

ユニバーサルアドヒーズおよび2ステップセルフエッチアドヒーズの エナメル質および象牙質に対する接着疲労耐久性

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹, 総合歯学研究所生体工学部門²
○辻本暁正^{1,2}, 土屋賢司¹, 植田浩章¹, 平井一孝¹, 金澤智恵¹, 鈴木総史¹, 高見澤俊樹^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}

Comparison of enamel and dentin bond fatigue durability between universal adhesives and two-step self-etch adhesives

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science², Nihon University School of Dentistry

○TSUJIMOTO Akimasa^{1,2}, TSUCHIYA Kenji¹, UETA Hirofumi¹, HIRAI Kazutaka¹,
KANAZAWA Chie¹, SUZUKI Soshi¹, TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}

【目的】

これまで、歯質接着システムの接着性に関する評価の多くは、剪断あるいは引張り試験を用いて静的荷重を接着試片に負荷し、その破壊に必要とされた応力の大きさの大小から検討されてきた。しかし、口腔内で修復物に負される荷重は、最大破折抗力以下の動的荷重負荷であり、その破壊に伴う塑性変形あるいは亀裂伝播は、静的荷重負荷試験によるものとは異なるとされている。そこで、繰り返し荷重が可能な疲労接着試験を用いて、ユニバーサルアドヒーズおよび2ステップセルフエッチアドヒーズのエナメル質および象牙質に対する接着疲労耐久性を検討した。

【材料および方法】

供試した接着システムは、ユニバーサルアドヒーズの Adhese Universal (AU, Ivoclar Vivadent), Clearfil Universal Bond (CU, Kuraray Noritake Dental), G-Premio Bond (GP, GC) および Schotchbond Universal Adhesive (SU, 3M ESPE) の4製品と、2ステップセルフエッチアドヒーズの Clearfil Mega Bond (CM, Kuraray Noritake Dental), Clearfil Mega Bond 2 (CM2, Kuraray Noritake Dental) および OptiBond XTR (OX, Kerr) の3製品の、合計7製品とした。

1. 剪断接着強さ

ヒト抜去白歯 (#760765-1) 歯冠部のエナメル質および象牙質に対し、耐水性 SiC ペーパーの#4,000 まで研磨を行い、これを被着歯面とした。これらの被着歯面に対して、供試した接着システムを製造者指示に従って塗布、光照射した。その後、ステンレス製金型をアドヒーズ塗布面に静置し、コンポジットレジンで充填、光照射を行い、接着試片とした。また、エナメル質の被着歯面においては、35%リン酸水溶液 (Ultra-Etch, Ultradent Products) を用いて15秒間エッチング処理を行った条件についても同様に接着試片を製作した。これらの試片は、37°C 精製水中に24時間保管後、電気式疲労試験機 (ElectroPuls E1000 Machine, Instron) を用いて、剪断接着強さを測定した。

2. 剪断疲労接着強さ試験

接着疲労耐久性試験に際しては、電気式疲労試験機および Staircase method を用いて行った。すなわち、得られた各接着システムの剪断接着強さの約50%荷重を、接着試片に対して20 Hzの条件で繰り返し50,000回負荷した。この規定回数に達する前に試片が脱落した際は、初期荷重の10%を減じ、試片が生存した際は、荷重を10%増加させ、段階的に荷重を負荷した。試片の脱落個数および段階的に負荷した荷重から、剪断疲労接着強さを算出した。

3. SEM 観察

供試した接着システムとエナメル質および象牙質との接合状態を検討するため、FE-SEM (ERA-8800 FE, Elionix) を用いて、その接合界面を加速電圧10 kVの条件で観察した。

【成績および考察】

リン酸エッチング後のエナメル質および象牙質に対するユニバーサルアドヒーズの接着疲労耐久性は、製品により異なるものの、エナメル質に対するものにおいては、いずれの製品においても違いは認められなかった。一方、エナメル質に対する2ステップセルフエッチアドヒーズの接着疲労耐久性は、製品により異なるものの、リン酸エッチング後のエナメル質および象牙質に対するものはいずれの製品においても違いは認められなかった。供試した接着システムの接合界面におけるSEM観察では、そのアドヒーズ層の厚さは製品の種類により異なるものであった。

【結論】

ユニバーサルアドヒーズおよび2ステップセルフエッチシステムのエナメル質および象牙質に対する接着疲労耐久性は、被着面の種類あるいはリン酸エッチングの有無により異なることが明らかとなった。また、その接着疲労耐久性は、それぞれの接着システムのアドヒーズ層の厚さに影響を受ける可能性が示された。

Office Bleaching がエナメル質の接着強さに及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座う蝕制御学分野
○スマヤ ハラビ、松井七生子、二階堂徹、田上順次

Effect of office bleaching on enamel bonding performance.

Department of Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University,
○Somayah HALABI, Naoko MATSUI, Toru NIKAIIDO, Junji TAGAMI

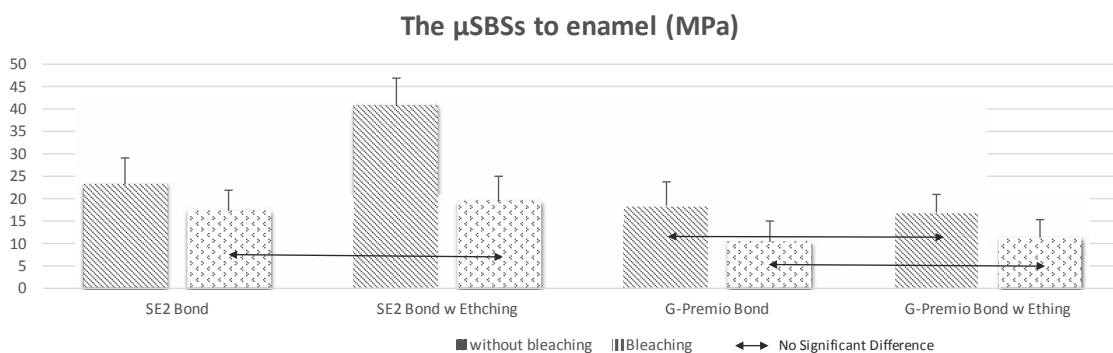
[Objective] The aim of this study was to evaluate effect of office bleaching on enamel micro-shear bond strength (μ SBS) by using self-etch adhesive with/without office bleaching.

[Materials and Methods] Forty bovine incisors were used in this study. Roots were resectioned 1 mm above the cemento-enamel junction. Each tooth was sectioned to obtain one fragment from labial surface per tooth (10 x 10 mm) using a slow speed diamond saw (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL, USA) under water-cooling. Enamel surfaces were wet-abraded with 600-grit SiC paper. The enamel surfaces were treated either with or without bleaching. For the bleaching group, the enamel surface was treated with a bleaching agent (TiON in Office, GC, Tokyo, Japan) for 60 sec according to the manufacturer's instructions, rinsed and dried. The specimens were then bonded with the following bonding procedures; Group 1; application of a two-step self-etch adhesive, Clearfil SE Bond 2 (SE2, Kuraray Noritake Dental, Tokyo, Japan), Group 2; etching with 40% phosphoric acid (PA, K-etchant, Kuraray-Noritake Dental) and application of SE2, Group 3; application of a one-step self-etch adhesive, G-Premio Bond (GP, GC Corp., Tokyo, Japan) and Group 4; PA and GP. Tygon tubes were placed on the treated enamel surface and light-cured. A resin composite, Clearfil AP-X (Kuraray Noritake Dental) was condensed into the tubes positioned on the enamel surfaces and polymerized using a light cure unit (Optilux501, Kerr, Orange, CA, USA). Following this, all specimens were stored in an incubator at 37°C distilled water for 24 hours. The μ SBS test was performed with a universal testing machine (EZ-SX, Shimadzu, Kyoto, Japan) at a crosshead speed of 1.0 mm/min until failure occurred ($n=45$ for each subgroup). The statistical analysis was performed with SPSS statistic software analysis by using two-way ANOVA.

[Results]

Two-way ANOVA indicated that bleaching and adhesive procedure influenced the enamel μ SBSs ($p \leq 0.005$). In both SE2 and GP, bleaching significantly decreased the μ SBSs in despite of phosphoric acid etching ($p \leq 0.005$). However, there were no significant differences in μ SBS between with and without etching, except for SE2 without bleaching, in which the μ SBS was significantly increased with phosphoric acid etching ($p < 0.05$).

[Conclusions] The enamel μ SBS values were adversely affected by the office bleaching. The two-step self-etch adhesive demonstrated significantly higher μ SBS values. Phosphoric acid etchant increased the μ SBS values only in the two-step self-etch adhesive without bleaching.



新規接着システム Clearfil Universal Bond Quick の歯質接合界面の観察

虎の門病院歯科

○陶山雄司, 山田敏元, 森上 誠, 宇野 滋, 杉崎順平

Interfacial Observation with a newly developed adhesive system “Clearfil Universal Bond Quick”

Department of Dentistry, Toranomon Hospital

○SUYAMA Y, YAMADA T, MORIGAMI M, UNO S, SUGIZAKI J

目的) 最近のレジン接着システムにおいては、臨床ステップを簡略化した all-in-one システムが普及しており、また歯面処理時間の短い製品も市販され注目されている。今回我々は、塗布後直ちに蒸散可能であり、かつ重合硬化性の向上を目指したシステムとして開発された Clearfil Universal Bond Quick (クラレノリタケデンタル) について歯質との接合界面の様相を SEM ならびに TEM を用いて観察を行い検討したので報告する。

材料および方法)

1. 歯質接合界面の SEM 観察

健全なヒト抜去大白歯を用い (虎の門病院研究倫理審査委員会 No.926 承認)、歯冠部エナメル質、象牙質を含む平坦面を切り出し、#1000 のシリコンカーバイドペーパーで仕上げた面を被着面とした。これらの被着面に対して、水洗、乾燥後 Clearfil Universal Bond Quick を塗布、直ちに弱～中圧エアードで乾燥し照射後、Clearfil Majesty ES flow Low (クラレノリタケデンタル) を充填して光硬化したものを接着試片とした。接着試片は水中に 24 時間保管後、垂直に切断され、接着界面が露出するようにエポキシ樹脂に包埋・硬化後研磨し、SEM 観察用の試料とした。試料はイオンシャワー装置 (EIS-200ER, エリオニクス) を用いて 1keV, 1.8mA/cm² の条件でアルゴンイオンエッチングを 25 秒間施した後、白金蒸着を行い、FE-SEM (ERA-8900FE, エリオニクス) を用いて硬化した Clearfil Universal Bond Quick と正常エナメル質、象牙質との接合界面の様相について観察、写真撮影を行った。

2. 歯質接合界面の TEM 観察

SEM 観察と同様の方法で接着試片を作製し、通報に従って 60-80nm の超薄切片を作製し、未脱灰・未染色の状態 JEM-200EX, JEOL を用いて Clearfil Universal Bond Quick と正常象牙質との接合界面の様相について TEM 観察を行い、写真撮影を行った。

結果ならびに考察)

SEM 観察像において Clearfil Universal Bond Quick は 5~10 μ m の幅で存在し、歯質との接合状態は極めて良好でエナメル質、象牙質との接合界面全面にわたってギャップの形成は認められなかった。象牙質との界面においては 0.5 μ m 以下の幅でアルゴンイオンによってより粗造感を増した層が観察され、この部分がハイブリット層であると考えられた。また、Clearfil Universal Bond Quick と Clearfil Majesty ES flow Low との界面に 1~2 μ m 厚の両者が混ざり合った層が観察された。

TEM 観察における象牙質との界面像においても同様に Clearfil Universal Bond Quick による脱灰の影響でアパタイト結晶が減少した象牙質表層にレジン成分が含浸したハイブリッド層が 200~300nm の厚で観察された。SEM 観察像で確認されたアドーシブとレジンの混合層は Clearfil protect liner F (クラレノリタケデンタル) との界面においては明瞭には観察されなかった。

結論)

本研究より、Clearfil Universal Bond Quick は歯質に対する良好な接着性能を有していることが明らかになり、臨床で使用するうえでも有望なコンポジットレジン充填システムであることが示唆された。

ポスト先端部と歯槽骨（皮質骨・海綿骨）の位置関係と荷重方向の違いが レジンコア築造歯の応力分布に与える影響

¹ 東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 う蝕制御学分野

² 東京医科歯科大学大学院 摂食機能保存学講座 部分床義歯補綴学分野

○畑山貴志¹ 千葉彩香¹ 貝ノ瀬典典¹ 中島正俊¹ 保坂啓一¹ 若林則幸² 田上順次¹

Stress distribution in tooth resin core build-ups with different post-end positions in alveolar bone level under two kinds of load directions

¹ Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

² Removable Partial Prosthodontics, Tokyo Medical and Dental University

○Takashi Hatayama¹, Ayaka Chiba¹, Kimisuke Kainose¹, Masatoshi Nakajima¹, Keiichi Hosaka¹, Noriyuki Wakabayashi², Junji Tagami¹

【目的】

近年、根管処置歯に対するファイバーポスト・コンポジットレジン支台築造法は、新しい接着材料の発展とともに広く使用されてきた。そのため、有限要素法（FEA）を用いてレジンコア築造歯の内部応力の解析が様々行われてきた。歯槽骨（皮質骨・海綿骨）とポスト先端部の位置関係による内部応力分布への影響はわかっておらず、またファイバーポストの効果に関しても未だ多くの議論がなされている。さらに、多くの FEA を用いた研究において荷重は咬頭に対して一方向から与えているものが多く、荷重方向の変化によるレジンコア築造歯内部の応力分布への影響の報告は少ない。本研究の目的は、FEA を用いてポスト先端部と歯槽骨の位置関係がレジンコア築造歯の内部応力に与える影響を調べ、また荷重方向の変化やファイバーポストの有無がそれらに対してどう影響するかを検討することである。

【方法】

根管治療後の下顎第一小臼歯歯根、歯根膜、歯槽骨（皮質骨・海綿骨）、根管充填材、レジンコアおよびセラミッククラウンからなる三次元モデルを製作した。各部は接着していると仮定し、弾性係数とポアソン比は報告されている実験値を引用した。残存歯根にフェールールは設置せず、ポスト窩洞深さは0mm、1mm（ポスト先端の位置は皮質骨縁上）、2mm（皮質骨縁と海綿骨縁の間）、3mm（皮質骨海綿骨の境界）、4mm（皮質骨海綿骨境界より1mm下）、6mm（皮質骨海綿骨境界より3mm下）と6群に設定し、3mm、4mm、6mmのモデルには直径1.7mmのファイバーポストを入れたモデルと入れないモデルを用意した。各モデルは近遠心で対称設定とし、約125,000の六面体要素に分割した後、頬側咬頭頂に頬側から（A方向）あるいは舌側から（B方向）斜め45°の角度で400Nの荷重をかけ、有限要素解析を行った。内部の相当応力分布、レジンコアと歯根の接着界面におけるせん断応力分布、さらに荷重負荷時のレジンコアの動きを調べるために、レジンコア内部の引張応力と圧縮応力の方向も分析した。

【結果】

- 1) 歯根・レジンコア内部：頬側咬頭に対する荷重を頬側からかけた場合（A方向）と舌側からかけた場合（B方向）を比較すると、歯根内部、レジンコアともに最大相当応力はA方向の場合は舌側歯頸部に位置し、B方向の場合は頬側歯頸部に位置し、B方向荷重時のほうが大きな値を示した。その値に対してファイバーポストの有無とポスト長さは影響しなかった。またポスト先端では大きな応力集中は認めなかったものの、先端の位置が皮質骨海綿骨境界に近づくにつれ相当応力は大きくなり、皮質骨内に位置するとまた小さくなった。
- 2) コア底面の接着界面：近遠心歯頸部において最大せん断応力を認めた。その値はファイバーポストの有無とポスト長さに影響されなかったが、荷重方向が変わると最大せん断応力の向きが真逆に変わった。ポスト側面では、ポスト上部の近遠心側面にせん断応力集中を認め、その値はファイバーポストの有無とポスト長さに影響されなかった。

【結論】

ポスト先端部の皮質骨・海綿骨に対する位置は、レジンコアのポスト先端の相当応力集中にとって重要な因子と考えられる。頬側咬頭への荷重方向の違いは、レジンコア内部や歯根内部の最大相当応力を示す位置や、その大きさを変えることがわかった。また、荷重方向の変化はコア底面の近遠心歯頸部に観測された最大せん断応力の方向を真逆に変化させ、それにより同部位での接着疲労破壊リスクを増加させる可能性があることが示された。ファイバーポストの埋入によるコア底面やポスト側面の接着界面、歯根側面やレジンコア歯頸内部への応力軽減効果は認められなかった。

ファイバーポスト用セルフアドヒーシブレジンセメントの 根管象牙質への初期接着挙動

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹⁾、総合歯学研究所生体工学研究部門²⁾
○瀧本正行¹⁾、黒川弘康^{1),2)}、崔慶一¹⁾、松吉佐季¹⁾、寺井里沙¹⁾、佐々木奈央¹⁾、
金丸壽良¹⁾、宮崎真至^{1),2)}

Determination of Early Bonding Characteristics to Root Canal Dentin of a Self-adhesive Resin Cement for Fiber Post

Department of Operative Dentistry¹⁾, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²⁾

