

Functionalized Graphene Oxide Nanoparticles Protect Tooth Dentin from Decalcification besides Bactericidal Activity.

○Nizami Mohammed Zahedul Islam, Yuta Nishina, Tadashi Yamamoto,
Yuki Shinoda-Ito, Shogo Takashiba

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

Introduction: Tooth decay and erosion are the critical clinical situations of complicated management because its multifaceted etiology has not yet been clearly understood. Several biomaterials, agents, and therapies have been proposed for the treatment of pain and hypersensitivity, however, none of them has been proven completely efficient, and the development of new desensitizing agents is the obligation now for an aging society.

This *in vitro* study assessed the efficacy of graphene oxide (GO) and its nanocomposite with metal ions were in protecting dentin decalcification of dentin surface and sealing the orifice of dentinal tubules.

Materials and Methods: We synthesized 5 different GO-nanocomposites. For the entire synthesis process, we followed a one-pot method and a 1:1 weight % composite preparation with GO and nanoparticles. All the samples were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Transmission Electron Microscopy (TEM), X-Ray Diffraction (XRD), X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS), and Thermogravimetric Analysis (TGA).

- 1) The conditions of the surface of the hydroxyapatite plate (HAp) and dentin slice were observed by SEM before and after treatment with GO-nanocomposites and Saforide® as a positive control after they were incubated at 37°C in EDTA and citrate buffer for 24 hours.
- 2) The antimicrobial test and the cytotoxicity test were performed for biological characterization by comparing to 0.1% povidone iodine as a positive control. Colony-forming unit (CFU) of *S. mutans* was counted after treating with GO-nanocomposites for 24 and 48 hours. MTS assay was performed to observe the viability of human epithelial HeLa cell line after treating with GO-nanocomposites for 48 hours.

Results:

- 1) Almost all GO-nanocomposites were effective to reduce decalcification of HAp plate.
- 2) GO-Ag-CaF₂ sealed the orifice of dentinal tubules completely (100%), and GO-CaF₂, GO-Ca₃(PO₄)₂, and GO-Ag were moderately (70-80%) or as Saforide®. In addition, no color change was noticed on the dentin surface by treating with GO-nanocomposites.
- 3) GO-nanocomposites were effective for reducing *S. mutans* CFU, especially GO-Ag-CaF₂ was stronger (60% more) than the positive control.
- 4) GO-nanocomposites were not cytotoxic to HeLa cells except a high concentration of GO-Ag-CaF₂(0.1%).

Conclusion: The ability of the GO-nanocomposites was to reduce dentin decalcification and to seal the orifice of dentinal tubules without discoloration provided it to be potentially useful as a clinical dentin mask, which must be established in future clinical studies.

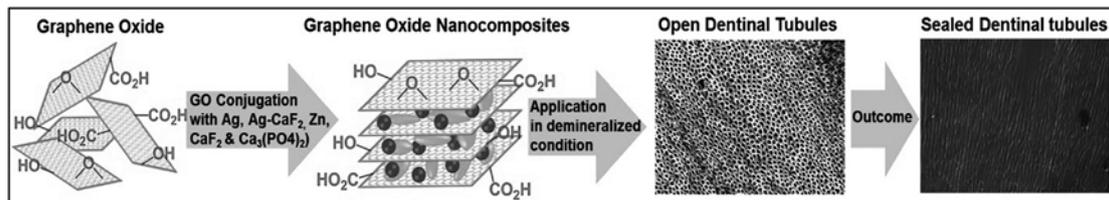


Figure: Nanocomposites were formed to be GO layers and nanoparticles, then applied on the dentin slices. Opened and sealed dentinal tubules were observed after dentin slices with/without GO-nanocomposites were exposed to demineralization solution.

探針による根面う蝕の硬さ判定法の検討

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座

○清水明彦

A consideration in judging the hardness of root caries lesions using a probe
Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine

○Akihiko Shimizu

【研究目的】

根面う蝕の硬さは、臨床では探針を用いた触診で3段階に判定されている。即ち、探針が容易に挿入でき引き抜くときに抵抗がなければ“soft”、圧入された探針を引き抜くときに抵抗(牽引抵抗)があれば“leathery”、探針が挿入できず、周囲の健全根面と同程度の硬さを感じられれば“hard”と判定されている。しかし、このような手用器具の触診による硬さの判定は客観性に乏しく、leatheryと判定されたう蝕が実際にどの程度の硬さなのかは明らかでない。本研究の目的は、抜去歯の根面う蝕の硬さおよび牽引抵抗の有無を、それぞれ測定機器を使って調べ、硬さと牽引抵抗の関係性を明らかにすることである。

【材料および方法】

ヒト抜去歯(兵庫医科大学倫理審査委員会承認番号2259号)の中から、着色(アンバー色～黒色)が認められかつ広範囲に拡大した根面う蝕を有する歯4本を選んで、それらのう蝕面に計30カ所の小領域を設定し被験部位とした。

まずカリオテスター(三栄エムイー)を用いて、各小領域内の5カ所でビッカース硬さ(HV)を測定し、その部の平均硬さを求めた。次に牽引抵抗を判定するための測定器(カコテクノス)を用意した。庄子(探針の針先に相当する)は、タングステンカーバイド製でその先端部曲率半径は15 μ m、円錐角は50度である。庄子の押し込み圧は70gfに、1gf以上の牽引抵抗があれば検出できるように設定した。測定は各小領域で5回とし、牽引抵抗が2回以上検出された場合「牽引抵抗あり」、牽引抵抗の検出回数が1回以下のときは「牽引抵抗なし」と判定した。これら2種の測定機器で得られたビッカース硬さおよび牽引抵抗「あり」「なし」の判定結果から、両者の関係性を検討した。

【成績】

ビッカース硬さ6未満のう蝕では、牽引抵抗「あり」と判定される場合と、「なし」と判定される場合があったが、ビッカース硬さ6以上のう蝕では牽引抵抗「なし」と判定された。この結果から、もし牽引抵抗「あり」ならそのう蝕の硬さは6HV未満と判定されるが、もし牽引抵抗「なし」ならそのう蝕の硬さは6HV以上か未満か、いずれとも判別できないことが分かった。

【考察】

臨床で根面う蝕の硬さを探針による触診で評価する場合、測定圧を規定することが難しく、牽引抵抗の判定も術者の感覚によるところが大きい。さらに探針の針先の形状はメーカーによって異なっているため、例え測定圧が同じでも探針が圧入される深さには差が生じ、引き抜くときの抵抗も違ってくる。従って、探針で“leathery”、“soft”、“hard”などと判定する際には、これらの問題が複雑に関係してくることを念頭に置く必要がある。

そこで今回の実験では、庄子の形状、押し込み圧、牽引抵抗の検出閾値など厳密に規定した機器を用いて、牽引抵抗の「あり」「なし」を評価した。その結果、今回使用した機器で、圧入された庄子を引き抜くときに抵抗「あり」として、いわゆる“leathery”と判定されたう蝕のビッカース硬さは6未満であることが分かった。

もし臨床で探針を用いて根面う蝕の硬さを評価するのであれば、探針の針先形状や測定圧などを規定した上で、牽引抵抗の有無と硬さの関係をあらかじめ調べておく必要がある。

【まとめ】

今回の実験では、ヒト抜去歯の根面う蝕を被験試料とし、庄子の先端形状、測定圧、牽引抵抗の検出閾値を規定した機器を用いて牽引抵抗の「あり」「なし」を判定し、さらにカリオテスターを用いてビッカース硬さ(HV)を調べたところ、牽引抵抗「あり」ならそのう蝕の硬さは6HV未満であった。探針を用いて根面う蝕の硬さを評価する場合でも、針先の形状や測定圧などを規定し、牽引抵抗と硬さの関係をあらかじめ検討しておくことが必要であろう。

新規バイオアクティブガラス配合覆髄剤の有効性の検討

大阪歯科大学 歯科保存学講座

○澤井健司郎, 保尾謙三, 小正玲子, 吉川一志, 山本一世

Study on Rehardening of Demineralized Dentin with the New Pulp-capping Agents containing Bioactive glass

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University

○Sawai Kenshiro, Yasuo Kenzo, Komasa Reiko, Yoshikawa Kazushi, Yamamoto Kazuyo

目的

Minimal Intervention(MI)の概念に基づき、齲蝕が深部象牙質にまで進行し歯髄に近接する場合、歯髄に近接する深部象牙質を保存し、露髄を回避する目的で暫間的間接覆髄法(IPC)が行われる。本研究では、Knoop 硬さ測定システムであるカリオテスター-SUK-971(三栄エムイー)を用いて象牙質試料の硬さを測定し、新規バイオアクティブガラス配合覆髄剤が軟化象牙質へ与える影響を検討した。

材料と方法

実験材料として、本学附属病院歯科口腔外科で抜去され、 -40°C で冷凍保存したヒト大臼歯を解凍して使用した。抜去歯の歯冠部および歯根部をモデルトリマーで除去し、耐水研磨紙#1000で研磨して厚さ2mmの円盤状の象牙質試料(デンティンディスク)を作製した。デンティンディスク中央部の直径3mm内でKnoop硬さをカリオテスター-SUK-971(三栄エムイー)を用いて5か所測定し、その平均値をデンティンディスクのKnoop硬さとした。Knoop硬さが 62 ± 3 のデンティンディスクを、ULVAC社製アスピレーターMDA-006を用いて歯髄腔から0.01MPaで吸引した状態で、20mM乳酸溶液(pH2.8)50mLに10時間浸漬して脱灰した。脱灰後、同様にKnoop硬さを測定してKnoop硬さが20前後のデンティンディスクを軟化象牙質試料とした。その後、軟化象牙質試料に、覆髄剤として新規バイオアクティブガラス配合覆髄剤(松風, SH-C), BioMTAセメント(モリタ, Bio-C), NEX MTAセメント(GC, NEX-C)を貼付し、ベースセメント(松風, BC)で被覆したものを覆髄試料とし、覆髄剤を貼付せずにBCのみで被覆したものをコントロールとした。作製した覆髄試料は、湿度100%容器中で1か月間保管後、Knoop硬さを測定した。試料数は各条件につき3試料とし、得られた値は一元配置分散分析およびTukeyの検定にて統計解析を行った($p < 0.001$)。また硬さ測定後、覆髄剤貼付部のSEM画像の観察を行った。(大阪歯科大学・医の倫理委員会(許可番号:大歯医倫第111023号))

結果および考察

覆髄剤貼付後のKnoop硬さ測定の結果、SH-C貼付群ではDW保管1か月で 21.6 ± 0.69 から 45.1 ± 1.8 となり、有意に硬さが向上した。またSEMによる観察の結果、管間象牙質が石灰化により緻密になっており、象牙細管開口部に石灰化物の緻密な沈着が認められた。Bio-C貼付群ではDW保管1か月で 22 ± 1.1 から 47.3 ± 0.7 となり、有意に硬さが向上した。またSEMによる観察の結果、管間象牙質が石灰化により緻密になっており、細かい石灰化物の沈着が認められた。NEX-C貼付群ではDW保管1か月で 20.7 ± 1.5 から 56.1 ± 1.6 となり、有意に硬さが向上した。またSEMによる観察の結果、管間象牙質が石灰化により緻密になっており、石灰化物の顆粒の沈着が認められた。コントロール群ではDW保管1か月で 20.6 ± 1.2 から 25.2 ± 2.5 となり、有意差は認められなかった。またSEMによる観察の結果、管間象牙質は脱灰により粗になっており、コラーゲン繊維の露出が認められた。SH-C, Bio-C, NEX-Cを覆髄剤として軟化象牙質に応用することで、コラーゲン繊維表面に石灰化物の沈着が起り、再石灰化により硬さが向上したと考えられる。今回の実験結果から、バイオアクティブガラスを配合した覆髄剤を用いることでMTAセメントと同等の脱灰象牙質の硬化が認められた。

結論

以上の結果により、バイオアクティブガラスを配合した新規覆髄剤の軟化象牙質の硬化への有効性が示唆された。

PCA 配合歯磨剤のレジン象牙質接着性への影響の検討

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 生体機能再生・再建学講座 歯科保存修復学分野
○吉山昌宏, 大原直子, 松崎久美子

Effects of PCA-containing dentifrice on resin-dentin bonding

Department of Operative Dentistry, Field of Study of Biofunctional Recovery and Reconstruction, Okayama
University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science
○YOSHIYAMA Masahiro, OHARA Naoko, MATSUZAKI Kumiko

【 緒 言 】

超高齢社会を迎えた我が国では、認知症患者やオーラルフレイル患者が激増しており、根面う蝕も多発しているのが現状である。しかしながら、根面う蝕の予防は極めて困難であり、根面う蝕の修復法も全く確立されていない。近年、ライオン歯科材社は、PCA（ピロリドンカルボン酸）が象牙質露出コラーゲンを保護する作用を有することを見出し、PCA 配合歯磨剤を市販している。そこで本研究では、PCA 配合歯磨剤を用いて歯磨きした人工脱灰象牙質への抗菌性レジン（クリアフィルメガボンド FA, クラレノリタケデンタル社）の微小引張接着強さを測定し、PCA が象牙質接着性に及ぼす影響を検討した。

【 材料および方法 】

本研究は、ヒト健全抜去大臼歯を使用したものであり、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の倫理委員会の許可（承認番号 189 号）の下で実施された。抜去歯は 24 歯使用した。歯冠部象牙質平坦面を露出し、耐水研磨紙#600 を用いて研削後、6 本ずつ無作為に 4 群に分けた。1 群は 37°C 水中保管、残りの 3 群は酢酸溶液 (pH5) に 5 日間浸漬して人工脱灰象牙質を作製した。人工脱灰象牙質は、37°C 水中保管群、PCA 非配合歯磨剤 (Check-Up gel, ライオン歯科材) 群、PCA 配合歯磨剤 (Check-Up rootcare, ライオン歯科材) 群とし、各々の歯磨剤群においては 1 回 10 分の歯磨きを 1 日 3 回 30 日間継続した。以上の 4 群に対し、クリアフィルメガボンド FA を用いて歯面処理を行い、クリアフィルマジスティ ES-2 (クラレノリタケデンタル) を築盛し、光重合を行った。37°C 水中に 24 時間保管後、被着面が 1mm² の短冊状になるように切片を作製し、クロスヘッドスピード 1.0mm/min の条件下で微小引張接着強さを測定した。統計分析は一元分散分析および Tukey HSD 法を用い、有意水準 5% で解析を行った。

【 結果および考察 】

人工脱灰象牙質群間の比較では、37°C 水中保管群が最も低い値を示し ($p < 0.05$)、PCA 非配合歯磨剤による歯磨き群、PCA 配合歯磨剤による歯磨き群の順に高い値を示した ($p < 0.05$)。歯磨きを行ったことで、人工脱灰象牙質の粗造な表面を除去できたことが、接着の向上につながったと考えられた。また、PCA 配合群においては、歯磨きによる粗造な表面の除去に加え露出コラーゲンを保護したことで、歯面処理剤が歯質表面に浸透し、健全象牙質よりは低いものの、接着強さの向上を示したと考えられた。

【 結 論 】

PCA 配合歯磨剤の使用は人工脱灰象牙質に対する接着性の向上に有用である可能性が示唆された。本研究成果は、非侵襲的な根面う蝕接着修復の確立に寄与すると考えられる。

歯磨剤に含有される低濃度フッ素と P0s-Ca が再石灰化に及ぼす影響

¹ 東京医科歯科大学医歯学総合研究科う蝕制御学分野

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 江崎グリコ株式会社

○井上剛¹、サイド マハムド¹、池田正臣²、田中智子³、滝井寛³、田上順次¹

Remineralization effect of low concentration fluoride and P0s-Ca in experimental toothpaste

¹Department of Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

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

³Institute of Health Sciences, Ezaki Glico Co., Ltd

○Go Inoue¹, Mahmoud Sayed¹, Masaomi Ikeda², Tomoko Tanaka³, Hiroshi Takii³, Junji Tagami¹

【緒言】歯磨剤に含有されるフッ素濃度は高いほうがCaF₂の形成量が増え、pH低下時の溶出による効果の持続性は高い。そのことから近年市販されている歯磨剤の含有フッ素濃度も基準が上がっているが、安全性の問題が懸念されることや、再石灰化の観点では低濃度のほうがアパタイトに取り込まれやすく、フルオロアパタイトの形成につながるという報告もある。そのため、カルシウムとフッ素の溶解性が課題となるが、物性的に歯磨剤中でイオン性を保つのは難しい。これまでの研究でカルシウムの溶解性が高い新素材のP0s-Ca(リン酸化オリゴ糖カルシウム)およびフッ素含有歯磨剤の再石灰化効果が高いことが井上ら(IADR, 2018)によって報告されたが、低濃度フッ素での検証はされていなかった。そこで本研究の目的は低濃度フッ素およびP0s-Ca含有歯磨剤が再石灰化に及ぼす影響をTMRを用いて解析することとした。

【材料と方法】本研究ではヒト抜去歯を使用した。東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会によって承認(D2013-022)されている。ヒト大白歯歯冠部からエナメルブロックを切り出し、耐水研磨紙を用いて研削した後、ネイルパーニッシュを用いて窓開け(3×3 mm)を行った。人工脱灰液(pH5.0)中に96時間浸漬し、窓開け部の半分をさらにネイルパーニッシュで覆ったものを試片とした。6種の歯磨剤(P0s-Ca(0mM, 13.2mM)とフッ素(0ppm, 3ppm, 1450ppm)の組み合わせ)を用いて1:3で蒸留水と混和し懸濁液としたものを、作製した脱灰エナメル試片に5分間作用させ水洗した。その後pHサイクル(人工脱灰液:pH4.8、30分間 再石灰化液:pH7.0、150分間)を行った。この行程を1日3回、7日間行った後、厚さが約150μmになるよう薄切研磨したものを試料とした。Transversal microradiography TMR(SOFTEX CMR-2)を用いてミネラル密度の解析を、またレーザー顕微鏡(VK-X160)を用いて、試料表面の表面粗さ(Sa)をpHサイクルの前で計測し比較した。ミネラル密度の比較はTukey's HSD testを、表面粗さの比較はPaired t-testとTukey's HSD testおよびDunnett's T3 testを用いて危険率5%にて検定した。

【結果】TMR解析によって得られたデータから算出したミネラル回復率を表に示す(表1)。それぞれグループ①～③のP0s-Ca含有群、グループ④～⑥の非含有群内において、フッ素濃度が増えるとミネラル回復率が有意に上昇した。またフッ素濃度が低濃度(0ppmおよび3ppm)の場合P0s-Ca含有群のほうが有意に高い値を示した。すべての群においてP0s-Ca含有、高濃度フッ素群が最も高い値を示した(p<0.05)。表面粗さ測定の結果、P0s-Caおよび高濃度フッ素含有群で最も低い値を示した。表面粗さ測定の結果、P0s-Caおよび高濃度フッ素含有群で最も低い値を示した(p<0.05)。

【結論】歯磨剤にフッ素が含有されることによりミネラル回復率が上がった。またP0s-Ca含有群では低濃度フッ素含有群において有意にミネラル回復率が上昇し、高濃度フッ素含有群では最も高い値を示した。また、表面粗さには含有フッ素濃度が影響することが示唆された。

Group	1	2	3	4	5	6
POs-Ca(mM)	13.2	13.2	13.2	0	0	0
F(ppm)	0	3	1450	0	3	1450
ave.	30a	52.9b	71.9b	5.7	30.4c	46.9abc
stdv	6.8	13.5	8.9	4.8	11.3	14.1

Table 1: Average and standard deviation of mineral recovery rate of each group after TMR analysis.

