

イヌ歯髄、骨髄、脂肪幹細胞の抜髄後根管内自家移植による歯髄再生能の比較

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¹

愛知学院大学 歯学部 小児歯科学講座²

愛知学院大学 歯学部 歯内治療学講座³

○村上 真史¹、林 勇輝²、庵原 耕一郎¹、竹内 教雄³、中島 美砂子¹

Pulp regenerative potential of dental pulp stem cells compared with bone marrow and adipose stem cells after autologous transplantation into pulpectomized teeth

Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, Obu, Japan¹, Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University, Nagoya, Japan², Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University, Nagoya, Japan³

○MURAKAMI MASASHI¹, HAYASHI YUKI², IOHARA KOICHIRO¹, TAKEUCHI NORIO³, NAKASHIMA MISAKO¹

【研究目的】私どもは、これまで、イヌ抜髄後の根管内に、フローサイトメーターにて分取した歯髄幹細胞を遊走因子 SDF-1 と共に自家移植すると、歯髄組織が再生することを明らかにしてきた。また、この歯髄再生治療法を臨床に応用するために、フローサイトメーターに替わる安全で効率的な歯髄幹細胞の分取法として、膜遊走分取法を開発した(第 136 回日本歯科保存学会発表)。さらに、この分取法によるイヌ歯髄膜分取幹細胞を、すでに製剤化されている遊走因子 G-CSF と共に自家移植すると歯髄組織が同様に再生された(第 136 回)。しかし、不用歯からの自家歯髄組織の供給は高齢になるにつれ限界が生じる。そこで、歯髄再生のための、歯髄幹細胞に代わる他の幹細胞源として、歯髄、骨髄、脂肪膜分取幹細胞の有用性を検討した。

【方法】1. 幹細胞分取：イヌ歯髄、骨髄および脂肪組織より細胞を酵素分離、培養後、2 代目コロニー形成幹細胞より膜遊走分取法にて歯髄、骨髄、脂肪膜分取幹細胞を分取した。2. 歯髄、骨髄、脂肪膜分取幹細胞の特徴化(1) 幹細胞表面マーカーの発現：フローサイトメトリーにて CD105、CXCR4、G-CSFR 発現率を解析した。(2) 分子生物学的解析：Real-time RT-PCR にて、血管誘導・神経栄養因子 mRNA 発現を解析した。(3) アポトーシス抑制能：Staurosporine によって生じたアポトーシスに対する、G-CSF の抑制効果を細胞間で比較した。3. in vivo における歯髄再生能の評価：歯髄、骨髄、脂肪膜分取幹細胞をコラーゲン及び G-CSF と共にイヌ抜髄後根管内に自家移植し、2 週間後、標本を作製した。HE 染色にて形態を観察し、歯髄再生量を比較した。血管新生能、神経再生能及び歯髄マーカー発現を免疫組織学的に検討した。また、象牙質形成を in situ hybridization (DSPP, *enamelysin*) にて解析した。さらにマッソントリクローム染色にて線維化を比較した。4. 歯髄、骨髄、脂肪幹細胞培養上清の効果(1) 血管誘導能：ヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC 細胞を用いて、Matrigel 上における管腔形成能を比較した。(2) 神経突起伸長能：ヒト神経芽細胞腫細胞株 TGW 細胞を用いて、神経突起伸長を比較した。(3) 遊走能：TAXIScan-FL にてイヌ骨髄 CD31⁺ SP 細胞を用いて、遊走能を比較した。(4) アポトーシス抑制能：イヌ骨髄 CD31⁺ SP 細胞を用いて Staurosporine によるアポトーシスに対するアポトーシス抑制能を Annexin V 染色後、フローサイトメトリーにて解析した。(5) 石灰化促進能：骨・象牙質誘導を行い、Alizarin Red 染色にて石灰化基質形成、*enamelysin* mRNA 発現を比較した。

【結果】骨髄、脂肪膜分取幹細胞は歯髄膜分取幹細胞に比べて、根管内に再生された歯髄組織量、血管新生能および神経再生能は劣るが、形態学的には同様の歯髄様組織が再生された。歯髄、骨髄、脂肪膜分取幹細胞の培養上清の in vitro における Trophic 効果は、いずれも歯髄膜分取幹細胞の培養上清が最も高く、G-CSF と相加作用がみられた。血管誘導・神経栄養因子発現は、歯髄膜分取幹細胞が、骨髄、脂肪膜分取幹細胞と比較して最も高かった。骨髄膜分取幹細胞を移植した再生歯髄組織は、線維化が見られ、in vitro における骨・象牙質誘導能は、骨髄膜分取幹細胞培養上清が最も高かった。

【結論】歯髄膜分取幹細胞は、骨髄、脂肪膜分取幹細胞と比較して、歯髄再生能が最も高いことが明らかとなった。これは、歯髄膜分取幹細胞の血管誘導・神経栄養因子発現が高く、また、Trophic 効果が高いことに起因すると考えられる。また、骨髄、脂肪膜分取幹細胞は、歯髄再生量は歯髄膜分取幹細胞に劣るが、歯髄再生における第二の細胞供給源として有用であることが示唆された。

根管充填材の効率的な除去法に関する研究

鶴見大学 歯学部 歯内療法学講座

○大槻 和正、宇田 琴美、吉田 拓正、神田 亘、山口 貴夫、山崎 泰志、細矢 哲康

The Efficient Method of Removing Root-Canal-Filling Material

Department of Endodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine, Kanagawa, Japan

○OTSUKI KAZUMASA, UDA KOTOMI, YOSHIDA TAKUMASA, KANDA WATARU, YAMAGUCHI TAKAO, YAMAZAKI YASUSHI, HOSOYA NORIYASU

【緒 言】慎重に行われた抜髄や感染根管治療も、再治療が必要になるケースがある。本邦においては諸外国と比較して、再治療ケースが多いとの報告もある。根管治療の最終ステップである根管充填は、ガッタパーチャポイントと種々の根管シーラーを併用した方法が一般的であり、再治療の際にはこれらの根管充填材を除去する必要がある。根管充填材の除去には、専用の除去器具をはじめ溶解剤や根管切削器具、超音波チップなどが応用されている。本研究の目的は、種々の器具を用いて根管充填材を除去する際の所要時間ならびに除去率を調査し、器具間における除去効率を比較することである。

【材料と方法】被験材料は、根管充填に使用されたガッタパーチャポイントの除去を目的とした GPR (2S, #50, マニー)、NiTi ロータリーファイルの Reciproc (#50, ジッペラー) ならびに根管内異物除去用超音波チップ (ST21, オサダ) である。30 本の透明根管模型 (S1-U1, ニッシン) の根管上部 1/4 を #3 ピーソーリーマーでロート状拡大し、NiTi ロータリーファイル (Profile #60/04, メルファー) にて作業長 18mm で根管拡大形成を行った後、シングルポイント法にて、ガッタパーチャポイント (#60/04, デンツプライ) と根管シーラー (キャナルス, 昭和薬品化工) の併用根管充填を行った。試料は、37°C、相対湿度 100% で 1 週間以上保管した。各試料の根管充填の状況を記録するために、4 方向から規格写真撮影を行った。試料の根管部分を厚紙でマスキングし、無作為に 10 試料ずつ 3 群に分配した。写真画像から、根尖側充填部分 2mm を減じた長さを根管充填材除去のための作業長とした。2 名の医局員が各群 5 試料ずつ、以下の各器具を用いて、#50K ファイルが作業長 (16mm) までスムーズに到達するまで根管充填材を除去した。1 群; GPR (1000rpm, 無注水)、2 群; Reciproc (規定プログラム, 無注水)、3 群; 超音波チップ ST21 (出力 5, 注水下) である。除去に要した時間を計測するとともに、処置前の写真撮影と同様に、除去後の試料を 4 方向から規格写真撮影した。処置前後の写真画像から、画像解析ソフト (image-j) を用いて根管壁に残存した根管充填材の面積を計測した。4 方向からの画像から、根管充填材の除去率の平均値を各試料における除去率とした。各群間において、除去に要した時間ならびに除去率に関し平均値の差の検定法を用いて比較検討を加えた。

【結 果】作業長までの根管充填材の除去に要した平均時間は、1 群 GPR が 49.6 秒で最も短く、次いで 2 群 Reciproc の 340.3 秒、3 群の ST21 は 402.4 秒であった。GPR と Reciproc および ST21 間には統計学的有意差が認められ、Reciproc と ST21 間には有意差は認められなかった ($P < .05$)。平均除去率は、1 群 GPR が 68.08% で最も高く、2 群 Reciproc が 63.27%、3 群 ST21 が 59.64% であった。除去率に関して、3 群間に有意差は認められなかった。

【考 察】今回の実験で、最も優れた根管充填材の除去効率を示した GPR は、ガッタパーチャポイントを除去するための専用器具であり、刃部の構造からガッタパーチャポイントの切削片の排出性が他の器具に比べて極めて高いことが、優れた結果が得られた理由と思われる。Reciproc は、すべての試料において新たな根管壁の切削が認められ、#50K ファイルは残存した根管充填材と根管壁との間隙に挿入されていた。本来の根管からの逸脱は、除去時の加圧でファイルがたわみ、根管壁を切削したと考えられる。ST21 は、超音波振動ならびに振動時の発熱により根管充填材を軟化、破壊して除去すると考えられる。注水により機械的に破壊した破片は洗い流すことができるが、軟化は難しくなる。一方、無注水では容易に軟化するが、根管内からの破片の除去が困難となり、使用時には注水、無注水を使い分けが肝要である。

【結 論】再治療のケースにおいて、ガッタパーチャポイントを除去する際には、GPR の使用が効率的である。

イヌ高齢における自家歯髄幹細胞を用いた抜髄後歯髄再生：若齢との比較
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
○庵原 耕一郎、村上 真史、中島 美砂子

Pulp regeneration in aged dogs after autologous transplantation of dental pulp stem cells into pulpectomized teeth compared with that in young dogs

Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, Obu, Japan

○IOHARA KOICHIRO, MURAKAMI MASASHI, NAKASHIMA MISAKO

【研究目的】私どもは、第136回日本歯科保存学会において、膜遊走分離法により分取した高齢のイヌの歯髄幹細胞を若齢と比較し、その形質に差がみられないことを明らかにした。一方、若齢のイヌの歯髄再生においては、移植した歯髄幹細胞は根管内で直接分化するのではなく、**trophic** 因子を分泌し、歯周囲組織から幹細胞を根管内に遊走させ、増殖、抗アポトーシス、血管新生・神経伸長促進により歯髄が再生されることを138回本学会にて発表した。しかしながら、一般的に、高齢では組織再生能力が劇的に低下するといわれている。よって、今回は、まず、イヌ高齢における膜分取歯髄幹細胞自家移植後の歯髄再生量を若齢と比較した。さらに、高齢イヌにおいて歯髄再生能の違いを生じる要因を若齢と比較して検討した。

【材料と方法】

1. 若齢および高齢歯髄幹細胞の分取：7か月および5歳のイヌ上顎犬歯を抜去し、歯髄細胞を分離、培養した。2代目において、膜遊走分取法 (Murakami et al., 2013) により歯髄幹細胞を分取し、7代目まで増幅後凍結した。
2. 若齢および高齢歯髄幹細胞上清の **trophic** 効果：7代目の培養上清を採取し、イヌ骨髄幹細胞(A~E)およびヒト神経芽腫細胞(TGW) (F) を用いて、以下の作用を比較した。

- A 増殖促進作用：Tetra Color ONE®
- B 遊走促進作用：TAXIScan-FL
- C 抗アポトーシス作用：フローサイトメトリー
- D 抗炎症作用：Mixed lymphocyte reaction (MLR)
- E 血管誘導能：Matrigel
- F 神経突起伸長作用

3. 若齢および高齢歯髄幹細胞のイヌ抜髄モデルにおける歯髄再生能：歯髄幹細胞 (5×10^5 cells) をコラーゲンに混合して遊走因子 **G-CSF** と共に根管内に自家移植した。移植後、14日および120日後に抜歯し、歯髄再生量を比較した。
4. 若齢および高齢歯根膜幹細胞の **G-CSF** に対する活性
 - A 増殖能
 - B 遊走能
 - C 抗アポトーシス作用 (フローサイトメトリー、Western blotting (BAX 発現))

【結果】前回、高齢の歯髄幹細胞は若齢と比較して、幹細胞マーカー発現、血管新生・神経栄養因子遺伝子発現、細胞増殖能、遊走能、および多分化能に差が見られないことを報告していた。今回、歯髄幹細胞培養上清の増殖・遊走促進作用、アポトーシス抑制作用、抗炎症作用、血管・神経誘導能も差がみられないことも明らかとなった。一方、高齢のイヌにおいて、根管内に歯髄幹細胞を自家移植すると、若齢と同様に歯髄が再生されたが、高齢のイヌは若齢に比べて有意に歯髄再生量が少なかった。また、**trophic** 因子に対する、歯周囲組織の幹細胞の反応性を高齢と若齢で比較するため、イヌ歯根膜幹細胞を分取し、その遊走能を比較したところ、高齢の歯根膜幹細胞は若齢に比べて有意に遊走能が低かった。また、**G-CSF** のアポトーシス抑制作用は高齢の歯根膜幹細胞において有意に減少がみられた。

【考察・結論】高齢のイヌ歯髄組織から膜遊走分取法により得られた歯髄幹細胞は、若齢と比べて、幹細胞としての形質および上清の **trophic** 効果ともに差がみられなかった。しかしながら、歯髄幹細胞を自家移植したイヌ抜髄モデルにおいて、高齢は若齢に比べて有意に歯髄再生量が少なかった。これは、高齢の歯根膜細胞は若齢に比べて有意に **G-CSF** の遊走促進とアポトーシス抑制が低かったことから、高齢では根管内へ遊走し定着する幹細胞数が減少することによる可能性が示唆された。

演題 P84 (歯内)
【2503】

Mineral Trioxide Aggregate による歯髄組織反応の組織学的研究

明海大学 歯学部 機能保存回復学講座 歯内療法学分野

○中村 裕子、井出 祐樹、門倉 弘志、高橋 哲哉、横瀬 敏志

Pulp tissue reaction by Mineral Trioxide Aggregate

Division of Endodontics, Department of Restorative and Biomaterials Sciences ,Meikai University school of Dentistry

○NAKAMURA YUKO, IDE YUKI, KADOKURA HIROSHI, TAKAHASHI TETSUYA, YOKOSE SATOSHI

【研究目的】歯髄保護材料として MTA (Mineral Trioxide Aggregate) セメントが歯髄細胞の硬組織形成を早期に亢進することが臨床報告され、注目を浴びている。しかし歯髄組織や象牙芽細胞にどのような作用機序で働き、硬組織形成を亢進しているかは、ほとんど明確にされていない。我々はこれまでに象牙芽細胞の分化と機能に対して Wnt シグナルが重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。そこで今回は、ラットの露髄部に覆髄材として MTA セメントを用いることにより、歯髄再生と硬組織形成に及ぼす作用を形態学的に観察し、さらに DSPP, Wnt 抗体を用いた免疫組織染色を行うことで作用機序の一端を解明することを試みた。

【材料及び方法】本動物実験は、明海大学動物倫理委員会の承認を得てから行い、動物の取り扱いには倫理委員会の指示に従って行った。実験は 15 匹の 6 週齢の雌 SD 系ラットの上顎左側第一大臼歯にデンタルバーにて露髄面を作成した。その後 MTA セメントを用いて覆髄し、グラスアイオノマーセメントにて修復したものを実験群とした。対照群として下顎右側第一大臼歯に同様に露髄面を作成し、そのままグラスアイオノマーセメントにて修復を行った。術後 7, 14, 21 日後のそれぞれ 5 匹のラットから上顎骨を摘出し、試料とした。試料は、中性ホルマリンにて固定し、EDTA にて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し連続切片を作成した。各切片をヘマトキシリン染色、免疫組織染色にて染色し、組織学的に検索した。

【結果および考察】 MTA を覆髄材とした歯髄組織は、コントロールと比較して、早期に硬組織の形成が行われていることが観察された。この形成量は、14, 21 日で有意な差を示した。また免疫組織染色により、MTA 群では、コントロールと比較して、Dentin bridge 下の象牙芽細胞に Wnt シグナルの高い陽性反応を認めた。

【結論】MTA は、歯髄再生能を促進し、早期に象牙芽細胞の分化を促進すること認められた。また、その分化には、Wnt シグナルが関与している可能性が示唆された。

演題 P85 (歯周)
【2504】

ホエイペプチド配合流動食による歯周炎患者 GCF 中の炎症性サイトカインへ与える影響

新潟大学大学院医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野¹

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔健康科学講座 予防歯科学分野²

株式会社明治 研究本部 食機能科学研究所³

○久保田 健彦¹、富田 尊志¹、阿部 大輔¹、清水 太郎¹、濃野 要²、金子 昇²、杉田 典子¹、川島 昭浩³、坪井 洋³、佐々木 一³、吉江 弘正¹

Influence of Mein, liquid food combined with whey peptides, in periodontal disease patients

Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences¹, Preventive Dentistry, Department of Oral Health Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences², Food Science Research Laboratorys R&D Division, Meiji Co., Ltd.³

○KUBOTA TAKEHIKO¹, TOMITA TAKAYUKI¹, ABE DAISUKE¹, SIMIZU TARO¹, NOUNO KANAME², KANEKO NOBORU², SUGITA NORIKO¹, KAWASHIMA AKIHIRO³, TUBOI HROSHI³, SASAKI HAZIME³, YOSHIE HIROMASA¹

目的:歯周病は生活習慣病と言われほとんどの成人が罹患し、超高齢化社会の現代において咀嚼・会話・審美に不可欠な歯を喪失する最大の原因となっている。更に歯周病を防ぎ健康増進を図ることは、歯周病が糖尿病や直接死因につながる循環器・脳・呼吸器疾患などと密接に関係することからも国家にとっても急務である。(株)明治が開発したホエイペプチド配合流動食(WHP)は、肝移植患者において手術後の菌血症発症率を有意に低下させ、肝炎マウスの血清中炎症性サイトカインの IL-6、TNF- α を抑制して肝炎発症を軽減するなどの機能を有する機能性栄養食品である。本品は食品のため安全であり、抗炎症効果も有することから、慢性炎症性疾患である歯周炎の予防や改善に有効である可能性がある。本研究は 4 週間の WHP 摂取が臨床歯周組織及び歯肉溝浸出液(GCF)、唾液に及ぼす影響について研究を行った。材料と方法:本研究は新潟大学倫理審査委員会の承認を得て新潟大学医歯学総合病院にて実施した。インフォームドコンセントが得られた 36 名の慢性歯周炎患者男性 24 名女性 12 名(66.8 $\pm$ 11.7 歳)を対象とし WHP 摂取群(n=18)、コントロール群として汎用流動食(Control)摂取群(n=18)に無作為に振り分けた。実施方法は評価者盲検法とし、摂取前と摂取 4 週間後に臨床検査としてポケット深さ(Pd)、アタッチメントレベル(LA)、歯肉炎指数(GI)、プラークコントロールレコード(PCR)、プロービング時の出血(BOP)の測定、更に生化学的な検査として最深歯周ポケット部位より GCF を採取し、炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)量、細胞逸脱酵素(AST、ALT)量、唾液中遊離ヘモグロビン(fHb)量を測定した。ベースライン時の群間の比較には Mann-Whitney の U 検定、群内の介入前後比較には Wilcoxon の符号付き順位検定、相関分析は Pearson の積率相関分析を用い、有意水準は 5%に設定した。成績:臨床パラメーターは両群共に GI、BOP、PCR において改善傾向がみとめられた。PCR の低下した Control 群でのみ有意に GI、BOP が減少した。Pd、AL は両群共に有意な変化はなかった。GCF 中の生化学的パラメーターでは TNF- α 、IL-6 は WHP 群においてのみ有意に減少し、Control 群では有意差は認められなかった。AST、ALT は両群共に有意差は認められなかった。唾液中の fHb は両群共に有意差は認められなかった。結論:摂取 4 週間後の臨床パラメーターの改善より WHP、Control 両群共に歯周組織に良好な結果を及ぼすことが示された。また、GCF 中の TNF- α 、IL-6 が WHP 群でのみ有意に減少したことより WHP に含まれるホエイペプチドが GCF 局所での炎症性サイトカインレベルに影響を与えた可能性が示された。

演題 P86 (歯周)
【2504】

ニフェジピン性歯肉増殖を伴う慢性歯周炎患者の経時的咀嚼能の変化と歯肉組織の組織学的評価

朝日大学 口腔感染医療学講座 歯周病学分野

○安田 忠司、渋谷 俊昭

A Chewing ability and histologic evaluation of the gingival tissue of Chronic Periodontitis with Gingival Overgrowth Induced by Nifedipin

Division of Periodontology, Department of Oral Infections and Health Science Asahi University School of Dentistry

○YASUDA TADASHI, SHIBUTANI TOSHIAKI

キーワード：ニフェジピン、歯肉増殖症、咀嚼能率、歯周治療

【はじめに】ニフェジピンは1984年にRomanらがその副作用として歯肉の増殖を引き起こすことを報告した。その発生機序は線維芽細胞増殖促進作用、コラーゲン分解抑制作用、薬剤に対する反応性の遺伝的な差などが提示されている。現在、薬物性歯肉増殖症例としてニフェジピンによる発症報告例が最も多く、歯肉肥大の程度も著しく、服用患者の15-20%に歯肉増殖症が認められ、口腔清掃、咀嚼や発音を困難にするだけでなく審美障害を招き、我が国において今後、増加すると考えられる疾患である。本症例報告は薬物性歯肉増殖を伴う広汎性重度慢性歯周炎患者に対し、徹底的なプラークコントロール、歯周外科治療およびプロビジョナルレストレーションによる咬合治療などを駆使し最終補綴した後、良好な状態を維持することができた。また咀嚼能率判定表を用いて食生活指導を実施した咀嚼能率の結果と歯周外科時に採取した歯肉組織の組織学的評価を報告する。

【初診】59歳女性。2002年より高血圧と診断されCa拮抗薬（ニフェジピン）を服用していた。6か月前より歯肉の腫脹に気づいていたが痛みがないため放置していた。しかし1か月前より歯肉の痛みを覚え近医を受診したところ、専門的治療を勧められ、2008年1月21日に本学附属病院を来院した。

【診査・検査所見】PD 4mm以上の割合は100%で、上顎前歯および臼歯部に線維性の歯肉増殖を認めた。エックス線所見では、下顎前歯部に根尖に達する骨吸収が多数歯に認められ、臼歯部も歯冠崩壊が著しく保存不可能歯が多数認められた。

【診断】薬物性歯肉増殖を伴う慢性歯周炎

【治療計画】1)内科への対診、歯周基本治療 2)再評価 3)歯周外科処置 4)再評価 5)最終補綴物の装着 6)メンテナンス

【治療経過】歯周基本治療として、TBI、保存不可能歯の抜歯、スケーリング、SRP、治療用義歯を作製した。再評価検査後、歯周外科処置を行い、歯槽骨の平坦化を行った。歯周組織の安定を確認後、最終補綴を行い、SPTへ移行した。初診時、多数歯にわたり歯冠崩壊していたため、咀嚼器官の機能を有していなかったが治療用義歯、プロビジョナルレストレーションを装着したことにより咬合機能の回復を図り、同時に食事指導を行った。初診時にはおかゆ、豆腐、プリンと摂取可能食物が限られていたものの食事指導として義歯の限界を説明し食物の大きさを小さくする、調理方法を変更するなど工夫することにより多くの種類の食物を摂取するように指導した。その結果、経時的に咀嚼可能な食品目が増加した。また組織学的所見から高度に増殖した不規則な走行を示す線維性結合組織を認めコラーゲン線維が太い束を形成しており、その線維には多数の線維芽細胞がみられた。炎症性細胞は歯肉溝上皮と口腔粘膜上皮に多く認められたが、結合組織深部には少なかった。不規則な上皮釘脚の延長を認めるも炎症性細胞の浸潤は目立たなかった。PCNA抗体を用いた免疫科学染色では上皮下直下と結合組織深部のコラーゲン線維にPCNA陽性細胞が散見された。

