

齲蝕原因菌に対するデルフィニジン型アントシアニンの抗菌効果

日本大学松戸歯学部 う蝕抑制審美治療学講座
○三田 肇、鈴木英明、水野恭子、並木泰次、池見宅司

Antibacterial effects of delphinidin type of anthocyanin against cariogenic bacteria

Department of Dental Caries Control and Aesthetic Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○ Hajime MITA, Hideaki SUZUKI, Kyoko MIZUNO, Yasuji NAMIKI and Takuji IKEMI.

【研究目的】

フラボノイドの一種で植物性食品素材の色素成分として検出されるアントシアニンには抗酸化作用、肝障害作用、視神経機能改善作用、抗炎症作用、動脈硬化改善作用などを有することが報告されており、その作用機構の解析をはじめ、多くの研究が行われている。また欧米では、脳血管障害の治療等、医薬品の成分として使われており、今後は食品に賦与することをも目的として新しい用途の開発が期待されている物質である。

今回、我々はこれらアントシアニン系の中からナスの皮に含まれるポリフェノールの一種であるナスニンに着目した。ナスニンには強力な抗酸化作用やコレステロールの吸収抑制作用を持つことが知られており、デルフィニジン型のアントシアニンに分類され、赤紫～紫～青色の色調を示す物質である。しかしながら、これらアントシアニンに対する歯科領域疾患に対する研究はほとんど行われていない。そこで、本研究は、ナスニンの成分であるデルフィニジンをを用い、齲蝕抑制効果の有無を *in vitro* において検討した。

【材料および方法】

1) 供試菌株および試薬

日本大学松戸歯学部感染免疫学講座から供与された *Streptococcus mutans* PS-14 株 (以下 *S.mutans*)、*Streptococcus sobrinus* 6715 株 (以下 *S.sobrinus*)、*Actinomyces viscosus* ATCC19246 株 (以下 *A.viscosus*) を本実験に使用した。また、デルフィニジンは Delphinidin 3- Glucoside Chloride (常磐植物化学研究所社製) を使用した。

2) 最小発育阻止濃度の計測

使用培地はBHI培地 (Difco社製) を用い、10 倍段階法にて最小発育阻止濃度の計測を行った。各菌体を 37℃、24 時間培養後、 1×10^7 cells / ml に調整して接種し、48 時間培養後に発育の有無を判定した。

3) GTF 活性の測定

0.6M sucrose、1.2M acetate buffer、WIG プライマーを用い、精製水またはデルフィニジンを加えて反応させ、室温、24 時間後における 340nm の吸光度を測定し GTF 活性値を計測した。

【成績】

- 1) デルフィニジンを用いた最小発育阻止濃度の結果は、*S.sobrinus* に対して 250～500 $\mu\text{g} / \text{ml}$ 、*S.mutans*、*A. viscosus* に対しては 500～1,000 $\mu\text{g} / \text{ml}$ であった。菌種間において若干の差はあるものの、これらの菌に対して抗菌力を有することが認められた。
- 2) GTF 活性値測定の結果、デルフィニジンの添加により軽度な WIG の合成阻害が認められた。

【考察および結論】

本実験の結果、デルフィニジンは *S.mutans*、*S.sobrinus*、*A.viscosus* 全てに対して抗菌作用を有することが確認された。しかしながらその抗菌効果は、カテキン系などの他のポリフェノール類と比べるとやや微弱であり、齲蝕抑制物質として実用するにはさらなる問題を解決しなければならないことが示唆された。

各種市販洗口液の殺菌効果およびキシリトール洗口液の有用性
北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 う蝕制御治療学分野
○川守田暢 安田善之 立松祐哉 新田督 犬山秀正 斎藤隆史

Antimicrobial activity of mousewashes sold commercially and usefulness of xylitol rinse

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Departemnt of Oral Rehabilitation,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

○Toru Kawamorita, Yoshiyuki Yasuda, Yuki Tatematsu, Osamu Nitta, Hidemasa Inuyama and Takashi Saito

【緒言】

キシリトールは、う蝕原因菌に酸を産生させない事から非う蝕性甘味料として使用されている。また歯の再石灰化を促進することでう蝕予防効果もあることが知られている。これまでに、キシリトール配合ガムを長期間摂取することで、唾液中の *Streptococcus mutans* 菌数が減少するという報告は多くあるが、キシリトールを主成分とした洗口液の唾液中う蝕原因菌レベルへの影響に関する報告はほとんどない。そこで今回、各種市販洗口液のう蝕原因菌に対する殺菌効果を比較するとともに、キシリトール洗口液を使用した際の唾液中う蝕原因菌レベルに対する影響を調べその有用性を検討した。

【材料および方法】

市販洗口液の殺菌効果: 計 12 種類の各種洗口液(クロルヘキシジン、フッ素、コンクール、ガム、リーチ、モンダミン、クリアクリーン、デンターシステム、ピュオーラ、リステリン、ネオステリングリーン、キシリトール)のう蝕原因菌に対する殺菌効果を比較した。 *Streptococcus mutans* および *Lactobacillus casei* 菌液(1×10^3 CFU/mL) 100 μ L を各洗口液 10 μ L と混合し、BHIプレートに播種し 37°C, 24 時間好気条件下で培養後、コロニー数をカウントして菌生存率を算出した。

キシリトールのう蝕原因菌増殖抑制効果: 96wellプレートに *S. mutans* 菌液を播種し、キシリトールを最終濃度 0.01%、0.1%、1% 添加し、37°C, 嫌気条件下にて 24 時間まで培養した。吸光度を測定することによりキシリトールの細菌増殖能への影響を調べた。

キシリトール洗口後の唾液中キシリトール残留濃度: 今回の実験に対して同意を得た被験者に 5%キシリトール洗口液 10mlにて 1 分間洗口してもらい、10 分ごとに唾液 1mlを採取した。唾液中のキシリトール残留濃度(mg/ml)は、D-Sorbitol/Xylitol assay kit (Megazyme)を用いて測定した。

キシリトール洗口の唾液中う蝕原因菌レベルに与える影響: 今回の実験に対して同意を得た被験者を 5%キシリトール洗口液と 5%ソルビトール洗口液の2グループに分け、洗口開始前唾液 1mlを採取した。各洗口液 10mlにて 1 分間洗口、これを 1 日 3 回、4 週間継続してもらい、2 および 4 週間後、唾液 1mlを採取した。MSKB寒天培地を用い唾液中の *S. mutans* 菌数を測定し、洗口開始前と 2 および 4 週間後で比較検討した。さらに、洗口開始前と 4 週間後のプラーク付着率を比較した。

【結果および考察】

市販洗口液の中では、リーチが *S. mutans* に対しては殺菌効果が最も高かったが、*L. casei* に対しては各洗口液間でほとんど違いはみられなかった。キシリトールは濃度依存性に *S. mutans* の増殖を抑制した。また、キシリトール洗口後の唾液中のキシリトール残留濃度は、時間経過とともに減少し 60 分後ではほとんど検出されなかった。キシリトール洗口 4 週間後の唾液中 *S. mutans* 菌数は洗口開始前に比べて約 60%減少したが、ソルビトール洗口 4 週間後では約 20%減少した。キシリトールを洗口液として 4 週間継続することにより、唾液中の *S. mutans* 菌レベルを減少させることが分かり、その洗口液としての有用性が示唆された。

象牙質マトリクスコラーゲンのペプシン消化におよぼす加齢の影響

東京医科歯科大学

1 歯学部附属病院 歯科総合診療部

2 大学院医歯学総合研究科 包括診療歯科学分野 総合診療歯科学

3 大学院医歯学総合研究科 包括診療歯科学講座 歯科医療行動科学分野

4 医歯学教育システム研究センター

○田村友寛¹ 礪波健一¹ 梅森幸² 佐野和信² 俣木志朗³ 荒木孝二⁴

Effect of aging on pepsin digestion of dentin matrix collagen

Tomohiro Tamura¹, Ken-ichi Tonami¹, Sachi Umemori², Kazunobu Sano², Shiro Matakaki³, and Kouji Araki⁴

Tokyo Medical and Dental University

1) Oral Diagnosis and General Dentistry, Dental Hospital, Tokyo Medical and Dental University

2) General Dentistry, Department of Comprehensive Oral Health Care, Division of Comprehensive Patient Care, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

3) Behavioral Dentistry, Department of Comprehensive Oral Health Care, Division of Comprehensive Patient Care, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

4) Center for Education Research in Medicine and Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

【目的】

象牙質マトリクスコラーゲンをドデシル硫酸化ナトリウムポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) にて分析する際、可溶化を目的として消化酵素ペプシンによる制限分解を行う。しかし試料となる象牙質の年齢がコラーゲンのペプシン可溶化に及ぼす影響は明らかでない。本研究の目的は、加齢がヒト象牙質マトリクスコラーゲンのペプシン消化に及ぼす影響を、SDS-PAGE を用いて明らかにすることである。

【材料および方法】

60歳以上のヒト抜去歯 7 本 (以下、高年齢群) および 30歳以下のヒト抜去歯 5 本 (以下、低年齢群) の象牙質粉末を低速回転のラウンドバーを用いて 20mg ずつ採取した。ついで、得られた象牙質粉末を 10% EDTA (pH 7.0) にて 7 日間浸漬して脱灰した。得られた、象牙質有機質画分について、4°C の 0.5M 酢酸 (pH 2) 0.5ml 中にてペプシン 2mg (ICN Biomedicals, USA) を用い、24 時間制限分解した。その後、通法に従い 15% SDS-PAGE に供した。得られた電気泳動パターンを画像解析ソフト (Image J, NIH, USA) を用いてデンストグラム上の濃度曲線に変換した。そして、コラーゲン α 鎖とペプシンのピーク面積比を算出し、サンプル中のコラーゲン α 鎖の質量を求めた。さらに、高年齢群、低年齢群の間の α 鎖量の差を、統計解析ソフトウェア (JMP 6, SAS, USA) を用い、student t-test にて検定した。

【結果および考察】

全ての試料の電気泳動パターンについてコラーゲン α 鎖、ペプシンのバンドが確認された。また、高年齢群よりも低年齢群においてデンストグラム上のコラーゲン α 鎖に相当するピークが大きくなり、その面積より求めたコラーゲン α 鎖量に、高年齢群と低年齢群の間で、統計的有意差を認め (図, $P < 0.05$)。以上より、高年齢群のヒト象牙質マトリクスコラーゲンのほうが低年齢群よりペプシン可溶化されにくいことが明らかとなった。加齢に伴いヒト象牙質内に安定した架橋構造が増加することが報告されている。そのような架橋構造の増加が、ペプシン可溶化に不利に影響していることが考えられた。

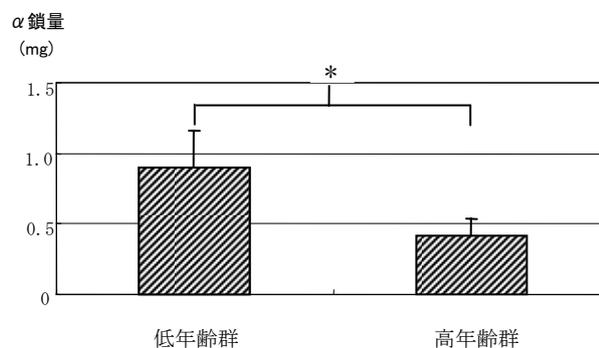


図 ペプシン可溶化後の α 鎖量

* : $P < 0.05$

S-PRG フィラー溶出液が象牙質再石灰化に与える影響

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯蝕制御治療学分野

○伊藤 修一、塚本 尚弘、斎藤 隆史

Effect of released solution from S-PRG filler in dentin remineralization

Division of Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation,
Health Sciences University of Hokkaido

○Shuichi ITO, Naohiro TSUKAMOTO, Takashi SAITO

[目的]

近年、接着修復材料の分野において S-PRG (酸反応性フルオロボロアルミノシリケートガラスとポリ酸の反応生成物) フィラーが開発され用いられている。これまで S-PRG フィラーは、優れたフッ素徐放性を有することが報告されており、二次う蝕抑制効果が期待されている。一方、接着の対象となる象牙質においては象牙質リンタンパク質が脱灰象牙質の再石灰化に重要な役割を果たしていると考えられている。これまで我々は、結合型象牙質リンタンパク質や不溶性象牙質基質を準安定溶液に浸漬すると再石灰化が観察されることを報告してきた。また、これまでに、S-PRG フィラーから放出される各種イオンが脱灰象牙質の再石灰化に与える影響について報告してきた。しかし、S-PRG フィラーから溶出したイオンを含む溶液が石灰化に与える影響を検討した報告はまだない。

本研究の目的は、モデル脱灰象牙質再石灰化実験系において S-PRG フィラー、S-PRG フィラー含有コンポジットレジンからの溶出液がホスビチン-ミネラル間の界面張力に及ぼす影響を検討することである。

[材料と方法]

まず、ビニルスルフォンを用いてアガロースビーズにホスビチン (Sigma Chem Co., U.S.A.) を架橋結合し、ホスビチン-アガロースビーズ複合体 (2.56 μ g ホスビチン/mg アガロースビーズ) を作製した。これを 37°C にてハイドロキシアパタイト (HAP) に対する飽和度 7.41, 7.59 および 7.74 を有するカルシウム・リン酸溶液中でインキュベートすることにより、象牙質基質による再石灰化をシミュレートする系を作製した (PV 群)。さらに、S-PRG フィラー (3 μ m) と蒸留水を 1 : 1 の割合で 24 時間混合後、遠心分離した上澄み液を 1% 濃度で添加した (PV+PRG 群)。また、S-PRG フィラー含有コンポジットレジン硬化物 (円盤状 : 直径 25mm、厚さ 1mm) を蒸留水 (13.9ml) 中に 4 日間浸漬して得られた溶液を 50% 濃度で添加した (PV+CR 群)。

それぞれの試料を経時的に回収し、誘導されたミネラル中のカルシウム量を原子吸光分析 (Perkin-Elmer, 5100, U.S.A.) により石灰化誘導時間を計算した。走査型電子顕微鏡 (SSX-550、島津製作所) により形態学的な観察を行なった。同様に得られた試料を X 線回折法により分析を行なった (Rint 2000、理学電気)。さらに、Nielsen の nucleation theory (1967) を用いて界面張力を計算した。

[結果および考察]

PV 群、PV+PRG 群、PV+CR 群ともに 24 時間後に Ca 量の上昇が認められた。PV+CR 群が PV 群、PV+PRG 群と比較して有意に高い値を示した。また、溶液の飽和度が低くなるほど、石灰化誘導時間は延長した。SEM 観察では、どの群においても 24 時間後に板状の HAP 結晶が確認された。得られた石灰化物の X 線回折パターンから HAP に特徴的なピークが認められた。

PV によるハイドロキシアパタイト誘導に関する界面張力は 90.5 ergs/cm²、PV+CR では 85.9 ergs/cm²、PV+PRG では 86.1 ergs/cm² だった。

これらの結果から、S-PRG フィラー、S-PRG フィラー含有コンポジットレジンからの溶出液がホスビチン-アガロースビーズ複合体による石灰化に影響を与えることが示された。これにより、象牙質接着界面において S-PRG フィラーからの溶出イオンが脱灰象牙質再石灰化に影響を与える可能性が示唆された。

チューインガム咀嚼後に生じるエナメル質再石灰化部の亜鉛濃度：
放射光による蛍光 X 線分析

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齲蝕学分野

○松永常典、石崎秀隆、林 善彦

**Concentration of Zinc in Remineralized Enamel after Gum-Chewing :
Synchrotron Radiation X-ray Fluorescence Analysis**

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

○Matsunaga Tsunenori, Ishizaki Hidetaka and Hayashi Yoshihiko

【緒言】

エナメル質の再石灰化現象は、MI Dentistry を実行する上で重要である。その基本は、唾液中のカルシウムとリンのイオン積がエナメル質の構成カルシウムリン酸塩であるヒドロキシアパタイトに対して過飽和なことである。一方、歯は、部位・深さによって、その化学組成が異なる不均一な組織で、比較的少量含まれる微量元素についても一様ではなくさまざまな分布を示していると考えられる。

我々は、過去 3 年間にわたり、つくば市にある高エネルギー加速器研究機構物質構造科学研究所放射光科学研究施設の放射光を用いて、蛍光 X 線分析を行い、エナメル質表層における微量元素分析を行ってきた。

今回、キシリトール含有ガム咀嚼後の人工脱灰エナメル質断面における Zn の定量分析を行い、特に最表層部の Zn 濃度に注目して、口腔内での人工脱灰エナメル質の再石灰化現象に検討を加えた。

【材料および方法】

上記施設のビームライン 4A にて実験を行った。微量元素の分析にはマイクロビーム (分析エネルギー値 14.2keV) を用いた。Ca, P のピークを低く抑え相対的に微量元素の検出感を増強させるために、検出部をアルミ箔で被覆した。

試料は、*in vivo* の再石灰化臨床試験時 (日歯保存歯, 48(5):648-655, 2005) に使用した中から、A 社ガム咀嚼群 (18 個)、B 社ガム咀嚼群 (23 個)、ガム咀嚼なし群 (4 個)、無処置 (健全歯) 群 (7 個) および脱灰のみ群 (7 個) のエナメル質片を用い、エナメル質断面を表層から 10 μ m ごとに 100 μ m までの範囲で分析を行った。各試料において表層から 100 μ m まで 5 箇所分析を行い、それらの平均カウント値と標準試料を対比することにより、Zn の濃度 (ppm) を定量化した。特に、エナメル質断面最表層および表層から 10 μ m 深部における Zn 濃度に注目した。分析結果を比較するため、Student's *t* test を用いて統計分析を行った (危険率 5%)。

【結果とまとめ】

Zn 濃度は 5 群全てにおいてエナメル質の表層が高く、深部に進むに従って濃度が低下した。A 社ガム咀嚼群の方が B 社ガム咀嚼群より Zn 濃度が高く、表層～30 μ m の範囲で統計学的有意差が認められた。ガム咀嚼なし群はガム咀嚼群と比較し Zn 濃度は低く、表層～10 μ m の範囲で統計学的有意差が認められた。また、A 社ガム咀嚼群は表層～60 μ m まで、B 社ガム咀嚼群は表層～10 μ m の範囲で無処置群より Zn 濃度が高く、表層～30 μ m の範囲での A 社ガム咀嚼群と無処置群との間に統計学的有意差が認められた。

最表層部の Zn 濃度に関して、A 社ガム咀嚼群、B 社ガム咀嚼群、無処置群、ガム咀嚼なし群および脱灰のみ群の順に濃度が高く、B 社ガム咀嚼群と無処置群との間およびガム咀嚼なし群と無処置群との間を除き、統計学的有意差が認められた。

Zn は骨の石灰化に必要な必須微量元素であり、また歯の Zn 含量は他のどの組織よりも高い。ガムを咀嚼することで Zn の沈着は促進され、特に最表層部において Zn 濃度は健全エナメル質よりも上昇することが判明した。今回の分析結果から、脱灰エナメル質表層の Zn 濃度上昇は再石灰化現象により関連していることが明らかとなった。

ウレタンアクリレートポリマーの細胞毒性と口腔粘膜刺激性

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科顎顔面機能再建学講座歯科保存学分野¹⁾

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科顎顔面機能再建学講座歯科生体材料学分野²⁾

○富田浩一¹⁾, 徳田雅行¹⁾, 梶原武弘¹⁾, 鳥居光男¹⁾, 蟹江隆人²⁾

Cytotoxicity and oral mucosal irritation of urethane acrylate polymers

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University¹⁾

Department of Biomaterials Sciences, Kagoshima University²⁾

TOMITA Kouichi¹⁾, TOKUDA Masayuki¹⁾, KAJIHARA Takehiro¹⁾, TORII Mitsuo¹⁾, KANIE Takahito²⁾

【研究目的】第128回日本歯科保存学会春季大会にて、我々は、ウレタンアクリレートポリマーの細胞毒性と機械的性質についての報告を行い、ウレタンアクリレートポリマーの歯科材料としての有用性を示唆した。今回、我々は、さらなるウレタンアクリレートポリマーの歯科材料への応用研究のため、残留したウレタンアクリレートオリゴマー（以下オリゴマー）の細胞毒性を明らかにするために、ウレタンアクリレートポリマー（以下ポリマー）とともに細胞毒性試験を行い、さらにウレタンアクリレートポリマーについては動物実験で口腔粘膜刺激性試験を行った。

【材料および方法】細胞毒性試験の実験試料として、市販ウレタンアクリレートオリゴマー9種類を選択し、各々のオリゴマーと、それに光重合触媒を添加して光重合したポリマーを使用した。また、口腔粘膜刺激性試験の実験材料として、細胞毒性試験に使用した9種類のポリマーを使用した。

1. 細胞毒性試験

オリゴマーと円形に重合したポリマーの各試料を3g準備し、紫外線滅菌を行った。滅菌後、37℃ 5%CO₂ インキュベーター内にて試料を培養液中に7日間浸漬し、その培養液を回収した。次に、ヒト子宮頸部腺癌細胞 (HeLa S3) とヒト下顎歯肉肉癌由来細胞 (Ca9-22) の2種類の細胞で回収した培養液を用いて、これら9種類のオリゴマー試料とポリマー試料の細胞毒性をMTT法にて比較検討した。

2. 口腔粘膜刺激性試験

細胞毒性試験で使用したポリマー9種類と、対照試料として市販常温重合型アクリル系歯科材料 (バイオライナー: ニッシン) 1種類について、直径8mm、厚さ1mmの円形試料を準備した。各ポリマー試験片につき、5週齢の雄のシリアンハムスター4匹を準備し、その左右の頬袋の片側にポリマー試験片を、他方にバイオライナー試験片を埋入した。2週間後、頬袋を摘出し組織標本を作製し、頬袋粘膜に炎症反応がないかをデジタル顕微鏡下で観察した。

【結果】

1. 細胞毒性試験

- HeLa S3細胞で6種類、Ca9-22細胞で7種類にオリゴマーとポリマーの間で有意差がみられた。
- 6種類のオリゴマーで、細胞毒性は低かった。
- 9種類のポリマー全てで、細胞毒性は低かった。

2. 口腔粘膜刺激性試験

- 全試料の頬袋粘膜にはポリマー、対照群のバイオライナーともに炎症反応はみられなかった。

【考察および結論】

今回作製したオリゴマーとポリマー間での細胞毒性の有意差は見られたが、全てのポリマーでは低い細胞毒性を示した。また、口腔粘膜刺激性試験で炎症反応がみられなかったことより、ポリマーは口腔粘膜刺激性がないことが示された。以上より、新規歯科材料としてウレタンアクリレートポリマーが応用できる可能性が示唆された。

(謝辞)

この研究は、NEDO R&D マッチングファンド補助金により助成されています。

エステニアC&B/ジャケットオpaque二層構造体の曲げ特性と臨床応用

東北大学大学院歯学研究科口腔修復学講座・歯科保存学分野

*東北大学歯学部附属技工士学校

○笹崎弘己、友田浩三*、小松正志

Bending Characteristics of Two Layer Structure (Estenia C&B and Jacket Opaque) and Clinical Application

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

*Tohoku University School of Dental Laboratory Technicians

○SASAZAKI Hiromi, TOMOTA Kohzo* and KOMATSU Masashi

【研究目的】

歯冠用硬質レジンを使用したジャケット冠やインレーを口腔内に装着すると、咀嚼時の咬合圧や衝撃等によりチップングや破折を招くことがある。これらを防止するためには、レジン修復物の靱性や耐衝撃性の改善が必要と考えられる。そこで今回、ガラスフィラーを含有したレジンプレーム材を硬質レジン内面に裏層した二層構造体の曲げ特性を検討するとともに、この材料を用い製作したレジンインレーやアンレーの臨床成績もあわせて検討した。

【材料および方法】

1. 曲げ試験

透明ガラス板に2×30×(0.2, 0.4, 1.0, 1.6, 1.8, 2.0) mmの穴の開いたSUS製金型を置き、ジャケットオpaque(以下JMO, サンメディカル)を充填した後、α-Light II(モリタ)で180秒間光照射した。次いで、表面を耐水研磨紙#600で一層削除した後、リペアリキッドを一層塗布し、同じ照射器で30秒間光照射した。これら試料の上に、2×30×(2.0, 1.8, 1.6, 1.0, 0.4, 0.2) mmの穴の開いたSUS製金型を置き、エステニアC&B(以下DA3, クラレ)を充填し、同じ照射器で180秒間光照射した後、加熱重合器KL100(モリタ)にて110℃で15分間加熱重合し、2×30×2 mmの試料を製作した。37℃水中に24時間浸漬した後、JMOが引っ張り側になるように装着し、島津製オートグラフ(AG-1S)にて3点曲げ試験を行った。スパン間は20mm、クロスヘッドスピードは1.0mm/minで、試料の個数は各群5個である。

2. 臨床試験

東北大学病院附属歯科医療センター(旧東北大学歯学部附属病院)保存修復科外来患者の中から、C2程度のう蝕を有する患者に対し、事前に十分なインホームドコンセントを行い、了解が得られた後、上記材料を用いて、インレーまたはアンレーを製作し、臨床成績を経時的に評価した。

【結果および考察】

1. 曲げ試験

DA3にガラスフィラーを配合したプレーム材を裏装し、曲げ試験を行った結果、曲げ強さはDA3:JMOが2.0:0~1.0:1.0間では有意差がなく、高い値を示した。JMO含有量が50%を超えそれ以上多くなると、その値は低くなった。また曲げ弾性率はDA3層が薄くなるに伴い、低くなった。これは、JMOの有機成分のウレタン系ジメタクリレートとトリエチレングリコールジメタクリレートが関与していると考えられる。歪量はDA3:JMOが2.0:0~1.0:1.0まで低い値で推移していたが、JMO層が厚くなるほど、最大点試験力までの値が大きくなった。また、エネルギーの推移も同じ傾向を示していた。DA3は、無機成分が多いハイブリットタイプの歯冠用硬質レジンで、硬くて脆い「脆性」材料であるが、シラン処理したガラス繊維を含有したJMOを裏装する事により、DA3単体よりも粘り強い靱性な材料(補綴物)になりうる可能性が示唆された。

2. 臨床試験

修復物を装着後、最長1年と経過時間はまだ短いですが、JMO使用群、未使用群ともすべての症例において臨床的不快症状はみられなかった。また、各群1例に、3ヵ月後、MOD窩洞連結部に破折がみられた。

【結論】

硬質レジン内面にガラスフィラーを含有したプレーム材を裏装した二層構造体の曲げ試験の結果から、下記のような傾向がみられた。

1. DA3/JMOを張り合わせた曲げ試験では、1mm/1mmまで有意差無く、高い曲げ強さを示した。
2. 最大点試験力までの歪やエネルギーはJMOの厚さが厚くなるほど大きくなり、DA3単体の脆性による破折の予防的効果が考えられた。
3. 臨床成績については、今後症例数を増やし、長期にわたり経過観察する予定である。

洗口剤によるコンポジットレジン表面性状への影響

¹岩手医科大学歯学部歯科保存学第一講座 ²岩手医科大学歯学部歯科理工学講座
○増山知之¹、根津尚史²、久保田稔¹

Effect of Mouthrinse on the Surface Properties of Resin Composite

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

²Department of Dental Materials Science and Technology, School of Dentistry, Iwate Medical University

○MASUYAMA Tomoyuki¹, NEZU Takashi², KUBOTA Minoru¹

【目的】

近年、う蝕予防や歯肉炎の抑制などを目的として洗口剤が普及しつつあるが、洗口剤の長期使用がコンポジットレジンの表面性状に影響を及ぼすことが懸念されている。特に洗口剤には、溶剤としているアルコールがレジン表層の物性を低下させる事が考えられる。本研究では、この点を明らかにするため、レジンに洗口剤に間欠的および連続的に浸漬したときの表層数 μm のダイナミック硬さ、弾性率およびスヌープ硬さの変化を調べた。

【材料および方法】

コンポジットレジンとして Z250 (3M ESPE) を用いた。洗口剤として、エタノールを約 20% 含むリステリン (ファイザー) とエタノールを含まないオーラツウ (サンスター) を用いた。比較として 20% のエタノールと蒸留水を用いた。

内径 7.0 mm、厚さ 1.5 mm のステンレス製金型にコンポジットレジンペーストを充填、上面よりポリエステルフィルムを介して手指圧でガラス板を圧接し、歯科用ハロゲン照射器 (JET ライト 3,000、J. Morita US) を使用して 40 秒間照射し、円盤形の試料を作製した。その後、試料を金型から取り出し、耐水研磨紙と研磨用ラッピングフィルムシート (3M) にて #800 から #3000 まで研磨した。

作製したコンポジットレジン試料は、蒸留水 10ml の入った蓋付きバイアル内に 1 個ずつ入れ、37°C 恒温水槽中にて 24 時間保管した。その後、リステリン、オーラツウ、20% エタノールおよび蒸留水を浸漬液とし、以下の 3 条件で浸漬を行った (n=5)。

A 群: [洗口剤または 20% エタノール (30 秒間) → 蒸留水 (6 時間)] × 6 回繰り返す

B 群: [洗口剤または 20% エタノール (10 分間) → 蒸留水 (6 時間)] × 6 回繰り返す

C 群: 洗口剤または 20% エタノール (1 時間)

各試料について浸漬後にダイナミック硬さ、弾性率およびスヌープ硬さを測定した。測定にはダイナミック超微小硬度計 DUH-W201S (島津製作所) を用い、測定は 1 試料につき 3 点測定した。

得られた値から平均値および標準偏差を求め、一元配置分散分析および Tukey's Test を用いて統計学的検定を行った (p<0.05)。

【結果と考察】

スヌープ硬さはすべての条件下において有意差を示さなかった。これは従来の報告と合致するものであった。

これに対し、右図に示すダイナミック硬さは、エタノールを含むリステリンおよび 20% エタノールへ浸漬後に有意に低下し、エタノールを含まないオーラツウおよび蒸留水では有意な変化は生じなかった。弾性率はダイナミック硬さと同様な変化を示した。

これらの結果から、エタノールを含む洗口液は短時間 (30 秒) の接触によってもレジンに浸入し、レジン表層のダイナミック硬さと弾性率を低下させることが明らかになった。

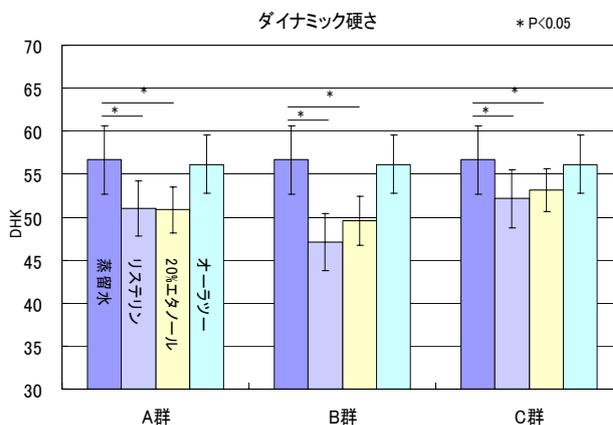


図 4 種の浸漬液へ浸漬後のレジンのダイナミック硬さ (A,B,C は上記の浸漬条件)

光重合型コンポジットレジンのインサイザルシェードの色について

明海大学歯学部機能保存回復学講座保存修復学分野

○小澤 有美 廣瀬 直子 加藤 高士 市村 葉 片山 直

Color of Incisal-shade Composites resin

Department of Restorative and Biomaterials Sciences Division of Operative Dentistry

Meikai University School of Dentistry

○Yumi Ozawa Naoko Hirose Takashi Katou You Ichimura Tadashi Katayama

【目的】 光重合型コンポジットレジンは、各社数種類のシェードを揃えて市販され、天然歯と調和のとれる歯冠修復処置が可能となってきている。今回の実験で用いたインサイザルシェードは、エナメル質ウ蝕やエナメル質形成不全、酸蝕症などエナメル質の欠損の際に用いられる為、色相を合わせるだけでなく透過光のコントロールも行って修復処置を行っていかねばならない。光重合型コンポジットレジンのインサイザルシェードを2種の測色器を用いて測色を行い、インサイザルシェードの色について検討を行った。