Different small letter shows no statistical differences between groups.

シュワン細胞はヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化を促進する

¹九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、²九州大学病院 歯内治療科、³九州大学大学院歯学研究院 OBT 研究センター
○糸山知宏¹、吉田晋一郎²、友清淳²、長谷川大学²、濱野さゆり^{1,3}、
杉井英樹²、小野太雅¹、藤野翔香¹、一法師啓太¹、前田英史^{1,2}

Schwann cells induce osteoblastic differentiation of human preosteoblast.

¹Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University, ²Department of Endodontology, Kyushu University Hospital, ³OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University
○Tomohiro Itoyama¹, Shinichiro Yoshida², Atsushi Tomokiyo², Daigaku Hasegawa², Sayuri Hamano^{1,3},
Hideki Sugii², Taiga Ono¹, Shoko Fujino¹, Keita Ipposhi¹, Hidefumi Maeda^{1,2}

【目的】シュワン細胞は、皮膚や神経等の様々な末梢組織再生に関与することに加えて、近年骨芽細胞分化を促進することが報告されている。我々は、傷害を与えた歯周組織において Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) (Yoshida et al., 2016) とシュワン細胞マーカーである S100 calcium-binding protein B (S100B) の発現が上昇することを報告している (糸山ら、第 149 回日本歯科保存学会秋季学術大会)。しかしながら、歯周組織再生におけるシュワン細胞の機能については十分な解明がされていない。そこで本研究では、歯周組織の傷害部位における S100-B の発現解析、GDNF がシュワン細胞の細胞遊走能および増殖能に及ぼす影響、ならびにシュワン細胞がヒト前骨芽細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】(1) Transwell assay および WST-1 proliferation assay にて、GDNF がヒト類上皮悪性シュワン細胞株 YST-1 (RIKEN BRC) の細胞遊走能および増殖能に及ぼす影響について検討した。(2) YST-1 がヒト前骨芽細胞 Saos2 の骨芽細胞分化に及ぼす影響について検討するため、YST-1 の培養上清、ならびに当研究室で樹立した未分化ヒト歯根膜細胞株 1-17 細胞 (Tomokiyo et al., 2008) の培養上清を用いて、石灰化物形成能を Alizarin Red S 染色法、骨関連因子 (ALP, Osterix, OPN, BMP2, BSP) の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した。(3) ラット歯根膜傷害モデル (SD ラット、5 週齢、雄性) を 1, 3, 5, 7, 14, 28 および 42 日間飼育後屠殺し組織切片を作製し、抗 S100-B 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。すべての実験は九州大学遺伝子組換え実験安全委員会および動物実験委員会の承認 (承認番号: 27-76, A30-265-0) の下で行った。

【結果】(1) Transwell assay の結果、GDNF は YST-1 の細胞遊走能を有意に促進した。一方、GDNF は YST-1 の細胞増殖能には影響を及ぼさなかった。(2) YST-1 の培養上清を用いて Saos2 を培養した結果、他の試験群と比較して石灰化物形成と骨関連因子の遺伝子発現が有意に上昇した。(3) 正常ラット上顎臼歯部切片を用いて免疫蛍光染色を行った結果、S100-B 陽性細胞は、歯槽骨近傍の歯根膜組織に発現していることが観察された。(4) 傷害 1, 3, 5 日後の歯周組織において S100-B 陽性細胞はほとんど観察されなかった。傷害 7 日後の歯周組織においては、S100-B 陽性細胞が観察され、傷害 14, 28 日後における歯周組織においてその陽性細胞数は有意に増加した。傷害 42 日後の歯周組織においては、歯槽骨形成が認められ、その新生骨周囲に S100-B 陽性細胞が観察された。

【考察】GDNF が YST-1 の遊走能を促進したことから、傷害部位において発現上昇する GDNF (Yoshida et al., 2016) がシュワン細胞の細胞遊走を促進することが示唆された。また歯周組織傷害部位の創傷治癒が進むにつれてシュワン細胞数が増加し、シュワン細胞が新生骨周囲および歯槽骨近傍の歯根膜組織に発現することに加え、YST-1 の培養上清が Saos2 の骨芽細胞分化を促進したことから、シュワン細胞が歯周組織の創傷治癒に関与する可能性が示唆された。

【結論】(1) GDNF は YST-1 の細胞遊走を促進する。(2) YST-1 の培養上清は、Saos2 の骨芽細胞分化を促進する。(3) 正常歯周組織において、S100-B 陽性細胞は歯槽骨近傍の歯根膜組織に発現する。(4) 傷害を与えた歯周組織においては、創傷治癒に伴って S100-B 陽性細胞数が上昇する。

Heat-Shock Protein がヒト歯根膜細胞のコラーゲン代謝に及ぼす影響の解析

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)
○西川有彩、山下元三、鈴木美麻、池上久仁子、中村友美、橋本康樹、森川竜也、北村正博、村上伸也

Roles of HSPs for the type 1 Collagen Production in HPDL Cells

1. Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry,
2. Osaka University Dental Hospital

○Arisa Nishikawa¹, Motozo Yamashita², Mio Suzuki², Kuniko Ikegami², Tomomi Nakamura²,
Koki Hashimoto¹, Tatsuya Morikawa¹, Masahiro Kitamura¹, Shinya Murakami¹

【目的】歯根膜は、歯根膜細胞、血管細胞、未分化間葉系幹細胞などの固有細胞成分と1型や3型コラーゲン、ファイブロネクチンを主成分とする細胞外マトリックス (ECM) から構成され、力学的負荷に耐えうる物理的な生体バリアーのみならず、歯周組織の修復・治癒、再生の場として重要な役割を演じる。その際に、ECMは、細胞間を充足することで物理的強度を与え、細胞が接着する足場を提供するのみならず、インテグリンなどの接着分子を介して様々なシグナルを細胞内に伝達し、組織発生、分化、創傷治癒、免疫応答に関与することが明らかとなっている。従って、歯根膜の恒常性維持には、歯根膜細胞におけるECM、とりわけ1型コラーゲンの細胞レベルでの代謝・調節制御が重要であると考えられる。

熱誘導性タンパク質、Heat-Shock Protein (HSPs)は、分子シャペロンであり、種々のタンパク質と複合体を形成することでストレス環境下でのタンパク質の変性を防ぐとともに、タンパク質のフォールディングを助けることで正常高次構造を維持することから、高分子タンパク質の安定化にとり重要である。コラーゲンは、細胞内の生合成において、小胞体内で2本の $\alpha 1$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖で形成され、それぞれの α 鎖はNプロペプチド、Cプロペプチド、グリシン-X-Yからなり、Yの位置のプロリンが水酸化されることにより3本鎖を形成し、ゴルジ体を通過して細胞外へ分泌、ECMに蓄積されるが、この過程において、HSP70、HSP90、HSP47が、細胞内輸送、小胞体内でのコラーゲンのフォールディングを調節制御することが報告されている。近年、これらHSPsの発現量が加齢やストレスに反応して変動すること、また遺伝子変異マウスの解析により骨格形成に重要であるとの報告がなされたが、歯周組織における生理的な役割は不明である。本研究では、HSPsの歯根膜細胞における機能を明らかにするために、同タンパク質が1型コラーゲンの産生に及ぼす影響を解析、検討した。

【材料と方法】初代ヒト歯根膜細胞 (HPDL: ScienCell research laboratories より購入) を用いて、HSP70および1型コラーゲン、小胞体 (ER)、ミトコンドリアの免疫細胞化学 (ICC) 染色を行い、その局在を共焦点蛍光顕微鏡で観察した。シャペロン活性化剤として、HSPs誘導剤、ゲラニルゲラニルアセトン (GGA)、阻害剤としてVER-155008を用いて、HSPsの1型コラーゲン生合成に及ぼす影響をウェスタンブロッティング法およびqRT-PCR法により検討した。また、ELISA法により、1型プロコラーゲンC末端ペプチド (PIP) を測定することで、細胞外に分泌された成熟1型コラーゲンを定量解析した。さらに、HPDLにおけるHSPsと小胞体ストレスセンサー Inositol-requiring enzyme 1a (IRE1a) の発現量についてはウェスタンブロッティング法にて検討した。

【結果】HPDLにおいて、HSP70および1型コラーゲンと、小胞体 (ER)、ミトコンドリアと共局在が認められた。また、HPDLにおいて、GGA処理により、HSP47、HSP70、HSP90の発現が誘導された。GGA、VER-155008処理により、1型コラーゲンのmRNA、タンパク質レベルの発現量に変化は認められなかった。その一方、GGA処理により細胞外に分泌された成熟1型コラーゲン量は増加し、VER-155008処理により抑制された。さらに、VER-155008処理によりIRE1の発現量が増加した。

【結論および考察】ヒト歯根膜細胞において、HSPsの活性化は、成熟1型コラーゲンの生成に関与することが明らかとなった。その分子メカニズムの一つとして、コラーゲン高次構造の構築、安定化および構造の保持、あるいは細胞外への分泌への関与が示唆された。今後、HSPsが歯周病の病態生理に及ぼす影響を検討する予定である。

臨床応用を目指した歯槽骨由来未分化前骨芽細胞の分離培養システム構築

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

○鈴木重人、Mary M. Njuguna、Suresh V. Venkataiah、中野将人、八幡祥生、半田慶介、齋藤正寛

Translational approach of Human alveolar bone derived immature Osteoblast culture system for Bone regeneration therapy.

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

○Shigetou SUZUKI, Mary M. NJUGUNA, Suresh V. VENKATAIAH, Masato NAKANO, Yoshio YAHATA, Keisuke HANDA, Masahiro SAITO

【目的】 水平性骨欠損は重篤な歯周病により歯を喪失した後に引き起こされる歯槽骨吸収の病態であり、現行の補填剤を用いた技術による骨再生は不可能であるため、インプラント治療や義歯補綴などの治療を困難にする。この問題を解決するには、3次元的な細胞培養技術を用いて立体的な骨再生を可能にする再生医療等製品の開発が必要である。当研究室ではこれまでヒト歯槽骨から生体外増幅能力を有する歯槽骨由来未分化前骨芽細胞 (HAOB) の分離培養技術を開発してきた (第 145 回日本歯科保存学会学術大会発表)。HAOB は生体内での骨形成能力を有していることから、骨組織工学において立体的な骨再生を可能とする細胞源であることが示された。今後 HAOB を再生医療等製品として開発するためには、安定的な供給源および安全性を担保する為に good manufacture practice (GMP) 基準で分離培養するプロトコルの確立が必須となる。そのため本研究では、供給する歯槽骨の採取部位の検討およびトレースアビリティを有するコラゲナーゼを用いて HAOB の分離培養を試みた。

【方法】 採取部位の最適化のため、ヒト顎骨より骨を採取し (東北大学大学院歯学研究科研究倫理委員会承認番号 2018-3-4, 26-23) collagenase を用いて連続的に消化を行う事で HAOB を分離培養した。各部位から得られた HAOB の細胞増殖能の比較および骨芽細胞分化能を検討するため、骨芽細胞分化誘導培地で 10 日間および 21 日間培養を行い骨原性の評価を行った。顎骨採取部位および分離培養について以下の条件で行った。

1. HAOB の分離培養条件の検討

顎骨採取部位: 下顎骨または口蓋部の骨隆起の歯槽骨を、組織障害の少ない最先端超音波メスである Variosurg3 (NSK) を用い採取した。

分離培養: 骨組織の分離は、collagenase P (Roche) およびトレースアビリティを有し、アニマルフリーである collagenase B (worthington) を用い比較検討した。培地は、MF 培地 (TOYOB0) および MF start 培地 (TOYOB0) を使用した。

2. HAOB の骨原性の評価

HAOB の骨芽細胞への分化誘導の判定としてアルカリフォスファターゼ活性 (ALPase) を、石灰化物形成能力の判定としてアリザリンレッド染色法を行った。また、ISOGEN を用いて total RNA を回収し、M-MLV によって cDNA を作製した。この cDNA を用いて骨形成関連遺伝子群の発現 (Runx2, Osterix, Osteocalcin, Osteopontin, Type I collagen) をリアルタイム PCR 法にて定量解析した。

【結果と考察】 下顎骨および口蓋部の骨隆起より HAOB の分離培養を行う事が出来た。Collagenase B は Collagenase P と同等の HAOB 分離能が示された。また分離培養した HAOB では、ALPase 活性と石灰化物形成能の上昇および骨形成関連遺伝子群の発現が確認された。このことから臨床使用の可能な安全性の高い HAOB の分離培養技術を確立できる可能性が示唆された。

【結論】 本研究の結果から、下顎骨と口蓋部の両方の骨隆起より HAOB の分離培養が可能であり、超音波メスによる骨採取は有効である事が判明した。そしてトレースアビリティを有しアニマルフリーである collagenase B は Collagenase P と同様に細胞の分離培養が可能である事が示された。

今後 HAOB を用いた再生医療等製品の開発を行うため、GMP に準拠した原材料を用いた培地の開発を進め、分離培養プロトコルを確立し臨床研究を進めていく予定である。

***Porphyromonas gingivalis* 感染によって誘導される脂質代謝異常は TRPV1 チャンネルの活性化により制御される**

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野, ²新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔保健学分野
○野中 由香莉¹, 原 実生¹, 竹内 麻衣¹, 松岸 葵^{1,2}, 山崎 和久², 多部田 康一¹

TRPV1 channel activation regulates dyslipidemia induced by *Porphyromonas gingivalis* infection

¹Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences. ²Division of Oral Science for Health Promotion, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences.
○Yukari Nonaka, Miki Hara, Mai Takeuchi, Aoi Matsugishi, Kazuhisa Yamazaki, Koichi Tabeta

【背景および目的】

ヒトを対象とした研究から、歯周病が動脈硬化性疾患のリスクを高めることが報告されている (J. periodontol. 2007; Atherosclerosis. 2009)。そのメカニズムとして、我々は歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の感染モデルマウスにおいて、肝臓の脂質代謝制御遺伝子の発現が変動し、動脈硬化性疾患のリスク因子である血中 LDL コレステロールレベルが上昇することを明らかとしてきた (Lipids Health Dis. 2012)。

Ca 透過型イオンチャンネルである Transient receptor potential (TRP) V1 チャンネルが腸炎などの様々な病態形成に関与することが明らかとなってきた。歯周病モデルマウスにおいても、TRPV1 アゴニストである唐辛子の辛味成分カプサイシンによる TRPV1 チャンネル活性化により、歯槽骨吸収が抑制されることが明らかとなった (Sci Rep. 2016)。また、高脂肪食投与下の ApoE^{-/-} mice においても TRPV1 の活性化が動脈硬化性病変を抑制することが示されている (Cardiovasc Res. 2011)。

以上より、*P. gingivalis* によって誘導される脂質代謝異常に対しても TRPV1 の活性化が抑制的に働くという仮説を立て、*P. gingivalis* 感染モデルを用いて TRPV1 が脂質代謝に与える影響を明らかとすることを目的とした。

【材料および方法】

9 週齢の C57BL/6 マウス、*Trpv1* ko マウスに 10⁹CFU の *P. gingivalis* W83 あるいは PBS を腹腔より 1 回投与し、16 時間後に安楽死させた。血清中の脂質プロファイルおよび PCSK9 タンパクレベルを測定した。肝臓における脂質代謝制御関連遺伝子の発現を q-PCR 法にて解析した。さらに、肝臓における LDLR のタンパク発現を Western blotting 法にて解析した。また、カプサイシン 50ppm を食餌に混合して 10 日間摂取させたマウスに上記同様の *P. gingivalis* の腹腔感染と解析を行った。

