# 再石灰化可能な白斑病変の臨床評価

<sup>1</sup>外務省 大臣官房 歯科診療所、<sup>2</sup>岡山大学大学院歯科保存修復学分野、<sup>3</sup>東京医科歯科大学大学院口腔機能再建工学分野、 <sup>4</sup>東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野

○北迫 勇一1,4、島田 康史2、池田 正臣3、田上 順次4

#### Clinical evaluation of remineralization capacity of white spot lesions

<sup>1</sup>Dental clinic, Ministry of Foreign Affairs, Tokyo, Japan <sup>2</sup>Department of Operative Dentistry, Okayama University Graduate school, Okayama, Japan <sup>3</sup>Oral Prosthetic Engineering, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan <sup>4</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate school, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan OYUICHI KITASAKO<sup>1</sup>, YASUSHI SHIMADA<sup>2</sup>, MASAOMI IKEDA<sup>3</sup>, JUNJI TAGAMI<sup>4</sup>

【目的】エナメル質の白斑病変(white spot lesion)には、初期う蝕(う蝕原生)以外に、エナメル質形成不全症や酸蝕症など非う蝕原生も存在する.過去の研究では、両者の識別なく、主に再石灰化促進剤の再石灰化効果が比較検討されてきた傾向にある.そこで本研究では、カルシウムおよびフッ化物配合ガムを用い、再石灰化可能な白斑病変について臨床評価を試みる.【方法】本研究趣旨に同意が得られ(歯学部倫理審査委員会承認番号: D2014-013)、エナメル質白斑(ICDAS code 1-2)を有する被験者45名(平均年齢26.1歳)に対し、口腔内診査、口腔内写真撮影、光干渉断層計(Optical Coherence Tomograpy、以下OCT)撮影を行い、2名の歯科医師で全ての白斑(140症例)をう蝕原生、非う蝕原生(エナメル質形成不全症または酸蝕症)およびう蝕原生・非原生の混合型の3群に分類した.その後、カルシウムおよびフッ化物配合ガム(POs-Ca F、江崎グリコ)を3ヶ月間摂取させ(1回2粒1日3回)、ガム摂取前後の白斑の病態を観察することで再石灰化可能な白斑について臨床評価を試みた.すなわち、ガム摂取開始1ヶ月毎に、白斑の表面性状変化をICDASコードで評価し、その脱灰深さ変化はOCT断層画像から脱灰深さを算出することで比較検討を試みた。ガム摂取前(OM)からガム摂取3ヶ月後(3M)におけるICDASコード変化は、Chi-squre test およびBonferroni correction を用いて危険率を5%として検定した。また、白斑の脱灰深さ変化は、各群の OM における脱灰深さを基準した場合の回復率をMunn-Whitney U test および Bonferroni correction を用いて危険率を5%として検定を行った。

【成績および考察】白斑 140 症例は、う蝕原生 72 症例 (51.4%)、非う蝕原生 24 症例 (17.2%)、両者の混合型 44 症例 (31.4%) に分類された。表 1 (Table1) に ICDAS コード変化を、図 1 (Figure1) に脱灰深さの回復率を各々示す。ICDAS コードは、う蝕原生・非う蝕原生間で有意差を認めた。また、回復率では、OM・3M 間の比較においてう蝕原生が他の群と比較して有意に高い値を示した。さらに、白斑の発症要因によりガム摂取前の脱灰形態に違いが認められ、脱灰が深く、広範囲に及ぶ白斑では再石灰化が困難な傾向を示した。白斑に対し再石灰化療法を試みる場合には、各種白斑の再石灰化傾向の違いについて考慮する必要性が示唆された。

【結論】各種白斑の再石灰化傾向は、その発症要因により異なり、う蝕原生が最も高い再石灰化傾向を示した. 【謝辞】本研究は、ISPS 科研費、IP16K11541の助成を受けたものです.

Table 1 ICDAS score transition (0M→3M)

Change score 2-1 score 2-0 score 1-0	No change score 2-2 score 1-1
45	27
25	19
6	18
	score 2-1 score 2-0 score 1-0 45

Figure 1 Mean recovery rate of the optical boundary depth derived from cross-sectional OCT images (%) % 30 Carious : Bars indicate statistical 25 significances (p<0.05) 20 Complex 15 10 Non-carious 5 n  $0M\rightarrow 1M$  $0M \rightarrow 2M$ 0M→3M

# 亜鉛含有ガラス塗布材の象牙質再石灰化促進効果に関する観察

1日本大学 歯学部 保存学教室修復学講座、2総合歯学研究所生体工学研究部門、3日本大学歯学部総合歯科学分野 〇古市 哲也 1、村山 良介 1、遠藤 肇 1、飯野 正義 1、石井 亮 1、瀧本 正行 2、宮崎 真至 2、升谷 滋行 3

# Observation on Dentin Remineralization Effect of Zinc-Containing Glass Coating Material

<sup>1</sup>Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan <sup>2</sup>Division of Biomaterials Science Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan <sup>3</sup>Department of Comprehensive Dentistry and Clinical Education, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

OTETSUYA FURUICHI¹, RYOSUKE MURUYAMA¹, HAJIME ENDO¹, MASAYOSHI IINO¹, RYO ISHII¹, MASAYUKI TAKIMOTO²,

MASASHI MIYAZAKI², SHIGEYUKI MASUTANI³

# 【緒言】

Minimal Interventionの概念の普及に伴って、根面齲蝕の予防のためにも再石灰化を促す重要性が認識されている。亜鉛イオンは抗菌性や歯質の再石灰化促進効果を示すとともに、コラゲナーゼの活性阻害能を有しており、硬組織疾患の予防に効果があることが報告されている。そこで、新たに亜鉛イオンを含有した試作根面齲蝕予防用材料に着目した。本材料は、歯面に塗布して象牙質表面にナノ粒子層を形成することで、再石灰化促進とともに齲蝕予防への効果が期待されているが、その詳細については不明である。そこで、ZIFが象牙質の再石灰化に及ぼす影響について、歯質の状態変化を非破壊的に評価が可能な超音波透過法および光干渉断層画像法を用いて経時的に観察するとともに、レーザー走査顕微鏡を用いて象牙質表面の形態的観察を行った。

# 【材料および方法】

ウシ抜去下顎前歯の唇側象牙質を 4×4×1mm のブロックとして切り出し、耐水性シリコンカーバイドペーパーの#2000 まで順次研磨した後、超音波洗浄を行ったものを試片として用いた。この試片に対して、製造者指示に従って亜鉛含有ガラス塗布材 (ZIF, GC) を塗布し、37℃人工唾液中で28 日間保管した。なお、脱灰条件として、1 日に2 回、0. IM 乳酸緩衝液に10 分間作用させた。試片の保管条件は、ZIF を塗布し、実験期間を通じて人工唾液に保管した群 (Baseline)、ZIF を塗布せず脱灰条件で保管した群 (De 群)、ZIF を塗布し、精製水で水洗した後に脱灰条件で保管した群 (ZIF 群) の3条件とした。試片に対して、超音波洗浄直後(0 日)、ZIF 塗布後、7、14、および28 日後の時点で超音波測定装置を用いて超音波伝網時間を計測し、超音波音速の経時的変化を求めた。また、光干波断層画像装置(Optical Coherence Tomography、以後0CT)を用いて信号強度分布を得ることで、そのピーク波形の変化を経時的に評価した。また、レーザー顕微鏡(VK-9700、KEYENCE)を用いて試片表層の観察を行った。なお、試片の数は6個とし、同一試片について経時的に観察を行った。

#### 【成績および考察】

超音波測定の結果、Baseline およびZIF 群においては、ZIF 塗布直後に音速が僅かに上昇し、その後実験期間を通じてBaseline では音速の変化は認めなかったが、ZIF 群では緩やかに音速の低下を認めた。De 群では他の群と比較して音速の経時的な低下を認めた。OCT 観察による信号強度分布は、Baseline およびZIF 群においては塗布直後に増幅し、ZIF 群はその後減衰する傾向を示した。これは、ZIF が歯質表面に沈着あるいは象牙細管内に侵入し定着したが、脱灰サイクルを行うことでZIF が歯面から経時的に脱離したことによるものと考えられた。これに対して、De 群は他の群と比較して信号強度分布の経時的な増幅を認めた。レーザー顕微鏡像からは、Baseline およびZIF 群において、ZIF 塗布直後で5~10μm 程の結晶構造物を含む体積物によって象牙質表面が被覆されている像が観察された。また、Baseline は実験期間を通じてZIF の歯面への沈着像を認めたのに対し、ZIF 群では経時的に結晶物の沈着量が減少し、象牙質面が現れたものの、その象牙細管は一部封鎖されている様相が観察された。De 群では削剰痕が不明瞭となり、象牙質表層が粗造になる傾向を示した。このことから、ZIF の歯面への沈着によって象牙質の脱灰は抑制されるものの、脱灰操作を繰り返すことで経時的にZIF が歯面から脱離する可能性があることが示唆された。

#### 【結論】

本研究の結果から、試作亜鉛含有ガラス塗布材である ZIF は、象牙質表層および象牙細管内に沈着することで、象牙質の再石灰化促進効果を有することが示された。

# フッ化ジアンミン銀による脱灰象牙質の変色の評価

「東京医科歯科大学大学院 う蝕制御学分野 ○マハムド サイド」、松井 七生子」、平石 典子」、井上 剛」、二階堂 徹」、田上 順次「

# Evaluation of discoloration of demineralized dentin with silver diamine fluoride

<sup>1</sup>Cariology and operative dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

OSAYED MAHMOUD<sup>1</sup>, Naoko Matsui<sup>1</sup>, Noriko Hiraishi<sup>1</sup>, Go Inoue<sup>1</sup>, Toru Nikaido<sup>1</sup>, Junji Tagami<sup>1</sup>

Purpose: To evaluate the effect of application of silver diamine fluoride (SDF) on discoloration of demineralized dentin over time.

Methods: Eighty dentin disc specimens were obtained from the cervical portion of bovine roots using a slow speed saw (IsoMet 1000, Buehler Ltd, Lake Bluff, Illinois, USA) with copious amount of water—cooling. The specimens were embedded in acrylic resin blocks, polished up to #2000—grit SiC paper and sonicated for 3 min to remove the smear layer. They were randomly divided into four groups: 0 min (control), 30 min, 5 hours and 13 hours ethylene—diamine—tetra—acetic acid (EDTA) treatment, to form demineralized dentin, respectively. A 38% SDF solution (Saforide, Bee Brand Medico Dental, Osaka, Japan) was then applied to dentin surface for 3 min according to the manufacturer's instructions, then rinsed with distilled water for 30 sec. A half of the specimens of each group were kept in shaded boxes and the other half kept in clear boxes. All the specimens were stored at 37° C under light exposure (18W, fluorescent, Mitsubishi, Japan). The color change was recorded using spectrophotometer (JP7200F, Juki, Tokyo, Japan) at following time intervals: before SDF application (baseline) and after application, immediately, 3 hours, 24 hours, 48 hours, 72 hours, 7 days, 10 days and 14 days". Each color was explained in a 3—dimensional CIELAB color space system (frequently denoted as L\*a\*b\*). The color difference (ΔE) between baseline and each time—interval point was calculated based on the mathematical equation:

$$\Delta E = [(\Delta L)^{2} + (\Delta a)^{2} + (\Delta b)^{2}]_{2}^{1/2}$$

Results: The 13 hours EDTA group showed the highest values for color change among different time intervals, with the control (0 min EDTA) being the lowest. The light exposed groups showed more color change compared to the unexposed groups.

Conclusion: Degree of dentin demineralization significantly increases the rate of dentin color change after application of SDF.

# フッ化カリウム及びフッ化ナトリウムの濃度が 微小剪断接着強さ及び脱灰抑制効果に及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院(TMDU)医歯学総合研究科 う蝕制御学分野 アルカタニ アリ、井上 剛、二階堂 徹、田上 順次

Effect of concentrations of potassium and sodium fluoride on micro-shear bond strength and inhibition of demineralization AlQahtani Ali, Go Inoue, Toru Nikaido, Junji Tagami Cariology and Operative Dentistry, Graduate School Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

Objective: There are several concentrations of fluoride sources in the market. The aim of this study was to investigate the effect of application of different concentrations of potassium and sodium fluorides for bond strength of a two-step self-etching system and protective effect against acidic challenge on bovine enamel.

Methods: Twenty four enamel blocks ( $6 \times 6 \times 2$  mm) were prepared from bovine teeth and the surfaces were polished and divided into two groups for micro-shear bond strength test and evaluation of the effect for inhibition of demineralization. The specimens of both groups were each treated by one of the following agents for 1 min; KF (1000, 9000, 55000) ppm, NaF (1000, 9000) ppm and deionized water (control). After treatment, for the first group Clearfil SE Bond 2 (Kuraray Noritake Dental) was applied on the treated surface and put Clearfil

AP-X (Shade A2) (Kuraray Noritake Dental) into a tygon tube (0.79mm diameter × 1mm height) and light cured. After removal of the tube, micro-shear bond strength test was performed. For the second group, the specimens after application of each solution on the window (1.5 ×1.5 mm) were immersed in demineralizing solution (pH 4.5) for 3 days then cut cross-sectionally and observed by 3D laser scanning confocal microscope (VK-X150/X160, Keyence). One way ANOVA was used to compare among tested groups.

Results: Lower concentrations of KF (1000 and 9000) ppm resulted in higher micro-shear bond strength values compared to the higher concentration of KF (55000 ppm) and NaF (1000,9000) ppm groups (Table). Moreover the NaF (9000 ppm) and KF (55000 ppm) showed higher resistance for acid challenge.

Conclusion: Micro-shear bond strengths were different in the same concentrations of fluoride between KF and NaF. Lower concentrations of KF (1,000 and 9,000 ppm) resulted in comparable micro-shear bond strengths to the control group. Despite the superior enamel protection against demineralization, KF (55,000 ppm) and NaF (9,000 ppm) significantly decreased micro shear-bond strength.

Table: Micro-shear bond strength (MPa)

	$Mean \pm SD$
Control	$22.4 \pm 4.6^{a}$
KF (1000 ppm)	$22.1 \pm 6.2^{a}$
KF (9000 ppm)	$22.3 \hspace{0.1cm} \pm 4.8^a$
KF (55000 ppm)	$17.5 \pm 5.7^{b}$
NaF (1000 ppm)	$16.2 \pm 4.7^{b}$
NaF (9000 ppm)	$16.4 \pm 4.0^{b}$

Means with the different letters within column shows significant difference.