【材料および方法】 本実験に用いた材料は、インサイザルシェードの光重合型コンポジットレジジン CLEARFIL MAJESTY-T(クラレメディカル 以下、M)、BEAUTIFIL II-Inc(SHOFU 以下、B)と ESTELITE Σ QUICK-CE(トクヤマデンタル 以下、Σ)を使用した。試料は内径8mmのプラスチックリングに各種コンポジットレジンを填入し、ハロゲンランプ重合器 (Astral) にて40秒間光重合を行い、耐水研磨紙 (BUEHLER) #600で即日研磨し光を遮蔽した水中下にて保存、24時間後#800、#1200の順に厚さ0.5mmと1mmになるように研磨を行い、各種5個製作した。試料は、白色板と黒色板、グレー色票(L*値75~15)および、反射光のみ測色できるよう試料背景が空洞になっているところに置き Spectra Scan PR650 (Photo Research, USA、非接触式分光測色器、D65光源、45度照明—0度受光)、Crystaleye(OLYMPUS、非接触式測色器、LED、45度入射の拡散反射式)にて各試料を5回ずつ測色した。色の測定方法は、JIS Z 8722に準拠して各試料の測色を行った。

【結果および考察】 各コンポジットレジンの透明性を調べるため Translucency parameter (以下、TP値)および Contrast ratio(以下、CR値)を算出し比較検討をおこなった。また、グレー色票上で測色した時と反射光のみ受光するよう測色した時の CIELabにおけるL*値を求めた。

その結果、TP値は0.5mmの試料では37.94~43.96、1mmの試料は29.59~42.48であった。CR値は0.5mmの試料では0.25~0.32、1mmの試料は0.32~0.43であった。TP値は値が大きいほど、CR値は値が小さいほど透明性が高いことを示すが、試料の厚さ0.5mmの方が全ての試料において透明性が高かった。また、種類別で比較をするとBとΣは同程度の値となり、MはBやΣより透明性の高い値を示した。グレー色票上での結果は、どの試料も背景色の影響を受けグレー色票のL*値が小さくなるにつれ試料のL*値も小さくなった。TP値とCR値の結果と同じ傾向を示しMのL*値はBやΣより小さい値を示した。反射光のみ受光したときのL*値は、グレー色票のL*値15上での値と同程度の値となった。測色器別で比較すると臨床で用いられる Crystaleye に比べ PR650の方が高い値を示す傾向であったが、3種類のコンポジットレジンのCIE色空間上での位置関係は同様の傾向を示した。

【結論】 各種コンポジットレジンのインサイザルシェードの色を比較すると

- 1) 厚さが変わると透明性も変化した
- 2) 種類が異なると透明性も異なっていた

実際に臨床でインサイザルシェードを用いる際、残存歯質との色調の調和のみならず、天然歯の半透明性を理解することが重要である。よって、臨床に沿った更なる検討が必要だと思われた。

積層充填によるコンポジットレジンの色について

明海大学歯学部機能保存回復学講座保存修復学分野
○逸見恵里 村井宏隆 中村英世 石原祥世 片山 直

Colorimetric Study of Composite Resin for Layering Technique

Department of Restorative and Biomaterials Sciences Division of Operative Dentistry
Meikai University School of Dentistry

○ Eri Hemmi Hiroataka Murai Hanayo Nakamura Sachiyo Ishihara Tadashi Katayama

【緒言】MI (Minimal Intervention) という概念のなか、光重合型コンポジットレジンによる修復が重視されるようになった。また、材料学的性質が向上し臼歯部においてもコンポジットレジンが多用されるようになった。特に審美性に優れた修復が注目されているが色調を天然歯に一致させるには、数種類の色調のコンポジットレジンを使用し積層充填しなければならず、材料の構成成分により様々な色調を現すため色調の選択・充填の術式に熟練が必要であるのが現状である。コンポジットレジン色調は周囲の歯質の色に大きく影響され、フィラー、マトリックスの構造の違いが色の適合性にも重要な役割を持っている。今回、球状フィラーと不定形フィラーを含有した 3 種類のコンポジットレジン色調を測色し比較検討した。

【材料および方法】材料は、トクヤマデンタル社のエステライトΣ (以下EΣ)、エステライトΣクイック (以下ΣQ)、エステライトPクイック (以下PQ) のA3シェードを使用した。試料は内径8mmのプラスチックリングに填入し、上下面をセルロイドストリップスおよびガラススライドで圧接して、ハロゲンランプ重合器 (Astral) にてEΣは30秒、ΣQとPQは10秒間照射し光重合させ、24時間後耐水研磨紙 (BUEHLER) #600、#800、#1200の順に、0.5mm、1.0mm、1.5mm、2.0mmの厚さになるように両面研磨を行い、試料を各5個製作した。試料の背景に白色板と黒色板を用いて、分光測色器 Spectra Scan PR650 (Photo Research, USA、非接触型分光測色器、D65光源、45度照明-0度受光) において作製した試料を JIS Z8722 に準拠して測色した。得られた値より TP 値、CR 値を計算した (実験1)。また、同様の試料を使い、1.0mm (0.5×2)、1.5mm (0.5×3、0.5+1.0、1.0+0.5)、2.0mm (0.5×4、1.0×2、0.5+1.5、1.5+0.5、0.5+0.5+1.0、0.5+1.0+0.5、1.0+0.5+0.5) の厚さになるように組み合わせ、Refractive Index Liquid 1.50 溶液を各ディスク間に介在し重ねて同条件で色の測定を行った (実験2)。

【結果】実験1: 白色背景上でのL*値は、どの試料でも厚みが大きくなるにつれ値が低くなる傾向となり、黒色背景上では、逆に値が高くなる傾向となった。a*値、b*値では、白色、黒色背景上では厚みが大きくなるにつれ、値は大きくなる傾向を示した。また、それぞれコンポジットレジンと同じ厚さでの色差は、EΣとΣQではL*値、a*値ともあまり差が認められなかった。b*値では2.0mmでEΣの方が大きい値を示した。ΣQとPQでは、L*、a*、b*値ともどの厚さでもΣQの方が大きい値を示した。TP値、CR値では、厚さが大きくなるにつれてTP値は低くなり、逆にCR値は、大きくなる傾向を示した。実験2: 単層と比較した結果では、重ねる枚数が多い方が色差が大きかった。また、重ねる枚数が少ない方が色差があまり認められなかった。

【考察】実験1より、L*値から不定形フィラー含有のレジンと球状フィラー含有のレジンでの違いでは、不定形フィラー含有のPQが低い値を示したことで明度を低下させる一因と考えられる。また、球状フィラーを持つΣとΣQでは、ΣQの値が低いことから、マトリックスの成分でも明度を低下させるものと考えられ、透明度に影響することが考えられた。実験2では、それぞれの試料の厚さに影響されるが、枚数が多くなることで明度が低下することから内部での光の散乱などが影響すると考えられる。

【結論】フィラー、マトリックスの構成成分と積層充填の方法がコンポジットレジン色調に影響を与えるものと思われた。

新規歯面コーティング材の経時的口腔内変化

- 色調変化とチッピングの頻度 -

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野

¹新潟大学歯学部口腔生命福祉学科

○小林千夏、竹中彰治、若松里佳、韓臨麟、福島正義¹、興地隆史

Short-term clinical evaluation of a newly developed tooth coating material-Color change and chipping frequency-

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

¹Department of Oral Health and Welfare, Faculty of Dentistry, Niigata University

○ KOBAYASHI Chika, TAKENAKA Shoji, WAKAMATSU Rika, HAN Linlin,

FUKUSHIMA Masayoshi¹, OKIJI Takashi

【目的】新規歯面コーティング材“ビューティコートTM”（松風）は口腔内の審美性への要求や関心の高まりに応じて、歯質に対する侵襲を最小限に抑えた治療を実現しうるものとして注目されている。しかしながら本材は、比較的短期間のうちに着色、摩耗、破折等が懸念される。そこで本研究では、口腔内における経時的色調変化とチッピングの頻度を観察するとともに、患者の満足度を質問票調査により検討した。

【材料および方法】本研究の趣旨を説明し協力の同意を得た20代から40代の本学学生および歯科医師8名を被験者とした。事前にBW1-BW4の各シェードペーストをプライマー処理を行わずに上顎中切歯にそれぞれ塗布し、被験者に希望シェードを選択させた。次いで上顎前歯6本を歯面清掃ののち、プライマー処理後、歯面コーティング材を塗布し10秒間光照射後、グロスエフェクトを塗布し、さらに30秒間光照射した。その後、1～3日後にバフ研磨で表面を研磨した。なお、歯面コーティング材の塗布は1名の術者により行われ、塗布後に切端被覆がないことを確認した。

色調変化については、術前および研磨直後、1週、2週、3週後に歯頸部（歯肉辺縁から1mm上方）における色調（CIEL^{*}a^{*}b^{*}）を歯科用色彩計（シェードアイNCC, 松風）で計測し色差（ ΔE ）を求めることで検討した。また、生活習慣（術前）、色調改善への関心（同）、使用感および満足度（3週間後）について質問票調査を実施するとともに、チッピングの有無を毎日観察させ、明瞭な因果関係として発生原因を認識した場合は申告させた。

【成績および考察】質問票の回収率は100%であった。使用感に関して「味は気にならない」を87.5%が選択、「おいは気にならない」を62.5%が選択、「唇や歯肉の違和感は気にならない」を50%が選択した。

選択されたシェードはBW1（75%）もしくはBW2（25%）であり、コーティング材塗布により術前と比較して $\Delta E(SD)=7.97(2.79)$ の色調変化が得られた。研磨直後と比較して1週後で中切歯0.84(1.95)、側切歯1.41(2.43)、犬歯1.14(1.85)、2週後でそれぞれ0.76(1.70)、1.75(2.02)、1.42(1.74)の色差が計測された。中切歯において、各週ごとの有意差は認められなかった（Mauchlyの球形検定（ $p>0.01$ ）球面性の仮定（ $p>0.05$ ））。側切歯および犬歯においては、各週の色差は有意差があり（Mauchlyの球形検定（ $p<0.01$ ）, Greenhouse-Geisserの ϵ 修正による検定（ $p<0.05$ ））、研磨直後と比較して1週後（Dunnett-test, $p<0.05$ ）および2週後（Dunnett-test, $p<0.01$ ）に色差に変化が認められた。さらに、時間経過とともに光沢感が減少し歯間部の着色が目立つ傾向があり、塗布後1週間で2名、2週間で3名が着色を認知しており、「塗布後の満足度はどれくらい持続しましたか？」の問いへの回答は「1週まで」が12.5%、「2週まで」が37.5%、「3週まで」が50%であった。チッピングは4名（50%）に認められ、その原因として「硬いものを前歯で噛んだ」あるいは「硬い歯ブラシによるブラッシング」が報告された。

【結論】コーティング材の色差は時間とともに減少傾向にあった。着色などによる色調変化への不満やチッピングの発生を鑑み、本材を暫間的な色調改善ツールとして位置づけるとともに、患者に定期的な来院を促すとともに満足度の変化に配慮すべきであることが示唆された。

歯面処理材及び歯面コート材が KTP レーザーを用いた 漂白エナメル質表面に及ぼす影響

昭和大学歯学部齶蝕・歯内治療学講座

森川長志 増田宜子 木下潤一郎 東光照夫 久光久 松本光吉

Effects of tooth coating materials and finishing agents on
bleached enamel surface by KTP laser

Department of Clinical Cariology and Endodontology,

Showa university school of Dentistry

Takeshi Morikawa Noriko Masuda Junichirou Kinoshita Teruo Toukou

Hisashi Hisamitsu Koukichi Matumoto

【目的】

本研究の目的は、漂白後のエナメル質表面に歯面処理材及び歯面コート材を用いその後の漂白エナメル質表面の変化をコート材を用いないものとで比較、検討することである。

漂白には、通常 35%過酸化水素を用いる Office Bleach、10%過酸化尿素を用いる Home Bleach があり、最近では KTP レーザーを用いる漂白が行われている。しかし、臨床において漂白後にフッ素もしくはフッ素含有の研磨剤での仕上げが行われるのみであり、漂白後のエナメル質への処理についての報告はあまり多くない。漂白により、エナメル質表面は耐酸性の低下、知覚過敏、再着色を惹起すると報告されている。有色飲食物、喫煙など制限は困難である。それらのことをふまえ、本研究においてエナメル質表面を歯面処理材及び歯面コート材を用いて処理し、その後の漂白エナメル質表面の形状と色調変化を比較、検討する事とした。

【材料及び方法】

被験歯には湿潤下に保管した 35 本のヒト抜去歯を用いた。漂白材として 27%過酸化水素を用いて KTP レーザーで漂白した。漂白処置は 30 秒 1W で行った。表面処理剤にはフッ素ジェル (Smartbleach kit)、ナノハイドロキシアパタイト含有歯面処理材(サンギ Renamel)、歯面コート材としてホワイトコート (クラレメディカル) を用いた。

被験歯をフッ素のみ、フッ素にコート材を加えたもの、Renamel のみ、Renamel にコート材を加えたもの、フッ素に Renamel を加えたもの、これにコート材を加えたもの、漂白のみ行ったものの 7 群に 5 本ずつ分けた。7 日間 37℃ 湿潤下に静置した後コート材を除去し漂白エナメル質表面の性状を SEM (走査型電子顕微鏡) にて観察した。また、漂白前後及びコート材除去後に歯科用彩色系シェードアイ NCC(松風) にて色調を測定した。

【結果】

歯面処理材とコート材を組み合わせたものは、組み合わせなかったもの及び他のものに比べ表面の粗さは小さかった。また、表面性状にあまり変化がなかった。色調の変化も術前と術後で歯面処理材とコート材を用いたものの方が 1.5 倍ほど大きかった。色の後戻りが小さかったことが示された。

【考察】

漂白後のエナメル質表面への影響を少なくする処理材として、歯面コート材が有効である可能性が示唆された。

フッ化ジアンミン銀による着色歯に対し、保存的に審美性を改善した症例

¹⁾ 稲葉歯科医院、²⁾ 日本歯科大学新潟生命歯学部歯科保存学第2講座

○稲葉 友良¹⁾²⁾、加藤 千景²⁾、鈴木 雅也²⁾、新海 航一²⁾、加藤 喜郎²⁾

Esthetic Improvement with Conservative Treatment on Permanent Incisors Discolored by Saforide

¹⁾Inaba Dental Clinic, ²⁾Department of Operative Dentistry, The Nippon Dental University School of
Life Dentistry at Niigata

○INABA Tomoyoshi¹⁾²⁾, KATO Chikage²⁾, SUZUKI Masaya²⁾, SHINKAI Koichi²⁾ and KATOH Yoshiroh²⁾

【緒言】 フッ化ジアンミン銀は、齲蝕進行を抑制する作用がある反面、金属イオンにより歯質に着色を引き起こすことが知られている。患者がこの着色を審美障害と捉えた場合、確実に除去する方法がないため、対応に苦慮することとなる。今回我々は、学童期の前歯部におけるサホライド（ビーブランド・メディコ・デンタル）による着色に対して、生活歯漂白法、ならびに歯面コート材の応用により、保存的に審美性の改善が得られた症例について報告する。

【症例の概要】 患者：平成15年7月初診、8才女児。主訴：前歯部の着色。現病歴：他院にて齲蝕治療を受け、帰宅後、保護者が着色に気づき転院。現症：上顎右側乳犬歯、上顎左側中切歯、側切歯、乳犬歯、第一乳臼歯に黒色の着色を認める。診断名：フッ化ジアンミン銀による着色歯。治療計画：ハイライト（松風）による生活歯漂白を行う。結果：1回の来院につき2回の漂白処置を行い、来院回数2回で着色範囲ならびに濃度の減少を認め、患者ならびに保護者の満足が得られたため一旦終了とした。経過：定期的な経過観察と予防処置の必要性を説明したが来院中断。平成19年8月、学校検診により齲蝕を指摘され来院。着色歯は萌出が進み、歯列中において相対的に縮小しかのように見え、濃度の軽減も認める。患者の希望により、残存着色部に対しホワイトコート（クラレメディカル）による被覆を行い、満足が得られた。



図1 初診時。広範囲の着色を認める



図2 漂白処置終了時。着色範囲・濃度の軽減を認める。



図3 4か年経過後。



図4 着色残存部をホワイトコートにより被覆した。

【考察とまとめ】 日常臨床において、フッ化ジアンミン銀による着色が主訴となるケースは稀ではあるが、使用に際しては、事前に十分なインフォームドコンセントを行い、審美障害の訴えを未然に防ぐことが重要である。本症例の場合、萌出途中の学童期であることから、ラミネートベニア修復は審美的に予後不良であると推測される。また、着色歯の硬組織に実質欠損を認めないことから、切削を伴うコンポジットレジン充填なども、MIの観点から好ましくない。ハイライト（松風）は、金属塩による着色歯に対しては効果が認められないことから禁忌としているが、他に選択肢が無い場合、患者ならびに保護者の同意を得た上で、生活歯漂白法を行った。着色を完全に除去するには至らなかったが、切削すること無く患者ならびに保護者の満足が得られたことから、本法の有用性が示唆された。4か年経過後には、さらに着色濃度の軽減を認めた。これは脱灰と再石灰化の平衡のなかで、表層着色部の置換が行われたこと、ならびに歯磨き等によるわずかな摩耗などが原因であると推察する。今後、思春期を迎えるなど患者の成長過程で、着色が心理的な負担とならないような配慮も必要であると考えられる。ホワイトコート（クラレメディカル）による待機的治疗を行いつつ、切削を伴う審美修復の開始時期についての検討も含め、現在経過観察を継続中である。

臨床使用条件がオフィスホワイトニング効果に及ぼす影響

鶴見大学歯学部第一歯科保存学教室
○飯田麻理子, 近藤愛恵, 清水園子, 大森かをる, 桃井保子

Effect of various clinical conditions on office whitening
Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine
○IIDA Mariko, KONDO Yoshie, SHIMIZU Sonoko, OHMORI Kaoru and MOMOI Yasuko

【研究目的】2.5~3.5%という低濃度の過酸化水素水に、光触媒の二酸化チタンを添加することでホワイトニングを可能にしたオフィスホワイトニング材「ピレーネ」(三菱ガス化学)が2006年に開発された。ピレーネの使用説明書に、LED照射器を使用する場合は約5分の照射時間(ハロゲン照射器では3分)を要すると明記されている。一般的に波長のピークが460nm付近にあるLED照射器はホワイトニングへの使用が懸念されていたが、最近では消費電力が少なく光源の寿命が長く、コードレスが可能であるなどの利点のあるLED照射器が急激に普及しつつある。そこで本研究ではハロゲン照射器と、LED照射器とによる二酸化チタン含有オフィスホワイトニング材のホワイトニング効果を、ヘマトポルフィリン染色試験紙およびヒト抜去歯で検証した。

【材料および方法】使用したオフィスホワイトニング材:ピレーネ。2液混合後の過酸化水素水の濃度は3.5%である。照射器:ハロゲン照射器(Optilux 501, Demetron, 以後0-501), およびLED照射器(Bluephase G2, IVOCCLAR VIVADENT, 以後B-G2)を使用した。

1) ヘマトポルフィリン染色試験紙に対する効果:試験紙に光硬化型レジンにて直径1cm高さ1mmの隔壁を作製し、その中に薬液60 μ Lをマイクロピペットで塗布し、薬液面と照射口の先端を1mm離して、0-501では3分間、B-G2では5分間(ともにメーカー指示時間)光照射した。(その間、紙面の乾燥を防ぐために、1分照射毎に10 μ Lの薬液を追加し攪拌した。)その後薬液を拭き取り、塗布と照射の操作を3回繰り返し水洗した。

2) ヒト抜去歯に対する効果:抜去歯エナメル質表面を歯面研磨材にて研磨し、光硬化型レジンにて直径5mm高さ1mmの隔壁を作製して被験面を規定し、薬液15 μ Lをマイクロピペットで塗布し、上記1)と同様の2条件で薬液面からの1mm離して光照射した。(その間2分照射毎に5 μ Lずつ薬液を追加した。)その後薬液を拭き取り、同様に塗布と照射を3回繰り返し水洗した。

測色:分光式色差計(SE-2000, 日本電色)を用いた。試験紙は隔壁内の5定点を測色し平均値を求めた。ヒト抜去歯はホワイトニング後水中に保管し、20分後と12時間後に隔壁の中心1点を測色した。測定したCIELab均等知覚色空間のL*a*b*の値から色差(ΔE^*ab)を算出した。

統計:上記1), 2)それぞれ0-501とB-G2の色差を、*t*-test ($P < 0.01$)で統計解析した。

【結果】それぞれの色差の平均値と標準偏差を以下の表に示す。(⇔間に有意差あり)

| | Optilux 501 | Bluephase G2 |
|-------------------------|----------------|------------------|
| 1) ヘマトポルフィリン染色試験紙 (n=4) | 29.9 \pm 5.5 | ⇔ 78.3 \pm 2.3 |
| 2) ヒト抜去歯 (n=5) 20分後 | 11.0 \pm 3.7 | ⇔ 18.9 \pm 3.2 |
| 12時間後 | 8.4 \pm 2.6 | 10.2 \pm 3.5 |

【考察】特異的に波長のピークが460nm付近にあるLED照射器はホワイトニングには不向きと考えられていた。特にピレーネにおいては含有する二酸化チタン光触媒反応波長が400nm以下であることから、使用説明書に記載されているように380~420nmの波長域を含む照射器が適している。またピレーネではLED照射器を使用する場合、照射時間はハロゲン照射器よりも長い時間を指定している。しかし、本研究でピレーネへのLED照射器の応用はむしろ有効であることが示唆された。ただし、供試したBluephase G2は460nmに加えて415nm付近にもピークがあるため、推奨の使用条件に合うLED照射器であり、また高出力を持つことがその結果につながったものと考えられる。

オフィスブリーチング材によるエナメル質漂白後の色彩学的分析

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯冠修復学分野

○藤本 将幸、堀田 正人、小竹 宏朋、作 誠太郎、山本 宏治

Colorimetric Analysis of Human Enamel with Office Bleaching

Asahi University, School of Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation, Department of Operative Dentistry

○Fujimoto Masayuki, Hotta Masato, Kotake Hiroto, Saku Seitaro, Yamamoto Kohji

緒言

漂白における最大の関心事は言うまでもなく歯質の色彩変化である。エナメル質は半透明であり、歯の色彩を表現するには透明度が大きく関係している。したがって、漂白することにより、エナメル質自体の光透過性がどのように変化するか詳細に検討することが重要である。一方、オフィスブリーチ剤のピレーネが2006年、国内で認可、発売された。この主成分は二酸化チタンを配合した低濃度3.5%の過酸化水素水である。また漂白後にはステインなどの再付着防止の目的で歯面研磨を行うことが推奨されている。そこで本実験ではオフィスブリーチ剤の松風ハイライトとピレーネを用い、漂白後のエナメル質研磨の有無によってエナメル質の全光線透過率、拡散光線透過率、平行光線透過率および透過光強度分布にどのような変化が起こるか検討した。

材料および方法

ヒト抜去上顎中切歯を用い、エポキシ樹脂に包埋後、直径10mm、厚さ約1mmに切り出したエナメル質切片を耐水研磨紙(#600~#2000)で順次研磨した。漂白は松風ハイライト(松風)とピレーネ(モリタ)を用い、メーカーの指示に従い、1週間間隔で行い、術前、3回(当日)、6回(7日後)、9回(14日後)、12回(21日後)、15回(28日後)とし、漂白後の試料は、フッ素研磨ペースト(メルサーージュ、松風)とメルサーージュカップ(松風)にて、20秒間歯面研磨したものとしなかったものに分け、蒸留水中に浸漬した。各試料は濁度計(NDH-300A、日本電色)を用いて、全光線透過率、拡散光線透過率、平行光線透過率について測定を行い、一元配置分散分析と多重比較検定Sheffeを用いて、有意差検定($p<0.05$)を行った。また、3次元自動変角光度計(GP-200、村上色彩技術研究所)を用い、透過光強度分布測定を行った。

結果および考察

松風ハイライト、ピレーネとも漂白により全光線透過率、拡散光線透過率、平行光線透過率ともに低下する傾向を示した。しかし、有意差は認められなかった。また低下する様相も漂白剤により異なり、ハイライトは漂白9回まで徐々に低下する傾向を示し、漂白12、15回では9回より上昇した。ピレーネは低下と上昇を交互に繰り返していた。透過光強度分布においては、漂白前の光拡散に比べて、漂白後の光拡散性が最も大きかった回数は、ピレーネ/研磨なしでは3回、12回、9回であり、ピレーネ/研磨ありでは15回、6回、6回、ハイライト/研磨なしでは9回、9回、9回、ハイライト/研磨ありでは9回、12回、15回であった。その代表例を下図に示す。



図：代表試料の透過光強度分布

まとめ

漂白により光線透過率は低下する傾向を認め、透過光線の分布状況から光の拡散性が多くなることが判明したが、漂白の回数を重ねることでその傾向が顕著になることはなかった。

ホワイトニング剤が修復物の機械的性質に及ぼす影響

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, 穴田歯科医院³
○加藤亜樹¹, 安田源沢¹, 植草智史¹, 井上直樹¹, 田村ゆきえ¹, 黒川弘康^{1, 2}, 宮崎真至^{1, 2}, 穴田直仁³

Effect of Whitening Agent on Mechanical Properties of Restoratives

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

Nihon University School of Dentistry, ANADA Dental Clinic³

○KATO Aki¹, YASUDA Genta¹, UEKUSA Satoshi¹, INOUE Naoki¹, TAMURA Yukie¹,

KUROKAWA Hiroyasu^{1, 2}, MIYAZAKI Masashi^{1, 2} and ANADA Naohito³

【研究目的】

生活歯のホワイトニングは、歯質を削除することなく白い歯を望む患者の希望に応えることができることから、その臨床要求が拡大しており、最近では、修復処置がなされた口腔内に対するホワイトニング症例も増加している。このような場合、ホワイトニング剤が歯質だけでなく修復物に接触する可能性が考えられるが、ホワイトニング剤が接触した修復物の機械的性質あるいは表面性状の変化に関しては不明な点が多い。そこで、ホワイトニング剤が、光重合型レジン¹の機械的性質および表面性状に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

供試したホワイトニング剤は、ホームホワイトニング用のハイライトシェードアップ (松風) であり、光重合型レジンとしてはクリアフィル AP-X (クラレメディカル) およびクリアフィルマジエスティー (クラレメディカル) の 2 製品を用いた。

レジン試片を製作するために、内径 4 mm、高さ 2 mm の円筒形白色テフロン型にレジンペーストを充填、60 秒間照射し硬化させ、1 時間後に型から取り出した。これを、37°C の精製水中に 7 日間保管した後、SiC ペーパーの #600 および #2000 を用いて照射面から 0.5 mm を研磨した。このレジン試片に対し、37°C、湿度 80% の湿箱中で 2 時間ホワイトニング剤を塗布し、この操作を、1 日 1 回、28 日間連続して行ったものをホワイトニング試片とし、以下の測定に供した。

1. 弾性率測定：超音波送受信装置としてパルサーレーザー (Model 5900, Panametrics), オシロスコープ (Wave Runner LT584, Lecroy) および試料台からなるシステムを用い、超音波透過法により縦波ならびに横波で発せられる超音波の伝播時間をそれぞれ測定し、それぞれの音速を求め、試片の密度とから弾性率を求めた。
2. ヌープ硬さ測定：ヌープ硬さの測定は、微小硬さ測定器 (DMH-2, 松沢) を用い、荷重 0.25 N、荷重保持時間 30 秒の条件で行った。ヌープ硬さの測定部位は、試片の中央部付近 5 点ずつとし、その平均値を各測定時期のヌープ硬さとした。
3. FE-SEM 観察：一定期間の塗布を終えた各試片について、通法に従って臨界点乾燥を行った後、金蒸着を施し、FE-SEM (ERA-8800FE, Erionix) を用いて加速電圧 15 kV の条件で観察を行った。

超音波の伝播時間の測定時期としては、ホワイトニング前、7、14、21 および 28 日後とし、ヌープ硬さの測定は、ホワイトニング前および 28 日後に行った。また、試片は実験期間を通じて 37°C の精製水中に保管し、試片数は各実験につき 5 個とした。

【成績および考察】

光重合型レジンの弾性率は、ホワイトニング期間の延長に伴い上昇するものの、いずれの製品においても実験期間を通じて有意差は認められなかった。これは、10% の過酸化尿素であるシェードアップが、光重合型レジン¹の後重合および機械的性質に影響を及ぼさないことを示すものと考えられた。また、ホワイトニング剤塗布前と比較して塗布 28 日後でホワイトニング試片の表面性状および微小硬さに著明な変化は認められなかった。したがって、フィラーの種類あるいは含有量に関わらず、ホワイトニング剤のレジン試片表層に及ぼす影響は認められないことが示された。

【結論】

ホワイトニング剤が光重合型レジン¹の機械的性質および表面性状に及ぼす影響は認められないことが判明した。したがって、修復処置がなされた口腔内に対しても、適切な指導の下であれば、積極的にホワイトニングを行なうことが可能であることが示唆された。

トレー法を併用したアスコルビン酸誘導体含有ジェルによる 歯肉メラニン色素沈着改善効果の検討

1) 新潟大学大学院医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野

2) 田井デンタルクリニック

○鈴木育世¹⁾、島田靖子¹⁾、長谷川麻衣子¹⁾、田井秀明¹⁾²⁾、吉江弘正¹⁾

Improvement of gingival melanin pigmentation by using an ascorbic acid derivative
component gel in custom bleaching tray.

1) Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

2) TAI DENTAL CLINIC

○Ikuyo SUZUKI¹⁾, Yasuko SHIMADA¹⁾, Maiko HASEGAWA¹⁾, Hideaki TAI^{1) 2)} and Hiromasa YOSHIE¹⁾

【背景・目的】

歯肉メラニン色素沈着は病的なものではないが、前歯部に多く見られるため審美的問題として取り上げられている。メラニン色素はメラニン産生細胞（メラノサイト）により、チロシンおよびドーパからドーパキノンやユーメラニン等の中間物質を経て生成される。アスコルビン酸誘導体は化学的に不安定なアスコルビン酸を安定な形にした活性型ビタミンCであり、生体内に吸収後アスコルビン酸に再変換され、抗酸化作用やメラニン色素の生成阻害作用などを及ぼすことが知られている。2007年度秋季日本歯科保存学会での我々の報告で、アスコルビン酸誘導体含有ジェルは *in vitro* や *in vivo* において、有効な美白効果を示した。*in vivo* での報告では、指による塗布であったが、唾液の影響を受けて希釈されてしまうため、トレーを用いて製剤の濃度を一定状態にした際の効果の増強の有無や即効性について検討を行った。

【材料および方法】

2008年4月現在、新潟大学歯学部在籍する学生、ならびに医歯学総合病院に勤務する歯科医師12名（非喫煙者・上顎前歯部頬側角化歯肉に軽度のメラニン色素沈着を認めるもの）を対象とした。使用製剤は10% Asc-2-O- α -グルコシドとメントールを含む基剤を製剤として使用し、プラセボはこの製剤から10% Asc-2-O- α -グルコシドを除去したものを使用した。トレーは、上顎前歯部歯肉頬移行部まで覆う形とし、ジェル塗布部位は歯肉頬移行部から1mm入った部位より歯肉辺縁から1mmはなれた部位までシートワックス分のスペーサーおき、正中で左右に分かれる形（スプリットマウス法）とした。左に製剤、右にプラセボの塗布を1ヶ月間行い、使用前、1・2・3・4週後で分光色差計（日本電色工業株式会社製 SE-2000）による計測を行った。計測は、1被験者あたり、上顎左右犬・側切歯間、側・中切歯間歯肉の4点（それぞれL2, L1, R1, R2）の角化歯肉の色調を計測し、1ヶ所につき3回ずつ測定したものの平均値を個々の測定値とした。同時に、口腔内写真撮影も行った。今回、対象者と計測者には左右どちらが製剤かを知らせず、ダブルブラインドにて行い、期間終了後にアンケートを採取した。

【結果】

肉眼的な変化としては、時間の経過とともに、製剤側のメラニン沈着部分の辺縁が不明瞭に変化していくことがわかった。色差計の計測値は、製剤側/プラセボ側の比を用いて解析を行った。L*値はほぼ変化なく、a*値は減少傾向、b*値は上昇傾向にあったが、いずれもベースライン時から第4週まで統計学的有意差は認められなかった。アンケートによる製剤側正答率は66.7%であった。

【考察】

今回の結果より、トレー法を用いるよりも前回報告した指で塗布する方法のほうが有効な結果となった。これは、指によるマッサージ効果が影響しているのではないかと考察している。表面に一定濃度で接触させているよりも指で塗布した方が有効に製剤が浸透するのではないかと推察する。

【結論】

アスコルビン酸誘導体含有ジェルの塗布に対して、トレー法の有効性は確認できなかった。今後、更なる検討・解析が必要である。

弱酸性次亜塩素酸水溶液を用いた試作漂白材の開発に関する研究

神奈川県立歯科大学口腔治療学講座歯内療法学分野, 保存修復学分野¹⁾
○西村 知子, 青柳 佳伸, 岡田 周策¹⁾, 寺中 敏夫¹⁾, 石井 信之

The Bleaching Effect of HClO Solution.

