

in vivo う蝕修復モデルを用いた象牙質の多面的評価法の検討

¹⁾大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学講座)

²⁾北海道医療大学歯学部 う蝕制御学分野 ³⁾朝日大学歯学部 歯科理工学分野

○神田 ひかる¹⁾, 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⁾

Investigation of comprehensive assessment methods for dentin caries following restoration using *in vivo* caries model

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

2.Health Sciences University of Hokkaido Graduate school of Dentistry, Division of Clinical Cariology and Endodontology 3.Asahi University School of Dentistry, Department of Dental Materials Sciences

○KANDA Hikaru¹, NAITO Katsuaki¹, YAMAMOTO Hiroko¹, MATSUDA Yasuhiro², OKUYAMA Katsushi³, HAYASHI Mikako¹

【目的】

「削らないう蝕治療」の実現のために、バイオミネラリゼーションを促進する材料開発が進められている。う蝕の進行と抑制には多様なイオンが関係しており、歯質内でのイオン動態を理解するためには、生体内のう蝕の状態を多面的に評価し、その構造と浸透したイオンの分布や機能との関連を検討することが必須である。本研究では、ラマン分光分析、nanoCT および SEM にて *in vivo* う蝕試料の同一部位を、結晶学的また形態学的に評価した。そして In-air micro-beam particle induced X-ray/gamma-ray emission (PIXE/PIGE) 法と飛行時間型 2 次質量分析 (TOF-SIMS) を用いて象牙質に浸透したイオンの分布を取得し、う蝕の状態とイオンの関係を探索した。

【材料と方法】

Sprague-Dawley 系ラット (15 日齢オス) に対して 5 日間抗生物質含有の飼料 (テトラサイクリン, 4 g/kg, 富士フィルム和光純薬) と水 (ペニシリン, 1 ampoule/mL Meiji Seika ファルマ) を投与し、口腔内常在細菌を抑制した。生後 20 日目より本抗生物質に耐性のある *Streptococcus mutans* MT8148R 株を 5 日間摂取させ、口腔内に菌が定着させた後、実験終了まで 56%スクロース配合粉末飼料 (Diet 2000, オリエンタル酵母) を与えて飼育し、う蝕の進行をマイクロ CT (mR_CT2, RIGAKU) にて確認した。感染後 1 ヶ月間の飼育で小窩裂溝う蝕を誘発させたラットにおいて、上顎第一臼歯咬合面小窩裂溝部にラウンドバーにて窩洞を形成し、窩洞内にケアダイン レストア (GC 社) を充填した。その後取り出した上顎臼歯部を近遠心方向に厚さ 500 μm に切断し、測定試料とした。

上記試料において、セメントに接する象牙質領域 (250 μm ×500 μm) のカルシウム、フッ素、亜鉛の元素分布を PIXE/PIGE 法で取得した。その後、nanoCT (SKYSCAN2214, BRUKER) で試料の 3 次元微細構造およびミネラル密度を取得した。同サンプルに対して、Ar イオンビームを用いたイオンミリング (IB-19530CP/IB-10500HMS, 日本電子) により表層の研磨を行った。その後 PIXE/PIGE 法にて元素分布を得た領域において、ラマン分光分析 (Ramantouch, nanophoton) を用いてハイドロキシアパタイトの結晶化度をイメージングした。また TOF-SIMS (M6, IONTOF) を用いて元素・分子分布を評価し、う蝕の詳細な状態とイオン分布との関連を探索した。

なお、本研究における全ての動物実験は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け、承認のもとに実施した (受付番号: 動歯 R-02-007-0)

【結果および考察】

ラマン分光分析にてハイドロキシアパタイトの結晶化度が低下している部位において、PIXE/PIGE 法ではカルシウムの強度、TOF-SIMS ではリン酸カルシウムの強度の低下を認めた。また TOF-SIMS において、同領域にフッ素の浸透を認める一方、亜鉛は浸透しないことが明らかになった。nanoCT において窩洞周囲にミネラル密度の高い領域を認め、同部位に PIXE/PIGE 法にてフッ素・亜鉛の集積を認めた。

本研究により *in vivo* 試料にて象牙質う蝕の状態を包括的に評価する手法を確立することができた。今後はこれらを応用し、各種イオンのう蝕抑制効果のメカニズムを明らかとし、バイオミネラリゼーションの理解を促進する新規材料の開発に寄与したい。

本研究は JSPS 科研費 JP20H00552、JP21K21009、JP23K16022 および Nakao Foundation Grants の助成を受けたものである。

根面う蝕象牙質のう蝕検知液に対する染色性とヌープ硬さ

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座

○清水明彦

Relation between dye stainability and Knoop hardness of root caries dentin

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine

○Akihiko Shimizu

【研究目的】

う蝕象牙質削除の end point (終了点) の目安として、臨床では「う蝕検知液の染色性」や「スプーンエキスカバーターに対する切削抵抗感 (硬さ)」が利用されている。しかしこの「染色性」と「硬さ」は end point の目安として重要視されているが、両者にはどのような関係があるのか、特に根面う蝕についての報告はない。

本研究の目的は、ヒト抜去歯の根面う蝕を試料とし、う蝕削除の終盤において、う蝕検知液の染色性とヌープ硬さの関係性を調べることである。

【材料および方法】

10%中性ホルマリンに保存された4本のヒト抜去歯の5つの根面う蝕を試料とした(兵庫医科大学倫理審査委員会承認番号 2259)。スプーンエキスカバーターは CDR #1 と #2 (YDM)、う蝕検知液は Caries Detector (クラレメディカル) を使用し、ヌープ硬さの測定にはカリオテスター (三栄エムイー) を用いた。

鋭利なスプーンエキスカバーターを用いて、根面う蝕象牙質を表層から深層に向かって削除を繰り返し、部分的に強い切削抵抗感 (カリカリ感、scratchy) が出現したところで削除を中止し、窩壁にう蝕検知液を塗布した。

なお、ピンク染部と淡ピンク染部の識別は主観に左右されるので、本研究ではいずれも「ピンク染部」で統一し、カリオテスターを用いて、ピンク染部 (36 部位) と不染部 (34 部位) のヌープ硬さを測定した。

【成績】

ピンク染部 (n=36) および不染部 (n=34) の「平均硬さ±SD」は、それぞれ 7.6 ± 1.5 KHN、 14.7 ± 4.9 KHN であり、ピンク染部と不染部の硬さには有意差が認められた (ウェルチの t 検定、危険率 $p < 0.05$)。

【考察】

鋭利なスプーンエキスカバーターを用いて、ヒト抜去歯のう蝕象牙質を end point まで削除すると、残存象牙質の硬さは 24.1 ± 3.9 KHN (清水ら、1985 年)、 25.5 ± 7.8 VHN (Oikawa ら、2008 年) と報告されている。しかし、通常臨床では、う蝕削除の操作に種々の制約があると考えなければならない。よって、臨床における現実的な end point の硬さは、抜去歯で示された硬さ値より幾分低い 20 KHN 程度と考えるのが妥当であろう。

今回う蝕検知液の染色性を指標に不染部まで削除した場合、残存象牙質の平均硬さは 14.7 KHN であったが、これは前述の切削抵抗を目安にした場合の硬さ 20 KHN より低いことが示された。

また、ピンク染部の硬さのバラつき ($6.1 \sim 9.1$ KHN) に比べ、不染部の硬さのバラつきは大きかった ($9.8 \sim 19.6$ KHN)。これは、根面う蝕象牙質の「硬さ-深さ曲線」を見ると、う蝕表層から深部に向かって硬くなる場合もあれば、ほとんど硬くならない場合もあり、このことが不染部の硬さのバラつきの要因になったと推察される。

【まとめ】

う蝕象牙質削除の end point (終了点) の目安として、臨床では「う蝕検知液の染色性」と「スプーンエキスカバーター」の切削抵抗感 (硬さ) が重視されていることから、今回は、根面う蝕を有するヒト抜去歯を試料とし、う蝕検知液の染色性とヌープ硬さの関係を調べた。その結果ピンク染部の硬さは 7.6 ± 1.5 KHN、不染部の硬さは 14.7 ± 4.9 KHN であり、不染部はピンク染部に比べ有意に硬いことが分かった ($p < 0.05$)。

根面齲蝕の再石灰化に伴うバイオフィーム細菌叢の変化

神奈川県歯科大学 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
○ 小浦裕菜¹, 富山 潔¹, 國松雄一¹, 浜田信城², 向井義晴¹

Microbial Shift of Biofilm Associated with Remineralization of Root Dentin Lesions

¹Dep of Restorative dentistry, ²Dep of Oral Microbiology

○ KOURA Yuna¹, TOMIYAMA Kiyoshi¹, HAMADA Nobushiro², MUKAI Yoshiharu¹

【研究目的】我々は、第 157 回保存学会において、多菌種バイオフィームによる象牙質表層下脱灰病巣の形成を行なった後にバイオフィームを除去せずに再石灰化を誘導し、脱灰群と再石灰化群の細菌叢間に違いが認められたことを確認した。本研究の目的は、多菌種バイオフィームにより歯根象牙質に形成した表層下脱灰病巣に対して、歯根象牙質表面の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、さらに再度脱灰環境へ変化させた場合に生じるバイオフィーム細菌叢の変化を菌属・菌種のレベルで比較検討することである。

【材料および方法】ウシ下顎中切歯歯根より円板状試料を切り出しバイオフィーム形成用被検体とした。培養には single donor の刺激時唾液を用い、バイオフィームモデルとして Amsterdam Active Attachment Model を使用した。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スクロース添加・非添加の 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。

【実験 1: マイクロラジオグラフィーによる評価】培養終了後、象牙質試料を厚さ 300 μm に薄切し、TMR 撮影後ミネラル喪失量(IML)および病巣深度(LD)を測定した(n=6)。統計分析は Tukey の検定により行った(p<0.05)。

【実験 2: 細菌叢分析】MiSeq を用いて各サンプル由来の 16S rRNA からシーケンスデータを得て部分塩基配列を決定後、次世代シーケンス・アンプリコン解析を行なう事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。群間の比較は、主成分分析および Steel-Dwass 検定により行った(n=4)(p<0.05)。

【結果】【実験 1】cont 群では多菌種バイオフィームによる典型的な歯根象牙質脱灰病巣の形成が確認された。S(-)群は、cont 群と比較しミネラル 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、S(-)群は IML および LD ともに cont 群と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(-)群と比較して 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 *Veillonella*, S(-)群では *Gemella*, *Haemophilus*, および、S(-)de 群では *Veillonella* が最も多く検出された。*Veillonella* は 3 つの群のなかでは S(-)群で最も少なかった。菌属および菌種ともに、cont 群と他のすべての群間のバイオフィーム菌叢の統計量に有意差があり、S(-)群と S(-)de 群の菌属間にも有意差が認められた(p<0.05)。

【考察】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栄養供給を再開することにより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。再石灰化環境およびその後の再度の脱灰環境において cont 群とは異なった細菌叢が確認され、バイオフィーム中でマイクロバイアルシフトが生じていることが示された。cont 群と他の 3 群の菌属と菌種との間には統計学的に有意差が認められ、S(-)群では構成割合の多くなかった *Veillonella dispar* のような細菌が S(-)de 群で再び増加し、齲蝕原生を増加させるための一役を担っているものと考えられる。

【結論】多菌種バイオフィームを用いて形成した歯根象牙質脱灰病巣に対しての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に違いが認められた。

本研究は、神奈川県歯科大学 倫理委員会の承認を得て遂行された【研究倫理 審査番号 853】。

本研究内容およ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。

柿タンニンによる持続的抗菌効果と口腔内細菌叢の健全化

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

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³

○富山 潔¹, 渡辺清子², 浜田信城², 齋藤正寛³, 向井義晴¹

Durable antibacterial effects and soundness of oral microbiome after the treatment with persimmon tannin

¹ Dep of Restorative dentistry, ² Dep of Oral Microbiology, Kanagawa Dental University,

³ Div. of Ecological Dentistry, Dep. of Operative Dentistry, Tohoku University, Graduate school of dentistry

○ TOMIYAMA Kiyoshi¹, WATANABE Kiyoko², HAMADA Nobushiro²,

SAITO Masahiro³, MUKAI Yoshiharu¹

【研究目的】渋柿は防腐, 防水, 抗菌, 抗ウイルスなどに効果があるとされ, 古くから日本人の文化に取り入れられてきた. 柿から抽出した柿タンニンはインフルエンザやノロウイルス, O157などを不活性化するとするとの研究成果が多数, 報告されており, 最近では, 新型コロナウイルス(SARS-CoV2)を1万分の1以下に不活化することも報告されている. 今回, 我々は, 渋柿由来の縮合型タンニンを含む食品・化粧品等の原料(Pancil PS-M: リリース科学工業株式会社)が多菌種含有バイオフィルムに与える影響を分析し, クロルヘキシジン処理を行なったバイオフィルムとの比較, 検討を行なった.

