を KB2 で、HPL cells を DMEM で培養した。subconfluent に達した時点で、BDNF (0, 10, 25, 50, 100, 200 ng/ml) を各種時間で刺激し実験を行った。
- (2) BDNF 24 時間刺激後の細胞増殖を、BrdU assay kit で測定した。
- (3) OBA9、HPL cells における、BDNF の受容体である trkB と p75 の発現を Western blotting 法によって分析した。
- (4) BDNF 刺激による trkB、JNK のリン酸化、及びアポトーシスシグナル伝達因子カスパーゼ 3 の活性化を Western blotting 法によって分析した。
- (5) JNK のリン酸化の阻害剤である SP600125 を前処理することによって、BDNF 刺激に対する影響を確認した。
- (6) Lipofectamine 法によって p75、trkB の siRNA を導入し、BDNF 刺激に対する影響を確認した。

#### <結果>

- (1) BDNF 刺激は、HPL cells の増殖を促進したが、OBA9 の増殖には影響を与えなかった。
- (2) HPL cells と OBA9 は trkB、p75 を発現していた。また、BDNF 刺激は、HPL cells の trkB のリン酸化を明らかに促進したのに対し、OBA9 の trkB のリン酸化は微弱であった。
- (3) BDNF 刺激は、HPL cells の JNK のリン酸化には影響を与えなかったのに対し、OBA9 の JNK のリン酸化を促進した。
- (4) BDNF 刺激は OBA9 のカスパーゼ 3 の活性化を促進し、この活性化は JNK 阻害剤 SP600125 前処理により抑制された。
- (5) p75 siRNA 導入は OBA9 の p75 の発現を減弱させた。BDNF 刺激による、JNK のリン酸化、カスパーゼの活性化が p75 siRNA 導入によって抑制された。

#### <考察および結論>

BDNF は歯肉上皮細胞においては、歯周靭帯細胞とは異なり、trkB-ERK カスケードではなく、p75 受容体を介した JNK シグナル伝達経路が優位に働き、カスパーゼ 3 を活性化させ、アポトーシスを促進する可能性が示唆された。このことが、BDNF が歯周組織再生過程において歯肉上皮の深部増殖が観察されない一因であると推察される。

## ラット全身性免疫応答モデルにおける歯肉炎の病態

福岡歯科大学総合歯科学講座総合歯科学分野<sup>1</sup>, 生体構造学講座病態構造学分野<sup>2</sup>

○瀬野 恵衣<sup>1,2</sup>、大野 純<sup>2</sup>、山田 和彦<sup>1</sup>、谷口 奈央<sup>1</sup>、廣藤 卓雄<sup>1</sup>

### Gingival pathosis caused by systemic immune responses of the rats

Department of General Dentistry, Division of General Dentistry<sup>1</sup>, Department of Biological morphology, Division of Pathology<sup>2</sup>, Fukuoka Dental College

○Kei Seno<sup>1</sup>, Jun Ohno<sup>2</sup>, Kazuhiko Yamada<sup>1</sup>, Nao Taniguchi, Takao Hirofuji<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

歯肉における免疫応答は、アレルギーなどのように外的刺激による局所性と自己免疫疾患などの全身性のものがある。局所性および全身性免疫応答により、リンパ球浸潤を主体とする歯肉炎が展開される。しかしながら、全身性免疫応答に継発する歯肉炎は、しばしば治療抵抗性の臨床的態度を示す。その理由として、代表的な免疫応答には、Th1型とTh2型があり、これらの応答が標的とする歯肉組織に違いがみられる可能性がある。そこで、本研究では、ラットにTh1型あるいはTh2型全身性免疫応答モデルを作製し、継発症として発症する歯肉炎での標的組織の病態を免疫病理学的に検討した。

#### 【材料・方法】

- 1) Th1型あるいはTh2型全身性免疫応答モデルの作製: Th1型モデルは、(LEWxBN)F1ラットにLEW脾細胞を投与して作製した。Th2型は、BNラットに頻回、低濃度(1mg/kg)の塩化水銀を腹腔内投与して作製した。
- 2) 試料採取: 経目的に、脾臓、腎臓、歯肉を採取した。凍結試料から、凍結切片(免疫染色用)の作製およびtotal RNA抽出(RT-PCR法)を行った。
- 3) 免疫組織化学的検索およびISH法: 凍結切片に各種抗体を用いて、免疫組織化学的にエフェクター細胞、上皮組織での接着分子およびlupus band testなどの自己抗体などの検索を行った。さらに、サイトカインmRNA発現をISH法で検討した
- 4) サイトカインmRNAの組織発現: 病変部組織でのサイトカインmRNA発現を検討するために、各種プライマーをもちいてreal-time RT-PCR法を行った。

#### 【結果】

##### 1) Th1型歯肉炎

粘膜固有層でのマクロファージおよびT細胞浸潤で病変が発症し、T細胞が上皮層内に浸潤し、上皮細胞を傷害するsatellitosis(上皮細胞へのT細胞接着)がみられた。病変の進行による、上皮組織剥離からの潰瘍形成を認めた。(1)エフェクター細胞: CD8陽性T細胞、(2)標的組織: 上皮組織、とくに上皮細胞はインターフェロン・ガンマ(IFN- $\gamma$ )刺激によるICAM-1およびclass II発現が誘導された、(3)サイトカインの組織発現: IFN- $\gamma$  mRNA、(4)局所での免疫応答: Th1型免疫

