

ニコチンが歯肉上皮細胞による自然免疫応答に及ぼす影響

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)

○柏木陽一郎、兒嶋由子、柳田 学、小林良平、山田聡、北村正博、村上伸也

Effects of nicotine on innate immunity of gingival epithelial cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Yoichiro KASHIWAGI, Manabu YANAGITA, Yuko KOJIMA, Ryohei KOBAYASHI, Satoru YAMADA, Masahiro KITAMURA, and Shinya MURAKAMI

目的)

上皮細胞は外界と生体内を隔てる物理的なバリアーとしての役割だけでなく、外来の細菌・ウイルスに対する生体防御機構の一端を担っている。上皮細胞からはケモカインや抗菌ペプチド、フリーラジカルなどが炎症初期に産生されることも知られている。最近、上皮細胞自体が抗原提示能を持っているという報告もあり、同細胞の免疫反応への関与が報告されつつある。

一方、歯周病の主な原因はプラークであるが、その病態の重篤度を左右するリスクファクターのひとつに喫煙があげられている。タバコの構成成分の主要な成分であるニコチンはその受容体であるニコチン様アセチルコリン受容体 (Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR)) を介するシグナルが LPS 刺激時のマクロファージより産生される TNF- α の量を抑制するという報告もされているが、ヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) に関してはほとんど報告がない。

今回、HGEC においてニコチンが、上皮細胞の産生する IL-8 や抗菌ペプチドである β -ディフェンシン2の産生に及ぼす影響について検討を行ったので報告する。

材料および方法)

1. ヒト歯肉上皮細胞の単離: 本研究の主旨を理解し実験に参加することを同意した歯周炎患者より歯周外科時に歯肉組織片を得て、0.4% Dispase 処理により上皮層を剥離した。上皮層を細切後、0.05% Trypsin EDTA 処理においてヒト歯肉上皮細胞を単離し、上皮細胞の選択培地である Humedia-KG2 培地を用いて培養、増殖してきた細胞を HGEC とした。
2. 長期継代培養可能な HGEC の樹立: HGEC を2代継代培養の後、SV40 T 抗原遺伝子を含むプラスミド (pMT10D) をリン酸カルシウム法を用いて同細胞に導入した。得られた細胞を Humedia-KG2 培地を用いて培養を続け、SV40 T 抗原遺伝子を導入していない親細胞の継代数をはるかにこえて培養可能となった細胞 (Epi4) を樹立した。Dish に 60~80% コンフルエントとなった Epi4 を以下の実験に供した。
3. Epi4 におけるニコチンレセプターの検索を RT-PCR 法にて行った。
4. ニコチン (10^{-8} ~ 10^{-3} M) とヒトリコンビナント TNF- α (10ng/ml) + IL-1 β (10ng/ml) + IFN- γ (50ng/ml) を添加し、培養を12時間・24時間行った後、IL-8、 β -ディフェンシン2 mRNA の発現をリアルタイム PCR 法にて検出した。また24時間・48時間後の培養上清中の IL-8、 β -ディフェンシン2産生を ELISA 法にて検出した。
5. nAChR を介したニコチンの影響について検討するために nAChR 非特異的阻害薬 d-ツボクラリン、nAChR α 7 特異的阻害薬 α -ブンガロトキシンを用いてレセプターを阻害した。
6. nAChR α 7 subunit の IL-8、 β -ディフェンシン2産生に及ぼす影響を検討するために siRNA を用い nAChR α 7 遺伝子発現を抑制した。

結果および考察)

HGEC を炎症性サイトカインにて刺激することで、IL-8、 β -ディフェンシン2の mRNA、タンパク発現が増強すること、さらにニコチンが nAChR とりわけ α 7 subunit を介して IL-8、 β -ディフェンシン2産生亢進に関与している可能性が示唆された。

リゾリン脂質・LPA (lysophosphatidic acid) の歯肉上皮細胞に対する影響

昭和大学歯学部歯周病学教室
○臼井通彦 宮園あがさ 山本松男

The effect of LPA (lysophosphatidic acid) on Ca9-22 cells
Department of Periodontology, Showa University Dental School

Michihiko Usui, Agasa Miyazono, Matsuo Yamamoto

【目的】

リン脂質は2本の脂肪酸を持つが、生体内には脂肪酸を1本しか持たないリン脂質が存在し、リゾリン脂質と呼ばれている。LPA(lysophosphatidic acid)はリゾリン脂質の1つで、様々な生理活性をもつことが近年明らかになってきた。LPAはLPA特異的な受容体に結合して、細胞増殖・分化・生存・移動などに関与していることが知られている。しかし、LPAの歯肉上皮細胞に対する影響については不明な点が多い。

本研究において、リゾリン脂質LPAが歯肉上皮細胞株Ca9-22の細胞増殖・サイトカイン・receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)産生に与える影響を検討した。

【方法】

歯肉上皮細胞株Ca9-22はDMEM(FBS10%)にて培養し、各種assayに使用した。細胞増殖はMTT assay法、遺伝子発現はRT-PCR法並びにリアルタイムPCR法、タンパク質発現はELISA法にて測定した。

【結果】

Ca9-22細胞からRNAを抽出し、RT-PCR法にてLPA受容体・LPA1, 2, 3, 4の発現の有無を調べたところ、LPA1, 3の発現を確認することができた。次に、LPAの細胞増殖に対する影響を評価するために、MTT assayを行った。その結果、LPA刺激により、細胞増殖が有意に亢進された。また、LPAの刺激により炎症性サイトカインの産生に変化がおきるか観察した。LPA刺激24時間後にRNAを回収し、炎症性サイトカインのmRNA発現を観察した結果、IL-6・IL-8の発現が増強していた。さらに、ELISA法を用いて上清中のIL-6並びにIL-8量を測定したところ、LPA刺激によりIL-6・IL-8がタンパク質レベルにおいても有意に増強していることが明らかになった。最後に、破骨細胞形成に必須な因子、RANKLのmRNA発現を確認したところ、LPAによりその発現が有意に増強された。

【考察】

歯肉上皮細胞株Ca9-22細胞はリゾリン脂質・LPAにより破骨細胞形成因子であるRANKLやIL-6, IL-8の発現・産生が増強された。IL-6は骨芽細胞に作用し、RANKLの発現を誘導することが知られている。我々は、脂質異常症(高脂血症)と歯周病との関連性を調査していく研究の中で、歯肉溝浸出液中に酸化LDL(low density lipoprotein)が含まれることを見出した(現在投稿中)。LDLは1分子のアポB蛋白質と種々の脂質からなる粒子である。炎症反応の拡大に伴って、LDLは酸化変性し、LPAなどのリゾリン脂質を産生することが知られている。本研究の結果より、歯周炎病態において、LPAは歯肉上皮細胞に作用しRANKLを介した破骨細胞形成を活性化している可能性が示唆された。今後、本細胞におけるLPAの下流シグナルに関して探索する予定である。

歯肉線維芽細胞におけるカベオリン-1 および可溶性 gp130 を標的とした IL-6 誘導性 VEGF 産生の抑制制御

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
○山口知子¹⁾, 成石浩司²⁾, 大森一弘¹⁾, 小林寛也¹⁾, 前田博史¹⁾, 高柴正悟¹⁾

Inhibitory effects of IL-6/sIL-6R-induced VEGF production by targetting caveolin-1 or soluble gp130 in gingival fibroblasts

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

²⁾Department of Periodontics & Endodontics, Okayama University Hospital of Medicine and Dentistry

○Tomoko YAMAGUCHI, Koji NARUSHI, Kazuhiro OMORI, Hiroya KOBAYASHI, Hiroshi MAEDA, Shogo TAKASHIBA

【緒言】

血管内皮増殖因子 (VEGF) は、強力な血管新生能および血管透過作用を有し、結果的に angiogenesis と呼ばれる炎症の増悪を導くサイトカインである。我々は、インターロイキン 6 (IL-6) が可溶性 IL-6 レセプター (sIL-6R) の存在下において、歯肉線維芽細胞の VEGF 産生性を亢進し、歯周病の悪化へと進展する病態メカニズムを提唱してきた。この研究成果を踏まえて、歯肉線維芽細胞を標的とした IL-6 誘導性 VEGF 産生を制御し得る治療戦略を確立することは、将来、歯周炎症の人為的・積極的な制御を想定した新規の歯周炎サイトカイン療法の実現に繋がる。

我々は歯肉線維芽細胞を中心とした歯周炎の治療ターゲットとして、細胞内および細胞外のそれぞれの領域における標的分子の候補を挙げた。すなわち、細胞内領域の標的分子として、歯肉線維芽細胞における IL-6 シグナル伝達経路の一翼を担う細胞膜蛋白カベオリン-1 (Cav-1) (Yamaguchi *et al*, *J Cell Physiol*, 2008) を選択し、一方、細胞外領域の標的分子として、IL-6-sIL-6R 複合体と 3 量体を形成して IL-6 作用のアンタゴニスト機能を有する分泌蛋白の可溶性 gp130 (sgp130) を選択した。

本研究は、歯肉線維芽細胞における IL-6 誘導性 VEGF 産生を抑制する治療戦略を探ることを目的に、① Cav-1 発現抑制細胞における IL-6 誘導性 VEGF 産生性の変化、② sgp130 添加による IL-6 誘導性 VEGF 産生性の変化を検討した。

【材料および方法】

1. 細胞および培養：細胞は、臨床的に健康なヒト歯肉から分離・培養した線維芽細胞様細胞を、ヒト歯肉線維芽細胞として用いた。培養は、ウシ胎児血清を 10% の割合に含む DMEM (Invitrogen) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下、95% 湿度下で行った。なお、5-9 代継代培養した細胞を実験に供した。
2. Cav-1 発現抑制細胞の樹立：Cav-1 の発現抑制細胞は、通法にしたがって Cav-1 を標的とする small interfering RNA (100 nM, Santa Cruz) を細胞に導入して樹立した。なお、抗 Cav-1 抗体を用いたウエスタンブロット法を用いて、対照細胞と比較して Cav-1 発現の有意な抑制を確認した。
3. IL-6 誘導性 VEGF 産生性及び Cav-1 発現抑制の影響：上記 2 の細胞を組換えヒト (rh) IL-6 および rhsIL-6R (R&D, 各々 50 ng/ml) で刺激した後、48 時間後の培養上清を回収した。なお、VEGF 産生量は、市販の ELISA キット (R&D) を用いて定量した。
4. IL-6 誘導性 VEGF 産生性及び sgp130 の影響：上記 1 の細胞を、rhIL-6 および rhsIL-6R (各々 50 ng/ml) で刺激する実験系に、rhsgp130 (R&D) を濃度依存的 (0~2 μg/ml) に添加した後、48 時間後の培養上清を回収した。VEGF 産生量は、上記 3 と同様に ELISA キットを用いて定量した。
5. IL-6 誘導性膜上 gp130 のリン酸化に及ぼす sgp130 の影響：上記 4 と同様に細胞を刺激した後、10 分後の細胞の全蛋白の可溶性画分を回収し、抗リン酸化チロシン抗体および抗 gp130 抗体を用いたウエスタンブロット法によって gp130 のリン酸化の程度を調べて評価した。
6. 統計解析：上記 3 および 4 の各実験結果の有意差は、ANOVA / Fisher's PLSD を用いて検定し、P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

