

S-PRG フィラー配合によるオフィスブリーチ材の漂白効果

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

○赤羽根 広大¹, 平石 典子¹, 下島 美夏¹, Feng QI¹, 大槻 昌幸¹, 島田 康史¹

Bleaching Effect of In-office Whitening Agent with S-PRG Filler

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

○Kodai Akabane¹, Noriko Hiraishi¹, Mika Shimojima¹, Feng QI¹, Masayuki Otsuki¹, Yasushi Shimada¹

【緒言】

S-PRG (surface reaction-type pre-reacted glass-ionomer) フィラーは、6種類のイオン（フッ化物イオン、ナトリウムイオン、ホウ酸イオン、アルミニウムイオン、ケイ酸イオン、ストロンチウムイオン）が徐放されることにより、抗プラーク付着性、酸中和能や、歯質の脱灰を抑制などの特徴を有する機能性ガラス素材として注目されている。しかし、過酸化水素を主成分とするオフィスブリーチ材に配合した場合、エナメル質の漂白効果に関する報告は未だない。本研究では漂白材（Hi-Lite, Shofu, Kyoto, Japan）に S-PRG フィラーを配合し、漂白効果を評価し、また、pH 変化と電子スピン共鳴装置(ESR)を用いて検証した。

【材料及び方法】

ウシ切歯唇側面より 5x5x3mm のエナメル-象牙質ブロックを切り出し、耐水研磨紙研磨した。その後、紅茶ティーバック(Lipton yellow label tea bags, Unilever Japan, Tokyo, Japan)の抽出液に 7 日間浸漬し、色彩計(NR-11, Nippon Denshoku, Tokyo, Japan)を用いて測色し L*値が 40-50 となったものを試料とした。漂白材 Hi-Lite の粉に S-PRG フィラーを 5%、10%配合させた群と、配合無し(コントロール)群を用いて、紛液比及び漂白方法はメーカー指示通りとした(各 n=8)。色彩計を用いて、漂白処置 30 分(10 分 x 3)後の CIE L*a*b*値測定し、 ΔE (色差)の算出し評価した。また、漂白材の液(35%過酸化水素)を 10 倍希釈し、pH meter (Laqua twin compact pH meter, HORIBA, Kyoto, Japan)を用いて S-PRG フィラー配合による pH 変化を 10 分間測定した。更に、ESR (Magnetech ESR5000, Bruker, MA, USA)にて、粉:液=2mg:6 μ l の割合で混和後、10 分経過時の含有マンガン(II)の ESR 信号を測定し、初期値からの信号減少割合を算出し、ラジカルの最終発生量とした。得られたデータは、一元配置分散分析、及び Tukey test を用いた統計学的検討を有意水準 5%にて行なった。

【結果及び考察】

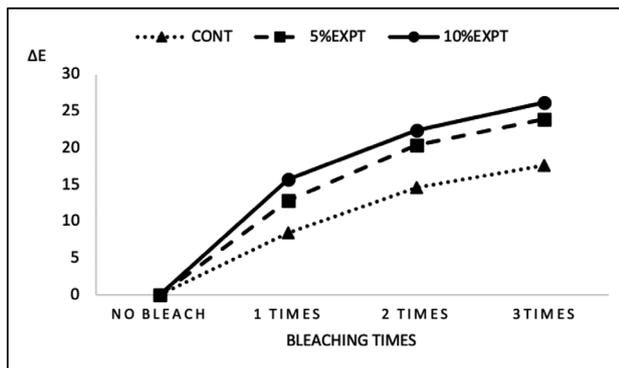
各実験群において肉眼にて漂白効果が認められ、その程度は、漂白回数が増すに連れて顕著となった。一方 5% S-PRG フィラーを配合した群と 10% S-PRG フィラーを配合した群では有意差が認められなかった(Fig)。液の pH では、コントロールでは pH4.8 から変化が見られなかったが、S-PRG 配合 5%では pH6.7、10%では pH6.8 まで上昇した。ESR では、漂白粉に含まれるマンガン(II)の ESR 測定から、ラジカルの最終発生量は、S-PRG 群はともに、コントロールと比べて上昇がみられ、統計結果では、5% S-PRG フィラー配合群と 10% S-PRG フィラー配合群では有意な差はなかった。

【結論】

過酸化水素を主成分とする漂白材は、S-PRG フィラーを配合することにより、その酸緩衝のために、pH が上昇し中性に近づく。その結果、過酸化水素の反応が促進され、ラジカルの発生量が増え、漂白反応が促進されることが推測できた。

Fig. Color difference of bleaching times

Groups with the same letter are not significantly different($p>0.05$)



S-PRG フィラー配合によるオフィス漂白材のエナメル質に及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野

○下島 美夏¹, 平石 典子¹, 赤羽根 広大¹, Feng QI¹, 大槻 昌幸¹, 島田 康史¹

Effect of In-office Bleaching Agent with S-PRG Filler on Enamel

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

○Mika Shimojima¹, Noriko Hiraishi¹, Kodai Akabane¹, Feng QI¹, Masayuki Otsuki¹, Yasushi Shimada¹

【緒言】

S-PRG (surface reaction-type pre-reacted glass-ionomer) フィラーは、6種類のイオン（フッ化物イオン、ナトリウムイオン、ホウ酸イオン、アルミニウムイオン、ケイ酸イオン、ストロンチウムイオン）が徐放されることにより抗プラーク付着性、酸中和能や、歯質の脱灰を抑制などの特徴を有する機能性ガラス素材として注目されている。しかし、過酸化水素を主成分とするオフィス漂白材に配合した場合、エナメル質への影響を評価した報告は未だない。本研究では漂白材 (Hi-Lite, Shofu, Kyoto, Japan) に S-PRG フィラーを配合し、漂白によるエナメル質形状への影響について、Sa 算術平均高さ (面粗さ)、ピッカース硬さ、走査電子顕微鏡 (SEM) にて表面性状、及びエネルギー分散型 X線分析 (EDX) にて表面観察を行い、検証した。

【材料及び方法】

ウシ切歯唇側面より 5x5x3mm のエナメル-象牙質ブロックを切り出し、耐水研磨紙にて研磨した。その後、紅茶ティーバック (Lipton yellow label tea bags, Unilever Japan, Tokyo, Japan) の抽出液に、7日間浸漬し、色彩計 (NR-11, Nippon Denshoku, Tokyo, Japan) を用いて測定し L*値が 40-50 となったものを試料とした。漂白材 Hi-Lite の粉末に S-PRG フィラーを 5%、または、10% 配合させた群と、配合無し (コントロール) 群を用いて、粉液比はメーカー指示通りとし、漂白操作 30 分 (10 分 x3 回) を行った (各 n=8)。漂白前後のエナメル質表層を、表面計測に関するパラメータの Sa 算術平均高さ (面粗さ) を、Confocal laser scanning microscope (CLSM; VK-X 150 series, Keyence, Osaka, Japan) にて、ピッカース硬さ試験には Microhardness tester (HM-102, Mitutoyo, Yokohama, Japan) を用いて観察した。また表層の形状は、SEM (JSM-IT100, JEOL, Tokyo, Japan) にて観察し、別途カーボンコーティングを施した後、EDX 分析を行った。得られた計測値は、一元配置分散分析及び Tukey test を用いた統計学的検討を有意水準 5% にて行った。

