

試作バルクフィルフロアブルレジンの研磨面性状の評価

日本大学歯学部保存学教室修復学講座

○飯野正義, 黒川弘康, 寺井理沙, 下山侑里子, 水口未穂, 古市哲也, 宮崎真至, 吉野弘三

Evaluation of surface texture of an experimental bulkfil flowable resin composite

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry

○IINO Masayoshi, KUROKAWA Hiroyasu, TERAJ Risa, SHIMOYAMA Yuriko,
MIZUGUCHI Miho, FURUICHI Tetsuya, MIYAZAKI Masashi, FUKUISHI Kozo

【緒言】

硬化深度の向上を目的として開発されたバルクフィルタイプのフロアブルレジン (以後, バルクフィルフロアブル) は, ペースト内部への光線透過性を高める必要があることから, レジンモノマーの種類, フィラー形状, 含有量あるいはフィラー表面処理法は各製品によって独自の設計がなされている。また, バルクフィルフロアブルの種類によっては, 簡便な操作で高い研磨性を得ることが困難な場合も考えられる。今回, 新規有機無機複合フィラーの採用によって, 優れた光学的特性とともに高い研磨性を特徴とするバルクフィルフロアブルが開発された。そこで, 研磨システムの違いが各種バルクフィルフロアブルの研磨面性状に及ぼす影響について, 表面粗さおよび光沢度を測定するとともに, 表面性状についてレーザ顕微鏡観察を行うことによって検討を加えた。

【材料および方法】

新規バルクフィルフロアブルとして EBF-001 (以後, EBF, トクヤマデンタル) を, 対照として Filtek Bulk Fill Flowable (以後, FIL, 3M ESPE) および SureFil SDR Flow+ (以後, SDR, Dentsply) を用いた。研磨システムとしては, コンポマスター (松風), スーパースナップ (松風) およびオクルーブラシ (sds Kerr) を用いた。

内径 10 mm, 高さ 2.1 mm のテフロン型にレジンペーストを充填, 加圧整形し, ポリstripps を介して 60 秒間照射した。これを, 37±1°C の精製水中で 24 時間遮光下に保管したものをレジン試片とした。研磨操作を行うレジン試片の基準面は, 形態修正用ダイヤモンドポイント (ブルーホワイトダイヤモンド CR フィニッシング, sds Kerr) を用いた研削面の表面粗さに近似する SiC ペーパーの研磨面から選定した。この研磨開始基準面に対して荷重 0.5 N, マイクロモーターの回転数を無荷重の状態, コンポマスターおよびスーパースナップでは 10,000 rpm, オクルーブラシでは 5,000 rpm とし, 30 秒間 (スーパースナップでは緑および赤の順で 15 秒間ずつ, 合計 30 秒間), 注水することなく研磨を行い, 表面粗さおよび光沢度の測定を行った。次いで, これらの試片をサーマルサイクル試験装置 (B type, トーマス科学) を用いて 5°C~55°C を 1 サイクルとして, 各温度における係留時間を 60 秒間に設定したサーマルサイクルを 10,000 回負荷した後, 表面粗さおよび光沢度の測定を行った。なお, 試片の数は各条件についてそれぞれ 3 個とした。

表面粗さの測定は, 形状測定レーザ顕微鏡 (VK-9710, キーエンス) を用い, 試片中央付近の 3 カ所について行い, その平均値をもってその試片の表面粗さとした。試光沢度の測定は, デジタル光沢度計 (GM-26D, 村上色彩技術研究所) を用い, 入射角および受光角を 60° とし, 黒ガラス標準板でキャリブレーションした後に行った。

【成績および考察】

形態修正用ダイヤモンドポイントを用いて研削したレジン試片の表面粗さ値は 0.6~0.8 μm を示し, FIL および SDR で #600 の, EBF で #800 の SiC ペーパーで研磨した面の表面粗さと統計学的に有意差は認められなかったことから, これらを研磨開始基準面とした。この研磨開始基準面に対して, コンポマスターを用いて研磨した場合の表面粗さは, いずれの製品においても低下する傾向を示し, FIL と SDR で約 0.3 μm を, EBF では約 0.1 μm であった。また, 光沢度は EBF で最も高く, 次いで, FIL および SDR の順であった。このように, 同一の研磨システムを用いて研磨を行っても, 製品によって表面粗さおよび光沢度に違いが認められた理由としては, 各製品に用いられているフィラーの形状や表面処理の違い, マトリックスレジンの重合性の違いによるものと考えられた。

【結論】

新規バルクフィルフロアブルは, 短時間の研磨によって良好な表面性状を獲得することが可能な製品であり, その臨床有用性が示された。

コンポジットレジン修復周囲に生じたギャップの光干渉断層計観察

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野, ²国立長寿医長研究センター
○ザクズーク リマ¹、島田康史¹、周媛¹、角 保徳²、田上順次¹

Assessment of gap formation around composite restorations using optical coherence tomography

¹Tokyo Medical and Dental University, ²National Center for Geriatrics and Gerontology
○Rima Zakzouk¹, Yasushi Shimada¹, Yuan Zhou¹, Yasunori Sumi², Junji Tagami¹

Background and purpose: Swept source optical coherence tomography (SS-OCT) is an interferometric imaging technique that has been recently used in cariology. In spite of progress made in adhesive dentistry, the composite restoration has been failing due to secondary caries which occur due to environmental factors in oral cavities. Therefore, a precise assessment to effective marginal sealing of restoration is highly required. The aim of this study was evaluating gap formation at composite/cavity walls interface with or without phosphoric acid etching using SS-OCT.

Materials and methods: Round tapered cavities (2×2 mm) were prepared in three locations, crown, cervical, and root of bovine incisors teeth in two groups (SE and PA Groups). While self-etching adhesive (Clearfil SE Bond, Kuraray Noritake Dental) was applied for the both groups, Group PA had been already pretreated with phosphoric acid etching (K-etchant gel, Kuraray Noritake Dental). Subsequently, both groups were restored by Estelite Flow Quick flowable composite resin (Shade A1, Tokuyama Dental). Following 5000 thermal cycles, four cross-sectionals were obtained from each cavity using SS-OCT at 1310-nm wavelength. Scanning was repeated after two months to monitor the gap progress. Then the average percentage of gap length was calculated using image analysis software, and the difference of mean between both groups was statistically analyzed by t-test. Subsequently, the results were confirmed by sectioning and observing representative specimens under confocal laser scanning microscope (CLSM).

Results and Discussions: The results showed that pretreatment with phosphoric acid etching, Group PA, led to significantly bigger gaps in crown ($p < 0.05$) and cervical ($p < 0.005$) compared to SE group, while in the root no significant difference was observed between both groups ($p > 0.05$). On the other hand, the gaps formed in root's cavities were significantly bigger than those in crown and cervical within the same group. This study investigated the effect of phosphoric acid on gap length progress on the composite restoration. Because of SE bond adhesive contains 10-methacryloxydecyl dihydrogen phosphate (MDP), which is known to have a high chemical interaction with hydroxyapatite we had a good marginal sealing performance better than PA group where the phosphoric acid has less intense interaction with hydroxyapatite. Therefore, using Phosphoric acid etching seems to add no benefit to the restoration process.

Conclusions: Phosphoric acid etching treatment did not reduce the gap formation even in different locations of the teeth, suggesting a reconsideration of its use, given its bad effects on dental tissues.

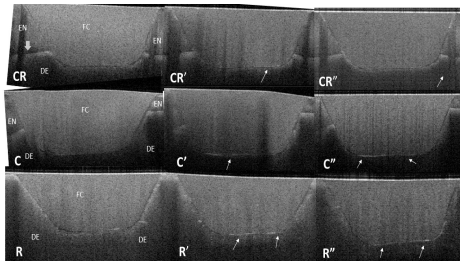


Fig1: SE group

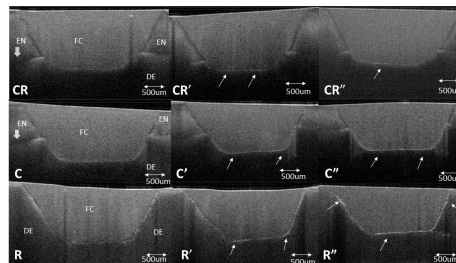


Fig 2: PA group

Representative (SS-OCT) images in three locations of the tooth. Before thermal-cycling (CR-C-R), after thermal-cycling (CR'-C'-R') and after 2 months (CR''-C''-R''). (EN) enamel, (DE) dentin, (FC) flowable composite (gray arrows) indicate to dentinoenamel junction.

窩洞深度及び接着材の違いが窩洞底面の適合性に及ぼす影響

¹東京医科歯科大学医歯学総合研究科 歯制御学分野

²おおくら歯科口腔外科

³国立長寿医療研究センター

○袁 楊^{1,2}、島田 康史¹、周 媛¹、角 保徳³、田上 順次¹

Effect of C-factor on cavity floor adaptation of three self-etch adhesives

¹Tokyo Medical and Dental University, Cariology and Operative Dentistry

²Ohkura Dentistry & Oral Surgery

³National Center for Geriatrics and Gerontology

○Yang Yuan^{1,2}, Yasushi Shimada¹, Yuan Zhou¹, Yasunori Sumi³, Junji Tagami¹

【目的】

コンポジットレジン修復において C-factor (接着面積/非接着面積) は重合収縮応力の影響を考察する指標として用いられている。窩洞外形一定の場合、窩洞が深くなると C-factor は大きくなる。本研究の目的は、C-factor 及び接着材の違いによる窩洞底面適合性への影響を、OCT を用いた非破壊的観察手法で比較検討した。

【材料及び方法】

実験材料として、2ステップ接着材のクリアフィルメガボンド (MB、クラレノリタケデンタル)、1ステップ接着のボンドフォース II (BF、トクヤマデンタル) およびスコッチボンドユニバーサル (SU、3M ESPE) を使用した。

ウシ抜去エナメル質の唇側歯冠部中央に、モデリングトリマーにて平坦部を作成し、耐水性シリコンカーバイドペーパー #600 にて研磨した後、直径 2mm×深さ 1mm 及び直径 2mm×深さ 2mm の外開きシリンダー状窩洞 2 種類を 30 窩洞ずつ作製した。

3 種類の接着材をメーカー指示通りに作用させ、エステライトフロークイック (トクヤマデンタル) にてバルク充填を行った (n = 10)。硬化 1 週間後、波長走査型干渉断層計 (SS-OCT) を用いて窩底部適合状態を観察し、Image J にて GAP 長の割合を測定した。その後窩洞を抽出し、半切後に共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) および走査電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察した。

【結果・考察】

SS-OCT 画像では、窩底部の GAP は帯状の高い輝度を示すシグナルとして観察された。GAP 長の割合を分析した結果、深さ 1mm の窩洞では MB ならびに SU が低い窩底部 GAP 率を示した (p < 0.05)。しかしながら深さ 2mm の窩洞では 2 種の接着材において GAP 率の上昇がみられ、MB が低い窩底部 GAP 率を示した (p < 0.05)。