ヒト歯肉線維芽細胞において、

1. IL-6/sIL-6R 誘導性 VEGF 産生は、Cav-1 発現の抑制によって、あるいは添加した sgp130 の濃度依存的に有意に抑制された (p<0.05)。
2. IL-6/sIL-6R 刺激による gp130 のリン酸化は、sgp130 の添加によって抑制された。

【考察および結論】

歯肉線維芽細胞における Cav-1 の発現抑制あるいは sgp130 の添加によって、IL-6 誘導性の VEGF 産生は抑制された。このことは、IL-6 による歯周病悪化を制御し得る新規の治療戦略として、歯肉線維芽細胞を標的とした細胞内外の両領域における Cav-1 および sgp130 が有効な標的分子である可能性を示唆する。

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は血管内皮細胞の VE-cadherin の発現を p44/42 MAP kinase を介して促進する

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座 歯周病態学分野、(株) ツーセル
松田真司、藤田 剛、加治屋幹人、武田克浩、柴 秀樹、河口浩之、辻紘一郎、栗原英見

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) enhances the expression of VE-cadherin in endothelial cells through p44/42 MAP kinase.

Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science, Hiroshima University
Graduate School of Biomedical Sciences, TWO CELLS Co. Ltd.

Shinji Matsuda, Tsuyoshi Fujita, Mikihiro Kajiya, Katsuhiko Takeda, Hideki Shiba, Hiroyuki Kawaguchi, Koujiro Tsuji, Hidemi Kurihara

研究目的

ビーグル犬の歯周炎モデルにおいて、脳由来神経栄養因子 (BDNF) 投与群では非投与群と比較してセメント質、歯槽骨の再生が促進され、一定の幅を持つ歯周靭帯も再生することを明らかにした。また、BDNF は歯周靭帯由来線維芽細胞やセメント芽細胞の増殖、および骨関連タンパク質の発現を促進することを明らかにしてきた。さらに、BDNF は血管内皮細胞に対しても、細胞増殖、VEGF-B の発現を促進し、管腔形成を促進した (Tissue Eng. 2005, Journal of Biol. Chem. 2008)。血管新生は組織再生において必要不可欠であり、増殖、遊走、接着は血管新生過程で重要であるとされている。BDNF が血管内皮細胞の遊走を促進することを第 132 回秋季歯科保存学会にて報告した。管腔形成においては、細胞間接着が重要な役割を担っており、特に VE-cadherin によって細胞相互が接着し、管腔構造を形成することが知られている。しかし、この細胞間接着に対する BDNF の作用機序については明らかとなっていない。そこで本研究では BDNF の血管内皮細胞の細胞間接着に及ぼす影響を検討した。

材料と方法

1. 供試細胞: ヒト微小血管内皮細胞 (HMVEC) は CAMBREX 社より購入し、5 代継代培養した細胞を実験に使用した。
2. 血管内皮細胞を Type-1 collagen coating 6 well dish にてコンフルエントになるまで培養し、P44/42 Map kinase の inhibitor である PD98059 (10 μ M) 存在下及び非存在下にて BDNF を作用させ VE-cadherin の mRNA の発現を real-time PCR によって、タンパクレベルの発現を Western blotting によって分析した。
3. 血管内皮細胞の ERK1/2 のリン酸化に対する BDNF の影響を Western blotting によって解析を行った。

結果

1. BDNF は血管内皮細胞の VE-cadherin の mRNA、タンパクレベルの発現を時間依存的、濃度依存的に増加させた。
2. PD98059 は BDNF による血管内皮細胞の VE-cadherin の mRNA の発現、タンパク量の増加を抑制した。
3. BDNF は血管内皮細胞の P44/42 Map kinase のリン酸化を促進した。

考察および結論

BDNF は血管内皮細胞の VE-cadherin の発現を増加させ細胞間接着を促進し、血管新生過程における管腔形成を促進していると考えられる。またそのシグナル経路は P44/42 Map kinase を介すと考えられる。これらのことから BDNF による歯周組織再生において、BDNF は血管内皮細胞の増殖、遊走、細胞間接着のすべての過程において、血管新生促進に関与していることが示唆された。

歯肉上皮細胞の細胞間結合に及ぼすマレイン酸イルソグラジンの影響

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座 歯周病態学分野
岸本亮義, 藤田 剛, 柴 秀樹, 林田浩一, 内田雄士, 河口浩之, 栗原英見

The effect of irsogladine maleate on intercellular junctional complexes in gingival epithelium

Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science,

Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences

Akiyoshi Kishimoto, Tsuyoshi Fujita, Hideki Shiba, Kouichi Hayashida, Yuushi Uchida,

Hiroyuki Kawaguchi, Hidemi Kurihara

<目 的>

現在の高齢化社会において 8020 達成者が増加することは、歯周病患者の著しい増加だけではなく、歯周病治療の対象者が高齢化することを意味する。したがって、今後は日常的な歯周病予防の拡大および歯周病治療後のメンテナンスが大きな課題である。歯周病の予防法としては、現在のところブラッシングなどの機械的方法が最も効果的かつ安全性が高い方法である。しかし、高齢化社会に伴い、今後自らのブラッシングだけでは細菌除去が困難となる高齢者が増加すると考えられる。一方、現在の齲蝕予防として、フッ素塗布による歯質の強化が効果的であることから、歯周病においても細菌を対象とした予防法だけでなく宿主細胞の機能を制御する歯周病予防について検討する必要がある。胃粘膜防護治療薬として臨床応用されているマレイン酸イルソグラジン(IM)は、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.a*)及び *A.a* の外膜タンパク質 (OMP) 29 刺激によって誘導されるヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) の Interleukin-8 産生促進を抑制する。また、IM は同様の刺激によって引き起こされる HGEC の細胞間コミュニケーション能の低下およびタイトジャンクション発現の低下を回復させる。これらのことから、IM は歯周病予防薬として有用であると考えられる。そこで本研究では、*A.a* によって惹起されたラット歯周組織炎症モデルを使用し、歯肉上皮の細胞間結合に及ぼす IM の影響について検討した。

<材料および方法>

1. 実験動物には 9 週齢の Fischer 344 ラットを使用した。
2. IM (10 mg/ml) を溶かした 0.5% methyl cellulose を皮下注射にて 100 μ l 投与したラットを IM 投与群、0.5% methyl cellulose のみを皮下注射にて 100 μ l 投与したラットを IM 非投与群として実験を行った。
3. IM 投与群および IM 非投与群ともに、皮下注射の 1 時間後に PBS に懸濁した *A.a* 生菌 (1×10^9 cells/ml) を右側上顎臼歯の歯肉に、PBS のみを左側上顎臼歯の歯肉にそれぞれ 5 μ l 塗布した。
4. *A.a* 生菌の塗布 3 時間後に 4% パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定を行い、上顎骨部分を 10% ethylenediaminetetraacetate により脱灰しパラフィンに包埋した後、5 μ m 厚の切片を作製した。
5. 細胞間結合蛋白である Zonula Occludens (ZO)-1, Claudin-1, E-cadherin, Connexin (Cx) 43 に対する抗体を使用し、ABC/DAB 法により免疫染色を行った。

<結 果>

1. IM 非投与群の *A.a* 非塗布側の歯肉では、多くの上皮細胞で ZO-1, Claudin-1, E-cadherin, Cx43 の発現がみられた。
2. IM 非投与群の *A.a* 塗布側の歯肉では、*A.a* 非塗布側と異なり、一部の上皮細胞でのみ ZO-1, Claudin-1, E-cadherin, Cx43 の発現がみられた。
3. IM 投与群の *A.a* 塗布側の歯肉では、コントロールと同様に多くの上皮細胞で ZO-1, Claudin-1, E-cadherin, Cx43 の発現がみられた。

<考察および結論>

本研究結果から、*A.a* によって惹起されたラット歯周炎モデルにおいて、IM が *A.a* によって引き起こされる細胞間結合能の破壊を抑制し、細菌の侵入を防ぐ可能性が示唆された。これにより、IM は歯周病予防薬として有用であると考えられる。

BMP による骨芽細胞分化における NF- κ B シグナルの生理的役割

九州歯科大学口腔治療学講座齲蝕歯髓疾患制御学分野¹、生命科学講座分子情報生化学分野²、
医療人間形成学講座総合診療学分野³

○平田志津^{1,2}、自見英治郎²、北村知昭¹、寺下正道³

The physiological role of NF- κ B signal on BMP-induced Osteoblastogenesis.
Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics¹, Division of Molecular Signaling
and Biochemistry², Division of Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental College
○HIRATA Shizu^{1,2}, JIMI Eijiro², KITAMURA Chiaki¹, TERASHITA Masamichi³

【目的】

重篤な根尖性歯周炎では炎症が根尖部歯槽骨まで達し大きな骨欠損を伴う。骨欠損の再生には適切な歯内治療を行っても長期間を要することが多い。強力な骨誘導作用を持つ BMP は、Smad と呼ばれる細胞内情報伝達分子依存性・非依存性に細胞分化亢進等の様々な生理活性作用を有し、骨組織再生因子として注目されている。一方、転写因子 NF- κ B は Rel Homology domain を共有する 5 つの転写因子 (p50, p52, p65, cRel, RelB) の総称で、炎症反応、免疫応答、発生や癌化等に関与する。我々はこれまでに炎症性サイトカイン TNF α が NF- κ B の活性化を介して Smad の標的遺伝子プロモーターへの結合を阻害することにより BMP2 刺激による骨芽細胞分化を抑制することを明らかにした。しかし、炎症などの病的状況下だけでなく、生理的状況下においても、NF- κ B が BMP/Smad シグナルを制御する可能性が考えられる。本研究の目的は、BMP 刺激による骨芽細胞分化における NF- κ B シグナルの生理的役割を解明することである。