Nihon University School of Dentistry

○TAKIMOTO Masayuki¹⁾, KUROKAWA Hiroyasu^{1),2)}, SAI Keiichi¹⁾, MATSUYOSHI Saki¹⁾, TERAJ Risa¹⁾,
SASAKI Nao¹⁾, KANAMARU Toshiro¹⁾, MIYAZAKI Masashi^{1),2)}

【研究目的】

ファイバーポストを用いた直接法レジン支台築造では、根管象牙質およびファイバーポストに対する前処理を適切に行う必要がある。一方、根管象牙質の形態は狭小かつ複雑であるところから、前処理によって象牙質表面に均質なアドヒーシブ層を形成することは容易ではなく、アドヒーシブ塗布後のエアブローが不足する条件では、アドヒーシブの重合性が低下する可能性も考えられる。このような臨床的背景のもと、ファイバーポストの植立にセルフアドヒーシブレジンセメントを応用することで、根管象牙質およびファイバーポストに対する前処理を不要とするシステムが市販された。そこで、根管処置を想定して処理を行った根管象牙質に対するセルフアドヒーシブレジンセメントの初期接着挙動について検討した。

【材料および方法】

ファイバーポストの植立に用いるセルフアドヒーシブレジンセメントとして RelyX Unicem2 Automix (3M ESPE) を、対照として、支台築造用コンポジットレジンシステムである Estelink と Estecore (トクヤマデンタル) および Self-Etching Bond と UniFil Core EM (ジーシー) を用いた。また、RelyX Unicem2 Automix と同一製造者のレジンセメントシステムである Scotchbond Universal Adhesive と RelyX Ultimate Adhesive Resin Cement (3M ESPE) についても同様に、比較検討した。

1. 被着面の調整

ウシ下顎前歯歯根部を歯頸部付近で歯冠部と離断した後、歯軸方向に縦断した。次いで、根管内象牙質が露出するよう常温重合レジンに包埋し、歯根の歯頸側 1/3 の部位に直径 5~7 mm の象牙質平坦面が得られるようにモデルトリマーを用いて研削した。この研削面を、耐水性 SiC ペーパーの#2,000 を用いて調整し、根管象牙質試片とした。

根管象牙質試片に対して以下の条件で処理を行ったものを被着面とした。

- 1) SiC ペーパー#600 を用いて研削 (コントロール群)
- 2) Control 群に対して 3%EDTA 水溶液 (スデアクリン, 日本歯科薬品) を 5ml 滴下し, 2 分間放置する。その後, 3%次亜塩素酸ナトリウム水溶液 (歯科用アンチホルミン, 日本歯科薬品) 用いて洗浄, 乾燥 (処置群)

2. 接着強さの測定

コントロール群および処置群の被着面を各製造者指示条件で処理した後、処理面に対して内径 2.38 mm の Ultradent 接着試験用治具を固定した。次いで、練和したセルフアドヒーシブレジンセメントあるいは支台築造用コンポジットレジンを治具に填塞し、30 秒間照射を行ったものを接着試験用試片とした。接着試験用試片を 37±1°C, 相対湿度 90±5% の条件で 10 分間, 1 時間, 12 時間および 24 時間保管した後、万能試験機を用いて剪断接着強さを測定した。

3. 走査電子顕微鏡観察

コントロール群および処置群とセルフアドヒーシブレジンセメントあるいは支台築造用コンポジットレジンとの接合界面について、通法に従って FE-SEM を用いて観察した。

【成績および考察】

コントロール群でのセルフアドヒーシブレジンセメントおよび支台築造用コンポジットレジンの根管象牙質への接着強さは経時的に上昇したが、その上昇傾向は製品によって異なるものであった。この要因としては、セルフアドヒーシブレジンセメント、支台築造用コンポジットレジンおよび前処理材の重合性などが影響したものと考えられた。

【結論】

ファイバーポスト用セルフアドヒーシブレジンセメントの根管象牙質に対する接着強さは接着初期から比較的安定した接着強さを示し、臨床有用性が示された。

光分解性 PRX を用いた新規可逆接着性レジンセメントの開発

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座う蝕制御学分野

²東京医科歯科大学学生体材料工学研究所医療基盤材料研究部門有機生体材料学分野

³東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再建工学分野

○松永悟美¹、高垣智博¹、松井七生子¹、有坂慶紀²、田村篤志²、
池田正臣³、二階堂徹¹、由井伸彦²、田上順次¹

The development of a new "reversible-adhesion" resin cement with a UV-cleavable PRX cross-linker.

¹Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University,

²Department of Organic Biomaterials, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,

³Oral Prosthetic Engineering, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

○MATSUNAGA Satomi¹, TAKAGAKI Tomohiro¹, MATSUI Naoko¹, ARISAKA Yoshinori², TAMURA Atsushi²,
IKEDA Masaomi³, NIKAIDO Toru¹, YUI Nobuhiko², TAGAMI Junji¹

[研究目的]

従来からレジンセメントを用いた接着技術の応用によって、歯質と歯冠修復物とが強固に一体化でき、その機能を長期的に安定して発揮することが可能となった。しかし、歯質接着材料は、歯の表面に浸透、重合すると、その撤去時には機械的に剥離、あるいは破壊しなければならないのが現状である。本研究では、環状分子である α -シクロデキストリン (α -CD) の空洞部をポリエチレングリコール (PEG) 鎖が貫通したポリロタキサンの超分子骨格に着目し、光分解性 PRX 架橋剤 (PRX, Fig. 1) を用いた新規レジンセメントを試作し、牛歯象牙質との接着強さを紫外光照射前後で検討したので報告する。

[材料及び方法]

ウシ下顎前歯唇面歯冠中央部に象牙質平坦部を露出し、耐水研磨紙 #600 にて研削後、表面処理材グリーン (サンメディカル) にて 10 秒間処理し、水洗、乾燥した。スーパーボンドモノマー液 (サンメディカル) に 0, 5, 10 wt%PRX を配合した試作モノマー液 (control, 5%PRX, 10%PRX) を作製した。各モノマー液 4 滴にキャタリスト V を 1 滴混和し、ポリマー粉末クリアを用いて筆積み法にて PMMA ブロックを牛歯象牙質に接着させた。試料は室温で 30 分放置後、37°C 水中に 24 h 保管した。その後、接着界面が 1.0×1.0 mm になるようにビーム状試片を作製した。各群半数の試料において紫外光照射 (254nm, UVF-204S type B, 三永電機製作所) を裏表各 1 分間行った後、小型卓上試験機 (EZ-SX, 島津製作所) にてクロスヘッドスピード 1 mm/min で微小引張り試験を行った。試験結果は two-way ANOVA & Tukey HSD test を用いて危険率 5% にて検定した。

[結果および考察]

微小引張り接着試験の結果を Fig. 2 に示す。5%PRX 群では control 群と比較して初期接着強さに有意な低下が認められたが ($p < 0.05$)、紫外光照射前後では有意差が認められなかった ($p > 0.05$)。10%PRX 群では、control 群に比べ、紫外光照射前において有意な接着強さの低下が認められた。一方、紫外光照射によって、接着強さが有意に低下した ($p < 0.05$)。

[結論]

試作レジンセメントにおいては、PRX を 10% 配合することで、紫外光照射により有意に接着強さの低下が確認された。

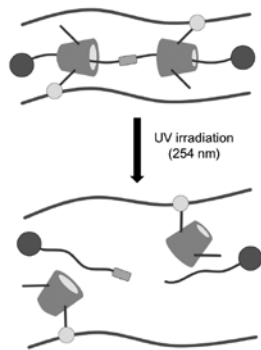


Figure 1. Chemical structure of a PRX-based UV-cleavable cross-linker.

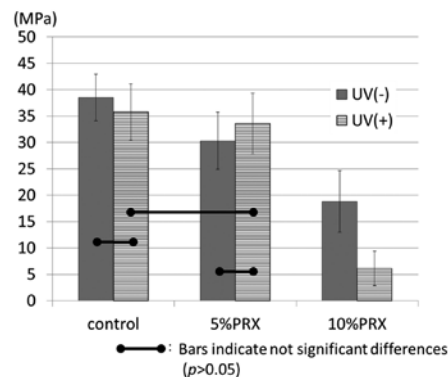


Figure 2. Means and S.D. of micro-tensile bond strength for all groups (n=20).

各種歯科材料に対する接着前処理に使用できる試作エッチャント液

山本貴金属地金株式会社

○坂本 猛, 水田 悠介, 木村 洋明

Trial etchant for pretreatment of adhesion for various dental materials

Yamamoto Precious Metal Co., Ltd.

○SAKAMOTO Takeshi, MIZUTA Yusuke, KIMURA Hiroaki

【目的】

一般に、接着メカニズムについて、簡単に、機械的結合、化学的相互作用、物理的相互作用の3つが提唱されている。このようなメカニズムを実現し良好な接着を達成する上で、歯科接着は難しい課題を抱える分野の1つである。例えば、材料表面の孔や谷間に液状接着材が入り込む代わりに、水や唾液などのタンパク質だけでなく、口腔内の雑菌によって、容易に接着対象が汚濁する。また、ジルコニアに対する接着において、リン酸エッチャント液による接着前処理により、ジルコニア表面にリン酸が吸着されることで、接着材に含まれる接着性モノマーとジルコニア表面との化学的相互作用が阻害され、強力な接着は達成できないことが報告されている。このように前処理材の用途を間違えると良好な接着を達成するための接着前処理が、かえって悪影響を生む結果となる場合もある。

このような観点で、歯科には、各材質の材料に関して専用の優れた性能のエッチャント液、プライマー、クリーナーはあるが、包括的に使用できる接着前処理材はほとんどない。とくに、歯質において、エナメル質と象牙質ではそれぞれ適したエッチャント液が存在し、前者では、リン酸を含む酸性の液材が挙げられ、後者は、リン酸より比較的酸性度の低いカルボン酸などを含む酸性の液材が挙げられる。リン酸エッチャント液を象牙質に対する接着前処理に使用すると、過度の脱灰によるコラーゲン線維の委縮などが起こり、接着材成分の浸透が起こりにくくなり、結果として、接着の不首尾の原因となる。したがって、エナメル質と象牙質が混在する窩洞にリン酸エッチャント液で処理する時は塗り分けが必要である。しかしながら、このような塗り分けは非常に煩雑かつ困難であり、接着システムの簡便化を図る上で包括的に使用できる接着系材料の研究が必要である。

本研究では、エッチャント液に着目し、酸性成分に水溶性リン酸モノマーを使用し、作成した試作エッチャント液を用いて、歯質と各材料に前処理材として適用しその性能を確かめた。

【方法および材料】

試作エッチャント液は、水溶性リン酸モノマーである11-メタクリロイルオキシテトラエチレングリコールジハイドロジェンホスフェート (M-TEG-P™) を使用し、溶媒としては水およびグリセリン、増粘剤としては、アエロジルを用いて作成した。各被接着材料に関して、牛歯、ジルコニア、金合金、銀合金およびレジン材料を用いた。接着方法は、被接着表面に塗布後、30秒放置した後、10秒間水洗し、接着材を使用して接着を行った。引張り試験は、小型卓上試験機 (Ez-Graph, 島津製作所社製) を用いて強度の評価を行った。

【結果】

試作エッチャント液の初期接着強さの評価によって、使用しない場合と比べ、エナメル質に対しても象牙質に対しても同等に有効であることを確認し、かつ、同じ試作でジルコニアに対しても有効であることが確認できた。さらに、金合金、銀合金やレジン材料に対しては、人工唾液によって被接着表面を汚濁させて、洗浄剤としての効果を評価した結果、どの材料も同等以上の効果あることが分かった。

これらの結果は試作に使用した M-TEG-P™ の機能性と各材料との化学的相互作用を考慮すると、本試作エッチャント液は、1) 歯質に対してはエッチャント液、2) ジルコニアに対してはプライマー、3) その他の材料に対してはクリーナーとして有効であると考えられる。したがって、本試作エッチャント液はどの各材料に対しても接着前処理材として有効であり、共通して使用可能であることが示唆された。

外傷による歯冠部の亀裂に対する歯面処理法の検討

¹奥羽大学歯学部歯科保存学講座保存修復学分野

²奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯内療法学分野

○山田嘉重¹, 木村裕一², 菊井徹哉¹

Investigation of tooth surface treatments for crown infraction by traumatic injury

¹Division of Operative Dentistry, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry

²Division of Endodontics, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry

OYAMADA Yoshishige¹, KIMURA Yuichi², KIKUI Tetuya¹

【緒言】

外傷受傷の程度により歯冠部歯質に亀裂が生じる場合がある。その場合では自発痛等の臨床症状が認められなくても亀裂を放置しておくことと亀裂の間隙からの細菌感染による歯髄疾患が生じる可能性がある。そのため軽度と思われる歯冠部の亀裂に対しても亀裂部の封鎖処置が必要と考えられる。しかしこれまで、亀裂に対する明確な処置法は確立されていない。本研究では、人工的に亀裂を形成したヒト抜去歯に対して幾つかの歯面処理法を施行し、その効果を検討した。

【材料および実験方法】

歯周病等の理由にて抜去された30本のヒト抜去中切歯を用いて(奥羽大学倫理審査委員会承認番号:第148号)、歯冠部にマイセルとマレットを用いて歯冠切縁側と平行方向に人工的に亀裂を起こさせた。亀裂作成後、亀裂表面に以下に上げる幾つかの方法を用いた。(1)スーパーボンドを筆積法にて亀裂部に塗布(2)スーパーボンドを混和法にて亀裂部に塗布(3)マルチボンドⅡを筆積法にて亀裂部に塗布(4)エステライトユニバーサルフローによる亀裂部の被覆(5)亀裂部へのボンドフォースの塗布を亀裂歯各5本ずつそれぞれに行った。また対照として未処置の亀裂歯の漏洩状態も観察した。各グループ亀裂部の封鎖処置終了後に全ての試料は5℃と55℃を1サイクルとした10000回のサーマルサイクリングを施行した。サーマルサイクリング終了後辺縁漏洩試験を行い色素の漏洩状態を実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡にて観察した。

【結果】

辺縁漏洩試験の結果、未処理では亀裂の深部まで色素漏洩が確認された。亀裂部に封鎖処理を施した各グループにおいて、MMA系のスーパーボンド、マルチボンドⅡを使用したグループでは色素漏洩の抑制効果が高かった。その中でスーパーボンドを混和法で塗布したグループにおいて色素の漏洩防止効果が最も良好な結果を示した。一方ボンディング材であるボンドフォースを用いたグループにおいても亀裂部からの色素漏洩防止効果は認められたがその効果は限定的であり、スーパーボンドやマルチボンドⅡを使用したグループには及ばなかった。同様にフロアブルコンポジットレジンによる亀裂部の被覆も漏洩防止効果はMMA系には及ばなかった。

【考察】

MMA系であるスーパーボンドやマルチボンドⅡにおいて他の処置法より高い亀裂部の封鎖効果が確認された理由としてMMA系レジンがコンポジットレジンやボンディング材より分子量が小さいことが起因しているものと推察される。これらMMA系レジンでは分子量が小さいため亀裂部の深部まで浸透したことが漏洩防止効果を向上させたものと考えられる。また光重合様式であるコンポジットレジンやボンディング材は、亀裂深部の重合が不十分であった可能性が考えられる。一方スーパーボンドやマルチボンドⅡは化学重合による重合様式なので、亀裂深部まで確実に重合したことも結果の違いに現れた可能性がある。さらに筆積法より混和法において亀裂部からの漏洩防止効果が高かったことから、塗布法の違いによっても亀裂部の封鎖効果に差が生じることが確認された。

本研究結果により、亀裂部は無処置であると亀裂部の深部まで細菌感染を生じてしまう危険性が示唆された。また亀裂部の封鎖処置では、従来のコンポジットレジン系による封鎖を試みるのではなく、MMA系のレジンであるスーパーボンドやマルチボンドⅡを亀裂部の封鎖に応用することが効果的であることが確認された。さらにその効果を向上させるためには筆積法による封鎖ではなく、亀裂深部まで浸透し易くなる混和法が有効であると思われる。しかしまだ検討した歯の数が限られているため、今後はさらに本数を増やし、亀裂部の最適な封鎖法の検討を続けていく必要が考えられる。

Ex vivo モデルを用いた結核菌表層糖脂質誘導体 (ビザンチン) の バイオフィーム形成への影響

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔健康科学講座う蝕学分野

²京都薬科大学薬学部 微生物・感染制御学分野

○長谷川泰輔¹、竹中彰治¹、小田真隆²、鈴木裕希¹、坂上雄樹¹、大墨竜也¹、野杵由一郎¹

Effect of Vizantin on initial supragingival biofilm formation: An ex vivo study

¹Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

²Department of Microbiology and Infection Control Science, Kyoto Pharmaceutical University

○HASEGAWA Taisuke, TAKENAKA Shoji, ODA Masataka, SUZUKI Yuki, SAKAUE Yuuki, OSUMI Tatsuya, NOIRI Yuichiro

【目的】

我々は第 145 回本学会において、結核菌表層糖脂質誘導体(ビザンチン; Viz)存在下で形成した *Streptococcus mutans* バイオフィームは、*gtf* 群の遺伝子発現量のバランスが変化することで構造安定性が低下し、易剥離性となることを報告した。さらに、付着に関与する遺伝子群の発現が変化することで、Viz でコーティングしたハイドロキシアパタイト(HA)表面への付着能が低下することから、新しい BF 制御剤として有用である可能性を報告した。本研究では、Viz の歯肉縁上バイオフィーム細菌に対する抗バイオフィーム効果について *ex vivo* モデルを用いて検討した。

