

バイオフィーム環境下で誘導された再石灰化象牙質の細菌叢分析

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

○小浦 裕菜¹, 富山 潔¹, 國松 雄一¹, 浜田 信城², 向井 義晴¹

Analysis of bacterial flora of remineralized dentin under the polymicrobial biofilm

¹Department of Restorative dentistry, ²Department of Oral Microbiology

○ Yuna Koura¹, Kiyoshi Tomiyama¹, Yuichi Kunimatsu¹, Nobushiro Hamada², Yoshiharu Mukai¹

【研究目的】多菌種バイオフィームにより形成された表層下脱灰病巣に対して、バイオフィーム残存下で培養環境を変化させることにより再石灰化を誘導し、バイオフィーム中の細菌叢の変化を分析した。

【実験材料および方法】ウシ下顎中切歯歯根より直径 5 mm 厚さ 1 mm の円盤状象牙質試料を切り出しバイオフィーム形成用試片とした。〔実験 1 再石灰化誘導〕実験群は①表層下脱灰病巣群 (cont), ②スクロース非含有再石灰化群 (S(-)), ③スクロース添加再石灰化群 (S(+)) および④再脱灰群 (S(-)de) の 4 群 (n=6) とした。〔実験 2 再石灰化象牙質細菌叢分析〕実験群は① cont, ② S(-), ③ S(+), ④ S(-)de の 4 群 (n=1) とした。培養には 1 被験者から採取した刺激時唾液を用い、バイオフィームモデルとして Amsterdam Active Attachment Model を使用した (研究倫理審査番号 853)。培養液には (0.2% スクロース, 0.4 ppm F, McBain 2005) を用い、培養液の交換を 10 時間, 14 時間の間隔で 1 日 2 回行う連続嫌気培養を 48 時間行った。その後、cont 群以外の実験群に対してはバイオフィームを残したまま 2 種類の再石灰化培養液を用いて、連続嫌気培養により 336 時間の培養を行った (S(-), S(+))。なお、S(-)de 群はその後再度 48 時間の追加培養を行った (0.2% スクロース, McBain 2005)。〔実験 1〕培養終了後、象牙質試料を厚さ 300 μ m に薄切し、Transverse Microradiography 撮影、ミネラル喪失量 (IML) および病巣深度 (LD) を測定した。〔実験 2〕各サンプル由来の 16S rDNA から、次世代シーケンサーを用いて、各サンプル由来の 16S rDNA からシーケンスデータを得て部分塩基配列を決定し、次世代シーケンス・アンプリコン解析を行なうことによりバイオフィームサンプルに由来する菌群の帰属分類群を推定した。サンプル間の比較解析は、主成分分析およびクラスタ解析 (クラスタリング手法: 群平均法, 距離関数: ピアソンの相関係数) により、各群のバイオフィーム構造の違いを比較した。

【結果及び考察】〔実験 1〕cont 群では表層下脱灰病巣の形成が確認された。S(-) 群および S(+), S(-)de 群は cont 群に比較しミネラル vol% の高い表層および病巣体部を示し、病巣の再石灰化が確認された。また、これら 2 群は IML および LD とともに cont 群に比較し有意に低い値となった。再石灰化環境終了後、再度スクロース含有培養地に移した S(-)de 群は、S(-) 群に比較して IML および LD の有意な増加が認められた。〔実験 2〕cont 群では *Streptococcus*, S(-) 群では *Parvimonas*, S(+), S(-)de 群では *Veillonella* が最も多く検出された。S(-) 群で最も多く検出された *Parvimonas* は他の群ではほとんどみられなかった。*Veillonella* は S(-) 群で最も少なかった。多菌種バイオフィーム存在下で表層下脱灰病巣が形成された後、スクロース供給が停止され無機イオンが供給されることにより再石灰化を誘導することができたと考えられる。一方、スクロース供給の停止により再石灰化が誘導された後に再度栄養供給を再開することにより再度脱灰が進行したという結果は、残存したバイオフィームの糖代謝が再度活性化したことを示している。また代謝が活発でない S(-) 群の細菌叢に *Parvimonas* が多く認められ、プラークの初期形成に関与していると言われている *Veillonella* が S(+), S(-)de 群に多く検出されたことは本再石灰化モデルが口腔内環境に類似している可能性を示唆するものと考えられた。

【結論】多菌種バイオフィームを用いて形成した象牙質表層下脱灰病巣に対してスクロース供給の停止ならびに無機イオンを添加したバイオフィーム環境下で培養を継続することにより再石灰化が誘導されるとともに、各段階において細菌叢の違いが認められた。

様々な深さの窩洞に充填した光重合型コンポジットレジン¹⁾の光重合および後重合による重合収縮

東京医科歯科大学医歯学総合研究科²⁾う蝕制御学分野

○秋谷 聡, 佐藤 健人, 木部 航太, 中島 正俊, 平石 典子, 大槻 昌幸, 島田 康史

Light-curing/post-curing polymerization shrinkage of light-cure resin composites in various depth cavities

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

○ Satoshi Akiya, SATO Kento, Kibe Kouta, Masatoshi Nakajima, Noriko Hiraishi, Masayuki Otsuki, Yasushi Shimada

