

## 象牙質 / 幹細胞ハイブリッド骨補填材の機能評価

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

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

### Evaluation of dentin / stem cell hybrid materials as a bone substitute

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

○Okuno Kumio<sup>1)</sup> Kawaki Harumi<sup>2)</sup> Tanaka Masashi<sup>1)</sup> Oguri Kensaku<sup>1)</sup> Mori Haruna<sup>1)</sup>  
Kawano Satoshi<sup>1)</sup> Kondoh Nobuo<sup>2)</sup> Yoshida Takakazu<sup>1)</sup>

#### 【研究目的】

歯周病や根尖病変、あるいは腫瘍による骨欠損、加齢による骨量減少などの問題が高齢化により増加している。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も増えてきている。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)、 $\beta$ -リン酸三カルシウム (以下 $\beta$ -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、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。今回はこれら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埋植後3~6週間の動態について検討した。

#### 【材料および方法】

象牙質顆粒作製のため、抜去歯は患者の同意のもと、朝日大学歯学部倫理委員会の承認 (第 23111 号) を得て採取し、抜歯直後に $-80^{\circ}\text{C}$ 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、整粒した後オートクレーブ滅菌した。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) の左側背部皮下に骨補填材を埋植 (20 mg/匹) し、3週間後および6週間後に摘出して通法に従い樹脂包埋切片、パラフィン包埋切片を作製し、組織化学的検討を行った。

#### 【結果】

埋植後3週間では、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、いずれの幹細胞を用いた場合でも、骨補填材顆粒間に線維性コラーゲンに富む骨芽細胞マーカー陽性細胞の豊富な組織が形成されており、特に象牙質顆粒・幹細胞凝集複合体埋植群で顕著に観察された。埋植後6週間では象牙質およびオスフェリオン埋植群で顆粒周囲に硬組織様組織が形成されており、幹細胞との凝集複合体埋植群で硬組織様組織が形成が顕著であった。

#### 【結論および考察】

象牙質・幹細胞凝集複合体埋植群が象牙質のみを埋植した群と比較して硬組織様の組織誘導に優れていたことから、象牙質顆粒は、複合体の作製に用いた2種の幹細胞の足場として適しており、抜去歯の骨再生療法への活用が有望であることが示唆された。そして、象牙質と体性幹細胞を自家移植が可能な骨補填材料として利用した象牙質 / 幹細胞ハイブリッド骨補填材の有用性が示された。

## 同種移植による抜髄後歯髄再生治療法の開発

<sup>1)</sup>国立長寿医療研究センター 幹細胞再生医療研究部 再生歯科医療研究室

<sup>2)</sup>愛知学院大学歯学部歯内治療学講座

○庵原 耕一郎<sup>1)</sup>, 藤田 将典<sup>1,2)</sup>, 村上 真史<sup>1)</sup>, 中島 美砂子<sup>1)</sup>

Pulp Regeneration by Transplantation of Allogenic Pulp Stem Cells

<sup>1)</sup>Laboratory of Dental Regenerative Medicine, Department of Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, Obu, Japan

<sup>2)</sup>Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○Koichiro Iohara<sup>1)</sup>, Masanori Fujita<sup>1,2)</sup>, Masashi Murakami<sup>1)</sup>, Misako Nakashima<sup>1)</sup>

### 【目的】

私どもは歯髄幹細胞を抜髄根管に自家移植する歯髄再生治療法の臨床研究を行い、安全性および、電気診、MRI にて有効性を確認した。一方、自家移植は、移植に十分な細胞の培養に時間がかかる。このため安全性をあらかじめ確保して保存している細胞を同種移植の方が効率的、経済的であると考えられる。実際に脳梗塞等においては、同種移植の臨床研究・治験が進められている。ただし、造血幹細胞移植などで同種移植を行う際は、免疫応答が生じるため、移植時に移植組織の HLA を合わせ、免疫抑制剤を使用する必要がある。しかし、間葉系幹細胞を移植する際には免疫反応がほとんど起こらないという報告がある。そこで今回、イヌのハプロタイプ解析後、歯髄幹細胞を抜髄根管内にハプロタイプ一致、不一致の 2 通りの同種移植を免疫抑制剤を用いずに行い、安全性・有効性を確認した。また、同じ細胞の複数回移植を行い同様に安全性・有効性を検討した。

### 【材料および方法】

#### 1. イヌ膜分取歯髄幹細胞の分取

イヌの抜去歯から歯髄を採取した後、歯髄幹細胞を分取し、7 代目まで増幅・凍結保存した。

#### 2. ハプロタイプ解析

イヌの血液よりハプロタイプの解析を行った。

#### 3. 抜髄後根管同種移植の安全性・有効性評価

イヌ上下顎前歯部に、ハプロタイプ一致 7 匹、ハプロタイプ不一致 7 匹で抜髄処置後、歯髄幹細胞を同種移植した。安全性試験として、一般状態、体重、摂餌量、尿検査、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量及び剖検を行った。また、有効性試験として 3 ヶ月後に標本を採取し、H-E 染色、マッソン・トリクロム染色、PGP9.5、BS-1 lectin の免疫染色を行い、歯髄組織再生を評価した。また先に移植したものと同一細胞を別の歯に移植し、3 ヶ月後に同様の解析を行った。

### 【結果】

歯髄幹細胞を同種移植してもハプロタイプが一致、不一致ともに安全性に問題がなかった。また、複数回移植をしても同様に安全性に異常はみられなかった。移植後 3 ヶ月目においてハプロタイプが一致、不一致共に、血管新生、神経侵入を伴う歯髄の再生が確認でき、それぞれ再生量に差はみられなかった。また、一度移植したイヌに複数回移植した場合においても歯髄が再生されることが確認でき、炎症所見も特にみられなかった。

### 【結論】

これらの結果より、同種移植による歯髄再生治療の安全性、有効性が示唆された。

## 根分岐部病変を伴う歯内-歯周疾患 I 型病変の一症例

福岡歯科大学口腔治療学講座 歯科保存学分野

○松崎 英津子, 二階堂 美咲, 中山 英明, 松本 典祥, 畠山 純子, 水上 正彦, 佐々木 由梨,  
松本 和磨, 池崎 綾香, 稲永 晃子, 西崎 竜司, 赤尾 瑛一, 春名 千英子, 中牟田 博敬,  
泉 利雄, 阿南 壽

### Endodontic-Periodontal Disease with Bifurcation Involvement: A Case Report

Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College  
○MATSUZAKI Etsuko, NIKAIIDO Misaki, NAKAYAMA Hideaki, MATSUMOTO Noriyoshi, HATAKEYAMA Junko,  
MINAKAMI Masahiko, SASAKI Yuri, MATSUMOTO Kazuma, IKEZAKI Ayaka, INANAGA Akiko,  
NISHIZAKI Ryuji, AKAO Eiichi, HARUNA Chieko, NAKAMUTA Hiroyoshi, IZUMI Toshio, ANAN Hisashi

#### 【緒言】

根分岐部病変を伴う歯内-歯周疾患は日常の臨床で比較的良好に遭遇する疾患である。本疾患は歯内領域および歯周領域の多様な原因で発症することもあり、診断を誤ると原因因子が長期に残存するため、炎症は遷延し良好な予後を得ることが困難になる場合がある。今回、心的状態が不安定で歯科治療に対して極度の不安感を訴えるうつ病患者の根分岐部病変を伴う歯内-歯周疾患に遭遇し、根管内嫌気性菌培養試験を併用した感染根管治療を施すことにより、破壊された根分岐部の骨組織は良好な治癒を示したため、その症例と治療経過について報告する。

#### 【症例】

患者:37歳、女性。主訴:下顎右側第2大臼歯の咬合痛および歯肉腫脹。全身既往歴:うつ病、不眠症。現病歴:2008年10月初旬、47に強い咬合痛を感じたため、近医を受診した。その際、47の根尖病変を指摘され、痛いときは処置できないという説明を受けた。そのため、他院を受診したが、根管治療は時間がかかるという説明を受け、特に処置は施されなかった。また、抗生物質等の処方も受けなかった。その後、痛みはやや減少した。2009年1月21日、前医を受診した際に、47の歯肉腫脹を指摘され、切開・排膿処置を受けた。その際に、47の分割あるいは抜歯の提案を受けたが、怖くなったため同年2月21日、47の精査および加療を希望し、福岡歯科大学医科歯科総合病院を受診した。また、患者は口臭に対する悩みが深く、毎日長時間のブラッシングを行っている。臨床所見:47は自発痛(-)、打診痛(+)、頬側歯肉腫脹(+)、動揺(-)、根尖部圧痛(+)、瘻孔(-)であった。また、頬側中央部にのみ6mmの歯周ポケットを認めた。根分岐部にはファーケーションプローブがわずかに挿入でき、1度の根分岐部病変(Lindheの分類)を認めた。他に4mm以上の歯周ポケットを有する歯は8歯、BOP陽性の歯は11歯であり、すべての歯に動揺は認められなかった。

#### 【治療】

信頼関係の構築を目的として、口腔内清掃指導およびスケーリング処置から治療を開始するとともに、心療内科での治療も開始された。心的状態の改善は認められたが、根管内の細菌感染に強い不安感を訴えていたため、47には、根管内嫌気性菌培養試験を併用した感染根管治療を施した。初回培養試験時、根管内からは多数の嫌気性菌のコロニーが観察された。数回の根管治療後に歯周ポケットは3mm以下となり、ファーケーションプローブを挿入することはできず、付着の回復が窺われた。また、臨床症状は認められず、根管からの細菌のコロニーもほとんど観察されなくなった。初診から約3ヶ月後、デンタリス KEZ® (ネオ製薬工業) およびガッタパーチャポイントによる側方加圧根管充填が施された。根管充填8ヶ月後、47に臨床症状はなく、エックス線上で歯根周囲の透過像の消失および骨組織の著明な回復が認められたため、臨床的に経過良好と判断し全部鑄造冠を装着した。現在まで臨床症状の再発はなく、良好に経過している。

#### 【考察および結論】

患歯は良好な治癒経過を辿っていることより、歯内-歯周疾患の治療において、的確な検査および診断の重要性が示唆された。また、心的状態が不安定な患者のQOLの向上に歯科的貢献を果たすことができたものと考えられた。

## 愛知学院大学歯学部附属病院歯内治療科の初診紹介患者に関する実態調査

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座

○久保田 真衣、平野 文菜、江場 久哲、稲本 京子、中田 和彦

Survey on new patients referred to the endodontic clinic of  
Aichi Gakuin University Dental Hospital  
Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○Mai Kubota, Fumina Hirano, Hisanori Eba, Kyoko Inamoto, Kazuhiko Nakata

### 【研究目的】

愛知学院大学歯学部附属病院は、臨床歯科医学の教育研究機関であるとともに、安心、安全な歯科医療を提供する総合医療機関として、東海地方で中心的役割を果たしている。そのため、外部の医療機関から専門的な診査や診断、あるいは治療の依頼も多く、歯内治療科にも多数の患者が紹介により来院している。その数は年々増加傾向にあり、スムーズな受け入れ体制の構築や地域医療機関との緊密な病診連携の推進は喫緊の課題となっている。また近年、患者の歯の健康に対する意識向上とともに高度で質の高い歯科医療に対する需要も高まっており、大学病院の歯内治療科としての役割をより明確にしていく必要がある。そこで本研究では、他の歯科医院から本学歯学部附属病院歯内治療科宛ての紹介状を持参して来院した初診患者を対象に、医療情報を調査し、その傾向を分析した。

### 【対象および方法】

2014年4月から9月までの6ヶ月間で、愛知学院大学歯学部附属病院歯内治療科宛ての紹介状を持参し、本院総合初診科に来院した患者231名(170歯科医院)を対象とした。基本情報(性別、年代、患者居住地と紹介元歯科医院所在地)、紹介目的、依頼部位、臨床症状、診断名、紹介元で根管処置が困難とされた要因、本院での処置方針、方針決定後の患者動向について調査を行い、紹介元からの情報と本院で得られたデータを比較検討した。

### 【結果】

男女比は、男性29%、女性71%であった。年齢構成は、30歳代が25%と最多で、次いで50歳代が20%であった。患者居住地、紹介元所在地ともに97%が愛知県内、さらに約半数は名古屋市内であった。紹介目的は、93%が治療依頼であり、次に精査依頼が6%、そして不明が1%であった。依頼部位は、上下顎第一および第二大臼歯が全体の58.4%を占めていた。臨床症状に関しては、紹介状の21%に症状自体の記載がなかった。「疼痛」が、紹介元、本院ともに最も多く認められた臨床症状であったが、「疼痛がある」と記載された紹介状のうち37%は、疼痛の性状については具体的な記述がなかった。診断名は、紹介元、本院ともに「根尖性歯周炎」が最も多かったが、診断名の記載がない紹介状が23%認められた。紹介元と本院で、診断の相違が紹介患者全体の26.5%に認められ、そのうち診断名の相違が62.5%、部位の相違が37.5%であった。紹介元で根管処置が困難となる要因があると診断された症例は、全体の35.5%であった。その要因として、歯根破折、根管異物(器具破折)、穿孔、根管閉鎖等が記載されていたが、実際に明確な原因が認められたのはそのうちの49%であった。歯内治療科で診断後の処置方針としては、「感染根管処置」が61%、「拔牙」が13%で、その他に、経過観察(9%)、抜髄処置(8%)、齶蝕処置(4%)、処置不要(2%)、その他(3%)であった。診断後の患者動向として、本院での処置希望が72%(当科での処置:61%、口腔外科への依頼:8%、その他:3%)で、紹介元で治療継続が24%、紹介元以外での処置が2%、その他(経過観察等)が2%であった。

### 【考察および結論】

今回の調査から、本院歯内治療科に期待されている主な役割は、マイクロスコープや歯科用コンビームCT等の特殊機器を必要に応じて適用した難症例への対応、ならびに精査と確定診断であることが確かめられた。しかし、そのために要する労力と時間などを考慮すると、現行の体制のままでは今後のニーズに十分対応できなくなると推測される。また、初診紹介患者の多くが診断後に当科での処置を希望した理由は、十分な説明とラバーダム防湿をはじめとする基本に則った歯内治療に納得したためと考えられる。したがって、当科での診療経過と結果の情報を紹介元歯科医院に確実にフィードバックし、基本原則を遵守した歯内治療の重要性を改めて啓蒙していく必要がある。そして、今後大学病院の歯内治療科として、社会から求められる歯内治療(歯髄保存と根管処置)を確実に提供し続けるために、円滑な対応ができるような新たなシステムづくりが急務である。

## 福岡歯科大学歯内治療学基礎実習で使用した天然歯に類似した 歯髓腔を有する新型人工歯の評価

福岡歯科大学口腔治療学講座歯科保存学分野

○二階堂 美咲, 泉 利雄, 佐々木 由梨, 松本 和磨, 池崎 綾香, 稲永 晃子, 中山 英明,  
西崎 竜司, 赤尾 瑛一, 水上 正彦, 畠山 純子, 松本 典祥, 春名 千英子, 松崎 英津子,  
中牟田 博敬, 阿南 壽

### Evaluation of new artificial teeth containing pulp cavity similar to the natural teeth in endodontic basics training at Fukuoka Dental College

Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College

○NIKAIDO Misaki, IZUMI Toshio, SASAKI Yuri, MATSUMOTO Kazuma, IKEZAKI Ayaka, INANAGA Akiko,  
NAKAYAMA Hideaki, NISHIZAKI Ryuji, AKAO Eiichi, MINAKAMI Masahiko, HATAKEYAMA Junko,  
MATSUMOTO Noriyoshi, HARUNA Chieko, MATSUZAKI Etsuko, NAKAMUTA Hiroyoshi, ANAN Hisashi

#### 【研究目的】

歯内治療学基礎実習は、歯髓に対する検査、診断、治療計画の立案・治療といった一連の基本的な技能を習得することを目的としており、卒前臨床実習および卒後臨床研修の基盤となる重要な過程である。そこで、昨年度まで実習で用いていた人工歯の問題点として示された直線的な根管を改良するとともに、よりリアルな抜髄時の感覚の取得を目的として、新規に人工歯を作製した。今回、4年次の歯内治療学実習に新しい人工歯を導入し、最終日に学生へのアンケート調査を行ったので報告する。

#### 【方法】

平成27年度4年次学生97名を対象とした。抜髄法、根管充填法の基礎実習を新たな人工歯を用いて行い、実習最終日に無記名のアンケート調査を行った。

#### 【材料】

ニッシン社製人工歯（歯髓腔に着色剤含有） A-END3B001 #11 #14 #16 #45

#### 【成績】

アンケートの概要を以下に示す。

- ・「削ってみてどうでしたか。」「透明根管で実際根管の走行を見ることができましたが実習はどうでしたか。」の設問に対しては、概ねやりやすかったとの回答を得た。
- ・抜髄時に良かった点については、天蓋除去の体験ができた 27%、本物の出血みたいだった 15%、根管が見えてよかった 34%、根管の拡大がしやすかった 10%、模型に付けて実際の治療みたいに行えた 14%であった。
- ・抜髄時に悪かった点については、人工歯の破損 6%、削片の根管への圧入 56%、根尖からの着色剤の漏出 22%、根管形成の難易度 12%であった。

#### 【考察】

新規の人工歯を用いた基礎実習を行うことにより、学生からは「根管の構造を見ながら体験できてよかった」、「出血が本物みたいだった」など、概ね良好との回答を得た。一方、「詰まりやすい」、「硬い」、「模型から人工歯がファイリング中に外れる」、「着色剤が根尖から外に出る」など多くの問題点も指摘された。今回の指摘を基にして、さらなる改良の必要性が考えられた。

#### 【結論】

4年次の歯内治療学実習に新しい人工歯を導入し、最終日に学生へのアンケート調査を行うことにより、歯髓腔を有する新型人工歯の抜髄及び根管充填の実習における有用性が示唆された。

## 20度湾曲根管を付与した根管壁着色透明模型の実習応用評価 — 手用 K ファイルと NiTi ロータリーファイルでの拡大形成 —

- 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、3) 日本歯科大学新潟病院 総合診療科  
○北島佳代子<sup>1,2)</sup>、新井恭子<sup>1,2)</sup>、飯野華絵<sup>2)</sup>、横須賀孝史<sup>3)</sup>、佐藤友則<sup>3)</sup>、松田浩一郎<sup>3)</sup>、  
北野芳枝<sup>1)</sup>、朝比奈壮郎<sup>1)</sup>、反町香子<sup>1)</sup>、三好敏朗<sup>1)</sup>、五十嵐 勝<sup>1,2)</sup>

Application of a transparent plastic model with 20 degree curved canal and dyed root canal wall for  
preclinical endodontic training -Canal preparation using hand files and NiTi rotary files-

- 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, 3) Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital  
○KITAJIMA Kayoko<sup>1,2)</sup>, ARAI Kyoko<sup>1,2)</sup>, IINO Hanae<sup>2)</sup>, YOKOSUKA Takashi<sup>3)</sup>, SATOH Tomonori<sup>3)</sup>,  
MATSUDA Koichiro<sup>3)</sup>, KITANO Yoshie<sup>1)</sup>, ASAHINA Takeo<sup>1)</sup>, SORIMACHI Kyoko<sup>1)</sup>, MIYOSHI Toshiro<sup>1)</sup>  
and IGARASHI Masaru<sup>1)</sup>

【目的】 本学の臨床前歯内療法学基礎実習では、根管拡大形成実習をステンレススチール製手用 K ファイル (SSK) で学んだ後、最後に湾曲の強い透明根管模型を用いたニッケルチタン製ロータリーファイル (NiTi) 実習を平成 20 年度から実施している。教員がその実習を評価する際、拡大前後に撮影した画像を重ねて判定するが、時間と労力を必要とし、実習直後の学生自己評価やフィードバックができないという問題がある。そこで、根管壁表層を着色した透明根管模型を開発し、模型の概要を第 140 回、第 141 回本学会で報告した。今回われわれは、SSK と NiTi で拡大形成した模型を分析し、実習応用評価について検討したので報告する。

【材料と方法】 対象は、本学部平成 26 年度第 4 学年学生 55 名である。根管模型は、下顎第一小臼歯の歯冠の付いたエポキシレジン製の四角柱 (10×10×13mm) で、02 テーパーの 20 度 J 字型湾曲根管が付与されている (ホクシンエレクトロニクス)。根管断面は円形で、根管壁が厚さ 0.1mm の着色樹脂でできており、根管長は 21.0mm、根尖孔径は 0.15mm で底面に開口している。根管を #10 SSK (25mm, GC) で穿通し、作業長を設定した後、まず SSK を用いて 30 分間の拡大形成を行った。拡大形成法は、プレカーブを付与した器具でファイリング主体に行い、任意の号数まで拡大した。次に、NiTi ロータリーファイルでの拡大では、WaveOne® Primary (25mm、先端直径 #025/テーパー .08、DENTSPLY) を用い、X-SMART™ PULS (DENTSPLY) に装着し、手順に従い拡大を行った。学生は拡大形成後に自己評価を行い、偶発事故の有無等を記録した。実習終了後に模型を回収し、頬舌近遠心の 4 方向から撮影した画像で評価した。本研究は倫理審査を受け、被験者の個人情報保護の下で実施された。

【結果ならびに考察】 SSK での最終拡大号数は、#15 が 5 名、#20 が 9 名、#25 が 32 名、#30 が 4 名、#35 が 5 名であった。step 形成や根管からの逸脱がない良好例は、最終拡大号数 #15 と #20 で 2 例、#25 で 6 例、#30 で 1 例であった。step 形成は 15 例、根管からの逸脱は 30 例、zip 形成は 11 例であった。#35 の 5 例では、湾曲中央部での根管からの逸脱が 2 例、zip 形成が 3 例みられた。根管の着色残存は、湾曲部全体や根管中央部の他、step や逸脱部から根尖側の未処理の根管や zip 形成の根尖内湾側にみられた。SSK では根管がストレート化し、湾曲開始部の歯冠側では根管湾曲の反対壁、湾曲開始部では内湾壁、根尖部では外湾部の着色が消失していた。全体的には、.02 テーパーの SSK で最終拡大号数が細い場合には、拡大不足となりやすく、また手用ファイルの材質上、湾曲根管の拡大では、step や zip を形成し、逸脱しやすかった。一方 NiTi では、湾曲中央部と根尖部での step 形成が各 1 例、根尖部での根管からの逸脱例が 4 例、zip 形成が 3 例であった。根管の着色残存は、根尖部のみが 34 例、湾曲開始部の根尖側半のみが 17 例、湾曲部全体が 4 例で、湾曲開始部から歯冠側の残存例はなかった。模型根尖部の着色層の幅は、根管径 0.15mm に両側壁着色層 0.2mm を加えた約 0.35mm であるため、25 号相当の NiTi で拡大した場合、根尖部の着色が残存しても拡大が不十分ではなく、過不足のない均等な拡大形成が行われたことを意味し、NiTi 形成が湾曲根管に適していることを示している。

【結論】 本根管模型は、根管拡大形成部位が容易に観察でき、拡大成功の可否や偶発事故等を確認しやすく、学生自己評価にも効果的であり、歯内療法学基礎実習への応用に有効であることが示された。

## マイクロ CT を用いた側方加圧根管充填修得の教育効果の評価について

昭和大学歯学部・歯科保存学講座・歯内治療学部門<sup>1</sup>・歯科理工学部門<sup>2</sup>・歯科薬理学講座<sup>3</sup>

○増田 宜子<sup>1</sup>、坂井 信裕<sup>2</sup>、荻野 玲奈<sup>3</sup>、馬場 聖<sup>1</sup>、宮崎 隆<sup>3</sup>

### Evaluation of educational effects of root canal obturation by lateral condensation using micro-computed tomography in dental students.

