

リン酸カルシウムセメントが生成するアパタイト結晶に対する有機質の影響

鶴見大学歯学部 歯内療法学講座¹⁾、保存修復学講座²⁾、口腔解剖学講座³⁾

○田井康晴¹⁾、関水健宏¹⁾、浅田由佳²⁾、千葉敏江³⁾、桃井保子²⁾、細矢哲康¹⁾、下田信治³⁾

Influence of Organic Materials on HAp Crystal in Calcium Phosphate-Based Cements

Department of Endodontology¹⁾, Operative Dentistry²⁾ and Oral Anatomy³⁾,
Tsurumi University School of Dental Medicine, Yokohama, Japan

○Y. Tai¹⁾, T. Sekimizu¹⁾, Y. Asada²⁾, T. Chiba³⁾, Y. Momoi²⁾, N. Hosoya¹⁾ and S. Shimoda³⁾

【緒言】

リン酸カルシウムセメント (CPC) は臨床で広く応用されている生体親和性材料である。塩基性リン酸四カルシウム (TTCP) と酸性リン酸水素カルシウム (DCPA) からなり、水和反応で硬化しハイドロキシアパタイト (HAp) を生成することが報告されている。歯科領域では CPC は知覚過敏抑制材料や根管充填用シーラーに用いられているが、pH が中性からアルカリ性の環境下で HAp に転化し安定するまでには2週間ほどかかり、この期間にリン酸カルシウム結晶の形状は幼若な結晶に特徴的な針状結晶から HAp に特徴的な扁平な六角形状結晶へと成長する。成長期間中の水溶性による崩壊や周囲環境によって硬化が遅れるなどの問題があり、付形性や硬さが必要な充填材料や覆髄材への応用には至っていない。

本研究は、歯内療法領域における硬組織穿孔部あるいは欠損部に対する修復材料としての CPC の改善を目的に、有機質を含有する CPC の性状ならびに結晶の生成に及ぼす影響について調査した。

【材料と方法】

実験群として2群の有機質含有 CPC を作製し、対照群は有機質を含まない CPC 製材とした。実験群として、I 群はコラーゲン線維抽出溶液 (膠溶液) で CPC 製剤 (ティースメイト®ディセンシタイザー、クラレノリタケデンタル) の粉末成分を混和した。II 群は同様に低分子コラーゲン溶液で混和した。対照群を III 群とし同梱のアプリケーションで混和した。混和の粉液比はメーカーの指示に従い各群3個の試験片を作製した。試験片は蒸留水に浸漬し 37°C にて保管した。1 週、2 週ならびに4 週経過後に試料を取り出し、沈殿物をホモジナイザーにて粉砕し試料とした。すべての試料において、リン酸カルシウム結晶の形状ならびに経時的な変化、さらに HAp 結晶の生成状態に関して透過型電子顕微鏡にて観察した。

【結果】

I 群では1 週から針状結晶が多量に認められ、経時的に増加傾向が認められた。針状結晶の大きさや形状の変化はわずかであった。II 群では観察期間を通して針状結晶は少量であり、結晶周囲には低分子有機質が認められた。III 群では1 週から針状結晶が認められ、わずかに扁平な六角形状結晶が認められた。扁平な六角形状結晶は経時的に増加傾向が認められた。すべての群において、4 週で扁平な六角形状結晶が認められた。

【考察】

I 群は他の群に比べ針状結晶の増加が認められたが、これは高分子有機質が核となり生成が促進したと考えられる。しかしながら形状の変化はわずかだったことから、結晶の成長には関与しないと思われる。II 群は針状結晶の生成が少なく周囲に低分子有機質が認められたことから、低分子有機質の吸水性によってリン酸カルシウムの水和反応が遅延し、針状結晶の生成が抑制されたと考えられる。III 群は I 群に比べると針状結晶は少なく、II 群に比べると針状結晶ならびに扁平な六角形状結晶が多く認められた。すなわち高分子有機質の添加により結晶の生成は促進し、低分子有機質の添加により結晶の生成が遅延することが考えられる。また、すべての群において4 週で HAp と推定される扁平な六角形の結晶が観察されたことから、有機質は結晶の生成に影響を与えるが、成長には関与しないと考えられる。

【結論】

本研究の結果から、リン酸カルシウム結晶の生成において、高分子有機質は促進的な影響を与え、低分子有機質は抑制的な影響を及ぼすことが示唆された。

慢性化膿性根尖性歯周炎に陥った根未完成歯に対して

Revascularization (Regenerative Endodontic Treatment) を行った症例

丸紅東京歯科診療所¹, 東京歯科大学歯科保存学講座², 東京歯科大学小児歯科学講座³

○浅井知宏¹, 土倉 康¹, 山田雅司², 杉内亜紀奈², 宮吉教仁²,
藤井理絵², 森永一喜², 熊澤海道³, 新谷誠康³, 村松 敬², 古澤成博²

Regenerative endodontic treatment of immature tooth with apical periodontitis: A case report

Marubeni Tokyo Dental Clinic¹, Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College²
Department of Pediatric Dentistry, Tokyo Dental College³

○Tomohiro ASAI¹, Yasushi TOKURA¹, Masashi YAMADA², Akina SUGIUCHI², Norihito MIYAYOSHI²,
Rie FUJI², Kazuki MORINAGA², Kaido KUMAZAWA³, Seikou SHINTANI³, Takashi MURAMATSU², Masahiro FURUSAWA²

【緒言】

従来、歯髄壊死に陥った根未完成永久歯に対しては Apexification が行われ、根尖部に硬組織を形成、閉鎖させる方法で歯の保存がなされていた。この場合、歯根形成が停止するため歯根長は短く、また根管壁も薄いため、将来的に歯根破折を起こすリスクが高い状態となる。しかし、2000年代に入り Revascularization を行うことで根尖部周囲組織に残存している組織により歯根成長が認められる症例・研究が報告されている。今回、東京歯科大学千葉病院保存科にて Revascularization (Regenerative endodontic treatment) を行った症例と治療経過について報告する。

【症例】

患者は7歳9ヶ月女児。中心結節の破折に伴い根尖部歯肉腫脹を主訴とし、当院小児歯科の紹介により当科受診した。現病歴としては、3ヶ月前に下顎右側第二乳臼歯の抜去後に自発痛が起り、その際は鎮痛剤服用により疼痛緩和したものの、その後、頬側歯肉腫脹が認められた。現在、下顎右側第二小臼歯の中心結節は破折しており、検査を行ったところ自発痛(-)、打診痛(+)、歯髄電気診断(-)、根尖部歯肉腫脹(+)、動揺度1度、歯周ポケットは頬側中央部に6mm、他は2mmであった。口腔内X線写真では根未完成であり、歯髄腔の拡大、根尖部および歯槽骨辺縁に透過像が認められた。以上のことから中心結節の破折によって生じた慢性化膿性根尖性歯周炎と診断した。患者の年齢、根未完成歯であること、当該歯の状態から Revascularization (Regenerative endodontic treatment) の適応症と判断し、AAEのガイドラインに則って治療を行うこととした。

【治療経過】

本症例は本人および保護者に治療方針、それに伴うリスク、代替療法を説明し同意を得て治療を行った。初診時の診察ではリドカイン塩酸塩・アドレナリン注射液 1.5mL (キシロカインカートリッジ, デンツプライ三金) にて浸潤麻酔奏功後、ラバーダム防湿を行い、髄室開拓を行った。根管内から膿性および出血性の排膿が認められた。1.5%に希釈した NaOCl (ネオクリーナー「セキネ」, ネオ製薬) と 3% EDTA (スミアクリーン, 日本歯科薬品) を用いて根管内洗浄を行った後、根管をキャピラリーチップおよびペーパーポイントを用いて乾燥し、水酸化カルシウム製剤 (カルピタル, ネオ製薬) を貼薬し、グラスアイオノマーセメント (Fuji I, ジーシー) にて仮封した。術後26日目には自他覚症状が消失したことを確認し、メピバカイン塩酸塩注射液 1.5mL (スキヤンドネストカートリッジ, 日本歯科薬品) を用いて浸潤麻酔を奏功後、ラバーダム防湿を行い、仮封材・貼薬剤を除去した。20mLの3% EDTA にて根管内洗浄を行い、キャピラリーチップおよびペーパーポイントを用いて根管を乾燥した。その後、K-file を用いて根尖部から出血を促し、根管内に CEJ より 4mm 下方の位置で血餅を誘導し、3mmの厚さで MTA セメント (プロルート MTA, デンツプライ三金) を用いて封鎖後、グラスアイオノマーセメントにて仮封を行った。術後3ヶ月の診査においても症状はなく、経過良好と判断し、口腔内 X 線写真撮影を行った結果、歯根の成長が認められた。ラバーダム防湿後、コンポジットレジン修復 (MI フィル, ジーシー) を行った。術後6ヶ月の口腔内 X 線写真では歯根の成長とともに根尖部に硬組織形成を示す不透過像が認められた。

【考察および結論】

Revascularization (Regenerative endodontic treatment) は、2001年に Iwaya らが発表して以来、研究と症例が報告され、現在では AAE でもガイドラインが作られており、歯髄が壊死した根未完成歯の治療の第一選択術式として定着しつつある。本症例は中心結節の破折により生じた慢性化膿性根尖性歯周炎であったが、治療により歯根の成長を促すことが確認できた。今後も症状の変化、歯髄腔内への硬組織の添加、歯根形態の変化、置換性吸収などの有無を確認し、長期術後経過を追っていく必要があると思われる。

レジン隔壁作製症例の実態調査

1) 鶴見大学歯学部附属病院総合歯科 2, 2) 鶴見大学先制医療研究センター 医療技能開発学寄付講座

3) 鶴見大学短期大学部 歯科衛生科

○山口博康^{1,2)}、渡邊保澄²⁾、湯浅茂平¹⁾、岩瀬弘和¹⁾、小林一行³⁾

Investigation of Resin Partitions Cases

1) Department of General Dentistry Clinical Education, Tsurumi University School of Dental Medicine

2) Department of Research in Dentistry and Advanced Medical Technology, Institute for Preemptive Medicine, Tsurumi University

3) Department of Dental Hygiene, Tsurumi junior College.

○Hiroyasu YAMAGUCHI, Hozumi WATANABE, Mohei YUASA, Hirokazu IWASE, Kazuyuki KOBAYASHI.

緒言

歯内療法においてラバーダム防湿処置は必須であるが、特に感染根管治療においては残存歯質の少ない症例に多く遭遇する。このような歯肉縁下及び広範囲な歯質の欠損症例でもコンポジットレジンを用いた隔壁形成によりラバーダム防湿下の治療が可能になる。現在までに我々は感染根管治療におけるレジン隔壁作製症例の調査を行ってきた。本症例報告では操作性の良い低粘性レジンが臨床に普及し現在までに行ってきた臨床的分類に加えてチェアタイム、隔壁作製状態についてさらに調査した。

方法

鶴見大学歯学部附属病院総合歯科 2 (卒後臨床研修) における 2012 年から 2016 年までの根管治療におけるレジン隔壁プロトコルを用いて隔壁作製状況について分類した。

診査項目は①隔壁作製数 ②残存歯質の状態 (歯肉縁上・縁下) ③隔壁の形態: 歯質の欠損壁数 ④歯種前歯、小臼歯、大臼歯、上下の分類。⑤隔壁作製時間⑥使用した接着システム、コンポジットレジンについて調査した。

結果

①全隔壁作製歯数は 79 症例であった。全隔壁作製時間は平均 26.1 分であった。

②残存歯質の状態は縁上に隔壁作製したのは 33 症例で縁下までが 40 症例で 縁上・縁下に及ぶ症例が 5 症例であった (その他 1 症例)。

③1 壁欠損・10 症例 2 壁欠損・13 症例 3 壁欠損・17 症例 4 壁欠損・36 症例であった。

④隔壁を作製した歯種および⑤隔壁作製時間

1) 上顎前歯 1 症例 (2.53%) 平均 20 分。

2) 上顎小臼歯 11 症例 (13.9%) 平均 21.3 分

3) 上顎大臼歯 25 症例 (31.6%) 平均 27.3 分

4) 下顎前歯 2 症例 (1.3%) 平均 20.0 分

5) 下顎小臼歯 8 症例 (10.1%) 平均 24.8 分

6) 下顎大臼歯 32 症 (40.5%) 平均 27.4 分であった。

⑥使用した材料は全てセルフエッチングシステムとコンポジットレジンであった。その中でも 1 例がペーストタイプでそれ以外は低粘性レジンが使用されていた。

考察

本調査は根管治療に際しての①隔壁作製頻度と②残存歯質の状態③隔壁の形態④隔壁作製を行うためのチェアタイムを調べる目的で調査したところ、全隔壁作製平均時間は 26.1 分であり、以前の我々の報告した 17.8 分を上回っていた。これは以前の調査に比較して 4 壁性欠損と大臼歯の症例が多く含まれていることによると考えられた。大臼歯では作製時間が平均で 30 分弱必要であり、次に小臼歯の作製時間 20 分強の時間が必要であった。歯種によりチェアタイムが異なることから確実な隔壁作製には診療時間の配分が必要と考えられた。

結論

確実な隔壁作製には歯種ごとに適切なチェアタイムが必要であり、診療時間の配分にも考慮が必要である

文献

山口博康ら: 感染根管治療においてレジン隔壁を作製した症例の実態調査, 日本保存学会雑誌 52(3) 248~254. 2009.

上顎第一大臼歯の歯根端切除術に3DモデルとPiezosurgeryを活用した1症例

東京歯科大学歯科保存学講座¹⁾、東京歯科大学口腔顎顔面外科学講座²⁾
○ 加藤広之¹⁾ 宮吉教仁¹⁾ 関谷紗世¹⁾ 村松 敬¹⁾ 古澤成博¹⁾ 神尾 崇²⁾

Application of 3D plastic models and Piezosurgery to periapical surgery of maxillary first molar: A case report

Department of Endodontics and Clinical Cariology¹⁾, Department of Oral and Maxillofacial Surgery²⁾, Tokyo Dental College
○ Hiroshi KATO¹⁾, Norihito MIYAYOSHI¹⁾, Sayo SEKIYA¹⁾, Takashi MURAMATSU¹⁾, Masahiro FURUSAWA¹⁾, Takashi KAMIO²⁾

【緒言】上顎第一大臼歯部で外科的歯内療法処置を適応する際、上顎洞は留意すべき解剖学的構造である。歯根尖との洞底との骨幅が菲薄な場合も多く、炎症性骨吸収により根尖端が洞内露出する場合も少なくないため、CBCTによる三次元的画像診断が必須といえる。歯根端切除術を施行する際も、切削器具による洞粘膜損傷や切断した根尖端の洞内迷入などのリスクが伴う。今回我々は、根尖病変と根尖端が上顎洞内に突出した上顎第一大臼歯に対して、施術時のリスク回避と侵襲軽減を図る目的で、歯・顎骨3Dモデルと超音波骨切削装置Piezosurgery®を利用し、安全に歯根端切除を行うことができた症例について報告する。なお本報告に関しては東京歯科大学倫理規定に従い、患者から書面での同意・承諾を得ている。

【方法】歯・顎骨3Dモデルは、CBCTの画像データを医用画像アプリケーション(Volume Extractor 3.0:i-Plants Systems)でCADデータに変換し、パーソナル3Dプリンタ(Value3D MagiX MF-2000:MUTOH)を用いてABS樹脂素材で造形した。Piezosurgery®(Mectron)は20~80µmの線形振動による骨組織切削を主用途とした超音波骨切削装置である。高出力過変調超音波のBONEモードは効率的な骨切削が可能であるとともに軟組織を損傷しにくいのが特徴とされる。外科的歯内療法の用途には、低出力のROOTモードで振動が数µm程度のENDOレベル設定で使用することができる。

【症例】患者は42歳の女性。上顎左側第一大臼歯の自発痛を主訴に紹介医を受診、感染根管処置を受けたが、咬合痛が消失しないため本学千葉病院保存科を紹介来院した。当科初診時、6に打診痛を認めたが歯肉腫脹、圧痛は認めなかった。口内法X線写真では根尖部透過像は判定できなかった。初回時、未処置の近心頬側第2根管(MB2)が認められ、次回時にMB2を含め4根管の根管形成を行った。2回の根管貼薬で臨床症状が改善しないため、CBCT撮影を行ったところ、近心頬側根(MB根)根尖部のみ直径約4mmの球状の病変が骨の介在なく洞内に突出した形態で観察された(図)。同部を歯根嚢胞と臨床診断、歯根端切除術を行うこととした。骨と歯根端部の切削操作時に想定されるリスクを回避するため、Piezosurgery®を用いることとした。CBCT画像と歯・顎骨3Dモデルを利用し、患者に診断と手術法の概要、リスク等を説明し、理解と同意を得た。施術1週前に根管充填とCR材での髓腔閉鎖を行った。3Dモデルで骨削去のシミュレーションを行った上で、顕微鏡下でMB根の歯根端切除術を実施した。Piezosurgery®の骨切除用チップをBONEモードで使用して骨切削し、歯根端を露出させてから同チップで切除した。病変部は断裂なく球状形態で摘出できたが、洞粘膜と癒着していたため、摘出後に上顎洞交通が認められた。歯根切断端の処理はROOTモードでチップを使用した。切断面を接着性レジンセメントで被覆後、縫合して手術を終えた。術後4日目の抜糸時に自発痛、腫脹はみられなかった。術後3か月リコールまで臨床経過は良好である。X線画像所見上もMB根上部の洞底線に連続像が認められ、順調な術後経過を示している。



【考察】我々は第144回本学会で、外科的歯内療法の治療マネージメントにおける歯・顎骨3Dモデルの有用性を報告した。本症例も、患部根尖端の上顎洞内露出の状況を3Dモデルで立体的に把握し、切削設計と操作シミュレーションも行えたことは、施術時のリスク回避に有効と考えられた。Piezosurgery®での硬組織切削は、回転切削具で懸念されるような洞粘膜損傷や歯根端切除時の骨火傷を起こしにくいので、低侵襲の手術が行い得た。Piezosurgery®は口腔外科や口腔インプラント領域で広く応用されているが、歯内療法領域での応用報告は僅少である。本症例の経験からすれば、各種の外科的歯内療法処置に有効な器材となるものと思われた。

【結論】歯根端切除術症例において、CBCT画像データから作製した歯・顎骨3Dモデルと超音波骨切削装置Piezosurgery®を利用することは、施術時のリスク回避と侵襲軽減に繋がり、精緻で安全な施術を行ううえで有効であった。

過剰根管充填された難治性根尖性歯周炎の治療経過における細菌学的解析

1. 大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)
2. 新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座 歯学分野
3. 永山歯科医院

○永山智崇^{1,3}、朝日陽子¹、吉岡靖介³、住岡龍一³、米田直道¹、松井沙織¹、
後藤満帆¹、野杵由一郎²、恵比須繁之¹、林美加子¹

Bacterial Analysis of a Refractory Periapical Periodontitis Excessively Obturated with a Gutta-percha Point

1. Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
2. Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
3. Nagayama Dental Clinic

○NAGAYAMA Tomotaka, ASAHY Yoko, YOSHIOKA Seisuke, SUMIOKA Ryuichi, YONEDA Naomichi, MATSUI Saori,
GOTO Maho, NOIRI Yuichiro, EBISU Shigeyuki, HAYASHI Mikako

【緒言】

難治性根尖性歯周炎に対する研究の結果、これまでに根尖孔外バイオフィームが関与することが明らかにされてきた (Noiri Y et al, J Endod. 2002)。一方で、その臨床的な病態の詳細については、根尖性歯周炎および辺縁性歯周炎に関連するバイオフィームの実態が報告されているが (野杵由一郎, 日歯保存誌, 2007)、いまだに未解明な部分も多いのが現状である。今回、感染根管治療により一度治癒した根尖病変が3年後に再発して外科的歯内療法 (意図的再植による歯根端切除術) を行った症例を経験し、16s rRNA 遺伝子解析法により細菌感染の実態を検索したので報告する。

【症例】

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を受け遂行された (承認番号 H20-E11、H26-E38)

46歳男性。平成22年11月に右下5インレー脱離が主訴で初診。局所的にはX線診査で失活歯かつ軽度の過剰根管充填で根尖病変が存在したので、再根管治療を行うことで合意した。全顎的には中等度～重度の歯周炎に罹患している、高血圧 (160/100mmHg)、喫煙 (30本/日)、食いしぼり、定期的な歯科受診歴がない、というリスク要因が存在した。平成22年11月末に根管治療が終了して、12月にFMCにて補綴を行った。歯周治療 (SRP) や他部位の処置も並行して行い、平成23年4月に終診した。平成25年10月に軽度の歯肉腫脹と自発痛、咬合時痛が主訴で再初診。咬合調整と投薬を行った。その後、歯肉が腫脹、排膿して急性症状は緩解した。難治性根尖性歯周炎と診断してCBCTを撮像したところ、歯根膜腔の拡大は認められたが、根尖病変と辺縁性歯周炎の骨吸収の連続性は認められなかった。平成26年1月に外科的歯内療法を行い、平成26年3月にFMCにて補綴を行った。外科的歯内療法時の術中所見としては、歯肉弁剥離前後で限局的な垂直性骨吸収は認めず、拔牙前後で根面にクラックや歯根破折像も確認されなかった。平成27年6月の再初診時には、根尖病変ならびに辺縁性歯周炎ともに経過良好 (EPP 3-4mm、動揺度0) であった。

【結果】

根管治療開始直後に根尖部より引き抜いた過剰根管充填されたガッタパーチャポイントの根尖内部および根尖孔外突出部、さらに根管充填後に再発して行った外科的歯内療法により得られた根尖部におけるバイオフィーム構成細菌種を16s rRNA 遺伝子解析法により検索した。その結果、根管内部のガッタパーチャポイントからは *Prevotella sp* が多く検出された (62%) のに対して、難治性根尖性歯周炎で検出頻度が高いとされる *Porphyromonas gingivalis* は検出されなかった。一方で、根尖孔外突出部のガッタパーチャポイントからも *Prevotella sp* (42%) が比較的多く検出されたが、その他にも *P. gingivalis* (14%) や *Bacteroides-like sp* (14%) が検出された。しかし、外科的歯内療法より得られた根尖部からは、根管内部および根尖孔外突出部のガッタパーチャポイントで検出された細菌がほとんど検出されず (0~2%)、*Phocaeicola sp* (22%) など他の細菌が比較的多く検出された。

