

## シランカップリング剤の併用が シランカップリング剤含有自己接着性レジンセメントの接着強さに及ぼす影響

日本大学歯学部保存学教室修復学講座

○高橋奈央, 黒川弘康, 白土康司, 崔 慶一, 武田光弘, 山内嘉文, 佐藤幹武, 宮崎真至

### Effect of combined use of silane coupling agent on bond strength of self-adhesive resin cement containing silane coupling agent

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry

○TAKAHASHI Nao, KUROKAWA Hiroyasu, SHIRATSUCHI Koji, SAI Keiichi,  
TAKEDA Mitsuhiko, YAMAUCHI Kabun, SATO Mikitake, MIYAZAKI Masashi

#### 【研究目的】

CAD/CAM レジンブロック (以後, CAD/CAM ブロック) に対するレジンセメントの接着操作では, 歯質および修復物に適した前処理が必要となる。一方, 被着面の前処理を行うことは臨床操作を煩雑にさせるとともに, 操作ステップ数の増加により接着阻害因子の影響を受ける可能性がある。そこで, レジンセメントの開発方向としては, 各被着体に対する前処理を簡略化しながら優れた接着性を獲得することに主眼がおかれ, これに沿った製品として, シランカップリング剤含有自己接着性レジンセメント (以後, シラン含有 SARC) が市販されている。これまで演者らは, シラン含有 SARC の CAD/CAM ブロックへの接着挙動について検討し, シラン含有 SARC の接着強さは, CAD/CAM ブロックのフィラー粒径, 形状および含有量に影響を受ける可能性を報告してきた。今回, 前処理にシランカップリング剤を併用した際の, シラン含有 SARC の各種 CAD/CAM ブロックへの接着挙動について検討した。

#### 【材料および方法】

シラン含有 SARC として, SA ルーティング Multi (クラレノリタケデンタル) を, 対照として, レジンブロック用プライマーを併用するレジンセメントシステムであるブロック HC セム (松風) を用いた。

CAD/CAM ブロックとして, セラスマート 300 (ジーシー), アークティカビタエナミック (カボデンタルシステムズ) および松風ブロック HC スーパーハード (松風) を用いた。

#### 1. CAD/CAM 試片の製作

CAD/CAM ブロックを台座に対して垂直にスライスした後, スライス面が平坦となるよう, 耐水性 SiC ペーパー#2000 を用いて厚さ 2.0 mm まで調整, 常温重合レジンに包埋したものを CAD/CAM 試片とした。

#### 2. 接着試験用試片の製作

CAD/CAM 試片の露出面を SiC ペーパー#320 で研削した後, アルミナ粒子 (50  $\mu\text{m}$ ) を用いて 10 mm の距離から垂直に, サンドブラスト処理 (0.2 MPa) を 10 秒間行い, 3 分間超音波洗浄した。このサンドブラスト面に対して, Ultradent 接着試験用器具を固定し, 練和したレジンセメントを填塞, 60 秒間照射したものを接着試験用試片とした。なお, SA ルーティング Multi では, サンドブラスト面を処理せずレジンセメントを填塞した条件をコントロール群, サンドブラスト面をシランカップリング剤 (セラミックプライマープラス, クラレノリタケデンタル) を用いて製造者指示条件で処理した後, レジンセメントを填塞した条件をシラン併用群とした。また, ブロック HC セムでは, サンドブラスト面を, HC プライマー (松風) を用いて製造者指示条件で処理した後にレジンセメントを填塞した。

#### 3. 接着強さの測定

接着試験用試片を照射終了直後から,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , 相対湿度  $90 \pm 5\%$  の条件で 15 分および 24 時間保管した後, 剪断接着強さを測定した。また, サーマルサイクル 10,000 回および 30,000 回負荷後の試片についても接着強さを測定した。

#### 4. 走査電子顕微鏡 (SEM) 観察

CAD/CAM 試片とレジンセメントとの接合界面について, 通法に従って SEM を用いて観察した。

#### 【成績および考察】

SA ルーティング Multi の CAD/CAM ブロックに対する接着強さは, シランカップリング剤の併用によって影響を受けるものの, その傾向は CAD/CAM ブロックの種類および接着操作後の経過時間によって異なるものであった。これらの要因としては, CAD/CAM ブロック表面でのレジンセメントのヌレ性の変化などが影響したものと考えられた。

【結論】 SA ルーティング Multi の CAD/CAM ブロックに対する接着強さは, シランカップリング剤の併用に影響を受けることが示された。

## 修復法と接着性レジンセメントの違いが CAD/CAM セラミック修復の接着に及ぼす影響

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座  
○越田清祐, 前野雅彦, 奈良陽一郎

### Effect of differences in the type of restoration and adhesive resin cement system on the bonding of CAD/CAM ceramic restorations

Department of Adhesive Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University  
○KOSHIDA Seisuke, MAENO Masahiko, NARA Yoichiro

**【目的】** 直接法による修復が難しい歯質の実質欠損に対しては、被覆する歯面に応じたインレー、アンレーおよびクラウンに類別される間接修復が選択される。特に最近のメタルフリー間接修復においては、修復物の製作プロセスがデジタル化され、大幅な改善・簡素化がなされた CAD/CAM システムが世界中で使用されている。一方、メタルフリー間接修復物の装着に必須となる接着性レジンセメントには、フィラーを含まない 4-META/MMA-TBB タイプとフィラー含有のコンポジットレジンタイプが存在している。そこで本研究では、修復法と接着性レジンセメントの違いが CAD/CAM セラミック修復の接着に及ぼす影響について、動的荷重負荷を経た修復歯内部の微小引張接着強さ ( $\mu$ -TBS) に基づく量的評価およびワイブル分析による質的評価を行った。

**【材料および方法】** 本学部研究倫理委員会の承認を得て (NDU-T2016-06)、ヒト抜去健全上顎大臼歯 72 本に規格化植立を行い、3 種修復群; MOD インレー群 (Inlay)、MODP アンレー群 (Onlay) およびクラウン群 (Crown) に類別し、規格化を図った窩洞/支台歯形成を行った。その後、CEREC system (CEREC AC Omnicam SW4.5 と CEREC MC XL, Dentsply Sirona) による光学印象採得、デジタル設計、VITABLOCS Mark II (VITA) のミリングを経て、修復物を作製した。ついで、使用するセメントシステムに応じた 3 群; Super Bond 群 (SB)、Calibra Ceram 群 (CC) および PANAVIA V5 群 (PV) に区分し、臨床的な修復物の装着を行った。その後、修復試料に対する 37°C 水中下の 157N×30 万回の動的荷重を負荷し、修復歯内部の  $\mu$ -TBS 値を測定 (n=16) した。得られたデータは、二元配置分散分析、メジアンランク法による Weibull 分析によって解析を行った。

**【成績】** 修復法と接着性レジンセメントの違いは、 $\mu$ -TBS に有意な影響を与えていなかった。3 種修復法ならびに 3 種接着性レジンセメント間において、接着信頼性の指標となる Weibull 係数 (Wm) と推定破壊応力値 (PF10/PF90) に有意な違いを認めなかった。インレー修復は、アンレー・クラウン修復に比べ、接着信頼性において同等または有意に劣る傾向にあった。セルフエッチングプライマーを用いた接着性コンポジットレジンセメント (PV) は、フィラーを含まない 4-META/MMA-TBB セメント (SB) ならびに指定されたオールインワンアドヒーズィブを併用するコンポジットレジンセメント (CC) に比べ、CAD/CAM セラミック修復における優れた接着信頼性を示した。

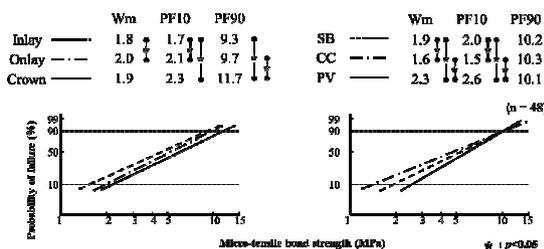
**【考察】** インレー修復の接着信頼性が他の修復に比較して劣った理由としては、繰り返し荷重に直接晒される咬合面における歯質/修復物接合部 (窩縁) が長く、かつ繰り返し荷重を受け止める帯状の歯肉側壁による合計面積が小さいことなどが推察できる。また、PV の優れた接着信頼性については、接着界面数の増加を招かないセルフエッチングプライマーによる前処理の採用と修復材料に近似したセメント自体の弾性係数などが考えられる。

**【結論】** 修復法と接着性レジンセメントの違いは、CAD/CAM セラミック修復歯内部の  $\mu$ -TBS に基づく量的評価において有意な影響を与えていなかった。しかし、質的評価である接着信頼性においては、インレー/アンレー/クラウン修復間ならびに国内外で頻用されている代表的な 3 種接着性レジンセメント間で有意差を認めなかった。

Differences in the mean  $\mu$ -TBS (MPa) among the three type of restorations cemented with three adhesive resin cement systems

Adhesive resin cement system	Type of restoration	Mean $\mu$ -TBS	SD	ptf	(n = 16)
SB	Inlay	5.4	3.2	3	
	Onlay	5.8	2.4	1	
	Crown	6.1	3.5	2	
CC	Inlay	4.9	2.9	3	
	Onlay	5.1	4.1	3	
	Crown	6.4	4.0	2	
PV	Inlay	5.2	2.7	2	
	Onlay	5.9	2.6	1	
	Crown	7.3	2.5	1	

SD: standard deviation, ptf: pre-testing failure



Differences in Weibull parameters among the three type of restorations and three adhesive resin cement systems

本研究の一部は、JSPS17K11719 の助成を受けた。

## 代表的なレジンコアシステムによって処置した 1 級型コア用窩洞の髄床底象牙質における接着実態

日本歯科大学生命歯学部 接着歯科学講座

○中澤美和, 林 孝太郎, 小川信太郎, 前野雅彦, 柵木寿男, 奈良陽一郎

### Actual bonding state on pulp chamber floor dentin of class 1 type core cavity treated by popular resin core systems

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

○NAKAZAWA Miwa, HAYASHI Kotaro, OGAWA Shintaro, MAENO Masahiko, MASEKI Toshio, NARA Yoichiro

**【目的】** レジンコアシステムによる築造は、歯根破折の抑制をはじめ、低侵襲性および審美的回復を見据えた根管治療後の有益な保存的処置法として活用されている。しかし、被着面として重要な髄床底象牙質は、C-factor の影響を強く受けるだけでなく、的確な接着手技の難しさも加わり、堅固な接着が獲得しにくい<sup>1)</sup>。本研究では、臨床を想定した規格化 1 級型コア用窩洞(c-value : 4.2)に対し、代表的な 3 種市販レジンコアシステムによる築造処置を行い、髄床底象牙質に対する微小引張接着強さ ( $\mu$ -TBS) を測定し、その接着実態について評価検討した。

