

Er,Cr:YSGG Laser で切削したコンポジットレジンに対する コンポジットレジンの接着強さに関する検討

¹ 日本歯科大学新潟生命歯学部歯科保存学第2講座

² 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

○加藤 千景¹、新海 航一¹、平 賢久²、鈴木 雅也¹、加藤 喜郎¹

Shear Bond Strength of Resin Composite Surfaces cut with an Er,Cr:YSGG Laser

¹Department of Operative Dentistry, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

²Advanced Operative Dentistry・Endodontics, Graduate School of Life Dentistry at Niigata,
The Nippon Dental University

○Kato Chikage¹, Shinkai Koichi¹, Taira Yoshihisa², Suzuki Masaya¹, Katoh Yoshiroh¹

【目 的】

本研究は窩洞内の旧コンポジットレジンに対する補修修復を想定し、Er,Cr:YSGG Laser で切削したコンポジットレジン面に対して歯質と同様の各種表面処理を施したのちコンポジットレジンを積層し、その接着強さについて検討した。

【実験方法】

接着面試料としてコンポジットレジンブロック（直径 10mm、高さ 5mm）を作製し、耐水研磨紙 #120 ~ #600 で平坦な研磨面を形成、即時重合レジンを用いて測定用治具に固定した。次に Er,Cr:YSGG Laser（Waterlase MD turbo hand piece, tip: MX5, 2.0W, 20Hz(50.96J/cm²/p)75%Water, 60%Air）を照射して切削面を作製し、アクリルチューブ（内径 3mm、高さ 3mm）を固定後、各種表面処理《表 1》を行った。その後、Clearfil Majesty LV（A3, Kuraray, Japan）を厚さ約 1mm 塗布し 20 秒間光照射、次いで Clearfil Majesty（A3, Kuraray）を約 2mm 積層し 40 秒間光照射を行った。接着試料は恒温恒湿器中に 24 時間保管後アクリルチューブを除去し、小型卓上試験機 EZ Test 500N（Shimadzu, Japan）にてクロスヘッドスピード 0.5mm/min でせん断接着強さ試験を行った(n=10)。得られた結果は ANOVA と TukeyHSD 検定による統計学的解析を行い、実験群間の有意差の検定を行った(p<0.05)。

【結果および考察】

各種表面処理方法によるせん断接着強さを《表 1》に示す。Group 1、6 の値がわずかに低いものの、Group 2-5 は Cont. と同程度の接着強さとなった。ANOVA では有意差が認められたものの、TukeyHSD 検定では実験群間の有意差は認められなかった。このことから、Er,Cr:YSGG Laser で形成したコンポジットレジン面は Air turbine で形成した際と同様の処理をすればいいことがわかった。

Group 1 はシランカップリン

グ処理を行っていないがかなりの接着強さを有しており、これは Er,Cr:YSGG Laser の形成面は凹凸が大きくなるため機械的なが嵌合効力働きやすいためではないかと思われる。

【結論】

Er,Cr:YSGG Laser で形成したコンポジットレジン面は、Air turbine で形成した際と同様の処理を行えばよい。

《表 1》各種表面処理方法とせん断強さ

窩洞形成	実験群 (n=10)	表面処理方法	接着強さ MPa:mean (SD)
Er,Cr:YSGG Laser	Group 1 無処理	Mega bond Bondのみ⇒光照射 (10 秒間) ⇒修復	13.8±6.8
	Group 2 メガボンド	Mega bond Primer + Porcelain bond activator (5 秒間処理) ⇒エアブロー ⇒Mega bond Bond ⇒光照射 (10 秒間) ⇒修復	15.5±2.7
	Group 3 リン酸 メガボンド	K-etchant (30 秒間処理) ⇒水洗・乾燥 ⇒Mega bond Primer + Porcelain bond activator (5 秒間処理) ⇒エアブ ロー ⇒Mega bond Bond ⇒光照射 (10 秒間) ⇒修復	16.0±7.4
	Group 4 リン酸 ADゲル メガボンド	K-etchant (30 秒間処理) ⇒水洗・乾燥 ⇒AD Gel (90 秒間処理) ⇒水洗・乾燥 ⇒Mega bond Primer + Porcelain bond activator (5 秒間処理) ⇒エアブ ロー ⇒Mega bond Bond ⇒光照射 (10 秒間) ⇒修復	16.0±4.0
	Group 5 トライエス	Tri-S bond + Porcelain bond activator (5 秒間処理) ⇒エアブロー ⇒光照射 (10 秒間) ⇒修復	15.9±4.3
	Group 6 リン酸 ADゲル トライエス	K-etchant (30 秒間処理) ⇒水洗・乾燥 ⇒AD Gel (90 秒間処理) ⇒水洗・乾燥 ⇒Tri-S bond + Porcelain bond activator (5 秒間処理) ⇒エアブロー ⇒光照射 (10 秒間) ⇒修復	14.0±7.9
Air turbine	Control Group メガボンド	K-etchant (5 秒間処理) ⇒水洗・乾燥 ⇒Mega bond Primer + Porcelain bond activator (5 秒間処理) ⇒エアブ ロー ⇒Mega bond Bond ⇒光照射 (10 秒間) ⇒修復	15.8±4.7

Clearfil Mega bond (Kuraray), Clearfil Tri-S bond (Kuraray), Porcelain bond activator (Kuraray)

K-etchant (37%リン酸水溶液, Kuraray), AD Gel (10%NaClO Gel, Kuraray)

光照射器 (Candelux, Morita, Japan) ボンディング: 800mW/cm² (10 秒) ⇒600mW/cm² (30 秒)

炭酸ガスレーザーの照射条件が歯根面の耐酸性に及ぼす影響

¹ 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第2講座

² 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

○新海航一¹、平 賢久²、鈴木雅也¹、加藤千景¹、加藤喜郎¹

Effect of CO₂ laser irradiation conditions on inhibition of root surface demineralization

¹Department of Operative Dentistry, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

²Advanced Operative Dentistry・Endodontics, Graduate School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

○SHINKAI Koichi¹, TAIRA Yoshihisa², SUZUKI Masaya¹, KATO Chikage¹, KATOY Yoshiroh¹

【目的】

露出歯根面の臨界 pH は高く、根面齲蝕の罹患率が高い一因と考えられる。炭酸ガスレーザー装置を用いた歯質へのレーザー照射はエナメル質あるいは象牙質の脱灰を抑制することが報告されているが、セメント質を有する歯根面に対しての脱灰抑制効果に関する詳細はほとんど知られていないのが現状である。フッ化物塗布、炭酸ガスレーザー照射あるいは両者の併用はエナメル質と同様に根面歯質に対しても耐酸性を向上させるものと期待される。今回は炭酸ガスレーザーの照射条件が歯根面の耐酸性に及ぼす影響についてヒト抜去歯を用いて検討した。

【材料と方法】

グレースー型スケーラーを用いて歯根全体のルートプレーニングを行った後、セメントエナメル境から約 2mm 根尖寄りの位置で頬舌方向に切断したヒト抜去小臼歯の歯根を実験に供した（20 歯）。近心あるいは遠心の歯根面に長方形のマスキングテープ（3×2mm）を切断面から約 2mm の位置に貼付し、歯根全体に Protect Varnish[®]（Kuraray Medical）を塗布、乾燥させてからさらにネイルバーニッシュを塗布した。乾燥後、テープを除去し、炭酸ガスレーザー装置（Opelaser 03SIISP, Yoshida）を用いて各照射条件にて長方形窓内にレーザー照射（ビーム径：1.0mm、デフォーカス）を行った。なお、照射面に対して均一な照射エネルギーが得られるようにムービングステージを用いて試料を移動させながら照射した（移動速度：1mm/sec）。また、レーザーを照射しないコントロールを含め、照射条件により 4 実験群（下表参照）を設定した。pH サイクリングは、pH4.7 に調整した脱灰溶液（0.05M 酢酸、2.2mM CaCl₂、2.2mM KH₂PO₄）と pH7.0 に調整した再石灰化溶液（0.02M HEPES、3.0mM CaCl₂、1.8mM KH₂PO₄）を用いて行い、「脱灰 18 時間⇒水洗 5 分間⇒再石灰化 6 時間⇒水洗 5 分間」のサイクルを 2 回繰り返した。pH サイクリング終了後、自動精密切断機（Isomet[®], Buehler）にて試料を約 230μm の厚さで歯軸に対して垂直に切断して薄切切片を作製した。さらに砥石法にて #2000 まで研磨し、最終的に約 100μm の厚さに調整した。1 歯から 3 枚の薄切切片を作製し、各実験群につき 15 枚の切片を得た（n=15）。偏光顕微鏡（Eclipse LV100POL, Nikon）を用いて脱灰層を観察（×200）しながら DS カメラコントロールユニット（DS-L2, Nikon）でデジタル情報を取得し、偏光画像上で脱灰深さ（μm）を測定した。一元配置分散分析と Bonferroni post hoc test により実験群間の脱灰深さに関する統計学的有意差を検定した（p<0.05）。