【結論】

本実験結果から、C-factor が窩底面の適合性に与える影響が確認され、また使用する接着材の影響もみられた。C-factor の大きい 1 級窩洞のフロアブルレジン充填では、ギャップを極力防ぐために厚さ 1mm 以下の積層充填が必要と思われた。

Figure 1. Typical OCT images of Clearfil Mega Bond

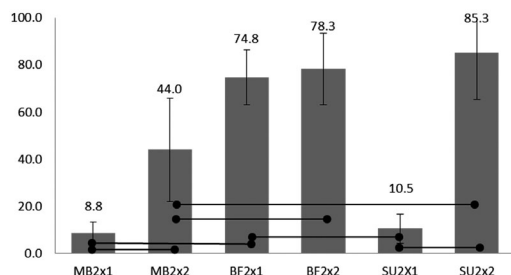
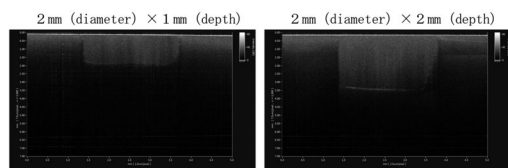


Figure 2. The average gap percentage at the cavity floor based on the evaluation of SS-OCT by ImageJ
●—● indicates significant difference between groups
(P < 0.05, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney Test)

結核菌表層糖脂質誘導体の *Streptococcus mutans* バイオフィーム形成に与える影響

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯蝕学分野¹、微生物感染症学分野²、小児歯科学分野³

○竹中彰治¹、小田真隆²、黒澤美絵³、土門久哲²、大墨竜也¹、寺尾豊²、野杵由一郎¹

Functional glycolipid yielded significant inhibitions on bacterial adhesion and biofilm formation of *Streptococcus mutans* and caused biofilm detachment.

Division of Cariology¹, Microbiology and Infectious Diseases², Pediatric Dentistry³,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○TAKENAKA Shoji, ODA Masataka, KUROSAWA Mie, DOMON Hisanori, OHSUMI Tatsuya,
TERAO Yutaka, NOIRI Yuichiro

【目的】殺菌に頼ったバイオフィーム制御は口腔細菌叢の変化の懸念があるだけでなく、付着界面にバイオフィーム構造が残存し、バイオフィーム再形成の足場となる可能性が指摘されている。本研究では、結核菌の表層糖脂質をリード化合物とする誘導体(MV)の *Streptococcus mutans* に対する増殖抑制能、バイオフィーム (BF) 形成抑制効果および剥離効果について検索した。

【材料および方法】0~100 μM の MV 含有 Brain Heart Infusion (BHI) 培地中で *S. mutans* MT8141 株を培養し、経時的な増殖を測定した。また、24 穴マイクロプレートを用い、0.5%スクロース含有 BHI 培地に MV を添加して同菌株を培養し、12 時間および 24 時間培養後の BF 量を、クリスタルバイオレット法により定量した。BF 形態は Calcein-AM および Rhodamine-B により蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。さらに、12 時間培養後の浮遊菌、BF 形成菌および 24 時間培養後の BF 形成菌の遺伝子発現動態を解析するため、RiboPure-Bacteria Kit (Thermo Fisher Scientific 社製)を用いて mRNA を抽出後、逆転写を行い cDNA を作製した。次いで、16S rRNA を内部標準とし、*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *comD*, *LuxS* の遺伝子発現量をリアルタイム PCR で解析した。また、24 時間培養後の GTF の発現は、ウエスタンブロット法により解析した。

MV 処理付着面に対する BF 形成抑制効果を観察するため、ハイドロキシアパタイトディスク (HA; オリンパスバイオマテリアル社製) を MV 溶液 (50 μM) に 1 時間浸漬させたのち、無刺激唾液中に 1 時間浸漬し試料とした。HA をフローセルチャンバー (IBI Scientific 社製) に装着後、対数増殖期の *S. mutans* 培養液をチャンバー内に 30 分静置したのち、0.05%含有 BHI 培地を毎分 2 ml の速度で 24 時間灌流させた。形成した BF の形態を SEM にて観察した。

【結果】最大 50 μM までの MV 存在下では BF 形成が観察されたが、60~100 μM 添加条件下ではマイクロプレートへの付着が抑制された。また、本実験条件下では、MV の *S. mutans* 増殖に対する影響は認められなかった。また、30 μM 以上の MV 濃度においてプレート底面に形成した BF は脆弱であり、ピペッティングにより容易に BF 構造が剥離した。50 μM 添加群において、浮遊菌 (12 時間培養) および BF 形成菌 (12 および 24 時間培養) の *gtfB* および *gtfC* の遺伝子発現レベルを解析した結果、コントロール群 (MV 未添加) と比較して有意に増加し、*gtfD* および *LuxS* の発現は減少した。また、24 時間培養後の BF において、10 μM の MV 添加群は、培養上清から遊離型 GTF が検出されなかった。

フローセル培養系を用いて HA 上に形成した BF を観察した結果、厚みを持った BF が形成され発達したクラスター状の構造体も認められた。一方、MV コート群の BF は、コントロール群と比較して薄く、HA の基底面が一部露出していた。

【考察】MV 存在下で形成した BF マトリックスは、*gtf* 群の遺伝子発現量バランスを崩し、かつ、*LuxS* が関与するクオラムセンシング機構に影響を与えることで、構造体の安定性が低下し易剥離性となった可能性が推察された。また、これらの遺伝子発現の変化が MV コートした HA 上でも付着を阻害した可能性が考えられる。

【結論】今回用いた結核菌表層糖脂質誘導体は、*S. mutans* の増殖を抑制せずに細菌付着を抑制するとともに、同菌の遺伝子発現を変化させて BF マトリックス構造を脆弱にすることで、易剥離効果が得られることが明らかとなった。以上の結果より、殺菌に頼らない新しいバイオフィーム制御剤としての応用の可能性が示唆された。

カキタンニン処理を行ったポリマイクロバイアルバイオフィーム細菌叢の網羅的解析

神奈川歯科大学大学院歯学研究所 歯蝕制御修復学分野¹, 微生物感染学分野², 神経組織発生学分野³,
クリニカル・バイオマテリアル分野⁴, 東北大学大学院歯学研究所歯科保存学分野⁵, ACTA⁶
○富山 潔¹, 石澤将人¹, 長谷川晴彦¹, 渡辺清子², 河田 亮³, 二瓶智太郎⁴, 齋藤正寛⁵,
高橋 理³, 浜田信城², Exterkate R.A.M⁶, 向井義晴¹

Comprehensive analysis of microbial community structure in polymicrobial biofilms treated with tannin from astringent persimmon

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

⁴Div. of Clinical Biomaterial, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University,

⁵Div. of Operative Dentistry, Tohoku University, Graduate School of Dentistry,

⁶Department of Preventive Dentistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), The Netherlands

○ TOMIYAMA Kiyoshi¹, ISHIZAWA Masato¹, HASEGAWA Haruhiko¹, WATANABE Kiyoko², KAWATA Akira³, NIHEI Tomotaro⁴,
SAITO Masahiro⁵, TAKAHASHI Osamu³, HAMADA Nobushiro², Exterkate R.A.M⁶, MUKAI Yoshiharu¹

【研究目的】 バイオフィーム中にどのような細菌が、どのような量比で含まれているかを解析することは、病因の推定、時間的な病態の変化に伴う細菌叢の変動、抗菌剤の効果、安全性、安定性などを評価する上で重要である。我々は、渋柿由来の縮合型タンニンを含む食品・化粧品等の原料 (Pancil PS-M : Rilis Co., Ltd., Osaka, Japan) が唾液を用いた多菌集合有バイオフィームモデルであるポリマイクロバイアル (PM) バイオフィーム中の病原性菌を持続的に抑制できることを報告した¹⁾。また、第138, 139, 140, 142および143回本学会において、Pancil PS-Mが同濃度のタンニン含有の緑茶抽出物や0.2% グルコン酸クロルヘキシジンよりも持続的にPMバイオフィームの増殖および乳酸産生を抑制できることを報告した。今回、Pancil PS-Mがバイオフィームの多様性にどのような影響を及ぼしているのかを分析する目的で、PMバイオフィームに対する抗菌剤処理後のバイオフィーム群集構造の網羅的分析を行った。

【実験材料および方法】 PMバイオフィーム形成用材料には直径12 mm厚さ150 μmのガラス円板 (Menzel, Braunschweig, Germany) を用いた。処理剤には、4% Pancil PS-M, Corsodyl (0.2 vol% グルコン酸クロルヘキシジン, GlaxoSmithKline, Brentford, UK), およびタンニン含有量を4% Pancil PS-Mと同濃度に調整した緑茶抽出液 (Rilis Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いた。実験群は、① 非処理群 (Cont), ② 4.0 vol% Pancil PS-M 群 (P), ③ 0.2% グルコン酸クロルヘキシジン群 (Cx), ④ 緑茶抽出液群 (G) の4群とした。PMバイオフィームの培養には、一被験者から採取した刺激唾液を用いた。培養液にはunbuffered McBain 2005 (0.2% スクロース含有) を用い、50倍希釈となるように刺激唾液を混入した。培養液の交換は10時間、14時間のサイクルで行ない、培養24時間の時点で各処理剤あるいは滅菌脱イオン水 (Cont) に5分間浸漬後、72時間まで嫌気条件下 (CO₂ : 10.0%, H₂ : 10.0%, N₂ : 80.0%, 37°C) で培養した。[実験1] 抗菌剤処理後のPMバイオフィーム群集構造の網羅的分析: 試片に付着しているPMバイオフィームからDNA抽出後 (MORA-EXTRACT kit), 16S rDNAを標的とし、プライマーとしてPro341F-Pro805Rを用いて、次世代シーケンサー (MiSeq™, Illumina, USA) により次世代シーケンス・アンプリコン解析を行ない、バイオフィームの網羅的分析を行った。サンプル間の比較解析は、Metagenome@KIN software (World Fusion) を用いて、二次元、三次元主成分分析およびクラスター解析 (クラスターリング手法: 群平均法, 距離関数: ピアソンの相関係数) により、各群のバイオフィーム構造にどのような変動が生じているのかを比較、検討した。[実験2] 蛍光顕微鏡によるバイオフィーム中の生菌/死菌の定量分析および形態学的観察: 培養72時間の時点で剥離、回収したPMバイオフィームに、生・死全細菌検出用の蛍光試薬としてLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen Ltd, Paisley, UK) を用いて、暗所、室温下で30分間反応させた後、蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka, Japan) を用いて、生・死全細菌の定量分析およびバイオフィーム構造の観察を行った。

【結果】 実験1: 24時間培養したPMバイオフィームに各処理を行い、その後、バイオフィーム培養を48時間継続して行った結果、PとContのバイオフィーム群集構造間には差が認められなかったが、Cxと他群間には明瞭な差が認められ、GとCont, P間にも、一定の差が認められた。PとContの構成菌は *Streptococcus salivarius* が主体であったが、Cx群では、*Haemophilus parainfluenzae* や *Streptococcus anginosus* の割合が、G群では、*Streptococcus parasanguinis* の割合が増加していた。実験2: LIVE/DEAD染色後の、PMバイオフィーム中の全ての細菌細胞に対する死菌細胞の割合は、Cont群: 4.1%, Cx群: 48.5%, G群: 50.4%, P群: 75.6%であった。