# 白斑病変の表層下エナメル質における軟化進行の様相

1兵庫医科大学 医学部 歯科口腔外科学講座 ○清水 明彦1

# Softening Pattern of Subsurface Enamel in White-spot Lesions

<sup>1</sup>Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine, Nishinomiya, Japan OAKIHIKO SHIMIZU<sup>1</sup>

【目的】演者は、第 146 回日本歯科保存学会学術大会 (2017 年) において、う蝕病変が象牙質に波及している ICDAS code 2 の白斑の表面硬さは、そうでない白斑より軟化していることを報告した。その研究のなかで、白斑の表層下部のエナメル質の軟化の様相にはかなりの違いのあることが観察された。そこで今回は、白斑病変の断面の「硬さー深さ曲線」から軟化のパターンを調べ、初期エナメル質う蝕において、表層下部でどのようにう蝕による軟化が進行し、病変が象牙質に波及するかを検討することとした。

【方法】10%中性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 のう触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)。被験歯を一側からすり減らし、白斑面と直行する断面を露出させ鏡面研磨した。この白斑断面の「硬さ一深さ曲線」を作成するために、ヌープ硬度計 (MVK-E、明石社) を用いて、白斑表面から 50 μm 間隔で DEJ までの硬さを測定した。得られた白斑断面の「硬さ一深さ曲線」から、白斑下のエナメル質における病変の進行過程をパターンとして評価することを試みた。

【成績】ICDAS code 2 の白斑断面の「硬さー深さ曲線」をもとに軟化のパターンを調べたところ、以下の知見が得られた。軟化のパターンとして、エナメル質表層部直下のごく狭い範囲に軟化が認められ、それより深部(DEJ側)のエナメル質は健全エナメル質の硬さを維持している場合、初期段階の code 2 病変と考えられる。軟化パターンとして、表層下部にある程度の幅で軟化が認められ、それに反比例して健全エナメル質の幅が減少している場合、中期段階にある code 2 病変と考えられる。さらに軟化のパターンとして、表層下部から DEJ に至るエナメル質全層に及ぶ軟化が認められ、健全エナメル質が残っていない場合、code 2 の病変でも末期の段階にあると考えられる。以上のように3段階に分類した軟化パターンから、code 2 の白斑におけるう蝕病変の進行の経過をまとめると次のようになろう。初期段階では表層下部の軟化層の幅は狭いが、う蝕の進行拡大に伴って表層下部の軟化層の幅が広くなり、残存する健全エナメル質の幅は次第に狭くなっていく。そしてう蝕病変が DEJに到達するころには、健全エナメル質は消滅し、エナメル質の全層が軟化し、code 2 の白斑は末期の段階となり、その後う蝕は象牙質に波及する。

【考察】臨床的にはICDAS code 2 として一つのカテゴリーに分類され、視診による所見ではほぼ同じに見える白斑であっても、白斑の表層下部で起こっているエナメル質の軟化は、軽度なものから DEJ に及ぶ重度なものまで含まれることが分かった。エナメル質の全層が軟化しう蝕が象牙質に波及すると、エナメル質表層の再石灰化に必要なミネラルの供給量は著しく減少すると考えられる。その結果、エナメル質表層部の軟化が進み、やがて実質欠損が生じ臨床的に code 3 の白斑として認識されるようになる。白斑の治療は、本来なら白斑内部の軟化の程度を客観的に診断し、それぞれの病態に適した治療法を立案実施し、再石灰化の有無を評価し進めることが大切であろう。隣接面う蝕については、bite-wing X線写真で評価した臨床研究が報告されているが、それにも限界があり硬さの評価まではなされていない。一方隣接面以外の平滑面にできた白斑では、エナメル質内部における病変の広がりや軟化の程度を、臨床的に判定することが困難で、また再石灰化によりどこまで硬さが回復するかについても臨床データはなく、今後の重要な研究課題であろう。

【結論】ICDAS code 2 の白斑として一つのカテゴリーに分類され、視診による所見ではほぼ同じに見える白斑であっても、白斑の表層下で起こっているエナメル質の軟化 (崩壊) は、軽度なものから DEJ に及ぶ重度なものまで混在していることが分かった。今後は、それらの病態を臨床で客観的に診断できる方法の開発が望まれるところである。

# コンポジットレジンの硬化前の汚染のSS-OCT評価

<sup>1</sup>岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 歯科保存修復学分野、<sup>2</sup>Department of Restorative Dentistry, University of Washington School of Dentistry、<sup>3</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科う蝕制御学分野、<sup>4</sup>国立長寿医療研究センター
○横山 章人<sup>1</sup>、島田 康史<sup>1</sup>、山路 公造<sup>1</sup>、SADR Alireza<sup>2</sup>、田上 順次<sup>3</sup>、角 保徳<sup>4</sup>、吉山 昌宏<sup>1</sup>

#### Assessment of surface contamination of uncured composite resin using SS-OCT

<sup>1</sup>Department of Operative Dentistry, Okayama University, Okayama, Japan <sup>2</sup>Department of Restorative Dentistry, University of Washington School of Dentistry, Seattle, USA <sup>3</sup>Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan <sup>4</sup>National Center for Geriatrics and Gerontology, Obu, Japan OAkihito YOKOYAMA<sup>1</sup>, Yasushi SHIMADA<sup>1</sup>, Kozo YAMAJI<sup>1</sup>, Alireza SADR<sup>2</sup>, Junji TAGAMI<sup>3</sup>, Yasunori SUMI<sup>4</sup>, Masahiro YOSHIYAMA<sup>1</sup>

【緒言】コンポジットレジン修復において、被着面の血液汚染は接着阻害因子となることが知られている。血液汚染はレジンを充填し光重合するまでの間にも起こり得るが、その硬化後のコンポジットレジン性状への影響は明らかでない。波長走査型光干渉断層計(Swept-source optical coherence tomography、SS-OCT)は、非破壊的に内部構造を観察する画像診断機器として注目されている。本研究は、コンポジットレジン硬化前に血液汚染させた場合のレジン硬化後の表層を、SS-OCT を用いて観察した。

【材料と方法】幅 2mm、深さ 2mm のテフロンモールドにコンポジットレジン(クリアフィル マジェスティ ES-2 シェードA3、クラレノリタケデンタル)を充填し、試料を作成した。実験群として、光照射前に精製水(W 群)あるいは牛保存血液(B 群)を滴下し 1 分間経過後に水洗・乾燥した汚染群と、汚染処理を行わずに硬化させた対照群 C 群)を用意した(n=5)。試料はポリストリップスおよびスライドグラスにて圧接し、20 秒間光照射を行った。作製した試料を 24 時間水中に保管し、その後SS-OCT(IVS-2000、サンテック)を用い、それぞれのコンポジットレジン圧接面表面から 5 つの断層画像を撮影した。得られた画像は画像処理ソフトウェア(Image J)を用い、表層から幅 1500  $\mu$ m、光学的深さ 500  $\mu$ m の範囲内における輝度の高い内部欠陥領域を検出し、欠陥の発現頻度と面積比を統計学的有意水準  $\alpha=0.05$  にて比較した。

【結果および考察】汚染群のコンポジットレジンのSS-OCT 画像ではレジン内部の欠陥に相当する部位が周囲より高い輝度を示すシグナルとして観察され、表層側に比較的多く認められた。W群あるいはB群における欠陥の発現頻度ならびに面積比は、C群よりも有意に高かった(p<0.05)。したがって、硬化前のレジンに水あるいは血液汚染後の水洗操作により、レジン表層に欠陥を生じやすいことが推測された。

# レジンコーティング法が CAD/CAM インレーに対する象牙質接着強さと客壁適合性に及ぼす影響について

<sup>1</sup>東京医科歯科大学 大学院 う蝕制御学分野 ○盧山 晨<sup>1</sup>、高橋 礼奈<sup>1</sup>、二階堂 徹<sup>1</sup>、田上 順次<sup>1</sup>

The effect of resin coating technique on dentin bond strength and internal adaptation of CAD/CAM—fabricated inlays

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

Dental University, Tokyo, Japan

OSHIN ROZAN<sup>1</sup>, RENA TAKAHASHI<sup>1</sup>, TORU NIKAIDO<sup>1</sup>, JUNJI TAGAMI<sup>1</sup>

【目的】近年の CAD/CAM システムの臨床応用によって従来の間接修復法は大きな変革期を迎えている。修復物の装着を1回で完了できる "Single visit treatment" が可能となったことで、仮封に対する考え方の再検討も必要である。レジンコーティング法は、従来の間接修復法において歯髄保護と象牙質接着性の向上に重要な役割を果たしてきた。本研究では、CAD/CAM インレー修復にレジンコーティング法を応用した場合の象牙質接着性能を微小引張り接着試験と窩壁適合試験を用いて検討した。【材料及び方法】72 本のヒト健全技去大臼歯に MOD 窩洞(幅 4mm、深さ 3mm)を形成した。次に試料を 3 群に分けた。すなわりコーティングなし(non-coat 群)、G-Premio Bond(GC)でコーティング(G-Premio 群)、Clearfil SE Bond 2 と Clearfil Majesty ES Flow(low) (クラレノリタケデンタル)でコーティング(SE2+Flow 群)したものである。その後、CAD/CAM システム(PLANMECA FIT、GC)を用いて MOD 窩洞を光学印象採得した。試料を 1 時間水中保管し、その間に CAD/CAM レジンブロック(Cerasmart、GC)を用いてインレー体の作製を行った。その後、3 種のレジンセメント;G-CEM LinkForce(LinkForce:GC)、Panavia V5 (V5:クラレノリタケデンタル)、RelyX Ultimate (RelyX:3M)を用いてインレー体を装着した。試料は、サーマルサイクル(5℃-55℃)5000 回負荷後に半切し、一方は微小引張り接着試験、他方は窩壁適合性試験に供した。微小引張り接着試験用試料は、ビーム状にトリミングし、EZ-SX(島津製作所)にて微小引張り接着試験を行った(クロスヘッドスピード 1.0 mm/min)。窩壁適合性の評価は、切断面を鏡面研磨した後、レーザー顕微鏡(WK-X150、キーエンス)にてインレー体と歯質の適合性を評価した。

【結果】微小引張り接着試験の結果を Fig. に示す。LinkForce を用いた場合、G-Premio 群、SE2+Flow 群では non-coat 群に比べて有意に高い接着強さを示した。一方、V5 を用いた場合、G-Premio 群は non-coat 群より、SE2+Flow 群は G-Premio 群、non-coat 群より有意に高い値を示した。 RelyX を用いた場合、コーティングの有無により接着強さに有意な差は認められなかった。 窩壁 適合性試験の結果、すべての修復物の試料において 90%以上の良好な適合性が認められた。

【結論】"Single visit treatment"を想定した場合の CAD/CAM インレー修復の象牙質に対する接着強さは、レジンコーティングの有無とその材料選択により影響を受けることがわかった。一方、CAD/CAM インレー修復の窩壁適合性は、いずれの試料においても良好であった。

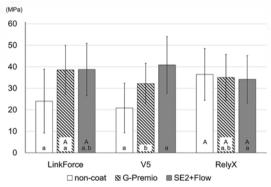


Fig. Microtensile bond strengths to dentin

The data were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's test.

Within the same coating group, the same small letters are not statistically different (p>0.05).

Within the same cement group, the same capital letters are not statistically different (p>0.05).

# レジンセメンテーション用前処理材の多種メタルフリー修復材料への接着有効性

1日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座

○越田 清祐¹、河本 芽¹、鴇田 智重¹、前野 雅彦¹、柵木 寿男¹、奈良 陽一郎¹

# Bonding validity of pretreatment agents for resin cementation to various metal-free restoratives

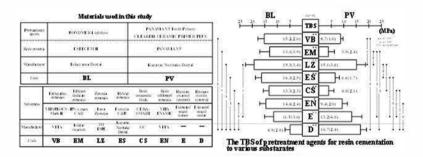
<sup>1</sup>Department of Adhesive Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University, Tokyo, Japan OSeisuke KOSHIDA<sup>1</sup>, Mei KOUMOTO<sup>1</sup>, Chie TOKITA<sup>1</sup>, Masahiko MAENO<sup>1</sup>, Toshio MASEKI<sup>1</sup>, Yoichiro NARA<sup>1</sup>

【目的】メタルフリー修復物に対する前処理法の発展は、患者の願いである高品位な審美性歯冠修復の具現化に大きく寄与する。近年、歯質と修復物との接着一体化のみならず、化学重合性能の向上、被着対象へのマルチユース化、利便性の亢進を図った前処理材が登場している。そこで本研究では、レジンセメンテーション用前処理材の多種メタルフリー修復材料への接着有効性について、引張接着強さの観点から検討した。

【方法】表に本研究で用いた材料を示す。前処理材には、汎用性化学重合型のBONDMER Lightless、ならびに歯質用のPANAVIA V5 Tooth Primer と汎用性修復材料用のCLEARFIL CERAMIC PRIMER PLUS を推奨セメントと共に選択した。接着試験試料の作製は、直径 2.4 mm の円形開孔部を有する厚さ 70 μm のアルミ箔テープによって被着面規定した各被着体に対し、製造者指定に従い前処理を行い、規格化レジン硬化体を 2種セメントによって接着した。ついで 37℃水中に 24 時間保管後、1.0 mm/min 条件下にて引張接着強さ(TBS)を測定(n=4)した。得られた値は二元配置分散分析、Tukey の検定、および平均値の差の検定による統計学的分析を行った。

【成績】図に得られた結果を示す。前処理材および被着体の違いは、それぞれ TBS 値に有意な影響を与えていた。また TBS 値に対する前処理材の効果は、被着体によって有意に異なった。前処理材において、BL を用いた各メタルフリー修復材料に対する TBS 値は、対照とした D 値より有意に大きかった。また LZ を除く修復材料への TBS 値は、第二対照の E 値と同等であり、LZ 値は E 値より有意に大きいことから、BL のメタルフリー修復材料に対する優れた接着有効性が明らかになった。一方、PV では、D 値が LZ を除く修復材料より有意に大きく、また E 値は EM、ES、CS 値より有意に大きいことから、歯質用前処理材の良好な接着効能が推察できた。一方、前処理材を含むセメントシステムとしては、LZ を除くいずれのメタルフリー修復材料に対しても BL は PV より有意に大きい値を示した。これはコンポジットレジン直接修復にも応用可能なボンディング材としての性能を具備する汎用性化学重合型前処理材が、セメント泥とのぬれ性や一体化などの亢進を促し、TBS の増強に寄与したと考える。また、E に対しての BL 値と PV 値は同等であったが、D に対しては BL 値が有意に大きかった。BL の汎用性化学重合型前処理材の効果は、PV の歯質用前処理材には及ばないことから、歯質および修復材料に拘わらない"真の汎用性"を兼備した前処理材開発の難しさが示された。

【結論】レジンセメンテーション用前処理材の接着効性は、被着体となるメタルフリー修復材料および歯質によって有意に異なることが明らかとなった。本研究の一部は、JSPS17K11719の助成を受けた。



# エナメル質初期齲蝕病巣の再石灰化過程におけるオフィスブリーチング剤の効果

「神奈川歯科大学」大学院歯学研究科」口腔統合医療学講座 保存修復学分野、『神奈川歯科大学 大学院歯学研究科 顎額面病 態診断治療学講座 放射線応用科学分野、『神奈川歯科大学 大学院歯学研究科 口腔科学講座 硬組織分子細胞生物学分野 ○國松 雄一¹、飯塚 純子¹、谷口 紀江²、高垣 裕子³、向井 義晴¹

#### Effect of in-office bleaching agent for remineralization process of enamel subsurface lesions.

<sup>1</sup>Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Interdisciplinary Medicine, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University <sup>2</sup>Division of Radiopraxis science, Department of Dentomaxill facial diagnosis and treatment, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University <sup>3</sup>Division of Molecular and Cellular Biology of Mineralized Tissues, Department of Oral Sciences, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University

OYUICHI KUNIMATSU¹, JUNKO IIZUKA¹, MOTOE TANIGUCHI², YUKO TAKAGAKI³, YOSHIHARU MUKAI¹

# 【研究目的】

エナメル質表層下脱灰病巣を形成している表層にはサブミクロンレベルの孔や裂構が存在し、病巣体部に侵入したタンパク質等の有機物が再石灰化の進行を妨げている可能性が指摘されている。 そこで我々は、エナメル質表層下脱灰病巣に侵入している有機物を分解し効果的な再石灰化を誘導するための手段の一つとしてオフィスブリーチング剤の有効性を検討してきた.