【結果及び考察】

P. gingivalis 感染によって上昇する血中 LDL コレステロールレベルが、C57BL/6 マウスと比較して *Trpv1* ko マウスにて有意に増加しており、TRPV1 チャンネルが脂質代謝異常の病態形成に関与することが示された。肝臓における *Ldlr*, *Pcsk9* の遺伝子発現および血清中の PCSK9 タンパクレベルが、*P. gingivalis* 感染下で C57BL/6 マウスと比較して *Trpv1* ko マウスにて有意に上昇していた。肝臓における LDLR のタンパクレベルは *P. gingivalis* 感染下で *Trpv1* ko マウスにて有意に抑制されていたことから、PCSK9 の発現増加によって肝臓に発現する LDLR が分解され、その結果、血中 LDL コレステロールレベルが増加したと考えられる。一方、TRPV1 アゴニストであるカプサイシンを投与したマウスにおいては、*P. gingivalis* 感染によって上昇する血中 LDL コレステロールレベルが有意に抑制され、さらに血中 PCSK9 レベルも有意に減少していた。以上より、PCSK9 産生の制御に TRPV1 チャンネルが関与し、TRPV1 の活性化によって、*P. gingivalis* 感染が引き起こす脂質代謝異常を制御しうる可能性が示唆された。

【結論】

TRPV1 チャンネルが PCSK9 産生の調整を介して脂質ホメオスタシスに関与することが示唆された。*P. gingivalis* 感染が引き起こす脂質代謝異常を TRPV1 チャンネルの活性化により制御できる可能性が示唆された。

※本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認(SA00363)を得ている。

脂肪・歯周組織で発現誘導される miRNA-146a による抗炎症効果の検討

1. 九州大学大学院 歯学研究院 歯周病学分野

2. 広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 医化学研究室

○真田大樹¹、佐野朋美^{1,2}、松永紘明¹、Rehab Alshargabi¹、岩下未咲¹、山下明子¹、西村英紀¹

Anti-inflammatory effect of miR-146a induced in inflamed adipose/periodontal tissue

1. Section of Periodontology, Kyushu University Faculty of Dental Science

2. Department of Biological Chemistry, Hiroshima University Institute of Biomedical and Health Sciences

○Taiki Sanada, Tomomi Sano, Hiroaki Matsunaga, Rehab Alshargabi,
Misaki Iwashita, Akiko Yamashita, Fusanori Nishimura

【目的】

先行研究で、脂肪細胞-マクロファージ共培養系を LPS 刺激した際に脂肪細胞で発現変動を示す microRNA のスクリーニングを行った。その中に炎症制御に関与する microRNA-146 が含まれていた。microRNA は炎症、細胞分化、細胞増殖、腫瘍形成を含む多彩な生物学的プロセスにおいて重要な役割を果たすことが示されている。中でも、microRNA-146a (miR-146a) は炎症反応のネガティブフィードバックを担っていることが知られている。miR-146a 発現誘導については、脂肪・歯周両組織で報告があるものの、その炎症抑制効果については十分に解明されていない。そこで本研究では、脂肪・歯周組織における miR-146a による抗炎症効果を検討した。

【材料と方法】

LPS 刺激下でマクロファージと共培養した脂肪細胞または歯肉線維芽細胞における miR-146a 発現量およびマクロファージ単独培養群における発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。また、共培養群に miR-146a を導入した際のサイトカイン遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で定量した。マクロファージ単独培養群では、miR-146a を導入した際のサイトカイン遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で定量するとともに、タンパク発現を ELISA 法にて測定した。miR-146a 導入による Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1) や TNF receptor associated factor 6 (TRAF6) 発現の検討はウエスタンブロットング法にて行った。さらに、マウス尾静脈より miR-146a を投与した際の脂肪・歯周組織の炎症抑制効果について検討した。

【結果と考察】

In vitro では miR-146a を脂肪細胞または歯肉線維芽細胞に導入し、LPS 刺激下でマクロファージと共培養すると、miR-146a を導入しない control 群と比較し、脂肪細胞および歯肉線維芽細胞からの *Il-6*、*Mcp-1* 遺伝子発現が有意に抑制された。また、マクロファージにおいても LPS 刺激下で培養すると、miR-146a 導入群で control 群と比較し、マクロファージにおける *Tnf-α*、*Il-6*、*Mcp-1* 遺伝子発現が有意に抑制された。培養上清中 *Tnf-α* タンパク発現量も miR-146a 導入群で control 群と比較し有意に減少した。

In vivo では miR-146a をマウスに尾静脈から経時的に投与することで、高脂肪食誘導性の肥満脂肪組織および歯肉組織における *Tnf-α* 遺伝子発現が control 群と比較し有意に抑制された。miR-146a は TNF-α シグナルを伝達する IRAK1 や TRAF6 の発現を抑える作用がある。我々の検討においてもマクロファージに miR-146a を導入することで TRAF6 の発現が抑制された。miR-146a は肥満糖尿病や関連する歯周炎などにおいて、脂肪・歯周組織の炎症に共通の制御因子として応用できる可能性がある。近年、様々な疾患に関連する miRNA を制御する試みが行われている。miRNA をターゲットとした新しい核酸医療薬は、疾患特異的に亢進した miRNA の阻害、もしくは発現が低下した miRNA の補充を目標に開発が進められている。miR-146a についても、炎症性疾患における新たな治療方法として将来的に有用となる可能性を秘めている。

【結論】

miR-146a は慢性炎症状態でマクロファージからの産生物質によって発現誘導され、負のフィードバック機構として脂肪・歯肉組織において炎症反応を抑制することが示された。

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

トリプシン前処理および CCR3 拮抗剤含有非細胞性根管充填材を用いた若齢歯の歯髄再生

1. 国立長寿医療研究センター 幹細胞再生医療研究部
2. 国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部
3. エア・ウォーター(株)グループ アエラスバイオ株式会社

○庵原 耕一郎¹、Mohammed Zayed¹、中島 美砂子^{2,3}

A non-stem cell therapy with CCR3 antagonist following trypsin pretreatment for total pulp regeneration in young teeth

1. Department of Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology
2. Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology
3. Air Water Inc. Group, Aeras Bio Inc.

○Koichiro Iohara¹, Zayed Mohammed¹, Misako Nakashima²

【目的】私共は歯髄幹細胞を抜髄根管内に自家移植する歯髄再生治療法を開発し、すでに臨床研究により安全性を確認し、有効性を示唆した(第138回保存学会)。一方、歯髄再生治療においては、この stem cell therapy (幹細胞移植治療法) に対して、cell homing method (細胞遊走法)がある。例えば歯根未完成歯に対しては、歯髄幹細胞を用いずに根管内に血餅や PRP (Platelet Rich Plasma, 多血小板血漿) を満たす方法が知られている。しかしながら、歯髄固有組織の再生はほとんどみられず、主に血管に富む線維性・骨様組織が再生されるにすぎない (Del Fabbro ら, 2016)。また、細胞遊走法として様々な細胞成長因子を用いる方法も開発されているが、十分な量の歯髄再生にはいたらず、大部分は血管を伴う密な線維性結合組織で、根管全部が石灰化する場合もある (He ら, 2016)。よって、特に根完成歯の歯髄再生には幹細胞が必須と考えられている (Cao ら, 2015)。一方、自家歯髄幹細胞移植においては、智歯等の不用歯が必要であること、細胞加工物の安全性確認が高額であること、必要な時にすぐ細胞加工物を供給できないことなどの欠点がある。したがって、幹細胞を用いることなく歯髄を再生させる技術の開発が望まれる。その中で、中高齢のイヌでは通法では歯髄再生が遅延するが、根管内をトリプシンにて前処理し歯髄幹細胞を移植すると歯髄再生が促進された(第147回)。また、歯髄幹細胞とともに CCR3 拮抗剤を注入することによっても中高齢歯の歯髄再生が促進された(第148回)。さらに、このトリプシン前処理や CCR3 拮抗剤の歯髄再生促進作用は、根管内への在来の幹細胞の遊走促進、血管誘導・神経突起伸長促進によることが示唆された。そこで今回、若齢のイヌにおいて、トリプシン前処理と CCR3 拮抗剤の注入を併用することにより歯髄幹細胞を移植しなくても歯髄が再生できるかを検討した。

【方法】全身麻酔を施した後、若齢イヌ上下顎前歯部に抜髄処置を行い、根尖部まで拡大し、洗浄後仮封した。1週間後、根管内を3%EDTA (スマアクリン) で2分間洗浄後、トリプシンを10分間根管内に作用させ、生理食塩水で洗浄した。その後、CCR3 拮抗剤 (SB328437, TOCRIS bioscience)、G-CSF およびアテロコラーゲンの混合物 (非細胞性根管充填材) を根管内に注入した。コントロールとしてトリプシン前処理は行わず、通法の幹細胞移植治療法で用いていた細胞性根管充填材 (歯髄幹細胞と G-CSF をアテロコラーゲンに混合したもの) を移植した。移植28日後に抜歯し、H-E染色後形態観察を行った。血管新生は BS-1 lectin、神経突起伸長は PGP9.5 にて免疫染色し比較検討を行った。さらに歯髄及び象牙芽細胞分化を確認するため、歯髄マーカー TRH-DE の免疫染色および象牙芽細胞マーカー *enamelysin* の *in situ hybridization* を行った。なお、本研究は、国立長寿医療研究センター動物実験倫理委員会の承認(動30-19)を得て実施された。

【結果】トリプシン前処理後、CCR3 拮抗剤含有の非細胞性根管充填材を若齢イヌの抜髄後の根管内に注入すると、28日後、炎症性細胞浸潤や内部吸収はみられず、細胞性根管充填材の注入の場合と同様に、血管と神経に富む疎性結合組織の歯髄様組織の再生がみられた。また両者とも *enamelysin* を発現する象牙芽細胞様細胞が象牙質側壁に付着して象牙質を形成していた。歯髄再生量に統計学的有意差はみられず、また、再生組織の一部の細胞に TRH-DE 陽性細胞がみられたことから、再生歯髄組織の量的、質的差はないことが示された。

【結論】若齢歯において、非細胞根管充填材による歯髄再生治療法の有用性が示唆された。

The Effect of CCR3 antagonist for enhanced pulp regeneration in aged teeth

○¹Mohammed Zayed, ¹Koichiro Iohara, ^{2,3}Misako Nakashima

1. National Center for Geriatrics and Gerontology
2. Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology
3. Air Water Inc. Group, Aeras Bio Inc.

Objective: Our previous investigation demonstrated that transplantation of mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) in pulpectomized teeth induced smaller amount of regenerated pulp tissue in aged dogs compared to young dogs (The 140th JSCD). This decline may be in part due to chronic inflammation. Eotaxin (CCL11), is a biological marker of pulp inflammation (Abd-Elmeguid et al, 2013) with highest binding affinity to CCR3. CCR3 antagonist (CCR3A) is a small molecule that inhibit CCL11 binds to CCR3. CCR3A with MDPSCs promoted pulp regeneration in aged dog teeth as a regenerating stimulating factor (148th JSCD). Thus, this study aimed to underline the mechanism of CCR3A for enhanced pulp regeneration in aged teeth.

Methods: Optimized concentration of *p*-Cresol to induce cellular senescence of human periodontal ligament cells (hPDLCs) was examined by cell size, proliferation and senescence marker expression. The rescue effect of CCR3A on cellular senescence was evaluated. Furthermore, chemokine ligands and anti-inflammatory markers in the senescent hPDLCs were identified by real-time PCR and Western blotting analysis. Chemotaxis effect and neurite outgrowth activity were further examined. All animal procedures were approved by the Animal Care and Use Committee of the National Center for Geriatrics and Gerontology (動物 30-19).

Results: After *p*-Cresol exposure (500 μ M for 72 hrs.), hPDLCs senescence was induced, as indicated by increased cell size, declined proliferation and increased expression of senescence markers, IL-1 β and IL-8. Pretreatment of senescent hPDLCs with CCR3A significantly reversed the cellular senescence. Also, CCR3A influenced the senescent hPDLCs to significantly decrease chemokine ligand markers, CCL11 and CCL5 and increase anti-inflammatory markers, IDO and PTGE. Migration ability and neurite outgrowth were increased by CCR3A, suggesting rejuvenating effect of CCR3A.

Conclusion: This study demonstrated that CCR3A protects against cellular senescence and regulates chronic inflammation in hPDLCs, suggesting its potential utility to stimulate pulp regeneration in the aged teeth.

炭酸リチウムの根尖病変の治癒促進効果についての解析

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)

○鍵岡琢実、伊藤祥作、成瀬陽菜、伊藤勇紀、林美加子

Analyses of Li_2CO_3 effect on healing of periapical lesions

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

○KAGIOKA Takumi, ITOH Shousaku, NARUSE Haruna, ITO Yuki, HAYASHI Mikako

【目的】

根尖性歯周炎は根管内から細菌などの外来性因子が侵入することにより引き起こされる。このとき、根尖孔外では免疫応答が惹起され、それに伴い骨吸収が生じることで根尖病変が形成される。現行の感染根管治療に用いられる根管貼薬剤は、根管内の感染源除去を主たる目的としている。しかし我々は以前より、宿主側をターゲットとした免疫応答および骨代謝を賦活化するバイオアクティブな根管貼薬剤の開発に着手しており、リチウムイオンがそれに有効であることを報告してきた。リチウムイオンは Wnt シグナル伝達経路の活性化を介して骨組織の再生を促進することが報告されており、我々の先行研究においても塩化リチウムの根管貼薬がマウス根尖病変の治癒を促す作用を持つことが確認された (第 148 回日本歯科保存学会にて報告)。今回、我々は、将来的なヒトへの応用を見据え、双極性障害の治療薬としてすでに利用されている炭酸リチウムを根管貼薬剤として用い、根尖性歯周炎に対してどのような影響をもたらすかを解析したところ、新しい知見が得られたので報告する。

【材料と方法】

実験 1: 炭酸リチウム根管貼薬が根尖性歯周炎へ及ぼす影響についての *in vivo* 解析

10 週齢雄性 Wistar 系ラットの下顎第一臼歯を全身麻酔下で 1/2 ラウンドバーにて露髄後、#10 K ファイルを用いて近心根根尖を破壊した。露髄 4 週後、#20 K ファイルを用いて根管拡大を行い、近心根に貼薬剤を貼薬後、コンポジットレジンにて仮封を行った。用いた根管貼薬剤により、1% 炭酸リチウム貼薬群、12% 炭酸リチウム貼薬群、24% 水酸化カルシウム貼薬群および陰性対照として炭酸リチウムを含まない基材のみ貼薬したブランク群を作成し、以上 4 群を比較した。処置当日および根管貼薬 7 日、14 日、21 日、28 日後のサンプルをマイクロ CT 撮影装置 (理学メカトロニクス、R_mCT2) にて撮影し、画像解析ソフト (RATOC、TRI 3D-BON) を用いて根尖病変体積の 3 次元評価を行った。なお、実験群間の比較は One-way ANOVA および Tukey's test によって有意水準 5% で検定した。

実験 2: H-E 染色による根尖病変部の組織学的評価

炭酸リチウム貼薬群とブランク群の根管貼薬 28 日後の組織サンプルをパラフィン包埋後、薄切切片を作製し、H-E 染色を施したのちに組織学的観察を行った。

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-26-011-0)。

【結果】

12%炭酸リチウム貼薬群は、根管貼薬 14 日目においてブランク群および水酸化カルシウム貼薬群と比較して有意な根尖病変の縮小を認めた。1%炭酸リチウム貼薬群は、根管貼薬 21 日目においてブランク群と比較して有意な根尖病変の縮小を認めた。組織学的評価においても、ブランク群と比較すると、炭酸リチウム貼薬群において根尖病変の縮小が確認された。また、炭酸リチウム貼薬群の根尖病変内への炎症細胞浸潤は、ブランク群と比較して軽度であった。

【結論】

炭酸リチウムの根管貼薬は根尖性歯周炎の治癒を促進し、根尖病変の早期の縮小をもたらす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 (19K21409)、武田科学振興財団研究助成金の補助の下に行われた。

Layer-By-Layer 法による歯根膜細胞の三次元培養

大阪大学歯学研究科 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)

○下村純平、竹立匡秀、沢田啓吾、森本千晶、平井麻絵、
川寄公輔、村田真里、村上伸也

Three-dimensional culture of periodontal ligament cells by Layer-By-Layer technique

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Junpei Shimomura, Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Chiaki Morimoto, Asae Hirai,
Kohsuke Kawasaki, Mari Murata, Shinya Murakami

[目的]

近年、各種疾患の病態解明や創薬・再生医療への応用を目的とし、生体類似の三次元組織を *in vitro* において構築するという試みが注目を集めている。次世代薄膜コーティング技術である Layer-By-Layer 法 (LBL 法) は、細胞外基質を細胞表面にナノオーダーの厚みでコーティングすることで細胞接着を誘起し、生体の立体臓器と同様に高い細胞密度からなる三次元組織体を構築することを可能にした。本研究では LBL 法を用いて歯根膜細胞の三次元組織体を *in vitro* にて構築するとともに、二次元培養と三次元培養における環境の差異が歯根膜細胞の細胞機能に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。また、歯根膜の三次元組織体を長期間維持するために、血管内皮細胞との共培養条件および三次元組織体における血管の管腔形成についても検討を加えた。

[材料及び方法]

ヒト歯根膜細胞 (HPDL) およびヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) は、Lonza 社より購入し実験に供した。LBL 法による三次元培養は、HPDL を fibronectin 溶液と gelatin 溶液に交互浸漬した後、トランズウェルのインサート内に播種し 10%FBS 含有 α -MEM 培地にて培養した。得られた三次元歯根膜組織体は、パラフィン切片を作成して HE 染色することにより組織学的に解析した。一方で、三次元歯根膜組織体と単層培養した HPDL における遺伝子発現をそれぞれ real-time PCR 法にて解析した。また、HPDL を fibronectin 溶液と gelatin 溶液に交互浸漬した後、HUVEC を混合し播種することにより血管内皮を含有した歯根膜三次元組織体を構築した。同組織体についても HE 染色による組織学的解析を行うとともに、抗 CD31 抗体による whole mount 免疫組織染色を行い、三次元組織体における血管の管腔形成について共焦点顕微鏡を用いて観察した。

[結果]

LBL 法にて HPDL を播種後 1 日目の組織学的解析により、密に積層された三次元組織体が構築されることが確認され、同組織体は培養 3 日目までその厚みを維持することが明らかとなった。Real-time PCR による遺伝子発現解析の結果、LBL 法で三次元培養した HPDL は、単層培養した HPDL と比較して *PLAP-1*, *POSTN*, *BGN* の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。また、LBL 法で処理した HPDL に HUVEC を混合し三次元培養することにより培養 6 日目も組織体の厚みが保たれ、免疫組織染色の結果から培養 3 日目、8 日目に同組織体の中に管腔形成が観察された。

[考察]

本研究結果より、LBL 法により HPDL からなる三次元的組織体を *in vitro* にて構築可能であることが明らかとなった。また、三次元的な培養環境が歯根膜細胞の遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆された。今後は、LBL 法による歯根膜三次元組織体における三次元的な細胞間シグナルの詳細について解析するとともに、同組織体を歯根膜組織の恒常性維持に関わる分子メカニズム解明や歯周組織再生薬の創薬スクリーニングへの応用の可能性について検討を行う予定である。

未分化骨芽細胞と3次元ポリ乳酸複合体を用いた歯槽骨再生医療の開発

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

○八幡祥生、鈴木重人、Mary M. Njuguna, Suresh V. Venkataiah, 半田慶介、齋藤正寛

Development of novel bone regeneration therapy using alveolar immature osteoblastic cells-three dimensional polylactic acid complex.

