

歯髄刺激に対するラット海馬 CA1 領域における電気生理学的応答

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座
○長谷川誠実、藤原正誠、本田公亮

Electrophysiological responses in the CA1 region of the rat hippocampus to tooth pulp stimulation

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine

○HASEGAWA Makoto, FUJIWARA Masanori, HONDA Kousuke

【緒言】 歯痛の情動記憶メカニズムを追究する目的で、第 129 回本学会から第 138 本学会まで、10 回にわたり歯髄刺激と海馬活動の応答性を海馬血流増加反応を指標に検討してきた。その中で、歯髄刺激により海馬内に遊離した ATP が分解しアデノシンとなり、アデノシンが血管内皮に作用し、またシクロオキシゲナーゼ 2 も関わり、歯髄刺激特有の中樞応答として、海馬血流増加反応を生じることを明らかにした。また、歯髄刺激は、侵害性のみならず繰り返し与えることで、内因性オピオイドにかかわる下行性疼痛抑制効果の一面も有する可能性についても明らかにした。今後、歯髄刺激の情動との関わりの研究を遂行するためには、海馬の可塑性と海馬以外の大脳辺縁系との連携の解明は避けては通れないところである。そこで、今回は、海馬の電気生理学的活動が歯髄刺激によりどのような影響を受けるのかについて検討した。

【実験材料と方法】 実験には雄性ウイスター系ラット (10 週齢、体重 290–320 g) 20 匹を用いた。ラットにはウレタン (1.2 g/kg) 腹腔内投与による全身麻酔を施した。下顎切歯に象牙質に至る窩洞を 2 ヶ所形成し、導電性ペーストと電極固定用レジンをを用いて銀線電極を固定し、歯髄刺激電極とした。また前肢皮膚内に先端以外を絶縁したステンレス針電極を電極間 5 mm で挿入し、皮膚刺激電極とした。ついで、ラットを脳定位固定装置に固定し、左側海馬 CA1 領域内にタングステン電極を、右側海馬内に血流測定用プローブを挿入し、左側海馬 CA3 領域内に双極貼り合わせ電極を挿入し、それぞれ記録電極および刺激電極とした。各刺激電極は、電気刺激装置 (PSS-101、ユニークメディカル社製) に接続し、記録電極はデータ収集システム (UAS-308S-HM、ユニークメディカル社製) に接続し、血流測定用プローブはレーザー血流計に接続し実験に供した。

実験は、まず海馬 Schaffer-commissural fiber に 100 μ s、500–700 μ A の電気刺激を 10 秒ごとに与え、その時の CA1 領域の対照となる Population spike の測定を行った。次いで、歯髄に海馬血流増加反応を生じる閾値の 3 倍の強度の Pulse duration 0.5 msec、Pulse interval 0.1 msec のパラメーターの電気刺激を 10 秒間与えた。その後、10 分ごとに、対照と同レベルに復するまで CA1 領域の Population spike amplitude を測定した。その後再度歯髄刺激を与え同様にして Population spike の測定を繰り返した。また同じ手順で、前肢皮膚に電気刺激を与えた場合の、海馬 CA1 領域の刺激前後における Population spike の測定を行った。Population spike amplitude は第 1 および第 2 の Positive peak を結んだ線と Negative peak までとした。そして、これらの結果から、歯髄および前肢皮膚刺激に対する海馬応答における Habituation について観察した。なお、統計学的解析は、Student's T-test を用いて行った。

【結果】 前肢皮膚刺激の場合は、刺激を最短で 2 回、平均的に 3 回以上繰り返すと刺激前後の Population spike amplitude に有意差を認めなくなった。それに対し歯髄刺激の場合は、5 回繰り返しても刺激前後で Population spike amplitude に有意差を認めた。

【考察および結論】 前肢皮膚刺激の場合は 2 から 3 回の電気刺激で海馬の応答性に Habituation を生じることが示された。一方、歯髄刺激においては、5 回刺激を繰り返しても海馬 CA1 における Population spike に変化を示し、Habituation は容易には生じないことが分かった。この歯髄痛の特性が、歯痛の情動記憶の特性に関わることは十分に推測されることである。今後も引き続き、歯痛と情動記憶に関して研究を進める所存である。

本研究の一部は、平成 24、25 年度兵庫医科大学教員研究助成および科研費助成、基盤研究 (C) : 課題番号 25462878 により遂行された。

ヒト歯髄象牙芽細胞層における $\beta 2$ アドレナリン受容体の局在に関する免疫組織化学的研究

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¹、グローバルCOEプログラム国際教育研究拠点²
○顧潔^{1,2}、池田英治¹、須田英明^{1,2}

$\beta 2$ -Adrenoreceptor immunoreactivity in the Odontoblastic Layer of Human Dental Pulp
Pulp Biology and Endodontics, Department of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
○GU Jie^{1,2}, IKEDA Hideraru¹, SUDA Hideaki^{1,2}

【研究目的】

歯髄内に存在する交感神経節後線維は、主に血管に沿って歯髄の中央部に分布しており、象牙芽細胞層と象牙芽細胞下層では明らかに分布が少ないとされている。一方、この節後線維は、刺激による歯髄内環境の変化に伴う歯髄中心部の血流変化の調節に重要な役割を有することが知られている。しかしながら、歯髄表層にある交感神経終末が象牙芽細胞の生理活動をどのようにコントロールするかについては、殆ど研究報告がないのが現状である。

本研究では、交感神経節後線維の象牙芽細胞に対する生理的な調節能について検討することを目的とした。

【材料および方法】

実験には矯正治療目的で抜去された健全なヒト新鮮小白歯を用いた。抜去後直ちに4%パラホルムアルデヒド溶液中に投入して24時間固定し、次いで0.5M EDTA溶液に浸漬して約10週間脱灰した後、TISSUE-TEK® OCT compoundに包埋して凍結切片(厚さ7 μ m)を作製した。その後に抗 $\beta 2$ アドレナリン受容体抗体を用い、免疫組織化学的に標識し観察した。

【成績】

光学顕微鏡観察では、象牙芽細胞層、象牙芽細胞下層および歯髄深部の血管に沿って $\beta 2$ アドレナリン受容体に特異的な免疫組織化学反応が観察された。

【考察】

視床下部からの交感神経信号は、骨芽細胞の表面にある $\beta 2$ アドレナリン受容体に伝達され、骨形成の調節に重要な役割を果たすことが認められている。類似の制御機構は、骨芽細胞と共通点を持つ象牙芽細胞にも存在すると考えられる。歯髄内の交感神経線維は、有害な刺激から歯髄を保護するため、修復象牙質形成に積極的な効果を発揮するものと推測される。すなわち、交感神経は象牙芽細胞の生理活動を調節する機能を有しており、修復象牙質の形成等を通じて歯髄保護に重要な意義を有すると考えられる。

【結論】

歯髄内に存在する交感神経節後線維は、象牙芽細胞の生理機能を調節している可能性が示唆された。

Porphyromonas gingivalis の PGN_0088 遺伝子は バイオフィーム形成に關与する

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)

○山本 れいこ, 野杵 由一郎, 山口 幹代, 朝日 陽子, 前菌 葉月, 林 美加子, 恵比須 繁之

PGN_0088 of *Prphyromonas gingivalis* is involved in biofilm formation

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

○YAMAMOTO Reiko, NOIRI Yuichiro, YAMAGUCHI Mikiyo, ASAHI Yoko, MAEZONO Hazuki,

HAYASHI Mikako and EBISU Shigeyuki

【研究目的】

バイオフィームとは固体と液体の界面に形成される微生物集落のことで、バイオフィーム中の微生物は自ら産生した菌体外マトリックスに被覆されている。歯や口腔軟組織に形成されたバイオフィームは、う蝕や歯周炎などの口腔バイオフィーム感染症の主因であり、口腔疾患と密接な関わりを持つ。

我々は、ヒトの歯周病関連細菌の 1 種であり、根尖性歯周炎の難治化に關与する、*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成過程における遺伝子発現の経時的变化を解析し、バイオフィーム形成 9-14 日間にバイオフィーム形成量が顕著に増加し、この時期に一致して発現変動遺伝子の数が最多となることを見出し¹、さらに、変異株作製実験により、上述のバイオフィーム形成後期において発現が顕著に減少した遺伝子の 1 つ、PGN_0088 が、菌体外マトリックス形成に關与することを明らかにした²。また、一般的にバイオフィームは抗生物質に抵抗性を示すにも関わらず、マクロライド系抗生物質のアジスロマイシン (AZM) は *P. gingivalis* に対して最小発育阻止濃度 (MIC) 以下の濃度 (sub-MIC) でバイオフィーム形成を阻害することが報告されているが³、詳細な作用機序については不明である。

本研究では、PGN_0088 によるバイオフィーム中の菌体外マトリックス成分の変化が、バイオフィームの性状におよぼす影響について検討した。

【材料及び方法】

P. gingivalis ATCC 33277 株の PGN_0088 配列にクロラムフェニコール耐性カセット (*cat*) を相同組換えにより挿入して PGN_0088 欠損株を作製した。また、PGN_0088 配列を挿入したプラスミドを構築後、上記の欠損株に接合伝達法を用いて導入することにより相補株を作製した。野生株と作製した欠損株ならびに相補株のバイオフィームを形成し、走査型電子顕微鏡 (SEM) および共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いたバイオフィームの観察、糖およびタンパク質の濃度測定、超音波による剪断応力の測定、ならびに AZM およびエリスロマイシン (ERY) に対する感受性の測定により、形成されたバイオフィームを評価した。

【成績】

SEM 観察において、欠損株のバイオフィームは野生株および相補株に比べ、起伏に富んだ表層構造をしていた。また、CLSM 観察では、欠損株のバイオフィームは網目様の糖構造を示した。さらに、バイオフィーム中の菌体当りの糖成分の量は欠損株において、野生株および相補株と比べて有意に増加した ($p < 0.001$, Welch' s t-test)。

欠損株の剪断応力は、野生株および相補株と比較して有意に高かった ($p < 0.001$, Welch' s t-test)。一方、欠損株の AZM および ERY に対する最小バイオフィーム抑制濃度 (MBIC) はそれぞれ 0.25, 0.125 $\mu\text{g/ml}$ となり、野生株および相補株 (両菌株ともそれぞれ 0.125, 0.0625 $\mu\text{g/ml}$) と比較して高い値を示したものの、AZM および ERY に対する MIC は全菌株においてそれぞれ 0.5 および 0.25 $\mu\text{g/ml}$ となり、sub-MIC の AZM および ERY によりバイオフィーム形成が有意に抑制された。

【考察及び結論】

ERY 耐性カセットを用いた先行研究において、欠損株における菌体外マトリックス中の糖成分の増加が認められ²、*cat* を用いた本研究においても同様の結果が得られたことから、挿入する耐性カセットの種類によるバイオフィーム形成への影響は無いと推察された。一方、欠損株における菌体外マトリックス中の糖成分の増加によるバイオフィームへの影響を検索した結果、バイオフィームの表層構造の変化、剪断応力の増加、ならびに AZM および ERY に対する抵抗性の増加などが観察された。また、全菌株において sub-MIC の AZM および ERY によりバイオフィーム形成が抑制されたことから、AZM および ERY は *P. gingivalis* に対し、抗菌作用とは異なる機序でバイオフィーム形成を抑制していると推察された。

これらの結果より、PGN_0088 は、バイオフィームの菌体外マトリックス中の糖成分の合成を抑制し、その結果、バイオフィームの立体構造や剪断応力、ならびにマクロライド系抗生物質に対する抵抗性などが変化すると示唆された。

【参考文献】

1. Yamamoto R *et al*, Appl Environ Microbiol 77, 6733-6, 2011.
2. Yamamoto R *et al*, PLoS One 8, e56017, 2013.
3. Maezono H *et al*, Antimicrob Agents Chemother 55, 5887-92, 2011.

本研究は日本学術振興会の科学研究費補助金 (24390424 および 24890118) の支援により実施された。

柿タンニンの長期培養ポリマイクロバイアルバイオフィーム形成に対する抗菌効果

神奈川歯科大学大学院 う蝕制御修復学講座¹, 微生物感染学講座², 神経組織発生学講座³, 歯科理工学講座⁴,
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⁵, リリース科学工業株式会社⁶
○富山 潔¹, 向井義晴¹, 齋藤正寛⁵, 渡辺清子², 熊田秀文², 河田 亮³, 東 一善³, 二瓶智太郎⁴, 椎谷 亨¹,
長谷川晴彦¹, 倉持江里香¹, 寺中文字⁴, 三宅 香⁴, 中村健一⁶, 奥原正國⁶, 邊見篤史⁶,
高橋 理³, 浜田信城², 寺中敏夫¹

Antibacterial effects of the condensed tannin extracted from astringent persimmon on the formation of matured polymicrobial biofilms

¹ Dept. of Cariology and Restorative Dent, ² Dept. of Microbiology, ³ Dept. of Histology, Embryology and Neuroanatomy,

⁴ Dept. of Dental Materials Science, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University,

⁵ Dept. of Restorative Dentistry, Div. of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, ⁶ Rilis Co., Ltd.

○ TOMIYAMA Kiyoshi¹, MUKAI Yoshiharu¹, SAITO Masahiro⁵, WATANABE Kiyoko², KUMADA Hidefumi², KAWADA Ryo³, HIGASHI Kazuyoshi³, NIHEI Tomotaro⁴, SHIYA Toru¹, HASEGAWA Haruhiko¹, KURAMOCHI Erika¹, TERANAKA Ayako⁴, MIYAKE Kaori⁴, NAKAMURA Kenichi⁶, OKUHARA Masakuni⁶, HENMI Atsushi⁶, TAKAHASHI Osamu³, HAMADA Nobushiro², TERANAKA Toshio¹

【研究目的】

口腔内バイオフィームは、浮遊菌と異なり抗菌作用を受けにくい性質を有するため、病原性バイオフィームへの移行を抑制することを目的とした抗菌薬の開発、あるいは抗菌法の検討を行うことは非常に重要である。単一あるいは数菌種を含むバイオフィームに対する抗菌薬の効果は数多く報告されているが、多菌種を含有するバイオフィームへの影響を分析した研究は、まだ少ないのが現状である。第 138 回本学会において我々は、渋柿由来の縮合型タンニンを含む食品・化粧品等の原料 (Pancil[®] PS-M: リリース科学工業株式会社) が、濃度依存的に短期培養ポリマイクロバイアルバイオフィーム形成を抑制することを報告した。今回我々は、長期培養ポリマイクロバイアルバイオフィームに対する渋柿由来タンニン酸の抗菌効果を分析することを目的として、Exterkate ちによるバイオフィームモデル (Caries Res, 2010) を応用し、ポリマイクロバイアルバイオフィームの形成に与える影響について検討した。

【材料および方法】

ポリマイクロバイアルバイオフィーム形成用材料には直径 12 mm 厚さ 150 μm の円盤状ガラス試片を用いた。処理剤には、Pancil[®] PS-M および Corsodyl (0.2 vol% グルコン酸クロルヘキシジン: CHX, SmithKline) を滅菌脱イオン水により希釈した溶液を用いた。実験群は、① 非処理群 (陰性対照, cont), ② 0.5 vol% Pancil[®] PS-M 群 (0.5 P), ③ 0.7 vol% 同群 (0.7 P), ④ 1.0 vol% 同群 (1 P), ⑤ 2.0 vol% 同群 (2 P), ⑥ 3.0 vol% 同群 (3 P), ⑦ 4.0 vol% 同群 (4 P), ⑧ 0.05% グルコン酸クロルヘキシジン (陽性対照, 0.05 C), そして⑨ 0.2% グルコン酸クロルヘキシジン (陽性対照, 0.2 C) の 9 群とした (n=6)。ポリマイクロバイアルバイオフィームの培養には、1 被験者から採取した刺激唾液を用いた。培養液には buffered McBain 2005 (0.2% スクロース, 50 mM PIPES) を使い、培養液の交換を 10 時間の時点で 1 回行なう嫌気培養 (CO₂: 10.0%, H₂: 10.0%, N₂: 80.0%, 37°C) を 72 時間行なった。培養 72 時間の時点で各処理剤 (0.5 P, 0.7 P, 1 P, 2 P, 3 P, 4 P, 0.05 C, 0.2 C) あるいは滅菌脱イオン水 (cont) に 5 分間浸漬後、ポリマイクロバイアルバイオフィームを Cysteine Peptone Water にて洗浄して血液寒天培地に 4 日間培養し、実験終了時に生菌数の算定を行なった。算出した生菌数は One-way ANOVA および Tukey の検定により有意水準 5% にて統計学的分析を行ない、抗菌効果を比較検討した。

【結果】

長期培養したポリマイクロバイアルバイオフィームに Pancil[®] PS-M 各群および CHX 各群の薬液を用いて薬液処理を行った結果、すべての薬液処理群におけるバイオフィームの生菌数は cont と比較して有意に低かった (cont: 7.57 × 10⁸, 0.5 P: 1.98 × 10⁸, 0.7 P: 1.85 × 10⁸, 1 P: 1.36 × 10⁸, 2 P: 1.25 × 10⁸, 3 P: 5.53 × 10⁷, 4 P: 1.53 × 10⁷, 0.05 C: 2.02 × 10⁸, 0.2 C: 2.03 × 10⁷, p < 0.05)。とりわけ Pancil[®] PS-M による、長期培養 (72 時間) により成熟したポリマイクロバイアルバイオフィーム形成に対する抑制効果は、濃度依存的に上昇し、0.5, 0.7, 1.0, 2.0, 3.0% パンシルは、0.05% CHX と同等かそれ以上、4.0% パンシルは、0.2% CHX と同等の抗菌効果を示した。

【考察】

Pancil[®] PS-M 処理を長期培養して成熟したポリマイクロバイアルバイオフィームに対して行った結果、抗菌スペクトルが広く *S. mutans* の発育阻止への効果が持続的であることが報告されているグルコン酸クロルヘキシジンと同等の抗菌効果が示された。

【結論】

Pancil[®] PS-M は、初期のみならず成熟したバイオフィームに対しても抗菌効果を有する可能性が示唆された。

デンタルバイオフィーム形成に関する *in situ* 解析～定量的 3 次元的検索～

¹ 大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)

² 大阪大学歯学部附属歯科技工士学校

○栗木菜々子¹, 朝日陽子¹, 永井真澄¹, 町博之², 野杵由一郎¹, 林美加子¹, 恵比須繁之¹

***In situ* analysis about human dental biofilm formation ~Quantitative three-dimensional research ~**

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

²Osaka University Dental Technology Institute

○KURIKI Nanako¹, ASAHY Yoko¹, NAGAI Masumi¹, MACHI Hiroyuki², NOIRI Yuichiro¹, HAYASHI Mikako¹, EBISU Shigeyuki¹

<研究目的>これまで多種多様な *in vitro* バイオフィーム形成モデルを用いた研究が行われている。しかし、ヒトの口腔内のデンタルバイオフィームは *in vitro* で形成されたバイオフィームとは異なり、600 種以上の細菌種が存在し口腔内環境や宿主因子に影響される。本研究の目的は、ヒトの口腔内で経時的にデンタルバイオフィームを形成・評価できるモデルを開発し、さらにその形成メカニズムを検討することである。そこで、口腔内装置を用いハイドロキシアパタイト (HA) ディスク上でデンタルバイオフィームを形成し、バイオフィームの定量分析を行った。さらに、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いてデンタルバイオフィームを 3 次元的かつ経時的に検索した。