##### 2) Th2型歯肉炎

粘膜固有層でのマクロファージ浸潤および上皮基底膜(BM)領域でのlupus band発現が特徴であった。病変の進行による明らかな上皮組織破壊は認めなかった。(1)エフェクター細胞: class IIおよびED1陽性の樹状細胞およびマクロファージ、(2)標的組織: BM領域で、同部ではimmune complex(IC)沈着およびマクロファージの集積、(3)サイトカインの組織発現: IL-4 mRNA発現、(4)局所での免疫応答: Th2型自己免疫応答

#### 【考察】

検索した歯肉炎モデルでは、誘導された免疫応答に関連した特徴的な歯肉炎の病態がみられた。Th1型では、エフェクター細胞の上皮親和性機構が特徴であった。この上皮傷害機序は、上皮細胞とエフェクター細胞でのICAM-1/LFA-1接着経路利用する可能性が示唆された。一方、Th2型においては、腎臓においてもIC沈着がみられ全身性自己免疫病が誘導されていた。Th2型歯肉炎においても、全身性自己免疫病の継発症(BMにおけるIC沈着など)としての病変が特徴であった。

【結論】全身性免疫応答の違いにより、歯肉粘膜での標的組織および病変進行の異なる歯肉炎が誘導された。

全身性免疫応答の違いにより、歯肉粘膜での標的組織および病変進行の異なる歯肉炎が誘導された。

## microRNA は歯肉線維芽細胞由来液性因子による間葉系幹細胞の分化を制御する

広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 歯周病態学研究室  
○兼田英里, 岩田倫幸, 石田 充, 高橋慶太, 永原隆吉, 藤田 剛, 柴 秀樹, 栗原英見

### microRNAs regulate differentiation of mesenchymal stem cells by humoral factors from gingival fibroblasts

Department of Periodontal Medicine, Division of Applied Life Sciences,  
Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University

○Eri Kaneda, Tomoyuki Iwata, Shu Ishida, Keita Takahashi, Takayoshi Nagahara,  
Tsuyoshi Fujita, Hideki Shiba, Hidemi Kurihara

#### 【目的】

歯周組織再生のひとつとして間葉系幹細胞 (MSC) 移植が行われている。移植された MSC は、移植局所において様々な刺激を受けて増殖・分化する。歯周組織構成細胞から分泌される液性因子も MSC の分化に影響を与えらる。また、いくつかの microRNA (miRNA) は MSC の分化を制御すると報告されており、MSC が発現する未分化マーカーとして 9 つの転写因子 (ETV1, ETV5, FOXP1, GATA6, HMG2, KLF12, PRDM16, SIM2, SOX11) が報告されている。MSC は miRNA やそれらの転写因子を介して制御されている可能性がある。そこで、本研究では歯肉線維芽細胞 (HGF) に着目し、HGF から分泌される液性因子が MSC における miRNA に与える影響を検討した。その後、液性因子によって発現が顕著に認められた miRNA が MSC における転写因子の発現と骨分化に与える影響を検討した。

#### 【材料および方法】

液性因子の作用を調べるために Transwell を用いて非接触下で MSC と HGF の共培養を行った。プレート上に MSC, Transwell 上に HGF または MSC を培養した。まず骨分化誘導時において HGF との共培養が MSC の骨分化に与える影響を確認した。骨分化誘導には  $\alpha$ -MEM に dexamethasone, ascorbic acid-2-phosphate,  $\beta$ -glycerophosphate を添加した培地を使用した。共培養を行ったのち、MSC から RNA を抽出し、骨分化マーカー遺伝子の mRNA 発現を real-time PCR によって検討した。石灰化を確認するために、Alizarin red 染色を行った。その後、通常培養において共培養による miRNA 発現レベルの解析を Array により網羅的に行い、miRNA ターゲット探索データベースを用いて最も影響を与える miRNA を抽出した。miRNA の mimic および inhibitor を MSC にトランスフェクションし、通常培養における 9 つの未分化マーカー転写因子と骨分化誘導時における骨分化マーカー遺伝子の mRNA 発現を検討した。

#### 【結果および考察】

HGF と MSC を骨分化誘導培地で共培養すると、MSC における Osteocalcin, BMP2, Runx2 の mRNA 発現は減少した。Alizarin red 染色では 2 週目から石灰化が確認され、HGF との共培養では石灰化の抑制が確認できた。377 種類の miRNA 発現レベルを比較したところ、HGF との共培養において 4 種の miRNA の上昇、3 種の miRNA の減少が確認された。miRNA ターゲット探索データベースを用いて miR-299-5p と miR-101-3p を候補 miRNA とし、MSC にトランスフェクションしたところ、いくつかの未分化マーカー転写因子の mRNA 発現レベルを制御した。miR-299-5p のトランスフェクション後、骨分化誘導を行ったところ Osteocalcin の mRNA 発現は減少した。

#### 【結論】

MSC 移植による歯周組織再生において、HGF から分泌される液性因子は miRNA を介して、MSC における未分化マーカー転写因子発現と骨分化を制御している可能性が示唆された。

## ヒト歯肉上皮細胞は TGF- $\beta$ type I receptor-smad2-caspase3/9 を介してアポトーシスを生じる

広島大学大学院医歯薬総合研究科 先進医療開発科学講座歯周病態学分野

○吉本 哲也 藤田 剛 應原 一久 加治屋 幹人 宮川 剛史 今井 遙香 柴 秀樹 栗原 英見

Human gingival epithelial cells induce apoptosis via TGF- $\beta$  type I Receptor-smad2-caspase3/9 signaling pathway.

Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University  
Graduate School of Biomedical Sciences

○Tetsuya Yoshimoto, Tsuyoshi Fujita, Kazuhisa Ouhara, Mikihiro Kajiya, Tsuyoshi Miyagawa, Haruka Imai, Hideki Shiba, Hidemi Kurihara

### 【目的】

過去の文献において、歯周病患者の歯肉上皮細胞では健常者の歯肉上皮細胞と比較し、より多くのアポトーシス陽性細胞が確認されることが報告されている。このことより歯肉上皮細胞の過度のアポトーシスは歯周炎の発症また進行に関連していると考えられる。それゆえに、歯周病原細菌によって引き起こされる歯肉上皮細胞のアポトーシスのメカニズムを解明することは歯周病の新しい予防法につながる可能性がある。しかしながらこのアポトーシスのメカニズムについては不明な点が多い。ここで過去の研究において、smad2 transgenic mice における接合上皮ではアポトーシスが誘導され、歯槽骨吸収を生じる事が報告されている。これらのことより本研究では、歯周病原細菌によって刺激されたヒト歯肉上皮細胞は smad2 signaling を介したアポトーシスを生じるのではないかと仮説を立てた。そこで、Aa の病原因子の一つである outer membrane protein 29kD(Omp29)を刺激物に用いて仮説の検証を行った。

### 【材料と方法】

上皮細胞は不死化したヒト歯肉上皮細胞 OBA9 (大阪大学, 村上伸也教授より供与)を使用した。培地 Hu-mediaKB2 に insulin, transferrin, 2-mercaptoethanol, 2-aminoethanol, sodium selenite, bovine pituitary extract, penicillin, streptomycin を添加して用いた。OBA9 をサブコンフルエントになるまで培養した。Omp29 は大腸菌系で合成したリコンビナントのものを使用した。OBA9 に Omp29 を 0, 1, 3, 6, 12, 24 時間作用させた後、Cell lysate を回収し cleaved caspase3/9 とリン酸化 smad2 をウェスタンブロット法によって検出した。さらに OBA9 のアポトーシスは TUNEL 法によって解析した。次に OBA9 のアポトーシスのメカニズムをリン酸化 smad2, cleaved caspase3/9 との関連性から明らかにするために、TGF- $\beta$  type I receptor(T $\beta$ RI) /Activin receptor の化学的阻害剤である SB431542(10  $\mu$ M)を用いて阻害実験を行った。OBA9 に SB431542 を Omp29 刺激 30 分前に投与し、続いて Omp29 を 0, 1, 3, 6 時間刺激した。また、OBA9 に T $\beta$ RI small interfering RNA (T $\beta$ RI siRNA)を 48 時間遺伝子導入し、その後 Omp29 を 0, 1, 3, 6, 12 時間刺激した。それぞれの Cell lysate を回収し、リン酸化 smad2, cleaved caspase3/9 をウェスタンブロット法で検出した。

### 【結果および考察】

OBA9 は、Omp29 の 6-12 時間刺激によって cleaved caspase3/9 の発現が上昇した。TUNEL 法においても OBA9 にアポトーシス陽性細胞の数が増加していた。また Omp29 刺激後 3 時間で OBA9 の smad2 のリン酸化が上昇していた。SB431542 と T $\beta$ RI siRNA はともに Omp29 刺激によって生じる OBA9 の smad2 のリン酸化を明らかに抑制した。さらに重要なことに、SB431542 と T $\beta$ RI siRNA による T $\beta$ RI シグナルカスケードの阻害によって、Omp29 刺激の OBA9 における cleaved caspase3/9 の発現は減弱していた。これらの結果から OBA9 においては T $\beta$ RI-smad2-caspase3/9 シグナル伝達経路を介してアポトーシスが生じることが示唆された。



歯の再植・他家移植後の歯髄におけるアポトーシスと細胞増殖：  
BrdU label-retaining cells との関連

<sup>1</sup> 神奈川歯科大・歯髄生物学、<sup>2</sup> 新潟大・医歯学総合・硬組織形態学  
○武藤徳子<sup>1</sup>、石井信之<sup>1</sup>、大島勇人<sup>2</sup>

**Apoptosis and cell proliferation in relation to BrdU label-retaining cells in the dental pulp following tooth replantation and allogenic tooth transplantation**

<sup>1</sup>Department of pulp biology and Endodontics, Kanagawa Dental University

<sup>2</sup>Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Noriko Mutoh<sup>1</sup>, Nobuyuki Tani-Ishii<sup>1</sup>, Hayato Ohshima<sup>2</sup>