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

○Yoshio YAHATA, Shigeto SUZUKI, Mary M. NJUGUNA, Suresh V. VENKATAIAH, Keisuke HANDA, Masahiro SAITO

【目的】

広範囲に渡る水平性の歯槽骨欠損の再生は咀嚼機能回復が困難であり、現行の骨電動能力を有する移植剤のみでは対応できない。水平性骨欠損に適応可能な再生医療技術を実用化するためには、3次元培養可能な足場と骨誘導能を有する細胞を用いて、立体的な骨組織再生を可能にする骨再生療法の実現が必要となる。これまで我々はこれまでに、段階的酵素消化法とヒト間葉系細胞専用培地を用いることで、中高年齢層の歯槽骨から骨再生に有用なヒト歯槽骨由来骨芽細胞様細胞 (Human alveolar bone derived immature osteoblast: HAOB) の分離培養が可能であることを報告してきた。

本研究では、新規骨再生医療等技術の臨床応用を視野に、骨再生に有用な生分解材料としてポリ乳酸とゼラチン複合体 (3-dimensional polylactic acid: 3DPLA) を用いて足場材料を開発し、HAOB の3次元培養を試みた。また3DPLA上でHAOBを骨芽細胞および骨細胞へ分化誘導する条件として、Sonic hedgehog antagonist (以下SAG) およびヘリオキサンチン類似体 (以下TH) を添加した分化誘導培地の検討を行った。

【方法】

1. HAOB-3DPLA 複合体の作製: 東北大学の倫理委員会で承認(2018-3-024)を得た実験計画に基づき、インフォームドコンセントを得られた40歳以上ドナーより5mm²の歯槽骨を採取し、細菌性コラゲナーゼを用いて連続的に消化を行い、MFstart 培地 (TOYOBO) を用いて HAOB を分離培養後に、3DPLA へ播種し HAOB-3DPLA 複合体を作製した。

2. 3DPLA の開発: ポリ乳酸とゼラチンを配合した溶液を用いてエレクトロンスピニング法による紡糸技術で綿状構造物を作製した。次に HAOB 分化に適した 3DPLA を検討するため強度の異なる 5 種類 3DPLA を用意し、HAOB の細胞増殖、石灰化能力およびアルカリフォスファターゼ活性で適切な足場を選択した。

3. HAOB-3DPLA 複合体の分化誘導条件の検討: HAOB の播種後、MF 培地 (TOYOBO) で培養後、骨芽細胞への分化誘導条件を検討するため、SAG 添加 ODM 培地 (以下 SAG 添加)、TH 添加 ODM 培地 (以下 TH 添加)、SAG と TH 添加 ODM 培地 (以下 SAG+TH 添加)、およびコントロールとして rhBMP2 添加 ODM 培地 (以下 BMP2 添加) の 4 群を用い、14 日間および 21 日間培養を行った。

4. 骨細胞、骨芽細胞分化の検討: 骨芽細胞への分化誘導の判定として、リアルタイム PCR 法で骨形成関連遺伝子 (Runx2, Osterix, Bone Sialoprotein, Type I Collagen) と骨細胞分化マーカー (RANKL) の発現を解析した。また sonic hedgehog による signal 活性化を検証する目的に Gli-1 の遺伝子発現を解析した。

【結果および考察】

HAOB 分化に適した 3DPLA を選択した結果、機械的強度を有している 3DPLA が HAOB の増殖および分化に適していることが判明した。21 日間培養後においては TH 添加群と SAG+TH 添加群で骨形成関連遺伝子の Type I Collagen および骨細胞分化マーカーの RANKL の発現上昇を認めた。このことから HAOB は 3DPLA 上で長期培養することでコントロールと比較して骨細胞に分化誘導が可能であることが示された。さらに TH 添加群と SAG+TH 添加群では Gli-1 の発現上昇が確認された。以上から SAG と TH を添加した ODM 培地を用いることで、ソニックヘッジホッグ経路の活性化が HAOB-3DPLA 複合体が骨芽細胞から骨細胞まで分化誘導を示し、新規の骨移植用細胞材として効果を示す可能性が示された。

【結論】本研究の結果から、骨芽細胞分化に適した 3DPLA を開発し、また 3次元培養にて HAOB を 3DPLA で分化誘導する培地を調整する事ができた。今後、HAOB-3DPLA を用いた再生医療等技術の臨床応用を目指し、培養条件の最適化を行った上で、GMP 基準に準拠した前臨床試験を行う予定である。

ボンディングシステムの違いが根管部位の接着強さに与える影響

岩手医科大学歯学部 歯科保存学講座う蝕治療学分野
○清水峻介, 岡田伸男, 野田 守

Effect of bonding systems on bonding strength of region in root canal
Division of Operative Dentistry and Endodontics, Department of Conservative Dentistry,
School of Dentistry, Iwate Medical University

○Shunsuke Shimizu, Nobuo Okada, Mamoru Noda

【緒言】

一般的に、根管充填後は支台築造を行い、補綴装置が作製される。近年、直接法レジン支台築造が多く用いられる。本法でのボンディングシステムは、光重合型、化学重合型やデュアルキュア型が使用されている。しかしながら、重合様式と根管内象牙質の接着部位の違いが接着強さに与える影響は不明な点が多い。本研究では、異なるボンディングシステムと、根管象牙質の接着部位の違いの接着強さへの影響を押し出し試験により評価、検討を行った。

【材料と方法】

ウシ下顎前歯の歯根に歯軸と平行に直径 3mm、深さ 14mm の支台築造窩洞形成を行った。窩洞を 18%EDTA、3% NaOCl、蒸留水で十分に洗浄し、水中に 5 日間 37°C で留置した。その後、根管を十分に乾燥し、各ボンディングシステムを、各社指示に従い象牙質面に作用させ、支台築造用レジンを充填し光照射によりレジンを重合硬化させた。ボンディングシステムとして、光重合型 (Light: G プレミオボンド, GC, スコッチボンド™ユニバーサルアドヒーズィブ, 3M), 化学重合型 (Chemical: クリアフィルニューボンド, クラレ, ボンドマーライトレス, トクヤマデンタル) およびデュアルキュア型 (Dual: ビューティーデュアルボンド EX, 松風, i-TFC ルミナスボンド, サンメディカル) を用いた。支台築造後、試料を水中に 7 日間 37°C で留置した。その後、歯軸に対して垂直に、厚みが 1.0mm となるように歯冠側から根尖側へと連続的に切断した。得られた円盤状試料のレジン部位の押し出し試験を行い、最大荷重から接着強さを算出した (万能材料試験機 EZ-LX: Shimadzu, クロスヘッドスピード 0.5mm/min)。根管上部から 1/3 ずつ、歯冠側を C 群, 中央部を M 群, 根尖側を A 群とした。得られたデータを二元配置分散分析 (因子: ボンディングシステム (BS) と接着部位 (Region)) および Tukey の多重比較により検定した ($\alpha=0.05$)。

【結果】

接着強さの結果を右図に示す。分散分析では、BS と Region の因子間に交互作用はなく ($P>0.05$)、BS 因子内でのみ有意差を認められた ($P<0.05$)。C 群では、Light に対して Chemical が有意に大きい値を示した。M 群では、Light に対して Chemical および Dual が大きい値を示した。A 群では、Light に対して Chemical および Dual が大きい値を示した。

【考察】

本研究では Chemical, Dual と比較して、Light が M 群, A 群で接着力が有意に小さい値であったことから、光照射の影響が考えられた。光重合型 (Light) のボンディング材の場合、光照射距離が重合の均一性や重合率に影響することが知られている。しかしながら、根管内の象牙質接着力は、接着材料の浸透性や粘性、溶媒の揮発性、築造材料の弾性、根管窩洞径や試験方法など多因子により影響を受けることからさらに分析が必要であると思われた。

【結論】

光重合型ボンディングシステムでは、根管中央部から深部の照射光が十分届きにくい部位で、他のシステムと比較し重合が不均一あるいは低重合率により象牙質接着力低下の一因となる可能性が示唆された。

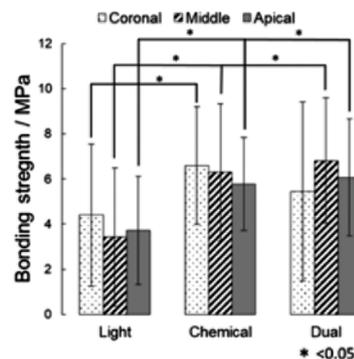


Fig. Bonding strength of resin composite on parts of bovine root dentin.

築造用コンポジットレジンに対するファイバーポスト光透過性の影響
および築造用コンポジットレジンと根管用シーラーの界面の解析

九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野

○三浦弘喜, 吉居慎二, 藤元政考, 鷺尾絢子, 北村知昭

**Analyses of Light Transmission Effect of Fiber Posts on Composite Resins for Constructing Tooth
Foundation and the Interface between Root Canal Sealer and Composite Resin**

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

○MIURA Hiroki, YOSHII Shinji, FUJIMOTO Masataka, WASHIO Ayako KITAMURA Chiaki

【目的】近年、ファイバーポストと築造用コンポジットレジン（築造用レジン）による支台築造システムが多用されているが、根管内における築造用レジンの重合状態は十分に解明されていない。一方、根管充填では様々な根管充填用シーラー（根管用シーラー）が使用されるが、築造用レジンと根管用シーラーの界面についても不明である。今回、築造用レジンの根管内における重合状態を明らかにするため、各種ファイバーポストの光透過性と築造用レジンの重合状態の関係を分析した。加えて、築造用レジンと根管用シーラーの界面の状態を観察した。

【材料と方法】<築造用レジンの重合状態解析>ファイバーポストは i-TFC ルミナスファイバー (Sun Medical), GC ファイバーポスト (GC) ビューティーコアファイバーポスト (松風) の計 3 種類を、築造用レジンに光重合型の i-TFC ルミナスコア LC フロー (Sun Medical), デュアルキュア型の GC ユニフィルコア EM (GC) とビューティーコアフローペースト (松風) の計 3 種類を用いた。ファイバーポストの光透過性は各ファイバーポスト歯冠側直上から照射器 (Radii Plus、SDI) にて照射を行いファイバーポスト根尖側先端の光透過量 (単位: counts) をマルチチャンネル分光器 (FLAME-S-XR1-ES, Ocean Optics) を用いて測定した。築造用レジンの重合状態は規格根管ポスト窩洞モデルとして作製したテフロン製半円柱状モールド (直径 3 mm・深さ 15mm) を用いて分析した。直径 1.0 mm テーパー型の各種ファイバーポストを長さ 17 mm になるよう調整した。モールド内に築造用レジンを入り後にファイバーポストをモールド中央に 15 mm 挿入して照射 (20 秒間) し、37℃ 湿度 100% の状態で 10 分間保留した後に重量を測定した。その後、アセトンに 30 秒浸漬し未重合層を除去・水洗乾燥して再度重量を測定し未重合層除去前後の重量変化率を測定した。得られた結果は一元配置分散分析により統計処理を行った ($P < 0.05$)。<根管用シーラーとの界面の観察>根管用シーラーは Bioactive glass (BG) を配合したニシカキャナルシーラー-BG (CS-BG, 日本歯科薬品) を使用した。ディスク状のモールド内で硬化した CS-BG の上にルミナスコア LC フローを填入・重合後、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて界面の状態を観察した。

【結果】各ファイバーポスト根尖側先端の光透過量は、i-TFC ルミナスファイバーが 62164 counts, GC ファイバーポストが 36000 counts, ビューティーコアファイバーポストが 47140 counts であった。各試料の重量変化率は、i-TFC が 97.8% (2.2%減少), ユニフィルコア EM が 96.0% (4.0%減少), ビューティーコアが 96.1% (3.9%減少) であり、i-TFC は他の 2 つに比べ有意に高かった。また、i-TFC ルミナスコア LC フローと CS-BG との界面では CS-BG へのボンディング剤の浸透が確認された。

【考察】今回、ファイバーポスト根尖側先端の光透過量は光ファイバを内包したファイバーポストが最も高いこと、光透過性の高いファイバーポストと組み合わせた光重合型コンポジットレジンが規格根管ポスト窩洞内で最も重合していること、BG 配合根管用シーラーと光重合型コンポジットレジンが接着することが示された。以上の結果は、ファイバーポスト、築造用レジン、および根管用シーラーが示す性質が根管封鎖性に影響し、光重合型コンポジットレジンと光透過性の高いファイバーポストを組み合わせた支台築造システムと Bioactive glass 配合根管用シーラーの併用は根管内の高い封鎖性を獲得する上で有用であることを示唆している。

【結論】ファイバーポストの光透過性は築造用コンポジットレジンに重合に影響を与える。また、光重合型の築造用コンポジットレジンに Bioactive glass 配合根管用シーラーと接着する。

新規熱処理合金製 NiTi ロータリーファイルの機械的特性に対する熱処理の効果

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
○中務太郎, 海老原新, 牧圭一郎, 木村俊介, 西条美紀, 興地隆史

Effect of heat treatment on the mechanical properties of a newly developed heat-treated NiTi rotary instrument

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

○NAKATSUKASA Taro, EBIHARA Arata, MAKI Keiichiro, KIMURA Shunsuke,
NISHIJO Miki, OKIJI Takashi

【目的】近年、熱処理加工を加えたニッケルチタンロータリーファイル (以下「NiTi ファイル」) では回転疲労耐性や柔軟性が向上していることが報告されている (Zupanc *et al.*, IEJ. 2018). 本研究では、独自の熱処理加工が施された新規試作 NiTi ファイル (マニー) について、その回転疲労耐性、曲げ特性に対する熱処理加工の効果の検証を目的として、同一形状で熱処理加工されていない NiTi ファイル、および熱処理加工された他種 NiTi ファイルとの比較検討を行った。

【材料および方法】1. 被験ファイル: 新規試作 NiTi ファイル (#25, 0.06 taper; 25 mm; 以下 MN), 熱処置加工されていない同一形状の NiTi ファイル (#25, 0.06 taper; 25 mm; 以下 nMN), HyFlex EDM® (#25, 0.08~0.04 taper; 25 mm; Coltene, Switzerland; 以下 HEDM), ProTaper NEXT® X2 (#25, 0.06~0.07 taper; 25 mm; Dentsply Sirona; 以下 PTN) の4種の NiTi ファイルを用いた。

2. 動的回転疲労試験: 自作型回転疲労試験機およびX-Smart Plus (Dentsply Sirona) を使用した (各群n = 10). 回転数はMN, nMNは500 rpm, HEDMは400 rpm, PTNは300 rpmとした。試験用の人工根管としてステンレス鋼製のメタルブロックを使用し (Plotino *et al.*, OOOOE. 2009), Schneider法 (Schneider, Oral Surg. 1971) を参考に曲率半径3 mm, 曲率角度60° に設定した。モーターを毎分300 mmで2 mm上下動させながらファイルを回転させ、破折までの時間を計測したのち、NCF (number of cyclic to failure) を、回転数 (rpm) ×破折までの時間 (秒) として算出した。

3. 曲げ試験: 自作型片持ち梁式抗曲試験機を使用し、曲げ試験を行った (各群n = 10). ファイル先端から7 mmの位置を支点とし、2 mmの位置に荷重をかけ、変位量0.5 mmおよび2.0 mmにおける荷重を計測し、それぞれ弾性領域および超弾性領域の代表点とした。

4. 統計学的解析: 動的回転疲労試験で得られたNCF値をKruskal-Wallis検定およびDunn検定、曲げ試験の計測値を、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】動的回転疲労試験では、MNにおけるNCFはnMNと比較して有意に大きかったが ($p < 0.05$), HEDM, PTNとは有意差を認めなかった ($p > 0.05$). 曲げ試験では、変位量0.5 mmにおいては、MN, nMNの荷重値に有意差は認められず ($p > 0.05$), とともにPTN, HEDMと比較して有意に大きい値であった ($p < 0.05$). 一方、HEDMの荷重値は他の3群と比較し有意に小さい値となった ($p < 0.05$). 変位量2.0 mmにおいて、MNとHEDMの荷重値はnMN, PTNと比較して有意に小さい値となったが ($p < 0.05$), nMN, PTNの間に有意差を認めなかった ($p > 0.05$).