【材料及び方法】

上顎臼歯部頰側面とう蝕、歯肉炎および修復歴がない健常者のうち、本研究の趣旨を説明し協力の同意を得た 3 名を被験者とした(承認番号 25-R16-08-15)。同部を PMTC ののち、2 日間すべての機械的清掃を中止した。2 日後、歯肉縁上バイオフィーム(BF)を採取し洗菌後、細菌懸濁液(BS)を調製した(OD₆₀₀=0.05)。

(実験 1 : Viz 存在下でのバイオフィーム形成) 24 穴マイクロプレートを用い、0~100 μM の Viz を添加した 0.5% スクロース含有 Brain Heart Infusion(BHI) 2ml 中に細菌懸濁液(10μl)を加えて、12 および 24 時間嫌気培養することで BF を形成させた。BF 量はクリスタルバイオレット(CV)法にて定量した。BF 形態は Live/Dead BacLight Bacterial viability kit もしくは Calcein-AM および Rhodamin-B により蛍光染色を施した後、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を用いて観察した。

(実験 2 : Viz 処理界面への細菌付着と BF 形成) HA(オリンパスバイオマテリアル社)を Viz 溶液 (0-200 μM) に 1 時間浸漬させたのちフローセルチャンバー (IBI Scientific 社製) に装着した。PBS もしくは無刺激唾液をチャンバー内に送り込み 1 時間静置したのち、BS (OD₆₀₀=0.025) を送り込み 30 分静置した。その後、1/10 濃度 BHI(0.05%スクロース含有)を毎分 2 ml の速度で 24 時間灌流し BF を形成させた。形成した BF の形態を SEM にて観察した。

また、HA の Viz 処理界面に対する付着抑制効果を検討するため、BS を 2 時間灌流後に HA を回収し、コロニーカウント法にて付着細菌数を計測した。

【結果】

最大 50 μM までの Viz 存在下では BF 形成が観察されたが、100 μM 添加条件下ではマイクロプレートへの付着が抑制された。50μM の Viz 存在下で形成した BF は脆弱であり、ピペッティングにより容易に BF 構造が剥離し、BF 量はコントロール群と比較して有意に低かった (p<0.05, Kruskal-Wallis H test, Dunnett's post-hoc test)。Live/Dead 染色像では、各濃度の Viz 存在でも 99%以上が生菌であり、少なくとも最大 50μM までの Viz には殺菌効果がないと思われた。Calcein-AM/Rhodamin-B 染色像から解析した付着界面の BF 量(占有%)は、それぞれ 77.8±2.5(コントロール群)、52.9±6.3(5μM)、29.1±4.4(10μM)および 1.6±0.8(50μM)であり、濃度依存的に有意に BF 残存量が低下した(p<0.05, Kruskal-Wallis H test, Steel-Dwass test)。

Viz 処理界面上に形成した BF の SEM 観察において、各処理濃度とも HA 全面に細菌付着が観察され、BF 形成抑制効果はないように思われた。2 時間灌流後の HA 上の付着細菌数も有意な差は認められなかった(p>0.05)。

【考察および結論】

50μM 以上のビザンチン存在下において、ヒトの歯肉縁上 BF 細菌の付着や BF 形成因子に何らかの影響を与えることで、BF を易剥離性に変化させ、口腔細菌叢を変動させない新しい BF 制御剤の候補物質として有用である可能性が示された。

一方で、Viz 処理界面への細菌付着および BF の形成抑制効果が認められなかったことから、低濃度での細菌の付着に与える影響は菌種により変動すると推察され、付着界面に高濃度 Viz を滞留させる工夫が必要と思われた。

細菌叢が異なるバイオフィルムに対する S-PRG 溶出液の抗菌効果

神奈川歯科大学大学院歯学研究所 口腔制御修復学分野¹, 微生物感染学分野², 神経組織発生学分野³,
クリニカル・バイオマテリアル分野⁴, ACTA⁵

○富山 潔¹, 石澤将人¹, 長谷川晴彦¹, 渡辺清子², 河田 亮³, 二瓶智太郎⁴,
高橋 理³, 浜田信城², Exterkate R.A.M.⁵, 向井義晴¹

Antibacterial effects of S-PRG eluate on polymicrobial biofilms with different microbial community structure

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

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

⁵Department of Preventive Dentistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), The Netherlands

○ TOMIYAMA Kiyoshi¹, ISHIZAWA Masato¹, HASEGAWA Haruhiko¹, WATANABE Kiyoko², KAWATA Akira³, NIHEI Tomotaro⁴,
TAKAHASHI Osamu³, HAMADA Nobushiro², EXTERKATE R.A.M.⁵, MUKAI Yoshiharu¹

【研究目的】口腔バイオフィルム中の齲蝕原菌や歯周病原因菌の割合を生体に害を及ぼさず、しかも持続的に抑制できる抗菌薬を開発することは重要である。近年、次世代シーケンサーを用いた菌叢解析法が、腸内、口腔内、食品中、土壌、河川、海洋中の細菌叢に対して応用されるようになり、この手法を用いれば、これまで見ることのできなかったフローラの深部に焦点を当てることが可能である。S-PRG 溶出液は、フルオロボロアルミノシリケートガラスを水の存在下でポリアクリル酸と反応させた surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラーを蒸留水に懸濁して各種イオンを溶出させた上清である。我々は、S-PRG 溶出液を混入させた培養液でバイオフィルムを 48 時間培養した場合、pH drop およびバイオフィルム形成量が抑制され、細菌叢が異なっていることを第 145 回本学会において報告した。

今回、S-PRG 溶出液が細菌叢の異なったバイオフィルムの構造にどのような影響を及ぼしているのかを分析する目的で、バイオフィルム群集構造の網羅的分析を行った。

【実験材料および方法】PMバイオフィルム形成用材料には直径12 mm厚さ150 μmのガラス円板 (Menzel, Braunschweig, Germany) を用いた。処理剤には、S-PRG溶出液を用いた。実験群は、① 0.2% sucrose 培養群 (0.2S), ② 2% sucrose 培養群 (2S), ③ 4% sucrose 培養群 (4S), ④ 20% sucrose 培養群 (20S), ⑤ 4% sucrose培養S-PRG溶出液処理群 (4SPRG), ⑥ 20% sucrose培養S-PRG溶出液処理群 (20SPRG) の6群とした。PMバイオフィルムの培養には、一被験者から採取した刺激唾液を用いた。培養液にはunbuffered McBain 2005 (0.2, 2, 4, 20% スクロース含有) を用い、50倍希釈となるように刺激唾液を混入した。培養液の交換は10時間、14時間のサイクルで行ない、培養48時間の時点で非処理群(0.2S, 2S, 4S, 20S)と、S-PRG溶出液に5分間浸漬する処理群 (4SPRG, 20SPRG) に分けて分析を行なった。[実験1] バイオフィルム群集構造の網羅的分析: バイオフィルムからDNA抽出後 (MORA-EXTRACT kit), 16S rDNAを標的とし、プライマーとしてPro341F-Pro805Rを用いて、次世代シーケンサー (MiSeq™, Illumina, USA) により次世代シーケンス・アンプリコン解析を行ない、網羅的分析を行った。サンプル間の比較解析は、Metagenome@KIN software (World Fusion) を用いて、主成分分析およびクラスター解析により、各群のバイオフィルム構造にどのような変動が生じているのかを比較、検討した。[実験2] 培養液交換時に、使用済み培養液のpH測定を行なった (9618-10D, F-71, Horiba, Kyoto, Japan)。

【結果】 実験1: 48時間培養したPMバイオフィルムにS-PRG溶出液による処理を行った結果、2Sと4S, 20SPRGの間のバイオフィルム群集構造間には差が認められなかったが、0.2Sと他群間には明瞭な差が認められ、4SPRGと2S, 4S, 20S, 20SPRG間や、2S, 4Sと20S, 20SPRG間にも、一定の差が認められた。0.2S群の構成菌は *Streptococcus salivarius*, *Veillonella dispar*, *Veillonella tobetsuensis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus sinensis*, *Streptococcus intermedius* が主体であったが、2S群では、*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus parasanguinis* の割合が、4S群では、*Streptococcus gordonii* の割合が増加していた。実験2: 使用済み培養液のpHは7.03から6.92の間で推移し、ほぼ中性環境を維持していた。

【考察および結論】 中性環境でスクロース濃度が0.2%から2%まで増加した場合、*Veillonella* 属が減少し、4%まではS-PRG溶出液処理の効果を認めるが、20%まで増えた場合、細菌叢の変化を伴い、効果が及びにくいことが示された。*St. mutans* バイオフィルムを対象とした研究 (Jian-Na Cai et al. Plos one 2016) では、0.45% sucrose をピークに生菌数が上限に達し、その後、濃度を上げても、徐々に生菌数が下降していくと報告されている。今回、多菌種を含むバイオフィルムでは、pHが中性付近に維持されている場合でもスクロース濃度の上昇とともに菌叢に変化を伴い、抗菌剤の効果にも影響を与えていることが示された。

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

脂肪由来幹細胞を用いた歯周組織再生療法の開発：
マイクロミニブタを用いた他家移植モデルの確立

¹東北大学大学院歯学研究科口腔修復学講座歯科保存学分野、²大阪大学大学院歯学研究科歯周病分子病態学分野
○V. Venkata Suresh¹、半田 慶介¹、竹立 匡秀²、村上 伸也²、齋藤 正寛¹

Development of periodontal tissue regeneration therapy by Allogeneic transplantation of adipose derived stem cell

¹Department of Restorative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, ²Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○V. Venkata Suresh, Keisuke HANDA¹, Kunihide TAKEDACHI², Shinya MURAKAMI², Masahiro SAITO¹

Background and Purpose:

The ultimate goal of periodontal disease treatment is the reorganization of functional tissue by the application of stem cells, cytokines and extracellular matrices that can regenerate the lost or damaged periodontal tissue. Regeneration of periodontal tissues are being clinically possible by using autogenic transplantation of mesenchymal stem cells (MSC) which can differentiate into PDL cells, cementoblast and osteoblast, stem cells. Recent advances revealed that efficacy of allogeneic MSC transplantation for the treatment of autoimmune diseases or graft-versus host disease by using their potent immunomodulatory activity which regulating the balance between immune suppressive genes and inflammatory cytokines. These findings suggested that allogeneic MSC transplantation could promote regeneration of damaged periodontal tissues by preventing inflammatory condition. To address these, we develop allogeneic transplantation model for periodontal tissue regeneration using pig derived Adipose tissue-Derived Multi-lineage Progenitor Cells (pADMPC).

Materials and Methods:

1. Isolation and characterization of pADMPC: pADMPC was isolated from greater omentum of micro-mini pig(2014DnA-036-3). Flow cytometry analysis was performed to analyze the MSC marker expression on pADMPC. Osteogenic, adipogenic and periodontal ligament differentiation ability was investigated to assess multi-lineage differentiation ability. Pig gingival fibroblast was also isolated from gingival tissue of micro-mini pig and used as control group.
2. Exposure of pADMPC to inflammatory condition: To investigate the immune-modulatory activity of pADMPC, cells were cultured with cytokine cocktail containing interferon(IFN)- γ , tumor necrosis factor(TNF)- α and interleukin (IL) -6 for 7 days.
3. Cell proliferation assay: To investigate the effect of inflammatory cytokines on cell growth of pADMPC, cells cultured with cytokine cocktails were examined for cell proliferation using cell counting kit -8 (CCK-8).
4. Gene Expression analysis: To assess the immunosuppressive effect of pADMPC, realtime PCR was performed in cells cultured with and without cytokine cocktail and investigated the expression of immune suppressive factors, guanylate binding proteins(GBP4), C-X-C motif chemokine (CXCL10) and IL1 receptor antagonist, and inflammatory cytokines IL-10, IL-6, IL-17 and TNF - α .

Results and Discussion: Flow cytometry analysis confirmed pADMPC express MSC related surface antigen such as CD44 and CD73. pADMPC exhibited osteogenic and adipogenic differentiation as they formed calcified nodule formation, alkaline phosphatase activity, expression of osteogenic related genes and large lipid droplets stained with oil O red in the induced cells. pADMPC also differentiated into PDL like cells as they expressed asporin, periostin, type I collagen and lumican. Cell proliferation of pADMPC was not affected by inflammatory condition that promoted by the treatment of cytokine cocktail. Realtime PCR analysis revealed that pADMPC was highly expressed CXCL10 along with down-regulation inflammatory cytokines IL-10, IL-6, IL-17 and TNF- α compared with those of mini-pig derived gingival fibroblast. No significant changes were observed in the expression of GB4 and IL1RA. These result suggest that pADMPC has a inflammatory suppressive abilities that express immune suppressive gene and survive in the presence of inflammatory cytokines.

Conclusion:

These findings suggest that, pADMPC obtained from micro-mini pig have the potent ability to enhance immunosuppressive capacity under inflammatory conditions. Our data demonstrated that ADMPC could be a useful tool as a source of allogeneic cell transplantation for development of periodontal tissue regenerative therapy.

マクロファージ周期的伸展刺激は NLRP3 インフラマソームを介した IL-1 β の分泌を抑制する

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
○丸山 顕太郎、須藤 瑞樹、向阪 幸彦、金谷 聡介、根本 英二

Cyclic mechanical tensile force inhibits NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in murine macrophages

Department of Oral Biology Division of Periodontology and Endodontology,
Tohoku University Graduate School of Dentistry

○Kentaro MARUYAMA, Mizuki SUTO, Yukihiro SAKISAKA, Sousuke KANAYA, Eiji NEMOTO

【目的】

歯周組織は咬合により生じる圧縮力や伸展力といったメカニカルストレスを受容し、様々な生化学的反応に変換することで、その恒常性を維持している。特に歯根膜組織においては線維芽細胞のみならず、マクロファージにおいてもメカニカルストレスを受容していると考えられるが、歯周組織の恒常性維持における役割は不明である。

サイトカインネットワークにおいて、IL-1 β による刺激はその下流で様々な炎症性サイトカインや炎症性メディエーターなどの発現を誘導し、さらにはメタロプロテアーゼや破骨細胞分化因子 (RANKL) などの発現の誘導を介して組織破壊に関与している。IL-1 β の分泌は、caspase-1 の活性化による pro-IL-1 β から活性型 IL-1 β に変換、すなわち NLRP3 インフラマソームという分子複合体を介することが知られている。歯周病原菌の影響を受けている歯周組織においては、インフラマソームを介した炎症反応の惹起が報告されているが、メカニカルストレスとの関連に関しては不明な点が多い。そこで本研究では、生理的咬合を模倣条件とした周期的伸展刺激がマクロファージ NLRP3 インフラマソーム情報伝達系に及ぼす影響について検討した。

【方法】

1.細胞培養および機械的伸展刺激

マウスマクロファージ様細胞株 J774.1(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)を 10% FBS RPMI1640 培地にて継代培養し実験に用いた。J774.1 を、300 μ g/ml の Type I 膠原蛋白 (KOKEN Co.) にてコーティングしたシリコンチャンバーに播種し、24 時間後に刺激を行った。周期的伸展刺激は、STB-140 STREX cell stretch system (STREX Co.) を使用し、生理的咬合を模倣した条件として伸展率 20%、10/60 Hz の条件下で行った。

2.NLRP3 インフラマソーム活性化刺激および機械的伸展刺激の付与

シリコンチャンバーにて 24 時間培養した J774.1 を *Escherichia coli* 由来の LPS (100ng/ml) で刺激し、4 時間後に 1mM ATP を添加し、その 2 時間後に細胞および培養上清を回収した。周期的伸展刺激は LPS 刺激と同時に開始し、最初の 2 時間のみ行った。Total RNA を回収する場合は、刺激開始から 4 時間後に回収した。

3.NLRP3 インフラマソーム関連因子の解析

培養上清中の IL-1 β は ELISA 法にて測定した。NLRP3 インフラマソーム関連遺伝子 (IL-1 β , caspase-1, NLRP3, ASC) は RT-PCR 法にて解析した。培養上清中の IL-1 β , caspase-1, IL-6, TNF- α および、細胞抽出物中の pro-IL-1 β , pro-caspase-1, NLRP3 のタンパク発現、I κ B のリン酸化は Western Blot 法にて解析した。Caspase-1 の活性化は FAM-FLICA Caspase Assay Kits (ImmunoChemistry Technologies) を使用し、蛍光顕微鏡にて解析した。

【結果】

LPS 刺激された J774.1 に ATP 刺激を加えると IL-1 β の分泌が認められたが、周期的伸展刺激を加えると、培養上清中の IL-1 β 量が有意に減少した。NLRP3 インフラマソーム関連遺伝子の発現とインフラマソーム関連タンパク質の発現は周期的伸展刺激の影響を受けなかった。IL-6 および TNF- α の産生と、I κ B のリン酸化は周期的伸展刺激の影響を受けなかった。Caspase-1 の活性化に関しては、周期的伸展刺激を加えた場合、培養上清中の caspase-1 発現が減少し、caspase-1 陽性細胞の割合も減少した。

