

Effect of HOCl-application and wash-out time on dentin bond strength of one-step self-etch adhesives

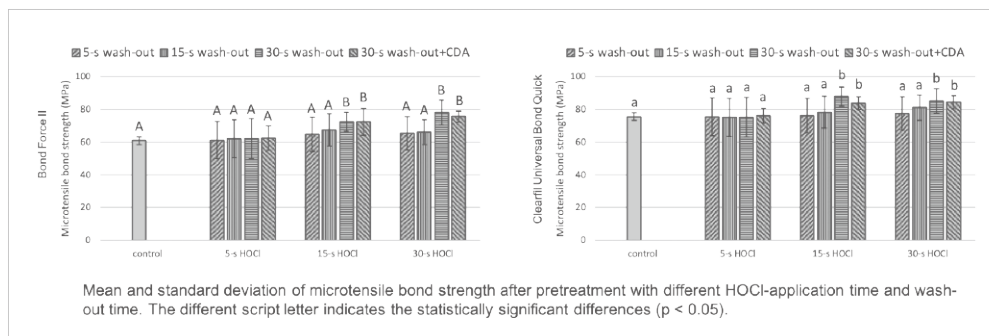
○ Kittisak Sanon, Takashi Hatayama, Junji Tagami, Keiichi Hosaka, Masatoshi Nakajima

Department of Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Science, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Objective: Recently, it has been demonstrated that smear layer deproteinizing with HOCl and NaOCl oxidizing solutions could improve dentin bonding with 1-step and 2-step self-etch adhesives without formation of hybridized smear layer. However, their oxidizing effects remained on the treated surface had reported to also cause an adverse effect on the polymerization. This study aimed to investigate the effects of HOCl-application time and wash-out time on microtensile bond strength (μ TBS) of 1-step self-etch adhesives (1-SEAs) to dentin. In addition, their deproteinizing effects and surface morphological alterations on smear layer-covered dentin were investigated.

Materials and Methods: Following ethical approval by the Ethics Committee of Tokyo Medical and Dental University under protocol number 2013-022, extracted human coronal-dentin discs with standardized smear layer were pretreated. After treatment with a 100 ppm HOCl solution (pH 6.8; provided by Tokuyama Dental) for 5 s, 15 s, or 30 s, the dentin surface was washed out with water for 5 s, 15 s, 30 s, or applied with a sulfinic acid salt agent (Clearfil DC Activator; Kuraray Noritake Dental) after 30 s-washed-out, and then applied with 1-SEAs according to the manufacturer's instruction; Bond Force II (Tokuyama Dental) or Clearfil Universal Bond Quick (Kuraray Noritake Dental). Microtensile bond strength were investigated after 24 h water storage. Their deproteinizing effects at the treated smear layer-covered dentin surface were determined by the measurement of amide:phosphate ratio using a FTIR. In addition, surface morphological alteration of smear layer-covered dentin surface of those HOCl-treated dentin were observed by SEM. The data were analyzed by three-way ANOVA, Games-Howell's post hoc tests, and t-test with the significant level of 0.05.

Results: Increasing HOCl-application time and wash-out time increased the μ TBS of both adhesives. The 5-s HOCl-application did not affect the μ TBS ($p > 0.05$), while for the 15-s and 30-s HOCl application, the following 30 s-wash-out significantly increased the μ TBS to dentin ($p < 0.05$) although the 5 s and 15 s-washing did not significantly increased them. The application of the reducing agent after the 30 s washing-out could not significantly improved the μ TBS to the 15-s and 30-s HOCl-pretreated dentin. The FTIR results revealed that the 15-s and 30-s HOCl application significantly reduced amide:phosphate ratio compared to no-pretreated dentin ($p < 0.001$), regardless of wash-out time ($p > 0.05$), however SEM observation revealed no noticeable morphological alterations on smear layer-covered dentin surface.



Conclusion: The 30 s-washing-out could increase μ TBS of 1-SEAs to smear layer deproteinized dentin with the 100 ppm HOCl solution for 15 s and 30 s.

Clinical significance The HOCl-application to smear layer-covered dentin could improve the μ TBS of 1-SEAs, depending upon the application time and wash-out time.

新規低重合収縮レジンコア材の根管象牙質接着性能評価と SS-OCT を用いた根管内挙動解析

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⁾国立長寿医療研究センター

○畑山貴志¹, 中島正俊¹, 保坂啓一¹, 中川寿一¹, 田端倫子¹, 角保徳²

Intra-root canal behavior analysis and bonding performance of a new bulk-fill resin core material using SS-OCT
Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

National Center for Geriatrics and Gerontology

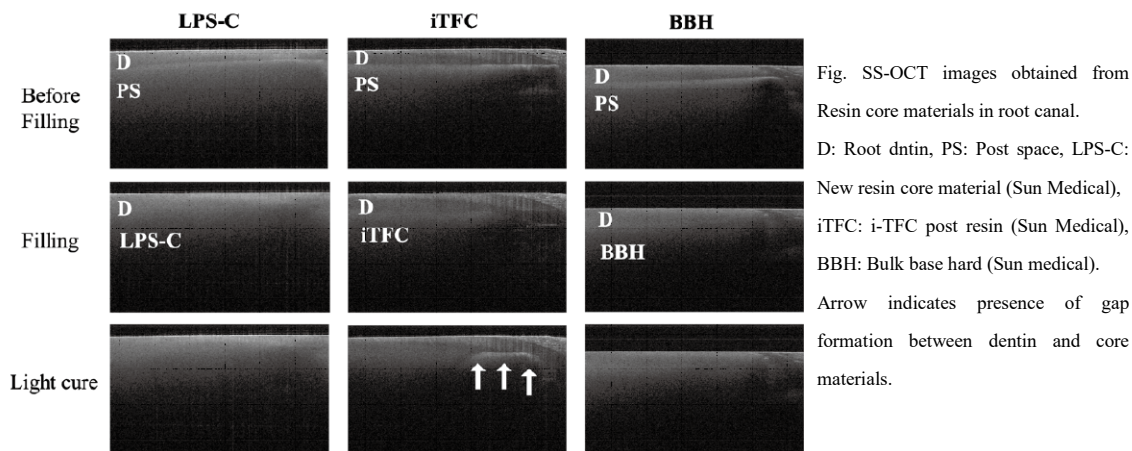
○HATAYAMA Takashi, NAKAJIMA Masatoshi, HOSAKA Keiichi, NAKAGAWA Hisaichi, TABATA Tomoko,
SUMI Yasunori

【緒言】近年、根管処置歯に対して接着性レジンコア材を用いた直接法支台築造法が行われる機会は益々増えている一方で、レジンコアを用いた支台築造には未だ様々な問題を抱えている。その一つとしてポスト窩洞内面における根管壁象牙質への接着強度不足の問題が今までも多くの論文の中で多く挙げられてきた。特にその中でも根尖付近の根管内は照射光エネルギーが十分に到達しにくい事による重合不良が起き、また重合収縮の影響を受け根管壁から剥離を起こしてしまう報告が数多くされている。そこでサンメディカル株式会社による新規低重合収縮モノマー (LPS モノマー) を活用した新規レジンコア材 (LPS-C) がこの諸問題を解決する材料ではないかと注目し、研究の着想に至った。本研究では根管内におけるレジンコア材重合時の挙動を、波長走査型光干渉断層計 (Swept-source optical coherence tomography, SS-OCT) を用いて非破壊的・非侵襲的に解析し、また根管壁象牙質に対する接着性能を検討した。

【材料及び方法】ヒト抜去下顎小白歯 18 本を使用するレジンコア材により 3 群に分けた。径 1.5mm、深さ 8mm のポスト窩洞を形成後、歯根側面をポスト窩洞と並行に厚さ 1mm にトリミングした。業者指示通りの接着操作後、新規レジンコア材 (LPS-C, サンメディカル), iTFC ポストレジジン (iTFC, サンメディカル), バルクベースハード (BBH, サンメディカル) を充填し、その際の根管内部の挙動を SS-OCT (サンテック) を用いて歯根側面から観察した。また、根管接着試料を 37℃水中に 24 時間保管後、歯根軸に対して直角方向にビーム状試片 (断面 0.6mm×0.6mm) を作製し、歯冠側群 (0～4mm) と根尖側群 (4～8mm) に分けクロスヘッドスピード 1mm/min にて微小引張り接着試験を行った。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。