【結果ならびに考察】

各実験群におけるレーザー照射条件と脱灰深さの測定結果（平均値 ± 標準偏差）を下表に示す。

実験群	レーザー照射条件						脱灰深さ (μm)
	発振 モード	パルス モード	照射時間 (msec)	休止時間 (msec)	照射出力 (W)	エネルギー密度 (J/cm ²)	
1	連続	リピート	5	10	0.5	17	41.0 ± 3.4
2			10			25	42.3 ± 2.9
3			50			41	38.4 ± 10.8
コントロール	照射なし						45.9 ± 2.7

統計分析の結果、実験群 3 とコントロールの間に有意差が認められた（p=0.007）が、その他の実験群間には有意差は認められなかった（p>0.05）。すなわち、今回設定した照射条件では、脱灰抑制効果は歯根面が受けるエネルギー密度が高い場合（41J/cm²）に認められたが、エネルギー密度が低い場合（17, 25J/cm²）には認められなかった。しかし、実験群 3 では照射面に薄い炭化が認められ、さらにデータのばらつきも大きかったことから、今後、照射条件を変えてさらに検討していく予定である。

本研究の一部は、平成 22 年度日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究（A）：No.21249091）の助成を受けて行われた。

新たな根管内照射用レーザーマニピュレーターの開発

明海大学歯学部 機能保存回復学講座 歯内療法学分野

○高橋哲哉, 小谷依子, 呉 崇史, 中村幸生

Development of New Laser Manipulator for Intracanal Irradiation

Division of Endodontics, Department of Restorative and Biomaterials Sciences,
Meikai University School of Dentistry

○TAKAHASHI Tetsuya, KOTANI Yoriko, KURE Takashi and NAKAMURA Yukio

【目的】 感染象牙質は必ずしも根管内全周に存在しているとは限らない。しかし、リーマー・ファイルを使用した根管形成では、同心円状に根管象牙質が削除されることになるため、僅かに存在する感染象牙質を削除するために、その周囲の健全象牙質をすべて同心円状に削除してしまうことになる(図1)。レーザーは、健全象牙質より感染象牙質に吸収されやすい性格を有している。そこで根管内の健全象牙質には影響を与えずに、感染象牙質のみが選択的に削除されるようにレーザーを使用することが可能であるならば、画期的な根管形成を行うことができると考えられる。そこで今回、根管内でレーザーが歯軸に対して側方かつ広域に効率よく照射できるレーザーマニピュレーターを開発し、コンピュータを使用したシミュレーションを行った。

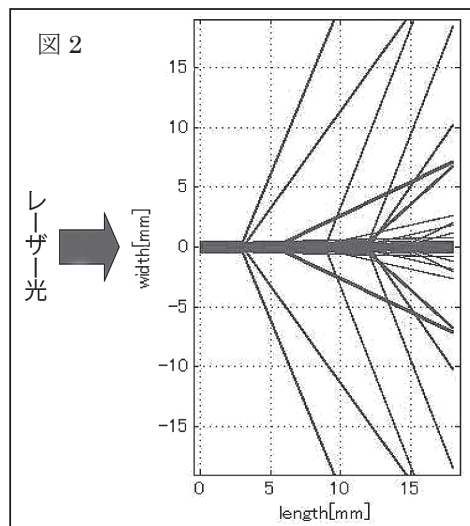
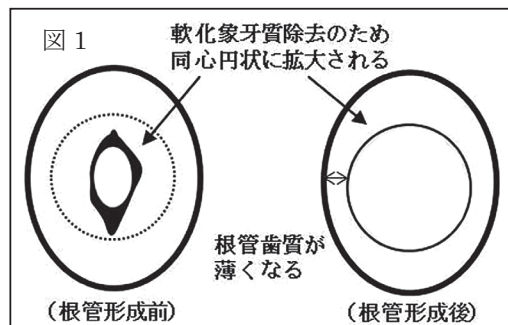
【材料および方法】 レーザーを側方かつ広域に照射するために、長さ3mmの円筒ガラスレンズ6個を直列に配置したプロトタイプのレーザーマニピュレーターを設計した。そして、コンピュータを使用して、入射したレーザーの光線軌跡シミュレーションを行った。シミュレーションでは、He-Ne レーザーを想定して光線の波長を633nmとし、1000本の平行光線を入射した。

【結果】 光線軌跡シミュレーションの結果、入射したレーザーが円筒ガラスレンズによって屈折・反射して、様々な角度を有して前側方かつ広域に放射した(図2)。すなわち、レーザーはおもに円筒ガラスレンズの接続部から前側方へ放射し、光源から遠方のレンズへ行くに従って複雑な放射の様式を呈した。

【考察】 光線軌跡シミュレーションの結果より、今回設計したレーザーマニピュレーターは、理論的に歯軸に対して側方かつ広域に照射できることがわかった。この結果は、このレーザーマニピュレーターが根管壁に効率よく照射可能であることを示していると考えられる。レーザーは直進性があり、根管壁に効果的な照射を行うことは難しい。根管内で照射可能なレーザーのTipは商品化されているものもあるが、そのほとんどはレーザーの広がり角を用いて根管に照射しているに過ぎない。今回、我々が開発したレーザーマニピュレーターは、側方に効率よく照射される結果を示した。このことは、根管内における感染象牙質に限られた選択的な削除を行う可能性があり、画期的な根管形成につながる可能性を有していると思われる。

【結論】 今回設計したレーザーマニピュレーターは、側方かつ広域に照射できる可能性があることが明らかとなった。今後は、このレーザーマニピュレーターを試作して、放射するレーザーの強度分布を測定するとともに、根管内における選択的な感染象牙質の除去に関する詳細な検討を行う必要がある。

なお、本研究におけるレーザーマニピュレーターの設計に関して、電気通信大学知能機械工学科 青山研究室 青山尚之教授、平田慎之介助教の助言を賜りましたことを、深く感謝申し上げます。



ビリルビン着色歯の漂白に関する研究

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¹、
東北大学大学院歯学研究科 口腔機能形態学講座 口腔器官構造学分野²、国立成育医療センター³
小林 洋子¹、笹崎 弘己¹、小松 正志¹、金田一 孝二²、金田一 純子³

Study on Bleaching for Bilirubin Pigmentation of Human Teeth

¹Division of Operative Dentistry, Department of Restorative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry, ²Division of Oral and Craniofacial Anatomy, Tohoku University Graduate School of Dentistry, ³National Center for Child Health and Development
KOBAYASHI Yoko¹, SASAZAKI Hiromi¹, KOMATSU Masashi¹ KINDAICHI Koji² and KINDAICHI Junko³

【研究目的】

新生児期に高ビリルビン血症をきたすと、乳歯にビリルビンが沈着し、緑色の着色を生じることがある。今回、我々は、交換期のため抜去されたビリルビン着色乳切歯について、その着色帯を顕微鏡観察するとともに、オフィスホワイトニング材による漂白効果について検討したので報告する。

【材料および方法】

新生児期に黄疸のみられた 6 歳男児の上顎左右乳中切歯を抜去後、PBS に保管し、外観を観察した。その後、右側乳中切歯は、オフィスホワイトニング材である松風ハイライト（松風）を、エナメル質表面からメーカー指示通りに作用させ、色調の変化を観察した。左側乳中切歯は樹脂包埋したのち、ゼーグミクロトーム（ライカ P1600）にて 100 μ m 厚の非脱灰切片を作製し、蛍光顕微鏡（キヤエンズ BZ-9000）にて観察した。さらに、同切片に松風ハイライトを作用させ、色調の変化を観察した。

【成績】

今回観察した乳中切歯は、一部にレジン充填が施されていたが、それ以外の部位は歯冠歯頸側のほぼ半分が緑色を呈していた。切片を顕微鏡観察すると、数本の緑色の着色帯が象牙質内に成長線に沿って観察され、その間隔は約 60 μ m であった。エナメル質に着色帯は観察されなかった。蛍光顕微鏡で観察すると、GFP あるいは TRITC のフィルタで蛍光を発したが、DAPI のフィルタでは発しなかった。

エナメル質表面から松風ハイライトを作用させても色調の変化はほとんどみられなかった。一方、切片に作用させると、緑色は消失傾向にあった。

【考察】

ビリルビン着色歯における着色帯が、象牙質のみに観察され、エナメル質はみられなかったことは、これまでのヒトでの報告ならびにビリルビン着色歯モデルラットでの報告と一致していた。同歯に対してホワイトニング材は、切片で着色帯が露出した状態では効果がみられたが、エナメル質表面からではほとんど効果が見られなかったことから、ビリルビン着色歯の漂白は困難であることが示唆された。

【結論】

1. ビリルビン着色歯の緑色の着色帯は象牙質の成長線に沿って観察され、エナメル質にはみられなかった。
2. ビリルビン着色歯の漂白は、切片上で直接作用させれば効果があつたが、エナメル質表面からは困難なものであつた。

アナターゼ型二酸化チタンの光触媒作用の解析 (第 4 報)