【材料および方法】ポリマイクロバイアルバイオフィルム形成用材料には直径 12 mm 厚さ 150 μm のカバーガラス(Menzel, Braunschweig, Germany)を用いた. 処理剤には, 4 wt% Pancil PS-M, Corsodyl (0.2 wt% グルコン酸クロルヘキシジン, GlaxoSmithKline)および Corsodyl の4倍希釈液を用いた. 実験群は, (1) 非処理群(cont), (2) 4.0 wt% Pancil PS-M 群(P), (3) 0.2 wt% グルコン酸クロルヘキシジン群(0.2C)そして(4) 0.05 wt% グルコン酸クロルヘキシジン群(0.05C)の4群とした. ポリマイクロバイアルバイオフィルムの培養には一被験者から採取した刺激唾液を用いた. 培養液には unbuffered McBain 2005 (0.2%スクロース含有)培養液を用い, 50倍希釈となるように刺激唾液を混入した. 培養液の交換は10時間, 14時間のサイクルで行ない, 使用済み培養液の pH 測定を行った. 培養 24 時間の時点で各処理剤(P, 0.2C, 0.05C)あるいは滅菌脱イオン水(cont)に5分間浸漬後, 嫌気条件下(CO_2 :10.0%, H_2 :10.0%, N_2 :80.0%, 37°C)で48時間, 培養した. 各処理後および, その後の48時間培養後に, バイオフィルムを Cysteine Peptone Water にて洗浄して血液寒天培地に4日間培養し, 生菌数の算定を行なった(CFU/ml). 乳酸産生量の測定は, バイオフィルムが付着した円盤状ガラス試片を Bacto Peptone Water (BPW)に浸漬した後, 乳酸測定キット(日本バイオコン株式会社)を用いて, 薬液処理後および培養終了時点で行なった. 生菌数, 乳酸産生量および pH 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, 各群の比較を行なった. 細菌叢分析は, 次世代シーケンサー(MiSeq™, Illumina, USA)により各サンプル由来の 16S rRNA からシーケンスデータを得て部分塩基配列を決定後, 次世代シーケンス・アンプリコン解析を行なう事によりバイオフィルムサンプルに由来する菌群の帰属分類群を推定した.

【結果】培養液の pH 下降は, P群において最も抑制されていた. 24時間培養したバイオフィルムに薬液処理を行い, その後, バイオフィルム培養を継続した結果, すべての薬液処理群におけるバイオフィルムの生菌数(CFU/ml)は非処理群と比較して有意に低かった(cont: 7.57×10^8 , P: 1.53×10^7 , 0.05 C: 2.02×10^8 , 0.2 C: 2.03×10^7 , $p < 0.05$). とりわけ Pancil® PS-M による, 長期培養バイオフィルム形成に対する生菌数の抑制効果は, 0.2% CHX 以上であった. 乳酸産生の抑制は, 処理直後(乳酸産生減少率:P: 40.2%, 0.05C: 12.5%, 0.2C: 40.3%)および, その後の培養停止時点での乳酸産生量は, P 群および 0.2C 群が cont および 0.05 群に比較して有意に抑制されていた(P: 48.2%, 0.05C: 7.8%, 0.2C: 35.5% ($p < 0.05$))細菌叢の解析の結果, *Veillonella* 属が P 群において顕著に抑制され, 一方で, 0.05C および 0.2C では, 増加していることがわかった. 一方, *Haemophilus* 属は, P 群において増加し, 0.05C および 0.2C では, cont に比較して増加しているものの, 限定的であることがわかった.

【考察】P 群が他群よりも持続的な生菌数, 乳酸産生および pH 下降の抑制効果を示したことから, Pancil PS-M 中の縮合型タンニンは, 細菌細胞に対し長時間にわたってダメージを与え続けていると考えられた. また, 細菌叢の分析機の結果は, 特に P 群で, *Veillonella* 属が減り *Haemophilus* 属の増加が認められたことから, 病原性バイオフィルムの健全化が生じている可能性が示された.

【結論】Pancil PS-M は口腔バイオフィルムの生菌数や代謝を抑制しつつ, 病原性バイオフィルムを健全化できる可能性が示された. 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 853】.

本研究内容およ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.

歯根膜線維芽細胞に対するコンポジットレジンの細胞毒性の検討

¹徳島大学大学院医歯薬学研究部 再生歯科治療学分野, ²徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔生命科学分野,

³東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔制御学分野, ⁴徳大ポスト LED フォトニクス研究所

○椋 由理子¹, 工藤 保誠², 伊田 百美香¹, 米倉 和秀^{1,4}, 中島 正俊^{1,3}, 保坂 啓一^{1,4}

Cytotoxicity of Different Resin Composites on Periodontal Ligament Fibroblasts

¹Department of Regenerative Dental Medicine, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences,

²Department of Oral Bioscience, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences,

³Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University

⁴Institute of Post-LED Photonics, Tokushima University

○Yuriko Mukunoki¹, Yasuei Kudo², Yumika Ida¹, Kazuhide Yonekura¹, Masatoshi Nakajima^{1,3}, Keiichi Hosaka^{1,4}

【緒言】

近年の高齢化の進行により根面う蝕の有病率が増え、う窩が歯肉縁下に及ぶ症例に遭遇することも少なくない。S-PRG (Surface pre-reacted glass-ionomer) フィラー含有コンポジットレジンには、フッ化物、ストロンチウム、ホウ酸、ケイ酸、アルミニウム、ナトリウムなどのマルチイオンリリースによる抗プラーク付着性や酸中和能などをもつため、根面う蝕の処置にも有用であるとされている。一方で、S-PRG フィラーからのマルチイオン溶出液を用いたヒト歯肉線維芽細胞 (Human gingival fibroblasts, HGF) への細胞増殖試験では、イオン濃度と細胞毒性との関連性が報告されている。しかしながら、S-PRG フィラー含有コンポジットレジン硬化体を用いて細胞毒性を検討した報告は少ない。本研究の目的は、歯肉縁下に存在する代表的な細胞である歯根膜線維芽細胞を用いて、S-PRG フィラー含有コンポジットレジンの細胞毒性について、非含有コンポジットレジンの細胞毒性と比較・検討することである。

【材料と方法】

本研究では、SPRG フィラー含有コンポジットレジンとして、ビューティフィルIILS (A2, BFLS: 松風)、ビューティーフィルフロープラス (A2, BFF: 松風)、SPRG フィラー非含有コンポジットレジンとして、ライトフィルIIA (A2, LFA: 松風) を用いた。ディスク状コンポジットレジン硬化体試料の作製は ISO10993-5 に準じて行った。(光照射器条件: pencure2000 (モリタ) ノーマルモード 1150mW/cm², 照射時間は表裏それぞれ 15 秒ずつ計 30 秒)。ただし、試料サイズについては、3種類 (L: 直径 6.5 mm・厚み 1.5 mm, M: 直径 2.0 mm・厚み 1.5 mm, S: 直径 1.5 mm・厚み 0.5 mm) を用意した。細胞毒性試験は、細胞はヒト不死化歯根膜線維芽細胞 (hPDL) を用いて、セルカルチャーインサートを用いた間接接触法により行い、培養 48 時間から 72 時間後にセルカウンター (コールター社) により生存細胞数を計測し、統計分析は One-way ANOVA により有意水準は 5% として統計処理を行った。

【結果および考察】

サイズL試料では、全てのコンポジットレジン硬化体に細胞毒性が認められ、BFLSとBFFはいずれもLFAに比べて、有意に高い細胞毒性が認められた。サイズM試料では、BFLSとBFFはサイズL試料と比較して細胞毒性は低く、LFAには細胞毒性は見られなかった。一方、サイズS試料では、全てのコンポジットレジン硬化体において細胞毒性は認められなかった。このことにより、S-PRGフィラーの有無に関わらず、hPDLに対する細胞毒性が存在することが明らかになり、S-PRGフィラー含有コンポジットレジンで高かった。また、S-PRGフィラーから培養液中にリリースされるマルチイオンとその濃度に影響を受けることが示唆された。

【結論】

本研究条件では、hPDL に対する細胞毒性が、コンポジットレジン硬化体における BFLS、BFF に特徴的な S-PRG フィラー含有コンポジットレジン硬化体の試料サイズによって影響を受けることがわかった。今後、コンポジットレジンから培養液中にリリースされた各種イオンの種類とその濃度が hPDL に対する影響について詳細な検討が必要である。

【謝辞】

本研究は、徳島大学研究クラスター (2202006) の支援により行われた

ユニバーサルアドヒーズの保管条件が 象牙質初期接着強さに及ぼす影響

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⁾
○若松賢吾¹⁾, 陸田明智^{1,2)}, 庄司元音¹⁾, 林 佳奈¹⁾, 高見澤俊樹^{1,2)}, 宮崎真至^{1,2)}, 岩崎圭祐³⁾

Influence of Storage Condition of Universal Adhesives on Immediate Dentin Bond Strength

Department of Operative Dentistry¹⁾, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²⁾,

Nihon University School of Dentistry, Iwasaki Dental Clinic³⁾

○WAKAMATSU Kengo¹⁾, RIKUTA Akitomo^{1,2)}, SHOJI Mone¹⁾,

HAYASHI Kana¹⁾, TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2)}, MIYAZAKI Masashi^{1,2)}, IWASAKI Keisuke³⁾

【研究目的】

ユニバーサルアドヒーズは、シングルステップセルフエッチング接着システムから発展した接着システムであり、簡便な臨床術式とともに、いずれのエッチングモードでも使用が可能である。この接着システムは、歯質の脱灰、レジンモノマーの浸透および歯質との化学的接着を同時に行うとともに、ボンディング材として重合硬化する必要がある。したがって、ユニバーサルアドヒーズの組成は複雑であるが、保管環境によってはユニバーサルアドヒーズの接着性能に影響を及ぼす可能性があるものの、これに関する情報は少ない。

そこで演者らは、保管温度および保管期間の違いがユニバーサルアドヒーズの象牙質接着性に及ぼす影響について剪断接着試験および試験終了時の破壊形式の分析から検討した。また、ユニバーサルアドヒーズの pH 測定、処理面および接着界面の走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察を行い、考察資料とした。