**【材料および方法】** 被験歯には、日本歯科大学生命歯学部倫理審査委員会の承認(NDU-T2019-32)を得て 0.1%チモール水溶液中に保存したヒト抜去健全下顎第一大臼歯 30 本を用いた。まず被験歯の規格化植立後に髄腔開拓を行い、通法に従った根管充填を経て、窩洞形成器と規格化窩洞模型の併用によって、Fig. 1 に示す規格化 1 級型コア用窩洞を形成した。レジンコアシステムとしては、Prim&Bond Universal と Self-Cure Activator の混和液によって前処理する core-X flow (CX、Dentsply Sirona)、Clearfil Universal Bond Quick ER 併用による Clearfil DC Core Auto mix ONE (DC、Kuraray Noritake Dental) およびセルフエッチングボンド A 液・B 液の混和液にて前処理する GC Unifil Core EM (UC、GC) を選択した。試料の作製は、製造者指定の歯面前処理を経て、窩洞内壁全面へのコア材一層塗布(窩洞底部厚さ 1.0 mm)、光照射を行った。ついで厚さ 2.0 mm  $\times$  2 回の水平的分割積層充填、各充填層への光照射によってコア築造を終えた。これら試料の 37°C 水中 24 時間保管後に、4 回の切断を行い、1 修復試料から髄床底象牙質を含む断面積 1.0 mm<sup>2</sup> のビーム状試料 1 片の調整を経て、 $\mu$ -TBS 値 (n=10) を測定した。得られた値は、等分散検定後に、一元配置分散分析、Tukey の検定、メジアンランク法による Weibull 分析によって統計学的解析を行った。

**【成績】** Fig. 2 に、3 種レジンコアシステム間の髄床底象牙質に対する平均  $\mu$ -TBS 値の違いを示す。分析の結果、レジンコアシステムの違いは  $\mu$ -TBS 値に有意な影響を与えており、3 種システム値は UC  $\leq$  CX  $\leq$  DC の順に大きく、DC は UC より有意に大きな値を示した。Fig. 3 に、3 種システム間の Weibull 分析によって得た帰帰直線、Weibull 係数(Wm) および累積破壊確率 10%における推定破壊応力値(PF10)の違いを示す。その結果、DC の Wm 値は UC より有意に大きな値を示し、また DC の PF10 値は CX ならびに UC より有意に大きな値を示した。

**【考察】** 接着の量的評価として捉えることができる平均  $\mu$ -TBS 値に対する分析によって、CX と DC による築造処置は UC を用いた場合に比べ、同等または有意に大きな接着強さを獲得していた。また、接着の質的評価として捉えることができる Wm に基づく接着信頼性の観点において、DC は UC より有意に優れ、また PF10 による接着耐久性において、他の 2 システムより長けていることが判明した。前処理液の接着機能性モノマーに注目すると、UC では 4-MET を、CX と DC では MDP を含有しており、髄床底象牙質への接着強さ獲得に際しての MDP 有効性が推察できた。さらに、DC には親水性アミド系モノマーが、CX では親水性と疎水性を 1 つの分子レベルに組み入れたモノマーが配合されており、これら新規モノマーの導入が接着信頼性・耐久性に少なからず影響していると考えられる。加えて、引張試験後の破断面様相は、システムにかかわらず界面破壊が全試料数の 90%以上を占めていた。したがって、髄床底象牙質とレジンコア材との界面に、接着破壊の起点となる最弱部が存在することが示唆された。以上から、今回検討した C-factor の影響を強く受けると考えられる症例を含め、レジンコアシステム活用の築造処置に際しては、予後を大きく左右する coronal leakage 等を抑止する“堅固な接着一体化”を促す手技や新たな器材の探究が求められる。

**【結論】** 代表的な 3 種市販レジンコアシステムによる築造処置を行った 1 級型コア用窩洞の髄床底象牙質における接着実態は、量的・質的観点において、用いるレジンコアシステムによる影響を受けていた。

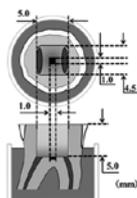


Fig. 1 Dimension of standardized class 1 type core cavity and  $\mu$ -TBS measuring area

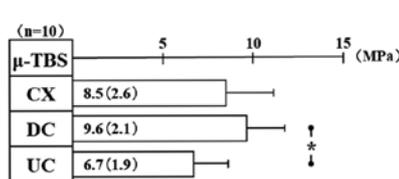


Fig. 2 Difference in mean  $\mu$ -TBS to pulp chamber floor dentin among three resin core systems

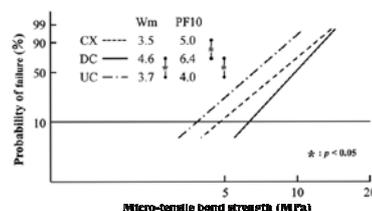


Fig. 3 Difference in Wm and PF10 values based on  $\mu$ -TBS to pulp chamber floor dentin among three resin core systems

本研究の一部は、JSPS 17K11719 の助成を受けた。

1) 小川信太郎, 柵木寿男, 奈良陽一郎. レジンコアシステム応用のコンポジットレジン直接修復における接着実態. 接着歯学 2013;31 : 175-190.

## 唾液汚染除去法の違いがレジンセメントの歯質接着性に及ぼす影響

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1)</sup>, 総合歯学研究科生体工学研究部門<sup>2)</sup>, 岩崎歯科医院<sup>3)</sup>  
○石井 亮<sup>1)</sup>, 笠原悠太<sup>1)</sup>, 廣兼榮造<sup>1)</sup>, 左 敏愛<sup>1)</sup>, 高見澤俊樹<sup>1,2)</sup>, 辻本暁正<sup>1,2)</sup>, 宮崎真至<sup>1,2)</sup>,  
岩崎圭祐<sup>3)</sup>

### Influence of Cleaning Methods on Bond Performance to Saliva Contaminated Tooth Substrate

Department of Operative Dentistry<sup>1)</sup>, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center<sup>2)</sup>,

Nihon University School of Dentistry

○ISHII Ryo<sup>1)</sup>, KASAHARA Yuta<sup>1)</sup>, HIROKANE Eizo<sup>1)</sup>, HIDARI Toshie<sup>1)</sup>, TAKAMIZAWA Toshiki<sup>1,2)</sup>, TSUJIMOTO  
Akimasa<sup>1,2)</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2)</sup>, IWASAKI Keisuke<sup>3)</sup>

#### 【研究目的】

CAD/CAM システムの進歩によって、簡便かつ精度の高い審美修復が可能となっている。また、様々な審美修復材料を使用することでその臨床応用範囲も広がっている。一方、審美修復に用いる材料の多くは脆性材料であるため、これらの修復物を口腔内で長期間機能させるためには優れた機械的性質および接着性を具備するレジンセメントの使用が必須となる。しかし、修復物装着時に生じる修復物内面あるいは被着歯面への唾液汚染は、レジンセメントの接着阻害因子となり、接着性は低下する。唾液汚染が生じた修復物内面への処理法に関しては、汚染除去法も含めてこれまで多くの報告があるものの、被着歯面に生じた汚染に対しては、簡便かつ効果的な処理法は確立していないのが現状である。

そこで演者は、レジンセメントの接着性に関する研究の一環として、被着歯面に唾液汚染が生じた際の汚染除去法について検討した。すなわち、唾液汚染が生じた被着歯面あるいは汚染を除去した後の表面自由エネルギーを測定するとともに剪断接着強さ測定からレジンセメントの歯質に対する接着性について検討した。また、考察資料として、その表面の走査電子顕微鏡 (以後、SEM) 観察を行った。

#### 【材料および方法】

供試したレジンセメントは、パナビア V5 (クラレノリタケデンタル) を用いた。唾液汚染後の表面処理剤としてカタナクリーナー (KC, クラレノリタケデンタル), Ultra-Etch (UE, Ultradent) および Multi Etchant (ME, ヤマキン) を使用した。

#### 1. 接着強さの測定

接着試験用試片の製作に際して、ウシ下顎前歯歯冠部を常温重合レジンに包埋し、エナメル質あるいは象牙質平坦面を耐水性 SiC ペーパー# 320 を用いて研削し、被着歯面とした。これらの被着歯面に対し、ヒト唾液を 10  $\mu$ l 滴下してこれを汚染面とした。汚染面に表面処理を施さず測定を行ったものを未処理面とした。汚染面の表面処理法は、KC 処理、UE 処理もしくは ME 処理の、合計 3 条件とした。各被着歯面に対し歯面処理を行った後、内径 2.4 mm、高さ 2 mm の円柱状ステンレス金型にセメントペーストを充填し、接着試験用試片とした。これらの試片を 37  $^{\circ}$ C 精製水中に 24 時間保管後、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いてクロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件で剪断接着強さを測定した。なお、ヒト唾液の使用に関しては、本学倫理委員会の審査を経て承認を得ている (倫許 2019-12)。

#### 2. 表面自由エネルギーの測定

接着試験用試片と同様に調整した試片を全自動接触角計 (DM500, 協和界面科学) に静置し、測定によって、得られた接触角から拡張 Fowkes の理論式を用いて、表面自由エネルギーを算出した。

#### 3. SEM 観察

表面処理後の歯質表面における形態的な検討を行うため、通法に従って試片を製作し、SEM を用いて加速電圧 10 kV の条件で観察した。

#### 【成績および考察】

得られた接着強さ試験の結果から、その接着強さは唾液汚染の除去を行った条件においても、これを行わない条件に比較して有意に高い値を示した。表面処理後の表面自由エネルギーは、汚染面と比較していずれの条件においても有意に高い値を示し、また、表面処理法の違いによって異なる傾向を示した。

#### 【結論】

唾液汚染された歯質に対するレジンセメントの接着強さは、汚染除去により向上した。また、唾液汚染された歯質の表面自由エネルギーは、汚染面に対する表面処理によって上昇することが判明した。

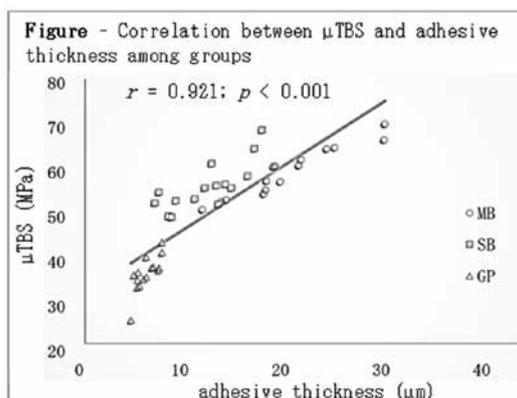
## Thickness and mechanical properties of universal adhesives can affect their bond strength to dentin

Hokkaido University, Graduate School of Dental Medicine, Dept. of Restorative Dentistry  
 ○Alam Arefin, Islam Rafiqul, Rime Shamme Akter, Islam Md Refat Readul, Mariko Matsumoto,  
 Shuhei Hoshika, Chiharu Kawamoto, Takatsumi Ikeda, Toru Tanaka, Monica Yamauti,  
 AFM Almas Chowdhury, Hidehiko Sano

