

失活した根未完成歯に対し revascularization を行った症例

昭和大学歯学部歯科保存学講座歯内治療学部門*

昭和大学歯学部歯科保存学講座歯科理工学部門**

○高林正行*、増田宜子*、細田秀剛*、宮本千明*、馬場聖*、宮崎隆**

Regenerative Endodontic Treatment (Revascularization) of Necrotic Immature Permanent Teeth

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

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

○Masayuki Takabayashi*, Yoshiko Masuda*, Shugo Hosoda*, Chiaki Miyamoto*, Satoru Baba*, Takashi Miyazaki**

【緒言】

根尖病変の有無にかかわらず、失活した根未完成永久歯の治療は Alfred L. Frank の報告(1966年)以降 Apexification が行われてきた。しかしこの治療法では、長期間複数回の来院が必要、薄い歯根象牙質に対してファイルなどのインスツルメンテーションによる障害、長期の水酸化カルシウム暴露による象牙質の機械的強度低下、根管充填が困難、根の成長は継続せず根管壁は短く薄いままで根管の強度に不安が残るなど問題が多い。

その問題を補うよう Torabinejad M, Chivian N らが報告(1999年)した、一回の来院で Apexification の処置を完了する One visit Apexification という処置法も従来の Apexification と比べ、根の成長は継続せず根管壁は短く薄いままで根管の強度に不安が残るという問題を改善する処置法ではなかった。2001年 Iwaya らが revascularization と題し、失活した根未完成永久歯に対し行った治療により根の伸長及び幅系の増加が認められた症例を報告した。その治療法について近年様々な研究及び報告がされている。今回、我々は昭和大学歯科病院歯内治療科にて失活した根未完成歯に対し、revascularization を行った症例を報告する。

【症状】

患者は15才女性、下顎右側の腫脹を主訴に当院口腔外科を受診した。当日は切開排膿処置及び抗菌薬の処方が行なわれ、急性症状の消退を確認した後に歯内治療科に紹介された。診察したところ患歯は下顎右側第二小臼歯。打診痛、圧痛、若干の咬合痛有り。エックス線診査において根未完成及び根周囲透過像有り。患歯周囲のポケットは全周2mm、アナリティックパルプテスターによる電気歯髄診及びパルパーによる寒冷診において陰性反応であった。視診にて中心結節の破折を認め、そこから感染を起こしたと考えられた。臨床診断を歯髄：歯髄壊死、根尖：慢性根尖性歯周炎と診断し、治療方針の説明を行い同意を得て治療を開始した。

【治療】

1st appointment：浸潤麻酔(血管収縮効果のあるもの)を行いラバーダム防湿し髄腔開拓を行った。根管壁を触れないうよう20mlの1.5%NaOClを用いて根管洗浄後、さらに生理食塩水を用いて洗浄した。その後根管内吸引を行い根管乾燥しカルシベックスプレーンII(日本歯科薬品)を貼薬、グラスアイオノマーセメントにて仮封を行った。

2nd appointment：症状の消退を確認し、浸潤麻酔(血管収縮効果のないもの)を行った。ラバーダム防湿し貼薬剤除去後20mlの17%EDTAを用いて根管洗浄、根管乾燥を行う。その後根尖部をオーバーインスツルメンテーションし根管内に血餅を誘導した。3~4mmの厚みでProRootMTA(デンツプライ三金)を充填し、水硬性セメントとグラスアイオノマーセメントで2重仮封を行った。

3rd appointment：歯冠部の仮封を除去し、コンボジットレジンで歯冠修復を行った。

【結果】

根管充填後、2ヶ月、4ヶ月、6ヶ月、12ヶ月と経過を追っているが臨床症状の再燃は無く、エックス線診査においても根尖病変は縮小の傾向を認め、根尖部及び根管内に硬組織の添加が確認できた。隣在歯に比べ若干の歯冠部の変色を認めるが、根管充填後12ヶ月の段階でアナリティックパルプテスターによる電気歯髄診、パルパーによる寒冷診にて陽性反応があり経過は良好である。

【結論】

Revascularization は失活した根未完成永久歯の治療に有用であると考えられる。引き続き本症例の経過観察を行う予定である。

上顎切歯歯冠部に発症した内部吸収の一症例

- 1) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病態学分野,
2) 岡山市 はなみずきデンタルクリニック, 3) 岡山大学病院 歯周科
○青柳浩明¹⁾, 下江正幸¹⁾, 峯柴淳二²⁾, 山本直史³⁾, 高柴正悟¹⁾

Internal Resorption Developed in the Tooth Crown of Maxillary Incisor: a Case Report

- 1) Department of Pathophysiology - Periodontal Science,
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences
2) Hanamizuki Dental Clinic, Okayama City
3) Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital
○Hiroaki Aoyagi¹⁾, Masayuki Shimoe¹⁾, Junji Mineshiba²⁾, Tadashi Yamamoto³⁾, Shogo Takashiba¹⁾

【緒言】 歯の内部吸収は、歯髄への何らかの刺激によって歯髄組織の一部に限局性の肉芽組織の増殖が起こり、歯髄側象牙質の吸収を自覚症状なく生じさせる。さらに、無症状のまま進行していくので、発見されることが比較的稀な疾患である。内部吸収のメカニズムとしては、炎症による象牙芽細胞層の消失と破歯細胞の侵襲が考えられており、内部吸収がみられる歯は非可逆性歯髄炎または歯髄壊死をも呈すると言われている。今回、11の歯冠部に限局的に内部吸収が進行し、露髄を引き起こした症例を経験したので、その病態考察と治療経過を報告する。

【初診】 初診：2010年5月、12歳、女性 現病歴：2009年4月、11の歯冠部中央にピンク色の斑点ができていたことに気付く近医を受診したが、経過観察となった。2010年5月、今度は11の口蓋側歯質に穴が開いていることに気付いて再び同院を受診したところ、大学病院での治療を勧められて岡山大学病院歯周科へ紹介となった。なお、11には外傷の既往は無かった。検査所見：口腔内所見では、ブラークコントロールは不良であった。11の歯冠部は、唇側面にPink Spotを呈しており、口蓋側面に露髄部があった。21の口蓋側面の同部には咬合接触が存在したので、11の露髄部位の歯質には過去に咬合接触が存在したとと考えられた。垂直打診痛は軽度であり、電気歯髄診では21と比較して閾値はほぼ同等であった。デンタルエックス線所見：11の歯冠部には類円形の透過像があり、根尖部は完成し、根尖周囲には透過像はなかった。

【診断】 11歯冠部の内部吸収からの露髄

【病態】 日常生活の中で、11の口蓋側の切縁結節部に対する41切端による咬合刺激が持続した結果として、歯髄内部に炎症が惹起された。その結果として引き起こされた内部吸収が自覚症状を起こさずに徐々に進行して、口蓋側歯質が菲薄となり、咬合接触時に薄い歯質が破折して露髄した。

【治療方針・計画】 原因不明の進行性の内部吸収が生じていること、感染した疑いのある歯髄組織があることから、早期に断髄あるいは抜髄を行う。

【治療経過】 初診当日：11の歯肉-頬移行部に浸潤麻酔を行った後に、ラバーダム防湿を行った。浸潤麻酔が奏功するために3分程度待ったが、切削時痛があったため歯髄腔内麻酔を追加した。その後、アクセスキャビティを形成する際に歯根部歯髄からも出血が多かったので、根尖部まで炎症が波及している可能性を疑い、抜髄を行った。#70のKファイル[®] (マニー) を用いて、21.0 mmの作業長で根管を拡大・形成し、ネオクリナー[®] (10% NaClO, ネオ製薬工業) とオキシドール[®] (1.5% H₂O₂, マルイシ) で相互洗浄を行った。その後、ブローチ綿栓にて根管を乾燥させて、脂溶性で長期間安定性の高い水酸化カルシウム製剤である Vitapex[®] (ネオ製薬工業) を根管内に注入してベースセメント[®] (松風) で仮封を行った。3ヵ月後：打診痛は消失した。肉眼所見に異常が無いことと、エックス線所見に内部吸収の拡大像等の異常がないことを確認し、Vitapex[®]を交換した。11ヵ月後：両所見に異常がないことを確認し、ガッタパーチャポイント[®] (ジーシー) を用いて側方加圧方式の根管充填を行った。3年半後：両所見に異常はなく、良好な経過を得ている。

【考察】 本症例の内部吸収の病態は、慢性的な咬合接触によって惹起されたものであると考えたが、12, 21, そして22も同様の部位に咬合接触が存在するため、11にだけ内部吸収が生じた理由は不明である。初診から約4年が経過し、機能的にも良好な経過を得ている。今後も咬合状態を確認しつつ患歯とともにこれら隣在歯の経過を追っていく必要があると考える。

歯根破折歯の意図的再植術による長期経過—自己血餅の有用性—

¹⁾福岡市 ひらかわ歯科医院 ²⁾九州大学大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野
³⁾九州大学大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 補綴学分野 ⁴⁾奥羽大学歯学部歯科補綴学講座
○平河貴大¹⁾ 梶島浩明²⁾ 栗田賢一³⁾ 寺田善博⁴⁾

Long-term progress for intentional replantation of vertically fractured tooth —the usefulness of an autologous blood clot—

¹⁾HIRAKAWA Dental Clinic ²⁾Section of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University ³⁾Section of Fixed Prosthodontics, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University ⁴⁾Department of Prosthetic Dentistry School of Dentistry, Ohu University
○Takahiro Hirakawa¹⁾, Hiroaki Kabashima²⁾, Kenichi Kurita³⁾, Yoshihiro Terada⁴⁾

「緒言」

日常の臨床において、しばしば難治性の根尖性歯周炎あるいは穿孔などの偶発症例、また歯の破折・亀裂などさまざまな原因による歯の喪失に遭遇することがある。その結果、喪失部位の歯槽骨の廃用萎縮、両隣接歯の傾斜、対合歯の挺出など歯列不正、咬合崩壊を引き起こし、咀嚼機能低下につながり、口腔内の不調へと至る。欠損補綴として、ブリッジ、部分床義歯、インプラントが考えられるが、患者の喪失感を払拭できないことがある。

近年、このような欠損部位において、天然歯列に近い状態で咬合支持の再建治療として、意図的再植術や自己歯移植術が施されてきた。

本症例では、組織親和性が良く、歯質に対して優れた接着性を有する 4META/MMA-TBB レジンを応用した意図的再植術を歯根破折歯に行った。歯周組織再生に効果的なゼラチンとテトラサイクリン系抗生物質の混合自己血餅を術部に応用したところ、口腔内所見並びにレントゲン所見など、臨床的に良好な経過を辿っている 2 症例を報告する。

なお、本症例の報告にあたり、口腔内写真やエックス線画像の担当使用に患者の同意を得ている。

「症例 1」

患者：53 歳、女性。

主訴：下顎左側臼歯部の頬側部歯肉腫脹を繰り返し、咬合痛。

初診時口腔内所見

┐7 自発痛なし。

頬側歯肉腫脹、根尖相当部歯肉の圧痛あり。

打診痛あり。咬合痛程度あり。

診断：┐7 歯根破折

「症例 2」

患者：48 歳、女性。

主訴：5 年前より 5┐ 相当部頬側部歯肉腫脹を繰り返し、咬合痛。

初診時口腔内所見

5┐ 歯根中央相当部遠心寄りの頬側歯肉に瘻孔を認めた。

自発痛 (-)、打診痛 (+)、咬合痛 (+)

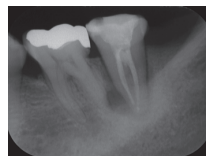
診断：5┐ 歯根破折

「考察及び結論」

本症例は、抗菌剤オキシテトラサイクリンとゼラチンとの混合自己血餅化の下、意図的再植術を行った。治療過程において外傷性咬合に留意し、暫間固定やプロビジョナルレストレーションを行い、最終補綴物を装着した症例である。本症例の意図的再植術における長期的な臨床的良好な結果が得られたのは、自己血由来の成長因子を豊富に含む血餅が長く保持されていることが該当歯根周囲の歯槽骨再生に繋がったと考えられる。

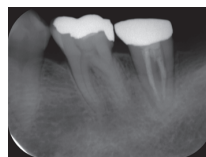
意図的再植術は、咬合再建治療の有効な治療法の一つと考えられるが、長期的観察の元、治療経過の検討が必要であると考えられる。

Pretreatment



Mobility	0	1
B.O.P	-	+
P.D	Lingual	3 3 3 6 6 3
	Buccal	3 3 3 6 7 3
dental formula	┐6	┐7

97 months after treatment



Mobility	0	0
B.O.P	-	+
P.D	Lingual	3 2 3 2 3 3
	Buccal	2 3 2 2 3 3
dental formula	┐6	┐7

Pretreatment



Mobility	0	0	0
B.O.P	-	+	-
P.D	Lingual	2 2 2 8 2 2 2 2	
	Buccal	2 2 2 7 2 2 2 2	
dental formula	6┐	5┐	4┐

73 months after treatment



Mobility	0	0	0
B.O.P	-	+	-
P.D	Lingual	2 2 2 3 2 2 2 2	
	Buccal	2 2 2 2 2 2 2 2	
dental formula	6┐	5┐	4┐

歯の再植後の硬組織変化に対する組織学的検索モデルに関する考察

1) 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第1講座

2) 日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学

○新井恭子^{1, 2)}、北島佳代子^{1, 2)}、五十嵐 勝^{1, 2)}、飯野華絵²⁾、山田理絵¹⁾

A consideration about the research model efforts for histological observation following tooth replantation of avulsed tooth

1) Department of Endodontics, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata

2) Advanced Operative Dentistry-Endodontics,

The Nippon Dental University Graduate School of Life Dentistry at Niigata

○ARAI Kyoko^{1, 2)}, KITAJIMA Kayoko^{1, 2)}, IGARASHI Masaru^{1, 2)}, IINO Hanae²⁾ and YAMADA Rie¹⁾

【緒言】

外傷で脱臼した歯を再植する場合、良好な治癒経過を得るには健全な歯根膜の存在と迅速な対応が重要である。歯根膜の汚染や損傷が著しい場合や脱臼歯が乾燥して歯根膜組織が壊死したと考えられる場合には、それらの壊死組織を徹底して除去しておく必要がある。ところが、歯根膜などの軟組織を失い、セメント質や象牙質が露出した状態で再植が行われると、歯根の外部吸収や骨性癒着が起こりやすいといわれている。そこで再植を行った後、歯根膜様の線維組織を根面に再生させることができれば、破骨細胞のセメント質吸着を防止でき、術後の外部吸収、骨性癒着、置換性歯根吸収などを回避できるものと推察できる。本研究は、歯髄や歯根膜などの軟組織を伴わない象牙質小片をラット歯肉下に埋入し、その後の組織反応を検索するための実験術式を確立させることを目的として行われた。

【材料および方法】

Wister系雄性ラット6週齢9匹を使用した。動物にチオペンタール25 mg/kgを投与して全身麻酔を施し、手術台に固定した。上顎右側第1大臼歯(M1)の口蓋歯肉に浸潤麻酔を施し、歯科用エキスカベーターを抜歯用挺子として使用し、歯の抜去を行った。抜去歯の歯根表面を#11フェザーメスで擦過し、可及的に歯根膜組織を除去した後、近心根を根分岐部付近で切断し、抜髄と根管拡大を行った。根中央部を約2 mmの大きさに調整し、歯根の長軸方向に沿って4分割し、滅菌生理食塩液中に浸漬し-30°Cで凍結保存した。

抜歯4週後に抜歯窩相当部の歯肉を#15メスで切開し、歯肉を剥離して歯槽骨を露出させた。カーバイトバーを使用し、骨面に約0.5 mmの深さの窩洞を形成した。解凍した象牙質小片を窩洞内に埋入後、歯肉弁を復位した。創面の縫合は行わず、1 x 1.5 mm大の滅菌不織布に手術用アロンアルファA「三共」(第一三共株式会社)を浸潤させて創面を被覆し終了した。術後2、4週時にラットを安楽死させ、被験部位を根尖部歯周組織も含めて摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液中で固定を行った。試料を10%EDTAで脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行い、厚さ6 μmの連続切片を作製後、HE染色を施し光顕にて観察した。なお本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理委員会の承認(承認番号137)を得て実施された。

【結果】

埋入した歯根片の多くは脱落し、歯肉下に残留したのは2例のみであった。埋入部に残存した象牙質小片は術後2週では、周囲組織に炎症性細胞浸潤はみとめられず、新生肉芽組織にて被包され、線維性治癒を示していた。マクロファージや破骨細胞の発現は明らかではなく、セメント質などの硬組織添加や歯根膜様組織の再生もみられなかった。骨小片が歯肉内に残存した場合、上皮突起から上皮細胞が伸長して被包しており、骨表面は凹凸を示し、吸収が盛んに生じていた。

【考察ならびに結論】

埋入片の脱落は、口腔切創の接着法が不十分であったことや、不織布の違和感からラットが除去行為を行った際に創面から排出した可能性が考えられ、歯肉弁に対する縫合を今後検討する必要性が認められた。本研究でM1の抜歯術の術式が確立でき、抜歯窩への再植も可能であることが確認できたことから、創面の縫合と埋入片脱落に対する対策を行うことで再植実験系を確立できることが示された。今後は、歯肉切開部の縫合法を確立するとともに、脱臼歯から得られた歯根膜由来線維芽細胞をコラーゲンゲルと併用し、セメント質再生や歯根膜再生、外部吸収防止等について検索を継続する予定である。

HY 材を用いた当院での歯髄温存処置

つは歯科医院
○津覇 雄三, 伊東 優

Conservative treatment of pulp in our dental clinic using HY material
Tsuha Dental Clinic
○Yuzo Tsuha, Yu Ito

【目的】歯牙を長期保存するために日々診療を行っているが、そのためには出来る限り歯髄を保存し、修復処置を行いたいと考える。日常臨床においてう蝕が歯髄に近接する深部象牙質にまで進行している場合、感染象牙質を徹底的に除去すると、露髄が生じるために抜髄を選択せざるを得ない症例に直面することがある。非侵襲性歯髄覆罩 (AIPC) は、感染象牙質を意図的に残しそこに覆髄材を貼付することで、残置した感染象牙質の無菌化や再石灰化、さらには第三 (修復) 象牙質の形成を促進して治癒を図る治療法であり、タンニン、フッ化物配合カルボキシレートセメントを使用することにより、抗菌効果や再石灰化、第三 (修復) 象牙質の形成が認められる事が科学的に証明されている。今回は当院で歯髄温存処置を行い、現在も歯髄が生活反応を示し経過観察を行っている 18 症例を考察するとともに、何症例かの術前、術中、術後のエックス線写真および口腔内写真を報告する。

【材料および方法】覆髄材のタンニン、フッ化物合材配合カルボキシレートセメントとして HY-Bond Temporary Cement Soft (松風) を使用し、う蝕の除去の際にはカリエスチェック (日本歯科薬品) を使用し、ラウンドエクスカーター S-0.7 (GC) にて除去を行った。術式としては、日本歯科保存学会 AIPC のガイドライン (2009 年 7 月 8 日更新) に基づいて行い、術前、術中、術後エックス線にて確認を行っていった。

【考察・まとめ】当院の患者 18 症例 (7 歳から 35 歳まで) において良好な結果を示した。そのうち 83、3% が大臼歯その他は小臼歯であった。また全体の 67% が第 1 大臼歯であった。また、72、2% が 2 級窩洞であった。術中において学童期の症例においてより著明な歯髄側に再形成されたエックス線不透過像が確認された。

当院の臨床において歯髄温存処置は大変有効な処置であるといえる。今後も経過観察を行い、歯牙の長期保存に努めたい。

マイクロCTを用いた下顎切歯根管湾曲の三次元的観察

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座
○西田太郎, 勝海一郎

Three Dimensional Observation of Root Canal Curvature in Mandibular Incisor

Department of Endodontics, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo
○NISHIDA Taro, KATSUUMI Ichiroh

【はじめに】

下顎切歯は単根歯であるが、歯根が強度に扁平しており、根管の分岐や湾曲、さらには根尖分岐などが認められ治療難度の高い歯種である。根管の湾曲度を計測した研究は様々なものがあるが、単純X線撮影などを用い平面的に評価したものが多く、また、三次元的に構築された画像を用いたものでも、湾曲度の測定は二次的な評価に終始したものが多い。

本研究は、マイクロCTを用い下顎切歯の連続的な断層撮影を行い、三次元画像を構築後、根管の湾曲を三次元的に評価した。

【材料と方法】

実験には齶蝕のないヒト抜去下顎切歯 50 本を用いた。歯根を肉眼的に観察後、マイクロCT (ELE-SCAN, 日鉄エレクトクス) を用い、管電圧 80kV, 管電流 $70\mu\text{A}$, スライス厚 $52.9\mu\text{m}$ の条件で、根尖から歯冠部まで連続的に断層撮影を行った。得られた断層像は画像処理ソフト (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング) により三次元構築を行った。三次元画像上で根管分岐を認める歯を除外し、39 歯を対象に分析を行った。

1. 根管湾曲度

歯軸に直行する断面画像を作り、断面画像上で根管中央を連続的に抽出し、根管中央を通る曲線 (CL) を作図した。三次元画像上で CL の上端と根尖孔開口部を参考に湾曲度を計測した。

2. 根管の湾曲位置

三次元画像上で、CL の湾曲点と根尖孔開口部の距離を計測した。根管湾曲度と根管の湾曲位置との関係について Pearson の相関係数を調べた。

【結果】

1. 根管湾曲度

根管の湾曲は 37 歯、38 カ所で認められ、1 歯は S 字状の湾曲を呈していた。39 歯の根管の湾曲の平均は 10.7 度で、最大 21.5 度であった。また、10 度以上の強湾曲を呈した歯は 21 歯認められた。

2. 根管の湾曲位置

根管の湾曲位置は根尖孔開口部から平均 3.5mm, 最大 13.1mm であった。統計分析の結果、2 群間に相関を認めなかった ($r=0.0303$)。

【まとめ】

本研究により、根管の湾曲を三次元的に計測することが可能となり、より正確に湾曲度を評価できる可能性が示唆された。

根管の湾曲が根尖側に存在し、その約半数が強湾曲を示した下顎切歯は、根管治療時に湾曲部でのレジ形成などへの注意が必要である。臨床では、ファイル先端部へのプレカーブの付与や柔軟性の高い Ni-Ti ロータリーファイルを用い拡大形成を行う必要性が窺われた。今後、さらに詳細な検討を行う予定である。