【考察】

P. gingivalis の分布より、根管由来細菌による根尖孔外バイオフィーム形成の進行は軽度であったと考えられた。さらに、歯周病の進行度やリスク因子ならびにCBCTでの歯根膜腔の拡大や根尖性および辺縁性骨吸収の状況を総合すると、今回の難治性根尖性歯周炎における細菌学的要因の関与は比較的軽度であったと推察された。

【結論】

難治性根尖性歯周炎の病態は複雑であり、歯周病と同様に細菌学的要因、免疫学的要因、咬合学的要因などが関与する多因子性の疾患である可能性が示唆された。

(本研究の一部は、科学研究費補助金 (基盤研究(A) 20249076、基盤研究(C) 26462880) の補助の下で行われた)

紫外線照射が歯内疾患関連細菌および歯髄細胞に及ぼす影響

¹九州大学病院 口腔総合診療科 ²九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野

³九州大学大学院歯学研究院 歯周病学分野

⁴国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター

○原口 晃¹、吉田晋一郎²、竹下正章³、角 保徳⁴、西村英紀³、前田英史²、和田尚久¹

Effects of UV irradiation equipment on endodontic disease-related bacteria and dental pulp cells

¹Division of General Dentistry, Kyushu University Hospital, Kyushu university,

²Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University,

³Department of Periodontology, Faculty of Dental Science, Kyushu University,

⁴Center for Development of Advanced Medicine for Dental Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology

○Akira Haraguchi¹, Shinichiro Yoshida², Masaaki Takeshita³, Yasunori Sumi⁴,

Fusanori Nishimura³, Hidefumi Maeda², Naohisa Wada¹

【研究目的】

う蝕による不顕性露髄の直接覆髄時には、露髄面の殺菌が求められる一方で、露髄面に存在する歯髄細胞の保護が必要であることから、これらの相反する効果を発揮する治療法の開発が求められている。また、感染根管においては根管内の無菌化を目的にファイリングによる感染象牙質の機械的な除去ならびに化学的洗浄法にて無菌化を図っているが、十分な効果が得られているとは言い難く、より確度の高い無菌化を図る治療法の開発が求められている。

近年、皮膚科領域では多くの皮膚疾患に有効な治療装置としてナローバンドUVB (波長ピーク: 311±2 nm) を用いた紫外線療法が急速に普及している。紫外線照射による殺菌効果と組織低傷害性の両面の効果を利用することで、歯科への応用が期待できる。本研究では、波長の異なる紫外線LED照射装置を用いて歯内疾患関連細菌に対する殺菌作用ならびに歯髄細胞に対する細胞傷害性について検討した。

【材料および方法】

Streptococcus mutans ATCC25175, *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277, *Fusobacterium nucleatum* ATCC25586 の各細菌株を培養後 PBS にて懸濁し 96-well plate に分注し、265nm, 285nm, 310nm, 365nm, 420nm, 525nm の各波長に設定した紫外線 LED (日機装技研株式会社) を異なる照射時間で照射した。その後 BHI 液体培地にて培養し、細菌株の増殖度を測定した。

また、ヒト歯髄細胞 (HDPC-3S: 1.5×10³/well) を96-well plateに播種し、10% FBS含有α-MEM (150 μl/well) にて、24時間培養後、各波長に設定した紫外線LEDを異なる照射時間で照射した。1、2、3日間培養後、WST-1アッセイを行い、各条件の吸光度を測定し、さらに細胞の形態観察を行った。

【結果及び考察】

265nmおよび285nm 紫外線照射においては、10秒以上の照射で全菌株の増殖が著しく低下し、死滅した。310nm 紫外線照射においては、*Enterococcus faecalis* は非照射群と比較して増殖に有意差は認めなかったが、それ以外の細菌の増殖スピードは時間依存的に有意に減少した。365nm, 420nmおよび525nm 紫外線照射においては、全菌株の増殖に影響は認められなかった。歯髄細胞に対する影響を検討した実験では、265nmおよび285nm 紫外線照射においては、10秒以上の照射で細胞増殖が非照射群と比較して有意に低下した。細胞膜が破裂したような細胞形態を認め、多くの細胞が剥離していた。一方、310nm, 365nm, 420nmおよび525nm 紫外線照射においては、265nmおよび285nm 紫外線照射と比較すると細胞増殖への影響が減少した。非照射群と同様の正常な細胞形態を呈し、剥離した細胞は認めなかった。

これらより、露髄面周囲のう蝕原因菌に対しては310nm 紫外線を60秒照射すると細菌の増殖抑制が期待でき、細胞に対する影響も最小限に抑えられる可能性が示唆された。難治性慢性根尖性歯周炎の感染根管より検出される *Enterococcus faecalis* に対しては285nm 紫外線を10秒以上照射することで殺菌効果を示す可能性が示唆された。今後ラット露髄モデルを用いて紫外線照射の影響を組織学的に検討し、さらに感染根管モデルを作成し、象牙細管内細菌に対する紫外線照射の殺菌効果を検討する予定としている。

【結論】

310nm 紫外線照射は、原因菌に対する殺菌効果を有する一方で歯髄細胞傷害性は低いことから露髄面での殺菌・静菌に有用であること、また、285nm 紫外線照射は感染根管内細菌の殺菌効果を有することから、感染根管における殺菌・静菌に有用である可能性が示唆された。(なお本研究で用いたヒト歯髄細胞 (HDPC-3S) は九州大学大学院歯学研究院倫理委員会の承認を得たものである (承認番号630-00))

歯内-歯周疾患Ⅲ型病変に智歯の自家移植を施した一症例

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, 松本 和磨, 赤尾 瑛一, 西崎 竜司, 稲永 晃子, 二階堂 美咲, 中山 英明,
水上 正彦, 畠山 純子, 松本 典祥, 泉 利雄, 阿南 壽

A Case Report: Autotransplantation of third molar as an approach for the treatment of Class III Endodontic-Periodontal Disease (Combined Lesion)

¹Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College
○MATSUZAKI Etsuko, MATSUMOTO Kazuma, AKAO Eiichi, NISHIZAKI Ryuji, INANAGA Akiko, NIKAIIDO Misaki,
NAKAYAMA Hideaki, MINAKAMI Masahiko, HATAKEYAMA Junko, MATSUMOTO Noriyoshi,
IZUMI Toshio, ANAN Hisashi

【緒言】

歯内-歯周疾患は、歯内・歯周領域の多様な要因で発症する。とりわけ歯内-歯周疾患のⅢ型病変（歯内-歯周疾患の三型分類）では、広範な炎症を惹起することもあり、抜歯を選択せざるを得ない場合も多い。一方、歯を保存する究極の方法として、近年、歯の自家移植が多数報告されている。今回、歯内-歯周疾患のⅢ型病変を有する歯の抜歯後のアプローチとして、智歯の自家移植を施し、6年7カ月にわたり良好な経過を辿っている症例について報告する。なお、発表に際し、患者本人に本症例の主旨を十分に説明し、同意を得ていることを附記する。

【症例】

患者:50歳、女性。初診:2009年2月。主訴:下顎右側第2大臼歯の自発痛及び咬合痛。全身既往歴:特になし。現病歴:2005年頃、近医にて47感染根管治療及び根管充填。その後特に症状なく経過していたが、2009年1月下旬、47に強い咬合痛を感じたため、前医を受診。その際、47の根尖病変を指摘され、咬合調整及び抗菌薬の処方を実施された。47抜歯と全顎的な歯周治療の依頼で九州大学病院を受診。臨床所見:47は自発痛(-)、打診痛(+)、頬側歯肉腫脹(-)、動揺度2度、根尖部圧痛(+)、瘻孔(-)であった。また、47には5-6mmの歯周ポケット及びBOP、排膿を認めた。エックス線所見:47根管充填の状態はアンダーであり、歯根周囲にびまん性の透過像を認めた。診断:広汎型中等度慢性歯周炎、47歯内-歯周疾患Ⅲ型病変。

【治療】

口腔内清掃指導および歯周基本治療から開始した。ラポール形成後、47は感染根管治療を試みる予定であったが、歯周基本治療中に、47頬側に瘻孔形成が認められたため、瘻孔からガッタパーチャポイントを挿入すると、ポイントは根尖方向へ容易に到達した。初診時と比較し、歯根周囲に不定形に拡大した透過像が認められたこと、再評価時に47の歯周ポケット、動揺及び排膿が改善しなかったこと、また槓状根であることから、47抜歯を選択することとした。一方、46には臨床症状は認められないものの分岐部の穿孔が認められ、47抜歯後のブリッジ支台歯としては不適切と判断し、2009年12月、47抜歯及び48の47部への歯の移植を行った。48は咬合性外傷が認められ、移植の前処置としてインレー除去後、抜髄及び根管充填を施した。移植後、47はワイヤー固定を行い3カ月経過観察後、プロビジョナルレストレーションを装着した。動揺度は1度で、エックス線上で歯根吸収あるいはアンキローシスの所見は認められなかった。移植から5カ月後、47根尖付近及び近心側の著明な骨組織の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。移植後6年7カ月の現在まで臨床症状はなく、歯根周囲の歯槽骨は健常レベルまで回復しており、良好に経過している。

【考察および結論】

本症例では、歯内-歯周疾患のⅢ型病変による受容側の歯周組織の破壊が大きかったが、的確な歯周基本治療が行われたこと、移植歯の抜髄・根管充填により感染性炎症歯髄が除去されたこと、及び適切な抜歯と速やかな移植が行えたことにより、炎症性外部吸収やアンキローシスが起ることなく、良好な治癒を示したと考えられる。また、長期にわたる経過観察の中で、外傷性咬合に配慮した冠作製や定期的な咬合チェックを行うことは、移植歯の予後に重要であることが示唆された。

知識データベースが歯科医師臨床研修に与える影響 - 歯周治療に関する日報の分析 -

岡山大学病院 総合歯科

○河野隆幸, 塩津範子, 武田宏明, 小野早和子, 渡邊 翔, 野崎高儀, 桑山香織, 鳥井康弘

The effect of Knowledge Database on postgraduate clinical training course -The analysis of portfolios associated periodontal treatment -

Comprehensive Dental Clinic, Okayama University Hospital

○KONO Takayuki, SHIOTSU Noriko, TAKETA Hiroaki, ONO Sawako, WATANABE Sho,
NOZAKI Takayoshi, KUWAYAMA Kaori, TORII Yasuhiro

【目的】

臨床経験の少ない研修歯科医の疑問や失敗の多くは共通している。しかしながら、単年度の歯科医師臨床研修では、その疑問や失敗を次年度に引き継ぐことは困難であるため、我々指導歯科医は同じ指導を毎年行わなければならない。我々は、平成 18 年度から電子ポートフォリオシステムを使用した歯科医師臨床研修を実施しており、研修歯科医が診療を行った際に、気付きや振り返りを日報として電子ポートフォリオに入力するように指導している。その日報は、次年度以降の研修歯科医が効率良く研修が行えることを目的に、知識データベースとして利用している。本報告の目的は、知識データベースが歯科医師臨床研修にどのような影響を与えるかを評価することである。

【方法】

1. 知識データベースを積極的に用いるよう指示した H26 年度と指示していなかった H25 年度を対象に、研修歯科医 (H25 年度 : 54 人, H26 年度 : 52 人) が電子ポートフォリオに入力した日報の中から、歯周治療に関連する日報を抽出し、テキストマイニングソフト WordMiner (日本電子計算株式会社, 東京) を用いて形態素解析を行った。それぞれの年度を前期・中期・後期の 6 つのカテゴリーに分け、それぞれのカテゴリーと出現頻度 50 以上のキーワードの関連性を調べるため、クラスター分析や頻度による有意性テストを行った。
2. H27 年度において、知識データベースの使用頻度や目的、有効性等を調べるため、研修開始時 3 ヶ月目と 11 ヶ月目に無記名アンケート調査を行った。

【結果】

6 つのカテゴリーは、H25 年と H26 年の前期が 1 つのクラスターに、他の 4 つの時期が 1 つのクラスターに分類された。H25 年前期と関連の深いキーワードのクラスターと H26 年前期と関連の深いクラスターの内容には差があった。各カテゴリーにおけるキーワードの有意性テストの結果、H25 年度前期では基本検査、診断、知識、スケーリング、歯間ブラシが、H26 年度前期では重要、比較、適切、診療、口腔内といったキーワードが上位であった。

H27 年度に行ったアンケート結果では、知識データベースの使用頻度は、3 ヶ月目では「毎回使用する」、「4~5 回に 1 度使用する」がそれぞれ 8.6%、25.7%であったが、11 ヶ月目ではどちらも 0%であった。両アンケート時とも使用目的は「疑問がある時」や「不安がある時」が多く、役に立つ内容は「失敗事例」や「技術的内容」が多かった。知識データベースの有効性については、両アンケート時とも 90%以上が有効であると回答していた。また、「知識データベースを使用することによって失敗を防げた」と回答した研修歯科医が 3 ヶ月目では 11 名いた。

【考察】

日報の入力内容の変化は、知識データベースの使用によって過去の研修歯科医の気付きや振り返りを疑似体験し、その結果、気付きや振り返りがより深まったため起こったと考える。アンケート結果から、研修初期において知識データベースの活用が多いことが示された。これは、研修初期において研修歯科医は診療に対して疑問や不安の多いため、それを解決する手段として知識データベースを使用していたためであると考えられる。

【結論】

研修初期において、研修歯科医が知識データベースを使用することによって、日報の内容が変化した。また、研修初期において知識データベースの使用は有効であると考えられる。

LPS 刺激歯根膜細胞におけるオートファジーの役割

1 福岡歯科大学総合歯科学分野、2 再生医学研究センター、3 高齢者歯科学分野、
4 九州大学病院歯内治療科

○萩尾佳那子¹、大野純²、山口真広³、瀬野恵衣¹、山田和彦¹、米田雅裕¹、前田 英史⁴、廣藤卓雄¹

A role of autophagy in PDLSC stimulated with LPS

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

2 Research Center for Regenerative Medicine, Fukuoka Dental College

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

4 Department of Endodontology, Kyushu University Hospital

○Kanakano Hagio¹, Jun Ohno², Masahiro Yamaguchi³, Kazuhiko Yamada¹, Kei Seno¹

Masahiro Yoneda¹, Hidefumi Maeda⁴, Takao Hirofujii¹

【研究目的】

これまで、私たちはケラチノサイト(KC)へのLPS刺激により誘導される自食作用であるオートファジーが、KCのストレス適応法の一つである可能性およびそのオートファジー経路について報告してきた。一方、歯周病の治療においては歯根膜線維の再生は重要な課題の一つである。すなわち、歯周病進行に伴う炎症反応に対して、歯根膜(PDL)細胞が活性化を維持して、線維の増生を続けることができれば急激な歯周ポケット形成および歯槽骨の吸収を抑制できると考えられる。そこで、本研究ではヒト不死化歯根膜細胞(PDLSC)を用いて、同細胞にLPS刺激を与えオートファジーが誘導されるかを検索する。そして、PDLSCで誘導されたオートファジーが同細胞のコラーゲン産生に関与するかを検討する。

【材料・方法】

- 1) PDLへのLPS刺激：PDLを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：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)法による検索した。
- 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) オートファジー誘導PDLSCにおけるコラーゲン発現：LPS刺激群および非刺激群で誘導されるオートファジーとコラーゲン発現の関連性をICC法およびWB法で検討する。

【結果・考察】

- 1) LPS刺激によるオートファジー誘導：刺激PDLSCでは、オートファジーのマーカーであるLC3-II、Atg5-12、Beclin-1発現の亢進がICCおよびWBで確認された。誘導されたタンパク発現は3-MAおよびWm投与により阻害された。この結果は、LPS刺激PDLSCではオートファジーが誘導され、誘導経路にPI3KC3複合体が関与することが示唆された。
- 2) LPS刺激PDLSCでの細胞内ROS誘導：コントロール細胞と比較して、刺激PDLでは細胞内ROSの蓄積が認められた。また、細胞内ROSの亢進によりpAMPK発現が増強した。それに対して、Be1-2発現は抑制された。これらの結果から、オートファジー誘導は細胞ストレス型のROS→AMPK経路の活性化に依存する可能性が考えられた。
- 3) オートファジー誘導PDLSCでのコラーゲン発現の亢進：非誘導PDLSCと比較して、誘導PDLSCにおいてはビメンチンおよびコラーゲンの発現が亢進していた。

【結論】

以上の結果から、LPS刺激により誘導されるPDLSCでのオートファジーは、同細胞のコラーゲン発現維持に関与することが明らかとなった。オートファジーが同細胞の再生能に関与する可能性が示唆された。

エピガロカテキンガレートは TNF α による破骨細胞形成促進を抑制する

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科・歯周病学分野
○鶴飼 孝、山下恭徳、小林弘樹、小山美香、原 宜興

Epigallocatechin gallate inhibits acceleration of osteoclastogenesis by TNF α

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate school of Biomedical Sciences
○Takashi Ukai, Yasunori Yamashita, Hiroki Kobayashi, Mika Oyama, Yoshitaka Hara

【研究目的】

我々はこれまでに茶カテキンの主要な成分であるエピガロカテキンガレート (EGCG) が *in vitro* で receptor activator of NF κ B ligand (RANKL) 刺激によるマウス骨髄細胞からの破骨細胞形成を抑制することを報告してきた。また茶カテキンがマウス *in vivo* においても lipopolysaccharide (LPS) による炎症性骨吸収を抑制することを報告している。LPS による炎症性骨吸収においては Tumor necrosis factor α (TNF- α) が重要なサイトカインの一つであり、RANKL による破骨細胞形成を促進することが報告されている。しかし、*in vitro* 破骨細胞分化において TNF α の作用に対する EGCG の影響は明らかになっていない。今回の研究では RANKL 存在下においてける TNF α による破骨細胞形成促進への EGCG の影響を検討した。

【材料および方法】

CB17 マウス骨髄マクロファージを macrophage colony stimulating factor (M-CSF) と RANKL で刺激して 72 時間培養して破骨細胞を形成させる系を用いた。また培養後、酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞として形成状態を評価した。まず RANKL 単独あるいは RANKL と同時に TNF α で刺激した時に EGCG を添加して 72 時間後に破骨細胞の形成状態を確認した。次に前破骨細胞である TRAP 陽性単核細胞への TNF α と EGCG の影響を検討するため、以前の研究で単核の TRAP 陽性細胞に分化することが分かっている RANKL で 48 時間刺激した骨髄マクロファージに、TNF α と EGCG を添加して 24 時間後に破骨細胞の形成を確認した。さらに、上記実験において破骨細胞形成に対する抑制効果が知られている Osteoprotegerin (OPG)、Interleukin 4 (IL-4) ならびに Interferon γ (IFN γ) を EGCG の代わりに添加してその影響を検討した。マウスからの骨髄細胞の採取に関しては長崎大学の承認を得た動物実験計画書に基づいて行われている。

【成績】

RANKL 単独刺激と比較して RANKL と同時に TNF α を添加した場合と RANKL48 時間刺激した後の TRAP 陽性単核細胞に TNF α を添加した場合のどちらにおいても破骨細胞の形成が促進した。EGCG は RANKL 単独刺激の場合のみでなく、これら RANKL と TNF α の同時刺激による破骨細胞形成促進も、TRAP 陽性単核細胞に TNF α を添加した場合の破骨細胞形成促進も抑制した。一方、OPG、IL-4 ならびに IFN γ は RANKL ならびに TNF α と同時に添加した場合には破骨細胞形成を強く抑制したが、RANKL48 時間刺激後に TNF α と添加した場合には抑制効果はわずかであった。

【考察と結論】

今回の結果から、EGCG は RANKL による破骨細胞形成ばかりでなく、TNF α 共刺激による破骨細胞形成促進においても抑制的に作用した。また EGCG は他の破骨細胞形成抑制因子と違い、前破骨細胞である TRAP 陽性単核細胞からの破骨細胞形成に対しても抑制的に作用することが明らかとなった。今回の結果は歯周炎のような TNF α が関与すると考えられる炎症性骨吸収において、EGCG が効果的な骨吸収抑制剤となりうる可能性を示している。

Runx2 ホモ欠損マウス由来 iPS 細胞を用いた骨芽細胞分化の解析

東京歯科大学 歯周病学講座¹, 東京歯科大学 口腔科学研究センター²
○ 青木 栄人¹, 喜田 大智¹, 勢島 典¹, 齋藤 淳^{1, 2}

Analysis of osteoblastic differentiation of iPS cells from Runx2 homo-deficient mouse

Department of Periodontology¹, Oral Health Science Center², Tokyo Dental College
○ AOKI Hideto¹, KITA Daichi¹, SESHIMA Fumi¹, SAITO Atsushi^{1,2}

【目的】 現在、歯周炎の治療においては、十分な量の歯槽骨の再生を含めた予知性の高い歯周組織再生が課題となっている。iPS 細胞は、その増殖能と多分化能から組織再生における移植細胞のソースとしての応用が期待されている。Runx2 は骨芽細胞分化に必須の転写因子であるが、iPS 細胞からの骨分化過程における作用については未だ明らかにされていない点が多い。そこで今回、Runx2 ホモ欠損マウス由来 iPS 細胞を作成し、骨芽細胞への分化の動態を解明することを目的に研究を行った。

【材料および方法】 Runx2 ヘテロ欠損マウス (C57BL/6) の交配により得られた胎児より、マウス胚線維芽細胞 (MEF) を作成後、Runx2^{-/-}, Runx2^{+/-}, wild type の 3 群に分け、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 因子をセンダイウイルスベクターを用いて導入し、マイトマイシン処理を行った MEF フィーダー細胞上に播種した。そしてマウス iPS 細胞 (miPSCs) の形態を示すコロニーを選別し、培養することで各群の miPSCs の作成を行った。未分化マーカーの発現およびテラトーマの作成を行い、miPSCs の樹立を確認した。Runx2^{-/-}, Runx2^{+/-}, wild type miPSCs は骨芽細胞分化誘導培地にて培養した後、14 日、21 日でアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色ならびに Real-time PCR を用いて骨芽細胞分化マーカーの解析を行った。また、骨分化誘導培地にて培養後 14 日の Runx2^{-/-}, Runx2^{+/-} miPSCs を用いて PCR array (mouse osteogenesis) を行い、骨分化関連遺伝子の発現プロファイルの解析を行った。