【材料および方法】

供試したユニバーサルアドヒーズは、All Bond Universal (Bisco), Beauti Bond Extreme (松風), Clearfil Universal Bond Quick ER (Kuraray Noritake Dental)および Scotchbond Universal Plus Adhesive (3M Oral Care)とした。アドヒーズの保管に関しては、インキュベーター保管 (37 ± 1°C, 50 ± % RH, Ozone espec temp and chambers-220, ICB 条件), 恒温恒湿室保管 (23 ± 1°C, 50 ± 5% RH, CTR 条件) および冷蔵庫保管 (5 ± 1°C, TRF 条件) の3条件とした。保管期間については、ベースライン, 6および12カ月とした。接着試験用試験片の被着体として、ウシ下顎前歯の歯冠部象牙質を用いた。接着試験に際しては、所定の保管期間が終了したユニバーサルアドヒーズを異なるエッチングモードで用いた。すなわち、アドヒーズの塗布に先立って、被着象牙質面に対してリン酸エッチングを行った条件 (ER モード) およびリン酸エッチングを行わない条件 (SE モード) とした。アドヒーズの塗布に際しては、各製造者指示条件に従って塗布、光照射した。その後、塗布面に内径 2.4 mm および高さ 2.5 mm のプラスチック型を用いてコンポジットレジンを填塞、光照射を行い、接着試験用試片とした。これらの試片は、24時間水中に保管した後、剪断接着強さを測定した。試験終了後の破断試片については、実体顕微鏡を用いて破断面を観察した。また、それぞれの保管条件でのユニバーサルアドヒーズの pH 変化を pH meter (LAQUAtwin-pH-33, Horiba) を用いて測定するとともにアドヒーズ処理面および接着界面の SEM 観察を行った。

【成績および考察】

いずれのエッチングモードにおいても保管条件、保管期間および種類の違いは、ユニバーサルアドヒーズの象牙質接着強さへの有意な影響因子であった。とくに、ICB 条件および CTR 条件はいずれのユニバーサルアドヒーズおよびエッチングモードにおいても保管期間の延長に伴って象牙質接着強さは低下する傾向を示し、保管期間1年ではいずれのエッチングモードおよびユニバーサルアドヒーズにおいて ICB 条件は TRF 条件に比較して有意に低い接着強さを示した。

【結論】

供試したユニバーサルアドヒーズの象牙質への接着性能は、エッチングモードの違いにかかわらず保管条件および保管期間によって影響を受けることが判明した。

新規ワンステップユニバーサルボンドの象牙質接着性と吸水性および機械的強度の評価

1. 徳島大学大学院 医歯薬総合研究部 再生歯科治療学分野
2. 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 口腔機能再建工学
3. 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 う蝕制御学分野
4. 徳島大学ポスト LED フォトニクス研究所

○松木優承¹, 伊田百美香¹, 井内智貴¹, 内海雄太¹, 米倉和秀^{1,4}, 池田正臣², 中島正俊^{1,3}, 保坂啓一^{1,4}

Evaluation of microtensile bond strength, water absorption and mechanical strength of a newly developed one-step universal bonding

¹Department of Regenerative Dental Medicine, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences

²Department of Oral Prosthetic Engineering, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

³Cariology and Operative Dentistry, Department of Restorative Science, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

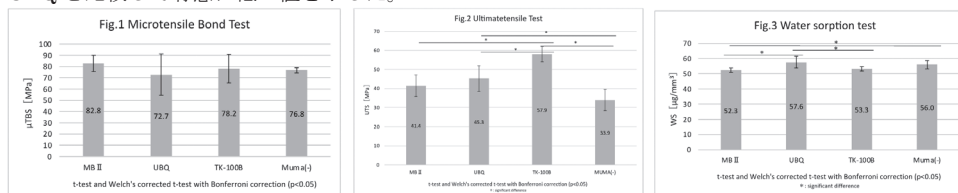
⁴Institute of Post-LED Photonics, Tokushima University

○Yusuke Matsuki¹, Yumika Ida¹, Tomoki Iuchi¹, Yuta Utsumi¹, Kazuhide Yonekura^{1,4}, Masaomi Ikeda², Masatoshi Nakajima^{1,3}, Keiichi Hosaka^{1,4}

【緒言】 近年、歯科用接着システムとしてユニバーサルシステムが登場し、日常臨床で多く用いられている。そのボンディング材に無機質フィラーが付与されると、機械的強度向上によりボンド層における接着破壊を防止する効果が期待できる反面、ボンド層の厚みが増加し、直接法修復においてはマージンラインが出現しやすくなり術後の審美性の低下に繋がる可能性がある。クラレノリタケデンタル社より新規開発されたワンステップユニバーサルボンド TK-100B は、フィラーを含有し、かつ薄膜のボンド層を有することを特長としている。TK-100B は、新規多官能ウレタン系メタクリルモノマー (Multi-functional urethane methacrylate; MUMA) を含有し、本モノマー導入により硬化時に架橋点を増加させ、機械的強度を向上させることが期待される。そこで本研究では、TK-100B の象牙質に対する初期微小引張り接着強さ (μ TBS) ならびに溶媒除去後のボンド硬化体の引張り強さ (UTS) と吸水率 (WS) について検討した。

【材料と方法】 本実験には TK-100B に加え、2 ステップセルフエッチングシステムであるクリアフィルメガボンド 2(MB2)、1 ステップユニバーサルボンドであるクリアフィルユニバーサルボンド Quick ER (UBQ)、TK-100B から MUMA を除去した試作システム(MUMA (-))(クラレノリタケデンタル)を使用した。ヒト健全抜去大白歯に対して歯冠象牙質平坦面を作製後、#600 の耐水研磨紙で研削し被着面とした。業者指示通りに接着操作を行った後に、同社製クリアフィル AP-X を築盛した。37°C水中に 24 時間浸漬後に微小引張り接着試験を行い μ TBS を計測した。また、あらかじめ用意したシリコンモールドに溶媒除去処理、脱泡処理を施したボンディング材を注入し光重合させ、UTS 測定用ビーム状ボンド硬化体、および WS 測定用ディスク状ボンド硬化体を作製した。WS は ISO4049 に準拠して吸水試験を行い、UTS は試料作製より 24 時間乾燥条件に保管しマイクロテンスイル法を用いて測定した。データは t-test と Welch 補正の t-test にて検定し、有意確率は Bonferroni の方法にて補正した。なお光照射器は Pencure2000 (モリタ) を使用した。(徳島大学倫理審査委員会承認番号:329-9)

【結果】 μ TBS において、各材料間に統計学的有意差は認められなかった。TK-100B は、UBQ と比較して有意に低い WS 値を示した。UTS の結果から、TK-100B は他の 3 種より有意に高い UTS 値を示し、MUMA (-)は TK-100B、UBQ と比較して有意に低い値を示した。



【考察】 TK-100B は MB2 と UBQ と比較し μ TBS の有意差が認められなかったことから、ボンド層の薄膜化が接着強さへ影響を及ぼさなかったと考えられる。WS の結果では MUMA 含有の有無に関して有意差は認められなかったが、TK-100B は UBQ より吸水率が低く長期耐久性に影響を及ぼしにくいことが示唆された。また、UTS の結果から、薄膜化した TK-100B は、MUMA を含有することでボンドの強度が向上し、耐久性に優れる可能性がある接着界面層の形成ができるものと考えられた。

【結論】 MUMA 含有によりボンドの強度向上が認められた。また、MUMA の含有によらず象牙質接着強さは MB2 および UBQ と同等であり、吸水率に MB2 と同等であった。

【謝辞】 試作の TK-100B を提供していただいたクラレノリタケデンタル株式会社に感謝申し上げる。また、本研究は徳島大学研究クラスターの支援にて行われた。(クラスター番号:2202006)

新規自己接着性コンポジットレジンの接着性評価

朝日大学歯学部 口腔機能修復学講座 歯科保存学分野 歯冠修復学

○清水翔二郎, 高垣智博, 二階堂 徹

Dentin Bonding Performance of New Self-adhesive Resin Composite

Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation,

School of Dentistry, Asahi University

○Shojiro Shimizu, Tomohiro Takagaki, Toru Nikaido

【目的】

近年、歯科用接着材料の開発・進化により、接着システムの操作時間の短縮や簡略化が進んでおり、臨床では1ステップセルフエッチングシステムが広く普及しつつある。さらなる簡略化をめざし、歯面処理の手順を省略した自己接着性コンポジットレジンも登場しているが、臨床での適応範囲は限られるのが現状である。

本研究では新規自己接着性コンポジットレジンレジン(の象牙質初期接着性について微小引張り接着試験を用いて評価した。

【材料および方法】

ウシ下顎前歯を解剖学的歯頸線で切断し、耐水研磨紙#600で研削して象牙質平坦面を作製した。接着材料として、①1ステップセルフエッチングシステム(ユニバーサルボンド Quick ER, UBQ)とコンポジットレジン(クリアフィル AP-X, クラレノリタケデンタル)、②新規自己接着コンポジットレジンレジン(SA-100R, SAR, クラレノリタケデンタル)、③市販自己接着性コンポジットレジンレジン(Constic, CON, DMG)の3種類を使用した。接着方法は各製造業者の指示通りに操作し、LED光照射器(ペンキュア 2000, 1200 mW/cm², モリタ)を用いて光照射を行った。試料は37°Cで24時間水中保管後、硬組織精密切断機(Isomet, Buehler)にて、1.0 mm × 1.0 mmのビーム状試料を作製した。得られた試料は、小型卓上試験機(EZ-SX, SHIMADZU)を用いて、クロスヘッドスピード 1.0 mm/minで微小引張り接着試験(μ TBS)を行った。得られたデータの統計処理は、一元配置分散分析(one-way ANOVA)およびBonferroni法($p < 0.05$)を用いた(n=20)。

【結果および考察】

各群の μ TBS (MPa)の平均値±標準偏差(最大値-最小値)は、UBQ+AP-X: 47.0±10.5 (28.8-64.6), SAR: 28.8±9.3 (11.9-44.4), CON: 19.7±8.2 (6.5-37.7)であった。UBQ+AP-XはSARおよびCONと比較して有意に高い値を示した($p < 0.05$)。一方、SARはCONより有意に高い値を示した($p < 0.05$)。また、UBQ+AP-X, SARにおいてはすべての試料の計測が可能であったが、CONにおいては試料作製中の破断が多数ありSurvival Rateは20%であった。SARがCONと比較して象牙質接着性が向上した理由として、SARに含まれるアミド型モノマーにより、CONと比較して歯質浸透性の向上によって接着強さが上昇したためと考えられる。

【結論】

新規自己接着性コンポジットレジン(SAR)は、1ステップセルフエッチングシステム(UBQ+AP-X)に比べて接着強さは低いものの、市販自己接着性コンポジットレジン(CON)よりも高い象牙質接着性能を示した。このことから自己接着性コンポジットレジン(は、訪問診療などの新たな用途への活用の可能性が期待される材料である。

新規 1 ステップ接着システムのレジンコーティング法における評価

1 東京医科歯科大学大学院 歯学総合研究科 歯制御学分野
2 東京医科歯科大学病院 歯科総合診療科

○高橋礼奈¹, 金森ゆうな², 高野隼輔¹, 品川淳一¹, 湊 洋祐¹, 高橋 基¹, 津田優香¹, 島田康史¹

Evaluation of a novel one-step bonding system on resin coating technique

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

2 Oral Diagnosis and General Dentistry, Tokyo Medical and Dental University Hospital

○Rena TAKAHASHI¹, Yuna KANAMORI², Shunsuke TAKANO¹, Junichi SHINAGAWA, Yosuke MINATO, Motoi TAKAHASHI¹, Yuka TSUDA¹, Yasushi SHIMADA²