【考察および結論】 *Haemophilus parainfluenzae* は肺膿瘍の原因菌として、*Streptococcus anginosus* は誤嚥性肺炎の、そして *Streptococcus parasanguinis* は口腔バイオフィームの早期定着群として報告されていることから、カキタンニンは、非処理細菌叢中の病原性菌種に影響を与えず細菌数を減少させる可能性が示された。

(参考文献) 1. Tomiyama K et al., BioMed Res Int 2016; Article ID 5730748 : 7 pages. (本実験は、神奈川歯科大学倫理委員会に研究方法の詳細 (唾液採取を含む) を提出し、許可を得てから行った (承認番号206)。

シトルリン化ビメンチンは破骨細胞分化を促進する

¹⁾徳島大学大学院医歯薬学研究部歯科保存学分野、²⁾日本学術振興会特別研究員 DC2、
³⁾The Forsyth Institute、⁴⁾ 徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔保健支援学分野
○進藤智^{1,2)}、池田淳史³⁾、細川義隆¹⁾、細川育子¹⁾、尾崎和美⁴⁾、松尾敬志¹⁾

Citrullinated vimentin promotes osteoclastogenesis

¹⁾Tokushima University Graduate School, Institute of Biomedical Sciences, Department of Conservative Dentistry
²⁾JSPS Research Fellow DC2 ³⁾The Forsyth Institute ⁴⁾Tokushima University Graduate School, Institute of Biomedical
Sciences, Department of Oral Health Care Promotion
○Satoru Shindo^{1,2)}, Atsushi Ikeda³⁾, Yoshitaka Hosokawa¹⁾, Ikuko Hosokawa¹⁾, Kazumi Ozaki³⁾, Takashi Matsuo¹⁾

【研究目的】

炎症局所において、タンパク質のアルギニン残基をシトルリン残基に変換する酵素である Peptidyl Arginine Deiminase (PAD)の酵素反応によって、シトルリン化タンパク質が増加することが明らかになりつつある。近年、細胞骨格を構成するタンパク質であるビメンチンが関節リウマチ患者の滑膜中においてシトルリン化ビメンチン(CV)として発現しており、CVに対する自己抗体が関節リウマチの特異的診断マーカーとされている。我々は、マウス歯周炎歯肉においてCVが発現している、骨吸収の増悪に関与しているということを第59回秋季日本歯周病学会学術大会にて報告している。しかし、CVが破骨細胞分化に直接与える影響の詳細については現在のところ不明である。本研究では、CVがマウス破骨細胞分化に与える影響を解明するために実験を行った。

【材料および方法】

8週齢 C57BL/6N マウスの骨髄由来単核球を MCSF (50 ng/ml) で3日間前培養し、破骨前駆細胞としたものを実験に用いた。破骨前駆細胞を MCSF (50 ng/ml)、RANKL (100 ng/ml)、各濃度のビメンチンおよび CV にて刺激を行い、RANKL 依存的な破骨細胞形成能への影響を TRAP 染色にて、破骨細胞活性化関連遺伝子である NFATc1 の mRNA 発現を real time PCR にて解析を行った。また、CV が関与しているシグナル伝達経路を解明するために、破骨前駆細胞を CV 存在下もしくは非存在下で RANKL 依存的に刺激したのから RNA を回収し、G protein-coupled receptor (GPCR) qPCR array を行い CV 刺激特異的に活性化されるシグナル伝達経路を探索した。その結果に基づいて、CV で刺激された破骨前駆細胞における PKC- δ のリン酸化をウェスタンブロットにて、PKC- δ 阻害剤の影響を TRAP 染色、real time PCR にて解析を行った。

【結果】

CV はシトルリン化されていないビメンチンに比べ、破骨前駆細胞の破骨細胞への分化をより促進した。さらに、CV 刺激により破骨前駆細胞の NFATc1 mRNA 発現は有意に増加した。GPCR qPCR array の結果、CV 刺激により破骨前駆細胞内で PKC ファミリーがシグナルの伝達に関与していることが示唆された。そこで、我々は特に PKC- δ に着目したところ、CV は破骨前駆細胞の PKC- δ リン酸化を促進した。また、PKC- δ 阻害剤は CV 刺激破骨前駆細胞の NFATc1 の mRNA 発現と破骨細胞形成能を有意に阻害した。

【考察および結論】

以上の結果より、CV が破骨前駆細胞の PKC- δ を介して NFATc1 の発現を増加させ、破骨細胞分化を促進するということが明らかとなった。炎症局所ではタンパク質がシトルリン化することで、病態の増悪に関与していると言われている。今回の結果から、歯周炎変局所においても、シトルリン化タンパク質である CV が破骨細胞を活性化し、骨吸収を増悪させている可能性が示唆された。

(会員外共同研究者) 河井敏久 (The Forsyth Institute, Cambridge, MA, USA)

(実験動物委員会承認番号 14-005)

ヒト歯肉上皮細胞における IL-35 の影響について

愛知学院大学歯学部歯周病学講座

○岡田康佑、藤村岳樹、菊池毅、相野誠、神谷洋介、伊澤有郎、
後藤久嗣、岡部猪一郎、三宅永莉子、三谷章雄

Effect of IL-35 on human gingival epithelial cell.

Aichi Gakuin University, School of Dentistry, Department of Periodontology

○OKADA Kosuke, FUJIMURA Takeki, KIKUCHI Takeshi, AINO Makoto, KAMIYA Yosuke,
IZAWA Ario, GOTO Hisashi, OKABE Iichiro, MIYAKE Eriko, MITANI Akio

【目的】

歯周病は歯周組織における、プラーク中の細菌感染による慢性炎症性破壊であり、その発症や進行には宿主の生体防御機構が大きく関わっている。上皮細胞は、生体防御の最前線であり、物理的バリアとしてはたらくことや、サイトカインや抗菌物質を産生することで生体防御に関与している。また、Interleukin(IL)-1 β 、IL-6、IL-8を含む炎症性サイトカインは、マクロファージやリンパ球を含めた免疫細胞、破骨細胞や線維芽細胞にはたらき、歯槽骨吸収や、上皮の付着破壊を引き起こし、歯周病病態の進行に関与していることが知られている。

近年発見された抗炎症性サイトカインであるIL-35は、p35とEpstein-Barr virus-induced gene 3 (EBI3) からなるヘテロダイマーである。主に制御性T細胞より分泌され、制御性T細胞に働き、IL-10やTransforming growth factor- β (TGF- β)の産生を促し、炎症を抑制するはたらきがあることが知られている。また、実験的にコラーゲン関節炎や全身性エリテマトーデスを惹起したマウスにIL-35を投与した結果、症状の改善が認められたと報告されている。さらに、我々はこれまでの研究で、歯周病患者において、健常者と比較し、歯肉溝滲出液中のIL-35タンパク量が有意に増加し、さらに歯周病の臨床所見であるProbing DepthおよびClinical Attachment Levelと正の相関を示すことを明らかにしている。しかし、歯周病病態におけるIL-35の役割は未だに不明な点が多い。そこで、本研究では歯周病病態において、IL-35が歯肉上皮細胞に対しどのような影響を与えるかを検討した。

【材料および方法】

ヒト歯肉上皮細胞株 (Ca9-22) を12well plateに播種し、10% FCSを含むDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)培地に培養を行った。セミコンフルエントの状態にてinterferon- γ を添加し、12時間後に *Escherichia coli*由来lipopolysaccharide (LPS)刺激およびrecombinant IL-35 (rIL-35) 添加を行いIL-1 β 、IL-8などの炎症性サイトカインの遺伝子発現量をReal-Time PCR法で測定した。また、遺伝子発現に差が認められた炎症性サイトカインのタンパク発現に関してはELISA法にて解析を行う予定である。実験群はコントロール群、rIL-35単独添加群 (rIL-35群)、LPS添加群 (LPS群)、rIL-35+LPS添加群 (rIL-35+LPS群) の4群で行った。

【結果】

LPS群において、コントロール群と比較し、IL-1 β およびIL-8の遺伝子発現量が有意に増加した。また、rIL-35+LPS群では、LPS群と比較し、IL-1 β およびIL-8の遺伝子発現量が有意に減少していた。また、rIL-35群では炎症性サイトカインの遺伝子発現量に変化は認められなかった。

【考察】

本研究より、IL-35が歯肉上皮細胞において、LPS刺激にて増強されたIL-1 β およびIL-8の遺伝子発現を抑制することが示された。今後より詳細な検討が必要ではあるが、IL-35は、歯周病病態における過剰な炎症反応を抑制する可能性が示唆された。

接着性を有する MTA 含有直接覆髄材の開発

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室¹

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座硬組織発生物理学教室²

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座生体材料工学教室³

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科う蝕制御学分野⁴

○戸井田 侑¹, 川野 晋平¹, 丁 世俊¹, 長谷川 智香², チョウドリ アルマス¹, サイケオ ピポップ¹,
アハメッド ズバエル¹, 成徳 英理^{1,3}, 勝俣 愛一郎¹, 福澤 尚幸¹,
松本 真理子¹, 角田 晋一¹, 星加 修平¹, 池田 考績¹, 田中 享¹, 島田 康史⁴,
田上 順次⁴, 網塚 憲生², 吉田 靖弘³, 佐野 英彦¹

Development of direct pulp capping material containing MTA with adhesive property

Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine¹

Department of Developmental Biology of Hard Tissue, Division of Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine²

Department of Biomaterials and Bioengineering, Division of Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine³

Department of Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University⁴

○Y. Toida¹, S. Kawano¹, S. Ting¹, T. Hasegawa², A. Chowdhury¹, P. Saikaew¹, A. Zubaer¹, E. Seitoku^{1,3},
A. Katsumata¹, N. Fukuzawa¹, M. Matsumoto¹, S. Kakuda¹, S. Hoshika¹, T. Ikeda¹, T. Tanaka¹,
Y. Shimada⁴, J. Tagami⁴, N. Amizuka², Y. Yoshida³, H. Sano¹

【目的】 Mineral trioxide aggregate (MTA) による直接覆髄が臨床で有効であることは多くの研究で明らかになっている。しかし、MTA そのものは臨床での操作性に難があり、また操作性を向上させた製品であっても接着性を有さないものがある。そこで、歯質接着性を有するリン酸化プルランに着目し、MTA を配合し高い操作性を持つ新規直接覆髄材を開発した。本実験ではこの新規材料の生体適合性及び二次象牙質形成能をサル歯髄を用いて検討した。