【結果】SS-OCT での根管内部の観察において、LPS-C, BBH を用いた試料において界面の剥離は観察されなかったが、iTFC を用いた試料においては界面の剥離が多く観察された。また、すべての群において、歯冠側での接着強さは有意差が認められなかった。一方で根尖側での接着強さは LPS-C 群が iTFC, BBH 群と比較して有意に高い値を示した。

【考察】SS-OCT 画像において、LPS-C, BBH を用いた試料で界面の剥離が観察されなかったが、接着試験の結果から考えると BBH は光重合深度が深くないので根尖側のレジンは十分に重合していなかったため剥離しなかったと推測される。また、iTFC 群は光が根尖側まで到達することで十分重合したが、重合収縮量が LPS-C に比べて大きいため、根管壁から剥離が多く認められたと考えられる。



構造発色を有するコンポジットレジンの

厚みが修復物の色調に及ぼす影響

東京医科歯科大学 大学院 歯医学総合研究科 う蝕制御学分野

○山下 亜子、中島 正俊、小林 駿、古澤 聖佳、田上 順次

Influence of thickness of resin composites with structural color

on color change over human dentin with various colors

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences,

Tokyo Medical and Dental University, Tokyo Japan

○AKO YAMASHITA, MASATOSHI NAKAJIMA, SHUN KOBAYASHI, KIYOKA FURUSAWA,

JUNJI TAGAMI

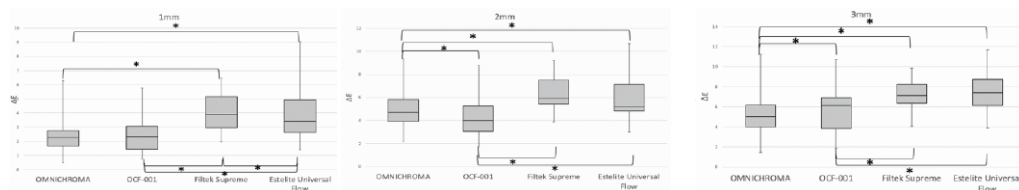
【緒言】

近年、光重合型コンポジットレジンは、審美修復材料として幅広く用いられている。しかしながら、歯の色調は部位や年齢によって様々であり、限られたシェードのコンポジットレジンで周囲歯質と正確に色調適合させることは容易ではなく、さらに修復物の色調はその厚みに強く影響を受けることから、コンポジットレジン修復物の色調適合性は臨床家にとって大きな課題となっている。トクヤマデンタルにより、260nmの球状フィラーを均一に配合して構造発色させることで、単一シェードであらゆる色調の歯に対し高い色調調和性を持つコンポジットレジンが開発された。しかし、修復物の厚みが色調に及ぼす影響については報告されていない。そこで本研究では、2種の構造発色を有する光重合型コンポジットレジンと2種の市販フロアブルコンポジットレジンを用いて、様々な色調のヒト抜去・上顎中切歯から得られた象牙質背景におけるコンポジットレジンの色調に及ぼす厚みの影響について評価・検討を行った。

【材料及び方法】

実験には、あらかじめクリスタルアイ (OLYMPUS) にて測色し、A1・2・3、B1・2・3・4、C2・4、D4の10種類の色調を持つ健全ヒト抜去上顎中切歯計30本を用いた。光重合型コンポジットレジンとしては、構造発色を有するOMNICHROMA(トクヤマデンタル)、顔料配合(シェードA2)のFiltek Supreme Ultra Flow (3M/ESPE)とEstelite Universal Flow(トクヤマデンタル)、および試作構造発色フロアブルレジン(OCF-001)の計4種類を用いた。フィラー含有率79%のOMNICHROMAに対し、OCF-001はフィラー含有率を71%としてフロアブル化が図られたが、一方でTP値は有意に高くなり、透明度が高い。健全ヒト抜去上顎中切歯をエナメル質表面から2mmの深さにおいて象牙質を露出させ、#1200耐水研磨紙を用いて平坦象牙質面を作成した。それぞれの象牙質面にボンドマーライトレス(トクヤマデンタル)を用いて、業者指示通りにボンディング操作を行った上で、内径4mm、厚み1mmの円形ワッシャーを置き、ワッシャー内にレジン进行充填し、20秒光照射後、研磨を行い、二次元色彩計(RC500, PaPaLaB Co.)を用いてD65光源下、黒色板背景、湿潤下のもと修復歯の撮影および測色を行った。さらにその上にワッシャーを積み重ねて充填することで、厚みが2mmおよび3mmのコンポジットレジン修復物の撮影測色が行われた。その後、コンポジットレジン进行象牙質面から慎重に除去し、他種のコンポジットレジン进行同様に充填し、撮影・測色を繰り返した。得られたCIE XYZデータからCIE L*a*b*値を算出し、充填後の窩洞中央部を通る歯頂側から歯頸側までのL*a*b*値を連続的に算出し(幅1mm)、充填部位におけるL*a*b*の平均値を抽出した。また、同一部位における窩洞形成前の象牙質面のL*a*b*の平均値に対して色差 ΔE_{00} を計算し、評価した。それぞれの値はWilcoxon signed rank testを用いて有意水準5%で統計学的分析を行った。本研究で使用したヒト抜去歯は、本学倫理審査委員会(承認番号D2013-022-03号)の承認済みである。

【結果及び考察】 Table (ΔE_{00})



厚みに関わらず、OMNICHROMAおよびOCF-001がFiltek Supreme Ultra Flow、Estelite Universal Flowに比べて ΔE_{00} が有意に低い値($p < 0.05$)を示し、より象牙質色を反映しやすいということが示唆された。また、OCF-001は2mmにおいてOMNICHROMAに対して ΔE_{00} が有意に低く、3mmでは逆に有意に高い値を示した。

X線ビームを用いた象牙質に導入した亜鉛の結合状態解析

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)

○内藤 克昭, 山本 洋子, 林 美加子

Analysis of chemical state of Zn in Zn doped dentin using X-ray beam
Osaka University Graduate School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry and Endodontology
○NAITO Katsuaki, YAMAMOTO Hiroko, HAYASHI Mikako

[研究目的]

超高齢社会において、根面う蝕を予防し歯を保存することは、健康寿命の延伸に重要である。我々は、第148回日本歯科保存学会秋季学術大会において、象牙質表層に浸透した亜鉛 (Zn) が耐酸性向上を示すことを報告した。耐酸性向上に関して、Zn はマトリックスメタロプロテアーゼ阻害作用を有するものの、無機成分に対する影響を調べた報告は少ない。本研究では、X線ビームを用いて象牙質における Zn の結合状態を解析し、耐酸性向上との関連について知見を得たので報告する。

[材料および方法]

21歳から28歳までのヒト健全第三大臼歯を使用した (n=3)。歯冠および根尖部を垂直方向に切断後、根面象牙質を露出させた。根面象牙質以外をスティッキーワックスで被覆し、Zn含有ガラスアイオノマーセメント (ZIF-10, GC, 東京) を根面象牙質に塗布した。湿度100%, 37℃下にて1時間保管後、生理食塩水10 ml中に浸漬した。生理食塩水は1週間ごとに交換した。4週間後、材料を機械的に除去し、測定試料 (Zn doped dentin) とした。また比較試料として、0.1M $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ と 0.1M $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ および 0.06 M $(\text{NH}_3)_2\text{HPO}_4$ を混和し、Zn含有ハイドロキシアパタイト (Zn doped HAp) を作製した。合成した試料は、化学量論比および結晶学的な特性を誘導結合プラズマ発光分光分析および粉末X線回折法で評価し、単相のハイドロキシアパタイトであることを確認した。また以後の測定の参考試料として、亜鉛箔 (Zn foil), 酸化亜鉛 (ZnO), リン酸亜鉛四水和物 [$\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$], フッ化亜鉛四水和物 ($\text{ZnF}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), 炭酸亜鉛 (ZnCO_3), ZIF-10 を準備した。