【結論】

本研究の結果から、マクロファージの周期的伸展刺激は、NLRP3 インフラマソーム活性化を抑制することで活性型 IL-1 β の分泌を抑制することが示唆された。本研究の結果は、歯周組織の恒常性維持において生理的な咬合の重要性を提起するものであり、今後さらにその分子メカニズムの詳細な解明が必要である。

流水式超音波歯垢除去器によるインプラントフィクスチャー表面のバイオフィーム除去効果

昭和大学歯学部歯周病学講座
○滝口尚 山田純輝 山本松男

Effect of removal of biofilm using by ultrasonic water flow plaque removing device from implant
fixture

Department of Periodontology, Showa University School of Dentistry
○Takashi Takiguchi, Junki Yamada, Matsuo Yamamoto

【背景および研究目的】

近年、欠損補綴に対するインプラント治療が普及し患者の多くはその恩恵を受けるようになった。しかし、インプラント治療を受けた患者の約40%はインプラント周囲炎に罹患すると報告もある。そのため、インプラント周囲炎の原因の1つであるバイオフィームの除去は欠かせない。一方、インプラント周囲炎の治療には、超音波スクレーパーやエアージェットと様々な治療方法が用いられているが、インプラント体表面への機械的損傷もあり、効果的なバイオフィーム除去方法は確立されていない。これまでに我々は、流水中の水分子に加速度エネルギーを印加した流水式超音波洗浄方法のバイオフィーム除去効果を報告してきた。そこで、本研究ではインプラント治療を受けている患者を対象に流水式超音波歯垢除去器のバイオフィーム除去効果と、ミニブタ口腔領域での安全性を評価した。

【材料と方法】

バイオフィーム除去効果はランダム化クロスオーバー比較試験とした。被験者はインプラント治療を受けている(フィクスチャー埋入済)10名の患者を対象に、埋入済フィクスチャーに粗面アバットメントを3日間装着し、表面にブラークを付着させた。その後、流水式超音波歯垢除去器(周波数345kHz、印加電力10W、水量毎分300ml:ジーシー社)またはブラシコーン(750rpm)を用いて各60秒間バイオフィームの除去を行った。評価方法は、術前、前後の残存バイオフィームの割合を光学画像を用いて算出し、電子顕微鏡観察(SEM)も行った。術中の疼痛、振動・音に対する不快感には100mmVASを用いて評価した。ミニブタ口腔領域の安全性の評価は、歯肉、歯髄、舌組織を対象に印加電力0Wまたは10W、180秒間作用後の病理組織学的検査を実施した。

【結果】

バイオフィームの除去効果は、術前のバイオフィーム残存率100%に対し、流水式超音波歯垢除去器は約35%、ブラシコーンは約50%であった。また各表面をSEMで観察すると、機械的損傷が無いことも観察された。疼痛の評価は流水式超音波歯垢除去器 9.4 ± 20.0 mm、ブラシコーン 1.0 ± 1.4 mmであった。ミニブタ歯肉組織は印加電力0W、10Wの条件下においても単核細胞浸潤は観察された。また、歯肉組織、舌及び歯髄組織は水腫等の急性炎症は観察されなかった。

【考察】

本研究より、流水式超音波歯垢除去器は、術前と比較して有意にバイオフィームを除去できることが確認され、この効果はブラシコーンと同等であった。流水式超音波歯垢除去器は、歯肉、舌及び歯髄のいずれの組織においても、印加電力10Wで組織学的変化がみられなかったことから、口腔領域へのダメージはないと考えられた。このことから、流水式超音波洗浄技術は、インプラント体からバイオフィームを除去するのに応用できる原理と考えられる。

(昭和大学歯学部医の倫理委員会承認 承認番号2014-014)

(昭和大学動物実験委員会承認 承認番号16083)

試作リン酸化プルラン含有 MTA 根管充填用シーラーの根尖封鎖性

1 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室, 2 生体材料工学教室
○大寫理紗¹, 下地伸司¹, 菅谷 勉¹, 吉田靖弘²

Apical sealing ability of trial phosphorylated pullulan-MTA root canal sealer

1 Department of Periodontology and Endodontology, 2 Department of Biomaterials and Bioengineering,
Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine
○Risa Oshima¹, Shinji Shimoji¹, Tsutomu Sugaya¹ and Yasuhiro Yoshida²

【研究目的】

Mineral trioxide aggregate (MTA)は、優れた硬組織形成能や抗菌性を有するが、操作性が悪く、歯質接着性がないため、根管充填に用いることは困難である。そこで、ハイドロキシアパタイトに接着する多糖誘導体であるリン酸化プルランを MTA に添加したリン酸化プルラン含有 MTA 根管充填用シーラーを試作し検討を行ってきた。これまでに、試作リン酸化プルラン含有 MTA 根管充填用シーラーの封鎖性は根管壁の乾燥状態に影響されないこと、長期間高アルカリ性が持続することなどを報告してきた(第 144 回日本歯科保存学会学術大会 2016, 第 37 回日本歯内療学会学術大会 2016)。本研究の目的は、リン酸化プルラン含有 MTA 根管充填用シーラーを用いて根管充填した後の根尖封鎖性を fluid filtration method を用いて明らかにすることである。

【材料および方法】

ヒト抜去単根歯を根管長 15.0mm になるように歯冠を切除し、0.02 テーパーK ファイル(ジーシー)を用いて#25 まで根尖孔を穿通、作業長 14.0mm で#40 まで根管形成して、17%EDTA および 10%次亜塩素酸ナトリウムで根管洗浄後水洗し、ペーパーポイントで乾燥した。根管充填はシーラーとガッタパーチャポイントを用いて側方加圧充填法で行った。シーラーには、試作リン酸化プルラン含有 MTA 根管充填用シーラー(ジーシー)、AH プラス(デンツプライ)、MTA フィラベックス(アンジェラス)およびキャナルス N(昭和薬品化工)を用いた。根管充填後、湿度 100%、37°C で 24 時間保存し、根尖孔を除いた歯根表面をネイルバーニッシュで被覆、fluid filtration method を用いて 200mmH₂O で 2 時間、根尖部から 0.5%塩基性フクシン溶液を浸透させた。さらに、fluid filtration method 後、歯根を歯軸方向に切断して根尖からの色素液侵入状態をデジタル顕微鏡下で観察した。統計学的分析は Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney U test with Bonferroni correction を行った ($p < 0.05$)。なお、本研究は、北海道大学大学院歯学研究科臨床・疫学研究倫理審査委員会の承認を得て行った(2016 第 2 号)。

【結果と考察】

試作シーラーの色素液侵入量は、AH プラスと同程度で、MTA フィラベックスおよびキャナルス N よりも有意に少なかった。また、シーラーのみで充填されていたアピカルストップより根尖側は、試作シーラーでは色素液の侵入がみられなかったが、他のシーラーでは色素液の侵入が認められた。これは、試作シーラーは MTA にリン酸化プルラン等を添加したことによりシーラーとしての適切な操作性が得られたこと、ペーパーポイントが届かず乾燥が不十分な部位や、加圧できない部位でも高い封鎖性が得られることを示すものと考えられた。

【結論】

試作リン酸化プルラン含有 MTA 根管充填用シーラーを用いた根管充填後の根尖からの色素液侵入量は、MTA フィラベックスおよびキャナルス N を用いた場合より少なかった。

テーパーの異なるニッケルチタンファイルにおける機械的特性
—根管のトランスポートと根管形成時に生じる応力の解析—

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院歯学総合研究科口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野
○福森洋平, 西条美紀, 時田大輔, 宮良香菜, 海老原新, 興地隆史

Comparative evaluation of mechanical properties with different tapered nickel-titanium files
- analysis of canal transportation and stress generation during instrumentation -

Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

○FUKUMORI Yohei, NISHIJO Miki, TOKITA Daisuke, MIYARA Kana, EBIHARA Arata, OKIJI Takashi

【研究目的】各種のニッケルチタンファイルの機械的特性を検討した報告は多いが、同じ号数でテーパーの異なるファイルを比較した報告は少ない。われわれはすでに回転疲労、曲げ疲労を評価し、平成 28 年度春季大会 (第 144 回) で報告した。今回は根管のトランスポート量と根管形成時に生じる応力に対するテーパーの影響を評価した。

【材料および方法】被験ファイルとして EndoWave (モリタ; 先端径 0.3 mm) を用い、0.04 テーパー, 0.06 テーパーの器具 (それぞれ 0.04 群, 0.06 群; 各実験についてそれぞれ n=7) を実験に供した。

1) トランスポート量: J 字型透明湾曲根管模型 (エンドトレーニングブロック, DENTSPLY Maillefer, Switzerland) を使用した。K ファイル (Zipperer, Germany 以下, 「SS」) で #25 まで拡大後、両群とも Dentaport ZX (モリタ) を連続回転 (300rpm) で同一術者が根管形成を行った。形成前後の模型をデジタルマイクロスコープ (VH-8000, キーエンス) で撮影後、画像を Photoshop 7.0® (Adobe Systems, USA) で重ね合わせ、根尖部より 0, 3, 6 mm における内湾部, 外湾部の根管の中心からの形成量と各群のファイルの半径との差をトランスポート量として計測した。また、根管形成に要した時間を作業時間として計測した。また、ファイルの変形と破折を目視で確認した。

2) 応力解析: 透明直線根管模型 (END3L001, ニッシン) を使用した。SS で #25 拡大後、両群とも可動式ステージ (MX2-500N; イマダ) に固定された試作型 Dentaport ZX (モリタ) を 300 rpm で連続回転させ根管形成を行った。ステージは 10 mm/min で 2 秒下降し、1 秒上昇する運動を繰り返す設定とした。自作応力解析装置を用い、根管形成時の垂直方向応力 (apical force) および回転方向応力 (torque) を計測し、平均値で評価を行った。apical force 計測にトルクセンサー (LUX-B-ID; 共和電業), torque 計測にはストレインゲージ (KFG-2-120-D31-11; 共和電業) を用いた。

3) 統計学的解析: Mann-Whitney U-test を用い、有意水準 5% で解析した。

【結果および考察】トランスポート量の結果を Table 1 に示す。0.04 群では、先端から 3 mm 外湾側と 6 mm 内湾側にて、0.06 群に比べ有意に平均のトランスポート量が小さかった。これはすでに報告したとおり 0.04 群が 0.06 群に比べ曲げ疲労抵抗性が高く、高い柔軟性を有するため根管追従性が高いと考える。作業時間は 0.04 群において 183.71 ± 23.56 秒, 0.06 群において 262.86 ± 109.57 秒で両群間に有意差を認めなかった。また両群ともファイルの変形と破折は認められなかった。

一方, apical force (N) の平均値は正領域 (根尖方向) において 0.04 群では 0.14 ± 0.06 , 0.06 群では 0.26 ± 0.14 , 負領域 (根管口方向) で 0.04 群では -0.11 ± 0.06 , 0.06 群では -0.10 ± 0.04 であった。どちらの領域でも両群に有意差を認めず、両群とも同等のファイルの進行方向への押し込みおよび "Screw-in-effect" が生じたと考える。torque (N・mm) の平均値は正領域 (正回転方向) で 0.04 群では 0.41 ± 0.18 , 0.06 群では 2.43 ± 0.67 , 負領域 (逆回転方向) で 0.04 群では -0.14 ± 0.09 , 0.06 群では -0.12 ± 0.06 であり、正領域で 0.04 群が 0.06 群に比べ有意に低くなった。これは 0.04 群の切削量が 0.06 群の切削量に比べ小さいためと考える。

【結論】本条件下では 0.06 群に比べ 0.04 群はトランスポート量が少なく、低トルクで根管形成が行なえることが示唆された。

Table 1 Mean (\pm SD) canal transportation (mm) values for the two groups at three levels

	0 mm	3 mm	6 mm		0 mm	3 mm	6 mm
0.04 outer	0.05 ± 0.14	0.09 ± 0.06	-0.16 ± 0.05	0.04 inner	-0.09 ± 0.03	-0.02 ± 0.07	0.01 ± 0.05
0.06 outer	0.20 ± 0.16	0.22 ± 0.09	-0.18 ± 0.07	0.06 inner	-0.08 ± 0.03	-0.07 ± 0.07	0.06 ± 0.05

Groups with the same letters are significantly different ($p < 0.05$)

ニッケルチタンロータリーファイルの上下動速度が根管形態に与える影響

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野
○牧圭一郎, 時田大輔, 木村俊介, 西条美紀, 宮良香菜, 海老原新, 興地隆史

The effect of the speed of up-and-down motion of nickel titanium rotary files on root canal shape

Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

○MAKI Keiichiro, TOKITA Daisuke, KIMURA Shunsuke, NISHIJO Miki, MIYARA Kana,
EBIHARA Arata, OKIJI Takashi

【目的】ニッケルチタンロータリーファイル (以下「ファイル」) の臨床使用において, 形成中の上下動の速度に明確な指標はない. 根管形成時に根尖部へのファイル接触回数が増えるほど, 根尖部が拡大すると報告されているが (Jeon *et al.* JOE. 2014), ファイルの上下動速度と根管形態の関係性についてはいまだ検討されていない. そこで, 3種類 (10, 50, 100 mm/min) の上下動速度で根管形成を行い, その相違が根管形態に与える影響について比較検討した.

【材料および方法】1. 根管形成: 作業長 17 mm の J 字型透明根管模型 (Dentsply Maillefer, Switzerland, 以下「根管模型」) に対し, 改造した Dentaport ZX (J MORITA) を使用した自作型自動根管形成装置 (以下「根管形成装置」) を用い, ProTaper SX shaping file (Dentsply Maillefer, Switzerland, 以下「SX」) を用いて根管口から 12 mm まで根管上部形成を行ったのち, 手用の stainless steel K file (Zipperer, Germany, 以下「SS」) の #10, 15 にてグライドパス形成を行った. その後, ProTaper NEXT® Rotary Files (Dentsply Maillefer, Switzerland, 以下「PTN」) を X1, X2, X3 の順で, 根管形成装置を用いて, 連続回転 (300 rpm), 2 秒間根尖側方向, 1 秒間歯冠側方向に上下動を繰り返すよう設定して作業長まで形成した. PTN は単回使用とした. 実験群は, 低速群 (10 mm/min), 中速群 (50 mm/min), 高速群 (100 mm/min) の 3 種類とし, 各群 7 根管形成した. 形成中に破折やレジジ形成が生じた場合は, 新しいファイルおよび根管模型と交換し, 実験群より除外した. 根管形成中は, 根管内を RC-Prep™ (Premier, USA) で満たし, ファイル交換ごとに蒸留水 1 ml にて洗浄, SS #10 にて穿通確認を行った.

2. 根管形態の評価: 形成前後の根管模型をデジタルマイクロスコープ (VH8000, キーエンス) を用いて, 20 倍で撮影し, Photoshop 7.0® (Adobe Systems, USA) を用いて重ね合わせ, 根尖孔から 0, 3 mm の外湾および内湾の切削量を計測した. 各群のファイルの破折, ねじれおよびレジジを生じた数, ファイルの種類を記録した. 破折したファイルは, その断面を走査型電子顕微鏡 (Hitachi High-Tech S-3400, 以下「SEM」) にて観察した.

3. 統計学的解析: 根尖孔から 0, 3 mm の外湾および内湾の切削量を一元配置分散分析および Tukey 法にて有意水準 5% で解析した.

【結果】0 mm では, 3 群間の内湾および外湾の切削量に有意差を認めなかったが, 3 mm では認めなかった. (Figure 1) 破折は低速群 (1 本), 高速群 (2 本), ねじれは中速群 (1 本), 高速群 (2 本), レジジは 3 群で認めなかった. 高速群の 2 本の破折ファイルの断面の SEM 画像にアブレーションマークを認めたが, 低速群には認めなかった.

【考察】0 mm では, 上下動速度が遅い場合, 外湾に接触する時間が長くなり, 外湾の切削量は大きく, 内湾は小さくなったと推察された. 3 mm の内湾および外湾の切削量は, 上部拡大を十分に行っていたため, 上下動速度による影響を受けなかったと推察された. 高速群の破折ファイル断面の SEM 画像にアブレーションマークを認めたため, ねじれ疲労による破折が疑われた. 低速群には認められなかったため, 回転疲労の蓄積によるものと推察された.

【結論】本実験の結果から, ファイルの上下動速度は, 根尖部の形態およびファイルの疲労に影響を与える可能性が示唆された.

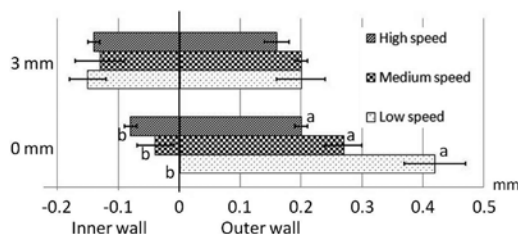


Figure.1 Amount of resin removal at 0, 3 mm from apex
Same superscript letters indicate statistical significant difference.