The purpose of this study was to evaluate the effects of thickness and mechanical properties on the dentin bond strength of a two-step self-etch adhesive: Clearfil Megabond 2 (MB; Kuraray Noritake, Osaka, Japan), and two universal adhesives: Scotchbond Universal Adhesive (SB; 3M Oral Care, Neuss, Germany), and G-Premio Bond (GP; GC, Tokyo, Japan). The use of extracted human teeth in this study was approved by the local Ethics Committee (protocol#2018-9). Eighteen sound human maxillary premolars were cut to expose flat dentin surface, ground with regular-grit diamond burs, and then randomly assigned to three groups (n=6) based on the adhesives: MB, SB, and GP. The adhesives were then applied as per the manufacturers' instructions, light cured for 10 s, followed by build-up with composite resin (Clearfil AP-X, Kuraray Noritake, Osaka, Japan). The teeth were then stored in distilled water at 37°C for 24 h. Five bonded teeth from each group were sectioned to 1 mm<sup>2</sup> resin-dentin beams and were subjected to microtensile bond strength ( $\mu$ TBS) test. Two fractured ends of each beam were embedded in epoxy resin, polished and the adhesive thicknesses were measured under SEM (x500). The remaining bonded teeth were sectioned into 1.5 mm thick slabs and were subjected to an ultramicrohardness tester to measure the Young's modulus of adhesive. One-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test showed that the  $\mu$ TBS values of both MB and SB were significantly higher than GP (Table;  $p < 0.001$ ). Welch's t-test followed by Dunnett's T3 test revealed that the adhesive thickness and Young's modulus values were significantly different from each other ( $p < 0.001$ ). The highest thickness was obtained by MB and lowest by GP, whereas, the Young's modulus was found highest in case of GP and lowest in MB. Spearman's rank-order test among the groups showed strong positive ( $r = 0.921$ ) and significant ( $p < 0.001$ ) correlation between adhesive thickness and  $\mu$ TBS (Figure). In this study, thicker adhesive layer and lower Young's moduli yielded higher bond strength values signifying the need for applying universal adhesives in thicker layers.

Groups	Mean values (SDs)		
	$\mu$ TBS (MPa)	Thickness ( $\mu$ m)	Young's moduli (GPa)
MB	60.1 (4.9) A	20.7 (4) A	5.3 (0.2) C
SB	56.9 (5.3) A	12.7 (3) B	5.9 (0.2) B
GP	37.4 (4) B	6.7 (0.4) C	7.8 (0.4) A

Different letters indicate statistically significant difference in columns.



## GLP-1 の膵外作用による歯周炎抑制についての検討

<sup>1</sup>愛知学院大学歯学部歯周病学講座、<sup>2</sup>愛知学院大学歯学部内科学講座

○澤田 憲孝<sup>1</sup>、足立 圭<sup>1</sup>、鈴木 佑基<sup>1</sup>、菊池 毅<sup>1</sup>、三谷 章雄<sup>1</sup>、松原 達昭<sup>2</sup>、成瀬 桂子<sup>2</sup>

### Suppression of periodontitis by extrapancreatic function of GLP-1

Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, Nagoya, Japan  
Department of Internal Medicine, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, Nagoya, Japan  
○Noritaka Sawada<sup>1</sup>, Kei Adachi<sup>1</sup>, Yuki Suzuki<sup>1</sup>, Takeshi Kikuchi<sup>1</sup>, Akio Mitani<sup>1</sup>, Tatsuaki Matsubara<sup>2</sup>,  
Keiko Naruse<sup>2</sup>

【目的】歯周炎は糖尿病合併症の1つであり、糖尿病の血糖コントロールは歯周炎の進行抑制に重要である。糖尿病治療薬の一つである Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は血糖降下作用に加え抗炎症性作用及び間接的骨吸収抑制作用を含む多様な膵外作用が報告されており、歯周炎に対し歯肉の炎症及び歯槽骨吸収抑制を介して治療効果を有する可能性がある。そこで本研究では GLP-1 受容体作動薬 (Liraglutide) の歯周炎に対する抗炎症効果及び歯槽骨吸収の抑制作用について検討した。

【方法】1. 実験的歯周炎の惹起：5週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットの顎第二臼歯歯頸部全周に縫合用ナイロン糸を結紮しデンタルブラークを停滞させ、実験的歯周炎を惹起した。2. Liraglutide の投与：正常ラット、歯周炎ラットの半数に結紮と同日より Liraglutide (0.03mg/kg/day) を2週間投与した。3. 歯周組織の遺伝子発現及び病理組織学的検討：結紮から2週間後の歯肉における炎症性サイトカイン遺伝子発現を real-time PCR 法にて解析、また歯肉の病理組織解析及び抗 iNOS 抗体による免疫組織染色を行った。4. 歯槽骨吸収の検討：臼歯部上顎骨を採取し、micro CT で撮影後、吸収が最も進行した位置からセメント-エナメル境までの距離を測定し骨吸収程度を評価した。5. GLP-1 の抗炎症作用の検討：THP-1 細胞を用いて LPS 誘導炎症性サイトカイン遺伝子発現に対する GLP-1 の抑制効果及びその経路について、real-time PCR 法にて解析した。

【結果】1. 歯周炎評価：歯周炎ラットでは、歯肉における炎症性細胞浸潤が増加しており、また TNF- $\alpha$ および iNOS 遺伝子発現の有意な増加を認めた。Liraglutide は歯肉の炎症性細胞浸潤を減少させるとともに、TNF- $\alpha$ および iNOS 遺伝子発現を有意に減少させた。2. 歯槽骨評価：歯周炎ラットでは有意な歯槽骨吸収を認めたが、Liraglutide の投与により抑制された。3. THP-1 細胞における GLP-1 の効果：GLP-1 は LPS 誘導 TNF- $\alpha$ 遺伝子発現を有意に抑制したが、その抑制効果は cAMP 阻害薬及び PKA 阻害薬の添加により解除された。

【考察】Liraglutide の投与は、歯肉の炎症及び歯槽骨吸収を抑制することより歯周炎治療に有効であることが示唆された。

動物実験承認番号：AGUD 318 号

CD40-CD40L を介した歯根膜細胞とセメント芽細胞間の相互作用が  
歯周組織のリモデリングに及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)  
○山本 優、藤原千春、榎本梨沙、松本昌大、村上伸也

The Effect of interaction between periodontal ligament cells and cementoblast cells  
via CD40-CD40L on remodeling of periodontal tissues

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry  
○Yu Yamamoto, Chiharu Fujihara, Risa Masumoto, Masahiro Matsumoto, Shinya Murakami

【目的】腫瘍壊死因子に属するCD40リガンド (CD40L) は、主に活性化したT細胞上に発現しており、抗原提示細胞や線維芽細胞上に発現しているCD40と相互作用することで様々な免疫応答を誘導することが知られている。一方、歯周組織では、矯正力のようなメカニカルストレスが負荷されると、牽引側のセメント芽細胞上に、CD40Lの発現が誘導されることが報告されている。同細胞上のCD40Lは、隣接する歯根膜細胞上に発現しているCD40と相互に作用すると考えられるが、CD40-CD40Lを介したこれら細胞間の相互作用が歯周組織のリモデリングにどのような機能を及ぼすのかに関しては未だ明らかではない。そこで本研究では、*in vitro*実験系を用いて、歯根膜細胞とセメント芽細胞間にCD40-CD40Lの相互作用を誘導し、これら分子が歯周組織のリモデリングに及ぼす影響について検討を行った。

【材料と方法】ヒトCD40L-GFP発現ベクターを遺伝子導入したCD40L発現ヒトセメント芽細胞 (CD40L-HCEM) を作成した。また、コントロール細胞として、GFP導入ヒトセメント芽細胞 (GFP-HCEM) を作成した。CD40L-HCEMあるいはGFP-HCEMとヒト歯根膜細胞 (HPDL) を1~3日間共培養し、細胞生存能、細胞増殖能、細胞外マトリックス (ECM) 産生能、及び硬組織形成細胞への分化能について、フローサイトメトリー解析 (ヨウ化プロビジウム (PI陽性細胞数))、BrdUアッセイ、及びReal-Time PCR法 (ECM関連遺伝子と骨関連遺伝子の発現) を用いてそれぞれ検討した。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て実施された。(承認番号: 3928-2)

【結果】フローサイトメトリー解析の結果、CD40L-HCEMとHPDLの共培養群では、GFP-HCEMとHPDLを共培養したコントロール群と比較して、PI陽性細胞の割合が有意に減少することが明らかとなった。BrdUアッセイの結果、CD40L-HCEMとHPDL共培養群では、コントロール群と比較して細胞増殖活性の有意な上昇を認めた。Real-Time PCR解析の結果、CD40L-HCEMとHPDL共培養群では、コントロール群と比較して、ECM関連遺伝子であるI型コラーゲン (*Coll1a1*)、*Decorin*、*Periodontal ligament-associated protein-1 (PLAP-1)* のmRNA発現が有意に上昇した。さらに、骨関連遺伝子については、CD40L-HCEM共培養群において、*Runt-related transcription factor 2 (Runx2)* mRNA発現の有意な上昇を認めた。一方、アルカリフォスファターゼ (*ALP*) やオステオカルシン (*OC*) mRNA発現についてはCD40L-HCEMとHPDLの共培養群とコントロール群の間で有意な差を認めなかった。

【結論】歯根膜細胞とセメント芽細胞間に誘導されるCD40-CD40L相互作用は、細胞の生存・増殖・ECM産生を促進すると共に、これら細胞の硬組織形成細胞への分化の初期に作用することで、歯周組織のリモデリングを促進する働きを持つことが示唆された。

## 膵β細胞 Xaf1 が膵島機能および糖尿病発症に及ぼす影響

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

### The effects of Xaf1 on pancreatic β cell function and diabetes

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

○Yuki Nishimura, Misaki Iwashita, Masato Hayashi, Takanori Shinjo, Tomomi Sano,  
Akiko Yamashita, Fusanori Nishimura

#### 【目的】

2型糖尿病患者の膵島ではマクロファージ等の炎症性細胞浸潤が観察されているものの、炎症性細胞による膵島機能や膵β細胞減少への影響は明らかではない。演者らは先行研究から、metabolic endotoxemia (代謝性内毒素血症)によって活性化したマクロファージが monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) などにより膵島に呼び寄せられ interferon β (IFNβ) を分泌し、膵β細胞でのアポトーシス促進分子として知られる X-linked inhibitor of apoptosis-associated factor 1 (Xaf1) 発現が亢進することで、膵β細胞のアポトーシスが誘導されることを明らかにした (Tsuruta M et al., Horm Metab Res, 2018)。

膵島での炎症が増悪した結果、膵β細胞のインスリン分泌量が低下し、糖尿病が進行する可能性が考えられる。すなわち、歯周病に代表される軽微な炎症は、短期的には脂肪組織炎症の増悪を介してインスリン感受性の低下をもたらすが、長期的視点で考えると、膵β細胞機能そのものにも影響を与える可能性が示唆された。そこで、本研究では膵β細胞 Xaf1 が膵島機能および糖尿病の病態に及ぼす影響について検証した。