Division of Endodontics, Division of Restorative Dentistry¹⁾

Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College

○Nishimura Tomoko, Aoyagi Kashin, Okada Shusaku¹⁾, Teranaka Toshio¹⁾, Tani-Ishii Nobuyuki

【目的】

審美への関心が高まるにつれ、白い歯への憧れから歯牙漂白の需要が増加している。しかしながら、高濃度の過酸化水素水を用いるウォーキングブリーチや生活歯のオフィスブリーチングなどでは、歯質や歯周組織への傷害が示唆されてきた。次亜塩素酸 (HClO) は多形核白血球の異物 (細菌) 処理作用時に産生され、作用後は生体内に残留しないことから生体親和性を有する分子として食品衛生管理等への応用が期待されている。カンファ水 (Campher ; ハセツパー技研) は次亜塩素酸ナトリウムと希塩酸との希釈混合水溶液として HClO を有する殺菌剤として平成 14 年に食品添加物として認定された。カンファ水中の全遊離有効塩素に占める HClO の比率は pH4.5 で 100% を示すが、pH6.7~7.0 においても 80% を維持し、室温で 33 日間保管後も遊離有効塩素濃度減少率は約 15% と非常に安定性の高い水溶液である。歯牙漂白にカンファ水を用いて漂白効果が期待できれば安全な漂白材として使用することが可能になる。今回、われわれは弱酸性次亜塩素酸水溶液を用いて歯牙の漂白を行い、臨床応用への可能性を検討した。

【材料および方法】

抜去ウシ前歯象牙質を 5 X 5mm に切り出し、回転研磨機にて研磨処理した象牙質ブロックを試料とした。着色液には 150ml の蒸留水で紅茶 (BROOKE BOND HOUSE, BROOKE BOND) 10g を 1 時間煮出して抽出した紅茶液を使用した。試料は未処理群、漂白処理群 (カンファ水) をそれぞれ 10 試料ずつに分類した。未処理群は着色した試料を 37°C 蒸留水に、漂白群は着色した試料を 37°C の弱酸性次亜塩素酸水溶液 (有効塩素濃度 200ppm, pH6.5) にそれぞれ 6 日間浸漬した。また、2 日に 1 度測色および液の交換を行った。漂白効果の測定は、シェードテイキング用デジタル測定器 (クリスタルアイ ; ペントロンジャパン) を使用して、各試料の処理前、処理後のシェード、Lab 系色彩値および処理前後の色差を計測した。

【成績ならびに考察】

カンファ水による歯牙漂白を検討した結果、1 回の漂白回数で著しい変化が見られ ΔE^*ab はエナメル質、象牙質ともに $\Delta E^*ab > 3.3$ の「肉眼的に色の変化が認められる値」を大きく上回った値を示した。カンファ水による漂白群は、L 値 (明るさ) の上昇、a 値 (赤-緑) および b 値 (黄-青) の低下が見られ、さらに、 ΔE^*ab の値は未処理群の値と有意差が認められた。カンファ水による漂白は水溶性の着色 (紅茶) に対して漂白効果が認められた。

今後、臨床応用を想定してバイタルブリーチングおよびウォーキングブリーチへの応用を行い、安全性の確認および歯牙への影響およびそれぞれの用途に適した形状、用法・用量の規定などについても検討が必要と考えられる。

感染防止のための光照射器先端被覆材が照射光量ならびにコンポジットレジンの象牙質への 接着強さに与える影響

東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存分野

○遠藤達雄、安倍 敏、笹崎弘己、小松正志

The effect of infection-control barriers on the light intensity of light-cure units and adhesive strength between composite resin and dentin.

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

ENDO Tatsuo, ABE Satoshi, SASAZAKI Hiromi, KOMATSU Masashi

【研究目的】

近年、歯科治療において感染防止対策の重要性が広く認識されてきている。一般歯科臨床において最も高頻度に行われる治療の一つであるコンポジットレジン修復において必須の診療器具である光照射器の先端部分を、病原性微生物やウイルスから保護するための被覆材が使用されるようになってきている。一方、こういった被覆材料は光を遮蔽する効果があるため、使用する事によって光照射器の照射光量を減弱させ、コンポジットレジン修復の予後に大きな影響を与える因子の一つであるコンポジットレジンと歯質間の接着に影響する可能性がある。本研究の目的は光照射器先端に被覆材を使用することによる、光照射強度の減衰程度と接着強さに与える影響を調べることにある。

【材料および方法】

1. 照射光量測定

照射光量計としてDENTSPLY社製Cure Rite™を用いた。東北大学病院附属歯科医療センター保存修復科外来および保存学分野研究室に設置されているハロゲンタイプ16台とLEDタイプ2台計18台の光照射器の照射光量を測定し、さらに照射器先端の被覆材として用いるPinnacle社製Cure Sleeve™を使用した状態での測定を行い比較した。測定回数は各群5回とした。

2. 接着強さ測定

クロラミンTに長期保管したヒト抜去大臼歯歯冠エナメル質を削除後、象牙質被着面を耐水研磨紙#320まで平坦に仕上げた。この象牙質面に窩洞を模したステンレス製枠を固定し、ボンディングシステムとしてGC社製G-BOND及び試作GBA400、クラレメディカル社製Clearfil[®] Mega bond_R及びClearfil S³ Bond[®]のいずれかを製造者の指示に従って適用後、クラレ社製コンポジットレジンClearfil[®] AP-Xを用いて充填し光照射を60秒間行った。照射器には松風社製ハロゲン照射器Glight IIを用いた。試料数は被覆材使用の有無各群6とし、接着試料作成後直ちに37℃水中に保管して24時間後にクロスヘッドスピード0.5mm/分で引っ張り接着強さを測定して比較した。

【結果および考察】

1. 照射光量

今回測定に用いた光照射器の照射光量の平均値は、被覆材なしでは $168 \pm 2 \text{mW/cm}^2 \sim 1454 \pm 10 \text{mW/cm}^2$ を示したが、被覆材ありでは $160 \pm 2 \text{mW/cm}^2 \sim 1279 \pm 9 \text{mW/cm}^2$ に低下していて低下率は最小5%から最大20%、平均 $13 \pm 4\%$ を示した。二元配置分散分析によって被覆材使用により有意($P < 1.7/10^{73}$)に照射光量は低下することが示され、各照射器間にも有意差($P < 1.1/10^{182}$)が認められた。被覆材使用による照射光量低下に比較すると、長期間の照射器使用による光量低下がきわめて大きいため、照射器には定期的な光量の検査が必要であることが示された。

2. 接着強さ

被覆材なし群では $13.9 \pm 4.3 \sim 16.1 \pm 1.9 \text{Mpa}$ 、被覆材あり群では $12.6 \pm 2.6 \sim 14.5 \pm 3.7 \text{Mpa}$ を示し、二元配置分散分析によって被覆材使用の有無による有意差($P < 0.297$)は無く、ボンディングシステム間にも有意差($P < 0.734$)は認められなかった。接着強さ試験に用いたハロゲン照射器の被覆材使用による光量低下は10%であったが、この程度の光量低下では接着強さに影響を与えないものと考えられた。

【結論】

- 18台の照射器を用いた照射器先端に使用する感染防止のための被覆材(Cure Sleeve™)使用により照射光量は有意に低下し、低下率は平均 $13 \pm 4\%$ であった。これに対して象牙質面に対する接着強さは被覆材使用によっても低下しなかった。
- 長期間の照射器使用による光量低下はきわめて大きいため、照射器には定期的な光量の検査が必要であることが示された。

塩化カルシウム, 象牙質マトリックスタンパク質 (DMP1) 由来合成ペプチド (pA,pB) ならびに
 ハイドロキシアパタイト配合接着性レジンシステムの象牙質接着強さに関する検討

¹日本歯科大学大学院 新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学専攻

²日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第2講座

○平 賢久¹, 新海航^{1,2}, 鈴木雅也², 加藤千景², 加藤喜郎²

Study on Dentin Bond Strength of Experimentally Developed Adhesive Resin Systems Containing
 CaCl₂, Synthetic Peptide Derivatives (pA,pB) of Dentin Matrix Protein 1 and Hydroxyapatite

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

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

○TAIRA Yoshihisa¹, SHINKAI Koichi², SUZUKI Masaya², KATO Chikage², KATOH Yosiroh²

【研究目的】

当講座の加藤らはこれまでに象牙質マトリックスタンパク質(DMP1)由来合成ペプチド(pA,pB)を配合した高分子系直接歯髄覆罩剤を開発し、ラットを用いた動物実験で直接歯髄覆罩効果について検討した結果、歯髄に重篤な炎症性変化を惹起させることなくデンチンブリッジが早期に形成されることを確認している。

しかしながら、このような高分子系直接歯髄覆罩剤を添加することにより従来のボンディング剤の組成・機能が変化し、歯質接着強さを低下させることが懸念された。そこで今回我々は、DMP1 由来合成ペプチド(pA,pB)配合接着システムによるヒト抜去歯・象牙質に対する微小接着強さを測定、比較検討したので報告する。

【材料と方法】

ヒト抜去歯の咬合面を削除し、平坦な象牙質面(各群につき 5 歯)を形成した(耐水研磨紙#120→#600)。次に露髄面の止血処理に準じて象牙質面をAD-Gel[®](10%NaClO:クラレメディカル)で1分間処理後、Purelox[®](6%NaClO:オーヤラックス)とOxydol[®](3%H₂O₂:三共)で交互洗浄、フィシザルツ[®](滅菌生理食塩水:扶桑薬品)による最終洗浄後、乾燥させた。次に、表1に示すpA,pB配合接着システムを用いて接着処理を行った。まずプライマーI・プライマーIIを各々塗布して20秒間放置後、5秒間強圧エアブローを行い、10秒間光照射(Candelux[®]:モリタ)した。その後、ボンドMB2(10wt%ハイドロキシアパタイト配合)を塗布して軽圧エアブローで薄くのばしてから10秒間光照射した。なお、コントロール(Cont)としてクリアフィル・メガボンド[®](MBP・MBB)を用いた。象牙質面に透明アクリルチューブ(内径6mm、高さ3mm)を固定し、接着処理面に約1mmの厚さでクリアフィル・マジスティ[®]LV(A3)を塗布し20秒間光照射、次にクリアフィルAP-X[®](A3)を約2mm積層充填して40秒間光照射した。恒温高湿器中に接着試料を24時間保管した後、ISOMET[®](BUEHLER)により象牙質接合界面断面面積が、1mm²になるように角柱型ビームを作製し、微小引張り試験用器具(Bencor-multi-T試験器:Danville Engineering)に取り付けて小型卓上試験機EZTest 500N(島津)を用いてクロスヘッドスピード0.5mm/minで微小引張り接着試験を行った(n=20)。ANOVAとBonferroni検定による統計学的解析を行い実験群間の有意差を検定した。(p<0.05)。

【結果および考察】

微小引張り接着試験の測定結果を表2に示す。塩化カルシウムあるいはpA,pBをプライマーに配合した直接歯髄覆罩剤(実験群①、②、③)の象牙質接着強さは実験群④およびコントロールと比較して有意に低い測定値を示した。したがって、プライマーへの塩化カルシウムあるいはpA,pBの配合は象牙質接着強さを低下させることが確認された。

表1 DMP1 由来合成ペプチド(pA,pB)配合接着システム

| | プライマーI | プライマーII | ボンド |
|------|--------------|------------|------------------------|
| 実験群① | 塩化カルシウムプライマー | DMP1 プライマー | MB2(10 wt%ハイドロキシアパタイト) |
| 実験群② | 塩化カルシウムプライマー | MBP | MB2(10 wt%ハイドロキシアパタイト) |
| 実験群③ | MBP | DMP1 プライマー | MB2(10 wt%ハイドロキシアパタイト) |
| 実験群④ | MBP | MBP | MB2(10 wt%ハイドロキシアパタイト) |
| Cont | MBP | | MBB |

表2 微小引張り接着強さ (MPa)

| 実験群 | 接着強さ (Mean±SD) |
|------|--------------------------|
| 実験群① | 15.4±5.4 |
| 実験群② | 36.3±12.7 ^a |
| 実験群③ | 42.6±9.9 ^{a,b} |
| 実験群④ | 49.9±11.4 ^{b,c} |
| Cont | 52.7±8.7 ^c |

同一文字は有意差なし
 (p>0.05)

LED 照射器の照射時間についての多角的評価

鶴見大学歯学部第1 歯科保存学教室
○池島 巖, 宮内貴弘, 萩原慎之輔, 松澤紀彦, 桃井保子

Multiple Evaluation of the Curing Time for LED Curing Units

Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine
○IKEJIMA Iwao, MIYAUCHI Takahiro, HAGIWARA Shinnosuke, MATSUZAWA Norihiko, MOMOI Yasuko

LED 照射器の照射時間はメーカーカタログ等によると, 従来のハロゲンランプ照射器の 1/2 から 1/4 とされている。本研究では, 臨床使用を想定して安全にコンポジットレジン硬化させる LED 照射器の照射時間について検討した。

材料および方法 9 種の LED 照射器, bluephase G2 (ivoclar vivadent 以下 G2), Curenos (SHOFU 以下 CN), DC Blue LEX (YOSHIDA 以下 DC), L. E. Demetron II (KERR 以下 LII), L. E. Demetron I (KERR 以下 LI), Pencure (J. MORITA 以下 PC), G-light (GC 以下 GL), Translux Power Blue (Heraeus Kulzer 以下 TL), bluephase (ivoclar vivadent 以下 BP) とハロゲン照射器 Optilux 500 (KERR 以下 O5) を用いた。

実験 1 : LII を除く全ての照射器について, 分光光度計にて, 波長ごとの相対光強度を測定した。

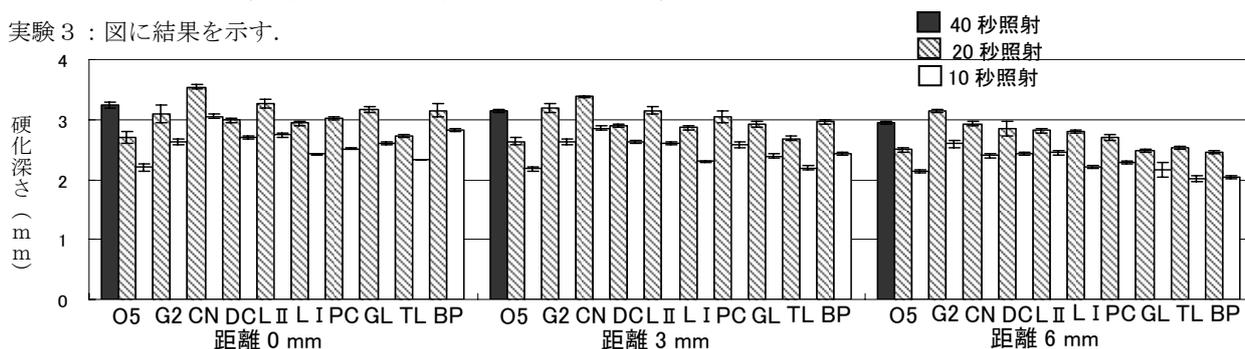
実験 2 : 全ての照射器について, 歯科用ライトメーターにて, 光強度を測定した。ただし, 臨床での使用を考慮して, ライトガイドをライトメーターに接触させた状態 (0 mm) と, 3 mm, 6 mm 離れたところからの計 3 条件の測定とした。

実験 3 : 全ての照射器について, ISO 4049 に準じて, 光重合型コンポジットレジン (XRV Herculite, A2, KERR) の硬化深さを測定した。照射時間は O5 で 10, 20, 40 秒, LED 照射器で 10, 20 秒とした。また, 実験 2 と同様に, 照射距離をそれぞれ, 0, 3, 6 mm の 3 条件で行った。

実験 4 : LI を除く全ての照射器について, 6 種のコンポジットレジン, Filtek Z250 (3M ESPE), SOLARE (GC), PREMISE (BODY) (KERR), BEAUTIKIL (SHOFU), ESTELITE Σ (Tokuyama), CLEARFIL MAJESTY (KURARAY) のそれぞれ A2, A4 シェードの硬化深さを測定した。ただし, ライトガイドとコンポジットレジンの距離は 6 mm とし, 照射時間は実験 3 を参考にして O5 で 40 秒, LED 照射器では 4 種を 20 秒, 残る 4 種を 40 秒とした。

成績 実験 1 : O5 は 490 nm をピークに 390~510 nm の範囲の光を放射していた。LED 照射器は 450~470 nm をピークに半値幅約 25 nm の光を放射していたが, G2 と GL ではさらに 400~420 nm 付近に小さなピークが認められた。実験 2 : 距離を離すと, 全ての照射器で光強度は減少したが, 減少の大きさは照射器ごとに異なっていた。

実験 3 : 図に結果を示す。



距離 6 mm では G2, CN, DC, LII は O5 の 1/2 の照射時間でほぼ同等の硬化深さを示した。GL, TL, BP は O5 と同じ照射時間でほぼ同様の硬化深さであった。LI と PC は両者の中間的な硬化深さであった。

実験 4 : 全てのコンポジットレジンの 2 つのシェードで, 実験 3 と同様な傾向となり, G2, CN, DC, LII は O5 の 1/2 の照射時間でほぼ同等の硬化深さを示した。

結論 6 mm 離れた条件では, 4 種の LED 照射器の照射時間をハロゲンランプ照射器の 1/2 に短縮できると思われた。

*なお本研究の 1 部は第 125 回日本歯科保存学会学術大会 (2006 年秋) にて報告した。

デジタル画像を用いた咬合面う蝕診断
- 口腔内カメラ Penscope の応用 -

東京医科歯科大学

- 1 大学院医歯学総合研究科 包括診療歯科学分野 総合診療歯科学,
- 2 歯学部附属病院 歯科総合診療部
- 3 大学院医歯学総合研究科 包括診療歯科学講座 歯科医療行動科学分野
- 4 医歯学教育システム研究センター

○梅森 幸¹, 礪波健一², 新田 浩³, 荒木孝二⁴, 俣木志朗³

Diagnosis of occlusal caries using digital image
- Application of intraoral camera, Penscope -
Tokyo Medical and Dental University

Sachi Umemori¹, Ken-ichi Tonami², Hiroshi Nitta³, Kouji Araki⁴, Shiro Matak³

Tokyo Medical and Dental University

- 1) General Dentistry, Department of Comprehensive Oral Health Care, Division of Comprehensive Patient Care, Graduate School
- 2) Oral Diagnosis and General Dentistry, Dental Hospital
- 3) Behavioral Dentistry, Department of Comprehensive Oral Health Care, Division of Comprehensive Patient Care, Graduate School
- 4) Center for Education Research in Medicine and Dentistry

【緒言】

我々は検診等スクリーニング応用可能な画像解析によるう蝕診断法を開発する目的で、デジタル画像を用いた咬合面う蝕診断の検討を行ってきた。その結果、抜去歯を用いた研究で着色部形態のフラクタル次元が臨床的診断名と相関があるということが明らかになった¹⁾。本研究では口腔内カメラ(Penscope)を用いて患者の口腔内を撮影し、咬合面小窩裂溝着色部のフラクタル次元とう蝕診断指標(う蝕深度、DIAGNOdent 値)との関係を検討した。

【材料および方法】

東京医科歯科大学歯学部附属病院外来患者の咬合面小窩裂溝部に着色を有する臼歯 23 本(小臼歯 6 本、大臼歯 11 本、智歯 6 本)を被験歯とした。う蝕深度(C0, C1, C2)と DIAGNOdent (Kavo, Germany) 値を診査後、Penscope による撮影で得られたデジタル写真について、画像解析ソフト(Image J, NIH, USA)を用いて画像処理および解析を行い、フラクタル次元を求めた。その後それぞれのう蝕深度において、フラクタル次元、咬合面に占める着色部位の面積の割合、DIAGNOdent 値の関係を検討した。

【結果および考察】

各う蝕深度におけるフラクタル次元、咬合面に占める着色部位の面積の割合および DIAGNOdent 値との関係を表に示す。フラクタル次元、咬合面に占める着色部位の面積の割合および DIAGNOdent 値はう蝕深度とともに大きくなる傾向を示した。臨床的診断名とフラクタル次元、咬合面に占める着色部位の面積の割合および DIAGNOdent 値との間の相関係数は、それぞれ 0.84, 0.84 および 0.80 となり、統計的に有意な相関をみとめた (Spearman の順位相関係数, $P < 0.01$)。特にフラクタル次元は C0 と C1 の間で大きく変化し、抜去歯にて得られた結果と同様の傾向を認めた。以上の結果より、Penscope を用いて求めたフラクタル次元は咬合面う蝕の診断に有用である可能性が示唆された。

| う蝕深度 | C0 n=12 | C1 n=3 | C2 n=8 |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|
| フラクタル次元 (SD) | 1.061 (0.194) | 1.402 (0.023) | 1.507 (0.094) |
| 咬合面に占める着色部位の面積の割合 (SD) | 0.003 (0.004) | 0.010 (0.011) | 0.051 (0.022) |
| DIAGNOdent 値 (SD) | 8.20 (3.36) | 41.9 (8.00) | 49.6 (28.3) |

【参考文献】

- 1) う蝕診断を目的とした臼歯小窩裂溝部着色形態のデジタル画像分析に関する基礎的研究: 日歯保存誌 49, 725-730. 2006

演題 P23 (歯内)

【0603】

骨内インプラントにおけるスクリーホール内の細菌叢

Identification of Bacterial Flora from Screw Holes in Endosteal Implant

渡邊浩章 藤井理絵 山口透子 井原郁夫 浅井知宏 中川寛一

WATANABE H, FUJII R, YAMAGUCHI Y, IHARA I, ASAI T, NAKAGAWA K

東京歯科大学歯内療法学講座

Tokyo Dental College, Department of Endodontics, Pulp and Periapical Biology

I 目的：フィクスチャーアバットメント接合部には微細なギャップがあり、スクリーホールのコンタミネーションが生ずる事が報告されている。Persson らや Quirynen らはブローネマルクインプラントのスクリーホール内の細菌同定を試みているが、形態や性質、グラム染色、などによる古典的な方法によるものである。近年、より正確な菌種同定を目的として分子化学的方法が細菌の同定に応用されている。今回我々は、免荷期間中キャップにて封鎖されているスクリーホール内の細菌叢の検索を PCR 法を用いて行った。

II 概要：骨内インプラントを埋入した 5 症例の患者から試料を採取した。インプラントスクリーホール内に滅菌精製水を入れ攪拌した後、ペーパーポイントで採取し、それを試料とした。好気または嫌氣的に 1 週間培養し、さらに純粋培養を行った。個々のコロニーより DNA を抽出し、さらに DNA の増幅を行った。ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer を用いて DNA 断片の配列を決定し、細菌種の同定を行った。

III 結果：5 症例から 19 菌株 9 菌種が同定された。Lactococcus lactis、Pseudomonas aeruginosa 以外はすべて通性または偏性の嫌気性菌であった。

IV 考察および結論：今回我々は PCR 法によってインプラント周囲炎に関連があると思われるスクリーホール内の細菌叢の同定を行った。インプラントスクリーホール内の細菌の存在はインプラント周囲炎の原因および進行に影響を及ぼすことが考えられる。インプラントスクリー内の細菌叢を調べ細菌種の同定を行うことはインプラント周囲炎の発症・治療・予後を考える上で有用であると考えられる。

マイクロCTを用いた日本人上顎第一大臼歯口蓋根管の三次元的解析

東京歯科大学歯内療法学講座¹⁾、東京歯科大学解剖学講座²⁾

柏木 勢¹⁾、山田雅司¹⁾、石川智子¹⁾、加藤広之¹⁾、井出吉信²⁾、中川寛一¹⁾

Three Dimensional Analysis of Palatal Root canal of Japanese Maxillary First Molar using Micro-CT
Department of Endodontics, Pulp and Periapical Biology¹⁾, Department of Anatomy²⁾, Tokyo Dental
College

Sei KASHIWAGI¹⁾, Masashi YAMADA¹⁾, Tomoko Ishikawa¹⁾, Hiroshi KATO¹⁾, Yoshinobu IDE²⁾, Kan-Ichi
NAKAGAWA¹⁾

1. 目的

上顎第一大臼歯の根管形態では、近心頰側根管が細く複雑に分岐するのに対して、口蓋根管は比較的太く、ほとんどが単根管である。この比較的単純な形態とされる口蓋根管であっても、根管処置後の再治療率は高いとする報告もみられ、何らかの特徴的な解剖学的形態が内在されている可能性も考えられる。そこで今回我々は、マイクロCTでヒト上顎第一大臼歯を撮影し、三次元立体画像構築ソフトにて非破壊的に作成した立体構築像を用いて口蓋根の根管形態の観察ならびに計測を行った。

2. 材料および方法

試料は、東京歯科大学解剖学教室所蔵の日本人上顎第一大臼歯を60本用いた。撮影はマイクロCT (HMX225-ACTIS 4 TESCO, Inc.) にて行った。試料はマイクロCTの試料台と、設定した歯軸が直角するように設置して撮影した。撮影条件は、管電圧100kV、管電流75 μ A、倍率10倍、スライス幅50 μ mで行った。マイクロCTで得られたデータから、ボリュームレンダリング法にて三次元立体画像構築を行った。立体構築像の作製・計測には、三次元立体画像構築ソフトVG-studio (Nihon Visual Science, Inc.) を用い、口蓋根管の分岐率、根管形態の検索を行った。

3. 結果

主根管分岐は観察されず、すべて単根管であった。根管口では頰舌側に強く圧扁され、根管の最大・最小幅径差が大きかったが、これ以降では近遠心幅径がやや大きな楕円形を呈する傾向が認められた。根管中央付近では根管彎曲が多く観察された。根尖部では半数以上で歯根尖と根尖孔開口部が一致せず、加えて約35%の歯牙で根尖分岐が観察された。

4. 考察

主根管分岐の発現は従来の報告と同様に、本研究でもほとんど観察されなかった。一方、根尖分岐の発現率は従来の研究に比べ10数%高かった。これはマイクロCTの高い描写能力により、従来の手法では観察が難しかった微細な根尖分岐を検出する事ができたためと考えられた。一般に根管治療の臨床で比較的容易と捉えられがちな口蓋根管だが、根尖分岐の存在と根管口から根尖部に至る根管の横断面形態や方向の推移など、治療成功率に関わる主根管分岐以外の形態学的因子の三次元的特徴をさらに明確にする必要があると考えられた。

根尖部における歯根と根管の形態 (第7報) 上顎小白歯

松本歯科大学 歯科保存学第2講座

○山口 祐美、前田 美樹、内山 真紀子、
山田 博仁、安西 正明、山本 昭夫、笠原 悦男

Morphometric Observations on Root Canal of Maxillary premolar

Department of Endodontics and Operative Dentistry, Matsumoto Dental University

○YAMAGUCHI Hiromi, MAEDA Miki, UCHIYAMA Makiko, YAMADA Hirohito, ANZAI Masaaki,
YAMAMOTO Akiyo and KASAHARA Etsuo

【研究目的】

より適切で効果的な根管処置を施すためには、根管形態の十分な知識が必要であり、個々の歯種の形態的な特徴やバリエーションを含めた傾向についても認識把握した上で、臨床手技的な基礎を構築することが肝要である。

我々は、歯種・根管別に透明標本による観察を行い、主として根管形態、根管の太さ、彎曲度、副根管の分布や発生頻度などについての調査結果を分類統計し、本学会にて報告してきた。これらの観察結果から、拡大機器が根尖孔に到達し得ない症例や根尖切除術を要する症例に対応するためには、根尖部根管についてのより詳細な形態を、歯根との関係とともに把握することが必要と考え、本学会において、第117回→上顎中切歯、第118回→上顎側切歯、第125回→上顎犬歯、第126回→下顎切歯、第127回→下顎第1小白歯、第128回→下顎第2小白歯に対する根尖部形態の詳細な観察結果を報告した。今回は上顎小白歯についての同様の観察・調査を行ったので報告する。

【材料および方法】

10%ホルマリン水中に保管した天然抜去上顎小白歯 500 歯について、真空注入法で墨汁を注入した後、通法に従って透明標本を作製し、歯根形態、分岐形態を分類した上で、各々について、根尖孔-1、-2、-3、-4、-5mmのレベルごとに根管の幅径を頬舌、近遠心の両方向から計測し、さらに歯根・根管・根管壁の幅径を頬、舌、近心、遠心の4方向にて計測した。加えて、それぞれのレベルにおける歯根・根管の分岐、単根管については単純根管とリボン状根管の判別、さらに分枝の状況についても調査を行った。

【結果】

| 単根 幅径 (単位:mm,av.) | | レベル | -0.5mm | | -1mm | | -2mm | | -3mm | | -4mm | | -5mm | |
|----------------------|------|-----|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | | 根管 | 単 | 複 | 単 | 複 | 単 | 複 | 単 | 複 | 単 | 複 | 単 | 複 |
| 歯根 | 頬舌 | B-L | 2.11 | 3.02 | 2.82 | 3.70 | 3.76 | 4.79 | 4.47 | 5.56 | 5.02 | 6.12 | 5.56 | 6.45 |
| | 近遠心 | M-D | 1.23 | 1.12 | 1.57 | 1.45 | 1.97 | 1.91 | 2.25 | 2.31 | 2.48 | 2.57 | 2.71 | 2.78 |
| 根管 | 頬舌 | B-L | 0.52 | 0.38 | 0.62 | 0.38 | 0.85 | 0.42 | 1.08 | 0.47 | 1.30 | 0.58 | 1.58 | 0.68 |
| | 近遠心 | M-D | 0.31 | 0.26 | 0.34 | 0.28 | 0.40 | 0.31 | 0.46 | 0.39 | 0.53 | 0.49 | 0.61 | 0.67 |
| 根管壁 | 頬側壁 | B | 0.84 | 0.60 | 1.11 | 0.80 | 1.43 | 1.09 | 1.66 | 1.27 | 1.81 | 1.47 | 1.95 | 1.64 |
| | 舌側壁 | L | 0.73 | 0.47 | 1.07 | 0.75 | 1.46 | 1.12 | 1.72 | 1.36 | 1.88 | 1.55 | 2.02 | 1.70 |
| | 近心側壁 | M | 0.52 | 0.48 | 0.66 | 0.60 | 0.81 | 0.81 | 0.92 | 0.97 | 0.99 | 1.05 | 1.07 | 1.11 |
| | 遠心側壁 | D | 0.39 | 0.37 | 0.57 | 0.56 | 0.76 | 0.78 | 0.87 | 0.96 | 0.96 | 1.03 | 1.03 | 1.10 |
| 複根 幅径 | | 根管 | 単 | 複 | 単 | 複 | 単 | 複 | 単 | 複 | 単 | 複 | 単 | 複 |
| 歯根 | 頬舌 | B-L | 1.40 | 1.40 | 1.80 | 3.04 | 2.29 | 4.05 | 2.64 | 4.56 | 3.07 | 5.13 | 3.34 | 5.66 |
| | 近遠心 | M-D | 1.11 | 0.95 | 1.46 | 1.54 | 1.94 | 1.65 | 2.24 | 1.96 | 2.47 | 2.18 | 2.70 | 2.46 |
| 根管 | 頬舌 | B-L | 0.25 | 0.20 | 0.26 | 0.25 | 0.28 | 0.35 | 0.30 | 0.40 | 0.38 | 0.46 | 0.45 | 0.55 |
| | 近遠心 | M-D | 0.23 | 0.20 | 0.24 | 0.26 | 0.26 | 0.28 | 0.26 | 0.31 | 0.30 | 0.43 | 0.35 | 0.53 |
| 根管壁 | 頬側壁 | B | 0.62 | 0.80 | 0.79 | 0.84 | 1.00 | 0.85 | 1.11 | 0.86 | 1.23 | 1.00 | 1.26 | 1.10 |
| | 舌側壁 | L | 0.50 | 0.40 | 0.69 | 0.48 | 0.93 | 0.84 | 1.07 | 1.11 | 1.24 | 1.28 | 1.37 | 1.55 |
| | 近心側壁 | M | 0.46 | 0.55 | 0.62 | 0.63 | 0.86 | 0.73 | 1.01 | 0.93 | 1.12 | 0.98 | 1.23 | 1.11 |
| | 遠心側壁 | D | 0.42 | 0.20 | 0.60 | 0.63 | 0.83 | 0.68 | 0.96 | 0.73 | 1.05 | 0.78 | 1.13 | 0.83 |