【結果】 作成した iPS 細胞様細胞は各群 (Runx2^{-/-}, Runx2^{+/-}, wild type) ともに未分化マーカーである Oct3/4, Nanog, Sox2, Cripto, Dax1, Ecat1, Rex1 の発現を認め、作成されたテラトーマには扁平上皮、腺上皮、骨様硬組織といった三胚葉由来の組織が確認された。また、各群ともに形態および増殖に明確な相違は認めなかった。骨芽細胞分化誘導後 14 日、21 日において Runx2^{-/-}, Runx2^{+/-} miPSC ともに ALP 活性を認めた。Real-time PCR の結果から骨芽細胞分化初期マーカーである *Alp* の mRNA 量は 14 日と比較し 21 日で各群 (Runx2^{-/-}, Runx2^{+/-}, wild type miPSCs) ともに上昇していた。また、後期の分化マーカーである *Bsp* の mRNA 量は Runx2^{-/-} miPSC で上昇傾向を認めなかった。PCR array の結果、Runx2^{+/-} miPSCs と比較し Runx2^{-/-} miPSCs では *Col1a1*, *Dlx5*, *Fgf2*, *Gli1* などの発現は低下したのに対し、*Rankl*, *Ahsg*, *Ihh*, *Egf* の発現の増加を認めた (Fig 1)。

【考察】 本研究において、Runx2^{-/-}, Runx2^{+/-} miPSCs の樹立に初めて成功した。Real-time PCR の結果より、骨芽細胞分化の初期においては Runx2 非依存的な経路が存在することが示唆された。骨分化過程において、*Rankl* は Runx2 の発現が低下してくる分化後期に上昇してくることが知られている。PCR array の結果から、Runx2^{-/-} miPSCs を骨分化誘導した群では、骨分化関連遺伝子の多くが発現を低下する中、*Rankl* の発現が上昇したことより、Runx2 が *Rankl* の発現を何らかの機序を介して制御している可能性が示唆された。

【結論】 miPSCs から骨芽細胞への分化誘導において、分化初期には Runx2 非依存的な経路が存在し、Runx2 は *Rankl* や *Ahsg* を抑制的に制御することで分化を促している可能性が示唆された。

(東京歯科大学実験動物委員会承認番号：280401)

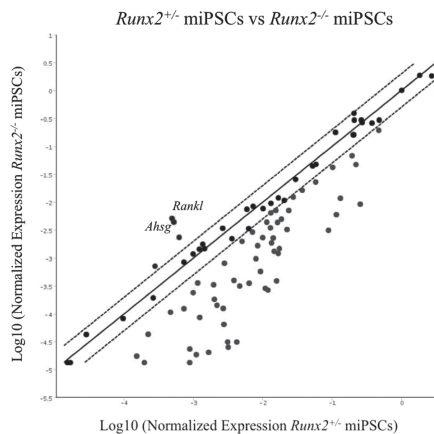


Fig 1. Gene expression profile of miPSCs cultured for 14 days with osteoblast basal medium

(会員外共同研究者：東京歯科大学生生化学講座 篠 宏美, 小野寺 晶子, 齋藤 暁子, 東 俊文)

Spheroid 培養時の歯根膜幹細胞における幹細胞関連遺伝子の変化

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科ナノメディスン(DNP)講座
○岩崎剣吾

The expression of stem cell-related genes in periodontal ligament stem cells under spheroid culture condition
Department of Nanomedicine (DNP), Graduate school of medical and dental sciences,
Tokyo Medical and Dental University
○Kengo Iwasaki

【目的】

歯根膜幹細胞 (PDLSC) は歯根膜より単離・培養される間葉系幹細胞である。PDLSC は *in vitro* において骨髄由来間葉系幹細胞と類似した特徴、すなわちプラスチックディッシュに接着しながら増殖し、特徴的な細胞表面マーカー発現(CD105+, CD90+, CD73+, CD44+, CD34-, CD45-)を示し、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有することが知られている。またその多分化能、免疫調節能、損傷部位への遊走能などから PDLSC を用いた歯周組織再生治療が提唱され、数々の動物実験において PDLSC 移植が歯周組織再生を誘導することが報告されている。細胞移植治療においては、治療に必要な幹細胞数の確保をするため、細胞培養と度重なる継代が不可避であるが、継代培養における幹細胞性の低下、細胞老化、自発的な分化などによる細胞の変化が問題となる。幹細胞性の維持の為にさまざまな方法が研究されているが、PDLSC の幹細胞性と培養方法については未だ情報が少ない。本研究では、PDLSC を 3 次元的な spheroid を形成させた状態で培養し、通常の平板の培養皿上で培養した場合と比べて PDLSC において幹細胞関連遺伝子の発現にどのような変化が起こるかを検討した。

【材料と方法】

東京医科歯科大学歯学部附属病院に来院した患者より健全抜去歯を採取し、得られた歯根膜組織から dispase/collagenase を用いた酵素処理法によってコロニーを形成する PDLSC を単離・培養した。本方法により得られた PDLSC は Flow-cytometry において CD90+,CD105+,CD73+,CD44+,CD146+,NG2+,CD34-,CD45-の表現型を示し、骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞への分化能を有することを確認している。本実験のプロトコールは東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得ており(#723)患者からは書面での同意を得た。Spheroid 培養には PDLSC を種々の細胞数で増殖培地(15%FBS 添加 α -MEM 培地)にて polypropylene tube 中で懸濁後、180 g 5 分遠心し pellet 培養を行った。Total RNA の回収には RNeasy mini kit (Qiagen), cDNA 合成には Reverse Transcription System (Promega)を用い、Realtime-PCR 法によって遺伝子発現の検討を行った。また autophagy の観察には LC3-II の免疫染色、および CYTO-ID autophagy detection kit (ENZO)を用いた。

【結果と考察】

Pellet にて培養を行った PDLSC は 24 時間後には tube 底面で Spheroid を形成した。Spheroid 形成後、さらに培養を行った PDLSC は 2 次元の平板上に培養した場合と比較して、幹細胞に関連する Oct4, Nanog, SIRT1 の遺伝子発現が上昇していた。また、autophagy に関連する TFEB の遺伝子発現が上昇しており、免疫染色では PDLSC spheroid で LC3-II の発現が亢進していた。PDLSC を平板上で血清、アミノ酸飢餓状態で培養すると autophagosome の形成が亢進し、同時に Oct4 の遺伝子発現が増強した。Spheroid で培養した PDLSC では autophagy が亢進しており、同時に Oct4, Nanog などの幹細胞に関連する遺伝子の発現も増強していた。また 2 次元培養であっても栄養飢餓にすることにより autophagy が誘導され、同時に Oct4 の発現が上昇することより、PDLSC の幹細胞関連遺伝子の発現調節の上流に autophagy が存在している可能性がある。

【結論】

Spheroid 培養によって PDLSC における幹細胞関連遺伝子の発現が増強する。

ヒト歯肉線維芽細胞の増殖, 接着, ERK 1/2 シグナルに対する
エムドゲイン由来合成ペプチドの影響

¹大阪歯科大学 歯周病学講座, ²大阪歯科大学 口腔病理学講座

○嘉藤弘仁¹, 田口洋一郎¹, 野口正皓¹, 山内伸浩¹, 山脇 勲¹, 富永和也², 田中 昭男², 梅田 誠¹

Effects of synthetic oligopeptide derived from enamel matrix derivative on cell proliferation, cell attachment, and activation of the signal of Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 1/2 in human gingival fibroblasts

¹Departments of Periodontology, Osaka Dental University

²Departments of Oral Pathology, Osaka Dental University

○Hirohito Kato¹, Yoichiro Taguchi¹, Masahiro Noguchi¹, Nobuhiro Yamauchi¹, Isao Yamawaki¹, Kazuya Tominaga², Akio Tanaka², Makoto Umeda¹.

【目的】

幼若ブタ歯胚から抽出されたエナメルマトリックスデリバティブ (EMD) は歯周組織再生療法に広く利用されている。しかしながら, EMD は動物由来の製剤であり, 未知の病原体やタンパクが含まれている可能性があり, 患者からの拒否感が強いという問題がある。したがって, 生物に由来しない人工的に合成可能な歯周組織製剤が必要とされているため, EMD 由来合成ペプチド (SP) を作製した。EMD は歯肉線維芽細胞に作用し, 歯周組織の創傷治癒を促進することが知られている。しかしながら, 歯周組織の初期創傷治癒に重要な役割を果たす歯肉線維芽細胞に対する SP の影響については未だ明らかになっていない。本研究はヒト歯肉線維芽細胞と SP を用いて, 初期の歯周組織創傷治癒に対する SP の効果について検討を行った。また Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 1/2 は MAPK ファミリーのひとつであり, 細胞の増殖や接着を制御する役割があるとされている。本研究では, SP がヒト歯肉線維芽細胞の ERK 1/2 リン酸化にどのような影響を及ぼすかわえスタンプロット法を用いて検討を行った。

【材料と方法】

ヒト歯肉線維芽細胞は抜去した際に歯冠周囲に付着した歯肉より採取された歯肉組織から樹立した細胞を実験に使用した。ヒト歯肉線維芽細胞に対する SP の影響としては, SP (0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml) を添加した FBS 含有 DMEM 培地でそれぞれ培養し, ヒト歯肉線維芽細胞の細胞増殖能, 接着能を検討した。また SP (0, 100 ng/ml) 添加培地をヒト歯肉線維芽細胞に作用させ, 細胞接着因子である Fibronectin mRNA, Vinculin mRNA, Collagen type1A1 mRNA の遺伝子発現を Real time PCR を用いて検討した。さらに, western blot 法を用いて ERK1/2, phosphor-ERK1/2 のタンパク発現を検討し, SP によって誘導される ERK1/2 経路の関与を検討した。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】

SP に対するヒト歯肉線維芽細胞の増殖は 10, 100 ng/ml 濃度の SP 添加 1 日, 3 日, 5 日, 7 日の培養後の評価において, 両 SP 添加群では対照群と比較して有意に高い値を示した。SP に対するヒト歯肉線維芽細胞の接着は 100 ng/ml 濃度の SP 添加 15 分, 60 分, 120 分, 240 分の培養後の評価において, 両 SP 添加群では対照群と比較して有意に高い値を示した。また 100 ng/ml 濃度の SP 添加群では Fibronectin の遺伝子発現を有意に促進し, SP はヒト歯肉線維芽細胞の ERK シグナルのリン酸化を増強した。

【考察および結論】

したがって, EMD 由来合成ペプチドである SP はヒト歯肉線維芽細胞の増殖能, 接着能, および細胞接着因子の遺伝子発現を促進することによって, 歯周組織の創傷治癒を促進し, 歯周外科治療に有用である可能性が示唆された。

細菌抗原による PCSK9 産生の誘導機構

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔保健学分野¹, 歯周診断・再建学分野²,
歯学教育研究開発学分野³, 高度口腔機能教育研究センター⁴

○横地 麻衣^{1,2}, 多部田 康一², 宮澤 春菜², 野中 由香莉², 高橋 直紀⁴, 松田 由実^{1,2},
佐藤 圭祐^{1,2}, 山田 実生^{1,2}, 伊藤 晴江³, 中島 貴子³, 山崎 和久¹

Mechanisms of PCSK9 production by bacterial antigens

Laboratory of Periodontology and Immunology, Division of Oral Science for Health Promotion¹,
Division of Periodontology², Division of Dental Educational Research Development³,
Research Center for Advanced Oral Science⁴,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Yokoji M^{1,2}, Tabeta K², Miyazawa H², Nonaka Y², Takahashi N⁴, Matsuda Y^{1,2},
Sato K^{1,2}, Yamada M^{1,2}, Ito H³, Nakajima T³, Yamazaki K¹

【研究目的】

Proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) は low-density lipoprotein receptor (LDLR) の分解を誘導するセリンプロテアーゼであり、血中一細胞内コレステロールレベルの調節において機能し、動脈硬化性疾患の発症や進行に関与することが報告されている。中等度から重度慢性歯周炎患者の血清サンプルにおいて、有意に高い濃度の PCSK9 が検出されることを我々は報告した (Miyazawa H *et al. Clin Chim Acta.* 2012)。また、マウスモデルにおいても *P. gingivalis* が PCSK9 および脂質プロファイルに影響を与えることを報告した (Miyazawa H *et al. Lipids Health Dis.* 2012)。これらのことから、PCSK9 は歯周炎と動脈硬化性疾患に共通する血中バイオロジカルマーカーとしてのみならず、両疾患の関連において機能することが示唆されるがその産生機序は明らかでない。

今回、我々は歯周病細菌及び菌体を構成する抗原分子として核酸抗原に着目し、これらに対する生体応答と PCSK9 の産生機構を解析することを目的としてマウスおよび培養細胞を用いた検討を行った。

【材料および方法】

6 週齢の C57BL/6 (wild-type) マウスおよび核酸抗原への不応答を特徴とする Unc93b1 ミュータントマウス (3d) に PBS に懸濁した *P. gingivalis* W83 株 (1×10^9 CFU)、核酸抗原である Poly(I:C) (100 μ g)、R848 (100 μ g)、CpG-DNA (100 μ g) をそれぞれ腹腔内投与し、16 時間後に安楽死後の肝臓および血清を採取した。肝臓における SAA、TNF- α 、PCSK9 の遺伝子発現を real-time PCR 法にて、血清中の PCSK9 濃度を ELISA 法にて解析した。また、肝細胞の PCSK9 産生による抗原への応答性を検討するために、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 を用いた。血清存在下で培養された HepG2 に *P. gingivalis* W83 株 (MOI 0, 10, 100) または TNF- α (0, 0.1, 1, 10 ng/mL) を添加した 4 時間後と 8 時間後の PCSK9 および LDLR の遺伝子発現を real-time PCR 法にて解析した。

【結果】

P. gingivalis 腹腔内投与後の血清中 PCSK9 濃度の上昇は wild-type マウスに比べて 3d マウスにおいて有意に減少した。wild-type マウスへの核酸抗原投与においては R848 および CpG-DNA の投与により、血清中 PCSK9 濃度は上昇したが、Poly(I:C)投与では PCSK9 産生が誘導されなかった。*P. gingivalis* およびすべての核酸抗原の投与により有意に TNF- α 、SAA-1、または IFN- α 、IFN- β の産生が誘導された。PCSK9 の血清中濃度と肝臓における遺伝子発現に相関を認めなかった。

培養 HepG2 においては、*P. gingivalis* または TNF- α の添加により PCSK9 の遺伝子発現の上昇を認めなかった。一方で TNF- α 刺激後の LDLR の遺伝子発現は濃度依存的に上昇した。

【考察と結論】

核酸抗原は PCSK9 の産生を誘導し、TLR 受容体における抗原認識経路により PCSK9 の産生誘導が制御されること、また、Poly(I:C)投与は肝臓からの TNF- α 産生を誘導するが PCSK9 産生は誘導されないことから、炎症応答が直接的に PCSK9 産生を誘導しないという二つの新しい知見が得られた。肝臓における PCSK9 の遺伝子発現と血清中 PCSK9 濃度が相関しないことから、PCSK9 産生が LDLR の発現や、血清中脂質濃度のフィードバックにより複雑に制御されていることが考えられる。

Gomisin N はヒト歯根膜由来細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制する

¹⁾徳島大学大学院医歯薬学研究部 歯科保存学分野 ²⁾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 ³⁾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¹⁾、細川育子¹⁾、進藤智²⁾、尾崎和美³⁾、松尾敬志¹⁾

The effect of Gomisin N on inflammatory cytokine production in human periodontal ligament cells

¹⁾Department of Conservative Dentistry, Tokushima University Graduate School, ²⁾JSPS Research Fellow DC2, Department of Conservative Dentistry, Tokushima University Graduate School, ³⁾Department of Oral Health Care Promotion, Tokushima University Graduate School

○ Yoshitaka Hosokawa¹⁾, Ikuko Hosokawa¹⁾, Satoru Shindo²⁾, Kazumi Ozaki³⁾, Takashi Matsuo¹⁾

【研究目的】

歯周炎は歯周病関連細菌により惹起される慢性炎症性疾患であり、細菌に対する免疫応答が歯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。特に、歯周炎病変局所で産生されるサイトカインや浸潤している炎症性細胞が歯周組織破壊の中心的役割を担っている事が示唆されている。

Gomisin Nは朝鮮五味子に含まれる生薬有効成分である。朝鮮五味子の果実は五味子という生薬であり、鎮咳去痰作用、抗炎症作用などがある事が報告されている。しかしながら、生薬有効成分であるGomisin Nの抗炎症作用に関しては不明な点が多く、歯周組織構成細胞に対する影響に関する報告はない。

本研究では、Gomisin Nが歯周組織構成細胞の一つであるヒト歯根膜由来細胞 (HPDLC) の炎症性サイトカイン産生に与える影響に焦点を絞り検討を行った。炎症性サイトカインとして炎症性骨吸収に関与するIL-6、好中球浸潤に関与するIL-8、マクロファージ浸潤に関与するCCL2、ならびにTh17細胞浸潤に関与するCCL20産生に着目した。また、Gomisin Nがサイトカイン産生に関与しているシグナル伝達経路に与える影響に関して明らかにする事も目的とし、特にMAPKsおよびAktのリン酸化に及ぼす影響に着目し実験を行った。

【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Gomisin N存在下あるいは非存在下にて24時間TNF- α 刺激を行い、IL-6, IL-8, CCL2,ならびにCCL20産生をELISA法にて、細胞内シグナル伝達 (p38 MAPK, ERK, JNK,ならびにAkt) の活性化をwestern blot法にて解析を行った。また、TNF- α 誘導サイトカイン産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにシグナル伝達経路阻害物質にて前処理後TNF- α 刺激を行い、サイトカイン産生に関してELISA法を用い検討した。

【成績】

Gomisin NはTNF- α 誘導したHPDLCのIL-6, IL-8, CCL2およびCCL20産生を濃度依存的に抑制した。また、Gomisin NはTNF- α が誘導したp38 MAPK, ERKおよびJNKのリン酸化を減弱したが、Aktのリン酸化には影響を与えなかった。TNF- α が誘導したIL-6, IL-8, CCL2産生はp38 MAPK, ERKおよびJNK阻害剤にて、CCL20産生はp38 MAPKおよびERK阻害剤にて有意に抑制された。

【考察および結論】

今回の結果より、Gomisin NはHPDLCのp38 MAPK, ERKおよびJNKのシグナル伝達経路を阻害する事により、TNF- α が誘導するIL-6, IL-8, CCL2およびCCL20産生を抑制できる事が明らかとなった。この事はGomisin Nを歯周炎病変局所に投与する事によりHPDLCのIL-6産生を抑制する事で炎症性骨吸収の抑制、IL-8, CCL2ならびにCCL20産生を減少する事により炎症性細胞浸潤が抑制され炎症局所で抗炎症作用を発揮できる可能性が示された。

口蓋粘膜の計測における CBCT の有用性

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野¹⁾
東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 部分床義歯補綴学分野²⁾

○小川 実穂¹⁾、小柳 達郎¹⁾、竹内 康雄¹⁾、片桐 さやか¹⁾、井川 貴博¹⁾、竹内 祥吾¹⁾、
関内 孝佑¹⁾、新井 祐貴²⁾、風間 龍之輔²⁾、若林 則幸²⁾、和泉 雄一¹⁾

Evaluation of palatal mucosal thickness measurements using CBCT

Department of Periodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University¹⁾
Department of Removable Partial Prosthodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University²⁾

○Miho Ogawa¹⁾, Tasturo Koyanagi¹⁾, Yasuo Takeuchi¹⁾, Sayaka Katagiri¹⁾, Takahiro Ikawa¹⁾,
Shogo Takeuchi¹⁾, Takayuki Sekiuchi¹⁾, Yuki Arai²⁾, Ryunosuke Kazama²⁾,
Noriyuki Wakabayashi²⁾, Yuichi Izumi¹⁾

〔目的〕 歯科用エックス線 CT 装置 (CBCT) を用いた診査・診断は特に硬組織に対して信頼性が高く、その有用性が多く報告されている。一方、軟組織に対しては、CBCT 画像の境界部の不明瞭さのためその応用が難しく、計測値の精密性を評価した臨床研究は少ない。近年、審美性の改善や歯周組織の安定のための歯周形成外科手術が多く適応されており、硬組織だけでなく移植片採取予定部位の口蓋粘膜の状況を術前に十分に把握しておくことが求められる。しかし刺入によって軟組織の厚みの計測を行う手法は部位によって煩雑であり、CBCT 画像上のみの計測ではその正確性の検討が困難である。本研究では、CBCT 画像と口腔内光学印象を用いて口蓋粘膜の厚みの計測を行い、実際に同部位をリーマーで刺入して得られた計測値と比較検討した。

〔材料と方法〕 歯肉退縮の改善を目的とした歯周形成外科手術実施予定者 10 名 (男性 7 名、女性 3 名、平均年齢 28.4 ± 2.0 才) を対象とした。各被験者について口腔内上顎模型を作製し、犬歯、第一小臼歯、第二小臼歯、第一大臼歯、第一大臼歯と第二大臼歯の midpoint の 5 点の口蓋側歯肉辺縁中央から、それぞれ 3mm、8mm、12mm の位置を 15 か所の計測点として定め、刺入位置と刺入方向を規制したステントを作製した。ステントはスプリント用ディスク (歯科咬合スプリント用材料: 山八歯材工業株式会社) と造影性を持ったリーマー用ストッパー (SILICONE STOPPERS: ZIPPERER) を組み合わせて作製した。ステントを装着した状態で CBCT (GALILEOS: Sirona Japan) を撮影し、得られた CBCT データと被験者の口腔内光学印象データ (CEREC Omnicam: Sirona Japan) を重ね合わせて口蓋粘膜の厚みを計測した。この手法で 1 名の検査者が 24 時間以上あけて 2 回計測した値の平均を「CT 計測値」とした。また、浸潤麻酔下でステントを装着し同部位を 2 名の検査者がリーマーを用いて刺入し、歯内療法用ステンレスメジャーにて計測した。この値の平均を「実測値」として、これら両値を Matched paired *t*-test を用いて比較した。また測定部位による影響を考慮して、部位別に CT 計測値と実測値の比較を行った。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 (第 766 号) を得て行い、患者の同意の上行った。

〔結果と考察〕 CBCT を用いた 2 回の計測値間と、2 名の検査者の刺入による実測値間にはどちらも有意差はなく、再現性のある計測方法であった。結果として、CT 計測値は実測値より平均 0.33mm 有意に小さい値を示した。CT 計測値と実測値の差は、歯肉辺縁からの距離 3mm、8mm、12mm 間で有意差は認められなかった。近遠心的位置による差は第二小臼歯で最も小さく、ついで第一小臼歯、犬歯、第一大臼歯、そして第一大臼歯と第二大臼歯の midpoint の順で大きかった。その差はそれぞれ 0.16 ± 0.42mm、0.25 ± 0.36mm、0.32 ± 0.48mm、0.42 ± 0.53mm、0.55 ± 0.63mm で、統計学的に有意な差を認めた。今回用いた CBCT のボクセルサイズが 0.25mm であることを考慮すると小臼歯部の差は最小限の範囲と言える。また、実測値の計測の際に用いたステンレスメジャーの目盛を 0.50mm 単位で読み取ったことから、口蓋の解剖学的形態により刺入が困難な第一大臼歯部で 0.50mm 前後の誤差が生じたと考えられた。