<材料および方法>本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を受け、遂行された (承認番号 H24-E4)。本研究に関して同意の得られた 10 人のボランティア患者から試料を採取し、実験に供した。口腔内装置は本学附属技工士 町博士が作製したもので、ナイトガードの臼歯部頰側に HA ディスクが挿入できるよう改良している。口腔内の装置中に固定した 8 つのアパタイトディスク上に形成されたデンタルバイオフィームを経時的 (4 時間、8 時間、12 時間、16 時間、20 時間、24 時間、48 時間、60 時間、72 時間、96 時間) に評価した。

デンタルバイオフィームを形成する細菌数については、HA ディスク上に形成されたバイオフィームを回収後、羊血液寒天培地に播種し、経時的に colony forming unit (CFU) を測定した。また、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により経時的な 3 次元観察を行った。その際、生菌と死菌をそれぞれ LIVE/DEAD® キットにて染色後、定性的分析を行った。また得られた CLSM 像より経時的に厚みの測定を行った。

<成績及び考察>

1. バイオフィーム形成細菌の生菌数測定

デンタルバイオフィームを形成する細菌の生菌数は下記の通りである。1 時間 平均 $1.63 \times 10^6 (\pm 1.590 \times 10^6)$ CFU/cm², 4 時間 $1.70 \times 10^7 (\pm 1.059 \times 10^7)$ CFU/cm², 12 時間 $1.55 \times 10^8 (\pm 1.041 \times 10^8)$ CFU/cm², 24 時間 $3.55 \times 10^8 (\pm 2.935 \times 10^8)$ CFU/cm², 48 時間 $1.86 \times 10^9 (\pm 1.39 \times 10^9)$ CFU/cm², 60 時間 $8.22 \times 10^{10} (\pm 3.99 \times 10^{10})$ CFU/cm², 72 時間 $1.98 \times 10^{11} (\pm 2.26 \times 10^{11})$ CFU/cm², 96 時間 $1.20 \times 10^{11} (\pm 9.01 \times 10^{10})$ CFU/cm² に達した。細菌数は 12 時間まで急速に増加を示し、その後 48 時間まで少しずつ増加し、60 時間後に再び急速に増加した後、72 時間後でプラトーに達した。つまり、96 時間後までの細菌の生菌数は二相性の増加を示した。

2. CLSM によるデンタルバイオフィームの定量的 3 次元的解析

デンタルバイオフィームを CLSM にて経時的に観察したところ、時間の経過とともにコロニー数が増加し、さまざまな細菌構造を含んだコロニーが観察できた。その厚みとしては 4 時間 $21.4 (\pm 15.9) \mu\text{m}$, 12 時間 $29.98 (\pm 13.9) \mu\text{m}$, 24 時間 $39.5 (\pm 9.1) \mu\text{m}$, 48 時間 $39.5 (\pm 9.7) \mu\text{m}$, 60 時間 $50.3 (\pm 11.4) \mu\text{m}$, 72 時間 $49.8 (\pm 12.2) \mu\text{m}$, 96 時間 $46.2 (\pm 3.0) \mu\text{m}$ であった。デンタルバイオフィームは 12 時間まで急速に増加し、その後 20 時間まで増加を示さず、24 時間後に急速に増加した。また 60 時間後で厚みは急速に増加して、プラトーに達した。これは 60 時間での細菌数の急速な増加に一致する。これにより、バイオフィームの厚みの増加はおおよそ生菌数の増加と一致することが示された。一方で生菌数の増加が認められるが、厚みは増加を示さない部分が存在し、この期間ではバイオフィームの形成面積を広げているのではないかと示唆される。

<結論>

本研究により、ヒトの口腔内で形成したデンタルバイオフィームの経時的な定量的 3 次元的検索が可能となった。

(本研究の一部は科学研究費補助金 (基盤研究(B)課題番号 24390425, 若手研究(B)課題番号 243792020) の補助の下に行われた)

デンタルバイオフィーム形成に関する *in situ* 解析 ～微細形態学的観察～

¹大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)

²大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部 ³大阪大学歯学部附属歯科技工士学校

○朝日陽子¹, 栗木菜々子¹, 三浦治郎², 町 博之³, 野杵由一郎¹, 林 美加子¹, 恵比須繁之¹

***In situ* analysis about human dental biofilm formation -morphological observation-**

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology, ²Division for Interdisciplinary Dentistry, Osaka University
Graduate School of Dentistry, ³Osaka University Dental Technology Institute

○Asahi Yoko¹, Kuriki Nanako¹, Miura Jiro², Machi Hiroyuki³, Noiri Yuichiro¹, Hayashi Mikako¹, Ebisu Shigeyuki¹

【研究目的】

デンタルバイオフィームは 500 種類以上の細菌から構成され、これらの細菌の相互作用が病原性に影響を及ぼしていると考えられている。デンタルバイオフィームがどのように形成されるか解明することは、バイオフィーム感染症のコントロールにつながると考えられる。これまでのバイオフィームに関する研究はほとんど単一菌種バイオフィームによるものであり、ヒト口腔内のデンタルバイオフィームとは異なるものである。そこで、本研究では、ヒトの口腔内でバイオフィームを形成する“*in situ*バイオフィーム形成装置”を新規開発し、可及的に再現したデンタルバイオフィームを経時的に取り出し、定量的解析、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡観察を行い、デンタルバイオフィーム形成過程における構成細菌の量と形態学的な動態を明らかにした。

【材料および方法】

本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を受け、遂行された (承認番号H 2 4 - E 4)。本研究に関して同意の得られた 10 人の被験者から試料を採取し、実験に供した。バイオフィーム形成は、我々が新規開発した *in situ* バイオフィーム形成装置を用いて行った。被検者の上顎に装着した装置の頬側にハイドロキシアパタイトディスクを挿入し、バイオフィームを形成した。バイオフィーム形成開始 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48 時間後にサンプルを取り出し、定量的解析、走査型電子顕微鏡 (SEM) および透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察に供した。

【成績】

1. 定量的解析結果より、バイオフィーム形成 4 時間から 48 時間後まで細菌数の増加が認められた。細菌数は形成 12 時間まで急速に、その後 24 時間まで緩やかな増加を示した。多くの観察時間において、バイオフィーム構成細菌数は被験者間で 10 倍程度の個体差を認めた。
2. SEM および TEM 観察より、バイオフィーム形成 8 時間に、球菌が主体のマイクロコロニーが観察された。バイオフィーム形成 12 時間後には糸状菌が出現し、厚み約 25 μ m のバイオフィームの形成が認められた。バイオフィーム形成 16 時間後に、マトリックス様構造物で被覆されたバイオフィーム像が観察された。24 時間および 48 時間後には、球菌、糸状菌および桿菌の多様な形態から構成されたバイオフィームが形成され、バイオフィーム下層には死菌を認めた。

【考察および結論】

バイオフィーム形成細菌数は、バイオフィーム形成初期に対数増殖を示すことが明らかとなった。バイオフィーム形成細菌数と形態学的な動態には相関を認めなかった。また、本研究で新規開発した口腔内装置を用いて形成したバイオフィームは、球菌主体のものから球菌、糸状菌、桿菌の多様な細菌から構成されるものへと成熟していくことが示され、デンタルバイオフィームを再現することが可能な実験モデルであることが示された。

(本研究の一部は科学研究費補助金 (基盤研究 (B) 24390425 および若手研究 (B) 24792020) の補助の下に行われた。)

根管の探索に歯科用 CT を応用した急性根尖性歯周炎の 1 症例

東北大学大学院歯学研究科 歯内歯周治療学分野
○荘司佳奈子、島内英俊

A case report of acute apical periodontitis using dental computed tomography (CT) for detection of the root canal

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Biology,
Tohoku University Graduate School of Dentistry,
○KANAKO SHOJI, HIDETOSHI SHIMAUCHI

【はじめに】近年、歯科用コーンビーム CT (CBCT) を歯内療法における診査および診断に取り入れることで良好な臨床成績を得られた症例が多数報告されている。今回、根管の探索が困難であった急性根尖性歯周炎の症例に CBCT を応用したところ良好な治療成績が得られたので、その経過について報告する。

【初診時】

患者：79 歳 男性、主訴：左側上顎小臼歯部の強い自発痛および咬合痛
一般既往歴：高脂血症、高血圧症、胃炎、脱腸、転倒による外傷、加齢黄斑変性症
服用薬剤：プラスタチンナトリウム (メバロチン)、ニフェジピン (ノルバスク OD)、ファモチジン (ガスターD)
現病歴：左上 4, 5 は 12 年前に頬側歯頸部にレジン充填、咬合面にメタルインレーを装着した。2 週間前に当院補綴科受診時に強い自発痛、咬合痛を訴えてメタルインレーを除去されたが、症状が改善しないため当科を紹介された

【診査・検査所見】

臨床所見：自発痛 (+)、冷水痛 (-)、温熱痛 (-)、左上 4, 5 部の根尖部歯肉の圧痛 (++)、腫脹・発赤 (±)、波動 (-)
瘻孔 (+)-左上 4 頬側歯根中央相当部歯肉、歯髓電気診 (pulp tester 値)：左上 4 (48)、左上 5 (>80)
垂直打診痛：左上 4 (++)、左上 5 (+++)、水平打診痛：両歯ともに (+)、動揺：両歯ともに (-)
X 線所見：左上 4 の根尖部に透過像を認め、瘻孔からポイントを挿入すると同部に到達する

【診断・治療計画】左上 4：partial pulp necrosis をともなう慢性根尖膿瘍の急性化、左上 5：急性根尖性歯周炎
急性症状の緩和後に感染根管治療を実施する

【治療経過】

根管経由の排膿が必要と判断し、歯科用顕微鏡を使用しながら、タービン・エンジンによる削除、探針による触知、J とアルコールによる清拭で根管口を探索したが、根管口を覆う 2 次象牙質が厚いためアクセスできなかった。そのため初回治療時はメイアクトおよびロキソニンを処方するのみとした。次回来院時以降に同様の根管探索を続けたところ、左上 4 の頬側根管のみにアクセスできた。その結果、自発痛および左上 4 の打診痛・圧痛は軽減したが、症状がより重篤である左上 5 の打診痛・圧痛には変化がなかった。そのため患者の同意のもとに、根管の位置や走行状態・根尖部周囲の状態・破折などの歯根の異常な所見の有無を検索する目的で CBCT を撮影した。CBCT 所見から、両歯ともに根管口は 2 つあり根尖側で 1 根管になっていること、根尖部周囲の骨欠損が大きいこと、現在探索している根管の位値が誤っていないことが確認され、残りの 3 つの根管にもアクセスすることができた。左上 5 の根尖穿通を行なったところ、根管内に多量の排膿が認められた。両歯ともに white dentin が出現するまで根管拡大し、臨床症状がほぼ消失したところで、根管充填を行なった。

【考察・まとめ】

今回の症例では、加齢とう蝕による二次象牙質が根管口を被覆したため、根管へのアクセスが困難だったと考えられる。根管探索のための象牙質削除は穿孔にいたる危険性があるが、CBCT を用いて根管の水平的・垂直的な位置と検索方向のずれを確認することで、全ての根管を発見して根管清掃を行なうことができ、症状の消退まで到達できた。

【会員外協力者】東北大学大学院歯学研究科 口腔診断学分野：小嶋郁穂、阪本真弥

SS-OCT による上顎大白歯近心頬側第二根管の検出

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, ¹ 歯髄生物学分野, ² う蝕制御学分野
³ 国立長寿医療研究センター 歯科口腔先端診療開発部

○飯野 由子¹, 河村 隼¹, 渡辺 聡¹, 吉岡 俊彦¹, 花田 隆周¹, 中野 生和子¹,
海老原 新¹, 島田 康史², 田上 順次², 角 保徳³, 須田 英明¹

Detection of the Second Mesio Buccal Canal in Maxillary Molars by Swept-Source Optical Coherence Tomography

¹Pulp Biology and Endodontics, ²Cariology and Operative Dentistry, Department of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

³Division of Oral and Dental Surgery, National Center for Geriatrics and Gerontology
○IINO Yoshiko¹, KAWAMURA Jun¹, WATANABE Satoshi¹, YOSHIOKA Toshihiko¹, HANADA Takahiro¹,
NAKANO Kiwako¹, EBIHARA Arata¹, SHIMADA Yasushi², TAGAMI Junji², SUMI Yasunori³, SUDA Hideaki¹

【緒言】

ヒト上顎大白歯近心頬側根にはしばしば2根管が出現する。拡大視野下や超音波による切削で、近心頬側第二根管（以下「MB2」）の検出率が高くなることが報告されているが、MB2を臨床的に検出するには限界がある。拡大視野下での超音波を用いた切削によるMB2の探索が提言されているが、盲目的に歯質の切削を行うこととなる。そこで、MB2の位置を特定するために非侵襲的に内部の精密断層像を得る技術が望まれる。

【目的】

本研究の目的は、ヒト上顎大白歯のMB2を波長走査型光干渉断層計（以下SS-OCT）で検出し、その有用性を評価することである。

【材料および方法】

実験にはヒト抜去上顎大白歯 40 歯を用いた（東京医科歯科大学歯学部倫理審査第 923 号承認）。まず、低速切断機（Isomet®, Buehler）を用い、被験歯の歯冠を歯軸と垂直に除去した。次に近心頬側根管の歯冠側形成を行った後、試料をレジン（OSTRONII®, GC, Japan）に植立した。その後、microCT（inspeXio SMX100CT®, Shimadzu）で被験歯を撮像、MB2の有無を判定し gold standard とした。

続いて、SS-OCT（Prototype2®, Panasonic Healthcare）、肉眼、歯科用実体顕微鏡（OPMI pico®, Carl Zeiss, 以下「MS」）にてMB2の有無を評価した。評価者は、本学歯学部附属病院むし歯外来（歯内療法）の臨床経験5年以上の歯科医師3名とした。評価は、スコア1: 明らかに1根管性, スコア2: おそらく1根管性, スコア3: おそらく2根管性, スコア4: 明らかに2根管性とした。評価者はあらかじめ別の試料により評価方法を習得し、全ての試料をSS-OCTで評価した後、肉眼で無作為に評価し、最後にMSで同様に評価した。

評価結果はmicroCTによる評価基準と比較し、SS-OCT・肉眼・MSにおける検出の感度、特異度、陽性的中率（PPV）、陰性的中率（NPV）、正答度、ROC曲線下面積（AUC）を算出した。統計学的解析は、Bonferroni の修正を加えたWilcoxonの符号付順位検定を用いて行った。また、3名の評価者間の一致率としてkappa値を算出した。

【結果ならびに考察】

結果を右の表1, 2に示す。MB2は40歯中19歯に見られた。感度は、MSがSS-OCTに比較し有意に高かった。特異度は、SS-OCTがMSに比較し有意に高かった。診断精度を示すAUCには有意差が見られなかった。SS-OCTのkappa値は、肉眼、MSよりも高く、肉眼およびMSでは術者間のばらつきがみられたことから、SS-OCTはより客観性があると考えられる。

【結論】

上顎大白歯の根管治療において、従来の歯科用実体顕微鏡や超音波に加え、SS-OCTを用いることで不要な歯質の切削を避けながらMB2の検出を行える可能性が示唆された。

表1. SS-OCT, 肉眼, MSの感度・特異度・PPV・NPV・正答度・AUC

	OCT		肉眼		MS		microCT
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性	
microCTあり	12	7	13	6	18	1	19
microCTなし	6	15	10	11	14	7	21
計	18	22	23	17	32	8	40
感度	0.632 ^a		0.684 ^b		0.947 ^a		
特異度	0.714 ^c		0.524 ^d		0.333 ^c		
PPV	0.667		0.565		0.563		
NPV	0.682		0.647		0.875		
正答度	0.675		0.600		0.625		
AUC	0.649		0.595		0.711		

異なるsuperscript間では統計学的有意差は認められなかった (p<0.05)

表2. SS-OCT, 肉眼, MSの評価者間におけるkappa値

Examiner No.	1 vs 2	1 vs 3	2 vs 3	Mean	SD
SS-OCT	0.495	0.545	0.539	0.526	0.019
肉眼	0.327	0.615	0.308	0.417	0.122
MS	0.211	0.489	0.277	0.326	0.103

根管治療における根管用内視鏡の応用

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

Root canal treatments with the aid of an intracanal endoscope

¹⁾Dept. of Endodontology, Kyushu University Hospital

²⁾Dept. of Endodontology and Operative Dentistry, Kyushu University

○MATSUMOTO Himeka¹⁾, YOSHIMINE Yoshito²⁾, SATO Hiromi¹⁾,
ARAI Yuki²⁾, KIHARA Tomoko²⁾, AKAMINE Akifumi²⁾

【研究目的】

根管治療において治療対象の可視化と操作の精密化は、治療を成功に導く上で重要な課題である。今日、マイクロスコープやコーンビームCTが導入されたことで、肉眼での観察やデンタルX線写真だけでは困難であった診断の確定を可能にし、治療成績の向上に役立つことが数多く報告されている。本研究では、試作段階にある根管用内視鏡を臨床応用するに際して、マイクロスコープとの比較を行いながらその精度と実用性を検討することを目的とした。

【材料および方法】

今回使用した根管用内視鏡は試作段階のものであり、内視鏡本体、モニター、注水装置、光源の各機器から構成されている。直径1.1mmの内視鏡先端部には、カメラ用チャンネル、多目的チャンネル、注水ファイバー、光源用ファイバーが組み込まれている。このうち多目的チャンネルには、内視鏡専用ファイルやEr:YAGレーザー用石英ファイバーが挿入できる。カメラ用チャンネルの先端レンズは視野角50度で、焦点距離は2~4±1mmに設定されている。さらに、注水装置から精製水や薬液を流して洗浄しながら、モニターで対象物を観察することが可能である。なお、レーザー照射装置および根管用内視鏡の臨床応用に際しては、九州大学病院倫理委員会の承認を得るとともに、患者の同意を得た。

- 1) 抜去歯を用いて根管用内視鏡とマイクロスコープの性能と特徴を比較した。
- 2) 破折ファイルなどの根管内異物除去の症例に根管用内視鏡を臨床応用した。

【結果および考察】

根管用内視鏡とマイクロスコープを比較すると、後者においてより明瞭な像が観察された。しかしながら、マイクロスコープの観察には根管内を乾燥する必要があったのに対して、根管用内視鏡では先端が水に入った状態でも観察が可能であった。さらに、マイクロスコープでは超音波ファイル等の治療器具を挿入した際に視野が阻害されることがあった。

臨床応用の症例においては、硬組織の切削が可能なEr:YAGレーザーを内視鏡観察下に併用することで、可及的に歯質の過剰な切削を回避しながら異物を除去できた。また、常に切削片を注水で洗い流しながらの操作できるため、クリアな画像が得られ効率のよい処置が可能であった。

根管用内視鏡の特徴は、目視やマイクロスコープでの観察が困難な部位においても視覚による情報が得られやすいことである。マイクロスコープはレンズと対象物との距離が離れており、かつ直線的に位置する領域しか観察できないのに対して、内視鏡ではレンズと対象物が近接した状態で使用できるため適応範囲が広い。また、マイクロスコープでは処置用の器具によって視野が妨げられることがあるが、内視鏡では器具先端の一部のみが視野に入るにとどまるため、対象物と治療器具の作用部位を観察しながらの処置が可能である。また、内視鏡では注水下においても安定した画像が得られるため、根管という閉鎖的な狭い環境内において観察対象物の状態を視覚的に把握し、注水を行いながら専用K-ファイル、Er:YAGレーザー、超音波ファイルなどを使用できるという特長を有している。

Er:YAGレーザーは、表面吸収型レーザーであり硬組織の切削能力も備えている。根管用内視鏡との併用で、観察しながら注水下にレーザー照射や超音波ファイルが使用でき最小限の侵襲での処置が可能である。