【目的】我々はこれまで非対称分裂する歯髄幹細胞／前駆細胞を効率良くラベルする胎生期 BrdU ラベリング法をラットまたはマウスの歯の再植実験や他家移植実験に応用し、再植・移植後の歯髄再生過程において Label-retaining cells (LRCs) が歯髄中央部に維持されると象牙質形成が誘導され、LRCs が歯髄腔から消失すると歯髄腔内骨組織形成が惹起されること、他家移植においては歯髄内象牙質形成が誘導された場合でも歯髄腔から LRCs が消失し歯髄腔が象牙質で閉塞してしまうことを明らかにした (Histochem Cell Biol 134(3):227-241, 2010; Histochem Cell Biol 134(3):227-241, 2010; Cell Tissue Res 348(1):95-107, 2012)。しかしながら、歯の再植・移植に対する歯髄初期反応における LRCs の動態、LRCs とアポトーシスや細胞増殖との関連、歯の再植と他家移植に対する歯髄反応の相違は明らかになっていない。そこで今回我々は、マウスを用いて、歯の再植・他家移植後の LRCs の動態とアポトーシスや細胞増殖との関連を検索した。

【方法】歯の再植・他家移植後の歯髄における LRCs の動態を観察するために、妊娠 ICR マウスに 3 日間 BrdU を腹腔内投与し、生後 2 週齢のラベルマウスと非ラベルマウス間で歯肉フラップ形成に引き続き上顎第一臼歯を深麻酔下で抜去後、相互に他家移植およびラベルマウスを用いた再植を行った。術後 3 日～4 週後にアルデヒド系固定液で灌流固定し、EDTA 脱灰後、パラフィン切片を作製し、抗ネスチン (象牙芽細胞分化マーカー)、抗 BrdU 抗体、抗 Ki67 (細胞増殖マーカー) を用いた免疫染色および TUNEL 染色 (アポトーシスの検出) を施し顕微鏡で観察した。さらに、抗 BrdU + 抗 Ki67 抗体二重染色、抗 BrdU 抗体 + TUNEL 二重染色を行った。

【結果および考察】

歯の再植・移植は象牙芽細胞層の変性を引き起こし、ネスチン陽性反応が歯髄から消失すると共に、歯冠部では広範なアポトーシスが惹起された。歯冠部のアポトーシスは術後 3 日に最大で術後 7 日まで持続した。その後、歯髄腔の血行の回復に伴い、歯根部から歯冠部へと歯髄内細胞増殖活性が充進し、術後 5～7 日で既存の象牙質に連続して第三象牙質形成が開始し、その直下にネスチン陽性象牙芽細胞様細胞が配列した。細胞増殖は術後 3 日に歯根部歯髄で開始、術後 5 日で歯冠部の細胞増殖活性が最大になり、歯の再植では術後 2 週に細胞増殖活性が減少するものの、歯の他家移植では術後 4 週まで細胞増殖活性が持続した。術後初期においては、根尖部歯髄の濃く染まる LRCs が維持されており、LRCs の細胞増殖活性も更新した。歯の他家移植後 2 週の歯髄腔には、免疫拒絶反応群、象牙質形成群、象牙質+骨組織混在群の 3 通りの治癒パターンが観察された。BrdU でラベルした移植歯では、象牙質形成群では濃く染まる LRCs が歯髄中央部に維持されており、象牙芽細胞様細胞にコミットされていたのに対し、象牙質+骨組織形成群における骨様組織周囲には LRCs は観察されなかった。歯の他家移植 4 週では、歯髄腔から LRCs が消失した。一方、歯の再植では、術後 4 週においても歯髄中央部に LRCs が維持されており、歯の再植と他家移植で LRCs の動態が異なることが明らかになった。したがって、歯の再植、他家移植後に歯冠部の象牙芽細胞や歯髄幹細胞／前駆細胞と考えられる濃く染まる LRCs が歯冠部歯髄からアポトーシスにより除去されるが、根尖部歯髄には濃く染まる LRCs が維持され、その後活発な細胞増殖により、歯髄組織が再構成され、再び歯髄中央部に濃く染まる LRCs が維持されることが明らかとなった。さらに、歯の他家移植では、術後 4 週で濃く染まる LRCs が歯髄腔から消失することより、幹細胞ニッチが消失することが示唆された。

## 日本人慢性歯周炎患者での EB ウイルスと歯周病原菌の検出

日本大学松戸歯学部歯周治療学講座<sup>1</sup>, 日本大学歯学部細菌学講座<sup>2</sup>  
○加藤彩子<sup>1</sup>, 今井健一<sup>2</sup>, 落合邦康<sup>2</sup>, 小方頼昌<sup>1</sup>

### Detection of Epstein-Barr Virus and Periodontopathic Bacteria in Japanese Chronic Periodontitis Patients

Department of Periodontology<sup>1</sup>, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Department of Bacteriology<sup>2</sup>,  
Nihon University School of Dentistry

○Ayako Kato<sup>1</sup>, Kennichi Imai<sup>2</sup>, Kuniyasu Ochiai<sup>2</sup>, Yorimasa Ogata<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

歯周病は、細菌因子、環境因子および宿主因子が複雑に絡み合って発症・進行する炎症性疾患である。日常臨床での歯周病治療では、歯周基本治療や歯周外科治療に対する反応が比較的良好な症例、反応が悪い症例、短期間で急速に付着の喪失と骨吸収を認める症例や難治性の症例に遭遇することがある。その原因として、一般的には、歯周病原菌の量や質の差、環境因子（喫煙等）や宿主因子（全身疾患等）の差が誘因となると考えられている。近年、歯周病と Epstein-Barr virus (EBV) および Human cytomegalovirus (CMV) との関係が報告されるようになり、歯周病の発症・進行と EBV、CMV 等のウイルスとの関係を検討することは、その病態を知るうえで重要であると思われる。そこで我々は、慢性歯周炎患者と健常者における、EBV と *Prophyromonas gingivalis* (*P.g.*) の検出およびそれらの相互関係について検索を行った。