花粉症のアレルギー性鼻炎症状改善における歯科保存治療の応用に関する研究

神奈川県歯科大学 大学院歯学研究科 歯髄生物学講座
毛塚 甫、三輪知志、下島かおり、室町幸一郎、武藤徳子、鈴木二郎
○石井信之

Study on application of dentistry for improvement of seasonal allergic rhinitis symptoms
Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University
KEZUKA Hajime, MIWATOMOYUKI, SHIMOJIMA Kaori, MUROMACHI Koichiro, MUTO Noriko, SUZUKI Jiro
○ TANI-ISHII Nobuyuki

【研究目的】

花粉症によるアレルギー反応は、鼻腔や口腔粘膜上皮直下に IgE 抗体を有する肥満細胞に花粉が再感作し、ヒスタミンを遊離することで鼻炎アレルギー症状が発現する。唾液 IgA は、微生物やウイルスの体内侵入を防ぐ第一次防御機構として作用するほか、上気道感染症の感染防御に重要な役割を果たしていることが報告されている。すなわち、唾液 IgA を介した粘膜免疫が花粉症発症に関与する可能性が示唆される。歯科診療外来で歯ぎしり発症防止や外傷性咬合防止にマウスピースを装着した患者において、唾液流量増加の自覚とともに花粉症症状が軽減したとの報告がある。以上のことから、マウスピースは唾液流量を増加させ、口腔内に分泌型 IgA が多量に分泌することで、スギ花粉、ハウスダスト、および PM2.5 等の粘膜上皮接着抑制と肥満細胞抗 IgE 抗体への接着阻害に作動している仮説を立てた。本研究は、マウスピース装着前後の唾液流量、唾液中の分泌型 IgA 量とアレルギー症状改善度との相関関係を解析することを目的とした

【材料および方法】

本研究は神奈川県歯科大学倫理委員会の承認を得て行った (承認番号 319)。被験者は 2016 年 2 月～5 月に本学を来院した花粉症患者 (鼻アレルギーガイドラインに従って診断) 15 名と健常者 8 名を対照群として唾液検査を行った。花粉症のアレルギー性鼻炎症状 (くしゃみ、鼻水、鼻閉) は重症度分類 12 点法に従って診査した。

実験に使用したマウスピースは、印象採得後にエルコフレックス 1.0mm (ERKODENT、Germany) を使用して作製した。マウスピースは下顎前歯部に装着し、装着前後の唾液流量を計測後、採取唾液を 3,000 rpm、10 分間遠心後に分注し -80°C で凍結保存した。マウスピース装着後の唾液流量を測定した。さらに、唾液性状検査を多項目唾液検査システム (AL-55:LION)、唾液 IgA 濃度を ELISA 法により測定した。

【成績および考察】

マウスピース装着前後におけるアレルギー性鼻炎重症度分類(0-12 点)は、実験群の装着前 (9.7±4.8) 後 (4.3±3.5) で有意に症状が改善されたが、対照群は変化しなかった (装着前 (3.3±3.7) 後 (1.4±0.9))。唾液流量は唾液分泌速度(g/min)として計測した結果、実験群の装着前 (0.6±0.5) 後 (1.0 ±0.6) で有意に上昇したが、対照群は変化しなかった (装着前 (0.7±0.2) 後 (1.0±0.6))。多項目唾液検査を行った結果、対照群のマウスピース装着前後でアンモニア量の減少が認められたが、実験群の装着前後による変化は認められなかった。

唾液 IgA 濃度(μg/ml)を測定した結果、マウスピース装着前の実験群(10.4±3.6)は、対照群(19.2±8.1)と比較して有意に減少した。マウスピース装着後の唾液 IgA 濃度は、実験群、対照群共に変化しなかったが、実験群の唾液 IgA 分泌速度(μg/min)は、マウスピース装着前と比較して有意に増加した。

以上の結果から、花粉症患者は唾液 IgA 分泌濃度が有意に減少していることが明らかにされた。歯科診療に使用するマウスピースは、唾液量、唾液 IgA 分泌速度を増加させることによって、花粉症によるアレルギー性鼻炎症状を軽減することが明らかになった。唾液分泌型 IgA が花粉アレルギーの粘膜上皮接着抑制と肥満細胞抗 IgE 抗体への接着阻害に作動する可能性が示された。

(多項目唾液検査システム解析研究協力者:ライオン(株) 事業開発部 西永英司, 生命科学研究所 内山千代子)

ステロイド療法による象牙質知覚過敏症様歯痛の発症に関する統計学的検討

東北大学大学院歯学研究科 口腔病態外科学講座 口腔診断学分野
○笹野高嗣、庄司憲明、飯久保正弘

**Statistical analysis on dentin hypersensitivity-like tooth pain
seen in patients receiving steroid therapy**
Division of Oral Diagnosis, Department of Oral Medicine and Surgery,
Tohoku University Graduate School of Dentistry
○Takashi Sasano, Noriaki Shoji, Masahiro Iikubo.

【研究目的】 副腎皮質ホルモン(以下ステロイドと略す)の大量投与を受けている患者の中に、象牙質知覚過敏症様の歯痛を訴える患者を時々経験する。この歯痛の共通点は、①歯にカリエスや歯根露出などの所見を認めないにもかかわらず、主に冷刺激により象牙質知覚過敏症様の誘発痛が多数歯に起こること、②ステロイドの減量や休薬と共に症状が改善すること、③象牙質知覚過敏症よりも症状が激的で、一般的な知覚過敏処置では症状が消失しにくいことである。しかしながらこのような症例は今のところ学術論文データベースにおいて報告されていない。そこで今回我々は、ステロイド投与患者を対象として象牙質知覚過敏症様歯痛の発症について統計学的に検討した。

【対象および方法】 東北大学血液免疫科でステロイド投与を受けている患者に研究の内容を説明後、参加に同意が得られた患者を対象とした。問診で歯痛の経験がある患者に対しては、同院口腔診断科にて口腔内診査およびエックス線検査を実施し、①ステロイド投与前に歯痛経験のある患者、②カリエスや楔状欠損を有する患者、③生活歯が5本以下である患者を除外した。最終的に220名(男40名、女180名;年齢17-87歳、平均49.9歳)を本研究の調査対象とした。調査は質問票を用い、①性別、②年齢、③原疾患、④治療[ステロイド非パルス療法(プレドニゾン、1-200 mg/day, 内服)、ステロイドパルス療法(メチルプレドニゾン、500-1000 mg/day, 静注、3日間)]、⑤象牙質知覚過敏症様歯痛の有無、⑥その歯痛の特徴[部位、開始時期、トリガー、強度 (Visual analogue scale (VAS)による疼痛スコア)など]の情報を収集した。データを基に、1)ステロイド投与患者における歯痛の出現率、2)ステロイド投与量と歯痛の強度 (VAS) との関係、3)ステロイドの減量および中止による歯痛の推移について統計学的に検討した。また、4)歯痛の特徴、および5)歯痛に対する象牙質知覚過敏症処置の効果についても検討した。本研究は東北大学倫理委員会の承認を得て行った(2011/22-31)。なお、本研究では調査対象の中でステロイド投与開始後に出現した象牙質知覚過敏症様歯痛を便宜的にステロイド歯痛と仮称した。

【結果および考察】 1. ステロイド歯痛はステロイド投与患者の17.7%に見られた。性別や原疾患により有病率に有意差はみられなかった。ステロイド歯痛の有病率はステロイド非パルス療法患者よりステロイドパルス療法患者で有意に高かった。2. プレドニゾン投与量と疼痛スコア (VAS 値) に正の相関がみられた ($\rho=0.642$)。3. 全てのステロイド歯痛症例において、プレドニゾンの投与量が最大の時、疼痛スコアは最大であり、その後の減量および中止に伴い有意に減少した(減量時: $p<0.001$; 中止時: $p=0.0057$)。プレドニゾンの減量および中止後、66.7%の患者(26/39)で疼痛スコアは0に推移し、その内訳は中止群では100%(7/7)、減量群では59.4%(19/32)であった。4. ステロイド歯痛は、患者の97.4%(38/39)に持続的な歯痛としてみられた。また多数歯に見られ、31%の患者では耐えがたい痛みであった。主なトリガーは冷水痛(84%)、およびエアータ痛(32%)で温水痛もトリガーであった(24%)。5. 歯科治療を希望したステロイド歯痛患者15名に対し知覚過敏処置を行ったところ、全ての症例で歯痛は減少した。しかし効果は一時的で、知覚過敏処置後1~7日で症状は再発した。

ステロイド歯痛発症メカニズムとして、ステロイド投与が歯髄組織に浮腫を惹起し、歯髄腔の内圧亢進により刺激に対する象牙細管内液の移動が起こりやすくなった可能性が考えられた。しかしステロイド投与患者全てにステロイド歯痛が惹起されないなど不明な点も多く、さらなる検討が必要であると思われた。

【結論】 本研究の結果から、ステロイド投与により象牙質知覚過敏症様の歯痛が惹起されることが示された。

*in vivo*における新規 S1P/S1PR2 シグナル伝達経路を介した骨形成促進作用

¹福岡歯科大学口腔治療学講座 歯科保存学分野

²九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座 歯周病学分野

○松崎 英津子¹, 東 克匡², 橋本 陽子², 松本 和磨¹, 阿南 壽¹

Novel molecular mechanisms in sphingosine-1-phosphate (S1P)/S1PR2-mediated bone formation *in vivo*

¹Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College

²Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation,
Faculty of Dental Science, Kyushu University

○MATSUZAKI Etsuko, HIGASHI Katsumasa, HASHIMOTO Yoko, MATSUMOTO Kazuma, and ANAN Hisashi

【目的】

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は、S1PR1-R5 の 5 つの G タンパク質共役受容体を介して細胞分化・増殖・遊走に関与する脂質メディエーターである。これまでに演者らは、骨芽細胞における S1P/S1PR1 シグナルの活性化による骨芽細胞分化促進作用を報告しているが、一方で、S1P/S1PR2 を介した RhoA/ROCK シグナルの活性化が、Smad1/5/8 リン酸化を亢進させ、骨芽細胞分化に関与することを第 142 回春季本学術大会にて報告した。またその後の検討で、この新規シグナル伝達経路の活性化による Runx2 発現増加が、骨芽細胞分化を促進することを明らかにした。

そこで本研究では、*in vivo*における S1PR2 作動薬による骨形成促進作用と S1PR2/RhoA/ROCK シグナルの関与について検討した。

【材料と方法】

8 週齢雄性 C57BL/6N マウス腹腔内に S1PR2 作動薬 (CYM-5520: 1 mg/kg)、S1PR1/2 阻害薬 (W146/JTE-013: 1 mg/kg) 及び ROCK 阻害薬 (Y27632: 1 mg/kg) を 1 日 1 回、28 日間投与し、翌日過麻酔下にて安楽死させ、脛骨を採取した。microCT (SkySCAN1176) を用いて、脛骨成長板近位端から 10-50 スライス部位における海綿骨の骨量、骨梁幅、骨梁数について解析した。また、S1PR1 作動薬 (FTY720: 1 mg/kg) を投与し、同様に検討した。各種パラメータの解析には、NRecon software、CT-Analyzer および CT-Vol software を用いた。(福岡歯科大学動物実験承認番号: 15022)

【結果と考察】

*in vivo*において、S1PR2 作動薬により、海綿骨の骨量、骨梁幅、骨梁数が増加した。S1PR2 阻害薬によりその作用は抑制された。また、S1PR2 シグナル下流の ROCK 阻害薬により骨量、骨梁数は減少した。しかしながら、S1PR1 阻害薬による影響は認められなかった。一方、S1PR1 作動薬により、S1PR2 作動薬とほぼ同程度の骨量、骨梁幅、骨梁数の増加を認めた。S1PR1 阻害薬によりその作用は抑制されたが、S1PR2 阻害薬による骨量、骨梁数への影響は認められなかった。

以上の結果から、*in vivo*において、S1PR2 および S1PR1 作動薬による骨形成促進作用が示された。また、S1PR2 作動薬による海綿骨の骨量、骨梁幅、骨梁数の増加には、S1PR2/RhoA/ROCK シグナル伝達経路の一部が関与し、骨形成を促進することが示唆された。

【結論】

本研究で明らかとなった S1P/S1PR2/RhoA/ROCK シグナルによる骨形成促進作用は、骨再生における新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

培養密度が歯髄幹細胞の幹細胞特性に与える影響

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座歯髄生物学分野
*東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座う蝕制御学分野
○野田園子、川島伸之、橋本健太郎、山本弥生子、荒牧音*、田上順次*、興地隆史

Effects of culture density on stem cell properties of human dental pulp stem cells

Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences, *Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Sciences, Medical and Dental Sciences Track, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Tokyo, Japan
○Noda S, Kawashima N, Hashimoto K, Yamamoto M, Aramaki O*, Tagami J*, Okiji T

〈緒言〉

歯髄幹細胞は抜去歯の歯髄組織より分離可能な間葉系幹細胞であり、神経、骨、脂肪、軟骨の細胞への分化能を有し、再生医療において有用な細胞として期待されている。一般的に再生医療において 10^6 - 10^7 個の幹細胞が必要と言われているが、歯髄の組織量はおよび分離される歯髄幹細胞の細胞数は限られており、*in vitro* で培養し細胞数を増やす必要がある。しかし、培養条件により歯髄幹細胞の特性が変化してしまうことが危惧される。今回我々は、細胞の培養密度に着目し、歯髄幹細胞を密あるいは疎な状態で培養し、これが歯髄幹細胞の増殖能や分化能に与える影響について評価した。

〈材料および方法〉

抜歯された健全智歯および第一小臼歯 (n=13、20-33 歳、倫理審査承認番号#948) を分割後、摘出した歯髄組織を細断し、リパーゼにて 37°C 、40 分間の条件で細胞を分散後、100 mm ディッシュに播種した。7-10 日間培養し、形成されたコロニーをトリプシン溶液にて分散し、疎な状態を維持して 2-7 代継代した。その後、細胞が密に接した状態 (1×10^5 個/ cm^2 、Dense : D 群) および細胞が接しない状態 (5×10^3 個/ cm^2 、Sparse : S 群) にて 4 日間培養を行った。細胞表面マーカー (CD34、44、73、90、105、146) 発現を FITC ラベルされた各抗原特異的抗体を用い、FACS Calibur にて測定した。細胞増殖活性は cell counting kit-8 にて測定した。脂肪、神経、骨芽および軟骨細胞への分化は、各細胞特異的な誘導培地を使用した。遺伝子発現は、抽出した RNA から cDNA を作成し、リアルタイム PCR を用いて解析した。石灰化結節はアリザリンレッド S 溶液を用いて染色した。さらに、インテグリンシグナルの関与について検討する目的で、FAK および PI3K/Akt の阻害剤を使用し、PI3K およびリン酸化 PI3K の発現について、特異的抗体を用いた Western Blotting により評価した。統計処理は Tukey-Kramer test、Mann-Whitney U test あるいは Student's t-test を用い、有意水準 5% で検定を行った。

〈結果および考察〉

- ・ D 群においては、S 群と比較して CD73 および CD105 陽性細胞数の有意な減少が認められ、また有意な細胞増殖能の抑制が認められた。
- ・ 両群とも、すべての細胞への分化誘導は可能であったが、D 群において有意に高い ALP mRNA 発現および石灰化結節形成の亢進が認められた。
- ・ D 群においてリン酸化 PI3K 発現の亢進が認められるとともに、FAK、PI3K/Akt の阻害剤の添加により ALP mRNA 発現は抑制された。

〈結論〉

歯髄幹細胞は高密度で培養すると、多分化能はある程度維持されるものの、一部の幹細胞性マーカーの発現低下と増殖能抑制が認められた。また、骨芽細胞への分化が促進される傾向を示すと同時に、インテグリンシグナルの亢進が認められた。

ヒト SNP 解析による根尖性歯周炎関連遺伝子の同定および *in vivo* 実験による機能解析

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)
○成瀬陽菜¹, 伊藤祥作¹, 山内裕香子¹, 伊藤勇紀¹, 林 美加子¹

Identification and functional analysis of the responsible genes for apical periodontitis
Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○NARUSE Haruna¹, ITOH Shousaku¹, YAMAUCHI Yukako¹, ITOH Yuuki¹, HAYASHI Mikako¹

【目的】

現在、一塩基置換遺伝子多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) がさまざまな慢性疾患の発症に関わっていることが判明しており、根尖性歯周炎に関しても欧米人や南米人での疾患関連遺伝子の報告がされているが、アジア人での報告はない。そこで我々は、根尖性歯周炎に罹患した日本人の患者における疾患関連遺伝子について、免疫応答に関与する IL-1 β および骨恒常性に関与する Wnt/ β -catenin シグナルの SNPs について解析を行った。また、根尖性歯周炎関連遺伝子について *in vivo* の実験系にて検証し、新しい知見が得られたので報告する。

【方法】

1. SNP 解析: 大阪大学歯学部附属病院保存科にて根尖性歯周炎と診断された患者のうち、デンタルエックス線写真にて直径 1cm 以上の根尖病巣を認めた日本人患者の頬粘膜から、大阪大学歯学部附属病院倫理審査委員会で承認されたプロトコール (承認番号 H25-E22) にて細胞を採取した。発症群 40 名およびコントロール群 40 名の SNP 解析を行った。

1) 被験者の頬粘膜から滅菌綿棒にて非侵襲的に細胞を採取し、綿棒の先を Lysis Buffer に浸漬させ、55 °C にて 24 時間反応させて、ゲノム DNA を抽出した。そこにイソプロパノール沈殿およびエタノール沈殿を行った後、100 μ l TE 溶液を加えて、マイクロチップで懸濁させ -80 °C にて保存した。

