

レジンコーティング法が CAD/CAM コンポジットレジンクラウンの適合性に及ぼす影響

1 東京医科歯科大学歯科総合診療部、2 う蝕制御学分野、3 口腔機能再建工学、4 口腔基礎工学、
5 朝日大学歯冠修復学、6 岡山大学歯科保存修復学分野

○金森ゆうな¹、高橋礼奈²、池田正臣³、上條真吾⁴、盧山晨²、則武加奈子¹、礪波健一¹、新田浩¹、
二階堂徹⁵、島田康史^{2, 6}、田上順次²

The effect of resin coating technique on internal fit of CAD/CAM composite resin crowns

1 Oral Diagnosis and General Dentistry, 2 Department of Cariology and Operative Dentistry, 3 Oral Prosthetic Engineering, 4 Basic Oral Health Engineering, Tokyo Medical and Dental University, 5 Operative Dentistry, Asahi University, 6 Department of Operative Dentistry, Okayama University
○Yuna KANAMORI¹, Rena TAKAHASHI², Masaomi IKEDA³, Shingo KAMIJO⁴, Shin ROZAN², Kanako NORITAKE¹, Ken-ichi TONAMI¹, Hiroshi NITTA¹, Toru NIKAI⁵, Yasushi SHIMADA^{2, 6}, Junji TAGAMI²

【研究目的】間接法修復におけるレジンコーティング法は歯を保護するだけでなく、レジンセメントの象牙質に対する接着性の向上と修復物の適合性を向上させることが明らかになっている。近年のデジタル・デンティストリーの技術革新により、口腔内スキャナーによる光学印象採得とレジンプロックの切削加工によるクラウンの作製が可能となっている。本研究では、レジンコーティングの有無が、CAD/CAM システムにより作製されたクラウンの適合性に及ぼす影響について検討した。

【材料及び方法】10本のヒト抜去小臼歯に対し辺縁形態を全周ディープシャンファーとした支台歯形成を行った。レジンコーティングなし (Non-coating) 群として、口腔内スキャナー (TRIOS3, 3Shape) を用いて光学印象採得を行い、CAD システム (松風 S-WAVE デンタルシステム, 松風) により設計後、2種のレジンプロック (KA:カタナアベンシアブロック、クラレノリタケデンタルと SH:松風ブロック HC、松風) から切削加工機 (DWX-52D, 松風) によりクラウンを作製した。支台歯とクラウンの適合性を評価するために、クラウン内面に白色のシリコンラバー印象材 (フィットチェッカー、GC) を填入し支台歯に圧接・硬化させ、クラウンを支台歯から取り外して内面に黒色のシリコンラバー印象材 (バイトチェッカー、GC) を填入して、シリコンブロックを作製した。シリコンブロックを頬舌的に切断し、P0~P9の10の基準点 (Fig.1) の厚さを光学顕微鏡 (SMZ1000, ニコン) にて測定した。その後、Non-coating 群に用いた10本の支台歯に、歯科用コーティング材 (クリアフィルユニバーサルボンド Quick ER, クラレノリタケデンタル) にて、業者指示に従いレジンコーティングを行った (Resin-coating 群)。Non-coating 群と同様に、Resin-coating 群にて光学印象とクラウンの作製を行った後、支台歯とクラウンの適合性を評価した。得られた値は Bonferroni 法にて危険率を5%に調整した Dunn's test, Wilcoxon signed rank test を用いて統計処理を行った。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 (2013-022 号) を得て行った。

【結果・考察】各条件におけるシリコンの厚みを Fig.2 に示す。KA 群において、P8、P9 で Resin-coating 群は Non-coating 群よりも有意に厚みが小さく、P6 では Non-coating 群は Resin-coating 群よりも有意に厚みが小さかった ($p < 0.05$)。SH 群において、P5、P8 で Resin-coating 群は Non-coating 群よりも有意に厚みが小さく、P2 では Non-coating 群は Resin-coating 群よりも有意に厚みが小さかった ($p < 0.05$)。それ以外の群では有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。レジンコーティング法は CAD/CAM 冠の適合性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

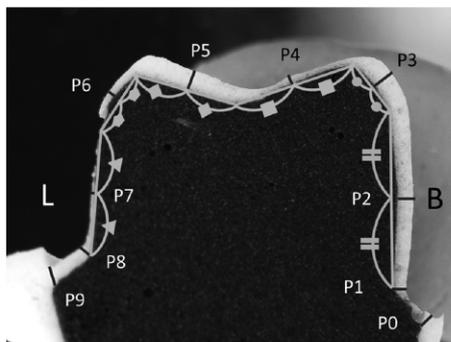
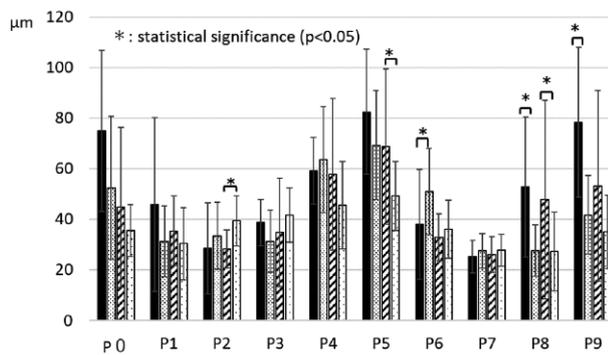


Fig.1 Reference points in silicon block



■ KA, Non-coating □ KA, Resin-coating ▨ SH, Non-coating □ SH, Resin-coating

Fig. 2 The results of internal fit analysis between the fabricated crown and the preparation at the ten measuring points

CAD/CAM メタルフリークラウン修復の接着を向上させる 有益な即時象牙質シーリング方法

日本歯科大学生命歯学部 接着歯科学講座
○中澤美和 河本 芽 前野雅彦 奈良陽一郎

Appropriate application of immediate dentin sealing improving bonding of metal-free CAD/CAM crown restoration

Department of Adhesive Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University
ONAKAZAWA Miwa, KOMOTO Mei, MAENO Masahiko, NARA Yoichiro

【目的】 近年、患者・術者双方における医療的因子の負担軽減を図ることができる歯科用 CAD/CAM システム活用によるメタルフリー間接修復が進展普及している。特に全部被覆症例においては、レジン接着システムのみを用いる即時象牙質シーリング (IDS) の臨床的応用頻度が、本邦健康保険制度への収載によって増加していると推察される。一方、メタルフリーインレー/アンレー修復で推奨されているレジン接着システムとフロアブルレジン併用の IDS は、修復物適合性の向上や衝撃緩衝作用の点で優れることが報告されている。そこで、CAD/CAM メタルフリークラウン修復の接着を向上させる有益な IDS 方法を検証するために、微小引張接着強さ (μ -TBS) に基づき量的質的に評価検討した。

【材料および方法】 本学部倫理審査委員会の承認 (NDU-T2019-32) を得て、ヒト健全下顎第一大臼歯 24 本に対する規格化植立と支台歯形成を行った。支台歯試料は、IDS を行わない非シーリング群 (C 群: 対照) オールインワンアドヒーズ (Clearfil Universal Bond Quick ER, Kuraray Noritake Dental) 単独によって IDS を実施した群 (A 群)、およびオールインワンアドヒーズとフロアブルレジン (Clearfil Universal Bond Quick ER and Clearfil Majesty ES Flow Low, Kuraray Noritake Dental) を併用した IDS 群 (F 群) の 3 群に類別した。その後、支台歯試料の光学印象採得、修復物設計、長石系セラミックブロックへのミリングを経て、クラウンを作製した。ついで全試料に対し、セルフアドヒーズレジメンセメント (SA Luting Multi, Kuraray Noritake Dental) を用いた臨床的装着を行い、37°C 水中における 78.5 N×30 万回の繰り返し荷重を負荷した。その後、頬側咬頭内斜面中央部の接界面 (Oc) および軸側壁中央部の接界面 (Ax) を含む断面積 1.0 mm² のビーム状試料を 1 修復試料から 2 本ずつ切り出し、 μ -TBS を測定 (n=16) した。得られたデータは、Kruskal-Wallis 検定、Steel-Dwass 検定、t 検定、およびメジアンランク法による Weibull 分析を行った。