【考察・まとめ】著しい口腔内変化を伴う場合、口腔内清掃指導にとどまらず、咀嚼能率判定表などを使用した食生活指導を行うことも必要と考える。食べる事は、QOLに関わる事が多く、患者本人も噛めることに対する喜びを再認識でき、治療に対するモチベーションの維持につながると感じた。すなわち重度歯周炎患者の多数歯の抜歯後、義歯を装着するため咀嚼能率判定表を用いた食事指導も重要と考える。カルシウム拮抗剤は線維芽細胞の増殖能亢進とコラーゲン産生に影響し、これを抑制するために歯肉が肥大するとのメカニズムが考えられている。本症例の組織学的所見の結果から線維芽細胞の増殖亢進を確認した。現在はメンテナンス移行後3年経過しているが、PD3mm以下に維持しており、歯肉増殖を認めていない。今後も注意深く経過観察を行っていく予定である。本症例報告について、得られた資料を使用するに当たり研究対象者の承諾を得た。

演題 P87 (歯周)
【3104】

BMP-9 と FK506 の共刺激はラット脱分化脂肪細胞(rDFATs)の骨芽細胞様分化を促進する

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野

○中村 利明、篠原 敬哉、瀬上 佐和子、野口 和行

Co-stimulation with bone morphogenetic protein-9 and FK506 induces osteoblastic differentiation in rat dedifferentiated fat cells

Department of Periodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima, Japan

○NAKAMURA TOSHIKI, SHINOHARA YUKIYA, FUCHIGAMI SAWAKO, NOGUCHI KAZUYUKI

【目的】

脱分化脂肪細胞(dedifferentiated fat cell: DFAT)は成熟脂肪細胞から天井培養と呼ばれる方法で体外培養することにより得られる線維芽細胞様の細胞群である。DFAT は高い増殖能と多分化能を有し、また純度の高い細胞群として入手可能で、細胞移植療法の有力なソースの一つとして考えられている。また近年、bone morphogenetic protein (BMP)-9 は間葉系細胞に対して BMP-2 と同等かそれ以上の骨分化促進作用を有することが報告され注目されている。そこで今回、骨組織再生への応用に向けた基礎的研究として、ラットより分離・培養した DFAT(rDFATs)の骨芽細胞様細胞への分化における、BMP-9 と補助的な促進因子として免疫抑制剤 FK506 共刺激による作用を評価した。

【材料および方法】

1. Wistar 系ラットの鼠径部より採取した脂肪を酵素処理し、脂肪細胞を採取後、天井培養にて分離培養した rDFATs を実験に用いた。2. rDFATs の BMPs 受容体(ALK-1, -2, -3, -6, BMPRII, ActRIIA, ActRIIB)の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて解析した。3. rDFATs を BMP-2 または BMP-9 および FK506 存在下で培養後、ALP 活性の測定(刺激後 6 日)、Alizarin Red S 染色(刺激後 21 日)を行い、また runx2, osterix, bone sialoprotein (BSP) の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。4. rDFATs の Smad1/5/8 のリン酸化を Western blot 法にて解析した。5. Noggin による BMP-9 と FK506 の抑制効果を、ALP 活性を指標として評価した。

【結果】

rDFATs は I 型および II 型の各種 BMP 受容体(ALK-1, -2, -3, -6, BMPRII, ActRIIA, ActRIIB)の遺伝子を発現しており、BMP-2、BMP-9 および FK506 存在下で培養したところ、BMP-9 と FK506 共刺激群は他群と比較して著しい骨関連遺伝子の発現と ALP 活性および石灰化の亢進を認めた。また BMP-9 単独刺激と比較して BMP-9 と FK506 共刺激において smad1/5/8 リン酸化の促進が認められた。BMP-9 と FK506 共刺激により上昇した ALP 活性の noggin による有意な抑制効果は認められなかった。

【考察および結論】

BMP-9 の作用を発揮する受容体として ALK-1, -2 が特に重要との報告があるが、rDFATs においては ALK-1, -2 を含む主要な BMP 受容体の遺伝子が発現しており、主なシグナル伝達経路である smad1/5/8 のリン酸化と runx2, osterix, BSP の遺伝子発現の促進が BMP-9 単独または BMP-9 と FK506 の共刺激において認められた。rDFATs においてどの受容体が BMP-9 の作用に重要な役割を果たしているかは不明であるが、いずれかの受容体を介して smad1/5/8 のリン酸化を促し、目的遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。また BMP-9 と FK506 の共刺激群では骨分化増地群と比較して顕著な ALP 活性の上昇や石灰化物形成の促進が rDFATs において認められたが BMP-9 単独、BMP-2 単独および BMP-2 と FK506 の共刺激群ではそのような作用は認められなかった。FK506 は、BMP または TGF- β の I 型受容体に結合し、シグナル伝達を抑制している FKBP12 に結合し、その抑制作用を解除すると考えられている。本研究においても BMP-9 と FK506 の共刺激では同様の機序が発揮されたと考えられる。しかしながら BMP-2 においてはそのような作用は認められなかった。これは Noggin に対する反応性の違いから来しているのかもしれない。BMP-2 は Noggin による抑制を受けるが BMP-9 は抑制されないとの報告があり、本研究においても BMP-9 と FK506 の共刺激により上昇した ALP 活性は外因性 Noggin による抑制作用はほとんど認められなかった。これらのことから、rDFATs は BMP-9 と FK506 の共刺激により強力に骨芽細胞様細胞へ分化誘導されることが示された。

【会員外研究協力者】

吉元剛彦 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野)

演題 P88 (歯周)
【3001】

長期メンテナンス受診患者の背景の質的分析
福岡歯科大学 総合歯科学講座 高齢者歯科学分野
○加藤 智崇、内藤 徹

Qualitative background analysis of long-term maintenance patients
Section of Geriatric Dentistry Department of General Dentistry Fukuoka Dental College
○KATO TOMOTAKA, Naito Toru

【目的】 健全な口腔機能を保つために、動的治療後のメンテナンスは大変重要である。しかし、我が国ではメンテナンス受診率が他の先進国に比べて著しく低い。本研究の目的は、長期メンテナンス受診患者の背景を分析することで、メンテナンス受診患者と歯科医院との関わりを明らかにし、メンテナンス受診率の向上につながる情報を得ることを目的とする。【材料と方法】 一般歯科医院に来院する長期メンテナンス患者 30 名に対して個別にインタビューを行い、その様子をビデオ記録した。インタビューを行う面接者は、事前にインタビュー調査の標準的なトレーニングを受け、半構造化されたインタビュー手法の中で情報収集を行った。インタビュー終了後、ビデオのデータからインタビュー中の会話をテキスト化し、Steps for Coding and Theorization (SCAT)法を用いて質的に解析した。本研究は、福岡歯科大学倫理審査委員会の承認を得て実施した。

【結果】 インタビュー中の会話で有効なテキストを得られた 29 名の患者を解析した。対象患者は平均年齢 60.7 歳であり、メンテナンス継続期間は平均 10.4 年であった。患者背景から、対象患者の 93.1%が食生活を気にしており、79.3%が運動の重要性を認識していた。また、対象患者のすべてがメンテナンスの継続を希望しており、75.9%の患者からスタッフに対して好感を持つという記述を得た。歯科衛生士の指導で行動変容したという記述も多数確認できた。

【結論】 長期メンテナンス受診患者は健康への意識が高く、また、スタッフに対して好感を持っていた。メンテナンス受診率の向上には、メンテナンスの中核をなすスタッフである歯科衛生士のコミュニケーションや接遇が重要であると示唆された。

ラット歯肉炎モデルでの免疫応答—なぜ臨床態度に違いがでるのか？—

福岡歯科大学 歯学部 総合歯科学講座 総合歯科学分野¹

福岡歯科大学 歯学部 生体構造学講座 病態構造学分野²

○瀬野 恵衣¹、大野 純²、山田 和彦¹、谷口 奈央¹、廣藤 卓雄¹

Immune responses in gingivitis of rats -why do so many clinical outcomes exist? -

Department of General Dentistry, Division of General Dentistry, Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan¹,

Department of Morphological Biology, Division of Pathology, Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan²

○SENO KEI¹, Ohno Jun², Yamada Kazuhiko¹, Taniguchi Nao¹, Hirofujii Takao¹

【目的】歯肉炎は、一般的に細菌による局所炎症として進行するが、全身性疾患の継発症としてのタイプも知られている。原因により、歯肉で展開される免疫応答は自然免疫と獲得免疫に分かれる。その結果、各種歯肉炎の治療に対する臨床態度の違いを示しているものと考えられる。そこで、本研究では、ラットに LPS 刺激による局所自然免疫型と全身性免疫応答 Th1 型および Th2 型の 3 タイプの歯肉炎モデルを作製し、各歯肉炎におけるエフェクター細胞と標的組織の関連性を免疫病理組織学的に検討した。

【材料・方法】1) LPS 型、Th1 型あるいは Th2 型全身性免疫応答モデルの作製：LPS 型モデルは 100mg/ml LPS を局所投与（注射および塗布）した。Th1 型モデルは、(LEW×BN)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（1 mg/kg）の塩化水銀を腹腔内投与して作製した。2) 試料採取：経口的に、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：免疫組織化学的にエフェクター細胞、接着分子発現および lupus band test などの検索を行った。4) サイトカイン mRNA の組織発現検索：病変部組織でのサイトカイン mRNA 発現を real-time RT-PCR 法にて行った。

【結果・考察】1) LPS 型歯肉炎上皮直下結合組織に好中球およびマクロファージ浸潤が病変の主体であった。(1)エフェクター細胞：好中球。(2)標的組織：上皮結合組織で、上皮組織の変性・破壊は軽微であった。(3) サイトカインの組織発現：IL-1 および TNF- α の発現上昇を認めた。(4)自然免疫応答による反応で、エフェクター細胞の上皮親和性機構はみられなかった。2) Th1 型歯肉炎 T 細胞の上皮層内に浸潤がみられ、satellitosis（上皮細胞への T 細胞接着）が特徴であった。(1) エフェクター細胞：CD8 陽性 T 細胞。(2) 標的組織：上皮組織で、とくに上皮細胞はインターフェロン・ガンマ (IFN- γ) 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- γ および MCP-1 の発現上昇を認めた。(4) Th1 型免疫による LFA-1/ICAM-1 接着経路を利用したエフェクター細胞の上皮親和性機構が特徴であった。3) 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。(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を認めた。(3) サイトカインの組織発現：IL-4 mRNA および MCP-1 発現の上昇。(4) Th2 型自己免疫応答により、上皮 BM へのマクロファージ走化性が特徴であった。

【結論】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。細菌に対する局所免疫応答および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。

演題 P90 (歯周)
【3102】

広汎な骨欠損を伴う歯内—歯周病変 (Weine クラス III) に対して再生療法を行った症例：6 ヶ月予後
白井歯科
○白井 義英、藤木 傑

A case of guided tissue regeneration for bone resorption because of endodontic-periodontal disease (Weine Class III) : 6 months
SHIRAI DENTAL CLINIC
○SHIRAI YOSHIHIDE, FUJIKI SUGURU

キーワード：歯内-歯周病変、歯槽骨破壊、再生療法

【緒言】

歯内病変により 2 次的に生じた広汎な歯槽骨破壊を伴う歯周病変に対して再生療法を行った。

【症例】

上顎左側中切歯部の歯肉腫脹と排膿を主訴として当院に来院された患者 (女性、62 才) に対して歯周基本治療終了後、患者の同意を得たのちに施術を行った。歯周基本治療を進めると同時に骨欠損形態と大きさについては術前に精査し、同時に歯内治療も進めていく。施術については、歯内治療および歯周基本治療終了後に行い、切開は歯槽骨破壊形態と審美性を考慮して最小限の外科的侵襲となるような切開を行い、歯内病変部の感染部を徹底して除去した後、接着材料 (G-フィックス、(株) ジーシー) にて歯根形態を修復後、歯槽骨破壊が大きいので超高気孔率ハイドロキシアパタイト (APACERAM-AX、発売元：株式会社ヨシダ、製造販売元：HOYA 株式会社) にてスペースを作った後に吸収性歯周組織再生材料 (ジーシー メンブレン、(株) ジーシー) を設置、また、歯肉弁に骨膜減張切開を加え術野を完全に被覆する様に懸垂縫合を行った。

【経過】

術後 1 ～ 2 週目までは同部の歯肉に軽度の発赤を認めた。2 週目より軟毛ブラシにてブラッシングを始めると同部に認められた発赤も消退し始めた。術後 3 週目にて全ての縫合部の抜糸を行い、術後 5 日間は抗菌薬を服用、術後 6 週間は 1 日 3 回含嗽剤にてうがいをしてもらった。また、術後 6 週間は 1 週毎に専門的機械清掃を行い、術後 6 ヶ月まで 1 ヶ月毎に口腔衛生状態の確認を行った。臨床的には、術前と術後 6 ヶ月における PD、CAL、X 線検査による評価を行った。

【予後】

通常の歯周骨内欠損に対して行われる再生療法と比較すると今回の症例の様に歯内病変から歯槽骨破壊を生じた症例では感染部が広範囲となるために治癒を左右する要因が多いことから単独の再生療法と比べて若干の治癒が遅れる傾向があると思われる。また、同部の術前の PD は 10mm、CAL は 12mm (唇側中央部) であったのが術後 6 ヶ月では PD が 3 mm、CAL が 5 mm と改善されていた。

【考察】

この症例の場合、Weine クラス III に分類される様に歯内病変由来の骨吸収と歯周炎による骨吸収とが連絡し、合併した病変である。歯髄は既に失活している。まず、感染根管処置を行い、歯周治療との併用が必要となる。つまり、それぞれからの治療のみでは完全に治癒することは困難であったと考えられる。この症例の様に、歯内—歯周病変の治療に関して歯内治療を先に済ませておくことで歯周外科時の施術時間短縮のみならず感染部を直視下にて完全に除去することが容易となる。このことから、歯内病変に対する処置を最優先に行い、感染層を少なくしておくことが重要と思われる。

【結論】

歯内—歯周という様な治療形態が複雑になるような症例において、外科処置は最終段階に実施することで、より確実に病因除去が可能になると思われる。また、術中・術後のインフェクションコントロールを維持することにより、長期に渡り安定化を図ることが可能になると思われる。

演題 P91 (歯周)
【2504】

糖尿病ラットに対する歯周外科処置が循環血中 VEGF 濃度に及ぼす影響

大阪歯科大学 歯周病学講座

○森田 浩正、河野 智生、津守 紀昌、重松 伸寛、中田 貴也、梅田 誠

The effect of periodontal surgery for diabetes rats on circulating VEGF concentration

Department of Periodontology, Osaka Dental University

○MORITA HIROMASA, KONO TOMOO, TSUMORI NORIMASA, SHIGEMATSU NOBUHIRO, NAKATA TAKAYA, UMEDA MAKOTO

【目的】Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)は 血管新生や血管透過性に関与するサイトカインである。その発症に血管新生が関わっている固型腫瘍や関節リウマチ患者においては循環血中 VEGF 濃度が高値を示し、臨床の場で確定診断における指標になっている。また、糖尿病の合併症である網膜症患者の場合でも循環血中 VEGF 濃度が健全者と比較して、有意に上昇傾向であることが知られている。現在、糖尿病患者に対しての歯周治療は、日本歯周病学会が発行する「糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン」においては、HbA1c の国際基準を基に歯周処置における合併のリスクを考慮して治療を行っているのが現状であり、必ずしも歯周治療の予後を示すものとは言えない。これまでの我々の研究では、2 型糖尿病モデルラットの歯周組織創傷治癒部の細小血管障害部において VEGF 発現が認められ、その VEGF 発現を介して障害部で未熟な血管の新生を通常より促進する組織像が観察され、VEGF 発現上昇が創傷部の治癒遅延を起こす可能性を報告した。したがって、VEGF は糖尿病患者に対する歯周治療の予後を占うものとして用いられると考えられ、本研究においては循環血中 VEGF 濃度が歯周外科を行うか否かの判断に用いるマーカーとなりうるかどうか明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】生後 8 週齢 GK 系雄性ラットを高脂肪飼料にて 40～45 週長期飼育したものを実験群、同条件下で飼育した SD 系雄性ラットを対照群とした。実験群はあらかじめ、空腹時に血糖値 200mg/dl 以上を示すラットのみを実験群として用いた。実験群および対照群に対し、両側上顎臼歯部口蓋側において外科的に歯周組織欠損を作成し、術後 3, 5, 7 日目、及び歯周外科処置を行っていないラットを安楽死させた。10%中性緩衝ホルマリンにて灌流固定の際にラット心臓部より、循環血を約 7ml 採血し、遠心分離を行い血漿成分のみを採取した。採取した血漿成分を用いて ELISA Kit を用いて循環血中の VEGF 濃度を両群間において比較を行った。また、歯周組織欠損部を含む試料を抗 VEGF 抗体で免疫染色し観察した。

【結果および考察】歯周外科を行っていないラットを実験群、対照群間で比較し、両群ともに循環血中の VEGF 発現は認められたが、実験群が有意に高い値を認めた。実験期間を通じて、術後それぞれの期間において実験群のほうが対照群より循環血中の VEGF 濃度は有意に高く認められ、さらに、両群ともに術後 3 日目が最高値で、3, 5, 7 日目と継続的な減少傾向を示した。また、両群ともに、未処置時と術後 7 日目における VEGF 濃度において有意差を認めなかった。以上から、2 型糖尿病モデルラットに歯周外科処置を行った場合、術部の早期創傷治癒段階において全身に循環する血液の VEGF 濃度上昇に関与していることが示唆された。

Genipin は *E.coli* LPS が誘導するヒト歯根膜細胞の IL-6 および IL-8 産生を抑制する

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¹

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野²

○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 IL-6 and IL-8 productions from *E.coli* LPS-stimulated human periodontal ligament cells

Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan¹,

Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan²

○SHINDO SATORU¹, HOSOKAWA YOSHITAKA¹, HOSOKAWA IKUKO¹, OZAKI KAZUMI², MATSUO TAKASHI¹

【研究目的】

歯周炎は歯周病関連細菌により惹起される慢性炎症性疾患であり、細菌に対する免疫応答が歯周組織破壊に関与している事が報告されている。*E.coli* LPS は Toll-like receptor 4 (TLR4) のリガンドであり、TLR4 の活性化が歯周炎病変局所において炎症性サイトカイン産生を誘導するということが報告されている。炎症性サイトカインである IL-6 は破骨細胞を活性化することにより歯槽骨吸収に関与している事が明らかとなっている。また、IL-8 は CXC ケモカインの一種であり、好中球をはじめとする白血球を炎症局所に浸潤・集積させる事により歯周組織破壊に関与している事が示唆されている。genipin はクチナシの果実に含まれるイリドイド化合物であり、漢方薬の成分として用いられている。genipin には抗酸化作用、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、歯周組織構成細胞の IL-6 や IL-8 産生に与える影響に関しては報告が少なく不明な点が多い。本研究では、*E.coli* LPS が誘導するヒト歯根膜細胞 (HPDLC) の IL-6 および IL-8 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。genipin にて HPDLC を 1 時間前処理後 *E.coli* LPS 刺激を行い、IL-6 および IL-8 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、*E.coli* LPS 誘導 IL-6、IL-8 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、*E.coli* LPS 刺激を行い IL-6、IL-8 産生に関して ELISA 法を用い検討した。

【成績】

genipin 前処理は *E.coli* LPS が誘導した IL-6 および IL-8 産生を有意に抑制した。また、genipin 前処理は NF- κ B シグナル伝達経路において *E.coli* LPS が誘導した NF- κ B p65 のリン酸化を抑制した。MAPKs シグナル伝達経路に関しては *E.coli* LPS が誘導した 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。さらに、ERK inhibitor および NF- κ B inhibitor は有意に *E.coli* LPS が誘導した IL-6 および IL-8 産生を抑制した。

【考察および結論】

今回の結果より、*E.coli* LPS 刺激による IL-6、IL-8 産生が HPDLC に誘導されることで、歯周炎病変局所において破骨細胞活性化による歯槽骨吸収ならびに好中球をはじめとする白血球の過剰な浸潤・集積を引き起こす可能性が示された。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、*E.coli* LPS 刺激 HPDLC の IL-6、IL-8 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 は破骨細胞活性化、好中球をはじめとする炎症性細胞の歯周炎病変局所への浸潤、集積を減少させることで、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。

低酸素環境と *P. gingivalis* 由来リポ多糖はヒト口腔上皮細胞での炎症関連因子および血管関連因子の発現を調節する
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

○木戸 淳一、中島 由紀子、板東 美香、稲垣 裕司、永田 俊彦

Hypoxia and *P. gingivalis*-lipopolysaccharide regulate the expression of molecules related to inflammation and change of blood vessels in human oral keratinocytes

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School

○KIDO JUN-ICHI, NAKAJIMA YUKIKO, BANDO MIKA, INAGAKI YUJI, NAGATA TOSHIHIKO

【研究目的】歯周病は、低酸素状態である歯周ポケット内において嫌気性の歯周病原細菌によって誘発される。歯周ポケット内の低酸素環境は、歯周病原細菌だけでなく歯周組織の恒常性に対しても影響を及ぼしている。低酸素環境下では、生体内で低酸素誘導因子(Hypoxia-inducible factor: HIF)を介して様々な炎症反応が引き起こされることが知られている。一方、歯周病の主要な病原因子である *P. gingivalis* 由来リポ多糖(P-LPS)は、Toll-like receptor (TLR)を介して複数の炎症性サイトカインの発現を増加させる。本研究では、低酸素環境と P-LPS によるヒト口腔上皮細胞での炎症関連因子、血管関連因子や抗菌ペプチドなどの発現への影響について検討した。【材料と方法】ヒト口腔上皮細胞株 (TR146) を低酸素環境下 (1% O₂) で培養した。培養した細胞から通法に従って RNA および蛋白質の画分を抽出した。TLR, TNF- α , IL-6, IL-8, adrenomedullin (ADM), VEGF, angiopoietin-like 4 および S100A8/S100A9 などの遺伝子発現は、RT-PCR および定量的 PCR により検討した。また、HIF-1 α 蛋白発現は western blotting により分析した。

【結果】低酸素環境下では、細胞中で HIF-1 α 蛋白が蓄積するとともに、TLR2 mRNA 発現が増加し、P-LPS の添加で TLR2 発現はより増強された。さらに、炎症関連サイトカインの TNF- α や IL-8、血管拡張作用を示す ADM および血管新生・再生作用を有する VEGF や angiopoietin-like 4 などの遺伝子発現が増加し、低酸素誘導による ADM 発現の上昇は、HIF 結合阻害剤の chetomin により阻害された。また、低酸素環境と P-LPS はそれぞれ単独の刺激で ADM と TNF- α の発現を増加させ、低酸素環境下で P-LPS を作用させると、単独の場合と比較して ADM と TNF- α のより強い発現増加が認められた。一方、上皮細胞中の IL-6 と抗菌ペプチドの S100A8/S100A9 (Calprotectin) の mRNA 発現は低酸素培養により減少したが、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMPs)の発現は変化が認められなかった。

【考察と結論】歯周ポケット内の低酸素環境と *P. gingivalis* 由来リポ多糖は、炎症関連因子、血管新生や機能の調節因子および抗菌ペプチドなどの発現を調節することにより歯周病の増悪化に影響を及ぼしていると考えられる。

GFP マウス骨髄由来間葉系幹細胞の分化能とサイトカイン受容体の発現

岩手医科大学 歯学部 歯科保存学講座 歯周療法学分野¹

岩手医科大学 生化学講座 細胞情報科学分野²

○滝沢 尚希¹、澤田 俊輔¹、伊東 俊太郎¹、佐々木 大輔¹、帖佐 直幸²、石崎 明²、八重柏 隆¹

Expression of cytokine receptors and differentiation potential of GFP mousebone marrow-derived mesenchymal stem cells.