演題 P97 (歯内)
【2503】

日本人上顎第一大臼歯の根管の根尖側 3mm への年齢による差異:マイクロ CT を用いた研究

東京歯科大学歯科保存学講座

○関谷紗世、山田雅司、宮吉教仁、藤井理絵、村松敬、古澤成博

Age related difference on the root canals apical third of the Japanese maxillary first molar :

a micro-computed tomographic study

Age related difference on the root canals apical third of the Japanese maxillary first molar :

a micro-computed tomographic study

○SEKIYA SAYO, YAMADA MASASHI, MIYAYOSHI NORIHITO, FUJII RIE,

MURAMATSU TAKASHI, FURUSAWA MASAHIRO

目的：現在、歯根端切除術において根尖側 3mm で根尖の切除を行うことが一般的である。しかしながら、その切断面は多くの場合にイスマス等の構造物が観察され、その対応が必要となる。イスマスは扁平根では高頻度で観察され、特に上顎第一大臼歯近心根では、根尖側 3mm において 6-64%存在すると報告されている。我々の研究でも、近心頰側根 (MB 根) > 遠心頰側根 (DB 根) > 口蓋根 (P 根) と扁平傾向が強くなるに従い、イスマスを含む根管形態が観察され、また 45%においてイスマスの発現が観察された。そのうちの多くは不完全イスマスであったことから、臨床において検出するのは困難であると考えられた。根管形態は加齢に伴う第三象牙質や象牙質粒の形成により狭窄傾向を示すことから、加齢に伴いイスマスも狭窄する可能性が考えられるものの、その詳細については不明な点が多い。今回我々は、年齢別に日本人の上顎第一大臼歯の根尖側 3mm 部でのイスマスと象牙質粒の発現についてマイクロ CT を用いて観察を行い検討した。

方法：検索には日本人の抜去歯 100 本を用い、マイクロ CT (HMX225-ACTIS 4 TESCO, Inc.) にて管電圧 100kV、管電流 75 μ A、倍率 10 倍、スライス幅 50 μ m の条件で撮影した。得られたスライスデータより、MB 根、DB 根、P 根の根尖側 3mm の部位での、スライスデータを観察し、年齢別 (20, 30, 40, 50, 60 歳代) に不完全イスマス、完全イスマス、イスマス無しの発現率について検索を行った。また、各根管の象牙質粒の有無に関しても年齢別に発現率を検索した。

結果：イスマスの発現率については MB 根では不完全イスマスの発現が多く (n=33/100)、20 歳代では完全イスマスが多いのに対し、30, 40, 50, 60 歳代では不完全イスマスが多く観察された (完全 : 50% \rightarrow 10% \rightarrow 15% \rightarrow 10% \rightarrow 13.3%, 不完全 10% \rightarrow 30% \rightarrow 45% \rightarrow 13.3% \rightarrow 30%) DB、P 根ではイスマスはほとんど観察されず、年齢による差異は認められなかった。象牙質粒の発現率は P>DB>MB の順で高く、P 根では 50 歳代で最も高かった。

考察：マイクロ CT を用いることによって非破壊的で正確に、根管やイスマスなどの構造物の形態を調査することが可能であった。今回の結果では、MB 根では不完全イスマスの発現が 30 歳代以降に多くなったことから、加齢に伴いイスマスが狭窄して不完全になったものと考えられた。また、今回 P>DB>MB の順で象牙質粒の発現率が増したが、根管が太く歯髄の容積が大きい根管の場合、加齢に伴い象牙質粒が形成されることで根管が狭窄傾向を示すものと考えられた。

ラット象牙芽細胞(KN-3)に対するカテキンとカフェイン酸の抗炎症作用

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 発達予防歯学部門
健康長寿歯科学講座 歯科保存学分野
○細川由樹、湯本浩通、平尾功治、中西正、武川大輔、松尾敬志

Anti-Inflammatory Effect of Catechin and Caffeic Acid on Rat Odontoblastic Cells (KN-3)

Department of Conservative Dentistry, Institute of Health BioSciences, Tokushima University
○Yuki HOSOKAWA, Hiromichi YUMOTO, Kouji HIRAO, Tadashi NAKANISHI, Daisuke TAKEGAWA,
Takashi MATSUO

【研究目的】

歯髄は、主に歯への刺激の知覚と細菌に対する免疫反応やそれらの侵襲に対する防御機能を担っている。齶蝕による細菌感染をはじめとした様々な刺激によって、歯髄に炎症性反応が惹起されて歯髄炎へと進行するが、この炎症が持続あるいは強度になると、歯髄組織に不可逆性の変化を与え、歯髄除去療法すなわち抜髄処置が行われる。抜髄による無髄歯の予後は、有髄歯と比較して悪く、特に破折等の理由により抜歯を余儀なくされるケースも決して少なくない。すなわち、歯髄保護の観点からも、歯髄炎の病態や発症のメカニズムを詳細に解明し、新規の歯髄炎の治療ならびに歯髄温存療法を開発することは重要である。齶蝕から歯髄炎への進行において、その感染初期に、齶蝕関連細菌による刺激で、まず象牙芽細胞の自然免疫機構が働き、炎症が惹起される。我々はこれまでに、自然免疫機構に関与するレセプター(Pattern Recognition Receptors, PRRs)のひとつである Nucleotide-binding Oligomerization Domain protein (NOD)-1 が、ラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)に発現しており、NOD1 の特異的リガンドである D-glutamyl-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP)刺激により、KN-3 は CINC-1、CXCL2/3、MCP-1 等のケモカインを産生することを本学会(日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会)にて報告した。

近年、ポリフェノール類の一種であるカテキンに抗炎症作用があることが報告されており、我々も歯髄線維芽細胞に対して、カテキンが抗炎症作用を有することを報告している(Life Sciences, 2010)。そこで本研究ではカテキンに加えてカフェイン酸、特にプロポリスの生理活性物質である Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)、の象牙芽細胞に対する抗炎症作用について検討を行った。

【材料及び方法】

ラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)(九州歯科大学、北村知昭教授・西原達次教授より恵与)を 24-well plate に播種し、サブコンフルエントまで培養後、Caffeic acid、Caffeic acid phenethyl ester (CAPE)あるいは Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) の存在下で、NOD1 リガンドである iE-DAP や炎症性サイトカインである Tumor Necrosis Factor (TNF)- α にて 24 時間刺激し、培養上清を回収した。細胞障害性については、細胞形態を顕微鏡下で観察し、加えて LDH Cytotoxicity Assay にて解析を行った。また、上清中のケモカインの産生量は ELISA 法にて定量した。

【結果】

顕微鏡下での細胞形態観察と LDH Cytotoxicity Assay による解析の結果、0.1~10.0 $\mu\text{g/ml}$ の濃度では、Caffeic acid、CAPE や EGCG による細胞障害性は、それぞれ認められなかった。ELISA 法にて培養上清中のケモカインの産生量を定量した結果、CAPE と EGCG の存在下では、iE-DAP 刺激により増加したケモカイン(CINC-1、CXCL2/3、MCP-1)の産生は抑制され、その効果は濃度依存的であった。しかしながら、Caffeic acid の存在下では、その産生量に有意な減少は認められなかった。

【考察】

本研究において、Caffeic acid phenethyl ester(CAPE)と EGCG は PRRs リガンドである iE-DAP によるケモカイン産生誘導を抑制することが明らかとなった。この結果により、カテキンと CAPE の抗炎症作用が歯髄保存療法にも有効である可能性が示唆された。

象牙芽細胞様細胞の生存維持における GDNF 分泌デバイスの効果について

九州歯科大学口腔保存治療学分野¹

NsGene Inc., USA²

○西藤法子¹, 諸富孝彦¹, 鷲尾絢子¹, 花田可緒理¹,
平田-土屋志津¹, Wahlberg Lars², Emerich Dwaine², 北村知昭¹

Effects of GDNF-secreting Device on the Viability of Odontoblast-like Cells

Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Kyushu Dental University¹

NsGene Inc., USA²

○SAITO Noriko¹, MOROTOMI Takahiko¹, WASHIO Ayako¹, HANADA Kaori¹,
HIRATA-TSUCHIYA Shizu¹, WAHLBERG Lars², EMERICH Dwaine², KITAMURA Chiaki¹

【目的】これまで我々は、歯髄温存療法が奏功しない齲蝕・破折症例に対する歯髄保存的治療法として、保存困難な冠部歯髄を断髄により除去し、残存する根部歯髄から喪失した象牙質-歯髄複合体の再生を誘導する局所的な象牙質-歯髄複合体再生療法の確立を目指した研究を進めてきた。この局所的再生療法を実現するためには、残存歯髄の炎症制御に加えて、残存歯髄を効果的に維持することが重要となる。グリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) は、神経組織の保護作用を有し、栄養因子として神経細胞生存、軸索伸長に作用することが知られた TGF β スーパーファミリーに属するタンパク質である。現在、GDNF はアルツハイマー病やパーキンソン病に対して細胞生存維持の点から治療効果が確認されている。GDNF 臨床応用のひとつとして、米国 NsGene 社は GDNF を恒常的に分泌するデバイスを開発し、アルツハイマー病の進行抑制治療法として臨床治験を進めている。本デバイスは、内部に GDNF を恒常的に分泌する上皮系細胞が充填されており、細胞がデバイス外へ漏出することなく分泌された GDNF のみが溶出するように設計されている。今回我々は、この GDNF を分泌するデバイスが象牙芽細胞様細胞の生存・増殖に与える影響について検討した。

【材料と方法】NsGene 社より供与を受けた GDNF 分泌デバイスは Human Endothelial SFM 無血清培地に浸漬し一定期間毎に培地を交換することで維持した。また、デバイスの取り扱いには米国 Environmental Protection Agency (EPA) の許可を得た消毒剤 (アクトリル®, 輸入元; ディーバリュエサービス) で環境を整えた培養室中で行った。象牙芽細胞様細胞としてはラット歯髄由来象牙芽細胞様細胞株である KN-3 細胞を用いた。まず、デバイスから分泌される GDNF 量を ELISA 法にて定量すると共に、GDNF 受容体の KN-3 細胞における発現を Western-blots 法にて確認した。次に、GDNF 分泌デバイスの効果を確認するため、KN-3 細胞を 96-well plate に播種し付着確認後、GDNF 分泌デバイスを維持している無血清培地の上清を KN-3 細胞の培養液に添加し刺激した。7 日間の培養後、WST-8 assay で細胞増殖能を確認した。24-well plate に播種した KN-3 細胞にも同様の刺激を加え、Trypan Blue 染色により生細胞数と死細胞数の割合を算出した。

【結果および考察】ELISA 法の結果から、GDNF 分泌デバイスからの GDNF 溶出は 5 か月以上にわたり継続しており、その溶出量はデバイスへの細胞充填後 2 週間目と比較し増加していることが確認された。また、Western-blots 法により KN-3 細胞における GDNF 受容体の発現が確認された。GDNF 分泌デバイス維持培地上清を用いた KN-3 細胞刺激実験の結果、デバイス培地上清で刺激した細胞群では無血清培地下でも細胞増殖が認められたが、この上清を加えなかったコントロール群では細胞は有意に減少していた。Trypan Blue 染色結果から、コントロール群では存在するほぼ全ての細胞が死細胞である一方、デバイス培地上清添加による刺激群では生細胞数の増加が確認された。以上の結果は、GDNF 分泌デバイスは KN-3 細胞の生存維持・増殖に有効であることを示唆している。

【結論】GDNF 分泌デバイスは象牙芽細胞様細胞の生存維持・増殖に有効であることが示唆された。

**IL-1 β 誘導オートファジー関連遺伝子 Atg5 は
マウス ES 細胞由来象牙芽細胞の細胞増殖を制御する**

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座, *愛知学院大学薬学部生体機能化学講座
○ 尾関伸明, 山口秀幸, 長谷 奈央子, 檜山太希, 川合里絵, 茂木 眞希雄*, 松本 享, 中田和彦

**Interleukin-1beta-induced autophagy-related gene 5 regulates
the proliferation of mouse embryonic stem cell-derived odontoblastic cells**

Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
*Department of Medicinal Biochemistry, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University

○ Nobuaki Ozeki, Hideyuki Yamaguchi, Naoko Hase, Taiki Hiyama,
Rie Kawai, Makio Mogi*, Toru Matsumoto and Kazuhiko Nakata

【研究目的】

これまでに我々は、純化したマウス胚性幹細胞 (ES 細胞: Embryonic stem cell) 由来象牙芽細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase: MMP) -3 が、インターロイキン [Interleukin (IL)] -1 β 誘導 Wnt5 シグナルを介して象牙芽細胞の増殖を制御することを報告した (Ozeki N. et al., *Experimental Cell Research* 2014)。近年、哺乳類の細胞内大規模分解系であるオートファジー (Autophagy) は、細胞質内タンパク質のクリアランス、発癌抑制、感染、免疫制御、プログラム細胞死、発生、分化などのさまざまな生理的役割を持つことが解明されている。さらに、根尖性歯周炎の進行や加齢化歯髓細胞において、オートファジー関連遺伝子 (Autophagy-related genes: Atg) の LC3 (a mammalian homolog of yeast Atg8) の発現上昇や Atg5 タンパク質の動態変化により、オートファジーが活性化することが報告されている。本研究では、マウス ES 細胞由来象牙芽細胞の炎症時におけるオートファジー関連遺伝子群 Atg5, LC3 および Atg12 の新規な生理的役割を明らかにするため、siRNA を用いて詳細な検討を行った。

【材料および方法】

セルソーターを用いて α 2 インテグリン陽性マウス ES 細胞由来象牙芽細胞を 98%以上高純度化した後、IL-1 β を添加し、Real time-PCR 法と Western-blots 法により、オートファジー関連遺伝子群 (Atg5, LC3 および Atg12) の mRNA ならびにタンパク質発現を評価した。Wnt5, MMP-3, Atg5, LC3 および Atg12 に対する各々の siRNA を用いた遺伝子のノックダウンにより、マウス ES 細胞由来象牙芽細胞の増殖過程における Atgs, Wnt5 および MMP-3 を介したシグナルカスケードの検索を行った。IL-1 β による細胞増殖活性は、BrdU を用いた Cell proliferation ELISA kit (Roche Applied Science) を通法に従い使用し、アポトーシス細胞死は APOPercentage apoptosis assay kit (Bicolor) により評価した。MMP-3 酵素活性測定は、抗 MMP-3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) と Protein-A/G アガロースによる免疫沈降法にて回収した酵素抗体複合体に MMP-3 基質 (5-FAM-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys-QXLTM520-NH₂ FRET peptide) を使用し、MMP-3 活性測定 (SensoLyteTM 520 MMP-3 assay kit; AnaSpec) を行った。

【結果】

マウス ES 細胞由来象牙芽細胞において、IL-1 β 誘導 Wnt5, MMP-3, Atg5, LC3 および Atg12 の遺伝子発現、タンパク質発現の亢進および MMP-3 活性上昇がコントロールと比較して統計学的有意に認められた。Wnt5, MMP-3 および Atg5 siRNA 処理により、IL-1 β による細胞増殖の抑制とアポトーシス細胞死が惹起され、コントロールと比較して統計的有意差が認められた。さらに、siRNA を用いたシグナルカスケードの検索により、IL-1 β による細胞増殖は Atg5 \rightarrow Wnt5 \rightarrow MMP-3 シグナルカスケードを介して制御されていることが明らかとなった。

【考察および結論】

マウス ES 細胞由来象牙芽細胞における IL-1 β 誘導の細胞増殖は、炎症反応の比較的早期にオートファジー関連遺伝子 Atg5 と Wnt5 シグナルを介して、MMP-3 酵素タンパク質が誘導されることにより、制御されている可能性が示唆された。

ポリリン酸誘導 MMP-3 はマウス iPS 細胞由来象牙芽細胞の細胞増殖を制御する

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座, *愛知学院大学薬学部生体機能化学講座
○ 長谷 奈央子, 尾関伸明, 山口秀幸, 檜山太希, 川合里絵, 茂木 眞希雄*, 中田和彦

Inorganic polyphosphate induces matrix metalloproteinase-3 mediated proliferation of odontoblast-like cells derived from mouse induced pluripotent stem cells

Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
*Department of Medicinal Biochemistry, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University
○ Naoko Hase, Nobuaki Ozeki, Hideyuki Yamaguchi, Taiki Hiyama,
Rie Kawai, Makio Mogi*, and Kazuhiko Nakata

【研究目的】

これまでに我々は、純化したマウス人工多能性幹細胞 (iPS 細胞: Induced pluripotent stem cells) 由来象牙芽細胞においてインターロイキン [Interleukin (IL)] -1 β 誘導マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix metalloproteinase: MMP) -3 が、象牙芽細胞の増殖を制御することを報告した (Hiyama T. et al., *PLoS One* 2013, Ozeki N. et al., *Experimental Cell Research* 2014) . 生体内物質であるポリリン酸は、リン酸が直鎖状に重合したリン酸ポリマーであり、ヒト歯肉線維芽細胞の増殖や骨芽細胞に作用することで骨形成を誘導することが報告されている。本研究では、マウス iPS 細胞由来象牙芽細胞に対するポリリン酸の新規な生理的役割を明らかにするため、siRNA を用いて詳細な検討を行った。

【材料および方法】

セルソーターを用いて α 2 インテグリン陽性マウス iPS 細胞由来象牙芽細胞を 98%以上高純度化し、ポリリン酸を添加後、Real time-PCR 法と Western-blot 法により、MMP-3 の mRNA ならびにタンパク質発現を評価した。MMP-3 siRNA を用いた MMP-3 遺伝子のノックダウンにより、ポリリン酸による細胞増殖の評価を行った。細胞増殖活性は BrdU を用いた Cell proliferation ELISA kit (Roche Applied Science)を通常に従い行った。MMP-3 酵素活性測定は、抗 MMP-3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) と Protein-A/G アガロースによる免疫沈降法にて回収した酵素抗体複合体に MMP-3 基質 (5-FAM-Arg-Pro-Lys-Pro-Val-Glu-Nva-Trp-Arg-Lys-QXLTM520-NH₂ fluorescence resonance energy transfer (FRET) peptide) を使用し、活性測定 (SensoLyteTM 520 MMP-3 assay kit; AnaSpec) を行った。石灰化能は Alkaline phosphatase staining と Alizarin Red staining による比色定量にて評価した。

【結果】

ポリリン酸添加群 (0.1mM) にて細胞増殖の亢進、MMP-3 遺伝子発現、タンパク質産生ならびに酵素活性が統計的有意 ($p < 0.05$) に認められた。MMP-3 の活性を制御する内在性阻害因子 TIMP-1, -2 および -3 の発現変動は認められなかった。一方、高濃度ポリリン酸添加群 (0.2mM or 0.5mM) では細胞増殖の低下が認められた。ポリリン酸添加群において odontoblast-phenotype である Dentin matrix protein-1(DMP-1), Dentin sialophosphoprotein (DSPP) および石灰化の統計的有意な上昇を確認した。さらに、0.1mM ポリリン酸添加群と MMP-3 siRNA 処理により、細胞増殖の抑制が惹起された ($p < 0.05$) .

【考察および結論】

ポリリン酸は本研究において、比較的低濃度ではマウス iPS 細胞由来象牙芽細胞の増殖および MMP-3 発現の亢進を導く一方、高濃度ポリリン酸添加群では細胞増殖の抑制が統計的有意に惹起されることを初めて明示できた。これにより、象牙芽細胞が生体適合性 (Biocompatibility) の高いポリリン酸に曝されることで、これまで主に組織破壊に関与すると考えられてきた MMP-3 を自ら発現し、その増殖と分化が制御され、歯髄創傷治癒に積極的に関与する可能性が示唆された。

ラット培養歯髄細胞における ectodin の象牙芽細胞様細胞分化に及ぼす影響について

明海大学歯学部機能保存回復学講座保存治療学分野
○上田堯之、門倉弘志、横瀬敏志、

Effects of Ectodin on Differentiation of Odontoblast-like Cells in Rat Dental Pulp Cells

Division of Endodontics and Operative Dentistry,
Department of Restorative and Biomaterials Sciences, Meikai Univ. School of Dentistry
○UEDA Takayuki, KADOKURA Hiroshi and YOKOSE Satoshi

【目的】歯髄組織が損傷を受けた場合には、歯髄組織に存在する未分化外胚葉性間葉細胞が象牙芽細胞に分化して修復象牙質を形成する。この未分化外胚葉性間葉細胞から象牙芽細胞への分化機構の解明は、歯科保存治療における vital pulp therapy のさらなる発展に極めて有用であると考えられる。近年、Wnt ファミリーは歯の発生過程に発現し、各種細胞の増殖と分化をコントロールしていることが報告されている。これまでに著者らは Wnt シグナルの canonical 経路が象牙芽細胞分化と修復象牙質形成を調節し、その調節機構には Wnt のアンタゴニストである ectodin が関わることを報告してきた。Ectodin は歯の咬頭数や歯数の決定に関わることが報告されているが、ectodin の象牙芽細胞分化ならびに修復象牙質形成に対する詳細な作用については現在のところ不明である。これらの背景から、ectodin が未分化外胚葉性間葉細胞から象牙芽細胞への分化過程ならびに象牙質形成にどのように影響するかを調べることを目的として歯髄培養細胞を用いて研究を行ったので報告する。

【材料と方法】本研究に用いた歯髄培養細胞は 20 日の培養期間によって象牙芽細胞様細胞に分化し、象牙質様石灰化結節を形成することが報告されている。本研究では歯髄培養細胞に siRNA 発現ベクターを導入し ectodin mRNA を knock down した細胞群 (ectodin KD 群) と siRNA を発現しないベクターを導入した細胞群 (対照群) について象牙芽細胞様細胞への分化ならびに象牙質様石灰化結節の形成を解析し比較を行った。形態学的解析としてアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色と Von Kossa 染色を行った。分子生物学的解析として ectodin ならびに象牙芽細胞の特異的分化マーカーである DSPP の mRNA 発現についてリアルタイム PCR 法にて解析した。

【結果】歯髄培養細胞では培養 5 日目に ectodin の発現が最も強く、その後、培養 10、15、20 日目と象牙質様石灰化結節の形成が充進するに従いその発現は減少した。Ectodin KD 群の ectodin 発現を解析したところ培養 4 日目においてその発現は対照群の約 0.5% に抑制された。Ectodin KD 群の DSPP の発現は対照群に比較して減少した。Ectodin KD 群では ALP 陽性細胞周囲の象牙質様石灰化結節の形成が対照群に比較して減少した。

【考察および結論】以上の研究結果から ectodin は象牙芽細胞分化ならびに象牙質形成を調節していることが示唆された。

感染根管における新規ナノバブルを用いた根管内無菌化と歯髄再生

¹⁾国立長寿医療研究センター歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部、

²⁾愛知学院大学歯学部 歯内治療学講座

○藤田 将典^{1,2)}、庵原 耕一郎¹⁾、堀場 直樹²⁾、中田 和彦²⁾、中島 美砂子¹⁾

Pulp Regeneration after Complete Disinfection of Root Canal System by Enhanced Delivery of Medicaments using new Nanobubbles in a Canine Periapical Disease Model

¹⁾Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, ²⁾Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

³⁾Department of Anatomy, School of Medicine, Fukuoka University

○FUJITA Masanori^{1,2)}, IOHARA Koichiro¹⁾, HORIBA Naoki²⁾, NAKATA Kazuhiko²⁾, NAKASHIMA Misako¹⁾