#### 【材料および方法】

慢性歯周炎患者 85 名 (57.4±13.1 歳) の同一口腔内から、5 mm 以上のプロービングポケット深さ (PPD) 部位 1 か所 (平均 PPD ; 6.18±1.04) と 3 mm 以下の PPD 部位 1 か所 (平均 PPD ; 2.91±0.36)、およびアタッチメントロスの無い健常者 20 名 (45.9±17.0 歳) の 3 mm 以下の PPD 部位 (平均 PPD ; 2.73±0.45) 2 か所 (計 40 部位) から、滅菌ペーパーポイントを使用して 30 秒間、3 回歯肉溝滲出液を採取した。歯肉溝滲出液から DNA を抽出後、特異的プライマーを用いた nested PCR および multiplex PCR で、EBV および *P.g.* の検出を行った。日本大学松戸歯学部倫理委員会承認 (EC11-027)

#### 【結果】

EBV は慢性歯周炎患者の深い PPD 56 部位 (66%)、浅い PPD 41 部位 (48%)、健常者の浅い PPD 18 部位 (45%) で検出された。EBV の検出率に、男女差は認められなかった。*P.g.* は慢性歯周炎患者の深い PPD 55 部位 (65%)、浅い PPD 34 部位 (40%)、健常者の浅い PPD 16 部位 (40%) で検出され、深い PPD 34 部位 (40%)、浅い PPD 12 部位 (14%)、健常者の浅い PPD 5 部位 (13%) では、EBV と *P.g.* の共感染が認められた。慢性歯周炎患者の 5 mm 以上の PPD 部位 (85 部位) の中で、EBV のみが 20 部位、*P.g.* のみが 19 部位、EBV と *P.g.* の両方が 36 部位と最も多く検出され、10 部位では両方とも検出されなかった。Bleeding on probing (BOP) は、EBV と *P.g.* の両方とも検出されなかった 10 部位の 50% で認められた。EBV のみが検出された 20 部位の 65%、*P.g.* のみを検出した 19 部位の 58%、EBV と *P.g.* の両方を検出した 36 部位の 61% で BOP が高率で検出されたが、BOP の発現率に有意差は認められなかった。EBV と *P.g.* の共感染が 5 mm 以上の PPD 部位に存在するオッズ比は 4.67 であった。

#### 【考察】

EBV は、約 95% 以上の健康成人に潜伏感染しているが、歯周炎患者の深い PPD 部位では、高率で EBV と *P.g.* 菌が共感染しており、歯周病原菌の代謝産物が EBV を再活性化する可能性が考えられた。EBV の再活性化はサイトカインの産生異常を引き起こし、歯周病の進行や歯槽骨吸収に関与すると考えられる。今後、ウイルスと歯周炎の発症・進行のメカニズムが解明されることにより、歯周病の診断や治療法も変化する可能性が示唆される。

日本人歯周病患者を対象とした抗菌ペプチド遺伝子の SNPs 解析と疾患感受性の検討

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 歯周歯内治療学分野

○生田貴久, 稲垣裕司, 中島由紀子, 板東美香, 木戸淳一, 永田俊彦

Gene polymorphisms of antimicrobial peptides in Japanese periodontitis patients

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences,

University of Tokushima Graduate School

○Takahisa IKUTA, Yuji INAGAKI, Yukiko NAKAJIMA, Mika BANDO,

Jun-ichi KIDO and Toshihiko NAGATA

【目的】

歯周病は遺伝的因子と環境因子が関与する多因子性疾患であり, 近年, 遺伝的因子として一塩基多型 (SNPs; Single Nucleotide Polymorphisms) が注目されている。一方, ヒトの口腔内は常に病原微生物にさらされており, 感染に対しては自然免疫と獲得免疫の2つの免疫システムによって防御されている。これらの免疫システムのうち自然免疫は微生物の接触の初期段階から作動し, 生体防御の一役を担っている。自然免疫において重要な役割を果たすのが抗菌ペプチドであり, 真核生物では800種類以上の存在が知られている。現在までに多くのSNPsが歯周病の発症や進行に関連することが明らかにされているが, 抗菌ペプチドのSNPsと歯周疾患との関連性についての報告は少ない。またSNPsと疾患との関連性には人種や地域間での差が存在すると考えられている。我々は第137回日本歯科保存学会秋季学術大会で,  $\beta$ -ディフェンシン-1のSNPであるrs1800972 C/C保有者は中等度~重度慢性歯周炎のリスクが有意に高いことを示した。そこで今回被験者数を増やして日本人の歯周病患者における抗菌ペプチドのSNPsを解析するとともにそのメカニズムについて *in vitro* の系で検討を行った。