松本歯科大学 歯科保存学第 2 講座

○佐藤 将洋 河瀬 雄治 内山 真紀子 安西 正明 山本 昭夫 笠原 悦男

Analysis of Photocatalytic Effect of Anatase-Titanium dioxide (TiO₂)

Department of Endodontics and Operative Dentistry, Matsumoto Dental University

○Masahiro Sato Yuji Kawase Makiko Uchiyama Masaaki Anzai Akio Yamamoto Etsuo Kasahara

【目的】

アナターゼ型二酸化チタン (TiO₂) は、光を照射することにより触媒作用を示す、光触媒作用 (photocatalysis) を有する。紫外線によって $\cdot\text{OH}$ 、 O_2^- 、 HO_2^- 、 H_2O_2 などのフリーラジカルを放出し、その強力な酸化力によって有機質を溶解する性質がある。

我々は、アナターゼ型二酸化チタンの光触媒作用の解析について第 130 回、第 131 回、第 132 回の本学会にて報告してきた。アナターゼ型二酸化チタンは、作用を発揮する面積に比例して光触媒作用が大きくなること、より紫外線領域の波長の光を照射することで光触媒作用が強くなること、さらに光を再照射すると再び光触媒作用を発揮することが明らかとなった。

本研究は、これまでの研究結果より非常に光触媒作用の強い ST-01 を歯科領域で応用して行くための基礎的データ収集を目的として齲蝕病原性菌である *Streptococcus mutans* (S. mutans) に対する作用を検討した。

【材料および方法】

二酸化チタンは、石原産業 (株) の ST-01 (粒子径 7nm) を使用した。

1. 電子顕微鏡：二酸化チタン ST-01 の粒子形状を見るために日立 H-7600 を用いた。
2. X 線回折：ST-01 がアナターゼ型二酸化チタンであることを確認するために SJEOL X-RAY DIFFRACTOMETER SYSTEM を用いて行った。
3. S. mutans に対する作用の解析：ST-01 の S. mutans に対する作用を比濁法にて検討した。ST-01 (5mg, 10mg) を 1.5ml セミマイクロキュベットに採取し、1ml の DW 混和後、S. mutans (2OD 100ml) を混入し、パラフィルムでシールした。1 時間 37℃インキュベーターに安置 (遮光) 後、トランスイルミネーター TOYOBO transilluminator model TSL-20 を使用し、365nm, 10,000 microwatts / cm² の紫外線を 20 秒間照射し、退色変化を NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer を用いて検討した。

【結果および考察】

1. 電子顕微鏡：ST-01 は、直径約 7nm であり約 20nm の 2 次粒子を形成している。
 2. X 線回折：ST-01 は、アナターゼ型二酸化チタンである。
 3. S. mutans に対する作用の解析：Control と比較し、ST-01 は吸光度を低下させた。
- 本結果より ST-01 は、齲蝕予防、齲蝕処置など歯科領域への応用の可能性が示唆された。

【結論】

アナターゼ型二酸化チタンである ST-01 は、光触媒作用による S. mutans に対する殺菌作用を有する。

審美性歯面コート材（ビューティコート）の臨床評価

医療法人社団 中川歯科医院¹ 医療法人 井殿歯科医院²

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯冠修復学³

○吉田幸司¹, 作誠太郎^{1,3}, 中川豪晴^{1,3}, 井殿泰造², 伊藤知佐³, 堀田正人³

Clinical evaluation of esthetic coating materials

Nakagawa Dental Clinic¹ Idono Dental Clinic²

Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Sciences and Rehabilitation.

Asahi University, School of Dentistry³

○Yoshida Koji, Saku Seitaro, Nakagawa Takeharu, Idono Taizo, Ito Chisa, Hotta Masato

【緒言】

近年、患者からの歯の審美的要求が強くなってきており、特に歯の色の改善に対する処置が求められている。中でも、審美性歯面コート材は短期間であるが、即日に審美要求を満たすことのできる材料であり、臨床では有用な方法と考えられる。なかでも、ビューティコートは酸反応性フッ素含有ガラスフィラー（S-PRG フィラー）が配合され、材料表面での抗ブラーク性が期待される。本発表では臨床で使用したビューティコートの予後について報告する。

【症例概要】

本発表では短期間の審美回復を主訴に来院した3名の患者に審美性歯面コート材であるビューティコートを応用した。口腔内写真に関しては患者に十分な説明を行い、同意を得たのちに撮影した。

（症例1）27歳、男性、前歯部の審美障害を主訴にして来院。アングルの分類はⅢ級であり、前歯部（上顎側切歯から側切歯まで）は逆被蓋を呈していた。また、患者は喫煙者であり、刺激物を好んで食べるとのことであったため、処置期間中はなるべく控えてもらうよう指導した。ビューティコート処置6日後に上顎左右中切歯の切端に剥離が認められたため、破断部をホワイトポイントで研削し、新鮮面を露出させ、メーカーの指示に従い修理した。しかしながら、修理4日後に上顎左右側中切歯および右側側中切歯切端に再度剥離が見られた。また、コート材表面にはたばこによると考えられるステインが認められた。

（症例2）30歳、女性、前歯部の審美障害にて来院。アングルの分類はⅡ級2類であり、患者は非喫煙者であった。歯面コート材を業者の指示通りに塗布したのち、2、4、8、12、16週間目に観察した。その結果、剥離は12週間目までは認められず、良好な色調を呈しており、患者の満足度は高かった。しかしながら、16週目には歯面コート材の一部に剥離が認められた。

（症例3）21歳、女性、前歯部の審美障害にて来院。アングルの分類はⅡ級2類であり、患者は非喫煙者であった。2、4、8、12、16週間目に観察した。その結果は良好であった。すなわち、16週までは剥離が認められなかった。

【考察およびまとめ】

今回の症例発表から、不正咬合（切端咬合や反対咬合）以外の患者の審美回復にビューティコートを用いることにより、満足した審美回復が得られ、さらに抗ブラーク性を有していることから臨床での有用性が示唆される。

歯面処理材及び歯面コート材による漂白エナメル質再着色への影響

昭和大学歯科病院・歯内治療科¹⁾・昭和大学歯学部・保存修復学講座²⁾
○亀田 歩¹⁾、増田 宜子¹⁾、大塚 玲美¹⁾、山田 嘉重¹⁾、東光 照夫²⁾、玉岡 慶鐘²⁾、久光 久²⁾

Effects of tooth coating materials and finishing agents on re-coloration of bleached enamel surface by KTP laser.

○Ayumi Kameda¹⁾, Yoshiko Masuda¹⁾, Reimi Otsuka¹⁾, Yoshishige Yamada¹⁾,
Keishou Tamaoka²⁾, Teruo Toko²⁾, Hisashi Hisamitsu²⁾.

(目的) KTP レーザーと 27%過酸化水素を用いて抜去歯を漂白した後、3 種の歯面処理材および歯面コート材の有無が、漂白エナメル質表面にどのような影響を与えるかを形態学的に検討し、Renamel・コート材を用いたものが、フッ素のみのものに比べ SEM 像において表面が滑沢であり凹凸が少ないという報告を第 129 回日本歯科保存学会にて行った。今回我々は、3 種の歯面処理材および歯面コート材によって漂白エナメル質表面の再着色性にどのような影響を与えるのかを検討することとした。

(材料及び方法) 被検歯：昭和大学歯学部歯内療法学教室に保存してあった抜去歯 18 本を用いた。各歯をカーバイトバーを用いて 2 分割にした。

抜去歯を超音波スケーラーで清掃した後、歯科用彩色計シェードアイ (NCC 松風) にて色調を測定した。コントロール群を除いた 15 本の抜去歯を、27%過酸化水素水と KTP レーザー (1 歯あたり 30 秒間 1 W の出力で照射) にて唇面を漂白し再度シェードアイ NCC にて色調を測定した。KTP レーザーにて漂白後歯面処理材にてエナメル質表面を処理した。使用した歯面処理材は、フッ素ジェル (Smartbleach kit)、HA 歯磨剤 (Renamel R、サンギ)、歯面コート材 (ホワイトコート、クラレメディカル) であり以下のように 7 群に用いた。

A 群：フッ素、B 群：フッ素と歯面コート材、C 群：フッ素と Renamel、D 群：フッ素、Renamel と歯面コート材、E 群：Renamel、F 群：Renamel と歯面コート材、G 群：コントロール (漂白のみ)

歯面処理材にて処理した後、7 日間 37℃、100%RD 環境下で人工唾液サリペートに浸漬した後、歯面コート材を除去した。色素液に 7 日間浸漬し水洗した後、シェードアイ NCC にて色調を測定した。

得られた測定値の統計学的検定は Mann-Whitney U-test を用いて行い、危険率 5% で判定した。

(結果) それぞれの群の色差 ΔE は、A 群 5.0、B 群 6.3、C 群 5.1、D 群 4.2、E 群 9.4、F 群 5.5、G 群 5.5、であった。D 群のフッ素、Renamel と歯面コート材にて処理したものが最も色差は少なかった。