Showa University, School of Dentistry, Dept. of Conservative Dentistry, Division of Endodontology<sup>1</sup>, Division of Oral Biomaterials and Technology<sup>3</sup>, Dept. of Pharmacology<sup>2</sup>

○Yoshiko MASUDA<sup>1</sup>, Nobuhiro SAKAI<sup>2</sup>, Reina OGINO<sup>3</sup>, Satoru BABA<sup>1</sup>, Takashi MIYAZAKI<sup>3</sup>

(目的) 昭和大学歯学部3年生の基礎実習において側方加圧根管充填の評価として従来のデンタルX線写真に加えマイクロCTを用いて3次元的に解析し第34回日本歯科医学教育学会にて発表した。今回、我々はマイクロCTによる3次元的な画像による根管充填解析を教材として用いた後、再度側方加圧根管充填を行いマイクロCT 3次元画像の教育効果を評価することを目的とした。

(対象及び方法) 本学歯学部第3学年の学生を対象とした。人工歯 (Nissin: S-12-500) を使用し通常の規格形成法 (昭和大方式) にて根管拡大しガッタパーチャーポイント(GP)とキャナルスN (昭和薬品化工) を用いて側方加圧根管充填を行った。デンタル X 線撮影にて根管充填の到達度と密度を評価した。到達度良好、密に充填されている評価良好の人工歯を選びマイクロ CT (ScanXmate-LO90H: コムスキャンテクノ社) を用いて測定し画像構築 (RATOC 社: TRI/3D-VIE) した。GP の湾曲とポイント下部の空隙の有無によってそれぞれ根管充填: 良好 (ほとんど GP に湾曲がない, ポイント下部空隙がない)、やや良好 (やや湾曲しているか許容範囲, ポイント下部空隙があるが許容範囲)、不良 (湾曲した GP がある, ポイント下部空隙がある) に分類した。根尖孔からセメント-エナメル(C-E)境までの根管内の死腔の体積を測定した (TRI/3D-VIE: ラトックシステムエンジニアリング)。

#### (結果)

最初の根管充填では、デンタルX線画像において根管充填の評価が良好であった7本中、GPの湾曲の有無に関して良好は2本、やや良好は2本、不良は3本であった。ポイント下部空隙の有無では、良好は2本、やや良好は3本、不良は2本であった。C-E境断面での死腔の有無は7本中6本に死腔が認められそのうち5本はわずかな死腔だが、2本は明らかに空隙があった。2本目、3本目に挿入したと推測されるGPが底部まで到達していないのがみられた。根尖孔からセメント-エナメル(C-E)境までの根管内の死腔の体積は、2回目が1回目より減少していたものが多いが同等か増加しているものもあった。

(考察及び結論) デンタルX線撮影にて根管充填を良好と判断していたが、マイクロCTにて加圧充填状態が不良なものも多く側方加圧根管充填を習得していない学生が多いことがわかった。2回目は明らかにGPの湾曲が減少したが側方への圧が弱いことがわかった。根管口明示が不良のものやポイントの充填方法に個人的な特徴があり2本目の挿入深度が浅いものなどそれぞれの学生によって修得出来ていないポイントを指摘できるため細かい指導が出来教育効果が上がると思われる。GP挿入圧やスプレッダーによる側方への加圧の強度を理解することが難しいことからどのように教育すると良いのかを今後は検討していきたい。CT画像を教材として用いることによってそれぞれの学生の修得出来ていない事柄が細かく理解できた。全ての学生の根管充填の評価をCT画像にて行うには時間や労力の問題もあり難しいが、効率よく教育効果を上げるために今後も用いていきたい。マイクロCT 3次元画像を用いることは学生教育において有効であることが示唆された。

### オートファジーを用いたヒトケラチノサイトのLPS刺激適応能

- 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、  
4 口腔保健学講座 口腔健康科学分野  
○萩尾佳那子<sup>1</sup>、大野純<sup>2</sup>、山口真広<sup>3</sup>、谷口奈央<sup>4</sup>、山田和彦<sup>1</sup>、米田雅裕<sup>1</sup>、廣藤卓雄<sup>1</sup>

#### LPS-stimulated adaptation in human keratinocytes by autophagy

- 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 Hagio<sup>1</sup>, Jun Ohno<sup>2</sup>, Masahiro Yamaguchi<sup>3</sup>, Kazuhiko Yamada<sup>1</sup>, Nao Taniguchi<sup>1</sup>  
Masahiro Yoneda<sup>1</sup>, Takao Hirofuji<sup>1</sup>

#### 【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展開していると考えられる。とくに、歯周病においては、接合上皮 KC は Lipopolysaccharide (LPS) のターゲットとなる。それらの刺激に対して、自食作用であるオートファジーを用いた適応の可能性を検討した。

#### 【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) オートファジー誘導の判定: (1) LC3 によるオートファゴソームの検出、(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。3) 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。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 PI3K3 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 刺激による KC でのオートファジー誘導は細胞内 ROS 蓄積に関与する: 刺激 KC においては、細胞内 ROS の蓄積が明らかとなった。この ROS 蓄積に関連して、phospho-AMPK 発現および PI3K/Beclin-1 発現が増強された。3-MA および Wm 投与により阻害されたことより、PI3K/Beclin-1 経路の活性化がオートファジー誘導に関与することが示唆された。しかしながら、ROS 蓄積は経時的にオートファジー発現が亢進するに伴い、減弱傾向がみられた。また、LPS 刺激によりオートファジーが誘導された細胞においては、E. coli 由来の Bioparticle の細胞内への取り込みが明らかとなった。細胞内での particle の局在は、autophagosome と一致した。この結果は、particle の取り込みにオートファジーが関与することを示している。2) TLR4 シグナルの活性化はオートファジーを誘導し、細胞内 ROS 蓄積を減弱する: LPS 刺激により、TLR4 発現が認められた。同発現は、LPS+PMB 添加群で減弱したことから、LPS 刺激に特異的に TLR4 シグナルが展開されることが明らかとなった。刺激細胞においては、TLR4 シグナルの下流に位置する MyD88 および TRIF 発現も確認された。さらに、MyD88 阻害剤の投与により、オートファジー・マーカーである LC3-II および phospho-Beclin-1 発現が減弱し、細胞免疫染色においても autophagosome 陽性細胞数も減少した。同様に、Bioparticle の取り込みも減少した。この結果は、TLR4→MyD88 経路がオートファジー誘導に関与することを示唆している。また、TLR4/MyD88 経路の活性化が、細胞内 ROS 蓄積を減少させることが阻害剤の投与実験から明らかとなった。しかしながら、phospho-AMPK 発現は MyD88 阻害によっても変化しなかった。

#### 【結論】

以上の結果から、ヒト KC は LPS 刺激により、TLR4/MyD88→AMPK→PI3K/Beclin-1 経路の活性化によりオートファジーが誘導された。さらに、細胞内 ROS 検索および Bioparticle 取り込み実験から、LPS 刺激により誘導されたオートファジーは、LPS ストレス回避に関与する可能性が示唆された。



*Porphyromonas gingivalis*由来LPSは歯肉上皮細胞の  
アンジオポエチン様タンパク質2産生を誘導する

愛知学院大学歯学部歯周病学講座<sup>1</sup>、薬学部生体機能化学講座<sup>2</sup>

○大野祐<sup>1</sup> 山本弦太<sup>1</sup> 西田英作<sup>1</sup> 後藤久嗣<sup>1</sup> 神谷洋介<sup>1</sup> 菊池毅<sup>1</sup> 山田章三<sup>1</sup> 茂木眞希雄<sup>2</sup> 三谷章雄<sup>1</sup>

*Porphyromonas gingivalis* LPS induced the production of Angiopoietin-like protein in human gingival epithelial cell.

Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University<sup>1</sup>

Department of Medicinal Biochemistry, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University<sup>2</sup>

○ONO Tasuku<sup>1</sup>, YAMAMOTO Genta<sup>1</sup>, NISHIDA Eisaku<sup>1</sup>, GOTO Hisashi<sup>1</sup>, KAMIYA Yosuke<sup>1</sup>,

KIKUCHI Takeshi<sup>1</sup>, YAMADA Syozo<sup>1</sup>, MOGI Makio<sup>2</sup>, MITANI Akio<sup>1</sup>

【目的】

歯周病は歯周病原細菌による慢性炎症性疾患であり、歯周病原細菌の内毒素や歯周局所の炎症メディエーターにより心臓・血管系疾患、糖尿病やがんなどの全身疾患のリスクが上昇することが知られている。近年、アンジオポエチン様タンパク質2 (Angiopoietin-like protein2: Angptl2) が慢性炎症に関与する重要な因子であることが明らかにされ、Angptl2 シグナル制御によるがんや糖代謝異常の新しい治療戦略の可能性が報告されている。しかしながら、歯周病における Angptl2 の関与についてはほとんど知られていない。本研究では歯周病における Angptl2 の役割についての基礎的研究として歯肉上皮細胞での Angptl2 の関与について検討した。

【材料及び方法】

(1)歯肉上皮細胞における Angptl2 遺伝子発現およびタンパク産生の確認

ヒト歯肉上皮細胞株である Ca9-22 を用い *Escherichia coli* および *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS にて刺激を行い、Angptl2 遺伝子発現を qPCR 法にて確認を行った。また *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激時の Angptl2 タンパク産生を Western blotting 法にて確認を行った。

(2)Angptl2 産生経路の検討

Ca9-22 を用い、RNA 干渉により *P. gingivalis* 由来 LPS のレセプターとして知られている TLR2, 4 遺伝子ノックダウンを行い、*P. gingivalis* 由来 LPS 刺激による Angptl2 および炎症性サイトカイン遺伝子発現およびタンパク産生の変化について確認した。

(3)歯周組織破壊における Angptl2 の役割

Ca9-22 に recombinant human Angptl2 刺激を行い、炎症性サイトカインおよび MMP-13 遺伝子発現について確認を行った。

【結果及び考察】

Ca9-22 においては *E. coli* 及び *P. gingivalis* 由来 LPS により、刺激後 24h をピークに Angptl2 遺伝子の有意な発現増強が確認された。またタンパク産生においても *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激後 24h, 48h において Angptl2 産生の増加が認められた。そこで LPS による Angptl2 産生経路を明らかにするため TLR2 及び 4 のノックダウンを行ったところ、Angptl2 遺伝子発現が対照群と比較して TLR2siRNA 群では約 70%、また TLR4siRNA 群では約 50%程度にまで抑制された。

Ca9-22 への Angptl2 の影響について検討したところ、刺激後 1h において IL-1β、IL-6、TNF-α などの炎症性サイトカインおよび MMP-13 の遺伝子の発現増強を認めた。

【結論】

本研究より *P. gingivalis* 由来 LPS 刺激により歯肉上皮細胞から Angptl2 が産生されたことから、歯周病局所においても Angptl2 が産生されることが示唆された。歯周病において Angptl2 は歯肉上皮細胞に作用し各種炎症性サイトカイン産生を誘導し、慢性炎症を遷延化させるだけでなく、MMP-13 活性を増強することで歯周組織破壊に影響する可能性が考えられた。

## ブラッククミン種子精油の *Fusobacterium nucleatum* に対する抗菌作用

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科保存学分野<sup>1</sup>, 稲畑香料株式会社応用研究部<sup>2</sup>, OHS 研究所<sup>3</sup>

○徳田雅行<sup>1</sup>, 森元陽子<sup>1</sup>, 川上克子<sup>1</sup>, 中杉徹<sup>2</sup>, 村川拓士<sup>2</sup>, 渋谷耕司<sup>3</sup>, 西谷佳浩<sup>1</sup>

### Antimicrobial effects of essential oil-extracted fractions of Black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds for *Fusobacterium nucleatum*

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences<sup>1</sup>, Applied Reserch Laboratory, Inabata Koryo Co., LTD<sup>2</sup>. Laboratory for Oral Health Science<sup>3</sup>

○TOKUDA Masayuki<sup>1</sup>, MORIMOTO Yoko<sup>1</sup>, KAWAKAMI Yoshiko<sup>1</sup>, NAKASUGI Toru<sup>2</sup>, MURAKAWA Takushi<sup>2</sup>, SHIBUYA Koji<sup>3</sup>, NISHITANI Yoshihiro<sup>1</sup>

#### [研究目的]

口臭予防は快適な個人生活および社会生活を送るうえで重要である。口臭の原因の一つとして *Fusobacterium*, *Porphyromonas* などの口腔細菌が産生する  $H_2S$ ,  $CH_3SH$  などの揮発性硫黄化合物があげられる。これまで口臭を予防するために抗菌性化合物 (塩化セチルピリジウム、トリクロサン等) がデンタルペーストやデンタルリンスに配合されてきた。一方、口臭を効果的に抑制するには、口臭産生菌の活動を抑制することと、口臭成分を消臭することが重要である。中杉らはインドなどで食品素材として使用されているブラッククミン (*Nigella sativa* L.) 種子精油が  $CH_3SH$  に対して、非常に強い消臭活性を示すこと、さらに主要な消臭活性物質が thymoquinone であることを報告した (58<sup>th</sup> 香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会, 2014)。そこで今回は、口臭の原因菌である *F. nucleatum* に対するブラッククミン精油の抗菌作用について評価し、さらにその抗菌活性物質について調べた。

#### [材料と方法]

##### 1-1. 植物材料

インド産のキンボウゲ科の一年生草本であるブラッククミンの種子精油

##### 1-2. 供試試料の調製

本種子をミルで粉碎後、常法により水蒸気蒸留を行うことにより得た精油 (28 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、*n*-ヘキサンおよびエタノールで順次展開して粗分画し、両画分をそれぞれ濃縮することにより、ヘキサン溶出画分 (5.09 g) とエタノール溶出画分 (20.59 g) を得た。つぎに両画分のうち、*F. nucleatum* に対して強い抗菌活性を示したエタノール溶出画分について、*n*-ヘキサン-酢酸エチル系溶媒を用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより、fr. E-1 ~ fr. E-8 に再分画した。

##### 2. 抗菌試験

1) 使用菌株: *Fusobacterium nucleatum* ATCC25586

2) 供試試料: ブラッククミン種子精油、シリカゲルカラムクロマトグラフィー分画物および試薬類

(Thymoquinone, thymohydroquinone, thymol, carvacrol, *p*-cymene, terpinen-4-ol, *l*-carvone, limonene, piperitone, linalool, 8-hydroxy *p*-cymene, 1,8-cineole, terpineol)

3) 培地: Tryptic Soy Broth (TSB) + ヘミン + メナジオン

4) MIC (最小発育阻止濃度) 試験: 96well plate にサンプルを段階希釈調製し、予め前培養した各菌株を分注し、嫌気下にて1~2日間培養し判定した。

#### [結果]

ブラッククミン種子精油は、*F. nucleatum* に対して強い抗菌活性を示した (MIC15.6 ppm)。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗分画したエタノール溶出画分の MIC は 7.8 ppm であったが、*n*-ヘキサン溶出画分の活性はみられなかった。次に抗菌活性の強かったエタノール溶出画分のシリカゲルカラムクロマトグラフィー再分画物 fr. E-2 ~ fr. E-8 のうち、fr. E-2 の収量が最も多く、強い抗菌活性を示した。そこで本画分に含まれる物質についてそれぞれ抗菌活性を調べたところ、thymoquinone が強い抗菌活性を有することが判った。

#### [考察及び結論]

今回、ブラッククミンおよびその主要成分が *F. nucleatum* に対して高い抗菌活性を有することが認められた。この成分を豊富に含有するブラッククミン種子精油は、高い消臭効果を併せ持つことから口臭予防および歯周病予防への有用性が期待される。

## Alkannin はヒト歯根膜由来細胞の CCR5 ligand 産生を抑制する

<sup>1)</sup>徳島大学大学院医歯薬学研究部 歯科保存学分野 <sup>2)</sup>徳島大学大学院医歯薬学研究部 歯科保存学分野  
日本学術振興会特別研究員 DC2 <sup>3)</sup>徳島大学大学院医歯薬学研究部 口腔保健支援学分野  
○ 細川義隆<sup>1)</sup>、細川育子<sup>1)</sup>、進藤智<sup>2)</sup>、尾崎和美<sup>3)</sup>、松尾敬志<sup>1)</sup>

### The effect of alkannin on CCR5 ligands production from human periodontal ligament cells

<sup>1)</sup>Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School, <sup>2)</sup>JSPS Research Fellow DC2, Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School, <sup>3)</sup>Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School  
○ Yoshitaka Hosokawa<sup>1)</sup>, Ikuko Hosokawa<sup>1)</sup>, Satoru Shindo<sup>2)</sup>, Kazumi Ozaki<sup>3)</sup>, Takashi Matsuo<sup>1)</sup>

#### 【研究目的】

歯周病は歯周病関連細菌により惹起される慢性炎症性疾患であり、細菌に対する免疫応答が歯槽骨吸収をはじめとする歯周組織破壊に関与している事が報告されている。近年、免疫担当細胞の中でもCC chemokine receptor (CCR5) 陽性細胞が歯周炎の炎症性骨吸収に関与している事が明らかとなった (Ferreira *et al.*, J.Dent. Res.,90(5),632-637,2011)。また、CCR5のリガンドであるCC chemokine ligand (CCL)3, CCL4ならびにCCL5の歯周炎組織での発現に関する報告はあるが、歯周組織構成細胞においてはその産生機構に関する報告は少なく不明な点が多い。

alkanninはルリジサに含まれる天然色素であり、抗酸化作用、抗菌作用、抗癌作用など様々な生理活性作用がある事が報告されている。しかしながら、抗炎症作用に関する報告は少なく、歯周組織構成細胞に対するalkanninの作用に関しての報告はなく不明である。

本研究では、alkanninがヒト歯根膜由来細胞 (HPDLC) のCCR5 ligand産生に与える影響に焦点を絞り検討を行った。また、alkanninがケモカイン産生に関与しているシグナル伝達経路であるNF- $\kappa$ Bに与える影響についても明らかにする事を目的として実験を行った。

#### 【材料および方法】

HPDLCはLonza社より購入し、10%FBSを含むDMEM培地にて培養し実験に用いた。HPDLCをalkannin存在下あるいは非存在下にて24時間IL-1 $\beta$ 刺激を行い、CCL3, CCL4ならびにCCL5産生をELISA法にて、細胞内シグナル伝達 (NF- $\kappa$ B) の活性化をwestern blot法にて解析を行った。また、IL-1 $\beta$ 誘導CCR5 ligand産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにNF- $\kappa$ B阻害物質にて前処理後IL-1 $\beta$ 刺激を行い、CCL3およびCCL5産生に関してELISA法を用い検討した。

#### 【成績】

IL-1 $\beta$ 刺激はHPDLCのCCL3およびCCL5産生を誘導したが、CCL4産生は誘導しなかった。alkanninはIL-1 $\beta$ が誘導したHPDLCのCCL3およびCCL5産生を濃度依存的に抑制した。また、alkanninはIL-1 $\beta$ が誘導したHPDLCのI $\kappa$ B- $\alpha$ 分解を阻害したが、NF- $\kappa$ B p65のリン酸化は抑制しなかった。NF- $\kappa$ B阻害剤はIL-1 $\beta$ が誘導したHPDLCのCCL3およびCCL5産生を有意に抑制した。

#### 【考察および結論】

今回の結果より、IL-1 $\beta$ はHPDLCのCCR5 ligand (CCL3, CCL5)産生を誘導する事によりCCR5陽性細胞の歯周炎病変局所への浸潤・集積に関与している事が示唆された。また、alkanninはHPDLCのNF- $\kappa$ B経路を阻害する事によりIL-1 $\beta$ が誘導するHPDLCのCCL3およびCCL5産生を抑制できる事が明らかとなった。ゆえにalkanninはCCR5 ligand産生を抑制し、CCR5陽性細胞の浸潤を減少させることにより、歯周炎病変局所において炎症性骨吸収を抑制できる可能性が示された。

## ヒト歯肉線維芽細胞での炎症性サイトカイン発現に対する microRNA の影響

日本大学松戸歯学部 歯周治療学講座<sup>1</sup>、口腔科学研究所<sup>2</sup>  
○松井 沙莉<sup>1</sup>、能田佳祐<sup>1</sup>、小方 頼昌<sup>1,2</sup>

**Effects of microRNAs on the expression of inflammatory cytokines in human gingival fibroblasts**  
Department of Periodontology<sup>1</sup>, Research Institute of Oral Science<sup>2</sup>, Nihon University School of Dentistry at Matsudo  
○Sari Matsui<sup>1</sup>, keisuke Noda and Yorimasa Ogata<sup>1,2</sup>

### 【研究目的】

歯周病は、歯周病原菌に起因する感染症であるが、宿主および環境因子が、歯周病の発症と進行に大きく影響する。歯周炎局所での慢性炎症は、炎症性サイトカインの持続的な産生を引き起こし、好中球、マクロファージおよび線維芽細胞からのマトリックスメタロプロテアーゼやプロスタグランジンの産生を誘導し、破骨細胞の活性化や、歯周組織の破壊に関与すると考えられる。

MicroRNA (miRNA) は、長さ約 22 塩基の一本鎖ノンコーディング RNA で、標的 mRNA の 3 末端非翻訳領域に結合して翻訳抑制を引き起こし、遺伝子発現を調節する。歯周炎の発症と進行への miRNA の役割を解明するため、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) での炎症性サイトカイン遺伝子発現に対する miRNA の影響について検索した。

### 【材料および方法】

フラップ手術時およびインプラント 2 次手術時に得られた炎症性および非炎症性歯肉を用いて miRNA マイクロアレイを行った結果、炎症性歯肉で miR-223 と miR-200b の発現が上昇した。miR-223 または miR-200b の発現プラスミドを HGF に導入後、IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) または TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) で 24 時間刺激し、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-6) と miR-223 の標的である I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) と mitogen-activated protein kinase phosphatase-5 (MKP-5) の遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR、タンパク発現を Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) または Western blotting で検索した。日本大学松戸歯学部倫理委員会承認 (EC10-0401 号、EC14-023 号)

### 【結果および考察】

歯肉線維芽細胞を炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ ) で 24 時間刺激すると、miR-223 と miR-200b の発現量が増加した。

歯肉線維芽細胞に miR-223 を過剰発現させると、IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA 量は増加し、IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  で刺激すると、さらに IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA 量は増加した。IL-1 $\beta$  と IL-6 のタンパク量は、IL-1 $\beta$  で刺激すると増加し、miR-223 を過剰発現させるとさらに IL-1 $\beta$  と IL-6 のタンパク量は増加した。歯肉線維芽細胞に miR-223 inhibitor を導入し、miR-223 の発現を抑制すると、IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA 量は減少した。

歯肉線維芽細胞に miR-200b を過剰発現させると IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA とタンパク量は減少した。歯肉線維芽細胞に miR-200b を過剰発現させ、IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  で刺激しても、IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA とタンパク量は減少した。

miR-223 の標的遺伝子の MKP-5 の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現させると減少したが、IKK $\alpha$  の mRNA 量は、miR-223 を過剰発現しても変化しなかった。しかし、Western blot の結果、miR-223 を過剰発現させると IKK $\alpha$  のタンパク量は減少した。以上の結果より、miR-223 は IKK $\alpha$  の発現を、翻訳のプロセスで抑制していると考えられた。

miR-223 の過剰発現により IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA 量が増加し、IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  刺激で、さらに IL-1 $\beta$  と IL-6 の mRNA 量が増加したのは、miR-223 が NF- $\kappa$ B の活性を抑制する IKK $\alpha$  と MAPK の p38 の活性を抑制する MAP-5 を阻害したためと考えられた。また、miRNA の標的遺伝子を予測するデータベースの TargetScan から、NF- $\kappa$ B を活性化する I $\kappa$ B kinase  $\beta$  (IKK $\beta$ ) が miR-200b の標的遺伝子として考えられた。現在、さらなる miR-223、miR-200b の標的遺伝子の検索および直接的、間接的作用について検索中である。