本研究では、オフィスブリーチング剤適用下におけるエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化様相を Micro-Raman spectroscopy (RAMAN) にて評価した。

#### 【材料および方法】

ウシ下顎中切歯よりエナメル質片を直径5 mmの円柱状に切り出し平坦な面を作製後、耐水研磨紙2,000番で研磨した。耐酸性メーニッシュにて試験面を2×3 mmに規定後、以下の5 群に分けた (1) Sound 群: 耐水研磨紙2000番で研磨した健全エナメル質。(2) DS 群: エナメル質片を脱灰緩衝液 (0.1 M lactic acid, 8 % methylcellulose, 0.2 ppm F, pH 4.6) に37℃で10日間浸漬し表層下脱灰病巣を作製後、安静時唾液に28日間浸漬 (3) DSR 群: DS 群と同様にして唾液に浸漬後、再石灰化液に28日間浸漬 (4) DSBR 群: DS 群と同様に唾液に浸漬後、オフィスブリーチング剤である Hi-Lite (松風) の適用3回を1セットとして2セット行い、再石灰化液に28日間浸漬した。各群脱水、レジン包埋後、RAMAN 分析に用いた(Nicolet Almega XR、Thermo Fisher Scientific)。分析条件は、励起波長: 780 nm、露光時間: 1.00 秒、露光回数: 200回、アパーチャ: 25 μm ピンホール、グレーティング: 1,200 lines / m とし、分析ソフト (OMNIC、Thermo Fisher Scientific)を用いて分析を行った。エナメル質表層から60 μm 付近を6点計測したものの平均値をその試料の値とした。統計処理にはKruskal - Wallis およびSteel - Dwass を用い、有意水準5 %にて行った。

#### 【結果】

RAMAN 分析では、アミド基の値は4 群間で有意差は認められなかったが、DSBR 群はDSR 群に比較して低い値を示した。リン酸基はSound 群に比較しDS、DSR 群で有意な減少を認めたが、DSBR 群では Sound 群と有意差を認めなかった。また、リン酸基/アミド基の比較においてもDSR 群が Sound 群と比較して有意な減少を認めたが、DSBR 群は有意差を認めなかった。

# 【考察】

我々は既に唾液に浸漬したエナメル質表層下脱灰病巣がブリーチングを行うことにより再石灰化が有意に促進されることを Transverse Microradiography で確認しており、このことから唾液自体にも再石灰化の効果がある一方で病巣に侵入した唾液の成分が再石灰化を阻害している可能性が示唆されていた。また、オフィスブリーチングを唾液を侵入させたエナメル質表層下病巣に適用することにより、唾液由来の有機質成分を減少させることができることも確認している。今回、唾液侵入させたエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化期間前にオフィスブリーチングを施すという試みを行ったが、RAMAN 分析結果から、DS およびDSR 群のリン酸基が有意に減少しているのに対し、DSBR 群では Sound 群と同程度であったこと、ならびにブリーチングによりアミド基が減少する傾向が認められたことから、ブリーチングにより表層下病巣内に侵入した唾液由来の有機質が減少し HAP 結晶の効果的な回復が誘導されている可能性が示された。

#### 【結論】

# 試作ホームブリーチ材の漂白効果について

<sup>1</sup>東京医科歯科大学 大学院 う蝕制御学分野 ○大槻 昌幸<sup>1</sup>、保坂 啓一<sup>1</sup>、平石 典子<sup>1</sup>、田上 順次<sup>1</sup>

# Evaluation of an experimental home bleaching material

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

OMASAYUKI OTSUKI¹, KEIICHI HOSAKA¹, NORIKO HIRAISHI¹, JUNJI TAGAMI¹

【目的】歯の漂白治療は、人々のQOLの向上に寄与し、費用対効果が高く、また、満足度の高い審美歯科治療のひとつである。 生活歯の漂白法は、トレーを用いて家庭で行うホームブリーチと、診療室で処置を行うオフィスブリーチに大別される。ホームブリーチはオフィスブリーチに比べて、一般に有効成分の過酸化物が低濃度であり、また、触媒の添加・加熱等がないために、漂白効果が緩やかに発現するが、より短期間で高い漂白効果が得られるホームブリーチ材が望まれる。本研究では、試作ホームブリーチ材の漂白効果について牛歯変色歯モデルを用いて評価を行った。

【方法】抜去ウシ下顎切歯の唇側歯冠中央を耐水研磨紙用いて研削して、エナメル質の厚さが約 1mm になるように平坦面を調製し、ダイヤモンドディスクを用いて注水下で、約 5mm x 5mm の試片を切り出した。試片は、内径 10mm、高さ 5mm のアクリルチューブに歯科用常温重合レジンで包埋し、エナメル質面を耐水研磨紙 #1,200 で研磨して被検面とした。紅茶ティーバッグから沸騰水で抽出したものを染色液とし、37℃で7 日間、試片を浸漬した。染色後、被検面を色彩計(NR-11、日本電色)で測色し、L\*a\*b\*値を求めた。いずれも主成分として 10%過酸化尿素を含有している試作ホームブリーチ材(HWX-01、ジーシー)と市販のホームブリーチ材(ティオン ホーム、ジーシー)を本研究では用い、それぞれ New 群、TiON 群とした。被検歯面に、ホームブリーチ材を適量塗布し、37℃湿箱中に2 時間保管後、ホームブリーチ材を除去して、測色を行った。漂白処置と測色は6回繰り返し、漂白前と各回の漂白後の測色値の差 dl\*、da\*、db\*を求め、また、それらから色差 dE を算出した。各実験群とも試料数は10 例とした(N=10)。得られた結果は、二元配置分散分析で有意水準5%にて統計学的検討を行った。

【成績】両実験群ともに、肉眼にて、顕著な漂白効果が認められた。L\*値は経時的に大きく増加し、a\*値と b\*値は概ね低下した。特に、New 群の b\*値の低下が顕著であった。それにより、両実験群とも色差 dE は経時的に増加した。2 群間の dL\*に有意差は認められず、一方、da\*と db\*については、両実験群間に統計学的有意差が認められた。また、dE においても、両実験群間に有意差が認められ、New 群の方がより大きな変化を示した。以上より、New 群は TiON 群に比べて、優れた漂白効果を示すことが明らかになった。過酸化尿素を主成分としたホームブリーチ材では、水分等の存在下で、過酸化尿素が尿素と過酸化水素に分解し、さらに、過酸化尿素が水と酸素に分解する過程において生じたフリーラジカルによって、有色の高分子が分解されて漂白効果が発現するとされている。本実験に使用したホームブリーチ材は、いずれも過酸化尿素の含有量は 10%で同じであることから、用いられている溶媒等の違いによって、過酸化尿素の分解速度に差が生じ、これによって漂白効果に差が出た可能性が考えられる。また、試作ホームブリーチ材は、ティオン ホームよりもやや粘度が高く、これも漂白効果に影響を与えた可能性が考えられる。

【結論】試作ホームブリーチ材HWX-01 は、市販のホームブリーチ材ティオン ホームに比べて優れた漂白効果を示した。

# 歯髄創傷治癒モデルラットを用いた Glucose Transporter-4 の局在および遺伝子発現の解析

「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
○遠間 愛子¹、大倉 直人¹、枝並 直樹¹、竹内 亮祐¹、吉羽 永子¹、吉羽 邦彦¹、野杁由一郎¹

# Immunohistochemical and Gene-expression Analysis of Glucose transporter-4 Following Direct Pulp Capping with Mineral Trioxide Aggregate in Rat Molars

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

○AIKO TOHMA¹, NAOTO OHKURA¹, NAOKI EDANAMI¹, RYOSUKE TAKEUCHI¹, NAGAKO YOSHIBA¹, KUNIHIKO YOSHIBA¹, YUICHIRO NOIRI¹

#### 【目的】

生命を維持する上で重要なグルコースは、組織再生・修復時においても損傷した組織タンパク質合成に関与する。我々は、グルコース輸送に関与する。glucose transporter (Glut) 1 およびGlut2 が歯髄組織において正常時の象牙芽細胞や創傷治癒過程での歯髄細胞や象牙芽細胞様細胞で発現していることを第144回日本歯科保存学会で報告した。このことから、通常よりも外部からグルコースを取り込こむことで急速な細胞増殖が可能となり、迅速な歯髄修復に対応していると考えられる。一方、Glut4 と呼ばれる上記2つとは異なるグルコース輸送担体は、糖尿病(DM)患者において細胞膜表面へtranslocation されないため血中グルコースを細胞内に取り込めない。従って、栄養素を確保できず、細胞増殖が行なえないことから炎症時における治癒遅延につながると予想される。これまで歯髄とGlut4 との関連についての報告はないため、本研究では、歯髄削傷治癒モデルを用いてGlut4の局在およびmRNA発現量を時空間的に解析することでDM患者の創傷治癒遅延過程の一端を解明することを目的としている。

#### 【材料と方法】

本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号:27新大研第79号1)。第144回日本歯科保存学会で報告したmineral trioxide aggregate (MTA, White ProRoot MTA; Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK)による歯髄創傷治癒モデルラットを使用して実験を行った。すなわち、8週齢Wistar系雄性ラットの上顎左側第一臼歯をラウンドカーバイドバーで露髄後、MTA 断髄を施し、その後フロアブルコンポジットレジン(Beautifil Flow; Shohu, Kyoto, Japan)で充填を行った。上顎右側第一臼歯は未処置の対照群として用いた。断髄後1,3,5,7日後に4%PFA溶液で灌流固定を行い、第一臼歯を周囲の組織と共に摘出し、10%EDTA溶液に4週間浸漬して脱灰させた後、パラフィン切片を作製した。近心根管を観察対象とし、Glut4の局在について酵素抗体法だけでなく、Nestin(象牙芽細胞分化マーカー)を使用した蛍光二重染色法による詳細な解析を行った。さらに上顎第一臼歯から、RNA 抽出キット(TRIzol, Life technologies)でmRNA を抽出後、real-time PCR 法によって処置群における1,3,5,7,14日後の SIc2a4 (encoding Glut4)、NestinのmRNA 発現量について未処置歯を対照群とし、βアクチン発現量を内部標準とした Dunnett 検定による経時的比較解析を行った。

#### 【結果】

正常歯髄での酵素抗体法による免疫染色反応では象牙芽細胞にGlut4 陽性反応を認めた。MTA 断髄 1 日後の歯髄ではGlut4 陽性細胞は認められなかったが、3 日後では断髄部直下から歯髄内全体にかけて楕円形、紡錘形あるいは不定形のGlut4 陽性反応が認められた。断髄 5 日後では、さらに歯髄内全体のGlut4 陽性反応が強く認められ、7 日後では形成された修復象牙質下に円柱形に整列したGlut4 陽性象牙芽細胞様細胞が認められた。Nestin との蛍光二重染色法では、断髄部直下にNestin 陽性反応と一部一致する Glut4 の陽性反応を認めた。さらに、断髄後の SIc2a4 mRNA 発現レベルは未処置歯群と比較し、3、5、7 日後に有意に増加し(P<.01)、Nestinの mRNA 発現量は5 日後に有意に増加した(P<.01)。

#### 【老室】

MTA 断髄後では全体の歯髄細胞だけでなく、断髄部直下で Glut4 と Nestin の二重場性を示す象牙芽細胞様細胞が確認されると共に、遺伝子発現において Slc2a4 および Nestin が 5 日後にピークを迎えたことから、Glut4 による創傷部位へのグルコース栄養供給による迅速な歯髄細胞の増殖亡進作用と、修復象牙質形成過程における象牙芽細胞様細胞への分化に導いていることが推察される。

#### 【結論】

ラット臼歯では、Glut4は正常歯髄において象牙芽細胞で発現が観察されるとともに、MTA 断髄後の歯髄修復過程において Glut4は処置後 3-7 日にかけて局在と遺伝子発現量の時空間的変化が観察された。

# 低酸素誘導因子 (HIF-1)による第三象牙質形成に与える影響

 $^1$ 大阪大学大学院歯学研究科 $^1$ D腔分子感染制御学講座(歯科保存学教室) 〇岡本 基岐 $^1$ 、小道 俊吾 $^1$ 、Manahil Ali $^1$ 、渡邉 昌克 $^1$ 、高橋 雄介 $^1$ 、林 美加子 $^1$ 

# Effects of hypoxia inducible factor 1 on the healing process of dentin-pulp complex

<sup>1</sup>Osaka University Graduate School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry and Endodontology OMOTOKI OKAMOTO<sup>1</sup>, shungo komichi<sup>1</sup>, Ali Manahil<sup>1</sup>, masakatu watanabe<sup>1</sup>, yusuke takahasi<sup>1</sup>, mikako hayashi<sup>1</sup>

【研究目的】我々は、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子解析により窩洞形成後の歯髄組織において、Tissue inhibitor of metalloproprtease (TIMP1)の遺伝子発現が上昇していることを報告した 1)。また、ラットを用いた覆髄実験において TIMP1 を直接覆髄薬として応用し、第三象牙質を誘導することを報告した 2)。これまでに TIMP1 は matrix metalloproprtease を阻害する働きだけでなく、低酸素誘導因子 (HIF1) の発現調整をおこなっていることが報告されている。さらに、HIF1 により歯髄細胞の様々な機能が促進されることが明らかになっていることから、我々は、TIMP1 が第三象牙質の形成を誘導するメカニズムの一端を HIF1 が担っているという仮説を立てた。本研究では、HIF1 の第三象牙質形成に与える影響を検討するために、低酸素模倣剤である Deferoxamine (DFO) および HIF1 阻害剤として考えられている Rapamycin が歯髄組織の創傷治癒に与える影響を、ラットを用いた直接覆髄実験モデルにて検討をおこなった。

【材料および方法】本研究は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認下で実施した(承認番号:動歯28-014-0)。8 週齢雄性Wistar系ラットに全身麻酔下で上顎第一日歯咬合面にφ0.4mmの露髄を伴う窩洞を形成し、スポンゼル(アステラス製薬)に低酸素模倣剤であるDFOを含侵させて、直接覆髄剤として応用した。その後、グラスアイオノマーセメントFUJIIX (GC)にて仮封した。4週間経過後、灌流固定し、通法にて組織切片を作製し、H-E 染色を施して形成された第三象牙質について病理組織学的評価を行った。コントロールにはPBSを用いた。さらに、HIF1の影響を明らかにするために、露髄を伴う窩洞を形成する4時間前に、HIF1の阻害剤と考えられているRapamycin(フナコシ)を腹腔内投与し、ProRoot MTAにて直接覆髄を行った後、3日ごとにRapamycinを腹腔内投与した。直接覆髄直後および2日後の試料に対しては免疫蛍光染色(HIF1α、TIMP1)およびH-E 染色を、4週間経過した試料に対しては、マイクロCTによる画像解析を実施し、免疫蛍光染色(DSPP)およびH-E 染色にてRapamycin 投与群と非投与群の比較検討をおこなった。統計学的有意差検定はt検定にて評価した(有意水準5%)。