(考察及び結論) 漂白後の問題点として、色の再着色が挙げられる。この問題点を軽減するために、表面処理剤として漂白後にフッ素、レナメル、コート材の使用が有効であると考えられるが、統計学的に有意差は認められなかった。原因としては色調測定の際、測定部位は歯冠部の切端寄り 1/3 としたため色調が安定しなかったと推測される。歯頸部寄り 1/3 にて測定し比較検討する予定である。

歯面コーティング材の歯ブラシ摩耗について

昭和大学歯学部 歯科保存学講座
○京泉秀明、山田純嗣、鈴木敏光、久光 久

Toothbrush abrasion of tooth coating materials

Department of Clinical Cariology, Showa University School of Dentistry
○KYOIZUMI Hideaki, YAMADA Junji, SUZUKI Toshimitsu and HISAMITSU Hisashi

【緒言】

近年、歯に対する審美的な要求や要望が高まっている。歯を白くする方法としての漂白は、時間や手間がかかり、補綴物に対しては効果がない。それに対して、歯面コーティング材はその日のうちに歯を白くすることが可能である。しかし、口腔内では材料に多くの負荷がかかる。その一つに歯ブラシ摩耗がある。我々は、今までコンポジットレジンやフロアブルレジン、さらにその上に塗布する表面滑沢硬化材の歯ブラシ摩耗について検討を行ってきた。その結果、材料間には大きな差が認められることを報告した。そこで、今回は歯面コーティング材の歯ブラシ摩耗について検討を行った。

【材料および方法】

歯ブラシ摩耗試験材料として歯面コーティング材であるホワイトコート・ベースコート（クラレメディカル、シェード OB0、以下 W0）、ホワイトコート・トップコート（以下 WT）、ビューティコート・ホワイトベース（松風、シェード BW3、以下 BB）、ビューティコート・ホワイトオパール（シェード W0、以下 BW）を使用した。

それぞれの材料をモールドに填塞した後、光照射器 キュアマスター（ヨシダ）を使用して上下面よりそれぞれ 60 秒間光照射し、3×3×12mm の試料を作製した。試料は相対湿度 100%、温度 37℃の恒温槽中に 1 時間放置した後、37℃の蒸留水中に 23 時間保管し、摩耗試験直前にシリコンカーバイトペーパーで最終的に #1500 まで研磨を行った。

摩耗試験には歯ブラシ摩耗試験機（東京技研）を使用した。歯ブラシはプロスペックスリム（ジーシー）を使用した。摩耗試験は毎分 60 回で、歯ブラシにかける垂直荷重は 500gf とした。研磨剤は、炭酸カルシウム飽和水溶液を使用した。繰り返し回数 2,500、5,000、10,000、20,000、30,000 回で試料を摩耗試験機より取り出し、表面粗さ輪郭形状測定機（SURFCOM 480A、東京精密）にて摩耗面の形状および表面粗さ（Ra）を計測した。記録紙上で摩耗面の最大深さを計測し、歯ブラシ摩耗深さとした。摩耗試験再開時には研磨剤は新しいものと交換した。試料数は各群 7 個とした。

各材料について、歯ブラシ摩耗深さの比較には一元配置分散分析を使用して行い、多重比較検定には Tukey-Kramer を使用した。有意水準は 5%とした。

【結果および考察】

歯ブラシ摩耗深さは、すべての材料で繰り返し回数が増えるにしたがい直線的に増加した。30,000 回において摩耗深さが最も大きかったのが BB で、以下 BW、W0、WT の順に摩耗深さは小さくなり、材料間にはそれぞれ有意差が認められた。WT は 30,000 回においても摩耗深さはごくわずかであった。

表面粗さは、繰り返し回数による差はほとんど認められなかったが、材料間で差が認められた。10000 回以降では、W0、WT に比較し、BB、BW で表面粗さが大きくなった。

ホワイトコートを使用する際には、ベースコートである W0 を塗布し光照射を行った後に WT を塗布する仕様となっている。今回の試験結果から、WT は W0 の歯ブラシ摩耗を保護する働きがあることがわかった。

天然歯の平均的な色の上での光重合型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
小澤有美 奥岡 徹 富田佳代子 石原祥世 片山 直

Color of Light-cured Composite Resins on Color of Natural tooth
Division of Operative Dentistry Department of Restorative and Biomaterials Sciences
Meikai University School of Dentistry
Ozawa Yumi Okuoka Tooru Tomita Kayoko Ishihara Sachiyo Katayama Tadashi

【目的】 コンポジットレジン修復は、MIに基づく齲蝕治療、また Tooth wear などの実質欠損に対する修復において歯面に対する接着システムの発展にともない臨床の場においてなくてはならない歯科材料のひとつとなっている。コンポジットレジンで歯冠修復を行うとき、天然歯と調和するように修復しなければならないが、半透明性のこの材料で歯冠修復を行う際、象牙質の色や着色歯質また変色歯など背景の色の影響を受けて修復することになる。これまで、光重合型コンポジットレジンの色に関する研究は、色と透明性、厚さによる色変化、積層による色変化、無彩色背景の影響、裏装材の影響など多数報告されてきている。これらの研究は、コンポジットレジンの色が多くの因子によって変化することが報告されてきた。今回、より天然歯と調和したコンポジットレジン修復が行うことができるよう、天然歯の平均的な色を参考にして、背景の有彩色がコンポジットレジンの色にどのような影響を与えるのか基礎的実験を行ったので報告する。

【材料・方法】 1, 材料 光重合型コンポジットレジン Filtek™ Supreme Ultra (UI)と Filtek™ Supreme XT (XT)(共に 3M ESPE, USA)にて試料を作製した。使用したシェードは共通のエナメルシェード **E**: A2、ボディーシェード **B**、デンティンシェード **D**: A2、A3、A4 の 7 種類である。試料は、内径 8mm のプラスチックリングに填入し、ハロゲンランプ重合器 (Astral) にて両面から 20 秒ずつ光重合を行い、耐水研磨紙 (BUEHLER) #600 で即日研磨し、24 時間後 #800、#1200 の順に 1.0mm の厚さになるように研磨を行い各試料 5 個ずつ作製した。背景色板 白色板、黒色板、グレー色票 (L*値 70)、淡黄色票 (L*値 85.13、a*値 2.94、b*値 19.79) を測色する時に背景とした。2, 方法 各試料をそれぞれの背景色板上に置き、非接触分光測色器 Spectra Scan PR650 (Photo Research, USA) にて D65 光源、照度 1000lx、45 度照明—0 度受光の条件下で各試料を 5 回ずつ測色した。測色したデータ CIELAB 値から Translucency parameter (TP 値)、グレー色票上での L*値とグレー色票と淡黄色票上での C*値を算出し比較検討を行った。

【結果および考察】 各コンポジットレジンの ①透明性を調べるために TP 値、天然歯の平均的な L*ab 値を参考に、グレー色票の L*値と淡黄色票の a*値と b*値を決め②グレー色票上での明度 L*値、③グレー色票上と淡黄色票上での彩度 C*ab 値を求めた。①TP 値は、17.33~29.52 でどちらのレジンの E>B>D の順に高い値を示した。XT は、B、D 共に A3 と A4 に有意差を認めなかった。②グレー色票上の L*値は、63.10~73.80 で D>B で高い値を示した。A4 は共に著しく低い値を示した。UI の B、D の A3 は有意差を認めなかった。③グレー色票上の C*ab 値は、14.32~30.54 で淡黄色票上の C*ab 値は 25.41~38.19 であった。XT-A3-B と XT-A3-D、UI-A3-B と XT-A3-D、UI-A3-B と XT-A3-B はグレー色票上で有意差を認めたが、淡黄色票上では有意差を認めなかった。これまでの多くの研究報告ではオパークシェードはボディーシェードより透明性が低く、明度と彩度が高いと報告されてきており、今回の研究においても同じことが認められた。また、第 130 回大会で、グレー色票 L*値 70 上ではオパークシェードを用いなくても高い明度が得られると報告した。しかし、今回の結果からは、L*値に関してボディーシェードでもシェード番号によって大きな差を認めた。また、透明性が関係していると思われるが、グレー色票上の D の C*値より淡黄色票上の B の C*値の方が高くなることが示された。

【結論】 背景の有彩色がコンポジットレジンにどのような影響を与えるのか検討をおこなったところ、**E>B>D の順に TP 値は高い。グレー色票、淡黄色票上共に D の方 C*ab 値は高いが、グレー色票上の D の C*値より淡黄色票上の B の C*値の方が高くなる。**色差が同じ場合、明度に比べて彩度の方が偏色方向は小さいが、コンポジットレジンの色について評価する場合、有彩色上において評価する必要があることが示された。

各種研磨システムによるコンポジットレジン表面光沢度

¹ 日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座、² ハーバード大学歯学部 - フォーサイス研究所

○秋山沙絵子¹, 小川信太郎¹, 柵木寿男¹, 貴美島 哲¹, 奈良陽一郎^{1,2}, I.L.Dogon², 勝海一郎¹

Surface gloss of resin composites polished with various polishing systems

¹ Dept. of Endodontics and Operative Dentistry, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