2) ゲノム DNA に対して、TaqMan® GTXpress™ Master Mix および TaqMan® SNP Genotyping Assays にて IL-1 β および LRP5 について SNP 解析を行った。

2. 根尖性歯周炎関連遺伝子の *in vivo* 検証実験: Wnt/ β -catenin シグナル経路阻害薬 IWR-1 投与群と非投与群との根尖病変を比較した。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のもと、大阪大学動物実験規定に則って、実施した (承認番号: 動歯-26-011-0)。

1) 8 週齢の C57BL/6J マウスを全身麻酔下にて、左側第一大臼歯を 1/4 ラウンドバーを用いて天蓋除去を行った後、#8 の K ファイルを用いて根尖の破壊を行った。

2) 露髄当日から 1 日 1 回、尾静脈から①IWR-1 投与群: DMSO に IWR-1 を溶解したものを PBS にて希釈した溶液 (IWR-1: 2.5 μ mol/kg)、②IWR-1 非投与群: DMSO を PBS にて希釈した溶液を連続投与した。

3) 根尖病変体積の測定: 露髄後、経時的にマイクロ CT (理学メカトロニクス、R_mCT2) 撮影を行った。根尖病変体積は骨形態計測ソフト (RATOC、TRI 3D-BON) を用いて算出し、3 次元的評価を行った。病巣体積の統計学的有意差の検定は Student's *t* 検定を用い、危険率 5% にて評価した。

4) 病理組織学的観察: 上記実験に供したマウスを還流固定した後、下顎骨を採取し、脱灰を行った。その後組織切片を作成し病理組織学的観察を行った。

【結果および考察】

SNP 解析結果、炎症サイトカイン IL-1 β をコードしている遺伝子上での SNP の相関がないことが示唆された。

IL-1 β 遺伝子については過去に欧米人において根尖性歯周炎と関連していると報告がある (Dill *et al.*, 2015) が、人種差が大きく関与していると考えられる。一方、Wnt 受容体の共役受容体である LRP-5 をコードする遺伝子上の SNP では有意な差がみとめられ、Wnt/ β -catenin シグナル経路が根尖病巣形成と関与していることが示唆された。

in vivo 検証実験より、露髄 4 週間において、IWR-1 投与群の方が統計学的有意差をもって、根尖病変体積の増加が認められた ($p < 0.05$)。また、HE 染色においても IWR-1 投与群の方が大きな根尖病巣および炎症の進展が認められた。

【結論】

Wnt/ β -catenin シグナル経路が、根尖病巣形成に関与していることが明らかとなった。

Mineral trioxide aggregate は LPS 刺激マクロファージの機能を calcium-sensing receptor を介して調節する

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野

*東京医科歯科大学 (TMDU) 生体材料工学研究所 生体機能修復研究部門 生体材料機能医学分野

○倉本将司、川島伸之、野崎浩佑*、A.Y. Bakhit、奈良圭介、藤井真由子、橋本健太郎、野田園子、興地隆史

Mineral trioxide aggregate modulates functions of LPS-stimulated macrophages via calcium-sensing receptor

○Masashi Kuramoto, Nobuyuki Kawashima, Kosuke Nozaki*, AY Bakhit, Keisuke Nara, Mayuko Fujii, Kentaro Hashimoto, Sonoko Noda, Takashi Okiji

Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, *Department of Material Biofunctions, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

【緒言】 Mineral trioxide aggregate (MTA) はポルトランドセメント由来の覆髄材で、直接覆髄に使用した場合水酸化カルシウムと同等以上の良好な成績が報告されているが、MTA に対する炎症歯髄の応答については知見に乏しい。我々は、マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 において、lipopolysaccharide (LPS) 刺激による炎症性メディエーター産生が MTA 存在下で抑制されることを、2016 年度本学会秋季学術大会 (145 回) で報告した。今回はその機構の解明を目的として、calcium-sensing receptor (CaSR) 阻害剤 (NPS-2143) の影響を検討するとともに、代表的な CaSR 下流のシグナル因子である Erk、p38 MAPK 等の発現を解析したので報告する。

【材料および方法】 製造者の指示に従い練和した ProRoot MTA (デンツプライ三金) を直径 0.8mm、高さ 0.4mm のプラスチックチューブに充填後、37°C、5%CO₂、湿度 100%の環境下で 24 時間硬化させた。次いで、MTA 硬化体を 10 mL のαMEM に浸漬して 24 時間震盪後、ろ過滅菌したものを MTA 抽出液として細胞に作用させた。また、10 mL の MilliQ 水に 24 時間浸漬した MTA 硬化体からの Ca²⁺溶出量を、高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法で測定した。

細胞増殖活性を測定するために、10%ウシ胎児血清 (FBS) 含有αMEM で培養した RAW264.7 を 9.0×10³ cell/well で 96 穴プレートに播種し、細胞の接着を確認後、FBS 不含の培地に交換し 24 時間培養した。その後培養液を LPS (100ng/ml) および NPS-2143 (5μM) を含む MTA 抽出液 (FBS 不含) に交換し、24、48 時間経過後に細胞数を Cell Counting Kit-8 を使用して測定した。αMEM (LPS 非添加もしくは添加) をコントロールとした。

また、炎症性メディエーター (IL-1α、IL-6) の mRNA 発現を検討する目的で、10%FBS 含有αMEM で培養した RAW264.7 を 2.0×10⁵ cell/well で 12 穴プレートに播種し、細胞の接着が確認されてから 24 時間無血清培地で培養後、LPS および NPS-2143 を含む MTA 抽出液に交換し、2 時間経過後に細胞から RNA を抽出し、RT-rPCR を行った。αMEM (LPS 非添加もしくは添加) をコントロールとして用いた。

さらに、Erk、p38 MAPK 等の発現を検討する目的で、10%FBS 含有αMEM で培養した RAW264.7 を 1.5×10⁵ cell/well で 24 穴プレートに播種し、細胞の接着が確認されてから 24 時間無血清培地で培養後、MTA 抽出液に交換し、7.5 から 60 分培養したのち、特異抗体を用いた Western blotting を行った。

【結果および考察】 MTA 硬化体から 43.67mg/L の Ca²⁺溶出が生じた。RAW264.7 の細胞増殖活性は LPS 添加により上昇し、MTA 抽出液添加でさらに亢進したが、NPS-2143 添加により MTA の効果は消失した。また、LPS 刺激で誘導された IL-1α および IL-6 mRNA 発現は、MTA 抽出液添加により抑制されたが、この MTA の効果は NPS-2143 添加で消失した。さらに、リン酸化された Erk、p38 MAPK の発現は、MTA 抽出液添加後それぞれ 45 および 7.5 分で最大となった。CaSR 阻害剤の添加により細胞増殖活性亢進、炎症性メディエーター産生抑制といった MTA 抽出液の作用が消失したこと、MTA 抽出液添加により CaSR 下流のシグナルとされる Erk、p38 MAPK のリン酸化亢進が確認されたことから、MTA より放出された Ca²⁺が CaSR を介してシグナル伝達を活性化させる可能性が示唆された。

【結論】 LPS 刺激された RAW264.7 における細胞増殖活性亢進および炎症性メディエーター産生誘導を、MTA 抽出液はそれぞれ促進および抑制したが、この MTA 抽出液の効果は CaSR 阻害剤により消失した。また、MTA 抽出液添加により CaSR 下流のシグナルであるリン酸化 Erk および p38 MAPK の発現が亢進した。

ラットの歯根未完成臼歯の抜髄後に行ったりバスクラリゼーション

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1講座

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

Revascularization after Pulpectomy of Immature Molars in Rats

1) Advanced Operative Dentistry-Endodontics, The Nippon Dental University
Graduate School of Life Dentistry at Niigata

2) Department of Endodontics, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata
○ MINATO Hanae¹⁾, ARAI Kyoko²⁾, KITAJIMA Kayoko²⁾, YAMADA Rie²⁾ and IGARASHI Masaru^{1, 2)}

【緒言】歯根未完成歯の歯内療法では、可逆性歯髄炎には歯髄の保存療法、不可逆性歯髄炎には歯髄の除去療法が行われる。一方失活歯では通常の根管治療は困難のため、アペキシフィケーションで根尖孔閉鎖後に加圧充填が施される。近年、根管壁の厚径と歯根長の獲得が期待されるリバスクラリゼーションが行われており、そこでは歯髄血流の再生、象牙芽細胞への分化誘導、根管壁新生が起こる。本研究は、ラット歯根未完成歯に抜髄を行い、MTAペーストあるいは水酸化カルシウム (CH) パウダーを用いたリバスクラリゼーションを施した後の組織修復について、組織学的に比較する目的で行った。

【方法】6週齢のWistar系雄性ラット56匹を使用し、被験歯は上顎右側第一臼歯の近心根を用いた。全身麻酔、ラバーダム防湿後、手術用マイクロスコープ下で髄室開拓し、歯冠部歯髄の除去を行った。6%次亜塩素酸ナトリウムと3%過酸化水素水で髄室内の交互洗浄を行い、近心根管口を確認後、作業長3.5mmで#10、15、20のHファイルおよび抜髄針を用いて根管歯髄を除去後、NiTiファイル (PROTAPER® F1, DENTSPLY) で根管拡大を行った。生理食塩液での根管内洗浄し、乾燥・止血確認後、#10のHファイルを根尖孔外に約1mm突き出して出血させ、根管口部まで血液を満たした。血餅形成確認後、MTAペーストまたはCHパウダーを血餅上部に貼付し、その上部をレジン系裏層材で裏層後、コンポジットレジン充填を行った。近心根以外の根管歯髄に対しては生活断髄に準じて処置を施した。術後1週、2週、4週に4%パラホルムアルデヒド溶液にて全身灌流固定を行い、実験歯を周囲組織とともに摘出し、浸漬固定を行った。試料を10%EDTAで脱灰しパラフィン包埋後、厚さ6µmの連続切片を作製し、HE染色およびDentin Matrix Protein 1, nestinを一次抗体とした免疫染色を行った。実験期間中に歯の破折、充填物脱離が生じた症例、および作製した標本上で根管壁穿孔が認められた症例20歯を実験群から除外し、36歯を検索した。HE染色を施した標本を光学顕微鏡で観察し、評価基準をもとに根尖部、中央部、歯頸部の3部位を評価し、各実験期間のMTA群とCH群の差についてMann-Whitney U検定で比較を行った。

【結果】術後1、4週においてMTA群とCH群には新生組織の形成に有意な差がみられ、さらに術後4週では硬組織の形成に有意差を認めた。術後1、2、4週でMTA群は歯頸部1/3まで新生組織の形成、硬組織の形成がみられたが、CH群は根中央部1/3から根尖部1/3までの形成であった。CH群は歯頸部1/3から根中央部1/3まで無構造層があり、組織の再生はみられなかった。形成された硬組織はすべて骨様硬組織であり、全標本で炎症性細胞浸潤はみられなかった。

【考察】CHはMTAよりも広範囲に及ぶ壊死層形成と炎症性細胞浸潤があるため、MTA群とCH群で根管内の組織の形成量の有意差があったと考えられる。免疫染色より、根管内では象牙芽細胞による硬組織形成ではなく、異所性石灰化が起きていると考えられる。

【結論】MTA群ではCH群よりも根管全体に組織の形成が起こり、硬組織の形成が期待できることが示唆された。また、ラバーダム防湿下で根管処置を施すことで、無菌的にラットの根管治療において処置ができることが示された。

Tenomodulin がヒト歯根膜細胞の機能維持に及ぼす影響について

¹九州大学病院 歯内治療科、²九州大学病院 口腔総合診療科、
³九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、⁴九州大学大学院歯学研究院 OBT 研究センター
○長谷川大学¹、和田尚久²、有馬麻衣³、吉田晋一郎¹、友清淳¹、
濱野さゆり^{3,4}、御手洗裕美³、前田英史^{1,3}

The effects of Tenomodulin on the function maintenance of human periodontal ligament cells.

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

○Daigaku Hasegawa¹, Naohisa Wada², Mai Arima³, Shinichiro Yoshida¹, Atsushi Tomokiyo¹,
Sayuri Hamano^{3,4}, Hiromi Mitarai³, Hidefumi Maeda^{1,3}

【研究目的】近年、重度歯周疾患の有効な治療手段として、歯周組織再生療法の開発研究が進められているが、未だ十分にその実用化に至っていないのが現状である。その理由の一つとして、歯根膜細胞の機能を評価するマーカー因子が殆どないため、歯根膜組織を機能的に修復・再生する方法が確立されていないことが挙げられる。そこで我々は、腱や靭帯の分化マーカーとして知られる Tenomodulin (TNMD) に着目した。本研究では、TNMD が歯根膜組織において果たす役割について明らかにするため、TNMD が歯根膜細胞の各種機能にどのように関与するかについて検討した。

【材料および方法】

1. 歯根膜組織および歯根膜細胞における TNMD 発現解析

- (1) 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 TNMD 抗体による免疫組織化学的染色を行った。
- (2) 本研究に同意が得られた患者(24 歳男性)の抜去歯より採取したヒト歯根膜細胞 (HPDLC)、ヒト歯髓細胞 (HDPC)、およびヒト肉肉線維芽細胞 (HGF) における TNMD の遺伝子発現を半定量的 RT-PCR 法にて比較検討した。

2. TNMD をノックダウンしたヒト歯根膜細胞における発現および機能解析

- (1) siRNA を用いて TNMD 発現をノックダウンした HPDLC における歯根膜関連マーカー (Periostin, PLAP-1, COL-1, および LOX) の遺伝子発現を、定量的 RT-PCR 法にて解析した。
- (2) 同様に、TNMD の発現をノックダウンした HPDLC における細胞増殖能、細胞接着能、コラーゲン線維形成能について、それぞれ WST-1 proliferation assay、ECM adhesion assay、および Picro-sirius red 染色法により検討した。また、細胞形態の変化について、ファロイジンを用いた蛍光免疫染色法により解析した。

3. Wnt5a がヒト歯根膜細胞における TNMD 発現に及ぼす影響

最近我々は、分泌タンパク Wnt5a が JNK を介してヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成を促進することを報告した (Hasegawa et al., 2015)。そこで、Wnt5a タンパク存在下で培養した HPDLC における TNMD の遺伝子発現と、それに対する JNK 阻害薬 (SP600125) の影響について、定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。

【結果】

- ・抗 TNMD 抗体による免疫組織化学的染色を行った結果、歯髓や歯槽骨と比較して、歯根膜組織全体に強い陽性反応が認められた。また、HPDLC における TNMD の遺伝子発現は、HDPC および HGF と比較して高かった。
- ・HPDLC の TNMD 発現をノックダウンした結果、歯根膜関連マーカーの発現、細胞増殖能、細胞接着能、コラーゲン線維形成能が低下した。また、細胞突起の伸長が顕著に減少し、細胞形態が紡錘型から敷石型に変化した。
- ・Wnt5a タンパク (50 ng/ml) 存在下で 48 時間培養した HPDLC において、TNMD の遺伝子発現が有意に上昇した。また、SP600125 (10 μM) を同時添加することで、Wnt5a により上昇した TNMD 遺伝子発現が抑制された。

【考察】以上の結果より、TNMD は歯根膜組織ならびに歯根膜細胞に強発現し、その機能維持において重要な役割を担っており、また Wnt5a が JNK を介してヒト歯根膜細胞の TNMD 発現を上方制御することから、Wnt5a/JNK/TNMD アキシスの解析は、歯根膜細胞の機能を検討する上で有効となる可能性が示唆された。

【結論】(1) TNMD は歯根膜組織および歯根膜細胞に強発現している。(2) TNMD のノックダウンにより、ヒト歯根膜細胞の歯根膜関連マーカー発現、細胞増殖能、細胞接着能、コラーゲン線維形成能が低下する。また、細胞突起の伸長が減少し、細胞形態が変化する。(3) Wnt5a は JNK を介してヒト歯根膜細胞の TNMD 発現を上昇させる。

脂肪組織由来多系統前駆細胞移植による歯周組織再生療法の安全性・有効性評価

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)
○竹立匡秀、沢田啓吾、岩山智明、柏木陽一郎、山本智美、森本千晶、平井麻絵、
野崎剛徳、北村正博、村上伸也

Clinical evaluation of periodontal tissue regeneration by adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell transplantation

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan
○Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Tomoaki Iwayama, Yoichiro Kashiwagi, Satomi Yamamoto,
Chiaki Morimoto, Asae Hirai, Takenori Nozaki, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami

【研究目的】

現在臨床応用されている歯周組織再生療法は、歯根膜に内在する幹細胞のもつ組織修復力に依存している。そのため、加齢に伴う同幹細胞数の減少や歯周病の進行に伴う歯根膜の破壊等により、歯根膜中の幹細胞の活用が十分に期待できない場合には、その再生誘導効果を十分に発揮するに至らない。そこで、歯周組織欠損部に他組織より採取した間葉系幹細胞を移植することにより、歯周組織の再生を促す新たな治療法の開発が注目されている。

