

新規化学重合型ボンディング材の接着強さと窩洞適合性の評価

東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 口腔制御学分野
○木部 航太、畑山 貴志、島田 康史

Evaluation of bonding performance about new chemical-cured bonding agents
Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University(TMDU)
○Kota Kibe, Takashi Hatayama, Yasushi Shimada

【緒言】 近年、1 ステップ接着システムの接着性や操作性は大きく向上してきている。その多くは光重合型であり、化学重合型のボンディング材は主流ではないが、その接着性能の向上と操作の簡便化の観点から再評価を受けている。またコンポジットレジン修復において、重合収縮応力に伴う界面剥離は術後疼痛や二次カリエスの原因となることから、波長掃引型光干渉断層計(Swept-source optical coherence tomography, SS-OCT)を用いた窩洞適合性の評価が行われている。本研究において、新規化学重合型ユニバーサルボンディング材(Bondmer Lightless 2, トクヤマデンタル)の象牙質に対する接着性能と窩洞適合性を評価し、従来の光重合型ボンディング材と比較、検討することを目的として、微小剪断接着試験と充填窩洞の接着界面の観察を行った。

【材料と方法】 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。微小剪断接着試験では、25本のヒト抜去大臼歯歯冠部を歯軸に垂直に切断し、抜去歯1本につき象牙質ディスクを2枚切り出した後、流水下にて耐水研磨紙#600まで研削して平坦面を形成、厚さ2mmの象牙質ディスクを作製した。その後各メーカーのボンディングシステムとコンポジットレジンを組み合わせ、試料を作製した。化学重合型ボンディング材として、Bondmer Lightless 2とEstelite Bulk Fill Flow(トクヤマデンタル)(BE群)および、Bondmer Lightless 2と試作コンポジットレジンOCFB-001(トクヤマデンタル)(BO群)の組み合わせを2群、また光重合型ボンディング材としてPrime& Bond UniversalとSDR flow+(デンツプライシロナ)(PS群)および、Scotchbond UniversalとFiltek Bulk Fill(3M ESPE)(SF群)および、G-Premio BondとGracefil BulkFlo(GC)(GG群)の3群、合計5群を作製した。これらをメーカー指示通りに使用して象牙質への接着操作を行った後、各コンポジットレジンを直径0.8mm、高さ1.0mmのタイゴンチューブ(R-3603, Norton Performance Plastic Co.)を用いて円柱状に築盛、20秒間光照射した。得られた試料は37°Cの蒸留水中に24時間保管した後、ユニバーサル試験機(EZ-Test-500N, Shimadzu)を用いてクロスヘッドスピード1.0mm/minにて微小剪断接着強さを測定した。得られたデータはone-way ANOVAを用いて有意水準5%にて統計処理を行った。その後、SEM(JSM-5310LV, 日本電子)を用いて破断面の観察を行った。窩洞適合性の評価では40本の牛切歯歯冠を用い、#1000耐水研磨紙にて研削して平坦面を形成し、深さ1mmの皿状窩洞を形成。上記の5群をメーカー指示通りに使用して接着操作を行い、各コンポジットレジンを充填、20秒間光照射を行った。充填操作を行った直後に各試料をSS-OCTにて観察し、37°Cの蒸留水中に24時間保管後、再度SS-OCTにて撮影した。その後平坦面に対し垂直に切断し、耐水研磨紙#1200とダイヤモンドペーストを用いて研削したものを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)を用いて観察した。

【結果】 微小剪断接着試験の結果、化学重合型の2群の象牙質に対する接着強さはBE 10.75(MPa)、BO 13.76(MPa)であり、光重合型の3群はPS 14.07(MPa)、SF 13.20(MPa)、GG 13.71(MPa)であった。各群で統計学的有意差は認められなかった($P>0.05$)。破断面形態は5群ともに接着界面での破壊が最も多く、象牙質の凝集破壊と混合破壊との割合で差は認められなかった。またSS-OCTとレーザー走査型顕微鏡で得られた画像から、BE、BO群はPS、SF、GG群と比較し、窩底部の象牙質とコンポジットレジンとの窩洞適合性及び、辺縁封鎖性には大きな差は認められなかった。

【考察】 新規化学重合型ボンディング材は光重合型1ステップボンディング材と比較し、接着強さおよび、窩洞適合性、辺縁封鎖性の点で遜色ない結果が示され、臨床において安定的な成績が得られる可能性が示唆された。

ユニバーサルアドヒージブへの化学重合触媒の添加が レジンセメントおよびコア用レジンの歯質接着性に及ぼす影響

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹⁾, 総合歯学研究所生体工学研究部門²⁾,
岩崎歯科医院³⁾, 後藤歯科医院⁴⁾

○青木良太¹⁾, 高見澤俊樹^{1,2)}, 林 佳奈¹⁾, 庄司元音¹⁾, 横山宗典¹⁾,
田村友彦¹⁾, 宮崎真至^{1,2)}, 岩崎圭祐^{1,3)}, 吉田武史^{1,4)}

Influence of chemical polymerization initiator in a universal adhesive on dentin bond effectiveness of resin luting cement and core build-up resin composite

Department of Operative Dentistry¹⁾, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²⁾,
Nihon University School of Dentistry, Iwasaki Dental Clinic³⁾, Goto Dental Clinic⁴⁾

○AOKI Ryota¹⁾, TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2)}, HAYASHI Kana¹⁾, SHOJI Mone¹⁾, YOKOYAMA Munenori¹⁾,
TAMURA Tomohiko¹⁾, MIYAZAKI Masashi^{1,2)}, IWASAKI Keisuke^{1,3)}, YOSHIDA Takeshi^{1,4)}

【目的】

近年、ユニバーサルアドヒージブにレジンセメントあるいはコア用レジンとの接触によって重合が開始する化学重合触媒を添加した製品が開発、臨床使用されている。しかし、レジンセメントあるいはコア用レジンを使用する際に、この化学重合触媒の添加がユニバーサルアドヒージブの象牙質接着性に及ぼす影響についての知見は少ない。

そこで演者らは、レジンセメントあるいはコア用レジンの重合を促進するユニバーサルアドヒージブへの化学重合触媒の有無が象牙質接着性に及ぼす影響について、剪断試験、試験終了後の破壊形式および接着界面の走査電子顕微鏡観察から検討した。

【材料および方法】

供試した接着システムは、2 ボトル 1 ステップユニバーサルアドヒージブのボンドマーライトレス II (BL2, トクヤマデンタル) を用いた。対照として同製品から重合触媒を除いた試作品 (N-BL2, トクヤマデンタル) を用いた。コア用レジンとして ESTECORE (トクヤマデンタル) を、レジンセメントとして ESTECEM II (トクヤマデンタル) を用いた。

接着試験用試験片の製作に際しては、ウシ下顎前歯の歯冠部象牙質を耐水性 SiC ペーパーの# 320 を用いて研削し、被着歯面とした。歯面処理に際しては、製造者指示条件に従って BL2 あるいは N-BL2 塗布を行った。

1. コア用レジン接着試験用試片の製作

歯面処理を行った後、内径 2.4 mm, 高さ 2 mm の円柱状ステンレス金型にコア用レジンペーストを充填、透明ストリップスを用いて圧接し、接着試験用試片とした。また、コア用レジンに対して光線照射行う群 (照射群) およびこれを行わない群 (照射なし群) の 2 群を設定した。なお、照射群では垂直方向から 20 秒間照射した。

2. レジンセメント接着試験用試片の製作

被着面にレジンセメントを用いてステンレスロッド (直径 4 mm, 高さ 2 mm) を接着した。すなわち、ステンレスロッドの表面はアルミナブラスト (アルミナ粒子, 50 μ m) を 0.4 気圧の条件で 10 秒間行った。次いで、セメントペーストをステンレスロッド表面に塗布、被着歯面にステンレスロッドを静置し、定荷重加圧器を用いて 196.8 N の条件で圧接した。荷重負荷下で、溢出したセメントペーストをマイクロブラシにて除去した。また、セメントに対して光線照射行う群 (照射群) およびこれを行わない群 (照射なし群) の 2 群を設定し、照射群では異なる方向の 4 ヶ所から 10 秒間ずつ、合計 40 秒間照射した。照射なし群では、接着操作後、荷重下で 5 分間静置した。これらの試片は、37°C 精製水中に 24 時間保管後、万能試験機を用いて接着強さを測定した。試片の数は、各条件についてそれぞれ 15 個とした。象牙質接着界面の微細構造については、通法に従って SEM 観察した。

【結果および考察】

得られた接着試験の結果から、コア用レジンおよびレジンセメントのいずれの条件においても、化学重合触媒を含有したユニバーサルアドヒージブは、光線照射の有無にかかわらずその象牙質接着強さが向上した。このことは、接着界面でのコア用レジンおよびレジンセメントの機械的性質が向上したことに起因した可能性が考えられた。

【結論】

本実験の結果から、コア用レジンおよびレジンセメントの重合を促進する化学重合触媒が添加されたユニバーサルアドヒージブは、その象牙質接着性が向上することが判明した。

リン酸エステル系モノマー含有シランカップリング剤による処理面への 光化学的追加処理による接着効果

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座

○河本 芽 奈良陽一郎

Bonding efficacy of additional photochemical treatments on the silanized surfaces with a silane coupling agent containing methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate

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

○KOMOTO Mei and NARA Yoichiro

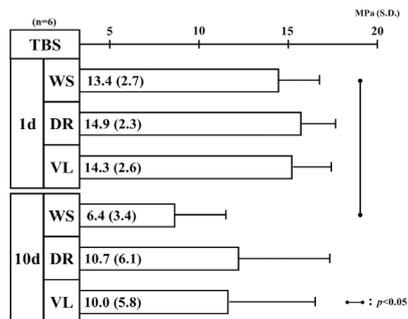
【目的】 シリカ系セラミック修復の良好な接着獲得に際し、シラン処理は重要な臨床的操作であるが、長期水中浸漬によって脆弱化することが知られている。本研究では、リン酸エステル系モノマー含有シランカップリング剤(以後、MDP カップリング剤)を用いた処理面への光化学的追加処理を行い、CAD/CAM セラミック修復物に対する接着効果について、水中浸漬を経た試料の引張接着強さ(TBS)を測定し、評価検討した。

【材料および方法】 長石系セラミックブロック：VITABLOCS Mark II (VITA)から得た板状試料を、注水下におけるSiCペーパー600番までの順次研磨を行った厚さ1.0 mmの試料に対し、MDP カップリング剤：CLEARFIL CERAMIC PRIMER PLUS (Kuraray Noritake Dental)を塗布した。その後、シラン処理面に対し3種処理条件：シラン処理後ただちに37°C水中保管する条件(WS)、シラン処理面に対し15 cmの距離からブロードライヤーによる20秒間の温風乾燥を行う条件(DR)、歯科用LED照射器：G-Light Prima-II (GC)の可視光領域を含む20秒間の光照射を行う条件(VL)を設定し、実施した。さらに、それら3条件試料について、24時間37°C水中浸漬する群(1d)、10日間37°C水中浸漬する群(10d)に類別し、設定期間の水中保管を行った。その後、直径2.4 mmの円形開孔部を有する厚さ70 μmのアルミ箔テープによって規定した被着面に対し、接着性レジンセメントPANAVIA V5 (Kuraray Noritake Dental)を直接塗布し、透明モールドガイドの設置、手指圧による規格化レジン硬化体の圧接を経て、3方向から20秒間ずつ、計60秒間の光照射を行い、接着試験試料とした。ついで、全試験試料は37°C水中24時間の保管を経て、クロスヘッドスピード毎分1.0 mmの条件下でTBS値を測定(n=6)した。得られた値に対して、二元・一元配置分散分析、Tukeyのq検定、t検定による分析を行った。

【成績と考察】 下図に、1d / 10d群における3種処理条件のTBS平均値を示す。分析の結果、水中保管期間はTBS値に対し有意な影響を与えているものの、処理条件は与えていなかった。また、水中保管期間にかかわらず、3条件間には有意差を認めなかった。さらに、WSでは1d値>10d値間に有意差を認めたが、DRとVLでは両水中保管期間の値間に有意差を認めなかった。さらに、TBS測定前に試料離断(ptf)を生じた試料は、処理条件にかかわらず、10d条件においてのみ1試料ずつ認めた。MDP非含有シランカップリング剤を用いた同様の研究によって、シラン処理面への光学的追加処理は、水中保管による接着強度の低下抑制に寄与する1)ことが確認されている。本実験で使用したCLEARFIL CERAMIC PRIMER PLUSは、成分中にγ-Methacryloxypropyltrimethoxysilaneとアルコール溶媒に加えてMDPが含有されている。したがって、シラン処理面へのDR・VL追加処理は、多様な被着体に対し優れた接着性を発揮するMDPの有無にかかわらず、水中保管後の接着強さの維持を可能としている。また、本研究によってその有効性が確認できた光化学的追加処理VLは、頻用されている歯科用LED照射器のみで実行でき、特別な高額装置や特殊なスキルを要せず、CAD/CAM用ブロックを含めたセラミック修復物に安定した接着効果を生む手技と考える。

【結論】 リン酸エステル系モノマー含有シランカップリング剤を用いた処理面への光学的追加処理は、簡便な操作によって、水中浸漬による脆弱化を抑制する接着効果を発揮することが明らかとなった。

1) 河本 芽, 榎木寿男, 奈良陽一郎, シラン処理したCAD/CAMセラミックブロックへの接着強さを向上させる光化学的処理. 接着歯学 2020 ; 38 : 44-52.



TBS of silanized restorative surfaces
with/without additional treatment

リン酸エステル系モノマー含有処理材がレジンセメントの接着性に及ぼす影響

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹⁾, 総合歯学研究所生体工学研究部門²⁾,
若松歯科医院³⁾, 岩崎歯科医院⁴⁾

○石井 亮^{1,2)}, 青木良太¹⁾, 横山宗典¹⁾, 田村友彦¹⁾, 高見澤俊樹^{1,2)}, 宮崎真至^{1,2)},
若松英輝³⁾, 岩崎圭祐⁴⁾

Influence of a surface conditioner containing phosphoric acid ester monomer on bond performance of a resin cement

Department of Operative Dentistry¹⁾, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²⁾,
Nihon University School of Dentistry, Wakamatsu Dental Clinic³⁾, Iwasaki Dental Clinic⁴⁾
○ISHII Ryo^{1,2)}, AOKI Ryota¹⁾, YOKOYAMA Munenori¹⁾, TAMURA Tomohiko¹⁾, TAKAMIZAWA
Toshiki^{1,2)}, MIYAZAKI Masashi^{1,2)}, WAKAMATSU Hideki³⁾, IWASAKI Keisuke⁴⁾

【研究目的】

間接法によって歯冠修復を行う際に、歯冠部の実質欠損が著しい場合には金属あるいはコンポジットレジンを用いた支台築造が行われる。このうち、築造を直接法によって行うレジン支台築造は、可及的な歯質の保存、優れた審美性および弾性率が象牙質と近似していることなどの理由から、これを行う頻度が増加している。一方、レジン築造体に審美修復材料を間接法にて用いる際には、レジンセメントの使用頻度が高い。しかし、修復物装着時に生じる修復物内面あるいは支台築造表面への唾液汚染は、レジンセメントの接着阻害因子となり、接着性が低下することが指摘されている。近年、唾液汚染が生じた際にリン酸エステル系モノマーの有する界面活性作用を応用することで化学的に汚染を除去する製品が開発、臨床応用されている。しかし、この化学的除去法の有する汚染除去効果およびレジンセメントの接着性に及ぼす影響については、不明な点が多いのが現状である。

そこで演者らは、レジンセメントの接着性に関する研究の一環として、被着面に唾液汚染が生じた際のリン酸エステル系モノマー含有処理材の除去効果およびレジンセメントの接着性に及ぼす影響について表面自由エネルギーおよびレジンセメントとの接着強さを測定するとともに、汚染除去後の表面性状の走査電子顕微鏡 (以後、SEM) から検討した。

【材料および方法】

供試した支台築造用レジンには、エステコア (トクヤマデンタル) を使用した。また、支台築造用レジン表面処理材としてボンドマーライトレス II (トクヤマデンタル) を、レジンセメントとしてエステセム II (トクヤマデンタル) を用いた。唾液汚染後の表面処理材としてカタナクリーナー (KC, クラレノリタケデンタル) を使用した。

1. 接着強さの測定

接着試験用試片の製作に際して、支台築造用レジンに常温重合レジンに包埋し、耐水性 SiC ペーパー# 320 を用いて研削し、被着面とした。ヒト唾液を 10 μ l 滴下してこれを汚染面とした。汚染面の表面処理法は、未処理面あるいは KC 処理とした。また、唾液汚染を行わず同様の処理を行ったものを対称群とした。

各被着面に対し処理を行った後、内径 2.4 mm、高さ 2 mm の円柱状ステンレスリングにセメントペーストを填塞、照射を行い、接着試験用試片とした。これらの試片を 37 $^{\circ}$ C 精製水中に 24 時間保管後、あるいは 24 時間保管後に温熱負荷を 10,000 回負荷した後、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いて剪断接着強さを測定した。なお、ヒト唾液の使用に関しては、本学倫理委員会の審査を経て承認を得ている (倫許 EP19D12)。

2. 表面自由エネルギーの測定

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

3. SEM 観察

各条件における支台築造用レジン表面における形態的な検討を行うため、通法に従って試片を製作し、SEM を用いて加速電圧 10 kV の条件で観察した。

【成績および考察】

得られた接着強さ試験の結果から、唾液汚染の除去を行った条件は、これを行わない条件に比較して有意に高い接着強さを示した。また、表面処理後の表面自由エネルギーは、汚染面と比較していずれの条件においても有意に高い値を示した。

【結論】

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

各種レジンセメントによる、歯冠象牙質ディスクおよび CAD/CAM コンポジットレジンドiskに対する象牙質微小引張り接着強さ

1. 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 歯蝕制御学分野
2. 徳島大学大学院 医歯薬学研究部 再生歯科治療学分野
3. 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

○石原洋樹¹、米倉和秀²、池田正臣³、中島正俊¹、大槻昌幸¹、島田康史¹、保坂啓一²

Dentin microtensile bond strengths of adhesively bonded coronal dentin or CAD/CAM resin composite disk.

1. Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Science, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
2. Department of Regenerative Dental Medicine, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences
3. Department of Oral Prosthetic Engineering, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

○Hiroki Ishihara, Kazuhide Yonekura, Masaomi Ikeda, Masatoshi Nakajima, Masayuki Otsuki, Yasushi Shimada, Keiichi Hosaka

【目的】

近年、レジンセメントの接着性能の向上、およびメタルフリーの観点から、間接法修復において歯冠色修復材料が用いられる機会が増えている。一方、抜去智歯などの歯冠を利用して修復治療を行うことで、機能的および審美的に生体を模倣した Biological Restoration が報告されている。しかし、接着性能を検討した基礎研究は行われていない。そこで本研究では、各種レジンセメントを用いて平坦象牙質に対する、歯冠象牙質ディスクおよび CAD/CAM コンポジットレジンドiskの接着性能を比較検討した。

【方法】

ヒト抜去健全大白歯の歯冠中央を、歯軸に対して垂直に切断し平坦面を作製後、#600 の耐水研磨紙を用いて仕上げ被着面とした。切断された歯冠側象牙質は厚さ 2mm になるよう削合し、切断面は耐水研磨紙を用いて仕上げ歯冠象牙質ディスクを作製した。一方、CAD/CAM ブロック (Katana Avencia P Block) を厚さ 2mm のディスクとして切断し耐水研磨紙を用いて平坦に仕上げ、50 μm 酸化アルミナ 0.2MPa にてサンドブラスト処理を行い、2 分間超音波洗浄し被着面とした。レジンセメントは、SA Luting Multi (SA)、Panavia V5 (PV5)、Super Bond C&B (SB) の 3 種を用いた。SA は、象牙質に対しセルフアドヒーズモードにて接着を行う群 (SA-S)、Universal Bond Quick ER を併用して処理を行った後、光照射の有無によって非光照射群 (SA-UBQ)、光照射群 (SA-UBQ-L) に分類した。PV5 は、象牙質に対しては Tooth Primer を、CAD/CAM ディスクに対しては Clearfil Ceramic Primer Plus を用いて、それぞれ処理を行った。SB は、歯面処理材によって Teeth Primer (SB-T) 群および Green Activator (SB-G) 群に分類し、CAD/CAM ディスクに対しては M&C Primer を用いて処理を行った。歯冠象牙質ディスクおよび CAD/CAM ディスクにレジンセメントを塗布して平坦象牙質に圧接し、SA と PV5 は 5 方向からそれぞれ 10 秒間光照射を行い、SB は圧接後 30 分間放置した。それぞれの試料は、37°C の水中に 24 時間保管した後、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。

【結果】

結果を Table に示す。全ての接着方法において、象牙質に対する歯冠象牙質ディスクと CAD/CAM ディスクの微小引張り接着強さ (μ TBS) の間に統計学的有意差は認められなかった。接着方法による比較では、歯冠象牙質ディスクは SB-G ≥ SB-T > PV5 ≥ SA-UBQ-L > SA-UBQ ≥ SA-S、CAD/CAM ディスクは SB-G ≥ SB-T > PV5 ≥ SA-UBQ-L ≥ SA-UBQ ≥ SA-S の順に高い μ TBS を示した。

【結論】

本実験系では各種レジンセメントにおいて、Biological Restoration を想定した歯冠象牙質ディスクの象牙質に対する接着強さと、CAD/CAM ディスクの象牙質に対する接着強さの間に有意差を認めなかった。一方、両群ともに材料選択により接着強さは影響を受けることがわかった。

東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会承認番号 D2013-022 号

Table. Microtensile bond strengths (n=30, MPa ± SD)

Mean value (MPa)	SA-S	SA-UBQ	SA-UBQ-L	PV5	SB-T	SB-G
Coronal dentin disk	12.6±3.2 ^{Aa}	14.6±4.8 ^{ABa}	20.8±5.7 ^{Ca}	21.2±4.5 ^{Ca}	30.9±5.4 ^{Da}	39.5±6.6 ^{Da}
CAD/CAM resin composite disk	13.9±3.5 ^{Aa}	15.1±3.4 ^{ABa}	20.4±6.0 ^{BCa}	22.3±5.0 ^{Ca}	32.9±7.5 ^{Da}	40.5±7.4 ^{Da}

Different superscript letters indicate significant difference between groups ($p < 0.05$); uppercase letters in rows, lowercase letters between coronal dentin and CAD/CAM resin composite disks with each adhesive group.

歯髄圧有無条件下における 4種接着システムを用いたコンポジットレジン1級直接修復窩底部象牙質接着に対する質的評価

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座

○前野雅彦, 森 のり子, 奈良陽一郎

Qualitative evaluation for cavity-floor dentin bonding of class 1 resin composite direct restoration using four adhesive systems with and without pulpal-pressure conditions

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

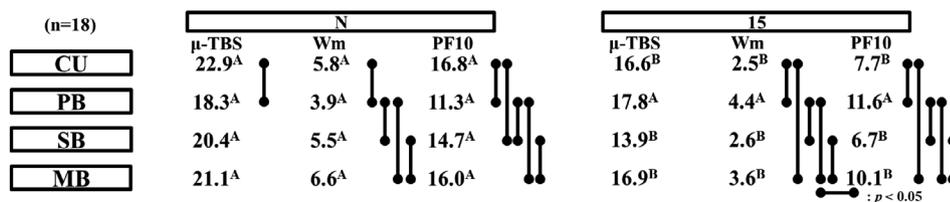
○MAENO Masahiko, MORI Noriko and NARA Yoichiro

【目的】 口腔内に存在する歯の修復に際しては、歯髄圧の有無による影響を理解した対応が望まれる。一方、臨床では、多種成分の最適配合バランスによって、多用途に応用できる接着システムが活用されている。そこで、修復頻度が高いコンポジットレジン1級直接修復を想定し、歯髄圧有無条件下における4種接着システムを用いた窩底部象牙質に対する微小引張接着強さ(μ -TBS)を測定し、その実態について質的評価を行った。

【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-T2022-31)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16本を用いた。まず、被験歯歯根の根尖側1/4の切断を経て、中隔部の切削によって歯髄腔を開放した。ついで、歯髄残存組織の除去後に綿球を挿入し、シリコンゴム印象材によって歯髄腔開放部を含め被覆した。その後、被験歯の規格化植立を経て、複製窩洞形成器と基準窩洞試料を用いて、中心窩から深さ2.0mm、頬舌・近遠心幅それぞれ5.0mmの規格化1級窩洞を形成した。ついで、被験歯植立モールド底面から印象材と綿球を除去し、歯髄腔に交通するスペースを小孔付き透明アクリル板によって封鎖した試料を、歯髄圧非負荷条件(N; 対照)とした。他方、水中にて歯髄腔交通スペースへの蒸留水注入後に、小孔に接着させたポリエチレン細管を介して蒸留水を充たしたシリコンチューブを連結させ、窩底部象牙質面から貯水面までの垂直距離を15cmに設定した試料を歯髄圧負荷条件(15)とした。その後、代表的なオールインワンアドヒーズシステム3種(CU: CLEARFIL Universal Bond Quick ER, Kuraray Noritake Dental, PB: Prime&Bond universal, Dentsply sirona, SB: Scotchbond Universal Plus, 3M)、および安定した接着性能を有するとの国内外評価を得ている2ステップセルフエッチングブライマーシステム(MB: CLEARFIL Mega Bond 2, Kuraray Noritake Dental; 対照)による歯面処理後に、汎用性コンポジットレジン(CLEARFIL MAJESTY ES-2, Kuraray Noritake Dental)を用いて2.0mm/残余部の2回分割積層充填による臨床的修復を行った。なお、Nへの歯面処理は、窩洞形成を経た直後に、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、Nは37°C水中24時間保管後に、15は歯髄圧負荷条件下の24時間経過後に、頬舌的・近遠心的それぞれ4回の切断によって、1試料から断面積1.0mm²のビーム状試料9片を得て、C.H.S. 1.0mm/min下の μ -TBS値(n=18)を測定した。得られたデータは、 μ -TBSに基づくメジアンランク法によるワイブル分析によって統計学的解析を図った。

【成績と考察】 得られた平均 μ -TBS値とワイブルパラメーター値の違いを下表に示す。CU・SB・MB群の平均 μ -TBS値とWm値・PF10値は、15条件がN条件より有意に小さい値を示した。一方、PB群では両歯髄圧条件間の値に有意差を認めなかった。また、N条件においては、PB群のWm・PF10値は、対照を含む3群値と比較して有意差ある最小値を示したものの、15条件では有意差ある最大値を示した。したがって、近年の接着システムによる窩底部象牙質の接着信頼性・接着耐久性は、歯髄圧による負の影響を受ける傾向にあるものの、歯髄圧の有無にかかわらず一定の質的性能を発揮するシステムが存在することが判明した。また杉山ら(日本歯科保存学会2022年度春季学術大会(第156回), 03, 2022)は、本実験と同様の手法によって、中心窩から2.0mm下方の平面象牙質に対する同一条件下のWm値/PF10値による質的評価を行い、CU(N:2.6/14.7, 15:2.9/10.8)、PB(N:2.6/14.3, 15:2.4/13.4)、SB(N:3.0/16.4, 15:3.1/12.1)、MB(N:4.4/18.8, 15:2.0/7.9)を報告している。本実験によるWm値/PF10値との質的差違の一因として、分割積層充填の第1層目におけるC値の差違(本実験値:3.10、杉山らの同値:0.23)が考えられる。

【結論】 コンポジットレジン1級直接修復窩底部象牙質における質的評価としての接着信頼性と接着耐久性は、歯髄圧負荷によって減弱する傾向を示すものの、同条件下においても優れた質的接着を獲得するシステムを確認した。



Differences in the values of μ -TBS and Weibull parameters among four adhesive systems with and without pulpal pressure condition

Different uppercase letters between two pulpal pressure conditions indicate statistically significant differences at $p < 0.05$.