Division of Periodontology, Department of Conservative Dentistry, School of dentistry, Iwate Medical University¹,

Division of Cellular Biosignal Sciences, Department of Biochemistry, Iwate Medical University²

○ TAKIZAWA NAOKI¹, SAWADA SHUNSUKE¹, ITOU SHUNTAROU¹, SASAKI DAISUKE¹, CHOSA NAOYUKI², ISHISAKI AKIRA², YAEGASHI TAKASHI¹

【目的】

間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSC) は多分化能を有する体性幹細胞である。主として骨髄に存在する MSC は血流を介して各組織に到達し、組織の修復や再生に働くと考えられている。近年では MSC の抗炎症作用ならびに炎症によって傷害を受けた組織修復への関与も注目されている。一方、マウス等のモデル動物を利用した再生や組織修復を評価するうえで、生体内で蛍光タンパク質をトレースする *in vivo* イメージング解析は重要なツールとなる。しかしながら、マウス MSC は *in vitro* における長期培養が容易でないことに加え、系統によって MSC マーカーの発現に違いがあることが報告されている。本研究では、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein : GFP) を強発現するトランスジェニックマウス (GFP マウス) より MSC を分離して株化細胞を作製し、それらの性状を詳細に検討した。

【材料および方法】

1. 岩手医科大学動物研究センターより供与された生後 3 週齢の GFP マウスから脛骨を摘出した。生理食塩水で洗浄後に両骨端を切断し、2mM EDTA, 0.5%牛胎児血清を含むリン酸緩衝液で骨髄内より細胞を流出させ、採取した。得られた細胞をコラーゲンコートデッシュに播種し、接着性の細胞のみを 37℃, 低酸素条件下 (5% O₂, 5% CO₂) にて市販の MSC 増殖培地で 2 週間培養した。
2. 増殖した MSC 様細胞に hTERT (human telomerase reverse transcriptase) および SV40 (simian vacuolating virus 40) large T-antigen 遺伝子のプラスミドベクターを Lipofectamine LTX 試薬にて導入し、薬剤耐性選択後、限界希釈法にて単一細胞由来細胞株を樹立した。
3. 樹立した細胞株について以下に示す性状を評価した。i) PDL (population doubling level) を指標に増殖能を評価した。ii) フローサイトメーターで MSC マーカーの発現を解析した。iii) 骨ならびに脂肪分化誘導培地中でそれぞれ培養し、分化能を評価した。iv) それぞれの細胞株におけるサイトカインならびにサイトカイン受容体の mRNA 発現をプライマーアレイにて網羅的に解析した。

【結果と考察】

GFP マウスの骨髄より得られた接着性の細胞より、21 系統 (SG1~SG21) の細胞株を樹立した。それぞれの細胞株において表面抗原マーカーの発現を解析したところ、95%の細胞株において主要な MSC マーカーである Sca-1 が陽性であった。一方、全ての細胞株で造血幹細胞マーカーの CD11b ならびに CD45 は陰性であった。Sca-1 陽性を示す細胞株から増殖能に長けた 3 細胞株 (SG2, SG3, SG5) を選択し、骨ならびに脂肪分化能を評価した。その結果、SG2 は骨と脂肪の両者へと効率良く分化した。一方で、SG3 は SG2 よりも脂肪への分化能が高かったが、骨分化能は低かった。また、SG5 は脂肪分化が認められないものの、SG2 や SG3 と比較して高い骨分化能を示した。さらに、これら 3 細胞株においてサイトカインならびにサイトカイン受容体の mRNA 発現を比較したところ、MSC の増殖や分化を制御するサイトカインである bone morphogenetic protein (BMP) と transforming growth factor (TGF)- β の受容体の mRNA 発現に差異が認められた。すなわち、SG2 は SG3 や SG5 と比較して TGF- β receptor 2 (Tgfr2) の発現が低く、SG3 は SG2 や SG5 と比較して BMP receptor 1B (Bmpr1b) が高発現を示した。これらの結果より、細胞の増殖や分化を調節するサイトカイン受容体、特に Bmpr1b や Tgfr2 の発現量が MSC の分化に関与する可能性が示唆された。本研究で樹立された細胞株における分化能の違いを様々な観点から詳細に比較することによって、これらの差異を生かした部位特異的な幹細胞治療に繋がる可能性が期待される。MSC を用いた歯周組織再生療法の早期臨床応用を目指して、マウス MSC を用いた *in vivo* 実験は不可避であり、未だ報告のない蛍光発現 MSC 株の樹立と解析は歯科臨床応用においても欠かせないといえる。

演題 P95 (歯周)
【3103】

ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドの抜歯窩治癒促進効果

北海道大学 大学院歯学研究科 歯周・歯内療法学教室

○加藤 昭人、宮治 裕史、光銭 裕太、小川 幸佑、百瀬 起人、西田 絵利香、村上 秀輔、井原 朝子、吉田 崇、田中 佐織、川浪 雅光

Effect of nano-beta-TCP/collagen scaffold on healing of extraction sockets

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

○KATO AKIHITO, MIYAJI HIROFUMI, KOSEN YUTA, OGAWA KOSUKE, MOMOSE TAKEHITO, NISHIDA ERIKA, MURAKAMI SYUSUKE, IBARA ASAKO, YOSHIDA TAKASHI, TANAKA SAORI, KAWANAMI MASAMITSU

【目的】

生体材料の表面特性，特に材料表面へのナノテクスチャの構築は，材料の表面積を増大させ，濡れ性やタンパク吸着性を変化させることから，再生治療における自己組織化プロセスに強い影響を与えると思われる．一方， β -三リン酸カルシウム (β -TCP) は骨誘導性を有するバイオセラミックで，生体親和性が高く骨補填材として整形外科分野などで広く臨床応用されている．当教室ではこれまでに，ナノ粒子化した β -TCP を用いてコラーゲンスキャフォールド表面に 3 次元微細構造の構築を行い，生体適合性に与える効果を検討してきた．本研究ではナノ β -TCP コラーゲンスキャフォールドをイヌ抜歯窩へ埋植して治癒効果を評価した．

【材料および方法】

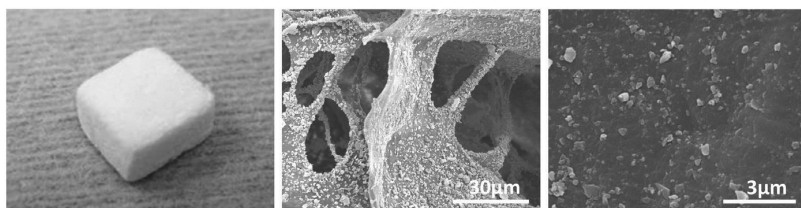
β -TCP 粒子 (平均粒径 $2.3\mu\text{m}$ ，富田製薬より提供) を 100nm 程度の大きさに粉碎後， $0.2\text{wt}\%$ コール酸ナトリウムを分散剤として， n -メチルピロリドンを主成分とした分散液 ($1\text{wt}\%$) を作製した．次にコラーゲンスポンジ (テルダーミス®，オリンパステルモバイオマテリアルより提供) を分散液に浸漬する方法でコーティングを行い，洗浄乾燥してナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドとした．スキャフォールド表面の SEM 観察を行い，MC3T3-E1 細胞を播種して細胞親和性を評価した．さらにビーグル犬の上顎第一前臼歯抜歯窩に $5 \times 3 \times 3\text{mm}$ に調整したナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドおよびコントロールとして未処理のコラーゲンスポンジの埋植試験を行い，2 週後，5 週後に新生骨形成率を計測して抜歯窩治癒効果を評価した．

【結果と考察】

ナノコーティングの結果，SEM 観察においてコラーゲンスポンジ表面にナノ β -TCP の粒子層が構築されているのが認められ，細胞培養試験によって細胞増殖性の向上が認められた．ビーグル犬抜歯窩への埋植試験の結果，2 週のナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールド埋植サンプルでは，抜歯窩内に既存骨から連続する新生骨形成が活発に認められ，同時にスキャフォールドへの良好な組織侵入性および吸収性が示された．5 週では抜歯窩内にスキャフォールドの残存は認められず，中心部まで新生骨で満たされていた．一方，コラーゲンスポンジを埋入した抜歯窩の 2 週では骨形成はわずかであり，5 週抜歯窩では幼若骨の形成が多量に認められたが，サンプルの一部では抜歯窩中心部が結合組織で占められ不十分な骨形成状態であった．2 週の抜歯窩に対する新生骨形成率は，ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールド埋植サンプルで 24.4% であり，コラーゲンスポンジ埋植サンプルの 7.6% に対して有意に大きかった．

【結論】

ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールドは良好な生体親和性および適合性を有し，イヌ抜歯窩の治癒を促進した．



ナノ β -TCP/コラーゲンスキャフォールド

SEM像

SEM像(拡大)

コンポジットレジン表面へのマイクロ・ナノ 3 次元微細構造の付与

北海道大学大学院歯学研究科 歯周・歯内療法学教室

○宮治 裕史、西田 絵利香、今村 琢也、長尾 敬志、田中 佐織、川浪 雅光

Fabrication of 3D micro/nano structures on composite resin

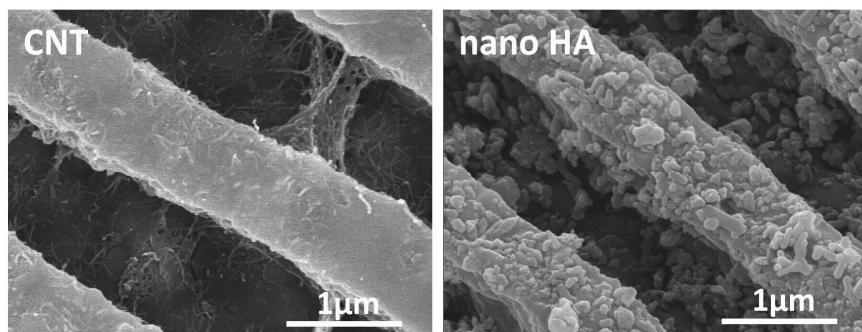
Department of Periodontology and Endodontology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Sapporo, Japan

○ MIYAJI HIROFUMI, NISHIDA ERIKA, IMAMURA TAKUYA, NAGAO KEISHI, TANAKA SAORI, KAWANAMI MASAMITSU

【目 的】コンポジットレジン (CR) の生体材料への応用が期待されているが、CR の生体適合性は十分であるとは言えない。近年、バイオマテリアル表面のマイクロ・ナノ構造が細胞の形態や接着性、さらに増殖・分化に強く影響を与えることが報告されている。そこで CR 表面の生体適合性向上を目的として、CR 表面への 3 次元微細構造の構築を行った。まず、マイクロパターンを CR へインプリントした後に、カーボンナノチューブ (CNT) 分散液、あるいはハイドロキシアパタイト (HA) のナノ顆粒分散液を用いてパターン面のコーティングを行った。また、培養細胞を播種して細胞形態の SEM 観察を行い、マイクロ・ナノ微細構造の効果について評価した。

【材料および方法】PET 製のマイクロパターンインプリント用モールドに、CR (ユニフィルフロー, GC) を圧接光硬化してパターンを転写した。マイクロパターンにはグループ、ホール、ピラー形状 (深さ: $2\mu\text{m}$, ピッチ: $1\mu\text{m}$) を設定した。次に多層 CNT (直径約 10nm, NC7000, Nanocyl SA), およびナノ HA (平均粒径 60nm, 富田製薬より提供) の分散液を作製後、CR のマイクロパターン面を各分散液に浸漬させる方法でコーティングした。まず、ナノコーティング前後の表面構造を SEM にて観察した。続いて MC3T3-E1 細胞を各パターンに播種して 24 時間培養後、細胞形態を SEM 観察した。

【結果および考察】CR 表面にインプリントされたマイクロパターン面をナノコーティングすることで、表面に CNT, ナノ HA が付着して、ナノスケールの 3 次元微細構造が構築された (図)。細胞培養試験の結果、ナノコーティングの有無、またはナノ材料の違いによって細胞の形態変化を認めた。ナノコーティング無しのマイクロパターン面における細胞形態はホール形状で良好な細胞伸展を示したが、ピラー形状では細長い形態を示し伸展不良であった。またグループ形状ではグループの方向に沿って細い細胞が整列する配向性を認めた。次に CNT コーティング後ではホール、ピラー形状ともに細胞伸展が良好であり、グループ形状でも配向性が消失して良好に細胞伸展しており、CNT によるナノ微細構造は細胞の足場としての特性を強く発揮すると思われる。一方 HA コーティング後では、どのパターンにおいても細胞は細長い形態で細胞伸展は不良であったが、グループ形状での配向性は維持されていた。ナノ HA による微細構造は CR のマイクロパターンの特性を減弱させると思われた。以上より、CR 表面に付与されたマイクロ・ナノ 3 次元微細構造は、細胞の形態や配向性に影響を与えることが明らかとなり、マイクロパターンニングとナノコーティングの条件を最適化することで CR の生体適合性を向上できる可能性が示された。



歯肉上皮細胞におけるカプサイシン受容体 TRPV1 の発現および機能解析

日本学術振興会 特別研究員¹

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野²

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔保健学分野³

新潟大学医歯学総合病院 歯科総合診療部⁴

大阪大学大学院歯学研究科 歯周病分子病態学⁵

○高橋 直紀¹、松田 由実³、山田 ひとみ³、中島 貴子⁴、多部田 康一²、村上 伸也⁵、山崎 和久³

Analysis of expression and function of capsaicin receptor TRPV1 in gingival epithelial cells

Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science¹, Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science, Niigata University Faculty of Dentistry, Niigata, Japan², Division of Oral Science for Health Promotion, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan³, General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata, Japan⁴, Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan⁵

○TAKAHASHI NAOKI¹, Matsuda Yumi³, Yamada Hitomi³, Nakajima Takako⁴, Tabeta Koichi², Murakami Shinya⁵, Yamazaki Kazuhisa³

【目的】

細菌感染による慢性炎症に伴う歯周組織破壊を特徴とする歯周炎において、歯肉上皮細胞は物理的なバリアーとして生体防御の最前線で重要な役割を担っている。近年同定された Transient receptor potential (TRP) タンパクファミリーは、温度や機械刺激、化学刺激により活性化される感覚センサーとして機能する陽イオンチャネルタンパクであることが知られている。口腔は外来性の細菌や飲食物が最初に体内に入る場所であり、そこに存在する上皮細胞にはこれらのタンパクが選択的に局在し、高度に機能していることが予測されるが、その詳細は知られていない。TRP ファミリーの中で、カプサイシン・酸・熱により活性化される TRPV1 が炎症性疾患の病態形成に関与していることは既に報告されているが、歯周炎における役割は不明である。本研究では歯周組織における TRPV1 の発現解析とその機能を明らかにすることで歯周炎の発症・進行への関与を検討することである。

【材料および方法】

マウス歯周組織および、インフォームドコンセントが得られた患者より採取したヒト歯周組織における TRPV1 の遺伝子発現を PCR 法にて、タンパクの発現を免疫組織染色法にて検討を行った。ヒト歯肉上皮細胞株 epi4 (大阪大学大学院歯学研究科 村上伸也教授より供与) における TRPV1 の遺伝子発現を PCR 法にて、タンパクの発現を Western blot 法にて検討を行った。また TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンを用いて、細胞増殖および遊走能を MTT assay および Wound healing assay により検討を行った。さらに、歯周炎の病態形成におけるカプサイシンの影響を検討するために、歯周炎モデルマウスにカプサイシンを食餌に混和して投与し、歯槽骨吸収および歯周組織における各種遺伝子発現の解析を行った。

【結果および考察】

マウスおよびヒト歯周組織において TRPV1 が遺伝子レベルで発現しており、上皮細胞において高発現していることが免疫組織染色法により確認された。epi4 においても TRPV1 の発現が遺伝子レベル、タンパクレベルで発現していることが確認された。カプサイシン刺激により、細胞増殖および遊走が促進されることが in vitro で確認され、その効果が TRPV1 のアゴニストである SB-366791 により抑制された。歯周炎モデルマウスにおいて、カプサイシン投与群はコントロール群に比較して歯周炎の発症・進行が抑制される傾向にあることが確認された。その分子生物学的なメカニズムの検討には更なる解析が必要である。

切迫早産と低体重児出産における歯周病原細菌とその抗体価に関する研究

東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 歯周病学分野¹

北海道医療大学 歯学部口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野²

○御給 美沙¹、葉 暢暢¹、片桐 さやか¹、小林 宏明¹、竹内 康雄¹、南原 弘美¹、須田 智也¹、
池田 裕一¹、須藤 毅頭¹、長澤 敏行²、和泉 雄一¹

The role of periopathogenic bacteria and anti-periopathogenic immunoglobulin in threatened preterm labor and preterm low birth weight cases

Department of Periodontology, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan¹, Section of Periodontology and Endodontology, Health Science University of Hokkaido, Sapporo, Japan²

○GOKYU MISA¹, YE CHANGCHANG¹, KATAGIRI SAYAKA¹, KOBAYASHI HIROAKI¹, TAKEUCHI YASUO¹,
NANBARA HIROMI¹, SUDA TOMONARI¹, IKEDA YUICHI¹, SUDO TAKEAKI¹, NAGASAWA TOSHIYUKI²,
IZUMI YUICHI¹

【目的】 歯周病は、切迫早産や低体重児出産に影響を与えていると考えられているが、どのような歯周病原細菌が関与しているかについては不明な点が多い。本研究の目的は、口腔内プラークサンプル・唾液と胎盤における歯周病原細菌を定量し、また、その血清抗体価を計測することにより、歯周病原細菌の出産に与える影響を検討することである。

【方法】 東京医科歯科大学医学部附属病院周産診療科を受診している妊産婦 64 名（切迫早産妊産婦 28 名、健康対照妊産婦 36 名）から、口腔内のプラークサンプルと唾液を採取した。また、出産時に胎盤を回収保存した。サンプル中の *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.), *Porphyromonas gingivalis* (Pg.), *Tannerella forsythia* (T.f.), *Treponema denticola* (T.d.), *Fusobacterium nucleatum* (Fn.), *Prevotella intermedia* (Pi.) 歯周病原細菌を Taqman-probe を用いた Real Time PCR 法にて定量した。また、末梢血から血液を採取し、歯周病原細菌に対する血清 IgG 抗体価を ELISA 法にて測定した。本研究は、東京医科歯科大学医学部および歯学部倫理審査委員会の承認を得て行った。

【成績】 64 名の妊産婦のうち、13 名が早期低体重児出産であった。プラークサンプル、唾液、胎盤において、歯周病原細菌の検出には個体差が認められた。定量 Real Time PCR にて、プラーク中の Pg. と T.f. 量が、早期低体重児出産群で有意に高い値を示した。また、唾液中の Pi. 量が、早期低体重児出産群で有意に高い値であった。血清抗体価に関しては、抗 Pg. 血清 IgG 抗体価が早期低体重児出産群で有意に高い値を示した。また、Pg. の検出された 21 名において、抗 Pg. 血清 IgG 抗体価と口腔内の Pg. 検出量には、有意な相関が認められた。

【結論】 口腔内の Pg., T.f., Pi. の存在が早期低体重児出産に影響を与えている可能性が考えられる。また、歯周病原細菌は、どの菌も胎盤に到達できることが確認された。抗 Pg. 血清 IgG 抗体価の上昇が早期低体重児出産に関連していたことから、抗 Pg. 抗体が生体に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

演題 P99 (歯周)
【2504】

段差植毛歯ブラシのプラーク除去効果について

鶴見大学短期大学部 歯科衛生科¹

小林製薬株式会社²

○小林 一行¹、渡辺 孝章¹、鳥越 直²、山口 康代²、玉木 裕子¹、松田 裕子¹

Plaque removal efficiency of bristle toothbrush which gave the level difference

Department of Dental Hygiene, Tsurumi Junior College, Yokohama, Japan¹, KOBAYASHI Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan²

○KOBAYASHI Kazuyuki¹, WATANABE Takaaki¹, TORIGOE Sunao², YAMAGUCHI Yasuyo², TAMAKI Yuko¹, MATSUDA Hiroko¹

【研究目的】

歯周病の予防や治療には、原因であるプラーク除去が必要不可欠であり、歯ブラシによる患者自身が行うプラークコントロールが重要である。歯ブラシの植毛状態はプラーク除去に大きく関わる部分であり、これを改良した様々な形態の歯ブラシが開発されている。現在までに毛先に段差をつけた歯ブラシが開発され研究が行われているが、臨床報告は少ない。そこで本研究は、段差植毛歯ブラシ(生葉歯ブラシ[®]、小林製薬)の使用による歯肉の炎症改善度、プラーク除去効果および使用感について、従来の平切り植毛歯ブラシと比較検討した。

【材料および方法】

被験者は、某製薬会社研究所の研究員で歯肉に炎症があり、実験の趣旨を説明し同意が得られた34名とした。各々17名を段差植毛歯ブラシ群(男性10名、女性7名、平均36.12±10.20歳)、平切り植毛歯ブラシ群(男性11名、女性6名、平均36.12±6.87歳)の2群に分け盲検法により調査を行った。また、ブラッシング指導は、個別にリーフレットおよび顎模型を用い十分な説明を行った。歯ブラシ刷毛部の仕様は、段差植毛歯ブラシ：毛穴配列3列、毛の長さ12mm(テーパー付与)、9mm。平切り植毛歯ブラシ：毛穴配列3列、毛の長さ9mm。毛のかたさ(座屈強度)は同等とした。

歯肉の炎症改善度を調べる目的でブラッシングを2週間実施(スクラッピング法、5分間、2回/日)、術前・術後のGIを評価し、術前に対する術後のGIの割合から歯肉の炎症改善度を比較検討した。また、プラーク除去効果を調べる目的でブラッシングを1日停止した後、術前のPCRを測定し、5分間スクラッピング法でブラッシングを実施、術後のPCRを測定して術前に対する術後のPCRの割合からプラーク除去効果を比較検討した。併せて両歯ブラシの使用感についての質問紙調査を実施し比較検討した。

【成績】

歯肉の炎症改善度について、段差植毛歯ブラシ群、平切り植毛歯ブラシ群、両群ともに2週間のブラッシング後ではGIの有意な減少が認められ、歯肉の炎症は改善した(段差植毛歯ブラシ群:0.83±0.41 → 0.61±0.29, 平切り植毛歯ブラシ群:0.77±0.42 → 0.55±0.26; Wilcoxon signed-rank test, p<0.01)。また、両群間の歯肉の炎症改善度に統計的有意差は認められなかった。プラークの除去効果について、段差植毛歯ブラシ群と平切り植毛歯ブラシ群間に有意差は認められなかった(段差植毛歯ブラシ群:48.95±13.57%, 平切り植毛歯ブラシ群:45.22±13.35%)。また、隣接面におけるプラーク除去効果も同様で有意差は認められなかった。歯ブラシの使用感についての質問紙調査では、すべての項目で段差植毛歯ブラシ群が平切り植毛歯ブラシ群に比べ満足度が同等かそれ以上であった。

【考察・結論】

段差植毛歯ブラシの歯肉の炎症改善度およびプラーク除去効果は、従来の平切り植毛歯ブラシと同等であった。現在までに段差植毛歯ブラシは平切り植毛歯ブラシに比べ清掃効果が高く、特に歯間部に毛先が到達することが報告されている^{1,2)}。本研究では報告されている段差植毛歯ブラシと刷毛部の植毛配列様式が異なることや段差がよりあるために、長い植毛部のテーパーのついた毛先は歯間部に入りやすいが、短い植毛部の毛先は入りにくいこと、また、長い植毛の撓み方が清掃効果に影響したことが考えられる。段差植毛歯ブラシの使用感が優れていたことについては、長い植毛部のテーパーのついた毛先が歯間部に到達していることを実感できたことに起因していると考えられる。

【文献】

- 1) 徳井 香 ほか. In vitro における段差植毛歯ブラシの歯間部清掃効果. 口腔衛生学会誌 2005;55(4):467.
- 2) 尾崎哲則 ほか. 段差をもたせて植毛した歯ブラシの歯垢除去効果. 口腔衛生学会誌 2005;55(4):468.