【諸言】

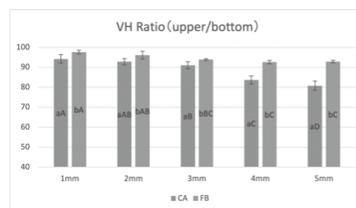
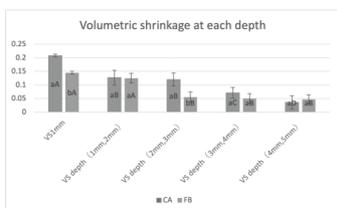
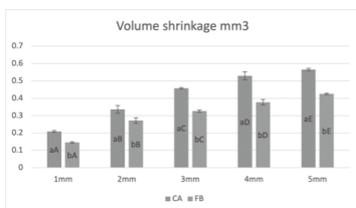
光重合型コンポジットレジン¹⁾の重合収縮応力は、歯質と接着界面の破断の原因になる。光照射エネルギーは、コンポジットレジン¹⁾の透過にしたがい減衰するため、コンポジットレジン¹⁾の深部では硬化不全が起こることがある。一般に、従来型コンポジットレジン¹⁾の硬化深度は3mmであり、バルクフィルコンポジットレジン²⁾では4-5mmであるとされ、この深さまでは一括充填が可能とされている。しかしながらコンポジットレジン¹⁾の硬化は、光照射中の急激な重合反応と光照射後も24時間にわたって継続する後重合反応が知られており、それぞれの重合収縮量は異なると考えられる。後重合は、光照射中に発生したラジカルの一部が残存するために起こるとされ、未反応の重合基が多く残っている方が、すなわち光照射中の重合率が低い方が生じやすい。したがって窩洞の深部では、光照射中の重合と同様に後重合による影響も考えられるが、その重合収縮に関する報告はほとんどない。本研究は従来型コンポジットレジン¹⁾およびバルクフィルレジン²⁾を用い、様々な深さの窩洞に充填した光重合型コンポジットレジン¹⁾の重合収縮量を計測することにより、光重合および後重合の収縮挙動の評価・検討を行った。

【材料及び方法】

本実験では従来型コンポジットレジン¹⁾として Clearfil AP-X (CA : Kuraray Noritake Dental, Tokyo, Japan), バルクフィルコンポジットレジン²⁾として Filtek bulk-fill (FB : 3M ESPE, St. Paul, MN) を使用した。シラン処理を行ったガラスプレート上に、直径 3.4mm 円柱形の穴を備えたラバーモールド (厚さ 1, 2, 3, 4, 5mm) を静置し、窩洞内に各コンポジットレジン¹⁾を充填した。SS-OCT にてレジンが過不足なく充填され気泡がないことを確認し、ガラスプレート側の窩洞底面から歯科用 LED 光重合照射器 (Pencure 2000, J. Morita, 1000mW/cm²) にて光照射 40 秒間を行った。室温、暗室環境下にて 24 時間保存後、Multi-file Analysis ソフトウェア (Ver. 1.3.1 VK-HIM) 内蔵共焦点レーザー走査型顕微鏡 (CLSM : VK-X 150, Keyence) を使用し、周囲のラバーモールド表面を基準面として、各厚さの充填試料におけるコンポジットレジン¹⁾の総重合収縮量を測定した。さらに総重合収縮量からそれぞれの深さでの収縮量 (1mm, 2mm-1mm, 3mm-2mm, 4mm-3mm, 5mm-4mm) を算出した。またコンポジットレジン¹⁾の硬化深度を評価するために、硬化したコンポジットレジン¹⁾の上面と底面においてビッカース硬度 (VH) 試験を行い、底面に対する上面の VH 比を算出した。得られた値は t-test (welch method) with Bonferroni correction を用い有意水準 5% で統計処理を行った。

【結果及び考察】

※同じ厚みにおいて異なる小文字は有意差を示し、同じ材料の異なる群間における大文字の違いは有意差を示す。従来型コンポジットレジン (CA) とバルクフィルコンポジットレジン (FB) において、それぞれの硬化深度内 (VH 比 90% 以上 : CA, 3 mm ; FB, 5 mm) であっても、重合収縮量は、試料の厚さに比例して増加しないことがわかった。表層部 (CA, 1mm ; FB, 1-2mm) では重合収縮量は有意に大きく、これは光照射時における重合反応によるものだと考えられる。一方で、深層部 (CA, 2-3mm ; FB, 3-5mm) では、重合収縮量は表層部より有意に低下し、一定の値を示した。これは、この領域における硬化が、主に後重合反応によって生じていることを示唆している。表層部におけるコンポジットレジン¹⁾の硬化は光照射時の重合によってもたらされ、一方で、コンポジットレジン¹⁾の硬化深度の確立においては、後重合が深く関与していることが示唆された。近年、後重合が主体となって硬化した層の機械的耐久性について危惧した報告がなされていることから、それぞれのコンポジットレジン¹⁾において一括充填できる厚さに関しては再検討が必要と考えられる。Rummani, et al., 2021, <https://doi.org/10.4012/dmj.2021-101>



新規アドヒーズの象牙質接着に対する colloidal platinum nanoparticles (CPN) の影響

北海道大学大学院歯学研究院口腔健康科学分野歯科保存学教室
 ○袁 媛, インタジャック パピチャヤ, 星加 修平, 鈴木 一矢, 池田 考績,
 ヤマウチ モニカ, 丁 世俊, 佐野 英彦

The effect of colloidal platinum nanoparticles (CPN) on resin-dentin bonding performance of current adhesives

Department of Restorative Dentistry, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University
 ○ Yuan Yuan, Papichaya Intajak, Shuhei Hoshika, Kazuya Suzuki, Takatsumi Ikeda,
 Monica Yamauti, Shihchun Ting, Hidehiko Sano

【目的】 宮本らの開発した白金ナノコロイド (Colloidal Platinum Nanoparticles ; CPN) は、高い還元作用と触媒作用及び活性酸素を抑える働きがあることが報告されている。また、当教室の研究によれば CPN にはう蝕病原細菌に対する抗菌作用も明らかになっている。そこで本研究では、コンポジットレジン修復の際に、抗菌作用を持つ CPN により象牙質の前処理をすることで象牙質接着にどのような影響があるか観察した。