【成績と考察】 Oc と Ax による測定面の違いは μ -TBS に影響を及ぼしていなかった。代表として、Fig. 1 に Oc における 3 種 IDS 条件下の μ -TBS を示す。IDS の違いは μ -TBS に有意な影響を与えており、A 群と F 群の μ -TBS は、対照の C 群より有意に大きな値を示し、かつ F 群値は A 群値より有意に大きかった。これは、接着獲得に際し、セメントの自己接着能に依存する C 群に対し、A 群ではオールインワンアドヒーズによる接着一体化が寄与することで、接着強さが向上したと推察できる。さらに F 群ではフロアブルレジン介在層が動的荷重ストレスを緩衝することで、A 群より更に優れた量的接着強さ獲得に至ったと推測する。Fig. 2 に、Oc における IDS 3 群の Weibull 係数 (Wm) と 10% 推定破壊応力値 (PF10) の違いを示す。A 群と F 群の Wm 値と PF10 値は、C 群の両値より有意に大きな値を示した。しかし、A 群の Wm 値は F 群値より有意に大きく、一方、F 群の PF10 値は A 群値より有意に大きかった。したがって、A 群は条件固有の接着強さ獲得に際しての信頼性には優れているものの、臨床における早期の接着破壊を反映するとされている PF10 値に基づく接着耐久性の点では、F 群が優れることが判明した。

【結論】 CAD/CAM メタルフリークラウン修復の接着を向上させる即時象牙質シーリング方法は、質的・量的観点において、アドヒーズとフロアブルレジン併用の対応が有益であることが示された。

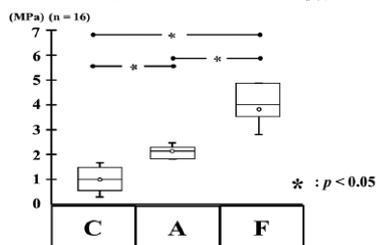


Fig. 1 Difference in the μ -TBS on occlusal wall among three types of dentin surface treatment

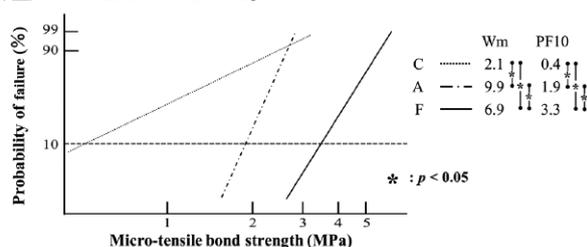


Fig. 2 Differences in Weibull parameters of occlusal wall among three types of dentin surface treatment

変色エナメル質に対するホームブリーチング剤適用時間の検討

¹⁾ 神奈川歯科大学歯学部 臨床科学系歯科保存学講座 保存修復学分野,

²⁾ 神奈川歯科大学歯学部,

³⁾ 公立千歳科学技術大学大学院 理工学研究科

○小倉真奈¹, 飯塚純子¹, 國松雄一¹, 中村郁哉³, 木村-須田廣美³, 高垣裕子², 向井義晴¹

Study on effective contact time of home bleaching agents on a discolored enamel model

¹⁾ Department of Restorative Dentistry, ²⁾ Faculty of Dentistry, Kanagawa Dental University,

³⁾ Graduate School of Science and Technology, Chitose Institute of Science and Technology

○ OGURA Mana¹, IIZUKA Junko¹, KUNIMATSU Yuichi¹, NAKAMURA Fumiya³, KIMURA-SUDA Hiromi³, TAKAGAKI Yuko², MUKAI Yoshiharu¹

【研究目的】

ホームブリーチング剤は薬剤を塗布したマウストレーを1日2時間装着して約2週間適用させるのが通法であるが、術後に知覚過敏を発症する事も報告されている。これまで2週間の適用期間における適用時間の短縮が漂白効果に与える影響を検討した研究はない。本研究では、複数のホームブリーチング剤を用いて適用時間を短縮させた場合の漂白効果の違いを経目的に検討した。

【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、エナメル質および象牙質の側面を耐酸性パーニッシュにてマスキングし、歯髄側象牙質面のみリン酸エッチングを10秒間行い水洗した。染色には紅茶ティーバッグ (Lipton YELLOW LABEL, ユニリーパジャパン) を使用した。煮出した紅茶を37°Cに冷却後、上記試料を14日間浸漬した。なお浸漬液は毎日交換した。浸漬期間終了後、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 (PRE-TiON, GC) を使用し30秒間ポリッシングを行い、30秒間水洗した。歯面の水分を除去し、測色計 (Easyshade Advance 4.0, Vita) にて測色した後、試料を10個ずつCONT群, TiON home Platinum (GC) 処理群 (60-P群, 90-P群, 120-P群), Opalescence 10% (Ultradent) 処理群 (60-O群, 90-O群, 120-O群) の7群に分け、各漂白剤を被験歯面に塗布し37°Cの湿潤状態で60分間, 90分間および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14日間繰り返し行った。各回の色差 (ΔE) を平均し、一元配置分散分析および多重比較を用いた統計学的検討を有意水準5%にて行った。

また、試料の内部に残存する有機成分の変化を観察する為にフーリエ変換赤外分光 (FTIR) によるイメージング分析 (Spotlight400/Spectrum400, PerkinElmer) を行った。ダイヤモンドワイヤー精密切断機 (Well3242, Walter Ebner) を用いて各試料の中央を垂直に半切後、断面を2000番の耐水研磨紙で平坦にし、超音波洗浄を5分間行った。計測部位はエナメル質表面から象牙質までの範囲内とし、測定条件は、波数領域 680-4000 cm^{-1} 、波数分解能 4 cm^{-1} 、ピクセルサイズ 25 μm 、偏光子は0°とした。

【結果および考察】

両漂白剤ともに期間を通して90分と120分との間に有意な差は認められなかった。また、TiON home Platinum を使用した群は初日から高い漂白効果が現れており、最終日には60分間処理と120分間処理の間で有意差が認められなかった。FTIRによるイメージング分析ではCONT群でエナメル質断面に有機成分の顕著な反応が現れていたのに対し、TiON home Platinum を60分, 120分間適用した群では減少傾向が確認された。

TiON home Platinum には浸透性の高い基材成分が含まれており、適用時間を短縮しても漂白効果を減退させずに着色成分を内部まで除去できたものと考えられる。また断面のFTIR分析は漂白前後の着色有機質の変化を確認するための有益な手法となる可能性が示唆された。

【結論】

色差並びに有機質の変化を検討した結果、ホームブリーチングの適用時間を120分から90分へ短縮する事は基材に関わらず可能であり、親水性基材を用いる事により60分への短縮も可能である事が示唆された。

非接触・高速三次元形状計測機を用いた窩洞形成評価の検討

大阪歯科大学 歯科保存学講座

○奥村瑳恵子, 谷本啓彰, 保尾謙三, 岩田有弘, 吉川一志, 山本一世

Study on Evaluation of Cavity Preparation using Non-contact High-speed 3-D Shape Measuring Device

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University

○OKUMURA Saeko, TANIMOTO Hiroaki, YASUO Kenzo, IWATA Naohiro,
YOSHIKAWA Kazushi, YAMAMOTO Kazuyo

【緒言】 歯科医学領域において窩洞形成技術を習得することは必要不可欠であり、また習得させることは歯科医学教育のうえで、長年の重要な課題でもある。特にメタルインレー修復における窩洞形成の技術は治療後の予後に大きく反映される修復法である。インレーの窩洞形成は、学生時代の基礎実習や臨床実習ならびに臨床研修歯科医師においても、従来からマネキンと顎模型によるトレーニングを繰り返し行い、基本的手技の習得を行っている。その指導には、窩洞外形や深さを指導者の主観によって行われるため、指導内容、評価にバラツキがみられ習得者が混乱することが多く、臨床の現場では指導に多くの時間と労力が必要とされ、十分な指導が行えないこともしばしば見られる。また、同一指導者においても評価結果に差が認められることがあり、定量化が難しいと問題点があり評価方法の客観性は以前から指摘されており、効果的で効率的な教育と指導ならびに再現性のある評価が不可欠である。そこで本研究では、非接触・高速三次元形状計測を行いコンピューターで客観的に評価、採点できるシステム (SURFLACER (株) モリタ製作所) を用いて、2 級メタルインレー窩洞の評価について検討した。