【結果】低酸素模放剤であるDFO を覆髄剤として応用することで、ProRoot MTA 同様に覆髄剤直下の歯髄組織に硬組織形成を誘導することが明らかになった。ProRoot MTA をもちいて直接覆髄をおこなった直後および2日後の試料において、Rapamycin 投与群のHIF1  $\alpha$  およびTIMP1 は、Rapamycin 非投与群と比較して異なる発現パターンを示した。すなわち、 HIF1 およびTIMP1 の象牙芽細胞における発現が消失していた。また、4 週経過後の Rapamycin 投与群において、病理組織学的な検討により DSPP 陽性細胞を認め、硬組織を誘導するものの、画像解析による定量評価より、覆髄剤直下から硬組織までの空隙が有意に大きい治癒形態を示した(p<0.05)。

【考察および結論】低酸素模倣剤の DFO は、象牙質歯髄複合体の窩洞形成部位直下に硬組織を誘導することが明らかとなったことにより、低酸素誘導因子促進物質は覆髄剤として応用できる可能性が示された。さらに HIF1 の阻害剤として用いたRapamycin を用いた動物実験より、HIF1 と TIMP1 は相互に影響している可能性が考えられ、本研究結果は、低酸素誘導因子が第三象牙質形成に重要な役割を果たしており、TIMP1 が関わる硬組織の誘導メカニズムの一端を HIF1 が担っている可能性が考えられた。本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金(JP16K20453、JP17K11704)の補助の下に行われた。1) Yoshioka S、Takahashi Y et al. J Biochem、20132) Okamoto M、Takahashi Y et al. Pulp Biology and Regeneration Group Meeting 2016

# Nano Hydroxiapatite 含有 4-META/MMA-TBB レジンがヒト歯髄幹細胞に及ぼす影響について

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

〇吉田 晋一郎  $^1$ 、杉井 英樹  $^1$ 、友清 淳  $^1$ 、長谷川 大学  $^1$ 、糸山 知宏  $^2$ 、御手洗 裕美  $^2$ 、有馬 麻衣  $^2$ 、濱野 さゆり  $^3$ 、野津 葵  $^2$ 、和田 尚久  $^4$ 、前田 英史  $^1$ 

#### The effects of 4-META/MMA-TBB resin including nano hydroxyapatite on human dental pulp stem cells.

<sup>1</sup>Department of Endodontology, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan <sup>2</sup>Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan <sup>3</sup>OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan <sup>4</sup>Division of General Oral Care, Kyushu University Hospital, Fukuoka, Japan OSHINICHIRO YOSHIDA<sup>1</sup>, Hideki Sugii<sup>1</sup>, Atsushi Tomokiyo<sup>1</sup>, Daigaku Hasegawa<sup>1</sup>, Tomohiro Itoyama<sup>2</sup>, Hiromi Mitarai<sup>2</sup>, Mai Arima<sup>2</sup>, Sayuri Hamano<sup>3</sup>, Aoi Nozu<sup>2</sup>, Naohisa Wada<sup>4</sup>, Hidefumi Maeda<sup>1</sup>

【目的】近年、う触や外傷により生じた偶発的露髄を想定した直接覆髄材の研究が行われているが、十分な修復象牙質形成と長期的な予後が見込める報告は多くない。4-META/MMA-TBB レジン(Super-Bond: SB)は、歯科用接着材料として幅広く臨床の場で応用されているが、直接覆髄材料としての実用化には至っていない。従来、硬組織形成を誘導させる補填材料としてハイドロキシアパタイト(HAp)が用いられており、その高い生体活性および生体親和性が証明されている。我々は以前、CaCl2含有 SBが生体内で骨伝導能を示すことを報告している(Maeda et al., Histol Histopathol, 2014)。そこで本研究では、SB にナノサイズで粉砕した HAp (naHAp)を複合化させることにより試作した SB を用いて、歯髄体細胞の象牙芽細胞様細胞分化および直接覆髄後の修復象牙質形成に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】本実験では、質量比で10,30,50%のnaHApを含有するSBと、マイクロサイズで粉砕したHAp(miHAp)およびCaCl₂を質量比で10%含有するSBを試験群として実験に使用した。(1)引張試験:象牙質を露出させた牛歯にアクリル棒(径5mm、高さ20mm)を各試験群のSBを用いて接着させた。引張強さはオートグラフ (AGS-J;島津製作所)を使用して測定した。サーマルサイクル試験:サーマルサイクリングK178(東京技研)を用いて、5℃の水中に20秒浸漬、室温大気中に20秒、そして55℃の水中に20秒を1サイクルとし、5000回繰り返した。その後引張強さを測定した。(2)各試作SBが歯髄幹細胞の象牙芽細胞様細胞分化に及ぼす影響について検討するため、SBディスク(径8mm、厚さ1mm)を作製し、そのディスク上でヒト歯髄幹細胞を培養した。象牙芽細胞関連因子(DSPPおよびDMP1)の遺伝子発現を定量的RT-PCR法、タンパク発現はウエスタンブロット法を用いて解析した。(3)ラット露髄モデル(Wistarラット、8週齢、雌性)を用いてSB、30%naHApおよび10%CaCl₂含有SBによる、直接覆髄後の修復象牙質形成についてH-E染色を用いて検討した。いずれの実験においてもSB単味を対照群とした。すべての実験は九州大学大学院歯学研究院生命倫理委員会および九州大学動物実験委員会の承認の下で行った。

【結果】(1) 引張試験の結果、SB 群と比較して10%naHAp, 30%naHAp, 10%niHAp 含有 SB 群の引張強さは有意な差を認めなかったが、50%naHAp および10%CaCl₂含有 SB 群の引張強さは有意に減少した。サーマルサイクル試験後の引張試験の結果、10%naHAp および10%miHAp 含有 SB 群の引張強さは SB 群と比較して有意な差を認めなかったが、30%naHAp, 50%naHAp および10%CaCl₂含有 SB 群の引張強さは有意に減少した。(2) SB ディスク上で培養した歯髄幹細胞における象牙芽細胞関連因子の遺伝子発現は、30%naHAp 含有 SB ディスク上で3 日間培養した歯髄幹細胞において、DSPPならびに DMP1 の遺伝子発現が有意に上昇した。また、30%naHAp 含有 SB ディスク上で7 日間培養した歯髄幹細胞において、DSPP ならびに DMP1 のタンパク発現が有意に上昇した。(3) ラット露髄面に SB を覆髄剤として応用した結果、歯髄組織に異所性の骨様象牙質形成を認めた。一方、30%naHAp および10%CaCl₂含有 SB 群では、露髄面直下の歯髄組織内にデンティンブリッジ形成による露髄面の封鎖が認められた。

【考察】30%naHAp 含有 SB は、サーマルサイクル試験では引張強さが低下する傾向がみられたが、SB と同等の歯質接着性を有し、またヒト歯髄幹細胞の象牙芽細胞様細胞分化を促進し、さらに直接覆髄後のデンティンブリッジ形成を促進したことから、直接覆髄材として応用できる可能性が示唆された。

【結論】本研究の結果から、30%naHAp 含有 SB は歯髄幹細胞の生物学的活性を促すことのできる新規直接覆髄剤の候補として有用であると考えられた。

【謝辞】本研究に試料を提供していただきましたサンメディカル株式会社(滋賀県)の荒田正三様、三浦善広様、久保田順子様に心より感謝致します。

# 抗菌ペプチド LL37 の宿主細胞傷害性低減を目指した複合体の開発

1広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 歯髄生物学研究室

○吉田 和真¹、鈴木 茂樹¹、中西 惇¹、小武家 誠司¹、本山 直世¹、永安 慎太郎¹、平田-土屋 志津¹、柴 秀樹¹

# Development of the complex of glycosaminoglycan and LL37, which possesses the ability to reduce host cell cytotoxicity

<sup>1</sup>Department of Biological Endodontics, Graduate School of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

○KAZUMA YOSHIDA¹, SHIGEKI SUZUKI¹, JUN NAKANISHI¹, SEIJI KOBUKE¹, NAOYO MOTOYAMA¹, SHINTARO NAGAYASU¹, SHIZU HIRATA—TSUCHIYA¹, HIDEKI SHIBA¹

【目的】 LL37 は塩基性の37 アミノ酸残基からなる抗菌ペプチドである。抗菌薬が細菌の細胞壁やタンパク質等の代謝系に作用し抗菌力を示すのに対して、LL37 の抗菌力は物理的に細胞膜の傷害を引き起こすことによって発揮されるので、LL37 に対する耐性菌は出現しにくいと考えられている。 さらに LPS の中和作用を示すことから、LL37 の感染疾患への臨床応用が期待されている。  $in\ vitro$  における LL37 の抗菌作用は  $1\ \mu M$  程度から認められる一方で、  $10\ \mu M$  程度の高濃度になると抗菌活性のみならず細胞傷害性も有する。 したがって、LL37 の臨床応用には、投与局所において細胞傷害性を生じることなく抗菌力を発揮する至適濃度を長期間維持する手法の開発が必要である。

当研究室は、LL37 がグリコサミノグリカン (GAG) に高い親和性を示すことに着目し、LL37 を低濃度へパリン (Heparin) と混合し複合体として作用させると、LL37 の宿主細胞傷害性を低減し、かつ抗菌活性を維持できることを明らかにしている。

本研究では、GAG であるコンドロイチン硫酸 (CS) あるいはヒアルロン酸 (HA) と LL37 の複合体の抗菌力と細胞傷害性を Heparin-LL37 複合体と比較した. また、低濃度 Heparin と LL37 複合体の LPS 中和能を検討した.

【結果】低濃度 Heparin( $2~\mu$ g/ml)と LL37 の複合体は、大腸菌に対して抗菌力を示したが、高濃度 Heparin( $9~\mu$ g/ml)と LL37 の複合体は抗菌活性を有してなかった。 両複合体では、 LL37 単独のように、 顕著な hDPCs の細胞死は生じなかった。 CS( $4~\mu$ g/ml)と LL37 の複合体では、 hDPCs の細胞死誘導および大腸菌に対する抗菌活性の両方が認められなかった。 HA は  $100~\mu$ g/ml の高濃度においても LL37 による抗菌活性および細胞傷害性に影響を及ぼさなかった。 Heparin-LL37 複合体は LL37 単独と同様に、 LPS で刺激されたマクロファージからの TNF- $\alpha$  分泌量を有意に減少させた。

【結論】 LL37 の抗菌活性を維持しつつ、哺乳類細胞の生存率を改善するのに最も適した GAG は Heparin であることが判明した。細胞傷害性を顕著に軽減する低濃度 Heparin と LL37 複合体は、抗菌作用に加えて、 LPS 中和能も維持していた。現在、この複合体が宿主細胞傷害性を低減するメカニズムを検討中である。

# Phosphophoryn の持つ抗炎症機能領域の探索

1広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 歯髄生物学研究室

〇中西 惇¹、鈴木 茂樹¹、吉田 和真¹、本山 直世¹、小武家 誠司¹、永安 慎太郎¹、平田-士屋 志津¹、柴 秀樹¹

# Exploration of anti-inflammatory domain of PP

<sup>1</sup>Department of Biological Endodontics, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

○JUN NAKANISHI¹, SHIGEKI SUZUKI¹, KAZUMA YOSHIDA¹, NAOYO MOTOYAMA¹, SEIJI KOBUKE¹, SHINTARO NAGAYASU¹, SHIZU HIRATA—TSUCHIYA¹, HIDEKI SHIBA¹

【目的】Phosphophoryn (PP) は象牙質や歯髄組織に最も多量に存在する非コラーゲンタンパク質であり、PP はセリンーセリンアスパラギン酸(serine/asparatic acid rich repeats: SDrr)の長い繰り返し配列をそのアミノ酸配列中に含み、この配列中のセリンは高度にリン酸化修飾を受けることから象牙質の石灰化に中心的な役割を果たしている。研究室の先行研究において、PP は石灰化のみならず、LPSで刺激されたマクロファージからの TNF-α分泌を抑制することを報告してきた。そこで、本研究では rPP の最も特徴的な領域である SDrr が、PP の抗炎症作用に寄与するかを、様々な改変型 rPP を用いて検討した。さらに、rPP の高い抗炎症作用が、敗血症や菌血症の発症予防に利用できるのではと考え、rPP がモデルマウスの生存予後に与える影響を検討した。

【方法】 1. in vitro 炎症モデルにおける PP 活性部位の検討: THP-1 細胞を 24 well プレート 1well あたり  $1\times10^6$ /ml の濃度になるよう播種し、PMA(30.8 ng/ml)を加えて 24 時間培養行、マクロファージ様細胞へ分化誘導した。分化マクロファージ様 THP-1 細胞に LPS を 10 ng/ml の濃度となるよう添加し炎症モデルとした。 LPS 刺激と同時に rPP-full(全長組み換え rPP)、 rPP-  $\Delta$ 37.6 SDrr(SDrr の 37.6%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 63.5 SDrr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 63.5 SDrr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP)、rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した rPP-  $\Delta$ 5Drr(SDrr の 63.5%が欠失した r

【結果】1. rPP 投与により LPS 誘導性の各種炎症性サイトカインの遺伝子発現が抑制された。rPP- $\Delta$ 37. 6 SDrr、rPP- $\Delta$ 63. 5 SDrr 投与によって、LPS 刺激によるマクロファージからの TNF- $\alpha$ 産生量の低下を認めた。これら組み換えタンパク質による抑制効果は rPP-full と同等であった。また rPP-N terminal および SDrr 繰り返し配列の合成ペプチド投与は LPS 刺激による TNF- $\alpha$ 産生に影響を与えなかった。 2. rPP 投与後 0.5~12 時間に関して rPP は細胞の lysate 中に検出され、免疫染色法にて 24 時間後において rPP は細胞膜近傍に存在していた。 3. D-ガラクトサミン/LPS 誘導性敗血症モデルマウスによる投与 72 時間後の生存率は 7.7% (n=13) であったが、rPP 事前投与行った群は 63.5% (n=16) に改善した。

【結論】rPPが有するSDrrの長さによってLPS 刺激によるマクロファージからのTNF-α産生抑制能は影響を受けず、またSDrrペプチドは抑制効果を示さなかったことから、PPの抗炎症作用はSDrr 非依存的であることが示された。また、rPP 投与により 敗血症モデルマウスの大幅な生存率の向上を認めたことから、rPP 投与が敗血症の発症抑制に有用であることが示唆された。

# 日中および睡眠時に形成されるデンタルバイオフィルムの比較検討

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大阪大学 歯学部附属病院 歯科技工士学校
○外園 真規¹、栗木 菜々子¹、朝日 陽子¹、町 博之²、林 美加子¹、恵比須 繁之¹

# Comparison of dental biofilm formed in daytime and nighttime

<sup>1</sup>Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan <sup>2</sup>Osaka University Dental Technology Institute, Osaka, Japan

○MAKI SOTOZONO¹, NANAKO KURIKI¹, YOKO ASAHI¹, HIROYUKI MACHI², MIKAKO HAYASHI¹, SHIGEYUKI EBISU¹

#### 【研究目的】

セルフケアを含めたデンタルバイオフィルムの物理的除去は、う触や歯周病の予防および歯の喪失の防止に極めて有用であることが多くの研究により明らかにされている。しかし、口腔ケアに関して、デンタルバイオフィルムを最も効果的に除去するための介入時期については未解用である。現在、デンタルバイオフィルム除去は就寝前に行うことが最も効果的であるという考えが広く浸透している。この根拠は、睡眠中に唾液分泌量が低下し、また唾液中の細菌数が急増するという1970年代の報告であり、デンタルバイオフィルムの量および質的変化を検討した結果に基づくものではない。そこで、口腔ケアの効果的な介入時期を明らかにすることを最終的な目標に、本研究では、日中および睡眠時に形成されるデンタルバイオフィルムの比較検討を行った。