演題 P100 (歯周)
【2504】

マクロファージにおけるアメロジェニン刺激が関与する pathway の検討

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

○後村 亮、豊田 敬介、福田 隆男、讃井 彰一、西村 英紀

The effect of amelogenin on mRNA expression profiles in human macrophage cell lines.

Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University, Kyushu, Japan

○ATOMURA RYO, TOYODA KYOSUKE, FUKUDA TAKAO, SANUI TERUKAZU, NISHIMURA FUSANORI

【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、長年 EMD の作用機序の解明を試みる研究が続けられてはいるにもかかわらず、歯周組織再生・歯肉上皮の down growth 阻害・抗炎症作用などに対する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。一方、EMD による歯周外科処置に、疼痛・腫脹の軽減を伴う治癒促進効果があることが経験的に知られているが、実際アメロジェニンが炎症性/抗炎症性サイトカイン産生の面から抗炎症作用を示す報告が存在する(Almqvist et al: Cytokine., 58:2012)。本研究ではアメロジェニンの免疫応答に及ぼす影響を検討することを目的とし、マイクロアレイ解析によりマクロファージ株におけるアメロジェニン刺激が関与する遺伝子群について網羅的解析を行った。

【材料及び方法】

1. 使用細胞：ヒトマクロファージ様細胞株 U-937
2. アメロジェニンの精製：マウス胎児 cDNA より GST 融合アメロジェニンを作製後(pGEX Vector)、GST カラムクロマトグラフィーと PreScission Protease(GE Healthcare)による on column 精製
3. マイクロアレイによる変動遺伝子群の網羅的解析：amelogenin (10 μ g/mL)で U937 細胞を 0, 4, 8, 12, 24 時間の time course で刺激後、total RNA を Isogen2-RNeasy Hybrid 法にて抽出し、各時間における遺伝子発現をマイクロアレイ(illumina 社 HumanHT-12 v4chip)により網羅的に解析した。
4. アメロジェニン刺激による変動遺伝子の pathway 解析：amelogenin 無刺激(0 時間)をコントロールとし、各時間における発現増加遺伝子群(Z-score ≥ 2.0 かつ ratio ≥ 1.5 以上)と発現減少遺伝子群(Z-score ≤ -2.0 かつ ratio ≤ 0.66)について、DAVID software を用いて変動遺伝子群の pathway を検証した。
5. 炎症関連遺伝子群の発現変動比較：炎症関連遺伝子群を GO(Gene Ontology term)解析で抽出し、コントロールに対する各時間の遺伝子発現変動をヒートマップ作成により比較検討した。

【結果】

1. アメロジェニン刺激により増幅した代表的な pathway には Cell cycle, DNA repair など細胞増殖に関連する pathway が上位を占めていた。
2. アメロジェニン刺激により減少した代表的な pathway には Allgraft rejection, Graft-versus-host disease, Type1 diabetes mellitus など免疫制御に関連する pathway が上位を占めていた。
3. 炎症関連遺伝子群のヒートマップにおいて、TNF, IL-18, CXCL16 など多くの遺伝子の減少が amelogenin 刺激の 4-8 時間後で確認された。IL-8 のみ 4 時間で上昇後、24 時間でベースラインまで減少がみられた。

【考察】

ヒトマクロファージ様細胞株 U-937 において、アメロジェニン刺激で細胞増殖が活性化されることが示唆された。一方、免疫制御系の遺伝子群の減少が確認されたが、これらには MHC classII 関連遺伝子が多数含まれていたことより、抗原提示能の低下に起因している可能性が示唆された。今後はこれらの遺伝子発現が、炎症性サイトカイン産生に及ぼす詳細なカスケードを検討し、アメロジェニンによる抗炎症作用の詳細について検討していく必要がある。

【結論】

ヒトマクロファージ様細胞株 U-937 において、アメロジェニン刺激で細胞増殖能の活性化および免疫抑制による抗炎症作用が示唆された。

局所麻酔と超音波スケーラーを用いたスケーリングが健全な若年成人の自律神経活動に及ぼす影響

北海道大学大学院 歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室

○小田中 瞳、下地 伸司、竹生 寛恵、大寫 理紗、菅谷 勉、川浪 雅光

Influence of Local Anesthesia and Ultrasonic Scaling on Autonomic Nervous Activity in Healthy Young Adults

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science, Hokkaido University
Graduate School of Dental Health, Sapporo, Japan

○ ODANAKA HITOMI, SHIMOJI SHINJI, TAKEFU HIROE, OSHIMA RISA, SUGAYA TSUTOMU,
KAWANAMI MASAMITSU

【目的】日本は 2007 年に超高齢社会を迎え、高齢者に対する歯科治療の必要性は年々増加している。高齢者の多くは、全身的基礎疾患を有しており、高齢者に対する歯科治療は中枢神経系および循環器系の全身的偶発症を起こす危険性があるため、治療が消極的になることがある。また高齢者以外でも歯科治療に不安感や恐怖心をもっている患者は多く、それらの患者に対して安心・安全に歯科治療を行うためには、その治療が全身状態に及ぼす影響を解明することが重要である。そこで我々は、歯科治療が全身状態に及ぼす影響を評価するための自律神経活動モニターシステムを開発してきた（日本歯科保存学会学術大会 2011）。本システムは心電図の R-R 間隔を高周波成分（HF）と低周波成分（LF）に周波数解析することで得た自律神経活動とデンタルユニットの諸動作や歯科治療動作の情報とを簡便かつリアルタイムに表示、解析することが可能となっている。本研究では、歯科治療の中でも偶発症の発症頻度が高い局所麻酔および超音波スケーラーを用いたスケーリングを行った際に健全な 20 歳代の若年成人の自律神経活動に及ぼす影響について検討を行った。

【対象と方法】被験者は全身的基礎疾患を有しないボランティア（北海道大学病院歯科診療センター所属歯科医師 10 名、 25.9 ± 0.99 歳）とした。最初にデンタルユニットに着席後、質問票への回答および唾液中のクロモグラニン A の測定を行い、被験者の歯科治療に対する不安感、恐怖心および現在のストレス状態の評価を行った。次に治療前の安静時（座位および横臥位それぞれ 2 分間）、歯科用キシロカイン®カートリッジを用いた局所麻酔（2 分間）、超音波スケーラーを用いたスケーリング（2 分間）、治療後の安静時（座位 2 分間）のそれぞれについて収縮期・拡張期血圧、心拍数および自律神経活動の測定を行った。それらの測定は本モニターシステムを用いて血圧は 5 分置き、心拍数および自律神経活動（交感神経活動の指標となる LF/HF および副交感神経活動の指標となる HF）は連続的に行い、処置ごとのそれぞれの平均値を計測し、変動特性について検討を行った。

【成績】（処置中の血圧の経時的変化）収縮期血圧および拡張期血圧の平均値（mmHg）はそれぞれについて測定開始時で 114.2 ± 7.96 、 73.5 ± 5.19 、5 分後で 110.5 ± 11.48 、 64.3 ± 7.31 、10 分後で 108.6 ± 14.01 、 64.8 ± 8.33 、20 分後で 111.9 ± 8.93 、 67.5 ± 9.26 だった。（処置ごとの心拍数の変化）心拍数の平均値（bpm）は、治療前（座位）で 69.94 ± 8.28 、治療前（横臥位）で 58.86 ± 13.77 、局所麻酔時で 54.55 ± 15.17 、スケーリング時で 60.42 ± 10.62 、治療後（座位）で 61.84 ± 14.32 だった。（処置ごとの自律神経活動の変化）LF/HF の平均値は、治療前（座位）で 5.00 ± 3.47 、治療前（横臥位）で 3.08 ± 2.09 、局所麻酔時で 1.46 ± 0.78 、スケーリング時で 1.35 ± 0.68 、治療後（座位）で 3.49 ± 2.65 だった。HF の平均値（Hz）は、治療前（座位）で 374.09 ± 282.71 、治療前（横臥位）で 282.71 ± 313.40 、局所麻酔時で 479.82 ± 323.95 、スケーリング時で 495.39 ± 303.59 、治療後（座位）で 397.96 ± 215.71 だった。血圧は測定期間を通して大きな変化は認められなかった。自律神経活動の中で、特にストレスの指標となる交感神経活動を示す LF/HF の平均値は、局所麻酔およびスケーリングといった歯科処置よりも治療開始時または治療終了後に上昇する傾向がみられ、特に治療開始前のユニットに座った状態で最も上昇した。これらのことから局所麻酔のような侵害刺激よりも治療を行う前の不安感、恐怖心の方がストレスになっている可能性が示唆された。そのために治療前に不安感、恐怖心を減少させる対応を行うことが安心・安全な歯科治療を実践するため重要と思われる。また治療後にも LF/HF が上昇したのは、横臥位から座位に姿勢を変更することにより静脈環流量が減少したため、ホメオスタシスが働き、交感神経活動が活発化したためかもしれない。

【結論】健全な若年成人に局所麻酔（歯科用キシロカイン®カートリッジ）とスケーリングを行った場合、実際の処置中よりも処置開始前のユニット着席時に最も交感神経活動が上昇する。

演題 P102 (歯周)
【2504】

禁煙がヒト歯周組織の創傷治癒に与える効果
日本歯科大学生命歯学部 歯周病学講座
○五十嵐・武内 寛子、沼部 幸博

The effect of smoking cessation on wound healing of human periodontal tissue
Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Tokyo, Nippon Dental University
○Igarashi-Takeuchi Hiroko, Numabe Yukihiro

【目的】今日、健康増進や分煙活動により、徐々に禁煙人口の増加が認められる。しかしながら、禁煙後の歯周組織の変化についての報告は少ない。そこで今回我々は、喫煙時と禁煙後の歯周組織の反応、特に創傷治癒に着目し *in vitro* により検討した。

【方法】健康歯周組織より樹立した、ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)およびヒト歯根膜線維芽細胞(PDL cells)を用いた。Nicotine 1 μ g/ml 含有 0.5%FBS DMEM/F-12 に 24 時間作用させ、顕微鏡および SEM にて細胞内に空胞様構造物を確認後、3 群(対照群、喫煙群:再び Nicotine 含有培地に交換、禁煙群: Nicotine を含まない培地に交換)に分け、6 日間培養を行った。培養後 6、12 時間、1、2、3、4、6 日ごとに細胞増殖および細胞遊走能(スクラッチテスト)の測定、TGF- β 1 および Type I collagen の ELISA 測定を行った。また、細胞への Nicotine の影響を見るために培地に ^3H -nicotine を添加し 24、48 時間培養後、液体シンチレーションカウンターにて測定を行った。

【成績】Nicotine 作用 24 時間後には細胞質内に空胞様構造物が認められたが、禁煙群では時間依存的に消失し、3 時間で完全に消滅した。細胞増殖測定において、喫煙群では時間依存的に有意な減少が認められ($P<0.001$)、禁煙群では有意な増加が認められた($P<0.001$)。TGF- β 1 および Type I collagen 分泌量は禁煙群で有意な増加が認められた($P<0.05$)ものの、対照群よりも減少していた。細胞遊走能測定において、喫煙群は細胞の形態変化が認められ間隙の閉鎖は認められなかったが、禁煙群では間隙の閉鎖が認められた。さらに、Nicotine 作用時間依存的に ^3H -nicotine 量が増加したが($P<0.05$)、禁煙群では有意な減少が認められた($P<0.001$)。

【結論】両細胞において、Nicotine 刺激により細胞質内に空胞様構造物を生じるが、刺激に伴い ^3H -nicotine 量が増加したことから細胞室内に Nicotine が取り込まれることが示唆された。対照群と比べて劣るものの、刺激を除去することにより増殖能、細胞遊走能が回復し、創傷治癒に関わる TGF- β 1 および Type I collagen の成長因子の分泌も認められたことから、喫煙は歯周組織細胞に形態的な変化を起こす一方、禁煙により歯周組織細胞が再活性化するものの、その能力は健常組織に劣ることが示唆された。

航空自衛隊大滝根山分屯基地における口腔衛生指導 (第5報)

奥羽大学 歯学部 口腔衛生学講座

○車田 文雄、佐藤 穂子、佐々木 重夫、木村 裕一、齋藤 高広

Oral hygien guidance for JASDF Ohtakineyama Sub Base (V)

Department of Preventive Dentistry OHU University School of Dentistry, Fukushima, Japan

○KURUMADA FUMIO, SATOH YASYUKO, SASAKI SHIGEO, KIMURA YUTHI, SAITOH TAKAHIRO

【 緒 言 】 先の第136～139回本学会において、航空自衛隊第27警戒群大滝根山分屯基地の隊員等の職場における集団口腔健康管理の目的で、齲蝕活動性および歯周疾患活動性検査を調べる機会を得たので、その結果を発表した。そこで今回、そのデータを基にコントロールとして被験者と同じ国家公務員（国税局職員）を対象として各々の齲蝕活動性試験等の相関傾向を調べた結果、若干の知見を得ることができたので、ここに報告する。

【 方法および結果 】 対象者は、自衛隊隊員等の対照としての国税局職員男女38名である。1. カリオスタット (検体:歯垢): 歯垢の酸産生能テスト青 (-): 口腔清掃は従来とおり。 緑 (+): 間食後の口腔清掃の必要性。黄緑 (++) : 間食における糖分摂取の制限要指導。 黄 (+++) : 食生活全体から糖分摂取の制限要指導。2. CAT 21 バフ (検体:唾液): 唾液リスクテスト A 唾液流出量 5 ml 以上: 口腔内は齲蝕になりにくい状態。2～5 ml 未満: 口腔内は齲蝕になりやすい状態。2 ml 未満: 非常に齲蝕になりやすい状態。B 唾液緩衝能 (指導は上記同様) 赤 (安全域-)、橙 (注意域+)、黄 (危険域++)。3. ミューカウント (検体:唾液): ストレプトコッカスミュータンス簡易菌測定テスト (-): 管壁付着が認められないもの。(+) : 1～10のコロニー様付着確認。(++) : 10以上のコロニー様付着確認。(+++): 管壁一面に細かなコロニー様付着確認。同時に大きなコロニー様付着も確認。これらのうち、唾液リスクテスト (CAT 21 バフ) の唾液流出量と唾液緩衝能との関係を調べた。すなわち5 ml 以上 (0)、2～5 ml 未満 (1)、2 ml 未満 (2) とスコア化し、同様に、赤: - (0)、橙: + (1)、黄: ++ (2) 4. ペリオスクリーン (検体:唾液): 免疫学的に唾液中のヘモグロビンを検出 A 飲食又は歯磨き後、2時間以上経過後、検体を採取 B 反応試験紙下端の試料添加部を測定試料に浸漬 C 反応試験紙を浸漬したまま5分後に反応試験紙の抗体固定下部を観察し、判定見本と比較判定 (-) 陰性: $0 \mu\text{g/mL}$ (+) 陽性: $1.0 \mu\text{g/mL}$ (++) 陽性: $5 \mu\text{g/mL}$

【 考察および結論 】 24時間勤務体制が任務である職業の自衛官に対し、同じ国家公務員であり比較的勤務時間が定時制である国税局職員をコントロールとして、齲蝕活動性および歯周疾患活動性を観た場合、不規則な時間を余儀なくされる自衛官の方が両活動性が高くなると推察されるが、現在、最終データ処理中のため、3種類の齲蝕活動性試験とDMF歯数との関係および歯周疾患の検査についての詳細は、当日の学会にて発表する。

演題 P104 (歯周)
【2504】

ヒト上皮細胞における Interleukin-1 α による S100A9 遺伝子の転写調節

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

○板東 美香、廣島 佑香、稲垣 裕司、木戸 淳一、永田 俊彦

Transcriptional regulation of a S100A9 gene by interleukin-1 α in human keratinocytes.

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan

○BANDO MIKA, HIROSHIMA YUKA, INAGAKI YUJI, KIDO JUN-ICHI, NAGATA TOSHIHIKO

【研究目的】上皮細胞は自然免疫を担う種々の抗菌ペプチドを産生することによって感染を防御する機能を有している。抗菌ペプチドの1つであるカルプロテクチンは、S100A8 と S100A9 のサブユニットから構成され、歯周病原細菌の口腔上皮細胞への付着および増殖を抑制することが知られている。私たちはこれまでにヒト上皮細胞において恒常的に産生される Interleukin-1 α (IL-1 α) が、カルプロテクチンを含む数種の抗菌ペプチドの発現を上昇させることを報告した。本研究では、IL-1 α による S100A9 遺伝子の転写調節機構について検討を行った。

【材料と方法】IL-1 α のシグナル経路を調べるため、IL-1 α 刺激した株化ヒト上皮細胞 (HaCaT) の培養系に、IL-1 α の中和抗体、IL-1 受容体アンタゴニスト、各種 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitors (p38: SB2033580, ERK: U0126, JNK: SP600125) および p38 siRNA を作用させ、S100A9 遺伝子の発現への影響を Northern blotting あるいは Western blotting で調べた。また、S100A9 転写調節領域を調べるため、S100A9 遺伝子プロモーター領域 (-2574~+430) を含む deletion constructs を作製し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その後、転写調節に関与する転写因子を同定するため、C/EBP β についてゲルシフトアッセイ、siRNA による阻害実験および結合配列の変異・欠失 constructs を用いたルシフェラーゼアッセイなどを行った。

【結果】IL-1 α による S100A9 遺伝子発現の増加は、IL-1 α の中和抗体および IL-1 受容体アンタゴニストにより抑制された。また、p38 の inhibitor および siRNA 処理により同様の抑制結果が認められた。一方、ルシフェラーゼアッセイにより C/EBP β 結合部位を含む -94/+430 と -53/+430 の deletion constructs 間で IL-1 α による転写活性増加の抑制がみられた。C/EBP β siRNA と結合配列の変異・欠失 constructs を用いたアッセイでは、IL-1 α 誘導性の転写活性の増加は認められなかった。さらに、ゲルシフトアッセイにおいて C/EBP β 抗体によるスーパーシフトが確認された。

【考察と結論】上皮細胞における IL-1 α による S100A9 遺伝子発現の増加は、IL-1 受容体、p38MAPK および C/EBP β のシグナル経路を介して転写調節されていることが示唆された。*この研究はミネソタ大学 Mark C. Herzberg 博士、Karen F. Ross 博士、Xianqiong Zou 博士との共同研究である。

電解酸性機能水の生物学的機能

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻応用口腔科学分野¹

日本大学歯学部病理学教室²

日本大学歯学部総合歯学研究所生体防御部門³

日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座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⁶

○五條堀 孝廣¹、浅野 正岳^{2,3}、牧野 勲嗣^{4,5}、岸田 修^{4,5}、西田 哲也^{4,5}、菅野 直之^{4,5}、伊藤 公一⁶、
小木曾 文内^{4,5}

The biological functions of electrolytically-generated acid functional water on oral epithelial cells

Division of Applied Oral Sciences, Nihon University Graduate School of Dentistry¹, Department of Pathology, Nihon University School of Dentistry², Division of Immunology and Pathobiology, Nihon University School of Dentistry³, Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry⁴, Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry⁵, Nihon University School of Dentistry⁶

○GOJOUBORI TAKAHIRO¹, ASANO MASATAKE², MAKINO NORITUGU⁴, KISHIDA OSAMU⁴, NISHIDA TETSUYA⁴, SUGANO NAOYUKI⁴, ITO KOICHI⁶, OGISO BUNNAI⁴

キーワード：電解酸性機能水，口腔上皮癌由来株化細胞，interleukin 1 α

【目的】電解酸性機能水 (FW) の殺菌効果については現在まで多くの報告がある。また，動物実験から FW の長期の飲用は生体組織に悪影響を及ぼさないことも明らかになっている。さらに，多くの臨床の現場で生体にとって有用な効果が認められている。しかし，FW がどのようなメカニズムで効果を発揮するのかは不明な点が多い。そこで本研究では，口腔上皮癌由来株化細胞 (HSC3) に FW を作用させた場合の効果と影響，ならびにマウスを用いて FW の生物学的機能について検討することを目的とする。

【材料および方法】 FW (pH 2.7, 遊離有効塩素濃度 30 ppm, 三浦電子) で 3 分間 HSC3 を刺激し，産生されるサイトカインについて cytokine array を用いて測定した。また，FW で HSC3 刺激後に RNA を抽出し，FW 未刺激の細胞との遺伝子発現の変化を real-time PCR 法 (Light Cycler, Roche Applied Science, USA) で比較した。さらに，同様に刺激した細胞の培養上清を用い，interleukin 1 α (IL-1 α) の濃度を ELISA 法 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) により測定した。また，FW 刺激後の培養上清 (conditioned medium ; CM+) と rhIL-1 α (R&D Systems) を歯肉線維芽細胞 (HGFs) に作用させた後，転写因子 peroxisome proliferation activation receptor β/δ (PPAR β/δ) と interleukin 1 receptor antagonist (IL-1ra) の遺伝子発現の変化を real-time PCR 法で比較した。また，wild type mouse (C57BL/6, 日本クレア)，および IL-1 α knockout mouse (東京理科大学) の背部に皮膚トレパンを用いて人工的に創傷を作製し，その治癒に対する効果について比較検討を行った。

【結果】 cytokine array の結果，FW 刺激後の培養上清中には，IL-1 α の分泌が有意に上昇していた。HGFs に対する IL-1 α の効果を検討したところ，PPAR β/δ およびそのターゲット遺伝子である IL-1ra の発現増強が認められた。また，マウス背部に作製した創傷部に FW を作用させたところ，創傷部の面積がコントロールと比較し有意に縮小された。さらに，wild type mouse において観察された FW による創傷部の縮小を促進する効果は IL-1 α knockout mouse では認められなかった。