【対象】 大阪歯科大学附属病院保存修復科で臨床研修を行っている研修歯科医 10 名。

【方法】 シミュレーター (DR-H Ni:MO (株) ニッシン) に、下顎右側第一大臼歯に人工歯(A5SA-500#46 (株)ニッシン)を入れた顎模型((D16FE-500H(GSF)-MF (株) ニッシン)を装着し、下顎右側第一大臼歯近心 2 級メタルインレーの窩洞形成を行った。切削器具としてダイヤモンドポイント(#401, #201, #301, #F215 松風), スチールバー(UA.No.701~703 (有) ベルデンサプライ)を用いた。形成時間は、30 分間とし、形成後の窩洞は、SURFLACER による計測・評価 (以下、計測機評価) と歯科保存学講座所属の臨床経験 8~20 年以上ある教員 9 名による評価 (以下、教員評価) を行った。なお、教員評価には、評価項目と指導項目の自由記載欄を設けた。評価後、結果を用いて各自にフィードバックを行い、2 カ月ごとに計 5 回の窩洞形成を行った。評価結果の相関関係の分析には、ピアソンの積率相関係数を用いた。

【結果・考察】

1. 計測機による客観的評価

相関関係の分析の結果、有意差は認められなかった (NS)。なお、切削・未切削禁忌カ所による最大減点 (-98 点) の評価であった 7 カ所を除き、相関関係の分析を行った結果、形成回数と計測機評価に有意な正の相関が認められた ($r=0.32$ $P<0.05$)。

2. 教員による客観的評価

相関関係の分析の結果、形成回数と教員評価に有意な正の相関が認められた ($r=0.30$ $P<0.05$)。

このことから、計測機による評価と教員による評価を用いた取り組みは経時的に技術向上させることが示唆された。

3. 計測機評価と教員評価の比較

相関関係分析の結果、計測機評価と教員評価との間に有意な正の相関が認められた ($r=0.41$ $P<0.01$)。

このことから、本システムを用いた装置による評価は、教員の評価と整合性のある評価ができることが示唆された。

【結論】 非接触・高速三次元形状計測機を用いて、研修歯科医による 2 級メタルインレー窩洞形成を評価するにあたって、計測機による評価は教員による評価と整合性のある評価を行うことが可能となり、本システムは、2 級メタルインレー窩洞を客観的に評価できるデバイスであることが分かった。

***in vitro* 培養系における紫色 LED 照射による歯間プラークの細菌叢変動**

¹大阪歯科大学大学院歯学研究科歯科保存学専攻, ²大阪歯科大学歯学部細菌学講座,
³大阪歯科大学歯学部歯科保存学講座
○王丹¹, 南部隆之², 谷本啓彰³, 岩田有弘³, 吉川一志³, 沖永敏則², 山本一世³

Shifts in microbial community structure of interdental plaque under violet LED irradiation *in vitro*

¹Department of Operative Dentistry, Graduate School of Dentistry, Osaka Dental University. ²Department of Bacteriology, Osaka Dental University. ³Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University.
○Dan Wang¹, Takayuki Nambu², Hiroaki Tanimoto³, Naohiro Iwata³, Kazushi Yoshikawa³,
Toshinori Okinaga², Kazuyo Yamamoto³

【研究目的】

ヒト口腔内には 100 種類以上、数千億の細菌が生息している。近年、その細菌群のバランス変化が、齲蝕や歯周病などの口腔の疾患、また糖尿病、脳心臓血管疾患などの全身疾患に強く関連していることが分かってきた。次世代シーケンズ技術の確立により細菌パターンを解析する技術は急速に進歩してきたが、細菌パターンを健康型へと変える方法については、ほとんど検証されていない。多くの細菌は、細胞内にヘム前駆体としてプロトポルフィリン IX (PpIX) を蓄積している。PpIX は、紫色光 (400~410 nm) の照射を介して殺菌力を有する一重項酸素を発生することから、この系を用いた光線力学的療法が緑膿菌感染症などで検証されている。口腔細菌の一部は、PpIX 依存的に光殺菌されることが知られているが、紫色 LED の口腔細菌叢への影響は明らかになっていない。そこで本研究では、プラークを用いた *in vitro* 培養系と次世代シーケンズ技術を組み合わせ、紫色 LED による細菌叢の変動を解析した。

【方法】

in vitro 菌叢培養系として、12名の被検者より採取したプラークを滅菌 PBS に懸濁し、嫌気環境にて培養した。培養液を 12 穴プレートに分注後、紫色 LED (ピーク波長 400~410 nm) を 0, 10, 25, 50 J/cm² にて各ウェルに照射した。サンプルを SHI 培地と混合し、37℃の嫌気環境で 20 時間振盪培養した。DNA 抽出後、リアルタイム定量 PCR (qPCR) 法により細菌密度の変動を測定した。16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域を PCR にて増幅後、次世代シーケンサー MiSeq にて配列解読を行った。得られた配列から Qiime 2 を用いて Amplicon Sequence Variant (ASV) テーブルを作成し、 α 多様性、 β 多様性、さらに Operational taxonomic unit (OTU) レベルでの変動に関して統計解析を行った。DNA の酸化損傷マーカーである 8-OHdG については、ELISA キットにより、細菌叢変動の原因と考えた酸化ストレスの検討も行った。本研究は、大阪歯科大学医の倫理委員会の許可 (承認番号第 111002 号) の下で実施された。

【結果および考察】

LED 照射の強度に応じて、プラーク細菌叢の細菌密度が有意に減少することが認められた。また、LED 照射により α 多様性 (Shannon effective, Simpson effective) の有意な減少が観察され、プラーク細菌叢は光殺菌感受性の異なる細菌群から構成されていることが示唆された。ノンメトリック多次元尺度構成法と UniFrac 解析により、光照射強度依存的に有意に β 多様性が変化することが明らかとなった。また、LED 照射強度の増加に伴って、歯周疾患への関与が示唆される *Fusobacterium* 属と *Prevotella* 属の著しい減少と *Veillonella* 属と *Campylobacter* 属の増加が確認された。OTU レベルでの解析でも、LED 照射により *Fusobacterium* 属細菌群の減少、*Veillonella* 属細菌群の増加が認められた。また、*Fusobacterium nucleatum* 培養液に紫色 LED を照射することにより、DNA 中の 8-OHdG 量の有意な増加が認められた。このことから、LED 照射による *Fusobacterium* 属細菌の減少は、少なくとも酸化ストレスによる DNA ダメージが原因となる可能性が示唆された。

【結論】

in vitro 菌叢培養系を用いることで、紫色 LED 照射によりプラーク細菌叢が有意に変化することが明らかとなった。また、LED 照射に伴って減少した細菌群の中に歯周病原細菌が含まれていることを確認した。この原因として、紫色 LED に励起された活性酸素種が細菌 DNA を酸化し、特定の細菌種の増殖抑制を引き起こしている可能性が示唆された。

**The effects of dentin phosphophoryn-derived RGD peptides on the proliferation
and differentiation of human dental pulp stem cells *in-vitro***

○Tubayesha Hassan, Takashi Saito
Division of Clinical Cariology and Endodontology
Department of Oral Rehabilitation
School of Dentistry
Health Sciences University of Hokkaido

Introduction

Vital pulp therapy is a treatment in which a protective agent is applied to injured dental pulp tissue due to deep dental caries or trauma. When such damage occurs, newly differentiated odontoblast-like cells migrate toward the site of injury and form reparative dentin to protect pulp tissue from harmful stimuli. However, the clinical performance and biocompatibility of the current materials remain unsatisfactory. Dentin phosphophoryn (DPP), the most abundant non-collagenous dentin matrix protein, is thought to have complex roles in dentinogenesis during tooth development. DPP belongs to the small integrin binding ligand, N-linked glycoprotein (SIBLING) family and is characterized by the presence of the integrin-binding tripeptide Arg-Gly-Asp (RGD). In the present study, we aimed to investigate the *in-vitro* effects of DPP-derived RGD-peptides on the proliferation, differentiation and mineralization of human dental pulp stem cells (hDPSCs) *in-vitro*.