S-PRG フィラー溶出液と超音波振動を用いた歯根象牙質脱灰抑制能の検討

¹ 神奈川歯科大学短期大学部歯科衛生学科, ² 神奈川歯科大学歯科保存学講座保存修復学分野
○片岡 あい子¹, 椎谷 亨², 小倉 真奈², 向井 義晴²

Anti-demineralization effect of S-PRG filler eluate with ultrasonic vibration on root dentin

¹Department of Dental Hygiene, Kanagawa Dental University Junior College,

²Department of Restorative Dentistry, Kanagawa Dental University

○KATAOKA Aiko¹, SHIYA Toru², OGURA Mana², MUKAI Yoshiharu²

【目的】

S-PRG 溶出液を用いた超音波デブライメントを想定し, S-PRG フィラー溶出液 (ナノ S-PRG フィラーを 0.5wt% 含有) を超音波振動を加えた動的な状態において歯根象牙質面に作用させた場合の脱灰抑制能を検討した。

【材料および方法】

1. 象牙質試料の作製: ウシ下顎中切歯歯根部を歯頸部直下およびそれより 5 mm 根尖側で切断し円筒状象牙質歯片を切り出した。その後, 歯軸方向に 2 分割し, 表面を 2000 番の耐水研磨紙により研磨後, 象牙質試料とした。耐酸性パーニッシュを用いて 2 × 3 mm 被験歯面を作製した。歯髄側および側面もパーニッシュを塗布した。
2. 処理群 (n=3) 3 群: 1) S-PRG フィラー溶出液 (超音波振動なし): PRG 群, 2) S-PRG フィラー溶出液+超音波振動: PRG+US 群, 3) 脱イオン水: DW 群
3. 処理方法: PRG 群および DW 群はそれぞれ 3 個の 50ml ビーカーに S-PRG フィラー溶出液もしくは脱イオン水 (40ml) と象牙質試料 1 つを入れ, 10 分間静置した。PRG+US 群は, 3 個の 50ml ビーカーにそれぞれ S-PRG フィラー溶出液 (40ml) と象牙質試料 1 つを入れ, 超音波洗浄機 (US-2R) にて超音波振動 (40kHz) を 10 分間与えた。これらの処理は 1 日 1 回とし, その他の時間は以下に記載するような脱灰液に浸漬した。
4. 脱灰試験: 処理以外の時間は各試料を脱灰溶液 (1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 50 mM acetic acid, 0.1ppm F, pH 5.0) 10ml に浸漬し, 37°C で 4 日間脱灰を行った。
5. 評価方法: ダイヤモンドワイヤー式精密切断機 (Well3242) にて厚さ 300 μm の薄切片を作製し, Transverse Microradiography (TMR) 撮影 (管電圧 35kV, 管電流 15mA, 焦点-試片間距離 570mm, 照射時間 15 分, PW3830) を行った。現像後, 分析用ソフト (TMR2006, 2012) を用いてミネラルプロファイルを作成し, ミネラル喪失量 (IML) および病巣深度 (Ld) を測定した。3 群間の比較には Games-Howell の多重比較検定 (有意水準 5%) を用いた。

【結果】

各群の平均ミネラルプロファイルは, PRG 群は DW 群と比較して表層のエックス線不透過性が高く, ミネラル密度は DW 群が 9.5 μm 付近で 14 vol% に対し, PRG 群では 12.5 μm 付近で 41 vol% と高い値を示した。PRG+US 群では 17 μm 付近で 38 vol%, 41 μm 付近で 44 vol% の二層性のピークが認められた。IML (vol% × μm) は DW 群で 4421, PRG 群で 2456, PRG+US 群で 2782 であり, PRG 群と PRG+US 群は DW 群と比較して有意に低い値となった (p < 0.05)。Ld (μm) は DW 群で 165, PRG 群で 135, PRG+US 群で 161 であり, 3 群間に有意差は認められなかった (p > 0.05)。

【考察】

今回の実験では, S-PRG 溶出液の脱灰抑制効果は認められたものの, 超音波を併用した群と非併用群との間で有意な脱灰抑制効果の差は認められなかった。一方, ミネラルプロファイルには違いが認められた。超音波併用群は 2 層性のピークを有する特徴的なミネラルプロファイルを示しており, これは S-PRG フィラー溶出液と超音波振動の併用により歯根象牙質面のスミヤー層が超音波キャビテーションにより象牙質面から除去されるとともに, キャビテーションによる衝撃波により溶出液中の微細なフィラーやイオンが深部にまで浸透し脱灰液中のフッ化物イオンをリチャージ・リリースすることで形成されたものと考えられた。

探針による触診は白斑エナメル質を破壊するか？

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座

○清水明彦

Does probing with an explorer produce traumatic damage in white spot lesions?

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine

○Akihiko Shimizu

【研究目的】

萌出まもない永久歯の小窩裂溝を探針で触診すると、エナメル質が崩壊する危険性が報告され(Ekstrand ら 1987 年)、また探針による触診は、小窩裂溝のう蝕歯質のみならず健全歯質も崩壊させる危険性が報告された(小澤ら 1990 年)。しかし、前者の報告では探針の触診圧や先端形状が不明であり、後者の報告では触診圧が約 800 gf と過大であるなど問題点も多く、探針の有害性の実態については、見直しておく必要がある。

本研究の目的は、探針を用いて抜去歯のエナメル質う蝕病変を触診したとき、如何なる深さのクボミができるかを調べ、探針による触診が白斑エナメル質表層を崩壊するかどうかを再検討することである。

【材料および方法】

先端曲率半径 $R=57\mu\text{m}$ 、円錐角 27 度の探針 (#23, Lot:CB1, YDM 社) の探針部分を柄から取り外し、触診圧が設定可能な機器のハンドピースに取り付けた。10%中性ホルマリンに保存された抜去歯の中から ICDAS code 2 の白斑を有する歯を選んだ(兵庫医科大学倫理審査委員会承認番号 2260)。白斑のう蝕断面を、耐水研磨紙で #2500 まで研磨し、得られたう蝕病変部を被験対象とした。

触診圧を 100 gf に設定した探針を、う蝕面に垂直に押し当て、形成されたクボミの直径を顕微鏡(200 倍)で計測し、その半径 $Z\mu\text{m}$ からクボミの深さを「計算式： $R \times [1 - \cos(90 - \cos^{-1} Z/R)]\mu\text{m}$ 」で算出したのち、硬度計(MVK-E, 明石社)を用いてクボミの可及的近傍のエナメル質のヌーブ硬さ(KHN)を測定した。次いで、触診圧を 150、200、300 gf に設定し、同様にクボミの深さ(μm)とクボミ近傍のエナメル質の硬さ(KHN)を調べた。

【成績】

設定された 4 通りの「触診圧」でエナメル質にできた「クボミの深さ(μm)」と「エナメル質の硬さ(KHN)」を調べ、全部で 48 のペアデータを得たのち、触診圧ごとに累乗近似曲線を求めた。

触診圧が同じならう蝕病変が硬ければクボミは浅くなり、また触診圧が大きくなるとクボミも深くなることが分かった。例えば、探針の触診圧を 100→150→200→300 gf と大きくすると、「硬さ 30 KHN のう蝕」にできるクボミの深さは 11→15→20→23 μm となり、「硬さが 75 KHN のう蝕」ならクボミの深さは 2.7→4.3→6.1→6.9 μm となった。

【考察】

一般に白斑は、表層下ではかなり脱灰が進んでいても、表層エナメル質(厚さは約 20~80 μm)はある程度の厚みと硬さを維持している。ここでは ICDAS code 2 の白斑として、白斑の表面硬さ 75 KHN(う蝕病変が象牙質に到達している白斑の表面硬さは 93±18 KHN と報告されている)、表層エナメル質の厚さ 20 μm と見積もって検討する。このような厳しい状況下にある白斑であっても、探針を触診圧 150 gf で使用した場合、クボミの深さは 4.3 μm (サランラップの厚さの 1/2 以下)なので、探針が厚さ 20 μm の表層エナメル質を破壊して表層下脱灰層まで貫通するとは考えられない。白斑は、小窩裂溝だけでなく、矯正治療や有床義歯の不適切な使用に関連して発現するが、これらの白斑に対し、探針を適切な触診圧(100~150 gf)で使用すれば、白斑エナメル質が崩壊することはない。

一方 ICDAS code 3 の白斑において表層の一部が崩壊している部位の硬さは 32±18 KHN と報告されている。よって、エナメル質表層が崩壊している部位(う窩)では、表層下の脱灰層が露出していると想定されるので、探針で調べる際には触診圧 100gf 以下で慎重に行うべきであろう。

【結論】

臨床医が先端曲率半径 $R=57\mu\text{m}$ の探針を常識的な触診圧(100~150 gf)で使用するなら、探針によって ICDAS code 2 の白斑のエナメル質表層が崩壊することはないであろう。

象牙質に浸透したイオンの局在と MMP 阻害作用との関係性の可視化

大阪大学大学院歯学研究科歯科保存学講座
○内藤 克昭, 島岡 毅, 神田 ひかる, 林 美加子

Visualization of the relationship between the localization of ions diffusing dentin and inhibition of matrix metalloproteinase activity

Osaka University Graduate School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry and Endodontology
○NAITO Katsuaki, SHIMAOKA Tsuyoshi, KANDA Hikaru, HAYASHI Mikako

[研究目的]

う蝕の進行過程において、有機成分であるマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) やコラーゲン線維と F, Zn, Mg などのイオンがそれぞれ脱灰・再石灰化に寄与することは知られているが、それらの相互作用は不明である。そこで我々は、象牙質内におけるイオンの局在とコラーゲン線維の崩壊に関与する MMP の抑制についての相互作用に着目した。本研究の目的は、ナノレベルでの元素検出力を有する飛行時間型二次イオン質量分析法 (TOF-SIMS) および組織学的に定量評価が可能な *in situ* zymography を用いて、イオンの局在と MMP 阻害作用への関係性を可視化し、う蝕の進行過程における両者の相互作用を理解することをめざした。