【結論】

根管用内視鏡、マイクロスコープ、コーンビームCTなど各種装置の特長を生かして、症例に応じて適宜組み合わせることで安全で正確な治療が可能になり、より予知性の高い根管治療に繋がると期待される。

大気圧低温プラズマジェットを用いた新規歯科医療機器の開発

¹⁾ 大阪大学大学院工学研究科アトミックデザイン研究センター、²⁾ 大阪府立産業技術総合研究所、
³⁾ 鶴見大学歯学部口腔微生物学講座、⁴⁾ 鶴見大学歯学部保存修復学講座

○北野勝久^{1, 3)}、井川聡²⁾、山崎弘光³⁾、臼井エミ⁴⁾、大島朋子^{1, 3)}、前田伸子³⁾、桃井保子⁴⁾

Development of novel dental instruments using atmospheric pressure plasmajet with room temperature

¹⁾Graduate School of Engineering, Osaka Univ., ²⁾Technology Research Institute of Osaka Prefecture,

³⁾Department of Oral Microbiology, Tsurumi University School of Dental Medicine,

⁴⁾Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine

○KITANO Katsuhisa¹⁾³⁾, IKAWA Satoshi²⁾, YAMAZAKI Hiromitsu³⁾,
USUI Emi⁴⁾, OHSHIMA Tomoko^{3, 1)}, MAEDA Nobuko³⁾, MOMOI Yasuko⁴⁾

大気圧低温プラズマジェットとは： “プラズマ”とは固体、液体、気体に次ぐ物質の第4の状態の事であり、物質は非常に高温になることでイオンと電子に解離した電離した状態であるプラズマになる。高電圧の印加により生成されたプラズマは、化学的・物理的な活性が高く、半導体プロセス等で必須の技術として産業利用されている。一般的には真空圧力下で生成されるが、近年の技術開発により真空容器を必要としない大気圧下のプラズマ生成が容易となってきた。その中でも、大気圧低温プラズマは適用範囲が広く、著者らは LF (Low Frequency) プラズマジェット (図1) と呼ばれる新しい大気圧プラズマ生成方法を開発し[1]、各種のバイオ応用を進めている[2]。

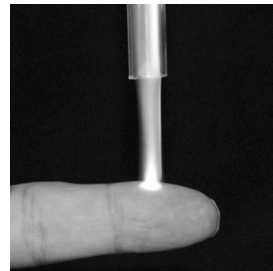


図1 大気圧低温プラズマの1つである LF プラズマジェット

プラズマ医療： 大気圧低温プラズマを人体に照射するプラズマ医療 (Plasma Medicine) の研究分野は世界的に注目度が高く、消毒、創傷治癒、止血、がん治療などへの適用が期待されている[3]。プラズマから供給される電子、イオン種、ラジカル種、励起種などの各種活性種や、高エネルギーフォトン、人体に対して様々な効果をもたらすとされている。著者らは医工連携により、消毒や止血に関して歯科分野への適用を進めている。

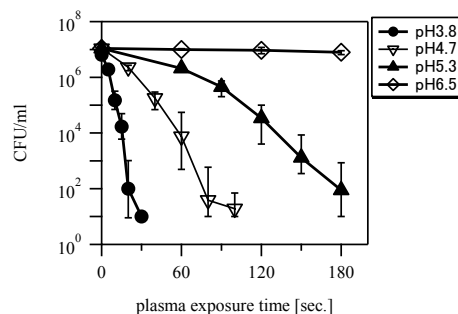


図2 液中プラズマ殺菌 (*E. coli*) の pH 依存性。

低 pH 法による効果的プラズマ殺菌方法： 大気圧低温プラズマを消毒に利用するためには、液体中 (体液中) に存在する細菌の殺菌技術が必須であるが、気体状であるプラズマ自身は液体に侵透

できないため、従来は十分な殺菌力を得られなかった。しかしながらこれまでの研究により、液体の pH を 4.7 以下の酸性条件にすることで、D 値 (菌数を 1 桁落とすのに必要な時間) が 1/100 以下になるという非常に高い殺菌力を得ることに成功した (図2) [4]。菌液を pH 調整しただけである図2の照射時間が 0 では菌数に変化はないことから、低 pH 条件でプラズマを照射した場合のみ見られる特異な現象である。pH が 7 程度と中性な人体組織に対してプラズマ殺菌を行うためには、酸性液を塗布する事が必須であり、抜去歯の感染歯質モデルを用いた実験でも、pH を下げることで *S. mutans*, *C. albicans*, *E. faecalis* 等に対して有効な殺菌力が得られることが判明している [5]。

歯科用医療機器： 安全性の担保ならびに効果の最適化を行うためだけでなく、新規医療機器を実用化するためには作用機序の解明が不可欠である。低 pH 法ではプラズマ化学反応により液中に生成されたスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^- \cdot$) という活性酸素が重要な役割を果たしていると考えられている。また、プラズマ照射による止血も可能であり、病理診断によると赤血球が形状を保った血餅ができてきていることから、いずれかの血液凝固因子に作用していると推察している。このように様々な応用の可能性を持つ大気圧低温プラズマジェットを歯科医療分野に対して応用することを異分野連携により進めており、発表では、低 pH 法によるプラズマ殺菌の実験結果を紹介する予定である。

参考文献

- [1] 北野勝久ら、応用物理学会誌、77(4)、pp383、(2008)。 日本国特許第 4677530 号。
- [2] 北野勝久ら、現代化学、7月号、p75、(2009)。 北野勝久、クリーンテクノロジー、2月号、p53、(2013)。
- [3] "Plasma Medicine", A. Fridman 編、Wiley、(2013)。
- [4] S. Ikawa et al., Plasma Process Polymers, 7, 1, pp.33, (2010)。 日本国特許第 4408957 号。
- [5] H. Yamazaki et al., 30 (3), pp. 384, (2011)。 臼井ら、日本歯科保存学会 2013 年度春期学術大会、P2, (2013)。

大気圧低温プラズマを用いた感染根管モデルでの殺菌および無菌化

¹⁾ 鶴見大学歯学部口腔微生物学講座、²⁾ 鶴見大学歯学部保存修復学講座、³⁾ 鶴見大学歯学部歯内療法学講座
⁴⁾ 大阪大学大学院工学研究科アトミックデザイン研究センター、⁵⁾ 大阪府立産業技術総合研究所
○山崎弘光¹⁾、大島朋子^{1,4)}、井川聡⁵⁾、臼井エミ²⁾、桃井保子²⁾、山本要³⁾、細矢哲康³⁾、前田伸子¹⁾、北野勝久^{1,4)}

Sterilization effect of atmospheric pressure and low temperature plasma on the root canal infection model

¹⁾Department of Oral Microbiology, Tsurumi University School of Dental Medicine,
²⁾Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine,
³⁾Department of Endodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine,
⁴⁾Graduate School of Engineering, Osaka University, ⁵⁾Technology Research Institute of Osaka Prefecture
○YAMAZAKI Hiromitsu¹⁾, OHSHIMA Tomoko^{1,4)}, IKAWA Satoshi⁵⁾,
USUI Emi²⁾, MOMOI Yasuko²⁾, YAMAMOTO Kaname³⁾, HOSOYA Noriyasu³⁾, MAEDA Nobuko¹⁾, KITANO Katsuhisa^{1,4)}

■目的

歯科医療において感染性微生物のコントロールはきわめて重要であるが、複雑な微細構造を持つ歯質の殺菌方法は未だ確立されていない。現在の感染根管治療では、強力な消毒薬を用いるにもかかわらず、システムティックレビューでは治療後 20~30%程度が再発するとされている。また、強力な消毒薬による事故例や残留毒性による有害事象例も報告されている。したがって現在の問題点を克服できる新たな殺菌方法が必要と考えられる。そこで我々はプラズマによる殺菌

表 1. 殺菌化学種の特徴

	化学種	殺菌力	浸透力	作用部位	酸化力 (酸化還元電位)	残留毒性
薬剤殺菌	オゾン	○	×	細胞壁・細胞膜	大 (2.07V)	小
	過酸化水素	△	◎	細胞内部	中 (1.76V)	大
	次亜塩素酸	◎	◎	細胞内部	大 (1.49V)	大
プラズマ殺菌	OH・	◎	×	細胞壁・細胞膜	大 (2.38V)	なし
	O ₂ ・	△	○	細胞壁・細胞膜	小 (0.645V)	なし
	HOO・	◎	◎	細胞内部	中 (1.65V)	なし

法(表 1)の感染歯質への応用が有効であるか検討を始めている。一般にプラズマ殺菌では、細菌に直接照射されない液中殺菌の実現は困難なため生体組織に対しての適応が難しいが、大気圧低温プラズマを低 pH 環境で用いた場合(低 pH 法 [1])、*in vitro* で有効性を検証しており[2]、齶蝕モデルでの感染歯質の殺菌に有効であることを本学会の本年度春季大会にて発表している。さらに今回は、プラズマを感染根管の殺菌による無菌化に応用できるかを検討することを目的とした。

■感染歯質モデルでの殺菌効果

感染歯質のモデルを歯の主要無機成分であるハイドロキシアパタイトペレットおよびヒト臼歯象牙質スライスに *Enterococcus faecalis* を 10^6 - 10^7 CFU/10 μ l 接種して構築し、殺菌実験を行った。軽く滅菌水にて洗浄後、クエン酸緩衝液(pH3.5, 4.5) 500 μ l に入れ、5分間プラズマ照射した。照射後緩衝液を取り除き、評価は細菌の呼吸活性を検出する Redox indicator の蛍光度で行った。その結果、どちらのモデルでも 99-99.9%の殺菌力であった。

■感染根管モデルでのプラズマ照射による殺菌効果

ヒト前歯の抜去歯を抜髄し、60号ファイルで根管拡大後、*E.faecalis* を 10^4 - 10^5 CFU/10 μ L 接種して一晚培養し感染モデルを作成した。根管内を滅菌水 100 μ L で洗浄し、クエン酸緩衝液(pH3.5)を注入後にプラズマ照射し、滅菌ペーパーポイントを根管内に挿入・浸漬したものを液体培地に培養した。37 $^{\circ}$ C、24-48時間培養後、濁度により無菌化の判定を行った。その結果、5分間照射および1分間照射を5回繰り返しても満足な殺菌効果が得られなかった。

■プラズマ処理水の作成

感染根管モデルでのプラズマ照射による殺菌効果が得られなかった理由として、気体、液体の対流が起こりにくい狭い根管という環境であるため、必要な活性種を深部まで供給できなかったと考えられる。そこで、あらかじめ液体にプラズマを照射し、十分な活性種を含有させる方法を検討した。大気中で純水に数分間照射することで殺菌活性があるプラズマ処理水を生成可能であることがわかり、-80 $^{\circ}$ Cの凍結で安定に保存が可能であった。

■プラズマ処理水による根管内殺菌試験

in vitro において、プラズマ処理水はクエン酸緩衝液(pH3.5)添加で十分な殺菌力を示したので、上記と同様の感染根管モデルでの殺菌試験を行った。感染根管内を滅菌水で洗浄後、クエン酸緩衝液で pH3.5 に調整したプラズマ処理水を 100 μ L 挿入し 30 秒後に抜取り、ペーパーポイントを挿入・浸漬し、液体培地で培養した。プラズマ処理水は希釈して実験に使用した。60%希釈では 30 秒での無菌化成功率は 85.7%、原液では 100%であった。

■まとめ 低 pH 条件下プラズマ照射およびプラズマ処理水殺菌は *E. faecalis* の感染歯質および感染根管モデルで十分な殺菌効果が得られ、**歯科臨床における新たな殺菌方法としてプラズマの性質に期待できると考えられる。**

文 献 [1] S. Ikawa *et al*, Plasma Process. Polym., 7(1) 33-, (2010), [2] H. Yamazaki *et al*, Dent. Mater. J 30(3) 384-391 (2011).

オゾン水発生装置を応用した歯科用ユニット給水経路における 従属栄養水生細菌バイオフィルムの抑制システムの開発

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
○大久保 圭祐, 河田 有祐, 伊東 孝, 塩田 康祥, 松永 一幸, 内藤 仁美, 前田 博史, 高柴 正悟

Development of heterotrophic biofilm inhibition system for dental unit water lines using ozone water generator

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

○Keisuke OKUBO, Yusuke KAWATA, Takashi ITO, Yasuyoshi SHIOTA, Kazuyuki MATSUNAGA, Hitomi NAITO,
Hiroshi MAEDA, Shogo TAKASHIBA

【研究目的】 歯科用ユニットの給水管路 (DUWL) の微生物汚染は, 易感染性宿主においては日和見感染症の危険性が危惧される。安心・安全な歯科治療を行うために, DUWL における微生物 (特に従属栄養水生細菌) の汚染抑制システムの開発が急務である。近年, 様々な化学薬品を用いた微生物汚染の除去システムが考案されてきたが, コストや安全性の観点から普及までに至っていない。また, 日本では DUWL の水質の保証は義務化されていない背景から, 一般の歯科医院に普及させるためには, 取り扱いが容易で安価なシステムであることが一層望まれる。そこで, 安全性が高くランニングコストを低減させた, DUWL の微生物汚染制御システムの開発を目的として, 残留性のないオゾン水を用いることに着目した。本研究では, 歯科用ユニット洗浄システムとしての実用化を想定し, 歯科用ユニットに搭載可能と考えるサイズまで小型化されたオゾン水発生装置の有効性評価を *in vitro* で実施した。

【材料および方法】

1. 試験水: オゾン水は, オゾン水発生装置 (OZS-PTDX, 桜川ポンプ, 大阪) で作成した, 溶存オゾン濃度を溶存オゾン測定器 (O3-1Z, 佐藤商事, 神奈川) にて経時的に測定した。対照水は, 0.1% 塩化セシルピリミジウム (CPC) 水溶液, 水道水, リン酸緩衝液 (PBS) を用いた。
2. 微生物: ① 基準として, 真菌である *Candida albicans* ATCC 10231 株を用いた。*C. albicans* は, Brain Heart Infusion 液体培地中で 12 時間培養した。そして, 試験水で 1×10^8 CFU/ml に調整した。前述の試験水中で, 室温で 1 時間, 緩やかに振盪した。② 従属栄養水生細菌として, 歯科用ユニットから除去した古い給水チューブ (タービンハンドピース用) 内のバイオフィルムを用いた。チューブを 1 cm 長に截断し, 縦割して 2 分した。そして, 3 cm 長分 (6 片) を 30 ml の試験水中へ浸漬して緩やかに振盪した (室温, 大気中, 1 時間)。その後, 各試験液を同量の R2A 液体培地 (日本製薬, 東京) に置換して, 静地培養した (32°C, 大気中, 96 時間)。
3. アデノシン三リン酸 (ATP) 活性の測定: ATP 活性は, ルシフェール HS キットおよびルミテスター-C-110 で測定した (ともに, キッコーマン, 広島)。
4. 従属栄養細菌バイオフィルムの観察: チューブ内面の性状を, 電界放射型走査電子顕微鏡 (FE-SEM DS-720: Topcon, 京都, 日本) にて観察した (加速電圧 15 kV)。

【結果】

1. *C. albicans* に対する殺菌効果

溶存オゾン濃度は, 測定開始時では 0.4 ppm であり, 2 時間で半減した。*C. albicans* の ATP 活性は, 陰性対照である水道水と PBS では同程度であり, オゾン水では陰性対照から半減する傾向にあり, 陽性対照である CPC 水溶液では検出限界以下であった。

2. DUWL 内の従属栄養水生細菌に対する殺菌効果

従属栄養水生細菌の ATP 活性は, 結果 1 と同様に, 陰性対照である水道水と PBS では同程度であり, オゾン水では陰性対照から半減する傾向にあり, 陽性対照である CPC 水溶液では検出限界以下であった。また, チューブ内面の走査電子顕微鏡観察から, オゾン水で処理したチューブではバイオフィルムの形成が抑制されていた。

【考察と結論】

上記の結果から, 単回のオゾン水処理によって, 試験管内の *C. albicans* と DUWL のチューブ内の従属栄養水生細菌の増殖を半減できることが確認できた。このことから, DUWL 内の従属栄養水生細菌による汚染をオゾン水によって抑制できる可能性が示唆された。今後, DUWL 内の部品材質へのオゾン水の影響を確認した後, この小型オゾン水発生装置を歯科用ユニットに組み込んだ試作機において, 有効性・安全性・品質評価を行う予定である。

Wnt5a がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について

¹九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、²九州大学病院 歯内治療科、
³アデレード大学歯学部歯周病学講座

○長谷川大学¹、和田尚久²、前田英史²、友清 淳³、門野内聡¹、郡勝明²、吉田晋一郎¹、
寺松陽子¹、濱野さゆり¹、祐田明香¹、杉井英樹¹、赤峰昭文^{1,2}

The effect of Wnt5a on human periodontal ligament cells.

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

²Department of Endodontology, Kyushu University Hospital,

³Colgate Australian Clinical Dental Research Centre, School of Dentistry, University of Adelaide.