ヒト抜去歯を用いた PROTAPER による根管拡大のマイクロ X 線 CT 評価 —根尖部での拡大の様相を中心に—

日本歯科大学新潟病院総合診療科
○江面 晃, 貝津 徹

Evaluation of Ni-Ti Instruments (PROTAPER) for Automatic Root Canal Shaping.
—Analysis by Microfocus X-Ray CT using Extracted Tooth—
Niigata Hospital, Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University
○EZURA Akira, KAIZU Toru

緒言

歯内治療において良好な経過・予後成績を得るには、まず創傷治癒に最も有利な根尖狭窄部までリーマー・ファイルを到達させ、根管の機械的・化学的清掃拡大を施す必要がある。次に汚染した根管内容物および根管壁の感染象牙質を除去し、根管を封鎖しやすい形に拡大形成をすることが予後を左右する重要な因子となる。大白歯などの根管では、かなり微妙な湾曲や狭窄を示すことが多く、狭く直視困難な口腔環境下なため、ほとんど手探りで施術される根管拡大形成は、高度のテクニックとある程度の時間を必要とする。

このような複雑な形態を有する根管の機械的拡大を行うには、これまでステンレススチール製の手用のリーマー・ファイルが広く用いられてきた。しかし、根管の拡大形成の機械化による効率化を目的として、電気エンジンと超弾性特性を有するニッケルチタン (Ni-Ti) 製ファイルを用いる方法が開発され販売されている。

今回われわれは、Ni-Ti 製ファイルとして PROTAPER (メルファ社製) とエンドモーターテクニカヴィジョン (メルファ社製) を用いて根管拡大形成を行い、根尖部での拡大の偏位量について手用 K-ファイルによる拡大形態とを比較検討を行った。

材料および方法

抜去時期不明の保管ヒト抜去歯で、大きなう蝕や修復処置のない上顎第 2 大白歯で解剖学的特徴を有した歯根完成歯を 10 歯用いた。被験歯は通法に従い髓室開拓を行い、電氣的根管長測定で作業長を決定し、一方は手用 K-ファイル (マイクロメガ社製) による根管拡大形成 (4 歯 12 根管)、他方は PROTAPER とエンドモーターテクニカヴィジョンによる根管拡大形成 (6 歯 18 根管) を行った。

マイクロフォーカス X 線 CT (島津社製作所: SMX-100CT-SV) 撮影は拡大前と拡大終了後で規格撮影を行い、根尖狭窄部での横断面での切削状態を Scion Image (Scion Corporation) を用いて測定し評価した。

結果

手用 K-ファイルと PROTAPER による根管拡大前と後の根尖狭窄部での横断面積の差を表に示す。口蓋根において手用 K-ファイルが PROTAPER より根尖狭窄部で有意に大きく拡大されていたが、近心頬側根と遠心頬側根では差は認められなかった。

手用 K-ファイルと PROTAPER による拡大前後の根尖狭窄部での面積の差

| | 手用 K-ファイル 4 歯 | | PROTAPER 6 歯 | |
|------------|---------------|------|--------------|------|
| | 平均値 (mm) | 標準偏差 | 平均値 (mm) | 標準偏差 |
| 近心頬側根 (MB) | 1.13 | 0.54 | 1.12 | 0.98 |
| 遠心頬側根 (DB) | 0.79 | 0.41 | 0.58 | 0.48 |
| 口蓋根 (P) * | 2.38 | 1.00 | 0.75 | 0.60 |

(*P<0.05 t-test)

結論

エンジン駆動 Ni-Ti 製根管器具 PROTAPER は、根尖狭窄部においてステンレススチールの手用のリーマー・ファイルと遜色ない拡大形成ができることが示唆された。

プロテーパーによる彎曲根管形成と根管壁変位量に関する研究

神奈川歯科大学 歯学部 口腔治療学講座 歯内療法学分野¹

湘南短期大学 歯科衛生学科²

○上田 剛史¹ 上島 茂明¹ 榎本 光夫¹ 大浜 美穂¹ 荻野 志保¹
徳永 幸世¹ 平嶺 倫子¹ 長谷 徹² 永井 旺介¹ 石井 信之¹

The Study of Double Curved Root Canal Preparation by ProTaper

Division of Operative Dentistry and Endodontics, Kanagawa Dental College¹ Shonan Junior College²

○Ueda Takeshi, Ueshima Sigeaki, Enomoto mitsuo, Ohama Miho, Ogino Shiho, Tokunaga Sachiyo,
Hiramine Michiko, Nagatani Tohru, Nagai Ohsuke and Tani-Ishii Nobuyuki

【目的】

彎曲根管の拡大形成に Ni-Ti ロータリーファイルの有効性が認められ、種々の形態を有する Ni-Ti ロータリーシステムが使用されている。第三世代 Ni-Ti ファイルのプロテーパー(DENTSPLY MAILLEFER)は可変テーパーを有し3～6本のファイルで最終根管形態が得られる Ni-Ti ファイルシステムである。本研究は、根管形成が困難とされる銃剣状彎曲根管の拡大形成を、プロテーパーを用いて行い、根管壁変位量を検討した。

【材料及び実験方法】

実験には、ダブルカーブを有する S 字タイプ透明根管模型 (Endo Training Block, Type-S; DENTSPLY MAILLEFER Ballaigues, Switzerland) 60 根管を使用した。プロテーパーファイルのロータリーエンジンは X-SMART (DENTSPLY MAILLEFER) を使用し、ファイルは SX, S1, S2, F1 の4本で根管形成を行った。根管形成は歯科大学卒業後2～4年の臨床経験を有する医局員6名によって行われた。根管形成終了後、根管壁変位量、根管形成に要した時間および偶発事故の有無について検討した。

プロテーパーによる根管形成法

- 1) ハンド #15K ファイルが抵抗なく到達した部位を仮作業長とし、根管形成時間の計測を開始した。
- 2) 仮作業長まで SX ファイル、X-スマートのプログラム 1 (250 rpm、4.0 Ncm) を用いて根管形成。
- 3) ハンド #15K ファイルにより作業長を決定。
- 4) S1 ファイル、プログラム 1 にて作業長まで到達させる。到達できないときは再度 SX ファイルにて根管形成。
- 5) S2 ファイル、プログラム 2 (250 rpm、1.2 Ncm) にて作業長まで到達させる。到達できないときは再度 SX ファイルにて根管形成。
- 6) F1 ファイル、プログラム 3 (250 rpm、1.6 Ncm) にて作業長マイナス 0.5mm まで到達させる。到達できないときは再度 SX ファイルにて根管形成。

根管形成変位量の評価は術前根管、術後根管を根尖孔から 7mm までの位置で 1mm の間隔に切削量を実体顕微鏡 Olympus SZX16 (Olympus) およびデジタルカメラ DP71 によりコンピュータ DP71-WPCXP に取り込みと計測用ソフト Win ROOF (三谷商事) を使用して計測した。

【成績及び考察】

S 字根管模型をプロテーパーで根管形成した結果、根尖部付近で外側、歯冠側で内側の切削量が増大する傾向が示された。ファイル破折及びレジ形成は6名中5名が経験し、おのおの合計5根管であった。破折ファイルは SX ファイル1本、S1 ファイル3本、F1 ファイルが1本であった。破折の原因は、SX ファイルによる根管上部の拡大が不十分であったと示唆された。根管形成時間に関しては形成本数が増えるに従って短縮する傾向を示し5本目以降の形成時間はすべて5分以内で終了した。プロテーパーによる S 字根管の根管形成を行った結果、根尖部で外側、歯冠側で内側の形成量が大きかったことにより根管は直線に近づいて形成された。これはプロテーパーの持つ大きなテーパーによるものと示唆された。

コスモ i キュアによる根尖到達度測定のマクロ CT による評価

日本歯科大学新潟病院総合診療科
○貝津 徹、馬場玲子、坂井 登、江面 晃

Evaluation of Reamer tip location measurement for Electrical root canal device Cosumo i cure by Microfocus X-Ray CT System

Niigata Hospital, Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University
KAIZU Toru, BABA Reiko, SAKAI Noboru, EZURA Akira

【研究目的】

砂田(1958)の電氣的根管長測定法の確立から、様々な電氣的根管長測定器が研究され臨床で使用されている。現在用いられている電氣的根管長測定器は、根管内の乾燥や浸出液などの環境に影響を受けずに正確な測定を行うためにマイクロコンピューターにより管理された二つの交流信号を用いて測定値を導き出している。今回われわれは、コスモペリオエンドシステム TYPE-F コスモ i キュア(以下コスモ i キュア)の機能の一つである、電気抵抗測定装置を用い、根尖到達度の精度についてマイクロフォーカス X 線 CT を用いて検討した。

【材料および方法】

1. 抜去時期不明の保管ヒト抜去歯で、大きなう蝕や修復処置のない解剖学的特徴を有する歯根の完成した上顎第二大臼歯 10 歯 (30 根管) を対象とした。
2. それぞれの抜去歯は通法に従い髓室開拓を行い、根管交互洗浄 (NaClO と H₂O₂) の後、#15K-ファイル (マイクロメガ社製) を挿入し、コスモ i キュアを用いて電氣的根管長測定を行った。被験歯の根尖部は生理食塩液に浸した綿花で覆い、#15K-ファイルをコスモ i キュアに接続し電気回路を作り測定した。測定値は操作手順に従い 0.0 を基準位置とした。
3. 根管長決定後、マイクロフォーカス X 線 CT (島津製作所: SMX-100CT-SV) を用い K-ファイルを挿入・固定した状態で撮影した。撮影したデータは 3D 骨梁構造計測ソフトウェア 3D ボーン (ラトック社製) を用い、根尖最狭窄部から根表開口部および K-ファイルの先端までの距離を計測した。

【結果】

1. 根尖最狭窄部から根表開口部までの平均は 1.00 mm であった。
2. 根尖最狭窄部から K-ファイルまでの平均は 0.75 mm 根表開口部寄りであった。
3. K-ファイルの位置は、すべて根管最狭窄部より根表開口部寄りであった。
4. 根表開口部から K-ファイルの先端までの平均距離は、MB 根管で 0.07 mm, DB 根管で 0.26 mm, P 根管で 0.43 mm であった。

【結論】

1. コスモ i キュアの電氣的根管長測定器では、根尖最狭窄部より平均 0.75 mm 根表開口部寄りにあった。
 2. 根表開口部から K-ファイルの先端までの位置が、最も根表開口部寄りを示したのは MB 根管で平均 0.07 mm であった。
 3. 0.0 の基準位置は、根尖最狭窄部よりやや根表開口部寄りであった。
- 以上から臨床上必要な精度で根尖狭窄部を示すことが可能である。

試作超音波レトロチップの有用性に関する基礎的研究

大阪歯科大学 口腔治療学講座
稲本 雄之, 馬場 忠彦, 林 宏行

Fundamental Study of a Trial Manufactured Ultrasonic Retrotip
Department of Endodontics, Osaka Dental University
INAMOTO Takeshi, BABA Tadahiko, HAYASHI Hiroyuki

逆根管充填窩洞形成用の超音波チップは数種類のものが市販されているが、それらはハンドピースに対するチップの角度が固定されている。われわれは、ハンドピースに対する角度が可変式のレトロチップを試作し、このチップの有用性を窩洞形成に要する時間と形成された窩洞の封鎖性について市販のチップと比較することによって検討した。

材料および方法

レトロチップ：#40 超音波ファイル (U-file、モリタ) の刃部を直角に曲げ、そこから 3mm の位置を切断したものを試作レトロチップ (以下 U-file チップ) とした。比較のための市販チップは SUPRASSON マイクロレトロチップ (P14D ユニバーサルタイプ, SATELEC, France) (以下 P14D) を用いた。

被験歯：ヒト抜去上顎前歯 40 本に対して、歯冠切断後 10%NaOCl および 3%EDTA 洗浄下で根管形成後、側方加圧根管充填を行った。その後、根尖 3mm を歯軸に対して垂直に切除した。歯をランダムに 4 群に分類して 2 種類のチップに各 15 歯、ポジティブコントロールとネガティブコントロールに各 5 歯ずつを実験に使用した。

形成時間の比較：U-file チップあるいは P14D を用いて各々 15 歯に歯軸方向へ深さ 3mm の逆根管充填窩洞を形成し、所要時間を記録した。なお、U-file チップは超音波ユニット (SOLFY、モリタ) に装着し、最大出力で窩洞形成を行った。P14D は超音波ユニット (SUPRASSON P-MAX, SATELEC) に装着し、出力 E-10 で窩洞形成した。

封鎖性の比較：窩洞形成した各々 15 歯にレジ系シーラー (SuperBond シーラー、サンメディカル) で逆根管充填を行った。ポジティブコントロールの 5 歯には窩洞形成し、逆根管充填を行わなかった。ネガティブコントロールの 5 歯には窩洞形成を行わなかった。U-file 群、P14D 群およびポジティブコントロール群の歯は根尖側の切断面を除いた歯根表面を、ネガティブコントロールの歯は切断面を含んだ全歯根表面をネイルバーニッシュで 2 回コーティングした。その後、歯を墨汁に 7 日間浸漬し、透明標本を作製し、色素浸透距離をマイクロSCOPE 観察下で計測した。

統計処理：形成時間および封鎖性の比較における統計処理には t 検定を用いた。

結 果

形成時間の比較：逆根管充填窩洞形成に要した時間の平均値は U-file 群が 35.9 秒、P14D 群が 57.7 秒であり、危険率 0.05% で有意差がみられた。

封鎖性の比較：U-file 群では 15 例中 7 例に色素浸透が見られ、その平均は 0.36mm であり、最大は 1.4mm であった。P14D 群では 15 例中 7 例に色素浸透が見られ、その平均は 0.70mm であり、根尖窩洞の全範囲に色素浸透が及ぶものが 2 例あった。U-file 群と P14D 群の間には有意差が見られなかった。

考 察

U-file 群のほうが形成に要する時間が短かった。これは、チップの材料や形状の差とも考えられるが、超音波発生装置や出力の差の影響を受けているため単純に比較はできない。U-file 群では超音波ユニットの最大出力で窩洞形成を行ったために形成時間が短くなった可能性が考えられる。窩洞封鎖性は、逆根管充填材料に接着性レジ系シーラーを用いたために U-file 群と P14D 群はともに良好であった。

結 論

試作超音波レトロチップで逆根管充填窩洞を形成してその所要時間および窩洞の封鎖性を検討したところ、所要時間は短く、封鎖性は良好であった。このことから、試作超音波レトロチップの有用性が示唆された。

逆根管充填材の物性に関する研究

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座

小澤稔史, 勝海一郎

A Study on Physical Properties of Retrofilling Materials

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

OZAWA Toshifumi, KATSUUMI Ichiroh

【はじめに】

EBAセメント(強化型酸化亜鉛ユージノールセメント)は、信頼性の高い封鎖材として逆根管充填時の根尖閉鎖に使用されているが、練和操作が物性に及ぼす影響については不明なことも多い。今回、EBAセメントの練和時の粉液比の違いが物性に与える影響を調べるとともに、通常の酸化亜鉛ユージノールセメント、近年、話題となっている Mineral trioxide aggregate (MTA) との比較、検討を行った。

【材料および方法】

EBAセメントはSuperEBA™(Bosworth, 米国, 以後SuperEBA)、通常の酸化亜鉛ユージノールセメントはネオダイン®-α(ネオ製薬工業, 以後ネオダイン)、MTAはProRoot® MTA (DENTSPLY, 米国)を用いた。物性試験は根管充填用セメントに関するISO規格の6876を参考に、流動性、操作時間、硬化時間、被膜厚さ、X線不透過性、溶解・崩壊性の各試験を、さらに封鎖性の検討のため色素浸透試験を行った。練和条件は、SuperEBAについては練和時の粉液比(L/P)を0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6の5条件に設定し、ネオダインとMTAについてはメーカー指示の標準粉液比で練和し各試験を行った。なお流動性試験は2.5kg荷重負荷下におけるガラス板間での試料の拡散した長さを、操作時間は拡散した長さが10%減少するまでに要した時間を、硬化時間は重さ100g、直径2mmのギルモア針の圧痕が試料に付与されなくなるまでの時間を、被膜厚さは1.5kg荷重負荷下におけるガラス板間での試料の厚さを測定することにより、X線不透過性は1mm厚の試料とアルミニウムステップの撮影後の濃度を比較することにより行った。色素浸透試験は、先端内面をカーボランダムポイントで粗造にした内径2mmのガラス管の先端4mm部に各封鎖材を填塞したのち、1%メチレンブルー溶液中に1週間、浸漬し、色素浸透距離をデジタルマイクロスコープで観察、測定した。なお各試験は、それぞれの材料の同一練和条件ごとの試料3個ずつについて測定を行い、その平均を測定結果とした。

【結果とまとめ】

SuperEBAは、液の増量により流動性が増大し、硬化時間が延長した。また液の増量により被膜厚さが減少し、X線不透過性が低下、溶解・崩壊性が増大する傾向がみられた。操作時間は、粉液比0.3, 0.4, 0.5では時間が延長する傾向がみられた。ネオダインは硬化が迅速なため操作時間の測定が不可能で、またMTAは初期硬化の進行が急速なため、流動性、操作時間、被膜厚さの測定が行えなかった。これら測定が行えなかった項目を除き各封鎖材の数値を比較してみると、SuperEBAは、ネオダインよりも流動性が大きく、被膜厚さは薄く、硬化時間は長く、また溶解・崩壊性が大きい傾向を示したが、X線不透過性はほぼ同等であった。MTAは、初期硬化は急速であったが硬化までに要した時間は三者の中で最長で、X線不透過性も強い傾向を示し、さらに溶解・崩壊性は最も大きかったが、色素浸透は最小であった。

今回の実験から、SuperEBAは練和時の粉液比の違いが物性に及ぼす影響が大きいことが認められたが、液の増量は溶解・崩壊性が増大するなど物性に悪影響を与えるため、充填操作に支障のない限りなるべく硬めに練和するのが好ましいことがわかった。今後、今回の実験で評価が行えなかった項目も含め、さらに詳細に検討を進めていく予定である。

根管充填法の違いが填塞率に及ぼす影響

- マイクロフォーカス CT を応用した根管充填の非破壊的評価 -

¹⁾ 日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座

²⁾ 日本大学歯学部歯科放射線学教室

³⁾ 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

清水 康平¹⁾, 羽鳥 啓介¹⁾, 亀岡 重雄²⁾, 松本 邦史^{2),3)}, 林 誠^{1),3)},

本田 和也^{2),3)}, 小木曾 文内^{1),3)}

The influence for obturating ratio using different root canal obturation techniques

-The evaluation of root canal filling using Micro Focus CT-

¹⁾ Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry,

²⁾ Department of Radiology, Nihon University School of Dentistry,

³⁾ Division of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

Kohei Shimizu¹⁾, Keisuke Hatori¹⁾, Shigeo Kameoka²⁾, Kunihito Matsumoto^{2),3)}, Makoto Hayashi^{1),3)},

Kazuya Honda^{2),3)} and Bunnai Ogiso^{1),3)}

【研究目的】

これまで、様々な方法により根管充填の評価がなされてきたが、X線による三次元的解析を用いた報告は少ない。そこで、本研究では Thermafil をはじめ、臨床で用いられている根管充填法の彎曲根管に対する填塞性の特徴を観察する目的で、彎曲根管模型および三次元マイクロフォーカス X線 CT を用いて、根管各部位における填塞状態を評価した。

【材料および方法】

実験には供試模型としてサーマフィルトレーニングブロック (Detsply Maillefer) を用い、Ni-Ti 製根管拡大形成用ファイルであるプロテーパー (Detsply Maillefer) にて SX ファイルから F2 ファイルまで拡大形成を行った。根管充填群は、Thermafil (TF) あるいは NT コンデンサーと Obturation Gutta NT (NT) を併用した垂直加圧充填群とした。TF および NT の填塞性は In vivo Micro X-ray CT System R_mCT (R_mCT, Rigaku) を応用して、根尖から 1mm, 3mm および 5mm の横断面画像により評価した。また、填塞率の評価は、根管充填前の供試模型を撮影したものを Control として比較検討した。

【結果および考察】

各観察部位における TF および NT 群の填塞率はほぼ同程度の高い値を示したが、填塞状態の観察では両群間で若干の相違が認められた。TF 群において根尖側 3mm および 5mm 部位では、コアプラスチックキャリアの周囲を比較的多量の軟化ガッタパーチャが占有する填塞状態であったのに対し、根尖側 1mm の部位では、コアプラスチックキャリア周囲の軟化ガッタパーチャ量はわずかであったが緊密性は高かった。これは、Thermafil による充填法がシステムティックに根管形成も含めて実施されることによるものと考えられた。一方、NT 群ではどの横断面画像においても、ガッタパーチャ内に気泡らしき像が観察され、これは NT コンデンサーのよる回転力を応用した充填法によるものと考えられた。

新ガンタイプ加熱根管充填器 HotShot による根管充填到達度の基礎的研究

¹ 神奈川県立歯科大学 口腔治療学講座 歯内療法学分野

² 湘南短期大学 歯科衛生学科

○榎本 光夫¹, 上田 剛史¹, 上島 茂明¹, 徳永 幸世¹, 長谷 徹², 永井 旺介¹, 石井 信之¹

The Basic Study of Apical Sealing Effects by HotShot

¹ Division of Endodontics, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College

² Department of Dental Hygiene, Shonan Junior College

Enomoto Mitsuo¹, Ueda Takeshi¹, Ueshima Shigeaki¹, Tokunaga Sachiyo¹,
Nagatani Tohru², Nagai Ohsuke¹, Tani-Ishii Nobuyuki¹

<目的> Obtura II は複雑な根管系を緊密かつ迅速に充填できる優れた根管充填法として開発され、槓状根や内部吸収歯、湾曲根管などに対しても十分に対応可能な根管充填法として広く使用されている。しかしながら、ニードル把持部分が高熱となり口唇を損傷するなどの欠点があった。これらの欠点が改善され、さらにコードレスとなり操作性が向上した新ガンタイプ加熱根管充填器 HotShot (DISCUS 社) が韓国および米国で発売された、本研究は、根管充填の操作性が改善された HotShot を使用して、根管充填到達度を Obtura II (Obtura 社) と比較検討した。

<材料および方法> 根管充填到達度；

実験 1；規格 J タイプ根管模型；HotShot および Obtura II の根管充填到達度は、規格根管形成模型を使用して行った。

規格根管模型は Pro-Taper F1 と同じ 7%テーパーを有する根管と根管口から 5.6mm (側枝①) と 10.7mm (側枝②) の部位に側枝を有する THERMAFIL Training BLOC (Dentsply) 模型 32 根管を使用した。さらに、本根管模型は Obtura II、HotShot の 25G ニードル先端が根尖孔から 3mm の位置に到達するように Pro-Taper を F3 まで根管拡大した THERMAFIL Training BLOC 96 根管を使用した。F1 群を 16 根管 F3 群を 48 根管ずつに分類、キャナルス N (昭和薬品) をシーラーとして Obtura II (25G ニードル) と HOT-SHOT (25G ニードル) で根管充填し主根管根尖到達度および側枝到達度を測定した。根管充填到達度の測定は実体顕微鏡 Olympus SZX16 (Olympus) 及びデジタルカメラ DP71 を使用し、コンピューターディスプレイ上で根管充填材の根尖孔からの到達度および側枝への侵入距離を測定し、完全到達根管を % で表示した。

実験 2；S タイプ模型の 40 根管を Pro-Taper を使用し、メーカー指示の条件で F3 まで根管拡大した。キャナルス N (昭和薬品) をシーラーとして各々 20 根管ずつ Obtura II と HotShot で根管充填し、主根管の根尖到達度を測定した。

<結果および考察>

実験 1

| J type 模型 | 到達度 | 側枝①-1 | 側枝①-2 | 側枝②-1 | 側枝②-2 |
|---------------------|------|-------|-------|-------|-------|
| Obtura II F1 (n=16) | 69% | 69% | 25% | 100% | 75% |
| Obtura II F3 (n=48) | 100% | 100% | 50% | 100% | 69% |
| Hot Shot F1 (n=16) | 100% | 100% | 63% | 94% | 44% |
| Hot Shot F3 (n=48) | 100% | 100% | 35% | 90% | 54% |

実験 2

| S type 模型 | Obtura II F3 (n=20) | HotShot F3 (n=20) |
|-----------|---------------------|-------------------|
| 到達率 | 100% | 100% |

実験 1 から Obtura II では ProTaperF1 群に対し、F3 群に高い到達度を示した。一方、HotShot ではテーパーの小さい ProTaper F1 群でも 100% の到達度を示した。すなわち、HotShot は細く湾曲があり十分なテーパー及び拡大を付与することが困難とされる根管においても緊密な根管充填が可能であることが示された。実験 2 において Obtura II、Hotshot とともに 100% 根管到達度を示した。以上の結果から HotShot は ProTaper F3 で形成される根管において Obtura II と同等、さらに ProTaper F1 根管では Obtura II よりも容易に根尖に到達率に優れていることが示された。

低温融解型ガッタパーチャによる根管充填到達度の基礎的検討

¹神奈川歯科大学 歯学部 口腔治療学講座 歯内療法学分野

²湘南短期大学 歯科衛生学科

○平嶺 倫子¹ 大浜 美穂¹ 荻野 志保¹ 長谷 徹² 永井 旺介¹ 石井 信之¹

The basic study of root canal obturation by low-temperature fusion gutta-percha

¹Division of Endodontics, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College

²Department of Dental Hygiene, Shonan Junior College

Hiramine Michiko, Ohama Miho, Ogino Shiho, Nagatani Tohru, Nagai Ohsuke, Tani-Ishii Nobuyuki

【研究目的】

感染根管治療の臨床成績を向上するために緊密封鎖性が得られる垂直加熱ガッタパーチャ根管充填が有効であることが示されている。加熱ガッタパーチャ根管充填法で使用するガッタパーチャの融解温度が高いため、冷却収縮率が大きいことや根管充填時に高温に加熱されたホルダーが口唇に触れると火傷を惹起するという問題があった。これらの欠点を改善するために低温融解型ガッタパーチャが開発された。本研究では、低温融解型ガッタパーチャを用いて根管充填を行い、その根管充填到達度を主根管および側枝への到達度を測定した。

【材料および方法】

本研究には、ガンタイプ加熱根管充填器具 (Obtura II、Obtura 社) を使用して2種類 (ソフト、ハードタイプ) の試作低温融解型ガッタパーチャの根管充填到達度を測定した。供試根管は、プラスチック透明根管模型 (THERMAFIL TRAINING BLOC : DENTSPLY, MAILLEFER, SWISS) 132 根管を使用した。供試根管模型は、Pro Taper の F1 ファイルによって根管形成され、根尖部テーパー7%、根尖孔径 0.2mm、根管長 16.8mmで、根管口から 10.7 mm (側枝①) と 5.3mm (側枝②) の位置に2つの側枝を有している。本根管模型を以下の3群に分類し Obtura II で根管充填を行った。

1. 90℃融解型ガッタパーチャ群 ソフトタイプ 60 根管
2. 90℃融解型ガッタパーチャ群 ハードタイプ 60 根管
3. 200℃融解型ガッタパーチャ群 ソフトタイプ 12 根管

Obtura II (Obtura社) にアプリケーションニードル 25G (外径 0.51mm) を装着し、シーラーとしてCANALS-N[®] (昭和薬品化工) を用いてペーパーポイントにて薄くフィルム状に根管壁に塗布した。アプリケーションニードルは、根尖孔から9mmの位置に挿入して根管充填を行った。根管充填操作はダウンパッキングとバックパッキングの2回法にて行った。根管充填到達度の測定は、実体顕微鏡Olympus SZX16(Olympus) 及びデジタルカメラDP71 を使用し、コンピューターディスプレイ上で根管充填材の根尖孔からの到達度および側枝への侵入距離を測定し、完全到達根管数を%で表示した。

【結果および考察】

| | 根尖到達率 | 側枝①-1 | 側枝①-2 | 側枝②-1 | 側枝②-2 |
|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 90℃ソフト (n=60) | 85% | 98% | 72% | 100% | 98% |
| 90℃ハード (n=60) | 83% | 85% | 37% | 100% | 98% |
| 200℃ソフト (n=12) | 33% | 58% | 17% | 100% | 83% |

根管充填材が根尖まで到達した根管は、90℃ソフトで80%、90℃ハードで82%、200℃ソフト33%であった。以上の結果から90℃融解型ガッタパーチャは、200℃融解型ガッタパーチャよりも流動性が高いことが示された。従来型加熱融解型ガッタパーチャの根管充填には十分なテーパーの付与が必要とされていたが、今回の低温融解型ガッタパーチャを使用することにより大きなテーパーを付与することが困難な細い彎曲根管への応用に有効であることが示された。

根管模型を用いたイオン導入法における *Candida albicans* 仮性菌糸に対する抗菌効果

鶴見大学歯学部 細菌学教室 第二歯科保存学教室*
○加藤 大輔、小山 隆夫、中野 雅子*、新井 高*、前田 伸子

In-vitro Evaluation for Microbicidal Effects of Iontophoresis against pseudohypha in *Candida albicans*.