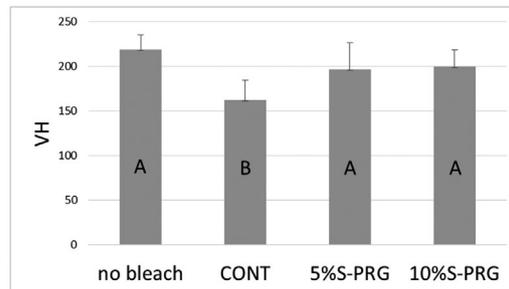
【結果及び考察】

Sa 算術平均高さは、コントロールは、S-PRG 配合群より有意に大きかった。なお 5% および 10% S-PRG 配合群の間には有意差が認められなかった。SEM 観察にて、コントロールでは表面が粗造で、耐水研磨紙によるエナメルスメアが除去されておりエナメル小柱形状が観察された。S-PRG フィラー配合群では、スメアが残り、表層の粗造感は顕著ではなかった。また Microhardness 試験 (Fig) では、コントロールでは値が低下したが、S-PRG 配合群では漂白前の値と有意差が認められなかった。EDX 分析にて、S-PRG 配合群では、漂白後のエナメル質表面に、フッ化物、ストロンチウム等の検出が多く見られた。

【結論】

S-PRG フィラー配合により、漂白時のエナメル質形状への影響が小さく、漂白による粗造感は軽減されることが判明した。また、EDX 分析の結果より、S-PRG フィラーからリリースしたフッ化物などが、漂白時にエナメル質に作用し、エナメル質表層を保護する可能性が示唆された。

Groups with the same letter show no significant difference (p>0.05) Fig. The results of Vickers hardness



最近のオールインワンアドヒーズシステムを用いた 歯髄圧負荷象牙質面への質的接着評価

日本歯科大学生命歯学部 接着歯科学講座

○杉山怜央, 河本 芽, 丸山智重, 越田清祐, 奈良陽一郎

Qualitative bonding evaluation for pulpal pressured dentin surfaces using recent all-in-one adhesive systems

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

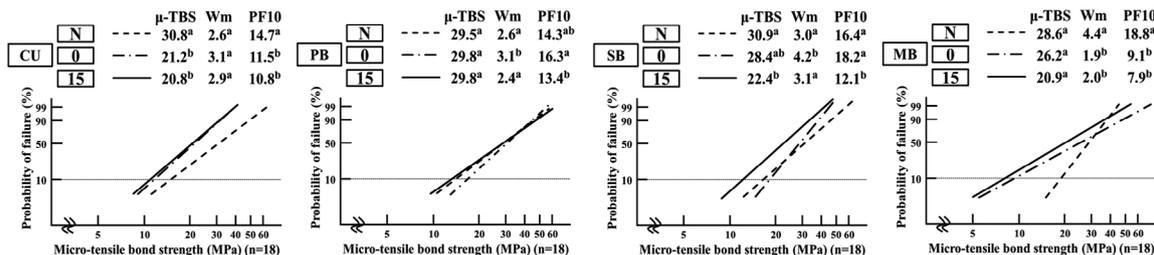
○SUGIYAMA Reo, KOMOTO Mei, MARUYAMA Chie, KOSHIDA Seisuke, NARA Yoichiro

【目的】生活歯への形成によって被修復面となる健全象牙質窩壁への接着は、歯髄圧負荷された象牙細管内液による影響が危惧される。そこで、最近のオールインワンアドヒーズシステムを用いて、異なる歯髄圧負荷条件下におけるヒト象牙質面に対する微小引張接着強さ (μ -TBS) を測定し、質的な接着評価を行った。

【材料および方法】被験歯には、本学部倫理審査委員会の承認 (NDU-T2019-32) を経て、0.1%チモール水溶液中に保存したヒト抜去健全上顎大白歯 24 本を用いた。まず、被験歯の CEJ 最下点から 2 mm 下方で歯根を水平断し、歯髄組織の除去を経て、小孔付きアクリル板によって歯髄腔を封鎖した。ついで、近心頬側窩から 2 mm の位置にて水平断後に、注水下 SiC 研磨紙 #180 より研削によって歯冠部象牙質面を得た。これら試料を 3 群、すなわち①歯髄圧非負荷群 (N; 対照)、②蒸留水を満たした被験歯歯髄腔封鎖のアクリル板小孔に蒸留水を満たしたシリコンチューブを挿入し、象牙質面から貯水面までの垂直距離を 0 cm に設定した 0 cm H₂O 歯髄圧群 (0)、③同距離 15 cm に設定した 15 cm H₂O 歯髄圧群 (15) に類別調整した。その後、これら象牙質面に対し最近のオールインワンアドヒーズシステム、すなわち CLEARFILL Universal Bond Quick ER (CU: Kuraray Noritake Dental)、Prime&Bond universal (PB: Dentsply Sirona)、Scotchbond Universal Plus (SB: 3M)、ならびに対照として 2 ステップセルフエッチングプライマーシステムの CLEARFILL Mega Bond 2 (MB: Kuraray Noritake Dental) を含めた 4 システムによる歯面処理を行った。なお、当該処理は、N では象牙質面の調整直後に、0 と 15 では湿潤効果が現れる歯髄圧負荷開始から 2 時間後に実施した。ついで、シリコンモールド併用による厚さ 2.0 mm × 3 回の規格化水平分割積層填塞と光照射によって、レジンの接着築盛を図った。その後、N は 37 °C 水中への 24 時間保管後に、0 と 15 は歯髄圧負荷条件下の 24 時間経過後に、それぞれ頬舌的 4 回、近遠心的 4 回の切断によって、1 試料から断面積 1.0 mm² のビーム状試料 9 片を得て、C.H.S. 1.0 mm/min で μ -TBS 値 (n=18) を測定した。得られたデータに対する質的評価には、メジアンランク法によるワイブル分析を用いた。

【成績と考察】下図に、4 種接着システムを用いた 3 種歯髄圧群間の平均 μ -TBS 値とワイブルパラメーターの違いを示す。CU における Wm 値は、歯髄圧条件に拘わらず同等であったが、PF10 値においては、対照とした N と比較して 0/15 は有意に小さな値を示した。また、PB/SB の Wm 値は、N と比較して 0 は有意に大きな値を、15 は同等の値を示した。さらに両システムの PF10 値に着目すると、PB では N と 0/15 との間に有意差を認めないものの、SB では N と 0 は同等であったが、15 は有意に小さい値を示した。さらに、対照とした MB は、N と比較して 0/15 が有意に小さな Wm 値/PF10 値を示した。他方、CU/PB/SB は MB と比較して、N においては同等または有意に小さな Wm/PF10 値を示したが、歯髄圧負荷条件下では同等または有意に大きな値を示した。以上の結果から、優れた接着性を具備するとの国内外評価を得ている MB は、歯髄圧負荷によって湿潤状態となった象牙質面への接着信頼性・耐久性が有意に劣化するものの、最近の 3 種オールインワンシステムを活用した場合は、その影響を受けにくいことが判明した。特に 15 cm H₂O 歯髄圧負荷条件下では、MB より優れた接着信頼性・耐久性を発揮することが確認できた。