#### 【材料・方法】

- ①RAW264.7 マウスマクロファージ細胞株をパルミチン酸 (100 μM) 刺激し、IFNβ 発現への影響を検証した。
  - ②C57BL/6 マウスにカロリー比 40%高脂肪食を 8 週間負荷した際の膵臓組織における Xaf1 発現への影響を通常食負荷マウスと比較検証した。
  - ③膵β細胞特異的に Xaf1 を過剰発現させたマウスを作製し、糖負荷試験、インスリン負荷試験を行い、耐糖能とインスリン分泌、全身のインスリン抵抗性について野生型マウスと比較した。また、膵臓組織中のグルコースの取込みや利用に関わる遺伝子、膵β細胞マーカー、アポトーシス関連の遺伝子発現解析、膵臓組織染色による解析を行い、糖尿病発症に及ぼす影響を検証した。
- \*\*本研究は九州大学動物実験委員会、遺伝子組換え実験安全委員会の承認のもと実施した (承認番号: A30-118-2, 1-7)。

#### 【結果及び考察】

RAW264.7 マクロファージ細胞株をパルミチン酸 (100 μM) で刺激すると IFNβ 遺伝子発現が有意に亢進した。カロリー比 40%高脂肪食を 8 週間負荷したマウスでは、通常食負荷に比べ、膵臓組織における Xaf1 タンパク発現の亢進をみとめたことから、in vitro, in vivo の両者の系で肥満により Xaf1 発現が亢進する可能性が示唆された。

インスリンプロモーター下流に Xaf1 遺伝子を組み込んだベクターを構築し、膵β細胞特異的に Xaf1 を発現させたマウスでは、野生型マウスと比較して Xaf1 タンパクが高発現することを確認した。マウス膵β細胞における Xaf1 が膵島機能および糖尿病発症に及ぼす影響とあわせて報告する。

# 取り下げ

## 高血糖状態が歯肉上皮の細胞間接着に及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)<sup>1</sup>  
大阪大学歯学部附属病院 口腔総合診療部<sup>2</sup>

○生川由貴<sup>1</sup>、柏木陽一郎<sup>1</sup>、森本千晶<sup>1</sup>、沢田啓吾<sup>1</sup>、三浦治郎<sup>2</sup>、竹立匡秀<sup>1</sup>、村上伸也<sup>1</sup>

### The inter cellular adhesion of gingival epithelium in hyperglycemic condition

<sup>1</sup>Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

<sup>2</sup>Osaka University Dental Hospital Division for Interdisciplinary Dentistry

○Yuki Narukawa<sup>1</sup>, Yoichiro Kashiwagi<sup>1</sup>, Chiaki Morimoto<sup>1</sup>, Keigo Sawada<sup>1</sup>, Jiro Miura<sup>2</sup>,  
Masahide Takedachi<sup>1</sup> and Shinya Murakami<sup>1</sup>

【目的】歯周病と糖尿病を関連づける研究報告は多くなされており、現在、歯周病は糖尿病の6番目の合併症と位置付けられている。糖尿病は血糖コントロール不良により組織が高血糖状態になり、微小循環障害、免疫細胞の不活性化がおこり、様々な病態を引き起こすと考えられている。近年、高血糖状態が上皮の物理的バリアに影響を及ぼしているとの報告がなされてきたが、歯肉上皮への影響については報告がない。そこで本研究では、糖尿病の病態である高血糖状態がヒト歯肉上皮細胞および糖尿病モデルマウスの歯肉上皮組織における接着分子の発現に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】ヒト歯肉上皮細胞(epi4)を高血糖条件(Glucose 30mM)で14日間培養し、細胞間接着のTight junction、Adherence junctionに関する遺伝子及びタンパク発現の変化について、Real-time PCR法、Western blot法にて検討し、細胞免疫染色法でも観察した。また、高血糖状態で長期培養を行った細胞同士の細胞間隙の形態変化について、透過型電子顕微鏡にて観察を行った。上皮細胞間の透過性に対する高血糖の影響を検討するために、トランスウェルにて細胞培養後、蛍光標識した分子量4kDのFITC-dextranを上槽のインサート内に添加し、下槽への浸出量を蛍光測定した。より歯周組織に近い状態での影響を検討するために、トランスウェルを用いたエアリフト培養を駆使し、歯肉上皮細胞の3次元培養を行った。細胞をインサート内のメンブレン上に播種し、2日後インサート内の培地を除去することで、メンブレン上の細胞の一方を気相にして培養を行った。高血糖刺激と培地交換を週に2回行い、培養30日目にメンブレンごと細胞を回収し、HE染色にて観察した。高血糖が細胞増殖に及ぼす影響の有無を確認するために、CellTiter-Glo Assay kitを用いて、生細胞のATP量を発光強度にて定量測定し、歯肉上皮細胞における細胞増殖能を検討した。一方、12週齢のcontrol mouseと糖尿病マウスであるdb/db mouseの歯肉上皮組織を採取し、Real-time PCR法にて細胞間接着分子の発現変化について検討を行った。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-27-022-0)。

【結果と考察】歯肉上皮細胞を高血糖条件下で長期間培養することでClaudin-1、E-cadherinといったTight junctionやAdherence junctionを構成する接着分子のmRNA発現の有意な低下が認められ、同タンパク発現についても低下が認められた。細胞免疫染色ではClaudin-1、E-cadherinの発現低下が認められた。高血糖状態で培養した細胞を電子顕微鏡にて観察したところ、細胞間隙の不定形な構造が認められた。また、デキストラン透過実験の結果、高血糖条件下で細胞間の透過性の亢進傾向が認められた。エアリフトにて立体培養を行った組織をHE染色し観察したところ、エアリフト培養を30日間行くと細胞が重層していることが確認され、day0と比較しday30の高血糖条件下では積層構造の緊密さが失われ、重層した厚みの異常が認められた。細胞増殖能については高血糖条件下で有意な差は認められず、高血糖による細胞増殖への影響はなかった。*in vitro*においてもヒト歯肉上皮細胞と同じくClaudin-1の他、ZO-1、TricellulinのmRNA発現の有意な低下が認められた。

【結論】糖尿病の病態は歯肉上皮細胞の接着分子の発現が低下することで細胞間の結合が減弱し、上皮の物理的バリア機能が低下する。それにより、病原性細菌が侵入しやすくなり歯周病の悪化につながる事が示唆された。今後、高血糖状態が歯肉上皮細胞間の接着を低下させる分子機構の詳細を解析する予定である。

### S-PRG 溶出液の濃度が多菌種バイオフィームへの抗菌性に与える影響

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<sup>1</sup>,  
口腔科学講座 微生物学分野<sup>2</sup>, 組織学分野<sup>3</sup>, ACTA<sup>4</sup>

○富山 潔<sup>1</sup>, 石澤将人<sup>1</sup>, 渡辺清子<sup>2</sup>, 河田 亮<sup>3</sup>, 高橋 理<sup>3</sup>, 浜田信城<sup>2</sup>, Exterkate R.A.M<sup>4</sup>, 向井義晴<sup>1</sup>

#### Antibacterial effects of S-PRG eluate with different concentrations on polymicrobial biofilms

<sup>1</sup>Dep. of Oral Interdisciplinary Medicine, Div. of Restorative dentistry, Dep. of Oral Science, Div. of<sup>2</sup>Microbiology,<sup>3</sup>Histology,  
Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University, Div. of Operative Dentistry,

<sup>4</sup>Dep. of Preventive Dentistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA)

○ TOMIYAMA Kiyoshi<sup>1</sup>, ISHIZAWA Masato<sup>1</sup>, WATANABE Kiyoko<sup>2</sup>, KAWATA Akira<sup>3</sup>,  
TAKAHASHI Osamu<sup>3</sup>, HAMADA Nobushiro<sup>2</sup>, EXTERKATE R.A.M<sup>4</sup>, MUKAI Yoshiharu<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

本研究の目的は、24時間培養多菌種バイオフィームの細菌叢に対して、様々な濃度のS-PRG溶出液による処理がどのような影響を及ぼすのかを検討することである。

#### 【実験材料および方法】

[多菌種バイオフィームの形成]: バイオフィーム形成用材料には直径 12 mm 厚さ 150 μm のガラス円板 (Menzel, Braunschweig, Germany) を用いた。培養には 1 被験者から採取した刺激唾液を 50 倍希釈となるように buffered McBain 2005 (0.2 %スクロース, 50 mM PIPES 含有) 培養液に混入後、培養液の交換を 10 時間の時点で 1 回行ない、24 時間嫌気培養 (CO<sub>2</sub>: 10 %, H<sub>2</sub>: 10 %, N<sub>2</sub>: 80 %, 37°C) によりバイオフィームを形成した (神奈川歯科大学 研究倫理審査番号 445)。実験群は ① 脱イオン水処理群 (cont), ② 0.2 %グルコン酸クロルヘキシジン群 (0.2C), ③ 10% に希釈した S-PRG 溶出液処理群 (10% S-PRG) ④ 20% S-PRG ⑤ 40% S-PRG ⑥ 80% S-PRG ⑦ 100% S-PRG の 7 群とし、24 時間培養後の PM バイオフィームに対し 15 分間の各処理を行なった (各群 n = 10)。

[実験 1] (1) 24 時間培養後のバイオフィームに対し 15 分間の各処理を行なった後、Cysteine Peptone Water にて洗浄して血液寒天培地に 4 日間培養し、実験終了時に生菌数の算定を行なった。(2) 各処理後、培養を継続し、処理から 48 時間の時点で生菌数の算定を行なった。[実験 2] 培養液交換時に使用済み培養液の pH を測定した。

[統計分析] 算出した生菌数および pH は One-way ANOVA および Tukey の検定により有意水準 5%にて統計学的分析を行ない、抗菌効果を比較検討した。

#### 【結果】

[実験 1] (1) 各処理直後においては、すべての処理群における生菌数 (CFU/ml) は非処理群と比較して有意に低かった (① cont:  $7.80 \times 10^8$ , ② 0.2C:  $1.32 \times 10^7$ , ③ 10% S-PRG:  $1.32 \times 10^8$ , ④ 20% S-PRG:  $9.20 \times 10^7$ , ⑤ 40% S-PRG:  $7.36 \times 10^7$ , ⑥ 80% S-PRG:  $5.84 \times 10^7$ , ⑦ 100% S-PRG:  $1.30 \times 10^7$ )。[実験 1] (2) 各処理後、培養を継続し、処理から 48 時間の時点で生菌数の算定を行なった結果、① cont:  $8.90 \times 10^8$ , ② 0.2C:  $1.79 \times 10^8$ , ③ 10% S-PRG:  $6.69 \times 10^8$ , ④ 20% S-PRG:  $5.26 \times 10^8$ , ⑤ 40% S-PRG:  $2.36 \times 10^8$ , ⑥ 80% S-PRG:  $1.87 \times 10^8$ , ⑦ 100% S-PRG:  $9.30 \times 10^7$  であり、cont 群の生菌数と、0.2C, 80%S-PRG および 100%S-PRG 群の生菌数間には有意差が認められた。