【考察】回転疲労試験の結果より、MNのNCFはHEDMおよびPTNと同等でnMNと比較して有意に高値を示したことから、熱処理によりMNが優れた回転疲労耐性を獲得したものと思われた。曲げ試験から、MNは超弾性領域でHEDMと同等の高い柔軟性を示すことが確認されるとともに、この性質が熱処理の結果得られたことが示唆された。

【結論】新規試作 NiTi ファイルにおける熱処理加工は、回転疲労耐性および超弾性領域における柔軟性の向上に寄与することが示唆された。

根管治療に応用したピストン運動ハンドピースについて

鶴見大学歯学部 歯内療法学講座¹⁾

医療法人社団 松伯会²⁾

○吉田拓正¹⁾、小野 京¹⁾、宮本永浩¹⁾、鈴木計芳²⁾、細矢哲康¹⁾

Application of contra-angle handpiece with piston movement for root canal treatment

Department of Endodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine¹⁾

Medical Corporation SHOHAKUKAI²⁾

○YOSHIDA Takumasa¹⁾, ONO Miyako¹⁾, MIYAMOTO Nagahiro¹⁾, SUZUKI Kazuyoshi²⁾,

HOSOYA Noriyasu¹⁾

【目的】

根管治療の重要なステップである根管拡大形成は、根管長の測定後、手用あるいは機械的根管切削器具にて行われる。一般に、これらの器具は回転運動により使用されるが、過度な力や過剰な動きによって、狭窄部分や根管壁へ食い込み、器具の破折や歯根の亀裂を招くことがある。

今回、高速で上下運動（ピストン運動）するエンジン用ハンドピースを開発したので、同器材を用いた根管の拡大形成について紹介するとともに、従来の回転運動による拡大形成との相違点について報告する。

【材料と方法】

ピストン運動ハンドピースは、アルミならびに真鍮により構成されており、オートクレーブによる滅菌処理が可能である。通常規格の歯科用ユニットのエンジンに装着が可能であり、ヘッド部のアダプターにより手用あるいは機械式根管切削器具が装着できる。ヘッド部の内筒部分は、高速かつ静音で駆動するように表面加工が施され、エンジンの回転数に伴って上下に高速運動する。根管拡大形成には、振幅幅 1.35 mm、5,000 往復/分のピストン運動が適しており、狭窄あるいは石灰化した根管を穿通できることもある。なお、本ハンドピースは平成 30 年 9 月に薬機法の承認を受けた。

ピストン運動ハンドピースの効果を、以下のような方法で確認した。透明湾曲根管模型（ニッシン）を用いて、3 通りの条件で拡大形成を行い比較した。#15 K ファイル（マニー）にて、根管模型の作業長を決定し、拡大形成中は随時 NaClO にて根管洗浄を行った。

- 1) 手指群：規格形成法にて #25 まで拡大形成を行う。
- 2) ピストン運動ハンドピース使用群：#25 H ファイル（マニー）を装着して拡大形成を行う。
- 3) NiTi ローターファイル使用群：Hyflex EDM（コルテン）にて #25 まで拡大形成を行う。

拡大形成前後に透明根管を規格撮影し、術前後における根管形態の比較ならびに拡大形成方法による形態の比較を行った。また、各群において拡大形成に要する時間を測定した。

【結果】

手指群、ピストン運動群、NiTi ファイル群のすべての方法で、透明湾曲根管模型の作業長までの拡大形成が可能であった。根管拡大形成後の形態は、NiTi ファイル群では根管中心軸の変位がわずかであったが、ピストン運動群、手指群では、湾曲部においてやや変位が認められた。拡大形成に要する時間は、NiTi ファイル群に比べピストン運動群が少なかった。また、ピストン運動群では、拡大形成中の切削片が粉末状となって、根管口側へ排出する様子が確認された。

【結論】

ピストン運動ハンドピースを用いた根管の拡大形成は、従来の手指による回転運動と比較して劣る点はなく、さらに、切削器具の食い込みと回転運動に由来した根管内での器具破折がない。手指に比べて効率的で、安全な拡大形成が可能なることから臨床応用の可能性が示唆された。

今後、硬組織ならびに歯周組織への影響について調査する予定である。

新規熱処理合金製 Ni-Ti ロータリーファイルにおける切削特性解析

福岡歯科大学口腔治療学講座 歯科保存学分野

○松本和磨, 松崎英津子, 松雪 稜, 水上正彦, 畠山純子, 松本典祥, 泉 利雄, 阿南 壽

Shaping ability and curved canal transportation of a newly developed heat-treated instrument
Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College

○Kazuma Matsumoto, Etsuko Matsuzaki, Ryo Matsuyuki, Masahiko Minakami,
Junko Hatakeyama, Noriyoshi Matsumoto, Toshio Izumi, Hisashi Anan

【目的】

ニッケルチタン合金製ロータリーファイル (以下 Ni-Ti ファイル) は、弾性係数が小さいことから根管追従性が高く、彎曲根管に沿った拡大形成が可能である。一方、彎曲根管の形成においては、根尖部での根管偏位、ステップ形成、ジップ形成や側方穿孔が発生しやすいことが報告されている。近年、様々な熱処理加工を施すことにより、さらに高い破折抵抗性と柔軟性を有する Ni-Ti ファイルが開発されている。本研究では、ラジアルランドを有する変則長方形断面デザインの新規試作 Ni-Ti ファイルを用いて、その切削特性として根管偏位量に着目し、既存 Ni-Ti ファイルとの比較検討を行うこととした。

【材料および方法】

実験には、3種の Ni-Ti ファイル (21 mm) : 試作 Ni-Ti ファイル (以下 MN) ; MN-. #25/0.04, #25/0.06, Protaper Next (Dentsply Sirona ; 以下 PTN) ; PTN-#17/0.04~0.075, #25/0.06~0.07, Hyflex CM 群 (Coltene ; 以下 HCM) ; HCM-#15/0.04, #25/0.06 を使用した。根管形成には、J 字型エポキシレジン製透明根管模型 (Dentsply Sirona ; 彎曲度 30 度、根尖孔径 #10、根管テーパー 0.02、根管長 17.0 mm) を使用した (各群 n=9)。ステンレススチール製手用 K ファイル (マニー ; 以下 SSK) #10 で根管の穿通を行い、作業長を 17.0 mm とし SSK-#20 までグライドパスを形成した後、被験ファイルによる根管拡大形成を行った。トルクコントロールエンジンには、MN 群ではトライオート ZX2 (モリタ製作所)、PTN 群と HCM 群では X-Smart Plus (Dentsply Sirona) を使い、オートリバース設定下で使用した。形成中にオートリバース機能が働くか、術者が停止しそうであると判断した時には引き抜くこととし、連続回転しながら 1 回の挿入による切削域が 3 mm を超えないよう軽圧で 3 回挿入する設定で形成した。回転数およびトルクは製造者推奨に従い、それぞれ MN: 300rpm/3N, PTN: 300rpm/2N, HCM: 500rpm/2.4N とした。形成中は根管内に蒸留水で満たし、適宜シリンジを用いて蒸留水で根管洗浄および SSK-#10 による穿通確認を行った。

形成前後の根管模型は実体顕微鏡 (OPMI pico: Carl Zeiss Meditec) で撮影し、画像解析ソフト (Photoshop7.0: Adobe Systems、Image J: NIH) を用いて 1 対 1 の重ね合わせにより解析した。根管長軸方向に平行に根尖孔から 1, 2, 3, 4, 5 mm の位置で根管に垂線を引き、内彎側と外彎側における形成前の根管壁から形成後の根管壁までの距離を測定してそれぞれの根管幅径増加量とした。One-way ANOVA および Tukey 法を用いて有意水準 5% で統計解析を行った。

【結果】

根尖孔から 1, 2, 3 mm の位置での内彎側において、MN が他の 2 種と比較して根管偏位量が少ない傾向にあったが、有意差は認めなかった。全てのファイルにおいて、根尖孔から 1, 2 mm の位置での外彎側において根管偏位量が大きい傾向にあった。

【考察】

本実験条件下では、今回使用した 3 種のファイルにおいて、内彎側および外彎側の根管偏位量に有意差は認められなかったが、新規試作ファイルでは根尖部で内彎側の根管追従性に優れた傾向を示した。一方、全てのファイルにおいて根尖孔から 1, 2 mm の位置での外彎側で根管偏位量が大きい傾向にあったことから、この点においては術者の手技が影響した可能性も考えられる。また、実験に使用した根管模型は規格化されたものではなく、製品間でずれ、ねじれ等を認めたことから、模型ごとに切削応力の分布が異なる可能性も考えられた。

【研究協力者】 福岡歯科大学歯科医療工学講座 生体工学分野 丸田道人 准教授

歯髄治癒過程におけるマクロファージ・再生神経のクロストークの解明

神奈川県立歯科大学大学院歯学研究所口腔総合医療学講座歯髄生物学分野

○武藤徳子、許多、石井信之

Elucidation of crosstalk between macrophage and regenerative nerve in the process of dental pulp healing

Department of Oral Interdisciplinary Medicine, Division of Pulp Biology,
Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University

○Noriko MUTOH, Kyo TA, Nobuyuki TANI-ISHII

研究目的 歯の損傷後の歯髄修復機構において、歯髄には前駆細胞と歯髄幹細胞が存在し、損傷の程度によって異なる修復機構が働き、象牙質形成と骨組織形成が惹起されると考える。マクロファージには M1 (炎症性) と M2 (抗炎症性) の二つの表現型(極性)があり、創傷治癒過程において、それぞれが炎症の惹起と消退に関わる。本研究は、直接覆髄処置後の歯髄修復過程におけるマクロファージの活性化、歯髄幹細胞/前駆細胞の分化能促進への影響と M1/M2 マクロファージの動態、神経再生の過程を明らかにすることを目的とした。

材料および方法 6週齢 ICR 系マウス(♂)の上顎臼歯咬合面に窩洞を形成し、露髄後 24 時間口腔内環境に露出させ、歯髄感染モデルを作成した。窩洞内の残渣を除去・洗浄後、MTA、水酸化カルシウム製剤をそれぞれ露髄面に充填し、グラスアイオノマーセメントにて仮封した。術後 1、2 週間後に深麻酔下にて還流固定した。試料は、パラフィン切片を作成し、HE 染色にて継時的な細胞動態を、さらに象牙芽細胞分化マーカー(nestin)、M1,2MΦ マーカー(ED1,2)、神経線維マーカー(PGP9.5)およびオステオポンチン(OPN)にて硬組織形成状態を解析した。歯髄感染後覆髄をせず、グラスアイオノマーセメントで仮封したものを対照群とした(動物実験承認番号:316-6)。

成績 水酸化カルシウム製剤群、対照群は、歯髄の炎症は持続傾向であったが、MTA 覆髄時の感染歯髄は消炎傾向を示し、さらに硬組織形成傾向が認められた。MTA 群は PGP9.5 は術後 1 週間後は、歯根全体に陽性所見が認められるが、術後 2 週間後は髓床底部付近に陽性所見が認められた。水酸化カルシウム製剤群は、術後 2 週後に ED1,2 が強く染色され、PGP9.5 の陽性所見は根尖付近にわずかに認められた。対照群は、歯冠部に ED1 の陽性所見が強く、PGP9.5 は根尖部から歯根中央部にかけて陽性所見が認められたが、術後 2 週間後では、ED1 の陽性所見が歯根の歯冠側から歯根中央部にかけて陽性所見が認められ、PGP9.5 は歯冠側に局限されていた。MTA 群においては歯髄の治癒が認められ、水酸化カルシウム製剤群、対照群では歯髄治癒遅延傾向が認められた。

考察 MTA を用いて直接覆髄を行うことで、可逆性の炎症性環境は、pH の変化を誘導することで、炎症改善と硬組織形成の促進の両方が期待出来ると考えられる。神経線維の局在と、歯髄組織の治癒過程が同部位に関連して認められた。水酸化カルシウム製剤は、溶出した構成成分が高 pH であり周囲の細胞に影響を与え、細胞数が減少するものの、細胞に影響を与えるもののその細胞への作用は一時的であると考えられるが、術後 1、2 週間という期間では、その影響を考慮せざるを得ない可能性が示唆された。

結論 再生神経の発生と歯髄治癒には、相関が認められた。MTA 及び水酸化カルシウム製剤は、感染を伴う直接覆髄に用いる生体機能性材料として有用であることが示唆された。今後、歯髄感染をコントロールすることによりマクロファージの動態の変化と末梢神経の再生の関係が解明できることが期待できると考えられた。

生物学的覆髄材料の臨床的評価を目指したラット覆髄モデルの開発

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)

○岡本 基岐, 高橋 雄介, 黄 海玲, 小道 俊吾, Manahil Ali, 渡邊 昌克, 松本 紗也子, 林 美加子

Development of a rat pulp capping model for clinical evaluation of a biological pulp capping agent

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

○OKAMOTO Motoki, TAKAHASHI Yusuke, HUANG Hailing, KOMICHI Shungo, ALI Manahil, WATANABE Masakatu, MATSUMOTO Sayako, HAYASHI Mikako

【研究目的】

ラットを用いた直接覆髄モデルは広く普及している実験手法であるが、過去の報告のほとんどにおいて窩洞や露髄部の大きさと歯髄創傷治癒の関連についての言及は認められない。そこで我々はラバーダム防湿下で露髄を伴う窩洞形成および直接覆髄を実施後、マイクロCTを撮影し、露髄径を規格化することで侵襲の大きさを統一した上で、覆髄材料により誘導された第三象牙質を定量的に解析する方法を確立した¹⁾。一方、我々のこれまでの研究を含め、ほとんどの直接覆髄モデルでは、健全な歯に対して窩洞形成を行い、人為的な露髄を惹起後に直接覆髄を実施しているため、実際の臨床で遭遇するう蝕除去後の露髄を想定しているとは考えにくい。よって、細菌感染があり炎症が生じている歯髄組織に対して実施される直接覆髄モデルの確立が必須であると考えた。

そこで本研究では、う蝕原細菌である *Streptococcus mutans* および高スクロース飼料を用いて、う蝕により炎症を惹起された歯髄に対して直接覆髄実験を行い、覆髄後に形成される第三象牙質および歯髄の炎症状態を評価することを目的とした。

【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 29-028-0)。2週齢雄性SDラットに抗菌剤含有の飼料 (テトラサイクリン, 4g/kg, 富士フィルム和光純薬) と水 (ペニシリン, 1 ampoule/L, Meiji Seika ファルマ) を7日間投与した後、本抗菌剤耐性をもつ *S. mutans* MT8148 を3日間経口接種した。菌が口腔内に定着していることを確認したのちに、高スクロース飼料 (Diet 2000, オリエンタル酵母) およびスクロース含有水を摂取させることでう蝕を誘発させた。う蝕の進行をマイクロCT (mR_CT2, RIGAKU) にて確認後、病理組織学的手法を用いて細菌侵入および歯髄組織の評価を行った。

う蝕が誘発された歯に露髄を伴う窩洞形成を行った後、ProRoot MTA (Dentsply Sirona) にて直接覆髄を行い、グラスアイオノマーセメント (FUJI IX, GC) にて仮封を行った。4週間経過後、灌流固定したのちにマイクロCTにて形成された第三象牙質の体積を計測し、同試料を用いて病理組織学的评价を行った。コントロールには健全歯に直接覆髄を行ったものを用いた。

【結果】

細菌接種後3週目よりマイクロCTにてう蝕の形成が観察された。う蝕の進行に左右差はなかったが、下顎臼歯は上顎臼歯と比較してう蝕の進行が早いことが明らかとなった。また、病理組織学的な検討より窩底部の象牙細管内には細菌侵入が認められ、その象牙細管の直下に反応象牙質の形成が観察された。また、細菌接種5週後の歯髄組織にはリンパ球浸潤などの炎症細胞浸潤が限局的に確認された。

また、う窩を形成したラットの上顎第一臼歯に直接覆髄実験を行ったところ、健全歯に直接覆髄を行った場合と類似した第三象牙質の形成を認めた。覆髄後の歯髄の炎症状態は軽減傾向を示したが、第三象牙質の形成後も残存を認める試料も認められた。

【考察および結論】

本研究結果より、より臨床的な第三象牙質形成メカニズム解明に向けたラット覆髄実験モデルの確立に成功した。今後、う蝕除去後の直接覆髄処置と炎症歯髄との関係を検討するとともに、間接覆髄や断髄モデルの構築も視野に入れて研究を継続し、我々が現在開発中である生物学的覆髄材料の非臨床試験を本モデルを用いて評価をしていく予定である。本実験により確立された実験手法により、さらに臨床的な視点に立脚した詳細な歯髄の創傷治癒メカニズムの解明および覆髄材料へ展開が可能になると考えられる。

本研究は、JSPS 科研費 17K11704, 19K18995, 19K19025 の助成を受けたものである。

【参考文献】

Okamoto M, Takahashi Y *et al.* *Clinical Oral Investigation*, 2018.