【考察】FW で HSC3 を刺激すると IL-1 α が上昇することが確認された。IL-1 は IL-1 α と IL-1 β の 2 タイプから構成される炎症性サイトカインであり，TNF- α などとともに歯周病における骨吸収を刺激し，骨の再構成を抑制すると考えられている。しかし，今回の我々の実験において IL-1 β および TNF- α の分泌は FW により影響を受けていなかった。従って，FW で誘導される IL-1 α は骨吸収以外の生物学的効果を有する可能性があると考えられる。また，HGFs に rhIL-1 α ，CM+ を作用させると PPAR β/δ と IL-1ra の遺伝子発現が増強した。皮膚の線維芽細胞において IL-1 は PPAR β/δ の遺伝子発現を増強し，IL-1ra を誘導することにより創傷治癒に寄与するという報告がある。IL-1ra の上昇と創傷治癒の関係は角膜においても指摘されている。以上より，FW の刺激により口腔上皮細胞から分泌される IL-1 α は HGFs に作用し，PPAR β/δ 産生を経て IL-1ra の分泌を引き起こすことによって創傷治癒の促進に寄与していると考えられる。さらに，動物実験より IL-1 α knockout mouse では wild type mouse で見られた創傷治癒の促進効果が認められなかったことから，IL-1 α が創傷治癒の促進の主体を担っている可能性が示唆された。以上の結果より，FW の生物学的機能として創傷治癒を促進する可能性が考えられた。

【結論】 FW の作用により発現増強する IL-1 α の生物学的機能として創傷治癒を促進することが明らかとなった。

シクロスポリンが歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響

京都府立医科大学大学院 医学研究科 歯科口腔科学¹

京都府立医科大学大学院 医学研究科 免疫学²

○大迫 文重¹、山本 俊郎¹、市岡 宏顕¹、西垣 勝¹、雨宮 傑¹、喜多 正和²、金村 成智¹

Cyclosporine influences cytokine production of human gingival fibroblasts

Department of Dental Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science¹,

Department of Immunology, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science²

○Oseko Fumishige¹, Yamamoto Toshiro¹, Ichioka Hiroaki¹, Nishigaki Masaru¹, Amemiya Takeshi¹, Kita Masakazu², Kanamura Narisato¹

【目的】 薬剤性歯肉増殖症は、免疫抑制剤、降圧剤、抗てんかん剤の服用に伴う副作用症状の一つであり、歯肉結合組織の線維性増殖と上皮組織の肥厚を特徴としている。免疫抑制剤であるシクロスポリン A (以下, CsA) は、抗真菌薬として開発された。主な役割としては、細胞性免疫を担う T 細胞を選択的かつ可逆的に抑制することで サイトカイン産生を抑制する。これにより、臓器移植や骨髄移植の拒絶反応を抑制、全身性エリテマトーデスや関節リウマチなどの自己免疫疾患の治療などに広く臨床応用されている。しかしながら、口腔領域においては歯肉増殖症が発症、深いポケットを形成することがしばしばみられ、審美障害だけでなく、口臭や歯周病の発症と進行をきたしやすい。この歯肉増殖は、CsA によって血中のインターロイキン (IL)-6 が減少する一方で、歯肉線維芽細胞の IL-6 が増加し、線維芽細胞が間接的に刺激され発症するとされているが、その免疫学的な詳細は不明な点が多い。我々は、過去に CsA を用い歯肉増殖マウスモデルを作製し、歯肉増殖の発症機序について免疫学的に検討を加え IL-6 および EGF の関与について報告してきた。そこで CsA がヒト歯肉線維芽細胞およびその影響について検討したので報告する。

【方法】 実験には歯周組織を構成する主要細胞であるヒト正常歯肉線維芽細胞 (以下 HGF) を用いた。HGF を 10%FBS/DMEM で満たした 10 mm dish に対し、 1×10^5 cells/well にて播種し、CsA (100 ng/ml) を添加した群を CsA 群、HGF 単独の群をコントロール群とした。CsA 添加 24, 48, 72 時間後に細胞数を計測し、細胞数の変化を観察した。また、CsA 添加 48 時間後に Th1/Th2/Th17 細胞関連因子検出用抗体アレイを用い、各種サイトカイン産生量を測定した。

【成績】 刺激 72 時間後において、コントロール群と比較し、CsA 群の細胞数の増加傾向を示した。また、刺激 24, 48, 72 時間後において、コントロール群と比較し、LPS 群の細胞数の減少傾向を示した。また、アレイアッセイにおいて、種々のサイトカイン産生に変化を認めたが、IL-1R, IFN- γ はコントロール群では検出されなかったのに対し、CsA 群では検出された。一方、IL-22, TNF- β , RANKL はコントロール群で検出されたのに対し、CsA 群では検出されなかった。

【結論】 これまで歯肉増殖症において関連が報告されている IL-6, TGF- β については、今回の結果においては著明な変化はなかった。しかし、CsA 群において IL-22, TNF- β , RANKL など炎症と骨吸収に関与するサイトカインは著しく減少した。このことから、歯肉の著しい肥厚を伴うが骨吸収を認めず、軽微な炎症を示す歯肉増殖症の病態にこれらサイトカインが深く関与している可能性が考えられた。本研究の一部は JSPS 科研費 24792358 の助成を受けた。

演題 P107 (歯周)
【2504】

ラット骨増生におけるメラトニンの効果

日本大学 大学院 歯学研究科 歯学専攻応用口腔科学分野¹

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座²

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座³

日本大学歯学部総合歯科学研究所高度先端医療研究部門⁴

日本大学歯学部⁵

○篠 弘道¹、佐藤 秀一^{2,4}、蓮池 聡²、津徳 亮成¹、佐藤 暢亮¹、井口 慎也¹、新井 嘉則⁵、伊藤 公一⁵、
小木曾 文内^{2,3,4}

Effect of melatonin on rat calvarial bone augmentation

Division of Applied Oral Sciences, Nihon University Graduate School of Dentistry, Tokyo, Japan¹, Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan², Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan³, Division of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan⁴, Nihon University, Tokyo, Japan⁵

○SHINO HIROMICHI¹, SATO SHUICHI^{2,4}, HASUIKE AKIRA², TSUNORI KATSUYOSHI¹, SATO NOBUAKI¹,
IGUCHI SHINYA¹, ARAI YOSHINORI⁵, ITO KOICHI⁵, OGISO BUNNAI^{2,3,4}

【目的】

松果体ホルモンであるメラトニンは生体リズム、睡眠に関係することが知られている。また、血管新生作用など抗酸化作用を示す抗加齢物質であると考えられている。最近、骨代謝に関わる機能が明らかにされつつあり、メラトニンが破骨細胞を抑制するとともに骨芽細胞を活性化させることが報告されている。そこで本研究では骨外側方向に対するメラトニンの効果を、ラット GBA (Guided Bone Augmentation) モデルを用いてマイクロ CT で経時的に観察することを目的とした。

【材料および方法】

16 週齢の雄性 Fischer ラットにイソフルラ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、#2 のラウンドバーを使用し 5 ヶ所骨髓穿通し実験母地とした。一方の実験母地に 10 mg のメラトニンパウダー (Sigma-AldrichTM5250) を填塞したプラスチックキャップを、他方に空のプラスチックキャップを外周溝に嵌合させ設置し、骨膜で被覆し、さらに皮膚を縫合した。術直後を 0 週とし、以後、2 週ごとに術後 12 週までマイクロ CT を用いて撮影を行い、経時的にキャップ内の新生骨様組織を観察評価した。

【結果】

マイクロ CT による観察結果から、実験側の新生骨様組織は術後 12 週の実験側でキャップ上縁まで達していたが、対照側ではキャップの上縁の 1/3 までしか認められなかった。また、キャップ内部の新生骨様組織量は術後 4, 8 および 12 週において実験側で対照側に比較して有意に増加していた。

【結論】

メラトニンの局所投与は、ラット GBA モデルにおいて骨増生を促進させることが示唆された。

間葉系幹細胞の *ex vivo* および *in vivo* 分化誘導を併用した細胞治療の開発—大規模歯周組織欠損再生への展開—
広島大学大学院医歯薬総合研究科 応用生命科学部門 歯周病態学研究室
○藤田 貴子、武田 克浩、永原 隆吉、藤田 剛、柴 秀樹、栗原 英見

Development of the novel cell therapy using the *ex vivo* and *in vivo* differentiation of mesenchymal stem cells—Application to the large periodontal defect—

Department of Periodontal Medicine, Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

○FUJITA TAKAKO, TAKEDA KATSUHIRO, NAGAHARA TAKAYOSHI, FUJITA TSUYOSHI, SHIBA HIDEKI, KURIHARA HIDEKI

【目的】広範囲に破壊された歯周組織を再生するには、細胞の不足を補うことのできる細胞治療が有効と考える。細胞治療の最大の特徴は、生体外で細胞を加工できることであり、細胞治療は硬組織と軟組織で構成される複雑な歯周組織再生に適していると考えられる。これまでの基礎研究で、骨髄由来の間葉系幹細胞 (MSCs) をアテロコラーゲンゲルと混和してビーグル犬の実験的 III 級根分岐部歯周組織欠損に自家移植したところ、MSCs 移植群は移植後 4 週目で対照のアテロコラーゲン群と比較してセメント質、歯槽骨再生が有意に促進した。しかし、一部の標本においては分岐部直下にセメント質および歯周靱帯が再生したにも関わらず、骨の再生が不十分であった。これは残存骨から離れた部位においては MSCs に対する骨分化刺激が遅延し、MSCs の骨分化誘導が達成されなかったと考えられる。一方、広範囲で平坦な歯周組織欠損では、細胞を欠損部に保持する担体が必要である。担体には生体適合性、多孔性、成形性、生分解性の性質が求められる。本研究では、poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) の成形性に着目した。すなわち、ブロック状に成形された PLGA を担体として用いることで MSCs を三次元的に保持できると考えた。本研究は、セメント質および歯周靱帯を再生させることを目的に未分化 MSCs を、そして歯槽骨再生を目的に PLGA を担体として *ex vivo* で骨分化誘導した MSCs を併用し、大規模歯周組織欠損に対する再生効果を検討した。

【材料および方法】1. 実験動物：10 ヶ月齢のメスのビーグル犬を 2 頭用いた。2. 細胞：ビーグル犬の腸骨骨髓液から採取・分離した MSCs を継代数 3 で実験に用いた。3. 培養：2×4×5 mm の PLGA ブロック (GC, 東京) に MSCs を播種後、10% ウシ胎児血清を添加した DMEM (培地 A) 中で 12 時間静地培養し、培地 A もしくは骨分化誘導培地 (培地 A に 50 μ g/ml Ascorbic acid, 10 mM β -glycerophosphate, 0.1 μ M Dexamethasone を添加) 中で 37°C にて 7 日間回転培養した。4. 欠損モデル：ビーグル犬の両側下顎第 1, 2, 4 小臼歯を抜去し、6 週間治療期間をおいた。抜歯窩治療後、両側下顎第 3 小臼歯の近遠心および第 1 大臼歯の近心に実験的歯周炎を惹起させた 1 壁性歯周組織欠損 (深さと近遠心幅 4 mm) を作製した。5. 移植体：A. 骨欠損部；a) PLGA ブロックのみ、b) PLGA ブロック + 未分化 MSCs, c) PLGA ブロック + 骨分化誘導した MSCs を移植した。B. 欠損根面；アテロコラーゲンゲル (KOKEN, 東京) を担体として未分化 MSCs (細胞密度：2×10⁷ cells/ml) をすべての実験群に移植した。6. micro computed tomography (CT) 解析法：移植後 6 週の下顎骨を micro CT (Skyscan 1176, Bruker) で撮影し、新生骨量を CT 解析ソフトで解析した。7. 組織観察：移植後 6 週の切片に HE 染色および Azan 染色を施し、組織観察を行った。

【結果】すべての実験群で上皮の侵入は認められず、露出根面表面にコラーゲン線維の埋入を伴ったセメント質が再生していた。また、アンキローシスは認められなかった。骨欠損部位では、すべての群で PLGA の残存が一部認められた。グループ C の再生骨の高さおよび再生骨量は、グループ A と比較して有意に高い値を示した。

【考察】根面へ移植した未分化 MSCs は生体内で分化制御して、セメント質および歯周靱帯の再生に関与したと考える。また、生体外で骨分化誘導した MSCs を適切な担体を用いて移植することで、より早期に、効率的に骨を再生できる可能性が示唆された。以上のことから PLGA ブロックを担体として *ex vivo* において三次元的に培養し骨分化誘導した MSCs とアテロコラーゲンゲルを担体として未分化 MSCs を同時に移植することは、大規模歯周組織欠損の再生に有用であることが示唆された。

活性型ビタミン D は IL-1 β 刺激ヒト歯根膜細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制する

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¹

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野²

○細川 義隆¹、細川 育子¹、進藤 智¹、尾崎 和美²、松尾 敬志¹

The effect of calcitriol on inflammatory cytokines production from IL-1 β -stimulated human periodontal ligament cells

Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan¹,

Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan²

○HOSOKAWA YOSHITAKA¹, Hosokawa Ikuko¹, Shindo Satoru¹, Ozaki Kazumi², Matsuo Takashi¹

【目的】 歯周炎は歯周病関連細菌により惹起される慢性炎症性疾患であり、細菌に対する免疫応答が歯槽骨吸収をはじめとする歯周組織破壊に関与している事が報告されている。ビタミン D は脂溶性ビタミンであり、腸管からのカルシウムやリンの吸収を促進する事による血中のカルシウム濃度の調整や骨芽細胞に作用し骨のリモデリングを促す事で骨代謝に関与している事が知られているが、近年、免疫反応を制御する機能もある事が報告されている。また、歯周炎患者の歯肉溝浸出液に活性型ビタミン D が含まれている事が明らかとなっているが、その機能については不明な点が多い。本研究では、活性型ビタミン D (calcitriol) が歯周炎病変局所において炎症性サイトカイン産生を抑制する可能性に関して、IL-1 β が誘導するヒト歯根膜細胞 (HPDLC) の炎症性サイトカイン産生に与える calcitriol の影響についてシグナル伝達系も含めて検討を行った。

【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。calcitriol にて HPDLC を 1 時間前処理後 IL-1 β 刺激を行い、IL-6, IL-8, CCL20, CXCL10, MMP-3, TIMP-1 産生を ELISA 法にて、HPDLC のビタミン D 受容体 (VDR) 発現ならびに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 β 誘導炎症性サイトカイン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 β 刺激を行い、炎症性サイトカイン産生を ELISA 法を用い検討した。

【成績】 無刺激 HPDLC は VDR を発現していた。calcitriol 前処理は IL-1 β が誘導した IL-6, IL-8, CCL20, CXCL10, MMP-3 産生を有意に抑制したが、TIMP-1 産生は抑制しなかった。また、calcitriol 前処理は NF- κ B シグナル伝達経路において IL-1 β が誘導した I κ B- α の分解を抑制した。MAPKs シグナル伝達経路に関しては IL-1 β が誘導した JNK のリン酸化を抑制した。さらに、JNK inhibitor および NF- κ B inhibitor は有意に IL-1 β が誘導した IL-6, IL-8, CCL20, CXCL10, MMP-3 産生を抑制したが、TIMP-1 産生は抑制しなかった。

【結論】 今回の結果より、活性型ビタミン D がヒト歯根膜細胞の様々な炎症性サイトカイン産生を抑制できる事が明らかとなった。歯周炎患者の歯肉溝浸出液に含まれる活性型ビタミン D の役割に関しては不明な点が多かったが、炎症性サイトカインを抑制することにより歯周炎病変局所の炎症を制御している可能性が考えられた。また、活性型ビタミン D 製剤は骨粗しょう症などの治療に用いられているが、歯周炎治療において炎色局所に活性型ビタミン D を入れることにより抗炎症効果を期待した歯周炎治療に用いる事ができる可能性も考えられた。

骨芽細胞における BMP-2 シグナル伝達経路に関与するスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) 受容体の検索
九州大学大学院 歯学研究院 歯周病学分野
○東 克匡、松崎 英津子、橋本 陽子、西村 英紀

The role of sphingosine-1-phosphate receptors on BMP-2 signaling pathway in osteoblast-like cells
Department of Periodontology, Faculty of Dental Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan
○HIGASHI KATSUMASA, MATSUZAKI ETSUKO, HASHIMOTO YOKO, NISHIMURA FUSANORI

【目的】血漿中に多く存在するスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は、細胞膜上の G タンパク質共役受容体である S1PR1-5 に結合し、分化・増殖など多彩な細胞応答を引き起こす脂質メディエーターである。骨組織においては、S1P の破骨細胞前駆細胞遊走制御による骨吸収抑制が報告されている。また、演者らは骨芽細胞において S1P が S1P/Akt/ β -catenin シグナル伝達経路を介して、alkaline phosphatase (ALP)、破骨細胞抑制因子 (osteoprotegerin) 発現を促進することを見出し、骨粗鬆症や歯周疾患により失われた歯槽骨の再生への応用が期待される。

これまでに、骨芽細胞における S1P の PI3K/Akt/ β -catenin シグナル伝達経路の活性化には、S1PR1 が重要であることを報告した (日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会)。一方、同シグナル伝達経路の標的遺伝子である ALP の発現調節には、S1PR1 及び S1PR2 が関与していることが明らかとなった。このことは、S1P が複数の受容体を介して、ALP 発現を調節する他のシグナル伝達経路にも影響を及ぼす可能性を示唆するものである。

そこで本研究では、骨芽細胞において ALP 発現を調節することが知られている BMP-2 シグナル伝達経路に着目し、S1P の影響について検討した。また、同シグナル伝達経路に関与する S1P 受容体の検索を行うこととした。

【材料および方法】実験には、マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。細胞をプレートに播種し、翌日無血清培地に交換、さらに 24 時間培養した。その後、S1P (2 μ M)ならびに BMP-2 (1-100 ng/ml)を添加した。

S1P 受容体刺激伝達の阻害には、S1PR1-2 siRNA 及び S1PR1-2 阻害剤 W146、JTE-013 を用いた。タンパク質発現については Western blot 法、mRNA 発現については real-time RT-PCR 法を用いて検討した。

【結果および考察】MC3T3-E1 細胞において、S1P は、BMP-2 シグナル伝達経路の活性化に重要な Smad1/5/8 のリン酸化には影響を及ぼさなかったが、BMP-2 による Smad1/5/8 リン酸化レベルの増加は、S1P の添加によりさらに亢進した。この S1P による BMP-2 誘導性 Smad1/5/8 のリン酸化の増強作用は、S1PR1 及び S1PR2 の阻害により減少した。

以上の結果から、骨芽細胞における S1P による ALP 発現増加には、PI3K/Akt/ β -catenin シグナル伝達経路のみならず、BMP-2 シグナル伝達経路も関与している可能性が示唆された。また、S1P による BMP-2 シグナル伝達経路の活性化には、S1PR1 及び S1PR2 が関与することも示された。

現在、S1P シグナル伝達経路が、BMP-2 誘導性 Smad1/5/8 のリン酸化を促進するメカニズム、ならびに、BMP-2 シグナル伝達経路の標的遺伝子で、ALP の上流に存在する Runx2 の mRNA 及びタンパク質発現に及ぼす S1P の影響を検討している。

【結論】骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 における、S1P による ALP 発現増加には、PI3K/Akt/ β -catenin シグナル伝達経路および BMP-2 シグナル伝達経路が関与している。また、S1P による BMP-2 誘導性 Smad1/5/8 のリン酸化の増強作用は S1PR1 及び S1PR2 を介している可能性が考えられた。

演題 P111 (歯周)
【2504】

ヒト歯根膜幹細胞の骨芽細胞分化、および石灰化に及ぼす高濃度グルコースの影響と炎症性サイトカインの産生
大阪歯科大学口腔病理学講座¹
大阪歯科大学大学院歯学研究科 (歯周病学)²
大阪歯科大学歯周病学講座³
○嘉藤 弘仁¹、片山 暢仁²、田口 洋一郎³、富永 和也¹、梅田 誠³、田中 昭男¹

Effects of high concentration glucose on osteoblastic differentiation of human periodontal ligament stem cells and inflammatory cytokine production.

Department of Oral Pathology, Osaka Dental University, Osaka, Jpn¹, Graduate Sch. Dentistry (Dept. Periodontology), Osaka Dental University, Osaka, Jpn², Department of Oral Pathology, Osaka Dental University, Osaka, Jpn³

○KATO HIROHITO¹, KATAYAMA NOBUHITO², TAGUCHI YOICHIRO³, TOMINAGA KAZUYA¹, UMEDA MAKOTO³, TANAKA AKIO¹

【目的】糖尿病は歯周病の主なりスクファクターの一つである。糖尿病による高血糖状態は細胞の増殖、分化、および炎症性サイトカインの産生に様々な影響を与えることが報告されている。また、Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) は糖尿病の様々な病態と深く関与しており、糖尿病における骨組織破壊マーカーであることが明らかになってきた。歯根膜幹細胞 (以下、PDLSCs) は高い増殖能力と骨芽細胞分化能を有している。最近の研究では、この PDLSCs は歯周組織や歯槽骨の再生について重要なカギとなる役割を果たすことが解明されてきた。しかし、高血糖状態が PDLSCs の細胞増殖、骨芽細胞分化、および石灰化物形成に与える影響に関する研究はほとんど報告されていない。本研究の目的は高血糖状態による PDLSCs の細胞増殖能、骨芽細胞分化能、および石灰化物形成能、ならびに RAGE の遺伝子発現への影響について検討することである。さらに、歯周組織破壊と強い関連がある IL-6、および IL-8 産生への影響について検討を行った。

【材料と方法】PDLSCs はヒト抜去歯 (第三大臼歯) の歯根膜より剥離・細切し、酵素処理により得た初代培養細胞で、間葉系幹細胞マーカー (STRO-1, SSEA-4) の免疫組織化学的染色にて分離・同定した。PDLSCs を各種グルコース濃度 (5.5 mM, 8.0 mM, 12.0 mM, 24.0 mM) に調整した培地で 1 日～21 日間培養し、細胞増殖、Runx2 mRNA、オステオネクチン (OSN) mRNA の発現、Alkaline phosphatase (ALP) 活性、procollagen Type I C-peptide (PIP) 産生量、Osteocalcin (OCN) 産生量、カルシウム析出量、および Alizarin red 染色による石灰化物形成の検討を行った。また、炎症性サイトカイン産生の検討についてはグルコース濃度 (5.5 mM, 24.0 mM) に調整した培地で 21 日間培養し、IL-6、IL-8 の産生量を測定した。なお、本研究は大阪歯科大学医の倫理委員会の承認を得て行った。(承認番号: 110712)

【結果と考察】PDLSCs の細胞増殖、Runx2、OSN mRNA の発現、ALP 活性、PIP 産生量、OCN 産生量、石灰化物形成はグルコース濃度依存的に抑制された。また、RAGE の遺伝子発現、IL-6、および IL-8 の産生量は有意に促進した。これらの結果より、高濃度のグルコースは PDLSCs の細胞増殖、骨芽細胞分化および石灰化を抑制し、歯周組織破壊に関わる炎症性サイトカインの産生を促進させることが示唆された。

【結論】本実験により、糖尿病による高血糖状態は歯周組織再生に重要な役割を果たす歯根膜幹細胞の細胞増殖、骨芽細胞分化、および石灰化物形成を抑制することによって、歯周組織の再生が阻害されることが示唆された。また、歯周組織破壊を促進する炎症性サイトカインが誘導されることにより、歯周組織再生の阻害が生じる可能性が示唆された。