[実験 2] 処理直後における使用済培養液の pH は、cont に比較して他群で有意に上昇し (① cont: 4.2, ② 0.2C: 6.5, ③ 10% S-PRG: 5.5, ④ 20% S-PRG: 5.9, ⑤ 40% S-PRG: 6.2, ⑥ 80% S-PRG: 6.6, ⑦ 100% S-PRG: 6.8), その後 48 時間培養を継続すると、0.2C 群では pH が下降するものの 100% S-PRG 群の pH 下降は有意に抑制された (cont = 4.1, 0.2C = 5.2, 100% S-PRG = 5.9)。

#### 【考察】

S-PRG 溶出液から溶出されるイオン濃度に依存して抗菌効果が上昇することが示された。クロルヘキシジンは細菌細胞膜を破壊することにより抗菌効果を発揮することが報告されており、多菌種入りバイオフィーム中に含まれる細菌の細胞膜を破壊し、処理直後に生菌数を顕著に減らしたと考える。抗菌効果の持続性も報告されているが、その効果は、*S. mutans* に対して特異的であるとも報告されている。一方で S-PRG フィラーは、フィラーから溶出されたホウ酸イオンの抗菌効果が細菌の生菌数を減らすことに寄与し、さらに放出されたフッ化物イオンがバイオフィーム中の細菌から代謝される乳酸の抑制に寄与するとともに、ナトリウムイオンが低下した pH を持続的に緩衝したと考える。

#### 【結論】

S-PRG 溶出液は、多菌種入りバイオフィームの生菌数を抑制するだけでなく、pH の下降も持続的に抑制することから、持続性を兼ね備えた抗菌作用を有することが示唆された。

## フルオロジンクシリケートガラス配合グラスアイオノマーセメントの 長期水浸後の抗う蝕原性バイオフィルム効果

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔生命科学専攻口腔健康科学講座う蝕学分野  
○Naksagoon Traithawit, 大墨竜也, 永田量子, 長谷川泰輔, 竹中彰治, 野杵由一郎

### Effects of water aging on the anti-biofilm properties of a glass ionomer cement containing fluoro-zinc-silicate fillers

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics,  
Faculty of Dentistry & Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University

○NAKSAGOON Traithawit, OSUMI Tatsuya, NAGATA Ryoko, HASEGAWA Taisuke, TAKENAKA Shoji, NOIRI Yuichiro

**Objectives:** We have reported that a glass ionomer cement (GIC) containing fluoro-zinc-silicate fillers (Caredyne Restore; CD, GC corporation, Japan) remarkably inhibited *Streptococcus mutans* biofilm formation compared with a conventional GIC (Fuji VII; FJ, GC corporation, Japan) by interfering with bacterial adhesion at the 148<sup>th</sup> Meeting of the Japanese Society of Conservative Dentistry. However, the long-term anti-biofilm effects need to be determined, because the complex oral environment provides constant challenges to the GIC properties due to the water-aging, pH changes and temperature fluctuations. This study aimed to assess the effects of water aging for 3 weeks on anti-cariogenic biofilm properties.

**Materials and Methods:** The standardized discs of CD and FJ, 6 mm in diameter and 1.5mm in thickness, were fabricated. The specimens for water aging group were stored in sterilized water for 3 weeks at 37°C. The water was changed every 7 days. The disc just after the fabrication was served as the control. *S. mutans* UA159 biofilm was allowed to develop on the disc for 24 h at 37°C using a modified Robbins device flow-cell system. The morphological structure and the bacterial viability were analyzed using a confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM). The number of viable cells on the specimen was determined by colony forming units (CFU) counting.

The specimen was vertically sectioned and embedded in a chemically polymerizing resin. The elemental mapping of the zinc and fluoride ions at the biofilm-GIC interface was also performed and the difference before and after water aging was compared using a wavelength-dispersive X-ray spectroscopy electron probe microanalyzer (EPMA).

**Results and Discussion:** Without the water aging, morphological observation by SEM revealed that biofilm formation in the CD group was remarkably inhibited compared with the FJ group, exhibiting sparse biofilm clusters. Water aging allowed the increased biofilm development in both the CD and the FJ groups. However, the biovolume on the CD groups was smaller than that on the FJ group. Three dimensional reconstructed CLSM images using a LIVE/DEAD staining kit showed that the microorganisms in the biofilm developed on both the CD and the FJ groups were mostly viable. The extracellular polymeric substance images stained with rhodamine-B showed that water aging contributed to form a dense and complex biofilm in both the CD and the FJ groups. The viable cells on the sample were  $7.19 \pm 0.16$  for CD and  $7.54 \pm 0.75$  log CFU/mm<sup>2</sup> for FJ without water aging, respectively ( $p > 0.05$ ). Water aging increased the number of viable cells, revealing  $7.61 \pm 0.29$  for CD and  $7.53 \pm 0.27$  log CFU/mm<sup>2</sup> for FJ, respectively ( $p > 0.05$ ). These results indicated that anti-cariogenic biofilm properties of CD and FJ may reduce after longer aging time. Although the EPMA analysis showed that the concentrations of fluoride and zinc ions at the biofilm-GIC interface decreased due to aging procedure, CD still possessed high amount of fluoride and zinc ions even after the water aging for 3 weeks, indicating the sustained antimicrobial activity. FJ also possessed adequate fluoride ion even after water immersion, enabling the sustained release.

**Conclusion:** A GIC comprised of fluoro-zinc-silicate fillers showed superior anticariogenic biofilm property in comparison with a conventional GIC immediately after restoration. Water aging reduced the anti-biofilm activity after 3 weeks of storage in water. However, CD possessed the ability to release the fluoride and zinc ions even after 3 weeks following the restoration, expecting the anti-biofilm property to some extent.

## 根面う蝕のビッカース硬さと探針による牽引抵抗との関係

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座

○清水明彦

### The relation between Vickers hardness and tug back with a probe in caries lesions

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やhard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、抜去歯の根面う蝕を用いて、探針による牽引抵抗の有無とビッカース硬さとの関係を調べることである。

#### 【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)が認められる根面う蝕を有する歯10本を選んで、それらのう蝕面に計45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カ所で硬さを測定しその部の平均ビッカース硬さ(Hv)を求めた。次に牽引抵抗測定のために、臨床用探針(#23、YDM)の柄から針先部分を取り外し、牽引抵抗測定器(カコテクノス)のハンドピースのカンチレバーに取り付けた。この探針の先端部の曲率半径は40 $\mu$ m、幅は0.08mm、円錐角は20度である。探針の押し込み圧は100gfに設定し、1gf以上の牽引抵抗があれば検出できるように調整した。

牽引抵抗の測定は各小領域で5回とし、牽引抵抗の検出回数が4回以上なら「牽引抵抗アリ」、1回以下なら「牽引抵抗ナシ」、2～3回なら「牽引抵抗不定」とした。

#### 【成績】

「牽引抵抗アリ」と判定されたう蝕の87%(13/15う蝕)はビッカース硬さ(Hv)は2.4以下であり、「牽引抵抗ナシ」と判定されたう蝕では83%(19/23う蝕)がHv4.6～10.1であった。また「牽引抵抗不定」と判定されたう蝕の硬さはHv2.5～4.5であった。なお健全根面(セメント質)の平均硬さは10.7 $\pm$ 1.7Hv(n=10)であった。

#### 【考察】

探針の先端形状や押し込み圧などを規定して牽引抵抗の有無を調べれば、う蝕象牙質のビッカース硬さ(Hv)の範囲を推定できることが分かった。従来探針を引く抜くときに抵抗があれば“leathery”(実際のなめし皮の硬さは2～3Hv)と判定されてきたが、本研究の結果から、「牽引抵抗アリ」のう蝕のほとんどが硬さは2.4Hv以下であることが明らかとなった。またこれまで、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”とされてきたが、本研究から健全根面の約半分の硬さであるHv4.6以上なら「牽引抵抗ナシ」と判定されたことから、牽引抵抗ナシを持って健全根面と同程度の硬さであるとは言えないことも明らかとなった。

本研究の結果がどのように臨床応用できるかを考えると、例えばベースラインで「牽引抵抗アリ」(2.4Hv以下)であった根面う蝕にフッ化物塗布などの介入を加えた結果「牽引抵抗ナシ」(4.6～10.1Hv)になったとすれば、そのう蝕は介入により2～4倍(4.6Hv/2.4Hv=1.9、10.1Hv/2.4Hv=4.2)程度は硬くなったと推定される。ただこの牽引抵抗の有無を調べる方法の限界は、う蝕象牙質の硬さ値そのものを知ることができないことである。

#### 【まとめ】

先端形状が規定された探針を一定の力でう蝕象牙質に押し当て、引き離すときの抵抗(牽引抵抗)の有無を調べれば、そのう蝕象牙質の硬さの範囲を推定できることが分かった。即ち、「牽引抵抗アリ」と判定されたう蝕の87%はビッカース硬さ(Hv)は2.4以下であり、「牽引抵抗ナシ」と判定されたう蝕の83%はHv4.6～10.1であった。一方「牽引抵抗不定」と判定されたう蝕の硬さはHv2.5～4.5であった。

## 各種歯磨剤が根面齲蝕の脱灰抑制および再石灰化に及ぼす影響

日本大学歯学部保存学教室修復学講座

○白土康司, 黒川弘康, 杉村留奈, 須田駿一, 宮崎真至, 武田光弘, 森竹宣之, 日野浦 光

### Effect of Various Tooth Paste on Demineralization and Remineralization of Root Surface lesion

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry

○SHIRATSUCHI Koji, KUROKAWA Hiroyasu, SUGIMURA Runa, SUDA Shunichi, MIYAZAKI Masashi, TAKEDA Mitsuhiro, MORITAKE Nobuyuki, HINOURA Ko

#### 【研究目的】

根面齲蝕への対応は、実質欠損を生じる以前の初期段階で積極的に再石灰化療法を行い、その進行を抑制することが重要とされている。最近では、各メーカーから根面齲蝕のリスクコントロールに主眼を置いた高濃度フッ化物配合歯磨剤も市販されている。そこで、根面齲蝕モデルに各種歯磨剤を応用した際の、脱灰抑制ならびに再石灰化促進効果について、光干渉断層画像法 (Optical Coherence Tomography, OCT) および微小硬さ測定器を用いて検討した。

#### 【材料および方法】

フッ化ナトリウム濃度 1450 ppm で fTCP 配合のクリンプロ歯磨きペースト F1450 (以後、クリンプロ, 3M ヘルスケア), フッ化ナトリウム濃度 1450 ppm で PCA 配合のチェックアップルルートケア (以後、ルートケア, ライオン) およびフッ化ナトリウム濃度 1450 ppm のチェックアップスタンダード (以後、スタンダード, ライオン) を用いた。