生物学的根拠に基づくペプチド覆髄剤の開発

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)

○高橋雄介, 渡邊昌克, 岡本基岐, 小道俊吾, Ali Manahil, 黄海玲, 松本紗也子, 林 美加子

Development of novel biological pulp capping agent containing functional peptide structure

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

○TAKAHASHI Yusuke, WATANABE Masakatsu, OKAMOTO Motoki, KOMICHI Shungo, ALI Manahil,

HUANG Hailing, MATSUMOTO Sayako, HAYASHI Mikako

【研究目的】

われわれは、これまでに生物学的根拠に基づく覆髄剤の開発を目標として様々な研究を展開しており、象牙質基質タンパクの分解産物を用いた研究により、歯髄の創傷治癒を促進するタンパク質を同定することに成功した。しかし組換えタンパク質を覆髄剤として用いるには高価であり、安全性や安定性の面でも問題がある。そこで本研究では、これまでに同定されたタンパク質である Protein S100A7 のアミノ酸配列の中から、歯髄創傷治癒を促進する機能部位を検索し、ペプチド構造を決定することでより安価で安全な覆髄剤の開発を目指すことを目的とした。

【材料と方法】

1. MMP20 処理を施した S100A7 および処理なしの S100A7 を用いた直接覆髄実験

これまでの研究で、MMP20 により分解を受けた象牙質基質が歯髄の創傷治癒を促進することが明らかとなっており、分解象牙質基質中から S100A7 が同定されているが、S100A7 が歯髄創傷治癒を促進するのか、もしくは MMP20 により分解を受けた S100A7 が同効果を持つのかを検証するため、ラットを用いた直接覆髄実験をおこない、形成された第三象牙質体積をマイクロ CT にて定量評価をおこなった (n=3)。なお本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会 (28-014-0) の承認下で実施した。

2. S100A7 の機能部位の検索 (*in silico*)

S100A7 の機能部位は生物進化の過程において保存されている可能性が高いことから、8 種の哺乳類間におけるアミノ酸配列アライメント解析をおこなった。同様に他の S100 ファミリータンパク質とのアミノ酸配列を比較することで機能部位の検索をおこなった。解析にはタンパク質データベース (Uniprot) および配列アライメントプログラム (CLUSTLW) を用いた。

3. 歯髄における標的分子の検索

S100A7 が歯髄のどの分子と相互作用を持ち、結果的に創傷治癒促進を誘導するかを検証するために、Pull-down 法にて歯髄細胞と S100A7 の相互作用について解析をおこない、その結果を SDS-PAGE にて可視化後、質量分析にて標的分子の検索をおこなった。

【結果および考察】

1. MMP20 処理の有無に関わらず、S100A7 を覆髄剤として用いた場合は、同等の第三象牙質形成が観察された ($p>0.05$, Student's *t*-test)。このことから、S100A7 が MMP20 によって分解を受けるのではなく、象牙質基質が MMP20 によって分解された結果、S100A7 が検出された可能性が示唆された。

2. 実施した 2 パターンの配列アライメント解析において、カルシウム結合部位 (EF-hand domain) で共に高い相同性が認められた。このことからこのドメインを含むアミノ酸配列が機能部位である可能性が示された。

3. 質量分析の結果より、Gene Ontology 分類における Cellular Process (GO:0009987) および Biological Regulation (GO:0065007) に関連する分子が見出され、S100A7 の標的分子の一端が明らかとなった。

【結論と展望】

歯髄組織と生物学的な作用を有する覆髄剤の開発という外的因子の検索と同時に、歯髄組織における標的分子の解析という内的因子を同時に検索することで、歯髄の創傷治癒メカニズムを背景とした覆髄剤への展開が期待できるようになりつつある。さらに、ラットう蝕・覆髄モデルの確立にもわれわれは成功しているので、これまでの実験手法よりもさらに臨床的な視点に立脚した Vital Pulp Therapy への道を拓いていくが可能になると考えている。

本研究は、JSPS 科研費 17K11704, 19K18995, 19K19025 の助成を受けたものである。

試作カルシウム含有プライマーシステムが脱灰エナメル質に及ぼす効果の TMR 解析

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¹
 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯冠修復学²
 ○越光 悠介¹, 井上 剛¹, サイド マハムド¹, 二階堂 徹^{1,2}, 田上 順次¹

TMR analysis of the effect of experimental calcium-containing primer system on decalcified enamel

¹Department of Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University(TMDU)
²Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation, Asahi University School of Dentistry

○Yusuke KOSHIMITSU¹, Go INOUE¹, Mahmoud SAYED¹, Toru NIKAIDO^{1,2}, Junji TAGAMI¹

【緒言および研究目的】

コンポジットレジン修復における被着体となる齲蝕罹患歯質の除去において感染エナメル質の除去は明確な指針がないのが現状である。特に隣接面齲蝕などの窩洞形成においては、マージンにおける脱灰エナメル質の取り残しが生じやすく、接着の不備や二次齲蝕の原因となる。落合、井上らは試作カルシウム含有プライマーシステムを用いた接着により、健全象牙質において耐酸性の向上が得られる事を報告した。そこで本実験の目的は試作カルシウム含有プライマーシステムを人工脱灰エナメル質に使用する事で無機質量変化が生じるかどうかを TMR を用いて解析することとした。

【材料および方法】

プライマー2種[Clearfil SE Bond Primer(SEP)、試作 Ca containing Primer(CaP)]とボンディング2種[Clearfil SE Bond(SEB)、Clearfil Protect Bond(PBB)](いずれもクラレノリタケデンタル社)を使用し4群(N=14)①SEP-SEB、②SEP-PBB、③CaP-SEB、④CaP-PBBとした。試料は、ウシ前歯歯冠部を頬舌的に切断し、エナメル小柱に対して垂直方向のエナメル質をネイルバーニッシュにて窓開け(2×2mm)後、37°Cの人工脱灰液(pH5.0)に4日間浸漬したものを被着体とした。4群(上記参照)に分類しそれぞれプライマー、ボンディング塗布後コンポジットレジンを築盛、24時間水中保管した後包埋した。硬化後 Isomet にて薄切し耐水研磨紙を用いて#1600 まで研磨、薄さ0.12mmになるよう全てのサンプルを調整した。サンプルを超音波にて洗浄後 TMR にて各サンプルエナメル質表面観察、無機質量の比較、検討を行った。TMR の条件として対物レンズ4倍、ISO感度400、露出モードはマニュアルに設定し使用した。また、得られた値を[One-way ANOVA ($\alpha=0.05$)]にて統計を行なった。

【結果および考察】

TMR を用いて各サンプルから得られた値をもとに ΔZ を算出し、統計解析を行なった結果を表に示す。(表1)
 エナメル質表面を分析範囲として設定したため、それぞれの脱灰量(ΔZ)を比較することにより小さな値を示した場合には他と比べて無機質量が増加したことになるが、得られた値は小さい順にCaP-PBB、CaP-SEB、SEP-PBB、SEP-SEBでありSEP-SEB群とCaP-PBB群の間にのみ有意差が認められた。フッ素が含有されているClearfil Protect Bond(PBB)を使用することにより、フッ素が試作Ca containing Primer(CaP)内のCaと反応することでフッ化カルシウムが形成され、沈着したことで、無機質量が上昇したと考えられる。また、有意差はなかったもののSEP-SEBと比較してSEP-PBBやCaP-SEBの ΔZ の値が小さい傾向を示したこと、さらにSEP-PBBよりCaP-SEBの ΔZ の値が小さかったことを考えるとフッ素だけでなくCaP単体でも何らかの効果を及ぼす可能性が考えられた。

【結論】

試作カルシウムプライマーを用いた場合、フッ素含有ボンドと組み合わせることで有意に高いミネラル回復が得られる事が分かった。また、試作カルシウム含有プライマー単体でも効果がある可能性が示唆された。

(表1)

	SEP-SEB	SEP-PBB	CaP-SEB	CaP-PBB
ΔZ (%)	*58.85	57.07	54.85	*53.49
	(±3.48)	(±5.43)	(±6.81)	(±6.56)

(n=14)

*significant difference

Deproteinizing treatment がワンステップシステムの酸蝕象牙質モデルの接着耐久性に及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野
 ○塩谷 頼誓、高橋 真広、保坂 啓一、中島 正俊、田上 順次

Effect of Deproteinizing Treatment on Eroded Dentin of a Self-etch Adhesive

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
 ○SHIOYA Yorichika, TAKAHASHI Masahiro, HOSAKA Keiichi, NAKAJIMA Masatoshi, TAGAMI Junji

【研究目的】近年、Tooth wear、特に酸蝕が注目を集めている。MI コンセプトの観点から、酸蝕歯に対する修復治療法として、直接法コンポジットレジン修復がしばしば行われる。これまで演者らは、次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いた Deproteinizing treatment がスマヤー層を改良しセルフエッチングシステムの接着耐久性を向上させることを報告してきた。しかし、Deproteinizing treatment による酸蝕象牙質接着性能への影響に関する報告はあまり多くない。そこで本研究では、酸蝕象牙質モデルを作製し、Deproteinizing treatment がワンステップセルフエッチングシステムの微小引張り接着強さに与える影響について検討した。

【材料及び方法】ヒト抜去健全大白歯歯冠中央部を歯軸に対して垂直に切断し平坦面を作製後、# 320 耐水研磨紙を用いて仕上げ、その後 Zimmerli (Clin Oral Invest, 2012) らの方法に従って酸蝕象牙質モデルを作製した(東京医科歯科大学倫理審査委員会承認 D2013-022-02 番)。すなわち、脱灰液 (1% citric acid with pH of 3.5) に 5 分間浸漬し水洗後さらに再石灰液 (pH 6.4) に 3.5 時間浸漬し水洗する 1 セットを、1 日 6 セット、連続 8 日間行った。本実験には、接着システムとしてワンステップセルフエッチアドヒーズのクリアフィルユニバーサルボンドクイック (以下 UBQ、クラレノリタケデンタル社製)、Deproteinizing treatment には AD ゲル (クラレノリタケデンタル社製)、還元剤としてアクセル (サンメディカル社製) を使用した。実験群として、健全象牙質に対して前処理なし (C 群)、酸蝕象牙質モデルに対して前処理なし (E 群)、AD ゲル 60 秒処理 (EH 群)、AD ゲル 60 秒処理及びアクセル 15 秒処理した群 (EHA 群) を設定し、UBQ を業者指示通り使用した。その後、クリアフィル AP-X (クラレノリタケデンタル社製) を築盛硬化させ試着試料とした。照射には LED 照射器、Bluephase 20i (Ivoclar Vivadent 社製) を用いた。試料は 37 °C 水中に 24 時間保管後、被着面積 1.0×1.0 mm² のビーム状試片を切り出し 2 群に分け、速やか (24h) に及びサーマルサイクル負荷 (10000 回, 5°C-55°C) 後 (TC)、クロスヘッドスピード 1 mm/min 条件で、それぞれ微小引張り接着試験を行った。得られた接着強さは Two-way ANOVA、Tukey HSD、T-test (有意水準 5%) を用いて、統計処理を行った。

【結果及び考察】得られた結果を下表に示す (Table)。24 時間後及び TC 後では共に、EHA 群 > C 群 = EH 群 > E 群の順に高い接着強さを示した。また、TC によって、C 群、E 群、EH 群の 24 時間後の接着強さが有意に低下したのに対し、EHA 群では有意な低下を認められなかった。酸蝕象牙質に対する Deproteinizing treatment が、露出コラーゲンを効果的に除去し接着性能の向上につながった可能性、及び、次亜塩素酸ナトリウム使用による重合阻害の影響は、還元剤の使用により回復し、酸蝕象牙質に対する接着強さおよび接着耐久性の向上が認められたことにより、これらの接着前処理の有用性が示唆された。

[Mpa]	Control (C)	Erosion (E)	Erosion+AD gel (EH)	Erosion+AD gel+Accel (EHA)
24h	67.6±8.2 ^{ACa}	55.2±8.4 ^{Ba}	63.3±7.4 ^{Aa}	73.0±6.9 ^{Ca}
TC	50.4±6.1 ^{Ab}	24.5±5.5 ^{Bb}	45.1±8.0 ^{Ab}	69.6±6.5 ^{Ca}

Table . The micro-tensile bond strengths (n=30, MPa ±S.D.). Within the same row, different superscript capital letters indicate statistically significant differences (p<0.05). Within the same column, different lowercase superscript letters show statistically significant differences (p<0.05).

【結論】 Deproteinizing treatment によって、酸蝕象牙質モデルに対するワンステップ接着システム UBQ の接着性能、及び接着耐久性は向上し、さらに還元剤の併用によりそれらはさらに大きく向上することがわかった。

仮封材およびその除去法がレジンコーティング面に対する接着へ及ぼす影響

¹ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野

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 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座 歯科保存学分野 歯冠修復学

○佐藤隆明¹, 高橋礼奈¹, 盧山晨¹, 内山沙紀¹, 馬場雄大¹, 佐藤綾花¹, 池田正臣², 高垣智博³, 二階堂徹³, 田上順次¹

Influence of temporalization and removal methods on dentin bond strength with resin coating technique

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

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

³ Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation, Asahi University School of Dentistry

○Takaaki Sato¹, Rena Takahashi¹, Shin Rozan¹, Saki Uchiyama¹, Yuta Baba¹, Ayaka Sato¹, Masaomi Ikeda², Tomohiro Takagaki^{1,3}, Toru Nikaido^{1,3}, Junji Tagami¹

【諸言】これまでの研究から、間接修復におけるレジンコーティング法は歯髄保護、内部適合性の向上、レジンセメントの象牙質に対する接着強さの向上に寄与することが知られている。本研究では仮封材およびその除去法がレジンコーティング面における接着強さに及ぼす影響について検討した。

【材料及び方法】ウシ下顎切歯の唇側面象牙質を注水下にて露出させ、#600耐水研磨紙にて研削した面をレジンコーティングとしてスコッチボンドアドヒーズユニバーサル (3M ESPE) で処理・光照射後、フィルテック シューブリーム ウルトラフロー (シェードA2、3M ESPE) を筆で一層塗布し光照射を行った。その後、アルコール綿球を用いて表層の未重合層を除去した面を被着面とした。仮封材の種類によりCav群：CAVITON EX (GC)、Sep群：ウォッシュャブルセップ (サンメディカル) + FIT SEAL (GC)、Vas群：ジーシーコアバター (GC) + FIT SEALの3群に分け、仮封後の試料を7日間37℃にて水中保管した。仮封材をエキスカにて除去後、被着面処理の種類によりAF群：エアフローマスター (松風)、BR群：プレサージュ (松風)、WA群：水洗のみの3群に分けた。その後、あらかじめ作製した厚さ1.5mmのCAD/CAMレジブロック (セラスマート300、A2 LT 12、GC) をスコッチボンドアドヒーズユニバーサルおよびリライエックスアルティメットレジセメントを用いて (3M ESPE) を用いて被着面に装着した。すべての試料を24時間37℃にて水中保管後、接着界面が1.0mm×1.0mmとなるようにビーム状試片を作製し、小型卓上試験機EZ-SX (島津製作所) を用いてクロスヘッドスピード1mm/minにて微小引張接着試験を行い、得られた値は2 way-ANOVAおよびt-test with Bonferroni correctionを用いて有意水準5%にて統計処理した。なお、光照射にはLED照射器 (VALO、ウルトラデント：ハイパワーモード 1400mW/cm²) を用いた。

【結果及び考察】微小引張接着試験の結果をFig.に示す。Cav群においてCav-BR(p=0.01)およびCav-WA(p=0.00)はCav-AFと比較して有意に低い接着強さを示した。Sep群において有意差は認められなかった。Vas群においてVas-WAはVas-AF(p=0.00)およびVas-BR(p=0.00)と比較して有意に低い接着強さを示した。またCav-BRはSep-BR(p=0.00)およびVas-BR(p=0.00)と比較して有意に低い接着強さを示し、Cav-WA(p=0.00)およびVas-WA(p=0.00)はSep-WAと比較して有意に低い接着強さを示した。

【結論】仮封材およびその除去法の組み合わせにより、レジンコーティング面における接着強さへ影響を及ぼすことが明らかになった。

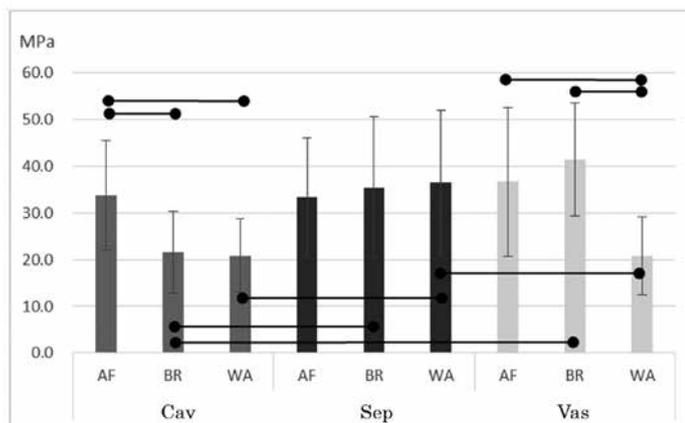


Fig. Microtensile bond strength (●—●; p<0.05, 2 way-ANOVA and t-test with Bonferroni correction)

親水性基材からなるホームブリーチング剤の経時的漂白効果

神奈川県立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

○小倉 真奈, 國松 雄一, 飯塚 純子, 向井 義晴

A time-course study on effects of at-home bleaching agent composed of hydrophilic base material *in vitro*

Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Interdisciplinary Medicine, Graduate School of Dentistry,
Kanagawa Dental University