Department of Oral Bacteriology, Department of Periodontics and Endodontics*,
School of Dental Medicine, Tsurumi University
○D. Kato, T. Oyama, M. Nakano*, T. Arai*, N. Maeda

【目的】*Candida albicans* は口腔や腸管、皮膚などにみられる常在微生物のひとつであり、免疫力低下により日和見感染症を引き起こすことがある。また、状況により酵母細胞と菌糸の二相性の発育形態をとる真菌であることが知られている。生体内においては、酵母型よりも菌糸の状態が多く存在しているとの報告もある。一方、難治性根尖性歯周炎の病巣局所においても、*C. albicans* は最終的に根尖に残存し検出される微生物のひとつとされており、病巣に菌糸の存在も報告されている。以前、我々は *C. albicans* を用いて実験を行ったが、全て酵母型細胞を用いての結果であった。そこで今回我々は、酵母型と菌糸型のそれぞれの状態の *C. albicans* を用いて、イオン導入法における各種薬剤の抗菌効果を比較検討した。

【方法】被検菌株として *Candida albicans* ATCC18804 株 (酵母型:Ca-Y、菌糸型:Ca-P) を使用した。被検菌株は Tryptic Soy 寒天培地上で培養後、およそ 10^7 cfu/ml となるよう調整した。菌糸の形成は、酵母型細胞を 10%BSA 添加 RPMI1640 培地にて、12 時間培養したものを実験に用いた。根管模型 (ニッシン社製、京都) は、小山らの根尖部病巣実験モデルを使用した。モデルの根尖部病巣に相当する腔に、滅菌生食寒天 $30\mu\text{l}$ 、被検微生物 (Ca-Y or Ca-P) 含有寒天 $30\mu\text{l}$ 、滅菌生食寒天 $70\mu\text{l}$ の順に重層し実験の根尖部病巣とし、イオン導入した場合 (通電+) と貼薬のみの場合 (通電-) で比較検討した。イオン導入には、カントップ・ジュニア (昭和薬品化工社製、東京) を用いた。薬剤はカントップ用ヨード・ヨード亜鉛液 (IZI)、38%フッ化ジアンミン銀溶液 (DSF) を用いて、それぞれ一定時間 (5 分・10 分・25 分・50 分) 作用させた。イオン導入後、あるいは貼薬後に根尖部病巣モデルから被検細菌を回収し、適宜希釈後コロニー数 (log CFU/ml) を測定した。

【結果と考察】*C. albicans* に対する根管消毒剤の抗菌効果は、薬剤や *C. albicans* の形態により差が認められた。DSF は、通電+、通電-、また Ca-Y、Ca-P 共に時間の差はあるものの、いずれにも抗菌効果が認められた。ASH は Ca-Y では検出限界以下にできたものの、Ca-P では検出限界以下にすることはできなかった。一方、IZI では通電+、通電-に関わらず Ca-Y が残存していたのに対し、Ca-P でも通電の有無に関わらず、検出限界以下にすることができた。しかし、過去の我々の実験結果を考慮しても、IZI は大腸菌にしか効果が認められず、他の口腔細菌には効果が認められなかった。*C. albicans* に関しても、根尖部病巣に単独で感染しているとは考えられにくい。以上のことから、イオン導入法における根管消毒剤の選択は、いずれの微生物に対しても DSF が有効性が高いことが推測された。またイオン導入法は、複雑な根管形状の歯牙などに対しても、確実に薬剤を病巣に到達させることが可能であると考察され、これらの組み合わせは、難治症例においても非常に有用な臨床手段の一つであると考えられる。

【結論】イオン導入法における各種根管消毒剤の *C. albicans* に対する抗菌効果は、形態や薬剤によって様々であった。また、通電の有無では、通電-群と比較して通電+群は短時間で抗菌効果が得られた。

水酸化カルシウム製剤貼薬根管における根尖封鎖性の検討 (第4報)

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯内疾患制御学研究分野

○吉田桐枝、後藤康治、河田真裕子、前田英史、畦森雅子、赤峰昭文

Influence of calcium hydroxide intracanal medication on apical leakage (Part 4)

Department of Endodontology and Operative Dentistry, Division of Oral Rehabilitation,

Faculty of Dental Science, Kyushu University

○YOSHIDA Kirie, GOTO Yasuharu, KAWATA Mayuko, MAEDA Hidefumi,

UNEMORI Masako and AKAMINE Akifumi

【研究目的】水酸化カルシウム製剤は根管貼薬剤として頻用されているが、ファイリングと専用シリンジを用いた根管洗浄を併用した除去法では水酸化カルシウム製剤を根管から完全に除去することは困難で、根尖部に残存した水酸化カルシウム製剤は根管充填後の根尖封鎖性に影響を及ぼすと考えられている。第1報において根管形態、根管充填法、水酸化カルシウム製剤の有無の条件を変えて、根尖封鎖性に与える影響を比較検討した。この結果より水酸化カルシウム製剤が多く残存し根管形態が湾曲であると根尖封鎖性が低下し、一方根管充填法に熱可塑性ガッタパーチャ法を用いると根尖封鎖性が向上する傾向がみられた。また第2報においてシーラーの種類を増やし、その種類の違いと水酸化カルシウム製剤の有無が根尖封鎖性に与える影響の比較検討を行った。この結果より水酸化カルシウム製剤が多く残存することで根尖封鎖性が低下する傾向がみられた。第3報において根管充填法、根管形態、シーラーの種類、水酸化カルシウム製剤の有無等、条件の変化によって根尖封鎖性にも変化がみられたため統計学的有意差を比較検討した。その結果、根管充填法の違いにおいて統計学的有意差がみられた。そこで今回の実験では根尖部においてガッタパーチャが占める割合と根尖封鎖性に関連があるかどうかを調べるために、根管模型を切断し、根尖部をガッタパーチャが占める割合を測定した。

【材料および方法】実験には透明エポキシレジン製歯根管模型(ニッシン)の根管が直(S8-BS.2)を使用した。#15Kファイルが根尖孔に一致した長さから1mm減じた長さを作業長とし、Ni-Ti製ファイルのエンドウェーブ(モリタ)を用いて根尖部を06テーパ#30まで拡大した。根尖側の水酸化カルシウム製剤は除去操作後も残存する可能性がある想定し、根尖側にカルシペックスII(日本歯科薬品)が残存した状態を再現した(カルシペックスII残存根管)。その後5%NaOClと3%H₂O₂による交互洗浄とファイリングを併用してカルシペックスIIの除去を行い、ペーパーポイントにて乾燥した(カルシペックスII除去根管)。そしてサーマフィル法およびシングルポイント法にて根管充填を行った。またカルシペックスIIを貼薬しない根管にサーマフィル法およびシングルポイント法にて根管充填を行ったものをコントロールとした。シーラーとしてキャナルス、キャナルスN(昭和薬品化工)、シーラベックス(KERR)を用いた。根管充填後、模型を墨汁中に3日間浸漬し、実体顕微鏡を用いて根尖からの墨汁の最大浸透距離を計測した。また根管模型を根尖孔から4mmのところにて切断し切断面をガッタパーチャが占める割合を測定した。得られた測定結果はANOVAおよびTurkeyの多重比較検定を用いて有意水準5%にて統計処理を行った。

【成績と考察】根尖孔から4mmの切断面においてガッタパーチャが占める割合は、サーマフィル法の方がシングルポイント法よりも大きかった。とくにサーマフィル法においてキャナルスは水酸化カルシウム製剤の影響を受ける傾向がみられた。しかしガッタパーチャが占める割合と色素浸透距離との間には関連はみられなかった。今回の実験では、根尖孔から4mmの切断面においてガッタパーチャが占める割合が大きいサーマフィル法に、根尖封鎖性が高い傾向はみられなかった。

【結論】根尖部においてガッタパーチャが占める割合が大きいサーマフィル法はシングルポイント法よりも必ずしも根尖封鎖性が良いとは言えなかった。

難治性根尖性歯周炎に対する水酸化カルシウム製剤「カルビタール®」の有用性

東京歯科大学 口腔健康臨床科学講座

埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科口腔保健科学専攻2)

○古澤成博、小貫瑞穂、大迫美穂、根本詩子、早川裕記、松本信哉、吉田 隆2)

The Effect of Calcium Hydroxide Preparation "Calvital" on Refractory Endodontic cases

Department of Clinical Oral Health Science, Tokyo Dental College

2) Division of Oral Health Sciences, Department of Health Sciences, Saitama Prefectural University

FURUSAWA Masahiro, Onuki Mizuho, Ohsako Miho, Nemoto Utako, Hayakawa Hiroki, Yoshida Takashi

緒 言

日常臨床において慢性化膿性根尖性歯周炎と診断された場合、大多数の症例では通法の感染根管治療を行うことにより治癒に向かうことが多い。しかしながら、咬合時痛や打診痛などの症状がなかなか消失せず、いわゆる難治性根尖性歯周炎と診断される場合が少なからず存在する。この場合、治療中の誤った作業長の設定や、いわゆるオーバーインスツルメンテーションなどによる根尖孔外への不用意な刺激によって惹起される根尖孔の過大な開孔が原因と考えられる、いわゆる擬似的難治性根尖性歯周炎と、根尖部の細菌バイオフィームが原因となっている真性難治性根尖性歯周炎とが考えられる。前者の場合は根管側壁穿孔やフェネストレーションなどと同様に、原因が明確な場合も多いが、後者の場合は一般的に症状の推移を経過観察するものの、通常の根管治療（消毒）剤では治療効果が得られず、治療法に苦慮する症例が少なからず存在する。

今回我々は、難治性根尖性歯周炎と診断された症例において、水酸化カルシウム製剤「カルビタール®」（ネオ製薬社製）を用いて根管治療を行った結果、興味ある知見が得られたので報告する。

方 法

症例は、開業医にて難治性根尖性歯周炎と診断され、東京歯科大学水道橋病院、総合歯科に紹介された患者から得られた症例100例である。これらの内、いわゆる擬似的難治性根尖性歯周炎と診断された症例は、髄床底などのパーフォレーションによるものが10例、根尖孔の開大によるものが20例で、その他歯牙破折やフェネストレーションなどが数例であった。それ以外は、通法の感染根管治療では効果が得られなかった、いわゆる真性難治性根尖性歯周炎と診断された症例であった。これらの症例に対して、水酸化カルシウム製剤「カルビタール®」を2週間から1ヶ月間隔で根管治療薬として応用し、経過観察を行った。

結 果

100例中、症状の消失を見たものは79例であり、根管治療回数は平均5.3回であった。その内根管治療中に根尖孔の穿通が不可能であったものは32例、穿通可能だったものが11例であった。また、症状が軽減したものの、消失には至らなかった症例が7例、症状の消失が認められずに外科処置に移行した症例が8例、神経因性疼痛と診断された症例は6例であった。

考 察

今回、いわゆる難治性根尖性歯周炎と診断された症例100例に対して、水酸化カルシウム製剤「カルビタール®」を応用し、症状の推移の経過観察を行った。その結果、86%の症例で症状の消失あるいは軽減が認められた。すなわち、パーフォレーションなどのいわゆる擬似的難治性症例では、本剤特有の創傷治癒作用が効果を発揮し、また、根尖孔外の細菌バイオフィームが原因と考えられる、いわゆる真性難治性症例では強アルカリ性である本剤の長期応用による根管内の環境変化によって、薬理学的効果が得られたものと考えられた。

以上の結果から、難治性根尖性歯周炎に対する水酸化カルシウム製剤「カルビタール®」の応用は、日常臨床における薬剤の選択肢として有用性が高いものと思われた。

新規スピントラップ剤にて検出されたNaClOとH₂O₂から発生したフリーラジカルの解析

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

○武内ひとみ、松井 智、高橋知多香、田中みどり、酒井きよ美、辻本恭久、松島 潔

Analysis of free radical generated from NaClO and H₂O₂ using new type spin-trapping Agent

Depts. of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Takeuchi Hitomi, Matsui Satoshi, Takahashi Chitaka, Tanaka Midori, Sakai Kiyomi,

Tsujimoto Yasuhisa and Matsushima Kiyoshi

緒 言

次亜塩素酸ナトリウム (NaOCl) は、過酸化水素水 (H₂O₂) とともに根管洗浄剤として広く用いられている。また、NaOClとH₂O₂はともに活性酸素に分類されている。これらの洗浄液を交互洗浄することにより、NaOCl+H₂O₂→NaCl+H₂O+O₂↑の反応式による酸素が発泡作用を生じる。この反応系は一重項酸素の発生系と言われており、発生した酸素が根管内の切削片や感染歯質の除去を行なえるものと考えられてきた。演者らは、この二つの反応から発生したフリーラジカルの同定について、従来型のスピントラップ剤DMPO (5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide) にて解析を行い、hydroxyl radical (OH·) やDMPO-Xが発生することを報告してきた。しかし、DMPOは、反応速度が速いsuper oxide (O₂⁻·) を捕捉するのに適しておらず、この反応系から発生するフリーラジカルの本質を解明するのは困難であった。したがって、根管の交互洗浄時のフリーラジカルの発生系を確認することは、臨床において有益なことと考えられる。そこで本研究では、O₂⁻·を安定して捕捉できるCYPMPO (5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrroline N-oxide) を用いて、H₂O₂に濃度別のNaOClを作用させ、発生したフリーラジカルをESR spin-trapping法を用いて従来型トラップ剤であるDMPOとの比較検討を行った。

材料および方法

3% H₂O₂に0, 0.0025, 0.025, 0.25, 2.5%のNaOClを反応させ、発生したフリーラジカルをESR 装置にて10 mM DMPOおよび10 mM CYPMPO adductのESR signalとして捕捉し、トラップ剤添加後、1, 3, 5, 10 分後に測定し、検討を行った。

結果および考察

DMPO添加により、OH·の発生が認められ、NaOCl濃度の上昇に伴いOH·の増加が認められ、時間の経過とともに発生量の増大が認められた。一方、CYPMPO添加では、O₂⁻·の発生が認められ、NaOCl濃度の上昇に伴いO₂⁻·の増加が認められ、時間の経過とともに発生量の減少が認められた。本研究の結果は、NaOClとH₂O₂との反応系から安定してO₂⁻·を捕捉し、ESRシグナルとして検出された。現在、この反応系から発生したO₂⁻·アダクトが真のO₂⁻·であるか検討中である。

本研究の一部は、平成20年度科学研究費補助金(若手研究(スタートアップ)) No. 19890226) より行いました。

根管洗浄剤としての中性電解水の評価

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野

朝日大学歯学部口腔科学共同研究所 1)

秋田 康充 河津 祐之 堀田 康明 1) 吉田 隆一

Evaluation of Neutral Electrolysed Water as Root canal irrigation Solution.

Department of Endodontics, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation
Asahi University School of Dentistry

1) Central Research Laboratories of Oral Science Asahi University School of Dentistry
AKITA Yasumitsu KAWAZU Sukeyuki HOTTA Yasuaki 1) YOSHIDA Takakazu

【緒言】

根管の化学的清掃は歯内治療を成功へ導くための重要なステップの一つであることは間違いない。根管の化学的清掃は器械的拡大と並行して次亜塩素酸ナトリウムと過酸化水素水による交互洗浄が行われ、その後スミヤー層除去を目的として、フェノールスルホン酸、EDTA、強電解酸性水による根管洗浄、あるいは無機質溶解剤と超音波発振装置を併用した根管洗浄法など多くの方法が試みられてきている。当教室においても強電解酸性水と超音波発振装置を併用した根管洗浄法が有効であるとの報告を行ってきた。しかしながら強電解酸性水は金属器具の腐食作用、成分の経日変化による劣化や特有の味や臭いなど臨床で使用するにあたり無視できない欠点があることも事実である。そこで本研究では、殺菌作用は強電解酸性水と比して遜色なく、長期保存が可能、金属に対する腐食作用が少なく、無臭に近いといわれる中性電解水を根管拡大形成後の根管洗浄剤として用い、各種根管洗浄法について比較し、根管洗浄剤としての有用性ならびに用途について検討した。

【材料および方法】

ヒト新鮮単根抜去歯 24 本を髓室開拓、#60 まで根管拡大形成後、以下の 6 グループに分け、各方法で根管洗浄を行った。今回使用した中性電解水は AP アクア 21 (アサヒプリテック) により生成されたもので pH6.9±0.04 で使用した。強電解酸性水は ALTRON-ND-1000 (エヌディ) により生成されたもので pH2.2~2.7 で使用した。また EDTA 溶液は自製の pH7.4~7.5 を使用した。Group 1~5 では ENAC 6 型 (長田) に #40 のチップを装着し、超音波 (以下 U1) を併用した。

Group 1 : 中性電解水 1 分間 (U1)

Group 2 : 蒸留水 1 分間 (U1)

Group 3 : 強電解酸性水 1 分間 (U1)

Group 4 : 15%EDTA 15 秒間 (U1) + 中性電解水 1 分間 (U1)

Group 5 : 15%EDTA 1 分間 (U1) + 中性電解水 1 分間 (U1)

Group 6 : 5%NaClO + 3%H₂O₂

各グループ各々の方法にて根管洗浄後 2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定、アルコール上昇系列後、抜去歯を歯軸方向に切断、凍結乾燥、オスミウムコーティング後 SEM 観察 (S-4500, 日立) を行った。

【結果および考察】

Group 6 の交互洗浄のみでは根管内スミヤー層の除去効果は認められなかった。さらに、これら積層物の中には細菌と思われる構造物もみられた。Group 1 ならびに Group 2 では ENAC のチップが触れた根管上部の一部のみにスミヤー層の除去が認められた。このことから中性電解水単独の使用ではスミヤー層の除去効果は認められないことがわかった。Group 3 と Group 5 では根管内全体、根管上部から根尖部付近にかけて象牙質が過度に脱灰された像、すなわち象牙質の基質構造に変化をきたした部位が散在した。このことから長時間の強電解酸性水や 15%EDTA の根管内への使用は、根管内象牙質にダメージを与える可能性が示唆された。Group 5 では根管上部から根尖部にかけて象牙質が過度に脱灰されることなく、一様にスミヤー層のみが溶解・除去されていた。また、根管内に細菌と思われる構造物も認められず、清掃効果が根尖部まで確実に行き届いていることが確認された。今回の実験結果から、中性電解水にはスミヤー層除去効果は認められなかったものの、超音波発振装置使用下で 15%EDTA を短時間作用させ、その後中性電解水を使用すると、金属腐食性や臭気を危惧することなく、根管壁スミヤー層の除去効果とともに殺菌効果が期待できる。

MMP-3 は血管新生および修復象牙質形成を促進する

- 1) 愛知学院大学歯学部 歯内治療学講座
- 2) 国立長寿医療センター研究所 口腔疾患研究部口腔機能再生研究室

○天野 一晴¹、中島 美砂子²、庵原 耕一郎²、田中 毅¹、松井 寛敬¹、山崎 雅弘¹、中村 洋¹

Stimulation of angiogenesis and reparative dentin formation by MMP-3

- 1) Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
- 2) Department of Oral Disease Research, National Institute for Longevity Sciences

Kazuharu Amano¹, Misako Nakashima², Koichiro Iohara², Tsuyoshi Tanaka¹,
Hironori Matsui¹, Masahiro Yamasaki¹, Hiroshi Nakamura¹

【研究目的】

エンドペプチダーゼである MMP-3 は細胞外基質や基底膜の分解、幹細胞や血管内皮前駆細胞の遊走、サイトカインやそのレセプターの活性制御、結合組織リモデリングや創傷治癒、血管新生促進など多岐にわたる機能を有するといわれている。歯髄創傷治癒においては血管の侵入は修復象牙質形成に必須である。しかしながら、歯髄創傷治癒における血管新生のメカニズムはいまだ明らかではない。また、MMP-3 の歯髄創傷治癒過程における機能も明らかでない。私共は第 127 回歯科保存学会秋季学術大会において、歯髄創傷治癒過程において MMP-3 が創傷部の血管周囲に発現し、*in vitro* では血管内皮細胞に対して増殖、遊走促進、アポトーシス抑制効果を有することを報告した。本研究では、さらに、ラット切歯生活歯髄切断面上に MMP-3 を応用して、その血管新生および修復象牙質形成に対する効果を検討した。

【材料と方法】

1. ラット上顎切歯生活歯髄切断面上への MMP-3 の応用

ラットの上顎切歯を生活歯髄切断後、50ng の MMP-3 をスポンジに添加して切断面上歯髄に応用した。コントロールとしては PBS をスポンジに添加したものを用いた。ボンディング剤を塗布後、光重合型コンポジットレジンにて仮封をした。24 時間あるいは 72 時間後に灌流固定を行い、脱灰後、パラフィン切片 7 μ m を作製した。

MMP-3 の歯髄細胞に対する増殖効果の検討するため、処置後 24 時間標本において、Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) 染色を行った。

新生血管密度を統計学的に解析するために、処置後 24 時間の MMP-3 添加群および PBS 群、それぞれ 4 歯ずつのパラフィン切片を BS-1 lectin にて免疫染色し、陽性細胞の密度を Keyence の蛍光顕微鏡下で BZ-II Analyzer software を用いて測定した。

2. イヌ生活歯髄切断面上へ MMP-3 の応用

2 週間後の標本を通常通りにパラフィン切片を作製した後、H-E およびマッソントリクロム染色をし、観察を行った。

【結果】

ラット生活歯髄切断処置後 24 時間標本において、MMP-3 添加群では、24 時間後の歯髄切断面に歯髄細胞が増殖し、新生血管形成が進み、統計学的な有意差がみられた ($P < 0.01$)。MMP-3 添加群の 72 時間標本では、PBS 群に比べて歯髄切断面に大量の修復象牙質あるいは細管象牙質形成がみられた。両群とも炎症性細胞浸潤はみられなかった。

イヌ生活歯髄切断面上に MMP-3 を応用すると、ラットと同様に、骨様象牙質形成促進作用がみられた。

【考察・結論】

MMP-3 を生活歯髄切断面上に蛋白応用すると、多数の歯髄細胞の増殖がみられ、血管新生ならびに修復象牙質形成が促進された。MMP-3 が血管新生および創傷治癒を促進するという結果は、将来の歯髄治療薬の開発に有意義な方向性を与えるものと期待できる。

ヒト象牙質フォスフォフォリン由来ペプチドを用いた新規骨再生材料の開発

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学分野

○安田善之 泉川昌宣 小池俊之 川守田暢 犬山秀正 立松祐哉 新田督 斎藤隆史
Development of a novel material using human dentin phosphophoryn-derived peptide

for bone regeneration

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Departemnt of Oral Rehabilitation,

School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

○Yoshiyuki Yasuda, Masanobu Izumikawa, Toshiyuki Koike, Toru Kawamorita, Hidemasa Inuyama,

Yuki Tatematsu, Osamu Nitta and Takashi Saito

【緒言】

象牙質フォスフォフォリンは DSPP (Dentin Sialophosphoprotein) 遺伝子産物で、象牙質の非コラーゲン性タンパク質の 50% を占める高リン酸化タンパク質である。これまでにわれわれは、象牙質フォスフォフォリンと象牙質コラーゲンとの複合体が、*in vitro* における再石灰化実験系において高い石灰化誘導活性を示し、象牙質の石灰化において主要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。これは、ヒト DSPP 遺伝子変異が象牙質異型性症、象牙質形成不全症 II 型や III 型を引き起こし、さらには DSPP 遺伝子ノックアウトマウスがヒト象牙質異型性症に似た病態を示すことから示唆される。

またわれわれは、動物由来象牙質フォスフォフォリン・コラーゲン複合体を動物の大腿骨欠損部や歯周病モデルとしての歯槽骨欠損部に移植してそれらの組織再生に対する高い誘導活性を確認した。さらにイヌの人工露髄面に移植し覆髄実験を行ったところ、早期に細管構造を有する緻密な修復象牙質の形成誘導が認められた。しかも、歯髄に炎症がほとんど認められず、強力な修復象牙質形成誘導活性と生体親和性を兼ね備えた覆髄材料であることを明らかとした (特許第 3646167, US patent application No.50/504959, EP patent application 03703126.7)。しかし、数年前からの BSE 問題の浮上により、より安全な組織再生材料の開発が重要課題となっている。本研究は新規骨再生材料の開発を目的として、ヒト象牙質フォスフォフォリン由来の各種合成ペプチドを複製し、ヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化および石灰化に与える影響について検討した。

【材料および方法】

ヒト間葉系幹細胞の培養; ヒト間葉系幹細胞(BioWhittaker)を 10%FBS添加ヒト間葉系幹細胞培地を用いて 37°C 5%CO₂環境下で培養した。さらに分化・石灰化誘導実験においてアスコルビン酸、グリセロリン酸とデキサメタゾン を添加した。

合成ペプチドの作製; ヒト象牙質フォスフォフォリンはその特徴的な配列として、細胞接着に重要なRGD配列、グリコサミノグリカン結合配列であるSGXG配列や高度にリン酸化されたDSS繰り返し配列を有する。これらの配列を有する計 14 種類のペプチドを合成し、ポジティブコントロールとして細胞外基質リンタンパク質由来ペプチドである Dentonin(AC-100) を用いた。

細胞分化および石灰化能への影響; ペプチド添加7日後のアルカリフォスファターゼ(ALP)活性は、LabAssay ALP(Wako)を用いて測定し、培地中のヒトオステオカルシン産生量の測定はHuman Osteocalcin ELISA(Biomedical Tech.)を使用した。また、ペプチド添加 28 日後の石灰化結節の形成はアリザリンレッド染色法により検討した。

【結果および考察】

各種合成ペプチドの ALP 活性への影響を調べたところ、SGXG 配列や DSS 配列を有するペプチドはほとんど影響がなかったが、RGD 配列を有するペプチドのみが有意に活性を増加させた。その中でも、RGD-1 が最も ALP 活性を促進した。さらに、RGD-1 作用群は、コントロール群に比べてオステオカルシン産生や石灰化結節形成においても亢進が認められた。以上の結果から、象牙質フォスフォフォリン由来ペプチドである RGD-1 は骨再生材料として有用であることが示唆された。

Phosphophoryn/アルギン酸ゲル複合体によるラット象牙質形成

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 歯蝕制御治療学分野

○小池俊之、半田慶介、斎藤隆史

Reparative Dentin Formation by Phosphophoryn/Alginate Gel Composite in Rats

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation,

School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

○Toshiyuki Koike, Keisuke Handa and Takashi Saito

【目的】

我々は、生体親和性を有し積極的に象牙質形成を誘導する歯髄保存療法剤の開発を最終目標としている。これまでに我々は、石灰化誘導性リンタンパク質である phosphophoryn と I 型コラーゲンとの複合体が高い修復象牙質形成能を有することを明らかにしてきた (第 127 回大会)。本研究では、生体吸収性の創傷被覆材として用いられているアルギン酸ゲルを phosphophoryn の担体として用いた場合、さらに硬組織形成誘導活性を有する BMP を添加した場合についてラット直接覆髄実験を行い、その修復象牙質再生能について、従来から覆髄剤として用いられている水酸化カルシウム製剤との比較・検討を行った。

【方法】

熱架橋処理を施したアルギン酸シート(クラレメディカル; 以下 AG)10mg に、ブタ抜去歯から抽出・精製した Phosphophoryn (以下 PP)20mg を架橋結合させて PP-AG 複合体を作製した。さらに、rhBMP-2 (以下 BMP)を添加した PP-AG-BMP 複合体を作製した。全身麻酔を施した 8 週齢ウィスター系雄性ラットの上顎第一臼歯に人工露髄面を形成し、1) PP-AG、2) PP-AG-BMP、3) BMP-AG、4) AG、および 5) 水酸化カルシウム製剤 (MultiCal, Pulpdent; 以下 Ca) を覆髄材料として直接覆髄を施した。術後 1~3 週で歯を顎骨ごと摘出し、通法に従って H-E 染色を行った。光学顕微鏡にて組織学的観察と形態計測を行い、各々の試料における修復象牙質形成および歯髄の炎症の程度を比較・検討した。

【結果および考察】

PP-AG 群では術後 2 週において、露髄面に細管構造を有する修復象牙質形成が認められた。術後 3 週ではさらに厚みのある修復象牙質形成が認められ、露髄面を完全に覆っていた。また、その直下には象牙芽細胞層が観察された。歯髄には軽度の歯髄充血が認められたが、強い炎症反応は認められなかった。術後 3 週における PP-AG-BMP 群では、PP-AG 群の場合よりも、さらに厚みを持つ修復象牙質の形成と、その直下に象牙芽細胞層が認められ、形成された修復象牙質の密度も増加していた。また、歯髄の炎症も軽度であった。修復象牙質の面積および緻密度を計測したところ、PP-AG-BMP 群 > PP-AG 群 (≒ BMP-AG 群) > Ca 群 (≒ AG 群) であり、統計学的有意差を認めた。phosphophoryn に BMP を添加することで、その硬組織形成誘導活性が増強されたものと考えられる。Ca 群では、術後 1 週で露髄面に壊死層の形成を認め、歯髄には強い炎症反応が術後 3 週まで持続していた。これは水酸化カルシウム製剤の高 pH による歯髄障害が長期にわたり継続したと考えられる。術後 3 週では誘導された修復象牙質の厚みが増加していたが、修復象牙質直下の象牙芽細胞層は不明瞭で、修復象牙質内部は多孔性でトンネル状の欠損や裂隙が多数存在しており、これまでの報告と一致した結果が得られた。

【まとめ】

PP-AG 複合体は生体親和性に優れ、高品質な修復象牙質を誘導することが明らかとなった。さらに、rhBMP-2 を添加することで修復象牙質形成能が増強されることが明らかになり、本複合体の覆髄材としての有効性が示唆された。

デキストランコーティングスポンジ状担体における骨髄幹細胞による硬組織形成

大阪歯科大学 口腔治療学講座

○下村容規、好川正孝、辻 則正、藪内崇督、林 宏行

Hard Tissue Formation by Bone Marrow Cells in Dextran Coated Sponge Used as a Scaffold

Dept. of Endodontics, Osaka Dental University

○SHIMOMURA Yasunori, YOSHIKAWA Masataka, TSUJI Norimasa,

YABUUCHI Takayoshi, HAYASHI Hiroyuki

【研究目的】

歯の再生には未分化間葉細胞が増殖と分化を行うための担体が必要である。その担体は再生硬組織の補填が必要となる欠損部の形状に容易に賦形できるスポンジが適すると考える。そこで、Formalin 処理 Polyvinyl Alcohol (Polyvinyl formale : PVF) スポンジを利用し、そのスポンジに未分化間葉細胞を播種して効果的に硬組織を形成させるため、多数の幹細胞が担体に接着し、より多量の硬組織を形成させるために必要と思われる化合物を担体へコーティングした。今回の研究では、担体と細胞とのより効果的な接着を期待して多糖類の一種であるデキストランを選択し、PVF スポンジにコートして *in vitro* での骨髄幹細胞による硬組織形成を検討した。

【材料および方法】

PVF立方体(5×5×5mm)を5mm厚のシートから作製し、一部(n=3)を2g/dl(10kDa)濃度のデキストラン水溶液に浸漬(PVF-a)し、一部(n=3)を4g/dl(500kDa)濃度のデキストラン水溶液に浸漬(PVF-b)し、乾燥させた。PVFにデキストランがコートされた状態はSEMで確認した。そして、残り(n=3)のPVFはデキストランに浸漬せず(PVF-c)に対照とした。6週齢の雄性Fischer 344ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取し、1週間の初代培養後に 1×10^6 個の細胞を担体に播種した。これらの担体は15%FBSおよび抗生物質を含むMEM内で4週間二次培養を行った。培地の交換は週に3回行い、1mM β -グリセロリン酸、82 μ g/mlアスコルビン酸、そして10nM デキサメタゾン(Dex)を培地交換時にそれぞれ20 μ l添加した。

4週後に各PVF担体内で形成された石灰化物をSEMで観察した。石灰化物形成の評価のために4週後の培養上清中のオステオカルシン量を測定し、また、担体内の石灰化物を10%硝酸で脱灰してCa量を測定した。得られた測定結果の有意差はANOVAおよびTurkey-Kramerで検定した($p < 0.05$)。

【成績】

SEM観察の結果から、PVF-aおよびPVF-b担体内への細胞接着とDexを添加した担体内での石灰化物の形成が認められた。各担体のCa量は、PVF-aで69.63 μ g/ml、PVF-bで73.07 μ g/mlで、PVF-cでは52.96 μ g/mlであった。オステオカルシン量はPVF-aでは380.97ng/ml、PVF-bで405.49ng/ml、そしてPVF-cでは226.38ng/mlだった。Ca量およびオステオカルシン量はPVF-aおよびPVF-bでPVF-cより有意に高い値が認められた($p < 0.05$)。しかし、PVF-aおよびPVF-bの間でのCa量とオステオカルシン量とに有意差は認められなかった。