#### 【材料および方法】

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を受け、遂行された(承認番号 H24-E4)。本研究に同意の得られた被験者より試料を採取し実験に供した。バイオフィルムの形成は、我々が開発した in situ バイオフィルム形成モデル を用いて行った。このモデルは、被験者の上顎に装着した口腔内装置の頬側にハイドロキシアパタイトディスクを挿入し、口腔内にてバイオフィルムを形成させるものである。研究は、睡眠を含む睡眠群と睡眠を含まない日中群に分けて行い、就寝前および起来後に口腔内装置を装着することにより、バイオフィルムを形成させ、8、12、16 時間後に試料を採取し、以下に示す評価を行った。

- (1)バイオフィルム構成細菌の生菌数測定:採取した試料を滅菌蒸留水中で5分間超音波処理しバイオフィルムを剥離した。その後、コロンビア羊溶血寒天培地に播種し、37°C、嫌気条件下で48時間培養し、生菌数測定を行った。
- (2) メタゲノム解析によるバイオフィルム構成細菌叢の同定: Power Soil DNA Isolation kit にて DNA を抽出した。その後、Ion Fragment Library Kit にてライブラリを調整し、Ion PGM Sequencing 400 Kit を用いて Ion PGM Sequencer で塩基配列を決定し、解析を行った。

#### 【結果及び考察】

- (1)バイオフィルム構成細菌の生菌数測定: 睡眠群と日中群の間で、バイオフィルム形成開始から8、12、16 時間後のいずれにおいてもバイオフィルムを構成する生菌数に有意差を認めなかった(多群比較、Kruskal-Wallis 検定、p>0.05)。
- (2) メタゲノム解析によるバイオフィルム構成細菌叢の同定門レベルでは、バイオフィルム形成開始から8時間後において日中群と比較し睡眠群では、Bacteroidetes 門の割合が高く、Proteobacteria 門の割合が低い傾向が認められた。一方、バイオフィルム形成開始から12、16時間後においては日中群と睡眠群で各属の割合に違いは認めなかった。さらに、バイオフィルム形成開始から8時間後に着目し、属レベルにおいて解析を行ったところ、日中群では睡眠群と比較し、Rothia 属およびNeisseria 属の割合が高かった。一方、Prevotella 属およびFusobacterium属の割合は日中群と比較して睡眠群において総菌に占める割合が有意に高くなっていた(二群比較、t-test およびWelch's test、p<0.05)。以上の結果から、睡眠時に形成されるバイオフィルムは、日中に形成されるバイオフィルムと比較して、バイオフィルムの構成細菌数には変化を認めないが、その構成細菌数は偏性嫌気性細菌の割合を増すことが分かった。

#### 【参考文献】

1 Wake et al. Temporal dynamics of bacterial microbiota in the human oral cavity determined using an in situ model of dental biofilms, Biofilms and Microbiomes , (2016) 2, 16018

本研究の一部は、科学研究費補助金(17H04384、17K11703、26462878)の補助のもと行われた。

# ユニバーサル接着システムの歯質接着耐久性にサンドブラスト処理が及ぼす影響

 $^1$ 日本大学 歯学部 保存学教室 修復学講座、 $^2$ 総合歯学研究所 生体工学研究部門、 $^3$ 花園歯科医院  $^0$ 大内  $元^1$ 、坪田  $\pm 3^2$ 、今井 亜理紗 $^1$ 、須田 駿 $^{-1}$ 、鈴木 崇之 $^1$ 、陸田 明智 $^2$ 、宮崎 真至 $^2$ 、山形 哲則 $^3$ 

# Influence of sandblasting methods on bonding durability of universal adhesives to tooth

<sup>1</sup>Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan <sup>2</sup>Division of a Biomaterials Science, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan <sup>3</sup>Hanazono Dental Clinic, Aomori, Japan OHAJIME OUCHI<sup>1</sup>, KEISHI TSUBOTA<sup>2</sup>, ARISA IMAI<sup>1</sup>, SHUNICHI SUDA<sup>1</sup>, TAKAYUKI SUZUKI<sup>1</sup>, AKITOMO RIKUTA<sup>2</sup>, MASASHI MIYAZAKI<sup>2</sup>,

TETSUNORI YAMAGATA<sup>3</sup>

#### 【目的】

近年、MI の概念の普及から修復物をすべて除去することなく病変部のみを除去し、光重合型コンポジットレジンで修復を行う補修修復を行う 頻度が増加している。この補修修復を行う際には、複数の被着体とコンポジットレジンとの間に確実な接着を得る必要があり、それぞれの被 着体に適した前処理を行うことが重要となる。旧修復物となるレジンや金属に対しては、サンドブラストによる前処理後に、ユニバーサル接着 システムを用いることで、良好な接着強さが得られることが報告されている。しかし、歯質付近に生じた欠陥に対して補修修復を行う際には、 サンドブラスト処理を選択的に修復物のみに行うことは、非常に困難である。また、サンドブラスト処理された歯質に対するユニバーサル接着システムの接着性に関しては不明な点が多い。そこで演者らは、歯質に対するサンドブラスト処理がユニバーサル接着システムの歯質接着耐久性 に及ぼす影響について検討することとした

#### 【材料および方法】

供試した接着システムは、化学重合型ユニバーサル系接着システムであるボンドマーライトレス(BML、トクヤマデンタル)、光重合型ユニバーサル系接着システムのScotchbond Universal Adhesive(SBU、3M ESPE)、Adhese Universal(ADH、Ivoclar Vivadent)、ALL-Bond Universal(ALB、Bisco)およびG-Premio Bond(GPB、GC)の5製品とした。コンポジットレジンとしてはClearfil AP-X(クラレノリタケデンタル)を使用した。接着試験用試片の製作には、被着体にウシ(2~3歳齢)の下顎前歯を抜歯後、ただちに抜髄し冷凍保管(-20°C)したものを用いた。実験に際して解凍し、その歯冠部のみを常温重合レジンに包埋し、直径6~8mm 程度の平坦な面が得られるようにモデルトリマーを用いて唇側中央部を研削し、この面をSiCペーパー#600まで研磨した(コントロール群)。さらに、表面に対してハイアルミナ(松風)を用いてサンドブラスト処理3秒間行ったものをサンドブラスト群とした。これら被着面に対して製造者指示条件に従ってアドヒーシブを塗布した後、ウルトラデント治具を固定しレジンペーストを填塞。20秒間光線照射を行ったものを接着試験用試片とした。これら試片を37℃精製水中に24時間保管あるいはその後サーマルサイクルを30、000回負荷した後、その剪断接着強さを測定した。なお、試片の数は10個とし、を有意水準0.05の条件で総計学的検定を行った。また、表面自由エネルギーの測定には、表面自由エネルギーが既知の液体として1-プロモナフタレン、ジョードメタンおよび蒸留水を使用した。接触角の測定は、全自動接触角計を用い、セシルドロップ法でそれぞれの液滴を1μ1滴下し θ/2 法で測定を行った。接触角の測定は液滴滴下直後とし、各条件における試片数は5個とした。なお、各条件におけるその処理面および接着界面に関しては通法に従ってSEM 観察を行った。

# 【結果および考察】

24時間後のエナメル質における剪断接着強さは、BMLでコントロール群に比較してサンドブラスト群で高くなる傾向を示し、ALBでは低くなる傾向を示した。象牙質の接着強さにおいて、BMLおよびALBではコントロール群で高くなる傾向を示し、ADHでは低くなる傾向を示した。また、サーマルサイクル後では、エナメル質においては、いずれの条件においてもその接着強さに有意な差を認めず、象牙質においてはサンドブラスト群のADHにおいて低下し、その他の条件では有意差を認めなかった。SEM観察においては、サンドブラスト処理後と比較しアドヒーシブ処理後は表面性状に変化が認められたが、接着システムによって異なる傾向を示した。これの理由としては、サンドブラスト処理後の被着面に残留するアルミナ粒子とともに、各ユニバーサル接着システムの脱灰能の違いに起因するものと考えられた。

#### 【結論】

本実験の結果から、コントロール群と比較してサンドブラスト群では、ユニバーサル接着システムの歯質に対する接着強さは低下する傾向が 認められたが、この傾向は接着システムにより異なるものだった。

# M-TEG-PTM を含む接着前処理材を適用した表面の濡れ性の評価

<sup>1</sup>YAMAKIN 株式会社 ○水田 悠介¹、木村 洋明¹、坂本 猛¹

# Evaluation of wettability of adherend applied with pretreatment agent contained M-TEG-PTM

¹YAMAKIN CO., LTD, Osaka, Japan ○YUSUKE MIZUTA¹, HIROAKI KIMURA¹, TAKESHI SAKAMOTO¹

【目的】 近年、レジンブロックやジルコニアなどのように歯科補綴物に用いられる材料の種類がますます増える中、それら の材質に対する研究が盛んに行われている。各材料にはそれぞれに特徴的な性質があることから、それらを考慮した取り扱い が必要である.材料の性質を理解しないままに、従来と同じ工程を行うと材料本来の性能を十分に発揮できない場合や、かえ って悪影響を与えてしまう場合がある. 例えば、唾液や血液が付着した試適後の補綴物の洗浄方法の一つとしてリン酸エッチ ング処理が施されるが、ジルコニア製補綴物への使用は不適切であるといった報告もある. 2017 年春季歯科保存学会において 当社より、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-PTM) を酸性成分として使用した試作エッチング材が、ジルコニア表面を効果的に洗浄できることを報告した. さらに、 洗浄だけでなく M-TEG-PTM はジルコニア表面に化学吸着することに由来するプライミング効果も確認した. ところで、接着 材の接着強さは濡れ性も影響を与えることが知られている。被接着体表面の接着材などに対する濡れ性が向上すると、被接着 体の細かい凹凸にまで接着材が入り込むため接着強さや再現性の向上が期待される. さらに Young-Dupre の式より、接着して いる 2 種類の物質を引き離すのに必要なエネルギー(接着仕事)は、液体(接着材)の表面張力および固体(被接着体)との 接触角で算出される。すなわち、接触角が小さい(濡れ性が高い)ほど接着仕事が大きくなり、この点においても接着に有利 である、濡れ性は、固液間の化学的性質によって決定し、親水性は親水性、疎水性は疎水性の組み合わせにおいて高くなる。 M-TEG-PTM はその構造内に両親媒性のテトラエチレングリコール鎖を有するので比較的高い界面活性作用が期待できる.この界 面活性作用によって接着材の被接着体に対する濡れ性を向上する可能性がある. そこで、試作エッチャントを各材料に対し て適用した時の、液体に対する接触角の評価を行い、接着強さへの影響について考察をおこなう。

【方法および材料】 試作品の作製:試作エッチャント液は、酸物質として水溶性リン酸モノマーであるM-TEG-PTM を使用し、溶媒として水およびグリセリン、増粘剤としてアエロジルを用いて作製した。また、比較対象として酸物質にリン酸を用いた試作品と酸物質のない試作品も作製した。接触角の測定:各被接着材料に対して市販の人工唾液(製品名:サリベート、製造販売元:帝人ファーマ)に牛血清アルブミン(製造販売元:シグマアルドリッチ)を濃度 2000 mg/1 まで溶かし、一般的な唾液相等のタンパク質濃度となるよう調整して疑似人工唾液を作製した。試験体の表面に、6~8 mg の水滴を垂らし、その水滴と試験体がなす角度を接触角として測定した。また、疑似人工唾液を試験体表面全体に塗布し、エアブローした表面(疑似人工・唾液汚染後)、さらに蒸留水にて洗浄しエアブローにて乾燥した表面(水洗後)、各エッチャント材を塗布、水洗、乾燥した表面にて、同様の試験を行った。

【結果】 各試作エッチャント液のPMMA ペレットの接触角の評価によって、酸物質としてM-TEG-PTM を使用した方が濡れ性の向上が見られたのに対して、リン酸だと濡れ性にほとんど影響を与えないことが確認された. さらに本発表では接着強さ結果を交えた議論を行う.

#### コンポジットレジンによる直接修復の臨床報告

1オーラルステーションデンタルクリニック ○山田 満憲1、牧野 千恵子1

# Clinical Report of Direct Composite Resin Restoration

<sup>1</sup>Oral-Station Dental Clinic

CMITSUNORI YAMADA<sup>1</sup>, CHIEKO MAKINO<sup>1</sup>

【諸言】Minimal Intervention (以後, MI) の普及およびコンポジットレジンの材料学的性質の向上は、従来の間接修復の適応からフリーエナメルを残した直接修復を可能としてきた。とくに、演者らは、MI コンセプトに基づいたコンポジットレジンによる直接修復は機能性と審美性を兼ね備えた解剖学的形態の回復を得る有効な手段と考え、第 145 回および第 146 回日本歯科保存学会にてその症例について報告してきた。より精度の高い解剖学的形態の回復のため適切な感染歯質の除去と連続性の保たれたエナメル質の保存、およびその複雑な窩洞に対する緊密な充填といった MI コンセプトに基づく繊細なテクニック(以後、MI テクニック)は、会場よりたくさんのご意見とご感想を頂いた。そこで今回、臼歯部隣接面における接触関係が維持されているう蝕に対し隔壁法を併用した MI テクニックの症例について追加報告する。

【対象および方法】う触症状を主訴とし来院した患者のうち臼歯部隣接面における接触関係が維持されている症例を対象とした。さらに対象者にはヘルシンキ宣言に基づく主旨説明を含むインフォームドコンセントを行った。各症例拡大鏡下にてアクセスオープニングを出来る限り小さくし(B's MI BUR, UEHARA),フリーエナメル直下のアンダーカット部を含む感染歯質除去後,2ステップボンドシステムを使用した。隣接面への隔壁器具の装着は,ボンディング材の塗布後光硬化させる前に行った。直視できない隣接面およびフリーエナメル直下のアンダーカット部においては,フロアブルレジンをリライニング材として注入し先端が湾曲加工された充填器(Mi-1, UEHARA)を用いて充填,硬化させた。その後,咬合面にHERCULITE XRV(A2, Enamel,Kerr)を充填。硬化、および形態修正を行った。

【結果】臼歯部隣接面における接触関係が維持されているう蝕に対し隔壁法を併用したMI テクニックは、機能性と審美性を兼ね備えた解剖学的形態の回復を得ることが出来た。さらに、先端が湾曲加工された充填器の使用によりフリーエナメル直下のアンダーカット部の複雑な窩洞および隣接面に対し緊密なコンポジットレジン充填が出来た。

【考察】MI テクニック成功の是非は、どれだけ連続性が保たれたエナメル質を保存出来るかであると演者らは考えている。しかし、どんなにアクセスオープニングを小さくても感染歯質が正確に除去できなくては意味がなく、また感染歯質を正確に除去した後に緊密な充填が出来なくては、コンポジットレジンによる直接修復の適応でないとも考えている。そこで、フリーエナメル直下のアンダーカット部に対し様々な角度から容易にアプローチできるよう先端が湾曲加工された充填器の使用は、流動性の高い材料と窩壁との間に気泡の巻き込みを防止し、および重力方向への充填材の偏りを防止しより緊密なコンポジットレジン充填が可能であった。また、臼歯部隣接面における接触関係が維持されているう蝕処置では、フリーエナメル直下のアンダーカット部の複雑な窩洞ばかりでなく、直視できない隣接面に対し連続性を有する解剖学的形態の回復が要求される。これは、歯牙形態は千差万別であることから、ただ単に付形された既成の隔壁器具を装着するだけでは隣接面形態の回復は困難であることから、演者らは隔壁器具の張りの強さとその方向および下部鼓形空隙に対するウエッジの大きさと強さによって連続性を有する解剖学的形態の付与を行っている。また、先端が湾曲加工された充填器の湾曲部で隣接部の隔壁器具を保持することで、より自然な形の辺縁隆線の回復を行うことが出来ると考えている。