〔結論〕 本研究の結果、CBCT と口腔内光学印象を併用して用いることで、刺入による正確な計測が困難である部位においても口蓋粘膜の厚みを高い精度で予測でき、臨床検査法として十分耐えうる可能性が示唆された。

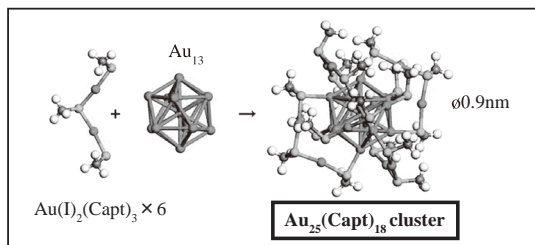
金クラスターを用いた抗菌の光線力学療法の開発
-歯周病原菌に対する抗菌効果と細胞親和性-

¹北海道大学大学院歯学研究科歯周・歯内療法学教室, ²口腔分子微生物学教室
³関西大学化学生命工学部, ⁴北海道大学病院口腔総合治療部
○宮田さほり¹, 宮治裕史¹, 佐伯 歩², 川崎英也³, 田中佐織^{1,4}, 菅谷 勉¹

Development of antimicrobial photodynamic therapy using the gold cluster;
Anti-periodontal bacterial activity and cytocompatibility

¹Department of Periodontology and Endodontology, ²Department of Oral Pathobiological Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine,
³Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University,
⁴Division for General Dentistry, Hokkaido University Hospital
○MIYATA Saori^{1*}, MIYAJI Hirofumi¹, SAEKI Ayumi², KAWASAKI Hideya³,
TANAKA Saori^{1,4}, SUGAYA Tsutomu¹

【研究目的】近年、歯周病やインプラント周囲炎の治療において抗菌の光線力学療法 (aPDT) が注目されている。aPDT は光増感剤の光励起によって発生する一重項酸素 (1O_2) の抗菌効果を利用した治療法であり、副作用や耐性菌の出現の可能性が低いという利点がある。現在歯科の aPDT では有機色素であるメチレンブルー (MB) が用いられているが、MB をはじめとする有機系光増感剤は生体毒性発現の懸念がある。近年我々は、新規の光増感剤として金原子 25 個の集合体を 18 個のカプトプリルで保護した金クラスター粒子 ($Au_{25}(Capt)_{18}$) を創製した。これは水溶性で取り扱いやすく光照射による光分解が起こらないこと、また光励起波長が 400-900nm と広域であるといった利点がある。昨年、我々は第 58 回日本歯周病学会において、金クラスターの歯科用青色 LED 光照射器による光励起によって、*S. mutans* (Sm) の増殖を抑制することを報告した。そこで本研究では、歯周病治療への応用を検討するために、金クラスターと歯科用光照射器による光励起が歯周病原菌 *A. actinomycetemcomitans* (Aa), *P. gingivalis* (Pg) の増殖に与える影響を検討した。また、金クラスターの生体細胞に対する親和性について MB と比較検討した。



【材料および方法】金クラスターは、塩化金酸とカプトプリルの混合溶液に、水素化ホウ素ナトリウム還元剤を添加して作製した。光照射器にはペンキュアー (モリタ, 1000mW/cm², 420-480nm) を使用した。金クラスターへの光照射による 1O_2 生成を、メトトレキサートを併用して蛍光強度を増大させ、UV-Vis 分光光度分析にて評価した。細菌増殖への影響を調べるために 48 ウェルプレート内で培養した Sm, Aa, Pg のそれぞれの懸濁液に金クラスター (0, 5, 50, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加してプレート底より培地に対して光照射 (0, 1min) を 1 ウェルごとに行い、培養 24 時間後の濁度を測定した。また MB との細胞親和性の差異を検討するために、NIH3T3 細胞, MC3T3-E1 細胞の懸濁液に金クラスター (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) あるいは MB (10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し 35mm マイクロディッシュにて 24 時間培養後に、細胞形態を SEM およびピンキュリン-F-アクチン蛍光二重染色にて観察した。また、96 ウェルプレートにて 8 日間培養し、2 日ごとの細胞増殖量を WST-8 アッセイにて測定した。

【成績】金クラスターへの青色 LED 光照射によって 1O_2 の生成が確認された。Sm の濁度は金クラスターの添加と光照射で減少したのに対し、Aa, Pg の濁度は金クラスターの添加のみで大きく減少し、光照射を行うとさらに有意に減少した。また金クラスターの濃度依存性に濁度の低下を示した。生体細胞を用いた評価において、金クラスター添加とコントロールに細胞形態の差を認めなかったが、MB (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加すると細胞の伸展が不良でピンキュリンの発現も少なかった。高濃度の MB (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 添加では萎縮した細胞が観察された。WST-8 アッセイの結果、MB の添加は金クラスターと比較して培養 2 日目から有意に細胞増殖を抑制した。

【考察】金クラスターと光励起により発生した 1O_2 が Sm をはじめとするグラム陽性菌だけでなく Aa や Pg などの歯周病原菌であるグラム陰性菌に対しても増殖を抑制したと考えられた。また金クラスターは良好な生体親和性を有すると考えられ、歯周病治療に対する aPDT においてより安全に利用できる可能性が示唆された。

【結論】金クラスターと青色 LED 光照射器による光励起は Aa, Pg の増殖抑制効果を示した。また金クラスターは MB に比較して良好な細胞親和性を示した。

擦過ケラチノサイトでの分子変化は歯周環境変化のバイオマーカーである

福岡歯科大学¹総合歯科学講座総合歯科学分野,²再生医学研究センター,

³総合歯科学講座高齢者歯科学分野

○瀬野 恵衣¹, 大野 純², 萩尾 佳那子¹, 山口 真広³, 山田 和彦¹, 森田 浩光¹,
米田 雅裕¹, 廣藤 卓雄¹

Exfoliative keratinocytes in gingival sulcular epithelium as a unique biomarker for pathogenesis of periodontal diseases

¹Division of General Dentistry, Department of General Dentistry, ²Research Center for Regenerative Medicine, ³

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

○Kei Seno¹, Jun Ohno², Kanako Hagio¹, Masahiro Yamaguchi³, Kazuhiko Yamada¹, Hiromitsu Morita¹,
Masahiro Yoneda¹, Takao Hirofuji¹

【目的】

歯周ポケット内上皮ケラチノサイト (KC) は歯周病の発症および進行に伴い、①細菌に由来する LPS からの外的刺激および②組織内からの炎症性細胞からの直接的な組織破壊または免疫担当細胞から産生される液性因子による刺激を受ける。これらの刺激により、KC では細胞内分子の発現が誘導されると推測される。そして、KC での発現変化を捉えることが可能となれば、KC の動態から歯周病の発症および進行程度などを把握することができると考える。しかしながら、ポケット内上皮組織の採取は侵襲が大きく、頻回採取は困難である。そこで、本研究では侵襲が少なく、頻回採取が可能な細胞診を応用し、擦過 KC を採取し、細胞内分子のタンパク発現変化を検索する。得られた結果から、擦過 KC の動態が歯周環境変化のバイオマーカーとしての可能性を検討する。

【方法】

実験デザインは、細胞診による擦過 KC とヒト KC 細胞である HaCaT 細胞を用いて細胞内分子の発現変化を検討する。

1) 擦過 KC の形態観察: 細胞採取部位は、歯周ポケット内の歯肉溝上皮とポケット外の遊離歯肉上皮とした。KC はサイトブラシによる擦過法で採取し、塗抹法および Liquid based cytology (LBC) 法で標本を作製した。細胞染色はパペニコロウ (Pap) 法を応用した。2) KC 内分子の発現変化: 免疫細胞染色法 (ICC) およびウェスタン・ブロッティング (WB) 法を応用して、以下の検討を行う。(1) LPS 刺激に対する変化: TLR 群およびその刺激に対するの適応現象に関与するオートファジー関連分子を検索する。(2) 炎症性サイトカインに対する変化: ①炎症性サイトカインに対する反応性として ICAM-1 および class II 発現を検索する。②抗炎症サイトカインに対する反応性として、CXCR3 発現を検索する。3) HaCaT 細胞による分子変化の検討: in vitro 実験により、LPS, interferon- γ (IFN- γ) および IL-4 刺激を行い、TLR 群、オートファジー関連分子、ICAM-1 および CXCR3 発現を検索する。これらの結果を (1) と (2) と比較する。

【結果・考察】

1) KC の形態学的特徴: 両 KC ともに表層型扁平上皮細胞が主体であった。しかしながら、遊離歯肉部 KC ではオレンジ G (OG) 陽性細胞が歯肉溝部 KC より多く認められた。この結果は、遊離歯肉上皮での角化傾向を示していると考えた。また、歯肉溝上皮においては、多数の単核円形細胞の浸潤が認められ、炎症性背景を呈していた。2) 歯肉溝部 KC では TLR 群の発現が認められ、同部 KC が LPS 刺激を受けていることが明らかとなった。また、オートファジー関連分子も歯肉溝部 KC で強く発現した。3) 歯肉溝部 KC では、ICAM-1 発現あるいは CXCR3 発現を認める細胞がみられた。これ結果は、ICAM-1 発現細胞は炎症性サイトカインが産生されている環境下に存在している可能性が示唆された。それに対して、CXCR3 発現細胞は抗炎症期、すなわち修復期の環境にあることが推測された。また、刺激実験により HaCaT 細胞においては、分子発現がこれらの結果を示唆するものであった。

【結論】

歯肉溝上皮からの擦過 KC の分子発現変化は、歯周環境変化のバイオマーカーになり得る可能性が示唆される。

***Porphyromonas gingivalis* 口腔感染はコラーゲン誘発関節炎モデルマウスの関節を悪化させる**

朝日大学歯学部口腔感染医療学講座歯周病学分野
○安田忠司, 佐藤 匠, 森永啓嗣, 清水雄太, 澁谷俊昭

***Porphyromonas gingivalis* oral infection exacerbates joint of collagen-induced arthritis.**

Division of Periodontology, Department of Oral Infections and Health Science Asahi University School of Dentistry
○YASUDA Tadashi, SATO Takumi, MORINAGA Keishi, SHIMIZU Yuta and SHIBUTANI Toshiaki

【目的】

歯周病は歯周病原細菌の感染によって惹起される慢性炎症であり、近年、関節リウマチ(Rheumatoid Arthritis: RA)との関連が指摘されている。RAの病因は不明な点が多いが、抗シトルリン化ペプチド抗体(Anti-Citrullinated Peptide Antibody; ACPA)やリウマトイド因子(Rheumatoid Factor; RF)などの自己抗体が産生され、さらに環境因子が作用することでRA 発症に至ると考えられている。歯周病とRAの病因の共通点として喫煙、感染症、生活習慣、ストレスなどが報告されている。このシトルリン化タンパク(CP)に対する抗体(ACPA)やRFが臨床マーカーとなっている。CPは内因性のペプチジルアルギニン・デヒミナーゼ(Peptidylarginine Deiminase :PAD)だけでなく、*Porphyromonas gingivalis*(*P.g*)が産生するPADによって生成されることによって、フィブリンなどの蛋白質をシトルリン化させることで、自己抗体産生を促し、RA の発症や進行に関与していると考えられている。RA患者における*P.g*菌感染に関しては、本菌のDNA がRA患者の血清や滑液から高頻度に検出されたこと、またRA患者では健常者と比べ*P.g*菌に対する血清IgG抗体価が高いとする報告がある。しかしながらその詳細なメカニズムは明らかでなく、歯周病とRAの関係を解明する上で重要である。そこで、本研究では、*P.g*菌感染がRAの増悪に与える影響についてRAモデルマウスとしてコラーゲン誘導性関節炎モデルマウスを用いて検討した。

【材料および方法】

RA モデルマウスとして DBA/J1 マウスの 11 週齢を用いた。実験群には *P.g* 菌 ATCC33277 株感染群ならびに対照群として CMC(Carboxy Methcellulose)投与群の 2 群を設定した。*P.g* 菌を 2.5%CMC に懸濁して 1 日おきにマウスの口腔内に直接投与した。実験開始後 45 日目に血清、足の膝関節を採取、以下の項目について検討した。*P.g*の感染を確認するために*P.g* に対する血清抗体価を ELISA にて確認した。また関節リウマチの臨床マーカーである抗 CCP 抗体価、MMP-3 量を ELISA 法にて解析した。膝関節組織の組織学的形態を評価した。

【結果】

*P.g*の血清抗体価は *P.g* 投与群において有意に増加した。Micro CT による解析では *P.g* 投与群において骨吸収像を認められた。MMP-3 産生量は *P.g* 投与群では実験群と比較し有意に増加した。膝関節組織は *P.g* 投与群では高度な炎症性細胞の浸潤、骨破壊像、を認めた。

【結論】

RA の環境因子については、以前は疫学的調査が中心であったが、近年は疾患感受性遺伝子との相互作用や抗 CCP 抗体との関連などの研究が進み、RA の発症機序に関する知見が蓄積されつつある。本研究の結果は *P.gingivalis* 感染が RA 病態の増悪を誘導することを示した。今後の課題としてさらに詳細なカスケードあるいは分子メカニズムを解明する必要がある。

本研究における動物実験は朝日大学動物実験倫理委員会の承認 (16-006) を得て行った。

タバコ煙濃縮物およびニコチンの全身投与が
マウス実験的歯周炎の病態形成に及ぼす影響

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
○久保田 実木子、柳田 学、長谷川 詩織、辰巳 真理、
山下 元三、山田 聡、北村 正博、村上 伸也

The effects of systemic administration of cigarette smoke condensate and nicotine
on periodontal tissue destruction in a periodontitis model mouse

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan

○MIKIKO KUBOTA, MANABU YANAGITA, SHIORI HASEGAWA, MARI TATSUMI,
MOTOZO YAMASHITA, SATORU YAMADA, MASAHIRO KITAMURA and SHINYA MURAKAMI

【目的】

歯周病は歯周病原性細菌により歯周組織の破壊が引き起こされる慢性炎症性疾患である。歯周病の危険因子には細菌因子だけでなく、宿主因子と環境因子があり、なかでも喫煙は主要な環境因子の一つと考えられている。喫煙者は非喫煙者と比較して歯周病の罹患率が高く、経時的にも歯槽骨吸収がより進行していくこと、喫煙者に対する歯周基本治療の効果は非喫煙者と比較して低く、喫煙は歯周組織再生に対して負の影響を及ぼすことが報告されている。ニコチンはタバコ煙に高比率で含まれており、タバコ煙含有物質のうちで最も研究されてきた物質である。喫煙が様々な生活習慣病の重要な危険因子となることの報告は多くなされているが、体内に吸収されたタバコ煙およびニコチンが歯周組織の破壊や治癒にどのように関与するのか未だ十分には明らかになっていない。本研究ではマウス実験的歯周炎モデルを作製し、タバコ煙成分(タバコ煙濃縮物及びニコチン)の全身投与が歯周組織や所属リンパ節にどのような影響を及ぼすかを解析することにより喫煙の歯周病病態形成への関与を検討した。さらに、歯槽骨治癒機転におけるニコチンの全身投与が、破壊された歯槽骨の回復に及ぼす影響を検討した。

【材料および方法】

実験動物には生後5週齢 C57BL/6 マウスを用いた。実験群としてマウス体重 20 g 当たりタバコ煙濃縮物 720 μ g を投与する群、ニコチン 16 μ g を投与する群、コントロール群として PBS を投与する群の 3 群に分けた。上記物質を 1 日 1 回 3 日連続で腹腔内投与後、全身麻酔下で上顎左側第二臼歯歯頸部に絹糸で結紮を行い結紮側とし、上顎右側第二臼歯には処置をせず非結紮側とした。絹糸結紮後 7 日目に全ての群のマウスから回収した歯周組織をマイクロ CT 撮影し、セメントエナメル境から残存歯槽骨頂の距離をはかり、歯槽骨吸収量を測定した。マイクロ CT 撮影後に上記歯周組織の切片を作製し、HE 染色および TRAP 染色を行い、光学顕微鏡で観察した。上記と同様の実験方法で、絹糸結紮後 7 日目に全ての群のマウスから顎下リンパ節を摘出したのち単核球を回収し、*Rank1* 遺伝子の発現を real-time PCR 解析で検討した。また *in vitro* の実験として、RAW264.7 細胞をタバコ煙成分存在下の RANKL 含有培地にて培養を行い、破骨細胞へ分化誘導に及ぼす影響について検討した。破骨細胞への分化度は TRAP 染色陽性細胞数を算定することで評価した。さらに、上記と同様のマウスを用い、以下の実験を行った。マウスに体重 20 g 当たりニコチン 16 μ g を投与する群とコントロールとして PBS を投与する群の 2 群に分け、腹腔内投与後、上記と同様の部位に絹糸を結紮し、結紮後 7 日目に絹糸を除去した。絹糸除去後に、再度ニコチンあるいは PBS を同様に投与し、絹糸結紮除去後 10 日目に歯周組織をマイクロ CT で観察し、歯槽骨の回復量を測定した。実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、有意水準を 5% に設定し、*p* 値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

【結果および考察】

絹糸結紮後 7 日目において、非結紮側ではいずれの群においても歯槽骨の破壊が観察されなかった。一方、結紮側では全ての群で歯槽骨の吸収が惹起され、PBS 投与群と比較してタバコ煙濃縮物あるいはニコチン投与群では歯槽骨吸収量が有意に増加した。組織学的解析により、結紮側において全ての群で炎症細胞の上皮内への浸潤が認められた。骨吸収に関与する破骨細胞を観察すると、PBS 投与群と比較してタバコ煙濃縮物あるいはニコチン投与群では結紮部位周囲歯槽骨で有意に増加した。結紮側では骨吸収に関与する *Rank1* 遺伝子発現が顎下リンパ節において認められ、特にタバコ煙濃縮物投与群では顕著であった。また、タバコ煙成分存在下で RAW264.7 細胞を分化誘導すると、非添加群と比較して TRAP 陽性細胞数は有意に増加した。絹糸除去後の歯槽骨回復実験では、PBS 投与群と比較して、ニコチン投与群において歯槽骨の回復が有意に減少した。以上の結果より、今回の実験で作製したマウス歯周炎モデルにおいて、タバコ煙成分がマウス顎下リンパ節での *Rank1* 遺伝子発現を介して絹糸結紮周囲歯槽骨表面での破骨細胞の分化誘導を促進し、歯槽骨破壊を促進する可能性が強く示唆された。さらに絹糸除去後のニコチンの全身投与は破壊された歯周組織の治癒・回復を遅滞させることが示された。

推薦理事名：村上 伸也

(本研究におけるすべての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った。

承認番号：動歯 24-012-0)

歯根膜細胞の骨芽細胞分化に対する SMPD3 の効果

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)

○北垣次郎太、宮内静香、柘本梨沙、藤原千春、山下元三、柳田学、山田聡、北村正博、村上伸也

Effects of SMPD3 on cytodifferentiation of periodontal ligament cells

Osaka University Graduate School of Dentistry, Department of Periodontology

○Jirouta Kitagaki, Shizuka Miyauchi, Risa Masumoto, Chiharu Fujihara, Motozo Yamashita, Manabu Yanagita, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura, Shinya Murakami

(目的)

スフィンゴミエリンホスホジエステラーゼ 3 (SMPD3) は、スフィンゴミエリンを加水分解し、セラミドの生成を担う酵素である。近年、SMPD3 ノックアウトマウスにおいて骨格形成の遅延を認めることや、骨形成不全症モデルマウス *fro/fro* マウスにおいて SMPD3 遺伝子の一部欠失を認めることが報告されており、SMPD3 が硬組織形成に重要な役割を担っていることが示唆されている。また、これらのマウスにおいて、象牙芽細胞や歯槽骨の石灰化の遅延も認められることから、SMPD3 が歯周組織形成においても重要な役割を担っていることが示唆されている。一方で、歯根膜細胞は歯周組織において、その恒常性維持に重要な役割を担っている。そのため、SMPD3 が歯根膜細胞の分化においても、何らかの関与をしている可能性が示唆されるが、詳細は不明なままである。そこで本研究では、SMPD3 の歯根膜細胞の骨芽細胞分化に対する役割について検討を行った。

(方法および結果)

ヒト歯根膜細胞株 (HPDL) をβ-グリセロリン酸 (5 mM) とアスコルビン酸 (50 μg/ml) を含むαMEM 培地にて長期培養した後、RNA を回収し、SMPD3 の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、HPDL の骨芽細胞分化誘導に伴い、SMPD3 の発現が上昇することが明らかとなった。次に、HPDL に SMPD3 を遺伝子導入した後、同 HPDL の骨芽細胞分化をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、SMPD3 遺伝子の導入は石灰化関連因子であるアルカリフォスファターゼ (ALPase) ならびに I 型コラーゲンの発現を上昇させた。一方で、SMPD3 阻害剤である GW4869 を HPDL に添加し、ALPase ならびに I 型コラーゲンの発現を検討したところ、GW4869 はこれらの石灰化関連因子の発現を減少させた。以上のことから、SMPD3 が歯根膜細胞の骨芽細胞分化を調節していることが明らかとなった。

そこで、SMPD3 が日本人侵襲性歯周炎の疾患関連候補遺伝子である可能性を探索するために、ゲノムワイドアプローチを行った。すなわち、大阪大学歯学部附属病院を受診し侵襲性歯周炎と診断された患者のうち、本研究に対するインフォームドコンセントが得られた患者 44 名の血液を採取し、エクソーム解析を行った (大阪大学ヒトゲノム研究承認番号 629)。侵襲性歯周炎患者の平均年齢は 32.55 歳、平均ポケット値は 4.18 mm、歯周組織の平均炎症面積 (PISA: Periodontal Inflamed Surface Area) は 1302.96 mm² で、Schei のルーラーを用いた歯槽骨の平均吸収度は 37.47% であった。遺伝子多型解析の結果、疾患群において、アミノ酸置換を認める 3 つの SNP を同定した。同定された SNP のうち、SNP rs145616324 (c.412C>T, p.Leu138Phe) において、対照群と疾患群間におけるマイナー対立遺伝子頻度 (MAF) に有意差を認めた (p 値: 0.0142)。そこで、rs145616324 を含む SMPD3 変異体を作成し、HPDL に遺伝子導入したところ、SMPD3 の活性、および ALPase ならびに I 型コラーゲンの発現上昇は認められなかった。以上のことから、rs145616324 により、SMPD3 の活性は阻害されている事が明らかとなった。