【目的】

これまで当研究室では、自家歯髄幹細胞を用いた抜髄後歯髄再生治療法を開発し(第136回本学会)、現在臨床研究を行っている。一方、この歯髄再生治療法を感染根管に適用するためには根管内の無菌化が必須である。私共は、超音波とナノバブルを併用して、薬剤を象牙細管内に深く浸透させる「超音波ナノバブル薬剤導入法」を開発し、根管を短時間に無菌化できる可能性を明らかにした(第134回本学会)。また、イヌの感染根管モデルにおいて超音波ナノバブル薬剤導入法は根管を短期間で無菌化でき、根尖性歯周炎の治療のみならず歯髄再生治療の前処置にも有用である可能性を明らかにした(第143回本学会)。本研究では、超音波を必要としない新規ナノバブルを用いてナノバブル単体による薬剤導入法を行い、前回と同等の薬剤浸透性を有することを確認した。また、イヌの感染根管モデルにおいてナノバブル薬剤導入法を行い、感染根管の無菌化を確認後、抜髄根管と同様の歯髄幹細胞自家移植を行い、病理組織学的に歯髄再生を検討した。

【材料と方法】

1. ナノバブル薬剤導入法の最適条件の検討：根管拡大し3% EDTA で2分間処理したイヌ抜去前歯の根管内に、最終濃度テトラサイクリン5.0 mg/ml、ナノバブル50%の薬液を注入し、5分間または10分間適用した。その後、ゼーゲミクロトームにて切片を作製し、象牙細管への薬剤浸透の比較検討を行った。

2. *in vitro* における根管内無菌化の検討：根管拡大し3% EDTA で2分間処理したイヌ抜去前歯の根管内に、GFPラベル *E. faecalis* 菌液を注入、仮封し、36°C、好気下で7日間培養した。仮封除去後に生理食塩水にて洗浄後最終濃度がアンピシリン10 µg/ml、ナノバブル99%の薬液を注入し、5分間または10分間適用した。生理食塩水にて洗浄後、再度仮封し2日間培養を行った後に、ゼーゲミクロトームにて切片を作製し、GFP照射下の共晶点レーザー顕微鏡にて、細管内の無菌化状況を形態学的に比較した。

3. イヌ感染根管モデルにおける歯髄再生：イヌ前歯を抜髄後、根管を14日間開放し感染根管モデルを作製した。この根管に一週ごとにビブラマイシン35 µg/ml、ナノバブル99%の薬液を5分間適用し薬剤導入をおこない、細菌数の変化を鈎菌により経時的に測定した。なお、ビブラマイシンの貼薬のみを対照群とした。4回導入後、自家の歯髄幹細胞およびG-CSFをコラーゲンとともに根管内に移植した。14日後に根尖部歯周組織を含む歯を摘出し、病理組織学的検査(HE染色)により有効性を評価した。

【結果】

薬剤浸透により最適条件を検討すると5分、10分両方で薬剤は根管壁から約1.2mmまで浸透した。*in vitro* における根管内無菌化において5分、10分両方でセメント質部までGFPの蛍光が消失していた。またイヌ感染根管モデルにおいて、ナノバブル濃度99%、5分間でビブラマイシンを2回薬剤導入すると、根管内の細菌は検出限界以下にまで減少し、貼薬のみに比べ有意な差がみられた。さらにナノバブル薬剤導入による無菌化後、歯髄幹細胞をG-CSFとともに移植すると歯髄および根尖部歯周組織の再生が対照群と比べ有意にみられ、炎症性細胞浸潤はほとんどみられなかった。

【結論および考察】

これらのことから、この新規ナノバブルは超音波を併用することなく薬剤導入法が行え、根管を短期間で無菌化でき、根尖性歯周炎の治療のみならず歯髄再生治療の前処置にも有用である可能性が示唆された。

MRI による抜髄後歯髄再生治療法の有効性解析

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, 中島 美砂子

Magnetic Resonance Imaging for Pulp Regeneration

Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases,
National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, Obu, Japan
○Koichiro Iohara,*, Masanori Fujita, Misako Nakashima

【目的】

これまで、私どもは歯髄幹細胞を抜髄後の根管に自家移植して歯髄を再生させる歯髄再生治療法を開発し (第 12 回再生医療学会)、安全性を臨床研究にて確認した。今後、この治療法の有効性を確認する予定である。有効性を測る方法として歯髄電気診があるが、この診断方法は、患者の主観によるため有効性を証明するのに十分な方法とはなりにくい。一方、MRI は歯科、特に歯内治療においてはほとんど用いられていない。今回、イヌを用いて MRI 装置にて正常歯、抜髄根管歯、コラーゲン充填歯および歯髄再生治療法を行った歯 (歯髄再生歯) を撮影し、HE 像と比較することで MRI が客観的かつ定量的に歯髄再生を診断できるかを検討した。

【材料と方法】

1. イヌ歯髄幹細胞分取: 7か月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、幹細胞膜分取法により歯髄幹細胞を分取し、増幅後凍結した。
2. イヌ抜髄モデルにおける歯髄再生: 1 の歯髄膜分取幹細胞 (5×10^5 cells) をコラーゲンと混合して遊走因子と共に根管に自家移植した。移植後、90日および180日後に抜歯した。また、歯髄再生不良モデルとしてコラーゲンのみを根管に移植し、移植後1日目、および90日目に抜歯した。
3. MRIによる計測: 正常の歯、抜髄処置をした歯、および2で処置した歯髄再生歯および歯髄再生不良の歯をMRI (4.7T Bruker) にて計測した。計測後、脱灰を行い薄切後、H-Eにて染色した。

【結果】

T2 強調画像において、正常歯では歯髄が白く (高信号) 撮影され、抜髄根管歯では歯髄部分が黒く (低信号) 撮影された。また、コラーゲン充填歯を充填後 3 ヶ月目に撮影すると、根尖部側の歯髄相当部分が黒く撮影され、逆に歯髄再生歯においては根尖部から歯冠部まで歯髄部分が白く撮影された。HE 像にて、コラーゲン充填歯内部には組織は見られず、歯髄再生歯においては、根尖部から再生歯髄の形成がみられることを確認した。

【結論および考察】

これより、MRI にて根尖部より連続した高信号領域が存在すれば、再生歯髄が存在すると考えられた。これらの結果より、MRI は歯髄再生治療法の有効性を診断する、ひとつの手法となりうる可能性が示唆された。

Porphyromonas gingivalis によるヒトマスト細胞からの interleukin-31 産生誘導

東北大学 大学院歯学研究科 口腔微生物学分野¹⁾、口腔診断学分野²⁾、歯内歯周治療学分野³⁾、国立長寿医療研究センター研究所 口腔疾患研究部⁴⁾

○多田 浩之¹⁾、高瀬 彩¹⁾、西岡 貴志²⁾、島内 英俊³⁾、松下 健二⁴⁾、高田 春比古¹⁾

Production of interleukin-31 induced by *Porphyromonas gingivalis* in human mast cell cultures

¹Division of Oral Microbiology, ²Division of Oral Diagnosis, ³Division of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry, ⁴Department of Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology

○Hiroyuki Tada¹⁾, Aya Takase¹⁾, Takashi Nishioka²⁾, Hidetoshi Shimauchi³⁾, Haruhiko Takada¹⁾

【緒言】 Interleukin-31 (IL-31)は主に Th2 細胞、樹状細胞やマクロファージなどから産生される gp130/IL-6 サイトカインファミリーの一員である。IL-31 は IL-31 受容体を持つ上皮細胞などに作用することで、炎症性サイトカインやケモカインの産生誘導を介して、アトピー性皮膚炎、気管支炎、肺炎、腸炎などの皮膚および粘膜の炎症ならびにかゆみを伴う疾患の病態形成に関与すると考えられている。最近、IL-31 はマスト細胞からも産生されることが報告された。慢性歯周炎において、マスト細胞は炎症歯周組織に集積することが示されているが、慢性歯周炎の病態形成におけるマスト細胞の役割については十分に明らかにされていない。歯周炎関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* が産生するトリプシン様システインプロテアーゼ (ジンジパイン)は、同細菌の歯周組織への感染や宿主防御機構の回避に重要な役割を担う。本研究では、*P. gingivalis* がヒトマスト細胞から IL-31 産生を誘導する可能性について検討した。

【材料と方法】

- (1) 供試細胞: ヒトマスト細胞株である HMC-1 細胞は、Joseph H. Butterfield 教授 (米国 Mayo Clinic)より分与を受けた。同細胞を 10% FBS, 1.2 mM α -thioglycerol 添加 IMDM 培地で継代培養して供試した。
- (2) *P. gingivalis* および菌体成分: *P. gingivalis* W83 および ATCC 33277 野生型株ならびに KDP136 ジンジパイン欠損株 (長崎大学・中山浩次教授より恵与)の凍結乾燥全菌体、*P. gingivalis* 381 株精製 fimbriae、*P. gingivalis* 合成リポペプチド (PGTP-2) (朝日大学・小川知彦教授より恵与)および *P. gingivalis* LPS を実験に供試した。
- (3) IL-31 産生: 各種菌体成分で刺激した HMC-1 細胞の培養上清における IL-31 レベルについて、ELISA 法にて測定した。また、IL-31 産生がジンジパインにより担われる可能性について、*P. gingivalis* 全菌体を KYT-1 (アルギニン特異的ジンジパイン阻害剤)および KYT-36 (リジン特異的ジンジパイン阻害剤)で前処理後、細胞に刺激した。

【結果と考察】 HMC-1 細胞を *P. gingivalis* W83 および ATCC 33277 野生型株の全菌体で刺激すると、刺激 24~48 時間後において IL-31 産生が認められた。IL-31 誘導活性を示す菌体成分について、同細胞を全菌体、fimbriae、PGTP-2 ならびに *P. gingivalis* LPS で刺激した結果、全菌体の刺激により IL-31 産生が亢進したのに対して、fimbriae、PGTP-2 ならびに *P. gingivalis* LPS 刺激による IL-31 産生は認められなかった。*P. gingivalis* による IL-31 産生は、全菌体を KYT-1 ならびに KYT-36 で前処理すると抑制され、KDP136 株の作用は野生型株に比べて減弱されたことから、IL-31 誘導活性はジンジパインにより担われることが示唆された。

【結論】 *P. gingivalis* によりマスト細胞から IL-31 が産生されることが明らかにされた。同菌による IL-31 亢進活性はジンジパインによって担われることが示唆された。IL-31-IL-31 受容体を介したシグナルにより誘導される炎症が、慢性歯周炎の病態形成に関与する可能性が示唆される。

培養歯肉線維芽細胞におけるクリプトタンシノンによる炎症関連分子の産生抑制効果

¹徳島大学病院 歯科・歯周病科, ²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
○成石浩司¹, 梶浦由加里², 西川泰史², 板東美香¹, 木戸淳一², 永田俊彦²

Inhibitory Effects of Cryptotanshinone on Productivity of Inflammation-related Molecules in Human Gingival Fibroblasts

¹Department of Periodontology, Tokushima University Hospital, ²Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences, Tokushima University Graduate School

○Koji Naruishi¹, Yukari Kajiura², Yasufumi Nishikawa², Mika Bando¹, Jun-ichi Kido², Toshihiko Nagata²

【目的】

漢方薬(生薬)タンジンの主成分であるクリプトタンシノンは、抗がん作用や抗酸化作用をもつことが知られている。一方、クリプトタンシノンが歯周組織の炎症に対してどのような影響を及ぼすのかは不明である。そこで本研究では、歯肉線維芽細胞におけるIL-1 β による炎症促進作用に着目し、クリプトタンシノンがIL-1 β 誘導性の細胞反応に対して抑制因子として働くかどうかを調べた。

【材料および方法】

1. 培養細胞

細胞は、市販のヒト歯肉線維芽細胞CRL-2014™(ATCC)を用いた。ウシ胎児血清を10%の割合に含むDMEM培地で、3~5代継代した細胞を実験に供した。

2. 細胞刺激因子

STAT阻害剤クリプトタンシノン(化学式:C₁₉H₂₀O₃)は、Selleck Chemicals(Houston, Tx)から購入した。ヒトリコンビナントIL-1 β は、R&D systems(Minneapolis, MN)から購入した。

3. クリプトタンシノンの細胞障害作用の判定

クリプトタンシノンによる細胞障害作用の有無は、トリパンブルー染色法で調べた。すなわち、クリプトタンシノンを最終濃度が0, 0.1, 1, 10, 100 μ Mになるように細胞に24時間作用させた後、トリプシン溶液で浮遊化させた培養細胞の混濁液に対して、5 mg/mLトリパンブルー染色液を1:1の割合になるように添加した。その後、青染した細胞を死細胞、青染されなかった細胞を生細胞として細胞数をカウントし、各々の生細胞率を計算した。

4. 炎症関連分子の産生に及ぼすクリプトタンシノンの影響の評価

IL-6およびVEGFの産生に及ぼすクリプトタンシノンの影響は、市販のELISAキット(R&D systems)を用いて検討した。すなわち、細胞をIL-1 β (最終濃度:1 ng/mL)で24時間刺激した後、培養上清をサンプルとして回収し、IL-6およびVEGFの濃度を測定した。また、カテプシンLの産生に及ぼすクリプトタンシノンの影響は、全細胞蛋白をサンプルとして回収し、通法に従ってウェスタンブロット法を用いて検討した。なお、この実験でのクリプトタンシノンの最終濃度は10 μ Mとし、IL-1 β 刺激の1時間前に培養系に添加した。

5. 統計解析

各群における有意差の有無は、統計解析ソフトJMP 8.0.2®(SAS Institute, Cary, NC)を用いてANOVA Tukey-KramerのHSD検定によって解析し、P値が0.05未満を有意差ありと判定した。

【結果】

1. クリプトタンシノンによる細胞障害作用

クリプトタンシノンの最終濃度が10 μ M以下の時は生細胞率に影響を及ぼさなかったが、100 μ Mになると、他の濃度群と比較して有意に生細胞率の低下が認められた(P<0.0001)。

2. IL-1 β 誘導性炎症関連分子の産生に及ぼすクリプトタンシノンの影響

歯肉線維芽細胞のIL-6産生は、IL-1 β 刺激によって有意に亢進した(P<0.0001)。また、そのIL-1 β 誘導性IL-6産生は、クリプトタンシノン添加によって有意に低下した(P=0.029)。また、カテプシンL産生はIL-1 β 刺激によって劇的に亢進し、そのIL-1 β 誘導性カテプシンL産生は、クリプトタンシノン添加によって著明に低下した。一方、VEGF産生はIL-1 β 刺激によって有意に亢進したものの(P=0.002)、そのIL-1 β 誘導性VEGF産生は、クリプトタンシノン添加によって低下しなかった(P=0.802)。

【考察および結論】

クリプトタンシノンは、歯肉線維芽細胞におけるIL-1 β 誘導性IL-6およびカテプシンL産生を有意に抑制することで、歯周組織の炎症を抑制方向に制御することが示唆された。

試作非接触型電磁式加振装置に関する基礎的研究

—模擬歯根膜の性状変化がレーザー変位計によって測定した力学的パラメーターに及ぼす影響—

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座¹、日本大学歯学部基礎自然科学分野(物理)²

日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門³、日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門⁴

○小林 寛¹、林 誠^{1,3}、山岡 大^{2,4}、石井 佳笑¹、古宮 宏記¹、清水 康平^{1,3}、鶴町 保^{1,3}、小木曾文内^{1,3}

Fundamental study of electromagnetic vibration device

—Effect of different simulated periodontal ligament on analysis by laser displacement sensor—

Departments of Endodontics¹ and Physics², Division of Advanced Dental Treatment³, Division of Functional Morphology⁴, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

○Hiroshi Kobayashi¹, Makoto Hayashi^{1,3}, Masaru Yamaoka^{2,4}, Ishii kae¹, Komiya Hiroki¹, Kohei Shimizu^{1,3}, Tamotsu Tsurumachi^{1,3}, Bunnai Ogiso^{1,3}

【研究目的】

歯周組織の状態を把握することは辺縁性歯周炎のみならず根尖性歯周炎や歯根骨折などの診断に必要な不可欠である。これまで、歯周組織の客観的評価方法を確立するため、電磁力を応用した非接触型電磁式加振装置を試作し、実験用植立模型および加速度ピックアップを用いて各種力学的パラメーターによる歯周組織応答について検討を行ってきた。その結果、本装置は歯の動揺だけでなく歯周組織の状態変化をも検出可能であるが、振動検出器として加速度ピックアップを測定対象物に接着させる操作を必要とした。そこで、操作性の向上を目的に振動検出器としてレーザー変位計を用いた測定方法の開発について第139、140回本学会にて報告した。今回、演者らは模擬歯根膜の性状変化がレーザー変位計で測定した力学的パラメーターに及ぼす影響を従来から使用してきた加速度ピックアップ方式と比較検討した。

【材料および方法】

実験に供した植立模型は模擬歯、模擬歯根膜および模擬歯槽骨により構成されている。模擬歯としてポリアセタール棒(直径6.0 mm、長さ25.0 mm)、模擬歯根膜として粘膜調整材であるティッシュコンディショナーⅡ(松風)、模擬歯槽骨として発泡ウレタン模型(ニッシン)を用いた。

植立模型の作製では、ティッシュコンディショナーⅡを粉4.8 gに対して液3.0 ml、4.0 mlおよび5.0 mlの粉液比で混和後、模擬歯の歯槽窩内に填入し、底面および側面厚さを0.5 mm、模擬歯の埋入深さを10.0 mmとなるよう規定した。なお、植立模型は室温23±1℃、湿度50±5%に設定した恒温恒湿室内で作製し、模型作製1時間後、試作非接触型電磁式加振装置にて強制振動を加えて力学的パラメーターを測定した。

振動検出法は、同一模擬歯においてレーザー変位計(キーエンス)による検出を行い、コントロールとして加速度ピックアップを取り付けての検出を行った。すなわち、振動が加えられた模擬歯に波長655 nmのレーザー光を照射し、その反射光をレーザー変位計にて読み取りFFTアナライザーにて模擬歯の振動状態を解析して力学的パラメーター(共振周波数、弾性係数および粘性係数)を算出した。

実験に供した植立模型数は各条件で5個とし、レーザー変位計と加速度ピックアップの比較はMann-Whitney U testを用い、液量の違いによる模擬歯の性状変化についてはKruskal-Wallis testおよびSteel-Dwass testにてそれぞれ有意水準5%にて統計学的解析を行った。

【成績および考察】

共振周波数、弾性係数および粘性係数は両検出方法において模擬歯根膜とした粘膜調整材の液量が大きくなるに伴って有意に減少した。また、レーザー変位計を使用して得られた全ての力学的パラメーターは、加速度ピックアップを使用した場合と統計学的有意差は認められなかった。これらの結果から、レーザー変位計を応用することで操作性が向上するとともに加速度ピックアップ方式と同様に模擬歯根膜の性状変化を読み取れるものと考えられた。

【結論】

以上のことから、試作非接触型電磁式加振装置における加速度ピックアップ方式に変わる振動検出法としてのレーザー変位計の有用性が示唆された。

侵襲性歯周炎における治療効果予知マーカーとしての細菌検査の有用性

東京医科歯科大学 大学院医学総合研究科 歯周病学分野

○竹内康雄, 片桐さやか, 小林宏明, 駒崎利奈, 須田智也, 若松美江, 高松秀行, 早雲彩絵, 高野琢也, 楠 侑香子,
吉田明日香, 杵渕恵那, 大津杏理, 関内孝佑, 片山沙織, 中里昭仁, 三瀬太記, 和泉雄一

The effectiveness of bacterial test as a prognostic marker for initial preparation in aggressive periodontitis

Department of Periodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)
○Yasuo Takeuchi, Sayaka Katagiri, Hiroaki Kobayashi, Rina Komazaki, Tomonari Suda, Mie Wakamatsu, Hideyuki Takamatsu,
Sae Hayakumo, Takuya Takano, Yukako Kusunoki, Asuka Yoshida, Ena Kinebuchi, Anri Otsu, Takayuki Sekiuchi,
Saori Katayama, Akihito Nakazato, Taiki Mise, Yuichi Izumi

【緒言】

歯周治療の目的は歯周組織破壊の進行を止めるとともに、その後、長期にわたり口腔機能を維持できるよう安定した歯周組織を確立させることが重要である、しかし急速で重篤な歯周組織破壊を示す侵襲性歯周炎では、時に通常の機械的ブラークコントロールに対する反応が不良な症例があるなど対応に苦慮することも多い。歯周病のリスク評価はポケット深さや歯肉からの出血など臨床的な評価によるのが現状であるが、歯周病の初発因子はブラークであり、細菌検査などによる評価が応用できればより意義があると思われる。本研究の目的は、侵襲性歯周炎患者を対象に歯周基本治療前後において臨床的・細菌学的な検査を行い、治療効果の予知マーカーとしての細菌学的検査の可能性を検討することである。なお、本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理委員会の承認を得て実施した (受付番号 122, 890 号)。

【材料及び方法】

東京医科歯科大学歯学部附属病院歯周病外来に来院した侵襲性歯周炎患者 50 名 (男性 24 名 女性 26 名, 平均年齢 33.3±5.1 歳) を被験者とし、歯周基本治療を行った。治療の前後において歯周病の臨床的パラメーター測定 {プロービングポケット深さ (PPD), プロービング時の出血 (BOP), アタッチメントレベル (AL), 歯の動揺度} を行い、臨床症状の変化を調べた。また定量的 PCR 法により術前の安静時唾液中における *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) および *Porphyromonas gingivalis* (Pg) の菌数を、ELISA 法 (Ishikawa et al., Adv Dent Res, 1988) により術前の患者末梢血から分離した血清中の Aa Y4 および Pg ATCC33277 に対する IgG 抗体価の測定を行った。そしてこれらの細菌学的マーカーが歯周基本治療前後の臨床症状と関連性があるかについて検討した。

【結果】

被験者における初診時の臨床的パラメーターの平均値は、それぞれ PPD 4.0±1.1mm, AL 4.5±1.5mm, BOP 88.8±16.4% であった。歯周基本治療の結果、多くの患者で症状の改善が認められ、平均 PPD, 平均 AL, 平均 BOP 陽性率にも有意な低下が認められた。その一方で、歯周基本治療を行ってもその反応が乏しかった者 (PPD≥5mm を示す部位のうち、30% 以上が歯周基本治療後も改善がない者) も 3 名 (6%) 認められた。また、初診時における歯周病原細菌の検出率は Aa が 32%, Pg が 80% であった。初診時における細菌学的パラメーターと臨床症状との関連を調べたところ、初診時で Aa に対する血清抗体価が高い被験者では、低い被験者と比較して再評価時の平均 PPD が大きい傾向が認められた ($p=0.07$)。一方で初診時における唾液中の Aa 量と再評価時における平均 PPD との間に有意な関連は認められなかった。さらに、再評価時における平均 PPD を目的変数とし、年齢、性別、喫煙歴、初診時平均 PPD, 初診時 BOP 陽性率、歯周基本治療時における抗菌剤服用の有無、初診時 PPD≥5mm の部位率、初診時における唾液中の Pg および Aa 量、Pg および Aa に対する初診時の血清抗体価を説明変数として、ステップワイズ法を用いて重回帰分析を行った。その結果、初診時における PPD≥5mm の部位率 ($p<0.001$)、および初診時における初診時における唾液中の Aa 量 ($p=0.03$) は、再評価時における平均 PPD との間に有意な関連が認められた ($R^2=0.40$)。