【研究目的】

レジンコーティング法は歯髄保護だけでなく、レジンセメントの象牙質に対する接着強さを向上させることが知られている。本研究では、新規 1 ステップ接着システムをレジンコーティング材として用いた場合、セルフアドヒーシブレジンセメントの象牙質に対する接着強さについて検討を行った。

【方法】

120 本のヒト健全抜去大白歯の象牙質を注水下にて露出させ、アクリル製リング内に常温重合レジンを用いて歯軸方向に包埋し、600 番の耐水研磨紙で研削し、被着面を 3mm に規定した。試料をレジンコーティングにより 4 群 (レジンコーティングなし: Non-coat 群, TK-100B (クラレノリタケデンタル): TK-100B 群, ハイブリッドコート II (サンメディカル): HYC 群, クリアフィルメガボンド 2 (クラレノリタケデンタル): MB2 群) に分けた。レジンコーティングを施した試料は、コーティング表層をアルコール綿球にて清拭し未重合層を除去した。その後、前述の 4 群をさらに immediate 群と 1 week 群に分けた。immediate 群は、象牙質面またはレジンコーティング面に直径 3mm の SUS チップを SA ルーティング Multi (クラレノリタケデンタル) を用いて接着した。1 week 群では、あらかじめ用意した常温重合レジンブロックをハイボンドテンポラリーソフト (松風) を用いて仮着し 37°C 水中に保管した。1 週間後に、仮着材を回転ブラシを用いて除去し、immediate 群と同様に SUS チップを SA ルーティング Multi を用いて接着した。37°C 24 時間水中保管後、万能試験機によりクロスヘッドスピード 1mm/分で剪断接着試験を行った。得られた値は、有意水準 5% にて、統計処理を行った。なお、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を得ている (D2013-022)。

【結果・考察】

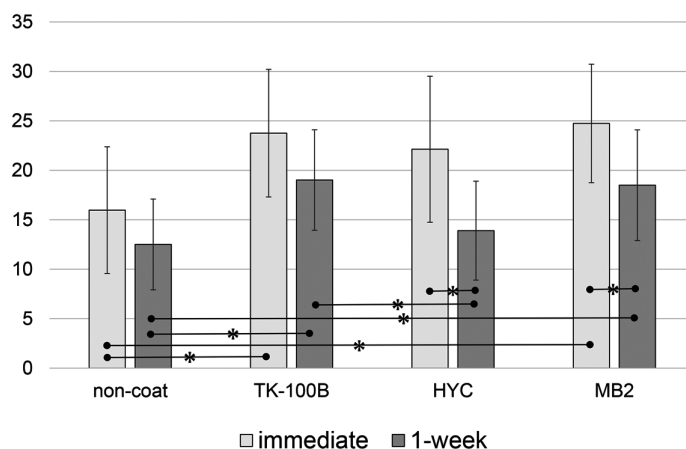
剪断接着試験の結果を Fig. 1 に示す。

二元配置分散分析の結果より、剪断接着強さに対してレジンコーティング、時間の主効果は有意であり ($p < 0.05$)、二要因間の交互作用は認められなかった ($p > 0.05$)。immediate 群および 1-week 群では、TK-100B および MB2 が non-coat と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。さらに、1-week 群では、TK-100B が HYC と比較して有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。同じレジンコーティングでは、non-coat および TK-100B では、immediate 群と 1-week 群に有意差は認められなかった ($p > 0.05$)。1-week 群では、レジンコーティング材の吸水と仮着材が剪断接着強さに影響を与える可能性がある。

【結論】

新規 1 ステップ接着システムをレジンコーティング材として用いた場合、セルフアドヒーシブレジンセメントの象牙質に対する接着強さは向上する。

Fig.1 Shear bond strength results Pa



* indicates statistically different.

レジン系材料を用いた直接ならびに CAD/CAM 修復の 象牙質窩壁前処理に対する量的質的接着評価

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座
○杉山 怜央, 柵木 寿男

Quantitative and qualitative bonding evaluations for the dentin cavity wall pretreatments of direct and CAD/CAM restorations using resin composite restoratives

Department of Adhesive Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University
○SUGIYAMA Reo, MASEKI Toshio

【目的】 修復の種類にかかわらず、窩壁の性状は臨床的予後を左右する要因となっている。特に接着修復においては象牙質窩壁の性状によって修復内部の接着に異なる挙動が生じると考える。本研究では、レジン系材料を用いた直接ならびに CAD/CAM 修復の象牙質窩壁前処理による効果を明らかにすることを目的に、化学的・機械的 2 種の前処理を施した試料における窩底部象牙質面の微小引張接着強さ (μ -TBS) を測定し、量的質的な評価を行った。

【材料および方法】 本学部倫理審査委員会の承認 (NDU-T2022-31) を得たヒト抜去健全下顎大臼歯 36 本を規格化植立後に、直接修復群 (DRR) と CAD/CAM 修復群 (CCR) に二分した。ついで、複製窩洞形成器を用いて全試料に規格化 MOD 窩洞を形成した。これらを 0.5M EDTA pH8.0 溶液 (武藤化学) による 60 秒間の化学的前処理を行った群 (C)、グリシンパウダー: Q - Powder G Extra Fine (YOSHIDA) を歯面清掃器具: QUICK JET M (YOSHIDA) を用いて噴射する 60 秒間の機械的前処理を行った群 (M) および象牙質窩壁非前処理群 (N; 対照) の 3 群に分けた。その後、DRR ではオールインワンアドヒーズシステム: Prime&Bond universal (Dentsply Sirona) による歯面処理後に、フロアブルコンポジットレジン: Neo Spectra ST Flow (Dentsply Sirona)、ユニバーサルコンポジットレジン: ceram.X Sphere TEC one (Dentsply Sirona) および事前採得しておいた咬合面形態ステント併用による 3 層分割積層法と各層への光照射によって修復した。一方、CCR では、Neo Spectra ST Flow を併用した Prime&Bond universal による即時象牙質シーリングを経て、歯科用 CAD/CAM システム: CEREC Primescan AC / Primemill (Dentsply Sirona) によるスキャニングを行い、事前採得しておいた歯冠形態データ活用による修復物設計、レジンプロック: Cerasmart 300 (GC) のミリングを経て CAD/CAM レジンインレーを作製した。ついで、接着性レジンセメント: Calibra Ceram (Dentsply Sirona) による修復物の装着を行った。全試料は 37°C 水中 24 時間の保管を経て、頬舌的に 4 回、近遠心的に 2 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 3 片を得て、C.H.S. 1.0 mm/min 下の μ -TBS 値 (n=18) を測定した。また、測定後の全試料破断面は、光学顕微鏡 200 倍にて観察した。さらに、前処理を施した象牙質面の観察を走査電子顕微鏡 (SEM) で行った。得られた値は一元配置分散分析、Tukey の HSD 検定によって量的評価を、メジアンランク法による Weibull 分析によって質的評価を行った。

【成績と考察】 量的評価としての 3 種前処理条件間における直接ならびに CAD/CAM 修復の平均 μ -TBS 値の違いを Fig. 1 に、質的評価としての Weibull パラメーターの違いを Fig. 2 に示す。平均 μ -TBS 値は修復方法にかかわらず N < C ≤ M を示した。したがって C・M では、接着強さ獲得に適した象牙質への改質が得られたものと考えられ、主たる要因は、前処理象牙質面の SEM 像からスミヤー層除去によることが示唆された。一方、質的評価のパラメーターである、Weibull 係数 (Wm) / 累積破壊確率 10% 推定応力値 (PF10) は、DRR では C < M < N / N ≤ C < M を、CCR においては C ≤ M ≤ N / N < C ≤ M を示し、これら前処理は堅固な修復に有益であると推測できた。また測定後の歯質側破断面は、修復方法にかかわらず混合破壊が主体であり、特に C・M では、象牙質/レジン間界面破壊を含む破断面試料数が、N と比較して減少していた。良好な臨床的予後を得るためには、量的指標である μ -TBS 値と質的指標である Wm / PF10 の調和が求められると考えられ、したがって本実験の総合的評価としては、象牙質窩壁へのグリシンパウダー噴射による機械的前処理が修復内部の接着に最も有用であると認められた。

【結論】 本実験の象牙質窩壁前処理は、レジン系材料を用いた直接ならびに CAD/CAM 修復の窩底部象牙質面接着を量的に向上させた。特にグリシンパウダー噴射による機械的前処理は量的質的な向上効果を有していた。

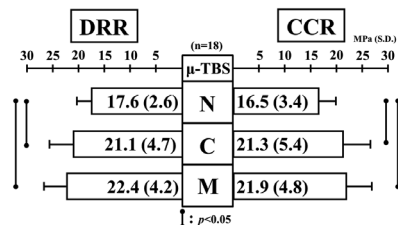


Fig. 1 Differences in mean μ -TBS of direct and CAD/CAM restorations among three types of pretreatment condition

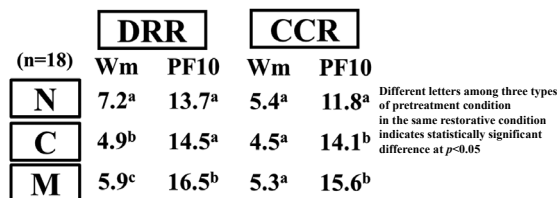


Fig. 2 Differences in Weibull parameters of direct and CAD/CAM restorations among three types of pretreatment condition

根管シーラーのぬれ性と流動性が根管封鎖性に及ぼす影響

¹岩手医科大学歯学部歯学研究科 歯科保存学講座 歯治療学分野

²岩手医科大学歯学部 医療工学講座

○相上雄亮¹, 清水峻介¹, 浅野明子¹, 武本真治², 野田 守¹

Influence of wettability and flowability of endodontic sealers on sealing ability of root canal

¹Division of Operative Dentistry and Endodontics, Department of
Conservative Dentistry, School of Dentistry, Iwate Medical University

²Department of Biomedical Engineering, Iwate Medical University

○Yusuke Aigami¹, Shunsuke Shimizu¹, Akiko Asano¹, Shinji Takemoto², Mamoru Noda¹

[目的]

歯内療法における根管充填は、根管の緊密な封鎖による再感染リスクの低減が大きな目的の一つである。根管充填では固形のガッターチャポイント (GP) と、糊材の根管シーラーが併用されることが多い。近年、ロータリーファイルを利用した再現性に優れた根管形成が可能となり、メインポイントとしての GP と根管シーラーを用いたシングルポイント法による根管充填が普及している。一方、根管シーラーは従来より用いられている無機系シーラー (ユージノール系および非ユージノール系) に加え、歯質接着性のレジン系シーラーも普及している。我々はこれまでウシ歯根を用い、根管充填材の封鎖性について、トルイジンブルー水溶液の浸透性をデジタル画像技術により可視数値化して評価検討を行ってきた [1]。その結果、GP への色素浸透は認められないが、一部の根管シーラーや根管象牙質に色素浸透が認められた。そこで本研究では、根管シーラーの蒸留水とのぬれ性ならびに根管シーラーの流動性が根管封鎖性に及ぼす影響を検討した。

[材料と方法]