Materials and Methods

Non-tissue culture treated polystyrene plates were coated with 1M concentration of different DPP-derived RGD peptides as follows: RGD-1 0.50 mg/mL, RGD-2 0.36 mg/mL, RGD-3 0.36 mg/mL. RAD-1, RAD-2, RAD-3 and RNase-free ultra-pure dH₂O were used as controls. The coated plates were air-dried for 48 hours at room temperature inside a clean bench. The hDPSCs were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS, 50 units/mL penicillin and 50 µg/mL streptomycin. On day 7, odontogenic medium were added to the culture medium. Cell proliferation rate was analyzed by CCK-8 assay at 96 hours. ALP activity assay was performed on day 14 and day 21. In addition, conventional RT-PCR and real time RT-PCR were performed at day 21. Alizarin red S staining was performed at day 31. One-way ANOVA and post-hoc Tukey HSD test were used for statistical analysis.

Results and Discussion

Cell number was significantly higher in all three RGD groups compared to control. All three RGD peptides showed significantly higher ALP activity compared to control on day 14 and day 21. RGD-3 group had the highest ALP activity on both days. The RAD groups exhibited ALP activity comparable to that of control on both days. According to conventional PCR, mRNA expression of DMP-1, ALP, BSP and DSPP was significantly enhanced in all three RGD groups compared to control. In the RGD-3 group, DMP-1 mRNA expression was promoted 1.69-fold, for ALP it was 1.51-fold, for DSPP it was 1.22-fold and for BSP it was 1.27-fold compared to control. Mineralization was markedly enhanced by all three RGD groups compared to control, with RGD-3 showing the strongest staining. The three RAD groups showed similar staining intensity to the control. In a recent study, DPP-derived RGD-peptides were shown to play a crucial role in the differentiation and mineralization of mouse dental papilla cell mdpc-23. In the present study, DPP-derived RGD peptides promoted the differentiation and mineralization of hDPSCs, a group of undifferentiated cells. The RAD groups results suggest the importance of the RGD domain. The specific conformation of RGD-3 in the DPP sequence may preferentially play a role in differentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts.

Conclusion

The findings indicate that DPP-derived RGD-peptides promoted proliferation, differentiation and mineralization of hDPSCs *in-vitro*. RGD-3 group had the most prominent ALP activity, mineralization stain as well as mRNA expression of odontogenic genes. It is suggested that inclusion of RGD-3 in the formulation of novel pulp capping agent may induce undifferentiated pulp cells to differentiate into odontoblasts and form reparative dentin in area of exposed pulp.

象牙芽細胞の IP/A_{2A} 受容体活性化は細胞内 cAMP レベルを増加する

¹⁾東京歯科大学 歯内療法学講座 ²⁾東京歯科大学 生理学講座

○北山えり¹⁾²⁾、木村麻記²⁾、澁川義幸²⁾、古澤成博¹⁾

Activation of IP/A_{2A} receptor increased intracellular cAMP level in odontoblasts

¹⁾Department of Endodontics, Tokyo Dental College

²⁾Department of Physiology, Tokyo Dental College

○Eri Kitayama¹⁾²⁾, Maki Kimura²⁾, Yoshiyuki Shibukawa²⁾, Masahiro Furusawa¹⁾

<目的>

象牙芽細胞は感覚受容細胞であり、象牙質痛や第三象牙質形成に関与する。これまでの研究で我々は、象牙質への熱刺激や浸透圧刺激などの刺激に伴う象牙質痛発生メカニズムや反応象牙質形成メカニズムの一端を明らかにしてきた。象牙質表面に様々な刺激が加わると象牙細管内液が移動し、象牙芽細胞膜を伸展する。これは transient receptor potential vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) チャンネルを含む機械感受性 TRP チャンネルを活性化させ、細胞内に Ca²⁺ が流入することで細胞内 Ca²⁺ が増加する。この増加した細胞内の Ca²⁺ は Na⁺-Ca²⁺ 交換体により石灰化前線に排出され、反応象牙質形成が駆動する。一方、カンナビノイド 1 受容体活性化による細胞内 cAMP レベル増加は TRPV1 チャンネルを活性化し、細胞内 Ca²⁺ 濃度が増加する。加えて象牙芽細胞は、多量の cAMP を含有することが報告されている。これらの結果は、cAMP が細胞内 Ca²⁺ シグナルを調節することで、感覚伝達や反応象牙質形成に重要な役割を果たすことを示唆している。一方で、プロスタグランノイドの一種である PGI₂ は、G_s タンパク質共役型受容体である IP 受容体に作用することで血管内皮細胞での血小板凝集抑制作用や血管拡張作用があることが明らかにされており、象牙芽細胞では、TRPV1 チャンネルとのクロストークの可能性が示唆されている。G_s タンパク質共役型受容体であるアデノシン受容体の一種である A_{2A} 受容体は、睡眠、覚醒、神経保護、てんかんの調節など、正常なプロセスと病態生理学的プロセスの両方に関与していることが示唆されており、特にカフェインによるアデノシン受容体アンタゴニストとしての不眠、興奮作用が広く知られている。しかしながら、象牙芽細胞におけるこれらの G_s タンパク質共役型受容体の発現や機能、受容体活性化による象牙芽細胞内 cAMP シグナルは不明である。そこで本研究では、ヒト培養象牙芽細胞 (HOB 細胞) において、G_s タンパク質共役型受容体活性化による細胞内 cAMP 動態を検討した。

<方法>

HOB 細胞は、10%ウシ胎仔血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1%アムホテリシン B を含む α MEM 培地で 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。実験に使用した細胞が象牙芽細胞であることを同定するために免疫蛍光染色を行った。その結果、象牙芽細胞マーカーである nestin、dentin sialoprotein に対して陽性反応を示した。HOB 細胞を FBS を含む α MEM 中で 24 時間培養後、mNeon Green-based cAMP センサーを加え、さらに 36 時間培養後、HOB 細胞から細胞内 cAMP レベルを測定した。細胞内 cAMP レベルは、蛍光強度 (F) の baseline level (F₀) に対する蛍光強度比 (F/F₀ unit) として表した。統計は Friedman 検定と Dunn の多重比較検定を用いた。

<結果>

細胞外 Ca²⁺ 存在下において IP 受容体アゴニストである Beraprost (10nM) 投与により細胞内 cAMP レベルは増加した。この増加はアデニル酸シクラーゼ抑制薬である SQ22536 (0.1 μ M) の投与により抑制された。加えて、IP 受容体アンタゴニストである Rol138452 (1 μ M) の投与は Beraprost 誘発性細胞内 cAMP レベル増加を抑制した。細胞外 Ca²⁺ 存在下において A_{2A} 受容体アゴニストである PSB (100nM) 投与により、細胞内 cAMP レベルは増加した。この増加はアデニル酸シクラーゼ抑制薬である SQ22536 (0.1 μ M) の投与により抑制された。

<考察>

象牙芽細胞には IP 受容体と A_{2A} 受容体が存在し、それらの活性化はアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内 cAMP レベルを増加させることが示唆された。

歯髄組織における $\gamma\delta$ T細胞の局在と歯髄石灰化に与える影響

¹⁾広島大学大学院医系科学研究科 歯髄生物学研究室

²⁾ノバサウスイースタン大学歯学部 ³⁾日本学術振興会 海外特別研究員

○熊谷 友樹¹⁾、進藤 智^{2, 3)}、武田 克浩¹⁾、柴 秀樹¹⁾

The localization of $\gamma\delta$ T cells in dental pulp tissues and the effect on pulp mineralization.