【結論】臼歯部隣接面における接触関係が維持されているう蝕に対し隔壁法を併用したMI テクニックは、患者負担の軽減および機能性と審美性を兼ね備えた解剖学的形態の回復を得る有効な手段と考えられた。

# グラスファイバー配合強化型レジンを用いた間接法レジン支台築造の開発

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大阪大学大学院 歯学研究科 顎口腔機能再建学講座 (歯科理工学教室) ○須崎 尚子¹、新野 侑子¹、廣瀬 奈々子¹、山口 哲²、今里 聡²、林 美加子¹

The development of the indirect method resin abutment constrution material using a glass fiber reinforced resin

¹Department of Restrative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan

²Department of Restrative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan

○NAOKO SUZAKI¹, YUKO SHINNO¹, NANAKO HIROSE¹, SATOSHI YAMAGUCHI², SATOSHI IMAZATO², MIKAKO HAYASHI¹

[研究目的] 破壊抵抗性の高い失活歯の支台築造修復を実現するために、本研究では、グラスファイバー配合強化型レジン材料を用いたポストコアー体型の間接法支台築造の開発をめざしている。第 145 回本学会において、メッシュ状グラスファイバー配合強化型レジン材料の曲げ強さは、明らかな異方性を認めることを報告した。今回は、このグラスファイバー配合強化型レジン材料の特性について、ファイバーの走行方向が異なる場合の破壊靱性および象牙質との接着強さを評価した。 [材料および方法]

グラスファイバー配合強化型レジンディスク(TRINIA、松風)(以下TR)を用いて、層状に配向するファイバーメッシュが試料の長軸に平行あるいは垂直に走行する2種類のプリズム型試料(6×6×6×12mm)を作製し、Notchless Triangular Prism(NTP)による破壊解性試験を行った。対照群として、支台築造用コンポジットレジンであるビューティコアフローペースト(松風)を使用した。作製した試料に、オートグラフ(AG-IS 20kN、島津)を用いてクロスヘッドスピード 1.0mm/min にて試料が破断するまで引張り荷重を加え、破断点における荷重を測定した。その後、試料の破断面を走査型電子顕微鏡(JSM-6390、JEOL、以下SEM)にて観察を行った。

象牙質への接着性については、う蝕および破折のないとト第三大臼歯を用いて低速精密切断機(ISOMET、BUEHLER)および回転研磨機(ECOMET、BUEHLER)にて歯冠象牙質を露出させ、レジセムプライマー(松風)にて歯面処理を行った。TR については、4×4×10mm の直方体試料を作製し、セラレジンボンド(松風)およびHC プライマー(松風)にて被着面処理を行った。TR は層状のファイバーメッシュの走行が被着面に平行および垂直になるように、接着性レジンセメント(レジセム、松風)を用いて接着させ、24 時間水中浸漬後、小型卓上試験機(EZ-test、島津)を用いて微小引張り試験を行った。その後、試料の破断面を SEM にて観察し破壊様式を分析した。

得られた結果は、ANOVA および、Tukey-Kramer またはt検定にて有意水準5%にて分析した。 [結果および考察]

NTP 試験において、TR のファイバーメッシュが長軸に平行の試料の破壊事件値は  $9.04\pm0.41$  MPa/m<sup>1/2</sup>であり、ファイバーメッシュが長軸に垂直の試料の  $1.89\pm0.25$  MPa/m<sup>1/2</sup>、およびビューティーコアフローペーストの  $2.25\pm0.34$  MPa/m<sup>1/2</sup> と比較し有意に高い値を認めた。また、SEM による観察より、TR のファイバーメッシュが長軸に平行の試料では破壊開始部で塑性変形を伴う延性破壊を認め、そこから脆性破壊への移行を認めた。他の 2 群については、破面全体が平滑であり、脆性破壊が起こっていた。破壊事件値はよび破壊様式から、TR のファイバーメッシュが長軸に平行の試料では、塑性変形を伴う延性破壊をおこすために亀裂が進展がしにくいことが高い破壊事件値につながったものと考えられる。

接着強さについては、TR のファイバーの走行方向および接着プライマーによる有意差は認めなかった。接着破壊様式については、被着面がファイバーメッシュの層状走行と平行に接着させた場合には、TR 内での凝集破壊が多く認められた。これは、TR のファイバーメッシュ層に沿って破壊されたためと考えられる。

以上より、TR をコア材料として使用する際には、グラスファイバーの走行方向を正確に規定することが重要であると考えられる。

本研究の一部は科学研究費補助金 (17H04382、16K20454、2017 IADR Innovation Oral Care Award) の補助の下に行われた。 なお、全ての実験は大阪大学倫理委員会の承認 (H21-E29) のもと行われた。

# Porphyromonas gingivalis 口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析

「新潟大学大学院医歯学総合研究科」歯周診断・再建学分野、<sup>2</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科 高度口腔機能教育研究センター、<sup>3</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯学教育研究開発学分野、<sup>4</sup>新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔保健学分野 ○佐藤 圭祐<sup>1</sup>、高橋 直紀<sup>2</sup>、中島 麻由佳<sup>1</sup>、松田 由実<sup>1</sup>、山田 実生<sup>1</sup>、横地 麻衣<sup>1</sup>、中島 貴子<sup>3</sup>、山崎 和久<sup>4</sup>

# Analysis of the mechanisms for deterioration of collagen-induced arthritis by oral administration of *Porphyromonas gingivalis* in mice.

<sup>1</sup>Division of Periodontology, Niigata University Graduate school of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan <sup>2</sup>Research Center for Advanced Oral Science (CAOS), Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan <sup>3</sup>Division of Dental Educational Research Development, Niigata University Graduate school of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan <sup>4</sup>Division of Oral Science for Health Promotion, Niigata University Graduate school of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

OKEISUKE SATO¹, Naoki Takahashi², Mayuka Nakajima¹, Yumi Matsuda¹, Miki Yamada¹, Mai Yokoji¹, Takako Nakajima³, Kazuhisa Yamazaki⁴

【目的】歯周疾患と関節リウマチ(RA)を含む様々な全身疾患との関連が報告されている。代表的な歯周病原細菌である Porphyromonas gingivalis は、RA の主要な自己抗原となるシトルリン化タンパク質を生成する細菌性の peptidylarginine deiminase (PAD)を発現することから注目されてきた。しかし、P. gingivalis PAD の関与については否定的な報告もある。近年、腸内細菌叢とRA の関連が報告されている。我々は、嚥下された P. gingivalisが腸内細菌叢を変化させることで、全身性に軽微な炎症を誘導することを報告した。今回、コラーゲン誘導性関節炎 (Collagen-induced arthritis: CIA) モデルマウスを用いて、嚥下された P. gingivalisが腸内細菌叢と腸管免疫応答に影響することで関節炎症状の重症化を促進する可能性について検証を行った。

【材料と方法】6 週齢雄 DBA/1J マウスを P. gingivalis W83 株を経口投与した P. gingivalis 群、コントロールとして他の歯周病原細菌である Prevotella intermedia ATCC25611 を投与した P. intermedia 群、基剤のみ投与した Sham 群に分け、週2回感染を5週間(合計10回感染)行った。その後、II 型コラーゲンを免疫して実験的関節炎を発症させ6週間後にサンプリングを実施した。関節炎症状、糞便中の細菌叢解析、腸管膜リンパ節・パイエル板・鼠径リンパ節・脾臓のリンパ球 subset 解析と培養上清の ELISA 解析、血清中炎症マーカー、各種抗体価の ELISA 解析を行った。なお、本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施された(承認番号:26新大研第195号2)。

【結果】P. gingivalis群はSham群、P. intermedia群と比較して、関節炎症状の重症化が認められた。マイクロCT像により四肢の骨破壊が確認でき、組織学的解析より膝関節間膜への炎症性細胞浸潤と破骨細胞の増加を認めた。P. gingivalis群では、他の2群と比較して腸内細菌叢の有意な変動を認めた。また、P. gingivalis群では腸管免疫応答に関連する腸間膜リンパ節・パイエル板において Th17 への分化誘導の促進を認めたが、鼠径リンパ節・脾臓では変化が認められなかった。P. gingivalis群では Sham群、P. intermedia群と比較して血清・リンパ球培養上清中の IL-17 レベルの有意な上昇が観察されたが、抗コラーゲン抗体価、抗シトルリン化タンパク抗体価に有意差は認めなかった。

【結論】 $P.\ gingivalis$ 口腔感染はCIAモデルマウスにおいて腸内細菌叢を介した腸管免疫応答への影響により、関節炎症状を悪化させていることが示唆された。

会員外共同研究者: 大野 博、加藤 完 (理化学研究所)、遠藤 直人、近藤 直樹 (新潟大学整形外科学分野)

# ゲノムワイドアプローチを用いた日本人における侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索

¹大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座、²東北大学大学院歯学研究科 歯内歯周治療学分野
○枡本 梨沙¹、北垣 次郎太¹、松本 昌大¹、宮内 静香¹、小笹 匡雄¹、東山 弥生¹、竹立 匡秀¹、藤原 千春¹、山下 元三¹、山田 聡²、北村 正博¹、村上 伸也¹

#### Identification of genetic risk factor of Japanese aggressive periodontitis through GWAS

<sup>1</sup>Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan <sup>2</sup>Department of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan

ORISA MASUMOTO<sup>1</sup>, JIROUTA KITAGAKI<sup>1</sup>, MASAHIRO MATSUMOTO<sup>1</sup>, SHIZUKA MIYAUCHI<sup>1</sup>, MASAO OZASA<sup>1</sup>, YAYOI HIGASHIYAMA<sup>1</sup>, MASAHIDE TAKEDACHI<sup>1</sup>, CHIHARU FUJIHARA<sup>1</sup>, MOTOZOU YAMASHITA<sup>1</sup>, SATORU YAMADA<sup>2</sup>, MASAHIRO KITAMURA<sup>1</sup>, SHINYA MURAKAMI<sup>1</sup>

【目的】侵襲性歯周炎の特徴の一つに家族内集積が挙げられることから、本疾患の発症には遺伝的要因の関与が示唆されている。疾患発症要因の一つとして炎症性サイトカイン等の一塩基多型 (SNP: Single nucleotide polymorphism) が関与していることが示唆されているが、未だその詳細を解明するに至っていない。これまでの侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索は、機能既知な単一遺伝子の遺伝子多型解析にとどまり、網羅的な遺伝子多型解析を行っていないことが本疾患の疾患関連遺伝子の解明に至っていない原因と考えられる。そこで本研究では、ゲノムワイドアプローチを用いて、日本人における侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子の探索を行った。

【方法および結果】 大阪大学歯学部附属病院を受診し、侵襲性歯周炎と診断された患者のうち、本研究への参加を応諾された 44名を対象としたエクソーム解析を実施した(大阪大学ヒトゲノム研究承認番号629-2)。エクソーム解析の結果、対照群と比 較して SNP の出現頻度に統計学的有意差 (p 値<0.05) を有する遺伝子の一つとして Paraoxonase 1 (PON1) の SNP rs854560 (c. 163T>A, p. Leu55Met) を同定した。疾患群でのマイナー対立遺伝子頻度 (MAF: Minor allele frequency) が 13.64%であ ったのに対し、対照群でのMAF は7.03%であり、p値は0.019、オッズ比は2.09、95%信頼区間は1.11~3.91 となり、MAF に統計 学的有意差を認めた。高密度リポタンパク質に存在している PONI 遺伝子は、抗酸化作用を有することから、低密度リポタンパ ク質の酸化を抑制することが報告されている。また、PON1 が抗動脈硬化作用を持つこと、PON1 の SNP が、動脈硬化や脳卒中な どの発症に関与していることも報告されている。さらに近年になり、PON1が硬組織形成に関与していることや、PON1のSNPが 骨粗鬆症や歯周病の発症に関与していることが報告されつつある。しかしながら、歯周組織の恒常性維持へのPON1の関与は未 だ不明な点が多い。そこで、ヒト歯根膜細胞(HPDL)の骨芽細胞への分化過程における PON1 の機能解析を実施した。HPDL を $\beta$ -グリセロリン酸 (5 mM) とアスコルビン酸 (50  $\mu$  g/ml) を含む  $\alpha$  MEM 培地にて長期培養した後、RNA を回収し、PON1 の発現を リアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、HPDL の骨芽細胞への分化誘導に伴い、PON1 の発現が上昇することが明らかとな った。次に、HPDL に PON1 遺伝子を過剰発現させ、石灰化関連因子アルカリフォスファターゼ(ALPase)、I 型コラーゲンの発 現をリアルタイムPCR 法により検討した。その結果、PON1 は、ALPase ならびに I 型コラーゲンの mRNA 発現を著明に上昇させ ることを見出した。さらに、PON1の選択的阻害剤2-ヒドロキシキノリンをHPDLに添加し、ALPase ならびに I 型コラーゲンの 発現をリアルタイム PCR 法にて、石灰化ノジュール形成をアリザリンレッド染色法にて検討したところ、2-ヒドロキシキノリ ンはALPase、I型コラーゲンの発現を減少させ、石灰化ノジュールの形成を減少させることを見出した。

【結論】本研究結果より、PON1のSNPrs854560が日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子の一つであることが示唆された。さらに、PON1がHPDLの硬組織形成細胞への分化を促進させることを見出した。以上のことから、SNPrs854560によりPON1依存性の歯周組織の恒常性維持が減弱することにより、侵襲性歯周炎が惹起される可能性が示唆された。

# CCR7 欠損マウスにおけるエネルギー消費亢進機序についての検討

「九州大学大学院 歯学研究院 □腔機能修復学講座 歯周病学分野 ○佐野 朋美」、松永 紘明」、新城 尊徳」、岩下 未咲」、山下 明子」、西村 英紀」

# Study on the mechanism of increased energy expenditure of CCR7-deficient mouse

<sup>1</sup>Section of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Kyushu University

CTOMOMI SANO<sup>1</sup>, HIROAKI MATSUNAGA<sup>1</sup>, TAKANORI SHINJO<sup>1</sup>, MISAKI IWASHITA<sup>1</sup>, AKIKO YAMASHITA<sup>1</sup>, FUSANORI NISHIMURA<sup>1</sup>

#### 【目的】

近年、肥満間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、これまでの報告 (Obesity, 2015 / 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し、それにはエネルギー代謝調節機構が深く関係しているものと考えている。中でも、CCR7 欠損マウスは高脂肪食負荷による肥満やインスリン抵抗性の発症が抑制されるという現象に特に注目している。そこで、本研究ではCCR 7 欠損マウスの褐色脂肪組織とエネルギー消費の関係を明らかにすることを目的とした。