【材料および方法】 本実験は、北海道大学大学院歯学研究院倫理委員会の承認 (2018 第 9 号) に基づき行った。う蝕のないヒト抜去小白歯を、モデルトリマーにて注水下でエナメル質を削除し象牙質を露出させて試験に使用した。その後、#600 耐水研磨紙を用いて 60 秒間研削した。CPN 20 秒前処理の有無により Cont 群と CPN 群の 2 群に分類し、更に使用した接着材により以下の 3 群に細分した。MB2 群: Megabond 2 (クラレノリタケデンタル); SE-SUP 群: セルフエッチングモード, Scotchbond Universal Plus Adhesive (3M); ER-SUP 群: エッチアンドリンスモード, Scotchbond Universal Plus Adhesive (3M)。CPN の前処理は MB2 群及び SE-SUP 群では接着材塗布前に、ER-SUP 群ではエッチング操作の後、接着材塗布の前に行った。その後各メーカー指示に従って、象牙質表面に接着材を塗布し、照射後、コンポジットレジン (AP-X, クラレノリタケデンタル) を積層充填した。37°C 水中に 24 時間保管後、1mm² のビーム状試料に切り出し、 μ TBS 試験を行った。結果は、二元配置分散分析および Tukey HSD test を用いて統計分析を行った ($p=0.05$) (IBM SPSS Statistic 25.0)。 μ TBS 試験後の試料破断面は SEM にて観察し、破断面形態分類を行った。また、各群の接着界面を含む部位で厚さ約 90nm の超薄切片を作製し TEM で観察した。

【結果】 μ TBS 試験: CPN 前処理の有無及び接着材の種類と使用方法の交互作用は認められなかった ($p>0.05$)。Cont 群と CPN 群において有意な差が認められなかった ($p>0.05$)。SE-SUP 群は MB2 群および ER-SUP 群に比べて有意に低い値を示し ($p<0.05$)、MB2 群と ER-SUP 群間には有意差はなかった ($p>0.05$)。破断面形態分類: MB2 群と SE-SUP 群は界面破壊と凝集破壊が同程度認められた。ER-SUP 群の主な破壊様式は象牙質内の凝集破壊であった。また、MB2 群、SE-SUP 群また ER-SUP 群において、Cont 群と CPN 群において破壊様式は顕著な差が認められなかった。

TEM 観察: CPN 群では、樹脂含浸層の表層プラチナナノ粒子と思われる黒点が観察された。

【結論】 CPN の抗菌性が期待できて、象牙質接着も低下しないので、臨床において有用と思われる。しかしながら、長期的な予後の検討は別途必要であると考えられる。

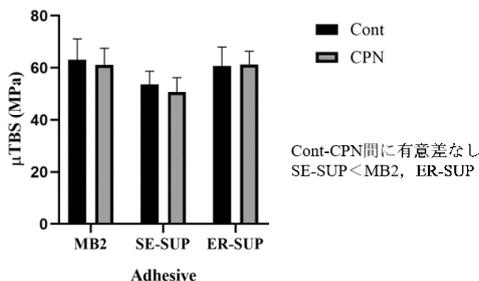


Fig.1 Results of μ TBS (mean/SD) ns: no significant differences

ナノフィラー含有コンポジットレジンの中保管および漂白による光透過性への影響

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯制御学分野
○ Alrefaie Taghreed, 中元 絢子, 中島 正俊, 島田 康史

Effect of water storage and bleaching on light transmission properties and translucency of nanofilled flowable composite

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

○ Taghreed Alrefaie, Ayako Nakamoto, Masatoshi Nakajima, Yasushi Shimada

Materials and Method : A total of 35 resin composite disk (0.5 mm thickness) were prepared from A2 shade of 5 nanofilled composite (n=7/each composite); Estelite Universal Flow (EUF, Tokuyama Dental), Clearfil Majesty ES Flow (ESF, Kurary Noritake Dental), Beautiful Flow Plus X F03 (BFP, Shufu Dental Imm.), Estelite Flow Quick (EFQ, Tokuyama Dental) and Filtek Supreme Ultra Flowable Restorative (FSU, 3M ESPE). Specimens were cured by LED device (VALO, Ultradent) on standard mood (1000mW/cm²) for 20s. Samples were tested for light transmission properties (straight-line transmission (GO), diffusion (DF), the amount of transmitted light (AV)) and translucency parameters (TP) immediately after preparation and the following storage/bleaching steps as follow; after 24 hours (dry storage), after water storage for 7 days and afterthought each cycles of in-office bleaching application for consecutive 3 application. The study data were analyzed using Kruskai Wallis test to compare between tested groups and time variable followed by pairwise comparisons.

Result : The Kruskai Wallis revealed that GO, DF, AV & TP were significantly affected by different materials (p<0.001) but not by aging conditions and bleaching except for AV of FSU and TP of EUF. Due to using 3rd generation of LED light cure both (FSU & EFQ) which have lower filler load aging condition has no significant changes of GO and TP. However the AV of FSU has increased significantly after the 1-week water storage then after 2nd bleaching cycle (p<0.001). The TP for EUF has significant change (p=0.019) after 1-week water storage and then increased after 2nd bleaching cycle.

Conclusion : The office bleaching has no significant changes in the materials since it was used at the same time for 3 cycles. More filler load the DF will increase and both (AV & TP) will decrease.