[材料および方法]

<試料作成> 21 歳から 28 歳のヒト健全第三大臼歯を使用した (n=6)。歯根をエナメル-象牙質から 0.5 mm 上方の位置を基準に厚さ 2 mm の歯冠部円盤状試料を取得した。象牙質以外をスティッキーワックスで被覆し、Caredyne® restore (GC, Tokyo) を象牙質に塗布した。湿度 100%, 37 °C 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。12 時間後 (n=2) および 1 週間後 (n=4)、材料を機械的に除去し、測定試料とした。

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)

<TOF-SIMS> 上述した 12 時間浸漬試料を常温重合レジンに包埋し、試料の固定を行った。材料塗布面を #600-#2000 の耐水ペーパーで表面を研磨後、酸化アルミナで鏡面研磨を行った。この試料を 15×15×10 mm のブロック状に加工し M6 (IONTOF, Munster, Germany) の測定ステージに固定して、Static TOF-SIMS による元素分析に供した。スペクトルは、陽イオンおよび陰イオンフラグメントを 500 × 500 μm の領域で取得した。またイメージング画像は、20 × 20 μm の領域で取得した。

<*in situ* zymography> 上述した試料を厚さ 150 μm に切断し、スライドガラスに貼付け、#600-#1500 の耐水ペーパーを用いて厚さ約 50 μm になるまで研磨した。フルオレセイン標識ゼラチン溶液 (E-12055) を緩衝液 (NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8.0) で希釈し、各象牙質切片に 50 μm 滴下した。ポジティブコントロールは材料を塗布しなかった試料とし、ネガティブコントロールは材料塗布後に MMP 阻害剤である 1.0 mol/L tetracycline を含む緩衝液に浸漬した試料を用いた。アルミホイルで遮光し、37°C の恒温槽で 24 時間静置した後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いた *in situ* zymography により、MMP 活性の抑制効果を評価した。

取得した画像は、Imaris 9.2.1 (Bitplane, Zurich, Switzerland) と image J (NIH) を使用して解析した。

[結果および考察]

材料を塗布した試料において、管周象牙質 (PTD) に F, Zn などの外来性イオンの集積を認めた。イオンの集積は、表層から約 10 μm で確認でき、深部ほど減少する傾向を認めた。管間象牙質 (ITD) においては外来性イオンの集積はわずかしか確認できなかった。コントロールと比較して、Ca²⁺, P, CN⁻; その他アミノ酸の分布に明らかな違いは認めなかった。*In situ* zymography では、Caredyne® restore を塗布した試料において、表層の蛍光強度が減少し、MMP の活性が阻害されたことがわかった。その深さは約 10 μm で、外来性イオンの集積を認めた範囲と一致した。以上の結果より、TOF-SIMS と *in situ* zymography の併用はイオンと有機質との相互作用を明らかにする上で有用であることが示唆された。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。

ヒト歯髄幹細胞における HEMA 誘導性細胞応答への TRPA1 の関与

九州歯科大学 口腔機能学講座 口腔保存治療学分野
○折本 愛、北村知昭

**The Role of TRPA1 Channels
in HEMA-Induced Cell Response of Human Dental Pulp Stem Cells**
Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Department of Oral Functions,
Kyushu Dental University
○ORIMOTO Ai, KITAMURA Chiaki

【目的】

歯の痛みは、う蝕、冷・機械刺激、化学刺激などの様々な外部刺激によって惹起される。一過性受容体電位アンキリン 1 (TRPA1) は一次求心性感覚神経に発現する非選択イオンチャンネルで、冷・機械刺激や様々な刺激性化学物質に応答する。歯髄において TRPA1 が発現していることから、歯髄の痛み刺激受容に TRPA1 が関与することが示唆されているが、その機序の詳細については不明な点が多い。これまでに、ヒト歯髄幹細胞に変異型サイクリン依存性キナーゼ 4 (CDK4^{R24C})、サイクリン D1 (CyclinD1)、テロメア逆転写酵素 (TERT) の 3 種類の遺伝子発現により、分化能力および元の染色体パターンを維持したまま細胞分裂が劇的に加速される効率の良い無限分裂ヒト歯髄由来幹細胞 hDPSC-K4DT の樹立に成功している (第 155 回 日本歯科保存学会にて発表)。本研究では、セルフエッチングシステムで頻用される 2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA) に対する細胞応答への TRPA1 関与を無限分裂ヒト歯髄幹細胞 hDPSC-K4DT を用いて検証した。

【材料と方法】

1. 細胞および培養法: 無限分裂ヒト歯髄幹細胞 hDPSC-K4DT を骨分化誘導培地で 1-2 週間培養した。
2. 定量性 RT-PCR: hDPSC-K4DT を骨分化誘導培地で培養し、TRPV1, TRPA1 および TRPV4 の培養日数依存的な遺伝子発現量の変化を解析した。
3. HEMA による細胞応答の評価: 予備実験として、hDPSC-K4DT を用いて細胞毒性試験を行い、以後の解析に供する HEMA 濃度を決定した。骨分化誘導培地で培養した hDPSC-K4DT を HEMA 暴露し、酸化ストレス応答関連マーカーである HO-1 の遺伝子発現量、活性酸素 (ROS) 量、細胞外に分泌された ATP 量を解析した。

【結果】

定量性 RT-PCR の結果、無限分裂ヒト歯髄幹細胞 hDPSC-K4DT において、TRPA1、TRPV1、TRPV4 の遺伝子発現が認められ、TRPA1 が最も高い発現を示した。TRPA1 の遺伝子発現量は骨分化誘導を開始して日数依存的に 10 倍 (分化誘導 8 日後)、40 倍 (分化誘導 15 日後) と増加した。HEMA に暴露した hDPSC-K4DT では、HEMA 濃度依存的に HO-1 遺伝子発現量が上昇した。骨分化誘導培地で 14 日間培養を行った後に 30 mM HEMA に暴露した hDPSC-K4DT では ROS 産生と細胞外に分泌された ATP 量の増加が認められた。また、30 mM HEMA 暴露により産生された ROS と細胞外に分泌された ATP 量は、ROS 抑制剤と TRPA1 選択的アンタゴニストにより減少した。

【考察】

無限分裂ヒト歯髄幹細胞 hDPSC-K4DT でみられる骨分化誘導下での TRPA1 の経時的な発現上昇は TRP チャンネルが hDPSC-K4DT の硬組織形成細胞分化に関与することを示唆している。また、HEMA 濃度依存的な HO-1 遺伝子発現の上昇、高濃度 (30 mM) HEMA 暴露による ROS 産生と細胞外 ATP 量の増加、および ROS 抑制剤と TRPA1 選択的アンタゴニストによる ROS 産生と細胞外 ATP 量の減少は、HEMA が高濃度になると hDPSC-K4DT の解毒代謝機能が追い付かなくなる結果として ROS が蓄積すること、ROS が TRPA1 の活性化に関与していることを示唆している。

【結論】

無限分裂ヒト歯髄幹細胞 hDPSC-K4DT の硬組織形成細胞への分化および HEMA 誘導性細胞応答に TRP チャンネルである TRPA1 は関与する。また、hDPSC-K4DT を用いた評価系による TRPA1 を介した歯髄における痛み受容メカニズムの解明は、歯の疼痛発症メカニズムの解明と疼痛制御治療法の開発に有用である。

【謝辞】

本研究の実施にあたり御指導賜りました九州歯科大学、生理学分野 小野 堅太郎教授に深く感謝申し上げます。

マウス歯髄におけるリンパ管の存在および細胞外液排出経路の組織学的観察

¹東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野

²University of Michigan School of Dentistry, Department of Cariology, Restorative Sciences, and Endodontics

³岩手医科大学 歯学部口腔医学講座 歯科医学教育学分野

○田澤 建人^{1,2}, 藤村 朗³, 興地 隆史¹, 佐々木 元²

Histological observation of the presence of lymphatic vessels and extracellular fluid drainage pathways in mouse dental pulp

¹Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

²University of Michigan School of Dentistry, Department of Cariology, Restorative Sciences, and Endodontics

³Division of Dental Education, Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Iwate Medical University
○TAZAWA Kento^{1,2}, FUJIMURA Akira³, OKIJI Takashi¹, SASAKI Hajime²

【緒言】

リンパ管は細胞外液の恒常性維持に重要な役割を担うが、歯髄リンパ管の有無については統一見解が無い。また歯髄は硬組織に囲まれ組織圧に対するコンプライアンスが低いとされるが、細胞外液排出機構については不明の点が多い。そこで本研究では、リンパ管上皮マーカーProx1 (prospero homeobox 1) の発現を緑色蛍光タンパクのシグナルで解析可能なProx1-eGFP トランスジェニックマウスを用い、歯髄リンパ管の存在および細胞外液排出経路を評価した。

【材料および方法】

歯髄リンパ管の評価にはProx1-eGFP マウス (生後1, 3, 5, 7, 14日, 6週齢, 各N = 3) を用いた。Dylight 594-lectin を心臓内に注入し血管内皮細胞を蛍光標識したのち、下顎骨を摘出、固定・脱灰を行い、抗-eGFP 抗体を用いて GFP シグナルを増強した。組織標本は凍結切片 (厚さ 10 μm) もしくは組織透明化操作により透明標本とした後、共焦点レーザー顕微鏡にて eGFP シグナル陽性管腔を観察した。また、マウス第一臼歯近心咬頭に窩洞形成し、3, 5, 7 日後に下顎骨を摘出し上記の観察を行い、歯髄リンパ管の可逆性歯髄炎に伴う動態変化を評価した。さらに細胞外液排出経路の評価のため、マウス第一臼歯を露髄させ同部に墨汁を滴下し、歯髄に吸収された墨汁の分布を組織学的に観察した。(本実験はミシガン大学動物実験委員会の承認を受けて行った。実験番号:PR000009610)