亜鉛が象牙質の結晶構造に与える影響を調べるために、平行ビーム光学系薄膜X線回折法にて、上述の Zn doped dentin および参考試料を、Cu K α 線 ($\lambda = 1.541 \text{ \AA}$), $2\theta = 10^\circ - 70^\circ$ の角度範囲で回折スペクトルを取得した。また亜鉛の結合状態を解析するために、X線光電子分光法 (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) による解析も行った。Zn doped dentin の表層 50 μm をメスを用いて機械的に削り出し、削片をさらに粉末化したものを測定試料とした。測定元素は、カルシウム (Ca 2p), 酸素 (O 1s), 炭素 (C 1s), フッ素 (F 1s), 亜鉛 (Zn 2p, Zn LMM) とし、C のピーク (284.5 eV) でキャリブレーションを行った。

なお、本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認下で実施した。(承認番号:H30-E36)

[結果および考察]

薄膜X線回折法により、Zn doped dentin は健全象牙質と同様のスペクトルを示し、象牙質の結晶構造に対して亜鉛の導入は影響しないことがわかった。また健全象牙質、Zn doped dentin および Zn doped HAp では、(002), (211) 面に幅広いピークを示し、アモルファスな状態を維持していることが示唆された。

XPS の結果から、Zn 2p において Zn doped dentin のスペクトルは、1045.2 eV (Zn 2p 1/2) および 1022.1 eV (Zn 2p 3/2) にピークを認め、Zn doped HAp や ZnO, ZIF-10 に類似していることが判明した。Zn Auger における Zn doped dentin のピークは、988.9 eV に位置しており、ZnO および ZIF-10 とほぼ一致していた。また Zn doped HAp は、Zn doped dentin と比較して低エネルギー側へわずかなピークシフトを示した。

以上の結果より、Zn doped dentin のにおける Zn の化学結合状態は、ハイドロキシアパタイト構造を維持したまま取り込まれており、さらに ZnO と ZIF-10 に類似しているものの、Zn doped HAp とは異なることが示された。X線ビームによる原子レベルでの解析を進めることにより、う蝕というマクロな現象をミクロな世界から説明できる可能性が示された。

本研究の一部は科学研究費補助金 (JP20H00552) の補助のもとに行われた。

新規ユニバーサルシェードフロアブルレジン充填材(OCF-001)の色調適合性の評価

北海道大学大学院歯学院歯科保存学教室
○陳 菲、戸井田 侑、呉 迪、川本 千春、佐野 英彦

Color matching evaluation of novel flowable universal composite resin (OCF-001)

Restorative Dentistry, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University
○Chen Fei, Yu Toida, Wu Di, Chiharu Kawamoto, Hidehiko Sano

【緒言】

近年、コンポジットレジンの性能の向上は著しい。新たに開発された OMNICHROMA は構造色を利用することで、単一ペーストでありながら優れた色調適合性を示すことが既に報告されている¹。今回評価する OCF-001 は、小窩裂溝部や歯頸部の楔上欠損などへの充填時の操作性を向上させるために開発されたフロアブルタイプのコンポジットレジンであり、これまでのペーストタイプの OMNICHROMA よりもフィラーの含有量が少なく、同等の色調適合性を有するか不明である。そこで本研究では OCF-001 の色調適合性を評価した。

【材料と方法】

エステライトΣクイック (ESQ; トクヤマデンタル)、グレースフィルパテ (GP; GC)、シュブリームウルトラ (SUF; 3M) を用いてレジンプロック (直径 10mm, 高さ 5mm) をそれぞれ作成し (シェード: A2, A3, A4)、中央部に窩洞 (直径 4 mm, 高さ 2 mm) の規格窩洞模型 (直径 10 mm, 高さ 5 mm) を作製した。窩洞模型内、OCF-001 (OCF, シェード: U, トクヤマデンタル)、GRACEFIL LoFlo (GLF, シェード: U, GC)、Supreme Ultra Flowable (SUF, シェード A3B, 3M) を用いて充填した。接着システムとしては、ボンドマーライトレス (トクヤマデンタル) を用い、メーカー指示に従い接着操作を行った。次いで、OCF、GLF、SUF をそれぞれ上記窩洞に充填し、研磨を行った。色調適合性は、二次元色彩計 (RC500, PaPaLaB Co.) を用いて、充填直後と 28 日 37 °C 水中浸漬後の充填部と窩洞周囲の色差 (ΔE) を算出し評価した。さらに、窩洞に用いた材料が色調適合性に及ぼす影響を調べるために窩洞周囲の L*、a*、b*、C` を測定した。光源には D65 を使用し、表色系には CIE LAB を用いた。統計処理は One-way ANOVA 及び Tukey HSD test を用いて有意水準 5% で統計学的分析を行った。

【結果及び考察】

ΔE 及び、L*、a*、b*、C` の結果を以下に示す (Figure 1, Table 1)。ΔE は充填材の種類に影響され (p < 0.05)、充填直後及び 28 日後の OCF は A2、A3 シェードとも他の材料 (GLF, SUF) に対して有意に低い値を示した (p < 0.05)。また、充填直後の A4 シェードは、GLF が他の材料 (OCF, SUF) に対して有意に低い値を示した (p < 0.05)。A4 シェードのモールドでは ESQ が高い a* と b* 値を示した。

【結論】

OCF-001 は A2, A3 シェードの規格窩洞において単一シェードで GRACEFIL LoFlo と Supreme Ultra Flowable に比べ、良好な色調適合性を示した。一方、A4 シェードでは、ΔE の値が高かった。その原因は、窩洞模型として用いたエステライト Σ クイックの C` 値が高いことに起因したと考えられる。

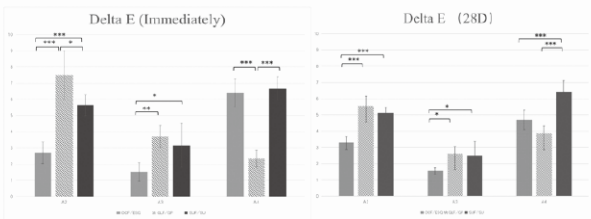


Figure 1. Color difference of three tested materials both immediately and after 28 days.

		$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$			
A4 Shade of Resin Composite		L*	a*	b*	C'
ESQ	Immediately	64.3	9.36	28.6	30.1
	28D	64.3	9.36	28.6	30.1
GP	Immediately	68.4	7.3	22.8	23.9
	28D	68.5	6.8	24.3	25.2
SU	Immediately	68.4	5.9	21.1	21.9
	28D	66.7	6.1	20.2	21.1

Table 1. L*, a*, b*, and chroma of A4 shade of the molds. Vertical lines indicate non-significant differences within the same parameter (p > 0.05)

文献 1. Chen F, Toida Y, Islam R, Alam A, Almas Chowdhury AFM, Yamauti M, Sano H. Evaluation of shade matching of a novel supra-nano filled esthetic resin composite employing structural color using simplified simulated clinical cavities. J Esthet Restor Dent. 2020;1-10.

ハイドロキシアパタイトとの反応が、ワンステップセルフエッチングシステム硬化体の吸水性及び弾性率に及ぼす影響

¹ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔制御学分野

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

○元山裕太郎¹、保坂啓一¹、池田正臣²、中島正俊¹、田上順次¹

Effect of exposure of one-step self-etching system to hydroxyapatite
on water sorption and modulus of elasticity

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

○YUTARO Motoyama¹, HOSAKA Keiichi¹, IKEDA Masaomi², NAKAJIMA Masatoshi¹, TAGAMI Junji¹

【研究目的】近年、ワンステップセルフエッチングシステム（以下 1-SEAs）は簡便かつ優れた接着性により広く臨床で用いられている。しかし、1-SEAs は HEMA 等の親水性モノマーや水を含有していることで親水性が高く、エアブロー後の残留溶媒の影響も加わり、接着界面における長期劣化が生じることが懸念されている。これまでの 1-SEAs を用いた吸水性及び溶解性試験では、エアブローを行い溶媒を除去後、光照射してボンド硬化体を作製していた。しかし、歯質との反応による影響を考慮できていない。そこで本研究では 1-SEAs をハイドロキシアパタイト（以下 HAp）と反応させた後に光重合し、そのボンド硬化体について吸水量（ W_{sp} ）、溶解量（ W_{sl} ）及び弾性率（ E ）を測定した。