【結論】歯髄圧負荷象牙質面に対し、最近のオールインワンアドヒーズシステムを活用した場合、その接着信頼性・耐久性はシステムによって異なるものの、湿潤状態にある象牙質面に対しても、質的に長けた接着の獲得に至っていると評価できた。



Different letters indicate statistically significant differences between two groups ($p < 0.05$)

Differences in μ -TBS and Weibull parameters using four adhesive systems among three pulpal pressured conditions

銀ナノ粒子含有洗口剤の多菌種バイオフィームに対する齶蝕原性抑制効果

神奈川歯科大学 歯科保存学講座 保存修復学分野¹, 分子生物学講座 口腔細菌学分野²

○富山 潔¹, 渡辺清子², 浜田信城², 向井義晴¹

Antibacterial effects of a mouth rinse containing silver nanoparticles for cariogenicity on polymicrobial biofilms

¹Department of Restorative Dentistry, ²Department of Oral Microbiology, Kanagawa Dental University,

○ TOMIYAMA Kiyoshi¹, Watanabe Kiyoko², HAMADA Nobushiro², MUKAI Yoshiharu¹

【研究目的】 銀は様々な細菌の増殖を抑制する抗菌効果を持ち、特に薬剤耐性菌に対しても抗菌作用を示すため、抗生物質が効かない感染症にも効果があると期待されている。銀イオンは細菌細胞膜の破壊やタンパク合成阻害により、口腔内プラーク形成を抑制すること、また、インプラント体をコーティングすることにより、インプラント体表面へのプラーク形成を抑制することなどが報告されている。グラム陽性および陰性菌など、広い抗菌スペクトルを有し、その抗菌力は銅イオンや塩素の約10倍大きく、その上、人体への影響も少ないと考えられている。ナノ銀粒子サイズにすることによりイオンの溶出量が増し、その抗菌効果の上乗せが期待できる。しかしながら、銀ナノ粒子を含有する洗口剤が口腔内のような多菌種を含有するバイオフィームに対して、どの程度、再増殖を抑制し、さらに代謝を抑制するか、その抗菌効果の持続性についての報告は認められない。本研究の目的は、ヒト口腔内の細菌叢を模したex vivo モデルである多菌種バイオフィームの齶蝕原性に対するナノサイズ銀イオンの効果を分析することである。

【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のガラス円板を用いた。被験者から採取した刺激唾液を50倍希釈となるようにunbuffered McBain 2005 (0.2%スクロース含有)培養液に混入後、培養液の交換を10時間の時点で行ない、培養24時間の時点で各処理剤あるいは滅菌脱イオン水(Cont)に5分間浸漬後、10時間、14時間毎に培養液を交換して72時間まで嫌気培養(CO₂:10%, H₂:10%, N₂:80%, 37℃)してバイオフィームを形成した。

[処理]: 処理群は、① cont群(滅菌脱イオン水)、② 0.05C群(0.05% グルコン酸クロルヘキシジン)、③ 0.2C群(0.2% グルコン酸クロルヘキシジン, Corsodyl, GlaxoSmithKline)、④ Xyl群(25% キシリトール)、⑤ Sv群(Nano silver mouth rinse, Elementa)の5群とした。 [分析]: 24時間培養後のバイオフィームに対し5分間の各処理を行なった時点および、その後48時間培養を行なった時点で、総細菌数(CFU/ml)および乳酸産生量(mmol/l)の分析を行なうことにより、抗菌剤のバイオフィームへの抗齶蝕原性の持続性を分析した(n=10)。測定値は、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、各処理剤が、多菌種バイオフィームの再増殖や糖代謝抑制後の、代謝の再活性化に与える影響を比較検討した。

【結果及び考察】 処理後の細菌細胞数(CFU/ml)は、培養24時間の処理直後において、cont群に比較し0.05C、0.2CおよびSv群は有意に低く(p<0.05) (cont: 3.76×10⁸, 0.05C: 5.73×10⁷, 0.2C: 1.77×10⁷, Sv: 1.87×10⁷)、Xyl群(3.30×10⁸)とcont群の間に有意差は認められなかった(p>0.05)。その後48時間培養を継続すると、Xyl群を除くすべての群では、cont群に比較して有意に細菌細胞数が低かったが(p<0.05) (cont: 4.90×10⁸, Xyl: 4.67×10⁸, 0.05C: 1.55×10⁸, 0.2C: 7.10×10⁷, Sv: 4.87×10⁷)、特に0.2CおよびSv群はすべての群に比較して有意に低い細菌細胞数を示した。バイオフィームの乳酸産生量(mmol/ml)は、処理直後において、contおよびXyl群に比較し他群は有意に低い乳酸産生量を示した(p<0.05) (cont: 1.02, Xyl: 0.96, 0.05C: 0.55, 0.2C: 0.22, Sv: 0.37)。その後、48時間、培養を継続した結果、すべての群に乳酸産生量の増加が認められたが、0.2CおよびSv群は持続的に低い乳酸産生量を示した(p<0.05) (cont: 1.95, Xyl: 1.90, 0.05C: 1.45, 0.2C: 0.47, Sv: 0.46)。

【結論】 銀ナノ粒子含有洗口剤による多菌種バイオフィームの細菌細胞数および糖代謝の抑制は持続的であることから、頻度の少ない使用法でも、効果的かつ耐性菌を作りにくい齶蝕原性の抑制法となり得ることが示唆された。

本研究は、神奈川歯科大学 倫理委員会の承認を得て遂行された【研究倫理 審査番号 495】。

本研究内容及び発表に際しての開示すべき利益相反関係にある企業などはない。

(本研究は、神奈川歯科大学 倫理委員会の承認を得て遂行された【研究倫理 審査番号 445】)

ニッケルチタン製ロータリーファイルによる 根管形成で生じる応力および根管形成能に及ぼす各種回転様式の影響

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野
○大森智史, 牧圭一郎, 木村俊介, 中務太郎, 雲野颯, 春日柚香, 平野恵子, 海老原新, 興地隆史

Effect of various rotational modes on the stress generation and shaping ability during nickel-titanium rotary root canal instrumentation

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

○OMORI Satoshi, MAKI Keiichiro, KIMURA Shunsuke, NAKATSUKASA Taro, UNNO Hayate,
KASUGA Yuka, HIRANO Keiko, EBIHARA Arata, OKIJI Takashi

【目的】ニッケルチタン製ロータリーファイル(以下「NiTi ファイル」)を用いた根管形成では、正逆回転を一定時間間隔で繰り返す往復回転や、設定値以上のトルクで 90° 逆回転し、その後は 180° 正回転を行う Optimum Torque Reverse (OTR) モーションなど、ねじり応力の発生低下を意図した様々な回転様式が開発されている。一方近年、熱処理加工された NiTi ファイルの特性が注目されているが、これらにいかなる回転様式が有用であるかは議論の余地がある。そこで本研究は、同一形状で熱処理のみ異なる二種の NiTi ファイル[ProTaper Universal (PTU; 非熱処理合金製) および ProTaper Gold (PTG; 熱処理合金製); いずれも Dentsply Sirona] を解析対象とし、切削角度の異なる往復回転、OTR モーション、あるいは連続回転で用いた際に生じる応力および根管形成能を評価することを目的とした。