【考察および結論】

機械的および化学的ブラークコントロールにより、侵襲性歯周炎患者であっても多くの症例においては良好な臨床症状の改善が得られていた。また、再評価時において平均ポケットが深いことは、初診時における深いポケット (PPD≥5mm) が多く認められることと、唾液中の Aa の菌数が多いことから予測できると示された。術前の細菌検査が侵襲性歯周炎における歯周基本治療の効果を予知する上で有用である可能性が示唆された。

S-PRG イオン溶出液が口腔内細菌バイオフィームにおよぼす影響

福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野
○藤本暁江 米田雅裕 鈴木奈央 梶尾陽介 山田和彦 森田浩光 廣藤卓雄

Effect of S-PRG eluate on oral bacterial biofilm

Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College
○A. Fujimoto M. Yoneda N. Suzuki Y. Masuo K. Yamada, H. Morita, T. Hirofujii

【目的】

近年、S-PRG(surface pre-reacted glass ionomer)フィラーは、フッ素、ホウ素、ストロンチウム等のイオンを溶出し、デンタルプラークに強い歯科材料として注目されている。今回我々は、S-PRG イオン溶出液がう蝕病原細菌、唾液中細菌のバイオフィームにおよぼす影響について検討した。また、歯周病原細菌の共凝集を阻害する作用について調べた。さらにS-PRG イオン溶出液含嗽による口腔内細菌除去効果についても検討を加えた。

【材料及び方法】

1. 口腔内細菌の付着能に対する作用

マイクロウェルプレート上に *Streptococcus mutans* JCM5705 株や *Enterococcus faecium* WB 2000 株と段階希釈した S-PRG イオン溶出液を混合し、24 時間後サフラニンで染色し付着量を測定した。

2. 口腔内のバイオフィームに及ぼす影響

安静時唾液と段階希釈した S-PRG イオン溶出液を混合し、マイクロウェルプレート上に嫌氣的に 24 時間静置し、形成された口腔内バイオフィームをサフラニン染色した。また、あらかじめ形成したバイオフィームに段階希釈した S-PRG イオン溶出液を加えた。嫌氣的に 37°C、24 時間反応後、上清を取り除きウェルに残ったバイオフィームをサフラニンで染色し口腔内のバイオフィーム破壊作用を調べた。

3. *Porphyromonas gingivalis* と *Fusobacterium nucleatum* の共凝集に対する作用

P. gingivalis ATCC33277 株と *F. nucleatum* ATC25586 株を液体培養、洗浄後、両者を混合し共凝集させた。本実験系に S-PRG イオン溶出液を濃度依存的に添加し共凝集に及ぼす影響を調べた。

4. S-PRG イオン溶出液における含嗽の効果

S-PRG イオン溶出液 5 ml で 2 分間含嗽後、含嗽液中の沈殿物の状態を観察した。

【結論】

S-PRG イオン溶出液のバイオフィーム形成過程に与える影響については、濃度依存的にバイオフィームの形成が抑制され、20%以上の S-PRG イオン溶出液において有意なバイオフィームの形成阻害がみられた。

バイオフィームに対する破壊能の実験では、60%以上の S-PRG イオン溶出液で著しくバイオフィームは減少し、統計学的に有意なバイオフィームの破壊作用が認められた。*S. mutans* JCM 5705 株と *E. faecium* WB2000 株では、S-PRG 添加によりプラークの形成が抑制された。共凝集バッファー希釈時に S-PRG 溶出液を 50%以上加えると *P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集が阻害された。S-PRG イオン溶液を含嗽した場合、dw で行ったものと比べ沈殿物が多くみられた。

【考察】

S-PRG はバイオフィーム形成抑制能や破壊能を有し、有意な抗菌活性を示すことや、*P. gingivalis* と *F. nucleatum* の共凝集を抑制し、口腔内細菌の付着を減少することから、S-PRG はう蝕や歯周病の予防に応用できる可能性があると考えられる。

アパタイト光触媒配合歯磨剤の抗菌性-第二報-添加量による影響

¹朝日大学歯学部歯科理工学分野, ²朝日大学歯学部歯冠修復学分野
○駒田裕子¹, 堀田正人², 玉置幸道¹

Antibacterial activity of toothpaste containing apatite photocatalyst/Part II Effect of the added amount

¹ Department of Dental Material Science, ² Department of Operative Dentistry

Asahi University School of Dentistry

○KOMADA Yuko¹, HOTTA Masato², TAMAKI Yukimichi¹

【目的】

前回の保存学会では、試作歯磨剤にアパタイト光触媒複合体 (La-OAP/HAP 複合体) を配合することで、可視光照射により良好な漂白効果や抗菌作用を示すことを報告した。また第 63 回日本歯科理工学会では、アパタイト光触媒複合体の添加量が抗菌性に及ぼす影響について報告した。今回は、前回同様アパタイト光触媒複合体を配合した歯磨剤を試作し、2種類の細菌に対する抗菌性について添加量の影響を比較し検討した。

【材料および方法】

1. アパタイト光触媒 (La-OAP/HAP 複合体) の調整

アパタイト光触媒複合体粉末 (可視光応答型) は、75wt%-ランタンオキシアパタイト (La-OAP) と 25wt%-ハイドロキシアパタイト (HAP) との混合粉末を 1,400°C、1 時間大気雰囲気下で加熱して作製した。加熱後、オートミルで粉砕し、200 メッシュのふるいにかけて 74 μm 以下の粒径で調整し、配合用粉末試料として使用した。なお、La-OAP は、前回と同様の乾式法にて合成し、HAP は湿式法 (100°C) により合成した。合成物の同定は、粉末 X 線回折法で行った。

2. アパタイト光触媒配合歯磨剤の試作

アパタイト光触媒配合歯磨剤は、市販のペースト状歯磨剤に類似した組成で試作した。すなわち、湿潤剤 (36wt%, グリセリン), 研磨剤 (17~22wt%, リン酸水素カルシウム), 粘結剤 (0.6wt%, アルギン酸ナトリウム), 発泡剤 (1.4wt%, ラウリル酸ナトリウム), アパタイト光触媒 (5~10wt%, La-OAP/HAP 複合体), 精製水 (35wt%) をメノウ乳鉢で混合してペースト状に調整した。コントロールとして、上記の成分に準じたアパタイト光触媒無添加の試作歯磨剤ペーストを使用した。

3. 複合体の抗菌性

抗菌性の評価はコロニーカウント法により行った。2ml の調整菌液 (OD1.0) に、アパタイト光触媒複合体を添加した各歯磨剤を 0.05 g ~ 0.2 g 加え、光照射を行うものには左右から 5 分間照射した。その後、連続的に 10 倍に段階希釈を行い、各段階の希釈液から 0.1ml ずつ寒天平板にとり塗抹し、24 時間恒温器で培養してコロニー数を数えた。なお、光照射を行わないものは、光触媒配合歯磨剤を調整菌液に加えたあと直ぐに寒天平板に塗抹した。また、再現性をみるために毎回同じ条件のものを各希釈段階で、それぞれ 3 枚ずつ塗抹した。なお今回も供試細菌として *E. coli* (NBRC 3972) と *S. mutans* (ATCC25175) を使用した。

【結果と考察】

S. mutans については、 10^{-4} の希釈段階から抗菌効果の発現が認められ、また添加量の増加とはあまり関係なく 0.05 g というごく少量でも抗菌効果を発揮することがわかった。光照射の有無については顕著な差は認められなかった。*E. coli* については、 10^{-6} の希釈段階から抗菌効果が確認され、同様に添加量の影響は著明ではなく 0.05 g 以上で大きな差はなかった。また光照射については、行った方がより強い抗菌効果を発揮することが認められた。

S. mutans と *E. coli* の比較では、*S. mutans* の方が早い希釈段階で抗菌効果がみられたことから、より強い効果があることがわかった。また、*E. coli* については光照射を行った方がよりコロニー数の減少がみられたが、*S. mutans* については光照射に関わらずコロニー数が減少していたことから、歯磨剤で齲蝕抑制効果が期待できると考えられた。今後は、試作歯磨剤に添加するアパタイト光触媒複合体の添加量の影響や照射時間の延長などの複合効果についても検討していく。

慢性歯周炎に対する抗菌的光線力学療法と局所薬物配送システムの 微生物学および臨床的効果

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野

²医療法人社団誠敬会 誠敬会クリニック

○保莉崇大¹, 両角俊哉¹, 吉野敏明^{1,2}, 小松康高¹, 田中真喜², 清水太郎¹, 田中良枝², 久保田健彦¹,
吉江弘正¹

Microbiological and clinical effect of antimicrobial photo dynamic therapy and local drug delivery system for chronic periodontitis

¹Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science, Niigata University Graduate
School of Medical and Dental Sciences

²Seikeikai Hospital, Seikeikai Group

○Takahiro Hokari, Toshiya Morozumi, Toshiaki Yoshino, Yasutaka Komatsu, Maki Tanaka,
Taro Shimizu, Yoshie Tanaka, Takehiko Kubota, Hiromasa Yoshie

【研究目的】

これまでの歯周病治療は機械的療法（器具によるブラークや歯石除去）や抗菌薬を併用する機械化学療法が主体であった。近年、光と色素の併用による光化学反応を利用した「抗菌的光線力学療法（Antimicrobial Photo Dynamic Therapy: a-PDT）」が新しい手段として注目を集めている。歯周ポケット内細菌を染色して光感受性を起こした後、これに反応する波長の光をアクチベーターとして照射することで活性酸素を発生させ細菌を死滅させる治療法である。これまで様々な基礎的・臨床的研究が行われ、その可能性が示唆されている。そこで本研究では、慢性歯周炎患者の歯周ポケットに対し従来の抗菌療法もしくは a-PDT を行い、その微生物学および臨床的効果を比較検討した。

【材料と方法】

1. 新潟大学医歯学総合病院歯周病科および誠敬会クリニック（横浜市）を受診し、本研究の趣旨に同意した慢性歯周炎患者 19 名を被験者とし、無作為に 2 群に分けた（被験者群 9 名, 対照群 10 名）。
2. プロービングポケットデプス（PPD）が 5-8 mm の 2 部位を選定し、ポケット内処置前および 1 週間後、4 週間後に歯周検査を行った。1 部位からはペーパーポイントにより縁下ブラークを同時に採取した。
4. 選定した 2 部位に 2 週連続（計 2 回）でポケット内処置を行った。
 - 1) 被験者群：メチレンブルー注入後、波長 670nm の低出力半導体レーザー（Periowave™, Periowave Dental Technologies Inc.）による 1 分間の光照射。
 - 2) 対照群：局所抗菌薬（ミノサイクリン軟膏）の投与（ペリオクリン歯科用軟膏, サンスター）。
5. 採取したブラークから modified Invader PLUS assay により歯周病関連細菌を定量した。
6. フリードマン検定およびマン・ホイットニ検定を用いて統計解析を行った。

本研究は、新潟大学医歯学総合病院医薬品・医療機器臨床研究審査委員会により承認（NH25-010）されたプロトコールに従って実施されている。

【結果および考察】

1. 対照群において *P. gingivalis* 数, *T. forsythia* 数, *P. gingivalis* 比率および *T. forsythia* 比率が 1 週間後に有意に減少した。被験者群においては総菌数, *P. gingivalis* 数および *T. forsythia* 数が減少傾向を示した。
2. 対照群において PPD が 1, 4 週間後に有意に減少した。被験者群においては歯肉炎症指数, PPD およびクリニカルアタッチメントレベルが減少傾向を示した。

今後はさらに例数を追加していくと同時に、細菌叢の変化や GCF 中サイトカインレベルについても解析する予定である。

歯周炎患者に対する電子歯ブラシの効果について

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野
○高野 琢也、田中 敬子、小林 宏明、須田 智也、御給 美沙、
今村 亮祐、和泉 雄一

Effects of Ion-toothbrush in periodontitis patients.

Periodontology, Bio-Matrix Department, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University

○Takuya Takano, Keiko Tanaka, Hiroaki Kobayashi, Tomonari Suda, Misa Gokyu, Ryosuke Imamura,
Yuichi Izumi.

【目的】プラークコントロールは歯周病の予防・治療において、重要な要素であり、患者自身が行える最も効果的な方法である。しかしながらプラークコントロールは患者の技術だけでなくモチベーションなどにも左右されるため、良好な状態を維持させることは難しい。したがって、付加的機能を与えた歯ブラシが開発されてきている。私どもは、第56回日本歯周病学会秋期学術大会において、陰イオンを放出する電子歯ブラシの健常者における効果を報告した。この電子歯ブラシはリチウム電池を内蔵しており、ハンドル部をもつ手指と口腔内で接触するヘッドの部分で回路を形成することにより、陰イオンを放出することができる歯ブラシである。プラーク生成過程において、プラークは唾液中の陽イオンを用い歯面に吸着(架橋結合)する。電子歯ブラシは唾液を介して陰イオンを放出することにより、歯面上のCa架橋を仲介とするペリクルと細菌の結合を阻害し、細菌のペリクルへの吸着を阻害することができると考えられている。また、この電子歯ブラシには、歯面がツルツルになるという満足感が得られることも報告されている。そこで本研究では、歯周病患者において、陰イオンを放出できる電子歯ブラシの臨床的、細菌学的有効性を二重盲検法にて評価検討することを目的とした。

【材料および方法】本研究内容に同意し歯科的適応基準を満たした東京医科歯科大学歯学部附属病院歯周病外来通院中の患者20名を対象とし、ランダム化二重盲検法にて研究を行った。患者からは紙面上での同意サインを得た。実験群として、電流が流れる電子歯ブラシ(キスユーイオン歯ブラシ:フクバデンタル株式会社)を10名、対照群として回路が切断されていて電流の流れない電子歯ブラシ使用群を10名組み入れた。電子歯ブラシは、歯磨剤を使わずに通常通りのブラッシングで3週間使用し、術前術後に検査を行った。検査項目は、1)細菌検査、2)Plaque Index (PII)、3)Gingival Index (GI)、4)Probing Pocket Depth (PPD)、5)Bleeding on Probing (BOP)を測定した。統計学的検定にはWilcoxon順位検定を用いた。細菌検査は無刺激唾液を回収後、細菌DNAを抽出し、real time PCR法を行った。Total BacteriaはSYBR Green法にて、*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)、*Treponema denticola* (*T.d.*)、*Tannerella forsythia* (*T.f.*)の菌数はTaqman Probe法にて測定した。また、術後に使用感などのアンケートを回収集計した。

【結果および考察】細菌検査の結果から、*P.g.*、*T.d.*、*T.f.*の菌数の変化に関しては有意な差は認められなかったが、細菌数が減少した比率は*P.g.*菌では実験群5/10と対照群4/10、*T.d.*菌では実験群6/10と対照群4/10、*T.f.*菌では実験群5/10と対照群3/10であった。また、PII、GI、PPD、BOPに関しては著名な変化は認められなかった。アンケート結果から、「歯ブラシを使用して効果は感じましたか?」の質問に「感じた」と回答したのが実験群5/10で対照群1/10であった。また、「歯がツルツルになりましたか?」の質問に、「ツルツル感を感じた」と回答したのが、実験群5/10で対照群1/10であった。以上のことから、電子歯ブラシは、歯ブラシとしての本来の機能に加えて、歯面をツルツルにするという付加価値を患者に与えることが出来ると考えられる。本研究から、陰イオンを放出する電子歯ブラシは、患者満足度に有益な結果をもたらす、プラークコントロールへのモチベーション維持に関与できる可能性が示唆された。

本研究で用いた実験群、対照群の電子歯ブラシはフクバデンタル株式会社からの供与である。

癬痕化を伴う歯肉退縮に対して審美的回復を試みた一症例

大阪歯科大学歯周病学講座¹⁾、大阪歯科大学有歯補綴咬合学講座²⁾
○田幡 元¹⁾、藤木 傑²⁾、田中昌博²⁾、梅田 誠¹⁾

A case report of aesthetical disturbance for gingival recession with scar tissue

Department of Periodontology, Osaka Dental University¹⁾

Department of Fixed Prosthodontics and Occlusion, Osaka Dental University²⁾

○Hajime Tabata¹⁾, Suguru Fujiki²⁾, Masahiro Tanaka²⁾, Makoto Umeda¹⁾

【はじめに】歯肉退縮が存在する症例では、審美性だけでなく清掃性の改善からも歯周形成外科による根面被覆を行うことが望ましい。歯周形成外科を行っても患者が満足する改善が得られるかは、術後の経過をみながら患者と確認していく必要がある。今回、複数回の歯周形成外科を行ったが患者が満足する改善が得られず歯周組織および歯槽粘膜に癬痕化を伴った歯肉退縮に対して、歯周形成外科および補綴処置を行い、良好な結果を得ることができたので報告する。

【症例の概要】患者：24歳女性、初診日：2013年3月25日、主訴：上顎右側側切歯部の歯肉退縮による審美障害、全身既往歴：特記事項になし、口腔既往歴：2012年6月頃より近医にて上顎前歯部の審美的改善の治療のため抜歯処置および補綴処置を行っており、その際上顎右側側切歯部Fc貼葉の漏洩が原因と考えられる歯頸部歯肉の壊死が起こり歯肉の退縮が起こった。そのうち歯肉弁側方移動術、歯肉弁歯冠側移動術を数回試みたが歯肉の改善は認められなかったため同歯科医院から、上顎右側側切歯部の歯肉退縮に対する審美的な改善の依頼により紹介され、大阪歯科大学歯周治療科に来院された。

【診査・検査所見】初診時の歯周組織所見として上顎前歯部歯頸部に発赤が認められ、歯間乳頭部には発赤、腫脹が認められた。上顎右側側切歯部に Miller Class2 の歯肉退縮が認められた。また上顎右側切歯部の歯槽粘膜部には組織の癬痕化が認められた。エックス線所見として歯槽骨の吸収は認められないが、CT所見として、上顎右側側切歯および犬歯の唇側に歯根3分の2におよぶ歯槽骨の吸収が認められた。プロービングデプスは全顎的に平均3mm程度であり、上顎前歯部にBOPが認められた。

【治療計画】1、歯周基本治療：口腔清掃指導、スケーリング・ルートプレーニング (SRP)、咬合調整、暫間補綴物の作製、2、再評価検査、3、歯周外科処置：口腔前提拡張術、結合組織移植術、4、再評価検査、5、口腔機能回復治療

【治療経過】2013年3月25日から5月20日まで歯周組織検査、口腔清掃指導、SRP、咬合調整 (12部)、暫間補綴物の作製を行い、2013年5月20日に再評価検査を行った。12部の口腔前庭が狭小であり歯肉退縮部にテンションがかかっていたため2013年5月27日に歯周外科処置：口腔前提拡張術を施行した。創傷の治癒を待ったのち2013年7月14日に結合組織移植術を施行した。術後の経過観察を行っていたが12部の患者の満足のいくほどの根面被覆が認められなかったこと、および13部の歯肉退縮が起こったため、2013年10月11日に12,13部に Emdogain gel を応用した歯肉弁歯冠側移動術を施行した。術後3カ月間評価を行い、同部位の状態が落ち着いていることを確認後、補綴処置を施行した。補綴処置としてはまず、歯肉縁下の形成には様々な注意を払って行い、高分子材料を用いた、支台築造を行った。プロビジョナルクラウンにて、歯肉の状態の観察を行いながら、歯頸部の形状の調整を行った。歯肉の状態が安定したのちにクラウンの製作に取り掛かった。ジルコニアフレーム、ビスケットベイクでの試適時に歯冠形態の確認、隣接歯間関係、咬合接触状態の調整を行った。オールセラミッククラウン完成後、適合、色調、咬合状態も良好で、患者の了解が得られたので装着した。2014年3月20日に再評価後、サポータティブペリオドンタルセラピー (SPT) へ移行した。

【考察・結論】

本症例では、複数回の歯周外科処置によって生じた歯周組織および歯槽粘膜部に癬痕化を伴った Miller Class2 の歯肉退縮に対して、審美的な改善を目的に歯周形成外科処置および補綴処置で対応し良好な治療成果が得られた。歯周形成外科は、多数の術式があり、歯肉の厚みや形態から適切な術式を選択することが重要であることが考えられる。経過は良好であり、今後も炎症のコントロールと咬合に注意を払い SPT を継続する予定である。

垂直性骨内欠損に対して垂直方向への造成を考慮した術式の試み

大阪歯科大学病院歯周治療科*1、大阪歯科大学歯周病学講座*2
○白井義英*1、本多正直*1、今泉健太*1、梅田 誠*1,2

A trial case of guided tissue regeneration for bone defect with vertical augmentation

Osaka Dental University Hospital, Periodontology*1, Osaka Dental University, Department of
Periodontology*2

○Yoshihide SHIRAI*1, Masanao HONDA*1, Kenta IMAIZUMI*1, Makoto UMEDA*1,2

[緒言]従来より骨内欠損に対する歯周外科においては一般的に歯槽頂付近に切開線を入れてから歯肉弁の剥離、搔爬を行っている。

[症例]下顎第一大臼歯遠心根を分割抜歯された後に下顎第一大臼歯部のブリッジが装着されており、下顎第一大臼歯遠心部より腫脹・排膿・出血を主訴として当科へ来院された患者(女性、63才)に対して診査・診断を行い、エナメルマトリックスタンパクと人工骨(セラソルブ)による再生療法を行うこととした。まず、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。従来からの歯槽頂付近に切開を入れると移植材が流出し易くなり縫合時に至ってはかなりの量が流出することも生じていた。そこで、今回は骨内欠損部付近への切開を極力避けて頬側の歯肉歯槽粘膜境付近に切開を入れて側方から骨内欠損部へのアクセスを試みた。

実際の施術においては、骨内欠損の大きさや形態を術前にX線とPD検査において熟知しておくことが重要である。はじめに、骨内欠損を生じた歯牙へ歯肉溝内切開を入れて1歯近心に縦切開を入れた。さらに、骨内欠損部へ人工骨を極力温存させる様に今回はイラストにも示した様に歯肉歯槽粘膜境付近に切開を入れる。その後、同切開線より歯冠方向への剥離を行い、骨内欠損部を明示させ徹底したデブライドメントを行うと同時にエナメルマトリックスタンパクと人工骨を混和して5分間放置しておいた。その後、骨内欠損部へ人工骨を填塞し縫合するのが一般的であるが、人工骨の流出を最小限とするため、まず、最初に縦切開を加えた歯肉弁の最歯冠側部を歯肉退縮を生じていた歯牙の歯頸部に合わせて歯肉弁の縫合を行う。それから、側方より骨内欠損部へ混和した人工骨を填塞しながら、より歯冠方向への骨造成を試みる。填塞ののち人工骨の流出が生じないよう歯肉弁にテンションを加えない様な縫合を進めていく。