【材料及び方法】本実験には、スコッチボンドユニバーサルアドヒーズ（以下 SBU；3M ESPE 社製）、クリアフィルユニバーサルボンドクイック ER（以下 UBQ；クラレノリタケデンタル社製）、Experimental 1-SEA（以下 UBQ_{exp}；UBQ の親水性アミドモノマーを HEMA に置き換えたもの）を用いた。3 種の 1-SEAs を、各 0.8ml ずつ HAp のディスク状試料（直径 30 mm 厚さ 2 mm、 $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ；100%）の表面上で 2 分間攪拌しながら反応させる群（HAp 群）とさせない群（control 群）に分け、10 分間のエアブローにより重量変化がなくなるまで溶媒の除去を行った。以上の処理を行った 1-SEAs を予め用意したシリコンモールドに注入、LED 光照射器（ペンキュア 2000；モリタ社製）を用いて光重合し、ディスク状ボンド硬化体（直径 6 mm 厚さ 1 mm）、及びビーム状ボンド硬化体（1.0 x 1.0 x 10.0 mm）を作製、それぞれ吸水性及び溶解性試験と三点曲げ試験用試料とした（ISO4049 を一部修正）。吸水試験では、24 時間を経過した時点での吸水量（24h- W_{sp} ）も測定した。三点曲げ試験は、作製試料を 24 時間乾燥させた群（dry 群）、その後 24 時間吸水させた群（24h-wet 群）の 2 つの実験群を設定しその E を測定し、24 時間吸水させたことによる E の減少率を ΔE として計算した。得られた W_{sp} 、 W_{sl} 及び E のデータはボンフェローニの補正を用いた t 検定（有意水準 5%）に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）。全ての 1-SEAs において HAp 群は control 群と比べて有意に 24h- W_{sp} 、 W_{sp} が低い値を示した。また、三点曲げ試験において、dry 群、24h-wet 群共に control 群よりも HAp 群の方が有意に高い E を示し、 ΔE は HAp 群の方が control 群よりも低値であった。HAp との反応によって 1-SEAs の極性が失われ、親水性が低下したことが、弾性率の増加に寄与している可能性が示唆された。

1-SEAs	experimental groups	24h-Water sorption	Water sorption	Solubility	Modulus of elasticity (MPa)		ΔE (%)
		($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	dry	24h-wet	
SBU	control	93±8	118±5	12.4±3.2	2537±36	1433±67	43.5
	HAp	80±4 *	99±4 *	13.2±1.1 *	2736±46 *	1729±42 *	36.8
UBQ	control	97±18	100±6	17.5±2.4	2538±55	1226±46	51.7
	HAp	63±11 *	80±8 *	7.8±0.5 *	3203±63 *	1636±45 *	48.9
UBQ _{exp}	control	147±22	174±15	117.5±6.2	934±44	523±26	44.0
	HAp	133±30 *	139±10 *	85.9±3.6	1095±54 *	630±37 *	42.4

*

Table. Water sorption, solubility (n=7, $\mu\text{g}/\text{mm}^3 \pm \text{S.D.}$) and Modulus of elasticity (n=8, MPa $\pm$ S.D.) tested in this study.

The asterisks (*) show statistically significant differences ($p < 0.05$).

【結論】本研究により、1-SEAs は HAp との反応によってその硬化体の吸水性は低下し、弾性率が増加することがわかった。1-SEAs の HAp 上での反応の詳細な機序や、より in vivo をシミュレーションする条件設定については今後更なる検討が必要である。

セルフエッチングプライマー採用 S-PRG フィラー含有シーラントによる、 エナメル質脱灰/再石灰化への影響

東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科 歯制御学分野

○小川友子、平石典子、田上順次

Effect of enamel de-/remineralization of S-PRG filler-containing dental sealant with a self-etching primer

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

○Yuko Ogawa, Noriko Hiraishi, Junji Tagami

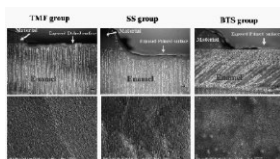
【緒言】

幼若永久歯のう蝕感受性は著しく高く、特にう蝕好発部位である小窩裂溝はシーラントによる封鎖が予防法として広く行われている。近年う蝕予防効果に加え、歯質の強化という観点よりフッ素徐放性を有するさまざまなシーラント材が研究開発されている。S-PRG フィラーは多種のイオンを放出する生体機能性材料であり、抗菌性、酸緩衝性、歯質抗耐脱・再石灰化効果を有することが先行研究より示されている。イオン徐放性によりフッ素のリリースとリチャージが行われるだけでなく、ストロンチウムにより抗菌性や歯質耐酸性が向上し、フッ素との相乗効果も報告されている。本研究では、セルフエッチングプライマー採用 S-PRG フィラー含有シーラントと、リン酸エッチング採用レジシン系フッ素徐放性シーラントの、エナメル質脱灰/再石灰化への影響を、pH サイクリング法にて比較検討した。

【材料及び方法】

S-PRG フィラー含有シーラントとしてビューティシーラント (以下 BTS (松風))、レジシン系フッ素徐放性シーラントとしてティースメイト F1 (以下 TMF (クラレノリタケデンタル))、さらに比較として、S-PRG 非含有シリカ系シーラント (以下 SS (松風提供)) を用いた。TMF では歯面処理剤としてリン酸エッチング (40%リン酸) を使い、BTS と SS は歯面処理剤としてセルフエッチングプライマー (pH2.5) を使用した。歯面処理剤の使用法はすべて各社の添付文書に従った。牛歯エナメルブロック (8×8mm) を耐水ペーパー600、#800、#1000、#1200 にて順次研磨を行い5 分間蒸留水中で超音波洗浄した。表面 6×6mm を残してネイルバーニッシュにて被覆し、6×6mm 内は各社添付文書に従って歯面処理を行った。さらに中心 3×3mm をシーラントにて填塞しエナメル質サンプルとした。サンプルを脱灰液に3 時間、再石灰化液に21 時間浸漬させるという pH サイクルを10 日間繰り返し、その後硬組織低速切断機 (Isomet, Buehler, USA) にて切断し、走査型電子顕微鏡 (SEM, JSM-IT100, JEOL, TOKYO, JAPAN) にてシーラントに隣接するエナメル質の形状観測を行なった。

【結果及び考察】TMF 群では、歯面処理剤であるリン酸エッチングによりエナメル質表層に過度の脱灰が認められた。シーラントに隣接するエナメル質は、リン酸エッチングにより歯面が粗造に脱灰されており、pH サイクル後でも再石灰化は見られず、フッ素徐放効果は顕著には確認できなかった。SS 群では、セルフエッチングプライマーを用いたが、シーラント填塞周辺エナメル質で脱灰が認められた。この原因として第一に、水洗が不要なセルフエッチングプライマーで処理したため、第二に SS は S-PRG 非含有である為、再石灰化効果が見られなかったためと推測する。BTS 群では SS 群と同じくセルフエッチングプライマーを用いたが、シーラント填塞周辺歯質に脱灰層は認められなかった。本研究では BTS では徐放されるフッ素および各種イオンの酸緩衝性、歯質抗耐脱・再石灰化効果により、シーラント隣接周辺部歯質の脱灰を抑制し、再石灰化を促進する可能性が示唆された。



【結論】

リン酸エッチング採用レジシン系フッ素徐放性シーラントでは、周辺エナメル質がリン酸により脱灰されていた。セルフエッチングプライマー採用 S-PRG フィラー含有シーラントでは、セルフエッチングプライマーによる脱灰は見られず S-PRG フィラーからリリースする各種イオンにより周辺エナメル質の歯質抗耐脱・再石灰化効果が示唆された。

水中浸漬を経た被シラン処理 CAD/CAM セラミック修復の 接着に対する追加光化学的処理の効果

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座
○河本 芽 柵木寿男 奈良陽一郎

The effect of additional photochemical treatments on the bonding of silanized CAD/CAM ceramic restorations after water-storage

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

【目的】シラン処理は、シリカ系セラミック修復の良好な接着獲得を見据えた重要な臨床的操作であるが、長期水中浸漬によって、処理されたシランカップリング剤に加水分解が生じ、接着強さの低下を引き起こすことが知られている。そこで本研究では、CAD/CAM セラミック修復におけるシラン処理効率に対する追加処理の効果を探究するために、水中浸漬期間3条件における微小引張接着強さ(μ-TBS)を測定し、量的および質的な評価検討を行った。