【材料と方法】

胎生 13.5 日齢の野生型、p65 欠損 (p65^{-/-})、および p50 欠損 (p50^{-/-}) 各マウス胎仔から酵素処理によって線維芽細胞 (MEF) を調製した。野生型および p65^{-/-} MEF を BMP2 (100 ng/ml) で刺激し、48 時間後に骨芽細胞の初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ (ALP) 活性測定と染色による観察を行った。次に、野生型および p65^{-/-} MEF を BMP2 刺激し経時的にタンパク質を抽出後、抗リン酸化 Smad1/5/8 抗体を用いてウェスタンブロット法により Smad1/5/8 リン酸化を分析した。また、p65^{-/-} MEF および p50^{-/-} MEF にそれぞれ p65 あるいは p50 遺伝子と、BMP 標的遺伝子の 1 つである Id1 にルシフェラーゼ遺伝子を繋いだレポーター遺伝子を導入し、BMP2 で 24 時間刺激後にルシフェラーゼ活性を測定し BMP/Smad 転写活性を分析した。p65^{-/-} MEF に p65 野生型および p65 の機能に関するセリン残基 (276, 311, 529, 534 番目) をアラニンに置換した変異体を過剰発現させ、NF- κ B ルシフェラーゼおよび BMP2 で刺激し、Id1 ルシフェラーゼ活性を測定した。さらに野生型、p65^{-/-} および p50^{-/-} MEF から全 RNA を単離し RT-PCR 法を用いて抑制型 Smad (Smad6, 7) の発現を検討した。

【結果】

野生型、p65^{-/-}、および p50^{-/-} MEF を BMP2 で刺激すると、野生型 MEF と比較して p65^{-/-} MEF では BMP2 刺激による著明な ALP 活性上昇と多数の ALP 陽性細胞が誘導された。野生型および p65^{-/-} MEF を BMP2 で刺激しても Smad1/5/8 のリン酸化に有為な差は認められなかった。p65^{-/-} MEF に野生型の p65 を過剰発現させると BMP 刺激による Id-1 の転写活性が著しく抑制されたが p50^{-/-} MEF に p50 を過剰発現させても Id-1 の転写活性はほとんど抑制されなかった。p65 変異体のうち、276 番目のセリンをアラニンに置換した変異体 (S276A) は野生型および他の変異体と比較して、NF- κ B の転写活性は低いが、BMP2 刺激による Id1 の転写活性の抑制効果が減弱した。野生型、p65^{-/-} および p50^{-/-} MEF の 3 つの細胞間で Smad6, 7 の発現の変化は見られなかった。

【考察】

p65^{-/-} MEF を BMP2 で刺激すると野生型 MEF と比較して骨芽細胞分化が亢進することから、生理的状況でも NF- κ B が BMP/Smad シグナルを制御していると考えられる。転写活性領域を欠如した p50 を p50^{-/-} MEF に強制発現させても BMP 刺激による Id-1 ルシフェラーゼは抑制されないこと、さらに p65 遺伝子の変異体を用いた実験結果より p65 の転写活性と BMP/Smad の転写活性には負の相関があることから、NF- κ B による BMP シグナルの抑制効果は p65 の転写活性が関与する可能性がある。また、どの MEF においても Smad6, 7 の発現に変化がないことから、p65 による Id-1 の転写活性の抑制は Smad6, 7 の発現に依存するものではないと考えられる。

【結論】

NF- κ B による BMP シグナルの抑制効果は p65 の転写活性に依存することが示唆された。

アスコルビン酸ラジカルがヒト歯髄培養細胞の石灰化物形成におよぼす影響

1) 日本大学松戸歯学部歯内療法学講座, 2) 小児歯科学講座, 3) 日本大学口腔科学研究所
松井 智¹⁾, 高橋知多香¹⁾, 和田陽子¹⁾, 臼井 朗²⁾, 荒井清司²⁾, 辻本恭久^{1,3)}, 前田隆秀^{2,3)}

Effects of Ascorbic Radical on Calcification Ability of Human Dental Pulp Cells

1) Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2) Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 3) Research Institute of Oral Science Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Satoshi Matsui¹⁾, Chitaka Takahashi¹⁾, Yoko Wada¹⁾, Akira Usui²⁾,
Kiyoshi Arai²⁾, Yasuhisa Tsujimoto^{1,3)}, Takahide Maeda^{2,3)}

【目的】

歯髄保存療法の確立は、患歯の寿命を左右する上で重要な要素である。しかし、う蝕や外傷などにより露髄が生じた場合、抜髄処置が選択され、失活歯となるケースが多いのが現状である。生活歯として歯を維持するためにも細胞レベルでの積極的な硬組織形成能を有する覆髄剤(材)や治療法の開発が望まれているが、現在、このような明らかな効果を有する覆髄材や治療法は少ない。また、硬組織の形成には、リン酸カルシウム形成の足場となるコラーゲンの合成が必要である。コラーゲンの合成には、アスコルビン酸が重要な役割を演じていることが知られているが、アスコルビン酸は構造上還元性を示し、適当な酸化剤の作用により、プロトンをもつ2個を放出して、デヒドロアスコルビン酸になる。これが、アスコルビン酸ラジカルとなるが、アスコルビン酸から発生したフリーラジカルとコラーゲンの合成や硬組織形成への関わりについては報告が無い。そこで本研究では、アスコルビン酸と硬組織形成との関わりを解明する一助として、各濃度のアスコルビン酸から発生したフリーラジカルがヒト歯髄培養細胞における石灰化物形成に与える影響について検討を行った。

【材料および方法】

細胞は、研究のインフォームドコンセントを十分に行って同意を得た、平均21歳の患者から抜去された第3大臼歯の歯髄組織を無菌的に取り出し、3~6代継代させた細胞を実験に用いた。細胞が50%コンフルエントの状態になったところで2mMのβ-グリセロリン酸に0, 500 ng, 5 μg, 50 μg, 500 μg, 5 mg, 50 mg/mlの濃度のアスコルビン酸を暴露させ、3日ごとに培地交換を行い、最大30日間培養を行った。石灰化形成物の評価は、ESR spin-trapping法を用いたフリーラジカルの測定、細胞数の測定、ALP活性、コラーゲン量の測定、von Kossa染色における石灰化結節形成数、Alizarin Red S染色およびカルシウム量を指標とした。

【結果および考察】

細胞に作用させる前の培地中のフリーラジカルの測定において、500 μgのアスコルビン酸添加群をピークにアスコルビン酸ラジカルの発生の増加が認められた。各濃度のアスコルビン酸添加後の24時間後の細胞数の測定においても、500 μgのアスコルビン酸添加群をピークに細胞数の増加が認められた。また、5 mgおよび50 mgのアスコルビン酸添加群においては、細胞数の減少が認められた。また、アスコルビン酸添加後15日目のALP活性および10日目のコラーゲン量の測定においても、500 μgのアスコルビン酸添加群をピークにALP活性とコラーゲン量の増加が認められた。また、5 mgおよび50 mgのアスコルビン酸添加群においては、ALP活性とコラーゲン量の低下が認められ、500 μgのアスコルビン酸添加群とコントロール群、5 mgおよび50 mgのアスコルビン酸添加群との間に有意差が認められた。また、最終形成物であるvon Kossa染色とAlizarin Red S染色においても500 μgのアスコルビン酸添加群において、陽性反応の増強が認められ、カルシウム量においても500 μgのアスコルビン酸添加群とコントロール群、5 mgおよび50 mgのアスコルビン酸添加群との間に有意差が認められた。以上のことから、アスコルビン酸から発生したアスコルビン酸ラジカルが、コラーゲン量を増加させ、リン酸カルシウムの形成を増大させる一方、許容量以上では、アスコルビン酸ラジカルが減少し、細胞増殖率やリン酸カルシウムを形成させる過程でコラーゲンの合成や骨形成タンパク質に障害をもたらす可能性が示唆された。

4-META/MMA-TBB レジンの各組成の培養ヒト骨芽細胞に及ぼす影響

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野¹、首藤歯科医院²、
長崎大学病院臨床教育・研修センター³

○川崎 綾¹、山田志津香¹、首藤 実^{1,2}、川久保 敦¹、柳口嘉治郎¹、久保 至誠³、林 善彦¹

Effects of the compositions of 4-META/MMA-TBB resin in cultured human osteoblastic cells

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences¹,
Syudo Dental Clinic², Center for Clinical Education and Training, Nagasaki University Hospital³

○Kawasaki Aya¹, Yamada Shizuka¹, Syudo Minoru^{1,2}, Kawakubo Atsushi¹,
Yanagiguchi Kajiro¹, Kubo Shisei³, Hayashi Yoshihiko¹

【緒言】

緊密な根管充填は、根管治療の予後を左右する重要な因子であり、使用される根管充填剤には根尖部の良好な創傷治癒の為に組織親和性、そして緊密な根管封鎖性などが必要とされる。従来からガッタパーチャが一般的に使用されているが、ガッタパーチャは熱膨縮係数が大きく歯根象牙質と接着しない。このためガッタパーチャと、酸化亜鉛エージノール、水酸化カルシウム、エポキシレジンなどを根管用シーラーが併用されている。近年、接着性レジンを用いた根管充填剤が開発・臨床応用されており、象牙質にレジンのハイブリッド層を作ることによって封鎖性を高める試みがなされている。わが国で開発され、接着材料として広く使用されている 4-META/MMA-TBB 系のスーパーボンドを根充シーラーに改良したスーパーボンド根充シーラー[®]が、2005 年に商品化された。当研究室においても骨芽細胞に及ぼす影響について遺伝子発現レベルで検討し報告している。¹⁾ 今回、硬化したシーラーから溶出される成分による細胞内の MAPKs シグナル伝達系への影響、ならびにスーパーボンド根充シーラーの構成要素である 4-META/MMA-TBB の各組成による培養ヒト骨芽細胞への影響を分析した。

【材料および方法】

本実験では、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞 (NOS-1) を用いた。ヒトリン酸化 MAPK 解析キット (ビオチン化抗体) (R & D Systems) をもちいて、種々なシグナル伝達関連 kinases のリン酸化の状況を解析した。¹⁾

96 well plate に 1×10^4 cells の NOS-1 細胞を播種し、各組成を添加した α -MEM 培地にて 3 日間 37°C で培養後、MTT Cell Growth Kit (CHEMICON) を用い、細胞の増殖を濃度別に検討した。