(考察)

本研究結果から、歯根膜細胞の骨芽細胞分化に伴い SMPD3 の発現が上昇すること、また、SMPD3 が歯根膜細胞の骨芽細胞分化を促進させていることが明らかとなった。ゲノムワイドアプローチを用いた日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索の結果、対照群と疾患群間において SMPD3 の SNP rs145616324 の MAF に有意差が認められることを見出した。さらに、rs145616324 を含む変異型 SMPD3 を過剰発現させても、HPDL における石灰化関連因子の発現上昇は認められなかった。以上の結果より、rs145616324 により SMPD3 活性が抑制されると、HPDL の骨芽細胞分化が認められないことが明らかとなった。本研究結果より、SMPD3 依存性の歯根膜組織の恒常性維持機構が破綻をきたすことで、日本人における侵襲性歯周炎が惹起される可能性が示唆された。

歯根膜細胞における非神経性コリン作動系の発現

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)
○三木康史、山下元三、柳田学、北村正博、村上伸也

Expression of non-neuronal cholinergic system in periodontal ligament cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, JAPAN
○Koji MIKI, Motozo YAMASHITA, Manabu YANAGITA, Masahiro KITAMURA and Shinya MURAKAMI

【目的】

アセチルコリンは中枢および末梢神経系におけるコリン作動性神経伝達物質であることが知られている。アセチルコリンは最も早く同定された神経伝達物質であり、末梢神経系では、運動神経の神経筋接合部、交感神経および副交感神経の節前線維の終末、副交感神経の節後線維の終末などのシナプスで伝達物質として働く。しかしながら近年上皮細胞、内皮細胞、免疫細胞および心臓のような哺乳動物の非神経性の細胞においてもアセチルコリン構成要素が発現しているとの報告がされている。

非神経性アセチルコリンは、限局された微小環境に存在するアセチルコリン受容体に、オートクラインあるいはパラクライン的に作用して、細胞増殖・細胞間接着・遊走・分化あるいはアポトーシスなどの微細な調節に関与していることが明らかになってきた。しかしながら歯周組織とりわけ歯根膜細胞に関して非神経性コリン作動系要素が発現しているかどうかは今まで検索されていない。そこでこれらの分子が歯根膜細胞に発現しているか否かを RT-PCR 法、免疫化学染色法および FACS 法を用いて検索した。

【方法】

1, ヒト歯根膜細胞(Lonza 社から購入した)およびマウス歯根膜細胞 (MPDL22) を 10%FCS および 60 μ g/ml カナマイシン (和光純薬) 含有 α -MEM 中で、5%CO₂、37°C、湿度 95%の気相下で培養し、RNA を RNABee™(TEL-TEST, Inc., Friedndwood, TX, USA)を用いて RNA を抽出した後、以下に示すアセチルコリン構成要素の発現を RT-PCR 法を用いて検索した。

- ・アセチルコリン合成酵素である choline acetyltransferase (ChAT)
- ・アセチルコリン合成酵素のひとつである carnitine acetyltransferase (CarAT)
- ・アセチルコリンの貯蔵に関与する vesicular acetylcholine transporter (VChT)
- ・アセチルコリンの主な分解酵素である acetylcholinesterase (AChE)
- ・アセチルコリンの分解酵素の一つである Butyrylcholinesterase (BChE)
- ・アセチルコリンの遊離や取り込みに関与しているとされる organic cation transporter (OCT)
- ・ニコチン受容体 (nAChR) およびムスカリン受容体(mAChR)

2, ヒト歯根膜細胞における mAChR、ChAT、VChT、AChE の発現に関して免疫化学染色法を用いて検索した。

3, ヒト歯根膜細胞における mAChR3 および ChAT の発現に関して FACS 法を用いて検索した。

【結果】

ヒト歯根膜細胞において ChAT、AChE、VChT、OCT、mAChR1-5 および複数の nAChR などさまざまなアセチルコリン構成要素の発現が RT-PCR 法および免疫化学染色で確認された。MPDL22 においては CarAT、VChT、BChE、OCT、mAChR1-5 および複数の nAChR の発現が RT-PCR 法により確認された。また FACS 法においては mAChR3 および ChAT に関して検索をおこなったがいずれもその発現が確認された。

【結論および考察】

歯根膜細胞は、アセチルコリンの合成・貯蔵・分解などのさまざまな非神経性コリン作動系の構成要素を有していることが明らかとなった。これらの結果は、歯根膜細胞における非神経性コリン作動系が歯周組織の恒常性維持に関与し得ることを示唆しているものと考えられる。

低出力 Nd:YAG レーザー照射がヒト歯周組織由来培養細胞に与える影響 —創傷治癒に関与する因子の検討—

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座
○大久保 美佐、村檜 悦子、石黒 一美、沼部 幸博

Effect of low-level Nd:YAG laser irradiation on human periodontal cell : Study on factors involved in wound healing

Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University
○Misa Ohkubo, Etsuko Murakashi, Hitomi Ishiguro, Yukihiro Numabe

【緒言】

歯周組織に Nd:YAG レーザーを照射する際、レーザーの照射条件を調節することで、組織や細胞に様々な影響が生じる。Nd:YAG レーザーによる低出力レーザー治療を行った臨床症例は多数報告されているが、歯周組織を構成する細胞に対する生物学的効果について不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞およびヒト歯根膜細胞に対する低出力 Nd:YAG レーザー照射が、創傷治癒に関与する因子に与える影響について検討することを目的に、細胞増殖率、細胞増殖因子の産生量の変化を検索すると共に、細胞傷害の有無を Lactase dehydrogenase (LDH) から検討を行った。

【材料と方法】

培養細胞は 4~7 継代のヒト正常歯肉線維芽細胞株 ((株) DS ファーマバイオメディカル, Gin-1) およびヒト正常歯根膜細胞株 ((株) ロンザジャパン, PDL cell) を用いた。Nd:YAG レーザー器機は歯科用パルス Nd:YAG レーザー ネオキュア 7200 を使用した。細胞に均一なレーザー照射を行うためにステントを作製してハンドピースに装着して用いた。Nd:YAG レーザー照射条件は 0.5 W (100 mJ, 5 pps)、1.0 W (200 mJ, 5 pps)、2.0 W (400 mJ, 5 pps)、照射距離 20 mm、照射時間 30 秒とした。細胞増殖率は MTT 改良法 (WST-8) に従い、レーザー照射後 3 日、5 日目に測定を行った。FGF-2、TGF- β 1 産生量は ELISA 法に従い、照射後 1 日、2 日、3 日目の培養上清を回収し測定した。LDH は照射後 3 時間、1 日、3 日目に測定を行った。

なお、統計方法は Dunnett's test を用いて、レーザー非照射群 (Cont 群) と各レーザー照射群間について検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差有りとした。

【結果】

細胞増殖率 : (Gin-1) 3 日目において Cont 群と比較して全てのレーザー照射群で有意な増加が認められ、5 日目において Cont 群と比較して 200mJ 群、400mJ 群で有意な発現の増加が認められた。(PDL cell) 3 日、5 日目共に Cont 群と比較して全てのレーザー照射群で有意な増加が認められた。

FGF-2 産生量 : (Gin-1) 1 日、2 日目において Cont 群と比較して全てのレーザー照射群で有意な発現の増加が認められた。3 日目においては Cont 群と比較して 100mJ 群で有意な発現の増加が認められた。(PDL cell) 1 日目において Cont 群と比較して 400mJ 群で有意な発現の増加が認められた。2 日目において Cont 群と比較して全てのレーザー照射群で有意な発現の増加が認められた。3 日目においては Cont 群と比較して 100mJ 群で有意な発現の増加が認められた。

TGF- β 1 産生量 : (Gin-1) 1 日、2 日目において Cont 群と比較して 200mJ 群で有意な産生量の増加が認められた。3 日目では Cont 群と比較して 100mJ 群、200mJ 群で有意な産生量の増加が認められた。(PDL cell) 1 日目では Cont 群と比較して全てのレーザー照射群で有意な産生量の増加が認められた。3 日目では Cont 群と比較して 100mJ 群、200mJ 群で有意な産生量の増加が認められた。

LDH : (Gin-1, PDL cell) Cont 群と比較して全てのレーザー照射群で有意な差は認められなかった。

【まとめ】

In vitro において、Nd:YAG レーザーを用いた低出力レーザー照射を行うことにより、細胞増殖率の増加、FGF-2、TGF- β 1 の産生量増加が認められ、臨床報告されている創傷治癒の促進にこれらの因子が関与している可能性が示唆された。また、LDH が Cont 群と全レーザー照射群との間に有意な差が認められなかったことより、本研究のレーザー照射条件は細胞膜に損傷を与えていないことが示唆された。

口腔粘膜潰瘍に対する等方性超高密度炭素を用いた炭素ローラーの影響

¹京都府立医科大学大学院 医学研究科 歯科口腔科学, ²北山武田病院歯科
³京都府立医科大学大学院 医学研究科 実験動物センター, ⁴株式会社 大木工藝
○中井 敬¹, 山本俊郎¹, 本城賢一¹, 西垣 勝¹, 大迫文重¹,
雨宮 傑¹, 坂下敦宏^{1,2}, 喜多正和³, 大木達彦⁴, 大木武彦⁴, 金村成智¹

Influence of carbon roller on oral ulcer

¹Department of Dental Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science
²Department of Dentistry, Kitayama Takeda Hospital, ³Laboratory Animal Center, Kyoto Prefectural University of
Medicine Graduate School of Medical Science, ⁴Ohgi Technological Creation Co., LTD
○NAKAI Kei¹, YAMAMOTO Toshiro¹, HONJO Ken-Ichi¹, NISHIGAKI Masaru¹, OSEKO Fumishige¹, AMEMIYA Takeshi¹,
SAKASHITA Nobuhiro^{1,2}, KITA Masakazu³, OHKI Tatsuhiko⁴, OHKI Takehiko⁴, KANAMURA Narisato¹

【研究目的】

等方性超高密度炭素は遠赤外線放射効率が高く、近年、様々な医療機器への応用が期待されている。これまでに我々は、等方性超高密度炭素を用いた炭素ローラーが歯肉線維芽細胞へ与える影響について検討、炭素ローラーは「3分間、振動刺激、温熱刺激(37℃)」の条件で歯肉線維芽細胞のFGF-2産生を増加させることを明らかにした(日歯保存誌 56, 4, 291-297, 2013)。そこで今回は、臨床応用を目指して口腔粘膜上皮細胞ならびに口腔粘膜潰瘍ラットに対する等方性超高密度炭素の影響について検討を行った。

【材料および方法】

炭素ローラーは、先端部分に等方性超高密度炭素を用いた炭素ローラー(大木工藝, 滋賀)である。まず、口腔粘膜上皮細胞であるヒト頬粘膜扁平上皮がん細胞株HO-1-N-1を24穴プレートに 1×10^4 cells/wellで播種、10%FBSおよびPenicillin-Streptomycinを添加したDMEM/F12を用い、37℃, 5%CO₂で培養した。サブコンフルエントに達した後、培養細胞に対して非接触の状態振動や温熱刺激を与えた。なお実験群は、炭素玉(炭素ローラー単独)群、炭素玉+温熱(37℃)群、炭素玉+振動群、炭素玉+温熱+振動群の4群に陰性対照群(炭素ローラー未使用)を加えた5群とし、刺激時間を3分間とした。そして、HSP27、HSP70産生に関してreal time RT-PCRとELISA法を行った。次に、生後7週齢雄SDラットに麻酔薬を投与、頬部粘膜面を生理食塩水で洗浄後、99.7%酢酸を塗布した口腔粘膜潰瘍ラットを作成した。実験群は頬部粘膜面に対して、潰瘍作製時および1, 3, 7, 14日後に炭素ローラーで炭素刺激(3分間、振動刺激, 37℃刺激)を加えた。なお、陽性対照群は潰瘍作製・未炭素刺激、陰性対照群は潰瘍未作製・未炭素刺激とした。そして、経時的に各群の頬粘膜組織を摘出、HE染色ならびに免疫染色(Ki67, HSP27, HSP70)を行った。その後、画像解析ソフトImage J (NIH, MD)を用いて免疫染色での陽性面積を計測、検討を加えた。なお本研究は、本学動物実験委員会(M25-224)で許可を受けている。

【成績】

口腔粘膜上皮細胞に対する炭素刺激は、陰性対照群と比較して炭素玉+温熱+振動群で有意にHSP27mRNA発現とHSP70mRNAの亢進を認めた。さらに、炭素玉+温熱+振動群はHSP27ならびにHSP70タンパク量の有意な増加を認めた。なお、炭素刺激は細胞活性と細胞形態に影響を与えなかった。次に、HE染色では対照群と比較して肉芽組織の増生と線維化傾向を認めた。免疫染色では、粘膜下にてKi67, HSP27, HSP70において炭素刺激で強い陽性反応を示した。そして、実験群の陽性面積の割合は、対照群と比較して1, 3, 7日後で高かった。

【考察および結論】

等方性超高密度炭素は、口腔粘膜上皮においてKi67, HSP27, HSP70に影響を与え、再生反応ならびに熱ストレスに対する防御反応を認めた。以上から、等方性超高密度炭素を用いた炭素ローラーは、口腔粘膜の創傷治癒の向上に寄与する可能性が示唆された。今後さらなる検討を予定している。

イオン徐放性 S-PRG ナノフィラーを用いた歯面の機能性コーティング

北海道大学大学院歯学研究科歯周・歯内療法学教室
○眞弓佳代子, 宮治裕史, 宮田さほり, 薮 佳奈子, 菅谷 勉

Generation of functional coatings on the tooth surface by ion-releasing S-PRG nanofillers

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

○MAYUMI Kayoko, MIYAJI Hirofumi, MIYATA Saori, SHITOMI kanako, SUGAYA Tsutomu

【研究目的】

S-PRG (Surface prereacted glassionomer) フィラーは、多機能性ガラスフィラーの表面にガラスアイオノマー相を形成した3層構造を呈しており、Fをはじめ、 Na^+ 、 BO_3^{3-} 、 Al^{3+} 、 SiO_3^{2-} 、 Sr^{2+} のイオンの徐放効果を発揮することから、再石灰化亢進、抗菌性などの特性を有している。そこで S-PRG フィラーをナノ粒子化して付着・凝集力を向上すれば、歯面に対して S-PRG フィラーの特性を持った機能性コーティングを施術できる可能性がある。本研究では、S-PRG フィラーの粒径を調整して象牙質面に対する付着性を評価するとともに、*S. mutans* を播種した場合の抗菌効果を検討した。

【材料と方法】

S-PRG フィラー分散液 (松風) を沈降法により4種類の粒子サイズ(250, 500, 1000, 3000nm)に分画した。次に、ヒト抜去歯より象牙質ブロック (5×5×1 mm) を作製し、EDTAにて表面を清掃後、各粒子サイズの分散液に3分浸漬処理、PBSにて洗浄、乾燥した。まず SEM およびレーザー顕微鏡にて処理象牙質ブロックの表面性状を観察するとともに、フィラーの象牙細管への侵入封鎖性についてスコア化した。スコアは、1; 封鎖なし, 2; 0~50%程度の封鎖, 3; 50~100%の封鎖とし、各サンプルのスコアの平均値を求め、統計処理を行った。また、分散液浸漬処理後に一部のサンプルに対し100gの力で10回表面をブラッシングした後、SEMにてフィラーの残存状態を観察した。次に抗菌性の評価として、分散液 (粒子サイズ 500nm) を用いて象牙質ブロックを同様に処理後、*S. mutans* の懸濁液を播種して24時間培養を行い SEM 観察した。また、処理象牙質ブロックからのイオン徐放量を、フッ素イオン電極ならびに誘導結合プラズマ発光分光分析装置を用いて測定した。なおヒト象牙質採取に関しては北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った(自 012-0046)。

【結果と考察】

SEM 観察の結果、象牙質に S-PRG フィラーの付着を認め、レーザー顕微鏡による観察の結果、ナノ粒子径サイズの S-PRG フィラーによって平滑なコーティング面が得られた。スコアはフィラー粒径 250, 500, 1000, 3000nm においてそれぞれ 2.7, 2.4, 1.5, 1.4 であり、フィラーの粒径が小さいほど象牙細管への侵入封鎖性が有意に向上した。ブラッシング後の SEM 観察の結果、フィラーの粒径が小さいほど残留量が多い傾向が示された。*S. mutans* 培養試験の結果、S-PRG フィラーコーティング面における *S. mutans* の付着・増殖は、コントロール(コーティング無し)に比較して強く抑制された。また、処理象牙質ブロックから F、 BO_3^{3-} 、 SiO_3^{2-} 、 Sr^{2+} のイオン徐放が確認された。以上より S-PRG フィラーの粒径は象牙質への付着性に強く影響を与えることが明らかになった。また S-PRG フィラーコーティングされた象牙質は F、 BO_3^{3-} イオンを徐放することで抗菌性を発揮する可能性が示唆された。

【結論】

S-PRG フィラーナノ粒子は象牙質に対して良好な付着性を示し、*S. mutans* に対する抗菌性を発揮した。

【謝辞】

本研究は AMED 橋渡し研究加速ネットワークプログラムの助成を受けたものです。

FGF-2 は歯根膜細胞の CD40 誘導性炎症反応を抑制する

1. 大阪大学歯学部附属病院 近未来歯科医療センター
2. 大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)
○藤原千春^{1,2}、山田 聡²、北垣次郎太²、村上伸也²

FGF-2 inhibits CD40-mediated inflammatory responses in periodontal ligament cells

1. Center for Translational Dental Research, Osaka University Dental Hospital
2. Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Chiharu Fujihara^{1,2}, Satoru Yamada², Jirouta Kitagaki², Shinya Murakami²

【目的】

CD40 は主に B 細胞や樹状細胞などの抗原提示細胞上に発現しており、炎症下において活性化した T 細胞上に発現する CD40 リガンド (CD40L) と相互作用することで、免疫・炎症の制御に関与している。歯周組織の構成細胞である歯根膜細胞においても CD40 の発現が認められることから、歯周炎において、炎症局所に浸潤した活性化 T 細胞が発現する CD40L と歯根膜細胞上の CD40 が相互作用することで、局所の炎症が調節されることが推察される。一方、塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) は、歯根膜細胞に作用し、細胞の増殖や遊走、細胞外マトリックスの産生及び、分化誘導調節など多彩な機能を誘導することで歯周組織の創傷治癒と再生を活性化する。しかしながら、FGF-2 が歯根膜細胞に発現する CD40 の発現を制御することで、歯周組織局所の炎症制御に関与するののかについては未だ不明である。そこで本研究では、CD40L-CD40 を介した歯根膜細胞の炎症調節機構における FGF-2 の関与について検討することを目的とした。

【材料と方法】

- 1) マウス歯根膜細胞株 MPDL22 における CD40 遺伝子及び同タンパク発現解析
マウス歯根膜細胞株 MPDL22 における CD40 遺伝子及び同タンパクの発現を RT-PCR 法及びフローサイトメーターを用いてそれぞれ解析した。
- 2) FGF-2 刺激による MPDL22 の CD40 遺伝子及び同タンパク発現変化の検討
MPDL22 を FGF-2 (100 ng/ml) を用いて刺激した際の CD40 の遺伝子及び同タンパク発現変化をリアルタイム PCR 法及びフローサイトメーターを用いてそれぞれ検討した。
- 3) FGF-2 が MPDL22 の CD40 誘導性 NF- κ B 活性化シグナルに及ぼす影響の検討
MPDL22 を FGF-2 (100 ng/ml) 存在下または非存在下で 2 日間培養後、CD40 リガンド (CD40L (1 μ g/ml)) で (0~30 分) 刺激した際の、細胞内 I κ B のリン酸化をウェスタンブロット法にて検討した。
- 4) MPDL22 において FGF-2 刺激が CD40 誘導性炎症性サイトカイン放出に及ぼす影響
MPDL22 を FGF-2 (100 ng/ml) 及び CD40L (1 μ g/ml) で 2 日間刺激した後、培養上清中に含まれる炎症性サイトカイン (IL-6 および TNF- α) の産生量を ELISA 法にて検討した。

【結果】

MPDL22 は恒常的に CD40 遺伝子及び同タンパクを発現していることが明らかとなった。リアルタイム PCR 及びフローサイトメーターの結果より、MPDL22 を FGF-2 刺激すると、遺伝子及びタンパクレベルで CD40 の発現が抑制されることが明らかとなった。ウェスタンブロットの結果より、FGF-2 非存在下では MPDL22 を CD40L で刺激すると、I κ B の細胞内リン酸化が促進された。一方で、FGF-2 存在下では、MPDL22 に CD40L 刺激を加えると I κ B のリン酸化が抑制された。ELISA 法の結果より、MPDL22 を CD40L で刺激すると、CD40 シグナルによって炎症性サイトカイン IL-6 及び TNF- α の産生が上昇した。一方、MPDL22 を FGF-2 と CD40L で共刺激すると、CD40L を用いて MPDL22 を単独刺激した場合と比較して、IL-6 及び TNF- α の MPDL22 からの産生量が有意に減少した。

【結論と考察】

歯周組織の炎症状態において、FGF-2 は、歯根膜細胞の CD40 の発現を低下させることで、NF- κ B を介した CD40 誘導性炎症性サイトカイン産生を抑制する働きがあることが示された。FGF-2 は歯根膜細胞における CD40 誘導性の炎症を抑制することで、組織の創傷治癒を促し、歯周組織の再生を誘導する可能性があると考えられる。

R-spondin2 が未分化なヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化に及ぼす影響

¹九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、²九州大学病院 歯内治療科、
³九州大学病院 口腔総合診療科、⁴九州大学大学院歯学研究院 OBT 研究センター

○園田麻衣¹、長谷川大学²、和田尚久³、吉田晋一郎²、御手洗裕美¹、友清淳²、濱野さゆり^{1,4}、前田英史^{1,2}

The effect of R-spondin2 on fibroblastic differentiation of immature human periodontal ligament cells

¹Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University, ²Department of Endodontology, Kyushu University Hospital, ³Division of General Dentistry, Kyushu University Hospital, ⁴OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University