【結果】

生後1-7日の歯髄では、prox1 陽性管腔の密なネットワーク構造を認め、Dylight 594 で標識された血管系とは完全に独立していた。一方、生後14日の歯髄組織切片ではProx1 陽性管腔は観察されなかった。6週齢の成熟正常歯髄におけるProx1 陽性管腔は、組織切片では観察できない場合があったが、透明組織標本ではいずれの試料においても少数かつ不連続ながら歯髄内にProx1 陽性管腔を認めた。可逆性歯髄炎誘発3-5日目では、歯髄内のProx1 陽性管腔は増生し歯冠部から根尖部まで連続性を示すようになり、根尖口外のProx1 陽性管腔と交通していた。一方、7日目では歯髄内Prox1 陽性管腔は正常歯髄と同レベルまで発現が低下し不連続性を呈していた。歯髄に吸収された墨汁は主に細胞希薄層を中心とした細胞間隙を通じて根尖口外へ排出されていたが、一部はProx1 陽性管腔内にも認められた。

【考察】

本実験ではリンパ管特異マーカーであるProx1 を指標とすることにより血管系とは独立した管腔を観察することができ、歯髄におけるリンパ管の存在を示唆した。成熟歯髄における組織切片でProx1 陽性管腔の発現に再現性が乏しかった理由は、成熟歯髄におけるリンパ管は数が少なく管腔壁も薄いために、凍結切片の厚みでは検出が困難であったためと考えられる。歯髄の成熟に伴いProx1 陽性管腔の発現は減少するが、歯髄炎誘発後一過性に増生することから、炎症時には細胞外液の排出経路の一端としてリンパ管も機能していると考えられた。しかしながら、成熟正常歯髄においては細胞間隙が主な歯髄組織液の排出経路であることが示唆された。

【結論】

マウス歯髄において血管系とは独立したProx1 陽性管腔ネットワークを認めた。Prox1 陽性管腔は成熟歯髄では不連続性であったが、歯髄炎誘発後に一過性に増生し連続性を認めた。歯髄細胞外液の排出経路として、細胞間隙と歯髄リンパ管を介した経路が存在することが示唆された。

*本研究はNIH/NIDCR grants R01DE024796, R21DE030213の助成を受けたものである。

歯髄再生療法モデルラットを用いた歯根成長段階による治癒形態の比較解析

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

○高原信太郎¹, 大倉直人¹, 吉羽邦彦², 吉羽永子¹, 竹中彰治¹, 枝並直樹¹, 庭野和明¹, 野杵由一郎¹

The comparison analyses of wound-healing mechanism according to the root development stage using the regeneration model rats

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

○Shintaro TAKAHARA¹, Naoto OHKURA¹, Kunihiro YOSHIBA², Nagako YOSHIBA¹, Shoji TAKENAKA¹, Naoki EDANAMI¹, Kazuaki NIWANO¹ and Yuichiro NOIRI¹

【目的】 根管治療歯は生活歯に比べて脆弱であり、喪失のリスクが高くなるため (Caplan DC *et al.* 2005)、歯の構造を強化させることが可能な再生歯内療法(regenerative endodontic procedure: REP)が注目されつつある。我々はこれまで、根未完成歯の REP における歯髄残存量の違いに応じた治癒形態のパターンについて調査したところ、残存量の減少に伴い、根管内の新生硬組織(dentin-associated mineralized tissue: DAMT)・新生軟組織の組み合わせは、象牙質様 DAMT・歯髄様組織、セメント質様 DAMT・歯根膜様組織、および骨・歯根膜様組織の3パターンを示すことを報告している (Edanami *et al.* 2020)。しかし、治癒に向かう際の詳細な分子細胞メカニズムや歯根成長段階による治癒形態に差があるか否かについては不明なままである。根未完成歯の根尖部には特異的な間葉系幹細胞(Mesenchymal Stem Cell: MSC)の存在が確認されており、MSCの有無を左右する根尖部の発達状況の違いが REP 後の治癒期間と治癒形態に大きく影響すると仮説を立てた。よって、本研究では、3つの歯根成長期(中期、後期、完成期)に着目し、REP 後の治癒形態のパターンおよび DAMT 量の比較を行った。また、治癒に重要な役割を演じる MSC と M2 マクロファージ(M ϕ)に着目し、REP 前の根尖部と REP 後の根尖部および根管新生軟組織における免疫組織学的局在の比較を行った。

【材料および方法】 本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認後実施した(承認番号 SA01156)。歯根成長中期、後期、完成期に該当する5週齢、8週齢および11週齢のWistar系ラットの下顎左側第一臼歯に対して、以前の研究(Edanami *et al.* 2020)に従って REP 処置を施した。すなわち、近心部を露髄し、近心根の根尖孔から0.8mm 上部までの歯髄を除去後、根管を血餅で満たし、MTAを塗布し、フロアブルコンポジットレジンで充填した。28日後に下顎骨ごと摘出し、4週間脱灰後、パラフィン切片を作成し、H-E染色、dentin sialoprotein、Nestinおよび Periostinの免疫組織学的解析による根管内の治癒形態および DAMT 量の評価、MSC マーカーである alpha-smooth muscle actin (α -SMA)、CD73、CD90 および CD146 を免疫組織学的に解析し、MSC の局在解析、さらに CD68 と CD206 とを免疫蛍光二重染色して M2M ϕ の局在解析を行った。本研究は科研費(21H03117B)の助成を受け、遂行された。

【結果】 未処置歯の近心根根尖部において、 α -SMA および CD73 は歯根の発達とともに陽性反応が著明に減少した一方で、CD90 および CD146 では変化は認められなかった。

REP 処置後28日目において、週齢の増加に伴い DAMT・歯髄様組織の治癒形態を示す頻度が減少し、DAMT 形成量の減少を認めた。 α -SMA の免疫組織学的解析では、週齢の増加に伴い根尖部の陽性領域が減少する一方で、根管内の新生軟組織において MSC の細胞形態を有する α -SMA 陽性細胞が増加した。また、根尖部および根管新生軟組織において MSC の細胞形態を有する CD73、CD90 および CD146 の陽性細胞が著明に増加した。さらに、週齢の増加に伴い CD68 と CD206 の二重陽性細胞が根尖部および根管新生軟組織でも著明に増加した。

【考察】 未処置歯に関して、週齢の増加に伴い根尖部での MSC の細胞形態を有する一部の MSC マーカー陽性細胞が減少していることから、歯根の完成とともに特定の MSC 数が徐々に減少していく可能性がある。このような変化は REP 後の治癒形態に影響を与える可能性を示した。すなわち、歯根の完成に伴い残存歯髄に存在する MSC 数が減少し、その結果、治癒遅延と DAMT 形成の減少が生じたと考えられる。

【結論】 ①未処置歯の近心根根尖部では α -SMA および CD73 の陽性細胞が歯根の発達に伴い減少した。②REP 後の近心根でも歯根の発達に伴い、治癒形態および DAMT 量に著明な差を認め、さらに③各 MSC マーカーおよび M2 マクロファージでも根尖部と根管新生軟組織で様々な局在形態が観察された。

miR-582-5p, that targets *Skp1* and suppresses NF- κ B signaling-mediated inflammation, is down-regulated in periodontitis and obesity

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

2 Department of Cell Biology, Aging Science, and Pharmacology, Division of Oral Biological Sciences, Faculty of Dental Science, Kyushu University

○Li Rongzhi¹, Tomomi Sano^{1,2}, Takao Fukuda¹, Takanori Shinjo¹,
Misaki Iwashita¹, Akiko Yamashita¹, Terukazu Sanui¹, Fusanori Nishimura¹

【Background, objective】

Nuclear factor-kappa B (NF- κ B) is a key transcription factor that associates with chronic inflammation states such as periodontitis and obesity. During the progress of inflammation, macrophages play an important role. MicroRNAs (miRNAs) are pivotal inflammation modulators. However, miRNA-regulated mechanisms that implicate NF- κ B activity are not fully understood. This study aimed to identify a potential miRNA that could modulate the dysregulated NF- κ B signaling during inflammation.

【Materials and methods】

Eight-week-old male C57BL/6J mice were fed with either a normal diet (ND) or a high-fat diet for eight weeks to develop diet-induced obesity. miRNA expressions of adipose tissues in each group were detected by microarray analysis, and were further verified by quantitative PCR (qPCR). Experimental periodontitis was created in 12-week-old ND-fed male C57BL/6J mice by 5-0 silk ligation around left maxillary molar for two weeks. Gingival tissues were isolated and subjected to qPCR for miRNA quantification. Production of the pro-inflammatory cytokines in miRNA-transfected macrophages was measured by qPCR, western blot, and ELISA. Target candidate gene of the fluctuated miRNA was selected via target prediction tool, TargetScan. Confirmation of the candidate gene was performed using dual-luciferase reporter assay and western blot. Signaling modulation by the miRNA was detected by western blot and immunofluorescence.