【材料および方法】J 字型透明根管模型 (Dentsply Sirona) に対し、PTG SX で上部形成後、ステンレススチール製 手用 K ファイル (Zipperer; 以下 SS) #10, 15, PTG S1, S2 を順次用いて形成を行った。続いて改造した TriAuto mini (モリタ製作所) と自作型自動根管形成・荷重/トルク解析装置を用い、PTG F1 (連続正回転 300 rpm, トルクリバースなし) にて、2 秒間根尖側方向、1 秒間歯冠側方向に分速 20 mm で上下動を行うよう設定し形成した。次に PTU または PTG の F2 (300 rpm; #25/0.08 テーパー) により同様の設定で作業長まで形成した。この際、回転様式を正回転 150°, 逆回転 30° の往復回転 (以下「R1」), 正回転 240°, 逆回転 120° の往復回転 (以下「R2」), OTR モーション (以下「OTR」: 起動トルク 0.4 Ncm), 連続正回転 (トルクリバースなし, 以下「CR」) の 4 群 (n = 10) とした。NiTi ファイルは全て単回使用とし、破折やレジ形成が生じた場合は実験群より除外し、その数を記録した。根管内は RC-PrepTM (Premier) で満たし、適宜蒸留水 1 ml にて洗浄、SS#10 にて穿通確認を行った。荷重/トルク解析装置にて形成中の垂直荷重 (根尖方向、歯冠方向) とトルク (正回転方向、逆回転方向) の最大値を求め、形成前後の根管模型をデジタルマイクロスコープ (VH-8000; キーエンス) にて 20 倍で撮影、画像解析ソフト (Photoshop 7.0; Adobe Systems) にて重ね合わせを行い、根尖 0 mm での Centering ratio [(外湾切削量-内湾切削量)/形成後の直径; 値が小さいほど偏位が少ない] を算出した。二元配置分散分析、Bonferroni 法にて有意水準 5% で統計学的解析を行った。

【結果】歯冠方向の荷重 (screw in force) は PTU では回転様式による有意差は認めず ($p > 0.05$)、PTG では R2, OTR が R1, CR と比較し、有意に小さい値を示した ($p < 0.05$)。正のトルクは PTU では R1 に比べて OTR が有意に小さい値を示し ($p < 0.05$)、PTG では R2, CR に比べて OTR が有意に小さい値を示した ($p < 0.05$)。Centering ratio は PTU では R2, OTR では CR と比較して有意に小さい値を示し ($p < 0.05$)、PTG では回転様式による有意差を認めなかった。また R1, CR では PTG が PTU と比較し有意に小さい値を示した ($p < 0.05$)。

【考察】Screw in force については、PTG のみ R2 や OTR で有意に小さく、ファイルの柔軟性が高い場合にこれらの回転様式が減少に寄与することが示唆された。柔軟性が高いファイルは切削効率に劣るため、本実験のような上下動速度が低い条件では、正回転時に根管壁への食い込みが解除されづらいと考えられる。このため、PTG では R2 や OTR による食い込みからの解放がより効果的に作用したと思われる。正のトルクから OTR では過剰な食い込みが効果的に解除され、PTU では R1 より、PTG では CR よりも有意に小さい値を示したと考えられる。また Centering ratio からファイルの柔軟性が高い PTG の場合は回転様式による影響は少ないが、柔軟性が低い PTU の場合には R2, OTR を用いることで、PTG と同程度まで偏位を抑制できる可能性が示唆された。

【結論】本実験条件下では、R2, OTR は PTU では偏位の抑制、PTG ではねじり応力低減に寄与することが示唆された。

ニッケルチタン製ロータリーファイル TruNatomy による根管形成：応力発生および アピカルトランスポートの評価

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野
○雲野颯, 海老原新, 平野恵子, 春日柚香, 大森智史, 牧圭一郎, 木村俊介, 興地隆史

Evaluation of Stress Generation and Apical Transportation during Root Canal Preparation with TruNatomy NiTi Rotary Instruments

Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)
○UNNO Hayate, EBIHARA Arata, HIRANO Keiko, KASUGA Yuka, OMORI Satoshi, MAKI Keiichiro,
KIMURA Shunsuke, OKIJI Takashi

【目的】 TruNatomy Shaping File (Dentsply Sirona) は、低侵襲性根管治療を意図して開発された新規ニッケルチタン製ロータリーファイル (NiTi ファイル) であり、テーパーの小さいデザインや熱処理加工などにより優れた柔軟性と根管追従性を示すとされるが、その機械的特性についての報告は少ない。本研究は、根管形成時に生じる応力や根管形成能について、TruNatomy と既存の NiTi ファイルとの比較検討を行うことを目的とした。

【材料および方法】 1. 根管形成: TruNatomy (TRN), Hyflex EDM (Colten; HEDM), ProTaper Next (Dentsply Sirona; PTN), WaveOne Gold (Dentsply Sirona; WOG) を被験器具とし、J 字型彎曲根管模型 (Endo Training Bloc, Dentsply Sirona) に対して製造者推奨の手順で根管形成を行った。すなわち、TruNatomy Orifice Modifier (TRN), Hyflex EDM Orifice Opener (EDM), ProTaper SX (PTN) あるいは ProTaper Gold SX (WOG) による根管上部形成および #10 ステンレススチール製 K ファイル (Zipperer, Munich) での穿通確認後、自作型自動根管形成装置を用いて以下の手順でグライドパス形成および 2 本のファイルによるシングルレングス形成を行った。

TRN: TruNatomy Glider → TruNatomy Shaping File Small → TruNatomy Shaping File Prime

HEDM: HyFlex EDM GlidePath File → HyFlex EDM Preparation File → HyFlex EDM One File

PTN: ProGlider → ProTaper Next X1 → ProTaper Next X2

WOG: WaveOne GOLD Glider → WaveOne Gold Small → WaveOne Gold Prime

2. 応力解析試験 (n = 10): 自動根管形成装置に接続した応力解析装置を用いて、歯冠側方向、根尖側方向への垂直荷重と切削方向、非切削方向へのトルクを測定した。全形成過程における最大値を求め、比較検討を行った。

3. 根管形成能の評価 (n = 10): 術前 (グライドパス形成前)、術後の根管模型をデジタルマイクロスコープ (VH-8000, Keyence) にて撮影し、画像解析ソフト (Adobe Photoshop Elements 2021, Adobe) にて画像を重ね合わせ、根尖から 0-3mm の位置での centering ratio を (外彎切削量-内彎切削量) / 形成後の根管の直径) により求めた。

4. 統計学的解析: 応力解析試験では一元配置分散分析および Tukey 法にて、根管形成能の評価では二元配置分散分析および Tukey 法にて有意水準 5% で解析した。