【材料および方法】本学部倫理審査委員会(NDU-T2019-32)の承認を得て、ヒト抜去健全上顎大臼歯 48 本に対し規格化 MODP アンレー窩洞の形成を経て、チェアサイド型 CEREC system (CEREC AC Omnicam と CEREC MC XL, Dentsply Sirona)による光学印象採得、修復物設計、長石系セラミックブロック: VITABLOCS Mark II (VITA)へのミリングによってアンレー体を製作した。その後、アンレー体内面に対し4種処理条件、すなわち製造者指示に基づくシラン処理(シランカップリング剤: RelyX Ceramic Primer, 3M)のみを行ったコントロール条件(CO)、被シラン処理面に対するヘアドライヤーによる20秒間の温風乾燥条件(DR)、歯科用LED照射器: G-Light Prima-II(GC)による紫外線領域を含む20秒間の光照射条件(UV)、可視光領域を含む20秒間の光照射条件(VL)を設定し実施した。ついで、接着性レジンセメント: RelyX Unicem 2(3M)を用いたアンレー体の臨床的装着を経て、一修復試料から規格化ビーム状試料4片を得た。その後、各処理条件の試料について3群、すなわち37°C蒸留水中に1日間浸漬群(1d)、30日間浸漬群(1m)、90日間浸漬群(3m)に類別し、実施を経て、μ-TBS値を測定(n=16)した。得られたデータは、Kruskal-Wallis 検定およびSteel-Dwass 検定による量的評価と、メジアンランク法によるWeibull分析によって質的評価を行った。

【成績】1dおよび1mにおける4種処理条件のμ-TBS値間に、有意差は認められなかった。Fig. 1に、3mにおける4条件のμ-TBS値を示す。分析の結果、UV・VL条件は、CO条件より有意に大きなμ-TBS値を示した。Fig. 2に、同じく3mにおける4種処理条件間のWeibullパラメーターの違いを示す。UV・VL条件のWm・PF10値は、CO・DR条件の両値より有意に大きく、かつUVの両値は、4処理条件中で最高値を示した。なお、1dおよび1mにおけるUV・VL条件のWm・PF10値は、CO・DR条件値より大きな傾向にあった。

【考察】追加光化学的処理を行ったUV・VL条件におけるμ-TBS値は、CO条件より有意に大きく、かつ両条件のWm・PF10値は、CO・DR条件よりも有意に大きな値を示した。シラン処理面に対する追加光化学的処理は、光学的効果と温熱的効果を要素として、安定した化学結合の形成を誘導し、確実な接着に寄与すると推察できた。

【結論】LED照射器を用いた簡便かつ短時間の追加光化学的処理は、追加処理なし条件や温風乾燥条件よりも優れた接着強さ獲得能を有し、かつ接着信頼性の向上に有効であった。

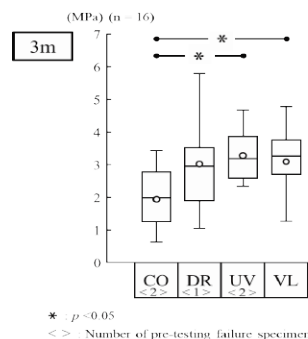


Fig. 1 μ-TBS of silanized restorative surfaces subjected to different surface treatments

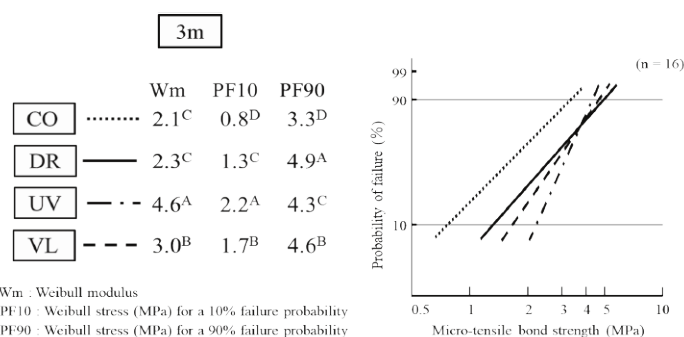


Fig. 2 Differences in the Weibull parameters of silanized restorative surfaces subjected to four types of surface treatment

Values with different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) among four types of treatment.

スペース設定値と修復用ブロック材料が メタルフリーCAD/CAM アンレー修復の接着に及ぼす影響

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座
○鴫田智重 前野雅彦 奈良陽一郎

The effect of space setting values and restorative block materials on the bonding of metal-free CAD/CAM onlay restorations

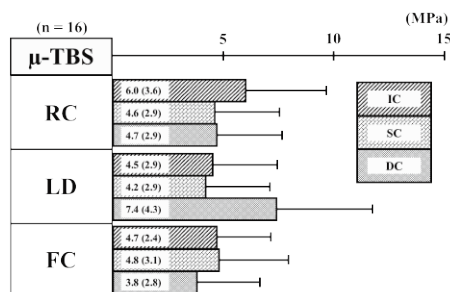
Department of Adhesive Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University
○TOKITA Chie, MAENO Masahiko, NARA Yoichiro

【目的】近年、メタルフリー間接修復において歯科用 CAD/CAM システムが頻用され始めている。CAD/CAM 修復の予後や寿命において、セメントスペース量は重要な因子であり、最近のシステムでは、当該スペースを任意に調整可能となっているが、最適スペースについての統一見解はない。さらに、修復物の製作に際しては、多種多様なブロック素材からの選択が叶う。そこで、本実験ではスペース設定値と修復用ブロック材料がメタルフリーCAD/CAM アンレー修復の接着に及ぼす影響について明らかにすることを目的に、スペース設定値と実際のセメント厚さとの関係ならびに繰り返し荷重負荷を経た CAD/CAM アンレー修復の微小引張接着強さ (μ -TBS) を指標に、評価検討を行った。

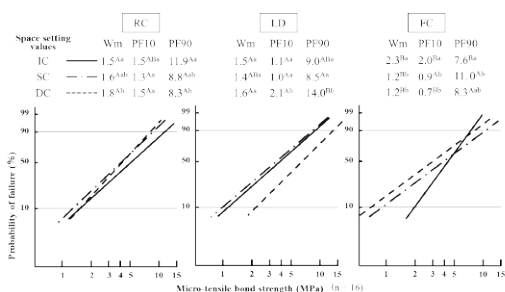
【材料および方法】本学部倫理審査委員会(NDU-T2019-32)の承認を経て、ヒト抜去健全下顎大臼歯 72 本の規格化植立を行い、規格化 MODB 窩洞を形成した。その後、窩洞内スペースについては 3 種設定値；増加設定条件(IC: 180 μ m)、製造者初期設定条件(SC: 120 μ m, control)、縮小設定条件(DC: 60 μ m)、および修復用ブロック材料については 3 群；コンポジットレジンブロック群(RC)、二ケイ酸リチウムガラスセラミックブロック群(LD)、長石系セラミックブロック群(FC, control)に基づく 9 条件に類別した。ついで、各条件による修復物の設計・製作、臨床的装着を経て、37℃水中で 157N×30 万回の動的荷重負荷、試料の切断調整、および実際のセメント厚さ計測後に μ -TBS の測定(n=16)を行った。得られたデータは、二元配置分散分析、Tukey の HSD 検定、および Weibull 分析によって解析した。

【成績と考察】窩洞内スペースにおける“スペース設定値”と“実際のセメント厚さ”との差は、IC / SC / DC: -32 / +5 / +58 μ m を示し、初期設定値(60 μ m)を固定条件とした咬合面・歯肉側マージンの値は、+57~+123 μ m の範囲にあった。したがって、SC 条件が最も“実際のセメント厚さ再現性”に優れ、咬合面・歯肉側マージンの再現性は、窩洞内スペースと比較して劣ることが明らかとなった。また、スペース設定値が μ -TBS に及ぼす影響は、修復用ブロック材料によって異なった。さらに、RC 修復の Wm と PF10 および LD 修復の PF10 と PF90 は、FC 修復値より有意に大きいことから、RC 修復の接着信頼性および LD 修復の接着耐久性は、FC 修復より優れていることが判明した。加えて、RC 修復において、IC・DC 条件下の Wm、PF10 および PF90 と SC 条件によるそれら各値との間には有意差を認めず、接着信頼性・耐久性は、SC 条件と同様であった。また、DC 条件下の LD 修復の PF10 と PF90、および IC 条件下の FC 修復の Wm と PF10 は、SC 条件による各修復値より有意に大きいことから、優れた接着信頼性獲得の点で、SC 条件による各修復と比較して有効であった。