根管シーラーは3種類の無機系シーラー (Canals (CAN : GC), ニシカチャンネルシーラーN (CSN) およびニシカチャンネルシーラーBG (CBG) (いずれも日本歯科薬品)) と3種類のレジン系シーラー (AH Plus jet (AHP : Dentsply Sirona), メタシール soft (MET) およびメタシール soft ペースト (MSP) (いずれもサンメディカル)) を用いた。メーカー指示に従って練和後、ガラス管 (内径 4 mm) に充填し、37°Cの湿潤環境に3分間または24時間静置した。各設定期間の静置後、蒸留水に対する接触角を $\theta/2$ 法で計測した (FACE 接触角計 CA-D 型, 協和界面科学, 各シーラーで n=6)。参考試料として、加熱圧接し平面とした GP および研磨根管象牙質平面 (耐水研磨紙, #2000) を作製し、同様に接触角を測定した。

根管シーラーの流動性は稠度 (拡がり直径) を測定することにより評価した。各根管シーラーを練和し、室温下 (室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 平均湿度 45%) でシリンジ (TERUMO) に $0.050 \pm 0.005\text{mL}$ を注入した。練和開始 180 ± 5 秒後に練和泥をガラス板 (40mm×40mm) 上に押し出し、上から同様のガラス板を置き 100g の錘を載せた。練和開始から 10 分後に錘を除き、拡がったシーラーの最大径および最小径を測定し、その平均値を拡がり直径とした (N=6)。統計解析は、一元配置分散分析 (ANOVA) ならびに Tukey の多重比較検定を行った ($\alpha=0.05$)。

[結果]

練和 3 分後および 24 時間後の蒸留水に対する根管シーラーの接触角は、MET と MSP では 5 度以下のため計測不能であった。一方で、CAN, CSN, CBG および AHP は GP の接触角 (98 ± 4 度) よりも象牙質 (59 ± 2 度) に近い値であった。練和開始から 24 時間後の根管シーラーの接触角は、MET と MSP は変わらなかったが、その他はいずれも増加した。

根管シーラーの拡がり直径は 21.0~26.9 mm の範囲であり、CAN が最も大きく平均で 25.9 mm, CSN が最小で 22.0 mm であった。CSN は CAN, CBG および AHP との間に、MSP は CAN との間に有意差を認めた ($p<0.05$)。

[考察]

練和開始 3 分後の根管シーラーは象牙質の接触角に近いことから、歯質とのなじみは優れていると考える。一方で、JIS[2]で根管シーラーの稠度は 17 mm 以上であると規定され、いずれも規格を満たしていた。しかし、CSN と MSP はペーストタイプであり粉液タイプのシーラーと比較して流動性が低い傾向にあった。したがって、根管封鎖性には根管シーラーの練和前の状態 (粉液, ペースト) も考慮する必要があると考える。

[参考文献]

[1] 第 158 回歯科保存学会学術講演会抄録 pp112 : 2023, [2] JIS T6522 : 2015 歯科用根管充填シーラー

ヒト抜去歯に充填したレジン系根管充填用シーラーの寸法変化に 歯根周囲の湿潤環境が及ぼす影響

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座

○古田賢太郎 三枝慶祐 関谷美貴 西田太郎 前田宗宏 五十嵐勝

Effect of Wet Environments around the Root on Dimensional Changes of Resin-based Root Canal Sealers Filled into Human Extracted Tooth

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

○Kentaro Furuta, Keisuke Saigusa, Miki Sekiya, Taro Nishida, Munehiro Maeda, Masaru Igarashi

【緒言】根管治療の成功には緊密な根管充填が必要とされ、従来からガッタパーチャポイントと根管充填用シーラー（以下：シーラー）を併用した加圧根管充填法が行われてきた。近年、根管壁接着性を有するレジン系シーラーや、膨張性を有するシーラーを併用することで、積極的な加圧を行わない考え方がみられるが、いずれの方法でもシーラーの寸法変化の把握が重要である。シーラーの寸法変化に関する先人の研究を渉猟すると、多くの研究は金属筒にシーラーを填入し硬化後に水中浸漬して変化量を測定しており、ヒト抜去歯を用いて口腔内環境を模した湿潤環境下で填入直後から測定を行った報告は見られない。本研究の目的は、ヒト抜去歯に充填したレジン系根管充填用シーラー硬化時の寸法変化に、歯根周囲の湿潤環境が及ぼす影響を明らかにすることである。

【材料と方法】実験には当講座で収集し4°Cの生理食塩水中に保管したヒト健全抜去智歯の中から、歯根癒合のある単根歯を24本使用した（日本歯科大学倫理委員会承認番号NDU-T2021-53）。根尖から3.0mmと8.0mmの位置で歯根軸に垂直な切断ができるよう低速精密切断機（アイソメットLS, BUEHLER）に抜去歯を固定した。切断後に得られた長さ5.0mmの歯根を、当講座開発の規格窩洞形成装置（日本メック）に歯冠側を上方にして設置し、5倍速コントラアングル（Z95L, ナカニシ）に装着した直径3mmのフレーム型ダイヤモンドバー（P17, ジーシー）を用いて、根管に沿って直径3.0mm深さ5.0mmの円筒形根管窩洞を形成した。作製した試料をシャーレ底面に接着剤を用いて固定し、再度4°Cの生理食塩水中に保管した。被験シーラーには、メタクリレートレジン系（メタシール Soft ペースト, サンメディカル, 以下: MR）、エポキシレジン系（AH プラスジェット, Dentsply Sirona, 以下: ER）の2種類を使用した。実験群は、シーラー充填後の歯根周囲の水分の有無から、MRの水浸漬群（MR-w）と乾燥群（MR-d）、ERの水浸漬群（ER-w）と乾燥群（ER-d）の4群（n=6）とした。充填操作前に、超音波発生装置（Varios 2, ナカニシ）による超音波振動を併用の上、根管窩洞内を3%NaClO溶液（クロルシッドJ, ウルトラデント）1.0ml、18%EDTA溶液（ウルトラデント EDTA18%, ウルトラデント）1.0ml、3%NaClO溶液1.0mlの順で各1分間作用させ、最後に生理食塩水1.0mlで洗浄し、綿球で窩洞内を乾燥した。次いでシーラーを練和し、エンドノズル（サンメディカル）を用いて窩洞内に充填を行い、余剰シーラーはスライドガラスで摺り切った。その後MR-wとER-wには、生理食塩水を試料上面を覆わない高さまでシャーレ内の歯根周囲に注入した。測定は、当講座開発の測定装置（日本メック）に組み込んだCMOSレーザーアプリセンサ（IL-S025, キーエンス）を用いた。照射レーザーが試料のシーラー表面に垂直となるよう位置付け、垂直方向の寸法変化を填入直後から48時間後まで測定した。尚、測定及び保管は37°Cの恒温器内で行った。各測定値と填入直後の値との差から垂直方向の寸法変化量を算出し、統計処理ソフト（SPSS Statistics version 28, IBM）を用いてKruskal-Wallis検定にて有意水準5%で多重比較を行った。

【結果】MR-wとER-wでは膨張を認め、MR-dとER-dでは収縮を認めた。統計解析より全測定時間において、MR-wとMR-d間、ER-wとER-d間に有意差を認めた。また、1.5時間後以降の測定時間においてMR-wとER-wに有意差を認めなかった。

【考察】メタクリレートレジン系シーラー（メタシール Soft ペースト）、エポキシレジン系シーラー（AH プラスジェット）の填入直後から硬化後までの寸法変化には、歯根周囲に由来する水分が歯根象牙質を通過して影響を与えたと考えられる。また、両シーラーの湿潤環境下における微膨張性が示唆された。今後はシーラー種の追加など、より詳細な検討を行う予定である。

***Fusobacterium nucleatum* が宿主免疫細胞の非標準的インフラマソームに与える影響**

¹大阪大学大学院歯学研究科 歯科保存学講座
○森田 真吉¹、大嶋 淳¹、阿部 翔太郎¹、田中 伸武¹、林 美加子¹

Effect of *Fusobacterium nucleatum* on the non-canonical inflammasome of host immune cells.

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry,
○Masayoshi MORITA¹, Jun OHSHIMA¹, Shoutaro ABE¹, Nobutake TANAKA¹, Mikako HAYASHI¹

【緒言】

口腔内には辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎などの感染症が存在し、その一因として *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) の関与が示唆されている。本菌は口腔内感染症のみならず、大腸がんや早産など全身疾患との関連が多数報告されており、その病原性の解明が急務である。*F. nucleatum* が引き起こす炎症惹起メカニズムについてはいくつか報告があるものの、詳細な検討まで行われているものは少ない。そこで本研究では、根尖性および辺縁性歯周炎に対する新規創薬や治療戦略の創成を念頭に、*F. nucleatum* 感染時の免疫細胞応答、とくに IL-1 β の放出経路であるインフラマソームに注目し感染時の宿主病原体相互作用について検討を加えた。

【研究方法と結果】

1. *F. nucleatum* 感染における宿主免疫細胞の遺伝子発現挙動解析

自然免疫の最前線で働く活性化マクロファージにおいて *F. nucleatum* 感染による遺伝子発現挙動を網羅的に把握するため、ヒトマクロファージ株 (THP-1) に *F. nucleatum* ATCC23726 株、比較として同じく歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) ATCC33277 株を感染させ、24 時間後の mRNA を精製して RNA シークエンス解析を行った。その結果、*F. nucleatum* 感染時には、*P. gingivalis* と比較して特に上昇する遺伝子群が存在し、炎症関連のサイトカインやケモカインが多数確認できた。

2. 発現上昇遺伝子に関する定量的解析

1 と同一条件で感染させた THP-1 について、RNA シークエンスで上昇が認められた遺伝子の発現変動を定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) で追加検証を行ったところ、IL-1 β 、TNF α 、CXCL2、IL-8 といった炎症関連遺伝子の発現上昇を確認することができた。破骨細胞に作用し、強い骨吸収活性をもつ IL-1 β に関しては感染時、実際に放出されているタンパク量について ELISA を用いて定量した。*P. gingivalis* 感染時と比較して *F. nucleatum* 感染時には顕著な IL-1 β 放出が認められ、インターフェロン γ で活性化したマクロファージではその放出が増強されることが明らかとなった。

3. IL-1 β 放出に関する因子の探索

インターフェロン γ であらかじめ刺激した細胞に *F. nucleatum* を感染させた場合、IL-1 β の放出がより増強されていたため、インターフェロン γ で誘導されるタンパク質群に注目した。その中の一つである GBP は寄生虫や細胞内寄生細菌に対する感染防御に重要とされており、かつグラム陰性菌感染時に働く非標準的インフラマソームに関連するという報告もある。そこで GBP を欠損させたマクロファージに対して *F. nucleatum* の感染実験を行うと、IL-1 β の放出が有意に抑制された。また、*F. nucleatum* を Fluorescein isothiocyanate isomer-I (FITC) で標識後、THP-1 に感染させ、抗 GBP 抗体で蛍光免疫染色を行うと、細胞内に存在する *F. nucleatum* の一部に GBP の集積が認められた。

【結論および考察】

本研究の結果より、*F. nucleatum* は宿主免疫細胞感染時に IL-1 β を含む多数の炎症関連遺伝子の発現上昇を誘導すること、IL-1 β の放出には非標準的インフラマソームが重要な役割を果たす可能性が示唆された。この研究により、*F. nucleatum* 感染による炎症反応の制御機構に対する理解が深まり、口腔疾患の予防・治療に向けた新たなアプローチへの寄与が期待される。

本研究の一部は JSPS 科研費 (JP21K19598, JP22K09980, JP22KJ2187) および G-7 奨学財団研究開発助成事業の補助のもとに行われた