【結果】 すべての試験でファイル破折、レジは生じなかった。

応力解析試験では、歯冠側方向の荷重は PTN > HED = WOG > TRN、根尖側方向の荷重は TRN が他群より有意に小さかった。トルクは切削方向では TRN が他群より有意に小さかったが、非切削方向では全群に有意差を認めなかった。

Centering ratio は根尖から 0mm の位置では WOG が他群より有意に小さく、0.5mm の位置では WOG は HEDM, PTN と比較して、また TRN は PTN と比較して有意に小さい値を示した。1, 2mm の位置では PTN は他の群と比較し有意に大きい値であったが、3 mm の位置では全群に有意差を認めなかった。

【考察】 本実験では、使用ファイルの本数や最終拡大サイズが類似の形成システムを TRN の比較対象とした。応力解析試験の結果から、TRN は小さいテーパーにより形成時に生じる応力が小さくなったと考えられる、また演者らは TRN が高い柔軟性を示すことを確認しており (第 41 回日本歯内療法学会学術大会)、その柔軟性からアピカルトランスポートが少ない形成が可能であることが示唆された。

【結論】 本実験条件下では、TRN は他の被験ファイルと比較して形成中の応力発生やアピカルトランスポートが少ない傾向を示した。

生体活性はケイ酸カルシウム系セメントに普遍的な特性か？

-18種のケイ酸カルシウム系セメントの生体内評価-

¹新潟大学 医歯学総合研究科 口腔健康科学講座 う蝕学分野

²新潟大学 医歯学総合研究科 口腔生命福祉学講座 口腔保健学分野

○枝並直樹¹, イブンベラル ラジサイフラー¹, 竹中彰治¹, 吉羽邦彦², 大倉直人¹,

吉羽永子¹, 野村由一郎¹

Is bioactivity a universal property of calcium silicate cements?

-In vivo evaluation of 18 calcium silicate cements-

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

²Division of Oral Science for Health Promotion, Department of Oral Health and Welfare, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○EDANAMI Naoki¹, Ibn Belal Razi Saifullah¹, Shoji Takenaka¹, YOSHIBA Kunihiko², OHKURA Naoto¹, YOSHIBA Nagako¹, and NOIRI Yuichiro¹

【目的】:ケイ酸カルシウム系セメントは現代の歯内療法に欠かせない材料である。このセメントの起源となる ProRoot MTA(PR)の発売から20年以上が経過し、現在では多数の後発製品が利用可能である。PRが優れた生物学的・理工学的特性を有していることは、これまでの研究から明らかである。一方で、後発ケイ酸カルシウム系セメントの特性は十分に解明されたとは言いがたい。後発製品の中にはレジンを添加したもの、プレミックス状のものなど、当初の粉・液タイプのPRとは材形および組成が大きく異なるものが存在しており、PRの優れた特性を受け継いでいるかは疑問が残る。ケイ酸カルシウム系セメントに期待される性質の一つが生体活性(アパタイト形成能)である。PRは体液と接触するとその表面に骨様アパタイトを形成し、骨伝導能を獲得すると共に、象牙質と密着する。大多数の後発ケイ酸カルシウム系セメントも、疑似体液中ではアパタイトを形成することが確認されているが、実際の生体内でアパタイト形成能が評価された例は非常に少ない。さらに我々は、疑似体液中でアパタイトを形成する材料も、生体内ではアパタイトを形成しない場合があることを報告している(RSI Belal, Clin Oral Investig. 2022)。そこで本研究では組成の異なる18種類のケイ酸カルシウム系セメントについて生体内アパタイト形成能を評価・比較した。

【材料および方法】:本研究は新潟大学動物倫理委員会の承認を得て行った(承認番号SA00365)。4週齢のWistarラットを剃毛し、背部皮下に以下のケイ酸カルシウム系セメントを埋入した(n=4)。PR、TMR MTAセメントミエール(TMR)、Biodentin(BD)、Retro MTA(RMTA)、MTA repair HP(MTAHP)、粉液5:1のMTA flow(FlowH)、粉液2:1のMTA flow(FlowS)、Endosequence BC Sealer(EBC)、Endosequence BC RRM Putty(EBCP)、EndoSeal MTA(EMTA)、BioC Sealer(BioC)、BioC Repair(BioCR)、Well Root ST(WST)、Well Root PT(WPT)、TheraCal LC(TCLC)、TheraCal PT(TCPT)、MTA Fillapex(MTAF)、Super MTA Paste(SMTA)。4週間経過後に試料を抽出し、結合組織を次亜塩素酸ナトリウムで除去した後に、各試料3点ずつ顕微ラマン分光光度計を用いてアパタイトの有無を評価した。

【結果】:PR、BD、Flow-H、Flow-S、EBC、EBCP、BioC、TCLC、SMTAでは960cm⁻¹の部位にアパタイトに由来するν1 P043-バンドを認めた。各材料のν1 P043-バンド陽性数は以下である。PR(4/12)、BD(8/12)、Flow-H(2/12)、Flow-S(2/12)、EBC(8/12)、EBCP(11/12)、BioC(4/12)、TCLC(3/12)、SMTA(12/12)。その他の材料では12計測点中、1点も960cm⁻¹の部位にバンドを認めなかった。

【結論】:後発ケイ酸カルシウム系セメントの生体内アパタイト形成能はPRと異なり、ラット皮下埋入条件下ではアパタイトを形成しない材料も存在することが明らかになった。後発ケイ酸カルシウム系セメントの臨床応用にあたりは各材料の特性を十分に考慮し、適切な材料を選択する必要があると思われる。

本研究に関して開示すべき利益相反関係にある企業などはありません。

ヒト歯髄細胞由来マイクロベジクル含有 PKR を標的とした歯髄鎮静薬および 歯内・歯周病変モデルの作成に向けて

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

○川上賢太郎、渡邊ゆかり、林千華子、豊田真頭、新城尊徳、讃井彰一、福田隆男、西村英紀

Establishment of sedative for dental pulp and combined periodontic-endodontic lesions model by targeting dental pulp-derived micro vesicle-containing protein kinase R

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

○Kentaro Kawakami, Yukari Watanabe, Chikako Hayashi, Masaaki Toyoda,

Takanori Shinjo, Terukazu Sanui, Takao Fukuda and Fusanori Nishimura

【背景および目的】

歯髄炎は急性の経過をたどることが多く、ひとたび急性歯髄炎が惹起されると組織は通常数日以内に完全に融解壊死する。我々は先行研究において、歯髄細胞がストレスに晒されると、①細胞内部でストレス顆粒を形成すること、②ストレス顆粒中で protein kinase R (PKR) が恒常的に活性化され、その活性を保持したままマイクロベジクル (mv) に内包され細胞外へ放出されること、③この mv が単球/マクロファージ系細胞に対して活性化 PKR を供給し、細胞を強力に活性化すること、④結果的にマクロファージから多量の TNF- α が産生されることを報告し、歯髄炎にみられる強力な急性炎症の原因を細胞外微粒子炎症惹起説として提唱した (Suzuki et al., *Sci Rep*, 2019)。歯髄細胞由来 mv による TNF- α 産生誘導能は極めて強力であり、その活性はグラム陰性菌由来内毒素 (LPS) の活性を遥かに凌ぐものであった。しかし、PKR を活性化する因子に関しては未だ不明な点が多い。そこで我々は、PKR と会合するとされる PACT が PKR 活性化に影響を及ぼすとの仮説を立て、既存の PKR 阻害剤 (2-AP, C16) および PACT と PKR 結合阻害効果が報告されているフラボノイド Luteorin による抗炎症効果を検証した。