#### 1. 根面齲蝕モデルの製作

ウシ抜去歯根面唇側面象牙質をブロックとして切り出し、耐水性 SiC ペーパーを用いて調整した。この象牙質ブロックの歯髄側および側面をワックスで被覆した試片を、0.1 M 乳酸緩衝液 (pH 4.75) に 10 分間浸漬した後、精製水を用いて水洗、乾燥し、人工唾液中に保管した。この操作を 1 日 2 回、28 日間行い、根面齲蝕モデルを作製した。

#### 2. OCT による最大ピーク強度値および $1/e^2$ 幅の測定

根面齲蝕モデルを以下に示す条件で保管した際の状態変化を、OCT を用いて非破壊に検討した。

- 1) 未処理群：根面齲蝕モデルを乳酸緩衝液に 10 分間浸漬した後、水洗、乾燥し、人工唾液中に保管。この操作を 1 日 2 回、28 日間継続した。
- 2) 処理群：各歯磨剤 0.1g を荷重 100 gf, マイクロモーターの回転数を無荷重の状態 で回転数 1,000 rpm とし、歯面研磨清掃用ブラシ (PTC ソフトブラシ, ジーシー) を用いて根面齲蝕モデルに 10 秒間塗布した。これらの試片を実験期間中 1 日 2 回、乳酸緩衝液に 10 分間浸漬した後、水洗、乾燥し、人工唾液中に保管した。なお、歯磨剤の塗布は、実験開始時および実験開始から 1 週ごとに 21 日まで行った。

Time-domain 型 OCT 装置 (モリタ東京製作所) の A-scan mode で得られた信号強度分布を解析、最大ピーク強度値 (dB) を検出するとともに、最大ピーク強度値が 13.5% に減少した際の信号強度が含まれる範囲から波形幅 ( $1/e^2$  幅,  $\mu\text{m}$ ) を求めた。なお、測定時期としては、根面齲蝕モデル製作時および実験開始 0, 7, 14, 21 および 28 日後とした。

#### 3. スラブ硬さの測定

OCT による信号強度分布測定に用いた試片について、微小硬さ測定装置 (DMH-2, 松沢) を用い、荷重 0.25 N, 荷重保持時間 30 秒の条件で行った。なお、スラブ硬さの測定部位は、試片の中央部付近 5 点とし、その平均値をその試片における各測定時期のスラブ硬さとした。

#### 【成績および考察】

OCT による最大ピーク強度値は、未処理群で実験期間の経過に伴って上昇したのに対し、処理群では低下し、その程度はクリンプロおよびルートケアで大きかった。また、実験開始 28 日後のレーザ顕微鏡像では、未処理群で象牙細管の露出が観察されたのに対し、処理群ではいずれの歯磨剤においても象牙細管を覆う析出物が観察され、その程度はクリンプロおよびルートケアで顕著であった。本研究で用いた OCT は、近赤外線を歯質に照射してその表層および内部で反射あるいは散乱した光の様相を光学干渉計によって捉えるものである。したがって、未処理群では象牙質の脱灰が進行することで表面が粗糙化し、照射光線の散乱が大きくなることで最大ピーク強度値が上昇したのに対し、処理群では析出物の存在によって脱灰が抑制され、象牙質表面での照射光線の散乱が少なくなり、最大ピーク強度値が低下したものと考えられた。

#### 【結論】

適切な歯磨剤の使用は、根面齲蝕モデル象牙質の脱灰を抑制し再石灰化を促進することが示された。

## リン酸化オリゴ糖カルシウムと塩基性ペプチドが初期う蝕に与える効果

江崎グリコ株式会社 健康科学研究所

○田中智子, 朝熊弘樹, 滝井寛, 釜阪寛, 栗木隆

### Effect of phosphoryl oligosaccharides of calcium and basic peptide on subsurface lesions

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

○Tomoko Tanaka, Hiroki Asakuma, Hiroshi Takii, Hiroshi Kamasaka, Takashi Kuriki

#### [研究目的]

初期う蝕の再石灰化の促進策はう蝕予防法の重要な1つ対策であり, 歯質強化ひいては歯の寿命延伸に繋がる手法である。従来, 唾液が有する再石灰化反応は非常に緩やかであり, ストレス, 食生活の乱れ, 加齢, 疾患等で口腔内環境が悪化することでう蝕リスクが容易に高まる。従来はフッ化物による再石灰化促進, 耐酸性の付与により予防してきた。しかし, 寿命の延伸に伴い, 歯の健康寿命の延伸が一層求められている。従来のFの利用に加えて, 新たな施策が望まれている。本研究では, 歯の構成元素であるカルシウムとリン酸に加えて, フッ化物を供給する際に, それらの再石灰化を著しく加速させる新しい技術開発に成功した。

#### [材料および方法]

①表層下脱灰病巣サンプル調整: 抜去ウシ歯冠部よりエナメル質ブロックを切り出し (約 10 mm×10 mm) レジン樹脂に包埋。新しいエナメル質面を露出させ, その 1/3 を被覆して健全部位とし, 二層ゲル法により脱灰処理を行った後, 脱灰部位の 1/2 を被覆し脱灰部位とした。残りの露出部位である脱灰部位を再石灰化処理部位とした。

② 再石灰化処理: 擬似唾液溶液をベースにカルシウム・リン酸モル濃度比率 (Ca/P) をカルシウム [塩化カルシウム/リン酸化オリゴ糖カルシウム (POs-Ca)] を添加して Ca/P=1.67, pH 6.5 に調整した。再石灰化溶液に, フッ化物 (F) ないし ε ポリリジン (EPL) を (25, 250, 1000 ppm) 添加した。表層下脱灰病巣サンプル (n=3) を各再石灰化溶液に, 6 時間 37°C で浸漬処理を行った。

③解析: 再石灰化処理完了後, 各 3 処理エリアを含む歯片サンプルの薄片試料 (150 μm厚) を切り出し, TMR 法に供し, 処理群毎に再石灰化率を求めた。

#### [結果]

POs-Ca 及び F に EPL を添加することで再石灰化反応は, 従来より加速化することが解った。同様に水溶性カルシウムである塩化カルシウムでも検討したが, POs-Ca の方が有意な再石灰化の加速化効果が得られた (Figure)。

#### [結論]

従来, F による再石灰化促進が一般的である。近年はポリアルギニンによる加速化も報告されてきたが, いずれもカルシウムを併用できる技術ではなかった。しかし歯の構成要素であるカルシウムを補給することは, 歯質の維持・回復には欠かせない要素であり, 唾液由来のカルシウムのみ依存せず, 歯のモル濃度比に向けて補給することは重要であることを私たちは見出してきた (Tanaka et al., 2013)。ところが, カルシウムイオンは唾液中のリン酸イオンや添加フッ化物と反応し, POs-Ca やフッ化カルシウムを形成し不溶化することから期待する効果が得られ難かった。本研究では, これまで高水溶性カルシウム素材で再石灰化促進, 再結晶化の研究報告がある POs-Ca を用いてカルシウムイオン及びフッ化物イオン濃度を高めて再石灰化を促す際に, 低濃度の EPL 添加することで本反応が従来よりもさらに約3倍加速化することを明らかにした。本研究成果をもとに今後, 歯の健康寿命延伸に向けた, 様々な製品開発に応用していきたい。 [引用文献] Tanaka T, et al., Archives of Oral Biology, 58, 174-180, 2013。

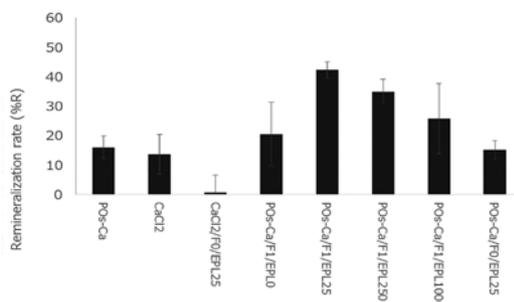


Figure: Recovery rates of enamel treated with artificial saliva contain POs-Ca/CaCl<sub>2</sub> with poly-lysine. Histogram and bars represent means and SD, respectively, of the recovery rates of each group.

## 光による加熱が歯の漂白効果に及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 う蝕制御学分野  
 ○齊 楓、大槻昌幸、畑山貴志、田上順次

### Effect of photo-thermal acceleration on in-office bleaching

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

○QI FENG, OTSUKI Masayuki, HATAYAMA Takashi, TAGAMI Junji

**[Introduction]** Light sources generally produce thermal emissions which increase the chemical reaction rate of in-office bleaching process. The purpose of this study was to evaluate the effect of photo-thermal acceleration on in-office bleaching efficiency using a bleaching agent without photocatalyst *in vitro*.

**[Materials and Methods]** Enamel-dentin specimens of 5 x 5 mm were obtained from extracted bovine incisors and were embedded in cylindrical acrylic tubes using a dental self-curing acrylic resin. Enamel surfaces of the specimens were polished with #1,200 silicon carbide papers and specimens were stained by immersion in the black tea at 37°C for 7 days. After staining, color of the stained surfaces was measured by a colorimeter and CIE L\*a\*b values were obtained. Then, mixed in-office bleaching material (White Essence Whitening Pro, White Essence) was applied on the enamel surface and the applied surface was treated by following procedures for 10 min: **HI group:** Light (WE light Class II, AIC) was irradiated with “High” mode, **LI group:** Light was irradiated with “Low” mode, **OV group:** Specimen was placed in an oven at 38°C, **RT group:** Specimen was left in a black box at room temperature. Temperature change of applied bleaching agent in HI and LI groups was measured and after light irradiation using a thermography. After bleaching, the color of treated surface was measured. The bleaching procedure and color measurement were repeated 6 times. The number of samples in each experimental group was twelve (n=12). The color difference ( $\Delta E$ ) was calculated from L\*a\*b values and was statistically analyzed by Two-way ANOVA and Tukey HSD test.

**[Result and discussion]** In all experimental groups, positive bleaching effect was visually found, accompanied by increase in L\* and decrease in a\* and b\*. Change of  $\Delta E$  in each group was shown in Fig.1. HI group showed the highest  $\Delta E$  and had statistical differences with LI group followed by HI group, but no statistical difference between OV and RT groups. The average temperature of bleaching agent in HI and LI groups after 10 min irradiation was 38.0°C and 34.8°C respectively. HI and LI groups showed better bleaching effect than other groups in spite of no existence of photocatalyst. And higher light intensity (HI group) showed higher bleaching effect than lower one (LI group). Consequently, not only heat generated by light exposure but also light itself may accelerate the reaction of hydrogen peroxide in the bleaching agent.

**[Conclusion]** The effect of photo-thermal acceleration was found for an in-office bleaching agent without photocatalyst *in vitro*.

