

CAD/CAM レジンブロックにフッ化水素酸処理は有効か

昭和大学歯学部歯科保存学講座美容歯科学部門¹

昭和大学歯学部歯科保存学講座歯科理工学部門²

○新妻由衣子¹、小林幹宏¹、市川琴奈¹、稲垣里奈¹、宮崎 隆²、真鍋厚史¹

Effect of HF etching on CAD/CAM resin block.

Department of Conservative Dentistry, Division of Aesthetic Dentistry and Clinical Cariology,

Showa University School of Dentistry¹

Department of Conservative Dentistry, Division of Oral Biomaterials and Engineering,

Showa University School of Dentistry²

○NIIZUMA Yuiko¹, KOBAYASHI Mikihiro¹, ICHIKAWA Kotona¹, INAGAKI Rina¹, MIYAZAKI Takashi², MANABE Atsufumi¹

【目的】

CAD/CAM レジンブロックを用いた歯冠修復が保険導入され、その普及が期待されているが被着面の処理方法に関しては確立されておらず、様々な検討がなされている。CAD/CAM レジンブロックの被着面処理方法としては、アルミナサンドプラスト処理が推奨されているが、機械的な表面構造の変化だけでなく化学的処理の併用が接着性の向上に有効であると考えられる。我々は本学会平成 28 年度春季大会 (第 144 回) にて、5%~9.5%の3種類の濃度のフッ化水素酸を表面処理として用いた接着強さへの影響を報告した。今回の実験では低濃度のフッ化水素酸を用いて、剪断接着試験及びその破壊形態、さらに 3D レーザー顕微鏡、EDX による処理前後の表面分析から接着性への効果を検討した。

【材料および方法】

CAD/CAM resin Block

Code	CAD/CAM resin block (Manufacturer)	Filler	Wt%
CS	CERASMART (GC)	Particulate silica, Barium glass	76
HC	shofu HC (shofu)	Silica, Particulate silicic acid, Zirconium silicate	62
KA	KATANA (Kuraray Noritake Dental)	ultrafine particles filler (Silica, Alumina)	62
EN	VITA ENAMIC (VITA)	Ceramics network (Al)	86

各ブロックを厚さ 2 mm に調整後、耐水研磨紙 #600 にて研磨し、内径 20mm のアクリルリング内に化学重合レジンパラプレスバリオ (ヘレウスグルツァー) にて埋入固定した。その後、各被着面に対し 0.5%、1%、2%、3%、3.5%、4% のフッ化水素酸処理を行い、クリアフィルマジエスティ LV (Kuraray Noritake Dental) を接着させた。ボンディング材、シランカップリング剤としてはそれぞれクリアフィルフォボンド、ポーセレンアクチベーター (Kuraray Noritake Dental) を用いた。製作した試験片は万能材料試験機 (type 5500R, Instron) を用いてクロスヘッドスピード 1 mm/min の条件下で剪断接着試験を行った (n=10)。得られた接着強さの値は Tukey's multiple comparison test を用いて、有意水準 0.05 の条件で統計学的分析を行った。

さらに、3D レーザー顕微鏡 (VK-X, KEYENCE) にてフッ化水素酸処理前後の表面性状の観察を行い、EDX (TM-3000+SwiftED3000, HITACHI) にて処理前後の被着面の構成元素の割合の変化を測定した。

【結果および考察】

3D レーザー顕微鏡を用いてフッ化水素酸処理前後の被着面の状態を観察した結果、HC は他のブロックと比べフッ化水素酸の影響が大きく表面粗さの増加が見られた。

剪断接着試験及び破壊形態から低濃度のフッ化水素酸は CS、HC、KA では接着強さの向上が認められたが EN では顕著には認められなかった。

EDX では、CS はフッ化水素酸処理後に酸素とケイ素の割合が減少しバリウムとフッ素の割合が増加する傾向にあった。それ以外のブロックでは酸素の割合が減少しケイ素の割合が増加した。

CAD/CAM レジンブロックの被着面処理として低濃度のフッ化水素酸は接着性の向上に有効であるが、その効果や最適なフッ化水素酸の濃度はブロックの組成や構造によって異なることが示唆された。

即時象牙質シーリングの応用方法が CAD/CAM セラミックアンレー修復の接着に及ぼす影響

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座
○村田 卓也 柵木 寿男 奈良 陽一郎

Effect of immediate dentin sealing applications on bonding of CAD/CAM ceramic onlay restoration

Department of Adhesive Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University
○MURATA Takuya, MASEKI Toshio, NARA Yoichiro

【目的】 メタルフリー間接修復において、窩洞内露出象牙質の即時シーリングは、象牙質歯髄複合体への保護効果だけでなく、窩洞適合性向上や接着性増強に寄与することが確認されている。しかし、シーリング厚さや形状に代表される臨床的な応用方法が当該修復の接着に及ぼす影響については未検討となっている。そこで、本研究では、即時象牙質シーリングの応用方法が CAD/CAM セラミックアンレー修復の接着に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、咀嚼環境想定 of 動的荷重負荷条件下における窩洞内微小引張接着強さ (μ -TBS) の測定を経て、評価検討した。