### 歯周炎モデルラットにおける 11 $\beta$ -HSD1 発現の比較・検討

大阪歯科大学大学院歯学研究科(歯周病学専攻)<sup>1</sup> 大阪歯科大学内科学講座<sup>2</sup>  
琉球大学医学部第二内科<sup>3</sup> 大阪歯科大学歯周病学講座<sup>4</sup>  
○中田貴也<sup>1</sup> 澤井宏文<sup>2</sup> 益崎裕章<sup>3</sup> 藤田敦子<sup>1</sup> 大久保直<sup>2</sup> 梅田誠<sup>4</sup>

#### Comparison of the 11 $\beta$ -HSD1 expression in periodontitis model rats

Graduate Sch. Dentistry (Dept. Periodontology) Osaka Dental University<sup>1</sup>  
Department of Internal Medicine, Osaka Dental University<sup>2</sup>  
2nd Department of Internal Medicine, University of Ryukyus<sup>3</sup>  
Department of Periodontology, Osaka Dental University<sup>4</sup>

○Takaya Nakata<sup>1</sup>, Hirofumi Sawai<sup>2</sup>, Hiroaki Masuzaki<sup>3</sup>, Atuko Fujita<sup>1</sup>, Tadashi Ohkubo<sup>2</sup>, Makoto Umeda<sup>4</sup>

#### 【目的】

グルココルチコイドは副腎皮質ホルモンの1つであり代謝や免疫応答に及ぼす様々な効果を持っている。また、コルチゾールはヒトにおける主要なグルココルチコイドホルモンである。11 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type1 (以下 11 $\beta$ -HSD1)は、不活性型であるコルチゾンから活性型であるコルチゾールに変換する酵素であり、11 $\beta$ -HSD1は脂肪組織(特に内臓脂肪)や肝臓で高発現しており過剰な活性化はアディポサイトカイン分泌異常を引き起こしメタボリックシンドロームに重要な役割を果たしている事が明らかになっている。

生活習慣病の一つであるメタボリックシンドロームは、内臓脂肪型肥満に高血圧・高血糖・高脂血症の要因がある状態であり、動脈硬化症のリスクが上がると言われている。近年、メタボリックシンドロームと歯周病には関わりがあるとされている。マウスを用いた実験で 11 $\beta$ -HSD1 の阻害剤がメタボリックシンドロームを改善する事が報告されており、ヒトにおけるメタボリックシンドロームの新規治療薬として期待されている。メタボリックシンドロームは脂肪組織の慢性炎症と考えられていることから、歯周組織の慢性炎症である歯周病と 11 $\beta$ -HSD1 との関連性について検討した。

#### 【材料および方法】

生後7週齢 Wistar 系雄性ラットにイソフルレンによる吸入麻酔を行なった後、ペントバルビタールにて腹腔内に注射し全身麻酔を行なった。実験側は歯周炎のモデルとして上顎左側第二臼歯部の歯頸部に 5-0 の絹糸を全周に巻き近心頰側で結紮した。また、対照側の上顎右側第二臼歯部は無処置とした。結紮3日目にラットを安楽死させ上顎両側第二臼歯部から歯肉を採取した。

採取した歯肉から TRIzol<sup>®</sup> Reagent を用いて total RNA を抽出し、吸光度計を用いて total RNA の濃度を算出した。使用する total RNA 量が 20ng になるように各検体ごとに算出して 11 $\beta$ -HSD1, 11 $\beta$ -HSD2, TNF- $\alpha$ , GAPDH のプライマーと TaqMan<sup>®</sup>RNA-to-Ct<sup>™</sup> 1-Step Kit, StepOnePlus Real Time PCR System を用いて real-time PCR を行い、各 RNA の発現量の解析を行った。

#### 【結果】

結紮群での TNF- $\alpha$  の RNA 発現量が亢進しているラットに関して、11 $\beta$ -HSD1 の RNA 発現量は結紮群の方が対照群と比較して有意に増加していた。一方、11 $\beta$ -HSD2 の RNA 発現量に関しては結紮群と対照群との間に有意差は認められなかった。

#### 【考察】

結紮群での 11 $\beta$ -HSD1 の発現量は対照群と比較して有意に多いことより、歯周組織中の炎症において 11 $\beta$ -HSD1 の関与が認められた。今後 n 数を増やし、免疫化学染色を行う。また 11 $\beta$ -HSD1 の阻害剤を使用して歯周病と 11 $\beta$ -HSD1 の関連性をさらに検討していきたい。

## 糖尿病ラットにおける VEGF 発現は *Porphyromonas gingivalis* LPS による歯槽骨破壊を促進する。

大阪歯科大学 歯周病学講座  
○津守 紀昌、河野 智生、重松 伸寛、森田 浩正、梅田 誠

VEGF expression in diabetic rats promotes alveolar bone resorption by *Porphyromonas gingivalis* LPS.  
Department of Periodontology, Osaka Dental University  
○TSUMORI NORIMASA, KONO TOMOO, SHIGEMATSU NOBUHIRO, MORITA HIROMASA, UMEDA MAKOTO

【目的】糖尿病は歯周病の重要なリスクファクターの1つであり、糖尿病患者では高頻度で歯周病を発病し、またその病状が重篤化することが以前から知られている。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF)は、血管内皮細胞の増殖・分化、および血管透過性の亢進、血管拡張作用などを持つ糖タンパクで、非常に重要な血管新生因子である。VEGF は、胎生期の血管形成、組織構築、黄体形成などの健常な血管新生に関与するだけでなく、固形腫瘍、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、炎症、創傷治癒などの病的な状態での血管新生や血管透過性亢進にも重要な役割を果たす。糖尿病の合併症は脳梗塞、心筋梗塞、網膜症、腎症、神経障害、歯周病などがあげられるが、そのすべてが血管障害に起因し、VEGF と深い関係がある。

*Porphyromonas gingivalis* は代表的な歯周病原細菌であり、その LPS は歯槽骨破壊に関与することは報告されているが、糖尿病により歯周組織に発現した VEGF が *P. gingivalis* LPS による歯槽骨破壊にどのような影響を与えるかはまだ明らかになっていない。そこで、本研究では *P. gingivalis* LPS を歯肉に注射することにより実験的歯周炎を作成して、歯周組織での VEGF 発現と破骨細胞の局在を観察することにより、糖尿病によって起こった歯周組織での VEGF 発現が歯周病による骨吸収にどのような影響を与えるかを明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】8週齢の糖尿病群として血糖値 200mg/dL 以上の II 型糖尿病モデルである GK 系雄性ラットを実験群、健全群として Wistar 系雄性ラットを対照群とし、両群の両側第二臼歯口蓋側歯間乳頭部に *P. gingivalis* LPS を注射し、さらに同部歯肉溝に 4-0 絹糸を結紮することにより実験的歯周炎を作成した。その後ラットを安楽死させ、マイクロエックス線 CT にて、両群の骨吸収像を撮影し、セメント・エナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定した。測定部位は第一臼歯遠心根、第二臼歯近心根、遠心根、第三臼歯近心根とした。試料は EDTA にて 1ヶ月脱灰し、脱水、パラフィン包埋後、連続切片を作成した。切片は抗 VEGF モノクローナル抗体の免疫組織化学的染色および酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い光学顕微鏡にて観察し、両群を比較、検討を行った。

【結果および考察】マイクロ CT 画像では対照群と比べ実験群で顕著な骨吸収がみられた。セメント・エナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定すると第二臼歯近心根、第二臼歯遠心根、第一臼歯遠心根、第三臼歯近心根の順で大きく、対照群と比べて実験群の方が有意に高い値を示した。抗 VEGF モノクローナル抗体の免疫組織化学的染色では歯槽骨の骨縁上および歯肉結合組織中の血管周囲および骨膜上に、対照群と比較して VEGF が強く発現していた。TRAP 染色では歯槽骨の骨膜上には実験群、対照群ともに TRAP 陽性細胞の局在がみられた。

以上の結果から、糖尿病ラットでは高血糖状態により歯周組織に発現した VEGF が *P. gingivalis* LPS による歯槽骨吸収に影響を与えることがうかがわれた。今後、糖尿病による歯周病の増悪のメカニズムを解明する上で、VEGF の働きをより明らかにすることが重要であると考えられる。

## 日本人慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液中の EB ウイルスと *P. gingivalis* ゲノムの定量解析

日本大学松戸歯学部歯周治療学講座<sup>1</sup>, 日本大学口腔科学研究所<sup>2</sup>,  
○加藤彩子<sup>1</sup>, 山崎瑞穂<sup>1</sup>, 小方頼昌<sup>1,2</sup>

### Quantitative analysis of Epstein-Barr virus DNA and *Porphyromonas gingivalis* associated with Japanese chronic periodontitis patients

Department of Periodontology<sup>1</sup>, Research Institute of Oral Science<sup>2</sup>,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Ayako Kato<sup>1</sup>, Mizuho Yamazaki<sup>1</sup>, Yorimasa Ogata<sup>1,2</sup>

#### 【研究目的】

歯周炎は、歯周ポケット内のプラーク中の歯周病原菌により惹起される炎症性病変である。細菌感染に対する生体の炎症反応は、免疫担当細胞により制御されるが、マトリックスメタロプロテアーゼや炎症性サイトカインが歯周組織で過剰に産生されると、結合組織の破壊や骨吸収等の臨床症状を生じる。近年 Epstein-Barr ウイルス (EBV) が、歯周炎の発症と進行に関与するという報告が認められる。我々は、日本人慢性歯周炎患者の歯肉溝滲出液から、EBV と *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を検出し、5 mm 以上の深い歯周ポケット部位で EBV と *P. gingivalis* が高率に検出されることを報告した。今回我々は、慢性歯周炎患者の歯周病変部位および健常部位の歯肉溝滲出液中の EBV と *P. gingivalis* ゲノムの定量解析を行った。

#### 【材料および方法】

慢性歯周炎患者 25 名の 5 mm 以上の深いプロービングポケット深さ (PPD) 部位と同患者の 3 mm 以下の浅い PPD 部位に、滅菌ペーパーポイントを 30 秒間、3 回挿入して歯肉溝滲出液を採取し、DNA を抽出した。また健常者 13 名の 3 mm 以下の健常 PPD 部位 2 ヶ所から同様の方法で歯肉溝滲出液を採取し、対照群として比較検討を行った。EBV および *P. gingivalis* に対する特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR (SYBR Green 法) を行い、EBV および *P. gingivalis* ゲノムを定量した。本研究は、日本大学松戸歯学部倫理委員会で承認 (EC11-027-1) を得た。

#### 【結果】

25 名の慢性歯周炎患者の 5 mm 以上の深い PPD 部位から採取した歯肉溝滲出液中の EBV と *P. gingivalis* のゲノムコピー数は  $3.74 \times 10^3 \sim 2.83 \times 10^9$  copies/ml および  $2.73 \times 10^5 \sim 6.65 \times 10^9$  copies/ml であった。また、同一患者の 3 mm 以下の浅い PPD からの歯肉溝滲出液中の EBV と *P. gingivalis* のゲノムコピー数は  $4.37 \times 10^4 \sim 9.13 \times 10^6$  copies/ml および  $3.97 \times 10^6 \sim 2.13 \times 10^9$  copies/ml であった。一方、健常者の 3 mm 以下の PPD からの歯肉溝滲出液中の EBV および *P. gingivalis* のゲノムコピー数は、 $1.27 \times 10^4 \sim 2.66 \times 10^8$  copies/ml および  $4.16 \times 10^6 \sim 6.62 \times 10^9$  copies/ml であった。EBV のゲノムコピー数は、慢性歯周炎患者の深い PPD 部位では、浅い PPD 部位に比べて約 300 倍、*P. gingivalis* のゲノムコピー数は約 3 倍高値を示した。EBV は、慢性歯周炎患者の深い PPD の 20 部位 (80%)、浅い PPD の 10 部位 (40%)、健常者の浅い PPD の 13 部位 (50%) で検出された。*P. gingivalis* は、慢性歯周炎患者の深い PPD の 20 部位 (80%)、浅い PPD の 9 部位 (36%)、健常者の浅い PPD の 7 部位 (27%) で検出された。さらに、慢性歯周炎患者の深い PPD の 17 部位 (68%)、浅い PPD の 3 部位 (12%)、健常者の浅い PPD の 4 部位 (15%) では、EBV と *P. gingivalis* の共感染が認められ、慢性歯周炎の進行した病変部位で最も高値を示した。

#### 【考察】

歯周病変部位では、EBV および *P. gingivalis* が多量に共存し、歯周組織の破壊に関与している可能性が示唆された。EBV は、約 90% 以上の健康成人に潜伏感染しているが、歯周炎患者の深い PPD 部位では、高率で EBV と *P. gingivalis* が共感染しており、歯周病原菌の代謝産物が EBV を再活性化する可能性が考えられた。EBV の再活性化はサイトカインの産生異常を引き起こし、歯周病の進行や歯槽骨吸収に関与すると考えられる。今後、ウイルスと歯周炎の発症・進行のメカニズムが解明されることにより、歯周病の診断や治療法が変化する可能性が示唆される。

研究協力者：日本大学細菌学講座 今井健一、落合邦康

酸化チタンの LPS 分解能について

鶴見大学歯学部歯周病学講座

○松島 友二 鈴木 琢磨 白川 哲

長野 孝俊 糸日谷 洋大 五味 一博

Study of LPS resolution of titanium oxide

○Yuji Matsushima, Takuma Suzuki, Shirakawa Satoshi,

Nagano Takatoshi, Itohiya Hiro, Kazuhiro Gomi

Department of Periodontology, School of Dental Medicine, Tsurumi University

【目的】

日本で開発された光触媒作用を有する酸化チタンは広く社会で応用されており、特定波長域の光が照射されるとヒドロキシラジカルやスーパーオキサイドアニオンを発生する。これらの活性酸素種による酸化還元作用が有機質分解や殺菌性などの作用を示すと考えられており、酸化チタンの光触媒作用を利用した機能製品として、すでに手術室のタイルや空気清浄機のフィルター、医療用カテーテルなどに応用され成果を挙げている。

現在医科領域における応用として人口関節や癌、難治性感染症の治療など臨床応用への研究が進んでおり、歯科領域でもすでに歯の漂白や義歯の洗浄剤の成分として利用されているが、歯科治療に関しての研究が少ないのが現状である。そこで我々は酸化チタンの光触媒作用に着目し、歯周疾患に罹患した根面へ酸化チタンを作用させることで感染あるいは汚染の除去ができるのではないかと考え、酸化チタンを根面に作用させることで根面性状の評価および LPS の分解能の評価を行い、象牙質上での酸化チタンの LPS 分解能を評価することを本研究の目的とした。

【材料および方法】

今回の実験には酸化チタンとして石原産業株式会社の酸化チタン粉末である ST-01 を用いた。特徴として ST-01 は、色は白色、粒径が 7 nm と極めて小さく、光触媒の活性が高いことが挙げられる。この酸化チタンの光触媒作用に着目し、歯周病に罹患した根面に作用させることで感染もしくは汚染が除去される可能性があると考え、根面に酸化チタンを応用し、一定時間作用させた後、位相差電子顕微鏡で根面の性状を観察した。また、歯周炎を惹起する物質のひとつであると考えられている LPS が酸化チタンによって分解されているかは不明の為、LPS の分解能を評価した。

LPS 分解能は、96 Well Plate に、1 EU に調整した LPS100  $\mu$ l を滴下、その後、酸化チタンの励起（活性酸素種の発生）を目的に、波長 352 nm 前後のスパイラル型 15 W ブラックライト (Jefcom 社) を用い照射距離 10 cm に規定し、5 時間照射をおこない LPS がどれだけ分解されたかを評価した。LPS の検出には Toxin Sensor (GenScript) を用い、吸光度を測定することで酸化チタンの LPS 分解能を評価した。

【結果および考察】

酸化チタンの添加で LPS が低下したことから、酸化チタンにブラックライトを照射することで、活性酸素種が発生し、LPS が分解されたと考えられる。また象牙質のディスク上に付着させた LPS に酸化チタンを応用することで LPS が分解されることが認められたことから、象牙質表面に付着させた LPS においても酸化チタンは作用すると考えられる。しかしながら象牙質表面に付着させた LPS は、象牙質のディスクを用いなかった結果と比較して、LPS の分解に有意差を認めなかった。これは象牙質の内部に含浸した LPS を酸化チタンが分解しきれなかったことによるものと考えられる。また、歯根表面および SRP 後の歯根面に酸化チタンを作用させることにより歯根表面の異物が除去されたことから、LPS を含めた根面性状の改善が酸化チタンには期待できると考えられる。

LPS は、酸化チタンの量に依存して分解され、象牙質のディスク上でも同様であった。象牙質の表層でも酸化チタンの光触媒作用が有効に働くことが示唆された。



**炎症性サイトカインで刺激したヒト歯根膜細胞由来の GDNF は PC12 の神経細胞分化を促進する**

<sup>1</sup>九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、<sup>2</sup>九州大学病院 歯内治療科、<sup>3</sup>九州大学病院 口腔総合診療科

○吉田晋一郎<sup>1</sup>、山本直秀<sup>1</sup>、和田尚久<sup>3</sup>、友清淳<sup>1</sup>、長谷川大学<sup>1</sup>、  
濱野さゆり<sup>1</sup>、祐田明香<sup>1</sup>、御手洗裕美<sup>1</sup>、杉井英樹<sup>1</sup>、前田英史<sup>1,2</sup>

**Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) from human periodontal ligament cells treated with proinflammatory cytokines promotes neurocytic differentiation of PC12 cells.**

<sup>1</sup>Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University,

<sup>2</sup>Department of Endodontology, Kyushu University Hospital, <sup>3</sup>Division of General Oral Care, Kyushu University Hospital  
○Shinichiro Yoshida<sup>1</sup>, Naohide Yamamoto<sup>1</sup>, Naohisa Wada<sup>3</sup>, Atsushi Tomokiyo<sup>1</sup>, Daigaku Hasegawa<sup>1</sup>,  
Sayuri Hamano<sup>1</sup>, Asuka Yuda<sup>1</sup>, Hiromi Mitarai<sup>1</sup>, Hideki Sugii<sup>1</sup>, Hidefumi Maeda<sup>1,2</sup>

【目的】歯根膜組織は豊富な感覚神経による支配を受けており、種々の侵害刺激や組織損傷への応答を示し、歯周組織の恒常性維持に重要な役割を持つと考えられている。Glial Cell-Line Derived Neurotrophic Factor (GDNF)は、種々の細胞に対して多様な生物学的活性を示すことが知られており、近年、組織修復や神経再生への関与が数多く報告されている。我々は以前、GDNF がヒト歯根膜細胞 (HPDLCs) に対して RGD 配列を含んだ細胞外マトリックスならびにインテグリン  $\alpha v \beta 3$  を介して走化性を誘導することを報告している (山本ら、第 133 回日本歯科保存学会)。しかしながら、GDNF の歯根膜組織における創傷治癒や神経再生に及ぼす影響については十分な説明がされていない。そこで本研究では、歯根膜組織の傷害部位における GDNF の発現解析、ならびに HPDLCs 由来の GDNF が PC12 細胞の神経細胞様細胞分化に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】(1) ラット歯根膜傷害モデル (SD ラット、5 週齢、雄性) の左側上顎臼歯部切片を用いて抗 GDNF 抗体、抗 IL-1 $\beta$  抗体による免疫蛍光染色を行った。(2) 本研究に同意が得られた 3 名の患者の抜去歯牙より歯根膜組織を採取し、培養して得られた細胞を本研究に用いた。HPDLCs を炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) で 24 時間刺激し、その培養上清中に含まれる GDNF タンパク濃度を ELISA 法を用いて解析した。(3) GDNF が PC12 細胞の神経細胞様細胞分化に及ぼす影響を検討するため、GDNF 含有培地に mouse control IgG または GDNF 中和抗体をそれぞれ 2 週間添加し、神経突起の伸長を検討した。さらに IL-1 $\beta$  で刺激した HPDLCs より得られた培養上清 (IL-1 $\beta$ -CM) を用いて同様の検討を行い、神経再生関連因子 (Gap-43 および Sprr1A) の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。

【結果】(1) 免疫蛍光染色の結果、傷害を与えたラット歯根膜周囲組織の創部近傍における歯根膜細胞は抗 GDNF 抗体および抗 IL-1 $\beta$  抗体に陽性反応を示した。(2) 炎症性サイトカインで刺激した HPDLCs 由来の GDNF 量は、非刺激群と比較して GDNF 発現が有意に増加した。(3) PC12 細胞における GDNF レセプター (GFR $\alpha 1$ 、RET および NCAM) の遺伝子発現を半定量的 RT-PCR 法を用いて確認した。GDNF で刺激した PC12 細胞では、非刺激群と比較して神経様突起の伸長が有意に促進し、神経細胞様細胞分化が促進した。この GDNF による効果は、GDNF 中和抗体により非刺激群と同程度まで抑制された。IL-1 $\beta$ -CM で刺激した PC12 細胞は、非刺激群と比較して神経細胞様細胞分化が有意に促進した。この IL-1 $\beta$ -CM による効果は、GDNF 中和抗体により非刺激群と同程度まで抑制された。2 週間培養後の PC12 細胞は、GDNF 刺激群ならびに IL-1 $\beta$ -CM 刺激群において、Gap-43 および Sprr1A の遺伝子発現が有意に上昇し、これらの効果は GDNF 中和抗体により非刺激群と同程度まで抑制された。

【考察】傷害を受けた歯根膜組織における歯根膜細胞は GDNF を発現し、さらに IL-1 $\beta$  で刺激したヒト歯根膜細胞由来の GDNF が PC12 細胞の神経細胞様細胞分化を促進したことから、GDNF は歯根膜組織において神経再生に機能的に作用する因子であることが示唆された。

【結論】(1) 傷害を受けたラット歯根膜組織における創部近傍の歯根膜細胞は、抗 GDNF 抗体および抗 IL-1 $\beta$  抗体に強い陽性反応を示す。(2) 炎症性サイトカインで刺激した HPDLCs は GDNF 発現を有意に上昇する。(3) IL-1 $\beta$  にて刺激した HPDLCs の培養上清を用いて培養した PC12 細胞では、神経細胞様細胞分化が有意に促進し、また Gap-43 および Sprr1A の遺伝子発現が有意に上昇する。

破骨細胞原性に対する IL-15 と RANKL の相乗効果について

○菊池毅<sup>1</sup>、岡部猪一郎<sup>1</sup>、相野誠<sup>1</sup>、神谷洋介<sup>1</sup>、藤村岳樹<sup>1</sup>、  
後藤久嗣<sup>1</sup>、岡田康佑<sup>1</sup>、黒須康成<sup>1</sup>、茂木眞希雄<sup>2</sup>、三谷章雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup>愛知学院大学歯学部歯周病学講座 <sup>2</sup>愛知学院大学薬学部生体機能化学講座

**IL-15 and RANKL play an synergistically important role in osteoclastogenesis.**

○KIKUCHI Takeshi<sup>1</sup>, OKABE Iichiro<sup>1</sup>, AINO Makoto<sup>1</sup>, KAMIYA Yosuke<sup>1</sup>, FUJIMURA Takeki<sup>1</sup>,  
GOTO Hisasi<sup>1</sup>, OKADA Kosuke<sup>1</sup>, KUROSU Yasunari<sup>1</sup>, MOGI Makio<sup>2</sup>, MITANI Akio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Aichi Gakuin University, School of Dentistry, Department of Periodontology

<sup>2</sup>Aichi Gakuin University, School of Pharmacy, Department of Medicinal Biochemistry