【材料および方法】 材料として新規直接覆髄材はリン酸化プルラン含有新規直接覆髄材 (PL: ジーシー)、MTA セメント含有直接覆髄材の NEX-MTA セメント (NX: ジーシー) 及びセラカル LC (TH: Bisco)、水酸化カルシウム含有直接覆髄材のダイカル (DY: デンツプライ三金) を使用した。実験には 5 頭のカニクイザルを用いた。ラウンドバーを用い歯頸部より歯髄腔に向かって直径 1.0mm の露髄窩洞を形成し、止血確認後、上記材料にて直接覆髄を行った。その後 G ボンドプラス (ジーシー) にてボンディング後 MI フロー (ジーシー) にて充填を行った。4 種の材料を実験期間 3 日、7 日、70 日間の期間に分けた。所定の期間後に実験動物を薬殺し、抜去した歯を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定した。それら歯の脱灰後、パラフィン包埋を行った。作成した切片を H-E 染色し、光学顕微鏡にて観察した。

【結果】 70 日後の PL、NX、TH において天然の象牙質に似た象牙細管様の構造を持つ良好な二次象牙質が認められた。DY では他と比べ顕著に薄い二次象牙質が確認され象牙細管様の構造は確認できなかった。70 日後の PL、NX、TH を充填した歯牙の露髄部位には、エオジン好性を示す二次象牙質の形成が認められ、このような象牙質直下の歯髄腔には、象牙芽細胞が規則的に配列しており、細胞突起を象牙質内部に伸長していた。歯髄側より離れた領域の象牙質は、内部にいくつかの不定形構造物を封入しており、象牙細管は認められなかったものの、歯髄側の象牙質は、内部に象牙細管を封入しており、正常象牙質と同様の構造を示していた。DY を充填した歯牙の露髄部位では、わずかな二次象牙質の形成しか認められなかった。

【考察】 PL が NX や TH と同等の二次象牙質による治癒構造を示したことで、新規直接覆髄材が臨床的に有効である可能性が示唆された。これらの治癒過程として、正常象牙質の形成と同様に、歯髄内の未分化間葉系細胞が象牙芽細胞に分化し、露髄部位を修復するように二次象牙質を形成していく可能性が推測された。今後は各種免疫染色法により生化学的な治癒過程の解明、辺縁封鎖性や長期耐久性を含めた結果についても検討する必要がある。また臨床的には従来型の製品に対して硬組織接着能や良好な機械的性質といった点から操作性の向上も期待できるため、その評価を行っていく必要がある。

【結論】 リン酸化プルラン含有新規直接覆髄材のカニクイザル歯髄に与える影響は従来型の MTA セメント含有直接覆髄材と同様、水酸化カルシウム含有直接覆髄材に比べて良好な露髄部の治癒過程を経ることが分かった。(動物実験委員会承認有 15024・倫理委員会番号 15-076)

象牙質-歯髄複合体の創傷治癒メカニズムに基づく生物学的覆髄剤の開発

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)
○高橋 雄介, 岡本 基岐, 小道 俊吾, S. Ali Manahil, 林 美加子

Development of a biological pulp capping agent based on the wound healing mechanism of dentin-pulp complex
Osaka University Graduate School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry and Endodontology
○TAKAHASHI Yusuke, OKAMOTO Motoki, KOMICHI Shungo, S. ALI Manahil and HAYASHI Mikako

【研究目的】

象牙質の有機成分中の象牙質基質タンパク (Dentin Matrix Components: DMCs) が Matrix Metalloproteinase (MMP) 分子によって分解を受け、その DMCs 分解産物が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進すること、またその DMCs 分解産物をプロテオーム解析にて同定することで、歯髄の創傷治癒を促進する分子を検索し、第 139、142、および 143 回本学会で報告をわれわれはおこなってきた。

本研究では、これまでの研究結果より得られた候補分子を用いて直接覆髄実験をおこない、形成される第三象牙質についてマイクロ CT ならびに病理組織学的手法にて解析し、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒メカニズムに立脚した、真の生物学的覆髄剤の開発を目的とした。

【研究方法】

TIMP-1 ならびに S100 タンパクがラット象牙質-歯髄複合体の創傷治癒に与える影響の検討

本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認下で実施した(承認番号: 23-005-1)。

1) 直接覆髄実験

8 週齢雄性 Wistar 系ラットに全身麻酔を施し、上顎第一臼歯をラバーダム防湿後、咬合面より露髄を伴う窩洞を形成し、露髄部を洗浄、止血をおこなった。続いて、Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 (TIMP-1) (R&D systems)、ならびに S100 タンパク (PROSPEC) をゼラチンスポンジ (スポンゼル®、アステラス製薬) に浸漬させたものを用いて直接覆髄をおこない、グラスアイオノマーセメント (FUJI IX, GC) にて充填をおこなった。コントロールには Pro Root MTA (デンツプライ三金)、PBS を用いた (n=5)。

2) マイクロ CT による第三象牙質の解析

直接覆髄から 4 週間経過後にマイクロ CT (SMX100CT, 島津製作所) を撮影し、画像解析 (TRI 3D-BON、RATOK) にて三次元的に解析後、形成された第三象牙質の定量評価ならびに定性評価をおこなった。統計学的有意差は One-way ANOVA および Bonferroni 検定にて比較検討した (危険率 5%)。

3) 病理組織学的評価

マイクロ CT 撮影後ラットを灌流固定し、通法にて脱灰、パラフィン包埋し、組織切片を作成、H-E 染色を施して、歯髄の炎症状態および形成された第三象牙質について評価をおこなった。

【結果および考察】

TIMP-1 と S100 タンパクを用いて直接覆髄をおこなった試料では、マイクロ CT 解析にて Pro Root MTA と同程度の第三象牙質形成が認められ、PBS と比較すると多くの第三象牙質量が形成された ($p < 0.05$)。また、三次元解析においてトンネル状欠損は認められなかった。病理組織学的評価においても、TIMP-1 および S100 タンパクいずれを用いて覆髄をした場合でも厚みをもった第三象牙質の形成が認められ、象牙細管構造が観察される試料も散見された。歯髄の炎症は TIMP-1、S100 タンパク、Pro Root MTA いずれの試料においてもほとんど認められなかった。

以上の結果より、TIMP-1 ならびに S100 タンパクを用いることで、覆髄剤としての応用が可能であることが示唆された。今後は、これらの分子をさらに断片化したものを作成し、歯髄の治癒を促進するペプチドの検索をおこなうことで、組換えタンパク等を用いずに化学合成が可能な覆髄剤の開発を目指すとともに、ヒト歯髄の創傷治癒機構についても研究を展開していく予定である。

ヒト iPS 細胞の象牙芽細胞への分化誘導における
オートファジー関連遺伝子 Atg10 と Wnt5 シグナルの関与

○ 樋口直也, 尾関伸明, 長谷奈央子, 檜山太希, 山口秀幸, 川合里絵, 松本 享, 茂木眞希雄*, 中田和彦
愛知学院大学歯学部歯内治療学講座
*愛知学院大学薬学部薬学総合教育講座

**Participation of Autophagy-related gene 10 and Wnt5 signaling pathway
in differentiation of human iPS cells into odontoblast-like cells**

○ Naoya Higuchi, Nobuaki Ozeki, Naoko Hase, Taiki Hiyama, Hideyuki Yamaguchi,
Rie Kawai, Toru Matsumoto, Makio Mogi* and Kazuhiko Nakata
Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
*Department of Integrative Education of Pharmacy, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University

【研究目的】

これまでに我々は、マウス iPS 細胞および ES 細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導法を確立し、さらに、得られた象牙芽細胞を FACS により高純度化する方法を構築した (Ozeki et al. *PLoS One* 2013, Kawai et al. *Oral Dis* 2014). また、このマウス象牙芽細胞に炎症性サイトカイン Interleukin (IL)-1 β を添加した際の細胞増殖過程において、Wingless/int1 (Wnt)5 \rightarrow Matrix metalloproteinase (MMP)-3 シグナルカスケードが関与することを報告した(Ozeki et al. *Exp Cell Res* 2014b, Ozeki et al. *Exp Cell Res* 2014b).

近年、細胞内成分の分解システムであるオートファジーが、発生や分化、炎症に関わるなど、多様な生理的役割を持つことが明らかとなり、注目されている。歯内療法領域においても、歯髄の加齢化や炎症時に、オートファジー関連遺伝子群である Atg5 や LC3 の動態変化によって、オートファジーが活性化されることが報告されている。そして昨年、我々は IL-1 β 添加によるマウス象牙芽細胞の細胞増殖が、Atg5 \rightarrow Wnt5 \rightarrow MMP-3 シグナルカスケードを介して制御されていることを明らかにした (Ozeki et al. *PLoS One* 2015)。しかし、ヒト幹細胞を用いた象牙芽細胞分化誘導過程にオートファジー関連遺伝子が関与するとの報告は未だされていない。

そこで、本研究では、ヒト iPS 細胞を用い、象牙芽細胞分化誘導過程におけるオートファジー関連遺伝子の関与について検索し、各種 siRNA を用いて遺伝子をノックダウンすることによりシグナルカスケードの検討を行った。

【材料および方法】

ヒト iPS 細胞を Gelatin scaffold (GS) と Bone morphogenetic protein (BMP)-4 (GS/BMP-4) の存在下で象牙芽細胞に分化誘導し、Real time-PCR 法と Western-blot 法により、オートファジー関連遺伝子群 (Atg5, Atg7, Atg10, LC3, TFE3 および Beclin1)、および、Wnt5, MMP-3 の mRNA ならびにタンパク質発現を評価した。その中で強く関与が疑われたオートファジー関連遺伝子 Atg10、および、Wnt5, MMP-3 に対する siRNA を用いて各々の遺伝子をノックダウンすることにより、ヒト象牙芽細胞の分化誘導過程に関与するシグナルカスケードの検索を行った。

【結果】

GS/BMP-4 を用いたヒト象牙芽細胞分化誘導過程において、Atg10, Wnt5 および MMP-3 の遺伝子発現、タンパク質発現の亢進が認められた。また、Atg10, Wnt5 および MMP-3 に対する siRNA 処理により、GS/BMP-4 によるヒト象牙芽細胞の分化誘導が抑制された。siRNA を用いたシグナルカスケードの検索により、GS/BMP-4 によるヒト象牙芽細胞分化は Atg10 \rightarrow Wnt5 \rightarrow MMP-3 を介して制御されることが明らかとなった。

【考察および結論】

今回、GS/BMP-4 を用いたヒト iPS 細胞の象牙芽細胞分化誘導は、オートファジー関連遺伝子 Atg10 と Wnt5 シグナルを介して誘導された MMP-3 により制御されることが明らかとなった。また、Atg10 がシグナルカスケードの上流域に発現誘導されることから、炎症場におけるマウス象牙芽細胞の増殖および象牙質再生過程 (Ozeki et al. *PLoS One* 2015) と同様に、分化過程においても Atg10 が強い影響力を持つことが示唆された。これらのことから、将来的に Atg10 の発現を人為的に調整することが可能になれば、象牙芽細胞の分化誘導を介して、歯髄炎に対して創傷治癒を促せる可能性が示唆された。(なお、本研究は愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認を得て行われた (承認番号 365) .)