¹⁾Department of Biological Endodontics, Graduate school of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

²⁾Department of Oral Science and Translational Research, Nova Southeastern University College of Dental Medicine

³⁾Overseas Research Fellowship, Japan Society for the Promotion of Science

○Tomoki Kumagai¹⁾, Satoru Shindo^{2, 3)}, Katsuhiko Takeda¹⁾, Hideki Shiba¹⁾

【緒言】歯髄炎は、主にう蝕原因細菌の侵襲に対する歯髄の生体防御機構が発動することによって惹起される。すなわち、象牙細管を通じて歯髄組織に侵入した細菌およびその細菌が産生する成分が抗原として認識され、象牙質近傍の歯髄に分布している樹状細胞やマクロファージなどの免疫担当細胞が活性化されることによって歯髄炎が発症する。さらに、う蝕の進行に伴い、歯髄組織にリンパ球浸潤が顕在化する。炎症反応が進展する一方、外来刺激への防御反応として歯髄の石灰化が生じる。 $\gamma\delta$ T細胞は γ 鎖と δ 鎖で構成されたT細胞受容体(TCR- $\gamma\delta$)を発現しており、自然免疫応答と獲得免疫応答の両方に関与していることが知られている(Holtmeier W *et al.*, Chem Immunol Allergy, 2005)。近年、根尖性歯周炎における病巣から $\gamma\delta$ T細胞が検出されており(McCutcheon JA *et al.*, Oral Microbiol Immunol, 2004)、また歯科矯正における歯牙の移動に $\gamma\delta$ T細胞が関与していることが報告されている(Wald A *et al.*, J Dent Res, 2021)。さらには $\gamma\delta$ T細胞が産生するIL-17Aが骨折治癒を促進する(Takehito O *et al.*, Nat Commun, 2016)。しかし、歯髄組織中における $\gamma\delta$ T細胞の局在やその役割に関する報告はない。

本研究ではヒト歯髄組織中における $\gamma\delta$ T細胞の局在、またIL-17Aに着目し、培養ヒト $\gamma\delta$ T細胞がヒト歯髄幹細胞(HDPSC)の石灰化に与える影響を調べた。

【材料および方法】1. ヒト歯髄組織中における $\gamma\delta$ T細胞の局在：本大学病院にて矯正的理由によって抜去された歯のうち象牙質う蝕を認めるものを炎症歯髄、そうでないものを健常歯髄として回収し(本学疫学研究倫理審査承認番号：E-133-2)、凍結切片を作製後、TCR- $\gamma\delta$ およびIL-17A陽性細胞の発現を蛍光免疫染色にて確認した。また、健常歯髄組織中のTCR- $\gamma\delta$ 陽性CD3陽性細胞をフローサイトメトリーにて検出した。2. ヒト歯髄幹細胞(HDPSC)の石灰化に与える影響：健康なボランティアから末梢血単核細胞(PBMC)を採取した(本学疫学研究倫理審査承認番号：E-1771)。2週間、IL-2(200U/ml)とゾレドロン酸(5 μ M)を加えた10%FBS含有RPMI-1640培地にて培養したPBMCを $\gamma\delta$ T細胞として使用した。TCR- $\gamma\delta$ 、TCR- $\alpha\beta$ 、CD3およびIL-17Aの発現をフローサイトメトリーにて確認し、ELISAキットを用いて培養上清中のIL-17A量を測定した。HDPSCはLonza社から購入し、10%FBS、 β -glycerophosphateおよびAscorbic acidを含むMEM- α 培地で培養した。培養HDPSCをIL-17Aあるいは $\gamma\delta$ T細胞の培養上清にて刺激し、7日後にALP染色を行い、28日後に石灰化をAlizarin red染色で評価した。

【結果】1. 健常歯髄と比べて炎症歯髄組において $\gamma\delta$ T細胞の浸潤が多く認められ、さらに炎症歯髄ではIL-17A陽性 $\gamma\delta$ T細胞が浸潤していた。また健常歯髄中のCD3陽性細胞のうち、その多数が $\gamma\delta$ T細胞であった。2. IL-2およびゾレドロン酸によってPBMCを刺激、培養した結果、90%以上のCD3陽性細胞が $\gamma\delta$ T細胞へと分化した。TCR- $\gamma\delta$ 陽性細胞はTCR- $\gamma\delta$ 陰性細胞に比べてIL-17A産生能が高かった。また、 $\gamma\delta$ T細胞の培養上清中にIL-17Aが検出された。IL-17Aあるいは $\gamma\delta$ T細胞培養上清はHDPSCの石灰化を促進した。

【考察】ヒト歯髄組織中に $\gamma\delta$ T細胞が浸潤しており、IL-17Aを産生していることが明らかとなった。*In vitro*においても $\gamma\delta$ T細胞はIL-17Aを産生し、 $\gamma\delta$ T細胞上清がHDPSCの石灰化を促進したことから、 $\gamma\delta$ T細胞がIL-17Aを介して歯髄組織の石灰化に関与している可能性が示唆された。

高速上下運動コントラハンドピースを応用した根管充填材の除去

鶴見大学歯学部 歯内療法学講座¹⁾, 医療法人松伯会 フラワーロード歯科²⁾
○西澤美沙¹⁾, 山本祐子¹⁾, 田井康晴¹⁾, 鈴木計芳^{1,2)}, 埜口五十雄^{1,2)}, 吉田拓正¹⁾, 山崎泰志¹⁾, 細矢哲康¹⁾

Clinical potential for the removal of endodontic sealers using contra-angle handpiece device with piston movement

Department of Endodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine¹⁾, Flower Road Dental Clinic²⁾
○NISHIZAWA Misa¹⁾, YAMAMOTO Yuko¹⁾, TAI Yasuharu¹⁾, SUZUKI Kazuyoshi^{1,2)}, NOGUCHI Isoo^{1,2)},
YOSHIDA Takumasa¹⁾, YAMAZAKI Yasushi¹⁾, HOSOYA Noriyasu¹⁾

【緒言】

根管の穿通ならびに拡大形成は、主に手動あるいは機械的に根管切削器具を回転運動させて行われる。近年、根管切削器具を高速で上下運動させるコントラハンドピース（以下、上下運動コントラ）を開発した。上下運動コントラを用いることにより、平滑な根管壁が得られ、根管洗浄や根管充填において優れた効果が期待できる。また、治療時間の短縮、偶発事故の防止にも有効であり、患者の反応も良好なことから、上下運動コントラの潜在的有用性とさらなる臨床応用の可能性が示唆された。

再根管治療における根管充填材の除去は、これまでに手用器具や機械的回転運動による種々の方法により行われてきた。本研究では、上下運動コントラを根管充填材の除去に応用できるかを検討するため、各種根管充填用シーラーのブロックを作製し切削状況の観察を行った。

【材料と方法】

被験試料は、チャンネル（昭和薬品化工）（以下CA）、チャンネルN（昭和薬品化工）（以下CN）、ニシカチャンネルシーラー（日本歯科薬品）（以下CS）、AH Plus（Dentsply Sirona）（以下AH）、ニシカチャンネルシーラーBG（日本歯科薬品）（以下BG）の5種とした。各製造元が推奨する方法に従って練和後、シリコンモールドに充填し、ブロック状（10×5×3 mm）の試料を各シーラー18個ずつ、計90個作製した。試料のブロック状シーラーは、充填後ただちに37℃、相対湿度100%の恒温器中で保管した。保管期間1週、2週ならびに1ヶ月（各n=6）の試料に対し、上下運動コントラに25号Hファイル（Mani）を装着して、ファイル刃部がブロックの中央に当たるように位置を設定し、5,000振動/分（20,000rpm）で切削を行った。約50gの荷重をファイルに与え、試料が二分割するまでの時間を計測した。術者は臨床経験4年以上の歯科医師2名、計測者は1名とし、計測は刃部がシーラー表面に触れた時点から、ブロックが分割した時点までとした。得られた結果から、各条件間で危険率5%未満で統計学的検算を行った。

【結果】

試料の切削に要した時間は、恒温器中での保管期間に伴い減少する傾向にあった。中でもBGが短く、1週保管試料で約60秒であった。次にCA、CS、CNであり、AHは最も切削に時間を要し15分で計測を終了した。