【材料および方法】 被験歯は、本学部研究倫理委員会 (NDU-T2016-06) の承認を得てヒト抜去健全上顎第一大臼歯 32 本を用いた。即時象牙質シーリングには、Scotchbond Universal Adhesive と Filtek Supreme Ultra Flowable Restorative (3M ESPE) を、切削加工用ブロックは、長石系セラミックの VITABLOCKS MarkII (VITA) を選択した。まず被験歯の 3 咬頭頂に基づく規格化植立を行い、各被験歯固有の歯冠形態を修復物に反映させるため、CEREC AC Omnicam (SW 4.3) (Dentsply Sirona) を用いた事前光学印象採得を行った。つぎに、歯冠部広範囲の実質欠損症例を想定した規格化 MODP アンレー窩洞を形成した。ついで Fig. 1 に示す 4 群、すなわち、象牙質窩壁に対するフロアブルレジンの薄層シーリング (T) 群、咬合面側から歯肉側に至るスロープ状シーリング (S) 群、S のステップ後に同量のレジンを積層したベース状シーリング (B) 群、さらに対照として非シーリング (N) 群の試料に調整した。その後、各窩洞の光学印象を行い、事前印象データに基づき CEREC MCXL (Dentsply Sirona) による MODP アンレーの作製、PANAVIA V5 (Kuraray Noritake Dental) を用いたアンレー体の装着を経て、37°C 水中に 1 時間保管した。ついで、37°C 水中 157N×30 万回 (90 回/分) の動的荷重負荷後に、全試料は植立軸に平行かつ頰側壁窩縁に直交する 3 回の縦切断と頰側壁窩縁に平行な 3 回の縦切断を行い、1 修復試料から断面積 1.0 mm² のビーム状試料 4 片を得た。全ビーム試料は crosshead-speed 1.0 mm/min の条件下で μ -TBS 値を測定 (n=32) した。得られた値は、一元配置分散分析、Tukey の q 検定およびメジアンランク法による Weibull 分析を行った。なお、ビーム状試料調整中に離断 (ptf) が生じた試料は、通法に従い、一元配置分散分析と Tukey の q 検定では 0 MPa としてデータに含め、Weibull 分析では除外して統計学的処理を図った。

【成績と考察】 Fig. 2 に 4 群の μ -TBS 値 (s.d.) ならびに ptf 数を示す。分析の結果、シーリング応用方法の違いは μ -TBS 値に有意な影響を与え、T・S・B 群は N 群より、さらに S・B 群は T 群より有意に大きな値を示した。Fig. 3 に μ -TBS 値に基づく Weibull 分析の結果を示す。4 群の Weibull 係数は、S 群が B 群より有意に大きな値を示した。また臨床的示唆に富む累積破壊確率 10% における 4 群の推定応力値は、N<T<S≤B の順に大きく、S・B 群は T・N 群より、また T 群は N 群より有意に大きな値であった。以上から、即時象牙質シーリングの応用は CAD/CAM セラミックアンレー修復の確実な接着獲得に有用であり、特に S・B 群に代表される厚めのシーリングは、荷重ストレスを吸収緩和し、強固かつ耐久性に長けた接着に寄与することが推察された。さらに、N・T 群には ptf 試料が散見され、かつ μ -TBS 値と PF10 値が小さいことから、S・B 群の様な堅固な接着一体化には至っていないことが考えられた。

【結論】 即時象牙質シーリングの応用は、CAD/CAM セラミックアンレー修復の窩洞内象牙質接着強さ・接着信頼性、接着耐久性の向上に寄与した。特にスロープ状およびベース状シーリングは、堅固な接着獲得に有益であった。

本研究の一部は JSPS 科研費 26462899 の助成を受けた。

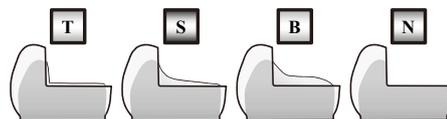


Fig. 1 Four restorations with and without immediate dentin sealing application

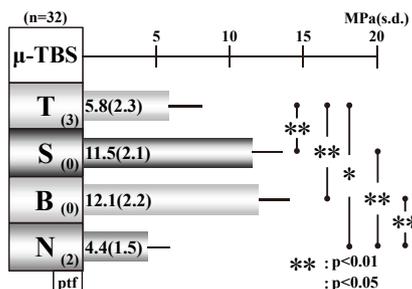


Fig. 2 Difference in mean μ -TBS among four restorations with and without immediate dentin sealing application

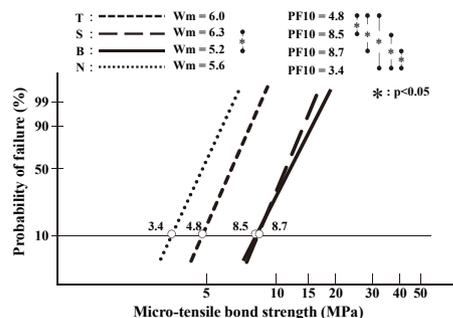


Fig. 3 Difference in the Weibull modulus (Wm) and the stress values for the 10% probability of failure (PF10) among four restorations with and without immediate dentin sealing application

各種表面処理方法が CAD/CAM ハイブリッドセラミックブロックの表面粗さに及ぼす影響

¹日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学

²日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第2講座

○チュンジット・パコーン¹、新海航^{1, 2}

Effects of various surface treatments on the surface roughness of hybrid ceramic CAD/CAM block

¹Advanced Operative Dentistry・Endodontics, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata

²Department of Operative Dentistry, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata

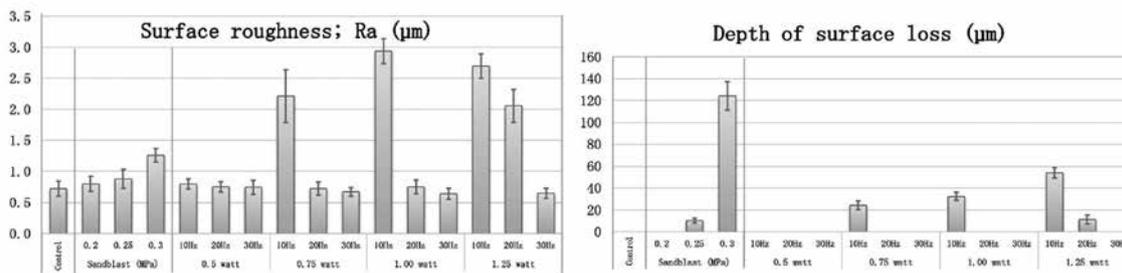
○CHUENJIT Pakorn¹, SHINKAI Koichi^{1, 2}

Objective: To evaluate the effects of various surface treatments on the surface roughness (R_a) and depth of surface loss for adhesion in hybrid ceramic CAD/CAM blocks.

Methods and Materials: Hybrid ceramic CAD/CAM blocks (Shofu Block HC, Shofu) were cut into slabs of 1.5 mm thickness and polished with sandpaper (240 grit) for 30 seconds to simulate the milled surface topography of CAD/CAM. The slabs were divided into three groups and subjected to the following surface treatment: group 1, no treatment (control group); group 2, sandblasting (50 μ m Aluminium oxide, Jet Blast II, J. Morita); group 3, laser irradiation by Er,Cr:YSGG (Waterlase MD, Biolase). The slabs in group 2 were further divided into three subgroups based on the sandblasting pressure (0.2, 0.25 and 0.3 MPa), whereas those in group 3 were divided into 12 subgroups by combining four powers (0.5, 0.75, 1 and 1.25 W) and three frequencies (10, 20 and 30 Hz) of laser irradiation. After each surface treatment, the specimens were measured for surface roughness and depth of surface loss using a surface texture-measuring device (Surfcom 470A, Tokyo Seimitsu). Data were statistically analyzed by one-way ANOVA and Dunnett T3 post hoc tests ($\alpha = 0.05$).

Results: No significant differences in R_a were noted in the 0.2 MPa and 0.25 MPa subgroups when compared with the control group ($p \geq 0.648$) in the sandblast-treated group. However, the R_a of the 0.3 MPa subgroup was significantly higher than that of the two other groups and the control ($p \leq 0.001$). In the laser treated groups, the 1.0 W-10 Hz and 1.25 W-10 Hz subgroups showed significantly higher R_a than the other groups ($p \leq 0.023$). Furthermore, subgroups in the laser treatment, except for 0.75 W-10 Hz, 1.0 W-10 Hz, 1.25 W-10 Hz and 1.25 W-20 Hz, showed no significant differences in R_a when compared with the control ($p \geq 0.648$). Surface losses were detected in two sandblast-treated and four laser treatment groups (10.2-124.3 μ m); while in the other specimens, surface loss was undetectable. The depth of surface loss detected in the 0.3 MPa sandblast-treated group was significantly higher than that detected in the other groups ($p < 0.001$).

Conclusion: Sandblasting treatment (0.3 MPa), and Er,Cr:YSGG laser treatment (0.75 W-10 Hz, 1.0 W-10Hz, 1.25 W-10Hz, and 1.25 W-20 Hz) significantly increased the surface roughness of the hybrid ceramic. Thus, Er,Cr:YSGG laser surface treatments can result in higher surface roughness with slight surface loss under some irradiation conditions.



白斑のう蝕深度と白斑の表面および表層下部の硬さの関係

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座
○清水明彦

White-spot lesion progression and hardness of enamel surface and subsurface lesions

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine

○Akihiko Shimizu

【研究目的】

視診でう蝕を認めない ICDAS code 2 白斑の断面を調べると、う蝕がエナメル質内に留まっている場合と、う蝕が象牙質まで進行している場合がある。視診では code2 として同じカテゴリーに含まれる白斑であっても、う蝕病変が象牙質まで波及しているかどうかの鑑別は、その白斑の治療法を決める上で大変重要である。演者は、2016 年春季保存学会において、白斑の表面硬さから、う蝕病変の象牙質への波及の有無を判別することが可能であることを報告した。

今回の研究の目的は、code2 の白斑において、う蝕病変が象牙質に波及している場合とそうでない場合とで、白斑の表面硬さの違いを再検証し、さらに白斑の硬さ-深さ曲線の特徴を調べることである。

【材料および方法】

10%中世ホルマリンに保存されたヒト抜去歯の中から平滑面に ICDAS code 2 の白斑を有する歯を選んだ(兵庫医科大学倫理審査委員会承認番号 2260)。まず白斑の表面硬さを、カリオテスター(三栄エムイー社)を用いて測定しヌープ硬さを求めた。次いで、歯を一側からすり減らし、カリオテスターで硬さを測定した白斑面とほぼ直交する断面を作製し、う蝕がエナメル質の範囲内に留まっているグループと、う蝕病変が象牙質まで進行しているグループに分けた。次いで、断面を鏡面研磨し微小硬度計(MVK-E、明石社)を用いて、エナメル質表層部から DEJ に向かって、50 μm 間隔でヌープ硬さを測定した。