一方で、歯髄炎や歯周炎による疾患の進行や組織破壊を比較・定量化するモデル、あるいは治療効果を判定する有効な *in vivo* モデルは未確立であった。そこでマウス結紮性歯周炎モデルにおいて、ヒト歯髄細胞由来 mv を結紮歯牙に注入することで、歯内・歯周病変モデルの構築を試みた。以上から、歯髄炎に対する PKR を標的とした分子標的療法および、歯内・歯周病変の動物実験モデル確立を目的として検証を行った。

【材料および方法】

不死化歯髄細胞 (DP-1) および急性単球性白血病細胞 (THP-1) を用いて以下の検証を行った。

- ① PKR 阻害剤 (2-AP, C16) の細胞毒性の検証 (WST-8 Assay)
- ② PKR 阻害剤の炎症抑制効果の検証; DP-1 上清中で THP-1 を培養し TNF- α 産生量を測定 (qRT-PCR, ELISA)
- ③ DP-1 由来 mv のプロテオミクス解析
- ④ PKR-PACT 会合阻害剤 (Luteolin) の PKR リン酸化抑制効果および TNF- α 産生抑制効果の確認 (qRT-PCR)

一方、結紮性歯周炎モデルマウスを用いて、以下の検証を行った。

- ① DP-1 由来 mv をマウス歯周炎モデルの結紮歯牙周囲に注入し、骨吸収量の測定を行った。
- ② PKR 阻害剤処理した DP-1 の mv をマウス結紮性歯周炎のスポットに注入し、骨吸収量の測定を行った。

【結果および考察】

各 PKR 阻害剤の DP-1 に対する毒性を確認し薬剤としての至適濃度の基準とした。また、各 PKR 阻害剤が TNF- α 産生を抑制することが確認され、薬剤としての至適濃度が確立された。そして、不死化歯髄細胞 (DP-1) 由来 mv のプロテオミクス解析により、mv 内の PKR および PACT の存在が確認され、Luteolin 処理により PKR のリン酸化の抑制が確認された。このことから、DP-1 由来 mv 中の PACT の存在により PKR が恒常的に活性化されている可能性が示唆され、歯髄鎮静薬として、PKR 阻害剤および PKR-PACT 会合阻害剤の歯科領域への活用の可能性が示唆された。

また、結紮性歯周炎モデルマウスにおいて、PBS 注入群と比較し、mv 注入群では骨吸収量が増加する傾向にあることが確認された。さらに、PKR 阻害剤処理した DP-1 上清から回収した mv の注入により、骨吸収量が無処理のものと比較し減少傾向にあることが確認された。このことから、DP-1 由来 mv に内包された PKR による歯内・歯周病変モデルの確立の可能性が示唆された。

(九州大学医系地区倫理審査委員会承認済、承認番号: 動物実験 A-21-131-2)

Resolvin D2 は歯髄幹細胞の増殖を促進して直接覆髄の断髄面における硬組織形成を誘導する

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野¹, ノバサウスイースタン大学歯学部 歯周病講座²
○米田光宏¹, 井手口 英隆¹, 中村 心², Zulema Rosalia Arias Martinez¹, 山本直史¹, 高柴正悟¹

Resolvin D2 induces the calcification on dental pulp surface after pulpotomy by promoting the growth of mesenchymal stem cells

○YONEDA Mitsuhiro¹, IDEGUCHI Hidetaka¹, NAKAMURA Shin², ARIAS Martinez Zulema Rosalia¹,
YAMAMOTO Tadashi¹, TAKASHIBA Shogo¹

¹Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University and ²Department of Periodontology, College of Dental Medicine, Nova Southeastern University

【研究目的】

直接覆髄法は、抜髄処置を避け、歯髄を温存するために重要な手法の一つである。水酸化カルシウム製剤 (Ca(OH)₂) などの既存の覆髄材料は、術後疼痛や細胞傷害などの問題が生じることから、異なった作用機序と生体親和性を持った新規覆髄材料の開発が求められる。我々は、ラット根尖性歯周炎モデルにおいて、遊離脂肪酸群の一つである Resolvin D2 (RvD2) が抗炎症作用と硬組織形成作用を示すことを報告した (Siddiqui, *Front Immunol*, 2019)。さらに、RvD2 の作用は覆髄材料として応用できる可能性もあると考えた。本研究では、ラット断髄モデルと歯髄培養細胞を用いて、RvD2 の歯髄組織に対する免疫学的影響と硬組織形成作用を検討した。

【材料と方法】

In vivo : 全身麻酔下で、SD 系ラット (8 週齢, 雄) の上顎第一臼歯を根管口上部で断髄した。その後、RvD2 (1 µg/mL, 10 µg/mL) を塗布し、α型リン酸三カルシウムと光重合レジンで緊密に封鎖を行った。4 週間または 6 週間後に上顎骨を回収して、コンピューター断層撮影を行った。さらに、ヘマトキシリン・エオジン染色と免疫組織染色 (RvD2 受容体の GPR18, 細胞増殖指標の Ki67, 間葉系幹細胞マーカーの CD34, 血管内皮増殖因子の VEGF, 組織修復に関与する TGF-β) を行い、断髄面直下の組織を観察した (動物実験計画書; OKU-2019575)。なお、リン酸緩衝生理食塩水を陰性対照に、Ca(OH)₂ を陽性対照に用いた。

In vitro : ラットの下顎前歯から歯髄組織を採取して 3~5 回継代した培養細胞に、RvD2 (最終濃度; 0~100 nM) を添加した。1 日または 2 日後に、細胞増殖能、細胞遊走能、RT-PCR 法で遺伝子発現変化 (*Gpr18*, *Vegf*, *Tgf-β*, 幹細胞マーカーとして *Nanog*), ELISA 法で培養上清中の VEGF 分泌量, 免疫蛍光染色法で CD105⁺ の歯髄幹細胞数, フローサイトメトリー法で CD73⁺CD90⁺ の歯髄幹細胞数を調べた。

【結果と考察】

In vivo : RvD2 と Ca(OH)₂ を塗布した群では、断髄面直下に硬組織が形成された。さらに、RvD2 群で、硬組織の周囲に GPR18, Ki67, そして CD34 陽性細胞と、VEGF および TGF-β の局在が増加する傾向にあった。

In vitro : RvD2 は、歯髄細胞の増殖能と遊走能を促進し、*Gpr18*, *Vegf*, *Tgf-β*, *Nanog* の遺伝子発現を増加させた。さらに、培養上清への VEGF 分泌量を増加させ、歯髄細胞中の歯髄幹細胞の増殖を促進した。

考察 : RvD2 は、歯髄細胞の増殖能と遊走能を促進することで、血管新生や組織再生に有利な環境を構築した。結果として、RvD2 は断髄面において高い生体親和性と硬組織形成能を発揮したと考える。