#### 【方法と結果】

野生型(WT)とCCR7 欠損(KO)の2種類のマウスを用い、マウスの表現型やエネルギー代謝について比較した。KOマウスは、WTマウスと比較し、食餌摂取量に有意な差はないものの蓄えるエネルギー量は少ない傾向にあった。各組織重量の割合はWTマウスとKOマウスで有意な差はなく、褐色脂肪組織や白色脂肪組織についてもそれぞれ同程度であった。また、経時的なモニタリングにおいて非活動期(明期)における自発運動量などのエネルギー消費、直腸温に変化はなかった。しかしながら、活動期(暗期)では、KOマウスにおいてWTマウスと比較し、エネルギー消費、直腸温ともに有意に上昇していた。そこで、熱産生とエネルギー代謝に関連している因子の遺伝子発現を調べたところ、KOマウスの褐色脂肪組織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)をはじめ、Pgc1 α、Sirt1、Dio2、Cidea、Adiponectinの遺伝子発現量が増加していた。つまり、KOマウスでは熱産生系が亢進していることが分かった。一方、2種類の白色脂肪組織(皮下脂肪および内臓間肪)においてはWTマウスとKOマウスを比較し、Ucp-1、Ucp-2、Dio2の発現に有意な差はなく、白色脂肪細胞の褐色化(ベージュ細胞誘導)はWTマウスとKOマウスで同程度であることが確認された。また、褐色脂肪組織においてUCP-1 抗体を用いた免疫染色による検討を行った結果、WTマウスの褐色脂肪組織と比較しKOマウスの褐色脂肪組織で強染色像が得られた。

#### 【結論】

CCR7 欠損マウスでは白色脂肪細胞の褐色化ではなく、褐色脂肪組織での脂肪分解が亢進することで、UCP-1 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が明らかとなった。生体のエネルギー代謝に寄与する 褐色脂肪組織には、寒冷環境における体温低下の防止や、生体内の過剰エネルギーを消費するために、熱を産生する機能を持っている。熱産生機能は、褐色脂肪細胞特異的に発現するタンパク質 UCP-1 が担っており、熱産生の必要性を褐色脂肪細胞が 感知すると UCP-1 の発現量が増加して熱産生機能が亢進する。本研究において、CCR7 欠損マウスの褐色脂肪組織における UCP-1 活性の上昇が明らかとなった。また、褐色脂肪細胞の機能が生体のエネルギー恒常性維持において非常に重要であることから も、CCR7 は熱産生機能制御の上で重要な役割を担っている可能性が示唆された。

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

# ヒト老化歯根膜細胞におけるマイトファジーの機能不全

<sup>1</sup>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、<sup>2</sup>大阪大学歯学部付属病院口腔治療・歯周科、 <sup>3</sup>神戸常磐大学短期大学部 口腔保健学科

〇鈴木 美麻¹、山下 元三²、池上 久仁子²、中村 友美²、西川 有彩¹、平沼 麻央¹、三木 康史²、柳田 学³、 北村 正博¹、村上 伸也¹

# Defective of mitophagy in senescent HPDL cells.

<sup>1</sup>Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan <sup>2</sup>Department of Periodontology, Osaka University Dental Hospital, Osaka, Japan <sup>3</sup>Department of Oral Health, Kobe Tokiwa Junior College, Hyogo, Japan

OMIO SUZUKI¹, MOTOZO YAMASHITA², KUNIKO IKEGAMI², TOMOMI NAKAMURA², ARISA NISHIKAWA¹, MAO HIRANUMA¹, KOUJI MIKI²,

MANABU YANAGITA³, MASAHIRO KITAMURA¹, SHINYA MURAKAMI¹

【目的】歯根膜一弾性線維組織は、歯根膜細胞より産生される I 型 Collagen、Periostin などの豊富な細胞外基質蛋白により 構成され、咬合ストレスに適応することで歯周組織の恒常性維持を担っている。ミトコンドリアは、細胞代謝の中心となるオ ルガネラであり、蛋白の生合成に際し、エネルギー源となる ATP を産生する。

その一方で、電子伝達系の疲弊によりダメージが蓄積されたミトコンドリアは、過剰な活性酸素種(Reactive Oxigen Species)を放出し、細胞構成蛋白や DNA を酸化、傷害することで炎症、アポトーシスを誘導する。老化により、ミトコンドリアの ATP 産生異常を伴う機能不全は亢進することがあきらかとされており、メタボリックシンドローム、神経変性疾患、循環器系疾患などの成人性疾患の病態への関与が注目されている。

そこで、本研究では、ダメージを受けたミトコンドリアの細胞内クリアランス機構であるマイトファジーに焦点をあて、老化に伴うヒト歯根膜細胞(HPDL)における過剰な活性酸素産生機構に及ぼす影響を検討する事を目的とした。

【材料と方法】老化ヒト歯根膜細胞におけるミトコンドリアを検討するため、Mitotracker にて染色、標識するとともに、透過型電子顕微鏡観察にて形態学的な変化を観察した。また、細胞内の活性酸素およびミトコンドリア内の活性酸素(mitoROS)について評価するため、蛍光プローブにて染色、標識し、蛍光顕微鏡ならびにFACS 解析により評価した。

老化ヒト歯根膜細胞におけるダメージミトコンドリアの膜電位の変化を JC-1 色素にて染色し、共焦点顕微鏡およびマイクロプレートリーダーを用いて解析する事で、定性、定量評価した。

ミトコンドリア標識タンパク、PTEN-induced putative kinase 1(PINKI), Parkin(PARK2)とオートファジー関連タンパク、Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)と P62/SQSTM1 の発現量については Western Blotting 法を用いて解析し、生化学的に検討した。

次に、ミトコンドリア局在配列を持つコモンサンゴ由来の蛍光タンパクである Mt-mkeima-Red をヒト歯根膜細胞に遺伝子導入し、脱共役剤である Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP) 処理により誘導される pH5.5 の励起光波長の 440nm から 586nm のシフトを共焦点顕微鏡にて検出し、老化ヒト歯根膜細胞におけるマイトファジーの機能不全を評価した。

また、Parkinの関与を検討するためヒト歯根膜細胞ならびにHela 細胞にMT-mkeima-Red-Park2 を遺伝子導入し、MT-mkeima-Red 導入細胞と共焦点顕微鏡を用いて観察、比較検討する事により、マイトファジーに及ぼす影響を評価した。

【結果と考察】ヒト歯根膜細胞においては、細胞老化にともなって、異常な形態のミトコンドリアや活性酸素の増加、ミトコンドリアの膜電位の低下が認められた。老化ヒト歯根膜細胞においては、PARK2 の発現低下、オートファジー活性の低下、マイトファジーの低下が認められた。また、PARK2 の遺伝子導入によりマイトファジーの賦活化が認められた。老化ヒト歯根膜細胞においては、細胞老化に伴うマイトファジーの機能低下により、ダメージを受けたミトコンドリアが蓄積し、過剰な活性酸素の産生を誘導し、細胞障害が惹起されている可能性が示唆された。

# Porphyromonas gingivalisバイオフィルムに対するインドシアニングリーン封入ナノ粒子と半導体レーザー 照射による aPDT の殺菌効果

1愛知学院大学 歯学部 歯周病学講座

○佐々木 康行¹、林 潤一郎¹、岩村 侑樹¹、藤村 岳樹¹、岡田 康祐¹、大野 祐¹、後藤 亮真¹、相野 誠¹、 西田 英作¹、山本 弦太¹、菊池 毅¹、三谷 章雄¹、福田 光男¹

#### Bactericidal effect of aPDT using diode laser with ICG nanosphere on Porphyromonas gingivalis biofilm.

<sup>1</sup>Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, Aichi, Japan ○YASUYUKI SASAKI¹, JUN-ICHIRO HAYASHI¹, YUKI IWAMURA¹, TAKEKI FUJIMURA¹, KOSUKE OKADA¹, TASUKU OHNO¹, RYOMA GOTO¹, MAKOTO AINO¹, EISAKU NISHIDA¹, GENTA YAMAMOTO¹, TAKESHI KIKUCHI¹, AKIO MITANI¹, MITSUO FUKUDA¹

[目的] 近年、歯周治療における抗菌療法の一つとして注目されている antimicrobial photodynamic therapy (aPDT)は、ポケット内に注入した光感受性物質に特定波長の励起光を照射することで放出される一重項酸素により殺菌する手法で、抗菌薬とは異なり耐性菌が生じるリスクがない。我々はこれまで、810mm 半導体レーザーと光感受性物質であるインドシアニングリーン封入ナノ粒子(ICG-Nano/c)を用いた aPDT の基礎的研究を行ってきた。まず、歯周病原細菌の一つである、Porphyromonas gingivalis ATCC33277 株(P. gingivalis) 菌液に対し ICG-Nano/c 溶液を混和し、レーザー照射を行うことで、99%の殺菌効果が得られることを確認した。次に、我々の用いる半導体レーザーの波長(810mm)が、生体の分光学的窓と呼ばれる組織透過性の高い波長帯内にあることから、歯周ポケット外からレーザーを作用させる方法(ポケット外照射)を想定し、擬似歯肉モデルを透過したレーザーの P. gingivalis 菌液に対する aPDT 効果を調べた。その結果、従来の照射法による aPDT と同様の殺菌効果が得られた。しかし、これらの研究は、培養した浮遊細菌に対して実施したのみであり、バイオフィルムに対する殺菌効果は確認していなかった。歯周病原細菌は浮遊細菌だけではなく、主にバイオフィルムとしても存在するため、今後の臨床応用を考慮する上で、バイオフィルムに対する効果についての検討は不可欠である。そこで本研究では、P. gingivalis のバイオフィルムを作製し、それに対する ICG-Nano/c と半導体レーザーによる aPDT の殺菌効果を検討した。

[材料と方法] 血液寒天培地を分注した 96well plate に、0D:0.1 に調整した P. gingivalis の菌液を入れ、嫌気状態にて 2 日間 培養しバイオフィルムを作製した。作製したバイオフィルムに ICG-Nano/c (10mg/ml) の溶液を入れ、レーザー照射 (照射出力 2W、RPT モード、duty cycle 50%、100ms、1 分間) を行ったものを aPDT 群とした。その他、ICG-Nano/c 添加及びレーザー照射を行わないものをコントロール群、ICG-Nano/c を添加しただけのものを ICG-Nano/c 群、レーザーを照射しただけのものをレーザー群とした。評価方法としては、各検体を希釈し、血液寒天培地に塗抹後、嫌気状態にて 7 日間培養、その後コロニーカウントを用いて評価した。

[結果] aPDT 群はコントロール群との比較において2乗オーダーの減少を認めた。これにより aPDT 群は、殺菌効果の一つの指標である99%の殺菌能を有することが示された。

[結論]直接照射を行うポケット内照射モデルにおいては、バイオフィルムに対しても、aPDT による殺菌効果が生じることが示唆された。また現在、歯周ポケット外照射モデルにおいても、同様の結果が得られるか否か、バイオフィルムに対する aPDT 効果を検討中である。

# 密度勾配遠心分離法による骨芽細胞系譜の解析

# The analysis of osteoblast lineages by density gradient centrifugation

<sup>1</sup>Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

OYuki ITO<sup>1</sup>, Shousaku ITOH<sup>1</sup>, Haruna NARUSE<sup>1</sup>, Takumi KAGIOKA<sup>1</sup>, Mikako HAYASHI<sup>1</sup>

#### 【目的】

骨髄ストローマ細胞は、分化誘導培地にて培養することで様々な種類の細胞に分化誘導することができる。これは骨髄ストローマ細胞に間葉系幹細胞が含まれているからである。間葉系幹細胞は、象牙芽細胞や骨芽細胞などの歯内・歯周の硬組織を構成する細胞へ分化しうると考えられているが、成熟骨芽細胞までの分化過程の詳細については未だに証明されていない。ところで、骨芽細胞はその分化段階で石灰化物を産生し、この石灰化物が詳細な解析を妨げてきた。その問題点を解決するために、我々は密度勾配にて、骨芽細胞が分化の途中で産生する石灰化物を除去し、生きた骨芽細胞のみを回収することが出来る密度勾配遠心分離法を見出した。そこで、骨芽細胞誘導をかけた骨髄ストローマ細胞に対して密度勾配遠心分離法を用い、細胞内密度の異なる骨芽細胞を分離することで異なった分化段階の骨芽細胞が分離できるのではないかと考えた。細胞内密度の異なる骨芽細胞を分離した後、骨芽細胞分化に関連する遺伝子群の発現量について解析したところ、新しい知見が得られたので報告する。

#### 【方法】

- 1. 生後 4~6 週齢の C57BL/6J マウスの大腿骨と脛骨から骨髄細胞を採取した。10%PCS 含有 α MEM 中で培養し、培養 3 日目に PBS にて洗浄し浮遊細胞を除去した。2 週間の培養の後、トリプシン・EDTA 処理により付着細胞を回収し骨髄ストローマ細胞とした。
- 2. 骨髄ストローマ細胞を骨芽細胞分化誘導培地 ( $50 \mu g/ml$  ascorbic acid、10mM  $\beta$ -Glycerophosphate、 $10^{-8}$  M Dexamethasone)にて  $1\sim2$  週間培養し、ALP 染色およびvon Kossa 染色を行い、石灰化能を評価した。
- 3. 上記の骨芽細胞分化誘導培地にて培養した骨髄ストローマ細胞を培養期間1週目、2週目、3週目にmRNAを回収し逆転写酵素 (ReverTraAce、TOYOBO) を用いて cDNA を合成した。この cDNA に対して骨芽細胞分化マーカー遺伝子である ALP、OPN、OCN の発現量について real-time PCR を行い比較検討した。
- 4. 上記の骨芽細胞誘導培地にて 2 週間培養した骨髄ストローマ細胞を回収し、濃度 10%/30%、30%/50%、50%/70%のパーコールグラジュエントを作成し、遠心分離した。各界面の細胞層を回収し、これら密度別に分けられた細胞の骨芽細胞分化マーカー遺伝子 Runx2、Cola-1、OPN、OCNの mRNA 発現量を real-time PCR にて比較検討した。得られた結果は Student's t 検定を用い、危険率を 5%で評価した。

なお、本研究における全ての動物実験は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け、承認のもとに実施した(受付番号: 動歯 -21-002-0 および動歯-26-011-0)。

#### 【結果】

骨髄ストローマ細胞を骨芽細胞誘導培地で培養することにより骨芽細胞へと分化し、培養期間によって骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現パターンが変化することが確認され、培養 2 週目が多様な骨芽細胞系譜が含まれていることがわかった。そこで、骨芽細胞誘導培地にて培養 2 週目の細胞群を、3 種類のパーコールグラジュエントにて分離し、骨芽細胞分化マーカー遺伝子について real-time PCR をおこなったところ、30%/50%のパーコールグラジュエントから回収された細胞は比較的未分化な細胞集団であることがわかった。また、10%/30%および50%/70%のパーコールグラジュエントから回収された細胞は分化が進んだ細胞集団であることがわかった。これらの解析結果より、骨芽細胞は、その分化過程でその細胞内密度を変化させることがわかった。

#### 【結論】

密度勾配遠心分離法により分化段階の異なる骨芽細胞を分離できることが明らかとなった。 本研究の一部は科学研究費補助金(17H04382、2017 IADR Innovation Oral Care Award)の補助の下に行われた。

# ニッケルチタンファイルによる天然歯根管形成過程のX線連続撮影

 $^1$ 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、 $^2$ 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 〇石幡 浩志 $^1$ 、半田 慶介 $^2$ 、齋藤 正寛 $^2$ 、山田 聡 $^1$ 