【成績】

カリオテスターで測定した ICDAS code 2 の白斑の表面硬さは、う蝕病変がエナメル質に留まっているグループでは $134 \pm 29\text{KHN}$ (n=40)、象牙質まで進行しているグループでは $87 \pm 17\text{KHN}$ (n=18)であった。カットオフ硬さを 110KHN に設定した場合、実際に象牙質にう蝕が波及している白斑のうち、白斑表面の硬さ測定値からそれを正しく判定できる割合(感度)は 0.89 であり、実際にう蝕が象牙質に達していない白斑に対し、それを正しく判定できる割合(特異度)は 0.85 であった。

また、う蝕病変がエナメル質に留まっている白斑病変の硬さ-深さ曲線は、表層下部から急激に硬さを減じ DEJ に向かって硬さが上昇し、いわゆる表層下脱灰を示すパターンが見られた。一方、う蝕病変が象牙質まで進行している白斑では、表層下部から DEJ に至る広い範囲で著しい軟化が認められた。

【考察】

視診だけで ICDAS code2 の白斑病変がエナメル質に留まっているか、それとも象牙質まで波及しているかを鑑別することはほぼ不可能である。しかし白斑表面の硬さ測定値から、それを客観的に鑑別できることが示されたことは、臨床的意義が大きい。一方、う蝕で軟化してもその形態を維持している象牙質とは異なり、表層下脱灰部の軟化したエナメル質は、表層部と深部のまだ硬さを維持しているエナメル質に囲まれた中に粉末状態で存在している。この粉末状のエナメル質が、再石灰化処置により硬さを回復するかどうかは今後検討する必要がある。

【結論】

- 1) カリオテスターで ICDAS code 2 の白斑の表面硬さを測定すると、う蝕病変が象牙質に波及している場合は、う蝕がエナメル質に留まっている場合に比べ、有意に軟化していることが分かった。
- 2) 白斑表面の硬さ測定値からは、実際に象牙質にう蝕が進行している白斑では 89%が判別でき、まだ象牙質にう蝕が進行していない白斑では 85%が判別できることが示された。
- 3) 白斑病変の硬さ-深さ曲線からは、う蝕病変がエナメル質に留まっている場合、表層下部を中心に明らかな軟化が認められたが、象牙質までう蝕が進行した白斑では、表層下部から DEJ に至る全層で著しい軟化が認められた。

In-air micro-beam PIXE/PIGE による Ca を含有したガラスアイオノマーセメントを塗布した 根面象牙質の耐酸性評価

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. 朝日大学歯学部 歯科理工学分野 3. 北海道医療大学歯学部 う蝕制御学分野
4. 若狭湾エネルギー研究センター

○八木 香子¹, 山本 洋子¹, 上村 玲央¹, 奥山 克史², 松田 康裕³, 鈴木 耕拓⁴, 林 美加子¹

Evaluation of acid resistance of root dentin with glass ionomer cement containing Ca using in-air micro-beam PIGE/PIXE system.

1. Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
2. Department of Dental Materials Sciences, Asahi University School of Dentistry
3. Division of Clinical Cariology and Endodontology, Health Sciences University of Hokkaido Graduate school of dentistry
4. The Wakasa Wan Energy Research Center

○Kyoko YAGI¹, Hiroko YAMAMOTO¹, Reo UEMURA¹, Katsushi OKUYAMA², Yasuhiro MATSUDA³,
Koutaku SUZUKI⁴, and Mikako HAYASHI¹

[研究目的]超高齢社会において重要視されている根面う蝕の予防については、う蝕の発症・進行メカニズムの分子レベルでの理解に基づく対応が期待されている。演者らは、従来より開発してきた歯質内のカルシウム(Ca)とフッ素(F)を同時に定量測定できる若狭湾エネルギー研究センターの In-air micro-beam Particle Induced X-ray/Gamma-ray Emission(PIXE/PIGE)を用いて、根面象牙質における脱灰前後の Ca および F の連続的定量評価法を確立し、第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会にて報告した。今回は、この評価法を用いて、Ca を含有した高フッ化物徐放性ガラスアイオノマーセメントを作用させた根面象牙質における Ca と F 濃度の経時変化について比較検討を行った。

[材料および方法]ヒト健全第三大臼歯 9 本のセメントエナメル境付近の頬側面を歯軸に平行に切断したうえで、根面象牙質を露出させた 4 ブロックを各歯より切り出し、3 ブロックの象牙質露出部に、高フッ化物徐放性ガラスアイオノマーセメント Fuji VII(GC, 以下 F7 群), Fuji VII の組成中のストロンチウム(Sr)/Ca 比を 50/50 とした試作セメント P1 (以下 P1 群), 0/100 とした試作セメント P2(以下 P2 群)を各々塗布した。一方、材料を塗布しない 1 ブロックをコントロール(以下 CO 群)とした。37°C で 1 カ月生理食塩水中に浸漬後、塗布材料を除去し、各ブロックを露出根面象牙質に垂直、歯軸に平行かつ頬舌方向に 0.5 mm 幅に切断して測定試料とした。切断面の象牙質表層より 800 μm の部位に厚さ 4 μm の銅箔を貼付し、根面象牙質表層から銅箔まで歯質内方向に歯質内の F および Ca 濃度を PIXE/PIGE を用いた線分析を既報(Yasuda et al., NIM B 260, 2007)に従って行った。PIXE/PIGE 測定後、各試料を脱灰溶液(50 mmol/l acetate buffer, 2.2 mmol/l CaCl₂, 2.2 mmol/l KH₂PO₄, pH 5.0) 10 ml に 3 日間浸漬した後、再度 PIXE/PIGE にて脱灰前と同一部位の線分析を行った。脱灰前後の線分析の結果を、銅箔を基準として重ね合わせ、Ca 喪失量と歯質への歯質内の総 F 量を算出し、群間で比較した。また、両者の相関関係についても検討した。さらに、脱灰後の表層の形態について、表層に変化なし、表層下脱灰あり、および表層が後退、の 3 群に分類して評価した。Ca 喪失量および総 F 量における群間比較には、Steel-Dwass test を用いて危険率を 5%として評価し、相関関係については、Spearman's rank correlation coefficient を用いて危険率を 1%として検定した。表層の形態については、Kruskal-Wallis test を用いて危険率を 5%として検討した。なお、本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認下で実施した(承認番号: H25-E28)。