フッ化物イオンの拡散過程解明に向けたマルチフィジックス解析モデルの構築

¹ 大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室),

² 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建系う蝕制御治療学分野,

³ 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科理工学分野

○内藤 克昭¹, 山本 洋子¹, 松田 康裕², 奥山 克史³, 林 美加子¹

Development for multiphysics analysis model to elucidate the diffusion process of fluoride ions in dentin

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Graduate School of Dentistry, Osaka University,

²Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry,

Health Sciences University of Hokkaido, ³Department of Dental Materials Science, Division of Oral

Functional Sciences and Rehabilitation, Asahi University School of Dentistry

○ Katsuaki Naito¹, Hiroko Yamamoto¹, Yasuhiro Matsuda², Katsushi Okuyama³,

Mikako Hayashi¹

【研究目的】

う蝕の撲滅をめざして、フッ化物 (F)、カルシウム、亜鉛、ストロンチウムなどの抗う蝕性イオンを歯質に導入する機能性材料の開発が行われているものの、抗う蝕性イオンがどのように拡散・浸透するのかという時間・空間的な反応過程の核心が未だ明らかではない。そこで我々は、近年発展の著しいコンピュータシミュレーションの一つである有限要素法 (FEM) を用いて、理論計算から歯質へのイオン導入時の動態現象を解明することを着想した。本研究では、F の象牙質に対する拡散過程を時間・空間的に解明するために、FEM を用いたマルチフィジックス解析のモデルを構築することを目的とした。

【材料および方法】

解析対象の象牙質は 2 次元とし、ミリスケールの均質なバルク材料を想定した代表体積要素モデルとした。F の拡散過程は移流拡散方程式を用い、歯髄内圧および材料適応時の外圧を Navier-Stokes 方程式で表し、支配方程式となる数理モデルを作成した。時間依存の非定常状態で規定し、化学種輸送と流体流れの 2 種類の物理計算を混合したマルチフィジックス解析を FEM を用いて行った。計算過程で必要な初期条件および境界条件は、文献^{1), 2)}を参考に設定した。上記の計算は、FEM ベースの汎用物理シミュレーションソフトウェアである COMSOL Multiphysics[®] ver. 6.0 (COMSOL, Stockholm, Sweden) を用いて、時間分解の数値解析を行った。

続いて、数理モデルの妥当性を検証するために実験的に求めた濃度拡散と比較検討を試みた。実験では、ヒト健全第 3 大臼歯 (n=3) の歯根を根面象牙質を露出するように切断し、露出した根面象牙質に F を徐放する F バニッシュ歯科用 5% (ビーブランド・メディコーデンタル) を塗布した。材料塗布後、イオンを浸透させるために 10 ml の生理食塩水中に浸漬し、1 ヶ月間 37 °C の恒温槽で保管した。上記試料に対して、F の歯質内濃度を計測するために、陽子線励起 X 線 / γ 線分析法 (PIXE/PIGE) を既報³⁾に基づいて定量分析した。得られた線分析の濃度分布から、R ver. 3.6.3 を用いて Fick の第二拡散方程式を利用した非線形最小二乗法の近似から、見かけ上の拡散係数を推定した。計算で求めた濃度曲線と、実験的手法で求めた濃度曲線を比較し、モデルの妥当性を検証するとともに、F の動態現象を時間・空間的に分析した。

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】

FEM 解析により、F の象牙質内への拡散において、非線形的な濃度曲線を算出することに成功した。また移流拡散方程式の拡散項は、濃度の変動に影響を与えたものの、深さ方向への浸透にはあまり影響しないことが判明した。一方で、Navier-Stokes 方程式の圧力項が材料塗布面から歯髄側方向への浸透距離を司るパラメータであることがわかった。FEM 解析と PIXE/PIGE の結果を比較すると濃度曲線が近似したことから、数理モデルの正当性が証明された。

以上の研究より、新たに構築した数理モデルを用いてマルチフィジックス解析を行うことで、歯質内への F の拡散過程を計算力学的に導出することに成功した。今後は、モデルのマルチスケール化と化学反応を組み込んだ数理モデルを作成し、三次元スケールでの複雑なイオン反応現象の可視化をめざすとともに、数理解析に基づくシミュレーションより得られた結果から革新的な材料開発に発展させるモデル構築をすすめる予定である。

本研究の一部は科学研究費補助金 (JP21K21009, JP20H00552) の補助のもとに行われた。

【引用文献】

- 1) Brown AC, Yankowitz D. Tooth pulp tissue pressure and hydraulic permeability. *Circ Res* 1964;15 : 42-50.
- 2) Ciucchi B, Bouillaguet S, Holz J, Pashley D. Dentinal fluid dynamics in human teeth, *in vivo*. *J Endod* 1995;21(4) : 191-194.
- 3) Naito K, Kuwahara Y, Yamamoto H, et al. Improvement of acid resistance of Zn-doped dentin by newly generated chemical bonds. *Mater Des* 2022;215.

要時生成型亜塩素酸イオン水溶液が *Enterococcus faecalis* バイオフィームに及ぼす影響

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)
○島岡 毅, 前齒 葉月, 川西 雄三, 朝日 陽子, 高橋 雄介, 林 美加子

The effect of on-demand aqueous chlorine dioxide solution on *Enterococcus faecalis* biofilm

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○ SHIMAOKA Tsuyoshi, MAEZONO Hazuki, KAWANISHI Yuzo, ASAHY Yoko,
TAKAHASHI Yusuke, HAYASHI Mikako

【目的】

根尖性歯周炎はう蝕に継発し発症するバイオフィームを原因とする感染症であり, *Enterococcus faecalis* はその悪化との関連が報告されている細菌のひとつである. 感染根管治療を成功に導くには根管内の無菌化が必要であり, 物理的な清掃に加え, 薬剤を用いた根管洗浄は重要な役割を果たしている. しかし, 現在の歯科臨床で根管洗浄に高頻度に用いられる次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) 溶液は強力な殺菌効果を有する反面, 強い毒性をもち, 使用に際しては細心の注意が必要である. そこで本研究では, 生体安全性と殺菌効果を併せ持つ新規薬剤である要時生成型亜塩素酸イオン水溶液 (Matching Transformation System®: MA-T) に着目し, この薬剤を将来的に根管治療へ応用することを念頭に, *E. faecalis* バイオフィームに及ぼす影響についての基礎的検討をおこなった.