【考察】

PVFへの骨髄細胞の接着は期待できないが、デキストランコートによって骨髄細胞のPVF担体内への接着が可能であった。デキストランには細胞が凝集および接着することに対して有効な作用があるとの報告があり、PVF担体でデキストランが骨髄細胞を凝集、接着させ、硬組織形成に効果を示したと考えられる。

【結論】

*In vitro*でPVF担体へのデキストランコーティングによって骨髄細胞が担体内に接着し、硬組織の形成量が増加した。

ヒト歯根膜細胞における炎症性サイトカインによる SOCS の発現

¹⁾ 福岡歯科大学口腔修復学講座歯科保存学分野, ²⁾ 福岡歯科大学顎顔面美容センター, ³⁾ 福岡歯科大学細胞分子生物学講座細胞生理学分野

福島 晶絵¹⁾、岡部 幸司³⁾、松本 典祥¹⁾、片山 知子²⁾、茂山 千英子¹⁾、泉 利雄¹⁾、阿南 壽¹⁾

Inflammatory cytokine-induced SOCS induction in human periodontal ligament cells

¹⁾ Section of operative dentistry & endodontology, Department of odontology, Fukuoka Dental College,

²⁾ Orofacial Esthetic Medical Center, Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Fukuoka Dental College, ³⁾ Department of Physiological Science and Molecular Biology, Fukuoka Dental College

Akie Fukushima, Koji Okabe, Noriyoshi Matsumoto, Tomoko Katayama, Chieko Shigeyama, Toshio Izumi, Hisashi Anan

[研究目的]

歯科保存領域で認められる疾患の原因は細菌感染的なもの大部分を占める。しかしながら、その中には先天的な歯周組織の形成不全や代謝不全、糖尿病などの全身疾患によりその症状を重篤にさせている症例も多く認められており、従来の外科的・原因除去的な治療方法の他に、生体側の免疫・炎症反応や組織の再生をより積極的に調節する治療法の開発が必要であると考えられる。そのために、これら生体反応を調節しているサイトカインのシグナリング機構の詳細を明らかにすることが有用であると思われる。Suppressor of Cytokine Signaling (以下、SOCS) は、主要な炎症性サイトカインシグナリングの一つである JAK-STAT 系の負の調節因子としての発見されたタンパク質分子で、細胞の増殖や分化、癌や糖尿病などの全身疾患との関連も多く報告されている。また、慢性関節性リウマチモデルにおいて、SOCS-3 が IL-6 を抑制することにより、炎症を抑制したという報告もある。従って、歯科領域においても歯周組織の局所炎症の生化学的指標や免疫療法などへの応用も期待することができる。しかし、これらが生体反応を調節する詳細なメカニズム、特に歯科領域における炎症に関して未だ不明な点が多い。そこで本研究では、歯周組織における炎症反応においてヒト歯根膜細胞の培養細胞における SOCS の発現について検討した。

[材料及び方法]

ヒト歯根膜細胞の初代培養細胞(PDL)を60mm ディッシュに80% confluent まで培養し、炎症に関連するサイトカインである IL-1 β 、LPS、TNF- α 、IL-6 及び IL-10 等の投与による発現誘導を行い、経時的に total RNA の抽出を行った。その後、Real time PCR 法にて SOCS-1、SOCS-2、SOCS-3 の mRNA 発現量の変化を定量的に測定した。同時に Western blot 法にてタンパク質の発現も確認した。

[結果]

投与した全てのサイトカイン(IL-1 β (10ng/ml)、LPS(10ng/ml) TNF- α (20ng/ml)、IL-6(20ng/ml)、IL-10(10ng/ml))でPDLを刺激した場合、SOCS-2 mRNA の発現にはほとんど変化が認められなかったが、SOCS-3 の mRNA 発現が刺激依存性に増加した。この内、IL-1 β と LPS で刺激した場合、SOCS-3 mRNA 発現上昇のピークは刺激後 1~3 時間の間に認められたが、TNF- α 、IL-6 の刺激では刺激後 10~24 時間以降に遅延して認められた。これらのサイトカインによる SOCS-3 の発現上昇は Western blot 法によるタンパク質でも同様に認められた。

[考察]

慢性関節性リウマチにおいては、IL-6 が主に TNF- α 依存性に滑膜細胞から産生され、他の炎症性サイトカインと相互作用しながら病態を形成するが、それは SOCS の過剰発現により著しく減少されることが報告されている。また、LPS は TLR シグナル伝達系を介し、炎症性サイトカインを産生するが、SOCS は TLR シグナリングを間接的に抑制する作用があるという報告がある。早期の LPS による歯周組織障害には TNF- α が大きく関わっていることが知られており、歯周組織の炎症部位に TNF- α や IL-1 β 等が過剰かつ持続的に産生されると、炎症の遅延及び悪化につながるといわれている。近年、SOCS は、炎症過程のステージごとに発現している各々の炎症性サイトカインの影響を受け、その働きを調節するという報告がある。今回、IL-1 β と LPS で PDL を刺激した時の SOCS-3 の発現上昇の時間経過と TNF- α や IL-6 で刺激した場合 SOCS-3 mRNA の発現のピークに時間差が生じたことから、SOCS が歯周組織の炎症の各ステージの調節機構に関わっている可能性があると考えられる。今後、下流へのシグナル伝達を含めて詳細に検討したいと考えている。

[結論]本研究では、ヒト歯根膜細胞に炎症過程で誘発されるサイトカインを作用させた時の大まかな SOCS の発現傾向の一端が明らかになった。

ヒアルロン酸による PC12 細胞の神経突起伸長抑制効果 における RHAMM レセプターの関与

九州歯科大学口腔治療学講座齲蝕歯髄疾患制御学分野¹、医療人間形成学講座総合診療学分野²

○鷲尾絢子¹、北村知昭¹、寺下正道²

Inhibitory Effects of Hyaluronic acid on Neurite Outgrowth of PC12 cells through RHAMM receptor.
Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Department of Cariology and
Periodontology¹, and Division of Comprehensive Dentistry, Department of Clinical Communication and
Practice², Kyushu Dental College

○WASHIO Ayako¹, KITAMURA Chiaki¹, TERASHITA Masamichi²

【目的】

ヒアルロン酸は、N-アセチル-D-グルコサミンと D-グルクロン酸の二糖単位から成るグリコサミノグリカンの一種であり、多くの組織において細胞外マトリックスを構成している。近年、ヒアルロン酸による炎症や疼痛の抑制、骨芽細胞や破骨細胞分化への影響等、ヒアルロン酸の有する生物学的活性が注目されている。我々の研究グループでは、歯髄創傷治癒・再生過程における神経組織再構築メカニズムの解明を目的として、神経細胞分化機構の研究に多く利用されている PC12 細胞を用い、ヒアルロン酸が PC12 細胞の神経細胞分化の指標である神経成長因子 (NGF) 誘導性神経突起伸長を抑制することを明らかにし、本学会で報告してきた。今回、ヒアルロン酸の神経細胞分化抑制メカニズムにおけるヒアルロン酸レセプターである RHAMM レセプターの関与について検討した。

【材料と方法】

NGF 添加により交感神経節ニューロン様細胞に分化するラット副腎髄質褐色細胞腫由来 PC12 細胞を用いた。NGF (5 ng/ml) および 800 kDa ヒアルロン酸 (0-100 µg/ml) の存在下・非存在下で PC12 細胞を培養後、位相差顕微鏡観察下で細胞体最短径の 2 倍長以上の突起を有する neurite positive cell の全細胞数に対する割合を算出するとともに、細胞増殖能への影響を MTT assay で、神経細胞分化マーカーである NF68 発現と MAPK および転写調節因子 CREB のリン酸化をウエスタンブロット法で検討し、更に pCRE-Luc プラスミドをトランスフェクトした PC12 細胞におけるルシフェラーゼ活性の変化を測定することで NGF 誘導性神経突起伸長に対するヒアルロン酸の抑制効果を検討した。また、ヒアルロン酸による神経突起伸長抑制メカニズムを明らかにするため、NGF とヒアルロン酸の相互作用を示す生化学的アフィニティを測定するとともに、ヒアルロン酸レセプターである RHAMM に対する抗体存在下における PC12 細胞の形態変化と p38 MAPK、ERK リン酸化の変化を検討した。

【結果】

ヒアルロン酸は PC12 細胞の細胞増殖能に影響を与えなかったが、NGF 誘導性神経突起伸長、NF68 発現、および MAPK (p38、ERK) と CREB のリン酸化をヒアルロン酸濃度依存性に抑制していた。また、pCRE-Luc プラスミドをトランスフェクトした PC12 細胞が示す NGF 誘導性ルシフェラーゼ活性はヒアルロン酸により明らかに抑制された。さらに、ヒアルロン酸と NGF の直接相互作用を示す生化学的アフィニティは認められないこと、および抗 RHAMM 抗体の存在下では HA による p38 リン酸化抑制は変化しないものの ERK リン酸化の抑制は回復されることが明らかとなった。

【考察】

今回、PC12 細胞でみられる p38、ERK および CREB を介した NGF 誘導性神経突起伸長はヒアルロン酸により抑制されること、ヒアルロン酸は NGF とは直接結合せず、ヒアルロン酸レセプターである RHAMM を介して NGF による ERK 活性化を抑制していることが明らかとなった。以上の結果は、ヒアルロン酸による PC12 細胞の神経細胞分化抑制には、ヒアルロン酸が NGF に結合することによる直接的制御ではなく、RHAMM レセプターを介した間接的制御が関与していることを示している。今後、更に詳細に解析を進め、歯髄創傷治癒・再生過程での神経組織再構築メカニズムにおけるヒアルロン酸の役割を明らかにしていく予定である。

【結論】

ヒアルロン酸は、RHAMM レセプターを介して、PC12 細胞の ERK を介した NGF 誘導性神経突起伸長を抑制する。

IL-1 α および IL-1 β によるマウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の動態における MAPK 系の関与

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⁾岡山大学医学部・歯学部附属病院 歯周科,
³⁾国立療養所大島青松園, ⁴⁾国立療養所邑久光明園

○富山高史¹⁾, 成石浩司²⁾, 大森一弘^{2,3)}, 久保克行¹⁾, 前田博史¹⁾, 新井英雄^{2,4)}, 高柴正悟¹⁾

Involvement of MAPKs on IL-1 α or IL-1 β -mediated Responses of MC3T3-E1 Osteoblastic Cells

¹⁾Department of Pathophysiology - Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ²⁾Department of Periodontics & Endodontics, Okayama University Hospital,

³⁾National Sanatorium Oshima Seisho-en, ⁴⁾National Sanatorium Oku Komyo-en

○Takashi Tomiyama¹⁾, Koji Naruishi²⁾, Kazuhiro Omori^{2,3)}, Katsuyuki Kubo¹⁾, Hiroshi Maeda¹⁾, Hideo Arai^{2,4)}, Shogo Takashiba¹⁾

【緒言】

根尖性歯周炎の病態は様々な視点から解明されてきたが、その治癒過程の分子メカニズムは未だ不明である。そこで我々は、ラット根管治療モデルを用いて、根尖周囲組織の遺伝子動態を遺伝子マイクロアレイ法によって網羅的に解析し、炎症期の Interleukin (IL) -1 β の発現上昇、および治癒期の IL-1 α 発現上昇という知見 (Martinez *et al*, *J Endod*, 2007) を基に、根尖性歯周炎病巣での治癒 (骨再生) を制御し得る IL-1 α および IL-1 β の骨芽細胞への作用に着目してきた。

これまでに我々は、マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) において、IL-1 α は IL-1 β に比べ、①細胞増殖活性を亢進し、同時に、②硬組織誘導能を亢進することを報告した (第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会)。しかしながら、上記の細胞反応を制御する細胞内刺激伝達系については不明である。そこで、今回、根尖性歯周炎の治癒メカニズムの一端を解明することを目的に、IL-1 α および IL-1 β 刺激による骨芽細胞の、①増殖活性に及ぼす MAPK 系の影響、および、②接着性の変化を検討した。

【材料および方法】

細胞培養: マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (理研 Cell Bank) は、ウシ胎児血清を 10% の割合に含む α -MEM 培地 (Invitrogen) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

p38 MAPK および ERK1/2 のリン酸化の検出: リコンビナントマウス IL-1 α および IL-1 β (R&D; 0-10 ng/ml, 10 分間) にて刺激した後、それぞれの特異抗体を用いたウエスタンブロット法によって検出した。

細胞増殖活性の測定: MTT [3-(4,5-dimethyl-thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma) 法を用いて測定した。すなわち、細胞を 1.6×10^4 個/96 well の密度に播種し、その 24 時間後に IL-1 α および IL-1 β (ともに 0-10 ng/ml) で刺激した。その後、24 時間培養し、MTT を最終濃度 0.5 mg/ml になるように添加した。細胞の増殖活性は、MTT を吸収して青褐色のホルマゼンを形成した細胞を酸性プロパノールで溶解した後、その溶解液の発色程度を吸光度計 (Bio-Rad; 測定波長: 595 nm) を用いて調べた。なお、MAPK 阻害剤として、p38 MAPK 阻害剤 (SB203580, 10 μ M) および ERK 阻害剤 (PD98059, 50 μ M) (ともに Calbiochem) を用いた。

細胞接着性の観察: 細胞を 1×10^6 個/6 well の密度に播種した後、IL-1 α および IL-1 β (0-10 ng/ml) で 24 時間刺激した後、リン酸緩衝生理食塩水で 3 回洗浄した後の細胞の様態を位相差顕微鏡で観察した。

統計解析: 各実験系における有意差は、Student's *t*-test を用いて検定し、P 値が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

【結果】

MC3T3-E1 細胞において、以下の事象が観察された。

1. IL-1 α および IL-1 β 刺激によって、p38 MAPK および ERK1/2 のリン酸化が誘導された。IL-1 α 刺激によるリン酸化の程度は、IL-1 β 刺激に比べ増強される傾向があった。
2. IL-1 α 刺激によって、細胞増殖活性は有意に亢進した。その活性の亢進は p38 MAPK および ERK 阻害剤によって有意に減少した。また、IL-1 α 刺激による細胞増殖活性は、IL-1 β 刺激のそれと比較して有意に亢進した (P<0.05)。
3. IL-1 α および IL-1 β 刺激による培養プレートへの細胞接着性の亢進が観察された。その接着性は p38 MAPK 阻害剤によって抑制された。

【考察および結論】

IL-1 α は、p38 MAPK および ERK を介して MC3T3-E1 の細胞増殖活性を亢進し、p38 MAPK を介して細胞接着性を亢進した。また、IL-1 β は p38 MAPK を介して MC3T3-E1 の細胞接着性を亢進した。このような IL-1 α および IL-1 β による骨芽細胞の動態制御は、根尖性歯周炎の治癒メカニズムの一翼を担う可能性があると考えられる。

MTAによる培養ラット歯髄細胞の象牙芽細胞様分化に及ぼす影響

昭和大学歯学部齶蝕歯内治療学講座

○小林未歩、増田宜子、山田嘉重、松本光吉

Effects of MTA on the odontoblast-like differentiation of cultured rat pulp cells

Department of Cariology and Endodontology, Showa University School of Dentistry

○Miho Kobayashi, Yoshiko Masuda, Yoshishige Yamada, Koukichi Matsumoto

【目的】

MTA (mineral trioxide aggregate) は従来行われている水酸化カルシウムを用いる方法より硬組織の誘導が顕著であり、組織親和性が高いことなどにより、諸外国ではパーホレーション、アペキシフィケーションの処置、根管充填剤などに応用されている。第127回の本会において我々は、培養ラット歯髄細胞のMTAによる象牙芽細胞様細胞分化への影響について Heat-shock protein (Hsp)-25 の発現をみるために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫組織学的について報告した。今回はさらに、MTAに対する培養ラット歯髄細胞の Hsp-25gene の発現を RT-PCR で検討した。

【材料及び方法】

5週齢の雄性Wister系ラット(同腹)4匹の下顎切歯より歯髄組織を摘出し、collagenase、trypsin、EDTAを含む酵素液にて細胞を分離して5%CO₂条件下にてα-MEM培地に10%FBSを加え培養し1週間後に12ウェルプレートに1×10⁵個/wellにて継代した。培養液は2日毎に交換した。継代1週間後に、直径7mm、高さ3mmのMTA(DENTSPLY Tulsa Dental)、Dycal(DENTSPLY CAULK)を37℃湿潤下30分間硬化させた後、培養ウェル中央に静置した。静置後2時間、18時間、2日からそれぞれTotal RNAの生成後cDNAを合成し、RT-PCRにてHsp-25の遺伝子発現をコントロール群と比較した。

【結果】

2日目では、MTAを用いた細胞のHsp-25に対する遺伝子発現でコントロール群より高い結果となった。

【考察及び結論】

MTAは生体親和性が高く、歯髄に対し低刺激性であり効果的な材料と考えられているが、歯髄を象牙芽細胞様細胞に分化誘導することができことが示唆された。

ラット培養歯髄細胞における HSPG (gpc-1, 2, 3, 4) の発現について

昭和大学歯学部齶触・歯内治療学教室
増田 宜子、山田 嘉重、小林 未歩、松本 光吉

Expression of cell-surface proteoglycan (gpc-1, 2, 3, 4) in rat cultured dental pulp cells.

Yoshiko Masuda, Yoshishige Yamada, Miho Kobayashi, Koukichi Matsumoto

(目的)

ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は種々の細胞増殖因子や基底膜細胞外マトリックス成分などの広範な蛋白質と結合してこれらの蛋白質の活性や機能を制御し、細胞内に特異的なシグナル応答を導く。我々が作成した象牙芽細胞様細胞が多く含まれるラット切歯歯髄の cDNA library から無作為に 200 個のクローンを採取し塩基配列を調べたところ、*glypican-1* が含まれていた。Glypican-1 (GPC-1) は細胞膜表面に存在する細胞膜型 HSPG である。歯髄の治癒過程における GPC-1 の発現を酵素抗体法によって調べたところ象牙芽細胞様細胞で発現していた。ラット培養歯髄細胞において *glypican-1* の発現を調べてきたが、他の *glypican (-2, -3, -4)* が歯髄細胞でどのように発現しているのかはわかっていない。そこで、本研究ではラット培養歯髄細胞における *glypican-1, 2, 3, 4* 遺伝子の発現について検討することを目的とした。

(材料及び方法)

5 週齢の雄性 Wistar ラット (同腹) 4 匹の下顎切歯より歯髄組織を摘出し、Collagenase、trypsin、EDTA を含む酵素液にて細胞を分離し 5%CO₂ 条件下にて α -MEM 培地に 10% FBS を加え培養し 1 週間後に 12 ウェルプレートに 4 x 10⁴ 個/well にて継代した。300 μ g/ml β -Glycerophosphate、50 μ g/ml Ascorbic acid をさらに α -MEM (FBS) に加えて培養した。培養液は 2 日ごとに交換した。継代 0, 7 日にてそれぞれ Total RNA を精製し cDNA を合成し、*glypican-1, 2, 3, 4* の歯髄細胞での発現を RT-PCR 及び real-time PCR によって調べた。

(結果)

コントロール及び β -Glycerophosphate、Ascorbic acid を培地に加えた 0, 7 日において *glypican-3, 4* の発現は顕著であったが、*glypican-2* の発現はいずれの場合も微量であった。コントロールと象牙芽細胞様細胞への分化を促した場合での *glypican-2, 3, 4* それぞれの発現量の違いはわずかであった。

(考察及び結論)

ラット培養歯髄細胞において *glypican-1, 2, 3, 4* の発現を調べた結果、発現量に違いがあることがわかった。*glypican-2* や *3, 4* は象牙芽細胞様細胞への分化や硬組織産生過程において発現量があまり変化しないのではと推測されるが、30 日までの長い経過についても今後検討する予定である。

ヒト歯髄培養細胞の石灰化物形成におけるPGE₂受容体の役割

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座
○坂本真樹, 安念素代, 富田 敬, 武内ひとみ, 松島 潔

Role of PGE₂ receptors on Mineralization of Human Dental Pulp Cells
Dept. of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
OMaki SAKAMOTO, Motoyo ANNEN, Takashi TOMITA, Hitomi TAKEUCHI
and Kiyoshi MATSUSHIMA

【緒言】

歯髄炎は外的刺激により励起される炎症であり、その炎症反応が軽度の場合、歯髄は修復象牙質を形成するが、炎症が進むと歯髄組織は不可逆性歯髄炎へと陥ってしまう。歯髄炎の進行に伴って炎症のケミカルメディエータである Prostaglandin E₂ (PGE₂) の産生が増加すると報告されており、また、PGE₂ は骨形成と骨吸収の二面性を併せ持つと考えられている。これまでに演者らは PGE₂ がその低濃度領域 (0.1 μM 以下) にて硬組織形成を促進させることを報告してきた (日本歯科保存学会誌, 46: 445-450, 2003)。しかし、その調節機構についての詳細は解明できていない。そこで本研究では PGE₂ を硬組織形成の調節因子として捉え、その調節機構の解明を行う一助として、PGE₂ 作用時のレセプター発現の検索を行った。

【材料および方法】

歯髄細胞は矯正学的理由により抜去された歯から歯髄を無菌的に取り出し、10%ウシ胎児血清を含む α-MEM を用いて 5~9 代継代し、歯髄培養細胞 (HDP) として研究に供した。細胞はコンフルエント直前に 0, 0.1 μM の濃度の PGE₂ を 4 時間作用させ、細胞回収後、全 RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて DNA の増幅を行い、PGE₂ のレセプターである EP1, 2, 3, 4 の遺伝子発現の観察を行った。また、上記と同様に培養した歯髄細胞に対し、EP2 のアゴニストである Butaprost (0.1 μM) を作用させ、12 日間培養後、大島らの方法により ALP 活性の測定を行い、また、同一条件下にて長期培養を行い、Calcified Nodule 形成の確認を von Kossa 染色を用いて行った。

【結果および考察】

PGE₂ 無添加のコントロール、および PGE₂ 添加群、ともに、EP1, 3, 4 の発現は認められなかった。さらに、PGE₂ の作用群ではコントロールと比較して、EP2 の発現の増強が観察された。また、EP2 のアゴニストである Butaprost を添加することで、コントロールと比較して、ALP 活性ではその上昇が観察され、von Kossa 染色でも Calcified Nodule の形成数の増大が認められた。

これらのことから、歯髄培養細胞における、低濃度の PGE₂ 刺激時の石灰化物形成には 4 つのサブタイプが存在する PGE₂ レセプターの中でも、EP2 のみはその情報伝達系に深く関与していることが示唆された。

この研究の一部は平成 20 年度科学研究費補助金 (若手研究 (B)) (19791414) によって行われました。

炎症歯髄組織における RAGE および HMGB1 の発現

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科保存学分野

○徳田雅行, 作田哲也, 小山徹, 達山祥子, 川上克子, 長岡成孝, 鳥居光男

Expression of the receptor for advanced glycation endproducts and high mobility group box 1 in human dental pulp tissues

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Medicine

○TOKUDA Masayuki, SAKUTA Tetsuya, OYAMA Tohru, TATSUYAMA Shouko, KAWAKAMI Yoshiko, NAGAOKA Shigetaka, TORII Mitsuo

[研究目的]

High mobility group box 1(HMGB1)は、最近新たな炎症マーカーとして注目されるサイトカインである。本来は DNA の立体構造の維持に重要な役割を果たす DNA 結合タンパクであるが、これが多くの細胞の壊死に伴い細胞外に放出され、RAGE(receptor for advanced glycation endproducts)に作用し NF- κ B を活性化し、炎症性サイトカインとして働く。HMGB1 は、炎症刺激に対して放出されるだけでなく、それ自身がマクロファージや好中球からの炎症性メディエーターの産生を誘導する。HMGB1 刺激に対して、毛細血管内皮細胞における接着分子 (RAGE, ICAM-1, and VCAM-1) の発現が上昇し、腫瘍壊死因子 (TNF) や白血球遊走因子 (IL-8) などの炎症性サイトカインの分泌を促す。このことは、HMGB-1 が感染や組織傷害における血管内皮の炎症反応を悪化させる可能性を示唆している。また、RAGE は免疫グロブリンスーパーファミリーのひとつであり、単球、白血球、血管平滑筋細胞やニューロンで発現が確認されている。さらに、HMGB1 は従来の炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β よりも遅れて出現し (late mediator)、細胞障害性を示すことから、致死因子 (lethal mediator) として知られている。われわれは、以前に温度痛覚に関わる因子である VR1 の研究において、炎症性ファクターの発現の後に細胞死が誘導されることを観察している。現在のところ、RAGE と HMGB1 は他の炎症組織での発現が確認されているが、歯髄組織における両者の発現は報告されていない。そこで今回は、歯髄炎における細胞壊死に HMGB1 と RAGE が関係するという仮説の元、炎症歯髄組織と正常歯髄組織を用いてこれらの発現を比較検討し、歯髄炎におけるこれらの役割を探ることを目的とした。

[材料と方法]

1. 不可逆性歯髄炎と診断された歯牙から摘出した歯髄組織 10 例およびう蝕を認めない抜去歯牙から摘出した歯髄組織 10 例を採取し、パラフィン切片を作製した。
2. 免疫染色；RAGE に対する抗体を用いて免疫染色を行った。
3. ウェスタンブロット分析；RAGE および HMGB1 に対する抗体を用いてウェスタンブロット分析を行った。
4. ELISA；組織から抽出したタンパクを用いて、ELISA 法にて HMGB1 の産生を調べた。

[結果]

1. 免疫染色では、炎症歯髄組織の毛細血管内皮や象牙芽細胞の周囲および線維芽細胞において強い RAGE の発現を認めた。
2. これに対して、正常歯髄組織ではわずかに毛細血管内皮と線維芽細胞にのみ発現しており、象牙芽細胞層には発現していなかった。
3. ウェスタンブロット分析では、炎症歯髄組織において RAGE および HMGB1 の発現が強く見られたが、正常歯髄組織における発現はわずかであった。
4. ELISA では、炎症歯髄組織における HMGB1 のタンパク産生は正常歯髄組織のそれに比べて有意に上昇していた。

[考察・結論]

炎症歯髄組織において RAGE および HMGB1 の発現が正常歯髄組織に比べて優位に発現していたことから、両者の発現は不可逆性歯髄炎における歯髄組織の組織破壊や細胞壊死に少なくとも部分的に関わる可能性を示唆している。

さらに、この状況における両者の発現は、不可逆性歯髄炎における治療方針の指標としても考えられ、また以前の研究とあわせて、歯髄炎における細胞壊死のメカニズム解明に役立つかもしれない。今後は、HMGB1 が歯髄の細胞壊死にどのように関わるか、細胞レベルでの検討を考えている。

FGF-2 濃度の違いが象牙質欠損部における硬組織誘導に与える影響

九州歯科大学口腔治療学講座齲蝕歯髄疾患制御学分野¹, 京都大学再生医科学研究所
生体組織工学研究部門生体材料学分野², 九州歯科大学医療人間形成学講座総合診療学分野³

○石松宏隆¹, 北村知昭¹, 諸富孝彦¹, 田畑泰彦², 寺下正道³

Effects of FGF-2 Concentration on Induction of Hard Tissue Newly Formed in Dentin Defects

Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Kyushu Dental College¹

Department of Biomaterials, Institute for Frontier Medical Science, Kyoto University²

Division of Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental College³

○ ISHIMATSU Hiroataka¹, KITAMURA Chiaki¹, MOROTOMI Takahiko¹, TABATA Yasuhiko², TERASHITA Masamichi³

【目的】

これまでに我々は、象牙質/歯髄複合体再生療法確立を目的に、細胞増殖・分化促進能を有する FGF-2 を徐放するゼラチンハイドロゲル粒子を断髄部に充填したところ、断髄面上の象牙質欠損部に象牙質様新生硬組織が誘導されることを報告してきた。今回、ゼラチンハイドロゲル粒子から徐放される FGF-2 濃度の違いが断髄部に形成される新生硬組織の性状に与える影響について検討した。

【材料と方法】

各種濃度 (0, 0.05, 0.5, 1.0, 5.0 mg/ml) の FGF-2 (10 μ l) をゼラチンハイドロゲル粒子 (含水量 95 vol%) 1.0 mg に滴下することにより FGF-2 含有ゼラチンハイドロゲル粒子を調製した。9 週齢 Wistar 系ラットの上顎第一臼歯咬合面より 1/2 ラウンドバーで断髄し、断髄面を次亜塩素酸ナトリウム溶液およびオキシドールで交互洗浄・止血後、各濃度の FGF-2 含有ゼラチンハイドロゲル粒子とコラーゲンスポンジの混合物を断髄部に充填し封鎖した。一定期間経過後、通法に従いパラフィン切片を作成し、充填部歯髄組織の変化をヘマトキシリン・エオシン染色により観察するとともに、DMP-1 の局在を免疫組織学的に検討した。

【結果】

術後 1 週では、すべての群において断髄面上の象牙質欠損部には歯髄組織侵入が観察された。FGF-2 徐放群では FGF-2 を徐放しない 0mg/ml FGF-2 群と比較して新生血管形成・侵入が多く認められたが、象牙質欠損部内での新生硬組織形成はすべての群において認められなかった。術後 3 週では、FGF-2 徐放群において新生硬組織形成が観察されたが、形成された硬組織の性状は徐放される FGF-2 濃度によって異なっていた。0 および 0.05 mg/ml FGF-2 濃度群では、硬組織形成はほとんど認められず、象牙質欠損部は侵入した歯髄組織で満たされていた。一方、0.5, 1.0, および 5.0 mg/ml FGF-2 濃度群では象牙質欠損部に侵入した歯髄組織内に硬組織形成が認められた。特に 0.5 mg/ml FGF-2 濃度群では象牙質欠損部侵入歯髄組織の最表層に dentin bridge 様新生硬組織形成が観察され、硬組織形成量の比較においても 0.5mg/ml FGF-2 群が最も大きかった。また、誘導された硬組織には DMP-1 陽性反応が認められた。

【考察】

今回、ゼラチンハイドロゲル粒子から徐放される FGF-2 濃度の違いにより断髄面上の象牙質欠損部に誘導される新生硬組織の形成量および形態が異なること、誘導された新生硬組織は DMP-1 陽性反応を示すことから象牙質と類似した性状を有することが明らかとなった。以上の結果は、象牙質・歯髄欠損部において最適な FGF-2 濃度を徐放することにより、本来の組織構造を有する象牙質/歯髄複合体が再生する可能性を示唆している。

【結論】

ゼラチン粒子から徐放される FGF-2 濃度の違いは、断髄面上の象牙質欠損部に誘導される新生象牙質様硬組織の性状に影響を与える。

培養歯髄細胞におけるカテキンの cell signaling に対する影響

徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 発達予防医歯学部門
健康長寿歯科学講座 歯科保存学分野

平尾功治、湯本浩通、中西正、高橋加奈子、向井佳代、松尾敬志

Effects of catechin on cell signaling in cultured human pulp cells

Department of Conservative Dentistry, Institute of Health Biosciences,
The University of Tokushima Graduate School

Kouji HIRAO, Hiromichi YUMOTO, Tadashi NAKANISHI, Kanako TAKAHASHI, Kayo MUKAI,
and Takashi MATSUO

【研究目的】

近年、ポリフェノール類の一種であるカテキンが抗菌作用・抗炎症作用などの様々な作用を持つことが報告されている。我々は、特にカテキンの抗炎症作用に着目し、歯髄炎の治療・予防法への応用の第一歩として、これまでにカテキンが培養歯髄細胞における自然免疫反応を抑制することを報告した(第127回秋季および第124回春季学術大会)。しかしながら、カテキンが有する抗炎症作用の詳細なメカニズムについては明らかにされていない。そこで、本研究では、この抗炎症作用のメカニズムを解明することを目的として、培養歯髄細胞におけるカテキンの影響について cell signaling の面から検討した。

【材料と方法】

1. 歯髄細胞の培養

徳島大学病院歯科を受診し、う蝕および歯周炎を有さず矯正治療目的のために抜去された健全智歯より、歯髄を採取し、通法に従い5~10代継代したものを実験に供した。

2. 歯髄細胞の刺激と反応解析

培養歯髄細胞を96穴プレートに播種し、サブコンフルエントまで培養した後、各シグナル経路特異的阻害剤にて1時間前処理後、Pam3CSK4 (Sigma), MDP (Invivogen)にて刺激し、培養上清中のIL-8濃度をELISA法にて測定した。