[結果および考察]CO 群, F7 群, P1 群, P2 群における Ca 喪失量は、各々 $2.2 \times 10^2 \sim 8.1 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ (中央値: $4.1 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$), $8.4 \times 10^2 \sim 5.2 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ (中央値: $2.8 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$), $0.0 \sim 4.0 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ (中央値: $1.2 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$), $0.0 \sim 2.3 \times 10^2 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$ (中央値: $7.0 \times 10^1 \text{ vol}\% \cdot \mu\text{m}$) であった。各群における Ca 喪失量は、CO, F7, P1, P2 群の順で多く、P1 および P2 群は F7 および CO 群と比較して有意に Ca 喪失量が少なかった(Steel-Dwass test, $P < 0.05$)。CO 群, F7 群, P1 群, P2 群における総 F 量は、各々 $0.0 \sim 0.0 \text{ ppmF} \cdot \mu\text{m}$ (中央値: $0.0 \text{ ppmF} \cdot \mu\text{m}$), $2.5 \times 10^2 \sim 7.7 \times 10^3 \text{ ppmF} \cdot \mu\text{m}$ (中央値: $2.1 \times 10^3 \text{ ppmF} \cdot \mu\text{m}$), $8.1 \times 10^2 \sim 7.4 \times 10^3 \text{ ppmF} \cdot \mu\text{m}$ (中央値: $2.9 \times 10^3 \text{ ppmF} \cdot \mu\text{m}$), $1.7 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^4 \text{ ppmF} \cdot \mu\text{m}$ (中央値: $5.5 \times 10^3 \text{ ppmF} \cdot \mu\text{m}$) であった。CO 群と P1, P2, F7 群との間に有意差が認められ(Steel-Dwass test, $P < 0.05$)、P1, P2, F7 群の間には有意な差はなかった。また、Ca 喪失量と総 F 量との間には有意な負の相関が認められた(Spearman's rank correlation coefficient, $r = -0.63$, $P < 0.01$)。表層の形態について、CO 群では全て表層が後退していたが、P1 および P2 群においてはほぼ全ての試料で表層が保持されていた。これらより、高フッ化物徐放性ガラスアイオノマーセメントの Sr を Ca に置換した材料を塗布することによって、根面象牙質の耐酸性がさらに向上す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(25293387, 26462879)の補助の下に行われた。

象牙芽細胞様細胞に対する CCN2 の *in vitro* 効果

北海道医療大学歯学部 口腔機能修復・再建学系 う蝕制御治療学分野

○邱 友靖, 唐 佳, 斎藤 隆史

The *in vitro* effects of CCN2 on odontoblast-like cells

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

○Youjing Qiu, Jia Tang and Takashi Saito

Purpose:

To investigate the *in vitro* effects of connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed 2 (CCN2) in MDPC-23 cell line.

Materials and Methods:

MDPC-23 cells, a type of rat odontoblast-like cell line were used in cell culture. The gene expression of CCN family (CCN1-6) was studied using conventional PCR. The mRNA expression of CCN1, CCN2, CCN4, CCN5 was investigated on non-coated and tilapia scale collagen-coated tissue culture-treated polystyrene (TCPS) over a period of eight days. Cell viability was assessed using CCK-8 assay in cells treated by CCN2 (concentration: 1, 10, 100 and 1000 ng/mL) and vehicle. Real time PCR was carried out in the time course of 12h, 24h, 36h and 48h after confluence. Finally, the mineralization inducing capacity was evaluated using alizarin red staining at day seven and day eight. Briefly, CCN2 (100ng/mL) was added from the second day after seeding, odontogenic factors (10mM β -glycerophosphate, 50 μ g/mL ascorbic acid and 100nM dexamethasone) were incorporated into the culture media at day five. Statistical analysis was conducted using One-way ANOVA with post-hoc Tukey HSD Test.

Results and Discussion:

It was found that except CCN3 and CCN6, the other CCN family members were stably expressed in MDPC-23 cells to different extent. Moreover, only CCN2 was markedly enhanced during the odontogenic differentiation of MDPC-23 cells, especially, its mRNA expression was further promoted in cells grown in surfaces coated with fish type I collagen (F-COL1) as compared to the non-coated control at eight days (F-COL1: 1.84 ± 0.11 versus control: 1.33 ± 0.09). The direct effects of soluble CCN2 protein on MDPC-23 cells in a short culture period of 48 h, it was found that addition of CCN2 to the cultured media in the absence of odontogenic factors significantly up-regulated the mRNA expression of bone sialoprotein (BSP) (CCN2: 4.56 ± 0.05 versus control: 3.55 ± 0.56), osteocalcin (OCN) (CCN2: 2.83 ± 0.16 versus control: 1.99 ± 0.23) and osteopontin (OPN) (CCN2: 3.35 ± 0.07 versus control: 2.33 ± 0.24). The mineralization of cells was promoted at day eight in CCN2-treated group.