【材料及び方法】

供試菌株として *E. faecalis* ATCC 29212 株を使用し, 浮遊菌およびバイオフィーム形成の各過程において MA-T が与える影響について検討した. 浮遊菌への評価は, 最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) 測定により行った. バイオフィーム形成への影響は, *E. faecalis* と MA-T (100 - 500 ppm) もしくは生理食塩水を共培養し, ハイドロキシアパタイトディスク上に形成されたバイオフィーム細菌量を生菌数測定にて評価した. 形成されたバイオフィームに対する影響については, 嫌気条件下で 1 週間培養して作製した *E. faecalis* バイオフィームに対し, MA-T (100 - 1000 ppm), 2.5% NaOCl もしくは生理食塩水を作用させ, 生菌数測定, クリスタルバイオレット染色および共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) 観察をおこなった. 得られた結果は一元配置分散分析 (One-way ANOVA with Tukey's HSD post-hoc test) により統計処理をおこなった ($\alpha = 0.05$).

【結果および考察】

E. faecalis に対する MA-T の MIC および MBC はいずれも 3.9 ppm であった. また, MA-T は *E. faecalis* バイオフィームの形成を抑制し, 形成されたバイオフィームに対しても生菌数測定および CLSM 観察より有意にバイオフィーム細菌を減少させることが明らかとなった. 一方, クリスタルバイオレット染色では, 形成されたバイオフィームに対し, MA-T を作用させてもバイオフィーム量の減少を認めなかった. 以上の結果より, MA-T が浮遊菌に対し強い殺菌作用を持ち, 100 ppm にてバイオフィーム形成を抑制することが明らかとなった. また, 1000ppm の MA-T を作用させてもバイオフィーム量を変化させず, バイオフィーム細菌に対して特異的に殺菌効果を発揮している可能性が示唆され, 500 ppm 以上で 2.5% NaOCl と同程度の殺菌作用を認めた. MA-T がバイオフィーム量を減少させなかった点については, 今後微細形態学的観察を含めた詳細な検討を行う予定である.

【結論】

MA-T は *E. faecalis* のバイオフィーム細菌を抑制することが明らかとなり, 将来的に根管治療に応用できる可能性が示された.

本研究は JSPS 科研費 JP22K09998 の助成を受けたものである.

安全性の高い Coronal laser activated irrigation (CLAI) を用いた根管内バイオフィーム洗浄技術の開発

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
○上松 丈裕, 八幡 祥生, 大西 小雪, 鈴木 重人, 兼平 正史, 齋藤 正寛

Development of Er : YAG laser activated laser irrigation for biofilm removal through cavitation

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

○ Takehiro Uematsu, Yoshio Yahata, Koyuki Ohnishi, Shigeto Suzuki, Masahumi Kanehira, Masahiro Saito

【目的】

根尖性歯周炎とは、根管系の細菌感染によって生じる顎骨内部の炎症性疾患である。根尖性歯周炎の治療目的は、バイオフィームやその副産物を機械的、化学的に排除する事である。近年、Er : YAG レーザーを用い、そのファイバーチップを髓室内に静置し、照射することで、根管内にキャビテーションを発生させ、バイオフィームの機械的圧力での除去を可能とする Coronal laser activated irrigation (CLAI) が提案された。一方、CLAI の生み出す圧力は根尖孔外へ根管洗浄で使用される次亜塩素酸ナトリウム溶液 (NaOCl) を溢出させるため、同手法を用いた根管洗浄を実施するためには、より安全性の高い方法が望まれる。そこで本研究では、従来の使用濃度よりも低い NaOCl を併用した CLAI のバイオフィーム除去効果および組織障害を検証することを目的とした。

【材料および方法】

CLAI の根管内バイオフィーム除去効果を比較するため、10 週齢の Wister Rat のオス下顎左右第一臼歯を用い、根管内バイオフィームモデルを作製した。まず、髓室開拓を行い、近遠心根について穿通を確認後、先端径 0.25mm、0.04 テーパーまで根管形成を行った。その後、口腔内細菌を根管内に侵入させるために 2 週間、開放状態とした。次いで仮封し、根管を 4 週間嫌気的環境下でバイオフィームの成熟を待たせた。バイオフィーム除去は、ラバーダム防湿下にて、以下の方法を用いた。31G ニードル (ウルトラデント) を使用し、1mL の 5%NaOCl で近遠心根をそれぞれ 15 秒行い、1mL の蒸留水で同様に洗浄したのを 1 サイクルとし、合計 5 サイクルを行った (CNI 群)。Er : YAG レーザー (Erwin AdvErl EVO, モリタ製作所) と R300T チップを使用した。洗浄手順は、5%NaOCl (5%CLAI)、0.5% NaOCl (5%CLAI) で近遠心根を 30 秒間シリンジ洗浄した後、髓腔内に R300T チップを配置させ出力設定 30mJ、20pps で 30 秒間照射しながら髓腔内に蒸留水を供給し洗浄を行った。根管形成のみを行った群をポジティブコントロール群、無処置の健全歯をネガティブコントロール群とした。バイオフィーム除去効果については、走査電子顕微鏡 (SEM) にて形態観測を定量 PCR 解析 (qPCR) にて残存細菌の定量し、Shapiro-Wilk 法にて各群のデータが正規分布に従うことを確認後、Tukey 法による多重比較を行った (有意水準 $\alpha = 0.05$)。また CLAI が根尖部炎症を誘導するかを検証するために上記の根管洗浄後に仮封し、3 日後に顎骨を摘出し組織切片を作製、根尖部の炎症状態をヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて観察した。