【材料と方法】

徳島大学病院を受診した日本人の患者で, 本研究の参加に同意の得られた者を被験者とした(徳島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会 承認番号H23-7)。歯周病群62名(重度慢性歯周炎28名, 中等度慢性歯周炎13名, 侵襲性歯周炎21名), 対照群43名(慢性歯周炎に対する対照22名および侵襲性歯周炎に対する対照21名), 合計105名の血液試料からDNAを抽出して, 抗菌ペプチドの既知の7SNPs( $\beta$ -ディフェンシン-1; rs1799946, rs1800972, rs11362, ラクトフェリン; rs1126478, およびカルプロテクチン; rs3795391, rs3806232, rs3885688)をインバーター法により解析した。引き続き, 各SNPsについて統計処理を行い, オッズ比, 95%信頼区間を求め, 有意差を検定した。一方, 被験者の一部から歯肉溝滲出液(GCF)を採取し, GCF中に発現している $\beta$ -ディフェンシン-1およびラクトフェリンをELISA法により定量した。次に, ヒト口腔上皮細胞株TR146を用いて,  $\beta$ -ディフェンシン-1, -2およびラクトフェリンの発現に対する歯周病細菌由来リポ多糖(LPS)の影響を検討した。すなわち, 10%ウシ胎児血清を含むHam's F12培地で培養したTR146細胞に, *P. gingivalis*由来LPSを10, 100, 1000ng/mlの濃度で添加し, 培養24時間, 48時間後に全RNAを抽出し, Real-time PCR法にて各種遺伝子の発現量を調べた。

【結果】

$\beta$ -ディフェンシン-1のrs1800972 C/C保有者は歯周病のリスクが有意に高く(オッズ比2.510), 特に重度慢性歯周炎や, 中等度~重度慢性歯周炎の患者でrs1800972 C/C保有者が多かった(オッズ比4.154, 4.038)。それ以外の6SNPsでは歯周病との関連性は認められなかった。さらに, 被験者のGCF中に発現している $\beta$ -ディフェンシン-1およびラクトフェリンを定量した結果, rs1800972 C/C保有者の $\beta$ -ディフェンシン-1濃度が有意に低かった。その他の $\beta$ -ディフェンシン-1のSNPsおよびラクトフェリンのSNPでは有意な差は認められなかった。ヒト口腔上皮細胞株を用いた実験では,  $\beta$ -ディフェンシン-1の発現は定常的であり, LPSの添加によって発現に変化はなかった。一方,  $\beta$ -ディフェンシン-2はLPS濃度に依存して発現が増強し, ラクトフェリンもLPSによって発現が増強する傾向が認められた。

【考察および結論】

以上の結果より,  $\beta$ -ディフェンシン-1のrs1800972 C/C保有者は歯周病のリスクが有意に高く, 特に慢性歯周炎の疾患感受性に対する関連が示された。また $\beta$ -ディフェンシン-1のrs1800972がGCF中の $\beta$ -ディフェンシン-1の定常的な発現をコントロールし, GCF中の $\beta$ -ディフェンシン-1レベルが低い場合に歯周病が発症しやすい可能性が示された。

## 全身疾患に影響を及ぼす *Streptococcus mutans* 新規病原性因子の探索

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科顎顔面機能再建学講座歯科保存学分野

○藤島慶 徳田雅行 鳥居光男

Search for novel pathogenic factors of *Streptococcus mutans* related to systemic disease  
Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Graduate School of  
Medical and Dental Sciences  
○FUJISHIMA Kei, TOKUDA Masayuki and TORII Mitsuo

【目的】近年、口腔内感染症と動脈硬化症、糖尿病、高血圧症などの全身疾患との関連性が報告され高い注目を集めている。口腔常在菌で、う蝕原因菌である *Streptococcus mutans* は菌血症や心内膜炎等の原因菌として知られているが、最近、*S. mutans*の菌体表層タンパクである Collagen-Binding-Protein (CBP) が出血性脳卒中を増悪させる直接的な病原性因子であるという報告がなされ(Nakano, K et al., Nat. commun. 2:1-10, 2011)、本菌の全身性に及ぼす影響についてのさらなる検討が必要である。これまでに *S. mutans*のう蝕発症に関する研究は多くなされているが、全身性に及ぼす影響については十分な検証がなされていない。そこで申請者は *S. mutans*の全身性に影響を及ぼす病原性因子を考慮し、*S. mutans*の全身疾患への関与、及び全身疾患をひきおこすメカニズムの解明という観点から、*S. mutans*の細胞に対する付着に着目した。本研究では最初のアプローチとして *S. mutans*の細胞への付着メカニズムの解明を行い、*S. mutans*の全身疾患に影響を及ぼす新規病原性因子の探索、同定を目的とする。

【方法】種々の細胞への付着、定着機構に関して、菌体表面に発現する表層タンパクについて検証を行った。*S. mutans*の表層因子としてペリクルへの付着能を有する PAc、脳卒中に関連する因子 CBP、グルカン結合タンパク GTFs 等が報告されているが、ゲノム上にはまだ未解析の細胞表層タンパクをコードする遺伝子が多数存在している。菌体表層タンパクの発現は菌体内で生成されたタンパクを菌体表面へと局在化させる Sortase 依存性のものと Sortase 非依存性のものに分けられる。*S. mutans*は SortaseA を所有するが、その遺伝子欠損変異株を作製し細胞に対する付着能を親株と比較、検証した。

**細菌付着試験方法** 96 穴プレートにおいてコンフルエントに達した細胞に対して種々の細菌を添加し 1~2 時間反応させた。反応後上清を除き PBS で洗浄し、Trypsin/EDTA により細胞をプレートから剥がした。その後 TSA 寒天培地にプレーティングし、生えてきたコロニー数のカウントを行い付着率を算定した。また、回収した培養上清を用いて、real-time PCR にて付着率の算定も合わせて行った。