[経過]術後1週経過より綿棒にて施術部の清掃を開始してもらい、2週目からは軟毛ブラシにてブラッシングを再開した。術後3週で縫合を抜糸した。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ヶ月毎に口腔清掃状態の確認を行った。臨床評価として、術前と術後6ヶ月のPD、CALを計測する。それと、同時にX線評価も行う。術前のPDは頬側近心から6.34mm、CALは7.54mm、術後6ヶ月のPDは2.32mm、CALは3.22mmであった。また、X線的にも人工骨を填塞した直後の状態から若干の吸収あるいは側方への流出があったものと思われるものの良好な改善を生じていると思われる。

[予後]今回の症例は下顎第一大臼歯に根分岐部病変が原因と思われるヘミセクションが以前に実施されており遠心根が抜去されている。分岐部病変が生じていた部位の歯槽骨吸収が残余していたものと思われる。今回、得られた付着と骨再生の維持は術後の口腔清掃状態を良好に維持することが重要であると思われる。

[考察]従来より一般的に行われている歯槽頂付近よりの切開線では十分な骨造成に疑問が残る。そこで、今回の様に側方からの切開、剥離を行うことにより垂直方向への骨造成量を増やすことが容易になると思われた。

[結論]今回の様に側方から骨内欠損部を明示させてアクセスが可能となる症例では、側方より人工骨を填塞することで垂直的に造成させられれば確実な骨造成を伴った再生療法を行えると思われる。

マウスケラチノサイト株における CLCA の NF- κ B による転写制御

福岡歯科大学 口腔治療学講座 歯周病学分野 1) 細胞分子生物学講座 分子機能制御学分野 2)

○廣松亮 八田光世 山崎純 坂上竜資

NF- κ B-regulated transcriptional control of CLCA in a differentiated mouse keratinocyte line

¹Section of periodontology, Department of Odontology, and ²Department of Physiological Science

& Molecular Biology, Fukuoka Dent. College

○Ryo Hiromatsu¹, Mitsutoki Hatta², Jun Yamazaki², Ryuji Sakagami¹

＜ 研究目的 ＞

CLCA は Ca²⁺ 活性化 Cl⁻ チャネルの調節因子として位置付けられ、腺上皮においては Cl⁻ の再吸収に関与するとされている。また、近年では CLCA が重層扁平上皮に発現することが明らかになっており、それらが細胞接着や分化に関与しているとの報告も存在する。このように CLCA は組織特有の機能を有していると考えられるが、それらの遺伝子発現制御については詳しく解明されていない。本研究は、ケラチノサイトに発現するマウス CLCA2 (mCLCA2) の転写制御メカニズムを解明することを目的とした。

＜ 材料および方法 ＞

培養上皮細胞には、マウスケラチノサイト株 Pam212 を用いた。mCLCA2 転写活性の検討について、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。NF- κ B p65 の標的 DNA への結合は、クロマチン免疫沈降 (ChIP) および ELISA 法を応用した転写因子アッセイによって検討した。発現については RT-PCR および蛍光免疫染色にて検討を行った。NF- κ B の関与について検討を行うために、活性化を促す TNF- α と活性化を阻害するカフェ酸フェネチルエステル (CAPE) を用いた。マウス皮膚、ラット皮膚、ラットケラチノサイトと Pam212 細胞の 3 次元培養モデルを用いて CLCA2、K10、p65 の免疫染色 (DAB) を行った。

＜ 結果 ＞

① mCLCA2 遺伝子の近位プロモーター領域で最も高い転写活性が認められた。その転写活性は、NF- κ B 結合配列の変異や p65 (RelA) のノックダウンによって、著しく減少した。② ChIP アッセイや転写因子アッセイによって、内在性の活性化 p65 と mCLCA2 プロモーター領域の NF- κ B コンセンサス配列との間に特異的な結合が認められた。③ 蛍光免疫染色にて、一部の Pam212 細胞では非刺激下で NF- κ B p65 の核内での局在が認められたことから、NF- κ B p65 が恒常的に活性化している細胞が存在すると考えられた。④ TNF- α あるいは CAPE にて処理を行った場合、蛍光免疫染色において p65 の核内移行はそれぞれ促進あるいは阻害を認め、mCLCA2 の転写活性においても同様にそれぞれ上昇あるいは減少を示した。⑤ 培地中の Ca²⁺ 濃度を 1.0 mM へ上昇させると、分化マーカーである keratin 1 (K1) と K10 の発現が増加し、それに伴い mCLCA2 の発現が mRNA レベルとタンパクレベルにおいて共に増加した。⑥ CAPEによって Ca²⁺ 依存性の mCLCA2 発現は著しく抑制されたが、K1およびK10の発現に影響は認められなかった。

＜ 考察 ＞

mCLCA2 の発現は NF- κ B の活性によって制御されており、Ca²⁺ による mCLCA2 発現の上昇には、NF- κ B を介した制御とは異なる他の転写制御因子も関与していると考えられた。

＜ 結論 ＞

本研究では、マウスケラチノサイトにおいて、NF- κ B の活性化が Ca²⁺ 依存性の mCLCA2 発現に深く関与していることが明らかとなった。ケラチノサイトにおける CLCA の転写制御について、NF- κ B と他の制御因子間の相互作用についてさらなる検討を行うことで、ケラチノサイトの分化プロセスに対する制御機構の解明へ展開する可能性がある。

LPS 刺激ヒトケラチノサイトでのオートファジー経路

1 福岡歯科大学総合歯科学講座総合歯科学分野、2 病態構造学分野、3 高齢者歯科学分野
○萩尾佳那子¹、大野純²、山口真広³、谷口奈央¹、山田和彦¹、米田雅裕¹、廣藤卓雄¹

Autophagy pathway in LPS-stimulated human keratinocytes

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

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

3 Department of General Dentistry, Division of Geriatric Dentistry, Fukuoka Dental College

○Kanako Hagio¹, Jun Ohno², Masahiro Yamaguchi³, Kazuhiko Yamada¹, Nao Taniguchi¹

Masahiro Yoneda¹, Takao Hirofuji¹

【研究目的】

歯周組織の被覆上皮組織およびポケット接合上皮組織を構成するケラチノサイト (KC) は、内因性および外因性ストレスに対する対処法を保持していると考えられる。昨年の本学会で、KCが Lipopolysaccharide (LPS) によるストレスに対して、自食作用であるオートファジーによる対処法を展開している可能性を報告した。そこで、本研究では、LPS 刺激 KC におけるオートファジーの経路を、阻害実験などを組み合わせて検討した。

【材料・方法】

1) ヒト KC への LPS 刺激: ヒト KC には HaCaT 細胞を用いて、10%FBS 含有 DMEM で培養した。E. coli 由来および P. gingivalis 由来 LPS を各濃度で培地に添加して、16時間反応させた。コントロールは、LPS 非添加群および LPS 阻害剤の Polymyxin B (PMB) を LPS に混合して検討した。2) 細胞内 ROS 発現の検索: LPS 刺激およびコントロール細胞での細胞内 ROS 発現を、ROS/RNS Detection Kit により検索した。さらに、ROS 関連遺伝子の発現を WB 法により検討した。3) オートファジー誘導の判定: (1) monodansyl cadaverin (MDC) 染色によるオートファゴゾームの検出、(2) オートファジー関連遺伝子 (Atg5, Atg12, Beclin-1, p62 および LC3) の免疫細胞染色 (ICC) 法および Western blotting (WB) 法による検索。4) Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナルのオートファジー誘導への関与: LPS 刺激およびコントロール細胞での TLR4 と TLR4 のシグナル下流遺伝子 MyD88 および TRIF 発現を WB 法にて検索。5) 阻害実験によるオートファジー経路の検討: MyD88 阻害剤および PI3KC3 複合体・阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) および Wortmannin (Wm) を用いて、WB 法にて検討した。6) 1) ~ 5) 実験での E. coli Bioparticle の細胞内取り込みの検討。

【結果・考察】

1) LPS 刺激 KC での細胞内 ROS 誘導: コントロール細胞と比較して、刺激 KC では細胞内 ROS の蓄積が認められた。また、細胞内 ROS の亢進により phospho-AMPK 発現が増強した。それに対して、Bcl-2 発現は抑制された。細胞ストレスに対して、ROS→AMPK 経路が活性化されたと考える。2) LPS 刺激によるオートファジー誘導: 刺激細胞では MDC 陽性オートファゴゾームが増加した。また WB 法においても、オートファジーのマーカーである LC3-II 発現が亢進し、LPS 刺激によりオートファジーが誘導されたことが明らかとなった。オートファジー誘導は、3-MA および Wm 投与により阻害され、PI3KC3 複合体が誘導に関与することが示唆された。3) 刺激細胞での TLR4 発現: LPS 刺激により、TLR4 発現が認められた。また、同発現は PMB+LPS 添加群において減弱した。さらに、刺激細胞では TLR4 のアダプター分子である MyD88 および TRIF 発現が亢進した。4) TLR4 シグナルのオートファジー誘導への関与: TLR4 シグナルがオートファジー誘導への関与を検討するために、MyD88 阻害剤でのオートファジー誘導を検討した。その結果、phospho-AMPK 発現が減弱し、それに対して Bcl-2 発現はコントロール細胞群と同様の発現促進を認めた。すなわち、LPS 刺激は TLR4→MyD88 を介して ROS/AMPK 経路に移行することが推測された。さらに、LPS 刺激細胞ではオートファジーを介した Bioparticle の取り込みが明らかであったが、MyD88 阻害により particle の取り込みも阻止された。

【結論】

以上の結果から、ヒト KC は LPS 刺激により、TLR4/MyD88 経路および ROS/AMPK 経路を利用した PI3KC3 複合体型オートファジーを誘導することが示唆された。

ROCK 阻害剤は歯根膜細胞の遊走を促進する

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

○河村麻理¹⁾, 山本直史²⁾, 吉原千暁¹⁾, 松永一幸¹⁾, 井手口英隆¹⁾, 本郷昌一¹⁾, 下江正幸¹⁾,
大森一弘²⁾, 高柴正悟¹⁾

ROCK inhibitor Enhances Migration of Human Periodontal Ligament Cells.

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

²⁾ Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital

○Mari KAWAMURA¹⁾, Tadashi YAMAMOTO²⁾, Chiaki YOSHIHARA¹⁾, Kazuyuki MATSUNAGA¹⁾, Hidetaka IDEGUCHI¹⁾,
Shoichi HONGO¹⁾, Masayuki SHIMOE¹⁾, Kazuhiro OMORI²⁾, Shogo TAKASHIBA¹⁾

【目的】

歯周組織の創傷治癒において、組織中の幹細胞は損傷部位に遊走し、周囲細胞と協調して組織を修復・再生すると考えられている。歯根膜細胞は未分化な間葉系細胞を含むヘテロな細胞集団であり、硬組織形成細胞へ分化することによって歯周組織の創傷治癒や再生に重要な役割を担っている。歯根膜細胞の分化は種々の成長因子に加えて、細胞外基質によっても制御を受けると考えられている。これまで我々は、細胞外基質-インテグリン-細胞骨格のシグナル伝達系に着目し、Rho-associated protein kinase (ROCK) シグナルを介した細胞外基質の性状変化が歯根膜細胞の分化を制御する事を報告した (*Differentiation* 2014)。そこで、本研究では損傷部位への歯根膜細胞の遊走を促進することを目的に、ROCK が制御する歯根膜細胞の遊走メカニズムを調べた。

【材料および方法】

歯根膜細胞の分離と培養：健康な歯周組織を有するドナーの便宜抜去歯から歯根膜組織を採取した^{*}。歯根膜細胞は Seo らの方法 (*Lancet* 2004) にしたがって、3 mg/mL collagenase type I および 4 mg/mL dispase で分離し、ウシ胎児血清 (FBS) を 20 % の割合に含む α -MEM を用いて、37 °C、5 % CO₂ 存在下で培養した。

細胞遊走刺激：遊走因子として stromal cell-derived factor-1 (SDF-1, 200 ng/ml), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1, 10 ng/ml), そして bone morphogenetic protein-2 (BMP2, 100 ng/ml) を用いた。培地 (0.1 % FBS 含有 α -MEM) を対照群として、24 時間の ROCK 阻害剤 (Y-27632, 10 μ M) 前処理の有無の条件下で各遊走因子を培地に添加し、細胞遊走能を比較した。

細胞遊走試験：ウェル中央部に細胞侵入を遮断するストッパーを備えた 96 穴プレート (OrisTM Cell Migration Assay Kit, Platypus Technologies) に歯根膜細胞を 1.5×10^5 個/ml で播種した。10 時間後に細胞接着を確認し、ストッパーを解除した後に細胞遊走刺激を行った。刺激 48 時間後に acetomethoxy derivate of calcein (Calcein AM, BD Bioscience) によって染色後、蛍光顕微鏡画像を Image J software によって処理し、細胞遊走面積を定量解析した。

インテグリン遺伝子発現の検出：RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて、上記遊走因子で刺激した細胞を 24 時間後と 48 時間後に回収し、全 RNA を抽出した。細胞遊走に関連するインテグリン (α 4, α 5, β 1) の遺伝子発現量を、リアルタイム RT-PCR 法にて蓄積された mRNA 量として定量的に調べた。

統計処理：細胞遊走面積と、 $\Delta\Delta$ Ct 法に基づいたインテグリン遺伝子の発現量の統計処理には Student's *t* test を用い、*P* 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

1. 歯根膜細胞の遊走は、SDF-1, TGF- β 1, そして BMP2 の各刺激によって、それぞれ約 1.2 倍促進した。一方、ROCK 阻害剤前処理下では、TGF- β 1 と BMP2 の各刺激によって約 1.4 倍促進したが、SDF の刺激によっては有意差がなかった。
2. インテグリン β 1 遺伝子発現は、SDF-1, TGF- β 1, そして BMP2 の各刺激によって約 2.5 倍増加した。一方、ROCK 阻害剤前処理下では、各刺激によってさらに増加傾向にあった。

【考察および結論】

インテグリンを介した細胞外基質への接着および細胞骨格系の制御は、細胞遊走のプロセスにおいて重要な役割を担っている。本研究では、各種遊走因子による歯根膜細胞の遊走時にインテグリン β 1 遺伝子の発現が増加し、ROCK 阻害剤によってさらに歯根膜細胞の遊走が促進された。すなわち、ROCK が制御する細胞骨格の変化とインテグリンの発現上昇による細胞接着の変化が、歯根膜細胞の遊走促進に関与したと考えられる。したがって、ROCK シグナルの抑制は、細胞外基質の増加とインテグリンの活性化を誘導することによって、細胞遊走を促進する可能性がある。

^{*} 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会承認番号 2070

歯根膜細胞における α -SMA 発現に Transgelin が関与する

¹九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、²九州大学病院 歯内治療科、
○御手洗裕美¹、和田尚久²、前田英史²、長谷川大学¹、吉田晋一郎¹、
濱野さゆり¹、祐田明香¹、友清淳²、赤峰昭文^{1,2}

Transgelin is involved in the expression of α -SMA in periodontal ligament cells.

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

²Department of Endodontology, Kyushu University Hospital,

○Hiromi Mitarai¹, Naohisa Wada², Hidefumi Maeda², Daigaku Hasegawa¹, Shinichirou Yoshida¹,
Sayuri Hamano¹, Asuka Yuda¹, Atsushi Tomokiyo², Akifumi Akamine^{1,2}

【研究目的】 歯根セメント質と歯槽骨の間に介在する歯根膜組織は、歯を支持する主機能と共に、咀嚼力を緩衝する機能を有している。咀嚼力による歯根膜組織の伸展・収縮に必要な要素の一つに、歯根膜細胞の収縮性を担うタンパク質の存在が挙げられる。血管平滑筋細胞マーカーである Alpha smooth muscle actin (α -SMA) は、細胞の収縮性や組織のリモデリングに必要と報告されており、歯根膜組織においては分化したヒト歯根膜細胞に発現し、その収縮性への関与が報告されている。同じく血管平滑筋細胞マーカーである Transgelin も、ヒト歯根膜細胞に発現することが報告されている。 α -SMA および Transgelin のプロモーター活性には Transforming growth factor β (TGF- β) シグナル伝達に関わる Smad3 の関連が報告されており、さらに TGF- β 1 は歯根膜組織に発現し、歯根膜組織のリモデリングに関わっていることが報告されている。しかし、歯根膜組織における α -SMA、Transgelin および TGF- β 1 の関連性については未だ報告が少ない。そこで今回我々は、ヒト歯根膜細胞を用いて、 α -SMA および Transgelin の発現ならびにこれらの関連性を検討した。

【材料および方法】 本研究に同意が得られた患者の抜去歯より採取したヒト歯根膜細胞 (HPDLCs) を用いた。(1) 8週齢雌性 SD ラットの上顎左側臼歯部の組織切片を用いて、抗 α -SMA 抗体ならびに抗 Transgelin 抗体による免疫組織化学的染色を行った。また、HPDLCs における α -SMA および Transgelin の発現を蛍光抗体染色法にて解析した。(2) TGF- β 1 刺激を加えた HPDLCs における α -SMA および Transgelin の遺伝子発現を、定量的 RT-PCR 法にて解析した。(3) Transgelin siRNA を導入した HPDLCs における α -SMA の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて検討した。さらに TGF β 1 刺激を加えた HPDLCs における α -SMA の発現に Transgelin の発現が関連しているかどうかを検討するため、Transgelin siRNA を導入した HPDLCs に TGF- β 1 刺激を行い、 α -SMA の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて検討した。

【結果】 (1) 免疫組織化学的染色を行った結果、ラット歯根膜組織全体に α -SMA および Transgelin 陽性反応が認められた。また、蛍光抗体染色法による解析の結果、HPDLCs において α -SMA および Transgelin が発現しており、これらの局在が重なる部位が認められた。(2) TGF- β 1 刺激により、HPDLCs において α -SMA および Transgelin の遺伝子発現量が有意に増加した。(3) Transgelin siRNA を 48 時間導入した HPDLCs において、scramble siRNA 導入 HPDLCs と比較して、 α -SMA の遺伝子発現量が有意に減少した。また、TGF- β 1 刺激を加えた条件においても、scramble siRNA 導入 HPDLCs と比較して、Transgelin siRNA 導入 HPDLCs における α -SMA の遺伝子発現量は有意に低い値を示した。

【考察】 以上の結果より、HPDLCs は α -SMA および Transgelin を発現しており、両者が関連して歯根膜組織で機能している可能性が示唆された。また、HPDLCs において α -SMA の発現上昇に Transgelin が関与していたことから、 α -SMA と Transgelin が相関して歯根膜細胞の収縮性に関与している可能性が考えられた。

【結論】 (1) α -SMA および Transgelin は歯根膜組織に局在しており、また HPDLCs は α -SMA と Transgelin を発現する。(2) TGF- β 1 刺激によって HPDLCs における α -SMA および Transgelin の遺伝子発現が上昇する。(3) HPDLCs における α -SMA 遺伝子発現に、Transgelin が関与している。

マクロファージにおけるアメロジェニン刺激の影響の網羅的遺伝子解析

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
○山道研介¹⁾、福田隆男¹⁾、讃井彰一¹⁾、豊田敬介¹⁾、後村亮¹⁾、西村英紀¹⁾

The effect of amelogenin on mRNA expression profiles in PMA-differentiated U937 cells.