【結論】メタルフリーCAD/CAM アンレー修復の、窩洞内スペースにおける SC 条件による実際のセメント厚さ再現性は、他の条件より優れていた。また、 μ -TBS に基づく接着の量的評価において、各条件間に有意差を認めなかった。一方、質的評価である接着信頼性・耐久性において、スペース設定値と修復用ブロック材料による影響を認めた。



Differences in micro-tensile bond strength among three space setting values and three restorative block materials



Differences in Weibull parameters among three space setting values and three restorative block materials

Values with different capital letters in same row indicate a statistically significant difference at p<0.05. Values with different small letters in same column indicate a statistically significant difference at p<0.05. 本研究の一部は、JSPS17K11719 の助成を受けた。

水酸化カルシウム系根管貼薬剤が根尖周囲組織の創傷治癒に与える影響

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)

○森山 輝一, 岡本 基岐, 松本 紗也子, 渡邊 昌克, 黄 海玲, 高橋 雄介, 林 美加子

Effect of calcium hydroxide intracanal medicament on wound healing of periapical tissue

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

○Moriyama Kiichi, Okamoto Motoki, Matsumoto Sayako, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Takahashi Yusuke, Hayashi Mikako

【目的】

感染根管治療の主目的は根管内の無菌化であり、機械的清掃の及ばない部位に対しては化学的清掃による効果が期待される。現在、根管の化学的清掃として、根管洗浄に加えて水酸化カルシウム製剤を中心とした根管貼薬が行われている。水酸化カルシウム製剤は高い pH による抗菌効果のみならず、生体組織と接する根尖部における硬組織誘導能などバイオアクティブな効果をもつ可能性がある。しかし、根管貼薬剤が根尖周囲組織に与える影響については完全に明らかになってはいない。そこで本研究では、2 種の水酸化カルシウム系根管貼薬剤を用いて、根尖周囲組織を構成する細胞の 1 つである歯根膜細胞に対する細胞毒性、細胞増殖、そして遺伝子発現に与える影響を評価した。

【材料と方法】

水酸化カルシウム系根管貼薬剤としてカルシペックス® (日本歯科薬品, Lot J7Q), ビタペックス® (ネオ製薬, Lot A9G1) を内径 3 mm, 高さ 1 mm の滅菌テフロンモールドに清潔環境下にて填入し、トランスウェルインサート (Corning, ポアサイズ 8 μm) に試料を静置した。各試料の存在下にてヒト歯根膜細胞 (human Dental Periodontal Ligament Cells, Lonza, 以下 hDPLCs) を培養し、以下の方法で各根管貼薬剤が hDPLCs に与える影響を評価した。コントロールとして、根管貼薬剤を填入していないテフロンモールドとともに培養を行った hDPLCs を用いた。統計学的有意差検定には One-way ANOVA および Tukey 検定を用いて評価した (危険率 5%)。

1. 細胞毒性試験

各試料の存在下にて培養 1, 3, 5 ならびに 7 日経過後に、培地中の乳酸脱水素酵素を定量し、細胞毒性について評価を行った (LDH アッセイキット, タカラバイオ)。同時に、歯根膜細胞の形態について光学顕微鏡で観察を行った。

2. 細胞増殖試験

各試料の存在下にて、培養 3, 5 日経過後に Countess 3 (Thermo Fisher Scientific) にて生細胞数を測定した。

3. 遺伝子発現に与える影響 (RNA シークエンス)

各試料の存在下にて、培養 3 日経過後に、mRNA を回収し、その後 RNA シークエンス (Hiseq 2500, イルミナ) を行い、遺伝子発現に与える影響について網羅的な比較・検討を行った。

【結果】

ビタペックス® は、カルシペックス® およびコントロールと比較して有意に高い細胞毒性を示し、細胞増殖も有意に抑制した ($p < 0.05$)。しかし、細胞形態には両貼薬剤ともに影響を与えなかった。RNA シークエンスによる遺伝子解析の結果、2 種の水酸化カルシウム製剤はそれぞれ異なる遺伝子発現パターンを呈し、カルシペックス® はコントロールと比較的類似した遺伝子発現パターンを示したのに対し、ビタペックス® では、石灰化に関連する複数の遺伝子発現の上昇が確認された。

【結論】

水酸化カルシウムを主成分とする 2 種の根管貼薬剤は、根尖周囲組織を構成する歯根膜細胞に対して異なる作用を示し、特にビタペックス® は細胞増殖を抑制する一方で、石灰化等の創傷治癒に関連する遺伝子発現を上昇させることが明らかとなった。今後、根尖周囲組織を構成する他の細胞での検討を行うとともに、現在臨床応用されている根管貼薬剤の特性を把握し、抗菌性と生体組織の治癒促進を両立させた次世代根管貼薬剤の開発へと繋げていく予定である。

感染歯髄における直接覆髄後の歯髄治癒過程の評価

神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔統合医療学講座歯髄生物学分野

○武藤徳子、許多、石井信之

Evaluation of dental pulp healing in the infected pulp by direct pulp capping

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: 直接覆髄の成功には露髄面直下に象牙質橋形成が必須であるが、MTA は生体親和性に優れるとともに象牙質形成能に優れていることが研究報告で明らかにされている。歯髄細胞に対する MTA は生体適合性が高く、歯髄の炎症を最小限に抑えて歯髄の治癒を促進し、象牙芽細胞の遊走と分化を促進し、象牙質形成を促進することが報告されている。本研究は、直接覆髄の適応外症例であった感染歯髄に対する MTA の有効性を解明することを目的とし、マウス臼歯の歯髄感染モデルと非感染モデルを作成し、MTA による直接歯髄の治癒メカニズムを解明することを目的とした。MTA による治癒メカニズムの解析は、象牙芽細胞の遊走と象牙質形成に焦点を絞り、水酸化カルシウムと比較検討した。

材料および方法: ICR マウス 36 匹 (6 週齢) を感染実験群と非感染実験群に分類した。各実験群は、さらに水酸化カルシウムセメント (以後 CH 群)、MTA (以後 MTA 群)、ガラスイオノマー (GI [コントロール] 群) の 3 群に分類した。両上顎臼歯の咬合面に露髄させた。感染モデルでは、露髄面を 24 時間口腔内環境に暴露させた。その後、露髄部を滅菌生理食塩水で洗浄し、CH 群では水酸化カルシウムセメントで、MTA 群では MTA セメントで、そして自己硬化型 GI セメント充填材で覆髄した。非感染モデルでは、露髄後直ちに CH 群では水酸化カルシウムセメント、MTA 群では MTA セメントで貼葉し、その後 GI セメント充填を行った。両モデルの GI (コントロール) 群では、GI セメントのみで仮封した。マウスは深麻酔下で灌流固定後、上顎を一塊として摘出し、12 時間同固定液に浸漬した。試料は 10%EDTA 2NA 溶液を用いて脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、厚さ 4 μ m の矢状断切片を作製し、スライドグラスに取り付け、ヘマトキシリン・エオジン染色及 nestin と Ki 67 の免疫組織化学的染色による歯髄治癒過程を分析した。Ki67 陽性細胞数と nestin 陽性細胞数を測定し、すべてのデータは、統計ソフトウェア (Bell Curve, Japan) を使用した Bonferroni 検定によって調整し、多重比較のための一元配置分散分析で、歯冠部と根尖部の細胞数をグループ間で比較した。(動物実験倫理審査番号; 28-316-6)。

成績: [感染実験群] MTA 群では、露髄面直下歯髄組織の炎症が軽度であるが、CH 群と GI 群では歯冠部歯髄の強い炎症性細胞浸潤が認められた。術後 1 週間後、MTA と CH 群は活発な細胞分化を起こった。術後 2 週間後、MTA 群が象牙芽細胞様細胞分化したが、CH 群が分化の促進は認められなかった。2 週目以降の歯髄治癒は、GI 群では MTA 群に比べて有意に悪化していた。[非感染実験群] 術後 1 週間後、非感染 MTA 群では感染 MTA 群に比べて炎症細胞の浸潤が少なかった、露髄面直下から歯冠部歯髄腔の範囲に局限して炎症性細胞浸潤が認められた。MTA 群では、歯髄-象牙質境界線に沿って歯髄全体に nestin 陽性反応が観察された。CH 群、GI 群では炎症反応が激しく、nestin 陽性部位が減少していた。術後 2 週間後の nestin 陽性反応は、3 群とも変化がなかった。感染歯冠歯髄における nestin 陽性所見の割合は、2 週目以降、MTA 群の方が GI 群よりも有意に高かった。また、非感染歯冠歯髄における nestin 陽性所見の割合は、1 週目以降、MTA 群の方が CH 群および GI 群よりも有意に高かった。nestin 陽性所見の割合は、1 週目、2 週目ともに MTA 群の方が CH 群、GI 群よりも有意に高かった。感染歯髄に対して MTA を使用した直接覆髄は、覆髄剤を使用しない GI のみ仮封や水酸化カルシウムよりも早期に歯髄治癒を促進することが示された。nestin および Ki67 陽性細胞の発現状況は、歯髄治癒過程の経時変化における組織学的所見と相関していた。