【結果】

ラットバイオフィームモデルの根管内の SEM 観察を行った結果、CNI 群と Positive control 群では根管壁全体を覆うように層状のバイオフィームに特徴的な構造が観察された。次に CALI による根管内で形成されたバイオフィーム除去効果を SEM で観察した。その結果、5%CLAI 群と 0.5%CLAI 群ともに CNI 群、コントロール群と比較して根管内のバイオフィームは剥離され、バイオフィームの残骸はしているものの根管壁に象牙細管の開口が観察された。

次に洗浄後の残存細菌量を定量化するため qPCR 解析を行うと、5%CLAI 群と 0.5%CLAI 群は CNI 群とポジティブコントロール群に比較して有意に低い値を示し、また 5%CLAI 群と 0.5%CLAI 群間において有意差は認めなかった。この結果より CLAI による根管洗浄効果は NaOCl 濃度に依存しない可能性が示された。そこで根尖部周辺の組織障害に及ぼす影響を組織学的に解析すると、5%CLAI 群では炎症性細胞浸潤を伴う中心に壊死細胞を特徴とする膿瘍形成を認めた。一方で 0.5%CLAI 群と CNI 群では、根尖部に炎症性細胞浸潤を認めなかった。

【考察・結論】

本研究では、CLAI がバイオフィームの除去に有効なことが示された。さらに、0.5%CLAI は、5%CLAI と同等のバイオフィーム除去効果が確認され、根尖部炎症も認められなかったことから、キャビテーションによる機械的圧力が除去機構の本態と考えられた。従って本手法を用いれば高濃度 NaOCl 使用に伴う安全性のリスクを低減した状態で、安全性を担保しつつ、信頼性の高いバイオフィーム除去を可能とする、新規治療基軸の確立に寄与するものと期待される。

ヒト 歯髄幹細胞の象牙芽細胞様細胞への分化に及ぼすストロンチウムイオン、
ホウ酸イオン、ケイ酸イオンの影響

¹ 日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学,

² 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第 2 講座,

³ 日本歯科大学新潟生命歯学部 微生物学講座

○宮野 侑子¹, 新海 航一^{1, 2}, 三上 正人³, 葛城 啓彰³

**Effects of Sr²⁺, BO₃³⁻ and SiO₃²⁻ on differentiation of human dental pulp stem cell into
odontoblast-like cell**

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

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

³Department of Microbiology, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata

○MIYANO Yuko¹, SHINKAI Koichi^{1,2}, MIKAMI Masato³, KATSURAGI Hiroaki³

【目的】 S-PRG フィラー含有コンポジットレジンには、6 種のイオン (ストロンチウムイオン、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、フッ素イオン) を徐放するバイオアクティブ材料である。これまでの研究で、ストロンチウムイオン (以下 Sr) とホウ酸イオン (以下 B) は歯髄幹細胞の分化・石灰化作用、ケイ酸イオン (以下 Si) は骨芽細胞の骨形成促進作用があることが報告されている。当講座では S-PRG フィラーを高分子系直接覆髄材に応用する研究を行っているが、歯髄組織に対するこれらイオンの作用は細胞レベルで詳細に検討されていない。本研究の目的は、ヒト歯髄幹細胞 (hDPSC) の象牙芽細胞様細胞 (OLC) への分化に及ぼす 3 種のイオン (Sr, B, Si) の影響について生体外の細胞培養モデルを用いて評価することである。

【方法】 各イオン溶液の濃度 (mM) は、Sr 群: 0.025 (SrL), 0.25 (SrM), 2.5 (SrH), B 群: 0.005 (BL), 0.05 (BM), 0.5 (BH), Si 群: 0.01 (SiL), 0.1 (SiM), 1.0 (SiH) の計 9 種類とした (松風より提供)。hDPSC (Lonza) を 1.0×10^4 cells/mL の濃度で DMEM に播種した後、実験群: 各イオン溶液を添加、対照群: イオン非添加で培養した (n=6)。(1) 細胞増殖試験: 3, 7, 10, 14, 21 および 28 日間培養 (以下、培養日数を D と略す) 後、増殖能の指標として alamarBlue (Invitrogen) を用いて蛍光度を測定した。以下の実験は D14, D21 および D28 に測定した。(2) アルカリホスファターゼ (ALP) 活性試験: 石灰化作用の指標として p-ニトロフェニルリン酸を基質とした吸光度を用いて ALP 活性を測定した。(3) アリザリンレッド S (ARS) 染色: 形成された石灰化物を ARS で染色し、定量化のために 10% 塩化セチルピリジニウムで抽出して吸光度を測定した。(4) シリウスレッド (SR) 染色: 形成されたコラーゲンを SR で染色し、定量化のために 0.1 M 水酸化ナトリウム溶液で抽出して吸光度を測定した。(5) リアルタイム PCR (qRT-PCR): 分化誘導能の評価として、Nestin, DMP-1, DSPP および ALP の発現量を測定した。(6) 免疫染色: 細胞内のタンパク発現の評価として、DMP-1 または DSPP を標識し、発現局在を観察した。(7) 統計分析: 分散分析後、多重比較 (Turkey 法または Scheffe 法) を行った ($\alpha = 0.05$)。