¹⁾Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science,
Kyushu University

○Kensuke Yamamichi¹⁾, Takao Fukuda¹⁾, Terukazu Sanui¹⁾, Kyosuke Toyoda¹⁾, Ryo Atomura¹⁾, and
Fusanori Nishimura¹⁾

【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.*, 2012. *Cytokine*)。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：ヒト単球系細胞株 U-937 をフォルボールエステル (PMA : 50 nM) で 24 時間刺激し、マクロファージへ分化誘導を行った。
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成後、on column 精製した*。
3. マイクロアレイによる変動遺伝子の網羅的解析：U-937 細胞を amelogenin (10 µg/mL), LPS (50 ng/mL), LPS + Amelogenin の各群で 0, 4, 8, 12, 24 時間の time course で刺激後、total RNA を抽出し、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：LPS と LPS + Amelogenin 刺激を比較し、各時間における発現増加遺伝子群 (ratio ≥ 2.0) と発現減少遺伝子群 (ratio ≤ 0.5) について、DAVID software を用いて変動遺伝子群の Pathway を検証した。
5. Pathway 関連遺伝子の抽出：特に増減のあった Pathway から、各時間における Pathway 関連遺伝子を抽出した。
6. マイクロアレイ解析の検証：Real-time PCR 法を用いてマイクロアレイの再現性を確認した。

【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 Chemokine Signaling, NOD-like Receptor Signaling, Graft versus host disease など、炎症・免疫応答に関連する 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、PPAR signaling など脂質代謝系の Pathway が上位を占めていた。
3. マイクロアレイ解析において、LPS + Amelogenin 刺激で特異的に増幅していた抗炎症関連遺伝子 TSG-6、抗酸化関連遺伝子 SOD2、グラム陰性菌貪食促進関連遺伝子 SLAMF1 について、Real-time PCR での遺伝子発現の増幅を確認した。

【考察】

マクロファージ分化した U-937 細胞において、アメロジェニン刺激で炎症・抗炎症作用の両方が活性化される事が示唆される一方、TSG-6 に代表される抗炎症遺伝子の著明な増幅が確認された。同時に、免疫制御系の遺伝子の増幅も確認されたが、SLAMF1 等のグラム陰性菌特異的に貪食作用を促進する遺伝子が含まれていたことより、歯周原菌に対する抗菌作用を促進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、蛋白レベルで行われているか確認すると同時に、アメロジェニンによる抗炎症・抗酸化・抗菌作用の分子基盤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による抗炎症・抗酸化・抗菌作用が示唆された。

必須微量元素ホウ素の培養骨芽細胞細胞膜 Ca チャネルへの影響

○大久保賢亮、井川 一成、山本裕也、山田志津香、林 善彦

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野

The effect to Ca channel of cell membrane on osteoblasts cultured
in supplementation with an essential trace element, boron

○Ookubo Kensuke, Kazunari Igawa, Yuya Yamamoto, Shizuka Yamada,

Yoshihiko Hayashi

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

【緒言】

周期表 5 番目の元素であるホウ素は、3A 族の非金属元素であるが、金属と非金属の両方の特徴をもっている。動物においては、植物とは異なり石灰化との関連で重要な微量元素とされており、最近では、ホウ素の影響を細胞レベルで検討した報告も行われている。我々の教室では、スーパーボンドシーラーの構成成分 TBB に含まれるホウ素 (B) による培養骨芽細胞増殖・分化への影響をすでに確認している (第 140 回日本歯科保存学会学術大会にて発表)。今回は、細胞膜活性化への影響を検討するため、すべての骨芽細胞に存在する Ca チャネルに注目して骨芽細胞の Ca イオンの細胞質内 (内向き) 流入との関係を検討したので報告する。

【材料と方法】

1) 至適ホウ素濃度

NOS-1 (ヒト骨肉腫由来骨芽細胞株) 細胞を使い、低濃度 TBB を培地に添加した MTT アッセイの結果から、0.125mM 添加無血清 α -MEM 培地で細胞の増殖傾向を確認できた。そこでホウ素を 0.1mM 培地に添加し培養実験を行った。

2) 細胞の培養

0.1mM ホウ素を添加無血清 α -MEM 培地で NOS-1 細胞を 35mm ガラスボトムカルチャーディッシュ (FD35, World Precision Instruments, Ltd.) に 3×10^5 個となるように播種した。対照群には、ホウ素無添加培地を用いた。細胞は、5%CO₂ 培養器内で通常どおり培養を行った。

3) 細胞内 Ca²⁺測定

細胞は 3 日間培養し、細胞内 Ca²⁺測定試薬である Fluo 4-AM (同仁化学) を細胞内へとりこませたのち、培養皿は共焦点レーザー顕微鏡 (ライカ TCS SL) ステージに取り付けた顕微鏡ステージ用 CO₂ (5%) 培養器 (Okolab S.r.L., NA, Italy) 内へ装着し観察・撮影を行った。蛍光観察条件は、励起波長: 495nm、蛍光波長: 518nm を参考とした。

4) ニフェジピンによる Ca チャネルの阻害

ホウ素の細胞膜安定化への影響を検討するため、L 型 Ca チャネルの特異的な阻害剤であるニフェジピンは 10 μ M となるよう培地に加え 15 分間培養した。その後、3) の条件で細胞内 Ca²⁺を測定した (n=3)。

5) Ca²⁺蛍光の相対強度変化の解析

ニフェジピンを添加後細胞は 30 分間培養ののち、Fluo 4-AM 染色しレコーディング用緩衝液で細胞を被覆した。培養皿を顕微鏡ステージ用 CO₂ (5%) 培養器 (Okolab S.r.L., NA, Italy) 内装填後、細胞 5~6 個程度の視野を 10 秒に 1 回の割合でスキャンした。スキャン開始 2 分後に 100mM のホウ素を 1.0mM となるよう緩衝液表面に滴下した。そののち 3 分間におけるホウ素添加群、非添加群に生じる相対的蛍光強度を記録し、滴下後 1 分間の変化は最小二乗法で回帰直線として求め比較を行った。

【結果と考察】

ニフェジピンをはじめジヒドロピリジン系薬は、L 型 Ca チャネルの N 部位に特異的に結合しその発現や活性を阻害する。Ca チャネルが阻害されると Ca イオンの細胞質への流入が抑制される。今回、ニフェジピン無添加群ではホウ素滴下後、1 分間の蛍光強度の上昇がみられ、ニフェジピン添加群では対照群と比べてホウ素滴下後、1 分間の蛍光強度上昇が弱かった。したがって、骨芽細胞株 NOS-1 の細胞膜における L 型 Ca チャネルの存在とホウ素の存在下で Ca チャネルは活性化されていることを明らかにできた。

謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費 (挑戦的萌芽研究、課題番号: 25670812) の助成によって実施している。

骨芽細胞における慢性炎症メディエーターAngptl2の発現及び機能解析

九州大学大学院歯学研究院 歯周病学分野¹

福岡歯科大学口腔治療学講座 歯科保存学分野²

○高野 愛子¹、松崎 英津子^{1, 2}、橋本 陽子¹、東 克匡¹、西村 英紀¹

Analysis of expression and function of Angptl2 in osteoblast-like cells

Department of Periodontology, Faculty of Dental Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan¹,
Department of Operative Dentistry and Endodontology, Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan²

○Aiko Takano¹, Etsuko Matsuzaki^{1, 2}, Yoko Hashimoto¹, Katsumasa Higashi¹,
Fusanori Nishimura¹

【研究目的】

慢性歯周炎において、歯槽骨を含む歯周組織は軽微な慢性炎症 (low-grade inflammation) の持続により破壊される。アンジオポエチン様タンパク質 2(Angptl2)は、近年慢性炎症を基盤としたメタボリックシンドロームの発症や進展に関与する炎症性メディエーターとして発見された。生体内において、Angptl2 は脂肪組織に多く発現することが知られているが、本来その発現が低い皮膚組織や筋組織における Angptl2 の発現増加が、持続的な炎症を引き起こす要因となることが明らかにされた。また、Angptl2 は、関節リウマチの病態形成にも関与するとの報告もある。しかしながら、骨組織と Angptl2 の関連については明らかとなっていない。そこで本研究では、骨芽細胞における Angptl2 の役割について検討することとした。

【材料および方法】

実験には、MC3T3-E1 細胞 (マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株) を用いた。細胞を播種し、24 時間後無血清培地に交換した。さらに 24 時間後、Tumor necrosis factor- α (TNF- α) (10 ng/ml) またはリコンビナント hAngptl2 (100 ng/ml) を添加し 24 時間培養した。Angptl2 mRNA 及びタンパク質発現については、real-time RT-PCR 法及びウエスタンブロット法を用いて検討した。NF- κ B シグナルの活性化については、免疫蛍光染色法を用いて NF- κ B p65 サブユニット核移行を解析した。

【結果および考察】

MC3T3-E1 細胞において、炎症性サイトカイン TNF- α の添加により、Angptl2 mRNA 及びタンパク質発現は増加した。現在、そのメカニズムについて、TNF- α の主要経路である NF- κ B シグナル伝達経路に着目し、NF- κ B 特異的阻害剤 BAY11-7082 を用いた検討を行っている。

一方、脂肪細胞、血管内皮細胞においては、Angptl2 によるインテグリンシグナルを介した NF- κ B シグナル伝達経路の活性化が報告されている。そこで、リコンビナント hAngptl2 を MC3T3-E1 細胞に添加したところ、NF- κ B p65 サブユニットの核移行が認められた。すなわち、Angptl2 による NF- κ B の活性化が示唆された。

破骨細胞形成支持細胞である骨芽細胞表面に発現する Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) (破骨細胞分化促進因子) は、NF- κ B シグナル伝達経路の標的遺伝子であることから、Angptl2 が RANKL の発現に及ぼす影響について、現在検討を行っている。同時に、RANKL と拮抗する Osteoprotegerin (破骨細胞分化抑制因子) の発現についても解析中である。

【結論】

骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞において、TNF- α の添加により、Angptl2 の発現は増加する。一方、Angptl2 は、MC3T3-E1 細胞における NF- κ B の活性化を引き起こす。今後、骨形成・破壊に及ぼす Angptl2 の影響とその作用機序についてさらなる検討を行う予定である。

骨再生療法における組織内での Fish collagen の動態 第一報：生分解時期の組織学的観察

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野
○山本 耕平、池田 毅、柳口嘉治郎、山田 志津香、林 善彦

The tissue reaction to fish collagen in bone regeneration therapy The first report: The observation of biodegradation time

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
○Yamamoto Kohei, Ikeda Takeshi, Yanagiguchi Kajiro, Yamada Shizuka, Hayashi Yoshihiko

【はじめに】

再生医療において不可欠な 3 要素である、細胞、足場、栄養因子のうち、われわれは足場材に関して、これまで種々検討を加えてきた。その結果、研究室では生体親和性、生分解性に優れ、かつ人獣共通感染症 (BSE など) の対象とならない Fish collagen 由来の足場材について、物理的、化学的な性状ならびに安全性について検討を終了した (第 135 回、第 138 回日本歯科保存学会学術大会)。現在、試作した多孔性担体 (スポンジ状) を使った歯槽骨再生療法を想定した観点から、組織内での動態に関する検証を開始している。そこで今回、スポンジ状 Fish collagen の生分解性について観察を行ったので、第一報として報告する。

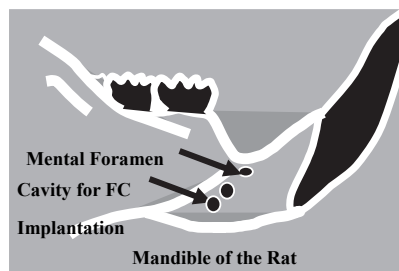
【材料と方法】

1) Fish collagen の調整

テラピアの皮膚からペプシン処理したのち、1% に調整されたアテロ化タイプ I コラーゲン (5mM 酢酸にて溶解, 0.45 μ m フィルターにて濾過済) は (株) ニッピ バイオマトリックス研究所から提供を受けた。

2) 埋入試験

凍結乾燥した Fish collagen から円柱状の多孔性担体を作製し、従来より当教室で骨組織反応を検討する場合に用いている動物 (ラット) 実験モデル系を使って、下顎骨内に形成した骨窩洞へ多孔性担体を移植し 3 日, 1 週, 2 週経過後に深麻酔下に灌流固定を行なった。その後、通法により EDTA 脱灰し、パラフィン包埋標本を作製した。なお Fish collagen を用いない群をコントロールとした。



3) 染色・観察

切片を作製後、HE 染色およびトルイジンブルー染色を行ない Fish collagen の分解状況を病理組織学的に検討した。

【結果】

今回の埋入試験において Fish collagen を用いた群において、3 日, 1 週, 2 週経過するにつれコラーゲンの分解は進み 3 日と 2 週経過時ではコラーゲンの残留に著大な差を認めた。また、コントロール群と比較して骨様組織の形成が促進されている結果も得られた。2 週経過時には、Fish collagen はほぼ分解されていた。

【まとめ】

これらの所見から、生体内では 1 週程度で吸収されることが判明した。この期間は、多孔体内で細胞保持する上でも適切な期間と考えられ、組織再生療法の際に、Fish collagen を用いた足場材が骨欠損部の治癒促進に有効であることが示唆された。今後は、免疫染色等を行いさらに詳細な病理組織学的検索を行っていく予定である。

参考文献

- 1) Yamamoto K, Igawa K, Sugimoto K, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, Ikeda T, Yamada S, Hayashi Y, Biological safety of fish (tilapia) collagen, BioMed Research International, vol. 2014, Article ID 630757, 9 pages, 2014. doi:10.1155/2014/630757.
- 2) Yamamoto K, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, Ikeda T, Yamada S, Hayashi Y, The characterization of fish (Tilapia) collagensponge as a biomaterial, International Journal of Polymer Science, in press, 2015.

PS リポソームおよびハイドロキシアパタイトの併用による骨欠損修復への応用

福岡歯大・歯科保存学分野

○島山 純子、松本 典祥、赤尾 瑛一、泉 健太郎、西崎 竜司
中山 英明、水上 正彦、松崎 英津子、泉 利雄、阿南 壽

The bone defect repair by PS liposomes and Hydroxyapatite

Department of Operative Dentistry and Endodontics, Fukuoka Dental College

○Junko Hatakeyama, Noriyoshi Matsumoto, Eiichi Akao, Kentaro Izumi, Ryuji Nishizaki,
Hideaki Nakayama, Masahiko Minakami, Etsuko Matsuzaki, Toshio Izumi, Hisashi Anan

(緒言)

細胞膜リン脂質のホスファチジルセリン (PS) を含むリポソーム (PS リポソーム)は破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への成熟を抑制し、慢性関節リウマチの動物モデルにおける骨破壊を抑制することが知られている (Wu et al., J Immun 2010, Price, Nature Rev Rheumat 2010)。またハイドロキシアパタイト (Hydroxyapatite 以下 HAP) は高い気孔率と親水性を有し、骨芽細胞の活性を高めることや破骨細胞増加の抑制により骨補填材としての期待が寄せられている (Yamazaki et al., Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater 91B: 2009.)。我々はこれまで、ラット頭頂骨骨欠損モデルにおける骨修復について本学会にて報告してきた。今回、PS リポソームと生体親和性に富む HAP 併用が骨形成に及ぼす影響について、 μ CT を用いて検索したので報告をする。

(材料および方法)

1. PS リポソームの調整: PS リポソームの調整はこれまでの報告の通り行った。すなわち、phosphatidylcholine (PC) と phosphatidylserine (PS) の乾燥リン脂質フィルムを molar ratio 7:3 の割合で PBS に溶解し、氷上で 10 分間超音波振動を与えて溶解した。0.22 μ m のフィルター滅菌を行い、調整から 3 日以内に実験に供した。
2. 動物実験: 動物実験は福岡歯科大学動物センターにより承認 (承認番号 08007) を得て、10 週齢雄性 Wister ラット 45 匹を用いて行った。イソフルラン (フォーレン吸入麻酔液、アボットジャパン)による吸入麻酔後、ラット頭頂部を剃毛し切開線を入れ、皮膚および骨膜を剥離反転した。注水皮下でトレフィンバー (GC 社製、直径 5 mm) により、円形の骨欠損を作製した。欠損部に ①HAP 粒子 (APACERAM-AX, HOYA Technosurgical 株式会社)を 6 mg + PBS 10 μ l 埋入 ②HAP 粒子 6 mg + PS リポソーム 10 μ l 添加 ③コントロールとして何も埋入しない の3種類を施した。その後、骨膜と皮膚のそれぞれを縫合した。処置の 2, 4, 8 週間後に屠殺し、4% paraformaldehyde 水溶液で灌流固定を行い、頭部を取り出した。高分解能マイクロ X 線 CT スキャナ (SKYSCAN, Bruker Corporation 社製) にて解析を行った。

(結果)

1. Control、HAP または HAP+PSL 充填による体重の変化は認められなかった。
2. 処置後 2 週齢における骨欠損部において、HAP 周囲には硬組織の形成像はほとんど認められなかった。処置後 4 週齢では、HAP 粒子を核にして新規の硬組織様石灰化物が少数、散在性に認められた。8 週齢の HAP + PSL 群で骨欠損部に HAP を中心にして不透過性が充進した像が多数認められた。一方で Control 群では、実験期間を通して骨欠損部には骨の添加は認められなかった。

(結論)

HAP と PS リポソームの併用により、骨形成が促進される可能性が示唆された。

(学会外研究分担者)

高山扶美子、武 洲、中西 博 (九州大学 歯学研究院 口腔機能分子科学)

マウス皮下移植における羊膜上培養歯根膜由来細胞シートの骨形成能の検討

¹京都府立医科大学 大学院医学研究科 歯科口腔科学, ²宇治徳洲会病院

○遠藤悠美¹, 雨宮 傑¹, 本城賢一¹, 市岡宏顕¹, 足立圭司¹,
大迫文重¹, 西垣 勝¹, 山本俊郎¹, 中村 亨^{1,2}, 金村成智¹

Examination of osteogenic potential in mice subcutaneous implantation of the periodontal
ligament-derived cell sheet cultured on amniotic membrane

¹Department of Dental Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine,
²Uji-Tokushukai Hospital

○ENDO Yumi¹, AMEMIYA Takeshi¹, HONJO Ken-Ichi¹, ICHIOKA Hiroaki¹, ADACHI Keiji¹,
OSEKO Fumishige¹, NISHIGAKI Masaru¹, YAMAMOTO Toshiro¹, NAKAMURA Toru^{1,2}, KANAMURA Narisato¹

【研究目的】

羊膜は抗炎症・感染抑制作用等を有し、様々な細胞の培養基質として適していることがわかっている。われわれは羊膜を培養基質として用いた歯根膜由来細胞 (PDL 細胞) シートの作製に成功し (Adachi *et al*, Oral Dis, 2014)、*in vivo* の環境下においてもその性質を維持することを明らかにした (雨宮ら、日歯医学会誌、2013)。PDL 細胞は、骨形成を行う骨芽細胞に分化する能力を有しているとされ、これら研究結果を基に、同 PDL 細胞シートを用いた新規骨再生医療の検討を行っている。同細胞シートの骨分化誘導培養を行ったところ、各種骨芽細胞関連のタンパク発現を認め、新生骨形成能、すなわち歯周組織再生を促進する細胞を有していることを報告した (2013 年度春季学術大会 (第 138 回))。そして今回、上記にて得られた培養細胞シートの *in vivo* における細胞動態、すなわち実験動物の皮下に移植することによる新生骨形成の可能性についての検討を行い、若干の知見が得られたので報告する。

【材料および方法】

羊膜は、帝王切開時の胎盤より採取し、洗浄後、羊膜上皮細胞を除去したものを研究に供した。また PDL 細胞は、抜去した智歯より歯根膜組織を採取し初代培養後、3~4 代継代したものを研究に使用した。継代培養した PDL 細胞は、羊膜上に播種し、約 4 週間、骨分化誘導培地 (デキサメタゾン、アスコルビン酸、β-グリセロリン酸含有培地) で培養を行った。上記にて得られた培養細胞シートは、羊膜ごと BALB/c ノードマウス背部皮下への移植を行い、8 週後に移植部位を採取した。なお、当研究の実施および歯根膜組織、羊膜の利用については、該当患者に対し本研究内容、安全性の説明を行い、同意を得たうえで実施した。また本学医学倫理審査委員会 (C-1111) ならびに本学動物実験委員会 (M25-268) の許可を得たうえでやっている。

【結果】

移植 8 週後、軟 X 線写真にて羊膜上培養 PDL 細胞シートの移植部に不透過像を認め、H-E 染色像で同部位に石灰化様組織を認めた。さらに、アリザリン・レッド S 染色で石灰化物形成を、また von Kossa 染色で石灰化用組織を認めた。免疫染色像では、間葉系細胞マーカーである vimentin、骨芽細胞マーカーである bone Gla-protein (osteocalcin) の発現を認めた。

【考察および結論】

本研究にて骨分化誘導培養を行った培養 PDL 細胞シートは、羊膜を培養基質として用いたことで、移植操作に耐えうる十分な強度を供えていた。また移植後における免疫染色像にて、間葉系細胞マーカーの vimentin、骨芽細胞マーカーの osteocalcin 陽性細胞を認め、生体内の環境下においてもその性質を維持していることが示された。さらにはアリザリン・レッド S 陽性、von Kossa 陽性の石灰化細胞外基質の形成が認められたことより、羊膜上培養 PDL 細胞シートは骨分化能を有した細胞シートであることが示された。今後さらなる検討が必要であると思われるが、同培養細胞シートによる新たな骨再生医療への応用の可能性が示唆された。なお本研究は、JSPS 科研費 (25861966) の助成を受けて行った。

2種の幹細胞を用いた象牙質・幹細胞凝集複合体による歯周組織再生療法

1) 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野

2) 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔生化学分野

○田中雅士¹⁾ 川木晴美²⁾ 奥野公巳郎¹⁾ 小栗健策¹⁾ 森 春菜¹⁾ 河野 哲¹⁾ 近藤信夫²⁾ 吉田隆一¹⁾

Periodontal regeneration using two types of dentin-stem cell complex

1) Department of Endodontics, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation,
Asahi University School of Dentistry

2) Department of Oral Biochemistry, Division of Oral Structure, Function and Development,
Asahi University School of Dentistry

○Tanaka Masashi¹⁾ Kawaki Harumi²⁾ Okuno Kumio¹⁾ Oguri Kensaku¹⁾ Mori Haruna¹⁾
Kawano Satoshi¹⁾ Kondoh Nobuo²⁾ Yoshida Takakazu¹⁾

【研究目的】

超高齢社会の到来により、歯科領域でも腫瘍、歯周病や根尖病変等による骨欠損の増加、加齢による骨量減少などの問題が増加しており、それに伴い、顎骨に骨補填材を用いた骨再生療法を適用する症例が増えてきている。骨欠損の治療に用いる骨補填材としては、自家骨移植がゴールドスタンダードであるが、その代用材料として歯科あるいは整形外科領域では、ハイドロキシアパタイト（以下HA）、β-リン酸三カルシウム（以下β-TCP）等のリン酸カルシウム系骨補填材が臨床応用されており、骨伝導能を示す材料として報告されているが、生体吸収性や親和性における問題点も同時に指摘されている。一方、象牙質は骨に類似した生体硬組織であり、抜去歯から自家移植への供給可能な生体材料としての可能性を有している。これまでに我々は、象牙質を骨補填材として応用するために、これに幹細胞を組み合わせた複合材料を作製し、象牙質顆粒がヒト骨髄由来幹細胞やヒト歯髄由来幹細胞の増殖と骨芽細胞様細胞への分化を促進することを報告してきた。今回は2種の幹細胞と比較対照として既存の骨補填材を用いて、それぞれ骨補填材顆粒・幹細胞凝集複合体を作製しマウス皮下での動態について検討した。

【材料および方法】

実験に用いた抜去歯は患者の同意のもと、朝日大学歯学部倫理委員会の承認（第26007号）を得て採取し、抜歯直後に-80℃で凍結保存した。これらの抜去歯から象牙質顆粒を作製し、整粒したのち、オートクレーブを用いて滅菌した。比較対照としてオスフェリオン（オリンパス社）、ネオボーン（MMT社）を同様に処理した。作製した顆粒とヒト骨髄由来幹細胞、ヒト歯髄由来幹細胞を7日間培養し、骨補填材顆粒・幹細胞凝集複合体を作製した。そして、ヌードマウス（6週齢、雄性、体重：約25g、骨補填材は20mg埋植）の左側背部皮下に埋植し、3週間後に摘出して適法に従いパラフィン包埋切片を作製し、組織化学的検討を行った。さらに、増殖細胞のマーカーであるKi-67、あるいは骨芽細胞のマーカーであるosterixとヒト核を検出するための蛍光免疫二重染色を行い、埋植後の幹細胞の動態について検討した。

【結果】

骨補填材のみを埋植した群に比べ、幹細胞凝集複合体埋植群を埋植した群では、いずれの幹細胞を用いた場合でも骨芽細胞のマーカーであるosterix陽性細胞が多数みられ、その多くがヒト核陽性であった。一方で、増殖細胞のマーカーであるKi-67陽性細胞は象牙質顆粒・歯髄由来幹細胞凝集複合体埋植群で顕著に観察された。

【結論および考察】

象牙質顆粒は、複合体の作製に用いた2種の幹細胞の骨芽細胞様細胞への分化において、比較に用いた人工補填材に匹敵する分化促進能を示した。また、歯髄由来幹細胞は骨髄由来幹細胞と同様に、その一部が埋植後組織で骨芽細胞様細胞に分化し、さらに一部は増殖能を有して埋植後の組織で生存していると考えられ、骨再生療法への細胞源として有望であることが示唆された。以上より、骨補填材顆粒のみを用いるよりも、あらかじめ細胞を培養した骨補填材顆粒・幹細胞凝集複合体を移植材として用いると新生骨形成が促進される可能性が示され、象牙質と歯髄由来幹細胞を自家移植が可能な骨補填材料として利用することは、抜去歯の活用法として有望であることが示された。

低出力パルス超音波はマウス筋芽細胞の分化を促進する

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯冠修復学¹⁾
武庫川女子大学健康運動科学研究所²⁾ 中部インプラントアカデミー³⁾
○玄 太裕¹⁾、山添光芳²⁾、梶本忠保^{1),3)}、堀田正人¹⁾