各組成の培地添加濃度は、4-META : 0.125~15mM/L、MMA・TBB : 0.125~50mM/L とし、基準濃度の添加培地 (4-META : 15mM/L、MMA・TBB : 50mM/L) を well 内で希釈し、計 100 μ L となるように調整した。各組成それぞれの添加培地でウシ胎児血清 (FBS) を添加・非添加したもの 3 well ずつ培養し、コントロール群は、4-META/MMA-TBB いずれも添加していない α -MEM 培地に細胞を播種したものを用いた。3 日後、MTT50mg を PBS 10mL に溶解し、濾過滅菌したのち 10 μ L ずつ各 Well に添加し、37°C 培養器内で 4 時間反応させた後、0.04N HCl を含有したイソプロパノール 100 μ L 各 well に添加した。ELISA Plate Reader にて計測を行い、それぞれ 3 つの well の平均吸光度を、組成別、濃度別に比較・検討した。

【結果とまとめ】

コントロール群と比べて、5 つの kinases (ERK1,2, Akt1/2/pan) が 1.2 以上増強されたので、シーラーからの溶出成分によって細胞内シグナル伝達系が賦活されることが明らかとなった。

ウシ胎児血清 (FBS) を添加していないグループにおいては、4-META、MMA、TBB すべての添加培地においてコントロール群と比較して細胞増殖が抑制されており、濃度ごとの細胞増殖についてもバラつきがみられた。ウシ胎児血清 (FBS) 添加のグループでは、4-META、MMA、TBB それぞれにおいて、特定の濃度で細胞増殖が活性化される傾向が見られた。したがって、血清添加条件での解析が有用と考えられる。今後、各構成成分について細胞内への影響を検討し接着性レジン系シーラーの有用性を詳細に解明する予定である。

【参考文献】

- 1) Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 107(3):e77-81,2009

歯髄幹細胞による創傷治癒、骨再生医療への展開 - 乳歯・永久歯歯髄幹細胞の比較 -

¹⁾名古屋大学医学部附属病院 遺伝子再生医療センター

²⁾名古屋大学大学院医学系研究科 頭頸部・感覚器外科学講座 顎顔面外科学分野

○山田陽一¹⁾, 中村さやか²⁾, 片桐渉²⁾, 杉戸孝行²⁾, 西野雄大²⁾, 伊藤憲治²⁾, 上田実²⁾

Application of dental pulp stem cells for wound healing and bone regeneration –Comparison between DPSCs and SHEDs-

Center for Genetic and Regenerative Medicine Nagoya University School of Medicine

○Yoichi Yamada¹⁾, Sayaka Nakamura²⁾, Wataru Katagiri²⁾, Takayuki Sugito²⁾, Yudai Nishino²⁾, Kenji Ito²⁾ and Minoru Ueda²⁾

[研究目的]

ヒト ES 細胞や iPS 細胞が発見され、究極の万能細胞として難治性疾患に対する治療法の開発などに期待されているが、社会的、倫理的、安全性の問題から、臨床応用への道りは険しく、時間を要すると考えられている。現在、臨床応用の主役は体性幹細胞である。中でも骨髄や臍帯血などが細胞供給源として用いられており、骨髄は加齢に伴い幹細胞数が減少する、骨髄穿刺が患者負担となる、採取できない場合もある等の問題を抱え、臍帯血は間葉系幹細胞の存在頻度が低い、分娩から細胞採取までの時間や臍帯血量により影響を受けるなど効率性、確実性に劣る。そこで、われわれは幹細胞の存在が報告され、全身疾患に対する有用性も期待されている歯髄幹細胞；不要となった永久歯歯髄幹細胞 (DPSCs)、中でもこれまで脱落后廃棄されてきた乳歯歯髄幹細胞 (SHED) に注目し、DPSCs、そして臨床応用されている骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) と比較検討することによって、再生医療における幹細胞供給源としての有用性について検討した。特に本発表では創傷治癒、骨形成能、そしてその同種移植の可能性を含めた骨再生医療の発展性について焦点を当てた。

[材料および方法]

1. ヒト SHED および DPSCs のキャラクタライズ；ヒト抜去乳歯および永久歯より歯髄組織を採取後、酵素処理にて歯髄由来幹細胞を分離、培養し検討した。検討項目は①増殖能の検討 ②幹細胞マーカーの発現解析 ③骨・象牙質および脂肪分化能の検討 ④マイクロアレイ解析による遺伝子発現プロファイル、パスウェイ解析

2. In vivo における解析

(1) マウス創傷治癒モデルにおける治癒促進能の検討

シリコンプレートを用いた直径 8mm の創傷治癒モデルにおいて、現在臨床応用が行われている線維芽細胞 (Fibro)、MSCs と SHED との創傷治癒効果、ヒアルロン酸発現、合成量の比較検討を行った。

(2) イヌ顎骨再生モデルにおける骨形成能の比較

イヌ下顎骨に直径 10mm の自然治癒しないとされる骨欠損を作成し、MSCs、DPSCs、SHED と多血小板血漿 (PRP) を移植し、欠損のみの対照群との骨形成能を肉眼的、組織学的、組織形態学的に検討を行った。

[結果]

ヒト乳歯歯髄幹細胞 (SHED) は、永久歯歯髄幹細胞 (DPSCs) と比較して高い増殖能を示し、マイクロアレイ解析においても細胞増殖に関連する遺伝子 (CTGF 等) が高発現を示した。フローサイトメトリー分析では MSCs、DPSCs と同様に CD13, CD29, CD44, CD73 等の間葉系幹細胞マーカーの発現を認め、骨、象牙質、脂肪などの多分化能も確認された。創傷治癒モデルにおいても SHED は fibro に比べても MSCs と同程度に有意な治癒促進作用を認め、移植細胞からの細胞外マトリックス (ヒアルロン酸) の発現も確認された。骨再生能についても、親イヌ顎骨に DPSCs による骨再生を検討した所、MSCs と同等の骨再生を認め、さらに驚くべきことに子イヌ SHED を親イヌに移植した場合にも良好な骨再生が確認された。

[考察および結論]

SHED、DPSCs は MSCs と同等の幹細胞特性を有し、創傷治癒、骨再生能力を有することが示唆された。さらに、in vivo における骨再生能は歯髄幹細胞を用いることによっても MSCs と同程度の再生能力を示し、世代間を超えた SHED を応用した同種移植の可能性が示唆された。また、SHED は DPSCs、MSCs と比較しても増殖能が高いことから、より未分化な細胞群に富んでいると考えられ、非侵襲的に採取可能であること、倫理上の問題も少なく安全性が高いという観点から、再生医療にとって将来有望な細胞源になり得ることが示唆された。

多相性リン酸カルシウムの直接覆髄法への応用
—細胞付着性と HAp 面での接着システムとの接合性の検討—

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)¹

大阪大学大学院工学研究科 マテリアル生産科学専攻², 北海道医療大学歯学部 う蝕制御治療学分野³

○騎馬 和歌子¹, 今里 聡¹, 西田万里子¹, 高橋 雄介¹, 恵比須 繁之¹, 中野 貴由², 斎藤 隆史³

Application of Polyphasic Calcium Phosphates to Direct Pulp Capping

— Evaluation of Cell Adhesion and Bonding of Adhesive Systems to HAp Surface —

¹Dept of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka Univ Grad Sch Dentistry; ²Dept of Materials Science and Engineering, Osaka Univ Grad Sch Engineering; ³Division of Clinical Cariology and Endodontology, Health Science Univ of Hokkaido
○KIBA Wakako¹, IMAZATO Satoshi¹, TAKAHASHI Yusuke¹, EBISU Shigeyuki¹, NAKANO Takayoshi², SAITO Takashi³

【研究目的】

現在、直接覆髄処置には Ca(OH)₂ 製剤や接着性レジンなどが用いられているが、Ca(OH)₂ 製剤には、歯質や修復材との接着性がなく、経時的に劣化しやすいという欠点があり、また接着性レジンでは、良好な封鎖が得られる反面、硬組織形成が遅延する傾向にあることや露髄面から再出血を引き起こしやすいことなどの問題点が指摘されている。

われわれは、骨補填材として開発したハイドロキシアパタイト (HAp) と可溶性リン酸カルシウムの複合体である多相性リン酸カルシウム (Poly-CaP) を露髄部に適用すれば、dentin bridge 形成の促進と窩洞の緊密な封鎖が同時に得られると考え、本材料の直接覆髄材としての有用性の検討を開始した。そして、第 127 回本学会において、まざラットを用いた *in vivo* 実験により、Poly-CaP を用いて直接覆髄を行うと、不活性な HAp と比較して早期に密な dentin bridge が形成されることを報告した。今回は、Poly-CaP の特性を *in vitro* 系実験で検討することを目的に、相構成の解析、象牙芽細胞様細胞を用いた細胞付着試験、および HAp 面での接着システムとの接合性の評価を行った。

【材料および方法】

- 1) 相構成の解析: 直径 9 mm、厚さ 2 mm の緻密性 HAp ディスクを、真空環境下で 1350°C にて 10 時間加熱処理して Poly-CaP 試料を作製し、表層から 1000 μm の深さまでの組成を X 線回折法により分析した。
- 2) 細胞付着試験: Poly-CaP または非加熱の HAp ディスクをマイクロプレートの well に置き、分化誘導培地を用いて調整したマウス象牙芽細胞様細胞 MDPC-23 浮遊液 (1×10⁴ cells/well) を播種した。24 時間培養後、MTT アッセイにより試料上の細胞数の評価を行った。
- 3) 接着システムとの接合性の検討: HAp を、40%リン酸、Adper Prompt L-Pop または Clearfil Mega Bond FA プライマーで処理後、SEM にて表面の脱灰状態を観察した。また、HAp 上に、Adper Single Bond Plus、Adper Prompt L-Pop または Clearfil Mega Bond FA を用いてコンポジットレジンを築盛し、界面の接合状態の観察を行った。

【結果】

- 1) Poly-CaP 試料の表層から 50 μm まで α-TCP のピークが明瞭に認められ、100 μm の深さから HAp のピークが出現した。また、TTCP のピークが表層から 1000 μm まで観察された。
- 2) MTT アッセイにおいて、Poly-CaP では、ポジティブコントロールであるマイクロプレート well 面と同様の結果が得られ、HAp と比較して有意に付着細胞数が多かった (ANOVA, Fisher's PLSD test, *p* < 0.05)。
- 3) リン酸およびセルフエッチングプライマー/アドヒーシブ処理のいずれにおいても HAp 表面の脱灰が認められ、その程度は処理液の pH に依存していた。一方、界面の観察では、三種のいずれの接着システムでも、HAp 表面の空孔部をレジンが満たして緊密に接合している様子が認められた。

【考察および結論】

本研究より、Poly-CaP 表層は可溶性リン酸カルシウム相から構成されているが、象牙芽細胞様細胞はその表面に高い付着性を示し、また非加熱の HAp 面と接着システムとの間に良好な接合が得られることが明らかとなった。前回の *in vivo* 実験も含め、これまでに得られた結果は、Poly-CaP が直接覆髄材として有用な材料であることを示唆している。現在、象牙芽細胞の分化と石灰化の観点から、Poly-CaP の有効性についてさらに検討を加えているところである。

骨形成における CD73 (ecto-5'-nucleotidase) の役割

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)
○大原廣之, 竹立匡秀, 村上伸也

The roles of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in bone formation
Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Hiroyuki Oohara, Masahide Takedachi and Shinya Murakami

【研究目的】

アデノシン (Ado) はその受容体であるアデノシンレセプター (AdoR) を介して, 神経系や脈管系の調節, 創傷治癒の促進, 低酸素環境への順応など, 様々な生物学的機能を制御することが知られている. 我々の研究室ではこれまでに, ヒト歯肉上皮細胞および歯肉線維芽細胞を用いて, これらの細胞膜上に発現した AdoR の活性化がその細胞機能に及ぼす影響について数々の新規知見を見出ししてきた. さらに AdoR の活性化が, 細胞外 Ado 濃度調節を担う CD73 とアデノシンデアミンナーゼ (ADA) の両酵素により制御されることを見出し報告してきた. 近年, 骨芽細胞において, ATP に代表されるヌクレオチドが細胞膜上に存在する特異的受容体を介してその細胞機能を制御する可能性が報告されているが, その代謝産物である Ado に関してはほとんど検討がなされていない.