【考察】

根管充填は、ガッタパーチャポイントと根管シーラーの併用が一般的であるが、再治療にあたっては、これらの根管充填材を完全に除去する必要がある。近年、根管シーラーの性状が躍進し、従来は推奨されていなかったシングルポイント法が広く応用されるようになった。このような背景の中、再治療に至った症例における根管充填材の除去では、根管シーラーの効率的な除去方法を考慮する必要があるが、根管シーラーの除去に関する報告は極めて少ない。

本研究では、25号Hファイルを装着した上下運動コントラを用いて、日常臨床で頻繁に使用されている、ユージノール系、非ユージノール系、レジン系、ならびにバイオセラミックス系の各シーラーをブロック状にして切削状況を観察し、ブロック状のシーラーの分割に要する時間を計測した。ブロック状シーラーを用いた口腔外での切削に関する先行研究はないが、保管時間の経過に伴い分割時間が短くなったのは、上下運動コントラに装着したHファイルが、硬化した被切削面を効率的に切削することが一因と考えられた。

【結論】

25号Hファイルを装着した高速上下運動コントラハンドピースの使用により、ブロック状のユージノール系、非ユージノール系、バイオセラミックス系シーラーの切削が可能であることから、臨床における根管充填材の除去に応用できる可能性が示唆された。

Bioactive glass を配合した逆根管充填材の 物理化学的特性、細胞適合性および生体適合性

¹九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野

²九州歯科大学健康増進学講座分子情報生化学分野

○村田一将¹, 鷲尾絢子¹, 古株彰一郎², 諸富孝彦¹, 北村知昭¹

Physicochemical Properties, Cytocompatibility, and Biocompatibility of the Retrograde filling material containing Bioactive glass

¹Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Department of Oral Functions,

²Division of Molecular Signaling and Biochemistry, Department of Health Improvement,
Kyushu Dental University

○MURATA Kazumasa¹, WASHIO Ayako¹, KOKABU Shoichiro², MOROTOMI Takahiko¹, KITAMURA Chiaki¹

【目的】我々はこれまでに、良好な特性や臨床成績が報告されているバイオセラミックス系根管用シーラーであるニシカチャンネルシーラーBG (CS-BG, 日本歯科薬品)の粘稠性・硬化速度を、用途に合わせて術者自身が変化させることのできる Bioactive glass (BG) 配合粉末 (開発コード: NSY-224) を研究開発し、本学術大会等で報告を行ってきた。その研究成果として、2021年6月末に歯内治療用の多用途製材・ニシカチャンネルシーラーBG multi (BG multi, 日本歯科薬品)が商品化された。今回は、BG multiの逆根管充填材としての評価を、物理化学的特性、細胞適合性および生体適合性について既存の逆根管充填材と比較検討した。

【材料と方法】CS-BGの重量に対してNSY-224をX = 0, 20, 40, および60 wt%の割合で練和し、BG multi(X)を作製した。対照として、White ProRoot MTA (WMTA, Dentsply Tulsa Dental), およびSuperEBA (EBA, Bosworth)を用いた。

〈物理化学的特性の評価〉表面性状, pH変化, イオン溶出, 耐wash out, ISOの規格に基づいて硬化時間, 稠度, 溶解率, エックス線造影性を検討した。〈細胞適合性・生体適合性〉ヒトセメント芽細胞 (HCEMs, 広島大学 高田 隆教授 [現徳山大学学長]より供与) と各材料を共培養後, Trypan blue 染色, 免疫細胞染色, real time PCRによる細胞分化マーカーのmRNA量測定, アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定・染色, およびAlizarin red S (ARS) 染色により, セメント芽細胞の生存・増殖・分化・石灰化に及ぼす影響を検討した。さらに, マウス背部皮下埋入試験後のヘマトキシリン・エオシン (H. E.) 染色と免疫組織染色により材料周囲の組織反応を評価した。動物実験は, 九州歯科大学動物実験委員会の承認 (承認番号 19-024) を得て行った。

【結果】〈物理化学的特性〉SBFに浸漬したBG multi群およびWMTAの表面には網状結晶構造が析出しているのが観察されたが, EBAには結晶構造は観察されなかった。pH変化は, 浸漬後48時間でBG multi (60)はpH10.7, WMTAはpH12.1, EBAはpH7.9であった。カルシウムイオンの溶出量はBG multi群よりWMTAが有意に高く, EBAは有意に低かった。ケイ酸イオンの溶出量はBG multi群が有意に高く, WMTAとEBAはほとんど溶出がなかった。硬化時間は, BG multi (60)は8分, WMTAは10分, EBAは1分であった。浸漬期間を通してBG multi群およびEBAの溶解率は1%未満であったが, WMTAの溶解率は2.4%であった。また, BG multi群のエックス線造影性はWMTAやEBAと同程度であった。〈細胞適合性・生体適合性〉Trypan blue染色を用いた生存細胞数の評価では, BG multi群ではNSY-224の混合割合による有意な差は認められなかった。他材料との比較では, BG multi (60)の生存細胞数はEBA群と比べて有意に高く, WMTA群よりも高い傾向が認められ, 免疫細胞染色によりEBA群でCaspase3の発現が上昇していることが確認された。また, HCEMsの分化に関与するF-spondinやCEMP-1のmRNA発現レベルは, WMTA群でF-spondinの発現が低下し, CEMP-1の発現が上昇する傾向にあった。ALP活性は, 材料間に有意差はないものの, ALP染色により, BG multi (60)群はWMTA群と比べて高くなる傾向を認めた。ARS染色は, BG multi (60)とWMTAは同程度の染色強度を示し, EBAより高い染色強度を示した。マウス背部皮下埋入試験後のH. E.染色および免疫組織染色において, BG multi (60)およびMTAによる周囲組織への炎症性細胞 (CD11bまたはCD45陽性細胞)の浸潤は少なく, EBAで多くの炎症性細胞の集積が観察された。

【考察】BG multiは, 既存材料と比較して硬化時間の短縮, および安定した物理学的特性を有することが示唆された。また, BG multiは, HCEMsの生存・分化に対する影響が少なく石灰化を誘導していることから細胞適合性を有し, さらに, マウス背部皮下埋入で材料周囲への炎症性細胞の浸潤も少ないことから生体適合性を有することが示唆された。

【結論】新たに商品化されたBG配合セメントであるBG multiは, 逆根管充填材として有用である。

Notch シグナル伝達経路を介した破骨細胞分化のメカニズム

1.岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野

2.岡山大学病院 歯科・歯周科部門

○本行令奈¹, 池田淳史², 山本直史¹, 高柴正悟¹

Mechanism for Osteoclast Differentiation through Notch Signaling Pathway

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

2.Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital

○HONGYO Reina¹, IKEADA Atsushi², YAMAMOTO Tadashi¹, TAKASHIBA Shogo¹

【目的】

歯周病は、歯周病原細菌の歯周組織への持続感染によって発症する感染症の一つであり、その本態は、歯周病原細菌を排除するために働く一連の免疫応答によって、血中に存在する単球が破骨細胞へと分化し、歯槽骨を吸収することにある。多細胞生物において進化的によく保存された有名なものの中に Notch シグナル伝達経路があり、それと破骨細胞分化との関連はいくつか報告されているものの(Ashley J.W. *et al.*, *J. Cell Biochem.*, 2015; Goel P.N. *et al.*, *J. Orthop. Res.*, 2019), 意見の一致は得られていない。また、その経路を活性化させる物質に A Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing protein (ADAM) 10 および 17 がある。ADAM は、メタロプロテアーゼドメインを有する膜貫通型タンパク質であり、様々な疾患との関与が明らかとなっているが、歯周病との関係は明確にされていない。本研究では、破骨細胞分化と Notch シグナル伝達経路、そして ADAM10 および 17 との関係を明らかにしようとした。(岡山大学動物実験委員会 承認番号: OKU-2020331)