○Daigaku Hasegawa¹, Naohisa Wada², Hidefumi Maeda², Atsushi Tomokiyo², Satoshi Monnouchi¹, Katsuaki koori²,
Shinichiro Yoshida¹, Yoko Teramatsu¹, Sayuri Hamano¹, Asuka Yuda¹, Hideki Sugii¹, Akifumi Akamine^{1,2}

【研究目的】 分泌タンパク質である Wnt ファミリー分子(Wnts)は、細胞増殖・分化、生存・アポトーシス及び細胞極性・運動を制御し、発生過程での組織形成や癌化、癌の浸潤・転移などにおいて重要な役割を担っている。Wnts は β カテニン依存的、または非依存的 Wnt シグナル伝達経路を惹起することが知られている。しかしながら、ヒト歯根膜細胞においては、 β カテニン依存的 Wnt シグナルが骨芽細胞様分化を制御することは報告されているが、 β カテニン非依存的 Wnt シグナルが骨芽細胞様分化および線維芽細胞様分化に関与するという報告は未だない。そこで、本研究では β カテニン非依存的 Wnt シグナル伝達において中心的な役割を担う Wnt5a に着目し、Wnt5a がヒト歯根膜細胞のこれらの分化に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】 当研究室にて樹立した未分化なヒト不死化歯根膜細胞株 1-17(Tomokiyo et al., 2008)ならびに本研究に同意が得られた 3 名の患者の抜去歯牙より採取した歯根膜細胞 HPDLC-3D(22 歳女性)、-3Q(21 歳女性)、-3R(24 歳男性)を用いた。(1)SD ラット(5 週齢、雄性)の下顎臼歯部の組織切片を用いて抗 Wnt5a 抗体による免疫組織化学的染色を行った。また、半定量的 RT-PCR 法にて HPDLCs および 1-17 細胞株における Wnt5a ならびにそのレセプター(Ror2, Fzd2, Fzd4, Fzd5)の遺伝子発現を検討した。(2)HPDLCs に 10%の伸展刺激を 24 時間負荷し、定量的 RT-PCR 法にて Wnt5a の遺伝子発現を比較検討した。(3)WST-1 proliferation assay および Scratch wound healing assay にて Wnt5a が HPDLCs および 1-17 細胞株の増殖能、遊走能に及ぼす影響について検討した。(4)Wnt5a 存在下で培養した HPDLCs および 1-17 細胞株における骨関連あるいは歯根膜関連遺伝子発現量、石灰化物形成量、および可溶性コラーゲン産生量についてそれぞれ定量的 RT-PCR 法、Alizarin red 染色法、Sircol collagen assay にて検討した。さらに、Periostin siRNA を用いたノックダウンにより、歯根膜関連遺伝子発現量ならびに可溶性コラーゲン産生量を評価した。

【結果】 (1)抗 Wnt5a 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った結果、歯根膜組織全体に陽性反応が認められた。また、HPDLCs および 1-17 細胞株において Wnt5a ならびにそのレセプターである Ror2, Fzd2, Fzd4, Fzd5 の遺伝子発現が認められた。(2)10%の伸展刺激を 24 時間負荷した HPDLCs において Wnt5a の遺伝子発現量が有意に増加した。(3)50 ng/ml の Wnt5a 存在下で、HPDLCs および 1-17 細胞株の増殖能ならびに遊走能が有意に上昇した。(4)50 ng/ml の Wnt5a を添加した石灰化誘導培地にて培養した HPDLCs および 1-17 細胞株において Alizarin red 陽性反応の抑制が認められ、また、OCN, OPN, BSP, BMP2, Osterix 遺伝子発現量が有意に減少した。100 ng/ml の Wnt5a 存在下で培養した HPDLCs および 1-17 細胞株において、COL-1, Periostin, Scleraxis, Fibrillin-1 の遺伝子発現量ならびに可溶性コラーゲン産生量が有意に増加した。しかしながら、Periostin のノックダウンにより、COL-1, Scleraxis, Fibrillin-1 の遺伝子発現量ならびに可溶性コラーゲン産生量は有意に減少した。

【考察】 以上の結果より、Wnt5a は歯根膜細胞の骨芽細胞様分化を抑制し、一方で、線維芽細胞様分化あるいは線維形成を促進する可能性が示唆された。また、機械的刺激により Wnt5a の発現が上昇したことから、Wnt5a が、咬合力に常時曝露される歯根膜の恒常性維持に関与している可能性が考えられた。

【結論】 (1)Wnt5a は歯周組織において歯根膜に限局して発現している。また、ヒト歯根膜細胞は Wnt5a およびそのレセプター遺伝子を発現しており、伸展刺激により Wnt5a の発現量は増加する。(2)Wnt5a はヒト歯根膜細胞の増殖能、遊走能を促進する。(3)Wnt5a はヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化を抑制し、一方、Periostin の発現上昇を介してヒト歯根膜細胞の歯根膜関連遺伝子の発現ならびに可溶性コラーゲンの産生を促進する。

歯根膜特異的分子 PLAP-1 による FGF-2 機能の制御

大阪大学大学院歯学研究所 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)
○栗田敏仁, 山田 聡, 山羽聡子, 阪下裕美, 津島賢一朗,
梶川哲宏, 北村正博, 村上伸也

Periodontal Ligament Specific Molecule PLAP-1 positively regulates FGF-2 functions

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Toshihito AWATA, Satoru YAMADA, Satoko YAMABA, Hiromi SAKASHITA, Kenichiro TSUSHIMA,
Tetsuhiro KAJIKAWA, Masahiro KITAMURA, Shinya MURAKAMI

【目的】

PLAP-1 は、歯根膜において恒常的に高発現している分子量約 40kDa のプロテオグリカン様構造をとる細胞外基質タンパクである。我々はこれまでに、歯周組織において PLAP-1 が BMP-2 のアンタゴニストとして機能し、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御することを明らかにしている。このことから、PLAP-1 は歯根膜において様々なサイトカインの機能を制御することで、歯根膜の恒常性維持に関与している可能性が考えられる。しかしながら、BMP-2 以外のサイトカインと PLAP-1 との相互作用については、未だ詳細に検討されてはいない。そこで本研究では、当教室にて樹立した PLAP-1 ノックアウト (KO) マウス胚から分離した初代培養マウス胎仔線維芽細胞 (MEFs) を用いて、PLAP-1 による FGF-2 機能の制御に関する解析を行ったので報告する。

【材料と方法】

PLAP-1 KO MEFs は胎生 13.5 日の PLAP-1 KO マウス胚から Trypsin-EDTA 処理により分離し、10% FCS 含有 D-MEM 培地にて培養を行い、継代数 3-5 を実験に用いた。まず、PLAP-1 KO MEFs から全 RNA を抽出し、real-time PCR 法によって種々の細胞外基質および転写因子の遺伝子発現を野生型 (WT) MEFs と比較することにより、細胞学的特性を検討した。さらに PLAP-1 KO MEFs を濃度 0~10 ng/ml の BMP-2 で刺激し、1hr 後に全 RNA を抽出して、BMP-2 反応性 *Id-1* 遺伝子の発現を検討した。また PLAP-1 KO MEFs を 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid, 100 ng/ml BMP-2 を添加した培地にて長期に培養することで、骨芽細胞へ分化誘導した。3 日ごとに全 RNA の回収およびアリザリン染色を行い、骨芽細胞分化関連遺伝子の発現解析および石灰化物形成能について検討を行った。次に 96 well plate に 1×10^4 個/well で播種した PLAP-1 KO MEFs を濃度 0~100 ng/ml の FGF-2 で刺激し、24hr 後の BrdU の取り込み量を化学発光法を用いて検出し、FGF-2 による細胞増殖を定量化した。さらに PLAP-1 と FGF-2 の相互作用の分子機構を明らかにするために、His 標識されたリコンビナント PLAP-1 タンパクとリコンビナント FGF-2 タンパクとの混合溶液を抗 His 抗体にて免疫沈降を行い、SDS-PAGE に展開し PVDF メンブレンに転写後、抗 FGF-2 抗体にて FGF-2 の共沈の有無をウエスタンブロッティング法にて検討した。

【結果】

PLAP-1 KO MEFs は WT MEFs と比較して *Biglycan*, *Decorin*, *Aggrecan*, *Collagen type I*, *Collagen type II* などの細胞外基質の遺伝子発現の上昇、および骨芽細胞分化関連遺伝子 *Osterix* の発現上昇を認めた。PLAP-1 KO MEFs を BMP-2 で刺激することにより、WT MEFs と比較してより高い *Id-1* 遺伝子発現の上昇を認め、加えて BMP-2 誘導性の骨芽細胞への分化能の亢進を認めた。一方、興味深いことに PLAP-1 KO MEFs において FGF シグナル特異的な反応遺伝子 *Spry2,4* の有意な発現低下が認められ、PLAP-1 KO MEFs を FGF-2 で刺激した際の細胞増殖は、WT MEFs と比較して有意に抑制されていた。さらにリコンビナント PLAP-1 タンパクとリコンビナント FGF-2 タンパクとの免疫共沈降解析より、PLAP-1 は FGF-2 と直接的に結合することが示された。

【結論と考察】

PLAP-1 KO MEFs において、BMP-2 に対する反応性の亢進および FGF-2 に対する反応性の低下が認められ、PLAP-1 が BMP-2 の機能を抑制的に、一方 FGF-2 の機能を促進的に制御することが示された。PLAP-1 がこれまでに報告のある BMP-2, TGF- β のみならず、組織の修復再生に重要な FGF-2 シグナルの制御にも関与している可能性が示唆された。

歯根膜特異的分子 PLAP-1 による炎症制御機構解明

大阪大学歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)

○山羽聡子, 山田 聡, 栗田敏仁, 阪下裕美, 津島賢一朗
梶川哲宏, 柳田 学, 北村正博, 村上伸也

Anti-inflammatory Functions of Periodontal Ligament Specific Molecule PLAP-1

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Satoko YAMABA, Satoru YAMADA, Toshihito AWATA, Hiromi SAKASHITA, Kenichiro TSUSHIMA
Tetsuhiro KAJIKAWA, Manabu YANAGITA, Masahiro KITAMURA, Shinya MURAKAMI

【目的】

近年、病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns ; PAMPs) のみならず、死細胞, 傷害組織あるいは癌細胞から産生・放出される因子や, 感染, 炎症あるいは酸化ストレスなどによって産生された自己由来の起因性因子 (damage-associated molecular patterns; DAMPs) が, Toll like receptor (TLR) などの Pattern recognition receptors (PRRs) を介して炎症を誘起することが明らかとなっている。Small leucine-rich repeat proteoglycan (SLRP) family class I に属する細胞外基質タンパクである Decorin および Biglycan は, TLR2 および 4 などの PRRs を介して炎症性サイトカインの産生を誘導し, 炎症・免疫反応を促進することが報告されており, SLRP family class I タンパクによる免疫制御機構が注目されている。一方, PLAP-1 は当教室においてヒト歯根膜 cDNA ライブラリーより発見された新規分子であり, 歯根膜に高頻度に発現することが明らかにされている。その構造より, SLRP class I に属し, Decorin および Biglycan と非常に高い相同性を持っている。我々は, これまでに PLAP-1 が BMP-2 のアンタゴニストとして機能し, 歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御することにより歯周組織の恒常性を維持していることを明らかとしてきた。一方, PLAP-1 の炎症・免疫反応への関与については, 未だ詳細は不明である。そこで, 本研究では TLR を介した炎症・免疫反応における PLAP-1 の機能について解析を行ったので報告する。

【材料と方法】

マウス歯根膜細胞 (MPDL6) における TLR family の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて解析した。MPDL6 を TLR2 アゴニスト *Porphyromona.gingivalis* (*P.g.*) LPS, あるいは, TLR4 アゴニスト *Escherichia coli* (*E.c.*) LPS にて刺激し, 炎症性サイトカイン *IL-6*, *CXCL10* の遺伝子発現を real-time PCR 法にて解析した。次に, マウス PLAP-1 発現ベクターを導入した培養細胞の上清を回収した。同上清における PLAP-1 タンパクの高発現をウエスタンブロット法にて確認し, リコンビナント PLAP-1 を含むコンディショニングメディア (PLAP-1 CM) として以降の実験に用いた。MPDL6 を PLAP-1 CM にて 1 時間前処理し, 続いて *E.c.* LPS 200ng/ml にて 8 時間刺激した。全 RNA と上清を回収し, *IL-6* と *CXCL10* の遺伝子発現およびタンパク発現を, それぞれ real-time PCR 法, ELISA 法にて解析した。さらに TLR を介して誘導される NF- κ B 活性化への PLAP-1 の影響については, TLR2 および 4 遺伝子と共に, それぞれの共受容体と NF- κ B 誘導性の SEAP (分泌性胎盤アルカリフォスファターゼ) レポーター遺伝子を安定的に発現するように設計された HEK Blue hTLR2 および HEK Blue hTLR4 細胞を用いて解析を行った。HEK Blue hTLR2 細胞は PLAP-1 CM 存在下で TLR2 アゴニスト Pam3CSK4 および *P.g.* LPS にて, HEK Blue hTLR4 細胞は PLAP-1 CM 存在下で *E.c.* LPS にてそれぞれ刺激し, これらの細胞の 24 時間後の SEAP 活性を QUANTI-Blue を用いて測定した。

【結果と考察】

MPDL6 には TLR1~9 の全ての TLR family 遺伝子が発現していることが明らかとなった。MPDL6 を *P.g.* LPS あるいは, *E.c.* LPS にて刺激することで, *IL-6* および *CXCL10* の遺伝子発現が誘導された。PLAP-1 CM にて前処理することにより, *E.c.* LPS 誘導性の *IL-6*, *CXCL10* の遺伝子発現, およびタンパク発現が抑制された。HEK Blue hTLR2 を PLAP-1 CM 存在下で Pam3CSK4 および *P.g.* LPS にて, HEK Blue hTLR4 を PLAP-1 CM 存在下で *E.c.* LPS にてそれぞれ刺激すると, コントロール CM 存在下で同様に刺激した場合と比較し, 共に有意に SEAP 活性が抑制された。

【結論】

歯根膜細胞において, PLAP-1 は TLR2 および 4 を介した炎症反応を抑制することが明らかとなった。歯周組織において, PLAP-1 は, 歯周病原性細菌による炎症反応を制御することで, 歯周炎などの病態形成に関与している可能性が示唆された。

上皮細胞の細胞増殖におけるアメロブラスチンの影響

九州歯科大学口腔治療学講座口腔保存治療学分野¹, 九州歯科大学名誉教授²
○西藤法子¹, 鷲尾絢子¹, 寺下正道², 北村知昭¹

The influence of ameloblastin in epithelial cells proliferation

¹Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Department of Cariology and Periodontology,
²Professor Emeritus, Kyushu Dental University
○SAITO Noriko¹, WASHIO Ayako¹, TERASHITA Masamichi², KITAMURA Chiaki¹

【研究目的】 上皮細胞の増殖抑制は、歯根肉芽腫や歯根嚢胞を含む難治性根尖病変成立過程に上皮細胞が重要な役割を果たすことから、歯周疾患治療同様、根尖性歯周疾患治療においても重要である。ブタ歯胚由来エナメルマトリックスタンパクであるエナメルマトリックスデリバティブ (エムドゲイン) は歯周治療における歯周組織再生の誘導に有効な材料として広く知られている。エムドゲインの作用メカニズムとして、歯根膜に存在する未分化間葉細胞をセメント芽細胞に分化させること、骨欠損部位の骨形成を促進させること、歯肉上皮の歯根面への侵入増殖抑制することなどが報告されているが、複数のタンパクの混在するエムドゲインの生物学的活性に関する詳細な検討は十分に行われていない。これまでに我々は、エムドゲインを逆相高速液体クロマトグラフィーにて分画化し、破骨細胞分化活性を持つ画分と上皮細胞の増殖抑制活性を有する画分が存在することを確認している。そして、上皮細胞の抑制活性を有する画分についてプロテオーム解析を行った結果、同画分の主要タンパクとしてアメロブラスチンが存在していることを明らかにしてきた。アメロブラスチンは歯の発生においてエナメル芽細胞で産生されるタンパク質であり、欠損マウスの観察結果からエナメル質形成に関与していることが知られている。さらに近年の研究から、アメロブラスチンはエナメル質形成のみならず、細胞の分化維持、エナメル芽細胞の細胞極性、および増殖制御に積極的に関与していることが報告され、その生理機能が注目されている。

今回、われわれは上皮細胞増殖に対するアメロブラスチンの作用に注目し、リコンビナントのアメロブラスチンを精製し、*in vitro*での解析を行った。

【材料と方法】 アメロブラスチン発現プラスミド (pFN21AE2417) を African green monkey の腎上皮細胞 (COS7 細胞) に Super Electroporator NEPA21 Type II (NEPA GENE) で遺伝子導入後、抽出タンパク質に対して、HaloTag Mammalian Protein Purification Systems (Promega) を用いた精製を行い、アメロブラスチンタンパクを単離精製した。精製後のタンパクは Amicon Ultra Centrifugal Filter (Amicon) で脱塩した後、凍結乾燥した。精製の各ステップで得られたフラクションに対して、アメロブラスチンのポリクローナル抗体を用いた Western blotting 法でタンパク質発現を確認し、Bio-Rad DC™ Protein Assay Kit (BIO-RAD) を用いてタンパク量を測定した。

次に、精製したリコンビナント・アメロブラスチンをヒト扁平上皮癌細胞株 (SCC25 細胞) に添加後 48 時間培養し、Water soluble tetrazolium salt (WST) assay を用いて細胞増殖能に対するリコンビナント・アメロブラスチンの影響を分析した。

【結果】 pFN21AE2417 を導入した COS7 細胞より抽出・精製したリコンビナント・アメロブラスチンは、SCC25 細胞に対して増殖抑制効果を示し、既存のアメロブラスチンのポリクローナル抗体で検出可能であった。この増殖抑制活性は約 8.0 μg/ml で 60 % の細胞増殖抑制率を示した。

【考察】 今回我々はリコンビナント・アメロブラスチンタンパクの精製方法を確立した。また、精製したアメロブラスチンは上皮細胞の増殖に対して強い抑制活性を有することが明らかとなった。以上の結果は、歯周組織再生過程で用いられたエムドゲインが、セメント芽細胞分化誘導とともに、その成分であるアメロブラスチンにより歯根膜面に対する上皮細胞の侵入を阻害することで、歯槽骨や結合組織の再生を誘導する可能性を示唆している。今後、歯根肉芽腫や歯根嚢胞を含む難治性根尖病変成立過程における上皮細胞機能への影響を検討していく予定である。

【結論】 精製リコンビナント・アメロブラスチンは、*in vitro* 実験系において上皮細胞の増殖抑制効果を示した。

プロテオーム解析によるアメロジェニン会合分子の検討

¹⁾九州大学病院歯周病科、²⁾九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野
○福田隆男¹⁾、豊田敬介²⁾、讃井彰一²⁾、西村英紀¹⁾²⁾

Identification of novel amelogenin-binding proteins by proteomics analysis

¹⁾Department of Periodontology, Kyushu University Hospital, ²⁾Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University
○Takao Fukuda¹⁾, Kyosuke Toyoda²⁾, Terukazu Sanui²⁾, and Fusanori Nishimura¹⁾²⁾

【目的】

歯周組織の再生にエナメル基質タンパク質(EMD:Emdogain Gel)が用いられ良好な結果が報告されている。しかしその作用機序についてシグナル伝達分子レベルでの統一的な見解は得られていない。アメロジェニンはEMDの90%以上を占める主要成分であり、実験動物において組み換えアメロジェニンによる歯周組織再生の成功例も報告されている。そのためアメロジェニン会合分子の同定は、同分子が再生に果たす役割を機序の面から解明するうえで非常に有益である。今回我々は、プロテオーム解析により骨芽細胞における新規アメロジェニン会合分子の同定を行い、その会合タンパク質が歯周組織再生に果たす分子基盤について検討した。

【材料および方法】

1. 胎生マウス cDNA から GST 融合アメロジェニンの作成および、アメロジェニン(GST タグなし)を精製した。
2. 組み換えアメロジェニンの骨芽細胞内への経時的な取り込みを、共焦点蛍光顕微鏡により観察した。
3. GST pull down assay により SaOS-2 ヒト骨芽細胞様細胞の可溶性分画・膜分画におけるアメロジェニン会合蛋白を2次元電気泳動(2D-PAGE)により分離し、CBB 染色により検出した。
4. 2D-PAGE で得られたアメロジェニン会合蛋白スポットをタンパク質質量分析(MALDI-TOF MS)により同定し、さらに骨芽細胞の可溶性分画・膜分画における会合蛋白の比較を行った。
5. アメロジェニンとアメロジェニン会合蛋白の細胞内における共局在を、共焦点蛍光顕微鏡により観察した。
6. アメロジェニン会合蛋白を siRNA でノックダウンし、アメロジェニン刺激時の細胞動態変化について細胞増殖(WST-8 assay)および骨分化マーカー遺伝子群の発現をリアルタイム PCR で比較検討した。

【結果】

1. SaOS-2 骨芽細胞において、アメロジェニンが経時的に細胞膜から核近傍へ集積して取り込まれる様子を確認した。
2. SaOS-2 骨芽細胞において、アメロジェニン会合蛋白を可溶分画に 16 個、膜分画に 12 個同定した。その中で、小胞体関連シャペロン蛋白である Grp78 のみが唯一、両分画に存在していた。
3. Grp78 は細胞内でユビキタスに発現していたが、アメロジェニン取り込み時には核近傍への共局在が確認された。
4. アメロジェニン刺激時に SaOS-2 骨芽細胞の有意な細胞増殖の亢進が確認されたが、Grp78 ノックダウンによりアメロジェニンの細胞増殖効果は消失した。
5. アメロジェニン添加により Osteopontin のみ発現が上昇したが、その他の骨分化マーカー遺伝子群は減少傾向を示した。SaOS-2 骨芽細胞の Grp78 ノックダウンにより、Runx2, Osterix, ALP の発現が低下したが、Osteopontin の著明な増加が認められた。

【考察】

プロテオーム解析によりアメロジェニン会合分子として同定された Grp78 は、アメロジェニンの取り込みに関与しているとみられる。両者の会合による細胞増殖への影響が強く示されたが、骨分化においては初期の影響は少なく、後期の石灰化への関与が示唆された。EMD が分化度の低い骨芽細胞系細胞には増殖を促進するのに対し、より分化度の高い骨芽細胞では増殖を抑制し、分化を促進するとの報告がある。Grp78 を介したアメロジェニンの骨芽細胞への影響について、今後は骨芽細胞の分化度に注目しての更なる検討が必要とみられる。