【結果】 (1) 細胞増殖試験: 全実験群で、増殖は D10 でピークに達し、D14 以降は抑制された。(2) ALP 活性試験: D14 の Sr 群、D21 と D28 の Sr 群と B 群で有意に高い吸光度を示した ($p < 0.028$)。 (3) ARS 染色: D14 の SiM, D28 の SrH で有意に高い吸光度を示した ($p < 0.028$)。 (4) SR 染色: D14 の全実験群、D21 の SrH, D28 の SrH, BO 群、SiL および SiH で有意に高い吸光度を示した ($p < 0.014$)。 (5) qRT-PCR: Nestin の発現は、D21 の全実験群で有意に上昇した ($p < 0.039$)。 DMP-1 の発現は、D21 の Sr 群、SiM および SiH で有意に上昇した ($p < 0.045$)。 DSPP の発現は、D14 の SiL と SiH, D21 の SrL, SrH, SiM および SiH で有意に上昇した ($p < 0.049$)。 ALP の発現は、D14 の SrL と SiL, D21 の BL で有意に上昇した。(6) 免疫染色: DMP-1 陽性は D14 の SrL と SrH, D21 の SrM と SrH, D28 の Sr 群、Si 群、BL および BM であった。 DSPP 陽性は D14 の Sr 群、BM および SiH, D21 の Sr 群、BL, BH および Si 群、D28 の Sr 群、BL, BM および Si 群であった。全培養期間で、対照群の DMP-1 と DSPP の発現は陰性であった。

【考察】 Sr, B あるいは Si の作用により hDPSC のコラーゲン形成、石灰化能は増強されたと考えられる。ARS 染色では明らかな石灰化物の形成は視認できなかったが、定量データでは石灰化の傾向が示された。Sr 群と Si 群では Nestin, DMP-1, DSPP および ALP, B 群では Nestin と ALP の各遺伝子の発現を認めた。DMP-1 と DSPP は基質石灰化に重要な働きを示すことから、Sr と Si を添加した場合、より長期間の培養で石灰化が生じる可能性がある。B 群では DMP-1 と DSPP の発現が比較的低かったが、Nestin と ALP の発現が高く ALP 活性を上昇させたことから、分化に関与する可能性がある。Sr, B, および Si は、毒性のない濃度の範囲であれば、hDPSC の OLC への分化誘導能を促進し、OLC の基質形成の速度にも影響を与える可能性がある。

フェノール系貼薬剤はケイ酸カルシウムの体積増加を介して
White Mineral Trioxide Aggregate の崩壊を誘導し封鎖性を低下させる

¹九州大学病院 歯内治療科, ²九州大学大学院歯学研究院 DDR 研究センター,
³九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野, ⁴九州大学大学院歯学研究院 OBT 研究センター
○友清 淳^{1,2}, 山下 梢³, 小野 太雅³, 一法師 啓太³, M.Anas Alhasan³, 濱野 さゆり^{3,4}, 長谷川 大学¹,
杉井 英樹¹, 前田 英史^{1,3}

**Phenolic medicaments reduce the sealing ability of White Mineral Trioxide Aggregate
via its expansion and disruption.**

¹Department of Endodontics, Kyushu University Hospital,
²DDR Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University,
³Department of Endodontics and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University,
⁴OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University
○Atsushi Tomokiyo^{1,2}, Kozue Yamashita³, Taiga Ono³, Keita Ippoushi³, M.Anas Alhasan³,
Sayuri Hamano^{3,4}, Daigaku Hasegawa¹, Hideki Sugii¹, Hidefumi Maeda^{1,3}

【目的】 Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は歯科用セメントであり, Portland cement と同様にケイ酸カルシウムを主原料とする. MTA は高い封鎖性ならびに硬組織形成誘導作用を示すことから, 穿孔部封鎖材として広く応用されているが, 我々は根管貼薬剤として用いられているフェノール製剤が, MTA の一種である White MTA (WMTA) の崩壊を誘導することを明らかにした (友清淳 他. 第 41 回日本歯内療法学会学術大会). しかしながら, 崩壊が WMTA の封鎖性に及ぼす影響は明らかになっておらず, またフェノール系貼薬剤による WMTA 崩壊のメカニズムも明らかとなっていない. そこで本研究では, 2 種類のフェノール系貼薬剤との接触により崩壊を生じた WMTA への色素侵入, および 2 種類のフェノール系貼薬剤と接触させた WMTA の各構成成分の体積変化について検証を行うこととした.

【材料および方法】 (1)WMTA disc の作製: ProRoot MTA (Dentsply Sirona) を蒸留水 (DW) と練和後, 型枠に填入したのち 37°C, 湿度 100% にて 24 時間硬化させることで, 直径約 5 mm, 高さ約 3 mm, 質量約 100 mg の disc を作製した. (2) 表面性状比較: DW, メトコール® (MET; ネオ製薬工業) またはクレオドン® (CRE; ネオ製薬工業) を各々 25 μ L ずつ 1.5 mL tube に注入し, そこへ disc を 1 枚ずつ浸漬した. 浸漬から 7 日後の disc 表面を scanning electron microscope (SEM; HITACHI) にて観察した. (3) 色素侵入試験: 1.5 mL tube に綿球を挿入し, DW, MET, または CRE を各々 25 μ L ずつ注入したのち, これらの綿球上に disc を 1 枚ずつ静置した. 静置から 7 日後に disc を取り出し, それらを 2% methylene blue (MB; Calbiochem) 溶液に 24 時間浸漬した. 浸漬後の disc をフロアブルレジン (ビューティフィルフロープラス X; 松風) に埋没し, 光照射にて硬化させることでレジンブロックを作製したのち, ダイヤモンドディスク (HORICO) にて割断した. 各 disc の割断面における最大色素侵入距離および色素侵入面積を, Image J software (NIH) を用いて計測した. (4) フェノール系貼薬剤と WMTA の構成成分との接触: WMTA の構成成分である酸化カルシウム (Alfa Aesar), 水酸化カルシウム (WAKO), ケイ酸カルシウム (WAKO), およびアルミン酸カルシウム (WAKO) を 1.5 mL tube に 100 mg ずつ填入したのち, DW, MET, または CRE を各々 25 μ L ずつ注入した. 7 日後, それらの体積変化を比較した.