【材料と方法】

12 週齢の雄性 C57BL/6J マウスの大腿骨および脛骨から骨髄細胞を採取し、10%の非働化したウシ胎児血清を添加した α MEM 培地にマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) を添加して 6 日間培養し、マクロファージへと分化させた。その後、M-CSF と NF- κ B 活性化受容体リガンド (RANKL) を添加して、破骨細胞分化を誘導した。まず破骨細胞分化に Notch シグナル経路が関与するか確認するため、RANKL を添加した 2, 4, 8, 12, 24, そして 48 時間後の総 RNA を回収し、破骨細胞の分化遺伝子 (*Nfatc1* と *Dcstamp*) と Notch シグナル経路の関連遺伝子 (*Notch1-4*, *Jagged1*, *2*, *Dll3*, *4*, *Adam10*, *17*) の発現量の違いを qRT-PCR 法を用いて解析した。さらに、4, 8, 12, 24, そして 48 時間後には総タンパク質を回収し、Notch シグナル経路の関連遺伝子に対応するタンパク質発現量の違いを Western blotting 法にて解析した。上記結果をもとに Notch シグナル経路の中で破骨細胞分化へ関わる JAGGED1 に着目し、RANKL の添加と同時に、もしくは 1, 2, 3 日後に JAGGED1 の中和抗体とそのアイソタイプ抗体を添加し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色にて破骨細胞の形成を調べた。さらに、ADAM10 と 17 それぞれの阻害剤である GI254023X と KP-457 を添加し、同様の実験を行った。尚、統計解析は、qRT-PCR 法の結果には Student's *t*-test を、TRAP 染色法の結果には One-way ANOVA Tukey-Kramer 法を用いた。

【結果】

RANKL 添加群は非添加群に比べ、*Nfatc1* の発現量の増加よりも早い 2, 4 時間後に *Notch2* と *Jagged1* の発現量が増加し、一方で 4, 8, 12, 24 時間後に NOTCH2 が、4, 8 時間後に JAGGED1 が増加した。また、RANKL 添加と同時に JAGGED1 の中和抗体を添加した群のみが、アイソタイプ抗体群に比べて破骨細胞の形成が抑制された。さらに、阻害剤を使用した同様の実験では、RANKL 添加と同時に KP-457 を添加した群のみが、非添加群に比べて破骨細胞の形成が抑制された。なお、GI254023X は破骨細胞の形成を抑制しなかった。

【考察と結論】

本結果から RANK-RANKL の結合によって、マクロファージの極早期に NOTCH2 と JAGGED1 が発現し、それらの結合と ADAM17 によって Notch シグナル伝達経路が生じ、破骨細胞の分化が開始することが示唆された。すなわち、生理的な条件下では、破骨細胞への分化の極初期に Notch シグナル伝達経路が関与している可能性がある。

日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子
LIPA SNP rs143793106 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 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)
○松本昌大、藤原千春、北垣次郎太、Teerachate Nantakeeratipat、山本 優、榎本梨沙、村上伸也

Effects of *LIPA* SNP rs143793106, a disease-related gene for aggressive periodontitis in a Japanese population, on cytodifferentiation of human periodontal ligament cells

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

【目的】侵襲性歯周炎は、全身的に健康であるが急速な歯周組織の破壊を示すことを特徴とする疾患である。また、家族内集積を認めることから、本疾患の病態形成には遺伝的要因の関与が示唆されている。我々はこれまでに、エクソームシーケンス解析を用いたゲノムワイドアプローチによって*Lipase-A*, *Lysosomal Acid Type (LIPA)* SNP rs143793106 (c.1009T>C, p. Thr337A1a) を日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として同定した (大阪大学ヒトゲノム研究承認番号 629-2)。しかしながら、*LIPA* のヒト歯根膜細胞 (HPDL) における発現及び機能は不明である。そこで本研究では、*LIPA* SNP rs143793106 の HPDL における発現及び同細胞の硬組織形成に及ぼす機能を解析することを目的とした。

【材料と方法】HPDL に *LIPA* mRNA が恒常的に発現していることを、リアルタイムPCR法を用いて検討した。さらに、HPDL を石灰化誘導培地 (10 % FCS, 10 mM β -glycerophosphate, 50 μ g/ml ascorbic acid 含有 α -MEM) 存在下にて硬組織形成細胞へと20日間分化誘導した際の、アルカリホスファターゼ (*ALP*) および *LIPA* の mRNA 発現の経時的変化をリアルタイムPCR法にて検討した。HPDL における *LIPA* SNP rs143793106 の機能解析を目的として、*LIPA* 野生型 (WT) および SNP rs143793106 (mut) 発現レンチウイルスベクターをHPDL に遺伝子導入した。コントロールには Empty Vector (EV) 導入HPDL を用いた (遺伝子組み換え実験認可番号 04290)。遺伝子導入後、リアルタイムPCR法及びウエスタンブロット法を用いて *LIPA* WT, mut および EV 導入HPDL における *LIPA* mRNA および Lysosomal Acid Lipase (LAL) タンパクの発現を比較した。*LIPA* WT, mut および EV 導入HPDL における LAL の酵素活性を、Lysosomal Acid Lipase Assay Kit を用いてフローサイトメトリー法により測定した。加えて、*LIPA* WT, mut および EV 導入HPDL を石灰化誘導培地にて硬組織形成細胞へと27日間分化誘導した後、ALP 活性の測定、石灰化関連遺伝子 I 型コラーゲン (*COL1A1*) の mRNA 発現 (リアルタイムPCR法) 及び石灰化物形成能 (アリザリンレッド染色) を検討した。

【結果】リアルタイムPCR解析の結果、HPDL において *LIPA* mRNA の恒常的な発現を認めた。また、HPDL の硬組織形成細胞への分化過程において、石灰化関連遺伝子である *ALP* mRNA の発現が経時的に上昇すると共に、*LIPA* mRNA の発現も、経時的に上昇することが明らかとなった。リアルタイムPCR解析およびウエスタンブロットの結果、*LIPA* WT および mut を導入したHPDL において、EV 導入HPDL と比較して、*LIPA* の mRNA および LAL タンパク発現の高い発現を確認した。LAL 酵素活性測定の結果、*LIPA* WT 及び mut 導入HPDL において、EV 導入HPDL と比較して LAL の酵素活性の有意な上昇を認めた。一方、*LIPA* mut 導入HPDL においては、*LIPA* WT 導入HPDL と比較して、LAL の酵素活性が有意に低下することが明らかとなった。ALP 活性を測定した結果、*LIPA* mut を導入したHPDL において、*LIPA* WT 導入HPDL と比較して、有意な ALP 活性の低下を認めた。また、リアルタイムPCR解析の結果、*LIPA* mut を導入したHPDL において、*LIPA* WT 導入HPDL と比較して、*COL1A1* の mRNA 発現の有意な低下を認めた。さらに、アリザリンレッド染色の結果、*LIPA* mut を導入したHPDL は、*LIPA* WT 導入HPDL と比較して、石灰化物の形成が減少することが明らかとなった。

【結論と考察】*LIPA* SNP rs143793106 導入HPDL は、*LIPA* WT 導入HPDL と比較して、LAL の酵素活性、ALP 活性、石灰化物形成能、及び *COL1A1* mRNA 発現が有意に低下することが明らかとなった。これらの結果より、*LIPA* SNP rs143793106 は HPDL の硬組織形成細胞への分化を負に制御することで、侵襲性歯周炎の病態増悪に寄与することが示唆された。

SPOCK1 は歯周炎における歯槽骨吸収と歯肉肥厚に関与する

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

○今川澤、新城尊徳、山下明子、西村優輝、瀬々起朗、佐藤晃平、岩下未咲、西村英紀

The involvement of SPOCK1 in alveolar bone loss and gingival overgrowth in experimental periodontitis.