○Mai Sonoda¹, Daigaku Hasegawa², Naohisa Wada³, Shinichirou Yoshida², Hiromi Mitarai¹, Atsushi Tomokiyo², Sayuri Hamano^{1,4}, Hidefumi Maeda^{1,2}

【研究目的】

分泌タンパク R-spondin ファミリー (RSPOs) は、Wnt と協調して Wnt シグナル伝達経路を活性化し、発生過程の様々な現象や疾患の発症に関与していることが知られている。私たちは、最近 Wnt シグナルがヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化を抑制し、一方で歯根膜線維形成に対しては促進することを報告した(Hasegawa et al., J Cell Physiol, 2015)。しかしながら、RSPOs がこの過程において担う役割については明らかになっていない。そこで本研究では、RSPOs の一つであり、靭帯や腱由来の疾患との関連が報告されている R-spondin2 (RSPO2) に着目し、RSPO2 が未分化なヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

本研究に同意が得られた患者の抜去歯牙より、採取した初代培養ヒト歯根膜細胞 HPDLC-3D(22 歳女性)、-3R(24 歳男性)ならびに当研究室にて樹立した未分化なヒト歯根膜細胞株(2-14)を用いた。

1. 歯根膜組織および HPDLC における RSPO2 発現解析

SD ラット(5 週齢、雄性)の下顎臼歯部の組織切片を用いて、抗 RSPO2 抗体による免疫組織化学的染色を行った。

また、HPDLC ならびに 2-14 における RSPO2 およびそのレセプター(LGR4, LGR5, LGR6)の遺伝子発現を半定量的 RT-PCR 法にて検討した。

2. 細胞伸展刺激が HPDLC における RSPO2 発現に及ぼす影響

細胞伸展装置 STB-140 (STREX 社)を用いて、HPDLC に 0 および 10%の伸展刺激を 24 時間負荷し、RSPO2 ならびにそのレセプターの遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて比較検討した。

3. RSPO2 刺激が 2-14 における歯根膜線維関連因子の遺伝子発現に及ぼす影響

リコンビナント RSPO2 タンパク (0, 1, 10, 100 ng/ml) 含有培地にて 2-14 を 7 日間培養し、歯根膜線維関連因子の遺伝子の発現を定量的 RT-PCR 法にて比較検討した。

【結果】

- (1) 抗 RSPO2 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った結果、歯根膜組織全体に陽性反応が認められた。また、HPDLC および 2-14 において、RSPO2 ならびにそのレセプターである LGR4 および LGR5 の遺伝子発現が認められた。一方、LGR6 の発現はほとんど認められなかった。
- (2) 10%の伸展刺激を 24 時間負荷した HPDLC において RSPO2 の遺伝子発現が有意に上昇した。また、LGR5 の発現も有意に上昇し、LGR6 の発現も検出されるようになった。一方、LGR4 の発現には有意な変化は認められなかった。
- (3) 100 ng/ml の RSPO2 タンパクを添加した培地にて培養した 2-14 において、歯根膜線維関連因子(Collagen-1, -3, -12, PLAP-1, Scleraxis, Tenomodulin)の遺伝子発現が有意に上昇した。

【考察】

以上の結果より、RSPO2 は咬合力が負荷される歯根膜組織において発現が促進し、未分化なヒト歯根膜細胞の線維芽細胞分化を促進する可能性が示唆された。

【結論】

(1)RSPO2 は歯根膜組織に発現する。また、HPDLC は RSPO2 およびそのレセプター遺伝子を発現する。(2) 細胞伸展刺激により HPDLC における RSPO2 ならびに LGR5、LGR6 の遺伝子発現が上昇する。(3)RSPO2 は未分化なヒト歯根膜細胞における歯根膜線維関連因子の遺伝子発現を促進する。

高出力赤色 LED がヒト歯肉上皮細胞に及ぼす影響

¹⁾ 大阪歯科大学 歯周病学講座, ²⁾ 上海交通大学 口腔医学院 歯周病科
○田口洋一郎¹⁾, 劉大力²⁾, 山内伸浩¹⁾, 山脇勲¹⁾, 野口正皓¹⁾, 嘉藤弘仁¹⁾, 周蓉²⁾, 梅田誠¹⁾

Effects of a high-power, red light-emitting diode on human gingival epithelial cells.

¹⁾ Department of Periodontology, Osaka Dental University, Osaka, Japan
²⁾ Department of Periodontology, School of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China
○Yoichiro Taguchi¹⁾, Dali Liu²⁾, Nobuhiro Yamauchi¹⁾, Isao Yamawaki¹⁾,
Masahiro Noguchi¹⁾, Hirohito Kato¹⁾, Rong Shu²⁾, Makoto Umeda¹⁾

【目的】

近年, 慢性歯周炎やインプラント周囲炎に対する治療法として抗菌光線力学療法が注目され, Er: YAG レーザーを中心に臨床応用されている。その中で Light emitting diode (以下, LED と略す) は本邦においては未承認であるが, 光増感剤を併用することで活性酸素を歯周ポケット内に発生させ嫌気性菌である歯周病原細菌を減少させ, また臨床試験でプラークを抑制することは様々な研究で報告されている。しかし, 歯周ポケット内では細菌感染と宿主応答が混在している状態で, 宿主である歯肉上皮細胞に対する LED および光増感剤の影響, そして LED 照射下での歯周病原細菌感染の歯肉上皮細胞に及ぼす影響を調べることは非常に重要なことである。

本研究では従来から市販されている光増感剤 Methylene Blue と Toluidine Blue を, そして光源として高出力赤色 LED を用いてヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) に及ぼす影響について検索した。

【材料と方法】

HGEC は大阪大学 村上伸也教授より供与されたヒト歯肉不死化細胞株 epi4 を用い, 光源は (株) モリタ製作所より供与された LedEngin 社製高出力赤色 LED (中心波長: 650nm) を用いて行なった。1 穴あたり 2.5×10^4 個の細胞を 24 穴細胞培養プレート上に播種し, 平均 4 J/cm^2 と 8 J/cm^2 の 2 種の照射エネルギーで 24 および 72 時間培養後の細胞増殖を Promega 社製 CellTiter-Blue 試薬を用いて計測した。その結果を基に至適照射エネルギーを策定し, ナカライテスク社製 Methylene Blue と WALDECK GMBH & CO KG 社製 Toluidine Blue を各々 0.01, 0.1, $1 \mu\text{g/mL}$ を培養液中に溶解させ, 策定した条件下で照射し細胞増殖を計測した。

細菌感染に対する LED の効果を調べるために, MOI: 50, 100 の 2 種の濃度の *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 (*P. gingivalis*) の菌液と, 上記実験で示された結果を基に Methylene Blue 各々 0.01, $0.1 \mu\text{g/mL}$ を培養液中に溶解させ, HGEC に刺激した。平均 4 J/cm^2 の照射エネルギーで LED 照射し 3 時間後の炎症性サイトカイン IL-1 β , IL-6, IL-8 の発現と, 炎症惹起に関係するシグナル伝達経路として NF- κ B のリン酸化について Western blot 法にて解析した。

【結果および考察】

LED 単体での HGEC に及ぼす影響では, LED 照射群のほうが非照射群に比べて有意に高い細胞増殖を示すことが分かった。そのうえで至適照射エネルギーを平均 4 J/cm^2 とした。光増感剤 Methylene Blue と Toluidine Blue を含めた影響では Methylene Blue を用い LED 照射を行うと細胞増殖が促進されるが, Toluidine Blue を用い LED 照射を行うと逆に細胞増殖を阻害することが認められた。

次に LED の細菌感染後の HGEC に及ぼす影響であるが, 測定したすべての炎症性サイトカインの発現で光増感剤 Methylene Blue 非投与群では *P. gingivalis* の感染の有無にかかわらず, LED の照射によって増加することが認められた。また Methylene Blue 投与群では, 炎症性サイトカイン IL-1 β , IL-6 の発現で LED 照射によって有意に減少させていることが認められたが, IL-8 の発現では認められなかった。また Methylene Blue を $0.1 \mu\text{g/mL}$ 投与した群のほうが $0.01 \mu\text{g/mL}$ 投与した群に比べて IL-1 β , IL-6 の発現を大きく減少させることが認められた。

NF- κ B のリン酸化の解析においても, Methylene Blue を $0.1 \mu\text{g/mL}$ 投与した群で LED 照射で NF- κ B のリン酸化の減退が認められ, 上記の炎症性サイトカイン IL-1 β , IL-6 の発現の減少につながるものだと示唆される。

【結論】

光増感剤を併用することで活性酸素を歯周ポケット内に発生させ嫌気性菌である歯周病原細菌を減少させることが様々な研究で認められるが, 今回の研究で歯周ポケット内において宿主である歯肉上皮細胞にも影響を及ぼし, 高出力赤色 LED の照射によって炎症性サイトカインの発現を減少させることが示唆される。

酸化グラフェンと近赤外線光を用いた光熱的抗菌治療法の開発

北海道大学大学院歯学研究科 歯周・歯内療法学教室
○長尾敬志, 宮治裕史, 西田絵利香, 加藤昭人, 菅谷 勉

Development of photothermal antimicrobial therapy using graphene oxide and near infrared light irradiation
Department of Periodontology and Endodontology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine
○Keishi NAGAO, Hirofumi MIYAJI, Erika NISHIDA, Akihito KATO, Tsutomu SUGAYA

【研究目的】

酸化グラフェン (GO) は厚さ 1nm 以下の炭素の単層ナノシートで、表面の酸素官能基の存在により親水性で良好な分散性を示し、活性酸素の発生による細菌抑制も報告され、抗菌性ナノマテリアルとして生体への応用が期待されている。当教室ではこれまでに GO ナノシートを用いてヒト象牙質表面に抗菌性 GO 被膜を形成することに成功した (西田ら, 第 137 回日本歯科保存学会)。一方で GO は近赤外線 (NIR) を吸収して発熱することが知られている。そこで、GO と NIR 光を用いて歯周治療や根管治療における抗菌的光熱療法を開発できる可能性がある。本研究ではヒト歯根象牙質表面を GO 被膜でコーティングして NIR 照射による表面温度変化と抗菌性について検討した。

【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製した GO (nanoGRAX (R), 三菱ガス化学) を蒸留水で希釈し、GO 分散液 (濃度 1 および 10 μ g/mL) を用意した。ヒト歯牙象牙質ブロックを作製し、3%EDTA (スメアクリン, 日本歯科薬品) にて清掃後、各 GO 分散液に浸漬してコーティングを行った。NIR 照射装置 (波長 800~1000nm; LA-100IR, 林時計工業) を用いて、GO コーティング象牙質ブロックに NIR を照射した。照射距離を 1, 2, 3cm, 照射時間を 0, 10, 20, 30 秒間に設定した。照射直後の表面温度をサーモグラフィにて測定した。次に、GO コーティング象牙質ブロックに *S. mutans* を播種後、NIR を照射し、LIVE/DEAD 染色にて細菌の生死を観察した。また、NIR 照射後に 5 時間培養を行い SEM にて観察を行った。なおヒト象牙質採取に関しては北海道大学病院自主臨床研究審査委員会の承認を得て行った (自 012-0046)。

【結果と考察】

NIR 照射後の温度は、GO コーティングに用いた GO 分散液濃度が高いほど上昇する傾向がみられた。また、NIR の照射距離と時間に依存して温度が上昇した。距離 1cm, 照射時間 30 秒の照射条件において、コントロール (未処理), 1 μ g/mLGO, 10 μ g/mLGO においてそれぞれ 39.9 $^{\circ}$ C, 47.1 $^{\circ}$ C, 58.5 $^{\circ}$ Cであり、有意差を認めた。LIVE/DEAD 染色の結果、GO コーティングと NIR 照射によって死菌が多く観察され、照射後培養しても *S. mutans* の菌体はほとんど観察されなかった。以上より、NIR を吸収した GO 被膜が発熱することで *S. mutans* が殺菌された可能性が示唆された。

【結論】

GO 被膜コーティングしたヒト歯根象牙質に NIR 照射を行うことで、表面温度が上昇し、抗菌効果が認められた。

【謝辞】

本研究は JSPS 科研費 JP25463210, および AMED 橋渡し研究加速ネットワークプログラムの助成を受けたものです。

インプラント周囲炎に対して再生療法にて対応した症例 12ヶ月予後

大阪歯科大学病院 歯周治療科
○白井 義英

A clinical case of regenerative therapy for peri-implantitis. 12 months follow-up

Osaka Dental University Hospital Periodontology
○Yoshihide SHIRAI

[緒言] 口腔機能回復治療としてインプラントを選択する症例が増加してきている。また、治療後の歯周組織に炎症と咬合性外傷を誘発しないことが重要となる。しかし、インプラントの普及とともに症例選択の誤りや術後の管理等の問題から生じるインプラント周囲粘膜炎やインプラント周囲炎の発生頻度が高くなってきている。また、インプラント周囲炎の診断においても歯周病の診断に準じた検査・診断を正確に行い、それぞれの症状に応じて治療法も様々な方法が試みられてきている。そこで、今回は再生療法にて対応した症例について報告する。

[症例] 2015年6月4日に大阪歯科大学病院歯周治療科へインプラント周囲からの出血と排膿を主訴として来院された78才の女性。全身既往歴に特記事項なし。初診時の状態は、インプラント3本ともにBOP(+)、PDは最も深いところで9mmであった。X線診査では1/3~1/2程度の骨吸収が認められた。また、全て連結された補綴物が装着されており動揺は認められなかった。

[経過] 一般的な歯周外科と同様に、まず、最初に検査・診断を行い、BOP(+)がみられた部位については患者自身による縁上プラークコントロールの大切さを十分に説明し理解してもらう。患者によるプラークコントロールの実施と併行して術者による縁下プラークコントロールも行い、全顎にわたりBOP(-)となる様に外科処置前に口腔内環境を改善しておく。その後、再生療法を行う事を患者に説明し同意が得られた後に施術を行った。施術はインプラント汚染部の徹底したデブライメントの後に、エムドゲンと β -TCPを併用しての再生療法を行った。

[予後] 術後5日間は抗菌薬を服用、また、術後から毎食後に含嗽を実施してもらう。術後3週目に抜糸を実施するまでは週に1回の来院にて専門的器械清掃を実施、また、術後2週目からは軟毛ブラシにてブラッシングも再開してもらう。その後は、月1回のペースで来院してもらい術部における変化が無いかを厳しくチェックする。術前のPDが9mmであったところが術後12ヶ月では3mmに改善していた。同部のBOP(-)が術後から12ヶ月まで維持されており術後の経過も良好であったと思われる。X線的には術前と比較してインプラント周辺の歯槽骨に不透過性が増大しているのが確認出来た。

[考察] 今回の患者の様に、加齢に伴いプラークコントロールが難しくなっていくと思われる点から、インプラントを完全に被覆しての回復より、治癒後に患者自身での清掃性を考慮して審美的に支障が出ない状況下での再生量にとどめる事も重要だと思われた。インプラント周囲炎に対する処置には非外科的・外科的な各種対応が試みられてきているが歯周基本治療を確実にを行い、縁上プラークコントロールの確立に努め、長期にわたりBOP(-)が維持されることで良好な結果が得られたものと思われる。

[結論] インプラント患者の増加とともにインプラント周囲炎の対応については、初めにインプラント周囲炎の基本治療としての1.メカニカルな原因菌の除去、2.殺菌剤の応用、3.全身のもしくは局所的な抗菌薬投与により、原因菌の徹底的除去が最優先される。その後再評価により、外科手術実施の有無を含めて外科手術法の選択がなされるべきである。術後は、患者の状況に応じた定期的なメンテナンスプログラムを立案し、残存歯ならびにインプラントについてはサポートイブペリオドンタルセラピー(SPT)を行う事が重要である。さらに、患者の年齢・機能面・プラークコントロールレベル等を十分に考慮して最良の方法にて治療に当たる事が必要と思われる。

クルクミンの LPS 誘発性 MMP-9 発現抑制

北海道医療大学病院歯科衛生部¹,
北海道医療大学歯学部 保健衛生学分野², 臨床口腔病理学分野³
○虎谷斉子^{1,2}, 植原 治², 平木大地³, 森川哲郎³, 安彦善裕³, 千葉逸朗²

Curcumin inhibits LPS-induced MMP-9 expression

Division of Dental Hygiene, Health Sciences University of Hokkaido Hospital¹,
Division of Disease Control and Molecular Epidemiology², Division of Oral Medicine and Pathology³,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
○Seiko Toraya^{1,2}, Osamu Uehara², Daichi Hiraki³, Tetsuro Morikawa³, Yoshihiro Abiko³, Itsuo Chiba²

【研究目的】

クルクミン (curcumin) は、ウコンの黄色色素から得ることができるクルクミノイド (ポリフェノールの一種) である。その代表的な作用として抗炎症作用や抗酸化作用、抗腫瘍作用などが知られている。一方、歯周ポケットには、*P. gingivalis*をはじめとする多くのグラム陰性菌が存在している。それらの菌体の細胞壁外膜には、Lipopolysaccharide (LPS) が存在している。歯肉上皮細胞などの歯周組織を構成する細胞は、LPSなどの菌体成分や菌体外産物からさまざまな刺激を受ける。刺激に対して歯肉上皮細胞は反応し、炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテナーゼ (MMP) を分泌することにより、細胞外基質が分解され歯周組織の破壊が進行する。生体でのMMP活性は、遺伝子発現、不活性な潜在型MMP (ProMMP) の活性化、インヒビター (TIMP) による活性阻害の順に制御されている。本研究では、歯肉上皮細胞を*P. gingivalis*由来LPSとcurcuminで長期間刺激し、MMP-9およびTIMP-1の変化について検証した。

【材料および方法】

ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEP, CELLnTEC 社より購入) を培養した。添加試薬は、*P. gingivalis* ATCC33277 由来LPS (WAKO, 1 µg/ml, DDWで溶解) およびcurcumin (SIGMA-Aldrich, 0, 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100 µM, DMSOで溶解) を用いた。Curcumin

Day	3	6	9	12	15	18
Control	DDW	DMSO	DDW	DMSO	DDW	DMSO
LPS	LPS	DMSO	LPS	DMSO	LPS	DMSO
Curcumin	DDW	CUR	DDW	CUR	DDW	CUR
LPS+Curcumin	LPS	CUR	LPS	CUR	LPS	CUR

のHGEPの増殖活性への影響をWST-1試薬で測定した。LPS, curcumin, 超純水 (DDW) およびDMSOの添加と培地の交換を表の示すように3日間毎に行い、21日間長期間培養した (Takai R et al., J Periodontal Res. 2015)。培養細胞よりRNAを抽出した後、 $\Delta\Delta Cq$ 法を用いたreal-time PCRによりMMP-9およびTIMP-1のmRNA発現解析を行った。また、3日間毎に培養した上清を回収し、ELISA法を用いて培養上清中のMMP-9およびTIMP-1を測定した。

【結果および考察】

細胞増殖活性は、72時間後curcumin 10 µMおよび100 µMに増殖活性の低下が認められた。遺伝子発現の変化は、LPSを添加することにより、MMP-9の発現上昇が認められた。Curcuminで長期間刺激することにより、MMP-9の発現低下が認められたが ($p < 0.05$)、TIMP-1の変化は認められなかった。一方、curcuminを添加することにより、MMP-9の発現低下が認められた。ELISA法についても同様の結果が認められた。

Curcuminは、*P. gingivalis*由来LPSによるMMP-9の上昇を抑制することから歯周疾患の改善に有益であると推察された。

【結論】

P. gingivalis 由来のLPS長期間刺激により誘発したMMP-9は、curcuminにより抑制されることが示唆された。

十勝産ワイン絞り粕 (パミス) の歯周病予防効果

北海道医療大学歯学部 臨床口腔病理学分野¹, 保健衛生学分野²,
日本製粉株式会社イノベーションセンター³, 池田町ブドウ・ブドウ酒研究所⁴
○清水 綾¹, 植原 治², 嶋津京子³, 大淵秀樹⁴, 間 和彦³, 安彦善裕¹

Preventive Effect of Tokachi Wine Pomace on Periodontal Disease
Division of Oral Medicine and Pathology¹, Division of Disease Control and Molecular Epidemiology²,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido,
Innovation Center, Nippon Flour Mills Co., Ltd.³, Tokachi-Ikeda Research Institute for Viticulture and Enology⁴
○Aya Shimizu¹, Osamu Uehara², Kyoko Shimazu³, Hideki Obuchi⁴, Kazuhiko Aida³, Yoshihiro Abiko¹

【研究目的】

ワイン絞り粕 (パミス) は、ワイン製造過程において、ブドウを圧搾することで排出されるものである。パミスは本邦で大量に発生しており、産業廃棄物として処理するには多額の費用を要するが、現在、この有効な利用方法は、堆肥や飼料に限られている。近年、歯科領域では、*S. mutans*をはじめとした腐病原細菌に対する抗菌作用のあることが報告されているが、歯周病原細菌に対する抗菌効果や歯周組織に対する影響に関する報告はほとんどみられない。本研究では、歯周病原細菌および歯肉上皮細胞に対するパミスとその主成分であるオレアノール酸の効果を解析し、さらにパミス含有のタブレットを試作し、ヒト唾液中の歯周病細菌の数、抗菌ペプチドの発現量への影響を検討した。

【材料および方法】

①歯周病原性細菌に対する影響：パミスエキスGR, OA (日本製粉) およびオレアノール酸 (Sigma-Aldrich) をDMSOに混合し、遠心後上清をろ過滅菌して試料とした。*A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis*および*P. intermedia*の標準株を37℃嫌気条件下、BHI培地で培養した。菌液を試料に添加し、48時間後の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

②歯肉上皮細胞に対する影響：正常ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEP) を各試料の希釈培地で培養後、増殖活性をWST-1試薬で測定した。増殖活性に影響のない濃度で、培養液に試料を添加および非添加を3日間毎に繰り返し、1ヶ月間培養を行った。培養サンプルからRNAを抽出し、SurePrint G3 Human GE 8x60K Ver.3.0 (Agilent) を使用してマイクロアレイ解析を行った。上清を回収し、マイクロアレイで遺伝子増加を認めたタンパクをELISA法で定量した。

③試作パミスエキスタブレットの効果：治療中の口腔疾患のない健康な40～60歳までの教職員を対象とし、倫理委員会承認後、被験者には研究目的を十分に説明し、書面による同意を得たうえで実施した。パミスタブレット (30%パミス含有) およびプラセボタブレットを用い、4日間、就寝前の歯磨き後に3粒を摂取させた。試験は二重盲検クロスオーバー法で行った。それぞれのタブレットの試験開始前および終了後、昼食の2時間後に無味ガムを2分間咀嚼させ、唾液全量を採取した。唾液の上清を回収してマイクロアレイで遺伝子増加を認めたタンパクをELISA法で定量した。採取した唾液からDNAを抽出しreal-time PCRを用いて唾液中の菌量の変化を測定した。