【結論】

小胞体関連シャペロン蛋白である Grp78 は、アメロジェニンのレセプターとして骨芽細胞の増殖・分化の制御に関与していることが示唆された。

Genipin は IL-1beta が誘導するヒト歯根膜細胞の CCL20 および IL-6 産生を抑制する

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯科保存学分野
²⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野
○ 進藤智¹⁾、細川義隆¹⁾、細川育子¹⁾、尾崎和美²⁾、松尾敬志¹⁾

The effect of genipin on CCL20 and IL-6 productions from IL-1beta-stimulated human periodontal ligament cells

¹⁾Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School, ²⁾Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School
○ Satoru Shindo¹⁾, Yoshitaka Hosokawa¹⁾, Ikuko Hosokawa¹⁾, Kazumi Ozaki³⁾, Takashi Matsuo¹⁾

【研究目的】

CC chemokine ligand 20 (CCL20)はCC chemokineに属するケモカインであり、CC chemokine receptor 6 (CCR6)を介してTh17細胞浸潤に関与している事が明らかとなっている。近年、Th17細胞が炎症性疾患の骨吸収を誘導する事が報告され、歯周炎においても病態への関与が示唆されている。また、IL-6は炎症性サイトカインであり破骨細胞を活性化する事で歯槽骨吸収に関与している事が明らかとなっている。genipinはクチナシに含まれるイリドイド化合物であり、抗酸化作用、抗癌作用、抗炎症作用などの生理活性化作用があることが報告されているが、CCL20やIL-6産生に与える影響に関しては報告がなく不明な点が多い。本研究では、炎症性サイトカインであるIL-1betaが誘導するヒト歯根膜細胞 (HPDLC) のCCL20およびIL-6産生に与えるgenipinの影響に関してシグナル伝達機構も含めて検討を行った。

【材料および方法】

HPDLCはTaKaRa社より購入し、10%FBSを含むDMEM培地にて培養し実験に用いた。まず、HPDLCをIL-1betaで刺激しCCL20ならびにIL-6産生をELISA法により解析した。さらにgenipinにてHPDLCを1時間前処理後IL-1beta刺激を行い、CCL20およびIL-6産生をELISA法にて、細胞内シグナル伝達 (MAPKs, NF- κ B) の活性化をwestern blot法にて解析を行った。また、IL-1 beta誘導CCL20およびIL-6産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにシグナル伝達阻害物質にて前処理後、IL-1 beta刺激を行いCCL20ならびにIL-6産生をELISA法を用い検討した。

【成績】

HPDLCはIL-1beta刺激でCCL20およびIL-6を産生した。genipin前処理はIL-1betaが誘導したCCL20およびIL-6産生を濃度依存的に抑制した。また、p38 MAPK inhibitor, ERK inhibitor, JNK inhibitorおよびNF- κ B inhibitorは有意にIL-1betaが誘導したCCL20およびIL-6産生を抑制した。genipin前処理はNF- κ Bシグナル伝達経路に関してNF- κ B p65のリン酸化は抑制したが、I κ B-alpha分解は抑制しなかった。MAPKsシグナル伝達経路に関してはERKのリン酸化を抑制し、さらにその上流のMEKのリン酸化も抑制した。

【考察および結論】

今回の結果より、IL-1beta 刺激により CCL20 ならびに IL-6 産生が HPDLC に誘導されることより、歯周炎病変局所において Th17 細胞浸潤の誘導ならびに破骨細胞活性化により歯槽骨吸収が引き起こされる可能性が示された。また、genipin は MEK/ERK ならびに NF- κ B を介するシグナル伝達経路を阻害することにより、IL-1beta 刺激 HPDLC の CCL20 および IL-6 産生を抑制する事が明らかとなった。この結果より、クチナシに含まれる genipin は Th17 細胞の歯周炎病変局所への浸潤・集積ならびに破骨細胞活性化を減少させ、歯周炎における炎症性骨吸収を抑制できる可能性が示唆された。

歯肉溝滲出液(GCF)における酵素活性と ALP 活性との関連について

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座¹⁾,

日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター・アイソトープ研究施設²⁾

○石井マイケル大宜¹⁾, 倉治竜太郎¹⁾, 伊藤 弘¹⁾, 沼部幸博¹⁾, 戸田智幸²⁾, 橋本修一²⁾

Relationship of enzyme activity and ALP activity in GCF

Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo¹⁾,

Dental Research Institute, Radio Isotope Center, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry Tokyo²⁾

○Hiroaki Michael Ishii¹⁾, Ryutarō Kuraji¹⁾, Hiroshi Ito¹⁾, Yukihiro Numabe¹⁾, Toshiyuki Toen²⁾, Shuichi Hashimoto²⁾

【目的】

GCF 成分解析の1つの意義は、より精度の高い診断結果を得る可能性のある有力なマーカーを検索することである。我々は、第137回日本歯科保存学会において、血清由来の成分が PPD と BOP の両検査の診断精度を補填する有効なマーカーであることを報告した。特にアルカリフォスファターゼ(ALP) は、広範囲の細胞膜上に局在し、一部の ALP は血清中に放出されている。また、ALP は組織損傷が生じた場合、細胞膜から遊離しやすくなり、酵素の最適 pH は 10.2 である。特に今回は ALP 活性と各生化学マーカー及び臨床パラメータとの相関関係を探索し、歯周組織損傷についても考察を加えた。

【材料および方法】

- 1、被験者：定期的に SPT を受診している非喫煙者 27 名 (男性 14 名, 女性 13 名) とし、年齢±標準偏差は 62.1±14.8 歳であった。
- 2、検索部位：歯冠修復のない上下顎前歯部 53 部位とした。
- 3、臨床パラメータ：PII, GI, CAL, PPD, BOP, GCF 量とした。GCF 採取は、余剰なブラークを除去後簡易防湿にてペリオペーパー(OraFlow)を同一部位に対して 3 回軽い抵抗感があるまで挿入を行い、ペリオトロン 8000(OraFlow)にて測定を行った。GCF 量は検量線にて算出した。
- 4、生化学マーカー
 - ①エラスターゼ活性：顆粒球エラスターゼの特異基質である Glutamic acid-Proline-Valine-p-nitroanilide を用いた酵素活性にてエラスターゼ活性を測定した。
 - ②AST 活性：Wako kit を用いた。
 - ③タンパク質量：BCA protein assay kit(USA)を用いた。
 - ④ALP 活性：Bessey-Lowly 法を応用した。
 - ⑤出血反応・履歴：ヒトモノクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフィー法とルミノール反応を応用した。

【結果および考察】

ALP 活性は、臨床パラメータのうち PII を除く各検索項目と相関関係を認めた。一方、ALP 活性とその他の生化学マーカーとの関係は、AST を除き相関性が認められた。特に、ALP 活性には歯周組織損傷の状態を示す PPD や CAL、歯肉の炎症状態を示す GI やエラスターゼ活性と強い相関が認められ、ALP 活性は歯周組織損傷に関する有力なマーカーであることが示唆された。また、遊離した ALP はリン酸カルシウムを歯肉構内に蓄積し、歯石形成に関与している可能性が考えられる。

本研究は文部省科学研究費助成金：基盤研究 C, 課題番号：20592437・25463267 の一部助成を受けて行われた。また本研究は倫理委員会の承認のもと遂行された (承認番号 2111)。

歯肉溝滲出液(GCF)の pH における一考察

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座¹⁾,

日本歯科大学生命歯部共同利用研究センター・アイソトープ研究施設²⁾

岩手医科大学歯学部口腔機能保存学講座歯周病学分野³⁾, 日本大学松戸歯学部歯周治療学講座⁴⁾,
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体支持組織学系専攻生体硬組織再生学講座歯周病学分野⁵⁾,

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野⁶⁾

○伊藤 弘¹⁾, 沼部幸博¹⁾, 関野 愉¹⁾, 村樫悦子¹⁾, 石黒一美¹⁾, 戸田智幸²⁾, 橋本修一²⁾,
佐々木 大輔³⁾, 八重柏 隆³⁾, 國松和司³⁾, 高井英樹⁴⁾, 目澤 優⁴⁾, 小方頼昌⁴⁾,
渡邊 久⁵⁾, 萩原さつき⁵⁾, 和泉雄一⁵⁾, 廣島佑香⁶⁾, 木戸淳一⁶⁾, 永田俊彦⁶⁾

pH in GCF

Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo¹⁾,

Dental Research Institute, Radio Isotope Center, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry Tokyo²⁾
Hiroshi Ito¹⁾, Yukihiko Numabe¹⁾, Toshiyuki Toen²⁾, Shuichi Hashimoto²⁾

Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo¹⁾,

Dental Research Institute, Radio Isotope Center, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry Tokyo²⁾,

Department of Conservative Dentistry and Oral Rehabilitation, Division of Periodontology, School of Medicine,

Iwate Medical University³⁾, Departments of Periodontology, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University⁴⁾,

Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Graduate School of Medical and Dental Science,

Tokyo Medical and Dental University⁵⁾, Department of Periodontology and Endodontology,

Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School⁶⁾

○Hiroshi Ito¹⁾, Yukihiko Numabe¹⁾, Satoshi Sekino¹⁾, Etsuko Murakashi¹⁾, Hitomi Ishiguro¹⁾, Toshiyuki Toen²⁾,
Shuichi Hashimoto²⁾, Daisuke Sasaki³⁾, Takashi Yaegashi³⁾, Kazushi Kunimatsu³⁾, Hideki Takai⁴⁾, Masaru Mezawa⁴⁾,
Yorimasa Ogata⁴⁾, Hisashi Watanabe⁵⁾, Satsuki Hagiwara⁵⁾, Yuuichi Izumi⁵⁾, Yuka Hiroshima⁶⁾, Jun-ichi Kido⁶⁾,

Toshihiko Nagata⁶⁾

【目的】

歯肉溝に存在する各種酵素が働く上で、温度や pH は重要な条件である。我々は、GCF を採取したペーパーストリップスを生理食塩液に浸漬し、溶液の pH とエラスターゼ活性とを測定し、臨床パラメータとの関係を検討した。

【材料および方法】

- 1、被験者：定期的に SPT を受診している非喫煙者 136 名（年齢±標準偏差：64.4±10.9 歳）とした。
- 2、検索部位：歯冠修復のない上下顎前歯部 296 部位とした。
- 3、臨床的検索項目：PII, GI, CAL, PPD, BOP, GCF 量とした。GCF 採取は、余剰なブラークを除去後、簡易防湿にてペリオペーパー(OraFlow, USA)を同一部位に対して 3 回軽い抵抗感があるまで挿入を行い、ペリオトロン 8000(OraFlow, USA)にて測定を行った。GCF 量はペリオトロン値から得られた検量線にて算出し、ペーパーストリップスは生理食塩液中に浸漬した。
- 4、生化学的検索項目：GCF 酵素活性の測定は顆粒球エラスターゼとし、Glutamic acid-Proline-Valine-*p*-nitroanilide を基質として用いた。ペリオペーパーを浸漬した生理食塩液の pH は、簡易型 pH 測定器 (Horiba, 日本) を用いて計測した。なお、本研究は倫理委員会の承認のもと遂行された (承認番号 2111)。

【結果および考察】

pH 測定時に計測した生理食塩液の pH5.70±0.14 を基準とした場合、基準値以上の pH を示した GCF 中のエラスターゼ活性の平均値は 609.4IU となり、基準値未満の pH を示した GCF 中のエラスターゼ活性の平均値は 247.4IU となった。一方、pH が基準値以上の群の PPD の平均値は 3.50mm であり、基準値未満の群は PPD の平均値は 2.85mm となった。従って、基準値に対しアルカリ性側、酸性側におけるエラスターゼ活性と PPD 値との間には相関性が認められた。以上の結果から、歯周組織損傷に歯肉溝内の pH が関与している可能性が示唆された。

本研究は文部省科学研究費助成金：基盤研究 C，課題番号：20592437・25463267 の助成を受けて行われた。

ラット GBA モデルにおける血管新生のマイクロ CT による観察

¹⁾ 日本大学大学院歯学研究科歯学専攻応用口腔科学分野, ²⁾ 日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座
³⁾ 日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座, ⁴⁾ 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門 ⁵⁾ 日本大学歯学部
○佐藤暢亮¹⁾, 佐藤秀一^{2,4)}, 宇田川麻美¹⁾, 篠弘道¹⁾, 江澤庸博²⁾, 新井嘉則⁵⁾, 小木曾文内^{2,3,4)}

Angiogenesis of bone augmentation in rat GBA calvaria model

¹⁾ Division of Applied Oral Science, Nihon University Graduate School of Dentistry, ²⁾ Department of Periodontology, ³⁾ Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry ⁴⁾ Division of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, ⁵⁾ Nihon University,
○Nobuaki Sato¹⁾, Shuichi Sato^{2,4)}, Asami Udagawa¹⁾, Hiromichi Shino¹⁾, Tsunehiro Ezawa²⁾, Yoshinori Arai⁵⁾, Bunnai Ogiso^{2,3,4)}

【目的】

骨再生に過程における血管新生の制御・誘導は非常に重要である。しかし、骨外側方向への骨増生における血管新生の動態については不明な点が多い。そこで、本研究では、骨外側方向への骨増生に対する血管新生の動態を、ラット GBA (Guided Bone Augmentation) モデルを用いて、血管造影およびマイクロ CT を用いて観察することを目的とした。

【材料および方法】

8 週齢のラット 30 匹にイソフルレンによる吸入麻酔後、ペントバルビタールナトリウム (50 mg/kg) を腹腔内に注射し、全身麻酔を施した。ついで、ラットの頭頂部に 2% 塩酸リドカイン (1 : 80,000 アドレナリン含有歯科用キシロカインカートリッジ) 約 0.5 ml を用いて局所麻酔を施し、正頭部皮下に切開を加えて皮膚骨膜弁を形成、剥離、翻転した。そして、ラットの頭頂部矢状縫合を中心に左右対称に直径 5.0 mm のトレファインバーを使用し外周溝を作製し実験母地とした。左側の実験母地は、#2 のラウンドバーを使用し 7 カ所骨髄穿通した 7M 群とし、右側は直径 2.7 mm のトレファインバーを用いて中心部に 1 カ所骨髄穿通した 1S 群とした。その後、外周溝にプラスチックキャップを装着し、骨膜で被覆し、さらに皮膚を縫合した。術直後を 0 週とし、4 週まで 2 週毎に CT 撮影および血管造影を行った。血管造影方法は、全身麻酔後に CT 撮影を行った後、ラットの腹部に 2% 塩酸リドカイン 1ml を用いて局所麻酔を施し、ラットの心臓を剖出させた。環流固定と同じ方法を用いて、生理食塩水で脱血させ安楽死させた後、10% 中性緩衝ホルマリン溶液を使用して全身を固定した。ついで、血管造影剤 (イオパミロン注 370 バイエル薬品株式会社, 大阪) 20 ml を自動注入機を用いて毎分 1.25 μ l の速度で全身に注入した後、CT 撮影を行い、造影前後の画像の差分を計測して血管新生と骨再生を評価した。

【結果】

マイクロ CT による観察から、両群とも経時的に骨外側方向に新生血管および骨様組織の増加を認めた。術後 2 週で 7M 群より 1S 群において血管新生様組織の形成が多く認められた。また、両群の新生血管様組織の高さは術後 4 週ではプラスチックキャップの約 1/3 までであった。術後 4 週での新生血管様組織の体積は両群ともに有意差は認められなかった。

【考察および結論】

骨髄穿通孔をより大きくすることによって、穿通孔からより多くの未分化間葉系細胞や成長因子などがプラスチックキャップ内に流入し、早期により多くの新生血管様組織が形成されたのではないかと考えられた。

咬合性外傷を伴った慢性歯周炎へ骨移植術を行った一症例

大阪歯科大学歯周病学講座

○田幡 元, 梅田 誠

A case report of bone graft for chronic periodontitis with occlusal trauma

Department of Periodontology, Osaka Dental University

○Tabata Hajime, Umeda Makoto

【はじめに】

慢性歯周炎により生じた歯周骨内欠損への再生療法が歯周治療において重要と考えられる。歯周骨内欠損の幅および深さによって歯周組織再生療法(エナメルマトリックスタンパク質を応用した手術法, GTR法)か, 骨移植か, また両方を併用するのか決定される。また骨移植材においても自家骨, 他家骨および人工的に合成された移植材が骨内欠損へ応用されてきている。自家骨は骨形成能、骨誘導能を有するが量的制限があり, 他家骨は感染のリスクや倫理的な制限があり, 人工骨は骨伝導能しか有さないが量的な制限や感染のリスクは有さないという特徴がある。

本症例では, 慢性歯周炎によって生じた歯周骨内欠損に自家骨または超高気孔率ハイドロキシアパタイト (医療機器承認番号:21800BZZ10055000) の顆粒を用いた骨移植術を行い, 良好な結果が得られたので報告する。

【初診】

患者: 62歳の女性 初診: 2010年10月20日

主訴: 両側上下顎大臼歯部の歯肉の腫脹, 出血, 排膿および違和感, 歯の動揺

【診査・検査所見】

17, 27, 37 遠心に 8mm の深いポケットが存在し, 同部位より排膿およびプロービング時の出血が認められた。また, 口腔内所見において, 全顎的に骨隆起が認められ上下顎第二大臼歯部で早期接触による咬合性外傷が認められ, ブラキシズムの自覚もある。全顎的に健康状態は良好で, 喫煙の既往はなく, ブラッシング状態は良好である。エックス線検査において 17, 27, 37 遠心に垂直性の骨欠損が認められる。

【診断】

軽度慢性歯周炎 (一部重度), (二次性) 咬合性外傷

【治療計画】

歯周基本治療 (プラークコントロール, スケーリング・ルートプレーニング, 咬合調整, バイトプレート装着), 再評価, 歯周外科治療 (27, 37 部に自家骨を用いた骨移植術, 17 部に超高気孔率ハイドロキシアパタイトを用いた骨移植術), 再評価, SPT

【治療経過】

歯周基本治療 (TBI, SRP, 咬合調整, バイトプレートの装着) ②再評価 ③歯周外科処置 (27, 37・自家骨を用いた骨移植術, 17・高気孔率ハイドロキシアパタイトを用いた骨移植術 ④再評価 ⑤SPT

【考察・まとめ】

27, 37 部の骨欠損部に対しては自家骨を移植し, 17 部に対しては十分な量の自家骨の採取が困難であったため人工骨の移植を行い, いずれも良好な結果が得られた。17 部において術後 1 年においてデンタル上で一部顆粒が認められたがこれは超高気孔率ハイドロキシアパタイトが非吸収性であり, 骨との置換を起ささないためであると考えられる。付着に関してはいずれも上皮性の付着であるため, 今後も歯周組織並びに咬合状態を慎重に経過観察しながら SPT を行っていく予定である。