歯髄細胞における炎症刺激とミトコンドリア機能との関係

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 歯科保存学分野¹ 歯科応用薬理学分野²

○高 裕子¹, 達山祥子¹, 富田和男², 星加知宏¹, 佐藤友昭², 西谷佳浩¹

Effects of Inflammatory Stimuli on Mitochondrial Function in human dental pulp cells

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology, ²Department of Applied Pharmacology,

Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○TAKASHI Yuko¹, TATSUYAMA Shoko¹, TOMITA Kazuo², HOSHIKA Tomohiro¹, SATO Tomoaki², NISHITANI Yoshihiro¹

【研究目的】

歯髄の保存は長期的な歯の機能保持のため重要であるが、細菌学的、物理的、化学的刺激などによる歯髄の炎症性変化により組織の破壊が進むと歯髄壊死に陥り、治療を余儀なくされる。歯髄炎や歯髄壊死のメカニズムを明らかにし、その原因療法を確立することで歯髄の保存を行うことができる。感染した根管象牙質や壊死歯髄からはグラム陰性菌が頻りに検出されており、これらが歯髄炎や根尖性歯周炎の進行に深く関与すると考えられている。例えば、グラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖(LPS)は歯周組織の破壊につながる炎症反応を惹起する物質の1つである事が知られている。さらに、歯髄組織は周囲を硬組織に囲まれているため、炎症の進行は組織圧の亢進を引き起こし、その結果壊死が起きることも明らかとなっている。生体内で浸透圧を調節する細胞膜チャネルのひとつとしてはアクアポリン(AQP)が知られており、AQPは水チャネルとして機能するだけでなくグリセロールや過酸化水素(H₂O₂)を透過させ、歯周炎を含む炎症に強く関与している。近年、歯髄炎の新規バイオマーカーとしてAQP9が報告された(Al-Natour *et al*, Int Ended J. 2021)。また、これまでの研究結果よりがん細胞ではH₂O₂への感受性はミトコンドリアによって制御されており、その結果AQPの発現が変化し細胞死が惹起されるという機序が示されている。しかしながら、歯髄組織における炎症刺激とミトコンドリア機能との関係は十分に明らかとなっていない。本研究では、歯髄細胞が炎症刺激にさらされるとミトコンドリア機能が低下するのではないかと仮説を立て、以下の実験を行った。

【材料及び方法】

ヒト歯髄由来細胞(DPCs: DV Biologics社)を用いて、炎症刺激によって、ミトコンドリアの内膜に存在し細胞増殖や細胞死などさまざまな機能を司るプロヒピチン(PHB)1,2の発現への影響を検討した。

DPCsに炎症刺激処理としてH₂O₂ 50 μMを1時間処理後さらに通常培地に交換し1時間培養した細胞を回収してRNAを抽出し、PHBについて定量PCR法を用いて未処理との遺伝子発現変化について比較した。*Porphyromonas gingivalis*由来LPSでは10 μg/mlで1時間処理を行い、同様に無刺激で1時間培養後に細胞を回収、その後RNAを抽出し、PHBの遺伝子発現変化を解析した。

【結果及び考察】

定量PCRの結果、50 μMのH₂O₂処理および10 μg/mlの*P.gingivalis*由来LPS処理により、PHB1,2の遺伝子発現は有意に減少していた。我々は、がん細胞を用いた研究においてミトコンドリア機能が低下した細胞に正常ミトコンドリアを移植するとH₂O₂への抵抗性が獲得されることや、AQPの発現が低下することを明らかにしてきた(Takashi *et al*, FRBM 2020)。また歯髄細胞では、炎症刺激による細胞生存率の低下や、AQP9発現の減少を報告している(第156回日本歯科保存学会春季学術大会, 2022年)。今回の研究で、歯髄細胞において炎症刺激はミトコンドリア機能低下を惹起することが示された。これらのことから、AQPの発現の抑制やミトコンドリア移植法によってミトコンドリア機能を強化し、ストレス抵抗性を高めることで、歯髄炎に対する新規治療法を提示できる可能性が示唆された。

ヌカシン耐性に関与する2つのABCトランスポーターの多型性の解明

広島大学 大学院医系科学研究科 歯髄生物学研究室
○貞岡 直樹、武田 克浩、柴 秀樹

Evaluation of two ABC transporters polymorphism involved in nukacin resistance.

Departments of Biological Endodontics, Graduate School of Biomedical and Health Sciences,
Hiroshima University
○Naoki Sadaoka, Katsuhiro Takeda, Hideki Shiba

【目的】 *Streptococcus mutans* 126株を用いて、皮膚常在細菌である *Staphylococcus* 属が産生するバクテリオシンの一つであるヌカシンに対する感受性を検証したところ、感受性に多様性を認めたため、この多様な感受性は、バクテリオシン関連遺伝子の存在によって既存の遺伝子が変異する遺伝子多型によって生じるという仮説を立てた。本研究では、仮説を証明するために、前回の本会にて報告したヌカシン耐性に関与する新規ABCトランスポーターMukFEGと既報のLctFEGに着目し、*Streptococcus mutans* のヌカシン感受性の多様性ととの関連性を検証した。

【方法】 ボランティア 289名の唾液からミュータンス連鎖球菌用選択培地を用いて分離した126株の *S. mutans* およびUA159株を被験菌とし、ヌカシン産生菌を用いたDirect法によりヌカシン感受性を検証した。ヌカシンはヌカシン産生培養上清から弱陽イオン交換担体であるMacro perp (Bio-Rad)を用いて粗精製後、TSKgel ODS-80Tsカラム (Tosoh)を用いた逆相クロマトグラフィーによって精製した。LctFEG/mukFEG欠損株作製はダブルクロスオーバー法による薬剤耐性遺伝子置換により欠損株を作製し、得られた変異株を用いて補完株も作製した。抗菌活性はDirect法で検査し、リアルタイムPCRにてヌカシン耐性遺伝子発現を検証した。

【結果】 *S. mutans* 127株のヌカシンに対する感受性パターンに多様性を認めたため、ヌカシン耐性に関与する2つのABCトランスポーターであるLctFEGとMukFEGのアミノ酸配列を検証した。その結果、LctF (Type I, II) ならびにMukF (Type α , β) に規則性を持つ多型性を見出した。さらに mukFEG の上流にヌカシンと同タイプのバクテリオシンであるmutacinK8合成関連領域 (mukA-T) の有無を認めた。これらのパターンから127株の *S. mutans* を7つのTypeに分類した。Type I株ではLctFのtruncate (LctFI) を認め、遺伝子欠損株と補完株を用いた検証の結果から、LctFIEGは耐性機能を持たないこと、このタイプの株のほとんどが type (α) MukF (MukF α EG) を保持し、このMukF α EGによってヌカシン耐性も保持していることが判明した。一方、LctFが機能型であるType II (LctFII) では、MukFは機能不全型 (Type β) であること、および mukA-Tの有無がLctFとMukFの遺伝子を相反させていることが明らかになった。LctFEGとMukFEGの耐性の寄与については、感受性試験と遺伝子発現解析によって、LctFEGの方がより強い傾向を示すことがわかった。これにより、既報のヌカシン耐性因子LctFと今回新たに同定された耐性因子であるMukFがアミノ酸配列に相反する変異に関係しており、2つのABCトランスポーターは二成分制御系であるLcrRSにより統括的な制御による耐性が発現することも明らかになった。

【考察】 ゲノム解析から *S. mutans* の mutacinK8 合成遺伝子領域には transposase が認められ、本領域はゲノムに挿入された可能性がある。今回の研究結果から、バクテリオシン mutacinK8 合成関連遺伝子の挿入により、既存の耐性因子LctFEGの一部に変異を生じることによって、MukFEGのみが効率的にバクテリオシン耐性を担う可能性が示された。遺伝子挿入の有無により遺伝子変異を生じることによって、バクテリオシンに対する耐性を獲得するための遺伝子を変異させ、新たな耐性を獲得するという詳細なメカニズムについてはまだ不明であるが、本研究からバクテリオシン関連遺伝子領域の有無によって耐性因子本体の多型が生じるという新たな知見を見出した。(会員外共同研究者：広島大学大学院医系科学研究科 細菌学教室 松尾美樹、小松澤均)

※倫理承認番号：E2020-1998

3 次元骨補填材を用いた新規骨再生法の探索

東北大学病院 歯内療法科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⁾
○鎌野優弥¹⁾, 原田芙太巴²⁾, 八幡祥生²⁾, 齋藤正寛²⁾

Exploration of Novel Bone Regeneration Methods Using 3D Bone Substitutes

Division of Endodontics, Tohoku University Hospital¹⁾, Division of Operative Dentistry, Department of Ecological Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry²⁾
○Yuya Kamano¹⁾, Futaba Harada²⁾, Yoshio Yahata²⁾, Masahiro Saito²⁾

【研究の背景と目的】

骨組織工学において、炭酸アパタイト、脱灰牛骨、 β -TCP、ハイドロキシアパタイトなどの顆粒タイプの骨伝導性補填材が広く応用されてきた。近年、これらの材料にコラーゲン線維を組み合わせた 3 次元骨補填材が開発された。それに伴い、歯科医療において小さな骨欠損であれば骨補填材単独で治癒を見込めることが増えてきた。現在承認されている骨伝導能力を有する補填材について炭酸アパタイト (Cytrans Granules)、ウシ脱灰骨 (Bio-Oss)、 β -TCP (Osferion, CERASORB)、ハイドロキシアパタイト (NeoBone)がある。しかし歯周病が重篤化すると垂直方向への造骨が求められる大規模骨欠損ができるためこれらの材料では対応できなくなる。この問題を解決する材料としてスポンジ状構造で立体的な造骨を可能にするリフィットデンタルが承認され販売が開始された。これらの材料はコラーゲンとセラミック系材料を主成分としている多孔質の 3 次元の構造を持つ骨補填材であり、高い骨伝導性を有している。しかしながら、広範な骨欠損や垂直的骨欠損では十分な治癒が得られていないのが現状である。

このような背景を元に、我々は骨補填材を用いた造骨治療の解決のため以下の 2 点、1) 優れた骨誘導性を有すること、2) 移植後の炎症を抑える治療を考慮すること、に重点を置いて骨造成材料および治療方法に関する研究を行ってきており、優れた骨誘導性を有するヒト未分化骨芽細胞 (human alveolar bone derived immature osteoblast: HAOB) と骨補填材を併用した造骨再生治療の開発研究を実施することとした。

【材料および方法】

倫理申請：本研究を実施するにあたり東北大学歯学部倫理委員会の承認を得て(2018-3-024)実施している。また、すべての被験者から研究開始前に書面によるインフォームドコンセントを取得した。

HAOB 培養：ヒト顎骨より骨片を採取し HAOB を分離培養した。HAOB が骨芽細胞分化能を有しているかを検討するため、骨芽細胞分化培地中で 10 日間培養し、アルカリフォスターゼ染色およびアリザリンレッド染色を行った。また real-time RT PCR 法により骨芽細胞分化関連マーカー遺伝子の発現を検討した。

皮下移植実験：次に HAOB を播種するのに適している骨補填材を選択するために、NeoBone, Cytrans Granules, Osferion, Refit-Dental の 4 つの骨補填材と HAOB を組み合わせた。HAOB を維持培地中で培養し、上記の骨補填材に播種した。これらの複合体を免疫不全マウス (SCID マウス：日本クレア) の背部皮下に 60 日間移植を行った。