【結論】

RvD2 は、既存の覆髄剤とは異なった機序で修復象牙質を形成し、直接覆髄法に応用できる可能性がある。

ポリアミド製チップによるラット根管内バイオフィルムの除去効果

¹東北大学大学院 歯学研究科 エコロジー歯学講座 歯科保存学分野

²日本歯科大学附属病院 総合診療科

○大西小雪^{1,2}、八幡祥生¹、上松丈裕¹、鈴木重人¹、Venkata V Suresh¹、兼平正史¹、北村和夫²、齋藤正寛¹

Removal of rat intraradicular biofilm by sonic-powered irrigation with polyamide tip

¹Division of Operative Dentistry, Department of Ecological Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

²Division of General Dentistry, The Nippon Dental University Hospital

○OHNISHI Koyuki^{1,2}, YAHATA Yoshio¹, UEMATSU Takehiro¹, SUZUKI Shigeto¹, VENKATA V Suresh¹, KANEHIRA Masafumi¹, KITAMURA Kazuo², SAITO Masahiro¹

【目的】

根尖性歯周炎は細菌、その副産物の影響で根尖部の炎症反応や骨吸収が引き起こされることにより成立する。感染根管治療は感染除去を目的として行われるが、根管系の解剖学的複雑さのために、無菌化は不可能である。さらに、根管内にバイオフィルムが形成されると除去は一層困難となり、難治化の原因となる。根管内の感染除去のために従来のシリンジ洗浄の他に、近年では、超音波振動、可聴域振動またはレーザーにより洗浄液を活性化させる方法が一般化されつつある。EDDY (VDW) は可聴域振動エアースケーラーに接続して用いるポリアミド製のチップであり、柔軟性を有することで根尖付近まで挿入可能、かつ根管壁を切削せずに洗浄液を活性化できる。一方、チップ自体の振動による物理作用の効果は明らかでない。そこで本研究ではラット根管内バイオフィルムモデルを用い、EDDY の物理作用によるバイオフィルム除去効果を細菌学、形態学的に検証することを目的とした。

【材料・方法】

本研究は「国立大学法人東北大学における動物実験に関する規程」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を得て実施した (承認番号: 2020 歯動-032)。ラット根管内バイオフィルムモデルには Wistar Rat (10 週齢、雄性) 12 匹の下顎左右第一臼歯、近遠心根を使用した。まず髓室開拓を行い、手用 K ファイル #15 にて根尖の穿通を行った。次に根管形成はトライオート ZX2 (モリタ) とニッケルチタンファイル (ProFile、デンツプライシロナ) を用いて、近心根と遠心根それぞれ #30/0.04 テーパー、#35/0.04 テーパーまで行った。2 週間口腔内で開放状態にした後、水硬性セメントで仮封し、根管内バイオフィルムの成熟を目的に 4 週間嫌気性状態にした。

バイオフィルム除去効果の比較には、EDDY による洗浄 (EDDY 群)、シリンジ洗浄 (CNI 群)、根管洗浄を行わなかった群 (Positive control 群)、髓室開拓を行わなかった群 (Negative Control 群) を用いた。根管洗浄は根管ごとに以下の手順で行った。EDDY 群では、5% 次亜塩素酸ナトリウム溶液によるシリンジ洗浄を 30 秒間行い、その後根管を生理食塩水でシリンジ洗浄した後 EDDY を 30 秒間根管内で作用させた。シリンジ洗浄と EDDY による攪拌を交互に繰り返し合計 5 分間洗浄を行った。CNI 群では EDDY 群と同様の手順で根管洗浄を行ったが、EDDY による攪拌は行わず、生理食塩水で 30 秒間シリンジ洗浄を行った。根管洗浄後、歯を顎骨より摘出し、バイオフィルム除去効果について SEM による根管壁の形態観察と real-time PCR 法による細菌の定量評価により確認した。各群の細菌量は有意水準 $\alpha=0.05$ にて一元配置分散分析および Tukey-Kramer 法による多重比較を行った。

【結果】

SEM による根管壁の観察において、EDDY 群に根管象牙質の切削条痕は認めなかった。また、CNI 群、Positive Control 群では多層構造のバイオフィルムを認めた一方、EDDY ではバイオフィルムを認めず象牙細管の開口を確認した。細菌の定量評価では EDDY 群は CNI 群、Positive Control 群と比較し、有意に少ない値を示した。

【考察・結論】

本研究の結果により、EDDY を使用した根管洗浄は根管壁を切削せずにバイオフィルム除去が可能だった。これは EDDY がポリアミド製の軟質な素材であり根尖付近まで挿入可能であること、根管内で作用させると 3 次元的な動作によりチップが根管壁に接触し、存在するバイオフィルムを物理的に剥離することが可能だったと推察できる。EDDY による根管洗浄は、根尖性歯周炎の難治化の原因となるバイオフィルム除去に有用であることが示唆された。

**TNF- α /IFN- α 共刺激した歯肉幹細胞由来エクソソームは
CD73 と CD5L を介して抗炎症性 M2 マクロファージを誘導する**

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

○渡邊ゆかり、林千華子、川上賢太郎、豊田真頭、中尾雄紀、大和寛明、四本かれん、新城尊徳、岩下未咲、
讃井彰一、福田隆男、西村英紀

**Exosomes derived from GMSCs stimulated with TNF- α and IFN- α promote M2 macrophage polarization
via enhanced CD73 and CD5L expression**

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

○Yukari Watanabe, Chikako Hayashi, Kentaro Kawakami, Masaaki Toyoda, Yuki Nakao, Hiroaki Yamato,
Karen Yotsumoto, Takanori Shinjo, Misaki Iwashita, Terukazu Sanui, Takao Fukuda and Fusanori Nishimura

【目的】

近年、間葉系幹細胞 (MSC) はその多分化能により再生目的組織の機能を代替するだけでなく、障害を受けた組織の再生を分泌物により強力にサポートすることで治療効果を発揮するといった概念が提唱され、その活性中心を担う分泌物としてエクソソームが注目されている。歯肉幹細胞 (GMSCs) は採取が容易なうえ、エクソソームの分泌能力が多い特徴を有する。先行研究において、GMSCs 由来エクソソームによる抗炎症性 M2 型マクロファージの誘導効果と同時に、GMSCs への TNF- α 刺激によるエクソソーム含有 CD73 を介した増強作用を報告した (Nakao et al., *Acta Biomater.* 2021)。このような炎症刺激によるネガティブフィードバック機構は、MSC の治療効果を改善するための戦略として報告されつつあるが、詳細な分子基盤は不明点が多い。さらに、複数のサイトカインによる併用効果の報告は少ない。IFN- γ より強力な 1 型インターフェロンである IFN- α 刺激の報告はなかった。本研究では TNF- α および IFN- α で前処理した GMSC 由来エクソソームの M2 マクロファージに対する誘導に対する相乗効果と、その分子機構解明のための検証を行った。