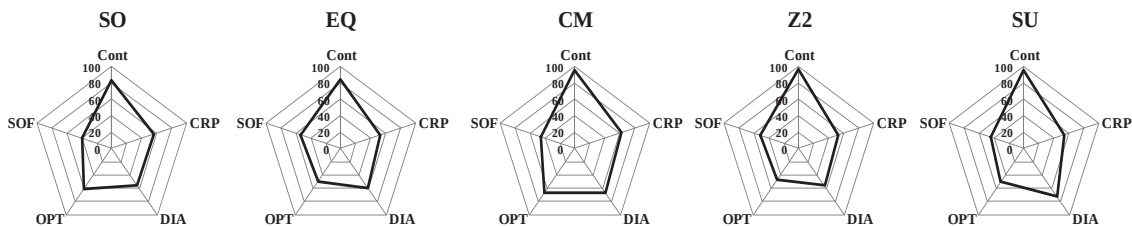
² Harvard School of Dental Medicine - The Forsyth Institute

○AKIYAMA Saeko¹, OGAWA Shintaro¹, MASEKI Toshio¹, KIMISHIMA Tetsu¹, NARA Yoichiro^{1,2},
DOGON I.L.², KATSUUMI Ichiroh¹

【研究目的】 コンポジットレジン修復は、自然感溢れる代表的な審美修復法として広く日常臨床に用いられている。修復過程における仕上げ研磨は、最終的なステップであると同時に審美性を向上させている。しかし、その良否によっては着色やブランク付着などを惹起し、患者の満足度を含めた臨床的予後に影響を及ぼす重要な因子と考えられる。そこで本研究では、各種研磨材によるコンポジットレジンの仕上げ研磨後の表面光沢度に着目し、評価検討を加えた。

【材料および方法】 材料には5種コンポジットレジン、すなわちMFR型であるSolare (SO: GC)、SFR型であるEstelite Σ Quick (EQ: Tokuyama Dental)、セミハイブリッド型であるClearfil Majesty (CM: Kuraray Medical)とFiltek Z250 (Z2: 3M ESPE)、ナノフィラー型であるFiltek Supreme Ultra (SU: 3M ESPE)のシェードA3をそれぞれ使用した。一方、研磨システムにはCR Polisher PS (CRP: 松風)、プレシャイン+ダイヤモンド(DIA: GC)、ダイヤモンドポリッシャー+オプティチャイン(OPT: Kerr)、Soflex XT (SOF: 3M ESPE)の4種を用いた。まず、内径15mm×高さ5mmの円筒モールド内にコンポジットレジンを填入し、透明ポリエチレンシートを介したスライドガラスによって圧接後、光照射を行い硬化試料とした。試料は37℃水中に24時間保管後、回転数5,000rpm、研磨荷重100gfの条件下で研磨システムの製造者指定に基づいた各ステップ60秒間ずつの研磨を行った。表面光沢度の測定は、光沢計 Gloss Checker IG-331(Horiba)を用いた測定角60°によって、試料圧接面(Cont)および研磨面の測定(n=6)を行った。なお、測定は各試料表面中央部の3か所に対し実施し、その平均値を当該試料の光沢度とした。得られた測定値は、コンポジットレジンと研磨システムの違いを主因子とするTwo-way ANOVAとTukey's q-testによる水準間多重比較を行った。

【成績および考察】 下図に、測定から得られた各コンポジットレジンの表面光沢度を示す。得られた光沢度は96.1～40.3の値を示し、統計学的分析の結果、コンポジットレジンの違いと研磨システムの違いは光沢度に対し有意な影響を与え(p<0.01)、さらに交互作用効果、すなわちコンポジットレジンの違いが光沢度に及ぼす影響は研磨システムによって異なること(p<0.01)が確認できた。コンポジットレジンにおいては、CM>SU≥Z2≥EQ≥SOの順で光沢度が高く、CMは他の4種に対し(p<0.01)、SUはEQ/SOに対し(p<0.05/0.01)有意に高い光沢度を示していたが、Z2とSU・EQ・SO間に有意差は認められなかった。レジンの違いに基づく光沢度の差異は、研磨面のみならず平坦滑沢な圧接面においても認められたことから、光沢度はMFR型・SFR型・セミハイブリッド型・ナノフィラー型などのフィラーによる分類によって決定されるのではなく、レジン自体の色調や透明性、さらには配合フィラーの製造方法・材質・形状・充填率・粒度分布などが複合的に影響しているものと考えられる。一方、研磨システムにおいては、Cont>DIA>CRP≥OPT>SOFの順で光沢度が高く、Contは他の4種に対し、DIAはCRP・OPT・SOFに対し、CRPとOPTはSOFに対し有意(p<0.01)に高い光沢度を示していたが、CRPとOPT間に有意差は認められなかった。今回用いた研磨システムにおいては、DIAとCRPに配合されているダイヤモンド砥粒が有効であったと推測できるが、すべてのシステムによる研磨面は圧接面に匹敵する光沢度が得られなかったことから、砥粒の大きさ・形状・材質などについて更なる検討が必要であると考えられる。さらに、コンポジットレジンと研磨システムとの間に交互作用効果が認められたことから、研磨によって簡便に光沢が得られる修復材や、汎用性の高い効果的な研磨システム開発の可能性が示唆され、臨床的な期待が持たれる。



Effect of Polished Procedures on Gloss Value of Each Resin Composite

S-PRG フィラー含有コーティング材直下の象牙質脱灰抑制能

神奈川歯科大学口腔治療学講座保存修復学分野¹⁾、
湘南短期大学歯科衛生学科²⁾

○椎谷 亨¹⁾、向井義晴¹⁾、岡田周策¹⁾、坂本英里¹⁾、室野井麻紘¹⁾、飯塚純子¹⁾、富山 潔¹⁾、
藤野富久江²⁾、寺中敏夫¹⁾

Anti-demineralization effect of a S-PRG filler coating material on underlying dentin *in vitro*

Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College¹⁾,
Department of Dental Hygiene, Shonan Junior College²⁾

○SHIYA Toru¹⁾、MUKAI Yoshiharu¹⁾、OKADA Shusaku¹⁾、SAKAMOTO Eri¹⁾、MURONOI Mayu¹⁾、IIZUKA Junko¹⁾、TOMIYAMA Kiyoshi¹⁾、
FUJINO Fukue²⁾、TERANAKA Toshio¹⁾

【研究目的】

露出歯根面はその解剖学的形態からプラークが停滞し易く、効果的な脱灰抑制法を開発することは急務である。これまで我々は、S-PRG フィラーを含有したワンステップの歯面コーティング材が塗布面周囲の象牙質脱灰を効果的に抑制することを報告した。一方、本材は良好なプラークコントロールがなされるようになった場合には、歯ブラシにより経時的に摩耗、消失することも考慮に入れ開発されているが、その場合においても象牙質酸抵抗性が維持されているか否かは不明である。そこで今回、コーティング材が摩耗、消失した象牙質の酸抵抗性を transversal microradiography (TMR) とミネラル分析ソフトを使用し検討した。

【材料および方法】

ウシ下顎中切歯の歯根部を歯頸部直下およびそれより 5mm 根尖側の位置で水平断し円筒状象牙質歯片を作製後、歯軸方向に 2 分割し、それぞれを新規材料群 (S 群) および S-PRG 非含有群 (N 群) 試料とした。各材料を平坦にした象牙質試料中央部に専用ブラシにて塗布し、10 秒間光照射を行った後、湿度 100%、37℃の湿箱内に保存した。1 週間経過後、コーティング材表面を、4000 番の耐水研磨紙を用いて、材料が確認できない段階まで研削した。その後コート材塗布部位に相当する象牙質面に 1mm×2mm の試験面を残して耐酸性バーニッシュを塗布した。また、材料を使用せず象牙質の脱灰を行う (C 群) を設定し、同様に試験面を作製した。脱灰ゲル (50mM 酢酸、8% methylcellulose、pH5.0) に 1 週間浸漬し表層下脱灰病巣を作製後、各象牙質試料から厚さ 300 μ m の薄片を切り出し、TMR 撮影 (PW3830、管電圧 25kV、管電流 15mA、照射時間 20 分) を行い、分析用ソフトを用いて、①C 群、②N 群、③S 群、各々の平均ミネラルプロファイルを作成、平均ミネラル喪失量 (IML) を算出した。群間における IML は、One-way ANOVA および Tukey の検定により有意水準 5%にて統計分析を行った。TMR 撮影終了後の薄片試料は Ca、Sr および F の分布を EPMA で観察した。

【結果】

平均ミネラルプロファイルを比較すると、S 群では象牙質表面から約 20 μ m の幅でミネラル濃度約 16 %の明瞭な表層が観察された。一方、C 群と N 群の平均ミネラルプロファイルは類似しており、ミネラル濃度約 4 %の低い表層を伴っていた。各群の平均 IML (vol%× μ m) は、C 群 : 8319.7±686.9、N 群 : 8701.1±843.0、S 群 : 7145.7±411.2 であり、N 群と S 群の間に有意差が認められた。また、S 群における EPMA 観察では、脱灰病巣表層に Ca が観察され、F が取り込まれている傾向も認められた。一方、Sr は観察されなかった。