○OGURA Mana, KUNIMATSU Yuichi, IIZUKA Junko, MUKAI Yoshiharu

【研究目的】

ホームブリーチング剤には低濃度過酸化尿素が用いられており、作用時間 2 時間、操作期間 2 週間以上の製品が主である。これら長時間の適用は日常生活において患者の負担となっており、時間に対するストレスの緩和は患者にとって有益であると考えられる。基材成分を親水性材料にして放出機能を向上させたホームブリーチング剤が発売された (TiON Take home Platinum)。本剤に関するこれまでの研究では、従来製品と同じ回数ブリーチングを行った場合に有意に色調の変化が認められたという報告がある。しかしながら、経時的な効果に関する研究報告は無い。本研究は TiON Take home Platinum の基材親水性に着目し、基材の異なるホームブリーチング剤との漂白効果の違いを経時的に観察した。

【材料および方法】

ウシ下顎中切歯歯冠部より 5×6×2 mm のエナメル-象牙質ブロックを切り出し、耐水研磨紙 1000 番、1500 番および 2000 番と順次研磨して象牙質に裏打ちされた平坦なエナメル質面を作製した。5 分間の超音波洗浄を行った後、被験歯面以外のエナメル質および象牙質を耐酸性バーニッシュにてマスキングし、象牙質面のみエッチングを 10 秒間行い水洗した。染色には紅茶ティーバッグ (リプトンイエローラベル, ユニリーバ) を使用した。100 ml の脱イオン水を沸騰させ、1 パック (2 g) を投入し 5 分間煮沸した。冷却後 37°C にて上記試料を 7 日間浸漬した。染色液は毎日交換し、染色後は脱イオン水にて 1 試料当たり 10 秒間の洗浄を行った。染色後エナメル質表面のステインを除去するためフッ化物非含有研磨剤 (プレティオン, GC) を使用し 30 秒間ポリッシングを行った後 30 秒間水洗した。歯面の水分を除去後、測色計 (Easyshade Advance 4.0, Vita) にて測色した後、ステッキークワックスを用いて円筒形容器の底部に固定した。試料を 6 個ずつ ①TiON 群 (TiON home)、②Platinum 群 (TiON Take home Platinum)、③Opal 群 (Opalescence 10%) に分け、被験歯面に適量塗布し、37°C の湿潤状態で 120 分間作用させた。漂白後に測色を行い、色差を $\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$ の式を用いて算出した。この処理を 6 日間繰り返して行った。各回の色差 (ΔE) を平均し、二元配置分散分析および有意水準 5% にて統計学的検討を行った。

【結果】

統計分析の結果、ブリーチング剤と期間の間には交互作用は認められなかった。Platinum 群の色差 (ΔE) は、初回の漂白直後から他の群と比較して高く、TiON 群と Platinum 群、および Platinum 群と Opal 群の間で有意差が認められた。2 日目は TiON 群と Platinum 群間でのみ有意差が認められた。その後、6 日目にて再び TiON 群と Platinum 群間に有意差が認められた。一方、3 群とも 1 日目から 6 日目まで色差の上昇傾向は認められたが有意差は確認されなかった。

【考察】

TiON Take home Platinum は他群と比較して初日から顕著な色差を認め、6 日目にも有意差が現れていることから、含有される親水性基材により薬効成分が従来品よりも内部まで浸透し、象牙質を含めて高い漂白効果が得られたと考えられる。有意な経時的色差の上昇は確認できなかった原因としては、初回の漂白で比較的高い効果が得られていることによると考えられるが、本モデルを使用したより長期の観察が必要であると思われる。

【結論】

親水性基材を含有するホームホワイトニング剤は、短期間で優れた漂白効果が得られる事が示唆された。

(参考文献)

Suliman M et al., Development and evaluation of a method *in vitro* to study the effectiveness of tooth bleaching. J Dent, 31, 415-422, 2003

光照射がオフィスブリーチの漂白効果に及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 歯制御学分野
 ○大槻昌幸、保坂啓一、平石典子、田上順次

Effect of light irradiation on in-office bleaching

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

○OTSUKI Masayuki, HOSAKA Keiichi, HIRAIISHI Noriko, TAGAMI Junji

【緒論】 歯の漂白治療が普及している中で、我が国で販売されているすべてのオフィスブリーチ材において、光照射が必要とされている。一方、オフィスブリーチにおける光照射の効果については様々な報告がある。本研究の目的は、光触媒を含まないオフィスブリーチ材（オパールエッセンス Boost、ウルトラデント ジャパン）による歯の漂白において、光照射が漂白効果に及ぼす影響について *in vitro* で明らかにすることである。

【材料および方法】 ウシ抜去下顎切歯の唇側面中央のエナメル質の厚さが約 1mm になるように耐水研磨紙 #280～#1,000 で研削し、約 6 x 6mm の試片を切り出し、内径 10mm の円筒形アクリルチューブに歯科用重合レジンで包埋した。硬化後、エナメル質表面を耐水研磨紙 #1,200 で研磨し被験面とした。紅茶からの抽出液を着色液とし、試料を 40°C で 7 日間着色液に浸漬した。着色後、色彩計（NR-12、日本電色）で測色を行い、CIE L*a*b*値を求めた。次いで、オフィスブリーチ材 オパールエッセンス Boost を用いて、下記の条件で漂白処置を行った。

OP-L10 群：混和したオパールエッセンス Boost のジェルを塗布し、7 分間、38°C の恒温槽に静置後、室温でハロゲン照射器（ローレンスキュアリングライト CU-100RLC、サンデンタル）を用いて、照射チップ先端とエナメル質面の距離を 10mm に固定して、3 分間光照射し、次いで、5 分間、恒温槽に静置した。

OP-L15 群：照射チップ先端とエナメル質面の距離を 15mm にして、OP-L10 と同様の漂白処置を行った。

OP-15 群：混和したオパールエッセンス Boost のジェルを塗布し、15 分間、38°C の恒温槽に静置した。

OP-20 群：混和したオパールエッセンス Boost のジェルを塗布し、20 分間、38°C の恒温槽に静置した。

漂白処置後、漂白材を除去して、測色を行った。漂白処置と測色は 6 回繰り返した。各実験群の試料数は 12 とした (n=12)。漂白前の測色値と各回の測色値から色差を算出し、二元配置分散分析および Tukey の HSD で有意水準 5% にて統計学的検討を行った ($\alpha=0.05$)。

【結果および考察】 各実験群ともに、肉眼で顕著な漂白効果が認められ、また、漂白処置を繰り返すことによって、漂白効果は増大した。各実験群の色差の変化を Fig. 1 に示す。いずれの実験群も、漂白回数が増すにつれて色差値は増加し、OP-L10 群は他に比べて有意に高い色差値を示した ($p<0.05$)。OP-L15、OP-15、OP-20 の各実験群における色差はほぼ同じで、有意差は認められなかった ($p>0.05$)。照射距離を短くし (OP-L10 群)、光量が上がると、漂白効果は高まるが、過熱の恐れがあり、適切な照射条件の設定が必要と思われる。一方、照射距離を長くし (OP-L15 群)、光量が下がると、未照射の場合 (OP-15 群) と漂白効果に差が認められなかった。したがって、光照射をせずに漂白処置行っても十分な漂白効果が得られることが示唆された。また、未照射で漂白時

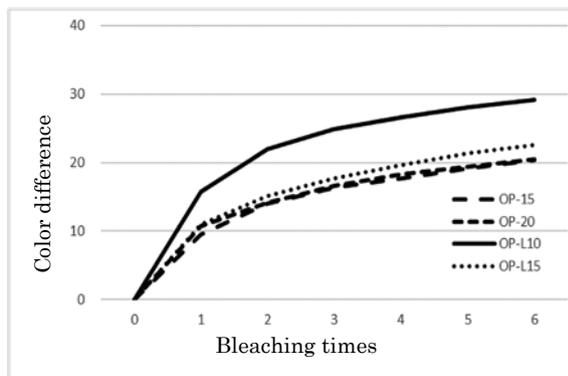


Fig.1 Color differences of each group

間を延長しても (OP-20 群)、漂白効果に差は認められなかったことから、適切な漂白時間の設定が必要と考えられる。

【結論】 オフィスブリーチ材 オパールエッセンス Boost による歯の漂白において、光量が大きい場合、高い漂白効果が得られたが、光量が小さいと光照射の効果が認められなかった。

マルチイオン徐放性研磨材を用いた歯面研磨後における根面の耐酸性

¹日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学

²日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第2講座

○新海航一^{1,2}、吉井大貴¹

Acid-resistance of dentin surface after polishing with a multi-ion slow-released paste

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

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

○SHINKAI Koichi^{1,2}, YOSHII Daiki¹

【研究目的】

高齢者の口腔内は、残存歯率の向上とブラークコントロールの低下によって根面齲蝕の発現頻度が増加する傾向にあると思われる。また、根面齲蝕が歯肉縁下への拡大や環状形態を示すケースは修復治療が困難であるため、齲蝕予防が最も重要である。定期的な PMTC は齲蝕予防に有効な処置とされている。PMTC を行う際、マルチイオン徐放性フィラーすなわち S-PRG フィラーを含有する歯面研磨材を用いると、フィラーから放出される各種イオンが歯面に浸透し、根面の性状に影響を与える可能性がある。特に、ストロンチウムイオンとホウ酸イオンは石灰化促進作用を有するため、根面の再石灰化に寄与すると考えられる。また、フッ素イオンの浸透はフルオロアパタイトを生成し歯面の耐酸性を向上させる効果がある。そこで本研究では、このマルチイオン徐放性研磨材を用いてヒト抜去歯の根面を研磨し、歯面研磨後における根面の耐酸性について評価した。

【材料および方法】

本研究は本学倫理審査委員会の承認を得て行った（許可番号：ECNG-R-319）。被験歯はチモール液中に冷蔵保存したヒト抜去上顎前歯で、齲蝕および修復処置のないもの 30 歯を使用した。下記の 5 つの実験群に 6 歯ずつ抜去歯を配分した。

1. 試料の作製：まず、エアスケーラーを用いて抜去歯の歯面付着物をすべて除去した。次に、S-PRG フィラーの配合量が異なる歯面研磨材（0wt%、1wt%、5wt%、20wt%および 30wt%）とラバーカップを用いて唇側根面を 1 分間研磨した。その後、スリーウェイシリンジで研磨面を 5 秒間噴霧洗浄して歯面研磨材を十分に除去し、蒸留水中に抜去歯を保管した。実験群は、使用した歯面研磨材の S-PRG フィラー含有量に応じて、Group 1：0wt%、Group 2：1wt%、Group 3：5wt%、Group 4：20wt%、Group 5：30wt%の 5 群とした。

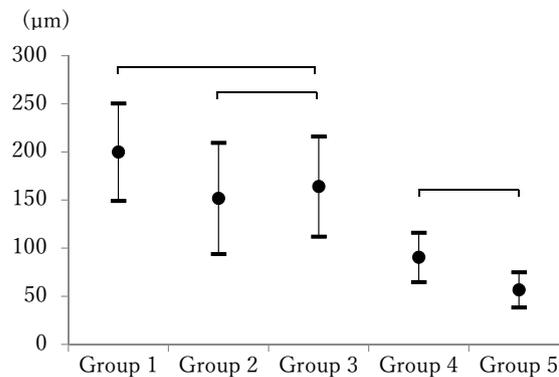
2. pH サイクルの実施：pH サイクルを実施する前に、歯軸に対し垂直方向に歯頸部で切断し、抜去歯の歯冠を除去した。根管内容物をファイリングで除去した後、根管口部をセルフエッチシステムで歯面処理しフロアブルレジンで封鎖した。唇側根面の研磨面（切断面から約 2mm、近遠心的中央部）にマスキングテープ（2 mm×2 mm）を貼付した後、歯根全体をプロテクトバーニッシュとエナメルバーニッシュでコーティングした。バーニッシュ乾燥後、マスキングテープを除去し貼付部分を脱灰対象とした。pH サイクルは、脱灰液（pH4.8）18 時間→水洗 5 分間→再石灰化液（pH7.0）6 時間→水洗 5 分間を 1 サイクルとし、合計 7 サイクルをインキュベーター内（37℃、攪拌 132rpm）で行った。その後、試料は生理食塩水に浸漬し恒温恒湿器中に保管した。

3. 脱灰層の観察と脱灰深度の測定：試料の脱灰面にエナメルバーニッシュを塗布して保護した後、Isomet Low Speed Saw（Buehler）を用いて頬舌方向に歯根を薄切し、脱灰面の中央、中央から左右約 0.5 mm の位置から厚さ約 200 μm の切片 3 枚を得た。各切片は耐水研磨紙と砥石を用いて 100 μm 前後の厚さに調整し、除光液にてエナメルバーニッシュを除去した。各実験群につき 6 歯から合計 18 枚の薄切切片を得た。切片をスライドガラス上に封入し、偏光顕微鏡（ECLIPSE LV100POL、Nikon）にて脱灰層を観察し、画像上で脱灰深度の計測を行った。得られたデータは One-way ANOVA を行った後、Tukey post hoc test を用い統計学的解析を行った。

【結果と考察】

各実験群の脱灰深度の平均値 ± SD を右のグラフに示す。統計分析の結果、Group 1 と Group 3、Group 2 と Group 3、および Group 4 と Group 5 の間には有意差は認められなかったが、その他の実験群の間には有意差が認められた。

S-PRG フィラーの配合量が増加するにつれて脱灰深度の低下が認められた。特に 30wt% は最も浅い脱灰深度を示し、20wt% 以上 S-PRG フィラーを含む歯面研磨材は 5wt% 以下のものより有意に根面の耐酸性を向上させた。以上の実験結果から、歯面研磨材中の S-PRG フィラーから放出された各種イオンが根面のセメント質あるいは象牙質表層に浸透してヒドロキシアパタイトの結晶構造に作用し、耐酸性の高いストロンチウムアパタイトやフルオロアパタイトが形成されたことによって根面の耐酸性が向上したものと推察される。



Mean values and standard deviations (SDs) of lesion depth. —: no significant difference

Nested PCR アッセイを用いた口腔内 *Helicobacter pylori* の検出

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座 歯学分野

○永田量子, 大墨竜也, 磯野俊仁, Naksagoon Traithawit, 鈴木裕希, 長谷川泰輔,
竹中彰治, 野杵由一郎

A newly developed nested PCR assay for the detection of *Helicobacter pylori* in the oral cavity.

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

○NAGATA Ryoko, OHSUMI Tatsuya, ISONO Toshihito, NAKSAGOON Traithawit, SUZUKI Yuki,
HASEGAWA Taisuke, TAKENAKA Shoji, NOIRI Yuichiro

【目的】近年、胃がんの原因である *Helicobacter pylori* は、胃内だけでなく口腔内からも高頻度で検出されていることが報告されている。*H. pylori* は、口腔内では Spiral form から Coccoid form に変化し、休眠状態 (Viable but Non-Culturable: VNC) にあるため、培養法では検出することができない。現在、口腔内の *H. pylori* の検出には PCR 法を応用した分子生物学的手法や抗原・抗体反応並びに酵素活性等が応用されてきた。これまで、唾液やデンタルバイオフィームから、*H. pylori* の細菌 DNA が検出されることが報告されているが、その検出率はばらつきがあり、デンタルバイオフィーム中での *H. pylori* については十分に検索されていない。

そこで本研究では、Nested PCR アッセイを用いて、デンタルバイオフィームから *H. pylori* を検出するために、信頼性の高い分子生物学的手法の構築を試みた。

【材料及び方法】2018年1月から2019年7月までに新潟大学医歯学総合病院に来院し、本研究の趣旨を説明し同意を得られた25歳~91歳の男女61名(平均年齢57歳)を対象とし、デンタルバイオフィームを滅菌済スプーンエキスカベータ等で採取した。(人を対象とする研究等倫理審査委員会、承認番号2017-0150)。各サンプルから細菌DNAを抽出し、Single PCR および Nested PCR を行った。Single PCR は、16S rRNA, および *vacA* を標的遺伝子とするプライマー (EHC および Vac-A) を用いた。Nested PCR は、EHC を用いた増幅産物を鋳型として、EHC の内部領域に位置するプライマー (ET-5 および EN-3) を用いた^{1,2)}。コントロールとして、*H. pylori* IID3023 株を使用した。

また、Single PCR および Nested PCR 法の検出限界を検討するため、*Streptococcus mutans* 細菌懸濁液 (OD₆₀₀=0.5) に、既知の細菌数の *H. pylori* IID3023 を10倍連続希釈した溶液を加えて細菌DNAを抽出した。抽出した細菌DNAを鋳型として Single PCR および Nested PCR 法を行い、DNA産物の有無を比較した。

【結果と考察】PCR法での陽性率はそれぞれ、EHC 3.2% (2/61)、Vac-A 3.2% (2/61) であった。Nested PCR 法での陽性率はそれぞれ ET-5 29.5% (18/61)、EN-3 3.2% (2/61) であった。そのうち、胃に *H. pylori* 罹患歴 (除菌療法後) がある患者から採取したサンプル数は18あり、そのうちの陽性率はPCR法でそれぞれ EHC 0% (0/18)、Vac-A 5.6% (1/18)、Nested PCR 法で ET-5 38.9% (7/18)、EN-3 5.6% (1/18) であった。

Single PCR における検出感度は、1000分の1 (10²-10³CFU) であった。一方で、Nested PCR 法では、100万分の1 (10CFU) まで検出可能であった。

これらの結果から、本研究で用いた Nested PCR 法は、口腔内で Coccoid form として存在する *H. pylori* を高い感度で検出できると考えられた。今回調査した61名中21名(34%)が *H. pylori* 陽性であり、口腔が *H. pylori* のリザーバーの役割を担っていることが示唆され、抗菌療法に偏重した *H. pylori* の制御戦略を再考する可能性が示された。

【結論】本研究で用いた Nested PCR 法は、口腔サンプル中の *H. pylori* を高感度に検出可能であった。そして、ヒトのデンタルバイオフィームからの *H. pylori* の検出率は、既知のう蝕や歯周病関連細菌の検出率と比較しても、高感度に検出された。本研究の一部は、科学研究費補助金 (19K22704) の補助を受けて実施された。

【参考文献】1) Ismail et al. J Clin Gastroenterol 50: 17-22, 2016. 2) Song et al. J Clin Pathol 53: 218-222, 2000.