【目的】炎症性サイトカイン interleukin (IL)-15 は Periodontitis (PD) や Rheumatoid Arthritis (RA) の病態進行において重要な役割を担っていることが示唆されている。IL-15 は免疫細胞の活性化、増殖、生存に関与する事が示されているが、骨代謝に与える影響は不明な点が多い。そこで我々は IL-15 の receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) 誘導性破骨細胞分化ならびに活性化への影響について検討した。

【材料および方法】マウスマクロファージ様細胞株 RAW264 細胞 (RAW 細胞) をリコンビナントマウス RANKL (rmRANKL)、リコンビナントマウス IL-15 (rmIL-15) にて刺激を行い培養 3 日目に tartrate-resistant acid phosphate (TRAP)、receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)、matrix metalloproteinase (MMP-9)、Cathepsin K などの破骨細胞分化・活性化マーカーの遺伝子発現量を定量 PCR 法 (qPCR) にて測定した。また、RANK のタンパク発現をウェスタンブロッティング法にて検討した。さらに培養上清中の MMP-9、Cathepsin K 産生量を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法にて測定した。培養 5 日目に TRAP 染色を用いて、破骨細胞形成状態を多核の破骨細胞数の計測およびフュージョンインデックス (3 核以上の TRAP 陽性細胞数/全体の TRAP 陽性細胞数) で確認した。また、Hydroxyapatite resorption assay を用いて、破骨細胞の機能を確認するため吸収窩の数と面積について測定した。Extracellular signal-regulated kinase (ERK)、p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、Nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) などの破骨細胞分化に関する細胞内情報伝達因子のリン酸化についてウェスタンブロッティング法にて検討した。同細胞内情報伝達因子の特異的阻害薬を用い IL-15 の重要なシグナルカスケードの同定を一部行った。

【結果および考察】rmIL-15 単独刺激により破骨細胞形成数の増加を、わずかながらも認めた。rmIL-15 と rmRANKL の共刺激により rmRANKL 単独刺激時よりも統計的有意に TRAP、RANK、MMP-9、Cathepsin K の遺伝子発現量と破骨細胞形成数およびフュージョンインデックスの増加を認めた。また、Hydroxyapatite による吸収窩の数と面積の有意な増加を認めた。rmIL-15 刺激は、ERK のリン酸化亢進を強く誘導した。MEK1/2 を阻害する事により rmIL-15 による破骨細胞形成能が低下した。これらのことから、rmIL-15 は、単独でもわずかながら破骨細胞形成を誘導すること、rmIL-15 併用により rmRANKL 誘導性破骨細胞形成を有意に増強することおよび rmRANKL 誘導性破骨細胞機能の顕著な増強を誘導することが示唆された。また、rmIL-15 の作用に関して、ERK の細胞内情報伝達経路が非常に重要であることが示唆された。

【結論】

IL-15 は、RANKL 誘導性破骨細胞原性を相乗的に促進し、PD や RA のような炎症性骨吸収を伴う疾患において、重要な役割を担う可能性が示唆された。IL-15 の産生・機能を調節することで、これら疾患の病態を改善する可能性が考えられる。

## アメロチン遺伝子欠失マウスはエナメル質石灰化不全を呈する

日本大学松戸歯学部歯周治療学講座<sup>1</sup>, 日本大学松戸歯学部口腔科学研究所<sup>2</sup>  
○中山洋平<sup>1,2</sup>, 岩井泰伸<sup>1</sup>, 小方頼昌<sup>1,2</sup>

**Amelotin-deficient mice show enamel hypomineralization**  
Department of Periodontology<sup>1</sup>, Research Institute of Oral Science<sup>2</sup>,  
Nihon University School of Dentistry at Matsudo  
○Yohei Nakayama<sup>1,2</sup>, Yasunobu Iwai<sup>1</sup>, Yorimasa Ogata<sup>1,2</sup>

### 【研究目的】

アメロチン (AMTN) は、エナメル質形成の成熟期エナメル芽細胞から分泌され、成熟期エナメル芽細胞層内基底層および萌出後の歯肉付着上皮内基底層にその発現が認められるエナメルタンパク質である。概知であったアメロジェニン (AMEL), アメロブラスチン (AMBN) といったエナメルタンパク質とは発現時期および局在が異なるのが特徴である。しかし、エナメル質の形成、成熟および構造、歯周組織の発生および恒常性に対するアメロチンタンパク質の機能はまだ分かっていない。AMEL, AMBN などのエナメルタンパク質の遺伝子欠失および過剰発現マウスの研究が盛んに行われ、それらの表現型はいずれもエナメル質形成不全や石灰化不全を呈することが知られている。そこで今回、AMTN 遺伝子欠失マウス (ko マウス) の表現型を組織学的に分析し、エナメル質形成および成熟への影響を組織学的に分析し、考察したので報告する。

### 【材料および方法】

まず最初に、AMTN 遺伝子翻訳開始点を含む Exon2 を *LacZ/neo* 遺伝子に置換し、AMTN 遺伝子ヘテロマウス (het) を作成し、het マウス同志を交配させて AMTN ko マウスを得た。Genotyping は、マウスから抽出した DNA を用いて、サザンブロット解析および PCR 解析によって行った。Wild type (wt) マウスおよび AMTN ko マウスの下顎切歯を用いて、パラフィン包埋による脱灰組織切片を作製し、HE 染色法および免疫染色法により、組織学的差異および他のエナメルタンパク質の局在の差を調べた。さらに走化型電子顕微鏡分析 (SEM 分析) にて、矢状断および水平断方向の断面を観察することによって、エナメル質形成各段階におけるエナメル質の厚さおよびエナメル小柱構造を分析した。透過型電子顕微鏡分析 (TEM 分析) においては、水平断方向の断面を観察することによって、アメロチンタンパク質の局在するエナメル芽細胞層の内基底層を観察した。

### 【結果および考察】

AMTN ko マウスの下顎切歯は均一な灰白色を呈し、著しい咬耗を認めた。HE 染色法では、AMTN ko マウスの下顎切歯水平断切片のエナメル空隙に、エナメル基質が長期にわたり、エナメル質形成成熟期まで残存していた。免疫染色法において、AMEL, AMBN, エナメルリン (ENAM), オーダム (ODAM) およびマトリックスプロテアーゼ 20 (MMP20) の発現パターンは、wt および ko マウスにおいて差は認めなかったが、カリクレイン 4 (KLK4) の局在は、wt マウスと比較すると、ko マウスで遅延して認められた。SEM 分析の結果、HE 染色法の結果と同様に、AMTN ko マウスにおいて、エナメル質中にエナメル基質残存を認めた。さらに、エナメル質表層に近い小柱構造を比較すると、AMTN ko マウスは wt マウスに比べて、不均一な疎な構造を呈していた。また、TEM 分析では、AMTN ko マウスにおいて、エナメル質形成成熟期までに及んで、エナメル芽細胞基底層に沿ったエナメル基質の残存を認めた。エナメル芽細胞の形態的特徴に差を認めなかった。

これらの結果から、AMTN ko マウスのエナメル質は、エナメル基質の残存によるエナメル質石灰化不全を認め、それは、KLK4 の発現の変化によって引き起こされたエナメル基質のエナメル芽細胞への再吸収の遅延とエナメル質中の残存が関与していることが示唆された。

## 高グルコースはNF $\kappa$ B 経路を介してヒト歯根膜幹細胞の骨芽細胞分化を抑制する

<sup>1</sup>大阪歯科大学 歯周病学講座, <sup>2</sup>大阪歯科大学 口腔病理学講座  
○嘉藤弘仁<sup>1</sup>, 田口洋一郎<sup>1</sup>, 野口正皓<sup>1</sup>, 山内伸浩<sup>1</sup>, 富永和也<sup>2</sup>, 田中昭男<sup>2</sup>, 梅田 誠<sup>1</sup>

### High glucose concentration inhibits osteoblastic differentiation in human periodontal ligament stem cells through NF- $\kappa$ B signal pathway

Osaka Dental University, <sup>1</sup>Department of Periodontology, <sup>2</sup>Department of Oral Pathology  
○Hirohito Kato<sup>1</sup>, Yoichiro Taguchi<sup>1</sup>, Masahiro Noguchi<sup>1</sup>, Nobuhiro Yamauchi<sup>1</sup>, Kazuya Tominaga<sup>2</sup>, Akio Tanaka<sup>2</sup>, Makoto Umeda<sup>1</sup>

#### 【目的】

ヒト歯根膜幹細胞 (hPDLSCs) は歯周組織再生に重要な役割を担うことが明らかになってきた。糖尿病は高血糖状態が慢性化し、様々な臓器に障害を引き起こす疾患であり、糖尿病は歯周病の重要なリスクファクターのひとつであるともされている。また nuclear factor kappa b (NF- $\kappa$ B) は硬組織形成阻害に関与しており、糖尿病とも関係していると報告されている。しかし、糖尿病が歯周組織再生に及ぼす影響やその分子メカニズムは十分に解明されていない。そこで、本研究では4種のグルコース濃度に調整した培地を糖尿病モデルとして実験に使用し、hPDLSCsの細胞増殖と硬組織分化誘導の発現、NF- $\kappa$ B 経路への影響について検討を行った。

#### 【材料および方法】

hPDLSCs はヒト抜去歯の歯根膜より剥離・細切し、酵素処理により得られた初代培養細胞で、間葉系幹細胞マーカー (STRO-1, SSEA-4) の免疫組織化学的染色にて分離・同定を行った。hPDLSCs を4種のグルコース濃度 (5.5 mM, 8.0 mM, 12.0 mM, 24.0 mM) に調整した糖尿病モデル培地で培養し、細胞増殖、Runx2 mRNA の発現、Alkaline phosphatase (ALP) 活性、ALP 染色、Osteocalcin (OCN) 産生量、ギ酸抽出によるカルシウム析出量の測定、および Alizarin red 染色による石灰化物形成能について検討を行った。さらに western blot 法により I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B タンパク発現を検討し、糖尿病モデル培地によって誘導される NF- $\kappa$ B 経路の関与を検討した。また糖尿病モデル培地が NF- $\kappa$ B 経路に及ぼす影響について NF- $\kappa$ B 経路阻害剤 (BAY-117082) を用いて同様の実験を行い、検討を行った。なお、本実験は大阪歯科大学医の倫理委員会 (110764 号) の承認を得て行った。

#### 【結果】

- 1.細胞増殖能は培養開始 1, 3, 5, 7 日のいずれにおいても高グルコース群で有意に抑制された。
- 2.Runx2 mRNA の発現は培養開始 7 日において高グルコース群で有意に活性化された。
- 3.ALP 活性, ALP 染色は培養開始 14 日において高グルコース群で有意に抑制された。
- 4.OCN 産生量は培養開始 21 日において高グルコース群で有意に抑制された。
- 5.カルシウム析出量と石灰化物の形成量は培養開始 21 日において高グルコース群で有意に抑制された。
- 6.I $\kappa$ B $\alpha$ , NF- $\kappa$ B タンパク発現は高グルコース濃度群で有意に増強した。
- 7.BAY-117082 によって、高グルコース濃度による細胞増殖と骨芽細胞分化の抑制を有意に改善した。

#### 【考察】

以上の結果より、高グルコース濃度によって、hPDLSCs の細胞増殖、中期~後期の骨芽細胞分化を抑制し、NF- $\kappa$ B 経路を活性化させることが示唆された。また、高グルコース濃度による hPDLSCs の細胞増殖、骨芽細胞分化の抑制は NF- $\kappa$ B 経路によって制御されることが示唆された。したがって、糖尿病による高血糖状態は NF- $\kappa$ B 経路を介して、歯周組織の再生を阻害する可能性が示唆された。

## Osterix の下流にある ZBTB16 はヒト歯根膜由来間葉系幹細胞における 骨芽細胞分化を制御する

1: 東京医科歯科大学 歯周病学分野 2: 東京女子医科大学 先端生命医学研究所  
3: 東京大学医科学研究所 ヒトゲノム解析センター  
○鬼塚理<sup>1,2</sup>, 岩田隆紀<sup>2</sup>, 朴聖俊<sup>3</sup>, 中井謙太<sup>3</sup>, 大和雅之<sup>2</sup>, 岡野光夫<sup>2</sup>, 和泉雄一<sup>1</sup>

### Zinc finger and BTB domain containing 16 as a downstream target gene of Osterix regulates osteoblastic differentiation of human multipotent mesenchymal stromal cells

1: Department of Periodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences  
Tokyo Medical and Dental University  
2: Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University  
3: Human Genome Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo  
○Satoru Onizuka<sup>1,2</sup>, Takanori Iwata<sup>2</sup>, Sung-Joon Park<sup>3</sup>, Kenta Nakai<sup>3</sup>,  
Masayuki Yamato<sup>2</sup>, Teruo Okano<sup>2</sup>, and Yuichi Izumi<sup>1</sup>

【目的】間葉系幹細胞(MSCs)は骨芽細胞分化誘導培地(OIM)で培養することにより骨芽細胞へと分化することが知られている。その分化の過程に関してはさまざまな転写因子が関与していると考えられているが、未だそのメカニズムは不明な点が多い。そこで我々は次世代シーケンサーを用いて、ヒト歯根膜由来間葉系幹細胞(hPDL-MSCs)をOIMで培養した群と通常培地で培養した群とで網羅的遺伝子発現解析を実施し、誘導培地により発現が大きく変動した遺伝子を選別したところ、転写因子である zinc finger and BTB domain containing 16(ZBTB16)の発現がOIMにより著しく上昇していることがわかった。そこで本研究ではMSCsの骨芽細胞分化におけるZBTB16の役割と既知の遺伝子群との関連性を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】ヒトの抜去歯牙より歯根膜を採取し、酵素処理により単離したhPDL-MSCsを用いて実験を行った。3種類以上の異なる検体より得られたhPDL-MSCsは10%FBS含有 $\alpha$ -MEMにて培養され、継代数3から6の間で使用した。OIMは上記の培地に82 $\mu$ g/mLのL-ascorbic acid phosphate magnesium salt、10mmol/Lの $\beta$ -glycerophosphateと10nmol/Lのdexamethasoneを添加したものを使用した。ZBTB16の発現を調べるため、hPDL-MSCsを4,7,14日培養の後、qRT-PCR法とWestern blotting法を行った。次にsiRNA transfectionによりZBTB16の発現をノックダウンし、同遺伝子が骨芽細胞分化に及ぼす影響を、骨芽細胞分化マーカーであるAlkaline phosphatase(ALP)活性試験により確認した。siZBTB16によるhPDL-MSCsの石灰化結節形成の影響はAlizarin Red Sの染色により確認した。さらに骨芽細胞分化において重要な転写因子であるとされるOsterixをsiRNAによりノックダウンし、ZBTB16の発現を確認した。またChromatin immunoprecipitation(ChIP) assayによりOsterixとZBTB16との関連性を調べた。

【結果】hPDL-MSCsを通常培地で培養した際にZBTB16はmRNA、タンパク質の発現共に検出出来なかったが、OIMで培養した際には同遺伝子の発現を検出し、経時的にその発現は上昇した。さらにsiZBTB16をhPDL-MSCsに導入することで、コントロール群と比較してALP活性の低下と石灰化結節の形成低下を認めた。またsiOsterixを導入することでコントロール群と比較してZBTB16のmRNAとタンパク質の発現は著しく低下した。さらにOsterixの抗体を用いてChIP assayを行ったところ、OsterixはZBTB16のプロモーター領域に結合することが確認された。

【結論】今回の研究により、ZBTB16は分化誘導時に顕著に発現していること、またノックダウンすることにより骨芽細胞への分化が減少することから、OIMを用いた分化誘導において骨芽細胞分化を正に制御しており、また新たな骨芽細胞分化マーカーとなりうることが示唆された。さらにOsterixの発現が減少することで、ZBTB16の発現も減少することと、転写因子であるOsterixがZBTB16のプロモーター領域に結合することから、ZBTB16の骨芽細胞分化への影響はOsterixにより制御されていることが示唆された。

## 真菌由来代謝産物(+)-terrein は RANKL 誘導性破骨細胞分化を抑制する

<sup>1</sup>岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野, <sup>2</sup>岡山大学病院 歯周科

○中川沙紀<sup>1</sup>, 大森一弘<sup>2</sup>, 山本総司<sup>1</sup>, 小林寛也<sup>1</sup>, 後藤絢香<sup>2</sup>, 中村亜里紗<sup>1</sup>, 山本直史<sup>2</sup>, 高柴正悟<sup>1</sup>

(+)-terrein suppresses receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis

<sup>1</sup>Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, and <sup>2</sup>Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital, Okayama, Japan

○NAKAGAWA Saki<sup>1</sup>, OMORI Kazuhiro<sup>2</sup>, YAMAMOTO Satoshi<sup>1</sup>, KOBAYASHI Hiroya<sup>1</sup>, GOTO Ayaka<sup>2</sup>,  
NAKAMURA Arisa<sup>1</sup>, YAMAMOTO Tadashi<sup>2</sup>, TAKASHIBA Shogo<sup>1</sup>

### 【目的】

歯周炎は、歯槽骨を破壊する骨吸収性疾患であり、その罹患率の高さを考えると国民病の一つと言える。超高齢化社会を迎えた我が国において、口腔機能を維持することは健康寿命を延伸する上でとても大切である。そのためにも、成年期・高齢期における歯の喪失原因第1位である歯周炎の効率的な予防・治療法を開発することが求められ、感染と炎症を制御して歯周組織の破壊を抑制する薬剤の開発が継続している。

真菌の一つである *Aspergillus terreus* が産生する代謝産物(+)-terrein は、抗炎症効果を有することが示唆されている。我々は、歯肉線維芽細胞において、有機化学的に合成した(+)-terrein が炎症性サイトカインの一つである interleukin-6 (IL-6) の細胞内シグナル伝達を抑制し、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の産生をも抑制することを報告した (Mandai H, Omori K *et al.* *Bioorg Med Chem*, 2014)。IL-6 は歯周炎や関節リウマチといった炎症性骨吸収を主病態とする疾患の発症と進展に深く関与していることが報告されており、炎症性骨吸収の進行を抑制する上で非常に重要なターゲット因子の一つである。しかし、IL-6 の細胞内シグナル伝達を抑制する(+)-terrein が、炎症性骨吸収に関与する破骨細胞の分化に及ぼす影響は不明である。

本研究では、(+)-terrein が、receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) 誘導性の破骨細胞分化に及ぼす影響を、マウス骨髄由来マクロファージ様細胞 (mouse bone marrow-derived macrophages; mBMMs) を用いて検討した。

### 【材料および方法】

**細胞および培養:** 雄性マウス (BALB/c, 4~12 週齢) の大腿骨および頸骨から骨髄細胞を採取した。採取した骨髄細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS) およびマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF, 50 ng/ml) を含有する  $\alpha$ MEM (Invitrogen) を用いて、37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 存在下で3日間培養した。3日間の培養後、培養皿底面に付着した樹状様細胞を破骨細胞前駆細胞である mBMMs として、以後の実験に用いた。

**(+)-terrein の合成:** (+)-terrein は、Altenbach らの報告を一部改変し、有機化学的に合成したものを用いた。なお、合成した(+)-terrein の構造は、核磁気共鳴装置およびエックス線結晶解析装置を用いて解析し、天然由来の(+)-terrein と同じ構造であることを確認している (岡山大学大学院自然科学研究科 萬代大樹博士提供)。

**細胞毒性の検討:** (+)-terrein の mBMMs に対する細胞毒性の検討は、MTS assay を用いて評価した。すなわち、mBMMs を  $1.0 \times 10^4$ /well で 96well 細胞培養プレートに播種した後、(+)-terrein (0.001-1,000  $\mu$ M) を添加して24時間後の細胞活性を、市販の MTS アッセイキット (Promega) を用いて測定した。

**破骨細胞分化に及ぼす(+)-terrein の影響の検討:** mBMMs は  $2.0 \times 10^4$ /well で 48well 細胞培養プレートに播種した。そして、RANKL (100 ng/ml) および M-CSF (100ng/ml) を添加して破骨細胞分化を誘導した。この実験系に(+)-terrein (0.1-10  $\mu$ M) を、① RANKL と同時、② RANKL 添加の24 または 48 時間後、に作用させて、破骨細胞分化に及ぼす影響を検討した。破骨細胞分化への影響は、分化開始4日後の破骨細胞を酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色によって評価した。

**統計解析:** 各実験結果の差の検定には 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】

mBMMs に対して、(+)-terrein は以下の作用をもたらした。

1. 100  $\mu$ M 以上で、細胞活性を抑制した ( $p < 0.05$ )。
2. 10  $\mu$ M で RANKL と同時添加すると、破骨細胞分化を抑制した ( $p < 0.05$ )。
3. さらに、RANKL 誘導開始後 (24 および 48 時間後) においても、10  $\mu$ M で破骨細胞分化を抑制した ( $p < 0.05$ )。

### 【考察・結論】

(+)-terrein に RANKL 誘導性の破骨細胞分化を抑制する効果が有ることが示唆された。(+))-terrein には IL-6 の細胞内刺激伝達系を抑制する効果もあることから、慢性炎症と骨吸収を主病態とする歯周炎の治療薬または予防薬としての可能性が示唆された。

## 再構成歯胚を用いた接合上皮の起源の探索

昭和大学歯学部歯周病学講座  
○氷室 沙羅, 相澤 怜, 関 辰明, 山本 松男

### Reconfirmation of the origin of the junctional epithelium by using the bioengineered tooth germ

Department of Periodontology, Showa University School of Dentistry  
○Sara Yajima-Himuro, Ryo Aizawa, Tatsuki Seki, Matsuo Yamamoto

【背景】歯周病は、歯垢中に含まれるブラク細菌由来物質の刺激で歯周組織に炎症が惹起され、エナメル質に直接付着する接合上皮が破壊されることから発症する。接合上皮の起源については、口腔粘膜とはその由来が異なり、歯原性上皮由来であると推察されていたが、接合上皮は生体内で最も固いエナメル質近傍の極めて狭い空間に位置する上に、未だに特異的のマーカが明らかにされていないことから、詳細な解析は行われていないのが現状であった。そこで、我々は、東京理科大学総合研究機構辻研究室で開発された再構成歯胚技術を応用し(Nature Methods 2007 4:227-230, Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 106:13475-80)、歯原性上皮細胞のみを GFP で標識し、接合上皮の形成過程を観察することで、その起源を明らかとした。すなわち、GFP トランスジェニックマウスの歯原性上皮組織と同系野生型マウス間葉組織から歯胚を再構成し、同系成獣の口腔内に移植し、再構成歯の萌出過程を観察した。その結果、萌出した再構成歯の接合上皮部分のみが GFP 陽性となった。このことは、エナメル質を形成した歯原性上皮が口腔上皮と癒合し、1次接合上皮を形成することを直接示す根拠となった。(Sci Rep. 2014 4:4867)

【目的】今回、我々は、野生型マウス (WTマウス) の歯原性上皮組織と GFP トランスジェニックマウス (GFPマウス) の間葉組織から歯胚を再構成し、同系成獣の口腔内に移植し、再構成歯の萌出過程を観察することによって、接合上皮の起源が歯原性上皮由来であることを再確認することとした。

【材料および方法】WT マウス歯胚 (E15) より歯原性上皮組織を、GFP マウス歯胚 (E15) より間葉組織を採取し、組織再構成を行い、上皮が WT 由来、間葉が GFP (+) 由来のキメラ歯胚を作成した。この歯胚を、事前に上顎第一大臼歯を抜歯し、治癒を確認した GFP マウスの上顎第一大臼歯相当部に移植・萌出させた。その後、WT 細胞の局在を観察することにより、接合上皮の由来を追求した。さらに、天然歯の接合上皮と再構成歯胚由来の接合上皮で、機能的に差異があるか確認するため、天然歯の接合上皮で過去発現が確認されている S100A8 の発現を解析した。