骨芽細胞分化における NSAIDs の COX 阻害活性非依存的な 細胞機能修飾に関する検討

九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野
○松山 篤史, 鷲尾 絢子, 諸富 孝彦, 北村 知昭

Modification of cellular functions by nonsteroidal anti-inflammatory drugs independent of cyclooxygenase-inhibiting activity in osteoblastic differentiation

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

○MATSHUYAMA Atsushi, WASHIO Ayako, MOROTOMI Takahiko, KITAMURA Chiaki

【目的】非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) はシクロオキシゲナーゼ (COX) を阻害することによりアラキドン酸からプロスタグランジン (PG) 類の合成を阻害して, 解熱・鎮痛・抗炎症作用を現し, リウマチ, 頭痛, 歯痛および術後痛などに対し日常の医療現場で頻繁に用いられている。一方, NSAIDs には COX-2 選択的阻害薬 celecoxib などのように血管新生の阻害を介した抗腫瘍活性など, 解熱・鎮痛・抗炎症以外の作用を有するものも少なくない。このような作用は一部の NSAIDs で認められることから, COX 阻害を介さない作用機序の存在が予想される。本研究では, NSAIDs の新規標的の同定を目指し, 骨芽細胞分化をモデルシステムとして用いて, celecoxib をはじめとする NSAIDs の COX 阻害以外の効果の有無について検討した。

【材料および方法】マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 は 10%牛胎児血清含有 α MEM で継代培養し, 10 mM β -グリセロリン酸, 50 μ g/ml アスコルビン酸を添加した上記培地により分化を誘導した。分化誘導培地は 2 日毎に交換し, 誘導開始 7 日目に ALP 活性を測定し骨芽細胞分化の指標とした。各 NSAIDs (celecoxib, valdecoxib, diclofenac, etodolac) は分化誘導培地に添加して影響を調べた。NSAIDs の細胞内シグナル経路への影響は MC3T3-E1 及びマウス筋芽細胞株 C2C12 を用いて検討した。一晩の血清飢餓処理後に insulin や BMP-2 で 10 分間刺激した細胞の溶解液を調製し, 抗リン酸化抗体 (Akt, ERK, Smad1/5) を用いたウエスタンブロット法により解析した。NSAIDs は細胞を刺激する 1 時間前に細胞に添加した。細胞増殖は WST-8 アッセイを用いて評価した。MC3T3-E1 細胞を 96 ウェルプレートに播種し, 種々の NSAIDs を添加した培地で 48 時間培養後に WST-8 溶液を添加し, さらに 2 時間培養後に 450 nm の吸光度を測定して細胞生存率を算出した。関連遺伝子の発現量は細胞から調製した総 RNA を用いた RT-PCR 法で, 発現タンパク質量はウエスタンブロット法にて解析した。MC3T3-E1 からの PGE₂ 分泌量は細胞を PBS で洗浄後に NSAIDs 含有または不含有の増殖用培地を添加し 1~3 時間後インキュベーションした培養上清を回収して ELISA 法 (Cayman chemicals) にて分析した。

【結果】MC3T3-E1 の骨芽細胞分化において, celecoxib 及び valdecoxib は分化に伴う ALP 活性の上昇を強く抑制したが diclofenac 及び etodolac は影響しなかった。COX 阻害活性を持たない celecoxib 誘導体 2,5-dimethyl (DM)-celecoxib は ALP 活性の上昇を抑制した。MC3T3-E1 は insulin 刺激によって惹起される Akt, ERK のリン酸化に関して celecoxib 及び DM- celecoxib の影響を受けなかった。一方, C2C12 において celecoxib 及び DM-celecoxib は BMP-2 刺激によって惹起される smad のリン酸化を抑制した。このとき C2C12 において celecoxib 及び DM-celecoxib は細胞増殖に対する影響は示さなかった。

【考察】COX 活性が骨芽細胞の分化に重要な役割を持つことは知られているが, celecoxib は同程度の COX 阻害作用をもつ他の NSAIDs と比較して骨芽細胞分化を強く抑制し, かつ COX 阻害活性の低い誘導体 DM-celecoxib も骨芽細胞分化抑制効果を有していた。細胞内リン酸化シグナル経路に対する抑制効果を認めたことを考えあわせると, celecoxib は他の NSAIDs と異なる COX 活性阻害作用に非依存的な作用機序を有することが示唆された。

【結論】骨芽細胞分化モデルを用いた実験から, NSAIDs のうち celecoxib は COX 阻害以外の作用機序を通じて細胞機能を修飾することがわかった。今後, 直接的作用点説明を通じて新たな疾患への応用や薬物の開発につなげていく予定である。

BMP-1 によるヒト歯髄培養細胞の mucin 様糖鎖修飾

神奈川県立歯科大学大学院歯学研究科 口腔機能修復学講座 歯髄生物学分野
○室町 幸一郎、石井 信之

BMP-1 promotes mucin-type O-glycosylation in human dental pulp cells
Division of Pulp Biology and Endodontics, Department of Oral Function and Restoration, Graduate School of
Dentistry, Kanagawa Dental University
○MUROMACHI Koichiro, TANI-ISHII Nobuyuki

【目的】

Bone morphogenetic protein (BMP) -1 は dentin sialoposphoprotein (DSPP) や dentin matrix protein-1 (DMP-1) などを分解することで象牙質の基質形成に関与すると考えられているメタロプロテアーゼである。

これまでの研究から、齶蝕直下の修復象牙質および象牙芽細胞様細胞に BMP-1 の発現が亢進し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれることを報告してきた (第 141 回 日本歯科保存学会 秋季学術大会)。しかし、細胞膜上のどのような分子を標的としてこの機序が生じるかは不明である。そこで細胞膜のタンパク質に修飾される糖鎖を標的として lectin microarray を用い検討したところ、BMP-1 がヒト歯髄培養細胞の膜分画タンパク質の O 型糖鎖修飾を促進することを明らかにした (第 143 回 日本歯科保存学会 秋季学術大会)。

本研究では、O 型糖鎖修飾の本態を解明するために、糖鎖特異的に結合する lectin を用いた lectin-probed western blot にて解析を行った。

【材料および方法】

治療目的で抜歯予定の患者に研究のインフォームドコンセントを行い、同意を得た後に抜去された健全歯から歯髄を抽出し研究に用いた。なお本研究は神奈川県立歯科大学倫理委員会の承認を得て行った。(承認番号: 277)

- 1) 細胞培養: ヒト健全歯から歯髄を抽出したのち、3 代継代培養した細胞をヒト歯髄培養細胞として実験に用いた。
- 2) 細胞膜画分の抽出: recombinant human BMP-1 (100 ng/ml) で刺激したのちに、Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit を用いて細胞膜画分を抽出した。
- 3) Lectin microarray: 細胞膜画分のサンプルを LecChip (GlycoTechnica) に供し、糖鎖プロファイリングの変化を解析した。
- 4) Lectin-probed western blot: 細胞膜画分のサンプルを SDS-PAGE にて展開後、ニトロセルロース膜へ転写し、N-acetylgalactosamine (GalNAc) 特異的に結合する lectin である *Helix Pomatia* agglutinin (HPA, HRP-conjugated) を用いてサンプル中の糖鎖を検出した。

【結果】

糖鎖プロファイリングデータの解析から、BMP-1 によって促進する細胞膜分画のタンパク質への O 型糖鎖修飾の本態は GalNAc の付加であった。また lectin-probed western blot 解析から、BMP-1 刺激により膜分画タンパク質の GalNAc 付加が促進されることを確認した。

【考察】

今回の結果から、BMP-1 存在下でヒト歯髄培養細胞の膜分画タンパク質中の serine 残基や threonine 残基への GalNAc 付加が促進されたことが考えられ、BMP-1 は細胞膜上に mucin 様の糖鎖修飾を促進する働きを有するものと考えられた。

レセプターを構成するタンパク質への糖鎖修飾が細胞膜上での安定した発現に寄与することが報告されており、BMP-1 が細胞膜上のレセプターの糖鎖修飾を調節することで自身の細胞内への取り込みを促進する可能性が考えられた。

本研究は、平成 28 年度科学研究費補助金 (若手研究 (B) No. 16K20469) により行った。

新規間葉系幹細胞集団による神経再生能の評価

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)

○伊藤祥作, 山内裕香子, 成瀬陽菜, 伊藤勇紀, 林美加子

The evaluation of a new murine mesenchymal population for neural regeneration.

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

○ITOH SHOUSAKU, YAMAUCHI YUKAKO, NARUSE HARUNA, ITOH YUKI, HAYASHI MIKAKO

【研究目的】

象牙質・歯髄複合体を構成する細胞集団は歯髄腔内に存在する間葉系幹細胞に由来すると考えられている。しかしながら、この間葉系幹細胞については、未だ単離には成功しておらず不明な点が多い。間葉系幹細胞は、歯髄のみならず骨髄にも存在することがわかっている。そこで我々はマグネティックビーズを用いた簡便な精製法によりマウス骨髄細胞から間葉系幹細胞の濃縮に成功し、その新規幹細胞集団(HipOP:Highly purified osteoprogenitors)は、高い硬組織再生能を持っていることを本学会 2009 年度秋季学術大会 (第 131 回) にて報告した。また、本学会 2015 年度秋季学術大会 (第 143 回) では、HipOP が神経細胞へ分化すること、そして、120 倍以上神経前駆細胞が濃縮された幹細胞集団であることを報告した。今回、我々は、*in vivo*における神経再生能について解析し、新しい知見が得られたので報告する。

【材料と方法】

- 1) マウス骨髄 (C57BL/6J) から骨髄細胞を調整し、10%FBS 含有 α MEM 中で培養する。培養 3 日目に PBS にて浮遊細胞を除去する。2 週間培養の後、トリプシン・EDTA 処理により付着細胞を回収する (骨髄ストローマ細胞:BMSCs)。なお、本研究における全ての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け、承認のもと、実施している (受付番号: 動歯-21-002-0 および動歯-26-011-0)。
- 2) 回収した骨髄ストローマ細胞と、血球系細胞のマーカー分子に対する抗体 (抗 CD5、抗 CD45、抗 CD11b、抗 Gr-1、抗 7-4、抗 Ter-119、抗 CD45R) を結合したマグネティックビーズとを反応させる。反応後、細胞をマグネティックカラムに注入し、カラムから流出してきた細胞を回収する (新規幹細胞集団: HipOPs)。
- 3) HipOPs を非接着性基材上で、bFGF (40ng/ml) と EGF (20ng/ml) を含む DMEM/F12 培地にて培養した。
- 4) 形成された神経細胞塊 (Neurosphere) を回収し、移植実験に供した (HipOP- NSCs)。
- 5) イソフルラン吸入麻酔下で、10 週齢メス Cr1j:CD1-Foxn1tm マウスの左側坐骨神経を露出した。腓腹神経を温存し、上流は腓腹神経が分岐する位置、下流は脛骨神経と腓骨神経に分岐する位置として、この間で坐骨神経を部分切除 (1.5 mm) した。BMSCs、HipOPs、および HipOP-NSCs をコラーゲンスポンジに導入した。切除後の間隙にコラーゲンスポンジを移植し皮膚縫合を行った。
- 6) 移植後 2 週間毎に 8 週間後まで、von Frey テストを行った。
- 7) 移植 3 カ月後に細胞移植した領域の組織を摘出し、凍結切片を作製した。FITC 標識 anti-H2K^b 抗体および Cy3 標識 anti-NGFR/p75NTR にて染色し、観察した。