【結果および考察】

①歯周病原性細菌に対する影響：MICにより、パミスエキスGR, OA, オレアノール酸ともに本研究で使用した歯周病原菌の増殖を抑制することが確認された。

②歯肉上皮細胞に対する影響：細胞に対しての至適濃度を定めるために、異なった濃度のパミスとオレアノール酸を使用し、細胞増殖活性を観察したところ、パミス粉末250 µg/ml, オレアノール酸16 µg/mlの濃度で細胞増殖活性が低くなることが確認された。このデータに基づきパミス63 µg/ml, オレアノール酸4 µg/ml, コントロールをそれぞれ3日間おきに細胞に添加し1ヶ月間培養を行い、マイクロアレイ解析を行った。その結果、パミスエキスOAとオレアノール酸添加によりPPBPの発現上昇が認められた。real-time PCRとELISA法でも同様に、PPBPの発現上昇が確認された。

③試作パミスエキスタブレットの効果：*in vitro*での研究により、PPBPの歯周病原菌増殖抑制作用が示されたため、タブレットを摂取した際の唾液中のPPBPと歯周病原菌の数を測定した。その結果、パミスタブレットにより唾液中のPPBP量は顕著に増加し、*P. gingivalis*および*P. intermedia*の菌量の低下が確認された。

【結論】

パミスは歯周病原細菌の増殖を抑制し、口腔上皮から産生されるPPBPの分泌を促進することが明らかとなった。

アスタキサンチンの LPS 誘発性 MMPs 発現抑制

北海道医療大学歯学部 臨床口腔病理学分野¹, 保健衛生学分野²,
北海道医療大学病院歯科衛生部³, 北海道医療大学個性医療科学センター眼科学系⁴
○平木大地¹, 植原 治², 原田文也¹, 虎谷斉子^{2,3}, 北市伸義³, 安彦善裕¹

Astaxanthin inhibits LPS-induced MMPs expression

Division of Oral Medicine and Pathology¹, Division of Disease Control and Molecular Epidemiology², School of Dentistry,
Division of Dental Hygiene, Health Sciences University of Hokkaido Hospital³,
Division of Ophthalmology, Institute of Personalized Medical Science⁴, Health Sciences University of Hokkaido
○Daichi Hiraki¹, Osamu Uehara², Fumiya Harada¹, Seiko Toraya^{2,3}, Nobuyoshi Kitaichi⁴, Yoshihiro Abiko¹

【研究目的】

アスタキサンチン (AST) は、ヘマトコッカス藻などの藻類、カニ、鮭などから得ることができるカロテノイド色素である。その代表的な作用として眼疾患の改善、皮膚の老化予防、がん、糖尿病、高血圧、肥満、動脈硬化などの進行や発症の抑制に効果が有することが報告されている。一方、歯周ポケットには、*P. gingivalis*をはじめとする多くのグラム陰性菌が存在している。それらの細胞壁外膜には、Lipopolysaccharide (LPS) が存在している。歯肉上皮細胞などの歯周組織を構成する細胞は、LPSなどの菌体成分や菌体外産物からさまざまな刺激を受ける。刺激に対して歯肉上皮細胞は反応し、炎症性サイトカインやマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMPs) を分泌することにより、細胞外基質が分解され歯周組織の破壊が進行する。細胞を*E. coli*由来LPSで刺激するとMMPsの発現が上昇する報告やASTがMMPsの発現を抑制する報告があることから (Zhang XS et al., Brain Res. 2015; Kishimoto Y et al., Eur J Nutr. 2010)、本研究ではこれまでに報告のないASTによる歯肉上皮細胞の*P. gingivalis*由来LPS誘発性MMPsの変化について検討した。

【材料および方法】

ヒト歯肉上皮前駆細胞 (HGEP CELLnTEC 社より購入) をepithelial culture mediumにて培養した。添加試薬は、*P. gingivalis* ATCC33277由来LPS (WAKO, 1 µg/ml, DDWで溶解) およびAST (SIGMA-Aldrich, 0, 0.1, 1.0, 10, 100 µg/ml, DMSOで溶解) を用いた。ASTのHGEPの増殖活性への影響をWST-1試薬で測定した。表のようにLPS, AST, 超純水 (DDW) およびDMSOの添加と培地の交換を3日間毎に行い、21日間培養した。

Day	3	6	9	12	15	18
Control	DDW	DMSO	DDW	DMSO	DDW	DMSO
LPS	LPS	DMSO	LPS	DMSO	LPS	DMSO
AST	DDW	AST	DDW	AST	DDW	AST
LPS+AST	LPS	AST	LPS	AST	LPS	AST

影響をWST-1試薬で測定した。表のようにLPS, AST, 超純水 (DDW) およびDMSOの添加と培地の交換を3日間毎に行い、21日間培養した。

培養細胞よりRNAを抽出した後、逆転写を行った。得られたcDNAを用いて、 $\Delta\Delta Cq$ 法を用いた定量的PCRによりMMP-2およびMMP-9のmRNA発現解析を行った。また、3日間毎に培養した上清を回収し、ELISA法を用いて培養上清中のMMP-2およびMMP-9を定量した。

【結果および考察】

ASTの細胞増殖活性は、72時間後AST 10 µg/mlおよび100 µg/mlに増殖活性の低下が認められた。遺伝子発現の変化は、LPSを添加することにより、MMP-9の発現上昇が認められた。ASTを添加することにより、MMP-9の発現低下が認められたが ($p < 0.05$)、MMP-2の顕著な変化は認められなかった。ELISA法についても同様の結果が認められた。

口腔内で、歯周組織の炎症が上昇するとMMP-2は変化しないがMMP-9は上昇し、歯周治療後MMP-2は変化しないが、MMP-9は減少することも報告されている (Chen L et al., J Periodontol. 2012)。本研究でASTがLPS誘発性MMP-9の上昇を抑制することが明らかとなったことから、歯周疾患の改善にASTが有益であると推察された。

【結論】

P. gingivalis 由来の LPS 刺激により上昇した MMP-9 は、AST により抑制されることが示唆された。

咬耗面積・接触面積・咬合接触点による咬耗症例の解析

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科保存修復学分野
○神農泰生、大原直子、松崎久美子、高橋 圭、山路公造、吉山昌弘

Analysis of attrition cases by attrition area, contact area and occlusal contact point
Department of Operative Dentistry, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical
Sciences, Okayama University
○Yasuo Shinno, Naoko Ohara, Kumiko Matsuzaki, Kei Takahashi, Kozo Yamaji, Masahiro Yoshiyama

【研究目的】

咬耗、摩耗、酸蝕に代表される Tooth Wear は、う蝕、歯周病に次ぐ第3の歯科疾患として注目され、欧米では臨床的研究が進展しつつある。超高齢化社会が間近にせまった我が国では罹患率が高くなることが予想され、治療ならびに進行予防法などの対応が求められることが予想される。そこで今回我々は、咬耗面積・接触面積・咬合接触点に焦点を絞って咬耗症例を解析し、その傾向を明らかにすることを目的として研究を行った。

【材料および方法】

岡山大学病院を受診し咬耗を認める患者のうち、インフォームドコンセントの得られた3名を対象とした。各被験者の印象採得を行い石膏模型を作製した。模型を対象にデジタルマイクロスコープ (VH-5500, KEYENCE) を用いてすべての歯の咬耗部をマッピングし、ソフトウェアにて咬耗面積を測定した。また、同時に咬合採得もを行い、BiteEye (GC) を用いて咬合接触点数、接触面積を測定した。

【結果】

Case1 は平均咬耗面積 5.46 mm²、咬合接触点 37、接触面積 28.1 mm²であった。Case2 は平均咬耗面積 12.91 mm²、咬合接触点 28、接触面積 22.7 mm²であった。Case3 は平均咬耗面積 20.89 mm²、咬合接触点 26、接触面積 79.5 mm²であった。それぞれの症例で歯種、左右別の詳細なデータは Case1 では右側の前歯 8.02 mm²、小白歯 5.85 mm²、大白歯 3.66 mm²、咬合接触点 19、接触面積 7.6 mm²であり、左側は前歯 5.50 mm²、小白歯 1.34 mm²、大白歯 4.83 mm²、咬合接触点 18、接触面積 20.5 mm²であった。Case2 では右側の前歯 11.16 mm²、小白歯 8.90 mm²、大白歯 14.28 mm²、咬合接触点 13、接触面積 11.4 mm²であり、左側は前歯 17.87 mm²、小白歯 5.96 mm²、大白歯 20.23 mm²、咬合接触点 15、接触面積 11.3 mm²であった。Case3 では右側の前歯 11.80 mm²、小白歯 10.52 mm²、大白歯 74.64 mm²、咬合接触点 5、接触面積 22.9 mm²であり、左側は前歯 11.16 mm²、小白歯 14.12 mm²、大白歯 37.31 mm²、咬合接触点 21、接触面積 56.6 mm²であった。

【考察】

平均咬耗面積から考えて、咬耗の進行度は Case1 が最も軽度で、Case2、Case3 の順で進行しているといえる。

それぞれの症例における歯種別の咬耗面積に着目すると、前歯に関しては最大値が概ね 11 mm²程度と考えられ、比較的早期に最大値に達すると思われる。一方、小白歯と大白歯に関して、大白歯がある程度咬耗が進行すると急激に咬耗面積が増大するのに対して、小白歯は比較的緩やかに増大していることがうかがえる。また、Case1 では前歯が最も咬耗面積が大きいのにに対して、Case2 では大白歯と小白歯がほぼ同等、Case3 では大白歯が最も大きくなっている。このことから、大白歯の咬耗面積が前歯を上回る事が咬耗症進行程度の分岐点といえる可能性があり、そこを超えると大白歯の咬耗面積が著しく増大するものと思われる。また、小白歯は Case3 でも物理的な最大値と思われる値までは増大しておらず、3症例で正の相関がうかがわれる為、咬耗症進行度合いの指標に用いる事が出来る可能性がある。

また、中心咬合位での咬合接触点数と咬合接触面積に着目すると、咬耗が進行するにつれて接触点数は減少、接触面積は増大する傾向にあると思われる。咬耗症は進行するにつれて点での咬合接触から面での咬合接触へと変遷していく事が示唆される。

【結論】

以上のことから、咬耗症は接触面が点から面へと移行していき、進行の評価基準として、各歯種、特に小白歯の咬耗面積が有効である可能性が示唆された。

レーザー援用バイオミメティック法によるレジン表面へのリン酸カルシウムの析出

¹北海道大学大学院歯学研究科 歯周・歯内療法学教室, ²産業技術総合研究所 ナノ材料研究部門

³北海道大学病院 口腔総合治療部, ⁴北海道大学大学院歯学研究科 歯科保存学教室

○西田絵利香¹, 宮治裕史¹, A. Joseph NATHANAEL², 中村真紀², 大矢根綾子²,

田中佐織^{1,3}, 田中 享⁴, 加藤昭人¹, 菅谷 勉¹

Deposition of calcium phosphate to the resin surface by laser-assisted biomimetic process

¹Department of Periodontology and Endodontology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine,

²Nanomaterials Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST),

³Division for General Dentistry, Hokkaido University Hospital,

⁴Department of Restorative Dentistry, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine

○Erika NISHIDA¹, Hirofumi MIYAJI¹, A. Joseph NATHANAEL², Maki NAKAMURA², Ayako OYANE²,

Saori TANAKA^{1,3}, Toru TANAKA⁴, Akihito KATO¹, Tsutomu SUGAYA¹

<研究目的>

コンポジットレジン (CR) は優れた歯質接着性, 機械的強度, 賦形性, 操作性から, 歯肉縁下カリエス, 外部吸収, 穿孔部の封鎖, 逆根管充填等への応用が期待されるが, 生体適合性が不十分で組織再生能が無いという欠点がある. 近年我々は, 低融点基材にも適用可能なリン酸カルシウム (CaP) 形成技術として, レーザー援用バイオミメティック法を開発した. 本法によれば, CaP 過飽和溶液中に設置された基材上に非集光のパルスレーザー光を数十分照射するだけで, 骨や歯質の成分である CaP を基材表面の目的の部位に形成できる. したがって本法を用いて CR 表面に CaP を形成できれば, 生体内での適合性が飛躍的に向上する可能性がある. 本研究では, CR 表面への CaP の析出について, CR の種類とレーザー波長を変えて検討した.

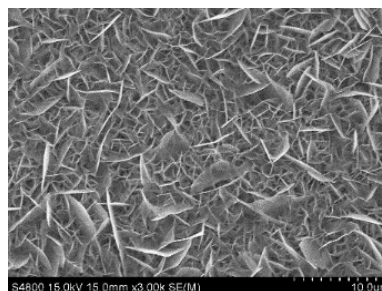
<材料および方法>

CR には UniFil Flow (UF, 色調 A3 ; GC), Beautiful flow plus (BF, 色調 A3 および CV ; 松風) を用い, 直径 6mm, 厚さ 1mm の型枠に CR を流し込み, 表面をストリップスにて圧接しながら光重合処理をしてディスク状サンプル 3 種 (UFA3, BFCV, BFA3) を作製した. 各ディスクを CaP 過飽和水溶液中に浸漬し, Nd:YAG レーザー (30 Hz) の第 3 高調波 (355nm, UV 光), あるいは第 2 高調波 (532nm, VIS 光) を集光せずに, 4W/cm² で 30 分照射した. 照射後の CR 表面を SEM にて形態観察し, EDX にて元素分析を行った.

<結果と考察>

SEM 観察の結果, UV レーザー照射ではすべてのサンプルで析出物は認められなかった. 一方, VIS レーザー照射ではすべての群で析出物が観察された. UFA3 では析出物がわずかにしか観察されなかったのに対し, BFCV, BFA3 ではマイクロスケールの鱗片状の析出物が多く認められ, 特に BFA3 では表面の 70%程度が析出物に被覆されたケースも観察された. EDX 分析の結果, これらの析出物からは Ca と P を検出した.

以上より, VIS レーザー照射された CR 表面に CaP が析出したことが示唆された. また CR の種類によってレーザー光の吸収性や化学組成が異なることで, CaP 析出量が増加するものと考えられた.



SEM image of BFA3 surface
after laser irradiation

<結論>

レーザー援用バイオミメティック法によって CR 表面に CaP を析出させることができ, 波長 532nm の VIS レーザー照射の方が 355nm の UV レーザー照射よりも効果的であった.

<謝辞>

本研究は JSPS 科研費 JP15F15331, JP16K11822, JP16K11538 の助成を受けたものです.

新規開所した特別養護老人ホームで実施した
摂食嚥下障害スクリーニングに併せて実施した口腔内の調査報告

¹宇治徳洲会病院 歯科口腔外科, ²京都府立医科大学大学院 医学研究科 歯科口腔科学

³京丹後市国民健康保険直営 宇川診療所

○中村 亨^{1,2}, 山本俊郎², 張 端良^{2,3}, 金村成智²

The intraoral survey and the dysphagia screening in the special elderly nursing home which opened newly

¹ Department of Oral Surgery, Uji-Tokushukai Hospital

²Department of Dental Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

³Ukawa Clinic Managed by Kyotango City National Health Insurance

○NAKAMURA Toru^{1,2}, YAMAMOTO Toshiro², CHO Tanryo^{2,3}, KANAMURA Narisato²

【はじめに】

当院は病床数 486 床の急性期病院であり、歯科口腔外科が配置されている。2015 年 4 月、当院に近接した敷地に特別養護老人ホーム（長期入居が 80 床、短期入所が 20 床）が開所された。入居者に対する窒息事故の予防と口腔衛生状態の評価のために、これに先立ち、摂食嚥下障害スクリーニングに併せて、口腔内の状態を調査したので報告する。

【対象及び方法】

2015 年 10 月、対象者は長期入所者 60 名（平均年齢 83.4 歳、男性 21 人、女性 39 人、要介護度 3 が 18 名、要介護度 4 が 27 名、要介護度 5 が 15 名、）のうち、希望者 50 名とした。歯科医師、歯科衛生士、摂食・嚥下障害看護認定看護師によって、摂食嚥下障害のスクリーニング（MWST: modified water swallow test:改訂水飲みテスト）とともに、う蝕治療および歯周病治療の必要性の有無、口腔衛生状態の評価、義歯の状態を調査、これら結果を入所者と家族に発信した。

【結果】

残存歯牙を有する者は 37 名、うち 24 名にう蝕治療、37 名に歯周病治療の必要性を認めた。口腔衛生状態については口腔、義歯、舌のいずれかに 48 名が汚れを認めた。そして 32 名が口臭を有し、7 名が口腔乾燥を認めた。47 名に MWST を行い、評点 1, 2, 5 が 0 名、評点 3 が 27 名、評点 4 が 20 名であった。評点 3 の利用者のうち、15 名が臼歯部の咬合に問題があった。なお、同時に行った頸部聴診では、28 名に残留音を認めた。

【考察】

特別養護老人ホーム新規開所時、窒息事故の予防との口腔衛生状態の評価のために、食形態の調整を目的とし摂食嚥下障害スクリーニングならびに口腔ケアの依頼があった。その際、簡易的にう蝕および歯周疾患について調査を実施した結果、歯科治療の必要がある患者が多数認められた。

このことより、摂食嚥下状態の評価や口腔ケアの依頼であっても、歯科疾患調査の必要性が示唆された。また特別養護老人ホーム新規開所時、歯科および摂食嚥下関連職種が連携し可及的に早い段階での介入が健全な経口摂取維持に重要であると考えられた。

微細炭酸カルシウム配合歯磨剤の硬質レジン上の着色除去能の評価

株式会社ジーシー
○高山和人, 船橋英利, 熊谷知弘

Evaluation of Stain Removal Efficacy of Toothpaste Containing Fine Calcium Carbonate on the Hard Resin

GC CORPORATION
○Kazuto Takayama, Hidetoshi Funabashi, Tomohiro Kumagai

【緒言】

ルシエロ歯みがきペースト ホワイト (RW, ジーシー) は美白歯磨剤であり, 清掃剤として微細な炭酸カルシウムを高濃度に配合したペーストである。本研究では, RW の硬質レジンに対する着色除去能の評価を目的とした。

【材料及び方法】

硬質レジン (ディアーナ エナメル E58, ジーシー) を Bovine Serum Albumin 水溶液 (タンパク質), 緑茶+コーヒー+紅茶 (ポリフェノール), クエン酸鉄 (III) アンモニウム水溶液 (金属イオン) に交互に浸漬することで着色し, 試料とした。歯磨剤 (RW, ルシエロペースト (RP, ジーシー), ルシエロ歯みがきペースト B (RB, ジーシー)) を 5 倍希釈し, ルシエロ歯ブラシ B-20M ピセラ (ジーシー) を用いて, 1. 5N 荷重, 200 回往復の条件でブラッシングし, 着色除去試験を行った。RP, RB は低研磨性であることを特長としている。対照群は, 蒸留水での評価とした。試験前後の試料の測色を行い, 色差 (ΔE^*ab) を算出し, Tukey 法で統計解析を行った (n=3)。また, 着色除去効果への影響を評価するため, 各歯磨剤を蒸留水で洗浄, 遠心分離を行うことで粒子を抽出し, 電子顕微鏡 (SEM) での観察を行った。

【結果および考察】

各試料の ΔE^*ab (標準偏差) は, RW で 31.80 (1.90), RP で 10.58 (4.71), RB で 13.36 (6.60), 蒸留水で 10.34 (5.44) であった。Tukey 法による解析の結果, RW でブラッシングした試料は, 他の試料よりも ΔE^*ab が有意に大きいことが確認された (P<0.05)。これより, RW は硬質レジン上の着色を効率よく除去できることが示唆された。SEM 画像より, 粒子の大きさは RP<RW<RB であった。

RP, RB は低研磨性を特長とした歯磨剤であるため, RW も硬質レジンに対して低研磨性であることが期待される。一方で, RW は粒子の配合量が高いことから高い着色除去能を示したと考えられる。

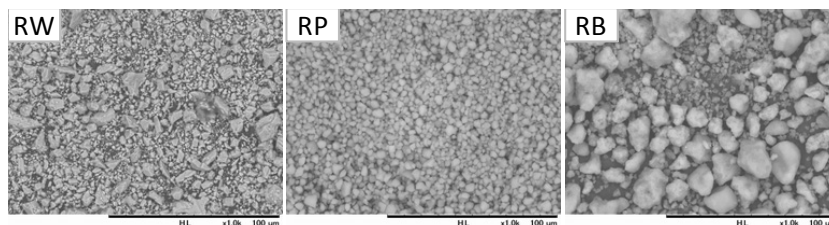


Fig. 2 SEM observation of insoluble particles

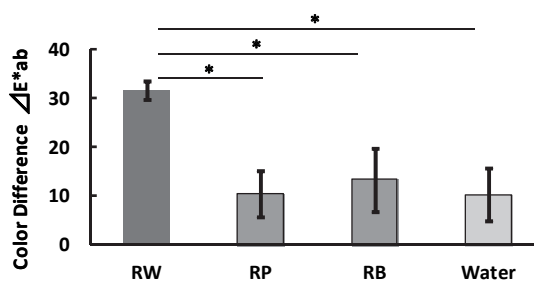


Fig. 1 Stain removal efficacy

【結論】

ルシエロ歯みがきペースト ホワイトは硬質レジン上の着色を効率よく除去できることが確認された。また, 配合されている粒子が小さいことから, 低侵襲性も期待される。

寒天粒子の噴射加工による歯科用純チタン表面の清掃法に関する検討

^{*1} 東京都市大学工学部機械工学科, ^{*2} 東北大学大学院歯学研究科
○白石智久^{*1}, 佐藤秀明^{*1}, 真柳弦^{*2}, 島内英俊^{*2}, 石幡浩志^{*2}, 佐々木啓一^{*2}

**Development of cleaning method for
pure titanium by agar particle blasting**
^{*1} Tokyo City University Faculty of Engineering,
^{*2} Tohoku University Graduate School of Dentistry
○Tomohisa Shiraishi^{*1}, Hideaki Sato^{*1}, Gen Mayanagi^{*2},
Hidetoshi Shimauchi^{*2}, Hiroshi Ishihata^{*2}, Keiichi Sasaki^{*2}