【結果】Hela 細胞を用いた細菌付着試験では、親株である *S. mutans* UA159 株よりも、*sortaseA* の遺伝子欠損変異株において付着率が低下する傾向が認められた。

【考察】これまでの検証により、*S. mutans* UA159 株において、Hela 細胞への付着に関して、菌体内で生成されたタンパクを菌体表面へと局在化させる SortaseA の関与が示唆された。今後は PAc を含めた SortaseA 依存性の表層タンパクをコードする遺伝子欠損株を作製し付着試験を行い、Hela 細胞に対する *S. mutans* UA159 の付着メカニズムの解析を行う。また、*S. mutans* の実際の血流を介した全身への波及経路を考慮し、感染源である口腔内における歯肉細胞、象牙芽細胞、歯髓細胞、さらに血管内皮細胞での付着試験を行い、*S. mutans* の全身疾患に影響を及ぼす新規病原性因子の探索、同定について検証を進める予定である。

## 歯周ポケットからの臨床分離株に対する抗菌薬の有効性、耐性の検討

新潟大学医歯学総合病院 歯科総合診療部<sup>1</sup>、  
新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔保健学分野<sup>2</sup>、歯周診断・再建学分野<sup>3</sup>  
○中島貴子<sup>1</sup>、奥井隆文<sup>3</sup>、伊藤晴江<sup>1</sup>、中島麻由佳<sup>2,3</sup>、多部田康一<sup>3</sup>、山崎和久<sup>2</sup>

### Effect of antimicrobials to bacteria colonizing periodontal pockets

General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital<sup>1</sup>,  
Laboratory of Periodontology and Immunology, Division of Oral Science for Health Promotion<sup>2</sup>, Division of  
Periodontology<sup>3</sup>, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Nakajima T<sup>1</sup>, Okui T<sup>3</sup>, Ito H<sup>1</sup>, Nakajima M<sup>2,3</sup>, Tabeta K<sup>3</sup>, Yamazaki K<sup>2</sup>

#### 【背景および目的】

歯周炎はバイオフィルム感染症である。そのために、抗菌薬を使用する際には機械的除去との併用療法がコンセンサスとなっている。近年バイオフィルムを形成している細菌にも奏功する抗菌薬が開発され臨床で使用されている。歯周治療での使用頻度が増しているニューキノロン系抗菌薬シタフロキサシン (STFX) やマクロライド系抗菌薬アジスロマイシン (AZM) もバイオフィルムへの一定の奏功が報告されている。一方で抗菌薬の頻用による耐性菌の高頻度出現が大きな問題となっている。歯周治療における抗菌薬の適正使用のためには実際の歯周ポケット内から分離される細菌に対する抗菌薬の有効性と抗菌薬の歯肉溝滲出液 (GCF) 中への移行性についてのデータの蓄積が不可欠である。本研究では日本人の歯周ポケットからの臨床分離株に対する STFX、ならびに AZM の有効性と歯肉溝滲出液中薬物濃度を明らかにする。

#### 【材料と方法】

新潟大学医歯学総合病院歯科にて歯周病安定期治療を受けており、活動性歯周ポケットが認められるようになった患者 50 名から本研究への参加に書面にてインフォームドコンセントを取得した。本研究は新潟大学医歯学総合病院治験審査委員会の承認を得て行った (承認番号 NH-23-010)。患者をランダムに 25 名ずつ 2 群に分け、一方には STFX、他方には AZM を経口投与した。服薬前のベースライン、服薬 1 か月後、3 か月後に歯周ポケット内からペーパーポイントにて細菌を採取し、培養検査にて菌種、菌株を特定し、さらに STFX と AZM に対する最小発育濃度 (MIC) を測定した。また、初回服薬の 2 時間後、ならびに最終服薬の 2 時間後に GCF をペーパーストリップスにて採取し、薬物濃度を測定した。

#### 【結果】

歯周ポケットから検出される歯周病原細菌のうち *Porphyromonas gingivalis* については線毛 FimA の type II および IV 型であり、抗菌薬に対する MIC は STFX 0.06  $\mu$ g/ml、AZM 2  $\mu$ g/ml であった。最も高頻度に培養された歯周病原細菌は *Prevotella intermedia* であり、STFX 0.03~0.5  $\mu$ g/ml、AZM 0.25~32  $\mu$ g/ml という MIC であった。培養検出されたすべての口腔レンサ球菌に対する抗菌活性は STFX は MIC 0.06  $\mu$ g/ml が高頻度であり、AZM は <0.004  $\mu$ g/ml~>32  $\mu$ g/ml まで広く分布していた。また AZM の MIC が高い菌株群にはマクロライド耐性遺伝子が検出された。培養検出されたすべての嫌気性菌に対して STFX は MIC 0.06  $\mu$ g/ml が高頻度で >1  $\mu$ g/ml の菌株は認められず、AZM は 0.25  $\mu$ g/ml~>32  $\mu$ g/ml の MIC であった。服薬 2 時間後の GCF 中薬物濃度は STFX 初回服薬 2 時間後が 0.64  $\mu$ g/ml、最終服薬 2 時間後が 1.36  $\mu$ g/ml、AZM はそれぞれ 0.48  $\mu$ g/ml、5.57  $\mu$ g/ml であった。