# Real-time radiographic imaging of root canal preparation on using nickel titanium files

<sup>1</sup>Division of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan <sup>2</sup>Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, Sendai, Japan

OHiroshi Ishihata<sup>1</sup>, Keisuke Handa<sup>2</sup>, Masahiro Saito<sup>2</sup>, Satoru Yamada<sup>1</sup>

【背景および研究目的】 モーターアシストによるニッケルチタンファイル(Ni-Ti ファイル)の根管形成時における挙動に関する知見は、模型を対象としたものが多い一方で、実際の治療の対象となる天然歯の根管形態は様々である。それらの形状すべてを模型で再現する事が困難である以上、根管構造のバリエーションに対応するシミュレーションを模型で再現するには限界がある。よって、天然歯におけるNi-Ti ファイルの根管形成は、X線造影下で可視化することに意義があると思われる。本研究では、低線量で造影可能な高精細X線受線センサーを用い、天然歯において Ni-Ti ファイルによる根管形成の連続透視撮影を行い、根管形態に対応する挙動について考察を行った。

【材料と方法】本研究におけるヒト由来試料については、東北大学大学院歯学研究科研究倫理専門委員会の承認下で使用した。 髄腔開拡および根管口形成、#10 手用ファイルにてパスファインドを実施した抜去歯 20 本について、ハンドピースモーターア シスト(X スマートプラス: (株)デンツプライ三金)によるX Ni-Ti ファイルで根管形成を実施した。ファイルはレシプロおよびロータリーモーションで使用する 2種のシリーズを用い、回転数とトルク値はメーカーの推奨値を適用した。X 線を直接電気信号 として検出する化合物半導体テルル化カドミウム(X CdTe)を素子としたピクセルサイズ X 100 X m の撮像センサー((株) X NSeeN)を用いた。線源はマイクロフォーカス(X 500 X A)とした。被写体一センサー間に X 7~15cm の距離を設けて受線センサーに達する像を拡大した。根管内におけるファイルの挙動を透視像として X 100 fbs のレートで連続撮影した。得られた投影データを画像 処理後、X X X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 7 X 8 X 8 X 9

【結果】マイクロフォーカス線源からの照射線量は、5秒間連続照射でデンタルフィルム1枚相当であった。透視像は#10 手用ファイルの先端を識別できる解像度であり、連続撮影から得られた動画ではファイルの回転や屈曲等のオリエンテーションを明瞭に描出していた。ファイルの挙動の可視化によって、大臼歯の90°弯曲根管に対してはpecking motionの上下動ストロークを小さくすることで、#45.05ファイルでも根尖アクセスが可能である一方、小臼歯におけるS字状根管など、プログライダーによるパスファインドが困難な事例があること、レシプロ、ロータリーモーションいずれのタイプのファイルでも、破折を生じる際は特に弯曲部における上下動で、ファイル先端が急速に根尖方向に進行した際に生じやすいことが判明した。

【考察】根管形成の開始時に用いる#10 ファイルが造影できたことで、本研究で使用した X 線画像センサーによるリアルタイム根管形成モニターの実用性が示された。Ni-Ti ファイルによる根管形成は、チェアタイム短縮のメリットに加え、弯曲根管に対する形成能の高さが評価されている一方、ファイル破折の懸念がつきまとっている。ファイル挙動のリアルタイム観察によって、根管形成の進行および達成度の把握、ファイル破折のリスクを探知できると思われる。撮像センサーは 100bps 撮影が可能であり、デンタルフィルム 1 枚分の線量で 500 フレーム相当の取得が可能と推定される。よって 10bps 程度の動画によるモニタリングでは、従来のフィルム 1 枚の被ばく量で 50 秒間の透視観察が可能と見られる。但し実用化には、ハンドピース操作を遠隔操作して術者を照射域から外すなど、術者の被ばく防止対策も必要と思われる。

# ラネル酸ストロンチウムによるマウス歯乳頭細胞の増殖および石灰化はカルシウム感知受容体を介して誘導される

1東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 医歯学系専攻 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野 ○バキト アラムッヂン¹、川島 伸之¹、橋本 健太郎¹、野田 園子¹、奈良 圭介¹、興地 隆史¹

# Strontium ranelate—evoked proliferation and mineralization of mouse dental papillae cells is mediated via calcium sensing receptor

<sup>1</sup>Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

OAlamuddin Bakhit<sup>1</sup>, Nobuyuki Kawashima<sup>1</sup>, Kentaro Hashimoto<sup>1</sup>, Sonoko Noda<sup>1</sup>, Keisuke Nara<sup>1</sup>, Takashi Okiji<sup>1</sup>

#### Purpose

Strontium ranelate (SrRn) is a medication for osteoporosis through promoting the osteoblastogenesis, and the potent hard tissue—inducing capacity of SrRn suggests its possible application to dentin or dental pulp tissue as a pulp capping agent. This study aimed to examine the effects and mechanisms of SrRn on the proliferation and differentiation/mineralization of mouse dental papillae cells (MDPs), focusing on the involvement of calcium—sensing receptors (CaSR).

#### Materials & Methods

The MDPs were cultured in  $\alpha$ -MEM with or without SrRn (0.01-2 mM), and cell proliferation was measured by a WST-8 assay. The odonto-/osteoblastic gene expression (*Alp, Bsp, Dmp-1, Dspp, Oc* and *Opn*) was evaluated by RT-rPCR. Mineralized nodules of MDPs were detected by alizarin red S staining. The PI3K/Akt signaling was evaluated by western blotting. NPS-2143 and LY294002 were used for a CaSR antagonist and a PI3K/Akt inhibitor, respectively.

#### Results

SrRn promoted the cell growth, which was blocked by NPS-2143 and LY294002. SrRn up-regulated the expression of *Alp*, *Bsp*, *Dmp-1*, *Dspp*, *Oc* and *Opn*, which was blocked by NPS-2143. Mineralized nodule formation was up-regulated by SrRn, which was blocked by NPS-2143 and LY294002. SrRn up-regulated the phosphorylation of Akt, which was blocked by NPS-2143.

#### Conclusion

SrRn promoted the proliferation and odonto-/osteoblastic differentiation/mineralization of MDPs, which may be partly mediated by the PI3K/Akt signaling activated by CaSR.

# ポルトランドセメント含有接着性根管充填用シーラーの細胞増殖への影響

「鹿児島大学学術研究院医歯学域歯学系歯科保存学分野 ○永山 祥子」、高 裕子」、勝俣 愛一郎」、梶原 武弘」、星加 知宏」、西谷 佳浩」

# Effect of cell growth on adhesive root canal sealer containing portland cement

<sup>1</sup>Department of Restrative Dentistry and Endodontology, Research Field in Dentistry, Medical and Dental Sciences Area, Research and Education Assembly, Kagoshima University, Kagoshima, Japan

OSHOKO NAGAYAMA¹, YUKO TAKASHI¹, ALICHIRO KATSUMATA¹, TAKEHIRO KATIHARA¹, TOMOHIRO HOSHIKA¹, YOSHIHIRO NISHITANI¹

【緒言】 不可逆性歯髄炎により抜髄を余儀なくされた歯においては、いかに感染をコントロールできるかが根管治療の成功の鍵となる. 抜髄後の根管充填においては、接着性を有する根管充填用シーラーを使用することが再感染防止の点で有利である. Mineral trioxide aggregate (MTA)は、殺菌作用と硬組織誘導能を有する水硬性セメントであり、直接覆髄、断髄、アペキシフィケーション、アペキソゲネーシス、パーフォレーション部の修復等の臨床応用が行われている. 本研究では、MTA の効果を有する接着性根管充填用シーラーの開発を目的として、MTA の主成分であるポルトランドセメントを用いて、ポルトランドセメント含有試作根管充填用シーラーが細胞増殖に及ぼす影響について検討を行った.

# 【材料と方法】

#### 1. 試料の作製

接着性レジン系シーラーとしてスーパーボンド根充シーラー (SBS) (サンメディカル) のシーラー紛材に対して、ホワイトポルトランドセメント (WPC) (太平洋セメント) を各濃度 (0, 5, 10, 20, 50 wt/%) で配合して SBS のモノマーで練和した. 試料となる硬化体の大きさは、高さ 2 mm、直径 4 mm の円柱状に調整し、実験に使用する前に 30 分間 UV を照射して滅菌した.

2. ヒト歯根膜細胞と培養条件

ヒト歯根膜細胞 (HPDLF) (Sciencell Reserch Laboratories) を 5%の牛胎児血清 (FBS) を含む専用培地 Fibroblast Medium (FM) で 37℃, 5% CO。存在下にて培養し、継代数 5~15 代までのものを実験に供試した.

#### 3. 生存細胞数の測定

SBS と WPC の各種配合比にて作成した試料を 96 well 細胞培養プレートの各 well に静置し、1% FBS を含む FM を各 well に 200  $\mu$ 1 添加した。15 分間 UV 照射して滅菌を行った後、37°C、5%002 存在下にて 24 時間保管した。各 well より採取した上清 100  $\mu$ 1 を培養液として準備した。ヒト歯根膜細胞を 96 well 細胞培養プレートに 2.5×104 個 / well になるように播種し、1%の FBS を含む FM にて 24 時間培養を行った後、上記の方法で得た培養液を用いて培養を 24 時間行った後、PrestoBlue Cell Viability Regent を用いて、生存細胞数を定量的に測定した。

4. 培養液中の Ca 濃度および pH の測定

1 の方法で作製して滅菌した試料を、96 well 細胞培養プレートの各 well に静置し、1% FBS を含む FM を  $200\,\mu$ 1 添加して、CO  $_2$ インキュベーターに保管した.静置開始から 3 時間,6 時間,9 時間,12 時間,24 時間,48 時間後に培地を全て回収し、新しい培地  $200\,\mu$ 1 に置換した.回収した培地の Ca 濃度はカルシウムイオンメーター(HORIBA)を用いて測定し,pH は pH メーター(HORIBA)を用いて測定した.

# 5. 統計解析

3の方法で計測された細胞数は、有意水準5%で1元配置分散解析を行った後にTukey 法を用いて統計解析を行った。

【結果と考察】 ポルトランドセメント含有量が 10 wt%以下においては、試作シーラーから溶出した成分を含む培養液中においてもヒト歯根膜細胞の生存する細胞数に変化はなかった。また培養液のpH および培養液中に溶出する Ca 濃度はポルトランドセメントの含有量依存性に上昇した。本研究で試作したシーラーは、細胞に為害性がなく、かつ WPC によるカルシウムの放出やアルカリ性を示す性質を維持していることから、MTA と SBS を構成材料として利用することによって、操作性に優れ、生体為害作用が少ない接着性根管充填用材料としての臨床応用の可能性が期待される。今後は、さらにヒト歯根膜細胞のアルカリフォスファターゼ活性、セメント芽細胞への分化を調べるために、Cementum attachment protein (CAP) や Cementum Protein 1 (CEMP1) の産生を解析し、根尖部における硬組織誘導の可能性について検討を行う予定である。

# 手術用顕微鏡下での手用器具による根管充填材の除去効果 ーマイクロ CT による評価ー

<sup>1</sup>昭和大学 歯学部 歯科保存学講座 歯内治療学部門、<sup>2</sup>University of New England College of Dental Medicine, Maine, USA

○八幡 祥生¹、鈴木 規元¹、KOMABAYASHI TAKASHI<sup>2</sup>

Efficacy of hand instruments in removing filling materials under an operating microscope: a micro-CT study <sup>1</sup>Division of Endodontology, Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Showa University, Tokyo, Japan <sup>2</sup>University of New England College of Dental Medicine, Maine, USA

○YOSHIO YAHATA¹, NORIYUKI SUZUKI¹, TAKASHI KOMABAYASHI²

【緒言】再根管治療において、感染源の可及的な除去のため、根管充填材の除去は必須の行程である。しかしながら、根管充填材の根管系からの完全な除去は非常に困難を伴う。近年、市場に供されたOKマイクロエキスカ(瀬戸製作所、以下OK)は、その先端が耳かき状に屈曲されたエキスカベータで、その先端は0.30 mm または0.50 mm と非常に細い、また、先端の屈曲方向や角度に様々の種類があり、手術用顕微鏡下で使用すると、根管内の根管充填材の残渣を確認しながら除去することが可能となるが、その効果についての報告は少ない、そこで本研究では、従来の回転切削器具を使用した方法とOKを補助的に使用した方法の再根管治療における根管充填材の除去効果について、マイクロCTを使用し比較検討を行った。

【材料と方法】 従来の回転切削器具を使用した方法と OK を補助的に使用した方法の 2 群を比較するための有意水準をα = 0.05, 検出力を power = 0.90 と設定し、サンプルサイズを算出、各群 n = 35 とした. 70 本の単根管ヒト抜去下顎前歯を使用 し、エナメルセメント質境で歯冠を切断除去後、#15K ファイルを使用し穿通性の確認と作業長の設定を行った. 根管形成は、 ProTaper Universal (Dentsply Sirona, USA) と X-smart (Dentsply Sirona) を用い、Sx, S1, S2, F1 そして F2 の順に 300rpm 下で行った. 根管充填はAH Plus シーラー (Dentsply Sirona, Germany) と ProTaper GP cone size F2 (Dentsply Sirona) を 使用し,コンティニュアスウェーブ法にて行った.根管充填後,根管上部は Cavit(3M ESPE,Germany)で仮封し,マイクロ CT (μCT40, Scanco Medical, Switzerland) の撮像を行った。その後試料は37度で90日間水中保管した。再根管治療は、ま ず全ての被験歯 ProTaper Retreatment (Dentsply Sirona) の D1, D2 と D3 を,次いで ProTaper Universal の F1, F2, そして F3 まで使用し作業長まで拡大した。その後35ずつの2群に分け、35歯は上記の方法で根管充填材除去を終了(以下Group PT) とし、残りの35 歯は、手術用顕微鏡 (OPMI Primo, Carl Zeiss Meditec, Germany) 下で、OK を使用して、さらに根管充填材 の除去を行った(以下 Group OK). 根管充填材の除去は、手術用顕微鏡下で視認できなくなるまで行った、全ての被験歯で根管 充填材の除去に要した時間を計測した. 根管充填材除去終了後, 再度マイクロ CT の撮像を行った. マイクロ CT データから, 画像解析ソフト (Amira 5.4, FEI, USA) を使用し、根管充填材除去前後の充填材の体積を求めた。根管充填材除去後に根管内 に残遺している根管充填材の割合(以下 PVFR)を体積の比から算出した. PVFR のデータの分布に正規性は確認できず (Shapiro-Wilk test, p < 0.05), Wilcoxon Mann-Whitney test にて2群の比較を行った. 一方,根管充填材除去に要した時 間のデータ分布は正規性を認めたため(Shapiro-Wilk test, p > 0.05), Student's t - test にて比較を行った.

【結果】根管充填材除去に要した時間(平均値±標準偏差)は、Group PT が 95.11 ± 20.47 秒で Group OK が 434.29 ± 171.21 秒と、Group PT が有意に小さい値を示した。また、全ての被験歯で、完全に根管充填材を除去することはできなかった。Group PT と Group OK の PVFR の中央値(四分位範囲)はそれぞれ 5.99%(3.31 - 13.06%)と 1.66%(1.07 - 1.93%)で、Group OK が 有意に小さい値を示した。

【考察と結論】手術用顕微鏡下でOKを使用することは、従来の回転切削器具を使用した方法よりも作業時間は延長するものの、より確実に根管充填材を除去できることが示唆された。