初期根面う蝕に関連する口腔バイオフィーム細菌叢の検索

¹大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)

²新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野

○朝日陽子¹, クランリアン キッティピット¹, 外園真規¹, 前菌葉月¹, 栗木菜々子¹, 野杵由一郎²,
恵比須繁之¹, 林 美加子¹

Investigation of microbiota of oral biofilm related with initial root caries.

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, ²Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Yoko Asahi¹, Kittipit Klanliang¹, Maki Sotozono¹, Hazuki Maezono¹, Nanako Kuriki¹, Yuichiro Noiri²,
Shigeyuki Ebisu¹, Mikako Hayashi¹

[研究目的]

高齢者における保有歯数の増加や歯肉退縮に伴う根面露出により、根面う蝕が増加している。う蝕などの口腔感染症の主因は口腔バイオフィームであり、これらの疾患はバイオフィームが病原性の高い細菌叢にシフトすることにより起こる。したがって、これらの疾患に関与するバイオフィーム細菌叢を解明することは、これらの疾患のコントロールにつながると思われる。これまでも根面う蝕の病原性細菌の解明を試みた研究はあるが、大部分が培養法によるものであり、複雑な細菌叢全体の構成の把握は困難であった。そこで、根面う蝕の発症に影響を及ぼす口腔バイオフィーム細菌叢を検討することを最終的な目標とし、本研究では、根面う蝕に罹患した患者の口腔内よりサンプルを採取し、初期根面う蝕に関連する細菌叢を網羅的に検索した。

[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 H29-E12-1)。大阪大学歯学部附属病院保存科を受診した根面う蝕を有する患者のうち、本研究に同意が得られた者を被験者とした。滅菌済みキュレットにて歯肉縁上バイオフィームを採取した。また、根面う蝕罹患部より滅菌済みスプーンエキスカベータを用いてう蝕象牙質をサンプルとして採取した。ICDAS の根面う蝕の診査基準における Code1 を初期根面う蝕サンプル、Code2 をより進行した根面う蝕サンプルとした。採取したバイオフィーム試料およびう蝕象牙質サンプルより DNA を抽出 (PowerSoil® DNA Isolation Kit) し、16S rRNA 遺伝子 (V1-V2 可変領域) を標的とし、次世代シーケンサー (Miseq™, Illumina, USA) を用いて細菌叢の網羅的解析を行った。

[結果]

得られた被験者のデータは個人差が大きかったものの、歯肉縁上バイオフィームサンプルと根面う蝕罹患部サンプルの細菌叢の構成には明確な違いが認められ、根面う蝕罹患部のサンプルは歯肉縁上バイオフィームサンプルと比較して、グラム陽性細菌が占める割合が高かった。また、根面う蝕罹患部より採取したサンプルにおいては、う蝕の進行度により細菌の構成は変化し、初期根面う蝕サンプルの方がより進行した根面う蝕サンプルと比較して、グラム陽性細菌が優勢であった。

サンプル間の細菌構成の変化は特に、門レベルでは Actinobacteria 門および Bacteroidetes 門、属レベルでは Actinomyces 属、Fusobacterium 属において認められた。

[結論]

本研究により、歯肉縁上バイオフィームと根面う蝕罹患部の細菌叢は異なること、さらに根面う蝕の進行度の違いによりう蝕罹患部から検出される細菌叢が異なることが示された。根面う蝕の発症と進行に関わる細菌叢が異なる可能性が示唆された。

本研究は JSPS 科研費 (17K11703) およびセコム科学研究費助成金の補助の下に行われた。

異なる湿潤状態で2種類のスミヤ層を有する象牙質表面への接着強さに対するワンステップセルフエッチングアドヒーズに含まれるアミド系モノマーの影響

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野

○ノールデーデン アリー サイド, 中島 正俊、久野 裕介、田上 順次

The effect of amide monomer in one-step self-etch adhesive on bond strength to different wet dentin surface with two types of smear layer

Department of Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

○Nooruldeen Ali SAEED, Masatoshi NAKAJIMA, Yusuke KUNO, Junji TAGAMI

Objective: Recently, newly developed one-step self-etch adhesive (UBQ; Clearfil Universal Bond Quick, Kuraray Noritake, Japan) has been introduced with the incorporation of amide monomer. Amide monomer contained in UBQ has a lower octanol/water partition coefficient; logPow (-0.7) (supplied information by the manufacturer) than HEMA (logPow=0.3), indicating more hydrophilicity of the adhesive agent before polymerization. The purpose of the present study is to examine the effect of the amide monomer in one-step self-etch adhesive on the micro tensile bond strength to different wet dentin conditions with two types of smear layer.

Material and methods: Forty extracted sound human molars were used in the study. Flat dentin surface was exposed using model trimmer and wet ground either with #600 SiC paper or fine grit diamond bur (F102R, Shofu, Japan) to prepare two types of standardized smear layer. The dentin specimens were divided into two groups according to dentin wet condition; wet dentin surface (gentle air drying for 2 seconds) or dry dentin surface (strong air drying for 10 seconds). Clearfil Universal Bond Quick (UBQ, Kuraray Noritake, Japan) and experimental Clearfil Universal Bond Quick (UBQexp; same composition as UBQ but the hydrophilic amide monomer was replaced with HEMA) were applied according to manufacture instruction followed by incremental composite buildup to 4 mm using Clearfil AP-X, A2, (Kuraray Noritake, Japan). After water storage for 24 hours at 37°C, the bonded specimen was sectioned into four beams with 1.0X1.0 mm² cross sectional area from the central region using slow speed diamond saw and subjected to the micro-tensile bond strength (µTBS) test at a crosshead speed of 1.0 mm/min. Fractographic study of cross sections of failed interfaces of beams was performed using SEM. Data were statistically analyzed using Three-way ANOVA followed by pairwise comparison with Bonferroni correction ($\alpha=0.05$). All the experiments were conducted according to protocol approved by the Human Research Ethics Committee, Tokyo Medical and Dental University, 2014-022.

Results: Micro-tensile bond strength to dentin (Mean and standard Deviation, MPa, n=20).

Groups		Wet Dentin		Dry Dentin	
		Mean	S.D.	Mean	S.D.
UBQ	Sandpaper	59.3 ^{Aa}	8.1	67.5 ^{Ba}	7.7
	Diamond Bur	44.7 ^{Ab}	7.3	50.7 ^{Bb}	8.4
UBQexp	Sandpaper	50.4 ^{Ac}	8.3	55.7 ^{Bc}	6.6
	Diamond Bur	33.6 ^{Ad}	5.4	41.0 ^{Bd}	6.1

Different uppercase superscript letters within each row indicates significant difference, different lowercase superscript letters within each column indicates significant difference. Abbreviations: MPa: Megapascal, S. D. : Standard deviation, UBQ: Clearfil Universal Bond Quick, UBQexp: Experimental Clearfil Universal Bond Quick. Failure analysis revealed that cohesive failure in adhesive resin were predominant followed by the mixed failure.

Conclusion: Amide monomer improve the dentin bonding strength of all experimental groups, but could not minimize the effect of surface wetness condition on dentin bond strength.

最近のセルフエッチングシステムによる歯頸部罹患象牙質に対する接着

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座

○岡田美里 中澤美和 河本 芽 嶋田智重 前野雅彦 森のり子 小川信太郎 奈良陽一郎

Bonding of cervical decayed dentin using recent self-etching systems

Department of Adhesive Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

○OKADA Misato, NAKAZAWA Miwa, KOMOTO Mei, TOKITA Chie, MAENO Masahiko,

MORI Noriko, OGAWA Shintaro, NARA Yoichiro

【研究目的】 コンポジットレジンを使用した直接修復は、患者の誰もが望む低侵襲性の治療と優れた審美的回復の両立に依っている。現在、セルフエッチングシステムは簡便かつ確実なコンポジットレジン修復を行うための代表的材料として、広く臨床で用いられている。本研究では、最近のセルフエッチングシステムを用いて、歯頸部罹患象牙質である摩耗症露出象牙質(ALD)と齶蝕罹患象牙質(CAD)に対する処理直後の引張接着強さ(ITBS)を、歯頸部健全切削象牙質(SD)と健全切削エナメル質(SE)を対照として測定し、量的質的な評価検討を行った。

【材料および方法】 被験歯には本学部研究倫理委員会(NDU-T-2016-06)の承認を経て、0.1%チモール水溶液に保存したヒト抜去下顎小白歯の中から、歯頸部に中等度のALDおよびCADを有する歯、さらに齶蝕や実質欠損を認めない健全歯、各32歯を選択した。1ステップ型セルフエッチングシステムには、Prime&Bond universal (PBU: Dentsply Sirona)、Scotchbond Universal Adhesive (SBU: 3M)、Clearfil Universal Bond Quick ER (UBQ: Kuraray Noritake Dental)の3種を用いた。また対照として、2ステップ型セルフエッチングシステム; Clearfil Mega Bond 2 (MB2: Kuraray Noritake Dental)を選択した。ALDへの歯面調整は、注水下の低速回転ポリッシングブラシによる清掃のみとし、CADでは齶蝕検知液を併用した低速回転のラウンド型スチールバーによる臨床的な齶蝕象牙質外層の除去を行った。一方、健全歯の類側歯頸部に対し、規格化V字状窩洞を形成し、歯肉側象牙質窩壁中央部の切削面をSD、歯頂側窩縁に付与したストレートベベルのエナメル質切削面中央部をSEとした。その後、各歯面に対してシステム指定の処理を経て、被着面処理完了後2分以内のITBS値測定を行った。得られた測定値(n=8)は、一元配置分散分析とTukeyのq検定による統計学的解析を経て、4種システム統合によるITBS値(n=32)に基づく4種歯質間の接着についてワイブル分析によって検討した。

【成績および考察】 Fig.1に、4種システムの各歯面に対する平均ITBS値(s.d.)を示す。分析の結果、対照システムのMB2においてのみCADが2種健全歯質より有意に低い値を示したものの、PBU、SBUおよびUBQでは4種歯質間にも有意差を認めなかった。また、各歯質における4システム間のITBS値には有意差を認めなかった。したがって、新たな光重合触媒やモノマーの導入等の改善が図られた最近の1ステップ型セルフエッチングシステムによる歯頸部罹患象牙質に対するITBS値は、健全歯質と同等レベルであり、かつ対照の2ステップ型システムのMB2と同様であることが確認できた。Fig.2に、4種歯面間のワイブル係数(Wm)と10%累積破壊確率における推定破壊応力値(PF10)の違いを示す。4種歯頸部歯質の質的接着評価において、接着信頼性の指標であるWm値による大小関係はSD>SE≧ALD>CADとなった。また臨床的示唆に富むPF10値において、罹患象牙質(ALD, CAD)値は健全歯質(SD, SE)値より有意に小さく、接着耐久性に劣ることが確認できた。したがって、罹患象牙質のALDやCADを対象とする修復に際しては、よりの確かつ慎重な処置と対応が求められる。

【結論】 最近のセルフエッチングシステムによる歯頸部罹患象牙質に対する接着は、健全歯質と同等レベルの平均接着強さが獲得できるものの、接着信頼性の点で劣る傾向にあり、接着耐久性の点では有意に劣ると考える。

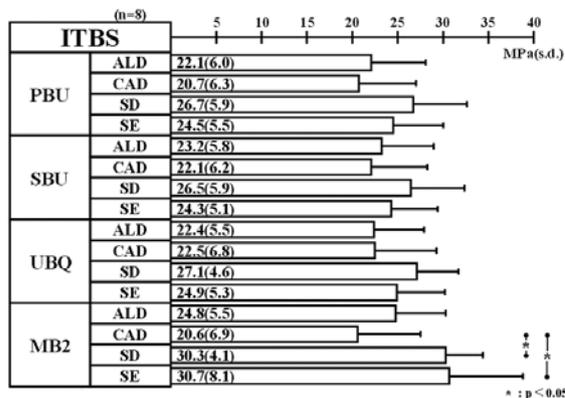


Fig.1 ITBS of four recent self-etching systems to four types of cervical tooth substance

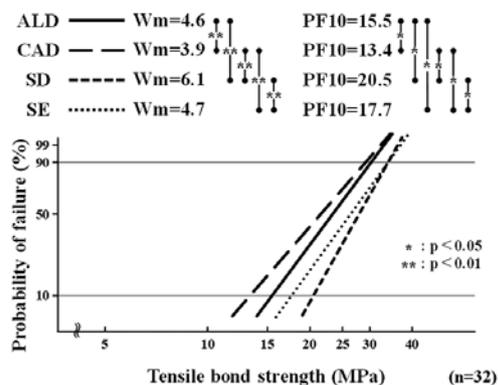


Fig.2 Differences in Weibull parameters among four types of cervical tooth substance

各種ユニバーサルアドヒーズが象牙質接着性能と酸塩基抵抗性に及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野¹

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座 歯科保存学分野 歯冠修復学²

○安藤 龍汰¹, 松井 七生子¹, 高橋 基¹, 清水 美透¹, 高垣 智博^{1,2}, 二階堂 徹^{1,2}, 田上 順次¹

The effect of various universal adhesive systems on dentin bonding performance and acid-base resistance.

¹Department of Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

²Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation, Asahi University School of Dentistry

○Ryuta Ando¹, Naoko Matsui¹, Motoi Takahashi¹, Miyuki Shimizu¹, Tomohiro Takagaki^{1,2}, Toru Nikaido^{1,2}, Junji Tagami¹

【緒言および研究目的】

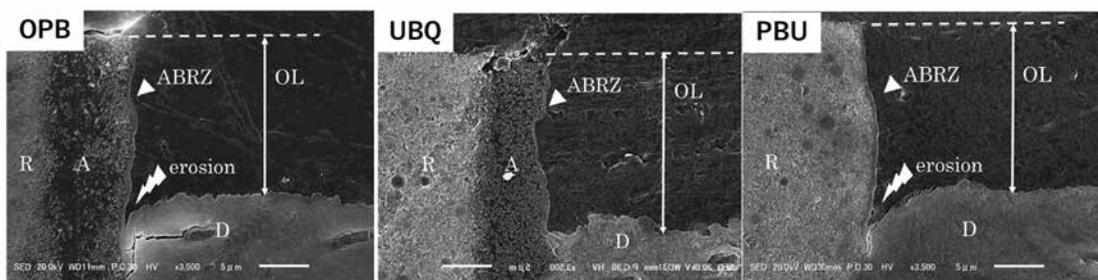
歯質接着システムは、各被着体に対する前処理を簡略化した 1 ステップセルフエッチング接着システムが各社から多く開発され、近年ではユニバーサルタイプの接着システムの使用も増加している。本研究の目的は 1 ステップセルフエッチング接着システムにおけるボンド中の各種機能性モノマーの違いが、象牙質に対する接着強さとレジン-象牙質接着界面における酸-塩基抵抗性に及ぼす影響について、比較検討することである。

【材料および方法】

1 ステップセルフエッチング接着システムとして OptiBond Universal (OPB, Kerr)、Clearfil Universal Bond Quick ER (UBQ, クラレノリタケデンタル)及び Prime&Bond universal (PBU, Densply Sirona)を使用した。ヒト健全大白歯歯冠部を歯軸と垂直に切断し象牙質を露出させ、耐水研磨紙 #600 にて研削し被着面とした。業者指示通りに各ボンドを塗布、エアブロー後、照射した。被着面にコンポジットレジン（築盛）を築盛、照射し、37°C水中に 24 時間保管して試料とした。その後、接着界面を含む 1 mm×1 mm のビーム状試料を作製した後、クロスヘッドスピード 1 mm/min にて微小引張り接着試験を実施した。試験後、破断面の SEM 観察を行った。接着界面の酸-塩基抵抗性の評価には Acid-base resistant zone (ABRZ) の観察を行った。Inoue ら (Oper Dent, 2006) の方法に準じて試料に酸-塩基処理を施した後、SEM 観察を行った。本研究は、東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認 (D2013-022 号) を得て行った。得られた接着強さは一元配置分散分析と Dunnett の T3 を用いて有意水準 5% で統計学的分析を行った。

【結果および考察】

微小引張り接着試験の結果、OPB 群 66.9±12.8(MPa)、UBQ 群 66.0±8.9(MPa)、PBU 群 62.2±8.0(MPa)となった。24 時間後の微小引張り接着強さにおいては各群間に有意差を認めなかった ($p>0.05$)。ABRZ の SEM 観察 (Fig.1) においては、OPB 群及び PBU 群では厚さ約 1 μ m の ABRZ が観察され、ABRZ の直下には erosion の形成が確認された。一方、UBQ 群では同様に厚さ 1 μ m の ABRZ が確認されたが、ABRZ の直下に erosion の形成は確認されなかった。また、OPB 群、UBQ 群においては、5-10 μ m のボンド層が確認されたものの、PBU 群においてはボンド層が菲薄化しており、他群のような明瞭なボンド層の観察が困難であった。



(Fig.1 Representative SEM images of the adhesive-dentin interface after acid-base challenge x3500)

【結論】

今回の実験で使用した 1 ステップセルフエッチングシステム中の各種機能性モノマーは、象牙質に対する初期接着強さには影響を及ぼさないが、レジン-象牙質接着界面における酸-塩基抵抗性に影響を及ぼす可能性が示唆された。