Low-intensity pulsed ultrasound promotes differentiation of C2C12 cells

Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation,
Asahi University School of Dentistry¹⁾ Mukogawa Women's University²⁾ Chubu Implant Academy³⁾
○GEN Taiyu¹⁾, YAMAZOE Mitsuyoshi²⁾, KAJIMOTO Tadamori^{1),3)}, HOTTA Masato¹⁾

【目的】

低出力パルス超音波 (low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS) は組織再生を促進すると考えられ、広く臨床で応用されている。口腔内にはさまざまな組織があるが、今回、マウス骨格筋由来の筋芽細胞株 C2C12 が筋分化する過程における LIPUS の作用に着目した。本実験では LIPUS を照射し分化誘導 2・3・5・7 日後の遺伝子とマイクロ RNA(miRNA) の発現をリアルタイム PCR 法を用いて定量し、LIPUS 照射が筋線維へ分化中の C2C12 細胞の遺伝子と miRNA 発現パターンにどのような影響を与えるか検討した。

【材料および方法】

1. 細胞培養と LIPUS の照射：12 穴プレートに C2C12 細胞を播種し、翌日、分化誘導培地に交換した。分化誘導 17 時間後に骨折治療装置 (BR Sonic Pro, 伊藤超短波) を用いて LIPUS を照射した (3MHz, 70mW/cm², 15 分間)。
2. 免疫染色：分化誘導 4 日後に C2C12 細胞の免疫染色を行った。一次抗体は抗ヒトミオシン重鎖モノクローナル抗体 (抗 MHC 抗体)、二次抗体は Alexa Fluor 488 標識 Anti-mouse IgG を用いた。DAPI 含有蛍光退色防止剤で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。
3. mRNA の定量解析：抽出したトータル RNA から cDNA を合成した。リアルタイム PCR で得られた値は、比較 C_T 法により相対定量した。結果は標的遺伝子発現を β-actin 発現量で正規化し、さらに標準サンプル (増殖培地で対数増殖している C2C12 細胞) との比率として示した。
4. miRNA の定量解析：トータル RNA から一本鎖 cDNA を合成し、リアルタイム PCR を実施した。得られた値は、比較 C_T 法により相対定量した。結果は標的遺伝子発現を U6 snRNA 発現量で正規化し、さらに標準サンプルとの比率として示した。

【結果】

1. C2C12 細胞の免疫染色の顕微鏡観察の結果から LIPUS 照射により非照射群に比べて MHC 陽性細胞が多数確認でき、陽性細胞の長径も有意に長かった。
2. mRNA 解析から、ERK5 の転写量は LIPUS 照射によりピークを迎える分化誘導 23 時間後の発現量が 1.7 倍、分化誘導 7 日後に 3 倍程度増強された。Klf2 は分化誘導 23 時間後に 1.7 倍増強された。Cdh15 は分化誘導 23 時間後に 1.8 倍程度、分化誘導 7 日後にも 2 倍程度増強されていた。MyoD は分化誘導 23 時間後に 2.4 倍程度、分化誘導 3 日後から 5 日後にも増強された。Myogenin は分化誘導 3 日後から 7 日後に最大 3.5 倍増強された。MCK は分化誘導 28 時間後のより早い時期から最大 2 倍程度の増加が認められた。
3. miRNA の定量解析から miRNA-499 は LIPUS 照射により分化誘導 7 日後に約 1.7 倍増強されたが miRNA-1b, miRNA-27a, miRNA-29b, miRNA-30a, miRNA-133a, miRNA-135b, miRNA-206, miRNA-208b, miRNA-486a については LIPUS 照射による影響を認めなかった。

【考察と結論】

LIPUS 照射の C2C12 細胞に与える影響について検討した結果、LIPUS 照射により C2C12 細胞の筋細胞への分化が促進され、骨細胞に分化することはなかった。ERK5-Klf2-Cdh15 の経路を介して筋分化過程における細胞融合を促進し、MyoD, Myogenin 等の転写活性因子を介して筋特異的なタンパク質の発現を促進していた。また、MCK の転写促進が分化段階の早期に認められたことから、筋細胞がより早く完成することが示唆された。さらに miRNA-499 の発現増強から筋細胞の遅筋への分化が促進されていることが示唆された。

周術期口腔機能管理下における患者の歯周病状態について

日本医科大学千葉北総病院歯科

○大木亜悠子、大畑菜々子、鈴木結己、村田侑加、藤川瑞穂、吉峰正彌、小倉喜一郎、鴨井久博

Periodontal condition in patients undergoing the perioperative oral management

Nippon Medical School Chiba Hokuso Hospital Dental Clinic

○Ayuko Ogi, Nanako Ohata, Yuna Suzuki, Yuka Murata, Mizuho Fujikawa, Masaya Yoshimine,
Kiichirou Ogura, Hisahiro Kamoi

【目的】

平成24年度から周術期口腔機能管理が保険診療として評価されるようになった。周術期術前患者に対して口腔ケアを行うことにより、誤嚥性肺炎や口内炎等の術後合併症の発症頻度が下がり、入院期間の短縮が図れることが明らかになっている。口内炎等が発症しないことで、早期から経口摂取が可能となり良好な身体回復に繋がる。患者の入院中の生活の質(Quality of Life)を確保することは非常に重要である。

今回、日本医科大学千葉北総病院の周術期患者に対して歯科的介入を行い、口腔内状況について検索を行ったので報告する。

【対象及び方法】

平成24年7月から平成27年1月までの周術期該当患者1771名を対象とした。男性679名、女性1092名、平均年齢59.2歳、平均入院日数は22.3日であった。

口腔内の診査項目は歯式、歯周基本検査(PD: Probing Depth・動揺度・歯周病状態)、歯面のプラーク・舌苔付着の有無、乾燥状態、口臭の有無、義歯の有無、重度う蝕・重度歯周炎の有無、最終歯科受診日及び細菌数測定、11枚法口腔内写真撮影を行い、手術疾患名の記録を行った。その後、動揺歯に対しては暫間固定・抜歯を行った。また併せて、全顎スケーリング・PMTC(Professional Mechanical Tooth Cleaning)を行い、口腔内の清浄化に努めた。術後は病棟へ往診し、口腔内の変化や術後合併症の発生の有無を確認、細菌数測定後、消毒用綿球にて清拭した。口腔乾燥を訴える者には保湿剤、咬頬・咬唇痕を認める者にはデキサルチン軟膏等の塗布を行った。

【結果】

術前の検査結果として、PD4 mm以上の歯周炎のある者は79.0%、動揺歯がある者は27.0%、プラーク付着がある者は31.4%、舌苔付着がある者は38.5%、口腔乾燥がある者は4.8%、口臭がある者は11.6%、義歯を装着している者は25.5%、重度う蝕がある者は10.9%、重度歯周炎がある者は12.9%、最終歯科受診日の平均は33.2カ月前、細菌レベルはレベル4で平均細菌数は19390977であった。対象者の疾患はS状結腸癌14.5%、胃癌10.7%、乳癌8.4%の順であった。

術後の検査結果として、術前後で変化がある者は9.0%、細菌レベルはレベル3で平均細菌数は1194075であった。

【考察・結論】

今回得られた結果より周術期該当患者は歯周病罹患率が高いことが示唆され、歯周病状態を把握するために歯周基本検査が重要であることがわかった。また術前に歯科的介入を行うことで術中の歯損傷を予防でき、口腔内細菌数を低いレベルに保つことができた。周術期口腔機能管理を行うことで口腔内の問題点を歯科-医科間で情報共有することができるため、術後の合併症予防及び入院日数の短縮に寄与できたのではないかと考える。今後も、病院歯科として円滑な手術を行えるような体制の充実、及び早期身体回復を図りたい。

歯周病の重症度別分類を用いた歯周病と糖尿病の関係解析

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講座²

○岩井由紀子¹, 窪川恵太¹, 海瀬聖仁¹, 三木 学¹, 石岡康明¹, 内田啓一², 田口 明², 吉成伸夫¹

The relationship between periodontal disease and diabetes mellitus by using the severity classification of periodontal disease

○Yukiko Iwai¹, Keita Kubokawa¹, Kiyohito Kaise¹, Manabu Miki¹, Yasuaki Ishioka¹, Keiichi Uchida², Akira Taguchi²,
and Nobuo Yoshinari

Department of Periodontology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University¹, Department of Oral and Maxillofacial Radiology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University²

【目的】

以前より、歯周病と糖尿病との関係が疫学研究により数多く報告されている。しかし、両疾患の関連性について、日本国内での詳細なデータはほとんど存在しない。その理由の一つとして、歯周病を評価する統一基準がなかったことが挙げられる。そこで、2011年に日本歯周病学会ペリオドンタルメディシン委員会は、より簡便で、医科と連携可能な評価法を目標とし、臨床指標である歯槽骨吸収率と、全身的炎症マーカーである高感度 CRP 値 (C-reactive protein) を用いた歯周病の重症度別分類を作成した。そこで本研究では、この重症度別分類に用いられている項目と糖尿病の関係を明らかにするとともに、歯槽骨吸収率、もしくは高感度 CRP 値が糖尿病を予測しうるかどうか検討することを目的とした。

【材料および方法】

松本歯科大学病院歯周病科、および大学病院健診センターに人間ドックを受診した、本研究に同意の得られた糖尿病患者 36 名を含む 280 名 (男性 186 名, 女性 94 名) を対象とし、すべての被験者のパノラマ X 線写真, またはデンタル X 線写真から Schei らの方法により各個人の歯槽骨吸収率を計測した。高感度 CRP 値の測定後、歯周病の重症度別分類を用いて、被験者の重症度分布を求めた。本研究で用いた分類基準は、高感度 CRP 値が 440ng/ml 以下: 炎症度軽度=A, 440ng/ml 以上 1020ng/ml 未満: 中等度=B, 1020ng/ml 以上: 重度=C とし、歯槽骨吸収率が 25% 以下: 臨床的軽度=I, 25% 以上 35% 未満: 中等度=II, 35% 以上: 重度=III とし、それぞれ 3 段階に分け、9 つの群に分類するものである。さらに、詳細な解析のため、性別、年齢、喫煙の既往、心臓血管疾患の有無、現在歯数、高感度 CRP 値 (3 分類)、歯槽骨吸収率 (3 分類) を独立変数とし、糖尿病の有無を従属変数とするロジスティック回帰分析 (変数増加法) により評価した。さらに、高感度 CRP 値および歯槽骨吸収率により、糖尿病の有無が評価できるか否かを ROC (Receiver Operatorating Characteristic curve, 受信者動作特性曲線解析) で評価した。なお、本研究は、松本歯科大学倫理委員会の承認 (承認番号: 0151 号) を得ている。

【結果】

ロジスティック回帰分析の結果、糖尿病の有無に関連する因子は、性別、年齢、歯槽骨吸収率、高感度 CRP 値であることが分かった。また、歯槽骨吸収率、および高感度 CRP 値が高いほど、糖尿病のリスクが高くなることが分かった。さらに、ROC から歯槽骨吸収率、および高感度 CRP 値と糖尿病の AUROC (ROC 曲線下面積) はそれぞれ、0.718 と 0.694 であった。

【考察】

歯槽骨吸収率と糖尿病の AUROC は 0.7 以上であるため、歯槽骨吸収率が糖尿病のスクリーニング指標として有用であることがわかった。今後、統計学的な分析がより確実となるように被験者数を増やしてゆく予定である。

中津川市における妊婦の歯周炎関連検査と出産・新生児との関係

朝日大学歯学部口腔感染医療学講座歯周病学分野¹, 中津川市健康医療課²

○濱 拓弥¹, 森永啓嗣¹, 安田忠司¹, 渋谷俊昭¹, 勝尚代²

The relationship between the markers of periodontitis in pregnant and the condition of birth delivery in Nakatsugawa City

Asahi University School of Dentistry, Department of Periodontology¹,
Nakatsugawa City Department of Health and Healthcare²

○Takuya Hama¹, Hirotsugu Morinaga¹, Tadashi Yasuda¹, Toshiaki Shibutani¹, Naoyo Katsu²

【目的】

中津川市健康医療課では妊婦教室での歯科検診を年9回実施しており、妊婦教室では歯科検診、細菌観察、ブラッシング指導、管理栄養士による栄養指導が主として行っている。本研究の目的は中津川における妊娠中の口腔内環境および出産時の状況との関連性を検討することである。

【材料と方法】

平成 24 年 6 月から平成 25 年 6 月に中津川市健康医療課妊婦教室に参加した妊婦 126 名を対象とした。検査項目は CPI, 出産期間, 新生児体重, 喫煙, 全身疾患を調査した。さらに唾液中の LPS 測定とポケット内細菌 A.a 菌, P.g 菌, Pi 菌についてスクリーニングした。エンドトキシン(Lipopolysaccharide, LPS)はグラム陰性菌の細胞壁表層を構成しているリポ多糖 (LPS) であり, リピド A, コア多糖体, O-多糖体から構成される。エンドトキシンの活性本体はリピド A であり, 細菌死により細胞壁が損傷しエンドトキシン(Lipopolysaccharide, LPS)が放出されると, 生体に様々な作用を及ぼし, 発熱ショックや敗血症を引き起こすことが知られている。本 LPS 測定方法はカプトガニの体液凝固系の LPS レセプターである Factor C と蛍光基質を用いたホモジニアスな比濁時間分析法であり, 測定には EG リーダー-SV-12 を用いゲル化により生じる濁度変化を透過光量比(%transmittance)として捉え, 反応開始 100%から一定の閾値 (threshold value%) に達する時間をゲル化時間 (gelation time) とする。エンドトキシン濃度とゲル化時間とは両対数プロットでほぼ直線に近い検量線を作成した。E.coli UKT-BUKT-B 株の菌体から精製した LPS の凍結乾燥品をコントロールスタンダードエンドトキシンとして供試した。本測定方法は高感度で測定範囲の広いエンドトキシン検出が可能である。

【結果】

対象者の検査時平均妊娠週数は 24.6 ± 3.1 歳, 平均年齢 31.1 ± 4.9 歳であった。平均妊娠期間は 38.8 ± 1.3 週であった。126 名中, 喫煙者 2 名, 全身疾患のある妊婦はいなかった。CPI コード 0: 0 名, 1: 5 名, 2: 44 名, 3: 66 名, 4: 11 名であった。低体重児出産が認められたのはコード 2 と 3 であった。その割合はコード 2 で 0.8%, 3 で 6.3% であった。PCR-インバーダー法の結果:陽性率(検出菌数 10 コピー/唾液 $10 \mu\ell$ 以上)は A.a 菌が 1.2%, P.g 菌は 8.6%, Pi 菌は 10.2% であった。唾液中 LPS は各コードで認められた。CPI コードと唾液中の LPS 濃度に正の相関はなかった。低体重児出産と CPI コード, 細菌種, LPS との相関は認められなかった。

【考察および結論】

近年, 早産・低体重児出産の原因として歯周病の関わりが注目されているが本研究においては明確な関与は認められなかった。既報に一致しなかった一因には, 中津川市では歯科医師会の協力による歯科保健指導が乳幼児期から成人期まで長年実施されているため, 妊婦の口腔保健意識が高く口腔環境が向上していることが考えられる。

**Does dental students' ability to self evaluate affect their performance
in preclinical operative dental procedures?**

Harvard School of Dental Medicine, Department of Restorative Dentistry and Biomaterials Sciences
○Hiroe Ohyama, Sheetal Asher, German Gallucci

Introduction:

Self-Assessment is defined as “the process of critically reviewing the quality of one’s own performance”. It is the ability to scrutinize, note and judge your own performance based on specific criteria and determine ways to improve it. Standard 2-10 of the Accreditation Standards for Dental Programs states that “graduates must demonstrate the ability to self-assess, including the development of professional competencies and the demonstration of professional values and capacities associated with self-directed, lifelong learning”.

(http://www.ada.org/~media/CODA/Files/predoc_2013.ashx)

Several studies in the literature report correlation between students’ self-assessment skills and their learning outcome, such as in preclinical prosthodontics procedures. However, to our knowledge, no studies have been published for operative dentistry.

Aim:

To evaluate whether the ability of students to self evaluate their procedures leads to a better performance in the preclinical operative dental procedures at Harvard School of Dental Medicine (HSDM).

Materials and Methods:

Dental students at HSDM complete a formative (time 1) and a summative (time 2) preparation and restoration for Class II (amalgam) and Class III (composite resin) cavities during the operative preclinical sessions. Students fill out a self-assessment form evaluating their preparations and restorations (total 8 procedures for formative and summative). Three independent faculty evaluators (who have been trained and calibrated as evaluators for the course) evaluate the cavity preparations and restorations based on the same criteria as the self-assessment forms.

In this study, the 8 self-assessment forms filled out by 36 students for the academic year 2014-2015 were scored. For each procedure, the faculty scores determined a range within which if the student self-evaluation lay, it was determined to be accurate. A comparison was also made within the two groups to assess the differences in the scores between the formative and the summative procedures. It has been also evaluated if the students’ self-assessment ability was influenced by academic and/or clinical performance. The study was approved by the Harvard Medical School; Institutional Review Board (IRB), prior to evaluating the data (#14-3012).

Findings and Conclusion:

The students’ self-assessment score was higher than the average faculty’s score most of the time. This over-estimation continues during the summative assessment at time 2, irrespective of the type of procedure. Overall, the students with high academic performance tend to have self-assessments similar to the average of the faculty members at time 1 but with more practice (time 2), the students with a high clinical performance have self-assessments similar to the average of the faculty members. Low clinical performers tend to over-estimate their self-assessment scores compared to any of the other groups.

講座を超えた実習教育の取り組み

～浸潤麻酔可能な顎模型の保存修復学シミュレーション実習への導入～

北海道医療大学歯学部 口腔機能修復・再建学系 う蝕制御治療学分野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

北海道医療大学歯学部 生体機能・病態学系 歯科麻酔学分野³

○泉川昌宣¹, 伊藤修一¹, 油井知雄¹, 白井要², 大桶華子³, 工藤 勝³, 古市保志², 斎藤隆史¹

Cross disciplinary approach of practical training in dental education

- Introduction of infiltration anesthesia training model to operative dentistry -

Division of Clinical Cariology and Endodontology, School of Dentistry, Health Sciences University
of Hokkaido¹

Division of Periodontology and Endodontology, School of Dentistry, Health Sciences University of
Hokkaido²

Division of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido³

○Masanobu Izumikawa¹, Shuichi Ito¹, Tomoo Yui¹, Kaname Shirai², Hanako Ohke³, Masaru Kudo³,
Yasushi Furuichi², Takashi Saito¹

【目的】

診療参加型臨床実習を円滑に遂行するために臨床実習前教育において実践に近い状況での実習が求められている。これまで我々はう蝕検知液可染性う蝕付き人工歯や覆髄実習用人工歯の開発を行い、実際の臨床をシミュレートした実習を行ってきた。さらに現在、全顎的な治療を経験可能な顎模型を開発中である。臨床実習前に本学歯科麻酔学分野と合同で、「う蝕治療」の学生相互実習を行っているが、局所麻酔注射時には多くの学生で手の振戦を認め、患者の口唇への誤穿刺、片付け時の使用済針の針刺などの事故も少数ではあるが発生しており、これは学生の麻酔注射の経験不足に起因するものであると思われた。

今回、臨床実習前に麻酔注射を含めた一連の実習を効果的に行うために浸潤麻酔の施行が可能な「う蝕治療」用顎模型の開発を行い、その適性について検討を行ったので報告する。

【方法】

株式会社ニッシンと共同で、左右分割可能な下顎模型の歯肉類移行部粘膜下に麻酔薬注入スペースを付与し、麻酔薬注入により粘膜の膨潤が再現可能な顎模型 (AR-001) を試作した。本顎模型はファントム DR-11 (モリタ製作所) に着脱可能である。実習の想定は浸潤麻酔下での下顎左側第二小臼歯のコンポジットレジインレー修復である。本学教員に対して、浸潤麻酔の施行から窩洞形成までの一連の模擬実習後に、適性検討のためのアンケート調査を実施した。

【結果】

23名から回答を得た。本模型を実習に導入することについては多くの教員が有用と感じており、基礎実習段階から一連の術式を一つの実習単位での導入を希望する意見が多く得られた。浸潤麻酔薬注入時の粘膜の膨潤については概ね適切であるとの回答を得たが、今回試作した模型は注射部位を限定しており、「前歯部や上顎臼歯部にも麻酔注射部位を設定してほしい」との意見が得られた。また模型の咬合状態や辺縁歯肉の形態に改良の必要があることが明らかとなった。

【考察】

本講座では、臨床実習前に臨床に則した診療の流れを習得させるとともに安全性の高い実習を行うために、歯科麻酔学の教員と合同で相互実習を行っている。しかし基礎実習時には前処置としての局所麻酔に関してはその内容について簡単に触れる程度に留まっている。今後、本顎模型の改良を行い、実習に本格導入することによってより効果的なシミュレーション教育を行うことが可能となると思われる。

【研究協力者】

株式会社ニッシン 岩城重次氏

ProTaper Next による湾曲根管形成修得の教育効果

神奈川歯科大学 大学院歯学研究科 歯髄生物学講座

○渡邊亮一郎、下島かおり、武藤徳子、石井信之

*Educational Effects of Curved-root Canal Preparation by ProTaper Next in Dental Students
Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University*

○WATANABE Ryoichiro, SHIMOJIMA Kaori, MUTO Noriko, TANI-ISHII Nobuyuki

【研究目的】

根管形成に変革を起こした Ni-Ti ロータリー・ファイルシステムは、2007 年に開発された M-Wire によって破折抵抗性を向上させ、湾曲度の強い複雑な根管形態に対しても容易に根管形成を可能にしました。本研究は、学部学生の模型実習に *ProTaper Next* による根管形成を実施し、教育効果を評価することを目的とした。

【材料および方法】

歯学部 3 年生 96 名に対する模型実習において、*ProTaper Next* (*Dentsply Maillefer*) による根管形成を導入して湾曲根管に対する根管形成の評価を行った。供試透明根管模型(学生 96 本、インストラクター (Ni-Ti ファイル使用経験年数 7 年以上) 5 本) は、エンドトレーニングブロック J タイプ (*Dentsply Maillefer*: 根尖孔径 #15、根管テーパー 02) を使用した。根管形成開始前に #15K ファイルで根管探索後、*ProTaper SX* ファイルでストレートラインアクセスと #15K ファイルによるガイドパス形成を行った。*ProTaper Next* は、*X Smart plus* (*Dentsply Maillefer*) を使用し、300rpm、2.0Ncm 設定で X1, X2 ファイル(25/06)の 2 本で根管形成を終了した。根管形成の評価は根管壁変位量によって評価し、さらに インストラクターと比較検討を行った。