【結果】移植後 50 日 (萌出完了) で、再構成歯が咬合面に達した。このとき形成されていた接合上皮は、WT 由来細胞で構成されており、GFP 陽性細胞を含めなかった。このことより、再構成歯由来の接合上皮は、歯原性上皮由来であることが示された。また、再構成歯、天然歯ともに、S100A8 は接合上皮の先端で発現が確認された。

【考察】以前より、接合上皮の起源は、歯原性上皮の一種である退縮エナメル上皮であると推察されていたが、歯原性上皮、接合上皮の特異的のマーカが存在しないため、これまで確定的な報告はなかった。本研究で我々が用いた再構成歯胚技術は、歯原性上皮のみをモニターすることが出来るため、本研究の目的を遂行するにあたり、非常に有効な手段であった。また、少なくとも接合上皮における S100A8 の発現において、天然歯と再構成歯で差異はなかった。しかし、これだけで、天然歯由来の接合上皮と再構成歯由来の接合上皮に構造的・機能的な変化が無いとは言い切れない。今後、さらなる詳細な解析が必要である。

【結論】再構成歯胚由来の接合上皮は、歯原性上皮由来である。

## 青色 LED 光が歯周病原細菌と歯肉線維芽細胞に与える影響

日本歯科大学生命歯学部 歯周病学講座  
○石黒一美, 大久保美佐, 倉治竜太郎, 藤田美也子, 沼部幸博

Effects of blue-light LED on gingival fibroblasts and periodontal bacteria  
Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University  
○Hitomi Ishiguro, Misa Okubo, Ryutaro Kuraji, Miyako Fujita, Yukihiro Numabe

### 【目的】

青色 LED (light emitting diode) 光は、殺菌作用を有することが知られている。歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (以下、*P. gingivalis*) は黒色色素産生菌であり、光感受性物質となるポルフィリン顆粒を有するため、光増感剤を併用せずに、青色 LED 光照射のみで殺菌効果が得られることが知られている。一方、強い青色 LED 光には視細胞障害作用を有していると報告されている。そこで、口腔内で安全に使用可能な照射条件を探索するため、青色 LED 光 (波長: 405nm) 照射による *P. gingivalis* 殺菌作用と歯肉線維芽細胞に対する細胞毒性を検討した。

### 【材料および方法】

#### 1. *P. gingivalis* の菌液調整

*P. gingivalis* (ATCC33277 株) は血液寒天培地にて嫌気培養後、コロニーを hemine / menadione 含有 Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地に移し、48 時間 嫌気培養した。その後、遠心分離して *P. gingivalis* を集菌し、PBS にて洗浄、光電比色計にて O.D. = 0.3 (測定波長: 600 nm) に調整したものを菌液として用いた。

#### 2. 歯肉線維芽細胞の培養

ヒト正常歯肉線維芽細胞株 (以下、Gin-1 (株) DS ファーマバイオメディカル) を使用した。Gin-1 を 96 well プレートに 1,500 cells/well になるよう播種し、10%FBS 添加 DMEM/F12 培地で 24 時間培養した。

#### 3. 青色 LED 光 (波長 405nm) の照射条件

照射出力 0.1、0.2、0.3 W として、それぞれ単位面積当たりのエネルギーが 10、20、30 J/cm<sup>2</sup> となるように照射時間を変え、9 通りの照射条件とした。

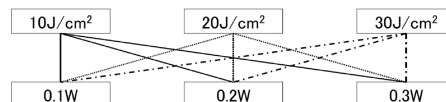


Fig.1 Irradiation conditions of blue-light LED

#### 4. *P. gingivalis* 殺菌能の評価方法

LED 照射後、希釈した菌液を血液寒天培地に塗布し、7 日間嫌気培養後にコロニー数を計測した。

#### 5. 細胞毒性の評価方法

LED 照射後 48 時間培養し、Cell Counting Kit-8 ((株) 同仁化学研究所) を用いて通法に従い評価した。すなわち、Cell Counting Kit-8 溶液を添加し、炭酸ガスインキュベータ内で 2 時間静置、マイクロプレートリーダーにて吸光度 (測定波長: 450 nm) を測定した。

#### 6. 統計学的解析

Mann-Whitney の U 検定を用い、有意水準 5% とした。

### 【結果】

#### 1. *P. gingivalis* の殺菌作用

すべての照射条件においてコロニー数が有意に減少し、青色 LED 光による殺菌作用が得られた。

#### 2. Gin-1 細胞に対する細胞毒性

20 J/cm<sup>2</sup>・0.3 W と 30 J/cm<sup>2</sup> ではすべての照射出力で生細胞数が減少し、細胞毒性が見られた。

### 【考察および結論】

青色 LED 光は光増感剤と併用しなくても *P. gingivalis* に対する抗菌作用を有している。しかしながら、照射出力、単位面積当たりのエネルギーが大きくなると細胞毒性が強くなることが明らかとなった。これらのことから、口腔内で用いる場合には安全性を考慮し、適切な照射条件を更に検討する必要があることが示唆された。



## ヒト口腔上皮細胞と歯肉線維芽細胞において低酸素環境が誘導する遺伝子発現の比較

徳島大学大学院医歯薬学研究部歯周歯内治療学分野

○木戸淳一, 板東美香, 中島由紀子, 梶浦由加里, 稲垣裕司, 生田貴久, 坂本英次郎, 成石浩司, 永田俊彦

### Comparison of hypoxia-induced gene expression in human oral epithelial cells and gingival fibroblasts

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School

○ KIDO Jun-ichi, BANDO Mika, NAKAJIMA Yukiko, KAJIURA Yukari, INAGAKI Yuji, SAKAMOTO Eijiro, NARUIISHI Koji, NAGATA Toshihiko

#### 【目的】

歯周ポケット内では嫌気性歯周病原細菌が生存することから低酸素環境であると考えられる。生体が低酸素環境に暴露されると Hypoxia-inducible factor (HIF) を介して炎症や血管新生などの反応が生じる。歯周ポケット周辺の組織中にも HIF が存在し、低酸素環境が歯周組織に対して炎症などの影響を及ぼしていると推察される。私たちは、低酸素環境と歯周病原細菌リポ多糖が、口腔上皮細胞において炎症関連因子や血管新生因子などの遺伝子発現を増加させることを報告した(平成 26 年度日本歯科保存学会春季学術大会)。しかしながら、歯周組織破壊が進行する過程で低酸素症の影響は結合組織にまで及ぶと考えられる。そこで本研究では、低酸素環境が口腔上皮細胞および歯肉線維芽細胞の遺伝子発現に及ぼす影響について比較検討を行った。

#### 【材料と方法】

ヒト口腔上皮細胞(TR146 細胞)および歯肉線維芽細胞を通常の条件でサブコンフレントまで培養し、その後低酸素環境下にて(1% O<sub>2</sub>)24 時間培養した。培養細胞から通法に従って RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ分析(Human Gene 1.0 ST Array: Affymetrix)および RT-PCR 分析を行い、低酸素環境による口腔上皮細胞と歯肉線維芽細胞での遺伝子発現の変化を比較検討した。

#### 【結果】

炎症関連遺伝子の IL6 では、低酸素環境によって線維芽細胞で発現が増加する一方、上皮細胞では逆に減少した。IL8 は、低酸素環境により上皮細胞で発現が増加し、線維芽細胞で減少した。また、TGFB や TNFA は上皮細胞で発現が上昇したが、線維芽細胞では変化は認められなかった。さらに、低酸素環境により上皮細胞で CCL20 や同 28 の発現が増加したが、IL1B および複数の CXCL は両細胞とも遺伝子発現の著しい変化は認められなかった。血管新生や拡張に関連する因子として、VEGFA は上皮細胞と線維芽細胞で低酸素環境によりその遺伝子発現が増加し、ADM(adrenomedullin)と ANGPTL4(angiotensin-like 4)は両細胞で発現増加がみられ、特に上皮細胞において著しい増加を示した。細胞接着関連因子では、低酸素環境により線維芽細胞の ICAM1 や ITGB8(integrin8)の発現の増加がみられ、上皮細胞では CLDN(cloudin)1 と同 16 の発現低下が認められたが、CDH(cadherin)群では両細胞において著しい発現変化はなかった。細胞外基質では、低酸素環境により上皮細胞の FN(fibronectin)と laminin(LAM)B3 の発現が軽度増加したが、COL(collagen)や TNC(tenascin C)の発現変化は上皮細胞および線維芽細胞ともに認められなかった。MMP, AST や cathepsin などの酵素の遺伝子については両細胞ともに低酸素環境による著しい発現変化は認められなかったが、グルコーストランスポーターの GLUT1 遺伝子(SLC2A1)は、両細胞において低酸素環境による発現増加がみられた。

#### 【考察】

低酸素環境は、血管関連因子については口腔上皮細胞と歯肉線維芽細胞で類似した遺伝子発現の増加を引き起こすが、炎症や組織破壊については異なる遺伝子発現調節を介して誘導する可能性が示された。歯周病において低酸素環境は、歯周ポケット周辺の複数の細胞に対して、複雑な反応と経路を介して歯周病病態に影響を及ぼしていると考えられる。

## 歯周炎と血液・尿中バイオリジカルマーカーとの関連解析

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野<sup>1</sup>, 口腔保健学分野<sup>2</sup>

○中島 麻由佳<sup>1,2</sup>, 多部田 康一<sup>1</sup>, 宮内 小百合<sup>1</sup>, 杉田 典子<sup>1</sup>, 小松 康高<sup>1</sup>, 本田 朋之<sup>1</sup>,  
高橋 直紀<sup>1</sup>, 宮澤 春菜<sup>1</sup>, 有松 圭<sup>1</sup>, 皆川 高嘉<sup>1</sup>, 松田 由実<sup>1,2</sup>, 佐藤 圭祐<sup>1,2</sup>,  
山崎 和久<sup>2</sup>, 吉江 弘正<sup>1</sup>

### Clinical analysis of the relationship between periodontitis and Biological markers

Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science<sup>1</sup>,

Laboratory of Periodontology and Immunology, Division of Oral Science for Health Promotion<sup>2</sup>,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Nakajima M<sup>1,2</sup>, Tabeta K<sup>1</sup>, Miyauchi S<sup>1,2</sup>, Sugita N<sup>1</sup>, Komatsu Y<sup>1</sup>, Honda T<sup>1</sup>, Takahashi N<sup>1</sup>, Miyazawa H<sup>1</sup>,  
Arimatsu K<sup>1</sup>, Minagawa T<sup>1</sup>, Matsuda Y<sup>1,2</sup>, Sato K<sup>1,2</sup>, Yamazaki K<sup>2</sup>, Yoshie H<sup>1</sup>

#### 【研究背景および目的】

歯周炎罹患に伴う局所の炎症応答及び全身的な応答を反映して、炎症性サイトカイン等のバイオリジカルマーカーが変動することが報告されている。また、特に血中バイオリジカルマーカーは歯周炎と糖尿病、動脈硬化性疾患等の全身疾患との関連において、バイオリジカルマーカー自体が生体分子として機能することで疾患の発症や進行に関与する可能性が示唆されている。歯周病の検査において、バイオリジカルマーカーの検査を応用することは、歯周炎に伴う生体応答を定量的に評価できるだけでなく、全身疾患のリスク評価をも可能とし、全身への影響を考慮した治療方針の立案・選択に有用な情報をもたらす可能性を持つ。さらに、バイオリジカルマーカーはその検査の簡便性から歯科医の検査によらない歯周炎罹患のスクリーニング等への応用も期待される。

そこで今回、一般健診項目に加えて新たなバイオリジカルマーカー群と歯周病検査結果との関連解析を行い、歯周炎罹患と関連するバイオリジカルマーカーの検索を行った。

#### 【材料および方法】

被検者は、企業健診において本研究に同意を得た男性 109 人を対象とした。一般健診項目のための問診・採血・採尿を実施後、歯周病検査・縁下プラーク及び唾液サンプルの採取を行った。縁下プラークは歯周病検査における Probing Depth (PD) の最深部を対象として 45 号のペーパーポイント (2 本) を用いて採取した。唾液は、検査用ガムを 5 分間咀嚼した刺激時唾液を 1ml 採取した。

被検者を PD4mm 以上の部位を有する Periodontitis 群と全歯 PD3mm 以下である Healthy 群に分類し、各群における血液・尿中マーカー及び縁下プラーク・唾液中の細菌検出率等に関して比較を行った。また、血液・尿中バイオリジカルマーカーと歯周病検査・細菌検査値等との相関分析を行った。統計分析には、対応のない t 検定または Welch の t 検定、Pearson の積率相関を用いた。

#### 【結果と考察】

Periodontitis 群と Healthy 群において年齢・BMI・喫煙状況について有意差は認められなかった。Healthy 群と比較して、Periodontitis 群の血液バイオリジカルマーカーでは酸化 Low Density Lipoprotein (LDL)<sub>2</sub>-small dense LDL, 高感度 CRP に加えて LDL 受容体分解因子である Proprotein Convertase Subtilisin Kexin 9 (PCSK9) が有意に上昇していた。尿中マーカーでは慢性腎臓病患者において尿細管機能障害の診断に用いられる β2-microglobulin/Creatinine (β2-MG/Cre), α1-MG/Cre, N-acetyl-β-D-glucosaminidase/Cre, Liver-type Fatty Acid Binding Protein/Cre 等のマーカーが有意に上昇した。また、PCSK9 と Bleeding on Probing (BOP) 陽性率及び平均 PD, α1-MG/Cre と平均 PD に有意な相関が認められた。さらに、PCSK9 濃度を指標として歯周炎罹患の有無について ROC 曲線を作成すると、従来の口腔細菌検査及び血清中細菌抗体価よりも高い Area Under the Curve (AUC=0.754) が得られた。

#### 【結論】

歯周炎罹患と関連する血液・尿中バイオリジカルマーカーが存在する。歯周炎による全身応答の評価及び歯周炎罹患を反映する血中バイオリジカルマーカー開発の可能性が示唆された。

### 高精細多孔チタン膜による顎骨増生に関する研究

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野<sup>1)</sup>口腔機能形態学講座総合歯科診療部<sup>2)</sup>、福島県立医科大学附属病院歯科口腔外科<sup>3)</sup>、東北大学大学院歯学研究科口腔機能形態学講座口腔システム補綴学分野<sup>4)</sup>

○石幡浩志<sup>1)</sup>、遠藤直樹<sup>2)</sup>、須藤瑞樹<sup>1)</sup>、向阪幸彦<sup>1)</sup>、小松秀裕<sup>1)</sup>、丸山顕太郎<sup>1)</sup>、遠藤 学<sup>3)</sup>、佐々木啓一<sup>4)</sup>、長谷川 博<sup>3)</sup>

#### Guided bone regeneration by using precision microperforated titanium membrane

Division Periodontology and Endodontology<sup>1)</sup>, Comprehensive Dentistry<sup>2)</sup>, Advanced Prosthetic Dentistry<sup>4)</sup>, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Department of Dentistry and Oral Surgery, Fukushima Medical University Hospital<sup>3)</sup>

○Hiroshi ISHIHATA<sup>1)</sup>, Naoki ENDO<sup>2)</sup>, Mizuki SUTO<sup>1)</sup>, Yukihiko SAKISAKA<sup>1)</sup>, Hidehiro KOMATSU<sup>1)</sup>, Kentaro MARUYAMA<sup>1)</sup>, Manabu ENDO<sup>3)</sup>, Keiichi SASAKI<sup>4)</sup> and Hiroshi HASEGAWA<sup>3)</sup>

【緒言】骨増生術(GBR)において、移植骨の固定・維持にチタンメッシュが用いられている。一方で、チタン材表面に細胞オーダーの微細トポグラフィーを構築して、細胞付着を促進している。本研究は微細貫通孔を高密度に形成したチタン薄板の生物学的効果を検証すると共に、この新規材料をGBRに適用した際の有用性を評価した。

【材料と方法】超短パルスレーザー加工法により、厚さ20 $\mu$ mの純チタン製薄板に、孔径20 $\mu$ mの小孔を、40000個/cm<sup>2</sup>(孔間距離50 $\mu$ m)の密度で形成、実験群として供した。コントロールとして、Frios<sup>®</sup> Boneshield (FBS: DENTSPLY社、厚さ20 $\mu$ m、孔径40-60 $\mu$ m、孔間距離250 $\mu$ m以上)を用いた。各材料にMC3T3-E1(マウス頭蓋冠由来)細胞を播種して3日、および1週間培養、材料表面上における細胞付着・増殖能についてSEM像による観察を行った。次に動物試験を東北大学動物実験専門員会の承認の下で実施した。ビーグル犬(雄:14M, n=2)に対し塩酸メドミジンおよびミダゾラム併用、筋肉内投与にて鎮静後、人工呼吸下にてイソフルラン0.5~5.0%により麻酔状態を維持した。左右下顎第4小白歯を抜歯後、近遠心径10mm、高さ8mm、頬舌幅5mmの歯槽骨欠損窩洞を作製した。腸骨より自家骨を採集、ボーンミルにて粉碎し顆粒状にした自家骨を左右の窩洞に填入した左右部位を実験群とFBSで各々被覆した上、チタンスクリューで固定した。術後16週目に動物を安楽死した上で、填入部位を含む顎骨を摘出し固定、マイクロCTによる断層画像を取得したのち、ピラヌエバ染色により組織標本作製、骨再生効果について検討した。

#### 【結果】

3日間培養後におけるSEM像では、実験群、コントロールとも材料上に多数の細胞が存在していたが、実験群では貫通孔をアンカーとして細胞体を付着する特徴が観察された。1週間後では、実験群では夥しい数の細胞が付着し、貫通孔を横断あるいは孔内に遊走した細胞が観察された。コントロールでは付着細胞数の大幅な増加は認められず、専ら貫通孔の辺縁に付着するのが特徴であった。動物試験では剖検時において両群とも移植した自家骨の定着が認められた。移植創とチタン膜の癒着は見られなかった。実験群では移植骨による増生ボリュームが概ね維持され、血流を伴う良好な骨質が認められた。コントロールでも移植骨による骨増生が認められたが、1例ではチタン膜の変形による歯槽粘膜の裂開が生じ、骨増生量の減衰が認められた。X線像では、実験群における骨増生部は骨稜と骨髄の形成による改質が進捗している一方、コントロールでは受容創と移植骨との一体化が認められるものの、実験群と比べると増生量はやや少なく、骨移植部の骨稜形成は途上であることが認められた。組織像では実験群にて新生骨形成に伴う外縁部の皮質化と骨髄様構造の形成が明瞭であった一方、コントロールでは移植骨の残遺が見られ、実験群に匹敵する明瞭な骨稜改質には至らなかった。

#### 【考察】

GBRの際に広く用いられるチタンメッシュは、移植骨を長期にわたり安定して維持できる利点がある一方、撤去時において周囲組織との癒着が避けられない。また、栄養透過性を有するポリマー製のバリアメンブレンは長期間の使用が困難なため、規模の大きい骨増生には適用が困難である。本研究で開発された材料は良好な栄養透過性と組織バリア機能の両立を目指したものであり、GBRにおける長期安定性を有しながら、撤去時における組織癒着を抑制する効果が期待されている。本実験では既に臨床応用されているチタン膜(Frios<sup>®</sup> Boneshield)と同様の使用法で、自家骨移植によるGBRに有効であることが示された。実験群において骨増生の成績がコントロールより優勢であったのは、開発品の貫通孔密度が大きく上回ることに加え、微細トポグラフィーによる細胞付着の促進効果が顕れたためと思われる。コントロールでは、GBR手術後に被験動物の咀嚼によってチタン膜の変形が生じた事例が見られた一方、開発品には、スペースメイキングの際に形状が維持されるよう、純チタンフレーム補強が講じられていたことで、咀嚼に伴う外力に対し、骨増生ボリュームをある程度維持する耐久性を保持していたと考えられる。

【結論】開発した多孔純チタン膜は、GBRへの適用が有効であると思われる。

## S-PRG フィラー抽出液由来イオンによるマウス歯周炎モデル抑制機構の解析

東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野  
○小林 洋子、兼平 正史、半田 慶介、齋藤 正寛

### TOF-SIMS Analysis of the Ligature-induced Mouse Periodontitis Model treated with S-PRG Filler Eluate

Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry  
○IWAMATSU-KOBAYASHI Yoko, KANEHIRA Masafumi, HANDA Keisuke and SAITO Masahiro

#### 【研究目的】

抗菌性歯科材料を用いて口腔内の細菌活性を抑制することで、う蝕および歯周炎の予防を目指した保存治療技術が開発されている。これらの歯科材料の中でも S-PRG フィラー(松風社製)は、コンポジットレジンなどに配合することにより、フッ素、ストロンチウム、ボロン、ナトリウム、アルミニウム、ケイ素イオンを徐放・再取り込みが可能であり、プラーク形成の阻害や歯周病原菌 (*P. Gingivalis*, *F. Nucleatum*) の活性化を抑制することが知られている。

我々はこれまで、マウス第二臼歯に結紮を行うことで迅速な骨吸収を伴う歯周炎モデルを用いて、S-PRG フィラー抽出液による *in vivo* での歯周炎予防効果について報告した(第141回日本歯科保存学会、2014)。本研究では、S-PRG フィラー由来イオンの歯周炎抑制機構を解析する目的に、飛行時間型質量分析計(TOF-SIMS)を用いて S-PRG フィラー抽出液中に含まれるイオンがどのように歯周組織内に分布しているかについて検討したので報告する。

#### 【材料および方法】

①S-PRG フィラー抽出液の作製：S-PRG フィラー抽出液は、等量の蒸留水中で24時間、室温にて攪拌した後、濾過ならびに遠心により上清を分離することで作製した。

②マウス歯周炎モデル：生体内で歯周炎を再現するために、生後8週齢のC57BL/6マウス下顎第二臼歯歯肉溝に全身麻酔下で実体顕微鏡を用いてS-PRG フィラー抽出液を浸漬した5-0絹糸(フィラー糸)を挿入・結紮し、さらに術後4、8、12日にS-PRG フィラー抽出液をフィラー糸に滴下した。コントロール群では、S-PRG フィラー抽出液浸漬なしの絹糸(普通糸)を用い、抽出液の滴下は行わなかった。手術14日後に屠殺、下顎骨を摘出し、マイルドホルムにて固定を行った。

③試料作成：摘出した下顎骨は非脱灰のまま樹脂包埋し、下顎第二臼歯の近遠心根が露出するまで研削したのち、耐水研磨紙#1200を用いて研磨した。

④TOF-SIMS分析：TOF.SIMS5(ION-TOF GmbH)を用いてBunching mode(High mass resolution mode)で組織上のイメージング分析を行った。一次イオン種には発生量の多いBi<sup>+</sup>を選択し、エネルギー：25keV、電流：1.25pA、分析範囲：500×500um<sup>2</sup>と設定した。また、チャージ補正用電子銃を併用し、金属イオンのイオン化率を上げるため、02ページを行いながら分析した(真空度2.0E-6mbar)。

#### 【結果】

①TOF-SIMS分析によりM2歯根周囲の組織上で、S-PRG フィラーに含まれる6つのイオンの解析が可能であった。特にストロンチウムイオンは硬組織に分布がみられ、ナトリウムイオンは主に歯根膜中に分布していた。ボロンイオン、アルミニウムイオンならびにケイ素イオンは硬組織・軟組織ともに散在性に分布していた。

②マウス歯周炎モデルにおいて歯槽骨吸収に差のみられたM2周囲ならびにM2分岐部において、S-PRG フィラー抽出液を浸漬した糸で結紮した群では、コントロール群と比べて、ボロンイオンのシグナル分布の範囲が広がった。

【考察】本研究では、非脱灰研磨標本のTOF-SIMS分析によりS-PRG フィラー抽出液に含まれる各種イオンの解析が可能にした。また、マウス歯周炎モデルにおいてボロンイオンの分布に差が見られたことから、歯槽骨吸収抑制機構に同イオンが関与している可能性が示唆された。今後さらに、各種イオンの定量化ならびに歯周炎モデルを引き起こす細菌叢に対するS-PRG フィラーの影響の解析等が必要であると考えられる。

【結論】S-PRG フィラー抽出液由来金属イオンは歯周組織の硬組織および軟組織に取り込まれ、抗菌効果を発揮している可能性が示された。

## 組織再生用ナノ酸化グラフェンスキャフォールドによる骨新生効果

<sup>1</sup>北海道大学大学院歯学研究科歯周・歯内療法学教室, <sup>2</sup>北海道大学大学院歯学研究科学術支援部  
<sup>3</sup>北海道大学大学院医学研究科組織細胞学分野

○西田絵利香<sup>1</sup>, 宮治裕史<sup>1</sup>, 滝田裕子<sup>2</sup>, 岩永敏彦<sup>3</sup>, 加藤昭人<sup>1</sup>, 川浪雅光<sup>1</sup>

### Bone inductive effect of nano-graphene oxide scaffold for tissue regeneration.

<sup>1</sup>Department of Periodontology and Endodontology, <sup>2</sup>Support Section for Education and Research, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine. <sup>3</sup>Laboratory of Histology and Cytology, Hokkaido University Graduate School of Medicine.