【結果】

- 1) 間葉系幹細胞集団 HipOPs を移植した群は、BMSCs を移植した群と比較して有意差をもって感覚機能の回復が認められた。また、HipOP- NSCs を移植した群は、HipOPs を移植した群よりも高い感覚機能の回復が認められた。
- 2) HipOP 移植 3 カ月後に細胞移植した領域の組織を摘出し、凍結切片を作製し、蛍光免疫染色をおこなったところ、移植細胞を示す H2K^b と神経栄養因子受容体 p75NTR を同時発現する細胞領域が認められた。

【結論】

新規幹細胞集団 (HipOPs) は、損傷した神経を再生する能力があることが明らかとなった。本研究結果から、HipOPs は、硬組織のみならず神経組織の再生にも有用であることが示された。

IL-17A は 3T3-L1 脂肪細胞における TNF- α 誘導性 IL-6・CCL20 産生を相乗的に増強する

九州大学大学院 歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野
○佐野朋美、新城尊徳、岩下未咲、山下明子、讀井彰一、西村英紀

IL-17A synergistically enhances TNF α -induced IL-6 and CCL20 production in 3T3-L1 adipocytes. Section of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation,

○Sano Tomomi, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamashita Akiko, Sanui Terukazu, Nishimura Fusanori.

【目的】

インターロイキン-17A (interleukin-17A: IL-17A) は主にヘルパーT17 (Th17) 細胞から分泌され、線維芽細胞や上皮細胞、マクロファージなどに作用して炎症性サイトカイン産生を誘導することから、関節リウマチやクローン病などの炎症性自己免疫性疾患において中心的役割を果たすことが知られている。また、近年では歯周炎症組織や肥満状態の脂肪組織中で Th17 細胞数が増加することや、歯周病患者や肥満・糖尿病患者で血中 IL-17 レベルが上昇することから、代謝性・感染性疾患における慢性炎症の成立や維持に重要な役割を担うことも明らかとなってきた。IL-17A は、脂肪細胞分化を抑制することはすでに検討されているが、IL-17A の成熟脂肪細胞における炎症誘導能や脂肪組織における慢性炎症状態に及ぼす影響は明らかではない。そこで、演者らが継続して検討を続けている脂肪細胞-マクロファージ共培養系を用いて、IL-17A が同系における炎症反応に及ぼす影響について検討を行った。

【材料と方法】

マウス前駆脂肪細胞株 3T3-L1 を通法によって成熟脂肪細胞へ分化させ、IL-17A 刺激 (0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml) し、IL-6・CCL20 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で、IL-6 産生量は HTRF アッセイ、CCL20 産生量は ELISA 法にて測定した。次に、3T3-L1 とマウスマクロファージ由来細胞株 RAW264.7 の共培養系を用いて、IL-17A 刺激による同系からの LPS 誘導性 IL-6、CCL20 産生への影響を検討した。さらに、3T3-L1 に TNF- α (1ng/ml) と IL-17A の共刺激を加えた際の IL-6、IL-17RA、IL-17RC、CCL20 の mRNA 発現量および IL-6、CCL20 産生量を検討した。マウスを用いた検討では4週齢の野生型マウス (C57BL/6J) に普通食あるいは高脂肪食を12週間摂取させ、精巢上体脂肪における IL-17RA、IL-17RC、CCL20、ROR γ t の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法にて、血清 CCL20 濃度を ELISA 法にて測定した。また、11週齢の糖尿病モデルマウス (KKAy/Ta) と同週齢の野生型マウスの血清 CCL20 濃度について比較した。

【結果と考察】

IL-17A は成熟 3T3-L1 脂肪細胞における IL-6、CCL20 の遺伝子発現およびタンパク産生を濃度依存的に誘導した。IL-17A を添加するとマクロファージと共培養した脂肪細胞において LPS 刺激による IL-6、CCL20 産生が相乗的に亢進することがわかった。また、IL-17A 刺激により、3T3-L1 における TNF- α 誘導性 IL-6、CCL20 の遺伝子発現やタンパク分泌は相乗的に増大し、IL-17RA 発現も亢進していた。一方、この相乗的な IL-6 産生は I κ B α や JNK 阻害剤での前処理により有意に抑制されたことから、NF- κ B および AP-1 活性化経路が IL-17A と TNF α の相乗効果において重要な経路であることが分かった。マウスにおける検討では、普通食負荷マウスに比べて高脂肪食負荷マウスの精巢上体脂肪組織では IL-17RA と ROR γ t の mRNA 発現レベルが有意に増加し、高脂肪食負荷マウスおよび糖尿病モデルマウス (KKAy/Ta) では普通食野生型マウスに比べ血清 CCL20 濃度が上昇していたが、KKAy/Ta マウスの方がより高値であった。これらの結果より、慢性炎症状態にある脂肪組織では IL-17RA 発現亢進と Th17 細胞浸潤が増大していること、肥満・糖尿病状態がより亢進したマウス脂肪組織では、CCL20 産生亢進によるさらなる Th17 細胞浸潤が起こっている可能性が示唆された。

【結論】

IL-17A は慢性炎症状態にある脂肪組織における IL-6 の産生を増強することでインスリン抵抗性を悪化させるとともに、CCL20 産生亢進を介して Th17 細胞の浸潤を促進し、さらなる炎症状態の増悪に働くことが考えられた。すなわち、IL-17A 産生細胞が 2 型糖尿病における脂肪組織の炎症状態の増悪に関与するという可能性が示唆された。歯周病によって上昇する IL-17 や循環 Th17 細胞も一部この現象に関わる可能性が考えられた。

(本研究は広島大学動物実験委員会の得た上で実施した。承認番号: A15-81)

コウボクは *Porphyromonas gingivalis mgl* を介したメチルメルカプタン産生を抑制する
広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命学部門 歯周病態学研究室

○佐藤 陽子, 應原 一久, 山川 真宏, 宗永 修一, 加治屋 幹人,
水野 智仁, 藤田 剛, 栗原 英見

The oriental medicine, *magnoliaceae*, inhibits the production of methyl mercaptan
via *mgl* mRNA inhibition.

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

○Yoko Sato, Kazuhisa Ouhara, Masahiro Yamakawa, Shuichi Munenaga, Mikihiro Kajiya,
Noriyoshi Mizuno, Tsuyoshi Fujita, Hidemi Kurihara

[目的]

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) は揮発性硫黄化合物 (VSC) を産生し、VSC は口臭の原因になる。METase は *Pg* も保有するアミノ酸分解酵素であり、VSC であるメチルメルカプタンを合成する。このメチルメルカプタン産生量は *Pg* の菌株ごとに大きく異なる。また、生薬であるコウボクが METase をコードする *mgl* 遺伝子を mRNA レベルで制御して、*Pg* のメチルメルカプタン産生を抑制する。しかし、*Pg mgl* mRNA 発現量は菌株間で異なっていることから、本研究ではコウボクによる *Pg* のメチルメルカプタン産生抑制メカニズムの解明を目的として、コウボクの *Pg* に対する作用について複数の *Pg* 菌株を用いて検討した。

[材料および方法]

Pg の分離：広島大学病院の口臭外来受診患者（広島大学病院倫理委員会承認済、患者同意取得済）の安静時全唾液を採取し直ちに血液寒天培地に播種し、アネロパックシステム（三菱ガス化学）で 37℃、7 日間培養した。生育してきた黒色コロニーを 1% yeast extract 含有 Trypticase Soy Broth にヘミンとメナジオンを添加した液体培地 (TSBYEhm) 中で培養した。*Pg* の同定は生育した菌体から染色体 DNA を InstaGene (Bio-Rad) を用いて精製し、16s rRNA を PCR 法で増殖して行った。また、*Pg* の標準株として W83 株を ATCC から購入した。*Pg* 絨毛遺伝子 *fim* type I-V 型の各菌株は、大阪大学予防歯科学教室 天野敦雄教授から分与して頂いた。

メチルメルカプタン産生量の測定：*Pg* を TSBYEhm 培地で 2 日間嫌気培養後、集菌し PBS で洗浄した。ガラス製試験管内に、*Pg* が PBS 1 ml 中に 10⁸ CFU となるよう調製し、メチルメルカプタンの基質として L-メチオニンを最終濃度 100 mM となるよう添加した。また、コウボク（湧永製薬から供与）のメチルメルカプタン産生への影響を検討するために、コウボクを PBS に 1-1,000 μg/ml になるように調製した。37℃、60 分間嫌気培養後、試験管内の気相部分を 1 ml 回収し、メチルメルカプタン産生量を簡易型ガスクロマトグラフィー（オーラルクロマ、日本歯科商社）で測定した。

mgl 遺伝子発現解析：*Pg* を 60 分間嫌気培養後に集菌し、total RNA を RNA isolation kit (Bio-Rad) を用いて精製した。*mgl* mRNA 発現量は real-time PCR で 16s rRNA 発現量を対照として評価した。

バイオフィーム形成実験：丸底 96 穴プレートに *Pg* W83 10⁷ CFU、および *Fusobacterium nucleatum* ATCC 24597 (*Fn*, ATCC から購入) 10⁶ CFU を TSBYEhm 中で 48 時間共培養し、形成されたバイオフィームを 1% クリスタルバイオレットで染色後、エタノールで色素を溶出させ、OD₆₆₀ で吸光度を測定しバイオフィーム量とした。

[結果]

Pg 標準株、臨床分離株ともに、L-メチオニンの濃度依存的にメチルメルカプタン産生量が増加した。コウボクの添加によって *Pg* メチルメルカプタンの産生量が抑制された。しかし、その抑制の程度には菌株間で差が認められた。また、コウボクによって *mgl* mRNA 発現量も抑制された。*Pg fim* type とメチルメルカプタン産生量の関係を検討したところ、*fim* III 型でメチルメルカプタン産生量が高い傾向にあった。コウボクの添加によって *Pg* W83 株と *Fn* 24597 株の共培養によるバイオフィーム形成が抑制された。

[結論]

以上の結果から、コウボクが mRNA レベルで *Pg* のメチルメルカプタン産生を抑制すること、およびバイオフィーム形成抑制にも関与することが示唆された。

新規接着性レジンセメントのガラスセラミックスにおける象牙質微小引張強さについて

¹鹿児島大学病院 保存科

²鹿児島大学学術研究院医歯学域歯学系大学院医歯学総合研究科歯科保存学分野

○星加知宏¹, 梶原武弘², 達山祥子¹, 徳田雅行², 西谷佳浩²

Microtensile bond strengths of new adhesive resin cements on new ceramic block and dentin