【研究目的】

歯科用インプラントの普及が進む一方で、インプラント周囲炎による口腔機能障害およびインプラントの短命化が問題となっている。その予防にはセルフケアや Professional Mechanical Tooth Cleaning (PMTC)による口腔内バイオフィルムの除去が欠かせない。しかし、スケーラー等による物理的清掃法によってインプラントの表面粗さが増加した場合、結果として口腔内バイオフィルム付着を招くこともあり、積極的なスケーリング・ルートプレーニングは躊躇われる。そこで、インプラントの長期的マネジメントに対し、PMTCの方法を検討する余地がある。

インプラント表面に対する清掃法として、これまで炭酸カルシウム粒子(CaCO₃)などが使用されてきたが、粒子衝突により、インプラント表面粗さの増加が懸念される。そこで本研究は、インプラント表面に悪影響を及ぼさない噴射清掃法を確立するため、新たに寒天粒子を用いた噴射清掃法を考案し、その実用化の可能性について検討した。

【材料および方法】

JIS2種の純チタンを、平面研削盤により、約10×15mmの長方形に研削加工し、試験片とした。試験面にC砥粒の耐水研磨紙を用いて研磨し、初期粗さがRa=0.05μm以下になるように調整した。試験面に模擬汚れとして油性ペンを塗布したのち、塗布面に対しWA砥粒(二軸平均径30.0μm)、CaCO₃粒子(二軸平均径93.8μm)、グリシン粒子(二軸平均径195.4μm)および寒天粒子(二軸平均径103.4μm)の4群を噴射した。噴射後、模擬汚れの清掃状態を観察、さらに表面粗さおよび光沢度を測定した。

【結果】

WA砥粒およびCaCO₃粒子を噴射した試料表面の模擬汚れはほぼ除去されていたが、微細な擦過痕に因るとみられる梨地状に変化し、表面粗さが増加した(Fig.1)。グリシン粒子および寒天粒子を噴射した試料表面では、大部分の模擬汚れが除去されながらも辺縁の一部に汚れが残った。一方で清掃後においても試料表面の光沢は維持され、表面粗さの増加は僅かであった。

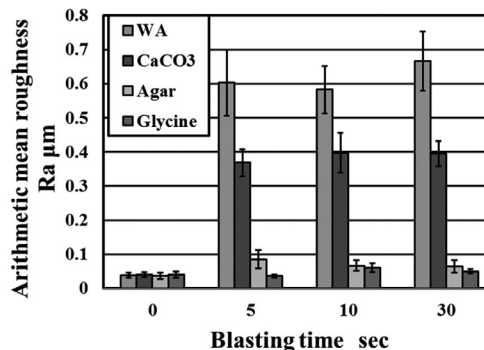


Fig.1 Relation between surface roughness Ra and blasting time

【考察および結論】

全ての粒子群において模擬汚れの除去が達成され、噴射清掃の効果が確認できた一方で、WA群およびCaCO₃群の試験片の表面粗さが増加した。これらの粒子はインプラント体の表面粗さを大きくする可能性があると思われる。一方、グリシン群および寒天群は表面粗さの増加量は僅かであり、表面性状に及ぼす影響は小さいと思われる。

寒天は、印象材の原料として利用されてきた一方、噴射清掃の砥粒として着目されなかった。CaCO₃粒子に比べ硬度が低いため、インプラント表面性状に及ぼす影響は小さいと思われる。インプラント体表面の滑沢さに影響を及ぼさない、グリシンおよび寒天粒子による噴射清掃法は、インプラントのPMTCにおいて大変有効であると考えられる。

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5報

奥羽大学歯学部口腔衛生学講座¹⁾、歯科保存学講座²⁾、薬理学講座³⁾
○車田文雄¹⁾、廣瀬公治¹⁾、佐藤穂子²⁾、佐々木重夫²⁾、木村裕一²⁾、長岡正博³⁾

Oral hygiene guidance for Tax office staff (compared with JASDF staff) V
Dept. Preventive Dentistry and Conservative Dentistry and Pharmacologic Dentistry
OHU University School of Dentistry
○Fumio KURUMADA, Kimiharu HIROSE, Yasuko SATOH, Shigeo SASAKI,
Yuichi KIMURA, Masahiro NAGAOKA

【 緒 言 】

先の第144回本学会を含め、4年前から当学会にて、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一連の口腔衛生について発表してきた。前々回は、齲蝕誘発性の抑止に関係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た結果について発表し、前回は、ストレス及び疲労に効果があるといわれる3大栄養素の摂取、すなわち「タンパク質・ビタミン・ミネラル」に着目し、歯垢形成食品および歯垢非形成食品と関連させて食餌指導を実施した結果を発表した。そこで今回は、「食事バランスガイド」を活用し、両者の食べた料理でわかる個人の食事バランスについて、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(某月の昼食)
- ② 福島県内の某税務署における献立(某月の昼食)

「食事バランスガイド」は、健康で豊かな食生活の実現を目的に策定された「食生活指針」(平成12年3月)を具体的に行動に結びつけるものとして、平成17年6月に農林水産省と厚生労働省により決定されたもので、上記献立より、データを分析した結果、主食、主菜に関しては、両者共に積極的に摂取されていたが、副菜、牛乳・乳製品、果物においては、自衛隊の方が税務署より積極的に摂取されていた。ゆえに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。

【 考察および結論 】

1. 主食(ごはん、パン、麺類)においては、両者共に積極的に食事の中心となす炭水化物を取り入れられていたことにより、他の料理をつなぐ役割が推進されていることがうかがわれた。
2. 副菜(野菜、きのこ、いも、豆類)では、両者ともメニューの違いはあるが、積極的に取り入れられていた、しかし、きのこ・海藻は、自衛隊が税務署より積極的に補給されており、常駐の栄養士(隊員)の献立作成が功を奏しているものとする。
3. 主菜(肉、魚、卵、大豆料理)においては、主食と同様に両者とも積極的に摂取されており、主食と並んで食事の中心的な位置を占めるタンパク質の取り入れが推進されていることがうかがわれた。
4. 牛乳・乳製品では、自衛隊では毎回必ず牛乳が出されており、乳製品摂取の習慣化がうかがわれた。
5. 果物においては、自衛隊では季節(旬)の果物を推奨提供しており、税務署より優っていたが、これも副菜同様、常駐栄養士(隊員)の献立作成が功を奏しているものとする。
6. すなわち、自衛隊では栄養士の資格を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。また、メニューが充実されており、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、前々回および前回同様、齲蝕活動性の低下につながることを示唆された。

無髄神経欠損モデルラットにおける島皮質局所回路の変化

¹⁾ 日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座

²⁾ 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

³⁾ 日本大学歯学部薬理学講座

⁴⁾ 日本大学歯学部総合歯学研究所顎口腔機能研究部門

○村山 翔太¹, 武市 収^{1,2}, 清水 康平^{1,2}, 小林 真之^{3,4}, 小木曾 文内^{1,2}

Changes of insular cortical local circuits in the model rats that receive ablation of unmyelinated primary sensory fibers by capsaicin injection.

Department of Endodontics, School of Dentistry, Nihon University¹

Division of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University²

Department of pharmacology, School of Dentistry, Nihon University³

Division of Oral and Craniomaxillofacial Research, Nihon University⁴

○S. Murayama¹, O. Takeichi^{1,2}, K. Shimizu^{1,2}, M. Kobayashi^{3,4} and B. Ogiso^{1,2}

【研究目的】

口腔内の侵害情報は末梢の自由神経終末で受容され、一次求心性線維である有髄の A δ 線維と無髄の C 線維を介して三叉神経脊髄路核に存在する二次ニューロンへ投射する。しかし、A δ と C 線維が高次脳で処理される機構、例えば各々の入力が大脳辺縁系の局所回路にてシナプスの可塑的な変化を起こしうるか否か、またその機序については不明である。そこで、A δ と C 線維いずれかを欠損させたモデルが極めて有用であると考え、本研究を企画した。

【材料および方法】

我々は、生後 1-2 日齢の Wistar 系ラットの頸部に capsaicin (CAP, 100mg/kg) を皮下投与し、TRP チャネルが発現する無髄神経を部分的に欠損したラットを作製し、口腔感覚を受容する島皮質でのシナプス伝達の変化を調べた。CAP 投与 20-25 日後に CAP 処置群および sham 群のラットから急性脳スライス標本を作製した。なお三叉神経節の CGRP 発現を免疫組織化学的手法により定量化することで、TRP チャネル発現線維の欠損度を評価した。顆粒島皮質ならびに不全顆粒島皮質Ⅱ,Ⅲ層に存在するニューロンからホールセル・パッチクランプ記録を行い、脱分極性パルスに対する発火特性から興奮性ニューロン (Pyr) および GABA 作動性 fast-spiking ニューロン (FSN) を同定した。その後 TTX (1 μ M)ならびに CNQX (20 μ M)の灌流投与し、miniature IPSC (mIPSC)を記録した。

【結果】

Sham 群と比較して、CAP 処置群の Pyr と FSN から記録される mIPSC の振幅の減少がみられた。一方、Pyr および FSN ともに、mIPSC の発生頻度に有意な差は認められなかった。

【考察】

結果から、CAP 処置による無髄神経の脱落によって、島皮質 Pyr と FSN に対する抑制性入力が減弱することが明らかとなった。また、神経伝達物質の感受性の低下に起因するシナプス後的な変化によるものであることが結論づけられた。一次求心性無髄神経の入力の減少が大脳皮質の神経回路を再編させる可能性が示唆された。

(承認番号: 第 AP15D040 号)

岡山大学病院歯科医師臨床研修における歯科保存治療の経験症例の分析

岡山大学病院 総合歯科

○塩津 範子, 野崎 高儀, 渡邊 翔, 小野 早和子

武田 宏明, 桑山 香織, 河野 隆幸, 鳥井 康弘

Case analysis of the conservative treatments in post-graduate clinical training in Okayama University Hospital.

Comprehensive Dental Clinic, Okayama University Hospital

○SHIOTSU Noriko, NOZAKI Takayoshi, WATANABE Sho, ONO Sawako,

TAKETA Hiroaki, KUWAYAMA Kaori, KONO Takayuki, TORII Yasuhiro

【緒言】

歯科医師臨床研修が必修化された平成 18 年度からこれまでの 10 年間で、延べ 537 名の研修歯科医が岡山大学病院 歯科医師臨床研修を修了している。岡山大学病院の研修プログラムは 1 年間当院で研修を行う単独型プログラム、4 ヶ月当院で研修を行った後に 8 ヶ月協力施設で研修を行う複合型 A プログラム、8 ヶ月当院で研修を行った後に 4 ヶ月協力施設で研修を行う複合型 B プログラムがあり、それぞれの施設において自ら処置を経験した場合に指導歯科医がケース管理表の該当項目に検印を行うことになっている。研修歯科医が修得すべき一般的な歯科治療の中で、歯科保存治療の比重は大きい。そこで、我々は岡山大学病院で歯科医師臨床研修を行った研修歯科医が 1 年間で経験した歯科保存治療での研修内容を検印数によって調査、分析を行ったので報告する。

【方法】

平成 18 年度から平成 27 年度の 10 年間に岡山大学病院で歯科医師臨床研修を行った研修歯科医 537 名を対象とした。岡山大学病院で用いているケース管理表の検印数をもとに、歯科保存治療（修復治療：4 項目、歯周治療：8 項目、歯内治療：5 項目）および保険請求（岡山大学病院では診療件数にあたる）について、年度、プログラムごとに研修歯科医が経験した処置項目の平均経験数を求めた。なお、経験数の算出にあたっては自験のみとした。

【結果】

平均保険請求数は 153 件であった。経験数が多い項目は、修復治療では軟化象牙質除去およびレジン充填でそれぞれ平均経験回数は 26 回、30 回であった。歯周治療では口腔衛生指導および歯肉縁上のスケーリングで、それぞれ平均経験回数は 37 回、51 回であった。歯内治療では根管拡大で、平均経験数は 25 回であった。経験数が少ない項目は歯周外科処置、湾曲根管での根管治療および外科的歯内療法で、それぞれ平均経験回数は 1.7 回、0.3 回、1.0 回であった。

1 年間大学病院で研修を行う単独型プログラムと比べ、複合型プログラムでは大半の項目において平均経験数が多かった。特に複合型 A プログラムの方が、複合型 B プログラムよりも多くの経験をしていた。単独型プログラムでは複合型プログラムに比較して、歯周治療の口腔衛生指導、歯肉縁上スケーリングおよび SPT の経験数が多かった。

年度が進むにしたがい、プログラムにより違いはあるもののいずれの項目も経験数およびそれぞれの標準偏差はやや減少傾向であった。

【まとめ】

過去 10 年間に於いて、研修歯科医は基本的な保存領域の歯科処置をほぼ経験できていると思われる。中でも、歯肉縁上のスケーリングは特に経験回数が多い。しかし、歯周外科処置、湾曲根管での根管治療および外科的歯内療法等の日常臨床でも症例数がさほど多くないと思われる高度な歯科治療について経験できている研修歯科医はかなり少なかった。

また、1 年間大学病院で研修を行う単独型プログラムよりも複合型プログラムの方が大半の項目において経験数が多く、これは経験できる診療件数の違いによるものと思われる。単独型プログラムで多かった項目である口腔衛生指導、歯肉縁上スケーリングおよび SPT については、それらの治療を主に担当する歯科衛生士が在籍している協力型施設と違い、当院では歯科医師および研修歯科医のみで全ての処置を行うためと考えられる。

平成 18 年度から平成 27 年度になるにしたがい、経験数はやや減少傾向ではあるものの、標準偏差も減少傾向であることから近年の研修歯科医は比較的均一な研修を行っていると思われた。

口腔細菌感染症を制御する機能性食品の探索

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野¹,
岡山大学病院 新医療研究開発センター², 岡山大学病院 歯周科³

○伊東昌洋¹, 大久保圭祐¹, 伊東 孝², 河田有祐³, 塩田康祥³, 大森一弘³, 山本直史³, 高柴正悟¹

Search for Functional Food to Control Oral Microbial Infections

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

² Center for Innovative Clinical Medicine, and ³ Department of Periodontics and Endodontics,
Okayama University Hospital

○ITO Masahiro¹, OKUBO Keisuke³, ITO Takashi², KAWATA Yusuke³, SHIOTA Yasuyoshi¹,
OMORI Kazuhiro³, YAMAMOTO Tadashi³, TAKASHIBA Shogo¹

【目的】

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

本研究では、上記の課題解決を目的に、口腔内細菌の繁殖を抑制する機能性を持った食品の開発を検討した。様々な食品に抗菌性があることは既知の事実であるが、高齢者向けに介護食等に添加しやすいパウダー形態の食品は実用化されておらず、また口腔内環境に近い条件での有効性評価が必要である。そこで、本研究では着目した食品の抗菌作用をスクリーニングし、抗菌作用を有した食品についてさらにバイオフィームへの影響を調べた。

【材料および方法】

マッシュルーム、ニンニク、パセリ、タイム、ショウガのパウダーのそれぞれ0.5gを、5mLのPBSに溶解させて室温で1時間放置した。その後、遠心分離によって上清を採取し、100mg/mLの抽出液として設定した。陽性対照は塩化セチルピリジニウム溶液（終濃度0.05%）を、陰性対照はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用いた。

a. 各食品における口腔内細菌（浮遊細菌）への抗菌性のスクリーニング

各サンプル抽出液の終濃度が10mg/mL, 1mg/mL, 100μg/mLになるように *Streptococcus mutans* (1×10^6 cfu/mL) を播種した液体培地に加え、1時間ごとに濁度を計測した（波長660nm）。

b. 抗菌効果を有した食品の口腔内細菌（バイオフィーム）への影響

12-well マイクロプレートに *S. mutans* (1×10^6 cfu/mL) を播種した液体培地を37°Cで9時間静置培養し、バイオフィームを形成させた。その後、サンプル抽出液の終濃度が10mg/mL, 1mg/mL, 100μg/mLになるように調整した液体培地を4mLに加え、再び37°Cで9時間静置培養した。生菌数の定量は、ATP活性を測定して行った。

c. 抗菌効果を有した食品の口腔内細菌（浮遊細菌）への影響

浮遊細菌への影響を観察した。サンプル抽出液の終濃度が10mg/mL, 5mg/mL, 1mg/mLになるように *S. mutans* (1×10^6 cfu/mL) を播種した液体培地に加え、37°Cで12時間静置培養した。その後、各培養液をナノパーコレーター（孔径0.6μm）で濾過し、電界放射型走査性電子顕微鏡を用いて加速電圧15kVの条件下で観察した。

【結果】

マッシュルーム、ニンニク、パセリはその濃度に関わらず、陰性対照と同様の増殖曲線を描いた。タイムは100μg/mLでは陰性対照と同様であったが、1mg/mLと10mg/mLでは増殖抑制を示す傾向があった。ショウガは10mg/mLのみ増殖抑制を示す傾向があった。また、タイムは10mg/mLのみバイオフィームに対して陰性対照よりも蛍光強度を低下させた。SEM観察では、5mg/mL以上の濃度で菌体形態が変化していた。

【考察と結論】

ニンニク、パセリ、ショウガは、それぞれアリシン、βピネン、ジンゲロンといった抗菌作用性の物質を含有している。しかし、アリシンは不安定であり、βピネンとジンゲロンは水に難溶性である点から、今回の方法ではいずれも有効濃度が得られずに十分な増殖抑制を示さなかったと推測される。また、タイムにはチモールが含まれており、これは抗菌性が高く、構造が比較的単純で水に可溶なため、有効濃度が得られたと考えられる。

以上から、タイムパウダーは口腔細菌感染症を制御する機能性食品となる可能性が示唆された。

長野県上伊那地区における永久歯抜歯の原因調査

¹⁾一般社団法人上伊那歯科医師会、²⁾松本歯科大学歯科保存学講座
○橋本 実樹¹⁾、花田 隆周¹⁾、池上 正資¹⁾、中塚 敏弘¹⁾、矢島 八郎¹⁾、吉成 伸夫²⁾

Investigation of extracted permanent teeth at Kami-ina area in Nagano prefecture.

¹⁾Kami-Ina Dental Association, Department of Periodontology, ²⁾Department of Operative Dentistry, Endodontology and Periodontology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University
○Minoki Hashimoto¹⁾, Takahiro Hanada¹⁾, Masasuke Ikegami¹⁾, Toshihiro Nakatsuka¹⁾, Hachirou Yajima¹⁾, Nobuo Yoshinari²⁾

【目的】 歯科医療従事者は、患者の歯を失うことを可能な限り避けるよう研鑽し、その責務を負っている。しかし、う蝕、歯周病、根尖性歯周炎などの疾病により抜歯に至ることを、歯科医師が完全に避けることは不可能であろう。近年、日本国内の口腔衛生状態改善により、従来抜歯原因の上位であったう蝕、歯周病、根尖性歯周炎は減少傾向にあるが、歯の破折により抜歯に至ることが多いと実感している歯科医師は多いと思われる。文献的には、2005年に厚生労働省が施行した歯科疾患実態調査に基づく8020推進財団による永久歯の抜歯原因調査¹⁾を筆頭として、1987年から2004年まで複数の調査研究報告がある²⁻⁴⁾。しかし近年、国内における抜歯原因に関する疫学的研究は2006年以降後にはほとんど存在しない。よって、日本国民あるいは地域における患者の抜歯に至る歯の疾病罹患率を把握することは、歯科診療を遂行する歯科医療従事者にとって、大変重要な事案であると考えられる。本研究の目的は、上伊那歯科医師会の該当地域における永久歯の抜歯原因調査および考査を行うことである。

なお、本研究は利益相反に該当することはなく、松本歯科大学倫理委員会の承認を得て施行した(承認番号: 第0229号)。

【対象および方法】 2016年6月27日から8月6日までの41日間で、長野県上伊那地区の上伊那歯科医師会会員診療所に来院し、本疫学的調査の同意を文書で得た患者857名を対象とした。各患者の性別、年齢、抜歯部位、口腔内の状態(下顎隆起、口蓋隆起、咬耗、くさび状欠損)、口腔内の清掃状態、間食の習慣、甘い物の嗜好、抜歯に至った主要因、および歯髄の状態について調査を行い、データを比較検討した。

【結果】 該当地域に開設している81軒の歯科医院中56軒の歯科医院が本研究に参加した。男女比は男性51%、女性49%であった。年齢構成は75歳以上が23%と最多で、次いで65-69歳が14%であった。抜歯原因で最も多かったのが慢性歯周炎で26%であった。次いで、智歯に起因する病名による抜歯が23%、以下根尖性歯周組織炎21%、歯の破折20%、う蝕による抜歯9%であった。また、抜歯された歯の80%は無髄歯であった。部位別では、智歯を除いても大白歯が37%を占めていた。

【考察および結論】 8020推進財団による永久歯の抜歯原因調査では、有効回答率は数%であったと考えられる。また、近年の商業雑誌における同様の調査では母集団に偏りがある。本研究では、該当地域の69%の歯科医院からの回答が得られたことから、本地域の抜歯にいたる歯科疾患の実態を、より正確に把握することができたといえる。長野県上伊那地区における永久歯抜歯の原因は、過去の調査¹⁻⁴⁾と同様に歯周病による抜歯が1位を占めたが、その割合が過去の報告で40%前後に対し、本研究では26%であった。根尖性歯周組織炎をう蝕の継発症として考えると、原因の30%を占め、さらに無髄歯の継発症として歯の破折も加えると、抜歯の約50%がう蝕を主因あるいは誘因としている。抜歯に至るあらゆる原因を可能な限り予防する、さらなる公衆衛生活動の推進が必要であると考えられた。

- 1) 安藤雄一, 相田潤, 森田学, 青山旬, 増井峰夫 (2005) 永久歯の抜歯原因調査報告書. 8020 推進財団.
- 2) 鈴木恵三, 石井拓男 (1987) 北海道における抜歯の理由について. 口腔衛生学会雑誌 37: 568-9.
- 3) 新庄文明, 鈴木尚, 池田雅彦 (1989) 成人, 高齢者にたいする歯科臨床における歯周疾患予防指導の効果についての研究——喪失歯数に与える影響——. 老年歯学 3: 15-9.
- 4) 安藤雄一 (2005) 歯の寿命延伸に歯科医療は貢献したか?. ヘルスサイエンス・ヘルスケア 5: 50-5.

会員外共同研究者

有賀正治、西尾圭司、宮下徹、中村千仁、土屋正、小町屋直樹、上島昌幸、倉田友宏、小池剛史、小木曾暁、小木曾雅、保科学、池上英明