Conclusion:

Among the four types of CCN family, which were expressed in MDPC-23 cells, only CCN2 was promoted during the differentiation of cells. The cell viability was enhanced by CCN2 protein. Furthermore, CCN2 significantly enhanced the expression of BSP, OCN and OPN after exposure of 48h. Meanwhile, continuous administration of CCN2 slightly promoted mineralization.

無髄神経欠損モデルラットにおける島皮質の抑制性神経伝達機構の変化

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, 林 誠^{1,2}, 小林 真之^{3,4}, 小木曾 文内^{1,2}

Modulates of insular cortical inhibitory neurotransmission in the model rats that ablated 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, M. Hayashi^{1,2}, M. Kobayashi^{3,4} and B. Ogiso^{1,2}

【研究目的】

大脳皮質感覚野は、末梢感覚入力によってその局所回路を形成する。例えば、幼若期に片眼遮蔽すると視覚野のニューロンは開眼側の入力にしか応答しなくなる、いわゆる眼優位可塑性、が生じることが知られている。痛みに関しても同様の可塑性が生じる可能性がある。すなわち、侵害情報を伝達する Aδ と C 線維からの入力どちらか一方を欠落させると、大脳皮質の痛みを処理している島皮質における神経回路が組み替わる可能性がある。このような機構は、慢性疼痛の原因となっているかもしれない。しかし、島皮質における可塑的变化に関する知見は極めて乏しく、痛みの慢性化や難治性疼痛の発症機構は不明のままである。そこで、我々は TRPV1 発現性の無髄神経を脱落させたラットモデル (Cap) を用い、味覚や侵害情報などの口腔内感覚が収束する島皮質において、末梢の無髄神経の脱落が局所神経回路の調節機能の可塑的变化に及ぼす影響を検討した。

【材料および方法】

生後 1-2 日齢の vesicular-GABA transporter (VGAT)-Venus line A ラットの頸部に 100 mg/kg capsaicin (CAP) を皮下投与し、TRPV1 チャンネルが発現する無髄神経を欠損させたラットを作製した。三叉神経節の CGRP 陽性細胞を免疫組織化学的手法により定量化することで、C 線維脱落の程度を評価した。CAP 投与 20-25 日後に CAP 処置群および Sham 群の島皮質を含む急性脳スライス標本作製した。顆粒島皮質および不全顆粒島皮質 □/□ 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と Venus 蛍光タンパクの有無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 (FS) を同定した。その後、1 μM tetrodotoxine (TTX) および、20 μM 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX) を灌流投与し、miniature inhibitory post synaptic current (mIPSC) を Pyr から記録し、その振幅と頻度を解析した。また、FS→Pyr を有するニューロンのペアを検索し、シナプス後ニューロンである Pyr から単一シナプス後電流 (uIPSC) を記録した。uIPSC は、振幅値と一回目と二回目の刺激より得られる振幅値の比 (paired-pulse ratio; PPR) として解析した。さらに、細胞外液中のカルシウム濃度を調整することで放出確率を変化させ、それぞれのカルシウム濃度における uIPSC の振幅値の変動係数と平均値から放出部位の数、素量サイズ、放出確率を variance-mean 解析 (V-M 解析) を用いて求めた。

【結果】

Sham 群と比較して、CAP 処置群の Pyr から記録される mIPSC は振幅値が有意に小さかった。一方、mIPSC の発生頻度に有意な差は認められなかった。uIPSC で記録される振幅値も CAP 処置群で顕著に小さかったが、PPR には変化が認められなかった。V-M 解析では、一つの小胞を受容した時に流れる電流量を示す素量サイズが CAP 群で減少した。

【考察】

以上の結果から、CAP 処置による無髄神経の脱落によって、島皮質の Pyr 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、この変化はシナプス後側の神経伝達物質に対する感受性の低下に起因すると推測された。これらのメカニズムは、異常疼痛を惹起する末梢神経系の損傷時にも働く可能性がある。したがって、難治性の疼痛治療に対する新たなアプローチとして GABA 受容体の活性化を今後検討していきたい。

CCL19-CCR7 経路を介したエネルギー代謝機構が肥満およびインスリン抵抗性に 及ぼす影響の機序に関する検討

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

Influences of energy metabolism via CCL19-CCR7 pathway on diet-induced obesity and insulin resistance

Section of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Kyushu University
○Sano Tomomi, Shinjo Takanori, Iwashita Misaki, Yamashita Akiko, Nishimura Fusanori