#### 【考察と結論】

いずれの抗菌薬も歯周病原細菌に有効な MIC を超える濃度が GCF 中に移行していた。歯周ポケット内から分離された歯周病原細菌 *P. gingivalis* に対しては STFX と AZM のいずれも良好な MIC を呈したが、*P. intermedia* に対しては AZM の MIC が高い菌株が存在した。検出された口腔レンサ球菌の 50% がマクロライド耐性遺伝子を有しており、マクロライドの高頻度の使用によって選択圧を高め、耐性菌率の上昇を誘導していることが推察された。

歯周ポケット内の歯周病原細菌に対して STFX、AZM のいずれもが有効であるが、選択圧を考慮すると抗菌療法を適用する症例は慎重に選ぶべきであり、今後も日本国内の歯周ポケット臨床分離株のデータを蓄積していくことが必要である。

【利益相反】本研究は第一三共株式会社の支援を受けているが、データの解釈は同社とは独立して行われた。

## 抗菌光線力学療法が *Porphyromonas gingivalis* の増殖に及ぼす影響について

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 歯周病学分野

<sup>2</sup>日本大学松戸歯学部 生体分子学・生化学講座

○上窪 彩乃<sup>1</sup>, 平塚 浩一<sup>2</sup>, 青木 章<sup>1</sup>, 竹内 康雄<sup>1</sup>, 安孫子 宜光<sup>2</sup>, 和泉 雄一<sup>1</sup>

### Influence of antimicrobial photodynamic therapy on growth of *Porphyromonas gingivalis*

<sup>1</sup>Department of Periodontology, Graduate school of Medical and Dental Sciences,  
Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo  
○Ayano Uekubo<sup>1</sup>, Koichi Hiratsuka<sup>2</sup>, Akira Aoki<sup>1</sup>, Yasuo Takeuchi<sup>1</sup>, Yoshimitsu Abiko<sup>2</sup>, Yuichi Izumi<sup>1</sup>

#### 【目的】

近年、歯周治療において抗菌光線力学療法 (a-PDT) が注目され、赤色光線と青色色素の組み合わせによる a-PDT の臨床応用が行われ始めた。私達は青色光線の Blue LED (BL) と赤色色素の Rosebengal (RB) を組み合わせた新しい a-PDT の効果の検討を行っている。これまでに私達は嫌気条件下での BL の照射によって *Porphyromonas gingivalis* の増殖が抑制され、さらに RB を併用した a-PDT により抑制が顕著になることを示した。本研究では、RB 添加後の BL 照射における一時的な好気条件下への暴露の有無が *P. gingivalis* に対する抗菌効果に及ぼす影響の相違について、RB 添加単独、BL 照射単独処置の場合を含め詳細に検討を行った。

#### 【材料および方法】

OD<sub>600nm</sub> の吸光度を 0.1 に調整した *P. gingivalis* ATCC33277 の菌液を用いた。まず 1. 未処置群, 2. RB 添加群, 3. BL 照射群, 4. RB+BL 群を設定し、さらに各群において嫌気下と好気下において照射、また照射を必要としない群では照射群と同時間の好気条件下への暴露を行った群を設定し、全 8 群とした。RB 群では最終濃度が 1 μg/ml になるように菌液に直接添加し、RB を添加しない群では等量の生理食塩水を添加した。BL を照射した群では、450–470 nm の青色光 (Flash Max2, CMS DENTAL, Denmark) を 1 W/cm<sup>2</sup> の出力で、生理食塩水あるいは RB 試薬添加後の菌液に 5 秒間照射した。基本的に実験操作のほとんどを嫌気チャンパー内で行うことにより嫌気状態を保ち、また BL 以外の二次的な光の影響を極力避けるために BL 照射時を除いて遮光条件下で操作し、照射後の菌液についても遮光条件下で嫌気培養を行った。照射後各 6, 12, 18, 36, 48 時間において OD<sub>600nm</sub> で吸光度を測定し、各菌液における細菌の増殖傾向を調べた。また照射後 18 時間培養後の未処置群、嫌気または好気下での RB+BL 群の 3 群の菌液を血液寒天培地に播種し、コロニーの形成数を計測した。

#### 【結果】

本研究の結果、嫌気下で照射した BL 群は、*P. gingivalis* の細菌生存率が有意に低下していた。さらに好気下では、嫌気下での BL 群より細菌の増殖抑制が顕著に示された。RB 群でも BL 群と同様の傾向が認められた。嫌気下で照射が行われた RB+BL 群では、BL と RB をそれぞれ単独応用した群と比較して細菌増殖がさらに抑制され、好気下での RB+BL 群において増殖が最も抑制されていた。特に、好気下での RB+BL 群を除く全ての群において、照射後 36 時間後に吸光度がほぼ同じ stationary phase に達しているにもかかわらず、好気下での RB+BL 群では照射後 48 時間後まで *P. gingivalis* の増殖が全く認められなかった。

#### 【考察および結論】

RB 存在下の BL 照射時における酸素への暴露により、*P. gingivalis* に対する抗菌効果が明らかに増強された。RB 存在下における嫌気下での BL 照射は、細菌に対し静的に作用したと考えられるのに対し、好気下での照射群ではより増強された抗菌作用、すなわち殺菌効果が発揮されたと考えられた。