根管壁変位量の解析は、根管壁切削量を測定し比較検討した。測定には実態顕微鏡 *Olympus SZX 16* およびデジタルカメラ *DP71* を使用し、根管形成前後の透明根管模型をデジタル画像で重ね合わせ、得られた画像データを PC に取り込み、計測用ソフトを使用して計測を行った。計測箇所は根尖から 1、2、3、5mm の位置を設定し、外湾側と内湾側それぞれの根管幅径増加量(形成前の根管壁から形成後の根管壁までの距離)を計測し統計処理を行った。

【成績および考察】

96 名の学生が *ProTaper Next* による根管形成を行った結果、96 根管中 12 根管にレッジ、1 根管にファイル破折が認められた。偶発事故が認められなかった 83 根管に対して根管壁変位量を解析した結果、内湾側変位量は根尖側 5mm のすべての測定部位で 0.2mm 以下を示し、外湾側変位量は 0.4 mm 以下であった。さらに、学生とインストラクターの根管壁変位量を比較検討した結果、学生は内湾側が高く、外湾側は低い傾向が認められた。しかしながら、内湾外湾側ともに有意差が認められたのは根尖側 1mm に認められた。

【結論】

ProTaper Next による根管形成を学部学生に導入した結果、86%の学生が強度湾曲根管に対しても本来の根管形態を保持した根管形成が可能になった。しかしながら、根尖側 1mm において内湾側切削量が高い傾向があるため、正確なガイドパス形成の必要性が示された。

歯科患者ロボット昭和花子2を用いたラバーダム防湿装置の開発

昭和大学歯学部歯科保存学講座歯内治療学部門*

医療法人松山会 ことぶきわたなべ歯科医院**

株式会社テムザック***

昭和大学歯学部歯科保存学講座歯科理工学部門****

○細田秀剛*、増田宜子*、鈴木重紀**、高林正行*、中山 乾*、石井佑典***、宮崎 隆****

Development of rubber dam isolation using a dental patient robot Showa Hanako 2

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

Kotobukiwatanabe Dental Clinic**

Temuzakku Co., Ltd***

Department of Conservative Dentistry, Division of Oral Biomaterials and Tecnology, Showa University School of Dentistry****

○HOSODA Shugo*, MASUDA Yoshiko*, SUZUKI Shigenori**, TAKABAYASHI Masayuki*, NAKAYAMA Ken*, ISHII Yusuke***、

MIYAZAKI Takashi****

【目的】

ラバーダム防湿時に痛みを伴うことは患者との信頼関係を築く上で大きなデメリットである。今回開発した歯科患者ロボットに取り付けたラバーダム防湿装置は、クランプで歯肉を挟むと痛い出声を出すように開発されたもので、従来用いられていた顎模型と異なり、痛みが発生しているかを知ることができるようになった。これまでの相互実習は学生間で行ってきたが、ほとんどの学生の歯肉の状態は健康的である。しかし、ロボットに取り付けた本装置を使うことで歯周病により歯肉が腫れ上がっている状態なども再現できるため、様々なパターンの歯肉の形態を用いた実習ができ、より臨床に近い口腔内環境に合わせた訓練が可能となる。そこで本研究では根管治療で必須であるラバーダム防湿時に、歯肉をクランプで挟むと痛みを訴えるロボットを開発することを目的とした。

【材料及び方法】

今回の開発は株式会社テムザックの協力の元行い、歯肉にクランプがかかった時に圧力が加わったことを認識する装置を共同開発した。株式会社テムザックと開発したものは既存の感圧センサを筒状にしたものであり、右図1のように電極・絶縁体にとりつけた。感圧センサは押さえる圧力に応じてデリケートに変化する電気抵抗値を利用する技術を活かしたものであり、従来絶縁体とされているゴム素材に導電材を混ぜることによって導電タイプにしたものである。また、この装置をとりつける専用の歯牙模型を右図1のような形状で開発した。

これらを組み合わせて歯肉を挟んだ時に痛みと反応するシステムを開発した。

以下に今回開発した歯科患者ロボットの痛みと発声するまでの仕組みを示す。

まず、ロボット体内より歯根部分に搭載している電極まで微弱な電気が流れる。(まだ電気は導通していない。)歯根部分に搭載している電極の外周には感圧センサを取り付けている。クリップで歯肉を挟むと圧力が感圧センサに伝わる。(図2-①)すると今まで導通していなかった歯根部分の電極が感圧

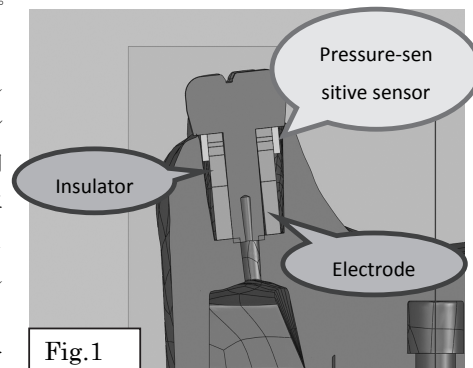
センサを介し導通する。導通することにより歯科患者ロボットが認識し、痛みと反応し発話する。この時、歯科患者ロボット内部の感度調整をする事により、痛みの反応を調節することができる。(図2-②)

【結果】

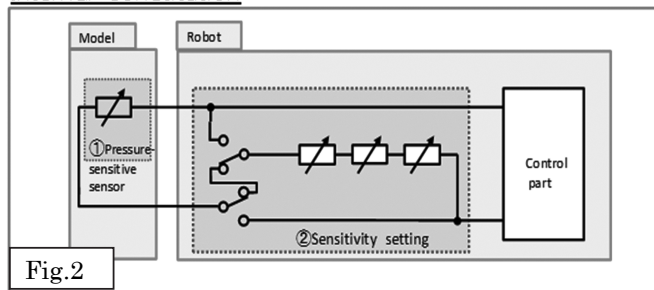
ラバーダム防湿時に歯肉をクランプで挟むと痛みを訴える歯科患者ロボット・歯牙模型を開発することができた。

【結論・考察】

今回開発した歯科患者ロボットを臨床実習の学生実習に用いることで、痛みなくラバーダム防湿をおこなうことの訓練に有効である可能性が示唆された。



Internal constitution



周期変調性の神経電気刺激を用いたオトガイ神経知覚障害への治療効果
京都府立医科大学大学院 医学研究科 歯科口腔科学

○久保恵津子, 山本俊郎, 岸野加奈美, 市岡宏顕, 西垣 勝, 大迫文重, 雨宮 傑, 坂下敦宏, 金村成智

Effect of the mental nerve paresthesia using electrical stimulation with periodic alternating intervals

Department of Dental Medicine,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

○Etsuko Kubo, Toshiro Yamamoto, Kanami Kishino, Hiroaki Ichioka, Masaru Nishigaki,
Fumishige Oseko, Takeshi Amemiya, Nobuhiro Sakashita, Narisato Kanamura

【目的】

歯科治療後に生じるオトガイ神経の知覚障害は、会話や食事などの日常生活に不快感を与え、長期にわたり患者を苦しめることがある。一般的に、理学療法や薬物療法などの非侵襲的な治療や神経節ブロックをはじめとした侵襲的な外科的治療が行われているが、十分に効果が得られないことが少なくない。これまでに我々は、周期変調性の神経電気刺激が神経細胞の細胞活性を増大させ、神経細胞の増殖・分化に関与する成長因子やサイトカインの発現を増大させることを報告している。

そこで今回は、周期変調性の神経電気刺激を用いてオトガイ神経の知覚障害症例に対する治療効果について検討したので報告する。

【方法】

対象は、オトガイ神経支配領域の知覚障害を主訴に本学附属病院歯科を受診した症例とした。方法は、周期変調性の神経電気刺激治療器（フロイデ、テクノリード、京都）を用い、知覚障害部位に対して同治療器のプロローベを3点になるように囲み、週1回、10分間の神経電気刺激とビタミンB₁₂製剤の経口投与を実施した。そして、自覚評価（生活支障度と自覚症状）と他覚評価（圧感受能検査、2点識別閾検査、痛覚検査）で治療効果を判定した。自覚評価は、日常生活における支障の度合い（以下、生活支障度）および自覚症状について visual analogue scale（以下、VAS）を用いて評価、スコア化した。他覚評価は、圧感受能検査（以下、SW 知覚テスト）、静的2点識別閾検査（以下、2PD）と痛覚検査を実施した。SW 知覚テストは、SW 知覚テスターを用い、1定点に対して3回の刺激ないし1回の刺激を実施、被験者が刺激を識別可能となる Fm 値を求めた。2PD は、ディスクリミネータの先端を皮膚に当て、2点を識別できなくなる最小間隔を測定した。痛覚検査は、歯科用探針にて痛覚を認知した場合（0）、認知不可能な場合（4）とした。各検査の測定部位は、口腔顔面神経機能学会「口腔領域感覚異常診査プロトコール」に従い、下唇、口角、オトガイ部2ヶ所の計4ヶ所とし、患側と健側に対して実施した。そして、得られた患側と健側の測定値の差を算出、口腔顔面神経機能学会の規定に従い、スコア化した。得られたスコアは、各月毎に平均値を算出、他覚的なスコアとし、一元配置分散分析で統計処理を行った。

なお本研究は、本学医学倫理審査委員会での許可のもとに実施された（RBMR-C-1006-1）。

【結果】

症例は、10歳代後半から80歳代前半の男性5症例と女性12症例であった。その内訳は、顎骨腫瘍摘出術後3症例、顎骨嚢胞摘出術後4症例、抜歯手術後6症例、インプラント埋入術後3症例、顎骨骨折整復固定術後1症例であった。神経電気刺激は、初診時から開始36ヶ月まで実施、生活支障度および自覚症状が、初診時と比べて開始4ヶ月後までの各月ならびに初診時から開始4ヶ月後の前後月間において有意な平均VASの低下を示した。なお、他覚評価の平均スコアは、初診時と比べて減少傾向を示したが、有意差を認めなかった。

【考察】

これまでに、周期変調性の神経電気刺激は、神経細胞の再生を促すことを報告している。この神経電気刺激をオトガイ神経支配領域に生じた知覚障害に応用したところ、自覚的な症状が改善した。そして、年齢に関わらず、臨床症状の増悪や再燃は認めなかった。なお、今回の対象症例は臨床症状から推察すると、神経の損傷程度が一過性局在性伝導障害あるいは軸索離断であると考えられた。今後、さらなる症例を積み重ね、本治療の効果について検討を加える必要がある。

以上から、周期変調性の神経電気刺激は、オトガイ神経の知覚障害に対して有用であると考えられた。

局所麻酔が自律神経活動に及ぼす影響 —健全な若年成人と高齢患者の比較—

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

○下地伸司、小田中 瞳、竹生寛恵、大島理紗、菅谷 勉、川浪雅光

Influence of local anesthesia on autonomic nervous activity: Comparison between healthy young adults and elderly patients

Department of periodontology and endodontology, Division of oral health science,
Hokkaido university graduate school of dental medicine

○Shinji Shimoji, Hitomi Odanaka, Hiroe Takefu, Risa Oshima, Tsutomu Sugaya and Masamitsu Kawanami

【目的】日本は超高齢社会を迎え、高齢者に対する歯科治療の必要性は増加している。高齢者の多くは、全身的基礎疾患を有しており、それらの患者に対して安心・安全な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。

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自律神経活動を評価する方法は、全身状態の瞬間的な変化をリアルタイムかつ精度良く捉えることができるため、我々は歯科治療の影響を解明するための自律神経活動モニターシステムを開発した。これを使ってこれまでに健全な若年成人にスケーリングや局所麻酔を行った際には、歯科治療中よりも、治療開始前にストレスを感じている可能性があることを示した (日本歯科保存学会学術大会 2014 春季、秋季)。本研究では高齢患者に対して歯科治療の中で偶発症の発生頻度が最も高い局所麻酔を行った際の自律神経活動に及ぼす影響について健全な若年成人と比較して検討を行った。

【対象と方法】

被験者は北海道大学病院歯科診療センターに通院中の 60 歳以上の高齢患者 10 名 (年齢: 63.5 ± 1.7 歳、性別: 男性 4 名、女性 6 名) と北海道大学病院所属の健全な若年成人ボランティア (全身的基礎疾患を有しない 20 歳代の歯科研修医) 10 名 (年齢 26.8 ± 1.6 歳、性別: 男性 5 名、女性 5 名) とした。本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会 (承認番号自 012-0212) の承認を受けて行い、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、同意の下で行った。デンタルユニットに着席後、麻酔前の仰臥位安静時 (3 分間)、仰臥位で歯科用キシロカインカートリッジを用いた局所麻酔時 (2 分間) および麻酔後の仰臥位安静時 (3 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 (交感神経活動の指標となる LF/HF) 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 分間隔、心拍数および自律神経活動は連続的にを行い、行為ごとのそれぞれの平均値および標準誤差を算出して変動特性について検討を行った。群間の比較には Mann-Whitney U 検定を行った ($p < 0.05$)。

【結果】血圧および心拍数は測定期間を通して大きな変化は認められなかった。

行為ごとの自律神経活動の変化: LF/HF の平均値は高齢患者の麻酔前で 3.44 ± 0.52 、局所麻酔時で 7.94 ± 2.23 、麻酔後で 5.37 ± 2.00 だった。若年成人の麻酔前で 2.46 ± 0.52 、局所麻酔時で 1.38 ± 0.25 、麻酔後で 1.72 ± 0.27 だった。LF/HF は若年成人では麻酔開始前に最も高い値を示したのに対して高齢患者では局所麻酔時に最も高い値を示した。また、若年成人に比べて高齢患者では局所麻酔時および麻酔後に有意に高い値を示した。

【考察】交感神経活動の指標となる LF/HF は、若年成人では局所麻酔時よりも麻酔開始前に高い値を示したのに対して高齢患者では局所麻酔時に最も高い値を示して、その後も下降はしたが開始前よりも高い値を示した。このことから高齢患者では局所麻酔時の侵害刺激や局所麻酔薬に含まれるエピネフリンが全身状態に影響を及ぼしている可能性が示唆される。また、測定期間を通して若年成人よりも高齢患者の方が高い値を示した。一般的に LF/HF は加齢に従って低下すると考えられているため、全ての行為中にストレスを感じていたかもしれない。本研究はサンプル数が少ないため、今後は症例を蓄積しながら全身的基礎疾患や歯科治療に対する恐怖心などの要因が及ぼす影響についても検討を行う必要がある。

【結論】健全な若年成人に比べて、高齢患者は局所麻酔時およびその後に関交神経活動が上昇する。

難治性疼痛の発症と維持における血小板活性化因子(PAF)合成酵素 LPCAT2 の役割

1) 広島大学大学院医歯薬保健学研究院歯髄生物学, 2) 広島文化学園大学大学院看護学研究科薬理学, 3) 武庫川女子大学薬学部, 4) 日本薬科大学薬物治療学

○ 本山 直世 1), 森田 克也 2), 北山 友也 3), 柴 秀樹 1), 土肥 敏博 4)

Role of the novel Platelet-Activating factor (PAF) synthetase LPCAT2 on chronic pain in mouse models

1) Dept. Bio. Endo., Hiroshima Univ. Inst. Biomed. & Health Sci., 2) Dept. Pharmacol., Hiroshima Bunka Gakuen Univ., 3) Dept. Pharmacol., Mukogawa Women's Univ., 4) Dept. Clinical Pharmacol., Nihon Pharmaceutical Univ.
○ Naoyo Motoyama1), Katsuya Morita2), Tomoya Kitayama3), Hideki Shiba1), Toshihiro Dohi4)

【緒言】

従来の NSAIDs をはじめとする鎮痛薬が奏功しない難治性疼痛に対して、新しい治療法・治療薬の開発が期待されている。血小板活性化因子(PAF)は、種々の組織で細胞外からの刺激に応答してアラキドン酸と同時に産生され、炎症・免疫系細胞の活性化や気管支収縮作用など多彩な生理・病態生理に関係するオートコイドとして注目されている。私達は、PAF が脊髄で痛みシグナル伝達の調節に重要な役割を果たしており、PAF 受容体-MAP kinase 系を介して、グルタミン酸遊離を惹起し、下流の NO/G-cyclase/PKG カスケードにより、脊髄抑制性グリシン受容体(GlyR) $\alpha 3$ 機能を抑制して、痛覚過敏と強力なアロディニアを引き起こすこと(Pain138(3):525-36,2008)、さらに、PAF 受容体阻害薬が神経障害性疼痛やがん性疼痛、炎症性疼痛等原因の異なる様々な疼痛モデルで強力かつ長期間持続性の鎮痛効果を示すことを報告した(Eur J Pain 17:1156-67, 2013; PLoSOne 9(3):e91746, 2014)。近年、PAF 合成酵素(LPCAT)1 および 2 がクローニングされた。LPCAT1 は恒常的に発現して PAF の生理機能に関係しており、LPCAT2 は誘導型酵素で病態生理に機能する(Shindo et al., J Biol Chem, 2007)。PAF は免疫担当細胞やグリア細胞を活性化し、これらの細胞では LPCAT2 が活性化されて PAF を産生遊離するという positive feedback loop が存在することも知られている。従って、LPCAT2 阻害薬が難治性疼痛の新規治療薬となる可能性が考えられる。しかしながら、LPCAT2 の特異的阻害薬はまだ発見されていない。本研究では、難治性疼痛の新規治療薬・治療法開発のシーズ創出を目的とし、難治性疼痛の発症と維持における脊髄 LPCATs の役割を検討した。

【方法】

ddY 系雄性マウスおよび C3H/HeN マウスを用い、実験的に各種疼痛モデルを作成した。脊髄 LPCAT1 および LPCAT2 の役割を調べるために、siRNA を脊髄腔内に投与し、ノックダウンさせた。疼痛関連反応の評価は、ペイントブラシによる軽い触覚刺激によるアロディニアスコアと von Frey hairs フィラメントによる足趾刺激に対するマウス後足の逃避反射閾値によって行った。がん性疼痛はアロディニアスコアおよびアロディニア閾値、Guarding behavior (安静時に患肢を持ち上げる行動)、および Limb-use abnormality (体動時に患肢を不自然に使う行動)によって評価した。

【結果および考察】

神経障害性疼痛モデル、がん性疼痛モデルにおいて LPCAT2 の持続した発現量の増加を認め、一方 LPCAT1 発現は変動しなかった。神経障害性疼痛モデルにおいて、脊髄 LPCAT2 ノックダウンは強力な鎮痛作用を示し、観察期間(90 日間以上)を通して疼痛関連行動の消失を認めた。LPCAT1 ノックダウンは鎮痛効果が弱く、一過性であった。更に PAF 阻害薬(TCV-309 および WEB 2086)の 5 日間連続頻回投与によっても疼痛関連行動が消失した。慢性炎症性疼痛モデル、がん性疼痛モデル、抗がん剤誘発神経障害に伴う疼痛モデルにおいても同様の鎮痛効果を見出した。これらのモデルにおいて、疼痛関連行動の消失後に再度モデル作製刺激を与えることによって、痛み行動が再燃した。加えて、脊髄 LPCAT2 を予めノックダウンしたマウスに各種疼痛モデルを作成しても痛み関連行動の発現はみられず、先行除痛のための重要な薬物となる可能性が示された。

以上のことから、各種難治性疼痛の発症・維持に脊髄 LPCAT2 の発現が重要な役割を果たすことが示唆された。LPCAT2 特異的拮抗薬が神経障害性疼痛、抗がん剤誘発性疼痛、がん性疼痛および炎症性疼痛といった様々な疼痛に対して有効な新規鎮痛薬・治療法開発のシーズとなる可能性を明らかにした。

税務署職員における口腔衛生指導(航空自衛隊隊員との比較) 第2報

奥羽大学歯学部口腔衛生学講座¹⁾、歯科保存学講座²⁾
○車田文雄¹⁾、長岡正博¹⁾、廣瀬公治¹⁾、齋藤高弘¹⁾、佐藤穂子²⁾、佐々木重夫²⁾、木村裕一²⁾

Oral hygiene guidance for Tax office staff (compared with JASDF staff) II

Dept. Preventive Dentistry and Conservative Dentistry OHU University School of Dentistry
○Fumio KURUMADA, Masahiro NAGAOKA, Kimiharu HIROSE, Takahiro SAITOH, Yasuko SATOH,
Shigeo SASAKI, Yuichi KIMURA

【 緒 言 】

先の第141回本学会を含め、一昨昨年から当学会にて、一連の部隊口腔衛生について発表してきた。そこで前回、職場における集団口腔健康管理の目的で、航空自衛隊第27警戒群大滝根山分屯基地の隊員等の対照群として、同じ国家公務員で勤務定時制である国税局職員の齶蝕活動性を調べる機会を得たので、その結果を発表した。そして前回、そのデータを基に各々の齶蝕活動性試験の相関傾向を発表した。そこで今回、歯周病活動試験を実施し、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 】

<口腔衛生指導アンケートより>

今回は「歯周病(歯槽膿漏症)の活動試験」を予定していますが、興味が有りますか。

(はい): 100% (いいえ): 0%

と、回答した対象者は前回同様、上記職員の男女24名である。

歯周局所において、現時点における疾患活動性ないし疾患進行性を評価するために、特異的細菌とその産生物、局所組織(上皮、結合組織、歯槽骨、細胞間基質)に由来した組織傷害産生物を測定対象として、歯垢、歯肉溝浸出液、唾液および血液等を献体に分析されている。そこで今回、下記の歯周疾患活動性検査を行った。

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

- ① 飲食または歯磨き後2時間以上経過後、検体を採取
 - ② 反応試験紙下端の試料添加部を測定試料に浸漬
 - ③ 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化部を観察し、判定見本と比較判定
- (-) 陰性: 0 μg/mL (±) 擬陽性: 2 μg/mL (+) 陽性: 5 μg/mL

歯頸部にプラークが付着した状態が続くと、2~4日以内に急性炎症反応として典型的な血管の変化が生じ、病理組織学的に開始期病変が出現する。臨床的徴候としては、歯肉出血傾向や歯肉溝浸出液の増加が認められる。従って、唾液中の潜血性出血の検出は、歯肉部病変の早期発見マーカーとして利用できると考えられる。

無色 or 薄赤紫色(-): 8名 (33.3%)、赤紫色(±): 4名 (16.7%)、濃赤紫色(+): 12名 (50.0%)

- ・20歳~30歳未満: 8名 (-): 6名 (±): 1名 (+): 1名 (33.3%)
- ・30歳~40歳未満: 3名 (-): 1名 (±): 1名 (+): 1名 (12.5%)
- ・40歳以上: 13名 (-): 1名 (±): 2名 (+): 10名 (54.2%)

【 考察および結論 】

1. 年代別が上がるにつれ、陽性の者が増加傾向(12.5%→76.9%)にあり、陰性の者はその逆傾向(75.0%←7.7%)を示したことから、若い世代ほど被験者のブラッシングの励行がうかがわれた。
2. 陽性の被験者に対しては、更なる口腔衛生指導(食後の歯磨き確認・ブラッシング指導等)の必要性があると考ええる。また陽性者のうち、特に20代の男性職員が(+)であったことから、「食生活と歯磨きを精査すること」が重要と考える。