【目的】

近年、肥満脂肪組織において脂肪細胞と浸潤マクロファージおよびその他の免疫系細胞による相互作用が炎症を促進し、結果的にインスリン抵抗性を惹起することが示唆されている。また、本邦における介入研究から、歯周炎症の影響を受けて炎症マーカーが上昇した2型糖尿病患者は、そうでない被験者に比べより脂肪組織が成熟していることを示唆する結果を得ている。演者らは、これまでにケモカイン CCL19 の受容体である CCR7KO マウスでは高脂肪食負荷による肥満やインスリン抵抗性が抑制されるところを報告した(*Obesity*, 2015)。さらに、エピカテキン (EC) が LPS 刺激下脂肪細胞-マクロファージ共培養系で CCL19 の発現を著明に抑制すること、EC 含有高脂肪食負荷マウスは CCR7KO マウスに酷似した表現型を示すこと (*Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2016) から、脂肪組織の炎症反応の発現に CCL19-CCR7 経路が重要な役割を果たすものと考えている。しかしながら、その詳細な分子基盤については不明である。そこで、CCR7KO マウスにおけるエネルギー代謝調節機構に着目し、脂肪組織での代謝関連遺伝子発現の解析、マウス自発運動量の測定、呼吸・代謝測定を行い、CCL19-CCR7 経路が肥満およびインスリン抵抗性へ及ぼす影響について検討を行った。

【方法と結果】

通常食あるいは高脂肪食を負荷させた野生型マウスおよび CCR7KO マウスを用い、マウスの表現型やエネルギー代謝について比較した。CCR7KO マウスは、野生型マウスと比較し、食餌摂取量 (摂取エネルギー) に差がないにもかかわらず、蓄えるエネルギー量は同じかやや少なく、経時的なモニタリングにおいて自発運動量 (仕事エネルギー) に変化はなかった。また、高脂肪食負荷 CCR7KO マウスでは、高脂肪食負荷野生型マウスと比較し、明らかに白色脂肪が小さい瘦せた表現型を示した。このことから、消費エネルギー量が亢進していることが示唆された。そこで、エネルギー消費について検討を行うため、呼吸・代謝測定システム (Oxymax) を用いた解析を行ったところ、CCR7KO マウスは野生型マウスと比較し、酸素消費量・二酸化炭素生産量ともに亢進しており、エネルギー消費が有意に上昇していることが確認できた。さらに、熱産生とエネルギー代謝に関連している褐色脂肪細胞組織の遺伝子発現を調べたところ、CCR7KO マウスにおいて熱産生に深くかかわるタンパク質である脱共益タンパク質 1 (uncoupling protein 1; UCP1) の遺伝子発現量が増加していた。つまり、CCR7KO マウスでは熱産生系が亢進していることが分かった。また、寒冷刺激下において、CCR7KO マウスと野生型マウスの直腸温を比較したところ、CCR7KO マウスで高く維持されていた。

【結論】

CCR7KO マウスでは褐色脂肪組織での脂肪分解が亢進することで、UCP1 活性が増強されて熱産生が亢進し、エネルギー消費の促進や直腸温の上昇につながることを示唆された。個体におけるエネルギーバランスは、食事から摂取するエネルギー、脂肪組織などに貯蔵するエネルギー、体内で消費するエネルギーの収支で決まる。本研究において、CCR7KO マウスではエネルギー代謝が亢進し、高脂肪食負荷による肥満が抑制されたことから、CCL19-CCR7 経路を介した肥満およびインスリン抵抗性の発症に、エネルギー代謝調節機構が重要な影響を及ぼしている可能性が示唆された。

LIPUS 刺激は NF- κ B シグナル抑制を介して IL-1 β 分泌を抑制する

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野¹⁾
東北大学大学院歯学研究科歯学イノベーションリエゾンセンター²⁾
○須藤瑞樹¹⁾、丸山顕太郎¹⁾、金谷聡介^{1),2)}、根本英二¹⁾

Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits IL-1 β secretion via inhibiting NF- κ B signaling.

Division of Periodontology and Endodontology¹⁾ Liaison Center for Innovative Dentistry²⁾

Tohoku University Graduate School of Dentistry

○Mizuki SUTO¹⁾、Kentaro MARUYAMA¹⁾、Sousuke KANAYA^{1),2)}、Eiji NEMOTO¹⁾

[目的]

歯周病および根尖性歯周炎においてグラム陰性嫌気性菌の Lipopolysaccharide (LPS)により、マクロファージを中心とする炎症性細胞から種々の炎症性サイトカインや炎症性メディエーターが誘導され炎症が憎悪する。この病変を憎悪させ、病態形成に重要な因子のひとつに IL-1 β がある。IL-1 β は、他の炎症性サイトカインを誘導することによって炎症反応を増大させ、破骨細胞の活性化やマトリックスメタロプロテアーゼを誘導することにより、歯槽骨吸収や結合組織破壊を進行させるなど病態形成に大きく関与している。

低出力超音波(Low-intensity pulsed ultrasound, LIPUS)は、骨関連細胞に対してメカニカルストレスとして作用し1980年代に骨折治癒促進効果が証明されて以来、現在整形外科領域における理学療法として広く用いられている。近年、LIPUS 照射は *in vitro* において骨芽細胞の炎症性反応を抑制させることが報告されている。しかしながら、LIPUS 照射における抗炎症作用の詳細なメカニズムは明らかにされていない。本研究は、LIPUS 照射が LPS 刺激マウスマクロファージ様株化細胞 (J774.1)にどのような影響を与えるかについて解析を行い、LIPUS の抗炎症作用のポテンシャルについて検討を行った。

[材料および方法]