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Hospital

²Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Research Field in Dentistry, Medical and Dental Sciences Area, Research and Education Assembly, Kagoshima University

○HOSHIKA Tomohiro¹, KAJIHARA Takehiro², TATSUYAMA Shoko¹, TOKUDA Masayuki², NISHITANI Yoshihiro²

【研究目的】近年、審美への要求が高まるにつれ、歯冠修復に用いられるセラミックス材料やそれに用いられる接着材料の開発が進められている。本研究では新規歯科加圧成形用ガラスセラミックス、イニシャルLiSi プレス (GC) に対するレジンセメントの接着性について、新規に発売されている3種のレジンセメント、ジーセムリンクフォース (GC) (以下 GLF)、パナビア V5 (クラレノリタケデンタル) (以下 PV5)、リライエックスアルティットレジンセメント (3M) (以下 RUA) を用いて、接着性の検討を行った。

【材料及び方法】試料体の作製：接着試験には鹿児島大学倫理委員会の承認のもと集められた新鮮なヒト抜去健全大白歯を用い、歯冠中央部を耐水研磨紙#600まで研磨した象牙質面を被着面とした。また、被着体にはイニシャルLiSi プレス (GC) を用いた。直径 10mm の円柱状に铸造し、平面を耐水研磨紙で#600で研磨、サンドブラスト後、超音波洗浄を行い、被着面とした。それぞれの接着性セメントをメーカー指示通りに用い、また RUA についてはセラミック被着面をリン酸処理後、セラミックプライマープラスで処理した群を加えた。試料体は 24 時間 37°C で水中浸漬後試験に用いた。試料体の接着強さの測定および観察：試料体を精密低速切断機 (Isomet, Buehler) を用いて連続切片に切り出し、各切片を接着面積が 1.0 mm² になるように棒型に形成した。接着試料体の一部をランダムに抽出してマイクロテンサイル法による引張接着試験および走査電子顕微鏡 (SEM) による接着界面の観察を行った。微小引張試験は卓上万能試験機 (EZ Test, Shimadzu) を用いて、クロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件下で行った。試料数を各 8 個とし、得られた結果は One-way ANOVA と Tukey's test を用いて有意水準 5% にて統計処理を行った。また引張試験後の破断面の形態観察も行った。

【結果】引張試験の結果を下表に示す。RUA を通法通りに使用した群については試料作製中に脱落し、引張試験は行えなかった。測定可能であった群では有意差を認めなかった。一方、破断面の形態を観察した結果、GLF では主にセメント-セラミック界面で、PV5 および RUA-シラン処理群ではセメントの凝集破壊が主に認められた。RUA-通常処理群の試料はセメント-セラミックス界面で脱落していた。

【考察および結論】引張試験結果では同等のセメントであっても、破断面形態観察からセメントごとに接着界面の剥離箇所には差異を認めた。今後、破断した箇所の改良を行うことでさらなる接着性の向上が期待される。試料作製により脱落した群については、本実験ではセラミックスを切断する際、コンポジットレジンなどと比較して試料作製時により強い負荷がかかったことが推測される。今後、試料作製においても検討が必要であるとともに、現状ではセラミックスへの接着の際にシラン処理は必要と考えられる。

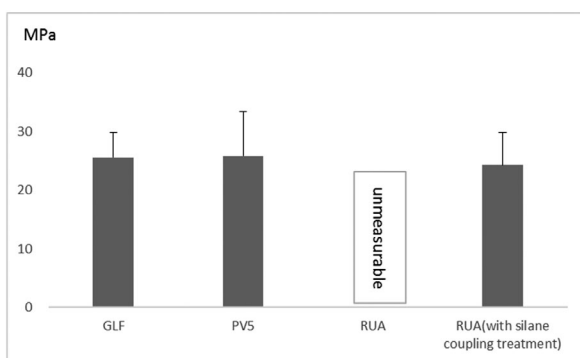


Fig. Microtensile bond strength of new adhesive resin cements on new ceramic block

There were no significant differences between the three measurable groups.

レジンセメントと光照射条件が CAD/CAM レジンブロックの象牙質接着強さに及ぼす影響について

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯蝕制御学分野
○金森ゆうな、高橋礼奈、二階堂徹、田上順次

The effect of light irradiation on dentin bond strengths of dual-cure resin cements to CAD/CAM resin blocks

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

○Yuna KANAMORI, Rena TAKAHASHI, Toru NIKAIIDO, Junji TAGAMI

【研究目的】近年、CAD/CAM 冠が保険収載され、広く臨床応用されるようになってきた。良好な臨床成績を得るためには、良好な象牙質接着強さが不可欠である。田上らは、光照射強度の減少により接着強さが低下することを報告している（日本歯科保存学会 2014 年度春季学術大会）。そこで、本研究では、光照射強度が CAD/CAM レジンブロックとデュアルキュア型レジンの象牙質接着強さに及ぼす影響について検討を行った。

【材料及び方法】2種のデュアルキュア型レジンのセメント、パナビア V5（以下 V5、クラレノリタケデンタル）群、ライエックスアルティメット（以下 RXU、3M）を使用した。40本のヒト抜去大白歯の象牙質を注水下にて露出させ、#600SiCで研削し、業者指示に従って接着操作を行った。歯面処理には、それぞれトゥースプライマー（クラレノリタケデンタル）とスコッチボンドユニバーサルアドヒージブ（3M）を用いた。

CAD/CAM レジンブロックは、カタナアベンシアブロック（クラレノリタケデンタル）を用いて厚さ 1 mm となるように 40 本切断し、#600SiCで研削し、0.1 MPa サンドブラスト処理後、超音波洗浄、K エッチャントにて処理を行った。V5 群と RXU 群に分け（n=20）、それぞれセラミックプライマープラス（クラレノリタケデンタル）とスコッチボンドユニバーサルアドヒージブを塗布した。

ヒト抜去大白歯とカタナアベンシアブロックを V5 または RXU にて接着させる際、さらに化学重合（C-mode）、高出力 LED 照射器 VALO（ウルトラデント）のスタンダードモード（S-mode、1000 mW/cm²、20 s×1 回）、ハイパワーモード（H-mode、1400 mW/cm²、4 s×5 回）、エキストラパワーモード（X-mode、3200 mW/cm²、3 s×6 回+2 s）の 4 グループ（n=5）に分けた。そして、接着操作後、30 分間放置した。その後、37°C 水中に 24 時間保管し、接着界面が約 1.0×1.0 mm となるようにビーム状試片を作製し、小型卓上試験機 EZ-test（島津製作所）にてクロスヘッドスピード 1 mm/min で微小引張り接着試験を行った。得られた値は two-way ANOVA 及び Turkey の多重比較検定を用いて有意水準 5%にて統計処理を行った。本研究は、東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認（725 号）を得て行った。

【結果・考察】各条件における微小引張り接着強さを Fig. に示す。

Two-way ANOVA の結果から、セメント（p=0.008）、光照射条件（p<0.001）ともに主効果が認められた。セメントと光照射条件の交互作用は認められなかった（p=0.162）。C-mode と S-mode、H-mode、X-mode の間にそれぞれ有意差が認められた（p<0.05）。S-mode、H-mode、X-mode の間に有意差は認められなかった（p>0.05）。

以上の結果から、光照射の有無はデュアルキュア型レジンのセメントの象牙質接着強さに影響を与えることがわかった。光照射強度の違いはデュアルキュア型レジンのセメントの象牙質接着強さに影響を与えないため、高出力 LED 照射器のモードの中では、S-mode（1000 mW/cm²）による光照射で十分であると考えられる。また、レジンのセメントの種類の違いは象牙質接着強さに影響を与えることがわかった。

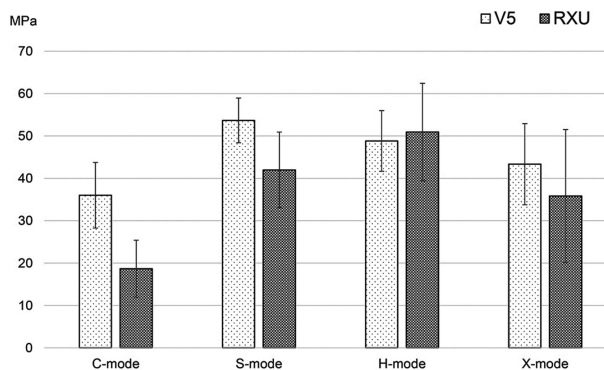


Fig. Microtensile bond strength to dentin.

LED 紫外線照射による光波長がう蝕原性細菌の殺菌効果に及ぼす影響

¹ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 う蝕制御学分野

² 鶴見大学歯学部 国際口腔保健学寄附講座

³ 国立長寿医療研究センター

○内沼 茂樹¹、島田 康史¹、マティン カイルール^{1,2}、荒牧 音¹、角 保徳³、田上 順次¹

Optimum wavelength for fatal damage of cariogenic bacteria by UV LED light irradiation

¹ Tokyo Medical and Dental University, Cariology and Operative Dentistry

² Tsurumi University, Endowed Department of International Oral Health Science

³ National Center for Geriatrics and Gerontology

○Shigeki Uchinuma¹, Yasushi Shimada¹, Khairul Matin^{1,2}, Oto Aramaki¹, Yasunori Sumi³, Junji Tagami¹

【目的】

う蝕はう蝕病原菌（主に Mutans streptococci）の感染と、そのバイオフィームによる歯質脱灰が病因として認知されている。う蝕の予防には適切なバイオフィームのコントロールが必要であり、機械的刷掃のみならず、フッ化物や抗菌剤が用いられる。しかしながら現在用いられているう蝕予防抗菌薬は、常在細菌叢の均衡の破綻や耐性菌の発生などの問題が指摘されている。新規開発された LED 光源による紫外線照射装置（日機装株式会社）は、口腔内のう蝕予防に使用できる可能性がある。今回 LED 紫外線照射装置を用い、波長の異なる光がう蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) に及ぼす効果を観察した。

【材料と方法】

S. mutans MT8148 菌を Brain Heart Infusion broth (BHI) 液体培地に 16 時間培養し、培養液のみ洗菌し、PBS を加え再懸濁後、懸濁度 OD₄₉₀ = 0.5 に調整した。その後、細菌懸濁液を 96-well プレートに 100μl ずつ分注し、LED 紫外線照射装置（日機装株式会社）を用いて 265nm (UVC) 及び 310nm (UVB) の紫外線を 5 分間ないし 2.5 分間 (UVC5 群、UVC2.5 群、UVB5 群、UVB2.5 群)、450nm の波長の可視光線を 5 分間 (BL 群) それぞれ照射した。ネガティブコントロールとして無照射群 (PBS 群) を、ポジティブコントロールとしてエタノールを作用させた群 (Et 群) を用いた。その後、全ての群の細菌懸濁液に BHI を加えて一定時間後に濁度を測定した。菌の生死の判別のため BacLight™ LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen Detection Technologies, USA) 染色下にて蛍光顕微鏡 (CKX41, Olympus, Japan) 観察を行った。また、希釈した懸濁液を EDDY JET (IUL, Barcelona, Spain) で Mitis Salivarius 寒天培地に播種し、48 時間培養 (37° C、嫌氣的条件下) した後、出現したコロニー数を計測 (CFU/ml) した。なお、再現実験は 5 回行った。