○Erika NISHIDA<sup>1</sup>, Hirofumi MIYAJI<sup>1</sup>, Hiroko TAKITA<sup>2</sup>, Toshihiko IWANAGA<sup>3</sup>, Akihito Kato<sup>1</sup>  
and Masamitsu KAWANAMI<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

厚さ 1 ナノメートルの単層カーボンシートであるナノ酸化グラフェン (GO) は、電気的特性、タンパク吸着性等の理工学的特性を有しており、近年では様々な生物学的特性も報告され、歯周組織等の再生医療分野への応用が期待されている。そこで我々は GO を用いた組織再生用スキャフォールドを作製、その生物学的特性評価と、イヌ抜歯窩モデルにおいて骨新生効果を検討した。

#### 【材料および方法】

Hummers-Offeman 法によるグラファイトの酸化と化学的剥離により作成した GO (nanoGRAX(R), 三菱ガス化学)と、N-メチルピロリドンを用いて nano-GO 分散液を作製した。GO スキャフォールドは、コラーゲンスキャフォールド (テルダーミス(R), オリンパスステルモバイオマテリアル) に GO 分散液を浸透させ、溶媒を除去洗浄することで作成した。GO の付着量は 1.4~2.2wt%の濃度範囲で設定した。SEM 観察, 圧縮強度試験, コラゲナーゼ耐性試験, カルシウム吸着試験, MC3T3-E1 細胞を用いた細胞培養試験で GO スキャフォールドの特性評価を行った。次にラット結合組織内へ埋植して生体親和性試験を行った。ラットへの埋植後 10 日目の炎症反応を観察するとともに、GO スキャフォールドへの細胞や組織のイングロースを DNA 量測定並びに免疫組織学的染色にて評価した。またビーグル犬の前臼歯部抜歯窩に GO スキャフォールドを埋入後、2 週間後の骨新生について組織学的に評価した。なお動物実験は北海道大学動物実験委員会の審査承認を受けて行った (北海道大学動物実験委員会, 承認番号 13-76)。

#### 【結果と考察】

SEM 観察の結果、GO はコラーゲンスキャフォールドの線維表面に薄く均一に付着しており、スキャフォールドの構造や内部空間は十分に維持され、高気孔性を維持していた。GO 分散液の濃度依存性に GO スキャフォールドの圧縮強度、コラゲナーゼ耐性およびカルシウム吸着量が増加した。細胞培養試験において、GO スキャフォールドはコントロール (テルダーミス) に比較して有意な細胞増殖効果を示した。

ラットにおける生体親和性試験の結果、GO スキャフォールドはペルオキシターゼ染色で陰性であり、活発な細胞のイングロースを認め、スキャフォールドに含まれる DNA 量は GO 濃度依存性に上昇した。コントロールではイングロースはほぼ生じなかった。免疫染色の結果、GO スキャフォールド内部にはマクロファージ、線維芽細胞がイングロースしており、血管平滑筋細胞、血管内皮細胞による管腔構造も認め、血管新生が起きていると考えられた。細胞や血管のイングロースはスキャフォールドの生体埋入後の自己組織化に有効であると思われた。

イヌ抜歯窩に埋入した結果、GO スキャフォールドでは抜歯窩内に多くの骨新生を認めた。一方コントロールでは抜歯窩の大部分は結合組織で満たされていた。新生骨形成率は GO スキャフォールドで 37%、コントロールで 3%であり、約 12 倍であった。抜歯窩に GO スキャフォールドを埋入することで生体活性が向上して、骨新生のための自己組織化が促進されたと考えられた。

【結論】 GO スキャフォールドは良好な生物学特性を有しており、抜歯窩へ埋入すると骨新生を促進した。

## ダイレクト・コンバージョンによる機能的なヒト骨芽細胞の創出

京都府立医科大学大学院医学研究科歯科口腔科学<sup>1)</sup>

京都府立医科大学大学院医学研究科免疫学<sup>2)</sup>

○山本健太<sup>1,2)</sup>、山本俊郎<sup>1)</sup>、佐藤良樹<sup>1,2)</sup>、大迫文重<sup>1)</sup>、雨宮傑<sup>1)</sup>、金村成智<sup>1)</sup>

## Direct conversion of human fibroblasts into functional osteoblasts

Department of Dental Medicine<sup>1)</sup> and Immunology<sup>2)</sup>,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

○Kenta Yamamoto<sup>1,2)</sup>, Toshiro Yamamoto<sup>1)</sup>, Yoshiki Sato<sup>1,2)</sup>, Fumishige Oseko<sup>1)</sup>,  
Takeshi Amemiya<sup>1)</sup>, and Narisato Kanamura<sup>1)</sup>

### 【目的】

歯周病に伴う歯槽骨吸収による歯牙の喪失、顎骨内腫瘍や顎骨壊死に対する手術後の著しい顎骨欠損などは、患者のQOLとADLを著しく低下させる。骨芽細胞は骨形成を担い、骨組織再生に寄与する細胞である。もし同部位に患者由来の骨芽細胞を体細胞より効率良く誘導し骨病変部に移植することが出来れば、これら疾患に対する効果的な治療法となりうると思われる。自家骨芽細胞は、現状では間葉系幹細胞(MSC)から誘導することができるが、細胞採取に侵襲を伴い、また得られる幹細胞数が不十分な例が多い。一方、最近になって心筋細胞、軟骨細胞などが、線維芽細胞からiPS細胞を経由することなく直接誘導(ダイレクト・リプログラミングまたはダイレクト・コンバージョン)できることが示された。そこで本研究では、細胞採取が容易な体細胞であるヒト線維芽細胞より機能的な骨芽細胞の直接誘導を試みた。

### 【材料および方法】

ヒト線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて数種の転写因子の遺伝子(Runx2, Osterix, Oct4, L-MycまたはOct4, L-Myc)を導入し、石灰化誘導培地にて培養した。得られた細胞の性質を、石灰化基質産生能(Alizarin Red S染色, von Kossa染色)、骨芽細胞関連遺伝子発現(Real-time RT-PCR、DNAマイクロアレイ)、骨芽細胞特異的タンパク質発現(免疫蛍光染色)にて*in vitro*での評価を行った。また一過性の導入遺伝子発現による直接誘導の可否についてドキシサイクリンドライブシステムを用いて検討するとともに、誘導細胞が直接誘導であるかどうかを多能性マーカーであるNanogの発現を観察すること(Real-time RT-PCR、免疫蛍光染色)で確認した。

さらに、得られた誘導細胞を、免疫不全マウスの人為的骨欠損部位へ移植した。移植部位大腿骨を取り出した後、 $\mu$ CT撮影および組織切片作成を行い、*in vivo*における骨形成能も検討した。

### 【成績】

誘導した細胞は、骨芽細胞特異的遺伝子およびタンパクを強力に発現しており、石灰化基質の産生を行うとともに、正常骨芽細胞に類似した遺伝子発現プロファイルを示した。そしてその誘導効率は約80%とかなりの高効率を示した。また誘導した細胞を移植した群では、線維芽細胞を移植した群と比べ、骨欠損部に顕著な骨再生が観察された。なお、誘導過程において多能性マーカーを発現することはなく、一過性の導入遺伝子発現によっても骨芽細胞は誘導されることも示された。

### 【考察および結論】

ヒト骨芽細胞の直接誘導はこれまでに報告がなく、今技術の確立は極めて独創的かつ先進的なものである。今後この技術を発展させることで新規骨再生療法の一つとなり得る可能性が考えられる。また本研究の成果は、再生医療への応用のみならず、研究用骨芽細胞として用いることで、さまざまな骨疾患を対象とした、発症・進展機序の解明、薬剤の副作用解析、新規薬剤の開発などの用途にも有用であろうと考えられた。

## IL-6 レセプター阻害による関節リウマチ患者の歯周炎症の改善

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野<sup>1</sup>

新潟大学医歯学総合病院 歯科総合診療部<sup>2</sup>

○小林哲夫<sup>1,2</sup>、小島杏里<sup>1</sup>、島田惇史<sup>1</sup>、吉江弘正<sup>1</sup>

### Interleukin-6 receptor blockade ameliorates periodontal inflammation in patients with rheumatoid arthritis

Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences<sup>1</sup>

General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital<sup>2</sup>

○Tetsuo Kobayashi<sup>1,2</sup>, Anri Kojima<sup>1</sup>, Atsushi Shimada<sup>1</sup>, Hiromasa Yoshie<sup>1</sup>

#### 【目的】

関節リウマチ (RA) 患者では歯周炎の罹患率は健常者と比べて高いことが知られている。RA と歯周炎は病態が類似しており、共通する病因の1つにインターロイキン 6 (IL-6) の過剰産生が示唆されている。近年、IL-6 レセプター (IL-6R) 阻害薬トシリズマブ (TCZ) により RA の臨床的改善が認められることが多数報告されてきている。演者らは、これまでに、TCZ 投与中の RA 患者では対照 RA 患者と比べて歯周組織の炎症・破壊レベルが減少することを報告した (*J Periodontol* 2014)。しかしながら、TCZ 投与前後において歯周組織状態を経時的に観察した報告は未だない。そこで今回、歯周炎を併発している RA 患者を対象に、TCZ 投与前後における歯周臨床指標、RA 指標、血清サイトカイン濃度、および血清炎症マーカーについて比較・検討を行った。

#### 【材料および方法】

1. 対象：新潟大学歯学部倫理委員会・新潟県立リウマチセンター倫理委員会の承認のもと、同センターを受診し、インフォームドコンセントが得られ、TCZ 投与予定の歯周炎併発 RA 患者 20 名を対象とした。
2. プロトコール：投与直前 (ベースライン) と投与 3、6 カ月後に、歯周検査、RA 検査ならびに血清検査を行った。
3. 検査：歯周検査では、歯肉炎指数 (GI)、プロービング時出血 (BOP)、プロービング深さ (PD)、臨床的アタッチメントレベル (CAL)、RA 検査として、疾患活動度 (DAS28)、疼痛・腫脹関節数、Visual Analogue Scale (VAS)、血清検査として、リウマトイド因子 (RF)、抗環状化シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体)、C 反応性蛋白 (CRP)、マトリックスメタロプロテアーゼ-3 (MMP-3)、IL-6、可溶性 IL-6R (sIL-6R)、可溶性 glycoprotein 130 (sgp130)、TNF- $\alpha$ 、IL-17、免疫グロブリン G (IgG)、serum amyloid A (SAA) の血清濃度を各々 ELISA 法にて測定した。
4. 統計解析：Friedman test、Wilcoxon signed rank test にて統計解析し、 $P < 0.01$  にて有意差ありとした。

#### 【結果および考察】

研究期間中、対象者の口腔内・RA 状態で副作用は認められなかった。ベースラインと比べて TCZ 投与 3、6 カ月後にプラークコントロールレベルは同等で RA 投薬も一定であったにもかかわらず、GI、BOP、PD、CAL、DAS28、RF 濃度、抗 CCP 抗体濃度、CRP 濃度、MMP-3 濃度、TNF- $\alpha$  濃度、IgG 濃度、SAA 濃度が各々有意に低下した。一方、IL-6 濃度は 3 カ月後に、sIL-6R 濃度は 3、6 カ月後に各々有意に増加したが、sgp130 濃度と IL-17 濃度は一定であった。したがって、TCZ 投与により血清中の IL-6 および sIL-6R 濃度は一時的に増加するものの、TCZ と sIL-6R の複合体の過飽和により IL-6 trans-signaling が抑制され、その結果、他の炎症マーカー濃度が減少し、歯周組織の炎症や RA 活動度の改善もたらされたことが考えられる。歯周局所の炎症への影響については歯肉溝浸出液を解析しておらず、今後の検討課題である。

#### 【結論】

TCZ 投与により RA 患者の歯周組織の炎症は改善することが示唆された。

会員外共同研究者：中園 清博士、村澤 章博士、伊藤 聡博士、小林大介博士 (新潟県立リウマチセンター)

## S-PRG フィラーの生体活性を有する歯科材料への応用のための細胞生物学的評価

1) 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯冠修復学

2) 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

○新谷耕平<sup>1)</sup>, 川木晴美<sup>2)</sup>, 森田侑宜<sup>1)</sup>, 玄 太裕<sup>1)</sup>, 近藤信夫<sup>2)</sup>, 堀田正人<sup>1)</sup>

### Cell based evaluation of S-PRG filler for application to the bioactive dental materials

1) Department of Operative Dentistry 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

○SHINTANI KOHEI<sup>1)</sup>, KAWAKI HARUMI<sup>2)</sup>, MORITA YUKI<sup>1)</sup>, GEN TAIYU<sup>1)</sup>, KONDOH NOBUO<sup>2)</sup>, HOTTA MASATO<sup>1)</sup>

#### 【研究目的】

S-PRG (surface pre-reacted glass ionomer) フィラーは、表層から表面改質層、ガラスアイオノマー相、ガラスコアの3層構造からなる白色のフィラーである。このフィラーのガラスアイオノマー相からはフッ化物イオン (F<sup>-</sup>) をはじめ、ストロンチウム (Sr<sup>2+</sup>)、ナトリウム (Na<sup>+</sup>)、アルミニウム (Al<sup>3+</sup>)、ホウ酸 (BO<sub>3</sub><sup>3-</sup>)、ケイ酸 (SiO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) 等の種々のイオンが放出される特性をもつ。これら、放出されるイオンの効果により抗菌性や歯質再石灰化等の効果が報告されつつある。そこで我々はこの特性を発揮する新たな歯科材料を開発するために、S-PRG フィラーより各種イオンを溶出させた抽出液に対するヒト歯髓由来細胞の応答性を培養系で評価した。

#### 【材料および方法】

S-PRG フィラー抽出液は株式会社松風より提供を受けた。抽出液と培養液 (D-MEM) を1:1で混合し、さらにD-MEMを用いて1/2, 1/4, ……1/512……と段階的に希釈し実験に用いた。96 well 培養プレートにヒト歯髓由来幹細胞 (hDPSC) を  $4 \times 10^3$ /well の密度で播種し、S-PRG/D-MEM 培地を用いて培養24時間後、72時間後の細胞毒性および細胞増殖を評価した。さらに、培養7日後のアルカリホスファターゼ (ALP) 活性染色を行い分化誘導能についても評価した。対照群には通常のD-MEMを用いた。

#### 【結果】

S-PRG フィラー抽出液の細胞毒性とhDPSCの細胞増殖を検討した結果、培養24時間後では1/100以下に希釈した場合で細胞毒性が認められなくなり、培養72時間後では1/500以下の希釈培地で細胞毒性が認められず細胞増殖も対照群と同等となった。そこで、1/8希釈培地、1/64希釈培地、1/512希釈培地を用いて7日間培養後にALP活性染色を行ったところ、培養72時間後でも細胞毒性を示さない濃度である1/512希釈培地でALP活性が認められた。

#### 【結論および考察】

S-PRG フィラー抽出液にはホウ酸イオンが含まれており、これが抗菌性に寄与していると考えられている。一方で、抽出液を培養に用いた場合、細胞毒性を示すと考えられたことからD-MEMで段階的に希釈した培地を用いてhDPSCを培養し、S-PRG フィラー抽出液の細胞毒性の発現と、その作用の減弱についてスクリーニングを行った。そして、今回実験に用いた抽出液では1/500以下に希釈することで細胞毒性が緩和される一方で、ALP活性を上昇させることを見出した。以上より、S-PRG フィラー抽出液を細胞毒性が緩和される濃度に希釈しても石灰化等の作用が期待できることが示され、S-PRG フィラーそのもの、あるいは抽出液を応用した新たな歯科材料開発の可能性が示唆された。



### 歯周病原細菌計測システムの開発に関する研究

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<sup>1</sup>,

北海道医療大学歯学部 口腔機能修復・再建学系 生体材料工学分野<sup>2</sup>

○金田 研郎<sup>1</sup>, 門 貴司<sup>1</sup>, 根津 尚史<sup>2</sup>, 伊藤 大輔<sup>1</sup>, 市岡 勇輝<sup>1</sup>, 遠藤 一彦<sup>2</sup>, 古市 保志<sup>1</sup>

#### A study on the development of a measurement system for periodontal pathogens.

Division of Periodontology and Endodontology<sup>1</sup>, Division of Biomaterials and Bioengineering<sup>2</sup>, School of Dentistry, Health Sciences University Of Hokkaido

○Kenro Kanada<sup>1</sup>, Takashi Kado<sup>1</sup>, Takashi Nezu<sup>2</sup>, Daisuke Ito<sup>1</sup>, Yuki Ichioka<sup>1</sup>, Kazuhiko Endo<sup>2</sup>, Yasushi Furuichi<sup>1</sup>

【緒言】歯周病は複雑な構成の細菌叢と宿主との相互作用から生じるとされている。近年、歯周病の診断や治療の評価のために、歯周ポケット内に存在している菌を定性および定量化する様々な手法が開発されている。それらの手法の中で現在はペーパーポイントによって採取した検体をPCR法によって測定する方法が主流となっている。PCR法は目的菌の菌種に特異的なDNAを増幅し、既知のコピー数から定量的に測定する方法である。しかしながらサンプリング手技は経験やテクニックに左右されやすく、また検査結果の取得に数日を要する。歯周ポケット内の細菌種の特定や細菌数の定量が簡便かつ迅速に測定可能となれば、歯周病の診断や治療の評価に有用となる可能性が高い。

【目的】本研究では、特定の細菌もしくはその反応物質を簡便かつ迅速に定量する生体内情報モニターを開発することを目的とした。細菌が放出するタンパク質、細菌本体もしくはその反応物質に対する抗体をチタン表面に固定し、チタン表面における抗原抗体反応を使った計測システムの開発を目的とした。その第一歩として、チタン表面にCarboxy-EG<sub>3</sub>-HPA (HPA) を結合させ、抗体のFc部を結合させるProtein Aを固定化する実験を行った。

#### 【材料と方法】

実験1：チタンとHPAの結合の確認（チタン表面へのカルボキシ基の導入）

X線光電子分光分析 (ESCA) の試料として JIS 第2種の純チタンディスク (直径5mm)、フーリエ変換赤外分光分析 (FT-IR) の試料としてチタン粉末を用意した。それぞれの試料を0.1mmol/l HPAのTHF溶液に浸漬し、室温で溶媒を除去した。HPAを結合させたチタンはメタノール中で5分間超音波洗浄し、乾燥させた後にESCAおよびFT-IRを用いてチタン表面の分析を行った。

実験2：チタン表面に結合したHPAに対するProtein Aの結合の確認と最適濃度の検索

HPAを結合させたチタンディスクは、Protein Aをそれぞれ1μg/ml, 10μg/ml, 25μg/ml, 50μg/mlを含有した1.47% 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド溶液に4℃で72時間浸漬し、表面に導入したHPAのカルボキシ基とProtein Aのアミノ基を脱水縮合させ、ペプチド結合を形成させることによってProtein Aをチタンディスク表面に固定した。固定化した後、脱イオン蒸留水で5分間超音波洗浄した。その後ESCAを用いてN1sスペクトルを測定し、チタン表面に固定されたProtein Aの量を評価した。

#### 【結果および考察】

実験1：ESCAの結果では、HPAを結合させたチタン表面から、133.9eVの位置にHPAのリン酸基に由来するP2pの明瞭なピークが確認され、533.5eVの位置にHPAのリン酸基に由来するO1sの明瞭なピークが確認されたことから、チタン表面にHPAが結合していることが確認された。また、285.5eVにC1sのピークが見られたことから、カルボキシ基がチタン表面に導入されていることが確認された。さらにFT-IRの結果では、C=Oの伸縮振動ν (1733 cm<sup>-1</sup>) に由来する吸収ピークが見られた。これらの結果から、HPAがチタン表面に結合していることが確認され、加えてチタン表面にカルボキシ基が導入されていることも確認できた。

実験2：HPAを介してProtein Aを固定化させたチタンディスクをESCAを用いて分析した結果、N1sのピーク強度はProtein Aの濃度依存的に上昇し、10~25μg/mlで一定値に達した。この結果から、HPAを介してチタン表面にProtein Aを固定化させる際の最適濃度は、25μg/mlであることがわかった。

【結論】HPAをチタン表面に対して結合させ、チタン表面にカルボキシル基を導入できることが明らかとなった。また、HPAを介してProtein Aを固定化させる際の最適濃度は、25μg/mlであることが確認された。

Er: YAG レーザーによるインプラント周囲病変に対する効果:

臨床的、細菌学的、生化学的マーカーに関する研究  
新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野  
○小松 康高

Efficacy of Er: YAG laser in the treatment of peri-implant disease: a study of clinical, microbiological and  
biochemical markers.