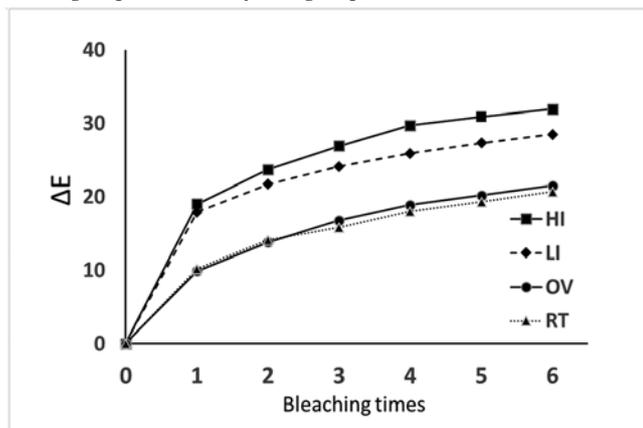


Fig 1. Color difference ( $\Delta E$ ) of four groups

## in vivo 感染根管モデルを用いた Er:YAG レーザーの洗浄効果

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  
○長橋泰次、半田慶介、兼平正史、八幡祥生、田中利典、齋藤正寛

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

Irrigation effect of Er: YAG laser using in vivo infected root canal model

○Taiji NAGAHASHI, Keisuke HANDA, Masafumi KANEHIRA, Yoshio YAHATA, Toshinori TANAKA, Masahiro SAITO

### 【目的】

根尖性歯周炎の治療においては可能な限りの根管内の無菌化が目標とされる。しかし、ファイルなどによる機械的清掃のみでは、3 次的に複雑な根管内を清掃するのは困難である。そのため近年、超音波や可聴域振動装置、Er:YAG レーザーなどを用いた根管洗浄が注目されている。第 39 回日本歯内療法学会大会において、当科の in vivo 感染根管モデルを用いた研究により Er:YAG レーザーでの高い洗浄効果が示唆された。本研究では、近年注目されている歯冠部にチップを定位させ洗浄液を攪拌する Photon-induced Photoacoustic Streaming (PIPS) と通常通り根管内にチップを挿入して行う Laser Activated Irrigation (LAI) を比較するため、同様のモデルを用いて Er:YAG レーザーの照射位置による洗浄効果の違いを検討した。

### 【材料】

本研究は「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」を遵守し、国立大学法人東北大学環境・安全委員会動物実験専門委員会の許可のもと実施した (承認番号: 2018 歯動-045)。

(1) in vivo 感染根管モデルの作製: 月齢 2 ヶ月以上の家畜ブタ 4 頭を用いて左右下顎第二小臼歯の近遠心根を実験対象根管 (n=16) とし、吸入麻酔および局所麻酔下で髄室開拓を行った。作業長確認後、手用 SS ファイルによる根管形成および 5% 次亜塩素酸ナトリウムによる根管洗浄でデブライドメントし、根管開放のまま 2 週間口腔内に暴露させた。その後根管系を低酸素状態にするため歯冠側を二重仮封 (ルミコンテンポラリーシーラーホホワイト: ヘレウス クルツァージャパン、MI フロー II: GC) し、4 週間バイオフィルムを成熟させた。

(2) 各種洗浄方法にて根管洗浄: 4 つの実験群 (各群 n=4) に分け比較検討した。実験群の処置時はラバーダム防湿し、歯冠部をソルフィーF およびペリオチップ (株式会社モリタ) で歯面清掃後二重仮封を除去し、以下の根管洗浄を行った。根管洗浄後はルミコンで歯冠側を封鎖した。洗浄液は 5% 次亜塩素酸ナトリウムを使用した。① 30G ニードル (MEDIC) によるシリンジ洗浄 (以下 CNI)、② シリンジ洗浄+レーザーチップを根管内で上下動させ照射 (以下 LAI, R300T, 30mJ, 20pps, アーウィンアドベール Evo: モリタ)、③ シリンジ洗浄+レーザーチップを髄腔内に定位させ照射 (以下 PIPS、条件は②と同じ)、④ コントロールとして生食によるシリンジ洗浄。

(3) 洗浄効果の評価: 家畜ブタに全身麻酔を施したのち顎骨とともに歯牙を摘出した。歯根を近心根と遠心根に分け、そのうちの 2 根については歯軸方向に切断し根管内面の状態を SEM にて観察した。各群残りの 2 根については、根管内の細菌感染を定量解析するために根管内細菌の DNA を抽出し、菌数を揃えた *Enterococcus faecalis* から抽出した DNA を reference とした real-time PCR 法を実施し、元配置分散分析および Tukey-kramer 法を用い、有意水準 5% にて統計解析を行った。

### 【結果および考察】

各群の根管内残存細菌数を real-time PCR 法で解析すると、コントロール>CNI>LAI>PIPS の順で多く、LAI と PIPS は他の CNI と比べ有意に残存細菌数が少なかった。LAI と PIPS に有意差はみられなかった。SEM 観察の結果、LAI、CNI と比較して PIPS では象牙細管の開開口部が明確に観察され、高い洗浄効果を有することが示唆された。これらの結果より、PIPS は LAI と同等の効果があることが認められた。歯冠部にチップを定位させ照射する PIPS では、洗浄液の攪拌を広範囲に行うことができるため複根管を同時に根管洗浄することができ、治療時間の短縮やより高い洗浄効果を期待することができる。今後 PIPS の臨床応用のために、安全性の確認と最適なレーザーの条件設定の検討が必要である。

### 【結論】

in vivo 感染根管モデルにおける根管洗浄実験において、PIPS は LAI と同等の効果が期待できることが示唆された。

## 日本人の感染根管における *Rothia* 菌種の分布調査 ならびに *R. mucilaginosa* の定量検出

大阪歯科大学 口腔治療学講座

○麻生由樹 至田宗泰 西川郁夫 池永英彰 稲本雄之 辻則正  
仲間ひとみ 杉本貞臣 麻生浩章 前田博史

### Survey of the distribution of *Rothia* species and quantitative detection of *R. mucilaginosa* in infected root canals of a Japanese population.

Department of Endodontics, Osaka Dental University

○ASO Yuki SHIDA Muneyasu NISHIKAWA Ikuo IKENAGA Hideaki INAMOTO Takeshi TSUJI Norimasa  
NAKAMA Hitomi SUGIMOTO Sadaomi ASO Hiroaki MAEDA Hiroshi

#### 【緒言】

口腔内常在菌である *Rothia* 種は、従来、病原性の低い細菌と考えられていた。近年、造血幹細胞移植患者をはじめとする易感染性宿主において、*Rothia* 種が重篤な感染症を引き起こすことが報告されるようになった。また、この細菌は難治性の根尖性歯周炎の原因菌となることも報告されている。その中でも、*R. mucilaginosa* は重篤な全身感染に関与する新たな日和見病原体として最も頻繁に報告されている。しかしながら、その病原性、そして根管内分布状況についてはほとんど解明されていない。本菌の根管内感染分布状態を調べ、根尖性歯周炎の病態との関連性を明らかにすることは、全身の健康に寄与することを目的とした歯科医療を実践していく上で重要な意義を持つ。本研究では、感染根管内における *Rothia* 種の分布状況を調べるとともに、根管内の *R. mucilaginosa* の定量的検出を行った。

#### 【材料および方法】

##### 1. 被験者ならびに被験歯

本研究は大阪歯科大学附属病院歯内治療科を受診した、20歳から93歳の患者で、本研究の趣旨に同意が得られた患者（全身疾患がなく、過去3ヶ月間に抗生物質を服用していない200名）を選択した。被験歯には感染根管治療を必要とする歯を、各被験者から1歯（一次感染92歯、二次感染108歯）選択した。なお本研究は医の倫理委員会の承認を得て行った。（大歯医倫 第110972号）

##### 2. 根管細菌サンプルの採取

根管細菌サンプルの採取は、感染根管治療開始時に行った。ラバーダム防湿を行い、髄質開拓後、オリジナルの根管径に一致する号数のKファイルを挿入し、根管壁の削片、ならびに根管内容物を掻き出し、PBS（－）に懸濁した。

##### 3. *Rothia* 菌種の検出

*Rothia* 種の検出には Tuzukibashi らの記載（journal of microbiological methods.2017）に基づいた、PCR法を応用した。

##### 4. リアルタイムPCR法

細菌種共通のプライマーを使用し、サンプル中の総菌数を定量した上で、本研究で設計した *R. mucilaginosa* に特異的なプライマーを用い、PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) および QuantStudio™ 3 (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量検出した。

##### 5. 病態との関連性

臨床所見との関連性については、フィッシャーの正確検定により評価した。統計学的な有意差は  $P<0.05$  とした。

#### 【結果】

*Rothia* 種 (*R. mucilaginosa*, *R. aeria*, *R. dentocariosa*) の検出頻度は、それぞれ 49/200 (24.5%)、95/200 (47.5%)、55/200 (27.5%) であり、134/200 (67%) から少なくとも1種類の *Rothia* 種が検出された。*R. mucilaginosa* の検出頻度は、歯肉腫脹が存在する場合に有意に高い結果となった (42.9%;  $P=0.042$ )。また、*R. aeria* の検出は根尖周囲のエックス線透過性 ( $P=0.001$ ) 及び打診痛 ( $P=0.044$ ) と相関性があった。総菌数中に占める *R. mucilaginosa* の検出割合は 0.04% から 91.8% の範囲であった。また 20.4% の根管サンプルにおいて *R. mucilaginosa* は総菌数中において 20% 以上の割合を示した。*R. mucilaginosa* の割合と根尖性歯周炎の病態との関連性は認められなかった。

#### 【結論・考察】

*Rothia* 種は比較的高頻度で根管内に定着しており、全身感染症のリスクになる可能性が示唆された。また *Rothia* 種は根尖性歯周炎の病態に関与していることが示唆された。

## レジシン系、バイオガラス系およびシリコン系 根管充填用シーラーのヒト歯根膜幹細胞株に対する細胞親和性比較

<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

○友清淳<sup>1</sup>、長谷川大学<sup>1</sup>、小野太雅<sup>2</sup>、一法師啓太<sup>2</sup>、山下梢<sup>2</sup>、M. Anas Alhasan<sup>2</sup>、濱野さゆり<sup>2,3</sup>、杉井英樹<sup>1</sup>、  
吉田晋一郎<sup>1</sup>、前田英史<sup>1,2</sup>

### Comparison of cell affinity in resin-, bioglass- and silicon-based root canal sealers for a human periodontal ligament stem cell line

<sup>1</sup>Department of Endodontics, Kyushu University Hospital, <sup>2</sup>Department of Endodontics and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University, <sup>3</sup>OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University

○Atsushi Tomokiyo<sup>1</sup>, Daigaku Hasegawa<sup>1</sup>, Taiga Ono<sup>2</sup>, Keita Ippoushi<sup>2</sup>, Kozue Yamashita<sup>2</sup>, M. Anas Alhasan<sup>2</sup>, Sayuri Hamano<sup>2,3</sup>, Hideki Sugii<sup>1</sup>, Shinichirou Yoshida<sup>1</sup>, Hidefumi Maeda<sup>1,2</sup>