【Results】

We identified that miR-582-5p was significantly downregulated in inflamed murine adipose tissues, gingival tissues and RAW264.7 cells, a macrophage-like cell line. Moreover, exogenous miR-582-5p attenuated the production of pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-6. S-phase kinase-associated protein 1 (SKP1), a core component of an E3 ubiquitin ligase that promotes the degradation of NF- κ B inhibitor alpha (I κ B α), thus regulating the NF- κ B pathway, was proposed as a biological target of miR-582-5p. The binding of miR-582-5p to a 3'-untranslated region site on *Skp1* was confirmed using a dual-luciferase reporter assay; in addition, transfection with a miR-582-5p mimic suppressed SKP1 expression in RAW264.7 cells. Importantly, exogenous miR-582-5p attenuated the production of pro-inflammatory cytokines in macrophages by suppressing the degradation of the I κ B α , which subsequently inhibited the phosphorylation of p65 and its nuclear translocation.

【Conclusion】

miR-582-5p, which decreases during inflammation, could inhibit LPS-induced inflammatory response via suppressing NF- κ B signaling by targeting *Skp1*. Therefore, regulation of miR-582-5p could be a therapeutic strategy for inflammation-related pathologies such as obesity and periodontitis.

機械感受性イオンチャネル Piezo1 はマクロファージの *Porphyromonas gingivalis* に対する自然免疫応答を制御する

1) 広島大学大学院医系科学研究科 歯髄生物学研究室

2) 日本学術振興会特別研究員 DC2

3) ノバサウスイースタン大学歯学部

4) 日本学術振興会海外特別研究員

○熊谷 友樹^{1),2),3)}, 進藤 智^{3),4)}, 中村 心³⁾, 武田 克浩¹⁾, 柴 秀樹¹⁾, 河井 敬久³⁾

Mechanosensitive Piezo1 dysregulates macrophage's innate immune responses to *Porphyromonas gingivalis*

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

2) JSPS Research Fellowship for Young Scientists DC2

3) Nova Southeastern University College of Dental Medicine

4) JSPS overseas research fellowships

○Tomoki Kumagai^{1),2),3)}, Satoru Shindo^{3),4)}, Shin Nakamura³⁾, Katsuhiro Takeda¹⁾, Hideki Shiba¹⁾, Toshihisa Kawai³⁾

【緒言】*Porphyromonas gingivalis* (Pg)は、歯周炎の主たる原因菌であり、LPS、ジンジパイン、外膜小胞 (OMVs) など多くの病原性因子を産生する(Weizhe et al., 2020)。これらのPg由来因子のうち、OMVsは、病原性因子の運搬手段として機能していると考えられる (Amano, et al., 2014)。近年、全ての宿主細胞は、細胞膜に発現する様々なチャネルを介して機械的刺激に応答する能力を持っていることが明らかになっている。特に、機械的ストレスを生体信号に変換する機械感受性Ca²⁺イオンチャネルであるPiezo1とPiezo2が発見され(Coste et al., 2010)、2021年にDr. Ardem Patapoutianのノーベル賞受賞へとつながった。興味深いことに、マクロファージに発現されたPiezo1は、大腸菌のLPSによって誘導される toll-like receptor-4 (TLR4) のシグナルを増幅することが報告されており(Geng et al., 2021)、自然免疫による炎症反応にPiezo1が関与する可能性が示唆されている。歯周炎患者では歯槽骨の吸収と歯周靭帯の損傷による歯牙動揺が病的に増大し、歯周組織に存在する細胞に機械的ストレスが発生していると考えられる。しかしながら、歯周炎においてマクロファージに発現されたPiezo1による機械的ストレスに対する応答がその病態に与える影響についてはほとんど不明である。本研究ではマクロファージに発現する機械感受性Piezo1 Ca²⁺チャネルの活性化とPg感染の相互作用が炎症反応に与える影響を検討した。

【材料および方法】Piezo1 ショートヘアピン RNA (shRNA) または対照のスクランブル shRNA を発現するレンチウイルスベクターを RAW264.7 細胞にトランスフェクションした。その後、RAW 細胞にPg (W83 株) から分離したOMVsを添加、若しくは無添加した後、Piezo1 特異的 activator である Yoda1、あるいは振とう攪拌機による培養液流動で起こす“ざり応力” (30 rpm, 15 degree)を加えた。上記の条件で刺激したRAW細胞を対象に、TLR-2、TLR-4のmRNA発現を定量的RT-PCRにより解析し、TNF- α の産生をELISAで、またPiezo1の発現をフローサイトメトリーにて調べた。LPS等によるTLRの刺激は細胞内シグナルであるMAPKカスケードを活性化することで、炎症性の細胞反応が誘導される(Chen D et al.2002)という報告から、MAPKリン酸化に与える影響をウェスタンブロット法にて評価し、Image Jソフトウェアによって定量化した。Ca²⁺流入量の変化はFluo-8 AM Calcium Assay Kit (AAT Bioquest)を用いて蛍光強度を継続的に測定した。MAPK活性化によるシグナル伝達経路は細胞障害性も併せ持つシグナル物質である活性酸素(ROS)の発生も誘導することから(Long C. et al., 2009)、Piezo1活性化およびOMVs刺激がRAW264.7細胞のROS産生に与える影響をDichlorodihydrofluorescein diacetate 溶液を用いて検討した。

【結果】OMVsとPiezo1活性の共刺激はRAW264.7細胞のTLR-4遺伝子発現を有意に増強した。またOMVsとPiezo1活性の共刺激によって、それぞれの単独刺激と比較してTNF- α の産生が有意に亢進した。Piezo1は、細胞膜の機械的伸展をCa²⁺の流入とそれに続く細胞シグナルに変換することが知られている(Fan J. et al.2021)が、予想に反してOMVの刺激はYoda1によって誘導されるCa²⁺流入に影響を与えなかった。一方、Yoda1はOMVsによって誘導されたROSの産生だけでなくMAPK (p38MAPK, ERK およびJNK)のリン酸化も促進させた。さらに、shRNAによるPiezo1のノックダウンはOMVsによって誘導されたROS産生を抑制した。

【考察】機械的刺激によるPiezo1の活性化はPg由来OMVsで刺激したマクロファージに対して、TLR-4/ROS/MAPKのシグナル経路を増幅させることで、炎症性サイトカインであるTNF- α 産生を促進し、炎症の増悪に関与している可能性が示唆された。本研究から、歯周炎における病的な歯牙動揺等の機械的刺激が、Pg感染とPiezo1 Ca²⁺チャネルの相互作用を介してマクロファージによる炎症反応を悪化させる新たなメカニズムとして考察された。

プロトンポンプ阻害剤服用時に歯周病原細菌が腸内細菌叢へ及ぼす影響

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 学術研究院 医歯薬学域 歯周病態学分野

³ 岡山大学病院 歯科・歯周科部門

○釜田 英幸¹, 平井 公人², 池田 淳史³, 伊東 有希², 井手口 英隆², 大森 一弘², 高柴 正悟²

Effect of periodontopathogenic bacteria on the gut microbiota when taking proton pump inhibitors

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

2. Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science, Okayama University

3. Department of Periodontics and Endodontics, Division of Dentistry, Okayama University Hospital

○KAMATA Hideyuki¹, HIRAI Kimito², IKEDA Atsushi³, ITO-SHINODA Yuki², IDEGUCHI Hidetaka², OMORI Kazuhiro², TAKASHIBA Shogo²

【目的】

胃酸分泌抑制剤であるプロトンポンプ阻害薬 (PPI) は、逆流性食道炎や消化管潰瘍の治療薬としてだけでなく、高齢者の診療では多剤服用の胃粘膜保護のために長期に処方頻度が高い。近年、歯周病などによる口腔内の細菌叢の乱れが腸内の細菌叢にも悪影響を及ぼす可能性が示唆され、歯周病が炎症性腸疾患の悪化に影響することが報告されている。さらに、消化性潰瘍や逆流性食道炎など胃の諸症状を治療するために PPI を使用した場合は胃酸の量が減少し pH が上昇することで、胃のバリアとしての機能が低下し消化管感染症のリスクを高めていることや、PPI を使用している患者の糞便から口腔内細菌の有意な増加が報告されている。本研究では、PPI の服用により胃 (胃酸) の殺菌作用が低下した状態で、歯周病原細菌である *Porphyromonas. gingivalis* (Pg) もしくはその代謝産物が腸内細菌叢へ与える影響を検討することを目的とした。そこでまず、PPI 服用時に大量の Pg を飲み込むことが腸内細菌叢に及ぼす影響を、マウスモデルにおいて組織学的及び免疫学的に検討した。

【材料と方法】

マウス (C57BL/6J, 雄性, 7 週齢) に PPI (15 mg/Kg) を毎日 5 週間経口投与した (陰性対照はリン酸緩衝液: PBS)。投与開始 1 週間後から Pg W83 株 (1×10^7 CFU あるいは 1×10^8 CFU) を週 3 回経口投与した (岡山大学動物実験委員会: OKU-2021888)。5 週間後に屠殺し、胃、大腸、盲腸を摘出した。そして、胃の内容物の pH 測定を、大腸組織のヘマトキシリン・エオジン染色を、腸管組織中の炎症性細胞数のフローサイトメトリー解析を行った。さらに、盲腸内容物中の細菌叢解析を 16S rRNA メタゲノム解析で、総細菌数に占める Pg 数の定量を real-time PCR 法で行った。統計分析は、one-way ANOVA および多重比較 Tukey 法を用いた。