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

○Yasutaka Komatsu

### 【目的】

Er: YAG レーザーのインプラント周囲病変に対する効果を、臨床的、細菌学的、および生化学的マーカーにおいて、テトラサイクリン軟膏の局所注入と比較検討すること。

### 【材料と方法】

インフォームドコンセントの得られた、インプラント周囲病変(粘膜炎+周囲炎)を有する患者、レーザー群 18 名、テトラサイクリン軟膏群 19 名を対象とした。Baseline 時に臨床パラメーター、ポケット内細菌、インプラント周囲溝浸出液(PICF)中の生化学的マーカー検査を行った後、各々単回、レーザー群はポケットに対し、Er: YAG レーザーを照射、軟膏群はテトラサイクリン軟膏を注入した。ポケット内細菌は PCR インベーター法、末端断片長多型解析法(T-RFLP)(網羅的解析)にて各々解析した。また、PICF 中の生化学的マーカーとして、IL-1 $\alpha$ , $\beta$ ,IL-6,8,TNF- $\alpha$ ,CRP,MMP-1,3,9,13 の測定を行った。1 ヶ月、3 か月後に再評価した。なお、本研究は、新潟大学歯学部、朝日大学歯学部、大阪歯科大学歯学部倫理委員会にて研究プロトコル承認の上、行われた。

### 【結果と考察】

①ポケット内細菌は、軟膏群で術後に、総菌数と *T. forsythia* の減少傾向が認められた。一方、レーザー群では術前後で有意差は認められなかった。

②網羅的細菌解析では、グラム陰性、陽性細菌に分けて解析した結果、軟膏群ではともに術後に有意に減少したが、レーザー群では有意差は認められなかった。

③PICF 中の生化学的マーカー解析では、2 群間の比較において、3 か月で、レーザー群で軟膏群よりも MMP-9 が有意に低かった (P=0.009)。

レーザーによるバイオフィルム破壊が PICF 中の生化学マーカーの変化に関係している可能性が考えられた。

【結論】Er: YAG レーザーは、インプラント周囲病変に対して PICF 中の生化学的マーカーの改善により、臨床的効果が期待できる可能性が示唆された。

双生児法を用いた肥満と歯周炎の関連性の解析

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

顎口腔機能再建学講座 (歯科補綴第二教室)

○三木康史<sup>1</sup>、山下元三<sup>1</sup>、東山弥生<sup>1</sup>、池上久仁子<sup>1</sup>、津島賢一朗<sup>1</sup>、久保田実木子<sup>1</sup>、鈴木美麻<sup>1</sup>、岩山智明<sup>1</sup>、藤原千春<sup>1</sup>、北垣次郎太<sup>1</sup>、柳田学<sup>1</sup>、野崎剛徳<sup>1</sup>、池邊一典<sup>2</sup>、北村正博<sup>1</sup>、前田芳信<sup>2</sup>、村上伸也<sup>1</sup> 大阪大学ツインリサーチグループ<sup>3</sup>

Cross sectional study between obesity and periodontal disease among elderly twins

1) Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry 2) Department of Prosthodontics,

Gerodontology and Oral Rehabilitation, Osaka University Graduate School of Dentistry 3) Center for Twin Research, Osaka University Graduate School of Medicine

○Koji Miki, Motozo Yamashita, Yayoi Higashiyama, Kuniko Ikegami, Kenichiro Tsushima, Mikiko Kubota, Mio Suzuki, Tomoaki Iwayama, Chiharu Fujihara, Jirouta Kitagaki, Manabu Yanagita, Takenori Nozaki, Kazunori Ikebe, Masahiro Kitamura, Yoshinobu Maeda and Shinya Murakami, Osaka University Twin Research Group

〔研究目的〕 歯周炎は、歯周病原性細菌が歯周組織局所に感染することで発症し、その病態形成には、加齢の過程で暴露される様々な環境因子が関与する。これまでに我々は、一卵性双生児者 (MZ) ならびに二卵性双生児者 (DZ) における表現系の類似度を比較・解析する双生児法により、歯列解剖形態については遺伝的要因が大きい一方、残存歯数を指標とした歯周病の重篤度は遺伝的要因よりも環境要因の影響が大きいことを報告してきた (平成25年度歯科保存学会春季学術大会)。その一方、歯周炎の病態パラメータであるプロービング時の出血 (BOP) 陽性部位率、4mm以上歯周ポケット部位率、*P. gingivalis*. に対する血清抗体価のペア間ばらつきは、MZ群においてDZ群よりも有意に小さく、歯周組織の炎症状態やそれに伴う生体応答には遺伝的要因が関与することを明らかとした (平成26年度歯科保存学会秋季学術大会)。近年、歯周炎と2型糖尿病、心臓血管疾患等の全身疾患との関連性が示唆されているが、肥満はこれらの慢性疾患発症のトリガーとして喫煙につぐ重要なリスクファクターであることが明らかとされており、ペリオドンタルメディスン病因論の観点からも歯周炎との関連が注目されている。しかしながら、肥満と歯周炎の因果関係、相互の作用機序は未だ多くが不明である。本研究においては、歯周炎とメタボリックシンドロームの関連性を明らかとする為に、遺伝的背景が同一あるいは関連が強い一卵性・二卵生双生児者を対象とし、歯周炎の病態パラメータと各種の肥満度指数との関連について解析、検討を行った。

〔材料と方法〕 大阪大学大学院医学研究科ツインリサーチセンターにおいて検診を受けた双生児のうち、卵生診断された148組を被験者とした。そして、各被験者に対し、以下の①～⑦の検査を実施し、各双生児ペア間における級内相関係数の検定を行った。(①残存歯数 ②プロービング深さ (PPD) ③BOP ④平均歯槽骨吸収率：パノラマレントゲン写真をもとに、Scheiのルーラーを用い歯槽骨の吸収率をスコア化 (1, 2, 3, 4)。⑤歯周病原性細菌に対する抗体価検査：凍結保存末梢血血清を用い*P. gingivalis*. (*P. g.*) に対する抗体価を測定。⑥血漿中の生化学検査：HbA1c、総コレステロール (Tcho)、トリグリセリド (TG)、HDLコレステロール、LDLコレステロール、空腹時血糖 ⑦身長、体重、BMI指数、腹位)。これらのメタボリックシンドロームに関わる指数と、歯周炎の炎症に関わる指数を相対化処理 (ペア内で高い値を示す人と低い値を示す人の群) し、各群の平均値と標準偏差を比較することで、ペア間のばらつきを評価した。

〔結果〕 双生児集団の特徴は、平均年齢 58.1 歳 (21-88 歳)、(MZ: 130 組、DZ: 18 組、男: 95 人、女: 201 人、喫煙経験: 無: 198 人 有: 52 人 喫煙者: 34 人 無回答: 12 人) 平均残存歯数 22.7 本、平均歯槽骨吸収率スコア 1.67、平均 PPD 2.67mm であった。*P. g.* 血清抗体価を測定した双生児のペア間 (MZ: 103 組、DZ: 17 組) において、糖尿病や脂質のマーカートとの有意な相関は認められなかった。なかでも Tcho、TG、LDL コレステロールと *P. g.* 血清抗体価に関しては MZ、DZ いずれのペア間においても負の相関の傾向がみられた。

〔考察並びに結論〕 今回の得られた結果からは、脂質代謝の生化学マーカーと、歯周病原性細菌の感染既往を反映する歯周炎マーカーとの相関は弱いと考えられた。

〔謝辞〕 本研究は大阪大学ツインリサーチグループによる総合的研究 (文科省特別経費) の一環として実施されたものであり、その御支援に感謝を申し上げます。また、血漿成分の生化学検査についてはバックマンコールターの御支援に感謝申し上げます。

## 自己血由来多血小板フィブリン膜と $\beta$ -TCP による歯周組織再生効果：症例シリーズ

新潟大学大学院医歯学総合研究科、<sup>1)</sup>摂食環境制御学講座歯周診断・再建学分野、<sup>2)</sup>顎顔面再建学講座歯科薬理学分野  
○奥田一博<sup>1)</sup>、中島 悠<sup>1)</sup>、小林美登<sup>1)</sup>、神谷真菜<sup>1)</sup>、堀水 慎<sup>1)</sup>、川瀬知之<sup>2)</sup>、吉江弘正<sup>1)</sup>

### Platelet-rich fibrin membrane combined with beta-tricalcium phosphate for treatment of infrabony defects in chronic periodontitis: clinical case series

<sup>1)</sup>Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science and <sup>2)</sup>Division of Dental Pharmacology, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences.

○Kazuhiro Okuda<sup>1)</sup>, Yu Nakajima<sup>1)</sup>, Mito Kobayashi<sup>1)</sup>, Mana Kamiya<sup>1)</sup>, Makoto Horimizu<sup>1)</sup>, Tomoyuki Kawase<sup>2)</sup> and Hiromasa Yoshie<sup>1)</sup>

#### 【目的】

自己血由来多血小板フィブリン (platelet-rich fibrin: PRF) 膜を  $\beta$ -第三リン酸カルシウム(beta-tricalciumphosphate:  $\beta$ -TCP) とともに歯周骨内欠損に応用し、1 年予後について臨床効果と安全性について検討した。尚、本研究は新潟大学歯学部倫理委員会の承認済み(24-R24-01-18)で患者には書面をもって十分に説明し、本研究への参加に自発的同意を得た。

#### 【材料と方法】

(1)対象：新潟大学医歯学総合病院に入院する慢性歯周炎患者のうち、歯周基本治療を完了して同意の得られた 13 名を被験者とした。6 mm 以上のポケット(probing depth: PD)と 6 mm 以上の付着レベル(clinical attachment level: CAL)、規格エックス写真より 3 mm 以上の骨内欠損を示す 13 部位を被験部位とした。

(2)PRF 膜の作製法：患者末梢血 8.5 ml を採取し、MEDIFUGE(製造元 Silfradent srl、販売元 (株)コアフロント)にて 3000 rpm 約 10 分間遠心を行った。血清部に出来たゲル状のフィブリンを滅菌ディッシュ上で切り出した後に、特製 PRF 圧延器 (YSEC (株)山之内製作所) で厚さ約 1 mm になるように成形した。 $\beta$ -TCP は、CERASORB<sup>®</sup>M (製造元 CURASAN AG、販売元 (株)白鵬)を用いた。

(3)評価項目：炎症評価としてプラーク指数(plaque index: PI)、歯肉炎指数(gingival index: GI)、プロービング時の出血(bleeding on probing: BOP)を測定し、臨床評価として PD、CAL、エックス線写真から計測した骨欠損深さ(radiographic infrabony defect depth: IBD)を計測した。評価は、ステントおよびバイトブロックを用いて半規格化して測定した。

(4)術式：歯肉溝切開による全層弁を形成・剥離後、徹底して病巣を搔爬して骨欠損を明示した。骨欠損部に  $\beta$ -TCP を填入しその上を被覆するように PRF 膜を設置して緊密に縫合した。

(5)予後：術後 14 日目に抜糸を行い 3 か月までは 2 週毎、その後 1 か月毎に専門的清掃を行い、3 か月、6 か月、1 年目に評価を行った。

#### 【結果】

観察期間中、炎症は厳密にコントロールされ、評価ポイント間で PI, GI, BOP に差は認められなかった。さらにすべての症例について有害事象は生じなかった。臨床評価についてのデータは下記に示す。

Clinical Index	Baseline	3	6	12	Baseline vs 12Months	$\Delta$ Baseline and
		months	months	months	: p-value	12 months
PD (mm)	7.9 $\pm$ 1.6	3.2 $\pm$ 0.9	3.2 $\pm$ 0.6	3.1 $\pm$ 0.3	p <0.01	4.8 $\pm$ 1.6
CAL (mm)	9.5 $\pm$ 1.9	6.8 $\pm$ 1.3	6.6 $\pm$ 1.3	6.6 $\pm$ 1.3	p <0.01	2.9 $\pm$ 2.1
IBD (mm)	5.1 $\pm$ 1.9	2.2 $\pm$ 1.1	2.0 $\pm$ 1.1	1.9 $\pm$ 1.0	p <0.01	3.2 $\pm$ 1.2

#### 【考察】

良好な臨床効果が得られた要因として PRF 膜の主要成分であるフィブリンネットワークが血小板を凝集し PDGF アイソフォームを高レベルで放出し、これらが細胞増殖及び血管新生を誘導 (Kobayashi et al., *Biologicals*, 2012; 40: 323-329.) したことに加え、フィブリンが創傷治癒を促進する包帯として作用した可能性が考えられる。さらに  $\beta$ -TCP がスベースメイキングを維持するスキヤフォールドとして作用し骨伝導能を発揮したことが考えられる。

#### 【結論】

歯周骨内欠損部に自己血由来多血小板フィブリン膜と  $\beta$ -第三リン酸カルシウムをともに用いたところ 1 年予後で安全性と臨床的有効性が確認された。

## ラット実験モデルを用いた歯周炎とインプラント周囲炎の病理組織学的比較

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻 展開医療科学講座 歯周病学分野

○高森雄三、中村弘隆、藏本明子、吉村篤利、鶴飼 孝、尾崎幸生、白石千秋  
山下恭徳、泉 聡史、小林弘樹、小山美香、原 宜興

### Histopathological studies on periodontitis and peri-implantitis in rat model

Department of Periodontology, Unit of Translational Medicine, Course of Medicine, and Dental Sciences, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

○TAKAMORI Yuzo, NAKAMURA Hirotaka, KURAMOTO Akiko, YOSHIMURA Atsutoshi, UKAI Takashi, OZAKI Yukio, SHIRAIISHI Chiaki, YAMASHITA Yasunori, IZUMI Satoshi, KOBAYASHI Hiroki, OYAMA Mika, HARA Yoshitaka

#### 【目的】

歯周炎とインプラント周囲炎の臨床症状は類似しているが、病理組織学的には異なる組織破壊像を示すといわれている。しかし両者の相違を詳細に比較した報告は少なく、その要因の一つに適切な動物実験モデルが確立していないことが挙げられる。当講座では、事前に lipopolysaccharide (LPS) で免疫感作を行ったラットの歯肉溝へ、LPS を頻回滴下することで、アタッチメントロスと歯槽骨吸収を誘導できる実験的歯周炎モデルを作製している。今回そのモデルを、ラットの抜歯窩に埋入したインプラントに応用して、実験的に誘導した歯周炎とインプラント周囲炎における組織破壊の相違を比較検討した。

#### 【材料と方法】

ラットを、LPS の腹腔内投与により免疫感作を行う群 (I 群) と、免疫感作を行わない群 (nI 群) に分けた。そしてそれぞれの上顎右側第一臼歯を抜歯後、インプラントを即時埋入 (IP 側) して 4 週間の定着期間を設けた。上顎左側第一臼歯は天然歯のまま (NT 側) とした。次に、それぞれの群のラットの半数に対して、歯肉溝およびインプラント周囲溝へ LPS を 3 日間滴下した (LPS 群)。残りの半数には、LPS の代わりに PBS を滴下した (PBS 群)。なお滴下開始直前の群も作製し、これを baseline 群とした。3 日目の滴下 1 時間後に上顎骨を摘出後、パラフィン標本を作製し、組織学的計測、Azan 染色、破骨細胞観察のための酒石酸耐性酸フォスファターゼ染色、および免疫複合体を検出するための免疫組織学的染色を行った。

#### 【結果】

NT 側では I-LPS 群、nI-LPS 群のいずれの歯肉溝底も cemento-enamel junction に一致しており、アタッチメントロスは認めなかった。IP 側では、base line 群、nI-LPS 滴下群、I-PBS 滴下群の間では顕著な相違はなかったが、I-LPS 滴下群においてのみ、インプラント接合上皮の下方伸長、結合組織への多数の炎症性細胞浸潤、骨吸収を観察した。他の 4 群と比較して I-LPS 群では、インプラント第一スレッドからインプラント接合上皮の最根尖側までの距離が最も短く、骨吸収が有意に強く、炎症性細胞数ならびに破骨細胞数も有意に多かった。base line 群を Azan 染色で観ると、NT 側では歯頸部から歯肉の三方向へ走行する密なコラーゲン線維を認めたが、IP 側では骨膜側一方向のみで配列も疎であった。免疫組織学的染色では、I-LPS 群の IP 側において、インプラント接合上皮内、その直下結合組織に顕著な集積を認めたが、NT 側においては接合上皮内にわずかに認めるのみであった。

#### 【結論および考察】

我々の以前の研究では、LPS 感作ラットの歯肉溝に LPS を滴下して歯槽骨吸収を起こすのに 10 日を要した。今回 3 日間の LPS 滴下では、NT 側の歯槽骨吸収およびアタッチメントロスを認めなかったが、IP 側では接合上皮の深部増殖と強い骨吸収を認めた。これは、インプラント周囲炎が歯周炎よりも早期に発症しうることを示唆していると思われる。その原因として、接合上皮下のコラーゲン線維の走行がインプラント周囲組織では一方向かつ疎であるなど、抗原の侵入に対する防御機構が弱いことが関連していると考えた。結果、抗原が拡散して免疫複合体が広範囲で形成され、古典経路の活性化、種々の炎症性サイトカインの放出、好中球浸潤の促進が誘導され、組織破壊が引き起こされたものと思われる。

今回の動物実験モデルは、インプラント周囲炎発症段階から病理組織学的に天然歯と同時に同条件で比較できる。このモデルを用いて、インプラント周囲炎の特徴の詳細をさらに明らかにすることで、インプラント周囲炎発症予防や治療に大きく貢献できると考えられる。

## 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の新規検出キットの臨床における有用性

東京歯科大学歯周病学講座<sup>1</sup>、東京歯科大学歯周病学講座<sup>1</sup>、日本大学松戸歯学部歯周治療学講座<sup>2</sup>、鶴見大学歯学部歯周病学講座<sup>3</sup>、新潟大学大学院歯学総合研究科 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野<sup>4</sup>、デンカ生研株式会社 試薬研究開発部<sup>5</sup>、昭和薬品化工株式会社<sup>6</sup>

○高山沙織<sup>1</sup>、今村健太郎<sup>1</sup>、齋藤淳<sup>1</sup>、井上英子<sup>2</sup>、中山洋平<sup>2</sup>、小方頼昌<sup>2</sup>、白川哲<sup>3</sup>、長野孝俊<sup>3</sup>、五味一博<sup>3</sup>、両角俊哉<sup>4</sup>、秋石和宏<sup>5</sup>、渡辺香里<sup>6</sup>、吉江弘正<sup>4</sup>

### Clinical evaluation of a novel detection kit for *Porphyromonas gingivalis*

Department of Periodontology, Tokyo Dental College<sup>1</sup>, Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo<sup>2</sup>, Department of Periodontology, Tsurumi University<sup>3</sup>, Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences<sup>4</sup>, Reagent R&D Department, Denka Seiken Co., Ltd.<sup>5</sup>, Showa Yakuhin Kako Co., Ltd<sup>6</sup>

○TAKAYAMA Saori<sup>1</sup>, IMAMURA Kentaro<sup>1</sup>, SAITO Atsushi<sup>1</sup>, INOUE Eiko<sup>2</sup>, NAKAYAMA Yohei<sup>2</sup>, OGATA Yorimasa<sup>3</sup>, SHIRAKAWA Satoshi<sup>3</sup>, NAGANO Takatoshi<sup>3</sup>, GOMI Kazuhiro<sup>3</sup>, MOROZUMI Toshiya<sup>4</sup>, AKIISHI Kazuhiro<sup>5</sup>, WATANABE Kaori<sup>6</sup>, YOSHIE Hiromasa<sup>4</sup>

### 【目的】

歯周病原細菌の検査は、歯周治療における適切な抗菌薬の検討、歯周外科治療の要否の判断、また歯周治療後の評価において重要項目であるといわれている。これまで臨床では様々な細菌検査法が用いられてきたが、コストや操作性などに問題があり、チェアサイドで簡便に歯周病原細菌を検出できるシステムの開発が求められてきた。

*Porphyromonas gingivalis* は種々の歯周炎の発症と進行に深く関与している。そのため、本菌の有無を歯周治療の早期に判断することは、その後の処置方針を決定する上で意義がある。

今回、歯肉縁下プラーク中の *P. gingivalis* をチェアサイドで容易に検出、半定量することのできるイムノクロマト法を用いた新規キットが開発された。我々はその臨床における有用性を検討した。

### 【材料および方法】

本研究は東京歯科大学、日本大学松戸歯学部、鶴見大学歯学部の倫理委員会の承認を得て行った。各施設を訪れた慢性歯周炎患者 63 名、および 28 名の健常者から本研究への参加の同意が得られ、被験者とした。初診時、臨床パラメータを計測、その約 2 週間後に歯肉縁下プラークを採取した。各歯周炎患者のプロロービングデプス(PPD) 4~5 mm の部位および 6~9 mm の部位の計 2 部位からペーパーポイントを用いて採取、各健常者では最深のポケット 2 部位から採取した。*P. gingivalis* の検出には、外膜タンパク OMP40 に対するモノクローナル抗体 2 種を使用したイムノクロマト法による新規検出キットを使用した。本キット内抽出補助具を用いて細菌懸濁液を作成後、デバイスに滴加し、15 分後に *P. gingivalis* の有無の確認、陽性の場合には半定量を行った。また、残液中の同菌の定量を PCR-Invader 法を用いて行った。

### 【成績】

各群の全顎における平均 PPD および BOP 率を比較すると、健常群と比較して歯周炎群で有意に高く、各プラーク採取部位における全ての臨床パラメータは、歯周炎群の方が有意に高かった。歯周炎群における *P. gingivalis* の検出では、本キットスコアと PCR-Invader 法で得られた細菌数との間に、強い正の相関が認められた。カットオフ値をキットスコア 0.25 および PCR-Invader 法 5 copies /  $\mu\text{L}$  とすると、本キットの感度は 96%、特異度 92%、陽性的中率 90%、陰性的中率 97%、一致率 94% であり、検出限界は約  $10^4$  copies / sample だった。また本キットから得られた任意のスコア範囲で各検体を群分けしたところ、細菌数は各群間で有意に異なった。歯周炎群の 76% の被験者において本キットにより *P. gingivalis* が検出され、キットスコアと平均 PPD および臨床的アタッチメントレベルとの間には、有意な正の相関関係が認められた。

### 【考察および結論】

本キットは、歯肉縁下プラーク中 *P. gingivalis* の検出について、PCR-Invader 法とほぼ同等の結果を示した。また、*P. gingivalis* 数は異なるキットスコアの群間で有意に異なっていたことから、本キットを用いて同菌を半定量することは可能であり、歯周治療前後での細菌数変化の評価などにも有効であると考えられる。得られたスコアが歯周パラメータとの相関を示したことから、本キットが臨床において簡便、迅速な *P. gingivalis* の検査として有用であることが示唆された。

## 歯磨剤に配合される抗炎症剤がヒト由来細胞の サイトカイン産生に与える影響

サンスター株式会社  
○木平 成子、田代 亜衣香、林 よし子

The effects of anti-inflammatory agents on cytokine production in cell lines  
Sunstar Inc.