【材料・方法】

ヒト GMSCs を単離し (九州大学医系地区倫理審査委員会承認済: 承認番号観察研究: 2019-37)、同細胞の培養上清から精製したエクソソームを用いて以下の検討を行った。マクロファージ (M ϕ) 分化能は、ヒト CD14+末梢血由来単球 (PBMC) から M-CSF で分化誘後、LPS/IFN- γ 刺激による炎症性 M1-M ϕ 、IL-4/13 刺激による M2-M ϕ をコントロールとした。

- ① TNF- α /IFN- α 単独・共刺激による GMSCs 由来エクソソームにおける CD73 発現状況の比較
- ② TNF- α /IFN- α 単独・共刺激による GMSCs 中の低酸素誘導因子 (HIF-1 α) 発現状況および哺乳類標的ラパマイシン (mTOR) 経路の活性化状況の検証
- ③ GMSCs への HIF-1 α 過剰発現およびノックダウンが CD73 発現に及ぼす影響の検討
- ④ GMSCs への siRNA の導入による CD73 発現変動の確認
- ⑤ M ϕ への TNF- α /IFN- α 刺激 GMSCs エクソソームによる M2-M ϕ 誘導効果の比較
- ⑥ TNF- α /IFN- α 刺激による GMSCs 由来エクソソームにおける CD5L(AIM) 発現状況および転写因子の検索
- ⑦ コンビナント CD5L 蛋白刺激による M2-M ϕ 誘導効果の検証
- ⑧ CD5L ノックダウンが TNF- α /IFN- α 刺激 GMSCs エクソソームによる M2-M ϕ 誘導効果に及ぼす影響

【結果及び考察】

GMSCs への TNF- α /IFN- α 共刺激により、CD73 mRNA 発現および GMSCs 由来エクソソームの CD73 蛋白発現が有意に亢進した。GMSCs における TNF- α /IFN- α 共刺激による CD73 発現誘導は、mTOR の活性化による HIF-1 α の発現誘導を伴う核移行を介して制御される可能性が示唆された。さらに、TNF- α /IFN- α 共刺激 GMSC 由来エクソソームは、無刺激および TNF- α /IFN- α 単独刺激 GMSC 由来エクソソームと比較し、炎症性 M1-M ϕ 1 をマクロファージへ抗炎症 M2-M ϕ への分化転換能が促進されることが確認された。さらに、GMSC への TNF- α /IFN- α 共刺激により転写因子 ID3、LXR を介した CD5L mRNA の発現亢進が確認されたが、そのほとんどが直接分泌されることなくエクソソーム含有蛋白として GMSCs より放出されることが示唆された。リコンビナント CD5L 単独刺激による M2-M ϕ 分化誘導能とともに、CD5L をノックダウンした GMSC への TNF- α /IFN- α 共刺激エクソソームでは、M2-M ϕ の誘導能が阻害された。

以上より、TNF- α /IFN- α 共刺激 GMSCs 由来エクソソームは含有 CD73/CD5L の促進を介して相乗的に M2-M ϕ 誘導能が増強されることが明らかとなった。

ACTA2 regulates human PDL function via interaction with or without TGF- β 1

九州大学大学院歯学研究院 総合歯科学講座 総合診療歯科学分野¹⁾、九州大学病院 口腔総合診療科²⁾、
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³⁾、
○Naati Fakatava¹⁾、御手洗 裕美²⁾、祐田 明香²⁾、原口 晃²⁾、長谷川 大学³⁾、前田 英史³⁾、和田 尚久¹⁾

ACTA2 regulates human PDL function via interaction with or without TGF- β 1

Department of General Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University¹⁾

Division of General Dental Dentistry, Kyushu University Hospital²⁾,

Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University³⁾

○Naati Fakatava¹⁾、Hiromi Mitarai²⁾、Asuka Yuda²⁾、Akira Haraguchi²⁾、Daigaku Hasegawa³⁾、
Hidefumi Maeda³⁾、Naohisa Wada¹⁾

[OBJECTIVE] ACTA2 (alpha-smooth muscle actin; α -SMA), one of the cytoskeleton protein, is known to be expressed in periodontal ligament (PDL) tissue. It might be involved in PDL function such as proliferation and migration. Also ACTA2 is upregulated with transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) which exists in PDL tissue predominantly (Fujii et al, *Cell Tissue Res.* 2010). So it is assumed that ACTA2 is involved in TGF- β 1-dependent function in human PDL cells, but little is known about them. Therefore, we focused on ACTA2 and examined its role within the PDL function via interaction with or without TGF- β 1 to find its role in the remodeling of the PDL.

[MATERIALS AND METHODS] Human PDL cell line 2-23, which was isolated from heterogeneous immortalized Human PDL cells (Hasegawa et al. *J Cell Physiol.* 2018) was used. (1) Western blotting analysis was performed to examine the protein expression of ACTA2. (2) ACTA2 or scramble siRNA were transfected to 2-23 for 48 h, and performed the WST-1 assay and scratch wound healing assay to analyze the proliferation and migration. (3) 2-23 cells were cultured with or without human recombinant TGF- β 1 (rhTGF- β 1: 10 ng/ml) for 24 h in the presence of ACTA2 or scramble siRNA. qRT-PCR was performed to examine the mRNA expression of PDL related genes; *collagen1A1 (COL1A1)*, *periostin (POSTN)*, and *fibrillin1 (FBN-1)*. Picro-sirius red staining and sircol collagen assay were performed to analyze the collagen production. Western blotting analysis was performed to examine the phosphorylation of TGF- β 1-related molecules; Smad2, Smad3, and YAP. All procedures were performed in compliance with requirements of the Institutional Review Board for Human Genome / Gene Research (approval number: 30-167) and Research Ethics Committee (approval number: 27-76) at Kyushu University.

[RESULTS] ACTA2 protein expression was observed through Western blotting analysis in 2-23. After transfection with ACTA2 siRNA, cell proliferation and migration levels were significantly downregulated compared with scramble siRNA. The mRNA expression of ACTA2, COL1A1, POSTN, and FBN-1 was upregulated in 2-23 stimulated with TGF- β 1. Those mRNA expression was significantly downregulated in the presence of ACTA2 siRNA stimulated with rhTGF- β 1 compared with scramble siRNA. The amounts of collagen production were upregulated in 2-23 stimulated with rhTGF- β 1 which were analyzed by picro-sirius red staining and sircol collagen assay. But after ACTA2 knockdown, the collagen production stimulated with rhTGF- β 1 were significantly downregulated compared with scramble siRNA. We revealed that phosphorylation of Smad2 and Smad3 in 2-23 were observed at 15-min time point with TGF- β 1, and phosphorylation of YAP was observed at 30-min time point with TGF- β 1 by Western blotting analysis. However, after ACTA2 knockdown, at each time point, the phosphorylation of Smad2, Smad3, and YAP was downregulated after TGF- β 1 stimulation.

[DISCUSSION] In this research, ACTA2 was involved in proliferation and migration of human PDL cells. These results suggest that as cytoskeleton protein, ACTA2 itself is crucial for PDL function. In the presence of ACTA2 siRNA, upregulation of PDL related genes, collagen production, and phosphorylation of TGF- β 1-related molecules were significantly downregulated, suggesting that ACTA2 might be a key factor for TGF- β 1 function.

[CONCLUSION] ACTA2 regulates human PDL function via interaction with or without TGF- β 1.