【考察】

EPMA において Sr が観察されなかったという結果は、研削によりコーティング材が完全に除去されていることを意味していると思われ、TMR の結果と合わせると、材料に含まれる S-PRG フィラーから徐放されたフッ化物が象牙質中に侵入し、材料研削後も効果的に脱灰を抑制したものと考えられた。口腔内でこのコーティング材を応用した場合、歯ブラシ等による経時的な摩耗、消失の可能性は想像できるが、本結果は、コーティング材が消失した後も、露出象牙質は耐酸性を維持し、齲蝕の発生を抑制する可能性を示唆するものと考えられた。

GIOMER 修復材料のイオン徐放性

鶴見大学歯学部歯科保存学第一講座
○宮内貴弘, 秋本尚武, 桃井保子

Ion release property of Gioner restorative materials

Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine
○MIYAUCHI Takahiro, AKOMITO Naotake, MOMOI Yasuko

【研究目的】

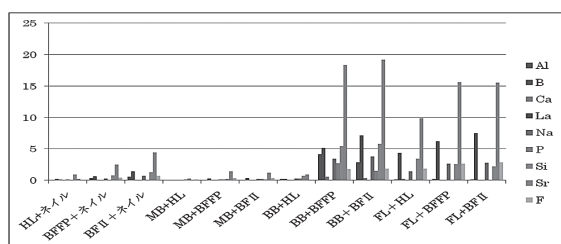
コンポジットレジンやレジン接着材料に生物学的機能 (バイオアクティブ), すなわちフッ素徐放性や抗菌効果などを付加した製品が開発され, 臨床応用されている. 2000 年, 従来のガラスアイオノマーセメント技術から発展した PRG (Pre-Reacted Glass-ionomer) 技術による, S-PRG (Surface Reaction Type Pre-Reacted Glass-ionomer) フィラーと呼ばれる新素材が松風により開発された. 現在, この S-PRG フィラーを含有した製品は GIOMER として数多くの修復材料が市販され臨床で注目されている. 今回, GIOMER 修復材料からの歯質への各種イオンの取り込みの可能性を知るために, モデル化 1 級修復物を各種 GIOMER 修復材料にて調製し, その修復物から徐放される各種イオンの定性と定量をフッ素イオン電極法および ICP 発光分析法から評価を行った.

【材料および方法】

本実験では, レジン接着材として, FL-BOND II (Shofu, 以後 FL II), BeautiBond (Shofu, 以後 BB), CLEAFIL MEGA BOND (Kuraray Medical, 以後 MB) を用い, コンポジットレジンとして, BEAUTIFIL II (Shofu, 以後 BF II), BEAUTIFIL Flow Plus F00 (Shofu, 以後 BFFP), Herculite XRV (sds Kerr, 以後 HL) を用い, レジン接着材とコンポジットレジンの全ての組み合わせで試験を行った. メラミン歯 (上顎第一大臼歯, ニッシン) の咬頭をマイクロカッター (MC-201, マルトー) にて切断し平坦にした. ダイヤモンドポイントを用いて, 咬合面に直径 3 mm, 深さ 3 mm の半球状窩洞を形成し窩洞内面をシリコンポイントで研磨した. さらにメラミン歯を近遠心方向にマイクロカッターで 2 分割し, モデル化 1 級修復物作製用モールドとした. 各種レジン接着材をメーカー指示に従い, コンポジットレジンで充填した. 40 秒間光照射 (Optilux 501, sds Kerr) 後, モールドからレジン硬化体を取り出し, レジン硬化体天面をネイルヴァーニッシュで被覆した. また, ネイルヴァーニッシュ部からのイオンの流出の有無を確認するため, 各コンポジットレジン硬化体全面をネイルヴァーニッシュにて被覆した試料も作製した. 作製したレジン硬化体は, 高速クロマトグラフ用蒸留水 (和光純薬) 1 mL に対して 1 個浸漬した. 浸漬期間は, 1 週間および 1 か月間とした. 各浸漬期間終了後, 蒸留水中からレジン硬化体を取り出し, 各蒸留水 1 mL に対して 0.01 mL の濃硝酸 (60 wt% 含有, ナカライテスク) を添加し, ICP (Inductively Coupled Plasma) 測定液とした. それぞれの元素の標準液を用いて各濃度の検量線作製用測定液を調製し測定を行った. 測定には, ICP 発光分析装置 (ICPS-8000, 島津製作所) を用いた. また, フッ素イオン電極 (Model 9609BN, Orion Research) および pH/イオンメーター (Model 720A, Orion Research) を用いて F 徐放量の測定を行った. なお F 測定時には, すべての測定液 1 mL に対して 0.1 mL のイオン強度調整材 (TISABIII, Orion Research) を添加した.

【結果および考察】

1 週間浸漬後の結果をグラフに示す. S-PRG フィラー含有材料の組み合わせである FL II + BF II および FL II + BFFP からは, F を初めとして Sr などのイオンの徐放が確認された. また S-PRG フィラーを含まない接着材である BB を用いた BB + BF II, BB + BFFP からも様々なイオンの徐放が確認されたことから, S-PRG フィラー含有のコンポジットレジンから徐放された各種イオンが BB の層を通過し, 歯質へと取り込まれる可能性が示唆された.



オフィスブリーチング剤を使用したエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化戦略

神奈川歯科大学 口腔治療学講座保存修復学分野
○飯塚純子, 向井義晴, 寺中敏夫

Remineralization strategy for enamel subsurface lesions using in-office bleaching agent
Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College
○IIZUKA Junko, MUKAI Yoshiharu, TERANAKA Toshio

【研究目的】 これまでエナメル質表層下脱灰病巣を形成する表層はイオンのみ通過可能な層であると考えられており、従来の再石灰化療方は口腔清掃の施行とフッ化物の使用および唾液中の無機イオンに依存して行われている。しかしながら、表層にはサブミクロンレベルの孔や裂溝が存在し、病巣体部に侵入した蛋白質等の有機物が着色の原因となるのみならず再石灰化の進行を妨げている可能性も報告されている。そこで本研究では、*in vitro* で作製したエナメル質表層下脱灰病巣に有機質を浸透させ、オフィスブリーチング剤を作用させることによる有機質分解ならびに再石灰化誘導への有用性を Transversal Microradiography (TMR) にて評価した。

【材料および方法】 ウシ下顎中切歯よりエナメル質片を切り出し、3×4 mmの平坦な面を作製した。その後、1500 番の耐水研磨紙で研磨を行った。耐酸性パーニッシュにて試験面を2×3 mmに規定し、以下に示す4群に分けた。表層下脱灰病巣群 (Lesion 群) : エナメル質片を脱灰ゲル (0.1M 乳酸, 8% methylcellulose, pH 4.6) に37℃で10日間浸漬し表層下脱灰病巣を作製した。表層下脱灰病巣→再石灰化群 (Rem 群) : 同様にエナメル質片に表層下脱灰病巣を作製した後、再石灰化溶液 (1.5mM CaCl₂, 0.9mM KH₂PO₄, 130mM KCl, 20mM Hepes, pH7.0) に37℃で14日間浸漬した。表層下脱灰病巣→casein 浸漬→再石灰化群 (Casein 群) : エナメル質片に表層下脱灰病巣を作製した後、蛋白質の侵入した脱灰病巣を模倣する目的でカゼイン溶液 (200ppm casein) に14日間浸漬し、その後再石灰化溶液に14日間浸漬した。表層下脱灰病巣→カゼイン溶液浸漬→漂白→再石灰化群 (HiLite 群) : エナメル質片に表層下脱灰病巣を作製し、カゼイン溶液に14日間浸漬した後、蛋白質を分解する目的でオフィスブリーチング剤である松風 HiLite を3回適用し、その後再石灰化溶液に14日間浸漬した。各処理後、エナメル質片から厚さ 150μm の薄片を切り出し、TMR 撮影 (PW3830, 管電圧 25kV, 管電流 15mA, 照射時間 20 分) を行い、分析用ソフト (Inspektor) を用いてミネラルプロファイルを作製、ミネラル喪失量、表層および病巣体部のミネラル濃度を測定した。統計分析は、one-way ANOVA ならびに Duncan の検定を用い有意水準 5%にて行った。

【結果】 本脱灰システムを用いることにより、表層 55%および病巣体部 35%のミネラル密度を有する典型的な表層下脱灰病巣が作製された (Lesion 群)。再石灰化溶液に14日間浸漬した Rem 群は病巣体部のミネラル濃度が顕著に上昇し明瞭な再石灰化が誘導されていた。一方、カゼイン溶液に浸漬した表層下脱灰病巣 (Casein 群) では病巣体部ミネラル上昇が抑制されたプロファイルを示した。カゼイン溶液浸漬後、HiLite 処理を行った群 (HiLite 群) は、Rem 群には及ばないものの Casein 群に比較してミネラル濃度の上昇したプロファイルが確認された。ミネラル喪失量の比較では Rem 群、HiLite 群および Casein 群間で有意差はないものの、HiLite 処理により再石灰化が助長される傾向が確認された。病巣体部のミネラル濃度の比較では、HiLite 群は Casein 群に比較し有意に高い値となった。