演題 P112 (歯周)
【2504】

グリシン含有歯面研磨剤噴射後のチタン金属の表面性状の変化とヒト歯肉上皮細胞の細胞増殖について

大阪歯科大学 歯周病学講座¹

大阪歯科大学 口腔病理学講座²

○小石 玲子¹、田口 洋一郎¹、奥田 麻貴子¹、山脇 勲¹、高橋 幸達¹、中島 幸市朗¹、嘉藤 弘仁²、
片山 暢仁¹、田中 昭男²、梅田 誠¹

Change of titanium surface topography and epithelial cell proliferation after abrasion of PMTC powder including glycine

Department of Periodontology, Osaka Dental University, Osaka, Japan¹, Department of Oral Pathology, Osaka Dental University, Osaka, Japan²

○KOISHI REIKO¹, TAGUCHI YOICHIRO¹, OKUDA MAKIKO¹, YAMAWAKI ISAO¹, TAKAHASHI SAITATSU¹,
NAKAJIMA KOITIRO¹, KATO HIROHITO², KATAYAMA NOBUHITO¹, TANAKA AKIO², UMEDA MAKOTO¹

【目的】インプラント材料としてチタン金属は広く用いられている。ここ最近ではアバットメントにおいてはジルコニアなどが使用されているが、実際のメンテナンスにおいては従来のチタン金属を使用している場合が多い。そこで今回、従来の炭酸水素ナトリウムではないより粒子の小さいグリシン含有歯面研磨剤を用いてインプラント周囲溝の清掃に対する評価を目的として、表面研磨後のチタンの生体適合性を評価するためにグリシン含有歯面研磨剤噴射後の純チタンと未処理の純チタン上の表面性状の観察と上皮細胞の増殖について検討した。

【材料および方法】実験材料として市販の直径 15mm、厚さ 1.5mm の JIS 規格 2 級純チタンの平板を #2000 まで研磨したものを用いた。噴射装置はモリタ製ハンディージェットを用い、噴射剤としてモリタ製ハンディージェットパウダー PMTC (平均粒子径 25 μ m) を用いた。実験群としてチタン板上にグリシン含有歯面研磨剤を噴射角度 90 度、噴射距離 5mm、噴射時間 3 分間で行い、噴射後は超純水で 5 分間 3 回超音波洗浄を行った。対照群は研磨後無処理の純チタンを使用した。まず噴射後のチタン板の表面性状について、日立製作所製走査型電子顕微鏡 (SEM) S-4800 を用いて観察し、3 次元的な観察を島津製作所製走査型プローブ顕微鏡 SPM を用いて観察し同時に平均表面粗さ (Ra) について評価した。その後、各群のチタン平板を 200℃、2 時間乾熱滅菌を行い上皮細胞の増殖に用いた。ヒト歯肉上皮細胞は大阪大学 村上伸也教授より供与されたヒト歯肉不死化細胞株 epi4 を用いた。1 穴あたり 4×10⁴ 個の細胞を各群のチタン平板上に播種し、3, 6, 24, 48, および 72 時間培養後の細胞増殖を Promega 社製 CellTiter-Blue 試薬を用いて計測した。統計学的解析は各時間毎に Student の t 検定を用いて行い、有意水準は 5% とした。

【結果および考察】SEM による表面性状観察では、対照群ではフラットな構造をしているのに対して実験群ではフラットな表面に様に傷を帯びておるような構造で高倍率の観察で酸性溶液やアルカリ性溶液の浸漬による一様なマクロレベルやナノレベルの表面改質ではないことが観察された。SPM による観察も SEM と同様であったが、Ra 値については対照群が 4.747nm であるのに対し実験群では 18.431nm であった。ヒト歯肉上皮細胞の増殖では、播種後 3 時間では対照群が実験群に比べて有意に高かったが、その後の播種後 24, 48, および 72 時間では実験群が対照群に比べて有意に高かった。今回の結果から、従来より小さい粒子のグリシン含有歯面研磨剤においても噴射後は表面性状が変化し、その変化はヒト歯肉上皮細胞の増殖を及ぼし、とくに早期の付着に影響を及ぼす可能性が示唆される。

演題 P113 (歯周)
【2504】

広汎型重度慢性歯周炎患者に対して歯周組織再生療法を行った一症例

大阪歯科大学歯周病学講座

○高橋 貫之、河野 智生、田幡 元、南堂 百映、片山 暢仁、三木 晴加、梅田 誠

A case report of periodontal tissue regenerative therapy for patients with generalized severe chronic periodontitis

Department of Periodontology, Osaka Dental University, Osaka, Japan

○TAKAHASHI TSURAYUKI, Kouno Tomoo, Tabata Hajime, Nandou Momoe, Katayama Nobuhito, Miki Haruka, Umeda makoto

【はじめに】進行した慢性歯周炎の治療においては、炎症のコントロールを行うのと同時に支持能力の低下した歯周組織に対して、咬合力が外傷的に作用しないようにする必要がある。今回、中等度慢性歯周炎と咬合性外傷の合併症に罹患した患者に対して歯周基本治療および歯周組織再生療法を含む歯周外科処置を行い歯周組織の炎症のコントロールを確立した。その後、最終補綴に移行したことで良好な結果が得られたので報告する。

【初診】患者：65歳 女性 初診：2008年2月10日主訴：右上奥歯の歯ぐきが腫れて、ブラッシング時に出血する。これまで開業医で歯周病との診断で定期的に診てもらっていたが動揺歯があり、抜歯の説明を受け義歯の説明を受けた。今後の治療方針に不安になり本大学病院に来院した。

【診査・検査所見】全顎にわたるプラークが歯頸部に付着しており PCR は 54.3%であった。臼歯部の咬合が確立されておらず、上顎前歯部のフレアーアウトが認められる。36 に 2 度の根分岐部病変が認められ、また咬合性外傷およびブラキシズムの自覚もあった。

【診断】重度慢性歯周炎，2 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，咬合調整，暫間固定，抜歯（14・26），便宜抜髄（24・43），感染根管処置（21・23・25・36），SRP，治療用義歯，ナイトガード装着），再評価，歯周外科治療（歯周組織再生療法），再評価，口腔機能回復処置，SPT。

【治療経過】2011 年 2 月～ 歯周基本治療（プラークコントロール，33～43 暫間固定，14・26 抜歯，21～23 暫間固定，21・23・25・36 感染根管治療，治療用義歯装着，24・43 抜髄，スケーリング・ルートプレーニング，ナイトガード装着）2012 年 1 月 31・32・33・41・42・43 歯周外科治療（歯周組織再生療法：エムドゲイン®ゲル・自家骨移植併用法）2012 年 4 月 21・22・23・24 歯周外科治療（歯周組織再生療法：エムドゲイン®ゲル・自家骨移植併用法）2012 年 6 月 35，36 歯周外科治療（歯周組織再生療法：エムドゲイン®ゲル・自家骨移植併用法）2013 年 1 月 口腔機能回復処置 2013 年 3 月 SPT

【考察・まとめ】本症例では、歯周基本治療後歯周ポケットの改善を目的に再生療法を含む歯周外科治療で対応した。進行した歯周炎患者では、炎症性因子と外傷性因子の除去が重要である。徹底した口腔衛生を柱に炎症の除去（PCR は 9.3%）につとめ、ブリッジと局部義歯により咬合の回復をはかった結果、良好な治療成果が得られた。また、クレンジングへの対応としてオクルーザルスプリントは継続して使用していただいているが、外傷性因子が働かないよう注意深い咬合の観察が必要である。

高分散性を有する新規ナノアパタイトの物理的特性と歯科応用の一例

東京医科歯科大学 大学院 歯学総合研究科 口腔機能再構築学系 歯蝕制御学分野¹

東京理科大学 理工学部工業化学科² 東洋水産(株)³

GCOE プログラム 骨と歯の分子疾患化学の国際教育研究拠点⁴

○中嶋 省志¹、尾崎 梓²、酒井 秀樹²、好田 勉³、安田 俊隆³、田上 順次^{1,4}

Physical properties of a new nano-apatite with high dispersion stability and its dental use

Cariology and Operative Dentistry School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University¹, Department of Pure and Applied Chemistry Tokyo University of Science², Toyo Suisan Kaisha, Ltd³, Global Center of Excellence, Tokyo Medical and Dental University⁴.

○NAKASHIMA SYOZI¹, OZAKI AZUSA², SAKAI HIDEKI², YOSHIDA TSUTOMU³, YASUDA TOSHITAKA³, TAGAMI JUNJI^{1,4}

【背景および目的】 ナノサイズのアパタイト (HA) がこれまでの通常サイズの HA と比べて反応活性に優れているとの期待で、歯科領域でも多数の報告が認められる。今回報告するナノアパタイト (CPCa: 東洋水産株式会社製) の特徴は、そのナノサイズ (10 nm 前後) に加えて、水系のサスペンションで高い分散性と透明性を示すことである。また限外濾過によって濃縮しても凝集や沈降もなく、チクソトロピックな特性を有している。さらにスプレー法にて得られた乾燥粉末は再度、水に分散してもその分散性は変わらないなど、ユニークな物性を有している。本研究では、CPCa の物性とそれに着目した歯科分野への一応用例を紹介する。

【材料と方法】 1)CPCa の調製法の概略: 水酸化カルシウムに水を加え、これにクエン酸とリン酸を逐次添加して水酸化カルシウムを溶解状態にした。次いで水酸化カリウムを添加して pH を中性付近に調整した。最後に、45℃にて 48 時間、放置・熟成し、透明性の青白分散液を得た。2)物性評価: 種々の調製条件下にて得られた分散液について濁度測定を行い、またこれを粉末化したものについて TEM 観察、ゼータ電位測定、XRD 結晶性評価を行った。3)脱灰抑制効果: pH4.5 の脱灰液 (CaCl₂: 1.5 mM. KH₂PO₄: 0.9 mM. 酢酸: 50 mM. NaN₃: 0.02%) に所定量 (250, 500, 1000 ppm; フッ素含有と非含有) の CPCa を加え、これに表面研磨した牛歯象牙質ブロックを浸漬して 1 週間脱灰した。同ブロックから約 230 μm の切片として切り出し、TMR 法 (Transverse Micro Radiography) にて脱灰の程度を観察した。

【結果と考察】 CPCa の分散性や結晶性は、調製法の条件を微妙に変えることで異なった。例えば、水酸化カリウムが多く pH が中性以上で高い分散性を示したが、粒子径に関しては pH7 にて最も粒径の小さい HA が得られた (図 1)。またクエン酸の量は、多いほど高い分散性を示したが、HA の結晶性は低下した (図 2)。さらに Ca/リン酸の比がやや大きいほど (2.0), 高分散性で結晶性の良い HA が得られた。熟成の時間に関しては、長いほど濁度は減少し透明性が増した (図 3)。分散安定性はクエン酸濃度が高いほど高くなる傾向であり、同時に粒子の表面電位 (ゼータ電位) が低下したことより、クエン酸イオンが HA 表面に吸着して粒子に負電荷を与え、その静電反発力で高分散性を獲得していると推察された。B) 脱灰抑制効果: CPCa を含まない場合、約 250 μm の脱灰深さであった (図 4a)。フッ素非含有の CPCa の場合、その濃度に応じて脱灰が抑制され、500 ppm で顕著な効果が見られた (図 4b)。一方フッ素含有の CPCa の場合、同様にその濃度に応じて脱灰が抑制され、250ppm でも顕著な効果が見られ (図 4c)、1000 ppm ではほとんど脱灰は認められなかった。後者の場合、Ca とリン酸イオンに加えて微量な F イオン (1-3 ppm) の効果が付け加わったことによると考えられる。

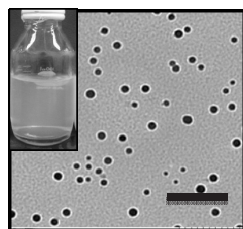


図 1 pH 7 における分散液の目視観察結果及び TEM 像

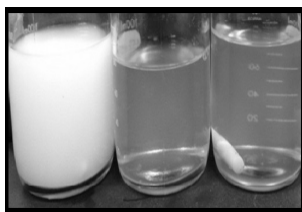


図 2 種々のクエン酸濃度における分散液の目視観察結果: 左から 50, 100, 100 mM

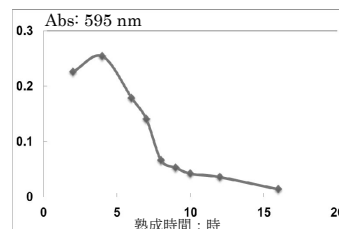


図 3 種々の熟成時間における分散液の濁度の経時変化測定結果



図 4a. CPCa なし

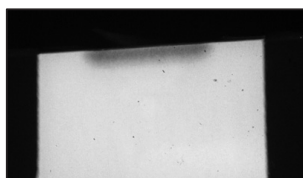


図 4b. CPCa 500 ppm

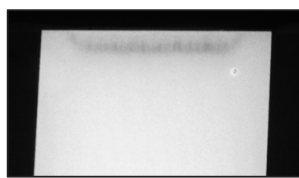


図 4c. F 含有 CPCa 250 ppm

象牙質知覚過敏抑制材ナノシールの臨床評価
平鹿総合病院歯科
○寺田 林太郎

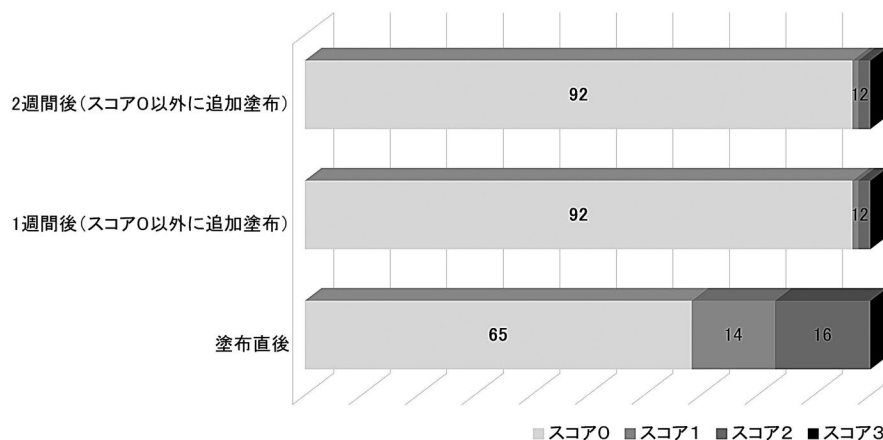
Clinical Evaluation of Repeated Application of Nanoseal Desensitizer
Dentistry, Hiraka General Hospital
○TERATA RINTARO

【緒言】象牙質知覚過敏症は、う蝕を伴わない露出した象牙質に軽微な外来刺激が加わった際に生じる一過性の誘発痛を特徴とし、日常臨床では発現頻度の高い疾患である。ナノシールは、歯質と反応して効果を発現し、歯肉に対して為害性がない操作性にすぐれた象牙質知覚過敏抑制材であるが、1回の塗布で十分な効果が得られない症例もある。今回は1回塗布で効果が得られなかった症例に対し、ナノシールを追加塗布した際の知覚過敏抑制効果を明らかにするべく、臨床評価を行った。

【対象および方法】当院において象牙質知覚過敏症と診断された95症例（性別：男性44名、女性51名、歯種：前歯33本、臼歯62本）を対象とし、ナノシールを用いて象牙質知覚過敏症の処置を行い、術前後の疼痛について評価を行った。効果を評価する指標として、患部より約1cm離れた3秒間のエアースリンジによる冷氣刺激、もしくは歯科用探針の先端での擦過刺激により生じた疼痛に関して評価基準（0：何ら痛みを感じない、1：わずかに痛みを感じる、2：やや痛みがある、3：強い痛みがある）に従い評価した。被験歯はブラシコーンを用いて清掃した後、水洗・乾燥を行い、ロール綿花により簡易防湿を施した後、患部に本材を20秒間塗布した。塗布後、再度水洗・乾燥し処置を終了した。評価の判定は、従前・術直後、術後1週間および術後2週間の術前・術直後時点で行った。なお、1週間および2週間後に症状が残っていた症例はナノシールの追加塗布を行った。有効性の評価は、著効（疼痛スコアが0になったもの）、有効（疼痛スコアが2改善したもの）、やや有効（疼痛スコアが1改善したもの）、無効（疼痛スコアが変化しなかったもの）、後戻り（疼痛スコアが1増加したもの）、著しい後戻り（疼痛スコアが2増加したもの）の6段階で行った。

【結果および考察】観察期間では、全症例にわたって患歯及び周囲歯肉に対して為害作用は認められなかった。冷氣・擦過刺激に対する疼痛スコアは術前の平均スコアが1.81であったのに対して、術直後は0.48、術後1週間後は0.21、術後2週間後は0.11であった。術前後での疼痛発現状況をMann-WhitneyのU検定により統計学的検定を行ったところ、各評価時点において術前に比較して症状が有意（ $p<0.001$ ）に改善されていることが明らかとなった。スコア0となった症例は塗布直後に65（著効率68.4%）であったが、症状が残っている、あるいは後戻りをした症例に追加塗布をすることで、2週間後に92（著効率96.8%）となった（図1）。ナノシールは1回の塗布で十分な効果が得られない場合も、追加塗布をすることによりさらに知覚過敏を抑制することが可能であり、追加塗布の有用性が示唆された。

図1. 塗布直後→2週間後のスコアの推移



3種の有効成分を配合した口腔咽喉薬の口臭抑制効果

福岡天神インプラントクリニック¹

福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野²

福岡歯科大学 口腔医療センター³

○山田 潤一^{1,2}、鈴木 奈央²、仲西 宏介²、伊波 幸作²、藤本 暁江²、瀧井 慶²、米田 雅裕³、山田 和彦²、
桒尾 陽介²、萩尾 佳那子²、廣藤 卓雄²

Suppressing effect of oral malodor by an oral and throat lozenge containing three kinds of active ingredients

Fukuoka Tenjin Implant Clinic, Fukuoka, Japan¹, Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan², Center for Oral Diseases, Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan³

○YAMADA JUNICHI^{1,2}, SUZUKI NAO², NAKANISHI KOSUKE², IHA KOSAKU², FUJIMOTO AKIE², TAKII KEI², YONEDA MASAHIRO³, YAMADA KAZUHIKO², MASUO YOSUKE², HAGIO KANAKO², HIROFUJI TAKAO²

【目的】口臭の主成分である揮発性硫黄化合物 (VSC) は、唾液、血液、剥離上皮細胞、食物残渣中の含硫アミノ酸を、嫌気性菌が分解・腐敗する過程で生じる。本研究では、抗菌成分、組織修復成分、唾液分泌促進成分の3種の有効成分を配合した口腔咽喉薬 A が口臭および口腔環境に与える影響を、抗菌成分のみを配合した口腔咽喉薬 B、有効成分を配合しない清涼菓子 C、水による洗口 D と比較し、効果の違いを評価した。

【方法】福岡歯科大学6年生82名(男58名、女24名、平均年齢25.2 ± 2.2歳)を対象とした非盲検ランダム化比較試験を実施した。本研究は福岡歯科大学・福岡医療短期大学倫理委員会により承認され(第197号)、被験者には本研究の目的およびその内容を十分に説明し、書面による同意の下で行った。被験者はくじ引きでランダムに4群に分けられ、1錠あたり塩化セチルピリジニウム (CPC) 1 mg、グリチルリチン酸二カリウム 2.5 mg、キキョウエキス 20 mg (原生薬換算量: 80 mg) の3種の有効成分を配合した口腔咽喉薬 A、CPC 1 mg のみを配合した口腔咽喉薬 B、有効成分を配合しない清涼菓子 C、水による洗口 D のいずれかが割り当てられた。摂取あるいは洗口前後(10分間)に、口臭、舌保湿度、刺激唾液量、唾液 pH、唾液緩衝能の変化を調べた。口臭測定には MS ハリメーター (モリタ) を利用した。口臭の少ない被験者が多いため、実験の最初に 1 mM メチオニンによる洗口を行い、口臭発生を促した。舌保湿度は口腔水分計ムーカス (ライフ) を用いて測定した。刺激唾液量はガムテストで評価し、唾液の pH と緩衝能の測定には COMPACT pH METER (HORIBA) を利用した。

【結果】ハリメーターは低濃度で検出精度が低下するため、メチオニン洗口でハリメーター値 80 ppb 以上だった者を解析対象者とした。解析対象者は 57 名 (A 群 15 名、B 群 14 名、C 群 14 名、D 群 14 名) であった。口臭抑制効果: ハリメーター値はすべての群で減少した。A 群、B 群、C 群では摂取前後に統計学的有意差がみられ、いずれも水よりも優れた口臭抑制効果があることがわかった。A 群と B 群においては、通常口臭がないとみなす Log VSCs levels = 2.0 (= 100 ppb) 以下に改善した。舌保湿度: A 群で増加傾向を示した。C 群では変化せず、B 群と D 群では減少傾向がみられた。刺激唾液量: C 群で有意な増加がみられた。A 群と B 群では変化がなく、D 群では減少傾向がみられた。唾液 pH: A 群で有意に増加した。A 群、B 群、C 群では変化がみられなかった。唾液緩衝能: A 群、B 群、C 群で増加、D 群で減少した。B 群では摂取前後に統計学的有意差がみられた。

【考察】今回調べた A、B、C はいずれも水による洗口に比較して、口臭を抑制することがわかった。ただし C については口臭がないとみなす VSC レベルまでの改善はみられなかったことから、優れた口臭抑制効果を期待できるのは A および B であると考えられる。A と B を比較すると、B では舌保湿度が低下したのに対し A では増加がみられた。A に含まれるキキョウエキスには、止渴作用があると言われる。口腔乾燥は口臭の一因であると考えられており、A では保湿向上による口臭抑制効果の持続性が期待される。また A では唾液 pH に、B では唾液緩衝能に、それぞれ摂取後に有意な増加がみられ、これらは唾液機能を正常化し、口腔内環境の健全化に働くことが示唆された。

【結論】抗菌成分、組織修復成分、唾液分泌促進成分の3種の有効成分を配合した口腔咽喉薬には、口臭抑制効果、舌保湿度の向上、唾液 pH の増加の効果があつた。

演題 P117 (その他)
【3001】

乳酸菌配合タブレットがう蝕リスク因子に与える影響の臨床的評価

福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野¹

福岡歯科大学 口腔医療センター²

たなべ保存歯科³

○西原 哲世¹、鈴木 奈央¹、藤本 暁江¹、米田 雅裕²、田邊 一成³、山田 和彦¹、岩元 知之¹、安 忠大¹、伊波 幸作¹、瀬野 恵衣¹、廣藤 卓雄¹

Clinical assessment of the effects of lactobacillus-containing tablets on caries risk factors

Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College¹, Center for Oral Diseases, Fukuoka Dental College², Tanabe Preservative Dentistry³

○NISHIHARA TETSUYO¹, SUZUKI NAO¹, FUJIMOTO AKIE¹, YONEDA MASAHIRO², TANABE KAZUNARI³, YAMADA KAZUHIKO¹, IWAMOTO TOMOYUKI¹, YASU TADAHIRO¹, IHA KOSAKU¹, SENO KEI¹, HIROFUJI TAKAO¹

【目的】近年、口腔内環境の正常化を目的とした乳酸菌配合食品が注目されている。乳酸菌の作用のひとつとして菌が産生する乳酸による殺菌作用が挙げられるが、一方で強酸はエナメル質を脱灰しう蝕進行を促進する可能性がある。ある種の乳酸菌はう蝕病巣で高頻度に分離され、う蝕と関係すると考えられてきた。本研究では、乳酸菌配合タブレットの摂取がう蝕リスク因子に与える影響を調べるために、*Lactobacillus salivarius* WB21 株配合タブレットおよび *L. salivarius* LS1 株配合タブレットを用いた臨床実験を行った。