我々は第 128 回日本歯科保存学会学術大会において, CD73 欠損マウスでは野生型マウスに比べ骨量が減少していること, またその表現型は CD73 分子が骨芽細胞の分化調節に関与することに起因する可能性を報告した. 本研究では CD73 分子の骨芽細胞分化制御機構をより詳細に解析することを目的とした.

【材料および方法】

(1) CD73 欠損マウス由来頭蓋骨における骨芽細胞分化マーカー発現解析: Linda Thompson 博士 (Oklahoma Medical Research Foundation) より供与された CD73 欠損マウスを実験に供した. CD73 欠損マウスおよび野生型マウスの 12~14 週齢雄マウスから頭蓋骨を採取し, 骨組織における骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシン (OC), 骨シアロプロテイン (BSP) およびオステオポンチン (OP) の mRNA 発現を定量 PCR 法により解析した.

(2) 骨芽細胞の分化に伴う AdoR および Ado 代謝関連酵素 (CD73, ADA) 発現解析: マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 を石灰化誘導培地 (FCS, beta-glycerophosphate, ascorbic acid 含有 alpha-MEM) にて長期培養を行い, 経時的に AdoR (A1, A2a, A2b, A3), CD73, ADA の mRNA 発現を半定量および定量 PCR 法にて解析した.

(3) 骨芽細胞における CD73 分子の機能解析: MC3T3-E1 にリポフェクション法にて CD73 発現プラスミドベクターを導入し, G418 含有選択培地にて培養することにより CD73 強発現 MC3T3-E1 (MC-CD73) を樹立した. そして, MC-CD73 の増殖能および, 石灰化誘導培地にて培養を行った際の経時的なアルカリホスファターゼ (ALPase) 活性の変化ならびに石灰化ノジュール形成能について解析を行った. また, 同時に OC, BSP, OP といった骨芽細胞分化マーカー mRNA 発現についても検討を行うべく, RNA を回収し定量 PCR 法にて解析を行った.

【結果および考察】

(1) CD73 欠損マウス由来頭蓋骨における骨芽細胞分化マーカー発現解析: CD73 欠損マウス由来頭蓋骨では野生型に比べ OC, BSP, OP mRNA の発現低下を認めた.

(2) 骨芽細胞の分化に伴う AdoR および Ado 代謝関連酵素 (CD73, ADA) 発現解析: MC3T3-E1 を石灰化誘導培地にて長期培養を行った際に, AdoR (A2a, A2b) mRNA 発現上昇を認めた. 一方で, A1 および A3 AdoR mRNA 発現は認めなかった. さらに, mRNA レベルでの CD73 の発現上昇, ADA の発現低下を認めた.

(3) 骨芽細胞における CD73 分子の機能解析: MC-CD73 は対照群と比較して増殖能に差を認めなかったが, ALPase 活性の上昇および石灰化ノジュール形成亢進を認めた. また, MC-CD73 は対照群と比較して有意な OC, BSP, OP mRNA 発現上昇を認めた.

以上より, CD73 分子および同分子を介して産生される Ado は骨芽細胞においてその分化調節に促進的に作用する可能性が示唆された.

キシリトール経口投与がラット骨代謝に及ぼす影響

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座
佐藤宏和 沼部幸博

The Effects of Oral Xylitol Administration on Bone Turnover in Rats

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

Hirokazu Sato Yukihiro Numabe

キーワード：キシリトール、骨代謝、 μ CT、骨形態計測、大腿骨

[目的]

キシリトールは1960年代からフィンランドにて代用糖として使用され、現在までう蝕予防に対する効果が報告されている。すなわち、ミュータンス菌数の減少、歯質再石灰化、プラーク粘着性の減少など多岐にわたる効果が示されている。その一方で、キシリトールの骨組織に対する影響に関する報告は少ない。Mattilaらは、ラットへのキシリトール投与後の骨形態計測結果から、骨密度が上昇し骨粗鬆症の予防に効果的であったという報告はあるが、詳細なメカニズムは解明されていない。そこで今回我々は、キシリトールの骨代謝に及ぼす影響を、軟エックス線写真、 μ CTを用いた骨形態計測に加え、組織学的、生化学的に検討した。

[材料と方法]

生後4週齢(体重約70g前後)のWistar系雄性ラット(日本クレア, 東京)を用いた。キシリトールの与え方は、通常の食餌として与えているCE-2飼料(日本クレア, 東京)に、キシリトール(和光純薬, 大阪)粉末を混ぜ、固形化したキシリトール添加特殊飼料を40日間経口摂取させた。キシリトール摂取群をテスト群、キシリトール無摂取群をコントロール群とした。なお、キシリトール濃度は20% (w/w)になるよう調整した。飼育開始40日後にラット左側大腿骨より血液を採取し、血清Ca濃度(OCPC法)を測定した。

各群のラットは4週齢より実験終了まで1週毎に体重測定を行った。飼育40日でペントバルビタール麻酔下にて安楽死後、左側大腿骨を軟エックス線写真(C60型撮影装置, 日本SOFTEX社)および μ CTにて撮影(ELESCAN, 日鉄エレックス, 東京)した。その後、 μ CT撮影画像については、再構成ソフト(TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング, 東京)を用い、3次元解析を行った。

組織学的評価として、右側大腿骨の組織切片作成後、通常に従いH-E染色、骨代謝を観察するためにALP染色、TRAP染色を行い、光学顕微鏡下にてテスト群、コントロール群の比較検討を行った。

なお本研究は、日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会の承認のもと、動物の愛護と福祉を遵守して行われた。

[結果および考察]

2群間で実験終了時の体重に統計的有意差は認められなかった。40日後の血清Ca濃度は、コントロール群と比較してテスト群で有意に高い結果となった($p < 0.05$)。また、 μ CT解析において、海綿骨骨密度に関して、テスト群で有意に高値を示した。組織学的評価では、各染色において有意な差は認められなかった。

血清Ca濃度、また骨密度の上昇という結果から、キシリトール経口投与がラット骨代謝に影響を及ぼすことが示唆された。

会員外共同研究者：日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター 那須優則

日本歯科大学生命歯学部歯科放射線学講座 井出吉昭

エピガロカテキンガレートによる破骨細胞形成抑制メカニズムの検討

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病学分野

○鶴飼 孝、横山美穂、Ayon Haro Esperanza Raquel、岸本隆明、吉永泰周、藏本明子
小野山美穂、白石千秋、阿部嘉裕、原 宜興

Analysis of inhibitory mechanism by epigallocatechin gallate on osteoclastogenesis

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

○Takashi Ukai, Miho Yokoyama, Ayon Haro Esperanza Raquel, Yasuhiro Yoshinaga, Akiko Kuramoto
Miho Onoyama, Chiaki Shiraiishi, Yoshihiro Abe, Yoshitaka Hara

【目的】

破骨細胞は骨吸収において重要な細胞で、macrophage colony stimulating factor (M-CSF) 存在下で receptor activator of NFkappa B Ligand (RANKL) が骨髄マクロファージ上の RANK と結合することで形成される。緑茶カテキンは多くの生物学的活性を持っていることが報告されている。我々はこれまでに緑茶カテキンが炎症性の骨吸収ならびに破骨細胞の形成を抑制することを示してきた。緑茶カテキンには多くのカテキン類が含まれている。なかでもエピガロカテキンガレート (EGCG) は主要な成分であり、生物学的活性も多く研究されてきている。EGCG は in vitro での破骨細胞形成を抑制することが示されてきているが、そのメカニズムは明らかとなっていない。今回の研究の目的は EGCG の破骨細胞形成抑制メカニズムを検討することである。

【材料と方法】

マウス骨髄マクロファージを M-CSF ならびに RANKL 存在下で 3 日間培養し破骨細胞を形成する系を用いた。破骨細胞の形成状態は TRAP 染色を行い多核の TRAP 陽性細胞を破骨細胞として評価した。緑茶カテキンの破骨細胞への影響を検討するため、数種類のカテキン類をそれぞれ破骨細胞形成系に添加し、破骨細胞の形成状態を調べた。さらに EGCG の破骨細胞形成への効果を詳しく検討するために、上記破骨細胞形成系において RANKL 添加と同時に、添加後 1 日あるいは 2 日目に EGCG を添加し、3 日目に破骨細胞形成状態を確認した。また RANKL ならびに EGCG 添加 1, 2, 3 日後の単核の TRAP 陽性細胞の形成状態も確認し、EGCG の影響を検討した。また flow cytometry により骨髄マクロファージ上の RANK 発現に対する EGCG の影響を検討した。

【結果】

カテキン類の多くが RANKL による破骨細胞形成を有意に抑制した。なかでも EGCG は抑制効果の大きなものの一つであった。我々の培養系では TRAP 陽性細胞は培養 1 日目では検出できなかったが、2 日目には単核の TRAP 陽性細胞が検出された。EGCG は 2 日目における TRAP 陽性の単核細胞の形成も抑制した。EGCG は RANKL 添加 0, 1 ならびに 2 日目のいつ添加されても、破骨細胞形成を有意に抑制した。骨髄マクロファージにおける RANK の発現は EGCG 添加により抑制されなかった。

【考察・結論】

EGCG は破骨細胞形成の初期に作用して、TRAP 陽性単核細胞への分化を抑制するばかりでなく、後期に作用して破骨細胞分化も抑制すると考えられる。この作用は EGCG が破骨細胞前駆細胞上の RANK の発現を減少させることで起こるものではないことが示唆された。