【考察】 Casein 群に比較し HiLite 群で病巣体部のミネラル濃度が有意に高い値となったこと、および HiLite 処理により再石灰化が助長される傾向が確認された結果は、カゼインが病巣体部にまで浸透し再石灰化抑制に働いたと同時に HiLite がその分解に関与していると考えられ、その結果速やかな再石灰化が誘導される可能性があることを示している。これまでも次亜塩素酸ナトリウム溶液を用いて有機質を分解し再石灰化を助長するという報告は存在したが、本方法はオフィスブリーチング剤を使用しているため、より安全に且つブラウンスポット等の着色エナメル質面に適用した場合には審美性の回復も兼ねた再石灰化誘導手段となるものと考えられた。

【結論】 エナメル質表層下脱灰病巣に侵入している有機質を分解し、効果的な再石灰化を誘導するための手段の1つとして、オフィスブリーチング剤である HiLite が有効活用できることが示唆された。

In vitro バイオフィルムモデルのバイオフィルム形成能と含嗽剤の殺菌効果

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
○若松里佳、竹中彰治、大墨竜也、福田敬、富田文仁、興地隆史

The property of biofilm formation using a continuous flow culture system and the resistance against a mouthrinse

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○ Rika WAKAMATSU, Shoji TAKENAKA, Tatsuya OHSUMI,
○ Takashi FUKUDA, Fumihito TOMITA, Takashi OKIJI

【目的】 *in vitro* バイオフィルムモデルを用いた各種抗菌成分への抵抗性評価には、一定流量の培地を灌流し流動性を付与しながらバイオフィルムを形成させるフローセル培養系がしばしば用いられる。*in vitro* バイオフィルムモデルは三次元構造を破壊することなく解析が行える反面、*in vivo* バイオフィルムと比較して未成熟なバイオフィルムとなる欠点がある。本研究では、フローセル培養系によるバイオフィルム形成能および含嗽剤への抵抗性について、Rotating Disc Reactor (以下 RDR, BioSurface Technologies 社) を用いて比較検討した。

【材料及び方法】 直径 6 mm、厚さ 1.5 mm のハイドロキシアパタイトディスク (HA ディスク, オリンパスバイオマテリアル社製) を無刺激唾液に 2 時間浸漬したのち、*Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Actinomyces naeslundii* を均量混合した懸濁液 ($A_{600} = 0.05$) 中に浸漬し 75 rpm の速度で回転させながら 37℃ にて 90 分間好気培養することによりディスク表面に細菌を付着させた。90 分後、RDR を用いて 50 rpm の速度で回転させながら毎分 4.6 ml の速度で 0.5% スクロース含有 BHI broth を灌流し 1 日もしくは 3 日間好気培養した。

培養終了後、PBS 中で 50 rpm にて 5 分間回転させながら洗浄し、PBS (コントロール: C 群) もしくはリステリン (J&J; L 群) に 30 秒間浸漬後 Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kit (Invitrogen 社) を用いて 15 分間蛍光染色した。その後、共焦点レーザー顕微鏡 (FV300, オリンパス) を用いて 0.46 μ m ごとに XY 断層像を採取し、細菌密度および生菌率を算出した (Ex 488/514, Em 510-530/610LP)。

【結果】 バイオフィルムの細菌密度は 1 日、3 日培養ともに HA 表面にもっとも細菌が多く、また、3 日培養では 1 日培養に比べ単一平面あたりに占める細菌数が少なくなる一方、バイオフィルムの厚みは約 2 倍に増加した。L 群による HA ディスク表面の細菌に対する殺菌効果は 1 日培養ではすべての細菌が死菌と判定されたのに対し、3 日培養ではおよそ半数が生菌であった。3 日培養により抵抗性は亢進したが、バイオフィルム各断面における殺菌率は同程度であり、浸透性に差はないように思われた。

【結論】 *in vitro* バイオフィルムモデルは 3 日培養においてもその成熟度は低いことが示唆された。

齲蝕原因菌に対するオゾンの抗菌効果

日本大学松戸歯学部 う蝕抑制審美治療学講座¹⁾、昭和大学歯科補綴学教室²⁾、(株)グイェムシー³⁾
○鈴木英明¹⁾、並木泰次¹⁾、熱田 互¹⁾、三田 肇¹⁾、芝 燁彦²⁾、鈴木 満²⁾、塩田剛太郎³⁾、池見宅司¹⁾

Antibacterial effects of Ozone against cariogenic bacteria

Department of Dental Caries Control and Aesthetic Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo¹⁾,
Department of Prosthodontics, Showa University School of Dentistry²⁾, VMC Co.Ltd³⁾
○ SUZUKI Hideaki¹⁾, NAMIKI Yasuji¹⁾, ATSUTA Wataru¹⁾, MITA Hajime¹⁾,
SHIBA Akihiko²⁾, SUZUKI Mitsuru²⁾, SHIOTA Gotaro³⁾ and IKEMI Takuji¹⁾

【研究目的】

オゾンから放出された酸素原子は、周囲のあらゆる物質と酸化反応を起こし、有害な細菌があれば、その細胞膜を酸化することで、細胞膜を破壊し、細菌そのものを死滅させることができることが知られている。また、これらの殺菌作用に加えて、オゾンに付帯するとされる組織賦活作用などから、歯科医療においても、殺菌、消炎、止血への効果が着目され、オゾン水を用いた義歯の洗浄・消毒や歯周ポケット、根管治療時の洗浄液としての可能性などが検討され、更なる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、医療分野で頻用されているオゾンに着目した。ヒールオゾンに関する歯科治療に関する研究は数多くなされているにもかかわらず、齲蝕予防に関する研究はほとんど行われていない。そこで、本研究は、試作のオゾンジェルを用い、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。試作オゾンはオゾンジェル (グイェムシー社製) 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。

【成績】

オゾンジェルを用いた最小発育阻止濃度の結果は、*S. mutans*、*S. sobrinus* に対して 300 µg/ml、*A. viscosus* に対しては 100 µg/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。

【考察および結論】

本実験の結果、試作のオゾンジェルは *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、齲蝕抑制物質として有用であることが示唆された。

抗菌性表面処理剤の歯科への応用 —リン酸エステル基含有第4級アンモニウム抗菌剤の合成と改質効果—

¹⁾神奈川歯科大学口腔治療学講座保存修復学分野, ²⁾神奈川歯科大学総合歯科学講座,
³⁾東京理科大学工学部工業化学科, ⁴⁾神奈川歯科大学生体材料器械学講座
○三宅 香¹⁾, 二瓶智太郎¹⁾, 大橋 桂¹⁾, 森 梨江¹⁾,
山口真一郎²⁾, 近藤行成³⁾, 倉田茂昭⁴⁾, 好野則夫³⁾, 寺中敏夫¹⁾

Application of surface modifier having antibacterial potency in dentistry —Synthesis and modification effect of quaternary ammonium salts of alkyl phosphate antibacterial agent—

¹⁾Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Medicine,
²⁾Department of Comprehensive Dentistry, ⁴⁾Department of Biomaterials and Devices, Kanagawa Dental College,
and ³⁾ Department of Industrial Chemistry, Tokyo University of Science
○MIYAKE Kaori¹⁾, NIHEI Tomotaro¹⁾, OHASHI Katsura¹⁾, MORI Rie¹⁾, YAMAGUCHI Shinichiro²⁾,
KONDO Yukishige³⁾, KURATA Shigeaki⁴⁾, YOSHINO Norio³⁾ and TERANAKA Toshio¹⁾

【研究目的】

我々は歯質表面の表面自由エネルギーを低下させ、かつ耐酸性を付与することができる歯面改質剤を開発し、プラークの付着、形成ならびに歯質の脱灰を抑制して、齲蝕および歯周疾患を予防することを目的として研究を進めてきた。そこで本研究では、抗菌効果を期待した quaternary ammonium iodide salt of 3-(*N*-allyl-*N*-dodecyl-*N*-methyl)propyl phenylhydrophosphate (以下、PPh-12-QAI)を開発し、エナメル質の主成分であるハイドロキシアパタイト粉末 (HAP powder) に対する吸着性を検討した。

【材料および方法】

1. 新規表面処理剤の合成

合成は *N*-メチルジアリルアミン (MDAA) を出発原料とし、9-BBN (ボラビシクロ[3.3.1]ノナン) を用いたモノヒドロホウ素化により MDAAOH を合成後、ジフェニルホスホロクロリダートによるリン酸エステル化、アルカリ分解後、1-ヨードドデカンと反応させ、目的物である PPh-12-QAI を合成し、同定は ¹H-NMR (DPX 400 型 NMR 装置, Bruker), FT-IR (AVATAR360FT-IR Spectrometer, Nicolet), ならびに質量分析装置 (JMS-SX 102A, 日本電子) により行った。