1. 供試細胞: マウスマクロファージ様株化細胞 (J774.1)は東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センター細胞バンクより入手し、10% fetal bovine serum (FBS)添加 RPMI 培地で継代培養して供試した。LPS は Escherichia Coli 055:B5 由来のものを使用し、100ng/ml の濃度で6時間培養を行った。
2. LIPUS 照射: ウルトラサウンド ST-SONIC (伊藤超短波株式会社)を用いて有効強度 60mW/cm²、音響作用周波数 1.5MHz で LPS 刺激開始とともに1時間照射を行った。インフラマソーム関連遺伝子およびタンパク発現においては最後の1時間 Adenosine-5'-triphosphate (ATP)を 1mM 添加した。
3. 遺伝子発現分析: マウスマクロファージ様株化細胞を所定の条件で培養し、RNeasy[®] (QIAGEN)を用いて全 RNA を抽出し、通法に従って cDNA を作製した。得られた cDNA は CFX96 Touch[™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)を用いて Real-Time PCR を行い、炎症性サイトカイン関連遺伝子、インフラマソーム関連遺伝子の発現について調べた。
4. タンパク発現分析: マウスマクロファージ様株化細胞を所定の条件で培養し、培養上清を回収し、IL-1 β の4解析を IL-1 beta Mouse SimpleStep ELISA Kit (abcam)を用いて解析を行った。また、Cell Lysis Buffer を用いて細胞溶解物のタンパクを回収し、インフラマソーム関連因子、炎症性サイトカイン因子の発現を Western blot 法にて解析を行った。

[結果]

LPS 刺激したマウスマクロファージ様株化細胞は LIPUS 照射を行った結果、LIPUS 照射群の IL-1 β 発現を遺伝子およびタンパクレベルで有意に抑制した。LIPUS 照射における IL-1 β 発現抑制は I κ -B 分解には影響を及ぼすのではなく、NF- κ B を構成している p65 のリン酸化および、p65 のタンパク発現を抑制していることが Western blot 法により示唆された。また、LPS 刺激と LIPUS 照射を同時に行った場合では IL-1 β のタンパク発現は有意に抑制されたが、LIPUS 照射を ATP 刺激と同じ最後の1時間で行うと IL-1 β のタンパク産生は抑制されなかった。

[考察]

LIPUS 照射の LPS 刺激したマウスマクロファージ様株化細胞に与える影響について検討した結果、LIPUS 照射は LPS が誘導した IL-1 β の発現を遺伝子およびタンパクレベルで抑制した。これはインフラマソームに影響を及ぼすことなく NF- κ B の p65 シグナルを抑制することによって IL-1 β の発現を抑制するものと示唆された。これらの知見は LIPUS 照射が NF- κ B に関与する疾患の治療法に対して有効に作用する可能性を示唆するものと考えられる。

ヒト歯髄幹細胞に対する
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, 安井菜津希¹, 今井一貴¹, 野口正皓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 in human dental pulp stem cells

¹Departments of Periodontology, Osaka Dental University

²Departments of Oral Pathology, Osaka Dental University

○Hirohito Kato¹, Yoichiro Taguchi¹, Natsuki Yasui¹, Kazutaka Imai¹, Masahiro Noguchi¹, Isao Yamawaki¹, Kazuya Tominaga², Akio Tanaka², Makoto Umeda¹.

【目的】

幼若ブタ歯胚から作製されたエナメルマトリックスデリバティブ (EMD) は歯槽骨再生を含めた硬組織の再生を目的として、主に歯周組織再生療法に広く臨床応用されている。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硬組織再生を可能にする製剤が必要とされている。そこで、我々は EMD を用いた基礎研究から硬組織誘導能を有する EMD 由来合成ペプチドを作製した。

近年の研究報告により、EMD を歯髄組織に作用させると、象牙質様硬組織の再生が誘導されることが明らかになっている。すなわち、覆髄材料としての EMD の有用性が注目されている。しかし、歯髄細胞に対する EMD 由来合成ペプチドの硬組織再生への効果については未だ明らかになっていない。したがって、本研究では象牙質の再生に重要な役割を果たすヒト歯髄幹細胞 (HDPSC) と EMD 由来合成ペプチドを用いて、EMD 由来合成ペプチドの覆髄材料としての有用性について検討を行った。

【材料と方法】

HDPSC は Lonza 社より提供を受け、実験に使用した。ヒト歯髄幹細胞に対するの影響としては、EMD 由来合成ペプチド (0, 10, 100, 1000 ng/ml) を添加した 10% FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium 培地でそれぞれ培養し、HDPSC の細胞増殖能を検討した。また EMD 由来合成ペプチド (0, 100 ng/ml) 添加した硬組織分化誘導培地を HDPSC に作用させ、Alkaline phosphatase (ALP) 活性の測定、Alizarin red 染色による石灰化物形成能の検討、ギ酸抽出によるカルシウム析出量の測定を行い、EMD 由来合成ペプチドの硬組織分化影響に及ぼす影響を検討した。

【結果】

HDPSC に対する EMD 由来合成ペプチドの細胞増殖への影響は 10, 100 ng/ml 濃度の EMD 由来合成ペプチド添加 5 日、7 日の培養後の評価において、両 EMD 由来合成ペプチド添加群では対照群と比較して有意に高い値を示し、100 ng/ml 濃度の EMD 由来合成ペプチド添加群が最も有意に高い値を示した。

また HDPSC に対する EMD 由来合成ペプチドの硬組織分化への影響は培養開始 7 日、14 日において ALP 活性、カルシウム析出量、および石灰化物形成能を有意に促進した。

【考察および結論】

以上の結果より、EMD 由来合成ペプチドは HDPSC の細胞増殖能と硬組織分化能を促進することが認められた。したがって、EMD 由来合成ペプチドは象牙質様硬組織の誘導を促進し、歯髄保存療法における覆髄材料として有用である可能性が示唆される。