【結果】

PPI 投与群では胃内の pH は上昇していた。腸管上皮細胞の配列の乱れと浸潤した炎症性細胞 (好中球とマクロファージ) の数は、有意差はなかったが、PPI+Pg 群で増加傾向にあった。しかし、PPI+Pg 群の盲腸内では PPI 非投与群よりも Pg の割合が上昇しており (1×10^7 CFU 群で 7.5 倍, 1×10^8 CFU 群で 13 倍), Pg 1×10^8 CFU 群では有意に上昇していた。また細菌叢解析結果から、PBS+Pg (1×10^8 CFU) 群と PPI±Pg 群で細菌叢の β 多様性が有意に変化していた。

【考察】

本研究で Pg をマウスに経口投与したところ、腸管粘膜の軽微な炎症を惹起させた。さらに、盲腸内の細菌叢に変化が生じた。以上から、PPI の長期服用時には、歯周病原細菌が腸内細菌叢に影響を与えることが示めされた。今後は、慢性腸疾患モデルで、この事象がどのように影響するかを検討する。

iPS 細胞由来歯根膜幹細胞様細胞の分化誘導における Fibrillin-2 の役割

¹九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

²九州大学大学院歯学研究院・OBT 研究センター

³九州大学病院歯内治療科

⁴九州大学大学院歯学研究院・DDR 研究センター

○濱野さゆり^{1,2}, 山下大輝¹, 糸山知宏³, 友清淳^{3,4}, 長谷川大学³,

杉井英樹¹, 兼子大志³, Bara Mardini¹, 前田英史^{1,3}

The role of fibrillin-2 in differentiation of iPS cell-derived periodontal ligament stem cell-like cells

¹Department of Endodontology and Operative Dentistry, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University, ²OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University,

³Department of Endodontology, Kyushu University Hospital, ⁴DDR Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University

○Sayuri Hamano^{1, 2}, Daiki Yamashita¹, Tomohiro Itoyama³, Atsushi Tomokiyo³, Daigaku Hasegawa³, Hideki Sugii¹, Hiroshi Kaneko³, Bara Mardini¹, Hidefumi Maeda^{1, 3}

【研究目的】歯根膜組織中に存在する幹細胞は、歯周組織再生において中心的な役割を果たすことが知られているが、歯根膜幹細胞を獲得するためには、侵襲性の高い抜歯が必要であり、臨床へ応用することは困難である。当研究室では、iPS 細胞が持つ高い自己増殖能と多分化能に着目し、初代ヒト歯根膜細胞 (HPDLC) の細胞外マトリックス (ECM) を用いることで、iPS 細胞を歯根膜幹細胞様細胞へ分化誘導することに成功した。一方で、HPDLC における ECM の構成成分はそのドナー間で異なることから、歯根膜幹細胞様細胞を安定して得るためには、ECM の中から歯根膜幹細胞誘導因子を同定・精製する必要がある。そこで当研究室では、HPDLC に由来する ECM について網羅的な解析を行い、歯根膜幹細胞誘導因子の候補として Fibrillin-2 (FBN2) を見出した。本研究では、FBN2 が iPS 細胞の歯根膜幹細胞様細胞への分化誘導に及ぼす影響について検討することとした。

【材料および方法】理化学研究所より購入したヒト皮膚線維芽細胞由来の iPS 細胞 (HPS No. 0063) を用いて実験を行った。当研究室では、iPS 細胞を歯周組織発生の起源である神経堤細胞様細胞 (iNC) へと分化させ、HPDLC の ECM 上にて iNC を培養することで歯根膜幹細胞様細胞 (iPDLC) を得ることに成功している。そこで、FBN2 が iPDLC の分化誘導に及ぼす影響について検討するため、FBN2 siRNA または control siRNA を導入した HPDLC の ECM 上にて iNC を培養することで得られた細胞 (iNC-siFBN2 または iNC-siCont) における歯根膜幹細胞特性について、(1) 歯根膜関連因子の遺伝子発現解析、(2) 間葉系幹細胞マーカーの発現解析、(3) 増殖能解析、ならびに (4) 多分化能解析について、RT-PCR 法、フローサイトメトリー解析、WST-1 assay、Alizarin red S (ARS) 染色および Oil red O (ORO) 染色を用いて検討した。なお本研究は九州大学大学院歯学研究院倫理委員会の許可を得て、患者様の同意の上で行った (承認番号: 2-115、4-99)。

【結果】(1) iNC-siFBN2 における歯根膜関連因子の遺伝子発現を RT-PCR 法を用いて解析した結果、iNC-siCont と比較して歯根膜関連因子である *α-smooth muscle actin*、*Collagen I*、*Osteoprotegerin*、*Periodontal ligament-associated protein-1* および *Periostin* の遺伝子発現が有意に低下した。(2) iNC-siFBN2 における間葉系幹細胞マーカーについてフローサイトメトリーを用いて解析した結果、iNC-siCont と比較して、間葉系幹細胞マーカーである CD90 を発現している細胞の割合はやや減少し、CD105 ではその陽性細胞の割合が顕著に減少した。(3) iNC-siFBN2 における増殖能について WST-1 assay を用いて解析した結果、iNC-siCont と比較して増殖能は有意に低下した。(4) iNC-siFBN2 を骨芽細胞誘導培地にて 3 週間培養した結果、iNC-siCont と比較して ARS 陽性面積が有意に低下した。また同様に、iNC-siFBN2 を脂肪細胞誘導培地にて 4 週間培養し、ORO 染色を行った結果、iNC-siCont と比較して脂肪滴の形成量が有意に低下した。

【考察】FBN2 をノックダウンした HPDLC の ECM は、iNC から iPDLC への分化誘導能が低下したことから、FBN2 は歯根膜幹細胞誘導因子の 1 つであることが示唆された。

【結論】iNC-siFBN2 は iNC-siCont と比較して、歯根膜関連因子の遺伝子発現、間葉系幹細胞マーカーの発現、増殖能、さらに骨芽細胞様細胞および脂肪細胞様細胞への分化能が低下することが明らかとなった。

抗 IL-17 抗体が実験的歯周炎に与える影響

神奈川歯科大学歯学部分子生物学講座 口腔生化学分野
○佐藤武則, 半田慶介

Influence of anti-IL-17 antibody on experimental periodontitis
Department of Oral Biochemistry, Kanagawa Dental University
○Takenori Sato, Keisuke Handa

【目的】

インターロイキン(IL)-17 はヘルパーT 細胞から産生される炎症性サイトカインである。IL-17 は皮膚の自己免疫疾患である乾癬の発症に関わるため、治療には抗 IL-17 抗体が適用され一定の成果が得られている。一方、歯周炎においても IL-17 は破骨細胞を活性化し歯槽骨吸収を誘導することが報告されているが、抗 IL-17 抗体投与が歯周炎に与える影響についての研究報告は非常に少ない。そこで本研究は現在乾癬の治療に用いられている抗 IL-17 抗体の歯周治療への有効性を検討する目的で、マウス実験的歯周炎モデルを用いて歯槽骨吸収抑制効果を評価し、さらに歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) の増殖抑制効果とヒト歯肉線維芽細胞を用いた炎症性サイトカインの発現抑制効果について *in vitro* で検討した。

【材料および方法】

1. 実験的歯周炎モデルを用いた骨吸収抑制効果

3 週齢 BALB/c 系雄性マウス口腔内に Pg を感染させて実験的歯周炎を誘導後、抗 IL-17 抗体 (プロダルマブ : BRD) を 2 日おきに腹腔内投与した (神奈川歯科大学実験動物・組み換え DNA 委員会承認番号 : No. 2021-007)。BRD の骨吸収抑制効果を評価するため、投与後に上顎骨を摘出し、マイクロ CT 画像上で上顎臼歯部の歯槽骨頂からセメント・エナメル境までの距離を骨吸収量として計測し、形態学的に骨吸収抑制効果を評価した。また歯肉の好中球数と歯槽骨の破骨細胞数を評価するため、上顎骨の病理組織標本を通常法に従い作製し、単位面積当たりの細胞数をそれぞれ計測した。

2. Pg に対する増殖抑制効果

BRD が Pg の生菌状態に与える影響を評価するため、Pg 含有培地に BRD を添加後、経時的に細菌のアデノシン三リン酸 (ATP) 活性量をルシフェラーゼ法により測定し細菌の発育を判定した。

3. 炎症性サイトカインの遺伝子発現抑制効果

BRD の抗炎症作用を評価するため、神奈川歯科大学倫理委員会で承認を得たヒト歯肉線維芽細胞 (承認番号 No. 455) を大腸菌の内毒素 (LPS) で処理後に BRD を添加した。添加 30 分後の炎症性サイトカインの遺伝子発現は、real-time PCR 法により解析した。

【結果】

マイクロ CT 画像を用いた骨の形態学的計測により BRD の骨吸収抑制効果を検討した結果、BRD 投与群では歯槽骨吸収量が濃度依存的に減少し、高濃度投与群では未処置群と同程度まで骨量の回復が認められた。また第一臼歯と第二臼歯の歯間部では BRD の投与により好中球や破骨細胞の減少が観察され、高濃度投与群では未処置群と同程度まで骨破壊が抑制された。さらに BRD 添加 Pg 菌液では時間経過により ATP 活性量の増加が遅延し細菌の発育阻害が見られた。LPS で刺激したヒト歯肉線維芽細胞が産生する炎症性サイトカインに対して BRD は、標的となる IL-17 だけでなく IL-1 β や IL-6 の遺伝子発現量を抑制した。

【考察および結論】

本研究の結果、BRD は歯周組織中の炎症を軽減し骨破壊の抑制に関与していると考えられた。したがって本歯周炎モデルに BRD を投与することは歯周組織の骨量回復に貢献すると示唆された。