ビスフォスフォネート製剤投与患者の顎骨壊死に関する調査

虎の門病院歯科

○森上 誠, 陶山雄司, 杉崎順平, 宇野 滋, 山田敏元

The survey on bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw

Department of Dentistry, Toranomon Hospital

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

【研究目的】

ビスフォスフォネート (Bisphosphonate: BP) 製剤は、破骨細胞のアポトーシスを誘導することにより骨吸収を抑制することから、骨破壊・骨吸収をきたす疾患に広く用いられている。多発性骨髄腫および乳癌・前立腺癌などの骨転移にも骨吸収抑制目的ばかりでなく、骨痛の緩和や随伴する高カルシウム血症の治療の目的で、静注薬として使用されている。また、日本だけでも 1,300 万人もの患者がいると推測される骨粗鬆症にも、主に経口薬として、その優れた有効性から最もよく使用されている。しかし、2003 年に米国で初めて BP 関連顎骨壊死 (BP related osteonecrosis of the jaw: BRONJ) が報告され、多分野からの注目を集めた。現在でも BRONJ の発生機序には不明な点が多いとされ、種々のガイドラインやポジションペーパーでは、BRONJ の発生を懸念し、BP 製剤投与患者に対する顎骨への外科的侵襲を伴う歯科処置を可及的に避けることを推奨している。ところが、近年、BP 製剤投与患者の中には、外科的歯科処置を実施していないにもかかわらず、顎骨壊死を発症した症例がみられるようになってきた。そこで、虎の門病院歯科において、BP 製剤投与患者の中で顎骨壊死がみられた症例について、調査を開始した。調査は現在も継続中であるが、現時点までに明らかとなった知見について今回報告する。

【方 法】

現在、本邦で使用されている BP 製剤には、静注薬として 3 種 4 製品 (アレディア、テイロック、ボナロン、ゾメタ) および経口薬として 4 種 7 製品 (ダイドロネル、フォサマック、ボナロン、ベネット、アクトネル、ボノテオ、リカルボン) がある。これらの BP 製剤を投与されている患者のうち、顎骨壊死がみられた症例について、患者氏名、年齢、性別、疾患名 (骨粗鬆症または悪性腫瘍名)、BP 製剤名、投与期間、顎骨壊死の発見時期、顎骨壊死の発生部位、発生部位が義歯床下粘膜であるか否か、転帰 (引き続き経過観察が必要、自然治癒した、歯科担当医が処置した結果治癒した、他科へ処置を依頼した、他病院へ処置を依頼した、死亡) について、歯科担当医がプロトコールに記入した。

【結果および考察】

平成 25 年 7 月 25 日の時点で、顎骨壊死がみられたのは 9 名の患者の 10 部位であった。乳癌 (4 名) および骨髄異形成症候群 (1 名) の患者にはゾメタが、骨粗鬆症の患者 (2 名) にはボナロンが、膵臓癌の患者 (1 名) にはゾメタおよびボナロンが投与されていた。また、肺癌の患者 (1 名) には BP 製剤ではないがランマークが投与されており、参考のためにあわせて記録することにした。全 10 部位のうち、抜歯後に顎骨壊死を発症したものは 2 部位であり、その他の 8 部位は外科的歯科処置を行っていないにもかかわらず、顎骨壊死を発症した。これら 8 部位のうち、義歯床下に発症したものが 3 部位であった。転帰としては、腐骨分離による自然治癒が 1 部位、歯科担当医が腐骨除去した結果治癒したものが 2 部位、本院形成外科へ処置を依頼したものが 1 部位、他病院へ処置を依頼したものが 1 部位、死亡したものが 1 部位、現在も経過観察中のものが 4 部位となっている。全症例数はまだ少ないものの、外科的歯科処置を実施していないにもかかわらず顎骨壊死を発症した症例数が、抜歯後に顎骨壊死を発症した症例数を上回っていることから、BP 製剤投与患者では外科的歯科処置の実施の有無にかかわらず、定期的に歯科を受診して、顎骨を被覆する歯肉粘膜部の慎重なチェックを受けることが望ましいと思われる。

【結 論】

BP 製剤投与患者では、外科的歯科処置を実施していない場合でも、顎骨壊死を発症する可能性が少なからずあることが示唆された。

メンテナンスに関する研究
—福島第一原子力発電所爆発事故が幼若永久歯におよぼした影響について—

医療法人社団馨会
○山田 満憲

**A study on Maintenance
Influence of the Fukushima Daiichi Nuclear Accident on Immature Permanent Teeth (Part 3)**
Homare-kai Medical Corporation
○YAMADA Mitsunori

【研究目的】医療法人社団馨会は、東日本大震災および福島第一原子力発電所爆発事故直後の生活環境を調査し、これらが幼若永久歯におよぼした影響について第135回日本歯科保存学会および第65回東北地区歯科医学会にて報告した。とくに、原発事故により飛散した放射性物質の全身への影響については、当初より地元医科大学を中心としたさまざまな対応がなされてきた。しかし、カルシウムと極めて同じ挙動を示すストロンチウムの土壌汚染状況が文部科学省より発表され、その危険性について指摘されているものの口腔領域における対応はなされていない。そこで今回当法人は、原発事故により飛散した放射性物質による被ばくの実態について調査したので、その概要を報告する。

【方法】本調査は、原発事故後2年±1ヶ月の間にう蝕および歯周病予防を目的にメンテナンスで来院し、また地元医科大学を中心として策定された一次甲状腺検査実施概要に準じた震災時18歳以下の全員を対象とした。さらに、対象者にはヘルシンキ宣言に基づき本調査の主旨説明を含むインフォームドコンセントを行った。放射線の測定は、シリコン半導体フォトダイオードを検出部とした放射線測定器を用いて1cm線量当量率($\mu\text{Sv/h}$ 、以下、線量)を測定した。口腔内放射線量は、被験者の口腔内で線量計検出部(以下、プローブ)を上顎または下顎歯列方向に向けて測定した線量から診療室内の線量(以下、空間線量)を差し引いた値とした。

【結果および考察】2013年2月の空間線量は $0.09 \pm 0.04 \mu\text{Sv/h}$ であった。対象となるメンテナンス受診者数は52人で、その内33%が口腔内放射線量は $0.00 \mu\text{Sv/h}$ より大きな値を示した。これら被験者の口腔内でプローブを上顎方向に向けて測定した口腔内平均線量(以下、上顎平均線量)は、 $0.026 \pm 0.021 \mu\text{Sv/h}$ で、プローブを下顎方向に向けて測定した口腔内平均線量(以下、下顎平均線量)は、 $0.022 \pm 0.014 \mu\text{Sv/h}$ であった。また口腔内放射線量の最大値は、年換算で 0.61mSv であった。2013年3月の空間線量は $0.09 \pm 0.04 \mu\text{Sv/h}$ であった。対象となるメンテナンス受診者数は58人で、その内26%が口腔内放射線量は $0.00 \mu\text{Sv/h}$ より大きな値を示した。これら被験者の上顎平均線量は、 $0.028 \pm 0.022 \mu\text{Sv/h}$ で、下顎平均線量は、 $0.026 \pm 0.012 \mu\text{Sv/h}$ であった。また口腔内放射線量の最大値は、年換算で 0.61mSv であった。2013年4月の空間線量は $0.09 \pm 0.04 \mu\text{Sv/h}$ であった。対象となるメンテナンス受診者数は60人で、その内28%が口腔内放射線量は $0.00 \mu\text{Sv/h}$ より大きな値を示した。これら被験者の上顎平均線量は、 $0.038 \pm 0.029 \mu\text{Sv/h}$ で、下顎平均線量は、 $0.033 \pm 0.025 \mu\text{Sv/h}$ であった。また口腔内放射線量の最大値は、年換算で 0.88mSv であった。また、各月において口腔内放射線量が $0.00 \mu\text{Sv/h}$ より大きな値を示した被験者であっても、これらすべての期間を通して $0.00 \mu\text{Sv/h}$ より大きな値を測定されるものはいなかった。すなわち、口腔内軟組織および硬組織への放射性物質取り込みによる内部被ばくの可能性は低いものの、経口摂取した地場の食品に含まれていた放射性物質が、一時的に口腔内に残留していた可能性が考えられた。また、これらの口腔内平均線量から残留していた放射性物質量を換算(Cs-137)すると 20Bq 程度と考えられホールボディカウンターの検出限界値を下回っていた。そのため、低線量被ばく環境において口腔内の放射線量を測ることは、人体内の放射性物質の残留および内部被ばくの度合いを相対的ではあるが把握できる有効な手段であると考えられた。

【結論】現時点における内部被ばくの可能性は低いものの、放射性物質による口腔内の汚染レベルの時間的変化を把握することは、将来の予測にも有効であることが示唆された。今後、特にストロンチウムは、幼若永久歯の高度な石灰化あるいは再石灰化の際に必要とされるカルシウムに代わって取り込まれる可能性が考えられるため継続的モニタリングが必要であると考えられた。

測定面積が分光光度計(クリスタルアイ CE100-DC/JP)の測色値に及ぼす影響

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 小児歯科学¹, 口腔インプラント学², 長崎大学病院冠補綴治療室³
○ 細矢由美子¹, 生駒玲奈², 田上直美³

Influence of the area to the values measured by a spectrophotometer (Crystaleye CE100-DC/JP)

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Medical and Dental Sciences, Dept of Pediatric Dentistry¹ and Applied Prosthodontics², Nagasaki University Hospital, Fixed Prosthodontics³
○ Yumiko Hosoya¹, Reina Ikoma², Naomi Tanoue³

[研究目的]: 目視による色の見えは同一物体であっても面積により異なり, 測色器械を用いた場合では, 光源の種類や照度, 受光部の面積により影響される事が報告されている。今回は, shade matching を主たる目的として開発された 7 band LED スペクトル方式分光光度計 (クリスタルアイ CE100-DC/JP; オリンパス) を用い, 測定面積が測色値に及ぼす影響の観察を, Beautifil II (松風) で作成したレジン試料と上顎中切歯唇面に対して行った。

[材料および方法]: 1 辺が 3mm, 1mm, 0.5mm の正方形による 3 種類の測定面積 (3mm 群, 1mm 群, 0.5mm 群) の場合について, 測色値を比較した。

<レジン試料の測定>: #3000 のエメリーペーパーで最終研磨を行った厚さ 2mm の Beautifil II (シェード: A2, A20, Inc) レジン試料をトリミングし, 顎模型 (500H 1-M; ニッシン) の上顎右側中切歯部と差し替え固定して測色した。左側中切歯唇面にスケールを貼付し, 測色面積の設定に用いた。測色は暗室箱 (クリスタルアイチェックボックス CE 100-MK) 中で 10 カ所に対して面積を変えて行った。

<天然歯の測定>: 26Y6M~48Y5Y (平均年齢: 25Y10M) の女性 4 名の上顎右側中切歯唇面をレジン試料と同様に, 10 カ所について面積を変えて測色した。

<色の比較>: クリスタルアイ解析ソフトウェア (クリスタルアイアプリケーションマスター Ver. 1.4.0.0.; オリンパス) を用いてレジン試料と天然歯の色彩を ISO L*a*b* 表色系で求め, 測定面積の異なる 3 群間の色差 (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^*ab) を算出した。レジン試料については, 測定部の直径が 7mm で CIE diffuse/8° 方式の分光測色計 (CM-3600d; コニカミノルタ) で D65 光源 2 度視野にて測色した値と比較した。

[成績ならびに考察]: <レジン試料>: 1). 各シェードに対する 3 群間の ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^*ab は, 以下のとおりであり, すべてのシェードに対し, 3 群間の ΔE^*ab は, 3mm vs 0.5mm の場合が最大であった。A2: 3mm vs 1mm (0.06, -0.05, -0.03, 0.08), 3mm vs 0.5mm (0.16, -0.11, -0.12, 0.23), 1mm vs 0.5mm (0.10, -0.06, -0.09, 0.15). A20: 3mm vs 1mm (0.71, 0.10, -0.16, 0.74), 3mm vs 0.5mm (-0.10, -0.13, -0.07, 1.01), 1mm vs 0.5mm (0.29, 0.03, 0.23, 0.77). Inc: 3mm vs 1mm (1.04, -0.42, -0.08, 1.12), 3mm vs 0.5mm (-1.19, 0.56, -0.03, 1.31), 1mm vs 0.5mm (0.15, -0.14, 0.12, 0.24). 2). すべてのシェードで L^* は 3mm > 1mm > 0.5mm の順に大きかった。 a^* は, Inc のシェードは 0.5mm > 1mm > 3mm の順で差がみられたが, 他のシェードの a^* とすべてのシェードの b^* は, 測定面積別の 3 群間の差がごくわずかであった。 3). $L^*a^*b^*$ 値をクリスタルアイと CM-3600d 間で比較すると, a^* と b^* はいずれの器械で測色した場合も A20 > A2 > Inc の順であり, クリスタルアイの測色値のほうが高く, 特に Inc のシェードは, 両器械間の測色値の差が大きかった。一般に歯冠色レジンの色彩に最も大きく影響する L^* は, CM-3600d で測色の場合は A20 > A2 > Inc であったのに対し, クリスタルアイで測色すると A20 > A2 \leq or \geq Inc であった。従来型の分光測色計である CM-3600d と比べ, クリスタルアイの明度と色味の検出に関わる測色精度は低い可能性が示唆された。

<天然歯>: 4 名の健全上顎中切歯に対する 3 群間の ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔE^*ab は, 以下の範囲の色差を示した。3mm vs 1mm (0.33 ~ 0.75, -0.18 ~ -0.66, -0.16 ~ -0.68, 0.53 ~ 1.01), 3mm vs 0.5mm (0.04 ~ -1.10, 0.33 ~ 0.52, 0.10 ~ 0.82, 0.67 ~ 1.15), 1mm vs 0.5mm (-0.40 ~ 0.64, -0.15 ~ 0.20, -0.19 ~ 0.10, 0.12 ~ 0.66)。4 名中の 3 名は, 3mm vs 0.5mm の ΔE^*ab が最大であったが, 1 名は, 3mm vs 1mm の ΔE^*ab が最大であった。比較的平面に近い唇面歯冠中央部のみならず, 切端部や歯頸部並びに隣接面に近い部分も含めた唇面全体を測色した為, 部位によっては正反射光を受光できていなかったなどの理由により, 計測誤差が生じた可能性が考えられる。

[結論]: 今回用いた 3 種類の測定面積間におけるクリスタルアイで測色時の色差は, 肉眼で感知できるレベル以下の値であったが, クリスタルアイで測定時の明度や色味の精度に関しては, さらなる詳細な観察が必要である。

[文献]: Yumiko Hosoya *et al*: J Oral Sci 52(4): 599-607, 2010.

新規コンポジットレジンの色調適合性

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

○飯野正義¹, 寺井里沙¹, 横川未穂¹, 小倉由佳里¹,
川本 諒¹, 黒川弘康^{1,2}, 安藤 進^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}

Evaluation of the color match of experimental resin composite

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

○Iino Masayoshi¹, Terai Risa¹, YOKOKAWA Miho¹, OGURA Yukari¹,
KAWAMOTO Ryo¹, KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, ANDO Susumu^{1,2} and MIYAZAKI Masashi^{1,2}

【緒言】

光重合型レジンをを用いたレイヤリングテクニックは優れた審美性を獲得することが可能な術式であり、これに対応するため、各メーカーからエナメルおよびボディシェードなど、色調あるいは透明性の異なる数種類のペーストで構成されたシステムが市販されている。一方、多くのレジペーストが準備されることは、歯科医師にとってどのペーストを選択すれば良いか判断に窮する場合も多く、これらの光重合型レジペーストが扱いにくい材料であるような印象を与える原因となっているのも事実である。このような背景のもと、レジペーストの光学的特性を改良することで、少ない色調構成でありながら、単色あるいは2層の積層充填で、多くの症例の色調回復を目的としたコンポジットレジペーストが開発された。今回、光線透過性および色調の異なるセラミックブロックに規格窩洞を形成、レジペーストを充填した際の、レジペーストと窩洞周囲のセラミックブロックとの色調適合性について評価を行った。

【材料および方法】

コンポジットレジペーストとして、エステライトアステリア (トクヤマデンタル) を、セラミックブロックとして IPS Empress CAD (Ivoclar Vivadent) を用いた。

1. 測定用試片の作製

- (1) 単一充填試片: 低透明性セラミックブロック中央部に直径6 mmの規格窩洞を形成した後、3.5あるいは2.5 mmの厚さとなるようスライスした。この深さの異なる規格窩洞にレジペーストを充填、加圧成形した後、30秒間照射した。セラミックブロックとレジペーストの組合せは、7色のセラミックブロック (シェードA1, A2, A3, A3.5およびB1, B2およびB3) に対し、ボディシェードのレジペースト (A1B, A2B, A3B, A3.5B, A4BおよびB3B) をそれぞれ充填し、42通りの組み合わせとした。これらの試片を37°C精製水中に24時間保管した後、SiCペーパーの# 2,000を用いて照射面から0.5 mm研磨し、深さ2および3 mmの単一充填試片を作製した。
- (2) 積層充填試片: 高透明性セラミックブロック中央部に直径6 mmの規格窩洞を形成した後、1 mmの厚さとなるようスライスし、レジペーストを充填した。セラミックブロックとレジペーストの組合せは、単一充填試片と同様、7色のセラミックブロックに対し、6色のボディシェードのレジペーストをそれぞれ充填するとともに、エナメルシェードのレジペースト (シェードNE) を充填し、合計49通りの組み合わせとした。これらの試片を37°C精製水中に24時間保管した後、SiCペーパーの# 2,000を用いて照射面から0.5 mm研磨し、厚さ0.5 mmの積層充填試片を作製した。なお、色調測定に際しては、ボディシェードのレジペーストを充填した試片上に、エナメルシェードのレジペーストを充填した試片を重ねることで色調適合性の評価を行った。

2. 色調適合性の評価

色調の測定にはクリスタルアイ (CE100-DC/JP, オリンパス) を用いた。すなわち、セラミックブロック全面をシェードマッピングすることでレジペーストと窩洞周囲のセラミックブロックの色調を確認するとともに、L*, a*, b*値およびΔE値を測定した。なお、色調の測定に際して、その背景色としては、単一充填試片の場合、黒色基準版および試片と同色のセラミックブロックを、積層充填試片では黒色基準版を用いて行った。

【成績および考察】

単一および積層充填とともに、背景色および窩洞の深さによって影響を受けるものの、レジペーストと明度の異なるセラミックブロックにおいても比較的良好的な色調適合性を示した。これは、入射光線のレジペースト内部での反射および吸収などの光学的特性が最適化されたためと考えられた。

【結論】

新規コンポジットレジペーストは単一および積層充填とともに、比較的広範囲な色調適合性を示すことから、簡便かつ審美的な修復処置を行うことが可能であり、その有用性が示された。

エナメル質が歯の色調に及ぼす影響

¹東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野

²東京医科歯科大学 歯学教育開発学分野

³歯と骨のGCOE

○小黒玲奈¹, 關奈央子², サダルアリレザ¹, 中島正俊¹, 田上順次^{1,3}

The Role of Enamel Color, Thickness and Refractive Index on Tooth Shade

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

²Tokyo Medical and Dental University Dental Education Development Section

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

○Rena OGURO¹, Naoko SEKI², ALIREZA Sadr¹, Masatoshi NAKAJIMA¹, Junji TAGAMI^{1,3}

【緒言】

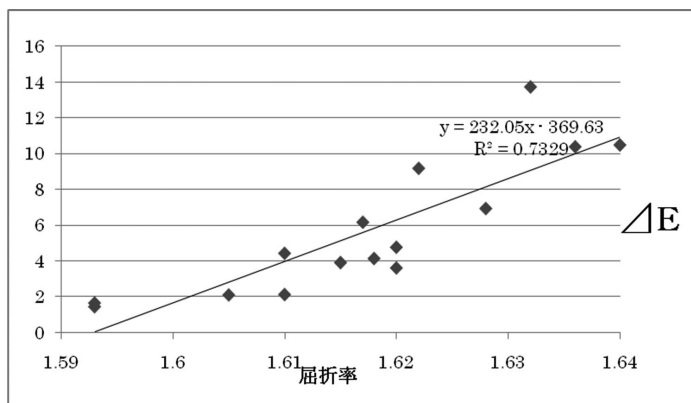
光重合型コンポジットレジン修復における課題の一つとして、天然歯との色調適合性がある。今日まで歯の色調には象牙質が大きな影響を及ぼしていると考えられており、半透明性のエナメル質が歯の色調に与える影響については評価の対象になることが少なく、実際にヒト歯牙を用いてエナメル質が歯の色調に及ぼす影響を評価した報告は少ないのが現状である。そこで、ヒト抜去歯牙を用いてエナメル質の厚みや屈折率の違いによる色調の変化挙動について検討を行った。