考察: 感染歯髄に対して MTA を使用した直接覆髄は有効であり、覆髄剤を使用しない GI のみ仮封や水酸化カルシウムによる直接覆髄よりも早期に歯髄治癒を促進することが示された。nestin および Ki67 陽性細胞の発現状況は、歯髄治癒過程の経時変化における組織学的所見と相関していた。

結論: MTA は感染歯髄と非感染歯髄においても直接覆髄材料として歯髄治癒効果に臨床的に有用であることが示された。

歯周組織再生におけるゲラニルゲラニルアセトンとアメロジェニンの複合的効果

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

○大和寛明、讃井彰一、四本かれん、中尾雄紀、渡邊ゆかり、林千華子、相原良亮、岩下未咲、田中麗
福田隆男、西村英紀

Combined effects of geranylgeranylacetone and amelogenin on periodontal tissue regeneration

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

○Hiroaki Yamato, Terukazu Sanui, Karen Yotsumoto, Yuki Nakao, Yukari Watanabe, Chikako Hayashi, Ryosuke Aihara,
Misaki Iwashita, Urara Tanaka, Takao Fukuda, Fusanori Nishimura

【目的】

演者らは先行研究でエナメル基質タンパク質の主成分であるアメロジェニンが熱ショック蛋白質である Glucose-related protein 78 (GRP78) と直接結合することを見出し、ヒト歯根膜細胞株に GRP78 を強発現させアメロジェニン刺激を加えると細胞の遊走が著しく亢進することを報告した。一方、ゲラニルゲラニルアセトン (GGA) は熱ショックタンパク質を誘導する胃粘膜保護薬であることから GRP78 の強発現が歯根膜機能に好影響を与えるとの仮説で、GGA 単体またはアメロジェニンとの複合刺激がヒト初代培養歯根膜細胞 (hPDLs) の機能に及ぼす影響を検討した。

【材料及び方法】

1. GGA 刺激による GRP78 の発現を検討した。また GGA 刺激での歯根膜細胞の細胞機能を解析した。
2. DNA マイクロアレイを用いて無刺激群と GGA 刺激群、GGA+アメロジェニン (rM180) 複合刺激群を比較した遺伝子発現解析を行い、その結果を遺伝子・タンパク質発現レベルで検証後、強発現誘導分子のシグナル伝達経路を探索した。
3. 歯根膜細胞の GGA 刺激、rM180 刺激、GGA+ rM180 刺激後の培養上清を使用し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の管腔形成能を評価した。

【結果】

1. GGA 刺激後 15 時間で GRP78 の遺伝子発現が、また 18 時間でタンパク質発現が最も強く誘導された。さらに、無刺激群と比較して GGA 刺激群では細胞増殖に有意差がない一方、細胞遊走能が有意に促進された。GGA+ rM180 刺激ではさらに細胞遊走能が亢進した。また、GGA は type-1 collagen や alkaline phosphatase および runt-related transcription factor 2 (Runx2) の発現を減少させることで hPDLs の骨分化能を抑制した。
2. 無刺激群と比較して GGA 刺激群において、血管新生作用のある angptl4 遺伝子が最も強く発現した。次いで上皮細胞成長因子ファミリーの一つである amphiregulin が高発現遺伝子として抽出された。angptl4 と amphiregulin はタンパク質レベルでも発現・分泌の増強が確認され、GGA は hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) および peroxisome proliferator-activated receptor δ (PPAR δ) の発現を誘導して angptl4 の発現を、cAMP response element binding protein (CREB) および protein kinase A (PKA) のリン酸化を誘導して amphiregulin の分泌を促進した。
3. GGA 刺激群と比較して GGA+ rM180 混合刺激群において、血管新生誘導因子である IL-8 遺伝子が最も強く発現した。次いで MCP-1、IL-6 が高発現遺伝子として確認された。IL-8、MCP-1、IL-6 はいずれもタンパク質レベルでも分泌の亢進が確認された。
4. hPDLs を GGA 刺激、rM180 刺激、GGA+ rM180 刺激した後の培養上清はすべて HUVEC の管腔形成を誘導した。また、3. で確認したサイトカイン群の各中和抗体で HUVEC の管腔形成は有意に抑制された。

【考察および結論】

GGA は hPDLs において GRP78 発現を増強し、細胞増殖には影響を与えない一方、細胞遊走を亢進した。また GGA 刺激による GRP78 の強発現が起点となり angptl4 や amphiregulin の産生を促進させた。さらにアメロジェニンを添加するとより細胞遊走が亢進し、IL-8、IL-6、MCP-1 によると考えられる血管新生が誘導された。したがって、GGA とアメロジェニンの複合刺激は再生や創傷治癒に適した環境を相乗的に創出するものと考えられることから、新たな歯周組織再生療法の開発に資するものと考えられた。

日本人侵襲性歯周炎疾患関連遺伝子 Claspin のヒト歯根膜細胞における機能解析

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)
○NANTAKEERATIPAT Teerachate、藤原 千春、松本 昌大、榎本 梨沙、山本 優、
北垣 次郎太、北村 正博、村上 伸也

Claspin is associated with aggressive periodontitis in the Japanese population

Department of Periodontology, Division of Oral Biology and Disease Control
Osaka University Graduate School of Dentistry

○NANTAKEERATIPAT Teerachate, FUJIHARA Chiharu, MATSUMOTO Masahiro, MASUMOTO Risa, YAMAMOTO Yu,
KITAGAKI Jirouta, KITAMURA Masahiro, MURAKAMI Shinya

Objective: Since an important characteristic of aggressive periodontitis (AgP) is familial aggregation, its susceptibility may be influenced by genetic factors. Previously, we identified Claspin (*CLSPN*) SNP rs115197921 as one of AgP-candidate genes by performing exome sequencing on DNA of Japanese AgP patients. *CLSPN*-encoding Claspin is a checkpoint protein required for the DNA replication on DNA damage and stress. However, its involvement in periodontal tissue remains unclear. Here, we aimed to analyze the function(s) of *CLSPN* in human periodontal ligament (HPDL) cells.

Methods: We performed real-time PCR (qPCR) and western blot analysis to confirm *CLSPN* mRNA and Claspin protein expression on HPDL cells, respectively. To silence *CLSPN* expression, HPDL cells were transfected by *CLSPN* small-interfering RNA (siRNA) and negative control siRNA. After transfected by 48 hours, we performed qPCR of *CLSPN* and trypan blue exclusion assay to confirm silencing effects and cell viability, respectively, followed by osteogenic induction. Then, qPCR of calcification-related genes and *CLSPN*, and alkaline phosphatase (ALPase) activity assay were performed. This study was specifically approved by Osaka University Research Ethics Committee (No. 629-4, H28-E-39-2).

Results: Claspin was expressed in HPDL cells at mRNA and protein levels. *CLSPN* siRNA transfection successfully knocked down *CLSPN* expression and did not affect cell viability. During osteogenic induction, *CLSPN* silencing significantly downregulated alkaline phosphatase (*ALPL*) expression and ALPase activity, compared to the negative control. *CLSPN* silencing also tended to decrease Runt-related transcription factor 2 (*RUNX2*) expression.

Conclusion: *CLSPN* is involved in cytodifferentiation of HPDL cells. We suggest that *CLSPN* has a role in the pathogenesis of AgP.