○Seiko Kinohira, Aika Tashiro, Yoshiko Hayashi

【背景および研究目的】歯周病は、細菌の感染によって引き起こされる炎症性疾患である。その進行過程において、様々なサイトカインが働くため、歯周病を予防するには、サイトカインを制御することが重要である。各種抗炎症剤はサイトカインに影響を与えることが知られているが、最適な抗炎症剤を選択するためには、炎症反応における多種類のサイトカインの挙動やそれらに対する抗炎症剤の特徴を包括的に把握する必要がある。これまでに IL-6 や IL-8 などの代表的なサイトカインについては、歯肉線維芽細胞やマクロファージにおいて、LPS 刺激により惹起され、抗炎症物質により抑制されることが知られている。しかし、その他を含む多種類のサイトカインについて、多種類の細胞を用いて、包括的に抗炎症物質の効果を調べた報告はない。そこで、ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF-1)、ヒト歯肉上皮細胞 (Ca9-22) およびヒトマクロファージ (THP-1) において、2種類の歯周病菌由来 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* および *Prophyromonas gingivalis* の LPS (A.a.-LPS、P.g.-LPS) の刺激応答または歯磨剤に配合される6種類の抗炎症剤に対する多種類のサイトカイン産生の変化を調べる目的で本研究を実施した。

【材料および方法】《LPS 刺激に対する応答》HGF-1 または Ca9-22 をそれぞれ 10%FBS 含有培地を用いて、適当な濃度で 96-well プレートに播種し 24 時間前培養した。2種類の LPS (A.a.-LPS、P.g.-LPS) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加し 24 時間培養後、17種類 (IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-13、IL-17、G-CSF、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、MCP-1、MIP-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ ) のサイトカイン産生量を測定した。THP-1 を 100 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate を用いて、ヒトマクロファージ様細胞へと分化させた後 1%FBS 含有培地に置換し 24 時間前培養した。その後2種類の LPS (A.a.-LPS、P.g.-LPS) 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加し 12 時間培養後、上記 17 種類のサイトカイン産生量を測定した。  
《抗炎症剤によるサイトカイン産生の変化》HGF-1 または THP-1 を上記と同様に前培養し、6種類の抗炎症剤 ( $\epsilon$ -アミノカプロン酸:  $\epsilon$ -AC、アラントイン: ALA、グリチルリチン酸ジカリウム: GK2、グリチルリチン酸モノアンモニウム: GMA、 $\beta$ -グリチルレチン酸:  $\beta$ -GR、トラネキサム酸: TXA) を添加し 24 時間培養した。A.a.-LPS 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を添加し、HGF-1 は 24 時間、THP-1 は 12 時間培養後、上記 17 種類のサイトカイン産生量を測定した。

【結果】HGF-1 および THP-1 において、A.a.-LPS 刺激に対して、多種類のサイトカインにおいて応答が見られたが、Ca9-22 ではほとんど見られなかった。6種類の抗炎症剤は、少なくとも1種類以上のサイトカインの産生を抑制したが、そのサイトカインの種類や抑制率は様々であった。HGF-1 において、 $\epsilon$ -AC、GK2、GMA、 $\beta$ -GR および TXA は、9-13種類のサイトカイン産生を有意に抑制した。その中でもステロイド様抗炎症剤である GK2、GMA および  $\beta$ -GR の抑制したサイトカインの種類数が多く、抑制率も高かった。一方、THP-1 において、ALA、GMA、 $\beta$ -GR および TXA は 4-8 種類のサイトカイン産生を有意に抑制した。その中でも GMA および TXA の抗炎症効果が高かった。また GK2 は G-CSF、MIP-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の産生を有意に促進した。

【結論および考察】各種抗炎症剤のサイトカイン産生に対する影響は、細胞や抗炎症剤によって様々であることが分かった。働く細胞やサイトカインは歯周病患者それぞれにおいて異なることから、更なる研究を進めることで、歯周状態により、最適な抗炎症剤を用いた歯周病予防が出来る可能性がある。

## 405nm の励起蛍光によるプラークの質的評価について

昭和大学歯学部歯科保存学講座総合診療歯科学部門

○伊佐津克彦、瀧野浩之、勝又桂子、山田理、池田 哲、高島英利、長谷川篤司

### A qualitative evaluation of the plaque by a 405nm light-induced fluorescence system

Department of Conservative dentistry, Division of Comprehensive Dentistry,  
Showa University School of Dentistry

○ISATSU Katsuhiko, TAKINO Hiroyuki, KATSUMATA Keiko, YAMADA Michi, Kunii Maiko,  
Satoshi Ikeda, Hidetoshi Takashima, HASEGAWA Tokuji.

近年、デンタルプラークに起因する歯周病と糖尿病や動脈硬化などの全身疾患との関連や、デンタルプラークを構成している細菌を誤嚥することによる肺炎についての報告が多く認められている。デンタルプラークは複数の細菌が形成するバイオフィルムの典型で、この中に存在している細菌に抗菌薬はほとんど効果を発揮することができないため、物理的にバイオフィルムを破壊することが必要である。したがって、デンタルプラーク除去の基本は本人あるいは介助者などによる機械的関与が必要で、プラーク付着部位を視覚的に正しく認識することは、治療効果を最大限に引き出すカギとなる。言い換えるなら、口腔および全身の健康維持のためにはプラークの量、付着部位、そして活動性を定期的に正しく認識することが必須である。

従来、付着しているプラークの評価は染めだし液などを用いて行うのが一般的であるが、高齢者や在宅看護の受診者では染色後の清掃が決して容易ではない。そこで、近年、染め出しなしにプラークの蛍光特性を利用するプラーク認識システムが開発、市販に至っている。我々は第 132 回大会で、この光誘導蛍光システムによるプラークの検出は、プラーク染めだし液に比較し鋭敏でないものの、その有効性について発表した。また、第 135 回大会では、光誘導蛍光システムによるプラークの評価が歯周病原性細菌の検出に関連し、質的な評価に応用できる可能性を報告した。

本研究では、臨床でのプラークの質的評価を検討する目的で、励起蛍光で赤色を呈するプラークが、歯周病原性細菌の活動度および臨床症状との関連性について比較検討した。

#### 【材料と方法】

対象と方法：3ヶ月以内に、抗菌薬を服用していなく、スケーリング・ルートプレーニングを受けていない患者を対象として行った。口腔衛生指導を目的に来院した際に、患者の上顎、下顎の前歯部唇側面に存在するプラークを検体とした。これらの患者の上顎、下顎の前歯部唇側面に存在するプラークにレーザーポインター (Up 社、照出波長 405nm、出力 1mW) を励起蛍光として照射して赤色の励起蛍光を呈するプラークを識別し、患者を赤色励起蛍光を呈するプラークを有する患者群 (FP 患者群) と、同プラークを有さない患者群 (NFP 患者群) に分類した。一方、FP 患者群の同一口腔内でも、赤色励起蛍光を呈するプラーク (FP 群) と蛍光を呈さないプラーク (NFP 群) を識別し、それぞれをプローブにて採取して検体とした。

口腔内細菌の量的検討：一口腔単位で細菌カウンター (Panasonic 社製) を用い、口腔内の細菌数はレベル 1~7 の 7 段階で評価し、FP 患者群と、NFP 患者群の口腔内細菌数を計測し比較した。

プラークの質的検討：FP 患者群の口腔内から得られたプラーク検体 FP と NFP を用いて各プラークの歯周病原性を評価した。すなわち、バナペリオ (BANAMet LLC 社) を用いて各プラークの歯周病原性細菌由来のペプチダーゼ活性を陽性、偽陽性、陰性の 3 段階で検出、評価した。

臨床的評価：プロービングポケット深さ、プロービング時の出血の有無、エックス線による骨吸収の程度を評価した。

#### 【結果および考察】

バナペリオは、歯周病の活動度との関連性が報告され、*Porphyromonas .gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tanneria forsythia* が持つ BANA 分解活性を検出する体外診断薬である。今回、405nm 励起蛍光で口腔内プラークが赤色に認識される FP 群で、バナペリオで陽性だと判定されることが多かった。これらのことと、*Pgingivalis*、*Pintermedia* の存在比が高い時に、405nm 励起蛍光で口腔内プラークの赤色による評価の差が高かった以前の報告とを併せると、405nm 励起蛍光を用いた口腔内プラークの質的評価は有効であると考えられる。今後、さらなるプラーク細菌の量的、質的検討を行うことで、405nm 励起蛍光を用いたプラークの評価が臨床で有用になると考えられた。



## 幅広段差植毛歯ブラシのプラーク除去効果について

<sup>1</sup>鶴見大学短期大学部歯科衛生科, <sup>2</sup>小林製薬株式会社

○小林一行<sup>1</sup>, 渡辺孝章<sup>1</sup>, 早坂奈美<sup>2</sup>, 国友栄治<sup>2</sup>, 玉木裕子<sup>1</sup>, 松田裕子<sup>1</sup>

### Plaque removal efficiency of step bristle toothbrush with a wide head

<sup>1</sup>Department of Dental Hygiene, Tsurumi Junior College, <sup>2</sup>KOBAYASHI Pharmaceutical Co., Ltd.

○KOBAYASHI Kazuyuki<sup>1</sup>, WATANABE Takaaki<sup>1</sup>, HAYASAKA Nami<sup>2</sup>, KUNITOMO Eiji<sup>2</sup>,  
TAMAKI Yuko<sup>1</sup>, MATSUDA Hiroko<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

歯周病の予防や治療には、原因であるプラーク除去が必要不可欠であり、特に機械的な方法である歯ブラシを用いたプラークコントロールが重要である。歯ブラシの刷毛部形態および植毛状態はプラーク除去効果に大きく関わる部分であり、これを改良した様々な形態の歯ブラシが開発され研究が行われているが、臨床報告は少ない。そこで本研究は、幅広段差植毛歯ブラシ(生葉極幅ブラシ：小林製薬、大阪)の使用による歯肉の炎症改善度、プラーク除去効果および使用感について、従来の平切り植毛歯ブラシと比較検討した。

#### 【材料および方法】

被験者は、某製薬会社研究所の研究者で歯肉に炎症があり、実験の趣旨を説明し同意が得られた23名とした。幅広段差植毛歯ブラシ群11名(男性8名、女性3名、平均31.45±8.32歳)、平切り植毛歯ブラシ群12名(男性11名、女性1名、平均34.50±7.19歳)の2群に分け調査を行った。また、ブラッシング指導は、個別にリーフレットおよび顎模型を用い十分な説明を行った。歯ブラシ刷毛部の仕様は、幅広段差植毛歯ブラシ：毛穴配列6列(つま先とかかと部分に向かって減少：つま先部2列、かかと部3列)、毛の長さ13mm(テーパー付与)、10mm。平切り植毛歯ブラシ：毛穴配列3列(つま先部は2列)、毛の長さ10mm。毛のかたさ(座屈強度)は59 N/cm<sup>2</sup>とし同等とした。

歯肉の炎症改善度を調べる目的でブラッシングを2週間実施(スクラッピング法、5分間、2回/日)、術前・術後のGingival Index (GI)を評価し、術前に対する術後のGIの割合から歯肉の炎症改善度を比較検討した。また、プラーク除去効果を調べる目的でブラッシングを1日停止した後、術前の0' LearyらのPlaque control record (PCR)を測定し、5分間スクラッピング法でブラッシングを実施、術後のPCRを測定して術前に対する術後のPCRの割合からプラーク除去効果を比較検討した。併せて両歯ブラシの使用感についての質問紙調査を実施し比較検討した。

#### 【成績】

歯肉の炎症改善度について、幅広段差植毛歯ブラシ群、平切り植毛歯ブラシ群、両群ともに2週間のブラッシング後ではGIの有意な減少が認められ、歯肉の炎症は改善した(幅広段差植毛歯ブラシ群:0.69±0.32 → 0.41±0.25, 平切り植毛歯ブラシ群:0.71±0.19 → 0.39±0.13; Wilcoxon signed-rank test, p<0.01)。また、両群間の歯肉の炎症改善度に有意差は認められなかった。プラークの除去効果について、幅広段差植毛歯ブラシ群と平切り植毛歯ブラシ群間に有意差は認められなかった(幅広段差植毛歯ブラシ群:45.48±15.25%, 平切り植毛歯ブラシ群:40.97±16.25%)。歯ブラシの使用感についての質問紙調査では、すべての項目で幅広段差植毛歯ブラシ群が平切り植毛歯ブラシ群に比べ満足度が高かった。

#### 【考察・結論】

幅広段差植毛歯ブラシの歯肉の炎症改善度およびプラーク除去効果は、従来の平切り植毛歯ブラシと同等であった。幅広段差植毛歯ブラシは、ヘッドの幅の広さおよび段差植毛であることからプラークを短時間で効率よく除去できることが報告されている。本研究では報告されている幅広段差植毛歯ブラシと刷毛部の植毛配列が異なることや段差がより大きいために短い植毛の毛先が隣接面に入りにくいこと、また、長い植毛にテーパーが付与され先端が細くなっていることが清掃効果に影響したと考えられる。幅広段差植毛歯ブラシの使用感が良好であることは、毛先の適切な歯面への接触、使用時間の維持を可能とし、より確実なプラークコントロールの実践に有効と考える。

## 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3報

奥羽大学歯学部口腔衛生学講座<sup>1)</sup>、歯科保存学講座<sup>2)</sup>、薬理学講座<sup>3)</sup>  
○車田文雄<sup>1)</sup>、長岡正博<sup>3)</sup>、廣瀬公治<sup>1)</sup>、齋藤高弘<sup>1)</sup>、佐藤穩子<sup>2)</sup>、佐々木重夫<sup>2)</sup>、木村裕一<sup>2)</sup>

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

Dept. Preventive Dentistry and Conservative Dentistry and Pharmacology 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142回本学会を含め、3年前から当学会にて、一連の部隊口腔衛生について発表してきた。そこで前々回、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齧蝕活動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歯周病活動性試験の傾向を発表した。そこで今回は、齧蝕誘発性の抑止に関する歯垢非形成食品に着目して、2職場間の1ヶ月間の昼食データを基に食餌指導を実施し、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 】

< 予定献立表より >

- ① 航空自衛隊第27警戒群大滝根山分屯基地における献立(10月の昼食) 1
- ② 福島県内の某税務署における献立(9月の昼食)

上記献立より、土、日、祝日を除く昼食について、食事のバランス、カロリー、塩分摂取量、歯垢非形成食品の摂取状況を調査し、なおかつ、バランスにおいては「飯塚・矢崎の分類」により、データを分析した結果、

食事のバランスでは、航空自衛隊の方が税務署より釣り合いが取れており、食事自体のメニューの工夫が凝らされていた。カロリーでは、自衛隊は「戦闘食」で1回の食事が約1,100キロカロリーの摂取と定められており、必然的に税務署よりは多めであった。塩分摂取量においては、各食事で自衛隊が3.1~9.9gの範囲であったのに対し、税務署は2.4~5.8g(定食)と少なかった。

歯垢非形成食品においては、バランスの面からしても、自衛隊の方が「野菜類、漬け物、味付けとしての酢等」が充実されており、繊維類の摂取、唾液の中和作用および分泌作用のある食材が積極的に取り込まれていた。

#### 【 考察および結論 】

1. 食事のバランスにおいては、自衛隊では栄養士の資格の持つ隊員自らが献立を作成し、また調理に携わる隊員への指導が徹底しているために、部隊の食事に対する声の反映につながり、調和の取れた食事内容がうかがわれた。
2. カロリーでは、自衛隊は「戦闘食」で1日の食事が約3,300キロカロリーの摂取と定められており、必然的に税務署よりは多めであるが、それを消費するだけの業務を行っているため、問題ない熱量と考えられる。
3. 塩分摂取量においては、自衛隊の方が税務署より約1.5倍多めではあったが、上記の如く、業務によっては身体を動かす部署では必要量とも推測できた。また今回、税務署でのメニューでは「定食」をデータに入れたが、麺単品のメニューもあるため、塩分摂取量は2.8~7.9gとなり、さらにその麺に「ご飯付きセット(いなり寿司、おにぎり、ミニカレー、半炒飯等)」の摂取であれば、4.0~9.0gとなり、塩分の過剰摂取が危惧された。
4. 歯垢非形成食品においては、自衛隊の方では「野菜類、漬け物、味付けとしての酢等」が充実されており、生野菜の繊維類および漬け物ならびに咀嚼回数が多い食材摂取での大まかな歯垢除去、また味付けとしての酢の使用で、唾液の中和作用および分泌作用のあるメニューが積極的に取り込まれていたことにより、齧蝕活動性の低下につながることを示唆された。

## シナリオベース実習を用いた体験先導型臨床基礎教育の教育効果

九州歯科大学 口腔機能学講座 口腔保存治療学分野

○諸富孝彦, 西藤法子, 吉居慎二, 平田-土屋志津, 鷺尾絢子, 市丸-末松美希, 中川愛加,  
中山皓平, 大塚麻衣, 藤元政考, 松山篤史, 浦田真梨子, 花田可緒理, 宮原宏武, 北村知昭  
Educational effects of the experience-led learning with scenario-based pre-clinical training

Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Department of Oral Functions, Kyushu Dental University

○MOROTOMI Takahiko, SAITO Noriko, YOSHII Shinji, HIRATA-TSUCHIYA Shizu, WASHIO Ayako,  
ICHIMARU-SUEMATSU Miki, NAKAGAWA Aika, NAKAYAMA Kohei, OTSUKA Mai, FUJIMOTO Masataka,  
MATSUYAMA Atsushi, URATA Mariko, HANADA Kaori, MIYAHARA Hirotake, KITAMURA Chiaki

【目的】 本学では歯科医学・医療を統合的に教育することを目的として、臨床基礎教育のうち歯の治療学、部分欠損補綴治療学、口腔機能再建治療学、口腔インプラント学および口腔外科学の各実習に共通の1人の仮想患者を設定し、初診から終診までの治療を想定したシナリオベース実習を導入し、株式会社ニッシンと共同開発した統合模型 iDSimを用いて実習を行っている。当科が担当する「歯の治療学」（う蝕学、保存修復治療学、歯内治療学および歯冠補綴学概論）は、3年次前期に学習する学生にとって最初の臨床基礎教育科目である。本科目の受講にあたり学生は1. 予習として実習毎の課題に関して自己学習レポートとして提出し、2. シナリオベースの体験実習を受講し、3. 実習後に内容に即した講義を受け、そして4. 治療技術習熟のために定着実習を行うという、講義に先駆け実習を行う体験先導型臨床基礎教育を実施している。今回、平成26年度および27年度の「歯の治療学」講義・実習最終回に実施したアンケート調査をもとに、歯の治療学におけるシナリオベース実習と体験先導型教育法の有効性について検証した。

【対象と方法】 本研究の主旨を説明し、同意を得られた第3学年の全学生（26年度：94名、27年度：97名）を対象として「歯の治療学」講義・実習最終回にアンケート調査を行った。アンケートでは1）講義前に実習を行うことについて、2）シナリオベース実習について、3）本教育カリキュラムの他教科への導入について、4）実習前に行う予習と自宅学習について、5）使用するノートブック（サブテキスト・実習書）についての各項目を調査した。

【結果および考察】 74.9%の学生が「実習が先が良い」と回答し、そのうち85.3%が「既に実習で体験した内容を講義で確認するため理解しやすい」と答え、42.7%が「実習中に理解できなかったことがあると、集中して講義を聴くことができる」と答えた。一方、「講義が先が良い」と答えた25.1%の学生のうちの83.3%が「知識を身につけた上で実習を受けたかった」と回答し、64.6%が「実習前に講義が無いと、実習の目的や内容が理解できず身が入らない」と答えた。シナリオベース実習については81.7%が「シナリオがあった方がよい」と回答した。その理由としては多くの学生が「臨床時のことが想定でき、治療を意識して実習に取り組めた」と記載した。このようにシナリオベース実習を用いた体験先導型教育についての評価は高い反面、他の教科にも導入して欲しいとの回答は59.7%にとどまった。予習に関しては「予習を行うことが苦痛だった」に「(強く) そう思う」と回答した学生は33.5%で「(全く) そう思わない」との回答(33.0%)と近似していたが、「予習に積極的に取り組めた」との問いには「(強く) そう思う」と回答した学生が「(全く) そう思わない」より多かった(60.2%/10.5%)。また「学習内容が記憶に残りやすい」にも肯定的な回答が多かった(58.1%/13.1%)。さらにシナリオをベースとした予習により「臨床の場で遭遇するような、患者の訴えや症状から疾患を想起する訓練となった」との問いに対して45.0%が肯定的であり、否定的な意見(22.5%)を上回った。以上から、講義・実習に先立ち予習を行わせることは学生にとって有用であることが示唆された。一方、「予習を行うことを通して、疑問を自分自身で解決することができるようになった」との問いには肯定的/否定的な回答が同数であり(28.3%/28.3%)、「講義以外でも自分で学習する習慣が身についた」に対しては肯定的な意見を否定的な意見が上回ったことから(22.5%/36.6%)、学生に自主学習の習慣を習得させるには至らなかった。「予習のみではその日に行う実習内容が理解できなかった」「予習課題の問題設定が曖昧で、何を調べればよいのか分からなかった」「予習課題についてもっとヒントが欲しい」の各の問いに「(強く) そう思う」と回答した学生の割合は、平成26年度と比較し27年度で低下した。27年度の予習課題を、小問に分けるなど正解を導きやすいように改善した結果と思われる。

【結論】 シナリオベース実習と体験先導型教育は臨床基礎教育法として有効であることが示唆された。

## 重度歯周疾患患者における 長期歯牙凍結保存後の意図的再植術 10 年経過の予後

日本大学松戸歯学部 再生歯科治療学講座

○牧村 英樹、小島 早絵、菊地 信之、長濱 文雄、和田 守康

### Prognosis of replantation after 10 years for long term cryopreserved incisor teeth in a patient with serious periodontitis

Departments of Renascent Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Hideki MAKIMURA, Sakie KOJIMA, Nobuyuki KIKUCHI, Fumio NAGAHAMA, Moriyasu WADA

#### 【緒言】

われわれは、イヌ実験において、凍結再植歯を病理組織学に検討を行った結果、凍結期間 6 ヶ月において、歯根膜様の膠原線維の梁状骨の形成を認め、再植歯表面において、その数の減少を認めたものの、セメント芽細胞の存在と骨芽細胞の出現も認められたことから、再植歯の歯根膜組織において、6 ヶ月の長期的な凍結保存は有効であることを考え、今回、臨床に応用した。患者は上顎左右中切歯ともに最深部のポケット 7mm、動揺Ⅱ度、X線診では根長 1/2 の歯槽骨の喪失を認めた。所見でも、側方運動時に上顎左右中切歯に早期接触を認めたため、上顎左右中切歯限局の咬合性外傷を原因とする重度歯周病と診断した。咬合調整、スケーリング→SRP、RCTをおこなったが、動揺もおさまらず歯肉の退縮もあり、歯周病の顕著な改善が認められなかったため、抜歯を選択して抜歯窩の治癒を待ってから Br、義歯、インプラントなどの治療法に加えて、凍結した歯牙の再植術を提案し患者が再植術を希望したため再植術を行い再植後 1 年、3 年、5 年、10 年と臨床的検討を行った結果、若干の知見を得たので報告する。

#### 【症例と経過】

**主訴：**上顎左右中切歯の動揺、出血排膿と左下 7 付近の疼痛

**診断：**術前検査の歯周精密検査では、上顎左右中切歯ともに最深部のポケット 7mm、動揺Ⅱ度、X線診では根長 1/2 の歯槽骨の喪失を認めた (右図)。所見でも、側方運動時に上顎左右中切歯に早期接触を認めたため、上顎左右中切歯限局の咬合性外傷を原因とする重度歯周病と診断した。

**治療方針：**咬合調整、スケーリング→SRP、RCTをおこなったが、動揺もおさまらず歯肉の退縮もあり、歯周病の顕著な改善が認められなかった。これらの歯頸部歯肉ラインや骨欠損形態から推測すると、GTRを含む Fop などを行ってもこれ以上の歯肉の左右非対称退縮が生じる可能性が高いため、抜歯を選択して抜歯窩の治癒を待ってから Br、義歯、インプラントなどの治療法に加えて、凍結した歯牙の再植術を提案した。

これらの選択肢の中からできれば自分の歯を生かして審美的にして欲しいという患者の希望もあり本症例では歯牙を凍結後再植し、咬合の改善をはかることにした。

**治療計画：**上顎左右中切歯を抜去、凍結保存後骨の状態を見て再植し、上部構造物装着を行う。

#### 【考察及び結論】

本症例では、凍結歯の再植 1 年、3 年、7 年後、10 年後の各種検査において予後は良好であった。

これは、抜去時に歯根膜細胞の傷害を最小限に抑えられた事と、プログラムフリーザーを用いて緩速凍結を行ったことにより、歯根膜細胞の傷害を最小限にできたことが良好な結果につながったのではないかと思う。

しかしながら置換性歯根吸収が発生した場合は、数年後に脱落する可能性もある。移植歯は、完全な歯根膜治癒が得られれば一生涯、正常歯と同様に機能することが可能とも考えられている。また、歯根膜傷害や完全な歯根膜治癒が認められない場合、再植歯に部分的に骨癒着が生じる可能性も考えられるが、骨癒着には歯根吸収を伴わないこともあり、その場合には歯根吸収が遅いことが報告されており、今回のケースではまだ歯根吸収や骨癒着の症状は確認されていないため、あと数年以上は臨床的な実用に耐えうる可能性があると考えられた。したがって、長期歯牙凍結保存後の意図的再植術は有用であることを示唆しているが、今後歯根膜の吸収やアンキローシスなどがいないか、特に歯周組織の経時的変化に注目して、長期的な経過観察を行い、更なる長期的な凍結保存を行った再植歯の組織学的研究と、歯根膜細胞の再生力を得る凍結方法および凍結温度、凍結保存液、凍害防止剤の研究が必要であると思われる。