マウス培養口蓋粘膜上皮細胞を用いた歯胚再生

新潟大学大学院医歯学総合研究科¹ 分化再生制御学分野² 歯周診断再建学分野
○中川英蔵^{1,2} 伊東達雄¹ 吉江弘正² 里方一郎¹

Odontogenic Potential of Postnatal Oral Mucosal Epithelium

¹Division of Developmental Biology and ²Division of Periodontology, Department of Oral Biological Sciences, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○E. Nakagawa^{1,2}, T. Itoh¹, H. Yoshie², and I. Satokata¹

【緒言】 自己の細胞を用いて組織を再生することは医療において大きな進歩となり得る。今日まで、歯胚の再生が行われているが、それはヒト以外の動物の胎生期の細胞を用いたものが主である。しかし、臨床応用を考えた場合、患者本人の自家細胞を用いて歯胚再生を行うのが理想的である。その一歩として我々は、生後の細胞を用いた歯胚再生が可能かどうかを検討した。

【目的】 臨床的に採取可能な口蓋粘膜上皮を用いた歯胚の再生が可能かどうか調べる。

【材料及び方法】 胎齢 12.5 日のマウス顎間葉組織と様々な時期のマウス口蓋粘膜上皮組織の直接接合、及び、胎齢 12.5 日のマウス顎間葉組織と口蓋粘膜上皮細胞シートの接合、の 2 通りで検討した。いずれの場合も接合組織を 2 日間培養した後、マウスの腎皮膜下に移植し、14 日後に移植組織を組織学的に解析した。

【結果】 直接接合した場合には生後 1 日まで歯胚の再生が可能であり、その効率は 13~33%であった(Table1)。また、口蓋粘膜上皮シートを接合した場合には、生後 4 週齢まで歯胚の再生が可能であり、その効率は 9~20%であった(Table1)。

Table1 接合組織の腎皮膜移植後の歯胚再生効率

	Age of mice													
	E12.5	E14.5	E16.5	E18.5	P0	P1	P2	P4	1W	2W	3W	4W	5W	8W
Mandibular or dental epithelium	9/25 (36%)	6/25 (24%)	6/25 (24%)											
Palatal epithelium		2/14 (14%)	3/18 (17%)	2/16 (13%)	4/18 (22%)	6/18 (33%)	0/18	0/21	0/20	0/20	0/20	0/20	0/23	0/21
Cultured epithelial cell sheet								4/21 (19%)	3/24 (13%)	2/21 (9%)	3/15 (20%)	3/24 (13%)	0/24	0/36

また、接合する培養口蓋粘膜上皮細胞シートの細胞構成を経時的に免疫組織学的手法を用いて観察したところ、接合に用いた時期 (day11~14) の細胞構成は、cytokeratin13 陽性細胞 (傍基底細胞、有棘細胞) が全体の約 60%を占め、cytokeratin19 陽性細胞 (基底細胞) が全体の約 8%を占め、cytokeratin1 陽性細胞 (顆粒細胞、角化細胞) が全体の 32%を占めていた。(Table2)。

Table2 培養口蓋粘膜上皮細胞シートの細胞分化プロファイル

Culture period	Percentage of cytokeratin expressing cells		
	CK19	CK13	CK1
5 days	35.0±1.0%	59.6±5.6%	3.9±0.3%
7 days	46.0±4.8%	47.7±3.7%	8.5±1.4%
11 days	30.0±0.6%	54.6±0.4%	15.0±0.8%
14 days	8.2±0.2%	60.3±0.3%	32.7±0.7%

【結論】 若いマウスの口腔粘膜上皮は歯上皮への分化能を有することが明らかになった。更に、上皮シートの作成は、より週齢が進んだマウスの口腔粘膜上皮の歯上皮への分化能を高めることも判明した。また、培養口蓋粘膜上皮細胞中の未分化な細胞 (CK13 陽性細胞) だけでなく、ある程度分化の進んだ細胞 (CK13 陽性細胞) もマウス顎間葉組織からの誘導を受け、歯上皮へと分化する能力を有する可能性が示された。

EMD, bFGF, PDGF/ β -TCP を用いた歯周組織再生—イヌ 2 壁性骨欠損モデルにおける比較検討—

鹿児島大学大学院医学総合研究科歯周病学分野

○白方良典、吉元剛彦、谷山勝義、宮本元治、竹内尚士、松山孝司、野口和行

Evaluation of periodontal healing of 2-wall intrabony defects with EMD, bFGF, or PDGF/ β -TCP—An experimental study in dogs—

Department of Periodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Yoshinori Shirakata, Takehiko Yoshimoto, Katsuyoshi Taniyama, Motoharu Miyamoto, Naoshi Takeuchi, Takashi Matsuyama
and Kazuyuki Noguchi

【目的】

近年、様々なスキャホールドおよび細胞成長因子を利用した歯周組織再生療法が開発されている。しかしこれらの適応基準となる治癒形態について比較を行った報告はない。そこで本研究では、エナメルマトリックスデリバティブ(以下 EMD)、塩基性線維芽細胞増殖因子(以下 bFGF)、血小板由来成長因子/ β -リン酸三カルシウム(以下 PDGF/ β -TCP)を用いたイヌの 2 壁性骨欠損における歯周組織再生について組織学的及び放射線学的に比較検討を行った。

【材料および方法】

実験動物にはビーグル成犬 4 頭を用いた。実験に先立って両側下顎第 3 前臼歯の抜歯を行った。抜歯後 10 週、両側下顎第 4 前臼歯近心および第 2 前臼歯遠心部の粘膜骨膜弁を剥離回転し、2 壁性骨欠損(深さ 5mm 頬舌径 5mm 近遠心径 5mm)を外科的に作製した。これらの欠損において対照群として 1) 歯肉剥離搔爬術(OFD 群)、実験群として 2) EMD 塗布(EMD 群)、3) 0.3% bFGF/HPC(ヒドロキシプロピルセルロース)塗布(FGF 群)、4) PDGF/ β -TCP 移植(以下 PDGF/ β -TCP 群)の 4 処置を各々施し、粘膜骨膜弁を復位縫合した。術後 8 週において実験動物を安楽死させ、実験部位を周囲軟組織と共に切除し μ CT 撮影を行った。通法に従い脱灰薄切標本を作製し HE 染色後、光学顕微鏡下で組織学的解析を行った。

【結果】

観察期間を通じて、創の裂開、腫脹、移植材の露出等は全ての部位で認められなかった。 μ CT 所見として OFD 群、EMD 群では頬舌的に骨再生はあまり認められなかったのに対し、FGF 群では顕著に骨再生が認められた。PDGF/ β -TCP 群では欠損内に不均一に残存した β -TCP 顆粒が観察された。組織学的所見として、実験群では既存骨骨頂および欠損底部より欠損歯冠側にかけて顕著な新生骨形成が認められた。OFD 群では、既存骨骨頂の吸収が著しく歯根面に並走して薄い新生骨形成が認められた。なお EMD 群は新生骨形成に個体差が認められたのに対し、FGF 群では強い骨形成を認めた。実験群では歯根面に沿って機能的な配列を有するシャーパー線維の埋入を伴った新生セメント質の伸展、および歯根膜様組織が認められた。新生セメント質形成に関して OFD 群では、欠損底部に局限し僅かであったのに対し、EMD 群では薄い無細胞性セメント質が、FGF 群および PDGF/ β -TCP 群では厚い細胞性セメント質が優位に認められた。組織形態計測結果として、実験群は全て OFD 群より、また FGF 群は EMD 群より統計学的に有意に新生骨形成量が多かった。新生セメント質形成量は実験群は全て OFD 群より統計学的に有意に多かった。

【考察および結論】

今回、2 壁性骨欠損における EMD 群、FGF 群、PDGF/ β -TCP 群で各々良好な歯周組織再生が認められた。しかしながら EMD のみではスペースメンテナンスが困難で、無細胞性セメント質の再生には有効であるが顕著な骨誘導能を有さない可能性が示唆された。FGF 群は担体を用いながらも関わらず新生骨形成量が最も多く骨誘導能が極めて高いことが示唆された。PDGF/ β -TCP 群では安定した歯周組織再生が認められた。しかし FGF 群と比較し骨形成量が少なかったことは β -TCP の欠損内の吸収速度に依存し骨再生が遅延している可能性が示唆された。以上のことより広い 2 壁性骨欠損において歯周組織再生療法を成功させるには、EMD、bFGF、PDGF/ β -TCP を適切に選択、応用することが肝要であると考えられる。

次亜塩素酸電解水の抗菌作用と細胞毒性の検討

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¹

東京医科歯科大学 GCOE プログラム²

○ 竹内康雄^{1,2}、坂東由記子^{1,2}、長澤敏行^{1,2}、南原弘美^{1,2}、小林宏明^{1,2}、和泉雄一^{1,2}

Antibacterial and cytotoxic effects of hypochlorous acid electrolyzed water

¹Section of Periodontology, Hard Tissue Engineering, Graduate School¹,

GCOE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases²,

Tokyo Medical and Dental University

○Yasuo Takeuchi, Yukiko Bando, Toshiyuki Nagasawa, Hiromi Nanbara, Hiroaki Kobayashi, Yuichi Izumi

【研究目的】

近年、電解機能水はその殺菌・消毒作用から医療分野で応用されている。う蝕や歯周病の発症や進行には病原細菌が関与していることから、その予防や治療における応用が進んでいる。機能水は抗菌剤と異なり耐性菌の発生などは起こさないものの、口腔内の臨床応用においては安全性の確認が重要である。本研究では、中性次亜塩素酸機能水の歯周病治療応用に先立ち、本機能水の歯周病原細菌に対する殺菌効果およびヒト由来細胞に対する毒性を検討した。

【材料および方法】

(1) 次亜塩素酸電解水の歯周病原細菌に対する殺菌効果

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718 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、 1×10^8 CFU/ml になるよう希釈調整した次亜塩素酸電解水 (HEW) は専用の装置 (PerfectPerio、野口歯科医学研究所) を用いて生成し、菌液 0.1ml に対し 9.9ml の HEW 原液 (HEW0: 有効塩素濃度 600ppm) または滅菌蒸留水にて 2 倍 (HEW2)・4 倍 (HEW4) に希釈調整したものを加え、10 秒間作用させた。対照として滅菌生理食塩水、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (NaOCl: 0.06、0.03、0.015%)、クロルヘキシジン溶液 (CHX: 0.06、0.03、0.015%) についても同様に作用させた。その後、溶液を段階希釈し、Brucella 血液寒天培地または TSBV 寒天培地に播種した。37°C で 72 時間培養後、コロニー数を計測し生菌数を算出した。