また、6穴プレートに播種し、サブコンフルエントまで培養した培養歯髄細胞を、Pam3CSK4, MDPならびにEpicatechin gallate (ECG), Epigallocatechin-3-gallate (EGCG)にて一定時間刺激・処理を行った後、細胞をlysis Bufferを用いて回収し、各cell signaling molecule特異的抗体を用いたWestern blot法にてカテキンの影響を解析した。

【結果】

1. Pam3CSK4刺激によりヒト培養歯髄細胞のp38 MAP kinaseのリン酸化が認められた。またcytosolにおいてNF- κ B transcription factor と complex を形成するI κ B α のリン酸化も認められた。
2. Pam3CSK4単独あるいはMDPとの刺激によるヒト培養歯髄細胞のIL-8産生増強は、p38 MAP kinase阻害剤であるSB20358にて有意に抑制された。
3. カテキンはPam3CSK4刺激によるヒト培養歯髄細胞のp38 MAP kinaseのリン酸化を抑制した。
4. カテキンはPam3CSK4刺激によるヒト培養歯髄細胞のI κ B α のリン酸化も抑制した。
その抑制効果は、EGCGの方がECGより強かった。

【考察】

本研究において、培養歯髄細胞は、Pam3CSK4やMDPの刺激によりNF- κ Bやp38 MAP kinase経路が活性化され、IL-8の産生増強が生じること、さらに、これらのシグナル経路の活性化は、カテキンによって抑制されることが明らかとなった。これらの結果より、カテキンの有する培養歯髄細胞に対する抗炎症作用は、上記のシグナル経路を抑制することによってもたらされていることが示唆された。

現在、他のシグナル経路への影響についても解析中である。

PGE₂添加ヒト歯髄細胞の石灰化物形成におけるsmadsの動態

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座
○安念素代, 坂本真樹, 岡部 達, 大林英美, 松島 潔

Manner of smads on Mineralization of Human Dental Pulp Cells stimulated by PGE₂
Dept.of Endodontics ,Nihon University School of Dentistry at Matsudo
OMotoyo ANNEN, Maki SAKAMOTO, Tatsu OKABE, Emi OBAYASHI
and Kiyoshi MATSUSHIMA

【緒言】

歯髄は慢性う蝕や磨耗症、咬耗症などの軽度な刺激を受けると、その防御機転として、修復象牙質を形成することが知られている。しかし、この硬組織形成のメカニズムについては明らかにされていない。これまでに演者らは、炎症のケミカルメディエーターであるPGE₂が、その低濃度域(0.1μM以下)では、歯髄培養細胞の硬組織形成能の分化促進を促し、高濃度域(1μM以上)では硬組織形成能の分化を制御していること、さらには炎症性サイトカインであるTNF-α添加時の硬組織形成の制御にはTGF-βスーパーファミリーの細胞内シグナル伝達を担うsmadsの動態が関与していることを報告してきた。(日本歯科保存学会誌 2003; 46: 445-50, J Endod 2006; 32: 516-520) これらのことから硬組織形成能促進と炎症にかかわる促進、抑制には共有型smad4、特異型smad1,5,8 と抑制型smad6,7などのsmadsが中心となっているであろう推測を立てた。そこで本研究では、smadsがPGE₂の硬組織形成の制御に関与しているものと考え、その調節機構の解明を行う一助として、PGE₂作用時のsmadsの動態について検索を行った。

【材料および方法】

歯髄細胞は矯正学的理由により抜去された歯から歯髄を無菌的に取り出し、10%ウシ胎児血清を含むα-MEMを用いて5~9代継代し、歯髄培養細胞(HDP)として研究に供した。細胞はコンフルエント直前に0, 0.1, 1μMの濃度のPGE₂を4時間作用させ、細胞回収後、全RNAを抽出し、RT-PCR法を用いてDNAの増幅を行い、smads(smad1, 7)の遺伝子発現の観察を行った。また、上記と同様に培養した歯髄細胞に対し、同一条件下にて長期培養を行い、Calcified Nodule形成の確認をvon Kossa染色を用いて行った。

【結果および考察】

コントロールと比較して、0.1μM PGE₂添加群では、smad7のmRNA量の減少がわずかながら認められ、1μM PGE₂添加群においては、逆にmRNA量の増加を認めた。smad1のmRNA量に関しては、すべての作用群において、変化は認められなかった。また、von Kossa染色において、0.1μM PGE₂添加群では、コントロール、および1μM PGE₂添加群と比較し、Calcified Noduleの形成数の増大が認められた。

これらのことから、PGE₂の濃度によって硬組織形成が促進あるいは抑制される、調節機構には、smadsが多く関与していると考えられ、特に高濃度のPGE₂の硬組織形成能抑制はsmad7の増加によるものであると示唆された。この研究の一部は平成20年度科学研究費補助金(基盤研究(C))(20592239)、および平成20年度科学研究費補助金(若手研究(B))(19791414)によって行われました。

不死化イヌ歯髄細胞の特性について

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学分野
半田慶介、小池俊之、斎藤隆史

Characterization of immortal dog dental pulp cells

Health Sciences University of Hokkaido, School of Dentistry, Department of Oral rehabilitation,
Division of Cariology and Endodontology
Keisuke Handa, Toshiyuki Koike, Takashi Saito

【目的】

偶発的な露髄に対して水酸化カルシウムを用いた直接覆髄は、これまで一定の効果をあげているが新生庇蓋硬組織の形成をコントロールすることは不可能であり、磐石な硬組織形成は期待できない場合が多い。臨床において歯髄保護の観点から水酸化カルシウム製剤に代わる早期に硬組織形成を促す薬剤開発が望まれている。また、一方で象牙質形成機構の研究においてはマーカー分子の同定と組織形態学的な探索が主で、細胞自身に旺盛な増殖能がないことから象牙芽細胞の培養が難しく、その分化機構は不明な点が多い。さらに正常細胞には一定回数の分裂を繰り返した後分裂を停止してそれ以上増殖しなくなるというヘイフリック限界が存在する。この有限回数の分裂を超えて細胞寿命の延長が可能になれば、これまで不明であった象牙芽細胞分化誘導現象を解明することが可能となる。そこで今回我々は、ヒトテロメラーゼ触媒サブユニット (hTERT) およびヒトパピローマウイルス (HPV) の E6, E7 遺伝子でイヌ歯髄細胞の不死化を行い、象牙芽細胞分化機構解明のため *in vitro* での石灰化能を検討した。

【方法】

ビーグル犬上顎前歯を抜歯後、歯髄を摘出した。摘出した歯髄をコラゲナーゼによって段階的に消化し、イヌ歯髄細胞 (Dog Dental Pulp Cells: DDP) を採取した。その後レトロウイルスベクターで hTERT および HPV E6, E7 遺伝子を遺伝子導入して不死化 DDP を得た。得られた不死化 DDP と遺伝子導入をしていない DDP を以下の方法で比較検討した。①BMP2 または bFGF の存在下で細胞培養して total RNA を通法によって回収し、逆転写によって得られた cDNA を用いて *in vitro* における石灰化能を象牙質関連遺伝子 (Dentin sialoprotein, Osteopontin, Osteocalcin, Type I collagen, Runx2) の発現を調べた。②ALPase 活性の測定で調べた。

【結果および考察】

不死化 DDP は遺伝子導入をしていない正常歯髄細胞と比較して寿命が延長していた。また BMP2 存在下では象牙質関連遺伝子群を発現し、アリザリンレッド染色によって *in vitro* における石灰化の可能性が示唆された。DDP は象牙芽細胞に分化可能な細胞を含んでいるが、それ以外に線維芽細胞や脈管系、神経系の細胞を多く含む細胞集団であると考えられる。BMP2 やその他の薬剤に対してよりシャープな反応性を観察するためには、細胞のクローニングが必要になると考えられる。新規覆髄剤作成のため、*in vitro* における材料のスクリーニングに使用できれば効率的に覆髄剤の選定に使用できる可能性が高いと思われる。さらに将来的には本細胞を用いて象牙芽細胞分化機構の解明を行い、細胞分化を制御する分子が同定できれば遺伝子導入という手法を用いることなく寿命延長や分化維持に役立つと考えられる。

【まとめ】 今回の実験結果から、本研究で作製した分化能を維持した不死化イヌ歯髄細胞は、象牙質形成機構の解明や新規覆髄剤の開発に役立つことが示唆された。

ステロイド剤長期服用患者に見られた象牙質知覚過敏症の一症例

徳島大学医学部歯学部附属病院 歯科 (歯周病科)
下川 洋介、堀部 ますみ、大石 慶二、永田 俊彦

Dentin hypersensitivity in a SLE patient receiving a long-term steroid therapy: a case report
Department of Periodontology and Endodontology,
Tokushima University Hospital
SHIMOKAWA Yosuke, HORIBE Masumi, OISHI Keiji, NAGATA Toshihiko

【緒言】象牙質知覚過敏症 (Dentin hypersensitivity) は、何らかの原因により象牙質が口腔内に露出し、ここに温度刺激、擦過刺激、化学刺激のような外来刺激が加わることによって鋭い痛みが一過性に生じるものである。これら外来刺激が痛みを誘発する機構は象牙細管内の組織液の移動によると考えられている。また、歯髄神経の外来刺激に対する閾値低下も知覚過敏症に関連する可能性がある。

全身性エリテマトーデス (SLE) は膠原病の一種で、自己抗体や免疫複合体の出現に基づく多臓器障害を主徴とする疾患である。その原因として遺伝要因、環境要因、免疫異常などがあると考えられているが、詳細は不明である。治療としては環境因子の除去や、ステロイド剤、免疫抑制剤の投与が行われている。今回、SLE の治療のためステロイド剤を服用中の患者で全顎的に象牙質知覚過敏症を認めた症例に遭遇し、これを治療する機会を得たので報告する。

【症例】患者：29 歳女性。主訴：全顎的に冷たいもの、熱いものがしみて痛い。現病歴：2006 年 4 月頃より全顎的に吸気の時や冷たいものを飲食した際に痛みを自覚するようになった。疼痛は一過性であるが徐々に強くなり、また温かい物に対しても痛むようになった。その後、食事や歯磨き、呼吸の際などの日常生活にも支障をきたすようになったため精査加療を求め医科担当医からの紹介により来科した。既往歴：2005 年 12 月徳島大学病院呼吸器内科において SLE の診断を受け、2006 年 1 月よりプレドニゾロンによる化学療法を開始した。歯科の既往として 13 歳から 26 歳まで矯正治療を受けていたが、歯がしみて治療継続が困難となり主治医と相談し中止した。現症：口腔内診査の結果、全歯わたり冷刺激、温刺激、擦過刺激や吸気に対し一過性の激しい痛みを訴えた。口腔内にカリエス、歯頸部の楔状欠損や歯周病は認められなかった。診断：象牙質知覚過敏症

【処置と経過】全顎的に知覚過敏抑制材 (MS コート) の塗布を数回行ったが全く奏効しなかった。

次に、マウスピースで歯面全体を被覆する事によって外来刺激を遮断し、またこのマウスピースをトレーとして知覚過敏抑制材を長時間作用させる治療を計画した。上顎下顎ともに個人トレーを用いて精密印象を行い、石膏模型を作製した。印象材は患者への刺激を可及的に少なくするため常温のシリコン印象材を使用した。この模型に、エルコプレスをを用いて硬軟 2 層のプラスチックシート (エルコロック：硬質部 1.0mm、軟質部 0.8mm) を、軟質部を内側にして圧接し、歯頸線から 2mm 根尖側まで歯肉を覆うマウスピース (トレー) を作製した。

このマウスピースを使用したところ、装着による違和感はやや感じるものの、呼吸や冷水、温水の摂取による疼痛はかなり軽減した。夜間はトレー内部に MI ペーストを注入し使用している。MI ペーストに含まれるカゼインホスホペプチド非結晶リン酸カルシウム複合体はエナメル質脱灰抑制・再石灰化効果があり、症状の軽減を期待して使用しているが、これまでのところ知覚過敏抑制効果は認められない。

【考察】今回、全顎的に激しい知覚過敏を認める症例を報告した。その原因は不明であるが、エナメル質表面でも擦過刺激に反応すること、歯髄電気診での閾値が低かったことなどから歯髄神経の反応閾値が低下していると考えられた。発症の時期からステロイド剤服用の影響が疑われるが、詳細は不明である。今後この点に関する調査が期待される。治療としては、歯冠全体を物理的に被覆し、外来刺激を遮断することで症状の発現を抑制することができた。今回の処置は原因除去には至らず対症療法である上、発音、摂食などの面で問題も依然残っているが、侵襲的処置を伴わずに症状改善したという利点を有している。今後経過を見ながら痛みの程度を観察し慎重に治療を進める必要がある。

マウス心臓におけるヒト歯周病原菌感染に対するサイトカイン産生

¹⁾ 京都府立医科大学大学院医学研究科歯科口腔科学

²⁾ 京都府立医科大学大学院医学研究科免疫・微生物学

○赤松佑紀^{1, 2)}、山本俊郎^{1, 2)}、山本健太^{1, 2)}、大迫文重^{1, 2)}、喜多正和²⁾、金村成智¹⁾

Cytokine production in heart of mice infected with human periodontal bacteria

Department of Dental Medicine¹⁾ and Microbiology²⁾, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

○Yuki Akamatsu^{1, 2)}, Toshiro Yamamoto^{1, 2)}, Kenta Yamamoto^{1, 2)}, Fumishige Oseko^{1, 2)}, Masakazu Kita²⁾, Narisato Kanamura¹⁾

【研究目的】

近年、歯周病原菌の感染は歯周炎を起こすだけでなく、肺炎、糖尿病、心臓血管病、低体重児出産・早産などの全身へ影響をもたらすことが知られている。その中でも、我々は歯周病の進行により口腔内常在菌である歯周病原菌が血行感染することで、心内膜炎や狭心症、心筋梗塞、動脈硬化など種々の心血管系疾患に影響を及ぼすことに着目した。これまでに、歯周病原菌がマウスの全身に影響を及ぼし、各臓器にサイトカインを発現すること、心臓において発現するサイトカインの変動を第126回、127回本学会にて報告した。そこで今回は、歯周病原菌の感染により心内膜炎に影響することに着目し、歯周病原菌のマウスにおける心臓への影響をサイトカイン産生について検討を加えたので報告する。

【材料および方法】

C57BL/6 マウス (日本チャールスリバー、神奈川) (n=3-4) に尾静脈から、*P. gingivalis* (ATCC33277) を 2.0×10^8 CFU/ml 静脈内投与を行い、*P. gingivalis* 感作マウスを作製した。1ヶ月後、再度 *P. gingivalis* (2.0×10^8 CFU/ml) 静脈内投与後、経時的に心臓、脾臓、肺を摘出し、RT-PCR及びreal-time PCR法を用いてサイトカインmRNAの発現を検討した。なお検討を加えたサイトカインは、IL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-18、TNF- α 、IFN- γ とした。また心臓を対象に組織学的検討の為、感染前後の心臓をパラフィン包埋し組織切片を作製した。組織切片は4 μ mとし、脱パラフィン処理後、HE染色を用いた病理組織学的検討に加え、マウスTNF- α 抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。

【成績】

RT-PCR法の結果では、感染前の心臓においてIL-1 β 、IL-6、IL-17、IL-18、IFN- γ mRNAの発現が認められ、感染後TNF- α mRNAの発現が誘導された。またreal-time PCR法の結果では、経時的に相対量評価を行うと、IL-1 β 、IL-6、TNF- α mRNAが初期に増加、感染12時間後IFN- γ mRNAの発現が誘導された。また各サイトカインについて半定量評価したところ、IL-1 β が他のサイトカインと比べ著しく発現しているのが認められた。

なお、HE染色では感染後に病理学的変化は認めなかったが、免疫組織化学的検討では感染後マウス心内膜部にTNF- α の染色が著明に観察された。

【考察】

歯周病原菌感染後に、心臓に発現していたサイトカイン mRNA 量が増加、もしくは新たなサイトカイン mRNA 発現したことから、歯周病原菌が心臓において炎症の惹起もしくは増悪に関与している可能性が考えられる。また免疫組織化学的検討により、TNF- α などのサイトカインを産生している細胞は、心内膜上皮細胞であることが明らかになった。

今回のヒト歯周病原菌感染モデルにおいては、病理組織学的な心内膜炎の病変を認めず、今後、より病原性の高い歯周病原菌を用いて検討することが必要であると考えられる。

【結論】

ヒト歯周病原菌 *P. gingivalis* 感染により、マウス心臓において有意な炎症性サイトカインの発現増強が認められた。これらの結果より、ヒト歯周病原菌の感染により炎症性サイトカインが誘導され、心内膜炎を惹起している可能性が示唆された。

歯周病原性細菌に対する宿主応答 —マウス膿瘍モデルを用いた免疫組織学的検討—

福岡歯科大学総合歯科学講座総合歯科学分野¹⁾

福岡歯科大学口腔治療学講座歯科保存学分野²⁾

○吉兼 透¹⁾、米田雅裕¹⁾、阿南 壽²⁾、山田和彦¹⁾、鈴木奈央¹⁾、
内藤 徹¹⁾、岡田一三¹⁾、岩元知之¹⁾、榎尾陽一¹⁾、廣藤卓雄¹⁾

Host responses against periodontopathic bacterial challenge -Immunohistochemical examination with murine abscess model-

Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College¹⁾

Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of Odontology, Fukuoka Dental College²⁾

Toru Yoshikane¹⁾, Masahiro Yoneda¹⁾, Hisashi Anan²⁾, Nao Suzuki¹⁾,

Toru Naito¹⁾, Ichizo Okada¹⁾, Tomoyuki Iwamoto¹⁾, Yoichi Masuo¹⁾, Takao Hirofujii¹⁾

【目的】

われわれは以前、さまざまな細菌種をマウス皮下に接種した場合、異なった大きさの膿瘍形成を誘導することを報告し、システインプロテアーゼ gingipain 活性を欠失した変異株は膿瘍形成能が弱いことを明らかにした。しかし、膿瘍部位での宿主応答に関しては不明な点が多い。そこで今回、歯周病原性細菌をはじめとする各種細菌をマウス皮下に接種したあとの宿主応答について組織学および組織化学的に検討した。また gingipain が宿主応答におよぼす影響についても検討を加えた。

【材料および方法】

1) 細菌：下記の細菌（長崎大学 中山浩次教授、サンスター株式会社より供与）を通法通り培養し、遠心により集菌し実験に使用した。 *P. gingivalis* ATCC 33277, KDP 128 (*rgpA rgpB kgp*) , *Tannerella forsythia* ATCC 43037, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Streptococcus mutans* UA130, *Actinomyces viscosus* NY-1。

2) 膿瘍形成実験：各種細菌の濃度を 6.6×10^{10} / ml に調整し、Balb/cNマウス（雌・7~8週齢）の皮下に 150 μ l ずつ接種した。全身状態、膿瘍の大きさを毎日観察しピーク時の膿瘍面積を比較した。

3) 組織学的実験：著明な膿瘍が形成された5日目に屠殺し、膿瘍部を採取した。組織標本は4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定後、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色および酸フォスファターゼ（ACP）染色を行い顕微鏡で観察した。また、一部の標本はラット抗マウスF4/80抗体（MCA497, Serotec）を用いて免疫染色を行った。Histofine Simple Stain Mouse MAX-POキットおよびdiaminobenzidine-H₂O₂ 溶液（ニチレイ）を使用し、メチルグリーン（和光）で対比核染色を行った。

【結果】

1) *P. gingivalis*, *T. forsythia* は、エオジン好性の線維性結合組織で囲まれた大きな膿瘍を形成し、好中球と ACP 陽性細胞が多く認められた。

2) *S. mutans* と *A. viscosus* は比較的境界明瞭な膿瘍を形成し、ACP 陽性細胞の浸潤は軽度であった。

3) *F. nucleatum* 接種により皮膚および一部皮下組織に潰瘍の形成が観察された。また、潰瘍形成の著しい部位では壊死層も認められ、潰瘍の辺縁付近の皮下には ACP 陽性細胞の浸潤が観察された。

4) gingipain 活性を欠失した *P. gingivalis* KDP 128 は小さな膿瘍を形成し、細胞浸潤も軽度であった。

【結論および考察】

以上の組織学および組織化学的検索を行ったところ、病変の性状や程度は各菌種において異なるとともに、病変周囲に観察される ACP 陽性細胞の局在も異なることが明らかになった。特に *P. gingivalis*, *T. forsythia* によって形成された膿瘍部位では ACP 陽性細胞が多く観察された。ACP はライソゾーム酵素のひとつであり病変の急性期あるいは活動期にその増加が認められることから *P. gingivalis*, *T. forsythia* は重度の組織破壊を惹起していると推察された。また、gingipain は組織破壊に重要な役割を演じていると考えられる。

Toll-like Receptor Ligands刺激が誘導する単球のCCL20産生に及ぼすAdrenomedullinの影響

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部発達予防医歯学部門 健康長寿歯科学講座 歯科保存学分野

²⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 保健科学部門 口腔保健学講座 口腔保健支援学分野

○細川育子¹⁾、細川義隆¹⁾、尾崎和美²⁾、中江英明¹⁾、松尾敬志¹⁾

The effects of adrenomedullin on CCL20 production by toll-like receptor ligands-stimulated human monocytes.

¹⁾Department of Conservative Dentistry, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School,

²⁾Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School

○Ikuko Hosokawa ¹⁾, Yoshitaka Hosokawa ¹⁾, Kazumi Ozaki ²⁾, Hideaki Nakae ¹⁾ and Takashi Matsuo ¹⁾

【研究目的】

Adrenomedullin(AM)は、血管拡張を介した降圧作用をはじめとした多くの生理活性を有することが知られるペプチドである。また近年、AMは抗炎症作用をもった内在性の免疫調節因子として作用することが報告されている。我々は、これまでにAMが歯周炎の病態形成に大きく関与しているとされる免疫担当細胞の一つである単球からのToll-like receptor ligands (TLRL) 刺激によるIL-1beta産生を抑制することを本学会(第128回春季学術大会)にて報告した。近年、Th17細胞が関節リウマチといった炎症性疾患における骨吸収に関与していることが報告されている。そこで、本研究ではAMが単球からのTLRL刺激によるTh17ケモカインの一つであるCC chemokine ligand 20 (CCL20)産生に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

健康人末梢血より単核球をHistopaque-1077により遠心分離後、磁気ビーズ(MACS)を用いてCD14陽性細胞を分離し、10%FBSを含むRPMI1640培地にて5%CO₂、37°Cの条件下で培養し実験に用いた。また、AMおよびAMのレセプターであるcalcitonin-receptor-like receptor(CRLR)、receptor-activity-modifying protein type2 (RAMP2) およびRAMP3の単球におけるmRNA発現をRT-PCR法で解析した。さらに、単球をAM存在下あるいは非存在下においてTLR-2 ligand (Pam3CSK4, *P.gingivalis* LPS)、TLR-4 ligand (*E.coli* LPS, Lipid A) あるいはTLR-5 ligand (Flagellin) で刺激し、上清中のCCL20濃度をELISA法にて解析した。

【成績】

AM、CRLR、RAMP2およびRAMP3のmRNA発現がヒト末梢血由来単球で認められた。さらに、TLRL (Pam3CSK4, *P.gingivalis* LPS, *E.coli* LPS, Lipid A, Flagellin) 刺激で誘導したヒト末梢血由来単球からのCCL20産生は、AMを加えることにより抑制された。

【考察および結論】

今回の結果より、AMはTLRL刺激による単球からのCCL20産生を抑制することが明らかとなった。このことより、AMが歯周炎病変局所において単球からのCCL20産生を抑制することにより、炎症局所へのリンパ球浸潤、特にTh17細胞の浸潤に関わっている可能性が考えられた。さらに、Th17細胞が歯周炎における骨吸収への関与が考えられることより、歯周炎治療に応用できる可能性も示唆された。

Effects of Inorganic Polyphosphates on Bone Sialoprotein Gene Expression

Departments of Periodontology ¹ and Research Institute of Oral Science ², Nihon University School
of Dentistry at Matsudo
Tianjin Stomatology Hospital ³

○ Zhitao Wang^{1, 3}, Hideki Takai¹, Yoko Sasaki¹, Masaru Mezawa¹, Shouta Araki¹
and Yorimasa Ogata^{1, 2}

Introduction: Inorganic polyphosphates (Poly (P)) are linear polymers of many orthophosphate residues linked by high-energy phosphoanhydride bonds. Poly (P) modulated mitogenic activities of fibroblast and induced calcification of osteoblast-like cells. Bone sialoprotein (BSP) is a mineralized connective tissue specific protein. Developmental expressions of BSP have shown that BSP mRNA is expressed at high levels at the onset of bone, dentin and cementum formation. The purpose of this study was to investigate the effect of poly (P) on the transcription of BSP in osteoblasts.

Materials and methods: We conducted Northern hybridization, real-time PCR, transient transfection analyses with chimeric constructs of the rat BSP gene promoter linked to a luciferase reporter gene, and gel mobility shift assay.

Results: Northern hybridization showed SPG25 (12.5 μ M, 125 μ M) increased BSP mRNA levels and SPG65 (12.5 μ M, 125 μ M) suppressed BSP mRNA levels in time dependent manners. Results of real-time PCR showed that the treatment with 12.5 μ M SPG25 and SPG65 increased the Runx2 and Osterix mRNA levels at 3 h. Results of luciferase assays showed SPG25 (12.5 μ M, 125 μ M, 12 h) stimulated luciferase activities of the constructs pLUC3 (-116 to +60) and pLUC4 (-425 to +60). On the other hand, SPG65 (12.5 μ M, 125 μ M, 12 h) inhibited luciferase activities of the constructs pLUC3 (-116 to +60) and pLUC4 (-425 to +60). The effects of SPG25 and SPG65 on the BSP transcription were inhibited by cAMP-dependent protein kinase inhibitor H89 (5 μ M) and tyrosine kinase inhibitor herbimycin A (HA, 1 μ M). Mutation analyses showed that the effect of SPG25 (12.5 μ M, 125 μ M, 12 h) was abrogated by 2bp mutations in the FGF2 response element (M-FRE) and the effect of SPG65 (12.5 μ M, 125 μ M, 12 h) was abrogated by M-FRE and in pLUC3. While the results of pLUC4 mutations showed the mutated HOX site (M-HOX) reduced the effects of SPG25 (12.5 μ M, 125 μ M), no effect of M-CRE, M-Runx2 (1) and M-Runx2 (2) was observed. In gel shift assay, the formation of FRE and HOX-protein complexes were increased by 12.5 μ M and 125 μ M SPG25 at 6 h. When SPG65 was used in gel shift assay, the formation of FRE and 3'-FRE-protein complexes was decreased.

Conclusion: These studies, therefore, showed that two kinds of Poly(P) had contradictory effects on BSP expression. Our results indicated that SPG25 upregulated BSP gene expression through tyrosine kinase, and PKA dependent pathways and that the effects were mediated by FRE and HOX elements in the proximal promoter of the rat BSP gene. However, SPG65 reduced BSP gene expression in ROS17/2.8 cells.

Co-investigator without membership of JCD: Li Yang, Zhengyang Li, Xinyue Li; Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan.

上皮細胞増殖因子 (EGF) はヒト口腔上皮細胞の抗菌ペプチド発現を調節する

¹徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部歯周歯内治療学分野
²産業技術総合研究所健康工学研究センターバイオマーカー解析チーム
○廣島佑香¹、板東美香¹、木戸淳一¹、片岡正俊²、永田俊彦¹

Epidermal growth factor (EGF) regulates the expression of antimicrobial peptides
in human oral epithelial cells

¹Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, ²Nano-bioanalysis Team, Health Technology Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

○Yuka HIROSHIMA¹, Mika BANDO¹, Jun-ichi KIDO¹, Masatoshi KATAOKA², Toshihiko NAGATA¹

[背景]

皮膚や粘膜の上皮細胞により産生される抗菌ペプチドは、生体の自然免疫機能の維持に貢献し、口腔内の感染予防においても重要な役割を果たしている。生体抗菌ペプチドの1つであるカルプロテクチン (S100A8 と S100A9) は、歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* の口腔粘膜上皮細胞への付着および増殖を抑制することが知られている。また、ディフェンシンは炎症性刺激により上皮細胞において合成、分泌され、粘膜表面での感染防御に関与している。我々は、カルプロテクチンの発現や遊離が炎症性サイトカインや上皮細胞分化調節因子により調節されることを報告してきた。一方、上皮細胞増殖因子 (epidermal growth factor : EGF) は上皮細胞の増殖や創傷治癒などの機能において重要な役割を果たしている。しかしながら、EGF が抗菌ペプチドの発現に及ぼす影響については、その詳細は不明である。そこで本研究では、EGF がカルプロテクチンを含む抗菌ペプチドの発現に与える影響について検討を行った。

[材料と方法]

1. 細胞培養： ヒト口腔粘膜由来上皮細胞株 TR146 は、10% FBS 含有ハム F12 培地にて 5% CO₂、37°C の条件下で培養を行った。
2. RNA の分離と Northern blot および RT-PCR 分析： サブコンフルエントに達した TR146 細胞に EGF (10 ng/ml, Invitrogen) を添加し、24 あるいは 48 時間培養後、全 RNA を抽出し、S100A8 および S100A9 の mRNA 発現を通常に従って Northern blot 法で調べた。また、S100A7, β -defensin 2, lipocalin 2 および secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) などその他の抗菌ペプチドの mRNA 発現を RT-PCR 法で調べた。
3. カルプロテクチンの ELISA 分析： TR146 細胞に EGF (10 ng/ml) を添加し、48 時間培養後、蛋白画分を抽出し、カルプロテクチン蛋白量を ELISA Kit (Hycult biotechnology b.v.) を用いて測定した。

[結果]

Northern blot 分析の結果、EGF 添加後の S100A8/S100A9 mRNA の発現はコントロールと比較して 0.3 倍の有意な減少が認められた。EGF のその他の抗菌ペプチドに及ぼす影響については、RT-PCR 法で調べた結果、S100A7, β -defensin 2 および lipocalin 2 の mRNA 発現の減少が認められた。一方、SLPI については mRNA の発現上昇が認められた。また、ELISA 分析では、EGF 添加後カルプロテクチン蛋白の発現はコントロールと比較して 0.4 倍の有意な減少が認められた。

[考察と結論]

ヒト口腔粘膜上皮細胞における抗菌ペプチド発現への EGF の効果を検討した結果、カルプロテクチン (S100A8 および S100A9) を含む複数の抗菌ペプチド発現の減少が認められた一方、SLPI のように発現上昇が認められるものもあった。抗菌ペプチドの発現は上皮細胞増殖因子などを含む複数の因子によって制御され、上皮の感染防御に関与していると考えられる。

ヒト歯肉線維芽細胞は機能的に CXCR6 を発現している

- 1) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯科保存学分野 2) 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野
○ 細川義隆 1)、細川育子 1)、尾崎和美 2)、中江英明 1)、松尾敬志 1)

CXCR6 is functionally expressed on human gingival fibroblasts.