組織解析：移植片を取り出した後に、固定、脱灰、包埋後にヘマトキシリンエオジン染色にて骨形成を検証した。

【結果および考察】

HAOB を顎骨から採取した骨片からコラーゲン消化により分離培養した。得られた HAOB 骨芽細胞分化培地で培養した結果、アルカリフォスターゼ染色およびアリザリンレッド染色に陽性であった。また、HAOB を維持培地で培養した群と比較して、有意に骨芽細胞分化マーカーの上昇を認めた。

次にマウス背部皮下移植実験において、HAOB に適した骨補填材と組み合わせて移植した結果、炭酸カルシウムであるサイトランス複合体のみで骨様組織の形成を認めた。

上記の結果より骨補填材と造骨能力を有する HAOB との組み合わせは、早期に骨形成を誘導できる新規骨組織工学として発展する可能性を秘めている。しかし誘導した骨量が十分でないことから、今後は抗炎症効果を有する材料との組み合わせ、また骨形成に適した移植部位を検討の必要である。これらの改良を加えることで、HAOB-骨補填材複合体による広範囲骨欠損、垂直的骨欠損に対する治療法の開発に繋がりたいと考えている。

本研究で得られた結果は、オステレナト株式会社北川全氏との共同研究による成果である。

2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン (MPC) ポリマーの チタン材料表面へのインプラント周囲炎原因菌の付着抑制効果

徳島大学大学院医歯薬学研究部歯周歯内治療学分野

○ 秋月皆人, 板東美香, 稲垣裕司, 湯本浩通

Inhibitory effect of 2-methacryloyloxyethylphosphorylcholine (MPC) polymer on adhesion of peri-implantitis-causing bacteria to the surface of titanium materials

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Biomedical Sciences,
Tokushima University Graduate School

○ Akizuki Minato, Mika Bando, Yuji Inagaki, Hiromichi Yumoto

【目的】 現在、歯の欠損補綴の方法として、生体適合性の観点からチタンやチタン合金を用いたインプラントが普及している。しかしながら、インプラント治療の成功率は向上しているものの、インプラント周囲炎によるトラブルの報告も少なくない。インプラント周囲炎は、インプラント体表面に形成されるバイオフィームが原因となって惹起される炎症性疾患である。すなわち、インプラントを取り巻く軟組織と硬組織に影響を与える破壊的な炎症過程であり、放置すればインプラント周囲組織の広範な骨吸収などを引き起こす可能性がある。その対応として、インプラント体表面に形成されたバイオフィームを口腔内で除去する方法が多数あるが、未だ有効な治療法は確立されていない。したがって、インプラント体表面へのバイオフィームの形成を防ぎ、インプラント周囲炎を予防するというアプローチも重要であると考えられる。既に付着した細菌やプラークに対する対応ではなく、バイオフィーム形成の最初の段階である細菌付着過程に着目し、我々は、細菌の付着・定着を抑制する“撥菌”（細菌をはじく）という概念を提唱し、超親水性の MPC ポリマーの歯面や義歯の材料であるレジン表面へのコーティングが細菌付着抑制に効果を有すること報告してきた。本研究では、インプラント周囲炎の予防を目的として、チタン表面への口腔内細菌、特に、歯周病原菌の付着について、口腔内での効果の持続性を考慮した疎水性の MPC ポリマーを用いた付着抑制効果を検討した。

【方法】 疎水性 MPC ポリマーでコーティングしたチタンプレートを細菌懸濁液に浸漬して 30 分または 24 時間静置後、付着した細菌の ATP 量を測定した。また、チタンプレートに付着した細菌を走査電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。さらに、実際の口腔内を想定して、MPC ポリマーでコーティングしたチタンプレートを被験者より採取した唾液にて処理後、細菌懸濁液に 24 時間浸漬・静置して、付着した細菌量の ATP 量を測定した。使用菌株として、*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277, *Fusobacterium nucleatum* JCM8532, *Streptococcus mutans* MT8148 を用いた。(本研究は、徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。承認番号: 329)

【結果および考察】 チタン表面を MPC ポリマーにてコーティングすることにより、30 分と 24 時間後で有意な細菌の付着抑制効果が認められた。チタン表面を SEM にて観察した結果、付着細菌数は ATP 量の結果と同様に顕著に抑制されていた。MPC ポリマー処理時の乾燥条件を室温に変更しても同等の抑制効果が得られた。また、MPC ポリマーでコーティングしたチタンプレートは、唾液タンパクそのものの吸着を抑制したため、唾液を介在させても細菌に対する付着抑制効果が認められた。また、予め唾液を吸着させたチタンプレートに MPC ポリマー処理を行った場合においても細菌の付着は有意に抑制された。さらに、MPC ポリマー処理の持続性を確認するために MPC ポリマーコーティングしたチタンプレートを生食中に約 1 週間保存した場合でも有意な細菌付着抑制効果を認めた。

以上の結果から、MPC ポリマーによるコーティングは、口腔細菌に対して強い付着抑制効果を有し、短時間の初期付着に対してだけでなく、24 時間の長期付着やバイオフィーム形成に対しても抑制効果を有しているが明らかとなった。また、唾液の介在の有無に関わらず、細菌付着抑制効果を発揮すること、さらには 1 週間程度の長期間湿潤環境下に暴露されても付着抑制効果が持続することが示された。

【結論】 チタンプレート表面への MPC ポリマーのコーティングにより、細菌付着が抑制されたことから、インプラント周囲炎の予防に有効である可能性が示された。

CPC 製品使用後の口腔内における CPC の経時的濃度変化

北海道大学大学院歯学院歯科保存学教室

○國井理恵子、川本千春、矢後亮太郎、兼子裕史、遠山晏梨
松尾友太、弥勒院択良、ヤマウチ モニカ、佐野英彦、友清 淳

Evaluation of CPC concentration oral cavity after using CPC products

Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dental Medicine, Hokkaido University

○Rieko Kunii, Chiharu Kawamoto, Ryotaro Yago, Hirofumi Kaneko, Anri Toyama,
Yudai Matsuo, Takuma Mirokuin, Monica Yamauti, Hidehiko Sano, and Atsushi Tomokiyo

【背景】

塩化セチルピリジニウム (別名:セチルピリジニウムクロリド[CPC]) はカチオン系界面活性剤であり、エンベロープを有するウイルスに抑制効果を示すと考えられている。本学の研究チームはヒト唾液を用いた研究において、CPC が SARS-CoV-2 に対して、0.0025%~0.004% (25~40 µg/mL) の範囲で抗ウイルス作用を発揮することを報告している。そこで本研究では、市販の CPC 製品を使用したのちに唾液中に含まれる CPC 濃度を明らかにすることで、CPC 製品の使用が SARS-CoV-2 の抑制に有効であるかを検証することとした。

【材料と方法】

初めに、セチルピリジニウムクロリド(MP Biomedicals, Inc.) を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用蒸留水にて 0.0005%~0.25%に希釈し、0.45 µm フィルターにてろ過後、HPLC 機器 (Chromaster; 日立ハイテクサイエンス株式会社) にて分析し、検量線を作成した。分析には Inertsil ODS-3V バリデーションカラム (内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, 粒子径 5 µm; GL サイエンス) を用いた。分析条件は移動層 0.1M NaClO₄ / acetonitrile (30 : 70, v/v), カラム温度 40 °C, 流速 1.0 mL/min, 試料注入量 10 µL, 分析時間 40 分, UV-VIS 検出器波長 258 nm で行った。唾液の採取は、被験者 2 名を対象にクロスオーバーデザインにて行った。まず被験者 2 名より安静状態で 3 分間唾液を採取した後、CPC 配合洗口剤 (モンダミンハビットプロ; アース製薬株式会社) 12 mL にて 30 秒間洗口を行い、吐出物を回収した。吐出した時点を 0 分とし、0 分後、15 分後、30 分後、および 60 分後に唾液を採取した。ウォッシュアウトを設けたのち、セチルピリジニウム塩化物トローチ 2 mg (イワキ; 岩城製薬株式会社) 1 錠を口腔内に含み、完全に溶解するまでの時間を計測した。完全に溶解した時点を 0 分とし、先述のように吐出物ならびに 0 分後、15 分後、30 分後、および 60 分後の唾液を採取した。翌日の同じ時間帯に、同一被験者がトローチ剤→洗口剤の順に製品を使用したのち、同様の方法で吐出物と唾液を採取した。採取した試料は遠心分離後、採取した上澄みに 0.45 µm フィルターろ過を行い、CPC 検量線作成時と同条件にて HPLC 分析を行った。また、使用した洗口剤の原液、およびトローチ剤 1 錠を 10 mL の HPLC 用蒸留水中にて 24 時間 37 °C にて静置したものを別途用意し、同条件で HPLC 分析した。S/N 比 = 3 を検出限界とした。

【結果】

CPC 濃度が 0.0005%~0.25%の範囲で検量線を得ることができた。洗口剤使用後の唾液中には、初日および翌日のいずれの分析においても吐出物、0 分後、および 15 分後に洗口剤の成分を示すピークが検出された。一方、30 分後の試料中には極めてわずかなピークが確認される程度であった。また、60 分後の試料中には明らかな CPC のピークは検出されなかった。口腔内においてトローチ剤の完全溶解にかかった時間は平均で 4.5 分であった。トローチ剤使用後の吐出物にはピークが確認されたが、0 分以降の唾液中、およびトローチ剤を蒸留水に静置した試料にはトローチ剤の成分を示すピークは検出されなかった。

【考察】

洗口剤使用後の唾液中において、60 分後の試料中には明らかな CPC のピークは検出されなかったことから、洗口後の CPC が SARS-CoV-2 の抑制効果を示すのは、洗口から数十分程度である可能性が示唆された。また、本研究に用いたトローチ剤においては、吐出物に CPC のピークが検出された一方、使用後の唾液中にはピークが検出されず、さらに 24 時間静置後の蒸留水にもピークが検出されなかったことから、このトローチ剤に含まれる CPC は唾液や蒸留水に溶解していない、あるいは吐出直後には口腔内に停滞しない可能性が示唆された。

※本実験は北海道大学大学院歯学研究院臨床・疫学研究倫理審査委員会の承認を得て、歯科医師の管理下で実施した (承認番号 2021 第 5 号)。

TNF- α で刺激されたヒト歯根膜由来細胞の炎症性メディエーター 発現に対する cardamonin の影響

¹⁾徳島大学大学院医歯薬学研究部 再生歯科治療学分野 ²⁾徳島大学大学院医歯薬学研究部 口腔保健支援学分野
○岡本 梨沙¹⁾、細川 義隆¹⁾、細川 育子¹⁾、下山 真弘¹⁾、尾崎 和美²⁾、保坂 啓一¹⁾

Effects of Cardamonin on Inflammatory Mediators Expression in TNF- α -Stimulated Human Periodontal Ligament Cells

¹⁾Department of Regenerative Dental Medicine, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, ²⁾Department of Oral Health Care Promotion, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences
○Risa Okamoto¹⁾, Yoshitaka Hosokawa¹⁾, Ikuko Hosokawa¹⁾, Masahiro Shimoyama¹⁾, Kazumi Ozaki²⁾, Keiichi Hosaka¹⁾

【研究目的】

歯周炎は歯周病原性細菌感染によって引き起こされる慢性炎症性疾患であり、宿主の過剰な免疫応答が歯槽骨吸収をはじめとする歯周組織破壊に関与していることが明らかになっている。また歯周炎病変局所での炎症性メディエーター産生が歯周組織破壊の中心的役割を担っていることが示唆されている。

cardamonin は月桃などのショウガ科植物に含まれる生理活性物質である。cardamonin はこれまでに抗癌作用、抗酸化作用、抗炎症作用などの生理活性作用があることが報告されている。しかしながら、歯周組織構成細胞に対する cardamonin の影響について調べた報告はなく、歯周病治療に cardamonin を用いようとした試みはない。