【方法】福岡歯科大学 6 年生 64 名（男 39 名、女 25 名、平均年齢 24.8 ± 2.3 歳）を対象とした非盲検ランダム化比較試験を実施した。本研究は福岡歯科大学・福岡医療短期大学倫理委員会により承認され（第 221 号）、被験者には本研究の目的およびその内容を十分に説明し、書面による同意の下で行われた。被験者をくじ引きにより無作為に 4 群にわけ、*L. salivarius* WB21 配合タブレット、*L. salivarius* LS1 配合タブレット、比較対象品として *Streptococcus mutans* に対する抗体を配合したオーバルゲン DC 配合タブレット、キシリトール配合タブレットのいずれかを割り当てた。タブレットは噛まずに舐めるよう指示し、摂取前と摂取 10 分後のミュータンス菌数、乳酸菌数、刺激唾液量、唾液 pH、唾液緩衝能の変化を評価した。刺激唾液量およびミュータンス菌数の評価にはデントカルト SM（オーラルケア）、乳酸菌数の評価にはデントカルト LB（オーラルケア）、唾液 pH と唾液緩衝能の評価には COMPACT pH METER (HORIBA) を用いた。

【結果と考察】デントカルト SM: キシリトールタブレット摂取群では 17% (3/18) にミュータンスレベルの減少が、44% (8/18) にミュータンスレベルの増加がみられた。これに対し WB21 タブレット群では 29% (5/17) に減少と 12% (2/17) に増加、LS1 タブレット群では 19% (3/16) に減少と 31% (5/16) に増加、オーバルゲン DC タブレット群では 38% (5/13) に減少と 31% (4/13) に増加がみられ、いずれもキシリトールタブレット群に比較してミュータンスレベルを抑える傾向がみられた。WB21 タブレット群とキシリトールタブレット群の間に統計学的有意差が認められた。デントカルト LB: WB21 タブレット群および LS1 タブレット群では、顕著に唾液中の乳酸菌数が増加し、オーバルゲン DC タブレット群、キシリトールタブレット群との間に統計学的有意差がみられた。これらのタブレット摂取では生きた乳酸菌が作用していることが確認された。刺激唾液量: LS1 タブレットで増加し、キシリトールタブレットとの間に統計学的有意差がみられた。タブレットを舐めることにより唾液量が増加すると予想していたが、WB21 タブレットとオーバルゲン DC タブレットでは唾液増加はみられなかった。

演題 P118 (その他)
【2807】

口腔由来病的口臭の治療例 ―種々の原因で生じた口臭―

福岡歯科大学 口腔医療センター¹

福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野²

福岡天神インプラントクリニック³

○岡田 芙実子¹、米田 雅裕¹、鈴木 奈央²、藤本 暁江²、山田 和彦²、山田 崇市³、松浦 洋志¹、
菅 亜里沙¹、大家 知子¹、古賀 千尋¹、廣藤 卓雄²

Case series of halitosis caused by oral origin -their various causes-

Center for Oral Diseases, Fukuoka Dental College¹, Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College², Fukuoka Tenjin Implant Clinic³

○FUMIKO OKADA¹, MASAHIRO YONEDA¹, NAO SUZUKI², AKIE FUJIMOTO², KAZUHIKO YAMADA², JUNICHI YAMADA³, HIROSHI MATSUURA¹, ARISA SUGA¹, TOMOKO OIE¹, CHIHIRO KOGA¹, TAKAO HIROFUJI²

【緒言】病的口臭の大部分は口腔内に原因があり、特に歯周炎が関与していることが多い。したがって歯周治療が病的口臭の解消に有効であるが、適切な診断にもとづいた治療を行わないと口臭が減少しないことがある。過去に歯科治療を受けたが改善がみられなかった口腔由来病的口臭に対し増悪因子の除去を含む治療を行ったところ、口臭が劇的に減少し大きな患者満足が得られた。今回は様々な原因で口臭が生じた症例およびその治療経過を報告する。

【症例】1. 不適合修復物が主な原因の症例患者：54歳・女性主訴：口臭が気になる。現病歴：初診の約20年前から口臭が気になっていた。初診の約1年前に、かかりつけ歯科医に口臭の相談をし歯石除去等を受けたが口臭が減少しないため来院。原因：多数の不適合修復物。主な治療：補綴物除去、再製。2. 根尖性歯周炎が主な原因の症例患者：72歳・男性主訴：(1)口臭が気になる。(2)歯の表面がすり減っている。現病歴：初診の約20年前から、口臭が気になっていた。かかりつけ歯科医で歯石除去等を受けるが口臭が減少しないため、梅干の種を食べたり硬い歯ブラシで磨く等独自の方法で口臭を減らすようにしてきた。最近、家族から口臭を指摘され、また歯の摩耗、咬耗が進行してきたため来院。原因：根管充填不良（綿栓根充）。主な治療：根管治療。3. 歯根の内部吸収・外部吸収による歯周炎が主な原因の症例患者：39歳・男性主訴：口臭が気になる。現病歴：初診の約3年前から口臭が気になりだした。2ヵ所の医院で歯科治療を受けたが口臭が減少しなかったため来院。原因：上顎前歯の内部吸収・外部吸収による歯周炎。主な治療：拔牙。4. 口腔清掃不良、歯根破折による歯周炎が主な原因の症例患者：56歳・女性主訴：口臭が気になる。現病歴：初診の約2年前から、家族から口臭を指摘されるようになった。近医で口臭について相談し、歯石除去を受けたが口臭は減少しなかった。夫のすすめで来院。原因：口腔清掃不良、歯根破折。主な治療：モチベーション向上、歯周治療

【まとめ】口臭の主な原因は *Porphyromonas gingivalis* 等の嫌気性菌が産生する揮発性硫黄化合物であるため歯周疾患の存在で口臭が強くなる。真性口臭症患者に対して口腔清掃指導やスクレーリング等を行うと口臭が減少することが多いが、種々の増悪因子が関与していると口臭が減少しにくいことがある。今回の症例では、口臭の原因および増悪因子を除去する治療を行ったところ口臭が減少し大きな患者満足が得られた。口臭症治療においても的確な診断、適切な歯科治療が重要である。

隣接面のプラークコントロールに関する研究 第7報 歯間ブラシによる人工歯隣接面のプラーク除去効率

鶴見大学 歯学部 保存修復学講座

○植松 裕美、臼井 エミ、大塚 良子、中野 正寛、菅原 豊太郎、桃井 保子

Study on plaque control in interproximal area Part 7 Plaque removal efficiency of interdental brushes in interproximal area of model teeth

Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine, Kanagawa, Japan

○UEMATSU HIROMI, USUI EMI, OTSUKA RYOKO, NAKANO MASAHIRO, SUGAWARA TOYOTARO, MOMOI YASUKO

緒言 私たちは、隣接面のプラークコントロールに関する一連の研究において、隣接面不潔域の全てに歯ブラシの毛先を到達させることはできなかったことを報告した¹⁾。近年、使用感の良さやプラーク除去効率が良いことをうたった歯間ブラシ製品が各社より発売されている。そこで私たちは、市販されている各種歯間ブラシにはプラーク除去効率に違いがあると仮説をたて、隣接面におけるプラーク除去効率を製品間で比較検討することとした。

材料と方法 評価した歯間ブラシは ISO 基準ブラシサイズ 2、又はそれに該当する大きさの計 8 社 17 種、DENT.EX 歯間ブラシ(SS、ライオン)、DENT.EX 歯間ブラシ フレキシネック(SS、ライオン)、ルシエロ 歯間ブラシ(SS、GC)、インターブロックス プラス(2、デントエイド)、インターブロックス フレキシブル(2、デントエイド)、アングル歯間ブラシ(2、Tepe)、オリジナル歯間ブラシ(2、Tepe)、エクストラソフト歯間ブラシ(2、Tepe)、プチ歯間ブラシ L 型(SS、サンデンタル)、プチ歯間ブラシ(SS、サンデンタル)、デンタルプロ 歯間ブラシ L 字型(2、ジャックス)、デンタルプロ 歯間ブラシ I 字型(2、ジャックス)、デンタルプロ シリコンゴム歯間ブラシ(2~4、ジャックス)、ガム·歯間ブラシ L 字型(SS、SUNSTAR)、バトラープロキサブラシトラベラー(SS、SUNSTAR)、ガム·ソフトピック(SSS~S、SUNSTAR)、やわらか歯間ブラシ(SSS~S、小林製薬)である。顎模型の着脱式メラミン歯(ニッシン)の下顎左側第一大臼歯の近心面を被験面とし、同面に歯間ブラシによるブラッシング領域を設定した。被験面に人工プラーク(ニッシン)を塗布したメラミン歯を、ファントムに設置した頬粘膜ボックス内の顎模型に装着した。ブラッシングは頬側から 2 方向、1 方向につき 3 回とした。試験する歯間ブラシの順をランダムに、各 5 歯ずつブラッシングした。デジタルカメラ(Nikon D100)を用いブラッシング前後の被験面を撮影し、画像分析ソフト(Adobe photoshop CS5)を使用してプラーク除去率を算出した。データの有意差検定は、一元配置分散分析の後、Tukey' s HSD test により行った(有意水準 5%)。

結果と考察 歯間ブラシのプラーク除去効率は 20.0~47.6 %の範囲内にあり、各種製品間のプラーク除去効率には統計的有意差を認めるものがあつた。歯間ブラシの形態タイプ別の L 字型と I 字型の間、またこれら一般歯間ブラシとシリコーン樹脂製歯間ブラシとの間に統計的有意差を認めた。今回の実験設定では歯面に対して歯間ブラシ圧を直接加えやすい形態の I 字型が L 字型よりも高い除去率を示した。シリコーン樹脂製歯間ブラシは耐久性の低さが除去率に影響を与えたと考えられる。今回評価した歯間ブラシのプラーク除去効率は、私たちが今までに報告した指巻きフロス及びホルダー型フロスの隣接面のプラーク除去効率(70.1%~97.8%)^{2,3)} より低かつた。

まとめ 市販の各種歯間ブラシには、製品間でプラーク除去効率に違いがあつた。形態別では I 字型が L 字型よりもプラーク除去効率が高く、これら一般歯間ブラシと比べシリコーン樹脂製歯間ブラシのプラーク除去効率は低かつた。

参考文献

- 1)第3報 歯ブラシによる人工歯隣接面のプラーク除去効率について(2013年 第62回日本口腔衛生学会学術大会)
- 2)第4報 ホルダー型デンタルフロスによる人工歯隣接面のプラーク除去効率について(2013年 日本歯科保存学会学術大会第138回)
- 3)第6報 デンタルフロスのフィラメントの違いとプラーク除去効率(2013年 日本歯科保存学会学術大会第139回)

神経細胞に対する高周波・低周波混合電気刺激の影響の検討

京都府立医科大学大学院 医学研究科 歯科口腔科学

○山本 健太、佐藤 良樹、市岡 宏顕、大迫 文重、山本 俊郎、金村 成智

The effects of high and low frequency combined electrical stimulation on growth factor expression and MAPK signaling in Neuro2A.

Department of Dental Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

○YAMAMOTO KENTA, Sato Yoshiki, Ichioka Hiroaki, Oseko Fumishige, Yamamoto Toshiro, Kanamura Narisato

【目的】 歯科領域の手術（智歯抜歯、インプラント埋入、歯周外科等）の合併症の一つとして、下歯槽神経および舌神経障害に伴う、知覚異常がある。この知覚異常は、日々の食事摂取や会話に支障をきたし、Quality of life (QOL) を低下させる。知覚異常の治療法としては、理学療法、薬物療法、神経ブロック等が知られており、我々はこれまでに、知覚異常患者に対して高周波・低周波混合電気刺激ならびにビタミン B₁₂ 製剤を用いた加療を行い、良好な結果を得ている。低周波電気刺激は、神経細胞の増殖を促し、神経損傷の回復を促進することが報告されているが、その分子メカニズムも不明な点が多く、また高周波・低周波混合電気刺激に関する報告はない。そこで本研究では、神経細胞に対する高周波・低周波混合電気刺激の及ぼす影響を検討した。

【方法】 マウス神経細胞株である Neuro2A を 6 well plate に播種し、高周波・低周波混合電気刺激装置 (FERUDE, テクノ) を用いて、任意の強さ (Level 0, 4, 8, 16) で高周波・低周波混合電気刺激を与えた。その後、Neuro2A の細胞形態の観察、WST assay による細胞活性試験、Real-time RT-PCR による遺伝子発現解析および ELISA array による網羅的サイトカイン、成長因子産生の検討を行った。また高周波・低周波混合電気刺激に伴う、Neuro2A の MAPK シグナリングの検討も併せて行った。

【結果】 高周波・低周波混合電気刺激により、Neuro2A の細胞形態に明らかな影響は認めなかったが、細胞活性は増大し、神経栄養因子と知られるニュートロフィン (NGF, NT-3) の発現の上昇を認めた。さらに ELISA array による解析では、VEGF ならびに PDGF 産生の有意な増大も認めた。また高周波・低周波混合電気刺激により ERK1/2 ならびに p-38 のリン酸化は亢進し、p-38 阻害剤を前処置して高周波・低周波混合電気刺激を加えた群では、非前処置群に比べ、VEGF ならびに PDGF 発現の有意な減少を認めた。

【結論】 近年、VEGF および PDGF には血管新生作用ならびに血小板増殖作用のみならず、神経保護作用や神経分化促進作用があることが報告されている。以上より、高周波・低周波混合電気刺激は、神経細胞の細胞活性を増大させるとともに、神経成長に関与する因子を増大させることが示され、その細胞内シグナリングには MAPK である ERK1/2 および p-38 が関与することが分かった。これより FERUDE による高周波・低周波混合電気刺激は、上記の分子メカニズムを介して作用することで、神経知覚異常に対する治療法となる可能性が示唆された。

表面処理剤の濃度の違いによる 4-META/MMA-TBB レジンと骨との接着状態の比較検討

北海道大学 大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室

○工藤 愛、菅谷 勉、柳澤 剛、猪股 慶久、佐藤 賢人、中谷 充宣、川浪 雅光

Adhesion between 4-META/MMA-TBB Resin and Bone in difference of surface treatment agent concentration

Periodontology and Endodontology, Department of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Sapporo, Japan

○KUDO MEGUMI, SUGAYA TSUTOMU, YANAGISAWA GO, INOMATA YOSHIHISA, SATO TAKAHITO, NAKATANI MITSUNORI, KAWANAMI MASAMITSU

【目的】

4-META/MMA-TBB レジンは、象牙質と同様に骨とも樹脂含浸層を形成し、長期に安定して接着し、骨の正常なリモデリングを阻害しないことが報告されている。その際の表面処理剤は、象牙質と同様に 10%クエン酸 3%塩化第二鉄溶液を用いているが、骨は象牙質と比較して無機成分が少なく脱灰されやすいこと、高濃度の酸は骨組織を障害する危険性があることから、接着が確保でき骨組織への侵襲が少ない処理剤が望ましい。

そこで、本研究の目的は、表面処理剤の濃度の違いが、レジンと骨との接着状態と、レジンが接着した骨組織に及ぼす影響を比較検討することである。

【材料と方法】

実験動物として 11 週齢 Wistar 系雄性ラット 21 匹を用いた。

実験材料として、4-META/MMA-TBB レジン（スーパーボンド クリア、サンメディカル）、表面処理剤 10%クエン酸 3%塩化第二鉄溶液（表面処理材グリーン、サンメディカル）を用いた。

全身麻酔下でラット頭部皮膚を切開、骨膜を剥離し、頭蓋骨を露出させた。生理食塩水で水洗、エアードライし、以下の 3 つの方法で表面処理を行った。1. 表面処理材グリーンで 5 秒間表面処理、2. 10 倍希釈した表面処理材グリーンで 5 秒間表面処理、3. 表面処理なし。3 群とも生理食塩水で水洗、エアードライ後、筆積み法にてスーパーボンドを骨面に直径約 3mm で 2 か所に塗布した。塗布後直ちに皮弁を縫合し、術後 1 週で通法に従い脱灰薄切標本作製、ヘマトキシリン-エオジン染色を行って、骨とスーパーボンドの接触状態、スーパーボンドが接触している骨組織の状態を光学顕微鏡で観察した。さらに一部の試料は、中央部を低速回転ダイヤモンドカッターで切断して、断面をアルミナバフ研磨し、6N 塩酸 35 秒、1%次亜塩素酸ナトリウム 12 分の処理を経て、乾燥後、白金蒸着を行い、骨とスーパーボンドとの界面を走査型電子顕微鏡で観察した。

【結果】

光学顕微鏡観察では、3 群とも骨とスーパーボンドとの界面には、結合組織の侵入や血餅の介在、破骨細胞などはほとんど認められず、ヘマトキシリンに染色する無構造な層が観察された。

また、スーパーボンドが接している直下の骨と接していない側方の骨で、骨小腔内の骨細胞の状態を比較すると、3 群とも表面から 100 μ m 程度の範囲に委縮や消失がわずかに認められた。

SEM 観察では、3 群とも骨とスーパーボンドの界面に間隙は認められず、塩酸にも次亜塩素酸ナトリウムにも溶解しない、骨ともスーパーボンドとも異なる約 20 μ m の層が観察された。

【考察】

表面処理材グリーンの濃度を 10 倍希釈しても、同様に骨との接着が得られたことから、骨を脱灰するためには 1/10 の濃度で十分であったと考えられた。さらに、表面処理を行わなくても接着したのは、モノマーの pH が低いため骨表面が脱灰されたためと考えられた。

一方、スーパーボンドが接している骨では、極めて表層のみに骨細胞の委縮や消失が見られたが、これは表面処理やスーパーボンドを塗布していない骨膜を剥離した範囲全体に同様に認められたことから、表面処理材やスーパーボンドの影響ではなく、外科的侵襲やエアードライの影響と考えられた。表面処理材グリーンは強酸性であるが、5 秒程度骨面に付着しても、その後水洗するため、その障害性は通常の外科的侵襲や乾燥を超えて深部に波及することはないものと思われた。

また、スーパーボンドが接することで骨に影響が見られなかったのは、TBB を重合触媒としているため水分が豊富な骨組織との界面でも良好な重合が得られたことが大きな理由と思われた。

【結論】

表面処理の有無に関わらず、骨と 4-META/MMA-TBB レジンは接着していた。また、表面処理材の濃度は骨組織への障害性に影響は認められなかった。

X線 CT データを用いた破折歯の早期診断による保存治療の選択肢拡大の可能性

北海道大学大学院 歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室¹

北海道大学大学院 歯学研究科 口腔機能学講座 リハビリ補綴学教室²

医療法人社団 友歯会 しぶかわ歯科医院³

加藤歯科医院⁴

○齋藤 恵美子¹、齋藤 彰²、渋川 義宏³、弓削 文彦²、加藤 熙⁴、菅谷 勉¹、川浪 雅光¹

The possibility of choice expansion of treatment with early diagnosis of fractured tooth by the data of X-ray CT
Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Sapporo, Japan¹, Department of Oral Rehabilitation, Division of Oral Functional Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine, Sapporo, Japan², Shibukawa Dental Clinic³, Kato Dental Clinic⁴

○SAITO EMIKO¹, SAITO AKIRA², SHIBUKAWA YOSHIHIRO³, YUGE FUMIHIKO², KATO HIROSHI⁴, SUGAYA TSUTOMU¹, KAWANAMI MASAMITSU¹

【緒言】

破折や亀裂に対する保存治療の技術の向上に伴い、抜歯以外に治療の選択肢がなかった歯の保存が可能なケースが増えてきている。しかしながら、破折や亀裂の診断がより早く適切に行うことができれば、保存が可能であったと思われる報告も数多くみられる。歯質の破折や亀裂の状態について、精度が高く正確な診査診断が可能になれば、初期の破折や亀裂に対する予防的な処置も含めて、保存処置方法が充実するのではないかと期待される。しかし臨床報告では CT が有力な手段と考えられるが、臨床所見や炎症の波及による診断も多く、新鮮破折の報告は少ない。

そこで我々は、先ず現在、臨床で使われている X 線 CT による破折、亀裂歯の診査に対する現状を把握する目的で、ビーグル犬に新鮮破折を作成した後に、歯科用と産業用 CT 装置を用いて撮影し、さらに 3 次元構築を行ったのでその結果を報告する。

【方法】

実験には、メスのビーグル犬 (12 週令) の下顎の前歯 6 本を用いた。歯冠を半分ほど切断したのち、さらにバーで溝を作成して、その溝に沿って、チゼルで人工的に破折、亀裂を作成した。その 2 日後に、新鮮破折を想定して下顎骨から離断して試料とした。離断直前に口腔内写真撮影を行い、離断後にデンタル X 線写真、歯科用 CT (撮影条件: VD 0.125mm, FOV80, 120KV, 5mA)、産業用 CT (撮影条件: VD0.086mm, FOV40, 130KV, 40 μ A) の撮影を行った。画像は臨床経験 15 年以上の歯科医師 3 名によって診断した。さらに 3 次元構築を行って観察を行った。

【結果・考察】

歯科用 CT (Fig.1) では、断層写真から破折や亀裂の有無に関して、大きな破折はある程度わかるが、鮮明さに欠けるため、小さな亀裂は観察できなかった。それに比べて産業用 CT (Fig.2) では、大きな破折以外にも小さな亀裂も確実に観察できるとともに、3 次元構築によって状態の把握が容易であった。以上の結果から、CT による破折亀裂の観察は理論的には可能であったが、臨床では人体への影響を十分に考慮する必要がある。今後は破折亀裂の観察も可能な歯科用 CT 装置の開発を希望するとともに検討課題としていただきたいと考えている。

Fig.1

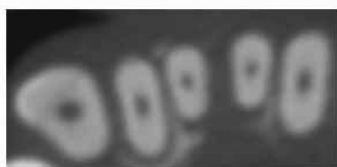


Fig.2



高齢者のパノラマエックス線写真による現在歯数の評価

松本歯科大学歯科保存学講座¹

松本歯科大学 歯科放射線学講座²

○石岡 康明¹、内田 啓一²、山田 真一郎²、三木 学¹、窪川 恵太¹、海瀬 聖仁¹、武藤 昭紀¹、田口 明²、吉成 伸夫¹

Evaluation of the present tooth number by the panoramic radiography of elderly people.