【材料および方法】

新鮮抜去ヒト上顎中切歯 (A2:2本, A3:2本, A3.5:3本, A4:2本, B3:2本, B4:1本, C1:1本, C2:1本, C3:1本) 15本を用い、頬側歯冠部中央1.0×1.0mmの範囲を、分光測色器 (Crystal eye : Olympus) にて測色し、CIE L*a*b*値を算出した。その後、測定箇所のエナメル質を約0.5mmずつ削除し、象牙質が露出するまで測色を繰り返して行い、エナメル質削除前後の色差 ΔE を算出した。

さらに、上記抜去歯の歯冠部よりエナメル質板状試片 (1.0mm×4.0mm, 厚さ0.5mm) を作成し、エナメル質試片の測色を黒色板と白色板上にてCrystal eyeを用いて行った。また、波長走査型光干渉断層計 (Swept source optical coherence Tomography, SS-OCT : Santec) を用いて、それぞれのエナメル質試片の屈折率を測定した。得られた結果について、重回帰分析を用いて ΔE (エナメル質削除前後) とエナメル質試片の屈折率、L*, a*, b*値および抜去歯のエナメル質の厚さの相関性について統計学的分析を行った。

【結果および考察】



エナメル質の厚みが薄くなるに従い歯の色調は変化したが、その色調変化は $\Delta E=1.4\sim 13.74$ と歯牙によって様々であった。

ΔE とエナメル質試片の L*, a*, b*値およびエナメル質の厚さの間に相関は認められなかった ($p>0.05$)。一方で、 ΔE とエナメル質試片の屈折率の間に相関が認められた ($p<0.05$)。

【結論】

エナメル質はヒト歯牙の色調に影響を及ぼしており、エナメル質の色調や厚さよりもエナメル質の屈折率が大きな影響を及ぼしていることが示唆された。

カリオテスターによる初期エナメル質う蝕のヌープ硬さ測定

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座
○清水明彦

Cariotester can Determine the Knoop Hardness of Incipient Carious Lesions

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine

○SHIMIZU Akihiko

【緒言】

エナメル質の初期う蝕は、一般に視診で白斑として判定され評価されている。しかし、この術者の肉眼による主観的な方法だけでは、白斑病変の軟化程度(脱灰程度)を的確に評価することは、ほとんど不可能であろう。

そこで今回、臨床でう蝕象牙質の硬さが測定できるカリオテスター(三栄エムイー社)を使用して、エナメル質白斑病変のヌープ硬さを求めることを目的に、基礎的実験を行った。

【材料と方法】

咬合面エナメル質に白斑病変を有するヒト抜去大白歯を、咬頭側からすり減らし、白斑病変を露出させ、最終的に#1500の耐水研磨紙で研磨した。カリオテスターには、エナメル質用の圧子(円錐角50度、先端曲率半径10 μ m)を装着した。実体顕微鏡下(倍率20倍)で、白斑部に直径0.7mm程度の小範囲を規定した。この小範囲内の異なる5ヵ所に、カリオテスター圧子を測定荷重150gfで押し付け、押し込み深さ(μ m)を測定し、その平均値を求めた。

次に、微小硬度計(明石製作所)を用いて、同じ小範囲内の5ヵ所のヌープ硬さ(KHN)を測定し、その平均値を求めた。同様に、別の小範囲を規定し、カリオテスターで押し込み深さを、微小硬度計でヌープ硬さを測定した。このようにして、全部で19ヵ所の白斑部と3箇所の健全部について、カリオテスターの押し込み深さと、微小硬度計のヌープ硬さをペアで求め、両者の関係をグラフにプロットし累乗近似曲線(校正曲線)を求めた。

【結果】

得られたグラフから、カリオテスターの押し込み深さとヌープ硬さの関係を求めたものが、右の表である。

表 カリオテスターの押し込み深さ(x μ m)とヌープ硬さ(KHN)の関係
($KHN=6839 x^{-1.409}$ $R^2=0.988$)

【考察】

従来、臨床でエナメル質白斑病変の硬さを測定することは不可能であった。しかし、カリオテスターを使用し、圧子の押し込み深さを測定すれば、白斑病変のヌープ硬さを知ることができる。

従って、臨床でカリオテスターを用いれば、白斑病変を、硬さというパラメーターでモニターリングすることができるので、その白斑病変が、進行、停止、回復(再石灰化)のいずれの状態にあるかを、客観的に判定することができるであろう。

カリオテスター値(μ m)	硬さ(KHN)
10	267
15	151
20	100
25	73
30	57
40	38
50	28

【まとめ】

エナメル質の白斑病変の硬さを、カリオテスターと微小硬度計で測定し、カリオテスター圧子の押し込み深さ(μ m)をヌープ硬さ(KHN)に換算する校正曲線を、実験的に求めることができた。

従って、臨床の場でカリオテスターを用いれば、エナメル質の硬さの変化を指標として、初期エナメル質う蝕に対する治療効果を、客観的に評価することが可能となるであろう。

酸蝕歯モデルを用いたエナメル質に対する歯ブラシ摩耗の影響 ～各種歯磨剤の比較～

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座う蝕制御学分野

○中村真理愛¹, 北迫勇一¹, 中嶋省志¹, 田上順次¹

Effects of toothbrushing on abrasion of eroded bovine enamel in vitro – comparison of different dentifrices –

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

○Maria Nakamura¹, Yuichi Kitasako¹, Syozi Nakashima¹, Junji Tagami¹

[研究目的]

Tooth Wear と称されるう蝕原因菌が関与しない歯質表面の損失には、咬耗・摩耗・アブラクション・酸蝕が属する。エナメル質酸蝕後のブラッシングによる摩耗の影響は報告が少なく、また歯磨剤の違いによる比較検討は行われていない。そこで本研究では、酸蝕歯および健全歯モデルを用い、各種歯磨剤のエナメル質に及ぼす歯ブラシ摩耗の影響について比較検討することを目的とした。

[材料および方法]

市販歯磨剤より 4 メーカー各 1 種の歯磨剤を選定した。牛歯からエナメル質試料を切り出し包埋後、鏡面研磨を施した。それを 4 分割し 1 試料とし (10mm x 8mm x 5mm), 測定基準面をマニキュアにて保護した。試料をコココーラ (pH2.2) に 90 秒浸漬し, Milli-Q 水で 10 秒洗浄後, ストローク幅 5mm, 荷重 250gf の条件下で 1 分間歯ブラシ摩耗 (歯ブラシ摩耗試験機: K236, 東京技研社製, 歯ブラシ: PROSPEC YOUNG, Medium, GC) を行った。そして再び Milli-Q 水で 10 秒洗浄した後, 人工唾液に 2 時間浸潤した。全ての歯磨剤において, この過程を 3 サイクル繰り返した (健全歯モデルではコーラ浸漬およびその後の Milli-Q 水洗浄過程を除外)。歯ブラシ摩耗後, 白色干渉計 (NanoMap-D, AEP Technology 社製) を用いて表面形状を測定し, 基準面と摩耗面との平均段差を求めた (図 1)。得られた結果は 2way-ANOVA&t-test with Bonferroni correction および t-test を用いて統計学的に検討した (有意水準 5%)。

[結果および考察]

健全歯モデルでは, 歯磨剤 A のみで歯ブラシ摩耗を認めた。酸蝕歯モデルでは, 歯磨剤 A と他の全ての歯磨剤の間に有意差が認められた ($p < 0.05$) (図 2)。また, 歯磨剤 A の健全歯モデルと酸蝕歯モデルとの間に有意差が認められた ($p < 0.05$)。今回, 表面形状測定において「白色干渉計」を用いナノレベルでの評価を行ったことで, 健全歯モデルにおける歯ブラシ摩耗が検知できたと考えられる。また, 歯ブラシ摩耗に違いが生じた要因として, 各歯磨剤の pH 値, 滴定酸度, Ca イオン濃度, 研磨剤等が挙げられる。今後, 各要因の歯ブラシ摩耗に及ぼす影響について比較検討を加える必要がある。

[結論]

酸蝕歯モデルは健全歯モデルと比較して歯ブラシ摩耗量が有意に増加し, 歯磨剤 A は両モデルにおいて他の歯磨剤と比較して歯ブラシ摩耗量が有意に大きかった。

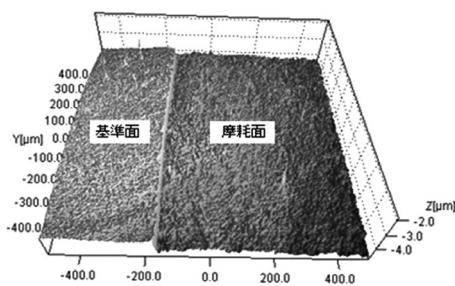


図1: 表面分析イメージ像

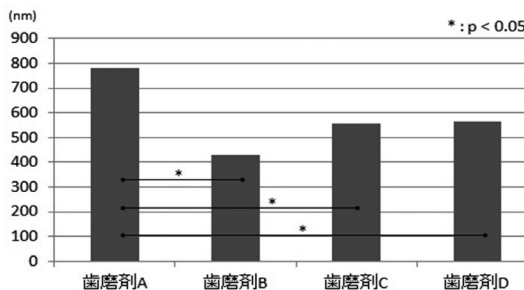


図2: 各歯磨剤の平均段差

成人を対象とした Tooth Wear に関する調査

(第一報) 歯種歯面別罹患率ならびに酸蝕関連因子
東京医科歯科大学大学院 歯制御学分野

○北迫勇一¹、佐々木好幸¹、高垣智博¹、田上順次¹

Epidemiological study on Tooth Wear for adult population

Part 1: Disease rate among locations and surfaces and related factors of dental erosion

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

○Yuichi Kitasako¹, Yoshiyuki Sasaki¹, Tomohiro Takagaki¹, Junji Tagami¹

【研究目的】

Tooth Wear は、咬耗、摩耗、アブフラクション、酸蝕が含まれる歯の疾患であり、欧米諸国では広く認知されている。しかしながら、わが国では疫学調査データが存在せず、その実態は把握されていない。そこで、成人および高齢者を対象に、Tooth Wear に関する疫学調査を実施したので報告する。

【材料と方法】

本研究趣旨に同意が得られた被験者 826 名（平均年齢 48.3 歳、男性 397 名、女性 429 名、学内倫理審査承認番号第 676 号）に対して、食生活習慣および口腔衛生状況に関するアンケート調査（全身疾患の有無を含む）を行い、その後口腔内診査を実施した。即ち、エナメル質・象牙質の両者が同時に評価出来る様に、Smith & Knight 法（1985）に準拠した Tooth Wear 評価項目を設定し、全顎的に歯頸部・唇側（頬側面）・切縁（咬合面）・舌側（口蓋側）におけるエナメル質および象牙質の損失（損耗）変化について、視診にて 7 段階（エナメル質 4 段階・象牙質 3 段階）のスコア付けを行った（各歯面の一番深い場所を代表所見とする）。また、くさび状欠損、処置歯面、エナメル質白濁についても別途評価を行った。なお、酸蝕歯を認められた場合には、食生活習慣に関する口腔衛生指導を行った。

【結果および考察】

歯種別の比較検討では、下顎前歯部で最も顕著な変化を認めた（図 1）。また、歯面別の比較検討では、切縁・咬合面において象牙質に達する変化を比較的多く認めた（図 2）。一方、歯頸部では、喪失または処置済みのため評価出来ない場合が多く認め、この主たる原因として矯正便宜抜去やくさび状欠損への充填処置が考えられたほか、くさび状欠損は 50 代まで経年的に増加する傾向を認めた。なお、酸蝕は、4-5 人に 1 人の割合（22.3%）で認められ（エナメル質段階 17.7%・象牙質段階 4.5%）、その関連食品として柑橘系果実・炭酸飲料・お酢系飲料が挙げられたほか、3.5%で逆流性食道炎を認めた。

【結論】

本疫学調査を通じて、口腔内調査および生活習慣調査の両面から体系的に Tooth Wear をとらえ、さらに他の全身疾患に関して同時に調査することで、医歯学双方の生活習慣病に通じる疫学データが集積された。

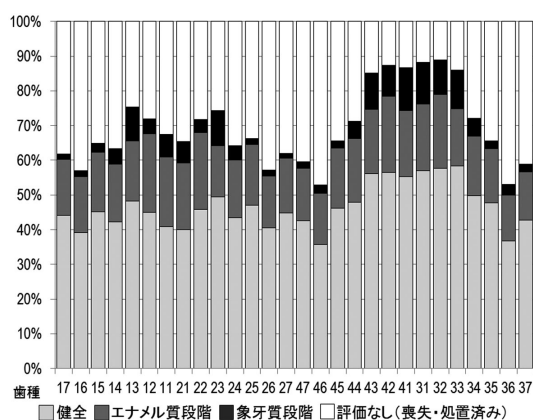


図 1

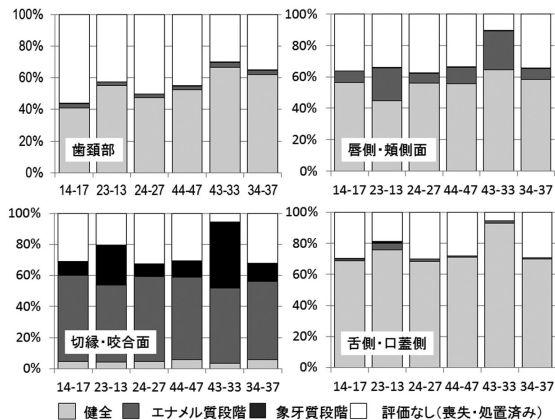


図 2

S-PRG フィラー含有ペーストによるエナメル質脱灰抑制効果 -マイクロ CT による評価-

¹東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯蝕制御学分野

²東京医科歯科大学 歯と骨の GCOE 拠点

○中村圭喜¹, 半場秀典¹, 住谷雄大¹, 二階堂徹¹, 田上順次^{1,2}

Inhibition of Enamel Demineralization by Paste Containing S-PRG Filler – A Micro-CT Study

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

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

○NAKAMURA Keiki¹, HAMBA Hidenori¹, SUMITANI Yuta¹, NIKAIDO Toru¹, TAGAMI Junji^{1,2}

【研究目的】

プラークコントロール良好な口腔内においてはエナメル質表面で脱灰と再石灰化の平衡が保たれている。しかし、口腔内環境が変化して平衡が一旦崩壊すると、エナメル質中のミネラル喪失を引き起こし、脱灰病変を作り出す。初期脱灰を抑制するためには耐酸性を高め、歯質強化を行うことが課題となる。Surface reaction type pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラーは、多機能性ガラスコアにガラスアイオノマー相を形成させる技術で作られたフィラーであり、フッ化物イオン、ストロンチウムイオンなどの 6 種類のイオンを徐放すると報告されている。本研究の目的は、S-PRG 含有試作ペーストによるエナメル質脱灰抑制効果について高解像度マイクロ CT 装置を用いて検討することである。

【材料および方法】

抜歯後凍結保存したウシ下顎切歯の唇側表面を精密低速切断機 (Isomet, Buehler) にて 3×3×2 mm のエナメル-象牙質ブロックを切り出し、エナメル質が一面に露出するようにエポキシ樹脂に包埋した。エナメル質表面は耐水研磨紙を用いて #2000 まで研削し、エナメル質表面にネイルバーニッシュにて 2×2 mm の処理面を規定した。試料側面にマイクロ CT 観察時の基準孔を作製した後、試料を 7 群に分けた。すなわち試作 S-PRG フィラー含有ペースト群 (0, 1, 5, 10, 30wt% の S-PRG フィラーを含有、以下 S0, S1, S5, S10, S30 群) (松風)、コントロールとして Milli-Q 水 (以下 DW 群) および NaF 含有の歯面研磨剤 (メルサージュプラス、以下 ME 群、松風) を用いた。各種ペーストはペースト : 水 = 1:2 の重量比で調製し、ペースト溶液を作製した。試料は各ペースト溶液中の浸漬を 1 日 5 分間 2 回、計 4 日間歯面を処理した。その後、試料表面を歯面処理後に水洗し、歯面処理期間以外は Milli-Q 水中 (37°C) に保管した。4 日間の歯面処理後、人工脱灰液 (2.2 mM Ca, 2.2 mM P, 50 mM buffer (acetic acid), pH 4.5, 37 °C) に 72 時間浸漬した。脱灰前と脱灰後の試料を高解像度マイクロ CT 装置 (SMX-100CT, 島津製作所) にて撮影した。エナメル質表面の 3D 解析には、3D 骨梁構造計測ソフト (TRI/3DBON, RATOC) を用い、得られた CT スケール値は基準濃度のハイドロキシアパタイト体を用いて、ミネラル密度値に変換し、表層から深さ方向へのミネラル密度プロファイルを算出した。得られた脱灰前後の 3D 画像からミネラル喪失量を算出した。

【結果および考察】

ミネラル喪失量の結果から、顕著に脱灰した群は DW 群および S0 群であり、次に S1 群、ME 群であった。S5, S10, S30 の各群では DW, S0 群と比べて有意にミネラル喪失量が減少した。S5, S10, S30 群間では有意差は認められなかった。S-PRG フィラーが 5wt% 以上含有するペーストにおいては、DW, S0, ME 群よりも高い脱灰抑制効果を示し、これは S-PRG フィラーから徐放されたイオンの効果と考えられる。一方、ME 群は DW, S0 よりも脱灰抑制の傾向を示し、この効果は含有成分である NaF の効果と考えられる。

【結論】

マイクロ CT によるミネラル密度プロファイル解析の結果、S-PRG フィラー含有ペーストは、エナメル質の脱灰抑制効果を示すことが明らかとなった。

SS-OCT による乳歯咬合面う蝕診断の評価

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 小児歯科学分野、

²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 う蝕制御学分野、

³国立長寿医療センター先端医療部口腔機能再建科

○中島 幸恵¹、島田 康史²、サダルアリレザ²、宮新 美智世¹、田上 順次²、角 保徳³

Cross-sectional assessment of occlusal caries in primary teeth using SS-OCT

¹Pediatric Dentistry, Tokyo Medical & Dental University

²Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical & Dental University,

³National Center for Geriatrics and Gerontology

○Yukie NAKAJIMA, Yasushi SHIMADA, Alireza SADR, Michiyo MIYASHIN, Junji TAGAMI, Yasunori SUMI

【研究目的】

現在う蝕の診断には、視診、触診に加えて、X線写真で確認してから確定診断が行われている。しかし初期う蝕は、X線写真など従来の診断法だけでは発見が難しい。特に小児は発育途上であり、放射線感受性が成人と比較して高いことから、X線に代わるより安全な装置での診断が望まれる。Optical Coherence Tomography(OCT)は、生体に無害な近赤外線を用いた断層画像撮像機器であり、電離放射線による被曝を伴わず、リアルタイムで何度でも撮影できるため、小児には特に適していると考えられる。そこで、本研究では画像解像度ならびに深度に優れた波長走査型 OCT (SS-OCT) を用いて、乳歯咬合面う蝕の検出を行い、OCT 画像の有効性を検討した。