ヒト歯肉線維芽細胞におけるカンナビノイド受容体 GPR55 の発現と GPR55 を介したカンナビジオールの抗炎症作用の検討

日本歯科大学生命歯学部 歯周病学講座¹
○三代紗季¹, 五十嵐(武内)寛子¹, 沼部幸博¹

**Expression of GPR55 in Human Gingival Fibroblasts
and Anti-inflammatory Effects of Cannabidiol via GPR55**
The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Tokyo Department of Periodontology
○Saki Mishiro¹, Hiroko Igarashi-Takeuchi¹, Yukihiro Numabe¹

【研究目的】Cannabidiol (CBD) は大麻に含まれる生理活性物質の主成分の一つであり、抗炎症作用を有することが報告されている。カンナビノイドが作用するカンナビノイド受容体には Cannabinoid Receptor 1 (CB1) および Cannabinoid Receptor 2 (CB2) が存在するが、近年新規の受容体である G-protein coupled receptor 55 (GPR55) が同定された。CBD は GPR55 のアンタゴニストとして作用するという報告があり、炎症制御との関連が示唆されている。しかし、歯周組織における発現とその役割、また CBD の歯周組織への影響に関しては不明な点が多い。そこで今回我々は、不死化ヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) における GPR55, CB1 および CB2 について発現を確認し、炎症による受容体の発現の変動および GPR55 を介した CBD の抗炎症作用を検討した。

【材料および方法】10%FBS 添加 DMEM/F12 にて HGFs を培養し, control 群, Ecoli 由来 LPS 刺激による LPS 添加群 (LPS 群), LPS 刺激 2 時間前に CBD を作用させる群 (LPS+CBD 群), LPS 刺激をせず CBD 添加のみを行う群 (CBD 群) 4 群に分けて実験を行った。HGFs における各受容体の mRNA の発現を RT-PCR, タンパク質の発現をウエスタンブロット法, タンパク質の局在を蛍光免疫染色にて検索し, それぞれ比較を行った。また, GPR55 mRNA ノックダウン後および非ノックダウン後の培養上清中の IL-6 および IL-8 のタンパク質発現について ELISA 法を用いて定量した。

【成績】GPR55 mRNA は LPS 刺激開始から 4 時間及び 12 時間後に, control と比較して発現の減少傾向を認め, 24 時間後には有意に減少が認められた ($P < 0.05$)。GPR55 タンパク質は, control 群と比較して, LPS 群および LPS+CBD 群で有意に発現の増加が認められた ($P < 0.05$)。また, GPR55 タンパク質の局在は, 全群の HGFs の細胞質内にびまん性に確認された。一方, CB1 および CB2 に関しては, mRNA およびタンパク質ともに有意な発現が認められなかった。非ノックダウン HGFs では LPS 群と比較して LPS+CBD 群で IL-6, 8 の産生が有意に抑制されていた ($P < 0.05$)。一方ノックダウン HGFs では, control 群と比較して LPS 群と LPS+CBD 群で有意に IL-6, 8 の産生量が増加していたが ($P < 0.05$), 両群間に有意な差は認められなかった。

【考察および結論】今回我々は, HGFs における LPS 刺激による炎症下での GPR55 の発現変動と, CBD による抗炎症作用を初めて報告した。GPR55 は HGFs において恒常的に発現しており, 炎症下で発現が減少する傾向が認められた。また, CBD の抗炎症作用の一部が, GPR55 を介する可能性が示唆された。

***Porphyromonas gingivalis* 由来 Mfa1 線毛のマウス歯肉線維芽細胞に対する
免疫調節能および代謝調節能に関する研究**

¹愛知学院大学歯学部歯周病学講座、²愛知学院大学歯学部微生物学講座

○高柳結平¹、菊池 毅¹、長谷川義明²、後藤久嗣¹、岡田康佑¹、岡部猪一郎¹、神谷洋介¹、鈴木佑基¹、
澤田憲孝¹、岡部徹平¹、鈴木祐希¹、近藤 駿¹、大野 祐¹、林 潤一郎¹、三谷章雄¹

***Porphyromonas gingivalis* Mfa1 induces chemokine and cell adhesion molecule in mouse gingival
fibroblasts via Toll-like Receptor 4.**

¹Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

²Department of Microbiology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○Yuhei Takayanagi¹, Takeshi Kikuchi¹, Yoshiaki Hasegawa², Hisashi Goto¹, Kousuke Okada¹,
Iichiro Okabe¹, Yosuke Kamiya¹, Yuki Suzuki¹, Noritaka Sawada¹, Teppei Okabe¹,
Yuki Suzuki¹, Shun Kondo¹, Tasuku Ohno¹, Jun-ichiro Hayashi¹, Akio Mitani¹

【研究目的】

歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*) の表面にある線維状構造物である線毛は、他の細菌や宿主組織との結合により、コロニー化に重要な役割を果たす。*P.g.* ATCC 33277 株は、FimA 線毛と Mfa1 線毛の2種類の線毛を有している。Mfa1 線毛はサブユニットタンパク質であり、主要な Mfa1 タンパク質に加えて、関連する Mfa2-5 タンパク質も存在する。これまでの研究で、FimA 線毛と Mfa1 線毛では、役割が異なることが示されている。FimA 線毛は歯周組織でのコロニー化と宿主細胞への侵入を媒介する主要な接着因子であり、様々な経路で歯周組織の炎症を誘導する。一方、Mfa1 線毛欠損株を用いた経口感染歯周炎モデルでは、歯槽骨吸収をほとんど起こさないことが示されているものの、Mfa1 線毛を用いた宿主免疫応答に関する研究報告はほとんどない。本研究では、*P.g.* Mfa1 線毛刺激がマウス歯肉線維芽細胞 (MGF) の免疫・代謝機構に及ぼす影響を検討した。

【材料及び方法】

Mfa1 線毛を Hasegawa ら (2010) の報告に従い精製し、JI-1 として実験に使用した。また、Mfa5 が ermF-B に
よって破壊された Mfa5 変異体 (FMFA5) 株および遺伝子相補体 (FMFA5C) 株からも同様に線毛を精製し、それぞれ
FMFA5 および FMFA5C として実験に使用した。次に MGF 細胞は、マウスの口蓋歯肉組織から採取し、細胞がコン
フルエントに達した時点で、*P.g.* の各種線毛 (JI-1、FMFA5、FMFA5C、FimA) および LPS の存在下 (各刺激濃度 1
μg/ml) または非存在下で 2 時間培養した後、各実験に用いた。

【結果・考察】

歯肉結合組織を構成する MGF 細胞に対する Mfa1 線毛の影響を調べたところ、好中球走化性因子である Cxcl1、Cxcl3
および炎症性サイトカインである IL-6 の mRNA 発現について JI-1 由来 Mfa1 線毛刺激の方が FimA 線毛刺激より
も強く亢進していた。これらのことから、Mfa1 線毛の免疫調節能は、FimA 線毛の免疫調節能を一部上回っている
可能性が考えられた。次に、Mfa1 線毛の免疫調節能は線毛構造のどの部分が重要なかを調べるために、JI-1 の先端
Mfa3-5 構造を除去した FMFA5 と、先端 Mfa3-5 構造を補完した FMFA5C を併せて用いて、免疫調節の誘導能を比
較した。その結果、JI-1 と比較して FMFA5 では Cxcl1、Cxcl3、IL-6 の mRNA 発現が著しく上昇し、FMFA5C では
有意に減弱していた。さらに細胞接着因子である Icam1、Sele も同様の結果が得られた。これらの結果から、Mfa1
線毛による免疫調節能および細胞接着因子の制御は、シャフト部分の Mfa1 分子に大きく影響される可能性が示唆さ
れた。各種線毛または LPS で刺激した MGF 細胞における TLR2 と TLR4 遺伝子の発現を調べたところ、TLR2 は
Cxcl1 など今回検討した他の遺伝子発現と同様の発現変動パターンを示したが、TLR4 は各種線毛や LPS に対して有
意な遺伝子発現変動を示さなかった。さらに、TLR2 または TLR4 をノックダウンした MGF 細胞を用いた検討では、
Mfa1 線毛による Cxcl1、Cxcl3、Icam1、Sele mRNA 発現亢進が、TLR4 をノックダウンするとほぼ消失していた。
また、TLR2 をノックダウンした場合も、これらの発現亢進は部分的に減衰していた。このことから、Mfa1 線毛によ
る細胞遊走や細胞接着に関連する遺伝子の発現には、TLR4 による認識が必須であることが示唆された。