我々の研究室では、脂肪組織中に存在する未分化間葉系幹細胞 (脂肪組織由来多系統前駆細胞 Adipose tissue-derived multi-lineage progenitor cell: ADMPC) に着目し、ADMPC移植による歯周組織再生誘導効果について検討を重ねてきた。我々はこれまでに、ビーグル犬の実験的歯周病モデルを用いた前臨床研究の結果、ADMPCを基材 (フィブリンゲル) とともに歯周組織欠損部に自己移植することにより歯周組織の再生が誘導されることを明らかにした。その成果に基づき、本研究では、ADMPC移植による歯周組織再生療法の安全性と有効性について臨床研究にて評価した。

【材料および方法】

研究参加の同意を得た被験者より腹部皮下脂肪組織を局所麻酔下にて採取し (平成 27 年 11 月まで、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針: 厚生労働省医政 0822 第 6 号、大阪大学歯学部倫理審査委員会: H21-E30、平成 27 年 11 月以降現在まで: 再生医療等の安全性の確保等に関する法律: 計画番号 PB5150004)、大阪大学歯学部附属病院近未来歯科医療センター細胞培養加工施設内に設置した閉鎖系培養施設セルプロセッシングアイソレーター内で ADMPC を単離、培養した。純度試験および感染症検査に合格したことを確認した後、生体接着剤として臨床応用されているフィブリン製剤を基材とし、歯周組織欠損部に ADMPC を自己移植した。プライマリーエンドポイントは当該治療の安全性とし、移植後 1 週から 36 週までの自覚所見・他覚所見 (血液、脈拍、呼吸数など) に加え、口腔内の異常の有無や血液検査、尿検査、十二誘導心電図、胸部レントゲン検査などの臨床検査の結果から、有害事象の有無、種類、重症度、発現頻度等々を評価した。セカンダリーエンドポイントは当該治療の有効性とし、移植後 36 週における新生歯槽骨の増加率や臨床的アタッチメントレベルの獲得量について評価した。

【結果および考察】

これまでに 6 名の被験者に対して、ADMPC 移植を行った。いずれの被験者においても移植に関連すると考えられる有害事象は観察されなかった。移植 36 週後までの観察期間が終了した 3 名の被験者において、ADMPC 移植部位における歯周ポケット深さの減少、臨床的アタッチメントレベルの獲得およびレントゲン不透過性の亢進が認められた。なお、同 3 名の被験部位は、既存の歯周組織再生療法の適応となる歯槽骨欠損のみならず、より重度な歯槽骨欠損が含まれていた。

以上の結果より、ADMPC の歯周組織欠損部への自己移植は、歯周組織再生を誘導することが示唆された。今後、症例を集積させることにより本研究で得られた結果をさらに検証するとともに、本再生医療の適応症について明らかにする必要があると考えられた。

Loeys-Dietz 症候群モデルマウスにおける *Porphyromonas gingivalis* 投与による 歯周組織破壊

¹⁾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

²⁾東北大学 大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野

○¹⁾津島賢一朗、¹⁾山田 聡、¹⁾木下昌毅、¹⁾阪下裕美、¹⁾栗田敏仁、¹⁾山羽聡子、¹⁾北垣次郎太、¹⁾藤原千春、
²⁾齋藤正寛、¹⁾村上伸也

Periodontal tissue destruction by oral infection of *Porphyromonas gingivalis* in Loeys-Deitz syndrome model mouse

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

²⁾Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

○¹⁾TSUSHIMA Kenichiro, ¹⁾YAMADA Satoru, ¹⁾KINOSHITA Masaki, ¹⁾SAKASHITA Hiromi,

¹⁾AWATA Toshihito, ¹⁾YAMABA Satoko, ¹⁾KITAGAKI Jirouta, ¹⁾FUJIHARA Chiharu,

²⁾SAITO Masahiro, ¹⁾MURAKAMI Shinya

【研究目的】

Marfan 症候群 (MFS) の類縁疾患のひとつである Loeys-Dietz 症候群 (LDS) は、TGF- β 受容体の遺伝変異によって発症する遺伝疾患である。MFS と歯周炎との関連性についての報告はこれまでにいくつかなされているが、LDS と歯周炎との関連性については明らかとなっていない。我々はこれまでに、侵襲性歯周炎様の病態を併発した LDS 患者を見出した。同患者の遺伝変異を再現したノックインマウスを作製し、LDS モデルマウスとしてその表現型を解析してきた。本研究では、LDS モデルマウスに *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) を経口投与し、実験的歯周炎を誘導した際の歯周組織の変化を解析した。

【材料および方法】

8 週齢の野生型 (WT) および LDS モデルマウスに、*P.g* W83 株を 2% carboxymethyl cellulose 含有 D-PBS に懸濁し、経口ゾンデを用いて経口投与を行った。*P.g* 投与は、3 日に 1 回、合計 10 回行い、対照群として溶媒のみを投与したマウスを使用した。最終投与日の翌日に歯周組織を採取し、解析した。それぞれの歯槽骨の吸収量は、マイクロ CT 撮影を行い、セメント-エナメル境から歯槽骨縁までの面積を測定することで定量し、比較を行った。さらに、歯周組織の構造を解析するため HE 染色を行い、歯周組織における破骨細胞の発現を観察するため TRAP 染色を行った。

8 週齢の WT および LDS モデルマウスの腹腔内に 4%チオグリコロート培地を注射し、3 日後にハンクス平衡塩溶液を用いて腹腔内を洗浄し、腹腔内の浮遊細胞を回収し、それぞれのマウス腹腔マクロファージを採取した。回収したマクロファージを *Escherichia coli* (*E.coli*) Lipopolysaccharide (LPS) にて刺激し、炎症性サイトカインの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。

【結果と考察】

WT マウスと比較して、LDS モデルマウスでは *P.g* 投与により対照群に比べ有意に骨吸収が起こっていることが明らかとなった。*P.g* 投与群の WT および LDS モデルマウスにおいて、歯槽骨に近接した多核細胞が観察された。TRAP 染色により、*P.g* 投与群において、歯槽骨に近接した位置に破骨細胞が観察され、LDS モデルマウスにおいて WT と比較して有意にその数が増加していることが明らかとなった。

マウス腹腔マクロファージでは、*E.coli* LPS 刺激により、WT と比較して LDS モデルマウスにおいて *Tnf* および *Il-6* の遺伝子発現が有意に上昇しており、遺伝子変異により、*E.coli* LPS に対するマクロファージの反応性が増加していることが示された。

【結論】

当研究室にて樹立した LDS モデルマウスにおける実験的歯周炎では、局所におけるマクロファージなどの免疫応答細胞の反応性が上昇し、破骨細胞の発現が有意に増加する結果、歯周組織破壊が促進される可能性が示唆された。

会員外研究協力者：森崎隆之 (東京工科大学)

アポトーシスが咬合性外傷における骨吸収におよぼす影響に関する病理組織学的研究

長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 歯周病学分野
○小山美香, 鶴飼 孝, 中村弘隆, 山下恭徳, 小林弘樹,
樋口賀奈子, 白石千秋, 吉村篤利, 原 宜興

Histopathological study on involvement of apoptosis in bone resorption induced by mice occlusal trauma.

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate school of Biomedical Sciences
○OYAMA Mika, UKAI Takashi, NAKAMURA Hiroataka, YAMASHITA Yasunori, KOBAYASHI Hiroki,
HIGUCHI Kanako, SHIRAIISHI Chiaki, YOSHIMURA Atsutoshi, HARA Yoshitaka

[目的]

歯周病を悪化させる病的要因の一つとして外傷性咬合が挙げられる。外傷性咬合により歯根膜に変性が見られ、その後骨吸収が起こることが報告されているが、現状では咬合性外傷の発症メカニズムが十分に解明されているとはいえない。強い矯正力が付与された場合にも咬合性外傷と同じく歯根膜の変性と骨吸収が起こり、これには歯根膜細胞や骨細胞のアポトーシスが関与していると報告されている。しかし、咬合性外傷における細胞のアポトーシスと破骨細胞出現の関連についての報告は見られない。そこで今回はマウスに外傷性咬合を付与し、その際に生じる骨吸収とアポトーシスの関係を病理組織学的に検討した。

[材料および方法]

8週齢の雄性 BALB/c マウスの上顎左側第一臼歯の咬合面に、厚さ 0.406mm、長さ 1mm の角ワイヤーを接着性レジンにて装着し、1,2,3,5 日後に各 5 匹屠殺して、左側下顎骨を摘出した。なお未処置マウスを対照として用いた。摘出した組織を、固定、脱灰後、パラフィン包埋し、第一臼歯の根分岐部が観察できるように近遠心的な連続切片を作製した。病理組織学的変化観察のため HE 染色を、破骨細胞同定のため酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を行い 2 核以上の多核の TRAP 陽性細胞を破骨細胞とした。またアポトーシス細胞同定のための TUNEL 染色 (in situ apoptosis detection kit, ApopTAG) と、RANKL 陽性細胞同定のため抗 RANKL 抗体を用いた免疫組織学的染色を行い、それぞれの陽性細胞を計測した。計測部位は、左側第一臼歯の根分岐部から下方 250 μ m の範囲とし、破骨細胞は根間中隔に存在するものを計測した。また TUNEL 陽性細胞と RANKL 陽性細胞は、計測部位に存在する歯根膜と歯槽骨それぞれに観察される全細胞数に対する各陽性細胞の割合を算出した。

[結果および考察]

1 日後から歯根膜に硝子様変性が起こり、根分岐部直下の歯根膜細胞ならびに骨細胞の一部が消失していた。その後、経時的に根分岐部直下の骨細胞の消失範囲は広がっていた。TUNEL 陽性細胞は 1 日後から硝子様変性周囲の歯根膜細胞に認められた。また骨細胞が消失した骨小腔周囲の骨細胞にも TUNEL 反応を認めた。破骨細胞は、外傷性咬合付与 1 日あるいは 2 日後には硝子様変性から少し離れた骨表面に認め、5 日後では骨吸収が進んだ根分岐部直下にも多く観察された。破骨細胞増加前には、歯槽骨内の RANKL 陽性細胞が増加していた。

骨細胞の存在しない骨小腔周囲に TUNEL 陽性の骨細胞を認めたことから、骨細胞の消失はアポトーシスによるものと考えられた。また、アポトーシスを起こした細胞と破骨細胞の出現が 1 日後から観察されたことから、外傷性咬合による骨吸収においてもアポトーシスが関与している可能性が示唆された。

真菌二次代謝産物(+)-terrein は RANKL 誘導性破骨細胞分化における NFATc1 の発現を抑制する

¹岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野, ²岡山大学病院 歯周科
○中川沙紀¹, 大森一弘², 山本総司¹, 小林寛也¹, 河村麻理¹, 中村亜里紗¹, 山本直史², 高柴正悟¹

Fungal secondary metabolite, (+)-terrein, suppresses NFATc1 expression in receptor activator of NF-κB ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis

¹ Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, and ² Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital, Okayama, Japan
○NAKAGAWA Saki¹, OMORI Kazuhiro², YAMAMOTO Satoshi¹, KOBAYASHI Hiroya¹, KAWAMURA Mari¹,
NAKAMURA Arisa¹, YAMAMOTO Tadashi², TAKASHIBA Shogo¹

【目的】

我々は、真菌の一つである *Aspergillus terreus* が産生する二次代謝産物(+)-terrein (TER) を有機化学的に合成し、TER に抗 interleukin (IL) -6 効果を有することを報告した (Mandai H et al, 2014)。IL-6 が関与する歯周炎や関節リウマチといった炎症性骨破壊疾患の発症を制御するためには、骨代謝を担う破骨細胞の分化を制御することが必須である。我々は、TER が receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) 誘導性の破骨細胞分化を抑制することを報告し (第 143 回秋季歯科保存学会)、TER の骨吸収抑制薬としての可能性を示唆した。しかし、TER の破骨細胞分化抑制時の作用機序は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、TER が破骨細胞分化に及ぼす影響について、マウス骨髄由来マクロファージ様細胞 (mouse bone marrow-derived macrophages; mBMMs) を用いて、破骨細胞分化におけるマスター転写因子である NFATc1 の発現に着目し、TER の作用機序を検討とした。

【材料および方法】

細胞および培養：雄性マウス (BALB/c, 4~12 週齢) の大腿骨および頸骨から骨髄細胞を採取した。採取した骨髄細胞は、10% ウシ胎児血清 (FBS) およびマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF, 50 ng/ml) を含有する αMEM (Invitrogen) を用いて、37°C, 5% CO₂ 存在下で 3 日間培養した。3 日間の培養後、培養皿底面に付着した樹状様細胞を破骨細胞前駆細胞である mBMMs として、以後の実験に用いた (岡山大学動物実験委員会, 承認番号: OKU-2016277)。

(+)-terrein の合成：TER は、Mandai らの報告に従い、L-酒石酸から合成したものをを用いた (岡山大学大学院自然科学研究科 萬代大樹博士提供)。

破骨細胞分化に及ぼす TER の影響の検討：培養液を除去し、PBS を添加して物理的に回収した mBMMs は、 5.0×10^4 /穴の細胞濃度で 24 穴細胞培養プレートに播種した。そして、RANKL (100 ng/ml) および M-CSF (100 ng/ml) を添加して破骨細胞分化を誘導した。TER (10 μM) は、RANKL と同時添加または RANKL 添加 24 時間後に添加した。RANKL 添加 48 時間後に mRNA は RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて、全タンパク質は細胞溶解液を用いてそれぞれ別々に回収した。NFATc1 の発現は、real-time PCR 法と Western blotting 法を用いて検討した。硬組織吸収能は、無機結晶性リン酸カルシウムをコーティングしたオステオアッセイ 96 穴プレート (Coming) に mBMM を 1.0×10^4 /穴の細胞濃度で播種して、上記条件で破骨細胞分化を誘導した。分化開始 5 日目に、吸収窩面積を測定し評価した。破骨細胞への分化状態は、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を用いて評価した。

統計解析：各実験結果は one-way ANOVA を用いて、P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

mBMMs の培養系において添加した TER (10 μM) は、以下の作用をもたらした。

1. RANKL と同時に作用させた場合、NFATc1 の mRNA 発現を抑制し ($p < 0.05$)、タンパク質発現を抑制した ($p < 0.05$)。さらに、硬組織吸収窩の形成を抑制した ($p < 0.05$)
2. RANKL 添加から 24 時間後に作用させた場合においても、NFATc1 のタンパク質発現を抑制した ($p < 0.05$)。

【考察・結論】

TER は、破骨細胞分化のマスター転写因子である NFATc1 の発現を抑制することによって、破骨細胞の分化を抑制し、硬組織の吸収を抑制した。

TER は、炎症性サイトカインの一つである IL-6 の細胞内シグナル伝達系も抑制することから、慢性炎症と骨破壊を主病態とする歯周炎の治療薬または予防薬として用いられる可能性が示唆された。

Non-carious cervical lesions の経年変化に関する共焦点レーザー顕微鏡観察

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座う蝕制御学分野

²東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再建工学分野

³長崎大学病院医療教育開発センター歯科教育研修部門

○林明賢¹、高垣智博¹、池田正臣²、中嶋省志¹、二階堂徹¹、久保至誠³、田上順次¹

CLSM observation of morphological progression of non-carious cervical lesions

¹Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

²Oral Prosthetic Engineering, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

³Medical Education Development Center, Nagasaki University Hospital

○HAYASHI Meiken¹, TAKAGAKI Tomohiro¹, IKEDA Masaomi², NAKASHIMA Syozi¹,

NIKAIDO Toru¹, KUBO Shisei³, TAGAMI Junji¹

【研究目的】

Non-carious cervical lesions (NCCLs)の形態解析に関する研究は、形態の分類とその割合についての報告はあるが、NCCLsの形成、進行のメカニズムに関する報告は少ない。Sugitaら(J Dent, 2017)は、NCCLsを有する患者から採得したレプリカ模型を用いて光干渉断層計(OCT)によるNCCLsの4年間の経年変化について二次元解析を行った。本研究では、Sugitaらの用いたレプリカ模型について、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)を応用することによってNCCLsの三次元的解析を試み、興味ある知見を得たので報告する。

【材料と方法】

本研究で使用したレプリカ模型は、長崎大学病院で2000年から2005年に来院したNCCLsを有する患者6名から得た(n=10)。まず各患者の4年間のレプリカ模型についてモールド(オストロン,GC)を作製して位置合わせを行った。既報に準じ、NCCLsの最大深さを示す位置を模型上に描記して基準線とした。さらにCLSM(VK-X150/X160, KEYENCE)を用いてNCCLs全体をスキャンして3D画像を取得した。その後、マルチファイル解析アプリケーション(VK-H1XM, KEYENCE)を使用して各NCCLの縦幅と深さを測定した。さらに本研究で得られた各測定値を既報のOCTで得られた測定値と比較するため、Repeated Measures ANOVA及びt-testを用いて危険率5%にて検定を行った。

【結果と考察】

CLSMにより得られたNCCLsの3D画像の典型像をFig. 1に示す。CLSM及びOCTにより測定した初年度と4年経過後のNCCLsの縦幅と深さの値をFig. 2に示す。Repeated Measures ANOVAの結果、縦幅、深さともに計測初年度と4年後の間に有意差が認められた($p < 0.05$)。t-testの結果、CLSMとOCTの間で縦幅、深さの計測値ともに有意差は認められなかった($p > 0.05$)。以上よりレプリカ模型を用いたNCCLsの計測において、CLSMはOCTによる計測と同等であり、NCCLsは縦幅、深さともに4年間で経時的に増加することがわかった。NCCLsの観察にCLSMを用いることによって3Dデータの取得が可能であり、NCCLsの経年的な体積変化を解析できる可能性が示唆された。