- 1) Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School, 2) Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School
○ Yoshitaka Hosokawa 1), Ikuko Hosokawa 1), Kazumi Ozaki 2), Hideaki Nakae 1) Takashi Matsuo 1)

【研究目的】

CXC chemokine ligand 16 (CXCL16)はCXC chemokineの一つであり、CXC chemokine receptor 6 (CXCR6)に結合し、その作用を発揮することが知られている。また、CXCR6は主にTh1細胞に発現し、その遊走・浸潤に関与している事も知られている。我々はすでにCXCL16およびCXCR6が歯周組織内に発現していること、ならびにヒト歯肉線維芽細胞(HGFs)がCXCL16を産生しうることを報告した。しかしながら、CXCL16がHGFsに与える機能あるいはそのレセプターであるCXCR6が発現しているかどうかに関しては不明である。本研究ではHGFsにおけるCXCR6発現ならび発現制御に関して検討を行った。また、CXCL16がHGFsの増殖に与える影響ならびに、そのシグナル伝達機構に関して明らかにすることを目的として検討を行った。

【材料および方法】

智歯抜歯時に採取した正常歯肉組織よりout growth法にてHGFsを分離し、10%FBSを含むDMEM培地にて培養し実験に用いた。HGFsのCXCR6 mRNA発現はRT-PCR法にて、CXCR6分子発現はflow cytometryを用い解析した。また、HGFsを様々なサイトカイン(IL-1beta, TNF-alpha, IFN-gamma, IL-4, IL-13, IL-10, TGF-beta)あるいはTLR ligands(E. coli LPS, S. aureus peptidoglycan, CpG DNA)にて24時間刺激し、CXCR6発現に与える影響をflow cytometryを用い解析した。一部の実験ではp38 MAPK inhibitor, ERK inhibitor, JNK inhibitor, PI3K inhibitor, mTOR inhibitor, NF-kappaB inhibitorにて一時間前処理後刺激を行った。さらに、CXCL16でHGFsを24時間刺激し、HGFsの細胞増殖に与える影響をTetracolor One Kit(生化学工業)を用い解析した。さらにCXCL16刺激がERKあるいはAktのリン酸化に与える影響をflow cytometryを用い解析した。

【成績】

無刺激のHGFsにおいてCXCR6 mRNAが認められた。また、CXCR6タンパクはHGFs表層に認められた。TNF-alphaあるいはCpG DNA刺激により濃度依存的にCXCR6の発現増強が認められ、TNF-alpha刺激で増強されたCXCR6発現はIL-1betaあるいはIFN-gamma刺激で抑制され、IL-4あるいはIL-13刺激でさらにその発現が増強した。p38 MAPK inhibitorあるいはJNK inhibitorはTNF-alphaが誘導したCXCR6発現を増強し、PI3K inhibitorおよびmTOR inhibitorはその発現を抑制した。CXCL16刺激はHGFsの増殖を誘導し、ERKならびにAktのリン酸化も誘導した。

【考察および結論】

今回の結果より、HGFsにはCXCL16のレセプターであるCXCR6が発現し、その発現に様々なサイトカインや細菌由来因子が関与していることが明らかとなった。また、CXCL16はHGFsの増殖を誘導し、その増殖にERKあるいはAktを介したシグナル伝達経路が関与している可能性が示唆された。これらのことより歯周炎変局所においてCXCL16はHGFsの増殖を調節することにより、歯周組織の病態、特にリモデリングに関与している可能性が示唆された。

ヒト歯根膜細胞中のアルカリフォスファターゼ陰性細胞の特徴

昭和大学歯学部歯周病学教室
鶴見 亜有子、小林 誠、臼井 通彦、山本 松男

Characteristics of alkaline phosphatase-negative cells isolated from human periodontal ligament

Department of Periodontology Showa University Dental School
Ayuko Tsurumi, Makoto Kobayashi, Michihiko Usui, Matsuo Yamamoto

背景と目的

歯根膜組織中に存在する細胞は歯の支持組織の恒常性維持や再生において重要な役割を担っており、骨芽細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などの中胚葉系細胞やその前駆細胞、また更に未分化な組織幹細胞から構成されている。また、歯根膜組織は非石灰化の線維性結合組織であり、腱・靭帯と類似した構造を呈している。したがって、歯根膜組織中には歯根膜線維束の形成に関わる線維芽細胞が存在していると考えられるが、その特徴や分取マーカーは未だ明確でない。一方、歯根膜組織中には骨芽細胞マーカーである alkaline phosphatase (ALP) の陽性細胞と陰性細胞が存在する。そこで本研究では、培養ヒト歯根膜細胞 (Human Periodontal Ligament cells: HPL cells) からフローサイトメトリーで ALP 陽性の細胞集団: ALP (+) HPL cells と ALP 陰性の細胞集団: ALP (-) HPL cells を分取し、ALP (+) HPL cells との比較において ALP (-) HPL cells の特徴を明確にする。

材料および方法

1) HPL cells を ALP 抗体で標識後、ALP (+) HPL cells と ALP (-) HPL cells を FACS Vantage® で分取した。2) 両細胞集団の細胞増殖能を比較した。3) 両細胞集団における骨芽細胞マーカー遺伝子 (*alp*, *runx2*, *osterix*) の発現を RT-PCR 法で比較した。4) 両細胞集団を骨分化誘導培地 (ODM) で培養後、ALP 活性と石灰化能を比較した。5) 両細胞集団における細胞外基質分子 (biglycan, decorin) の遺伝子とタンパク質の発現を RT-PCR 法と western blotting 法で比較した。

結果

①ALP (-) HPL cells は ALP (+) HPL cells よりも細胞増殖能が有意に高かった。②両細胞とも骨芽細胞マーカー遺伝子である *alp*, *runx2*, *osterix* を発現していたが、これらの遺伝子の発現はいずれも ALP (+) HPL cells で強かった。③ALP (+) HPL cells は ALP (-) HPL cells と比較して、ALP 活性が高く、また ODM で培養することによる ALP 活性の上昇と石灰化の誘導も ALP (+) HPL cells で顕著であった。④細胞外基質分子である decorin の遺伝子とタンパク質の発現は ALP (-) HPL cells で強く、一方 biglycan の発現は ALP (+) HPL cells で強かった。

考察

以上の結果から、ALP (-) HPL cells は骨芽細胞への分化能の低い線維芽細胞様の細胞集団であると考えられる。また decorin と biglycan は、腱、靭帯、歯根膜での発現が確認されている class I Small Leucine Rich Proteoglycan (SLRP) に属する細胞外基質タンパク質であるが、decorin は骨芽細胞の石灰化を抑制するのに対し、biglycan は骨芽細胞分化を促進することが明らかにされている。したがって、ALP (-) HPL cells では、decorin の発現が強く、biglycan が弱いことで、自らの骨芽細胞様分化が抑制的に制御されている可能性がある。

ヒト胎盤における Fc γ RIIb 発現と歯周病原細菌の存在

新潟大学大学院医歯学総合研究科 摂食環境制御学講座 歯周診断・再建学分野
長谷川朋子、杉田典子、平野絵美、岩永璃子、吉江弘正

Fc γ RIIb expression and presence of periopathogenic bacteria in human placenta.
Division of Periodontology, Department of Oral Biological Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
Tomoko Hasegawa, Noriko Sugita, Emi Hirano, Ruriko Iwanaga, and Hiromasa Yoshie

目的：近年、低体重児出産における歯周病との関連性が報告されている。Barak らは preeclampsia (子癇前症) を有した奨励の胎盤 16 例のうち半数で歯周病原細菌を検出したと報告している。母体血中の IgG は、胎盤を介して胎児の血中へ運ばれる。このことが、まだ IgG を作れない胎児および新生児の感染防御にとって極めて重要である。また胎盤血管内皮細胞に発現し、IgG 輸送にかかわる可能性がある Fc γ RIIb に関しては、従来、白血球に広く分布する抑制性の IgG 受容体であることが知られている。本研究における目的は、ヒト胎盤における Fc γ RIIb の局在と、免疫組織化学による歯周病原細菌の検討である。

方法：新潟大学医歯学総合病院にて分娩した妊婦の胎盤組織を採取し、厚さ 7 μ m の凍結切片を作成し、免疫組織化学 (マウス抗ヒト Fc γ RIIb モノクローナル抗体、ウサギ抗 P. g 40kDa OMP IgG 抗体等) にて局在を検討した。また分娩後 5 日以内に全顎的な歯周組織検査、細菌検査を行った。本研究は本学倫理委員会の承認のもと十分な説明の後、書面による同意を得られた場合のみを対象に行った。

結果：絨毛羊膜炎の低体重児胎盤において、Fc γ RIIb は絨毛内皮と B リンパ球に認められた。グラム染色ではグラム陽性細菌、グラム陰性細菌ともに認められ、主に毛細血管内の白血球様細胞で認められた。今回、胎盤組織で Porphyromonas gingivalis OMP は検出されなかった。

考察および結論：これらの所見において、胎盤組織の毛細血管内皮細胞で認められる Fc γ RIIb が IgG 輸送に関与しているが、免疫複合体は輸送しないことが示唆される。今後、更なる実験においてヒト胎盤における Fc γ RIIb の役割を検討していく必要がある。

会員外共同研究者：

菊池朗、笹原淳、田中憲一 (新潟大学医歯学総合病院 産婦人科・周産母子センター)

歯根膜由来細胞を用いたメカニカルストレスに対する *Porphyromonas gingivalis* の影響

京都府立医科大学大学院医学研究科歯科口腔科学

*京都府立医科大学大学院医学研究科免疫・微生物学

○山本俊郎、赤松佑紀、足立圭司、大迫文重、雨宮 傑、中西 哲、喜多正和*、金村成智

Porphyromonas gingivalis and mechanical stress induces production of cytokines in human periodontal ligament cells

Department of Dental Medicine and*Microbiology,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

○Toshiro Yamamoto, Yuki Akamatsu, Keiji Adachi, Fumishige Oseko,

Takeshi Amemiya, Akira Nakanishi, Masakazu Kita[†], Narisato Kanamura

【研究目的】

これまでに我々は、ヒト歯根膜由来細胞 (hPDL 細胞) に対して、静水圧を用いメカニカルストレス (力学的負荷) を負荷する実験系を考案、本学会第 126、127 回大会において、hPDL 細胞は咬合圧に近似したメカニカルストレスや過度のメカニカルストレスに対しサイトカイン産生能を有し、歯周組織の局所炎症や外傷性咬合に影響を与えることを報告した。

そこで今回は、hPDL 細胞を用いてメカニカルストレスに対する歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) の影響について免疫学的検討を加えた。

【材料および方法】

hPDL細胞は便宜的に抜歯された、炎症所見の認めない健全な第 3 大臼歯を用いた。患者より同意を得た上で、抜去歯牙より歯根膜の組織片を採取し、10%FBS、50 µg/mlカナマイシン含有 D-MEM培養液中で 37°C、5% CO₂条件下に初代培養を行った。3~4 代の継代培養後、1×10⁵ CFU/mlで播種、コンフルエントに達したのち、静水圧負荷装置にて静水圧 (1, 6, 10MPa) を負荷した (メカニカルストレス単独群)。さらに、*P. gingivalis* (1×10⁷ CFU/ml) を用いて 24 時間の細菌刺激を行った (メカニカルストレスと *P. gingivalis* 刺激群)。その後、細胞から RNA を抽出、炎症性サイトカインである IL (インターロイキン) -1β、IL-6、IL-8、TNF (腫瘍壊死因子) -α に関して RT-PCR 法を用いた定性分析および ELISA 法を用いた定量分析を行った。そして、負荷後の細胞形態を倒立位相差顕微鏡にて鏡検を行った。

なお hPDL 細胞の使用に関しては、当大学における人間を対象とする医学研究審査委員会より承認済みである。

【成績】

定性分析では、メカニカルストレス単独群は、IL-6、IL-8、TNF-α mRNA が発現、さらにメカニカルストレスと *P. gingivalis* 刺激群は、検討を加えたすべての炎症性サイトカイン mRNA を発現誘導した。

定量分析では、両群ともに IL-6 と IL-8 産生を認めたが、IL-1β と TNF-α 産生をほとんど認めなかった。そして IL-6 と IL-8 産生量は、メカニカルストレス単独群では、メカニカルストレスの強さが強くなるにつれ増加した。また、メカニカルストレスと *P. gingivalis* 刺激群の方がメカニカルストレス単独群に比べて、IL-6 と IL-8 産生量の著しい増加を認めた。

なお、両群ともに hPDL 細胞は、形態学的な変化をほとんど認めなかった。

【考察および結論】

本研究から、hPDL 細胞の炎症性サイトカイン産生は、メカニカルストレスの強さの影響を受けるが、メカニカルストレスよりも歯周病原菌 (*P. gingivalis*) の影響を強く受けることが判明した。すなわち、歯根膜の局所炎症には病原性因子である歯周病原菌の影響が強く、メカニカルストレスはこれを助長する因子であると考えられた。

臍帯由来間葉系細胞の培養試験

1) 鶴見大学・歯学部・第二歯科保存学教室、2) アルブラスト株式会社・事業開発部
○金指幹元¹⁾、白川 哲¹⁾、井上剛臣²⁾、島 伸行²⁾、五味一博¹⁾、新井 高¹⁾

Growth kinetics and characterization of umbilical cord-derived MSCs

¹⁾ Dept. of Periodontics & Endodontics, School of Dental Medicine, Tsurumi University,

²⁾ ArBlast Co., Ltd.

○M. Kanazashi¹⁾, S. Shirakawa¹⁾, T. Inoue²⁾, N. Shima²⁾, K. Gomi¹⁾ and T. Arai¹⁾

【目的】

近年骨髄由来間葉系細胞を代表に自己細胞を用いた歯周組織再生療法が臨床応用されつつある。研究代表者である金指は2005年3月から1年間カナダ・トロント大学にて臍帯動・静脈周囲に存在する間葉系細胞の分離、培養ならびに凍結保存までの培養手技、さらに石灰化誘導に関する研究を行った。本研究では、この方法に従い協力医療機関より提供された臍帯から細胞を分離、培養し、この細胞の基本特性ならびに分化誘導能について検索した。

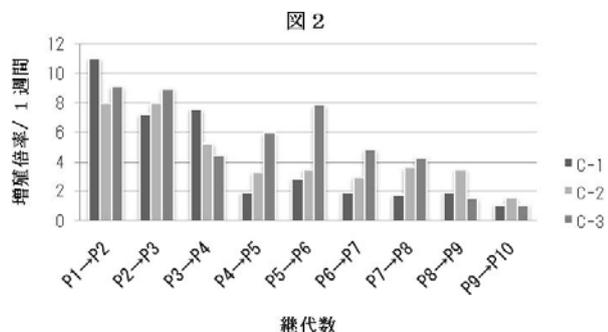
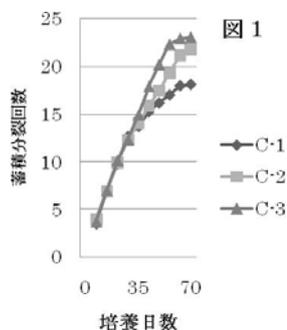
【材料と方法】

鶴見大学歯学部倫理委員会の審査と承認のもと、書面にて同意の得られた被験者より臍帯の提供を受けた。本研究では帝王切開より得られた3例の臍帯より、Rahul Sarugaser, John E. Davies *et al.*, (Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. *Stem Cells* 2005;23:220-229) の方法にしたがいP0の細胞を得た。この細胞の増殖倍率、蓄積分裂回数をP10まで求めた。

さらに1例の細胞は増殖培地と 10^{-8} M デキサメタゾン、5 mM β -グリセロリン酸、50 μ g/ml L-アスコルビン酸を含む骨芽細胞分化誘導培地で培養を行い、total RNAを抽出後PCR templateを作製し、I型コラーゲン (Col I)、オステオカルシン (OC) の遺伝子発現を調べた。

【結果】

図1に蓄積分裂回数を、図2に増殖倍率を示す。



Col I の遺伝子発現は増殖培地、分化誘導培地それぞれで認められたが、OCは分化誘導培地で培養した場合のみ認められた。

【考察】

本研究に用いた臍帯由来間葉系細胞の増殖倍率ならびに蓄積分裂回数は、骨髄由来間葉系細胞とほぼ同様な挙動を示した。また分化誘導培地でOCの遺伝子発現が認められたことから、骨再生への新たな細胞ソースとして、その有用性が示唆された。

現在、平成20年2月に竣工した鶴見大学歯学部附属細胞培養室 (Cell Processing Center : CPC) にて帝王切開あるいは自然分娩後に提供された臍帯より細胞を分離・培養し、基本特性、分化能について検索中である。

本研究は文部科学省・科学研究費補助金 (若手研究B) 「ヒトさい帯由来幹細胞を用いた歯周組織再生療法に関する集約的研究」ならびに新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 「基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発: 再生医療材料の安全性確立と規格化および臨床研究への応用」の委託を受け実施した。

歯周組織欠損を施したⅡ型糖尿病モデルラットの
早期創傷治癒過程におけるⅢ型コラーゲン形成
大阪歯科大学大学院(歯周病学)¹, 口腔病理学講座², 歯周病学講座³

○田幡 元¹, 富永 和也², 上田 雅俊³

The formation of type III collagen during early wound healing of periodontal defects in model rats with type II diabetes mellitus

Graduate School of Dentistry (Periodontology)¹, Department of Oral Pathology²,
and Department of Periodontology³, Osaka Dental University
Hajime Tabata¹, Kazuya Tominaga², Masatoshi Ueda³

【緒言】

近年、歯周疾患のリスクファクターとして糖尿病が注目されているが、歯周組織における早期創傷治癒過程に及ぼす糖尿病の影響に関する報告はほとんどない。創傷治癒に関わる主要因子のⅢ型コラーゲンは創傷治癒の早期に毛細血管や細胞の足場となり、組織の成熟化に深く関与している。一方、高血糖状態で形成が促進される advanced glycation end products (AGEs) は、細胞表面受容体を介して認識され、細胞内酸化ストレスの産生を促進する。その結果、種々なサイトカインや増殖因子の分泌が促進され炎症反応が惹起される。そこで本研究では、歯周組織の創傷治癒過程に糖尿病が及ぼす影響を明らかにするためにⅡ型糖尿病モデルの Goto-Kakizaki (GK) ラットの臼歯歯周組織に作製した人工的欠損の治癒過程におけるⅢ型コラーゲンおよび AGEs の局在を免疫組織化学的に観察した。

【材料および方法】

生後 8 週齢の SD 系ラット (対照群) および GK ラット (実験群) を使用した。両群とも歯肉全層弁を作製し、直径 1 mm のラウンドバーを用いて骨セメント質欠損を作製した。両群ともに歯肉弁を元の位置に戻し 1 糸縫合を行った。両群とも術後 3、5、7、14 日にラット各 5 匹を安楽死させ、10% 中性緩衝ホルマリンにて灌流固定後、被験歯根を含む周囲組織を一塊として採取し脱灰した。脱灰後、パラフィン切片を作製し、H・E 染色および、Ⅲ型コラーゲンおよび AGEs の免疫染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

【結果】

術後 3 日では、対照群、実験群ともに歯周組織欠損部に血餅がみられⅢ型コラーゲンの局在は認められなかった。術後 5 日の対照群の歯周組織欠損部には赤血球およびフィブリンが主体で、少数の好中球を含む血餅が残存し、血餅周囲にはⅢ型コラーゲンを含む肉芽組織が認められた。実験群では、歯周組織欠損部に赤血球およびフィブリンを主体とする血餅が残存していたが、血餅周囲の肉芽組織におけるⅢ型コラーゲンの発現は対照群に比べて少なかった。肉芽組織には類円形ではない不定型管腔を形成する毛細血管が増生し、その血管内皮には AGEs の局在が認められた。術後 7 日の対照群の歯周組織欠損部では血餅は消失したが、実験群では赤血球およびフィブリンを主体とする血餅が残存していた。術後 14 日の対照群の歯周組織欠損部では歯根面に並走するⅢ型コラーゲンで構成された肉芽組織が認められ、実験群の歯周組織欠損部では血餅は消失し、Ⅲ型コラーゲンを含む肉芽組織が存在し、その構成要素である毛細血管は不定型の管腔を呈し、血管内皮には AGEs の局在が認められたが、毛細血管数は術後 7 日に比べ減少していた。

【考察】

術後 5 日および 7 日において対照群に比べ実験群では、歯周組織欠損部に形成された肉芽組織におけるⅢ型コラーゲンの発現は少なかった。これは、高血糖状態により生成された AGEs が肉芽組織中の線維芽細胞に作用し、線維芽細胞のⅢ型コラーゲン形成能が低下したためと考えられる。さらに、毛細血管壁にはⅢ型コラーゲンが存在するとされている。また、AGEs はⅢ型コラーゲンを産生する周皮細胞のアポトーシスを促進させ、内皮細胞のコラーゲン付着も減少させるといわれている。本実験の実験群において肉芽組織中に不定型の血管腔が観察されたのは、線維芽細胞の一種である周皮細胞が AGEs によりⅢ型コラーゲンの産生が低下したことによる血管壁形成不良、さらには AGEs によって周皮細胞のアポトーシスが進行したことが原因と考えられる。以上のことから高血糖状態は歯周組織欠損の早期創傷治癒過程に影響を与えていることが示唆される。

ラット頸骨のベスキチン F による骨治癒過程における組織学的研究

奥羽大学歯学部歯科保存学講座

○中島 宗隆 安達 仁 松浦 芳久 高橋 一人 菊井 徹哉 横瀬 敏志

Histochemical Demonstration of Bone Repair Process Applied BeschichinF for Rat Tibiae.

Department of Conservative Dentistry Ohu University School of Dentistry

○Nakashima Munetaka, Adachi Hitoshi, Matsuura Yoshihisa, Takahashi kazuto, Kikui Tetuya and Yokose Satoshi

目的

歯科保存治療において骨欠損の修復が必要となるケースが多々ある。形態および機能の回復を目的とする骨組織再生において骨欠損部に自家骨移植や生体材料が応用されている。特に骨補填材として使用する材料は安全面や倫理面から考えてもある程度の制限が生じる。それらの材料でも医科の領域で多く使用されているキチンは生体親和性に優れ特に軟組織の再生治療に多く用いられている。しかしながら、骨組織に対する応用に関しては、生体適合性や骨形成誘導能については基礎的な知見が多く得られていないのが現状である。我々はキチンの創傷治癒促進効果、止血効果、炎症抑制効果に着目し、この材料が骨組織の再生療法に応用可能かどうかを調べる目的で、基礎的な形態実験を行った。scaffold としてキチンを用いた場合、骨形成作用に対してどのような影響を与えるかを形態学的に解析した。

材料と方法

材料として 10 週齢のメス SD ラットの左右頸骨に直径 1 mm のデンタルバーで骨欠損を作製した。右側の欠損部に縦 1 mm 横 1 mm のキチン (ベスキチン F ユニチカ社製) を充填し実験群とし、左側の欠損部は対照群とした。手術後 1 週、2 週にエーテル麻酔下にて左右頸骨を摘出し、10 % 中性緩衝ホルマリン液にて固定した。10 % の EDTA にて脱灰後、通法に従い脱水してパラフィンにて包埋し、切片を作製した。切片に H-E 染色を施し、切片上で骨形成過程を観察した。また、軟 X 線写真にて摘出した頸骨の骨形成を確認した。これらの結果を実験群と対照群にて比較検討した。

結果と考察

H-E 染色上において術後 1 週目の実験群ではキチンの周囲に炎症性細胞の浸潤が著明に認められ、骨の形成はみられなかった。しかし 2 週目ではキチン周囲に骨芽細胞が出現し、キチンを中心に骨形成が行われ、類骨の形成が多く認められた。興味あることに骨形成の多くはキチンをコアとして誘導されていることが確認された。一方対照群では、術後一週間目では骨形成は認められなかったが、2 週目では骨欠損部の周囲の骨から類骨が形成され、欠損部に濾胞状の類骨形成がみられた。両群を比較すると明らかにキチンを充填した実験群のほうがより骨の置換量が多く認められた。

以上の結果からキチンは骨形成において有用な scaffold になることが示唆され、今後骨再生療法において応用可能であることが示された。

結論

キチンは骨再生の scaffold として応用可能である。

クマザサ抽出エキスの口腔内細菌、歯周病原細菌および口臭に対する作用

明海大学 歯学部 口腔生物再生医工学講座 歯周病学分野

○大橋敏雄, 谷田部一大, 大塚秀春, 秦泉寺 傑, 申 基喆

Functions of the Extract from Bamboo leaf to Oral bacteria, Periodontal pathogen and Halitosis

Division of periodontology Department of Oral Biology & Tissue Engineering

○Ohashi Toshio, Yatabe Kazuhiro, Otsuka Hideharu, Jinzenji Suguru, Shin Kitetsu

【目的】:ササの葉は古来より抗炎症作用, 防腐作用を有することから, 食品の包装材や民間薬として広く用いられてきた。一方, クロルヘキシジンは殺菌剤として有効であるが, 副作用の問題を無視することはできない。このことから, 殺菌剤としての劇的効果は期待できないものの, 安全で日常的に用いることの出来る代替医薬品の開発が期待される。そこで, クマザサ抽出エキスの歯周病原細菌および口腔内細菌に対する作用を *in vitro* および *in vivo* で検討した。また, 歯周病患者の口臭と舌苔の細菌叢の変化についても検討した。

【材料および方法】:クマザサ抽出エキスは, ㈱鳳凰堂社より供与されたクマザサの全成分を水抽出した物を用いた。本抽出エキスは酸性で粘性のある茶褐色の水溶液で, タンパク質, 脂質, タンニン, ミネラルおよび糖質を含んでいる。

1. 歯周病原細菌に対する抗菌作用

使用菌は *A. actinomycetemcomitans* とし, 5% CO₂ を含んだBHI液体培地を用い, 37.0°Cの好気条件下で培養した。実験群としては, 培地中にクマザサ抽出エキスを低濃度から高濃度まで段階的に添加したものを用いた。コントロールとしては, クマザサ抽出エキスを添加していない培地を用いた。経時的に培養液を採取し, 吸光度で菌の増殖状態を観察した。

2. 口腔内細菌に対する抗菌作用

1) 被験者は, 明海大学歯学部の職員および学生で重篤な全身疾患のない5名とした。洗口試験溶液としては, クマザサ抽出エキス溶液, 滅菌PBS(コントロール)を用いた。

2) 昼食終了1時間後に, 被験者に滅菌PBSで洗口させ, 洗口液を滅菌チューブに吐出させた。吐出直後に, 被験者に試験溶液で30秒間洗口させ, 洗口液を吐出させた。洗口液吐出後, 経時的に被験者に滅菌PBSで洗口させ, 洗口液を滅菌チューブに吐出させた。回収した各吐出液を滅菌PBSで段階希釈し, BHI寒天培地に塗布した。この培地を37.0°Cで48時間好気培養し, 培地上に形成されたコロニー数をもって, 吐出液中の生菌数とした。

3. 口臭および舌苔の細菌叢に対する作用

明海大学歯学部付属明海大学病院歯周病科に通院している歯周病患者3名を被験者とした。前日の夕食後から水以外の食物の摂取を控えさせ, 当日の朝, 口腔清掃を行わない状態で来院させ, 呼気を採取し, ガスクロマトグラフィーで硫化水素, メチルメルカプタン, ジメチルサルファイド量を測定した。併せて, 舌苔より細菌の採取を行った。実験期間は約1週間, 1日3回食後1分間クマザサ抽出エキス希釈液で洗口させた。その後, 実験期間前と同様に口臭測定と細菌採取を行った。細菌の同定は株式会社ビー・エム・エルにより総菌数, および *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* の割合を測定した。

【成績と考察】: *A. actinomycetemcomitans* に対する抗菌作用の実験では, 1.0%以上の濃度のクマザサ抽出エキスを添加した培地において, コントロールと比較して増殖抑制傾向が見られた。また, 口腔内細菌に対する実験では, コントロールと比較して, クマザサ抽出エキスで洗口後一過性に増加するが, その後の増加は緩やかであった。口臭測定では, メチルメルカプタンの減少が認められた。舌苔の細菌叢では, 総菌数に対する *P. gingivalis* の減少が見られた。この *P. gingivalis* 等の細菌数の減少が, 産生されるメチルメルカプタン量の減少に至ったことが考えられた。

【結論】:クマザサ抽出エキスは, *P. gingivalis*, *T. forsythensis* に対して抗菌力を持つ可能性が示唆された。このことによりクマザサ抽出エキスは, 口臭抑制効果が期待される。

柿ポリフェノールオリゴマーの歯周病原細菌に対する抗菌効果

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 生体硬組織再生学講座 歯周病学分野

○竹内康雄、渡辺 久、和泉雄一

Antibacterial effects of persimmon polyphenol oligomer against periodontopathic bacteria

Section of Periodontology, Hard Tissue Engineering, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

○Yasuo Takeuchi, Hisashi Watanabe, Yuichi Izumi

【研究目的】

ポリフェノールはフェノール性水酸基を多数分子内に持つ化合物である。本物質は多くの食品に含まれおり、その活性酸素消去能や抗菌性などが注目されてきた。例えば緑茶ポリフェノールは、う蝕や歯周病に関与する細菌に対しその増殖と付着を抑制する作用が報告されている。近年、柿の未熟果や柿皮より抽出された柿タンニンを低分子化することにより、柿ポリフェノールオリゴマー (PP オリゴマー) が製造され、上記口腔疾患の予防や改善のために応用できる可能性がある。本研究では、PP オリゴマーを用いて歯周病原細菌に対する抗菌作用を調べた。

【材料および方法】

(1) 最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 測定

寒天平板希釈法により PP オリゴマー (明治薬品株式会社より供与) の MIC を測定した。感受性測定用培地は Brucella agar に Hemin を 5 µg/ml、Vitamin K1 を 0.1 µg/ml、5% の割合で馬脱線維血液を添加したもの (Brucella 血液寒天培地) を準備した。これに最終濃度が 0.016 - 4,096 µg/ml になるように PP オリゴマーの希釈液を加え測定に用いた。また、比較対照として、アンピシリン (ABPC)、緑茶カテキンであるサンフェノン BG-3 および EGCg、リンゴポリフェノールであるアップルフェノン SH (A-SH)、0.9% NaCl を加えた培地も同様にそれぞれ用意した。

被験菌は、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277、W50、381、A7A128、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCCC 43718、NCTC 9710 を用いた。これらの細菌は、Hemin 5 µg/ml と Vitamin K1 0.1 µg/ml を添加した BHI broth により 24 時間培養したものを、 5×10^7 CFU/ml になるよう希釈した後、2 µl を培地にスポット接種した。37°C で 48 時間嫌気培養後、肉眼的に菌の発育が認められない最終濃度を MIC とした。

(2) PP オリゴマーの *P. gingivalis* ATCC33277 に対する増殖抑制作用

P. gingivalis ATCC 33277 を Hemin 5 µg/ml と Vitamin K1 0.1 µg/ml を添加した BHI broth により 24 時間培養したものを、 2×10^8 CFU/ml 程度になるよう希釈調製した。これに等量の PP オリゴマー溶液を添加し (最終 PP オリゴマー濃度 0、1,024、1,489、2,048、4,096 µg/ml)、37°C で 120 分間培養した。これを Brucella 血液寒天培地に播種し、72 時間培養した後コロニー数をカウントした。

【結果】

PP オリゴマーの MIC は *P. gingivalis* の各菌株に対し 2,048 µg/ml であり、*P. gingivalis* の菌株の違いによる MIC の値の差は認められなかった。一方 *A. actinomycetemcomitans* では、今回測定した最大濃度である 4,096 µg/ml の PP オリゴマー濃度で、実験ごとに発育阻止が認められた場合と認められなかった場合があった。対照群 (BG-3・EGCg・A-SH) は、*P. gingivalis* に対し PP オリゴマーと同程度の MIC 値を示した。ABPC は *P. gingivalis* に対し 0.03 - 0.06 µg/ml、*A. actinomycetemcomitans* に対し 1 µg/ml と高い抗菌力を示した。また、*P. gingivalis* に対する PP オリゴマーの抗菌効果はその接触時間や濃度に依存することがわかった。

【考察および結論】

PP オリゴマーは主要な歯周病原細菌である *P. gingivalis* に対し抗菌性を示した。その効果は、すでにその抗菌性が知られている緑茶カテキンとほぼ同等であり、歯周炎予防剤などへの応用が期待される。但し *A. actinomycetemcomitans* ではその抗菌性が *P. gingivalis* と比較して弱く、また歯周病原細菌は口腔内では他の口腔内細菌とバイオフィルムを形成していることなどから、その効果についてはさらなる検討が必要である。