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

○Mio Imagawa, Takanori Shinjo, Akiko Yamashita, Yuki Nishimura, Tatsuro Zeze,
Kohei Sato, Misaki Iwashita, Fusanori Nishimura

【目的】

生活習慣の欧米化、メタボリックシンドロームの増加などにより、高血圧患者数が増加している。一部の高血圧薬は副作用として薬剤性歯肉増殖症 (Drug-induced gingival overgrowth : DIGO) を起こすことが知られている。ひとたび、DIGO が歯周炎を併発すると難治性となることが多い。また難治性となった歯周炎は、歯周医学的な観点から全身的な問題となりやすいことが示唆される。したがって、歯肉増殖を引き起こす要因と、それが既存の歯周炎においてどのような動態を取るかを理解し、歯周炎並びに歯肉増殖に対する新たな制御法を確立することは急務の課題である。

これまで我々は、細胞外プロテオグリカンであり上皮間葉転換 (EMT) 誘導因子として発見された SPOCK1 に着目し、ニフェジピンやフェニトインなど歯肉増殖症を引き起こすことが知られている薬剤が、歯肉線維芽細胞の TGF- β 産生を促進し、結果的に歯肉上皮細胞の SPOCK1 発現を増大することで EMT が亢進し歯肉増殖症が誘発されること、また SPOCK1 タンパクを過剰発現させた *Spock1-Tg* マウスは歯肉増殖を発症することを発見し報告した (Alshargabi R *et al.*, *Sci Rep*, 2020)。一方で、SPOCK1 は複数のプロテアーゼ阻害活性を持つことが知られており、歯周炎の組織破壊における関与や、歯周炎症にตอบสนองしてさらに歯肉増殖を増大するか否かは不明である。そこで、*Spock1-Tg* マウスにおいて実験的歯周炎を惹起し、歯槽骨吸収や歯肉増殖の変化についての検討を行った。

【材料・方法】

- ①10~12 週齢の雄性 *Spock1-Tg* マウスに、麻酔下で 6-0 絹糸を上顎第 2 臼歯周囲に結紮し 10 日間維持することで実験的歯周炎モデルとした。対照群には同週齢で雄性の同腹仔野生型 (WT) マウスを用いた。屠殺後、速やかに実体顕微鏡下で歯肉の肥厚を観察・評価したのちに、上下顎臼歯部周囲歯肉を採取し、RNA およびタンパクを抽出した。上顎は残余軟組織を除去し歯槽骨吸収を実体顕微鏡下で評価した。歯肉組織中の SPOCK1 タンパクの発現レベルをウェスタンブロッティング (WB) 法にて確認した。
- ②チオグリコレートを腹腔内投与し、*Spock1-Tg* および WT マウスから腹腔マクロファージを得た。その後、10ng/ml *E.coli* LPS と 100ng/ml Pam3CSK4 で刺激を行い、TNF α ・IL-1 β の遺伝子発現を qPCR 法にて検討した。
- ③マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に 100ng/ml recombinant mouse (rm)RANKL を 100ng/ml rmSPOCK1 とともに 7 日間共刺激を行い、破骨細胞形成を TRAP 染色にて確認し、RANKL 単独刺激条件と比較した。

**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 : A20-109-2, 2-15)。

【結果及び考察】

- ①*Spock1-Tg* マウスは WT マウスと比較して、結紮による歯肉肥厚が有意に増大するとともに、歯槽骨吸収が有意に増悪した。結紮による歯肉肥厚は、歯肉中の SPOCK1 タンパクの発現量に応じて亢進した。
- ②*Spock1-Tg* マウス由来腹腔マクロファージにおける LPS 誘導性 TNF α および IL-1 β の遺伝子発現は、WT マウス由来細胞よりも有意に抑制されていた。
- ④RAW264.7 細胞の破骨細胞形成は、RANKL 単独刺激と比較して RANKL・SPOCK1 共刺激条件下で亢進した。

以上の結果より、SPOCK1 はマクロファージの炎症反応に対しては抑制的に働く一方で、破骨細胞形成については促進的に働くことで歯周炎における歯槽骨吸収を増大させることが分かった。また、歯周炎症にตอบสนองした歯肉肥厚は *Spock1-Tg* マウスで大きく亢進することが分かった。

***Porphyromonas gingivalis* はインターフェロンシグナルを抑制する**

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)
○阿部 翔太郎、大嶋 淳、森田 真吉、林 美加子

***Porphyromonas gingivalis* suppresses interferon signaling.**

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry,
○Shoutaro ABE, Jun OHSHIMA, Masayoshi MORITA, Mikako HAYASHI

【緒言】 インターフェロンシグナルは、宿主細胞にとって細胞内に侵入してきた病原体の排除にきわめて重要な感染防御機構である。特にマクロファージでは、インターフェロン-ガンマの作用によって約2000にも及ぶ遺伝子の発現が誘導され、活性化することにより細胞内殺菌作用が増強される。一方、主要な歯周病原細菌である*Porphyromonas gingivalis* は、細胞内に侵入することで宿主の免疫系を回避し、病態を進行・遷延化させている可能性が示唆されているものの、その細胞内生存戦略については不明な点が多い。そこで本研究では、根尖性および辺縁性歯周炎に対する新規の創薬・治療戦略の創生を念頭に、宿主のインターフェロンシグナル応答と*P. gingivalis* 感染の相互作用について検討を加えた。

【研究方法と結果】

1. RNA-seq法による*P. gingivalis*感染時の宿主遺伝子発現の網羅的解析

活性化マクロファージにおいて*P. gingivalis* 感染による遺伝子発現挙動を網羅的に把握するため、ヒトマクロファージ株 (THP-1) に*P. gingivalis* ATCC33277株を感染させ、24時間後のmRNAを精製してRNAシーケンス解析を行った。その結果、インターフェロンにより誘導される炎症関連因子の多くが*P. gingivalis* 感染によって発現抑制されることが明らかとなった。インターフェロンシグナルの中心となる転写因子であるSTAT1の発現も有意に阻害されていた。また、同一条件で回収したmRNAをリアルタイム定量PCRにて追加検証を行ったところ、STAT1、GBP、IRFといったインターフェロン誘導因子の発現低下を確認することができた。

2. 他種細胞・他種細菌での*P. gingivalis* によるシグナル抑制効果の検討

P. gingivalis 感染によるインターフェロンシグナルの抑制効果が、マクロファージ以外の細胞でもみられるのかを検討するために、多様な細胞株をインターフェロン-ガンマで刺激した後*P. gingivalis* を感染させ、24時間後のSTAT1の発現をリアルタイム定量PCRで解析した。その結果、血球系細胞株や歯肉上皮細胞株においても*P. gingivalis* によるシグナル抑制効果を認めた。

また、*P. gingivalis* 以外の口腔内細菌によるインターフェロンシグナルの抑制効果についても検討するため、*Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Enterococcus faecalis*を感染させて24時間後のSTAT1遺伝子の発現をリアルタイム定量PCRで解析したところ、*P. gingivalis* で確認されるようなSTAT1の発現抑制は他の菌種では認められなかった。

3. *P. gingivalis* が持つインターフェロンシグナル抑制に関わる病原因子の探索

P. gingivalis によるインターフェロン抑制メカニズムについてさらなる検討を加えるため、*P. gingivalis* の遺伝子欠損株を作成し、上記と同様の方法で細胞に感染させ24時間後のSTAT1遺伝子の発現をリアルタイム定量PCRで解析した。その結果、T9SS (The type IX secretion system) に関連する遺伝子のノックアウト株でSTAT1の抑制効果が消失した。

【考察および結論】 *P. gingivalis* はインターフェロンシグナルを抑制し、マクロファージの活性化を阻害することが明らかとなった。また、免疫細胞だけでなく歯肉上皮細胞でも*P. gingivalis* はインターフェロンシグナルを抑制しており、これにより宿主が持つ細胞内侵入病原体に対する排除機構を回避していることが示唆された。*P. gingivalis*と同様のシグナル抑制効果は他の口腔内細菌では認められず、*P. gingivalis* に特異的なものであることが示された。さらに、*P. gingivalis*によるインターフェロンシグナル抑制効果にはT9SSに関連する遺伝子が重要であることが明らかとなり、T9SSを介したインターフェロンシグナルの抑制メカニズムをさら詳細に検討することで、歯周疾患の成立機序に新たな視点を加えられる可能性が示唆された。