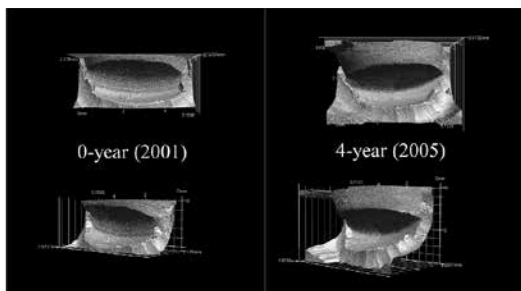


Fig.1 3D images of NCCLs

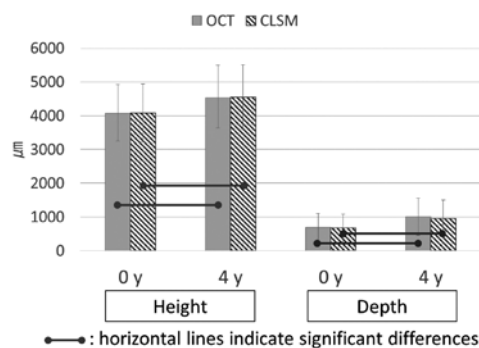


Fig.2 Measurements of NCCLs

*本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会によって承認され(959号)、遂行されたものである。

ヒト歯髓由来線維芽細胞における NOD1 の影響

1) 大阪歯科大学 歯科保存学講座 2) 神奈川歯科大学大学院歯学研究科 口腔科学講座

○岩佐 一弘¹⁾, 小正 玲子¹⁾, 吉川 一志¹⁾, 合田 征司²⁾, 山本 一世¹⁾

Effects of NOD1 in human dental pulp fibroblast like cells

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University¹⁾

Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University²⁾

○Kazuhiro IWASA¹⁾, Reiko KOMASA¹⁾, Kazushi YOSHIKAWA¹⁾,
Seiji GODA²⁾, Kazuyo YAMAMOTO¹⁾

【研究目的】

歯髓は常時、物理・化学的刺激のもと歯を維持するために象牙質への栄養補給、修復象牙質の形成などの役割を果たしている。可逆性歯髓炎は原因を除去することにより正常な歯髓に回復し得るため、歯髓に存在する細胞における炎症の進行過程や発症機序を解明することは歯髓の存在のために重要であると考えられる。歯髓炎の多くは、齶蝕の進行により象牙質深部に侵入した細菌による感染症であるという観点から、自然免疫に関するレセプターによって認識され、炎症反応が惹起される。また、刺激を受けた歯髓組織では細胞外マトリックス分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs) が産生され、歯髓組織を破壊し病態が進行する。c-Jun N-terminal kinase (JNK) は、種々の酵素産生に関与していることが報告されている。今回、細菌のペプチドグリカンの構造の一部である D-glutamy-meso-diaminopimelic acid (iE-DAP) に対する自然免疫レセプターである Nucleotide-binding oligomerization domain protein (NOD)1 に着目し、ヒト歯髓由来線維芽細胞における iE-DAP 刺激による MMPs 産生およびそのシグナル伝達経路を検討した。

【方法】

本研究に参加同意を得た患者の抜去歯（大歯医倫 110910 号）より歯髓組織を採取・培養し、3～10 世代目をヒト歯髓由来線維芽細胞として本研究に使用した。ヒト歯髓由来線維芽細胞を 24well plate に 5.0×10^5 cells/well になるよう播種し、24 時間培養後、iE-DAP を各種各条件下で加え、刺激を行った。刺激終了後、上清中の MMPs の産生を Western Blotting にて検討した。次に RIP2 阻害剤である Gefitinib を各種各条件下で加え、刺激を行い、上清中の MMPs の産生を Western Blotting にて検討した。ヒト歯髓由来線維芽細胞を 24well plate に 5.0×10^5 cells/well になるよう播種し、iE-DAP $10 \mu\text{g/ml}$ を各タイムコースで加え、JNK のリン酸化について Western Blotting にて検討した。また、JNK 阻害剤である JNK inhibitor を各種各条件下で加え、刺激を行い、上清中の MMPs の産生を Western Blotting にて検討した。

【結果】

- 1) ヒト歯髓由来線維芽細胞における iE-DAP 刺激において MMP-1, 3 の産生は濃度依存的に増強した。
- 2) iE-DAP 刺激によって産生が増強した MMP1,3 は RIP2 阻害剤である Gefitinib により産生が抑制された。
- 3) ヒト歯髓由来線維芽細胞における iE-DAP 刺激において JNK のリン酸化は経時的に変化した。
- 4) iE-DAP 刺激によって産生が増強した MMP1,3 は JNK 阻害剤である JNK inhibitor を加えることで抑制された。

【結論】

ヒト歯髓由来線維芽細胞において iE-DAP 刺激によりマトリックス分解酵素であるコラゲナーゼ群 MMP-1, 3 の産生は濃度依存的に上昇した。また、 β -actin の産生は無刺激時においても産生は確認され、iE-DAP 刺激による影響は認められなかった。RIP2 阻害剤により MMP-1, 3 の産生が抑制されたこと、JNK がリン酸化され、JNK 阻害剤を加えることで MMP-1, 3 の産生が抑制されたことから、ヒト歯髓由来線維芽細胞における iE-DAP 刺激による MMP-1,3 産生に対して RIP2, JNK が関与していることが示唆された。

ADAMTSL6 β を介した Marfan 症候群の解離性大動脈瘤発症機構の解析

東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野
○折本 愛、二木 正晴、石河 真幸、半田 慶介、齋藤 正寛

Analysis of pathogenesis of the aortic aneurysm and dissection by ADAMTSL6 β in Marfan syndrome.

Department of Restorative Dentistry, Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

○Ai Orimoto, Masaharu Futagi, Masaki Ishikawa, Keisuke Handa, Masahiro Saito

【背景】

微細線維は、fibrillin-1 (FBN-1) を主成分に形成される線維状細胞外マトリックスで、様々な分子間ネットワークを形成することで、歯、皮膚、骨格および血管などの結合組織における弾性機能と機械的強度の維持に関わる。FBN-1 の遺伝子変異を原因とする Marfan 症候群 (MFS) は、FBN-1 の遺伝子変異を原因に微細線維崩壊症を引き起こし、体全体の結合組織が脆弱化し、歯周炎や解離性大動脈瘤を含む様々な結合組織疾患を引き起こす。このことから、微細線維は結合組織で強度維持に働いている普遍的な機能分子であり、その崩壊機構は全身の結合組織疾患と歯周炎などの歯科領域での疾患を繋げる共通の標的と考えられる。これまでに我々は、MFS モデルマウスの大動脈中膜を用いて、FBN-1 結合タンパク質である ADAMTSL6 β が、ADAMTS4 との直接結合を介してその基質である Versican 複合体を分解することで、MFS の主たる死因である解離性大動脈瘤発症に関与する可能性を報告した (第 143 回日本歯科保存学会にて発表)。そこで本研究では、MFS 患者の大動脈病理切片を用いて、ADAMTSL6 β の解離性大動脈瘤における組織破壊の分子メカニズムを解析した。

【方法】

1. ADAMTSL6 β 、ADAMTS4、FBN-1 の複合体形成機構の解析: ADAMTSL6 β 、ADAMTS4 および FBN-1 の変異体組換えタンパク質を作製し、各々に対する結合活性を免疫沈降法にて解析した。
2. ADAMTSL6 β による ADAMTS4 活性化機構の解析: マウス血管平滑筋細胞 (mVMSC) に ADAMTSL6 β を過剰発現させ、ADAMTS4 組換えタンパク質を添加し、mVMSC の産生する Versican の分解活性に及ぼす影響を解析した。
3. Human FBN-1 と ADAMTSL6 β のモノクローナル抗体作製: ADAMTSL6 β 、FBN-1 の組換えタンパク質を作製し、モノクローナル抗体を作製した。
4. MFS の大動脈解離部における ADAMTSL6 β -ADAMTS4 複合体の発現解析: MFS と診断され、解離性大動脈瘤の手術で摘出された大動脈病変の組織解析に関して、3 で作製したモノクローナル抗体に加え、抗 ADAMTS4 および抗 Versican 分解産物抗体を用いて免疫組織化学解析を実施した。

【結果】

本研究では ADAMTSL6 β が MFS の解離大動脈瘤において組織破壊に促進的に働くことを見出した。そのメカニズムとして、ADAMTS4 は、ADAMTSL6 β の thrombospondin type I repeat を介して直接的に結合を介して、FBN-1 微細線維上に選択的に取り込まれること、ADAMTSL6 β -ADAMTS4 の直接結合を介して FBN-1 と結合している Versican の分解を促進することが判明した。また、MFS の解離性大動脈瘤の病理学的所見では、中膜で変性所見を認め、さらに大動脈中膜の弾性線維の崩壊の進行と ADAMTSL6 β 、ADAMTS4 の発現上昇 Versican の分解の促進が関連する所見が観察された。このような ADAMTSL6 β -ADAMTS4 を介した Versican の分解が大動脈壁の機械的外力を低下させ、MFS の解離性大動脈瘤で見られる非炎症性の組織破壊を促進することが示唆された。

【結論】

以上の結果より、ADAMTSL6 β は ADAMTS4 のアダプター分子として働き、ADAMTSL6 β と ADAMTS4 は互いに協調して Versican の分解に対して促進的に働き、MFS の大動脈中膜の組織破壊に関与している可能性が示唆された。この ADAMTSL6 β -ADAMTS4 を介した微細線維を中心とする機械的外力の維持機構の破綻が、MFS の解離性大動脈瘤発症過程に重要な役割を果たしている事が考えられた。今後、ADAMTSL6 β による ADAMTS4 の活性化機構の解明が、MFS を含む他の非炎症性組織崩壊を伴う結合組織疾患に対する病態解明および有効な治療技術へと発展する可能性が示された。従って、本研究成果は結合疾患と歯科領域の疾患に対する共通の標的とした新たな生物製剤の開発が期待できる。

音波式電動歯ブラシがコンポジットレジンの表面性状に与える影響について

¹昭和大学歯学部 歯科保存学講座 美容歯科学部門、²歯科理工学部門
○京泉秀明¹、寺島実華子¹、星野 睦代¹、真鍋厚史¹、宮崎隆²

Effect of the sonic toothbrush on surface morphology of composite resin

Department of Conservative Dentistry, ¹Division of Aesthetic Dentistry and Clinical Cariology,
²Division of Biomaterials and Engineering, Showa University School of Dentistry
○KYOIZUMI Hideaki¹, TERASHIMA Mikako¹, HOSHINO Mutsuyo¹, MANABE Atsufumi¹ and MIYAZAKI Takashi²

【目的】

電動歯ブラシには、回転式、超音波式や音波式などがありそれぞれ特徴を持っている。今回使用した歯ブラシは音波式の電動歯ブラシ ソニックアー (フィリップス) である。この歯ブラシの特徴は、音波水流を発生させ歯垢を効率的に除去することができ除去効果は非常に優れている。日本歯科保存学会秋季学術大会 (第 145 回) において、研磨材入りの歯磨剤を使用して音波式電動歯ブラシを使用すると暫間修復材料の表面性状に影響があることを報告した。

そこで今回は、音波式電動歯ブラシがコンポジットレジンの表面性状に与える影響について実験を行った。

【材料および方法】

摩耗材料として、フロアブルコンポジットレジンである MI フィル (ジーシー)、ユニフィルフロー (ジーシー) の 2 種類を使用した。

それぞれの材料を、製造者指示に従い直径 10mm 高さ 3mm の円柱状の試料を作製した。試料はシリコンカーバイトペーパー #1000 まで研磨し、次にプレシャイン (ジーシー) を使用し、最終研磨はダイヤモンド (ジーシー) を用いて行った。試料は相対湿度 100%、温度 37°C の恒温槽中に 1 時間放置した後、37°C の蒸留水中に 23 時間保管した。

音波式電動歯ブラシは、ソニックアー フレックスケアーブラチナ、ブラシヘッドはダイヤモンドクリーン ブラシヘッド スタンダードサイズ (フィリップス)、を使用し、ブラッシング圧は荷重約 100gf で、刷掃時間は 1 週間に相当する 90 秒で行った。ブラッシングは歯磨剤なしの水のみと歯磨剤ありで行った。歯磨剤は、ホワイト&ホワイト (ライオン) を使用し、スラリーは歯磨剤と蒸留水の割合が重量比 1 : 2 になるように調製した。

試料の表面をブラッシング前後で光沢度計 (VG2000, 日本電色) を使用して 60 度鏡面光沢法にて光沢度を測定し、さらに形状解析レーザー顕微鏡 (UK-X250, キーエンス) にて表面粗さの測定及び表面性状の観察を行った。試料数は各群 5 個とした。

【結果および考察】

歯磨剤なしの水のみでブラッシングを行った結果、MI フィル、ユニフィルフローともに光沢度はブラッシング前後でほとんど変化がなかった。表面性状の観察結果においても両者ともにほとんど変化がなかった。

歯磨剤を使用してブラッシングを行った結果、MI フィル、ユニフィルフローともに光沢度はブラッシング前後で大きく低下した。今回使用した歯磨剤には、清掃剤 (研磨材) として重質炭酸カルシウムが入っておりその影響と思われる。表面性状の観察の結果を Fig. に示す。ユニフィルフローよりも MI フィルの方が荒れが小さかった。MI フィルにはナノフィラー、ユニフィルフローにはマイクロフィラーが含有されており、フィラーの大きさやマトリックスレジンの種類によって機械的強度が異なるためと思われる。

そして、手用歯ブラシは、今回行った荷重 100gf よりも強く磨く場合が多いと推測され、音波式電動歯ブラシよりも、もっと表面性状に影響を与える恐れがあると思われる。

【まとめ】

音波式電動歯ブラシを使用してコンポジットレジンにブラッシングを行う場合、歯磨剤なしの水のみでは、表面性状に与える影響はほとんどなかった。しかし、研磨材入りの歯磨剤を使用して行くと、表面性状に与える影響が大きいことがわかったが、MI フィルはユニフィルフローに比較して、高い光沢度を保ち、表面性状の荒れが小さいことがわかった。

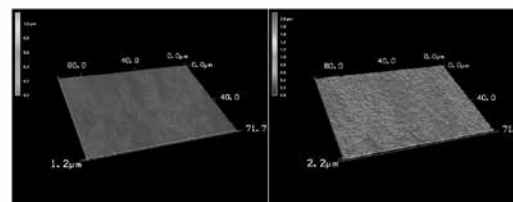


Fig. Specimen surface after brushing with toothpaste by a laser microscope (×150)

脱臼歯の保存に対する卵白の応用

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

○Emm Dayiriasat Hasan, 齋藤 隆史

Egg white as tooth storage media for avulsed tooth

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

○Md Riasat Hasan and Takashi Saito

[PURPOSE] An easily available tooth storage medium is required to preserve a tooth after avulsion when immediate re-implantation is not possible. Milk and Hank's balanced salt solution (HBSS) are recommended as tooth storage media, and egg white is also reported to be comparable with milk as a storage medium for avulsed teeth, although there is no histopathological data for this method. The purpose of the present study investigated the effectiveness of different tooth storage media using transplantation procedure.

[MATERIALS AND METHODS] This experiment used HBSS, milk and egg white as tooth storage media. Extracted rat molar teeth were immersed in these different storage media for one hour. Some samples were then fixed immediately, with the remaining samples transplanted in a receiving pocket within the abdominal wall. In the control group, the extracted teeth were fixed or transplanted immediately after extraction, with no storage. At 4 day, 7 day, 14 day after transplantation, rats were euthanized, the teeth carefully excised together with the surrounding tissue, and then examined by radiographic, histological and immunohistochemical methods.

[RESULT AND DISCUSSION] Teeth immersed for 1 h in milk showed the thinnest PDL. There was no significant difference between the HBSS group and the control group in terms of the number of cells and cell layers, whereas the egg white group had slightly less—and the milk group significantly less—cell numbers and cell layers. For immunohistochemistry, periostin labeling was prominent in the control, HBSS and egg white groups, whereas in milk group the labeling was generally weak with some intense punctate staining. After four days, evidence of early granulation tissue formation was observed in all groups. In the milk group, periostin labeling was found to be weak, and more CD68-positive cells were detected in the PDL. Furthermore, epithelial cell rests of Malassez (ERM) were markedly increased in all groups and formed a large cluster at one week after storage in HBSS, milk and egg white. At one week after transplantation, mature granulation tissue was formed in all groups. Some cathepsin K-positive cells were observed on the root surface of teeth in the milk group. At two weeks after transplantation, formation of alveolar bone was observed in all groups. In the HBSS and egg white groups, the PDL maintained a thickness similar to that in the immediate control group, whereas it was thinner in the milk group and was associated with some ankylosis. Many cathepsin K-positive cells were found around the alveolar bone and ankylosed areas in milk group. At two weeks after immersion in HBSS, ERM numbers had reduced to a level similar to that in the control group. In contrast, despite some reduction, ERM numbers remained high in the milk and egg white groups.

[CONCLUSION] The results of this study suggest that, due to its easy availability and effective preservation of the PDL, egg white might be a suitable storage medium for avulsed teeth.