(2) 次亜塩素酸電解水のヒト由来細胞に与える影響

ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF-1) を DMEM (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 含) にて培養し、 5×10^4 cells/ml になるよう細胞懸濁液を調製した。またヒト単核細胞 (THP-1) を RPMI-1640 (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin 含) にて培養し、 1×10^5 cells/ml になるよう細胞懸濁液を調製した。24 時間培養後、PBS で 3 回 wash し、各細胞に HEW 原液および 10 倍希釈 (HEW10)・100 倍希釈 (HEW100) を加え、60 秒間作用させた。対照として滅菌生理食塩水、CHX、NaOCl についても同様に行った。作用後、PBS で 3 回 wash した後、各細胞をそれぞれ DMEM、また RPMI-1640 で培養し、37°C、5% CO₂、95% Air 条件下で培養した。1・24 時間培養後、Cell Counting Kit (DOJINDO) を用いて酵素活性を測定し細胞生存率を算出することで、HEW の細胞毒性について検討した。

【結果】

HEW0 を 10 秒間作用させた場合、*P. gingivalis* と *A. actinomycetemcomitans* の生菌数に有意な減少が認められた。また、*P. gingivalis* に対しては、HEW2 や HEW4 でも生菌数の減少が認められた。HEW0 と同程度の濃度である 0.06% CHX や 0.06% NaOCl を作用させた場合も生菌数の減少が認められたが、HEW を作用させた場合と比べると、その細菌の減少率は低かった。

また HEW0 や HEW10 を HGF-1 に作用させた場合、滅菌生理食塩水を加えた場合と比較して有意に細胞数の減少が認められた。同様の傾向は CHX や NaOCl を作用させた場合においても認められた。THP-1 に作用させた場合、HEW10 では細胞数の減少は認められなかったが、同程度の濃度である 0.006% CHX や 0.006% NaOCl を作用させた場合には細胞数の減少が認められた。

次亜塩素酸電解水及び洗口剤の短時間作用によるう蝕病原菌に及ぼす効果

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科う蝕制御学分野、²東京医科歯科大学歯学部大学院教育支援プログラム

「大学院から医療現場への橋渡し研究者教育」、³東京医科歯科大学 GCOE プログラム(歯と骨)

小柳 岳大^{1,2}、マティン カイルール^{1,2}、岡田 彩子¹、田上 順次^{1,2,3}

Response of Cariogenic Bacteria on Short Exposure to Hypochlorous Acid Electrolyzed-water and Mouth Washes

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

²Support Program for Improving Graduate School Education at Tokyo Medical and Dental University

³GCOE Program, “International Research Center for Molecular Science in Tooth Bone Diseases” at TMDU

Takehiro OYANAGI^{1,2}, Khairul MATIN^{1,2}, Ayako OKADA¹ and Junji TAGAMI^{1,2,3}

【概要及び研究目的】近年、う蝕予防に対する関心の高まりに伴い、ホームケア用品の充実が求められている。特に洗口剤は、含嗽形式である簡便な使用であるため、使用者の年齢や能力などの制限が少なく、期待が高い。一方、これまで、器具の消毒や治療等に用いられてきた口腔機能水の幅広い応用性に注目が集まり、洗口剤としての応用に期待が寄せられている。本研究で用いた口腔機能水は、従来の酸性次亜塩素酸電解水と異なり、弱アルカリ性を示すため歯質への影響が少なく、且つ高濃度の有効塩素（600ppm）により Oral Health を考慮した歯科への応用が期待されている。これまでの研究で、う蝕病原菌に対する殺菌、或いはう蝕バイオフィームへの浸透性に関する効果的な使用方法に関して報告されているが、一般に市販されている洗口剤と比較した研究の報告はまだ無い。従って、本研究では、次亜塩素酸電解水（Hypochlorous Acid Electrolyzed-water; HEW）及び各種市販洗口剤のう蝕病原菌に対する殺菌効果及びう蝕バイオフィームに対する影響に関して、比較、検討する事を目的とした。

【材料及び方法】材料：試溶液として HEW (PerfectPerio™、野口歯科医学研究所)、ConcoolF (Con-F, Weltec)、Neostelin green (Neo-G、日本歯科薬品)、LISTERINE (LIS、Johnson&Johnson)、ポピョドンガーグル (PG、吉田薬品) を使用した。それぞれ希釈倍率は業者指示量とし、HEW は 1 倍 (HEW-1) 及び 5 倍希釈 (HEW-5) を用いた。また、対照群としてリン酸緩衝液 (PBS) を使用した。供試細菌として、*Streptococcus mutans* MT8148 (*S. mutans*)、*Streptococcus sobrinus* 6715 (*S. sobrinus*) を用いた。方法：*S. mutans* 及び *S. sobrinus* を Brain Heart Infusion 液体培地で培養後、PBS 中で洗菌後、再懸濁した細菌懸濁液を準備した。次に遠心操作を行い、上澄みを除去後の各菌塊に各種試溶液を加え、10 秒間インキュベーションした。その後、LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit (Molecular Probes、Invitrogen Detection Technologies) を用いて染色後、蛍光顕微鏡観察による生死判定を行った。また、Mitis Salivarius 寒天培地に播種し、37 度 48 時間培養後、コロニー数を計測 (CFU/ml) し、統計処理を行った。さらに、う蝕バイオフィームに対する浸透性の検証のために、人工口腔装置 (Oral biofilm reactor: OBR) 内にウシエナメル質を切断して作製した試料を固定し、複数う蝕病原菌による、sucrose dependent biofilm を形成した。その後試料は各試溶液に浸漬し、振動によりバイオフィームを三層に分け、各層におけるコロニー数を計測し、統計処理を行った。

【結果及び考察】う蝕病原菌に対する各種試溶液の影響に関してコロニー数計測の結果、各試溶液は、対照群と比較しコロニー数は少なかった。特に、HEW-1 と HEW-5 群においてコロニーは認められず、また LIS、PG、Neo-G 群では、コロニーは僅かであった。さらに BacLight 染色による蛍光観察の結果、HEW-1、HEW-5 及び LIS 群で死滅が認められ、Neo-G 及び PG 群では、死菌と共に減弱した生菌の割合が高く見られた。また、Con-F 群では死菌は僅かであった。バイオフィーム浸透性の検討に関しては、HEW-1 群において、バイオフィーム最下層におけるコロニー数は、僅かであった。上記結果により、本実験条件において HAEW は、僅かな作用時間で、う蝕病原菌及びバイオフィーム内におけるう蝕病原菌に対して、高い殺菌性を示し、各種洗口剤と比較し、同等或いはそれ以上の殺菌効果が認められた。今後、さらなる研究により、HEW 或いは、各種市販洗口剤の殺菌メカニズムの解明が必要であると考えられる。

【結論】本実験条件において、HEW はう蝕病原菌に対し強い殺菌効果を示し、またう蝕バイオフィームに対しては底部まで浸透し殺菌効果が示された。また、HEW は洗口剤として適切なガイドラインの下で作用させれば他の市販洗口剤と同等、それ以上のう蝕予防効果が十分期待される。

本研究は東京医科歯科大学 GCOE プログラム(歯と骨)及び野口歯科医学研究所の補助を受けて遂行された。

次亜塩素酸ナトリウムの有機質溶解効果について

1. 日本大学松戸歯学部歯内療法学講座、2. 日本大学松戸歯学部小児歯科学講座
○和田陽子¹、高橋知多香¹、松井 智¹、臼井 朗²、荒井清司²、三浦孝司¹
辻本恭久¹、前田隆秀²、松島 潔¹

Effect of dissolution of organic tissue by NaClO

1. Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
2. Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○Wada Yoko¹, Takahashi Chitaka¹, Matsui Satoshi¹, Usui Akira², Arai Kiyoshi², Miura Takashi¹,
Tsujimoto Yasuhisa¹, Maeda Takahide², Matsushima Kiyoshi¹

【目的】

歯髄組織や感染歯質の除去をするにあたって、リーマーやファイルなどによる機械的方法と、薬剤による化学的方法(ケミカルサージェリー)がある。ケミカルサージェリーを行う代表的な薬剤として、次亜塩素酸ナトリウム(NaClO)が多く用いられている。NaClOは殺菌作用と有機質溶解作用を持ち合わせている活性酸素の一種であるが、有機質溶解作用と活性酸素、フリーラジカルについての関連性については報告が少ない。そこで本研究では、NaClOの有機質溶解作用の解明の一助として、NaClOから発生した活性酸素、フリーラジカルが有機質溶解作用に与える影響について解析を行った。

【方法および材料】

ウィスター系ラット(雄、10週齢)の腹直筋約1gを試料とした。NaClO(関東化学)を0, 1.0, 2.5, 5.0%に濃度調整した。はじめに、試料の湿重量を測定した。NaClO(5ml)各濃度に試料を浸漬し、ウォーターバス中で5, 10, 20, 30, 60分作用させた。その後、試料を取り出し、水分をふき取った後、再度湿重量を測定した。作用後のNaClO中のタンパク質溶解量をProtein Assay(Bio Rad, USA)を用い、通法に従って波長570nmにおける吸光度で測定した。作用前NaClO, 作用後NaClOに発生する活性酸素、フリーラジカルを、スピントラップ剤であるDMP0(5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide)でトラップし、電子スピン共鳴装置(JES FA-200, 日本電子)にて測定を行った。なお、実験は37°Cの条件下で行った。

【結果および考察】

湿重量測定の結果から、作用させるNaClOの濃度上昇と時間経過に依存して試料重量の減少が認められた。

タンパク質溶解試験の結果においても、重量変化の結果と同様に、NaClOの濃度上昇と時間経過に伴い、タンパク質溶解量の増加が認められた。なお、0%と5.0%の濃度において有意差が認められた。

フリーラジカル測定の結果から、作用前のNaClOでは、0%で活性酸素、フリーラジカルの検出が認められなかったが、1.0, 2.5%で典型的なDMP0-Xの検出が認められ、5.0%ではヒドロキシラジカル(OH[•])のspin adductが検出された。

作用後の0% NaClOでは、全ての時間においてフリーラジカルの検出が認められなかった。作用後の1.0% NaClO中には、DMP0-XやOH[•]と異なるspin adductが検出され、時間の経過とともに減弱し、60分後にはOH[•]が認められた。作用後の2.5% NaClO中には、1.0%で検出されたspin adductの増強が認められ、時間の経過とともに減弱した。作用後の5.0% NaClO中には、5, 10分においてDMP0-Xの検出が認められた。20, 30, 60分においてはDMP0-XやOH[•]と異なるspin adductが検出され、時間の経過とともに減弱した。