Department of Periodontology, Matsumoto Dental University School of Dentistry, Shiojiri, Japan¹, Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Matsumoto Dental University School of Dentistry, Shiojiri, Japan²

○YASUAKI ISIOKA¹, UTIDA KEIICHI², YAMADA SINITIRO², MIKI MANABU¹, KUBOKAWA KEITA¹, KAISE KIYOHITO¹, MUTO AKINORI¹, TAGUCHI AKIRA², YOSINARI NOBUO¹

【目的】長野県は、男女ともに全国一の長寿県であり、単身世帯が大都市に比べて少なく、住民の健康意識が高いうえに、高齢者に対して地域の医療機関活動が優れた地域である。そのうえ、行政は疾患予防に力を入れており、医療費は全国最低額に抑えられている。しかし、高齢者の口腔内状態を詳細に検討したデータは報告されていない。そこで、今回われわれは、高齢者の口腔内状態を全身の健康状態の一環として捉え、現在歯数の現状に着目し、60歳以上の松本歯科大学病院来院患者において、パノラマエックス線写真を用いて、現在歯数と歯種別現在歯数の現状について全国の歯科疾患実態調査との比較検討を行ったので報告する。

【方法】2007年8月から2010年12月までの間に松本歯科大学病院を受診し、歯科治療のためパノラマエックス線写真を撮影した60歳以上の患者821名(男性:378名、女性:443名)を対象とした。今回のパノラマX線写真からの調査では、第三大臼歯を除き、修復処置、補綴処置の有無にかかわらず、現在歯数と歯種別現在歯率について検討を行った。統計学的解析は、性別、年齢層別に関して、一元配置分散分析を用い、さらに、年齢層別は、Bonferroni法を用いて多重比較解析を行った。統計学的有意水準は、 $p<0.05$ とした。

【成績】被験者の最高年齢は94歳であった。全被験者821名中、無歯顎者は11名(1.3%)であった。全被験者の現在歯数の最高値は32歯で、1人平均現在歯数は20.2歯(男性:20.4歯、女性:20.1歯)であった。20歯以上現在歯数の保有者は533名(64.9%)であった。80歳以上の20歯以上現在歯数の保有者は36名(80歳以上の被験者の43.4%)であった。各年齢層による平均現在歯数は、60～64歳で23.4歯、65～69歳で21.7歯、70～74歳で19.1歯、75～79歳で16.8歯、80～84歳で16.3歯、85歳以上で16.6歯であった。現在歯数と年齢との関係では、男性では60～69歳群に比較して、80歳以上は有意に低い傾向があり($p=0.004$)、70～79歳群は有意に低かった($p<0.0001$)。70～79歳群と80歳以上群との間に関しては有意な相関関係は認めなかった($p=1.0$)。女性では60～69歳群に比較して70～79歳群と80歳以上群との間に有意差がみられた(ともに $p<0.0001$)。さらに、70～79歳群に比較して80歳以上群は有意に低い傾向が認められた($p=0.043$)。20歯以上の現在歯数を保有する者の割合は60～64歳で83.2%、64～69歳で72.9%、70～74歳で56.3%、75～79歳で39.6%、80～84歳で40.4%、85歳以上で25.9%であった。歯種別において、現在歯の残存率が最も高いのは下顎犬歯で91.1%、次いで下顎側切歯85.4%、上顎犬歯82.0%の順であり、最も低いのは下顎第二大臼歯の52.4%、下顎第一大臼歯の53.0%であった。現在歯数、20歯以上保有者率は、本研究のすべての年齢層において、厚生労働省から公表されている2005年歯科疾患実態調査に示された全国平均の値より高かった。

【結論】本研究結果より、年齢と現在歯数との間に有意な相関関係が認められた。また、80～84歳の現在歯数は16.3歯で、20歯以上保有している割合は40.4%であった。現在歯数、20歯以上保有者率を2011年歯科疾患実態調査で示された全国平均12.2歯、28.9%と比較すると約1.3倍となっており、本研究の高齢者の現在歯数、20歯以上の保有率は高かったが、70～74歳では現在歯数は20歯以下となり、現状は7020の状態であるといえる。今後は高齢者における現在歯数や歯槽骨吸収と、全身疾患の関連について検討する予定である。

マッシュルーム粗抽出物による口腔感染制御能を有した機能性食品の開発

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¹

株式会社医学生物研究所²

岡山大学病院 歯周科³

株式会社 グライコポリマーサイエンス⁴

○伊東 孝¹、今村 幸治²、塩田 康祥¹、河田 有祐⁴、大久保 圭祐¹、高知 信介¹、峯柴 淳二³、
山本 直史³、前田 博史¹、高柴 正悟¹

Development of Functional Food with Infection Control Effect by Mushroom Extract

Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama, Japan¹, MEDICAL and BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD.², Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital³, Glycopolymer Science Co., LTD.⁴

○ITO TAKASHI¹, IMAMURA KOJI², SHIOTA YASUYOSHI¹, KAWATA YUSUKE⁴, OKUBO KEISUKE¹, KOCHI SHINSUKE¹, MINESHIWA JUNJI³, YAMAMOTO TADASHI³, MAEDA HIROSHI¹, TAKASHIBA SHOGO¹

【研究目的】

日本人の死因の3位である肺炎による死亡者数のうち、約97%が65歳以上の高齢者である。このうち誤嚥性肺炎が多くを占め、本疾患の主な原因は口腔内における細菌感染である。しかし、現在の主な予防法は口腔ケアによる感染源の機械的除去であり、時間と労力の問題から十分な対策が行き届かないのが現状である。口腔内という特殊な環境における細菌感染を制御するマテリアルの開発は、高齢化社会に伴う要介護者を守るための課題である。

本研究では上記の課題解決を目的とした機能性食品の開発にレクチンの応用を検討している。レクチンとは糖鎖と特異的に結合する能力を有する酵素や抗体以外のタンパク質の総称である。これらは、原始的生物から高等生物に至るまであらゆる生物に存在し、結合する糖鎖によって多くのファミリーが存在する。また、植物レクチンの中でグルコース・マンノース認識レクチンに *Streptococcus* 属細菌の初期付着及びバイオフィーム形成の抑制効果があることは既に報告されている (E. H. Teixeira *et al.*, 2005; B. Islam *et al.*, 2008)。我々は Gal β 1-3GalNAc 認識レクチンが *Streptococcus mutans* の唾液を介した初期付着、およびバイオフィーム形成を抑制する事を発見した (虫歯予防剤 WO2010/050369)。その中で実用化が可能なレクチンとしてマッシュルーム由来レクチンに着目し、安価な原材料としてマッシュルームの粗抽出物を作製した。今回の報告はマッシュルーム粗抽出物の *in vitro* における有効性評価と安全性評価である。

【方法】

1. 有効性評価

S. mutans ATCC25175 株における唾液への付着度の測定によってマッシュルーム粗抽出物の有効性評価を行った。96穴マイクロプレート上にヒト唾液を固相し、唾液をマッシュルーム粗抽出物で被覆し、更に唾液上に *S. mutans* を付着させ、クリスタルバイオレットで染色・抽出し、菌体数の定量を行った。同時に走査電子顕微鏡 (SEM) で *S. mutans* の付着状態を観察した。

2. 安全性評価

安全性評価として細胞傷害性、および遺伝毒性の検討を行った。ヒト歯肉線維芽細胞に対する影響を検討するため、3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) 法を用いた。マッシュルーム粗抽出物の添加による刺激24時間後に MTT 試薬を添加し、4時間後に細胞溶解液の吸光度を測定した。また、遺伝子突然変異誘発性を検討するため、細菌を用いた復帰突然変異試験を行った。細菌は *Salmonella typhimurium* 4菌株および *Escherichia coli* 1菌株を用いた。試験は直接法および代謝活性化法で、プレインキュベーション法により実施した。

【結果および考察】

有効性評価では、陽性対照条件 (添加なし) に対してマッシュルーム粗抽出物は有意に高い付着阻害効果を示した。同時に、*S. mutans* に対する付着阻害効果は SEM でも顕著に観察することができた。また、MTT法による細胞毒性試験では、細胞傷害性を認めなかった。また、復帰突然変異試験では復帰突然変異コロニー数は陰性対照群の平均値の2倍未満であったことから、遺伝子復帰変異誘発性を有しないと判断した。

【結論】

本研究結果から、食品としての *in vitro* における有効性と安全性が確認できた。今後、マッシュルーム粗抽出物を機能性食品もしくは口腔ケア剤として応用する事で、口腔内細菌の歯面への付着およびバイオフィームの形成を阻害し、感染の成立を予防できる可能性が示唆された。

低濃度オゾン水を応用した歯科用ユニット給水管路内 (DUWL) の微生物汚染抑制システムの検討

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¹

岡山大学病院 歯周科²

岡山大学 歯学部 歯学科³

○大久保 圭祐¹、河田 有祐²、伊東 孝¹、塩田 康祥¹、松永 一幸¹、岡本 大典³、内藤 仁美²、

前田 博史¹、高柴 正悟¹

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

Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan¹, Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital, Okayama, Japan², Okayama University Dental School, Okayama, Japan³

○ OKUBO KEISUKE¹, KAWATA YUSUKE², ITO TAKASHI¹, SHIOTA YASUYOSHI¹, MATSUNAGA KAZUYUKI¹, OKAMOTO MASANORI³, NAITO HITOMI², MAEDA HIROSHI¹, TAKASHIBA SHOGO¹

【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惹起が危惧される。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。近年では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もある。そのため、歯科医療機関に広く普及するには、取り扱いが容易で安価なシステムであることが望まれる。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 DUWL の汚染防止策としてオゾン水 (OZ 水) に注目し、すでに従属栄養水生細菌の増殖抑制を定量的に検討してきた。今回はその結果を視覚化して定性的に検討した。

【材料および方法】

OZ 水は、オゾン水発生装置 (OZS-PTDX: 桜川ポンプ) で作成した (溶存オゾン濃度: 最大 0.4ppm, 半減時間: 約 90 分)。

1. DUWL 中の水の汚染状況の調査

歯科診療室の DUWL から採水した水 (DUWL 水) 0.1 ml を R2A 寒天培地 (和光純薬) に展開して従属栄養水生細菌を培養した。対照は、リン酸緩衝液 (PBS; pH 7.4, Gibco), OZ 水, および水道水 (岡山市水道局) とした。好気下の 33°C で培養し、10 日後にコロニーのカウントと形状を観察した。

2. DUWL 中の水に対する殺菌効果

DUWL 水と OZ 水の比を 1:9 で混合した水 50 ml と DUWL 水 5 ml を、5 分、30 分、そして 60 分間穏やかに振盪し、ナノパーコレータ (孔径 0.6 μ m, フィルタ膜厚 10 μ m, 日本電子) で濾過した。その後、内部フィルタを電界放射型走査性電子顕微鏡 (SEM; FE-SEMDS-720, Topcon) で、加速電圧 15 kV の条件下で観察した。

3. *Candida albicans* に対する殺菌効果

C. albicans ATCC 10231 株を、Brain Heart Infusion 液体培地 (Becton Dickinson) で 24 時間培養した。遠心分離後に上清を除去し、300 ml の OZ 水または PBS で 1×10^8 CFU/ml に調整した。そして、前述の方法で振盪と濾過を行い、SEM による観察を行った。

4. DUWL 構成部品への為害性の検討

未使用の DUWL 構成部品を OZ 水および水道水へ浸漬させ、1 回/日で新鮮な試験水へ交換した (平日のみ 6 ヶ月間)。その後、表面性状の比較を行った。

【結果】

1. 水道水と比較して DUWL 水からは多種・多数のコロニーが確認された。一方、OZ 水からはコロニーは確認されなかった。

2. DUWL 水と OZ 水を混合した場合、DUWL 水の微生物の大部分に破壊像が確認された。

3. *C. albicans* に OZ 水を作用させた場合、菌体の明確な破壊像は観察されなかった。しかし、経時的に、菌体は膨張し、その辺縁は不明瞭化し、形状は球体から楕円形、更には扁平に変化した。

4. DUWL 構成部品に対して OZ 水を作用させた場合、水道水と比較して明確な性状の差は観察されなかった。

【考察】

1. DUWL 水は従属栄養水生細菌を含有していたが、1/10 量の OZ 水と混合するとこの細菌は障害された。DUWL へ持続的に OZ 水を作用させると、効果的に汚染を抑制するかもしれない。

2. *C. albicans* では、真核細胞ためか、細胞形態の変化は細菌ほど顕著ではなかった。しかし、我々の既存の研究では、*C. albicans* の ATP 活性を半減させていたので、*C. albicans* に対しても OZ 水は抗菌効果があると考えられる。

3. 用いた OZ 水は、DUWL 構成部品に対して影響が少ないと考えられる。

【結論】

DUWL の微生物汚染を抑制する方法として、低濃度 OZ 水を断続的に応用したシステムの有用性が示唆された。

岡山県内パーチェット病患者とその口腔状態に関するアンケート調査

岡山大学病院歯周科¹

岡山大学歯学部²

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病態学分野³

○工藤 値英子¹、小谷 朋子²、松永 一幸³、前田 博史³、高柴 正悟³

A questionnaire survey of the intraoral hygienic condition of Behçet's Disease patients in Okayama Prefecture

Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital, Okayama, Japan¹, Okayama University Dental School, Okayama, Japan², Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama, Japan³

○KUDO CHIEKO¹, ODANI TOMOKO², MATSUNAGA KAZUYUKI³, MAEDA HIROSHI³, TAKASHIBA SHOGO³

【緒言】パーチェット病は、難治性で慢性再発性の全身炎症性疾患である。その病因は未だ不明であるが、日本、韓国、および地中海沿岸諸国など特定地域で多いことから外因や内因の関与が考えられる。その中で、口腔内感染も外因の1つといわれており、口腔内感染巣とパーチェット病の関連性や歯科治療によるパーチェット病症状増悪の関連性を示唆する報告がある。主な治療法は投薬治療であり、難治性ブドウ膜炎に対して2007年から保険適用となった抗TNF α 抗体製剤の使用が増加している。本治療は免疫力低下を伴うので敗血症、肺炎、結核等の感染症を惹起する可能性があるため、本疾患患者では口腔感染管理が重要である。この度、岡山大学病院歯周科において、過去に齶蝕治療後に眼発作や視力低下を繰り返した既往があり、かつ抗TNF α 抗体製剤の投与予定である男性パーチェット病患者が受診した。当科において少量の歯石を除去した際にも、翌日から発熱に加えて眼発作および関節痛が5日間続いた。この経験から患者は歯科治療に対して一層消極的になったため口腔内感染を多量に残したままとなり、抗TNF α 抗体製剤に投与を行うことができなかった。そのため、医科歯科連携によって入院管理下の歯科治療を行い、抗TNF α 抗体製剤の投与にまで導いた。本症例の経験から、我々は市井のパーチェット病患者の口腔状態を調査したいと考えた。そして、地域医療機関を受診するパーチェット病患者への対策も踏まえて、大学病院を基点とした医科歯科での地域医療連携による「パーチェット病患者に対する早期の口腔内感染・炎症の制御を目的とした口腔内衛生管理システム」を構築することを考えた。今回は当院内科協力の下で、岡山県におけるパーチェット病患者とその口腔状態を把握するためのアンケート調査を実施したので報告する。

【材料および方法】1.岡山大学病院腎臓・糖尿病・内分泌内科の協力の下、岡山県から提供された「パーチェット病登録医療機関」(特定疾患申請時に「受診予定」として患者が登録した医療機関)から抽出した261施設(病院:88施設、診療所:165施設、歯科医院:8施設)に対して、無記名アンケートを実施した。2.アンケートに回答のあった122施設について結果をまとめ、考察した。

【結果】122施設から以下のアンケート結果の回答を得た。1.このような調査検討に興味があると答えた施設は72施設(59%)であった。2.122施設中、パーチェット病患者が通院中の施設は62施設(50.8%)で、通院患者総数は162人であった。前述の62施設において、3.「通院中のパーチェット病患者のうち、歯科に通院している患者はいますか?」との質問に対して、「はい」との回答は10施設(患者総数18人)、「いいえ」は39施設、「不明」は13施設だった。4.「口腔衛生状態不良と思われるパーチェット病患者はいますか?」との質問に対して、「はい」との回答は7施設(11.3%)、「いいえ」は34施設(54.8%)、「不明」は21施設(33.9%)だった。5.歯科治療後にパーチェット病が悪化した患者を経験した施設は、内科と皮膚科の2施設で、その症状は「口内炎」または「発熱」だった。6.歯科治療後にパーチェット病が改善した患者を経験した施設は、内科と歯科の2施設で、その症状は「口内炎」だった。

【考察および結論】1.患者に自覚がない口腔内症状の場合は、医師が口腔内情報を正確に把握できていない可能性もある。そこで、全てのパーチェット病患者において、医師が口腔状態を把握できる環境整備が必要である。2.歯周病感染度を調べる血漿IgG抗体価検査や口腔内細菌数を測定する唾液検査などの簡易郵送検査の利用によって、医師など歯科医師以外の医療従事者でも口腔内状況を把握することができる。このような口腔領域の簡易検査を充実させた医科歯科連携による口腔感染管理システムの確立は、原疾患の軽症化や医科治療の効率化に繋がると考える。3.以上から、本アンケート調査によって、医科におけるパーチェット病患者に対する口腔内情報の把握度は低い可能性が予測され、医科歯科連携による口腔内感染管理の重要性を再確認した。

ラウリルジアミノエチルグリシンナトリウムを配合した含嗽薬の評価
株式会社ジーシー
○高山 和人、石原 容子、熊谷 知弘

Effect of mouthwash containing Sodium Lauryldiaminoethylglycine
GC Corporation
○TAKAYAMA KAZUTO, ISHIHARA YOKO, KUMAGAI TOMOHIRO

【概要】

含嗽薬は口腔内やのどの殺菌、消毒、口臭予防に効果があり、有効成分としてはポビドンヨード、塩化セチルピリジニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、塩化ベンゼトニウムなどがよく知られている。これらの多くはカチオン系殺菌剤で、負電荷をもつ細菌に付着することで殺菌効果が得られると言われている。
また、含嗽薬の有効成分として両性界面活性剤という種類もある。これは、陽イオンによる殺菌作用だけでなく陰イオンによる洗浄作用もあるため、口腔内の殺菌・洗浄作用の相乗効果が期待できる。
本試験では両性界面活性剤の一つであるラウリルジアミノエチルグリシンナトリウムの殺菌効果と細菌の付着抑制能を評価し、含嗽薬への利用の可能性を探ることを目的とした。

【試験方法】

1. 含嗽薬の殺菌効果の評価

刺激唾液 100 μ L を含嗽薬（蒸留水、0.0005%クロルヘキシジン（CHX）、0.003%ラウリルジアミノエチルグリシンナトリウム（LDE））1mL に加え、攪拌した。PBS 希釈後、BHI 寒地培地に播種し、37℃で一昼夜培養した。得られたコロニー数から殺菌効果を評価した。統計解析には Steel-Dwass 法を用いた。

2. 含嗽薬の *S. mutans* (Sm) バイオフィーム付着抑制能の評価

蒸留水、0.0005% CHX、0.003% LDE を入れた 96 穴プレートに MBEC Biofilm Inoculator (innovotech 社、以下 MBEC) を挿入し、室温で一昼夜処理した。1%スクロース含有 BHI 培地に懸濁した Sm ATCC25175 を入れた 96 穴プレートに MBEC を挿入し、37℃で 1 時間嫌気培養した。MBEC はクリスタルバイオレットで染色し、595nm の吸光度を測定して Sm の付着抑制能の評価を行った。統計解析には Tukey 法を用いた。

【結果】

1. 殺菌効果の評価結果

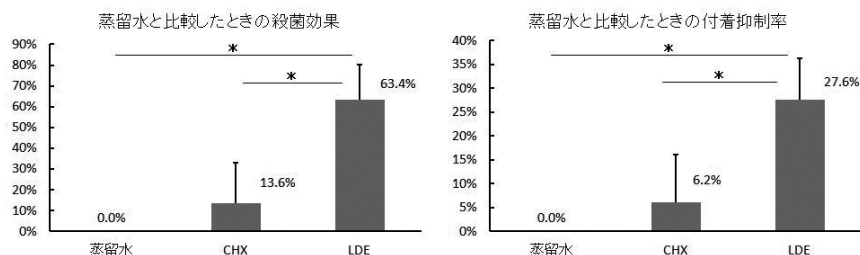
各含嗽薬で処理したサンプルの菌数は、蒸留水で 9.0×10^7 CFU/mL、CHX で 7.5×10^7 CFU/mL、LDE で 3.2×10^7 CFU/mL となった。蒸留水と比較したときの殺菌効果は CHX で 13.6%、LDE で 63.4%となった ($p < 0.05$)。

2. 付着抑制能の評価結果

クリスタルバイオレットは細菌の染色液として知られており、細菌数が多いと吸光度が高くなる。595nm の吸光度は、蒸留水で 0.531、CHX で 0.498、LDE で 0.382 となった。蒸留水と比較したときの付着抑制能は CHX で 6.2%、LDE で 27.6%となった ($p < 0.05$)。

【結論】

実使用を想定した濃度で比較すると、LDE は CHX よりも高い殺菌力、Sm 付着抑制能を有していることが示唆された。LDE を配合した含嗽薬は殺菌効果だけでなく細菌の付着抑制効果も有するため、歯科治療前後の口腔内洗浄に有効であると考えられる。



痛みのコントロールにおける合谷と迎香の関連について - ハリと炭酸ガスレーザーとの比較 -

明海大学 歯学部 機能保存回復学講座 保存修復学分野¹

○市村 葉¹、片山 直¹

THE RELATIONSHIP BETWEEN HEGU AND YINGXIANG - EFFECT OF THE NEEDLES AND THE CO2 LASER -

Division of Operative Dentistry Department of Restorative & Biomaterials Science¹, Division of Operative Dentistry Department of Restorative & Biomaterials Science²

○ICHIMURA YOH¹, KATAYAMA TADASHI¹

【緒言】我々は、歯科臨床における痛みのコントロールの一助として、東洋医学的アプローチによるハリ療法を応用してきた。なかでも口腔内の痛みのコントロールに有効であるとされる合谷に注目してきた。合谷のハリ刺激によって同一経絡の終末にあたる迎香の経時的温度変化から、痛みの除去に伴う二者間における関連性に注目し、痛み除去の効果判定に応用した報告をおこなっている。また、炭酸ガスレーザーによるツボ刺激がハリと同様の効果を示すことも報告してきた。そこで今回、我々は、ハリ刺激の効果判定に合谷と迎香を応用し、ハリ療法と炭酸ガスレーザーによるツボ刺激の効果について比較検討したので報告する。

【方法】同意を得たボランティアの被験者 10 名において、左側合谷に 10 分間置針し、サーモグラフィーにて左右迎香の経時的な体表面温度変化を測定した。同様に、左側合谷に炭酸ガスレーザーにて、同一エネルギー量となるようにハリ療法を行い、経時的温度変化を測定した。温度測定は、施術前の安静時を基準とし（術前）、刺激直後（0 分）から、5 分ごとに、約 40 分間測定を行った。

【結果】1）ハリ刺激と炭酸ガスレーザーによるツボ刺激において、同様の体表面温度の変化が見られたのは、10 人中 6 人であった。2）ハリ刺激にのみ顕著な体表面温度の変化が見られたのは、2 人であった。3）炭酸ガスレーザーによるツボ刺激では、顕著な体表面温度の変化が見られなかったのは、2 人であった。4）体表面温度の変化が見られたものでは、ハリ刺激においても、炭酸ガスレーザー照射においても同様の結果を示した。

【考察】以上の結果から、本研究において、ハリ刺激と炭酸ガスレーザーによるツボ刺激の效果に類似性があることが示唆された。しかし、経絡やツボの実態、本来の刺激伝達経路や、遠隔部への作用機序などについては未だ不明な点も多く、今後も更に研究が必要である。今回の研究においても、炭酸ガスレーザー照射は、ハリ刺激と類似の効果を得ることが出来たことより、痛みの除去方法におけるハリ療法の 1 つとして応用可能であることが示唆された。

【結論】1）ハリ刺激と炭酸ガスレーザーによるツボ刺激において、同様の体表面温度の変化が見られたのは、10 人中 6 人であった。2）刺激部の合谷と反対側の迎香の体表面温度が上昇したのは、10 人中 2 人であった。3）両側の迎香の体表面温度が上昇したのは、10 人中 2 人であった。4）ハリ刺激、炭酸ガスレーザー照射ともに同様の結果を得ることが出来た。5）痛みのコントロールにおいて、CO2 レーザーによるツボ刺激の有効性が示唆された。