**【目的】**根管充填に用いるシーラーの役割は、充填材と根管壁間の空隙を塞ぎ根管の封鎖性を向上させることである。さらに根管充填後の根尖部においては、シーラーと歯根膜組織が持続的に接触することとなることから、シーラーには高い細胞親和性も求められる。歯根膜組織には歯根膜幹細胞が存在し、根尖周囲組織の治癒に重要な役割を果たすことが知られている。しかしながら、歯根膜幹細胞に対するシーラーの細胞親和性は未だ不明な点が多い。そこで本研究ではヒト歯根膜幹細胞株を使用し、細胞親和性に優れることが報告されている 3 種類のシーラーが細胞増殖および歯根膜細胞関連遺伝子ならびに細胞増殖関連遺伝子発現に及ぼす影響について比較することで、それらの歯根膜幹細胞に対する細胞親和性を検証することとした。

**【材料および方法】****(1)シーラーdiscの作製:** スーパーボンド根充シーラー (SB; サンメディカル株式会社)、ニシカキャナルシーラーBG (BG; 日本歯科薬品)、ガッタフロー2 (GF; コルテンジャパン合同会社)を、それぞれ操作手順に従い混和したのち、直径 5 mm 厚さ 2 mm の円柱型枠に填入した。それらを 37°C、湿度 100%のインキュベーター内に静置し、24 時間硬化させ disc を作製した。**(2)細胞増殖試験:** 10% fetal bovine serum 含有 alpha minimum essential medium (10%FBS/αMEM)を含む 6 well 培養プレート上に各シーラーを静置し、当研究室で樹立したヒト歯根膜幹細胞株 (2-23 細胞; Hasegawa D et al. 2017) を 5 x 10<sup>4</sup> cells/mL の濃度で播種した。培養 3 日後に酵素処理を行い、培養プレートから剥離した 2-23 細胞の総細胞数を計測した。**(3)遺伝子発現量比較:** (2)と同様の条件で 3 日間培養した 2-23 細胞株から mRNA を抽出したのち、逆転写酵素を用いて cDNA を作製した。これらの cDNA を用いて定量的 RT-PCR を行い、歯根膜細胞関連遺伝子 (*PERIOSTIN*, *PLAP-1*, *COLLAGEN TYPE 1 [COL-1]*, *COLLAGEN TYPE 3 [COL-3]*)ならびに細胞増殖関連遺伝子 (*CYCLIN [CCN] A2*, *CCND1*, *CCNE1*) の発現量について比較検討した。**(4)表面性状比較:** 硬化後のシーラーを 10%FBS/αMEM に浸漬し、3 日後の表面を scanning electron microscope (SEM; HITACHI)にて観察した。また、浸漬前のシーラー表面および 10%FBS/αMEM に浸漬せず 3 日間 37°C、湿度 100%のインキュベーター内に静置したシーラー表面の観察も同様に行った。**(5)pH およびカルシウムイオン濃度の定量:** 硬化後のシーラーを 10%FBS/αMEM 内に 3 日間浸漬し、浸漬後の培地の pH を twin waterproof (堀場製作所)を用いて測定した。また、3 日間浸漬後の培地のカルシウムイオン濃度を、Calcium Assay Kit (BioAssay Systems)およびマイクロプレートリーダー (BioRad)を用いて算出した。本研究は九州大学遺伝子組換え実験安全委員会の承認(承認番号:27-76)の下で行った。

**【結果と考察】**SB では Cont と比較し、培養プレート全体で細胞数の減少を認めた。BG ではシーラー周囲で細胞数の減少を認めたものの、その外側では Cont と同程度の細胞が存在していた。GF では、培養プレート全体に Cont と同程度の細胞が存在していた。また Cont と比較して、GF では細胞数に有意差を認めなかったが、SB および BG では細胞数が有意に減少した。各シーラーと共培養した 2-23 細胞の *PERIOSTIN*, *PLAP-1*, *COL-1* および *COL-3* 発現は、Cont と比較して GF では同程度であったのに対し、SB ならびに BG では低下した。一方 *CCNA2*, *CCND1* および *CCNE1* の発現は、Cont と比較して GF および SB では同程度であったのに対し、BG では上昇した。SEM 観察の結果、いずれのシーラーにおいても浸漬による溶解は認められなかった。pH 測定の結果、Cont、BG および GF に有意差は認めなかったが、SB は他の 3 種と比較して有意に低い値をした。またカルシウムイオン濃度測定の結果、Cont、SB および GF に有意差は認めなかったが、BG は他の 3 種と比較して有意に高い値を示した。以上の結果から、3 種のシーラーが 2-23 細胞の細胞増殖および遺伝子発現に及ぼす影響は異なること、および pH ならびにカルシウムイオン濃度の変化が、この差異を引き起こす原因の一つであることが示唆された。

**【結論】**培養 3 日目では、GF が歯根膜幹細胞株に対して最も高い細胞親和性を示した。一方で長期培養の場合、硬化直後の SB および BG からの細胞傷害性物質の wash out が予想されることから、今後長期間での検討が必要である。

## NaClO に浸漬した Mineral Trioxide Aggregate は ヒト歯根膜幹細胞株の骨芽細胞分化能を低下させる

<sup>1</sup>九州大学 大学院歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯科保存学研究分野、<sup>2</sup>九州大学病院 歯内治療科、

<sup>3</sup>九州大学 大学院歯学研究院 OBT 研究センター

○<sup>1</sup>山下梢、<sup>2</sup>友清淳、<sup>1,3</sup>濱野さゆり、<sup>2</sup>長谷川大学、<sup>2</sup>杉井英樹、<sup>2</sup>吉田晋一郎、<sup>1</sup>小野太雅、<sup>1</sup>一法師啓太、

<sup>1</sup>M.Anas Alhasan、<sup>1,2</sup>前田英史

### Effects of MTA exposed to NaClO on osteoblastic differentiation in a human periodontal ligament stem cell line

<sup>1</sup>Department of Endodontology and Operative Dentistry, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental

Science, Kyushu University, <sup>2</sup>Department of Endodontology, Kyushu University Hospital,

<sup>3</sup>OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University

○<sup>1</sup>K. Yamashita, <sup>2</sup>A. Tomokiyo, <sup>1,3</sup>S. Hamano, <sup>2</sup>D. Hasegawa, <sup>2</sup>H. Sugii, <sup>2</sup>S. Yoshida, <sup>1</sup>T. Ono, <sup>1</sup>K. Ippoushi,

<sup>1</sup>M.Anas Alhasan and <sup>1,2</sup>H. Maeda.

【目的】Mineral trioxide aggregate (MTA) は、1990 年代初頭に Torabinejad らによって開発された歯内治療用材料である。多くの基礎研究により、MTA がカルシウムイオンを放出し、歯根膜細胞や歯髄細胞の硬組織形成を促進することで、充填部周囲の骨性癒着治療や修復象牙質形成を誘導することが明らかとなっている。我々はこれまでに、次亜塩素酸ナトリウム (NaClO) と接触した MTA が、色調変化を起こすことを報告してきたが (友清ら 日本歯科保存学会誌 2017)、NaClO と接触した MTA が、周囲に存在する細胞の硬組織形成能に及ぼす影響は未だ明らかとなっていない。そこで本研究では、NaClO に浸漬した MTA disc と、ヒト歯根膜幹細胞株 (I-17 細胞株) との共培養を行い、それらが I-17 細胞株の骨芽細胞分化に及ぼす影響について検証することとした。

【材料と方法】(1) MTA disc 作製: ProRoot MTA (Dentsply) を蒸留水 (DW) と粉液比 0.33 w/p にて混和し型枠に充填後、37°C、湿度 100%にて 24 時間硬化させ MTA disc を作製した。次に、1.5 mL tube の中に disc を静置し、200  $\mu$ L の DW または 5% NaClO (WAKO) を加え 24 時間浸漬した。(2) 走査型電子顕微鏡 (SEM) およびエネルギー分散型 X 線分析 (EDX): DW または NaClO に浸漬した disc の表面を、SEM (Hitachi S-3400N) を用いて観察した。同時に EDX 検出器 (EDAX) を用いて元素分析を行い、disc 表面の元素比 (At%) および元素分布を解析した。(3) カルシウムイオン濃度および pH 測定: DW または NaClO に浸漬した disc を、500 $\mu$ L の 10% 胎児ウシ血清含有  $\alpha$ -MEM (CM) に 1、7 および 14 日間浸漬した。浸漬後に、disc から CM 中に放出されたカルシウムイオン濃度を、Calcium Assay Kit (BioAssay Systems) およびマイクロプレートリーダー (BioRad) を用いて算出した。また、twin waterproof (堀場製作所) を用いて、disc 浸漬後の CM の pH を測定した。(4) 遺伝子発現解析: I-17 細胞株を CM 含有 48 well 細胞培養プレート上に播種し、24 時間培養を行った後、7 日間 disc と共培養を行った。培養後、I-17 細胞株から mRNA を回収し、定量的 RT-PCR 法を用いて骨芽細胞関連遺伝子 (*BMP2*, *OPN*) および歯根膜細胞関連遺伝子 (*PLAPI*, *PERIOSTIN [POSTN]*, *OSTEOPROTEGERIN [OPG]*) の発現解析を行った。disc は DW または NaClO に 24 時間浸漬後、さらに CM 中に 24 時間浸漬したものをを用いた。本研究は九州大学遺伝子組み換え実験安全委員会の承認 (承認番号:27-76) の下で行った。

【結果と考察】DW に浸漬した disc (DW-MTA) では色調変化は認められなかったが、NaClO に浸漬した disc (Na-MTA) では色調変化が認められた。SEM の結果、DW-MTA では表面に均一にカルシウム結晶構造物を認めた一方、Na-MTA では DW-MTA とは異なる、ナトリウムが含まれた針状の構造物を認めた。また、EDX の結果、Na-MTA では DW-MTA と比較し、表面の元素分布におけるカルシウムの割合が減少した。disc から CM 中に放出されたカルシウムイオンの濃度を測定した結果、浸漬後 1、7 および 14 日目において、Na-MTA は DW-MTA と比較して有意に低いカルシウムイオン濃度を示した。定量的 RT-PCR の結果、disc 無しで培養を行った I-17 細胞株と比較し、DW-MTA では *BMP2* および *OPN* の遺伝子発現が有意に亢進した。一方で、DW-MTA と比較し Na-MTA では、これらの遺伝子発現が有意に低下した。また、*PLAPI*, *POSTN*, *OPG* の遺伝子発現は、disc 無しで培養を行った I-17 細胞株と比較し、DW-MTA および Na-MTA のいずれにおいても有意に低下した。pH を測定した結果、DW-MTA および Na-MTA のいずれにおいても、1 日目と比較し 7 日目および 14 日目において有意な上昇が確認されたが、DW-MTA と Na-MTA の間に有意差は認めなかった。本研究結果から、NaClO は MTA 表面の結晶構造および元素分布を変化させることで、カルシウムイオン放出量を減少させることが示唆された。一方で、この結晶構造および元素分布の変化は、MTA の持つ強アルカリ特性に影響を及ぼさないことが示唆された。加えて、NaClO による MTA からのカルシウムイオン放出量の減少が、歯根膜幹細胞の骨芽細胞への分化誘導能を低下させる可能性が推察された。