以上の結果から、NaClOを有機組織に作用させると、濃度依存的、時間依存的に有機質を溶解し、タンパク質が溶出する事が認められた。また、NaClOから発生した活性酸素、フリーラジカルは、有機質溶解によってそのspin adductのシグナルと強度を変え、更に時間の経過とともに変化することが認められた。このことから、活性酸素、フリーラジカルのspin adductのシグナルと強度の変化することで、NaClOの有機質溶解の一役を担っている可能性が唆された。

保存修復学基礎実習における教材の共有化に関する検討

福岡歯科大学総合歯科学講座総合歯科学分野¹⁾、口腔治療学講座歯科保存学分野²⁾
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³⁾、个体差医療科学センター⁴⁾
東京歯科大学保存修復学講座⁵⁾ 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科補綴学分野歯冠修復学⁶⁾
大阪歯科大学歯科保存学講座⁷⁾ (株)ニッシン⁸⁾ 広島歯科技術専門学校⁹⁾
○山田 和彦¹⁾、米田 雅裕¹⁾、泉 利雄²⁾、阿南 壽²⁾、廣藤 卓雄¹⁾、泉川 昌宣³⁾、川上 智史⁴⁾、齋藤 隆史³⁾、
高瀬 保晶⁵⁾、平井 義人⁵⁾、堀田 正人⁶⁾、山本 宏治⁶⁾、谷本 啓彰⁷⁾、山本 一世⁷⁾、岩城 重次⁸⁾、新谷 英章⁹⁾

Trial for Establishment of Common Educational System in Operative Dentistry Basic Training

Section of General Dentistry, Department of General Dentistry¹⁾, Section of Operative Dentistry and Endodontology, Department of Odontology²⁾, Fukuoka Dental College, Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry³⁾, Institute of Personalized Medical Science⁴⁾, Health Sciences University of Hokkaido, Department of Operative Dentistry, Tokyo Dental College⁵⁾, Department of Prosthodontics (Operative Dentistry), Division of Oral Functional Science and Rehabilitation, Asahi University, School of Dentistry⁶⁾, Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University⁷⁾, Hiroshima Dental Technical College⁸⁾, NISSIN DENTAL PRODUCTS INC.⁹⁾
○Kazuhiko Yamada¹⁾, Masahiro Yoneda¹⁾, Toshio Izumi²⁾, Hisashi Anan²⁾, Takao Hirofujii¹⁾, Masanobu Izumikawa³⁾, Tomofumi Kawakami⁴⁾, Takashi Saito³⁾, Yasuaki Takase⁵⁾, Yoshito Hirai⁵⁾, Masato Hotta⁶⁾, Kouji Yamamoto⁶⁾, Hiroaki Tanimoto⁷⁾, Kazuyo Yamamoto⁷⁾, Shigetsugu Iwaki⁸⁾, Hideaki Shintani⁹⁾

【目的】

保存修復学は、歯の硬組織疾患に対して審美性を配慮した歯の解剖学的形態ならびに顎口腔機能の回復と調和を図る学問である。う蝕処置の中で現在、基本的な処置として多用されているのはメタルインレー修復およびコンポジットレジン修復であり、これまでは各大学が独自に実習を計画し、それぞれの指導法に基づいて実行してきた。しかし今後、臨床研修歯科医が母校以外の研修施設で研修を行うケースが増加すると考えられることから、研修過程で一定水準の技術を確保する為にも規格化された基礎実習システムの構築が必要と思われる。そこで我々は北海道医療大学、東京歯科大学、朝日大学、大阪歯科大学、福岡歯科大学の5大学での保存修復学基礎実習の比較を踏まえ、必要不可欠な実習項目14テーマを選択し共有化を図った。

【方法】

5大学の保存修復学基礎実習帳について共通の要素、個別の方法などを分析し各大学の意見を基に共有化を図った。

【結果】

1. 5大学の保存修復学基礎実習の分析：基本姿勢修得のための実習設備は5大学とも臨床を擬似的に再現し標準化されていたが、使用する人工歯の種類（エポキシ歯、メラミン歯、カリエス付きメラミン歯、カリエス付き2層構造歯など）やバーは各大学に特色が見られた。メタルインレー修復やコンポジットレジン修復の課題については、使用する歯種や部位は多様であり、使用する本数においても違いが認められた。また窩洞形態、使用材料、実習方法などにも違いが認められた。

2. 教材の共有化に向けての取り組み：器具の取り扱いから、う蝕除去、修復治療までの基礎実習課題について以下の14テーマを共有化した。①う蝕の取り扱いを習得する。総論 ②基本手技を習得する。A 手用切削法 ③基本手技を習得する。B 回転切削法 ④基本手技を習得する。C 補助的手法 ⑤う蝕の診査・診断法を習得する。⑥回転切削器具の特性を習得する。A 机上練習 ⑦回転切削器具の特性を習得する。マネキン（ファントム）練習 ⑧接着システムを習得する。⑨1級CR修復を習得する。⑩2級・4級CR修復を習得する。⑪インレー修復（ボックス式2級窩洞）を習得する。⑫インレー修復（スライズ式2級窩洞）を習得する。⑬3級・5級CR修復を習得する。⑭GI修復（WSD窩洞）を習得する。

【考察】

5大学におけるカリキュラム内容は様々であり、実習の時間、内容、器具などにも多様性が認められた。各大学で設備、カリキュラム内容に差異があることから、すべてを共通化することは困難であったが、今回の検討の結果、保存修復学基礎実習における基本的な部分は5大学で共有することができた。このような実習システムを構築することは学生指導、評価の統一、研修の標準化などに非常に有用であると思われる。

保存修復学基礎実習における問題志向型教材の開発

大阪歯科大学歯科保存学講座¹⁾、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²⁾・
個体差医療科学センター³⁾、東京歯科大学保存修復学講座⁴⁾、朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科補綴学分
野歯冠修復学⁵⁾、福岡歯科大学総合歯科学講座総合歯科学分野⁶⁾・口腔治療学講座歯科保存学分野⁷⁾、(株)ニッ
シン⁸⁾、広島歯科技術専門学校⁹⁾

○谷本 啓彰¹⁾、山本 一世¹⁾、泉川 昌宣²⁾、川上 智史³⁾、斎藤 隆史²⁾、高瀬 保晶⁴⁾、平井 義人⁴⁾、
堀田 正人⁵⁾、山本 宏治⁵⁾、米田 雅裕⁶⁾、泉 利雄⁷⁾、山田 和彦⁶⁾、阿南 壽⁷⁾、廣藤 卓雄⁶⁾、
岩城 重次⁸⁾、新谷 英章⁹⁾

Development of Problem Oriented Teaching Materials in Operative Dentistry Basic Training

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University¹⁾, Division of Clinical Cariology and
Endodontology²⁾, Institute of Personalized Medical Science³⁾, Health Sciences University of Hokkaido,
Department of Operative Dentistry, Tokyo Dental College⁴⁾, Department of Prosthodontics (Operative
Dentistry), Asahi University⁵⁾, Department of General Dentistry⁶⁾, Department of Odontology⁷⁾,
Fukuoka Dental College, Nissin Dental Products Inc.⁸⁾, Hiroshima Dental Technical College⁹⁾

○Hiroaki Tanimoto¹⁾, Kazuyo Yamamoto¹⁾, Masanobu Izumikawa²⁾, Tomofumi Kawakami³⁾, Takashi Saito²⁾,
Yasuaki Takase⁴⁾, Yoshito Hirai⁴⁾, Masato Hotta⁵⁾, Koji Yamamoto⁵⁾, Masahiro Yoneda⁶⁾, Toshio Izumi⁷⁾, Kazuhiko
Yamada⁶⁾, Hisashi Anan⁷⁾, Takao Hirofujii⁶⁾, Shigetsugu Iwaki⁶⁾, Hideaki Shintani⁹⁾

【目的】保存修復学基礎実習は、う蝕をはじめとする硬組織疾患の基本的な手技を習得することを目的としており、歯
学部学生にとって、以後の臨床実習ならびに卒後臨床研修、さらにその後の臨床実践の基礎となるものである。しか
し、現在の基礎実習においては診査・診断を加味した実習が少なく、臨床における治療プロセスとの乖離が認められ
る。したがって実際の臨床に即した問題志向型の実習が求められている。そこで、先に山田らが報告した保存修復学
基礎実習テーマをもとに問題志向型教材を開発したので報告する。

【材料および方法】まず、臨床における保存修復治療プロセスと、北海道医療大学、東京歯科大学、朝日大学、大阪
歯科大学、福岡歯科大学の5大学における基礎実習内容
とを比較・検討した。その結果をもとに、視覚資料（口
腔内写真、エックス線写真等、Fig.1）をはじめとする患
者の情報をニッシン社製実習模型に付与し、問題志向型
教材を作成した。



Fig.1

【結果】歯科治療において最も重要である治療計画は、
医療面接・診査による患者情報の収集、問題点の抽出・
分析・リストアップ（診断）を経て立案される。一方、基礎実習における計画（治療計画）は、実習帳に記載して
ある手順が基となる。同じ処置においても、実際の臨床と基礎実習では得られる患者情報（模型情報）量に大きな差
があることがわかった（Fig.2）。また、現在の基礎実習では、教材として静止
画・動画といった視聴覚システムの導入が進んではいるものの、断片的情報が
多いため、学生の実習意識として、「削って詰める」といった単純作業になっ
ている傾向にあることがわかった。そこで、実習模型に自覚症状・他覚的所見
を付与することにより、診査・診断・治療計画の立案・治療のプロセスが有機
的に繋がった教材を作成し、学生が臨床における問題解決のプロセスを習得し
やすいように工夫を加えた。

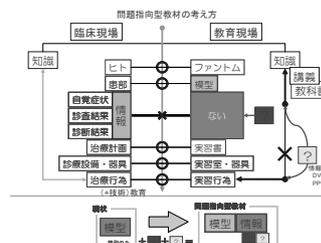


Fig.2

【考察】歯学教育において合理的で効率的な臨床教育を実践するためには、基
礎実習の段階からより臨床に即した実習を導入することが重要であると考え
る。今回われわれは、医療面接・診査等
で得られる情報をファントム・模型に付与することにより、「実習室」が「診
療室」となり学生の問題解決プロセスの
習得に役立つ保存修復学基礎実習システムの構築を試みた。本発表ではその一
部の紹介にとどまるが、さらに今後、
学生の臨床推論能力を育成する新しい実習システムの構築に関して検討を進
めていきたいと考えている。