【結果と考察】 SEM にて観察した結果, DW と接触した WMTA disc (DW-WMTA) 表面には, 様々な大きさの多角形の結晶を認めた. 一方, MET と接触した WMTA disc (MET-WMTA) ならびに CRE と接触した WMTA disc (CRE-WMTA) 表面には, 針状および綿状の結晶を認めた. MB に浸漬した DW-WMTA の割断面では, わずかに MB が侵入する程度であったが, MET-WMTA ならびに CRE-WMTA の割断面では, 多くの MB の侵入を認めた. 最大色素侵入距離および色素侵入面積においては, いずれも MET-WMTA が DW-WMTA よりも有意に高い値を示し, さらに CRE-WMTA が MET-WMTA よりも有意に高い値を示した. 酸化カルシウム, 水酸化カルシウム, およびアルミン酸カルシウムにおいては, MET および CRE と接触しても体積に変化を生じなかったが, ケイ酸カルシウムにおいては, いずれと接触した場合にも著明な体積の増加を認めた. これらの結果から, MET および CRE はケイ酸カルシウムの体積増加を介して, 硬化後の WMTA の崩壊を誘導し, それらの封鎖性を低下させる可能性が示唆された.

根尖部骨欠損を有する穿通不可症例における高周波通電の有効性に関する後ろ向き観察研究

¹ 医療法人 とみなが歯科医院, ² 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室
○多田 瑛一朗¹, 富永 敏彦^{1,2}, 菅谷 勉²

**Retrospective observational study of effectiveness of high-frequency conduction
in un-negotiated root canals with apical lesion.**

¹Tominaga Dental Clinic,

²Department of Periodontology and Endodontology Faculty of Dental Medicine Hokkaido University
○ Eiichiro Tada¹, Toshihiko Tominaga^{1,2}, Tsutomu Sugaya²

【目的】

根尖性歯周炎は、根管を化学的機械的に清掃することにより多くの症例は治癒する。しかし、根尖孔まで穿通できない症例では、根管洗浄や貼薬だけではファイル未到達根管に感染組織や汚染物質が残留する可能性があり、根管治療の成功率も低下する。一方、高周波電流を根管内に通電（以下、HFC：High-frequency conduction）すると、電極先端部で発熱するだけでなく根管が狭窄している部位でも電流密度が上昇して発熱し、根管壁を焼灼することが可能である。したがって、根尖部に炎症がある穿通不可症例においても、高周波通電によりファイル到達不可根管の病原因子を焼灼、殺菌して、根尖性歯周炎が治癒する可能性がある。

そこで本研究では、根尖部に骨欠損があるが根尖孔を穿通できない症例に対して HFC を応用し、その有効性を後ろ向きに評価した。

【方法】

2010 年 1 月 1 日から 2021 年 8 月 31 日の間に、北海道大学病院および医療法人とみなが歯科医院にて、エックス線画像で根尖部に骨欠損があり、根尖性歯周炎と診断され、マイクロスコープ下で化学的機械的根管清掃を行った患者を対象とした（北海道大学病院生命・医学系研究倫理審査委員会承認番号：生 021-0011）。エックス線写真で術前より骨欠損が縮小し臨床症状がないことを成功とし、それ以外を失敗と評価した。術前の骨欠損の大きさや歯種など、予後に影響する可能性がある 24 項目についても調査を行い、HFC により治療を行った HFC 群と HFC を用いずに通法の治療を行った対照群に分類して、これらの因子の影響を比較した。

まず、 χ^2 検定、Fisher 正確確率検定、Mann-Whitney U 検定で予後に影響する因子の両群間での偏りを解析した。次に、Kaplan-Meier 法により累積成功率を算出し、全ての予後因子について Log-rank 検定を行って予後に影響する項目を抽出したのち、ステップワイズ法で変数を選択して Cox 比例ハザードモデルで複数の予後因子の関連性を分析した。さらに、予後に関連する因子を両群間で最小にするために傾向スコアマッチングを行い、Logistic 回帰分析にて HFC の効果を評価した。

【結果】

症例数は 107 歯 120 歯根（北海道大学 51 根管、とみなが歯科 69 根管）であった。2 年後の累積成功率は HFC 群が 65.8%，対照群が 2.3% で、HFC 群は対照群より有意 ($p < 0.001$) に高かった。単変量解析で両群間に有意差 ($p < 0.05$) を認めたのは、HFC 応用、年齢、術前の根尖部骨欠損面積、根尖からの根管充填材到達距離であった。多変量解析結果では、HFC 応用、術前の根尖部骨欠損面積、根尖からの根管充填材到達距離に有意差 ($p < 0.05$) を認めた。傾向スコアマッチング後の Logistic 回帰分析の結果、HFC 群の成功率は対照群と比較してオッズ比で 66.5、信頼区間：8.15-542.00、 $p < 0.001$) と、HFC のきわめて高い効果が明らかとなった。また、術後の疼痛や腫脹など有害事象は 1 例もなかった。

【考察】

HFC 群で高い成功率を示したのは、穿通できなかった根管内で病原因子を焼灼、殺菌できたためと考えられる。また、HFC による疼痛や腫脹などは認められなかったことから、根尖部根管での発熱が歯周組織に障害を与えることはなく、安全性の高い治療法であることが明らかとなった。また、高周波通電を行うことは短時間で容易な治療であることから、ファイルが根尖に穿通できない根尖性歯周炎の症例に対して今後広く臨床応用され、感染根管治療の成功率向上に寄与することが期待される。

今後は症例数を増やして HFC の電圧や通電回数等と成功率との関連性を検討し、さらに効率的で確実な治療法に発展させたいと考えている。