本研究では、cardamonin を歯周病治療に用いるための基礎的研究として、TNF- α が誘導するヒト歯根膜由来細胞 (HPDLCs) の炎症性メディエーター産生に与える cardamonin の影響について検討を行うこととした。すなわち、cardamonin が TNF- α 刺激により HPDLCs に誘導される炎症性サイトカインである IL-6、CCL2、CCL20 および CXCL10 産生、細胞接着分子 (ICAM-1) の発現ならびに COX-2 の発現に与える影響について検討を行った。また、TNF- α が HPDLCs 細胞内で活性化するシグナル伝達因子 (p38 MAPK、ERK、JNK、NF- κ B、STAT3) に与える cardamonin の影響に関して明らかにすることも目的とした。さらに TNF- α が誘導する抗酸化酵素である HO-1 の発現に対する cardamonin の影響についても検討を行った。

【材料および方法】

HPDLCs は Lonza 社より購入し、10%FBS を含む DMEM 培地にて培養し実験に用いた。コンフルエントに達した HPDLCs を cardamonin 存在下あるいは非存在下にて TNF- α 刺激を行い IL-6、CCL2、CCL20 および CXCL10 産生を ELISA 法にて解析を行った。さらに、western blot 法を用いて ICAM-1 および COX-2 の発現、細胞内シグナル伝達因子 (p38 MAPK、ERK、JNK、IKK- α/β 、NF- κ B p65、I κ B- α 、STAT3) の発現およびリン酸化、抗酸化酵素の HO-1 の発現の解析を行った。

【成績】

cardamonin は TNF- α が誘導した HPDLCs の IL-6、CCL2、CCL20 および CXCL10 産生ならびに ICAM-1、COX-2 発現を濃度依存的に抑制した。また、cardamonin は TNF- α が誘導した IKK- α/β 、NF- κ B p65、I κ B- α 、STAT3 のリン酸化ならびに I κ B- α の分解を抑制したが、p38 MAPK、ERK、JNK のリン酸化には影響を与えなかった。さらに cardamonin は、HO-1 の発現を増強した。

【考察および結論】

今回の結果より、cardamonin は HPDLCs の NF- κ B および STAT3 のシグナル伝達経路の活性化を抑制することにより、TNF- α が誘導する HPDLCs の IL-6、CCL2、CCL20 および CXCL10 産生ならびに ICAM-1、COX-2 発現を減少させることが示唆された。また、cardamonin が HPDLCs の抗酸化酵素発現を増強することも明らかとなった。このことより歯周炎病変局所への cardamonin の投与によって歯根膜細胞の IL-6、CCL2、CCL20、CXCL10、ICAM-1 および COX-2 などの炎症性メディエーターの産生が抑制され、HO-1 などの抗酸化酵素が増加することで歯周炎病変局所での過剰な炎症反応を抑制できる可能性が示唆された。

SPOCK1 はシクロスポリンによる薬物性歯肉増殖症において
歯周炎症を介した歯肉肥厚と歯槽骨吸収を増大する

九州大学歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

○今川 滯、新城 尊徳、佐藤 晃平、川上 賢太郎、瀬々 起朗、西村 優輝、岩下 未咲、山下 明子、西村 英紀

SPOCK1 enhances periodontitis-mediated gingival thickening
and alveolar bone loss under cyclosporin-treated mice.

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

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

【目的】

薬剤性歯肉増殖症(DIGO)は、一部の降圧薬や免疫抑制剤の副作用の一つとして知られている。DIGOの primary な病因は薬剤であるが、歯周炎症を併発すると歯肉肥厚が増大するとともに、仮性ポケットが存在することで歯周炎が難治性となることが多い。我々は、SPOCK1は上皮間葉移行を促進し、DIGOに関わる新たなタンパク質であることを報告した(Alshargabi *et al.*, *Sci Rep*, 2020)。また、第156回日本歯科保存学会秋季学術大会にて、野生型(WT)マウスと比較してSPOCK1を過剰発現させた *Spock1-Tg* マウスでは、シクロスポリンの連日投与と実験的歯周炎を併発したDIGOモデルにおいて、歯周炎症に伴う歯肉肥厚や歯周炎病態がさらに増悪することを報告した。そこで今回、EMT関連マーカーならびに結合組織恒常性の維持に関わる遺伝子発現の検証、*Spock1-Tg* マウスの歯肉組織切片における破骨細胞の検出、および免疫蛍光染色等を行い、DIGOモデルにおける歯周炎病態増悪のメカニズムを探索した。

【材料・方法】

①8週齢の雄性 *Spock1-Tg* マウスに、50mg/kg 体重のシクロスポリン(CsA)の腹腔内(ip)投与を1日1回行い、7日目に上顎両側第2臼歯への6-0絹糸結紮による歯周炎を惹起した群(Tg CsA lig+群)と惹起しなかった群(Tg CsA lig-群)に分けた。絹糸結紮は2週間維持し、その間も50mg/kg 体重のCsAのip投与を連日継続した。同時に、雄性的同腹仔野生型(WT)マウスについても、同様にCsAのip投与と絹糸結紮を行い歯周炎群(WT CsA lig+)および非歯周炎群(WT CsA lig-)を設定した。

②結紮2週間後に各マウスを安楽死させ、上下顎臼歯部周囲歯肉からRNAを抽出し、qPCR法にて検討を行った。また、この定量結果を、CsA非投与で絹糸結紮による歯周炎を惹起したWT・Tgマウス(WT lig+, Tg lig+)群と、しなかった(WT lig-, Tg lig-)群を含めて、8群で比較した。

③各条件のマウス上顎組織切片にミエロペルオキシターゼ(MPO)を標的とした免疫蛍光染色を行い、歯周炎に伴う歯肉中の好中球数の変化を計測した。また、TRAP染色による破骨細胞数、Masson trichrome(MT)染色による線維化領域の定量化を行った。

**本研究は九州大学動物実験委員会、遺伝子組換え実験安全委員会の承認のもと実施した。

(承認番号:A23-061-2, A20-109-2,2-15)

【結果及び考察】

①各条件マウスの歯肉RNAを用いたqPCRの結果、WT・Tgマウスともに歯周炎によって発現上昇したTNF α 、IL-1 β 、MMPsは、CsA投与群で減少傾向を示した。これに対して、Colla1は逆に増加傾向を示し、特にCsA投与Tg lig+群でより増加傾向を示した。

②結紮を行った群間で組織切片中の歯肉中のMPO発現細胞数を定量化したところ、CsA非投与ではWTマウスよりもTgマウスで有意なMPO陽性細胞数の増加を認めた。また、CsA投与群ではWT・TgマウスともにMPO陽性細胞数は減少傾向が見られたが、TgマウスではWTよりも高値を示した。TRAP染色の結果、WTと比較してTgマウスの方が多く破骨細胞が検出されたが、CsA投与による影響は見られなかった。また、MT染色によって、マウス歯肉組織切片における線維化領域を定量化したところ、WTと比較してTg群では歯周炎による線維化領域の有意な増加を認め、CsA群ではTgマウスでさらに有意な増加が見られた。

以上の結果より、SPOCK1は歯肉中のTNF α やMMPsの発現低下を介して、歯肉の肥大を増悪させるとともに、破骨細胞形成を促進させ骨吸収の増悪に働く可能性が示唆された。DIGOの管理に厳格なプラークコントロールが求められる機序の一端が明らかとなった。

Cadherin-2 はヒト歯根膜細胞の幹細胞転換に関与する

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 歯科保存学研究室
○長谷川大学¹、田下滉大²、Kidsen Huang²、兼子大志¹、前田英史^{1,2}

Cadherin-2 participates the conversion of human periodontal ligament cells into stem cells

¹Department of Endodontology, Kyushu University Hospital,
²Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University
○Daigaku Hasegawa¹, Koudai Tashita², Kidsen Huang², Hiroshi Kaneko¹, Hidefumi Maeda^{1,2}

【研究目的】歯根膜幹細胞は歯周組織再生の有用なツールであるが、患者の抜去歯から採取した歯根膜組織より分離できる幹細胞の数には限界があるため、臨床応用の実現には、歯根膜幹細胞を大量に獲得する方法の確立が必要不可欠である。我々は最近、ヒト歯根膜幹細胞に高発現する因子として mesoderm-specific transcript (MEST) を同定し、分化能を有さないヒト歯根膜細胞株に MEST を遺伝子導入することで、多分化能を有する幹細胞様の細胞に転換させること(幹細胞転換)に成功した(Hasegawa et al., 2020)。しかしながら、その詳細なメカニズムは不明である。そこで本研究では、ヒト歯根膜細胞における幹細胞転換に関与する因子を明らかにし、その因子を標的とするタンパクを用いた、“より簡便な歯根膜幹細胞獲得法”を見出すことを目的とした。

【材料および方法】本研究はすべて、九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会(承認番号:30-167)の承認の下に実施された。

1. ヒト歯根膜細胞の幹細胞転換に関与する因子の同定

- (a) まず、多分化能を有さないヒト歯根膜細胞株(2-52)に MEST 遺伝子を導入した歯根膜幹細胞様細胞(2-52_MEST)と、コントロールベクター導入細胞(2-52_empty)を用いて、網羅的遺伝子解析(cDNA マイクロアレイ法)を行った。これにより、2-52_empty と比較して 2-52_MEST において発現の高い因子を複数抽出した。
- (b) 次に、抽出した各因子の siRNA を用いて、2-52_MEST における各因子の発現をノックダウンさせ、幹細胞マーカーの発現および多分化能への影響について、定量的 RT-PCR 法、フローサイトメトリー分析法、および各種分化アッセイ(骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞分化)により検討を行った。

2. 幹細胞転換に関与する因子を標的とするタンパクの探索

1 において同定された因子(Cadherin-2)は Bone Morphogenic Protein type 4 (BMP4) により発現が誘導されることが報告されている(Hamada et al., 2007; Damian et al., 2011)。そこで、リコンビナント BMP4 タンパク(10 ng/ml)を添加した培地にて 2-52 を一定期間培養したのち、2-52 における Cadherin-2 ならびに MEST の発現、および幹細胞マーカーの発現について、定量的 RT-PCR 法およびフローサイトメトリー分析法にて解析を行った。

【結果】(1) 網羅的遺伝子解析の結果、2-52_MEST において、細胞接着因子 Cadherin-2 の発現が有意に高いことが分かった。また、2-52_MEST における Cadherin-2 の発現をノックダウンすると、CD146 や p75NTR といった間葉系幹細胞マーカーの発現が低下し、かつ骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞分化能がいずれも低下した。(2) 2-52 を BMP4 添加培地にて 7 日間培養した結果、2-52 における Cadherin-2 ならびに MEST の遺伝子発現が上昇した。また、間葉系幹細胞マーカー(CD146 および p75NTR)の発現が上昇した。

【考察】以上の結果より、MEST によるヒト歯根膜細胞の幹細胞転換には Cadherin-2 が関与していることが明らかになった。また、BMP4 刺激により、ヒト歯根膜細胞における Cadherin-2 ならびに MEST の発現上昇、および幹細胞マーカーの発現上昇がみられたことから、BMP4 が Cadherin-2 の発現上昇を介してヒト歯根膜細胞における幹細胞転換を誘導する可能性が示唆された。

【結論】Cadherin-2 はヒト歯根膜細胞の幹細胞転換に関与する。また、BMP4 はヒト歯根膜細胞における Cadherin-2 の発現を上昇させる。