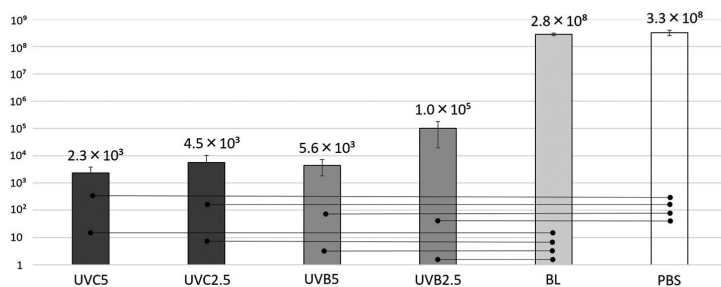
【結果と結論】

得られたコロニー数を下図に示す。BL 群のコロニー数は PBS 群と差がみられなかったが、紫外線を照射すると 4 群の全てで有意にコロニー数の低下が確認された。また UVC5 群、UVC2.5 群、UVB5 群および UVB2.5 群の 4 群において、各群の間に有意差はみられなかった。蛍光顕微鏡観察を行った結果、PBS 群では死菌がほとんどみられないが、UVC 群では明らかな死菌の増加が認められた。また Et 群では多くが殺菌され、生菌はほぼみられなかった。

以上より、265nm および 310nm の紫外線照射は *S. mutans* に対して殺菌効果があることが示唆された。

Wavelengths of irradiated UV LED lights that caused fatal damage to cariogenic bacteria expressed as:

Colony forming unit (CFU) /ml



● Significant difference, one-way ANOVA and Dunnett's T3 test ($p > 0.05$).

最近市販されたコンポジットレジンの SEM 観察

虎の門病院歯科

○森上 誠, 陶山雄司, 宇野 滋, 山田敏元, 杉崎順平

An SEM observation on the recently available resin composites
Department of Dentistry, Toranomom Hospital
○MORIGAMI M, SUYAMA Y, UNO S, YAMADA T, SUGIZAKI J

【研究目的】

近年のコンポジットレジンは、従来のものよりフィラーのサイズを一層小さくすることにより、研磨性を向上させ、滑沢な表面性状が長期にわたり維持されるよう審美的性能を向上させたり、フィラーの表面処理法を工夫するなどしてフィラーをより高密度かつ均一に分散させることにより、機械的性能を向上させるといった改良が進められている。今回、最近市販された充填用またはベース用の 13 種類のコンポジットレジンについて硬化物研磨面の SEM 観察を行い、フィラーの形状や粒度分布を中心に分析したので報告する。

【材料および方法】

本研究に用いられた材料は、充填用レジンとして Clearfil Majesty ES-2、Clearfil Majesty ES-2 Premium、Clearfil Majesty ES Flow (クラレノリタケデンタル)、Beautiful Next (松風)、Estelite Asteria (トクヤマデンタル)、MI Gracefil (ジーシー)、Filtek Supreme Ultra Universal Restorative (3M ESPE)、Tetric N-Ceram (Ivoclar Vivadent)、Amelogen Plus (ULTRADENT) の 9 種およびベース用レジンとして Beautiful Bulk Flowable (松風)、Bulk Base H、Bulk Base M (サンメディカル)、SDR (デンツプライ三金) の 4 種のコンポジットレジンであった。

各材料を直径 4 mm、深さ 5 mm のテフロンモールドに填入し、Oputilux 400 (Demetron Kerr) を用いて 30 秒間光照射し、重合させた。この試料をモールドより取り出し、裏面にも同様に光照射を行った後、エポキシレジンにより包埋した。1 週間後に、この試料を注水下で耐水シリコンカーバイドペーパー #800、#1,000、#1,200、#1,500 (丸本ストルアス) を用いて、次いで湿潤下でダイヤモンドペースト 6 μm、3 μm、1 μm、0.25 μm (DP-Paste, P, 丸本ストルアス) を順次用いて研磨した。なお、作製された試料数は各材料につき 2 個であった。この試料に対してアルゴン (Ar) イオンシャワー装置 (EIS-200ER, エリオニクス) を用いて 1keV, 1.8mA/cm² の条件で Ar イオンエッチングを 25 秒間行った後、白金蒸着を 2 分間施し、SEM (ERA-8900FE, エリオニクス) にて観察し、写真撮影を行った。

【結果および考察】

SEM 観察の結果より、充填用レジンの Filtek Supreme Ultra Universal Restorative には非常に小さなサイズのフィラーとナノサイズ粒子のクラスターフィラーが配合されており、Estelite Asteria には球状サブミクロンフィラーとそれによる有機複合フィラーが同程度の密度をもって配合されていた。Clearfil Majesty ES-2、Clearfil Majesty ES-2 Premium には不定形の無機フィラーと有機複合フィラーが配合されており、以上 4 種の充填用レジンは、研磨性を重視したフィラー配合であると思われた。Clearfil Majesty ES Flow には不定形の無機フィラーと球状フィラーが配合されており、流動性を良好にするために球状フィラーを用いたものと思われた。Beautiful Next、MI Gracefil、Tetric N-Ceram、Amelogen Plus には不定形の無機フィラーが高密度に配合されており、耐摩耗性などの機械的性能を重視したフィラー配合であるように思われた。

ベース用レジンの Beautiful Bulk Flowable、Bulk Base H、Bulk Base M、SDR の 4 種は、充填用レジンと比較すると大きなサイズの無機フィラーが配合されており、またその配合が充填用レジンほど密ではなく、マトリックスレジンの占める割合が大きかった。これら 4 種のベース用レジンはいずれもフロアブルレジンであること、さらに 4 mm の深度まで一括築盛可能なバルクフィルタイプのレジンであることから、研磨性や機械的性能よりもペーストの流動性を高めて築盛時の操作性を向上させることを優先するために、大きなサイズの無機フィラーを配合し、その含有量を充填用レジンよりも低くしたものと推察された。

バイオアクティブガラス含有歯質接着材の電子顕微鏡観察

¹⁾ 岡山大学歯学部先端領域研究センター, ²⁾ 岡山大学病院新医療研究開発センター,
³⁾ 北海道大学大学院歯学研究科生体材料工学教室
○長岡紀幸¹⁾, 吉原久美子²⁾, 吉田靖弘³⁾

Electron microscope observation of bio-active glass containing dental adhesives

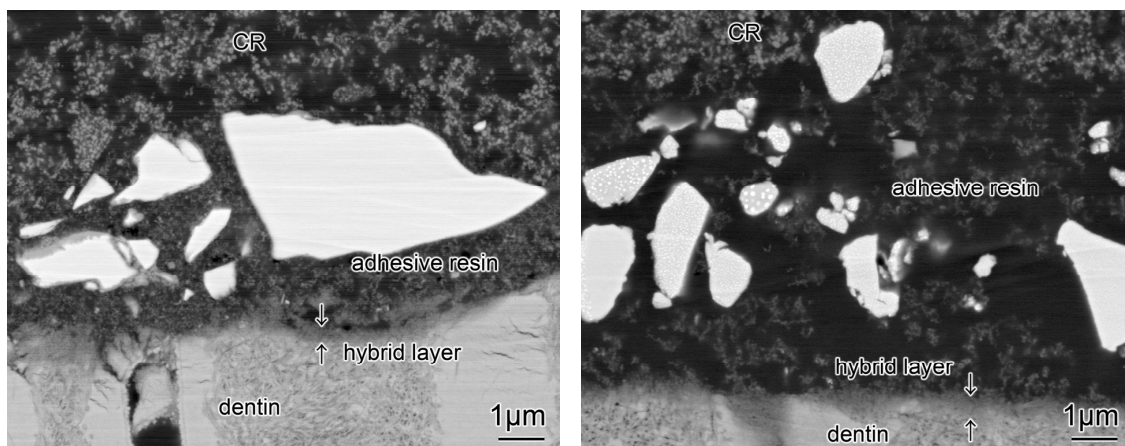
¹⁾ Advanced Research Center for Oral and Craniofacial Sciences, Okayama University, Dental School,
²⁾ Center for Innovative Clinical Medicine, Okayama University Hospital, ³⁾ Department of Biomaterials
and Bioengineering, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University
○Nagaoka N. ¹⁾, Yoshihara K. ²⁾, Yoshida Y. ³⁾

【目的】歯質接着材, コンポジットレジン, レジンセメントに含有される無機フィラーは, 主に生体不活性ガラスが用いられてきた。歯科や整形外科領域では, 再石灰化を促進させる性質を有し, 為害性がないバイオアクティブガラスが用いられている。本研究では, バイオアクティブガラスを含有した歯質接着材に注目し, 接着界面を電子顕微鏡観察した。

【材料と方法】歯質接着材は, S-PRG フィラーを含有した2ステップタイプの歯質接着材であるフルオロボンドⅡ, および2液混和タイプの歯質接着材であるフルオロボンド シェイクワン (共に, 松風) を用いた。メーカー指示の方法で歯質接着材を象牙質に塗布し, コンポジットレジンで築盛した。37℃の水中に1日保管し, 通例の透過電子顕微鏡 (TEM) 試料作製法に従い, エポキシ樹脂包埋した。クロスセクションポリッシャ (SM-09020CP, 日本電子) で断面観察試料作製した。カーボンコートし, 走査電子顕微鏡 (SEM: JSM-6701F, 日本電子) で反射電子による組成像観察した。

【結果と考察】下図は, それぞれの歯質接着材による界面の断面観察結果である。接着材層中の白く大きなコントラストの部分がS-PRG フィラーと示唆された。観察像から2つの歯質接着材に含まれるS-PRG フィラーは異なる材料と示唆された。フルオロボンド シェイクワンに含まれるS-PRG フィラーには, 白い析出物が観察された。マトリクス部分よりも白いことから, より高密度の析出物であった。フルオロボンドⅡに含まれるS-PRG フィラーには, 白い析出物が観察されなかった。一部のS-PRG フィラー周辺には, グレーのコントラストが観察された。

一般的にバイオアクティブガラスは水で活性化し, イオン放出する。歯質接着材では, 象牙質側からの水の浸透により, S-PRG フィラーからイオン徐放されると考えられる。フルオロボンドⅡは2ステップタイプであり, S-PRG フィラーは水を含まないボンディング材に含有されていると考えられる。フルオロボンド シェイクワンは, S-PRG フィラーが水-アセトン溶液に混ぜられたスラリー液に含有されていると考えられる。酸性モノマーを含むボンディング液と十分に混和してから象牙質に塗布する。このため, 混和時にS-PRG フィラーは酸性水溶液と混ざり, 活性化すると考えられる。このような使用方法の違いがあるため, S-PRG フィラーが異なることと示唆された。



A SEM composition images (left : Fluoro Bond II, right : Fluoro Bond Shake One)