【材料および方法】

咬合面裂溝に着色または C1 から C2 程度のう蝕を有する、26 本のヒト抜去乳臼歯を用いて、健全部を含めた 38 の裂溝部を選択し、実験に使用した。OCT 診断経験を持つ歯科医師 6 名が着色またはう蝕裂溝部に対し、視診により、(スコア 0) う蝕なし、(スコア 1) エナメル質に限局したう蝕で、エナメル質の実質欠損を伴わない(表層下) 脱灰、(スコア 2) エナメル質に限局し、エナメル質の実質欠損を伴うう蝕、(スコア 3) 象牙質にまで及ぶう蝕、の 4 段階評価を行った。次に同部位に対し、SS-OCT (Prototype 2、パナソニックヘルスケア) による断層画像診断を行い、視診と同様、4 段階評価した後、ダイヤモンドブレードにて半切、研磨後、走査型レーザー顕微鏡(CLSM)にて観察した。エナメル質脱灰病変(カットオフ値 0-1)、エナメル質う蝕(カットオフ値 1-2)、象牙質う蝕(カットオフ値 2-3)につき、視診と SS-OCT の感度、特異度、Az 値(ROC 曲線)を求め、有意水準 5%で統計処理を行った。

【結果】

結果を下表に示す。SS-OCT を用いた乳歯小窩裂溝におけるう蝕の検出は、散乱した光の輝度変換によって得られ、全てのう蝕診断において、SS-OCT は視診に比べて感度、Az 値とも有意に高かった。特異度に関しては、視診と SS-OCT で有意差は認められなかった。

	感度		特異度		Az 値	
	視診	SS-OCT	視診	SS-OCT	視診	SS-OCT
エナメル質脱灰	0.70	0.93	0.88	0.93	0.79	0.93
エナメル質う蝕	0.49	0.89	0.92	0.83	0.70	0.86
象牙質う蝕	0.36	0.75	0.99	0.91	0.68	0.83

【考察】

OCT 画像における輝度の上昇は、脱灰により微小な欠陥が生じ、エナメル質と空隙という、屈折率の異なる媒体に光が散乱し、その変化を捉えたものと考えられる。裂溝部の崩壊は少なく中で広がっている hidden caries においても、視診では検出が難しかったが、SS-OCT では有意に感度が高かった。OCT は断層画像をチェアーサイドで何度でも撮影することが可能であり、乳歯においても SS-OCT は有効な診断手段であることが示唆された。

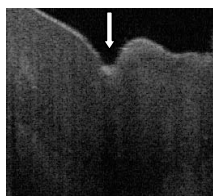


図 1: エナメル質脱灰を示す SS-OCT 画像

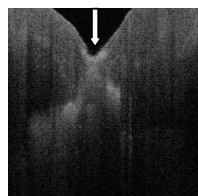


図 2: hidden caries を示す SS-OCT 画像

SS-OCT による咬合面裂溝ならびに予防填塞材の断層画像評価

¹⁾東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児歯科学分野,
²⁾東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科う蝕制御学分野,³⁾国立長寿医療研究センター病院
○伊藤幸子¹, 島田康史², サダルアリレザ², 中島幸恵¹, 高木裕三¹, 田上順次², 角保徳³

Cross-sectional observation of occlusal fissure and fissure sealant using SS-OCT

¹⁾Pediatric Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, ²⁾Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, ³⁾National Center for Geriatrics and Gerontology
○Sachiko Ito¹, Shimada Yasushi², Sadr Alireza², Yukie Nakajima¹,
Yuzo Takagi¹, Tagami Junji², Sumi Yasunori³

【諸言】 幼若永久歯はう蝕感受性が高く、特に小窩裂溝はう蝕好発部位である。小窩裂溝予防填塞（フィッシャーシーラント）は、この小窩裂溝を予防填塞材で封鎖し、う蝕の抑制を図るものであり、高いう蝕抑制効果が報告されている。一方、予防填塞の適応歯か否かは術者の視診や触診に主に委ねられており、客観的評価が求められている。また、予防填塞の予後を左右する因子として、予防填塞材と歯面との接着が挙げられ、小窩裂溝部への予防填塞材の浸透性が重要と考えられる。本研究では、小窩裂溝の観察ならびに予防填塞材の浸透性の評価における SS-OCT の有用性を検討することを目的とした。

【材料及び方法】 ヒト抜去臼歯 15 本の小窩裂溝より無作為に 30 部位を検査部位として選択した。まず、3 人の検査者が視診または SS-OCT（Santec 2000[®], Santec）を用いて、裂溝の深さの評価を行った。裂溝周囲のエナメル質の厚みを 1 とし、裂溝底の位置により以下の通りに分類した。スコア 0: 裂溝底が表層にあるもの、スコア 1: エナメル質表層 1/3 にあるもの、スコア 2: エナメル質中間層 1/3 から 2/3 にあるもの、スコア 3: エナメル質内層 2/3 以上にあるもの の 4 グループに分類した。次に、裂溝に予防填塞材（ティースメイト[®]F-1 2.0、クラレノリタケデントタル）をメーカー指示通りに填塞し、填塞材の裂溝への浸透性を SS-OCT を用いて評価した。評価後、各部位を切断し研磨後、走査型レーザー顕微鏡（CLSM）により小窩裂溝形態および予防填塞材の浸透性を評価し、統計処理を行った。

【結果】 術前の裂溝の深さの評価は、SS-OCT の方が視診よりも高い感度が得られ、予防填塞材の浸透性を画像表示することができた。2/3 以上の深さの裂溝では底部付近の脱灰が多くみられ、また予防填塞材の深部への浸透が困難であった。

【考察】 SS-OCT を用いることにより、予防填塞前の小窩裂溝の断層画像を観察でき、視診と比較し予防填塞の適応歯か否かの客観的評価を行うことができることが示唆された。また、裂溝に対する予防填塞材の浸透性の断層画像も観察できるため、SS-OCT は予防填塞後の予後観察にも適していると考えられる。また、CLSM の画像より小窩裂溝が表層より 2/3 以上の深さの裂溝では予防填塞材が底部まで浸透していないことがあり、臨床において経過観察が必要と思われた。

図 1 SS-OCT 画像

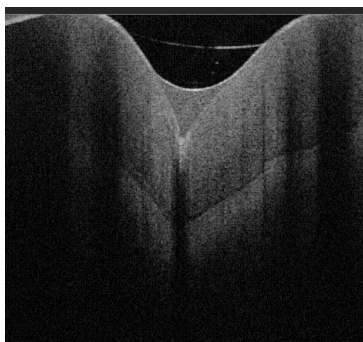


図 1: 予防填塞後の SS-OCT 画像。裂溝底部付近に輝度の上昇が見られ、エナメル質の脱灰と予防填塞材の空隙が疑われる。

図 2 CLSM 画像

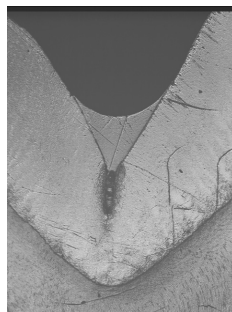


図 2: 図 1 の切断面における CLSM 画像。予防填塞材の裂溝への不十分な浸透とエナメル質の脱灰が観察される。

エナメル質再石灰化病巣における重炭酸塩の影響

－炭酸基およびリン酸基の変化－

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 う蝕制御修復学講座

○ 倉持江里香, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 菌部悠子, 椎谷 亨, 富山 潔, 向井義晴

Effect of Bicarbonate on the Remineralization of Enamel Lesion

－ Alternation of Carbonate and Phosphate groups －

Dept. of Cariology and Restorative Dentistry, Graduate School of Dentistry,
Kanagawa Dental University

○ KURAMOCHI Erika, IIZUKA Junko, HASEGAWA Haruhiko, SONOBE Yuko, SHIYA Toru,
TOMIYAMA Kiyoshi, MUKAI Yoshiharu

【研究目的】

我々は再石灰化エナメル質では健全エナメル質に比較し炭酸基が減少しリン酸基が増加することによってより純粋なハイドロキシアパタイトへの置換が生じていることを顕微ラマン分析により明らかにし、その後の耐酸性が向上することを *in vitro* 研究により報告した。一方、唾液には重炭酸塩による緩衝能が存在しており、pHの低下を抑制し脱灰抑制効果の一端を担っている。前述の研究では、再石灰化中に重炭酸塩は添加しておらず、口腔内と同様に重炭酸塩が存在する場合に再石灰化病巣中の炭酸基が減少していくか否かは確認できていない。そこで本研究では、重炭酸塩をヒト安静時唾液の濃度と同等の5 mM および刺激時唾液と同等の50 mM を添加した再石灰化液を用いて、エナメル質再石灰化病巣における炭酸基およびリン酸基の変化を顕微ラマンを用いて測定し、脱灰および再石灰化の状況を Transversal Microradiogram (TMR) にて確認した。

【材料および方法】

ウシ下顎中切歯よりエナメル質片を直径5 mmの円柱状に切り出し、平坦な面を作製、耐水研磨紙2,000番まで研磨を行い耐酸性パーニッシュにて試験面を2×3 mmに規定、脱灰液(0.1 M lactic acid, 8% methylcellulose, pH 4.6)に37℃で10日間浸漬し表層下脱灰病巣を作製した。再石灰液(1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 130 mM KCl, 20 mM HEPES, pH 7.0)は炭酸水素ナトリウムを添加することにより重炭酸塩濃度をそれぞれ5 mM, および50 mM に調整し10週間浸漬、再石灰化を行った。

実験群は、1) Sound 群: 健全エナメル質, 2) Control 群: 重炭酸塩非添加再石灰化液浸漬, 3) Rest 群: 5 mM NaHCO₃ 添加再石灰化液浸漬, 4) Stim 群: 50 mM NaHCO₃ 添加再石灰化液浸漬とし、得られた試料を顕微ラマン分析用, TMR 用に分けた。顕微ラマン分析用試料は、ワイヤー式精密切断機 (Well 3242, Walter Ebner, Germany) を用いて歯軸方向に垂直に切断し、断面を耐水研磨紙2,000番で研磨後、DWにて水洗し顕微ラマン分光光度計 (Nicolet Almega XR, Thermo Fisher scientific) を用い露光時間30秒、露光回数10回、励起波長780 nm、出力レベル10 mW、グレーティング360 lines/mm、アパーチャー50 μmにて測定を行った。測定は、1試料において深度別に表層より10 μmを表層付近、40 μmを病巣体部と規定し行った。今回は、1,070 cm⁻¹を炭酸基のピーク、960 cm⁻¹をリン酸基のピークとしてラマン強度を測定し、1,070 cm⁻¹/960 cm⁻¹比を比較検討した。TMR用試料は樹脂包埋後、薄切片としTMR撮影(PW3830, 管電圧25 kV, 管電流15 mA, 照射時間20分)を行い、分析用ソフト(TMR2000)を用いて分析した。

【結果および考察】

Control 群および Rest 群の炭酸基のラマン強度は Sound 群に比較して低く、炭酸基/リン酸基比も低下した。TMR 分析においては Control 群および Rest 群間の再石灰化量に差は無かった。この結果は、再石灰化により炭酸基が減少しリン酸基が増加するという我々の報告を再確認するものであり、安静時唾液と同レベルの重炭酸イオンが存在する環境下においても安定したリン酸化されたアパタイトとして再析出する現象が生じることが確認できた。加えて、Control 群・Rest 群の測定深度別の比較より、重炭酸塩の取り込みは、表層付近(10 μm)より病巣体部(40 μm)で強い傾向が見られた。一方、高濃度の重炭酸塩が存在する Stim 群では、有意な炭酸基の増加が確認され、TMR 分析においても Control 群・Rest 群に比較し再石灰化は抑制され、表層に析出物が観察された。

【結論】

安静時唾液中の重炭酸塩濃度を模倣した5 mM 重炭酸塩添加再石灰化液浸漬では、再石灰化エナメル質中におけるリン酸基に対する炭酸基の割合は健全エナメル質に比較して低く、また炭酸基の取り込みは、表層付近より病巣体部に強い傾向を示した。

ペプチド(P11-4)の応用がエナメル質再石灰化および脱灰抑制に及ぼす影響

日本大学歯学部保存学教室修復講座¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門²

○高橋史典¹, 佐藤愛子¹, 吉田ふみ¹, 遠藤 肇¹,
村山良介¹, 岩佐美香¹, 黒川弘康^{1,2}, 瀧川智義^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}

Effect of Application of Peptide (P11-4) on Remineralization of Enamel

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

○TAKAHASHI Fuminori¹, SATO Aiko¹, YOSHIDA Fumi¹, ENDO Hajime¹, MURAYAMA Ryosuke¹,
IWASA Mika¹, KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, TAKIGAWA Tomoyoshi^{1,2} and MIYAZAKI Masashi^{1,2}

【緒言】

カリオロジーの発展に伴う齲蝕に関する知識の蓄積と MI という概念の普及に伴って、実質欠損を伴わないエナメル質齲蝕に対して再石灰化療法を行うことが推奨されている。さらに、非侵襲的な初期エナメル質齲蝕へのアプローチとして、バイオアクティブな性質を有する材料の歯科臨床への応用が期待されている。そこで今回演者らは、ペプチド(P11-4)の塗布が歯質の脱灰抑制あるいは再石灰化に及ぼす影響について、脱灰と石灰化の動的平衡の推移について、これを非破壊的に測定することが可能な超音波透過法を用いて検討するとともに、レーザ顕微鏡および SEM 観察を行うことによって考察資料とした。

【材料および方法】

実験に供試した材料は、ペプチド (P11-4) を含有する Curodont (Credentis, 以後 CD)を用いた。

1. エナメル質試片の製作

ウシ抜去下顎前歯の唇側エナメル質を 4×4×1mm のブロックとして切り出し、耐水性 SiC ペーパーの #2,000 まで順次研磨したものをエナメル質試片とした。このエナメル質試片の底面および側面をワックスで被覆して以下の実験に供試した。なお、CD の使用に際しては、露出面に対して 35% リン酸水溶液を 20 秒間塗布、水洗、乾燥した後、CD を塗布した。

2. 超音波伝播時間の測定

超音波測定装置としてパルサーレーザ (Model 5900, パナメトリクス), 縦波用トランスデューサー (V112, パナメトリクス) およびオシロスコープ (Wave Runner LT584, レクロイ) から構成されるシステムを用い、試片の厚さとの関係から縦波音速を求めた。すなわち、エナメル質試片に対して口腔内環境をシミュレートした pH サイクルを設定し、経時的にその脱灰程度を超音波測定法によって測定するとともに、このサイクルに CD を応用した場合の脱灰抑制あるいは再石灰化効果について検討した。なお、pH サイクルは以下の 4 条件に設定した。

- 1) 実験期間を通じて 37°C 人工唾液中 (pH 7.0) に保管する条件 (Control 群)
- 2) 0.1M 乳酸緩衝液 (pH 4.75) に試片を 10 分間浸漬した後、37°C 人工唾液中に 12 時間保管する条件 (De 群)
- 3) 試片に CD を 5 分間塗布後、実験期間を通じて 37°C 人工唾液中に保管する条件 (CD 群)
- 4) 試片に CD を 5 分間塗布後、0.1M 乳酸緩衝液に試片を 10 分間浸漬する。その後、37°C 人工唾液中に 12 時間保管する条件 (CD-De 群)

以上の操作を 1 日二回、28 日間連続して行った。さらに、歯質表面における形態的な変化について、形状測定レーザ顕微鏡 (VK-9710, キーエンス) を用いて観察した。なお、超音波測定およびレーザ顕微鏡観察の時期としては pH サイクル開始前および浸漬後 1 から 7 日まで一日毎、および 14, 21 および 28 日後とした。

3. SEM 観察および元素組成分析

所定の保管期間が終了した試片に対して、FE-SEM (ERA8800-FE, エリオニクス) を用いて、試片断面の観察を行うとともに、代表例については元素組成分析を行った。

【成績および考察】

Control 群では実験期間を通じて音速の著明な変化は認められないものの、De 群では他の条件と比較して経時的にその音速が減少する傾向が認められた。一方、CD 群および CD-De 群では、Control 群および De 群と比較して、実験開始 7 日後までに音速が増加する傾向が認められた。この歯質を透過する音速の変化は、CD の塗布により、脱灰されたエナメル質試片深部に CD が浸透、ゲル化することで、酸に対する緩衝材として機能するとともに、ペプチド膜がカルシウムイオンを吸着することで脱灰抑制あるいは再石灰化に影響を及ぼした可能性が考えられた。

【結論】

ペプチド(P11-4)の塗布は、初期エナメル質齲蝕の脱灰抑制および再石灰化促進作用を有する可能性が示された。

フッ化物配合ジェルによるリン酸カルシウム系知覚過敏抑制材の耐酸性向上に関する研究

高輪歯科 DCC & DSS
○加藤 正治、今村 光志

Improving Acid Resistance of the Calcium Phosphate Desensitizer by Trial Fluoride Gels
Takanawa Dent. DCC & DSS
○Shoji Kato, Koji Imamura

【研究目的】

リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材「ティースメイトディセンシタイザー」(クラレノリタケデンタル株式会社製、以下 TMD)は、露出した象牙質表層の開口した象牙細管を封鎖することで高い知覚過敏抑制効果を発揮するが、同時に酸蝕症や根面う蝕の予防処置としての効果も期待できることから、封鎖物(ハイドロキシアパタイト)の耐酸性向上が望まれる。そこで本研究では、臨床上で応用を想定し、TMD 処置後におけるフッ化物配合ジェル塗布について検討し、封鎖物の耐酸性におよぼす影響について評価した。

【材料および方法】

1. 材料

TMD をメーカーの指示通りに粉液比 1.2 で混和した後、得られたペーストを用いた。

2. 方法

耐酸性の評価は、JIS T 6609-1:2005 の酸溶解試験に準拠し以下のように行った。

- 1) TMD のペーストをアクリル樹脂製の型 (5mm φ×1.9mm) へ充填し、37℃100%RH 下で 1 時間保持した。
- 2) TMD が硬化後、#1500 耐水研磨紙にて注水下で研磨後に初期厚み(a)を測定した。
- 3) その後、TMD に NaF を 0.2%、5%配合した試作フッ化物配合ジェルを 10 分塗布し、蒸留水で水洗・乾燥した。
- 4) フッ化物配合ジェル未塗布群(コントロール)と塗布群を pH2.74 の乳酸水溶液に 37℃24 時間浸漬した。
- 5) 酸浸漬後の厚み(5 点平均値 : b)を測定して、値 a-b で求められる酸により溶解した厚みを酸溶解度として耐酸性を評価した。

【結果および考察】

表 : フッ化物配合ジェル 10 分塗布時の耐酸性への影響

	未塗布 n=10	0.2%NaF n=5	5%NaF n=5
酸溶解度(mm)	0.766 (0.015)	0.550 (0.021)	0.386 (0.045)
未塗布に対する酸溶解減少率	—	28.2%	49.6%

括弧内の数値は標準偏差

- ・ フッ化物配合ジェル塗布群は未塗布群よりも有意に酸溶解度が減少した。
- ・ 酸溶解減少率は、NaF 濃度に依存し濃度が高い方がより効果的であり、医薬部外品歯磨剤レベルの 0.2%NaF では 28.2%、医療用医薬品レベルの 5%NaF では 49.6%であった。

臨床においては、脱灰傾向の強い症例や酸蝕症ならびに根面う蝕の予防など高度な耐酸性が要求される症例に対し、リン酸カルシウム系知覚過敏抑制材の封鎖効果を持続させるためにフッ化物配合ジェルの併用が有効と考えられる。

【結論】

以上の結果から、TMD 処置後にフッ化物配合ジェルを一定時間塗布することは、封鎖物であるハイドロキシアパタイトの耐酸性の向上に寄与し、作用させる NaF は高濃度の方が、酸溶解を減少させる効果が高いことが示唆された。