2. HAP powder に対する吸着性

HAP powder 50 mg を採取し、エタノールで 1.0, 3.0, 5.0 および 7.0 mmol/l に調製した PPh-12-QAI 溶液をそれぞれ 1.0 ml 加え、振盪器で 10 分間反応後、上澄 100 μl をマイクロチューブに採取し、1,300 rpm で 1 分間遠沈した。さらに上澄を遠沈用フィルターに採取し、再度 1,300 rpm で 1 分間遠心分離を行った後、HAP powder に吸着せずに濾液に残った PPh-12-QAI を Wakosil-II 5C18RS カラム (和光純薬) を装着した高速液体クロマトグラフィー (HPLC; LC-10AD, 島津製作所) により定量した。

【結果および考察】

1. 化合物の同定

合成した化合物 PPh-12-QAI は ¹H-NMR スペクトルでは、ピークの積分比が目的生成物の各スペクトルと一致し、FT-IR および 質量分析においても生成物が目的化合物であることを裏付ける結果が得られた。

2. HAP powder に対する吸着

HAP powder に対する PPh-12-QAI の吸着量は、改質開始 10 分後で 1.0mmol では 0.04 μmol, 3.0mmol では 0.05 μmol, 5.0mmol では 0.01 μmol, そして 7.0mmol では 0.06 μmol となり、濃度ごとに吸着量が異なることが示されたが、5.0mmol 以上では吸着量も不安定となり飽和状態を生じたと考えられた。

以上の結果より、今回新規に合成、開発した PPh-12-QAI は、HAP powder 表面に対して吸着することが示され、エナメル質の改質効果も期待できることが示唆された。

口腔バイオフィルムに対する界面活性剤とエリスリトールの併用効果

花王株式会社 ヒューマンヘルスケア研究センター パーソナルヘルスケア研究所
○高橋典敬、加藤和彦、矢納義高

Combined efficacy of surfactants and erythritol on oral biofilm *in vitro*.

Kao Corporation Personal Health Care
○Noritaka Takahashi, Kazuhiko Kato, Yoshitaka Yano

【研究目的】

歯垢や舌苔などの口腔バイオフィルムは、う蝕、歯周炎、口臭などの口腔トラブルの原因の一つである。これらの予防には、日常的なブラッシング等によってバイオフィルムを物理的に除去することが効果的である。しかしながら、ブラッシングには、器具の送達性や術者のテクニックの違い等の問題があり、完全にバイオフィルムを除去することは困難である。そこで、ブラッシングによる物理的除去を補助するために、歯磨剤などに配合された成分の化学的作用が期待される。これまでに我々は、糖アルコールの一種であるエリスリトールが、口腔バイオフィルムを分散しやすくすることを報告した (1)。そこで本検討では、エリスリトールと界面活性剤による、口腔バイオフィルムの分散作用を *in vitro* バイオフィルムモデルを用いて評価した。

【材料及び方法】

○ バイオフィルムモデル作成方法: *S. mutans* ATCC 25175 株、*S. gordonii* ATCC 10558 株、*A. viscosus* ATCC 43146 株を、それぞれ 0.5 % Yeast Extract 添加 Trypticase Soy Broth (TSB-YE) にて、嫌気培養した。その後、これら 3 菌種を、1.0 % Glucose 及び 2.0 % Sucrose 添加 TSB-YE にて、ベリクルコーティングを施した glass base dish 上で嫌気培養することで、バイオフィルムを形成させた。

○ バイオフィルム分散試験方法: glass base dish 上に形成させたバイオフィルムに対して、各種薬剤 (界面活性剤、及びエリスリトールの併用) を、超音波振動下で 30 s 作用させた。薬剤未処理のバイオフィルム量 (A) と、薬剤処理後に dish 上に残存したバイオフィルム量 (B) を、フェノール硫酸法で測定し、 $(A-B)/A$ をバイオフィルム分散率 (%) として算出した。

【結果】

各種界面活性剤のバイオフィルム分散作用を評価した結果、アニオン性界面活性剤に分散作用が確認され、特に N-ミリスチル-L-グルタミン酸ナトリウムの作用が高かった。また、この界面活性剤とエリスリトールを併用させた場合、その分散作用が促進される傾向が確認された。

【考察】

本検討により、アニオン性界面活性剤が口腔バイオフィルムの分散を高める作用を有する可能性が示唆された。口腔バイオフィルムは、構成菌体によって産生された多糖に覆われており、表面はマイナスに帯電していることが知られている。本検討結果は、界面活性剤の荷電や分子量、バイオフィルムとの親和性などの特性が影響したものと推察される。一方、エリスリトールの口腔バイオフィルムの分散作用は、細菌間の共凝集や細菌-ベリクル間の付着に作用することにあると推察してきた。界面活性剤とエリスリトールの併用においては、これら両方の作用によって、口腔バイオフィルムの分散が促進されたと考えられる。

【結論】

口腔バイオフィルムを効果的に除去するには、ブラッシングによる物理的除去に加え、アニオン性界面活性剤とエリスリトールの化学的作用を併用することが効果的である。

【参考文献】

- (1) *J. Oral Biosci.* 48(4):209, 2006

クロルヘキシジン含有歯科メチルメタクリレートセメントの長期性抗菌作用

○平石典子¹、田上順次^{1,2}

(¹東京医科歯科大学大学院う蝕制御学分野、²歯と骨の GCOE)

Chlorhexidine release and antibacterial properties of chlorhexidine-incorporated polymethyl methacrylate based resin cement

○HIRAISHI Noriko¹, TAGAMI Junji^{1,2}

(¹Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ²Global Center of Excellence Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases)

概要

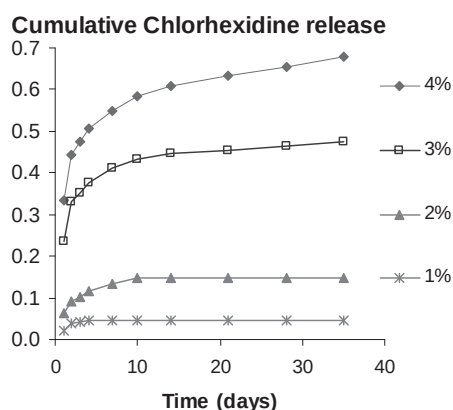
医薬用殺菌薬のクロルヘキシジンは、口腔粘膜への非侵襲的修復治療に一般に用いられるが、これをガラスアイオノマーセメントに混合した抗菌活性を有する歯科材料の臨床への応用が試みられている。さらにこのクロルヘキシジンは歯質接着性の長期耐久性劣化を遅延する働きが報告されている。この耐久性劣化には、象牙質基質に存在する Matrix Metalloproteinases (MMP) の存在が指摘されており、クロルヘキシジンは MMP 阻害剤として、歯科修復への使用が注目されている。我々は、歯質により長期効果的な薬剤の放出を考え、歯科接着材料のレジンセメントそのものにクロルヘキシジンを付加する試みを行い、クロルヘキシジンの長期放出量、抗菌性を検討した。

方法

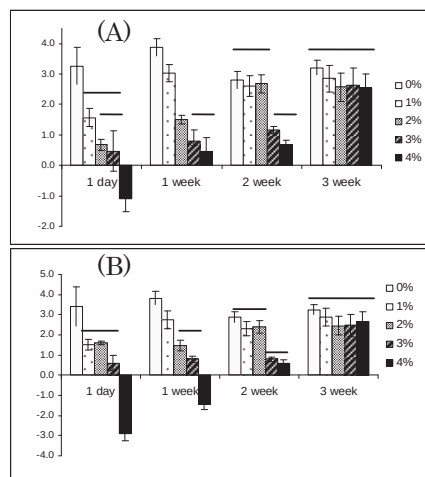
Super-Bond C&B Quick, (Sun Medical Co. Ltd.) のポリメチルメタクリレート (PMMA) 粉末に、クロルヘキシジンを 1.0 wt%, 2.0 wt%, 3.0 wt%, 4.0 wt% 含有させた資料を、常温重合開始剤、単官能モノマーにて重合させ、円盤状サンプル (12 ± 0.1 mm diameter, 0.7 ± 0.1 mm thicknesses) を作製した。硬化後サンプル片を 37 °C 蒸留水に保存し、5 週間クロルヘキシジンの放出を HPLC にて測定した。レジンセメントの抗菌性評価のため、重合開始直後は agar diffusion test を、硬化後は direct contact test を *Streptococcus mutans* と *Enterococcus faecalis* を用いて行った。

結果考察

3.0 % と 4.0 % 含有の PMMA レジンセメントは 5 週間クロルヘキシジンの放出が見られたが、1.0 % と 2.0 % 含有はそれぞれ 1 週間、2 週間のみに留まった。硬化後試料の抗菌性の検討は direct contact test にて測定が可能であり、有意な抗菌性は、3.0 % と 4.0 % 含有では 2 週間見られたが、低い含有度では長期抗菌性はなかった。長期抗菌性を PMMA レジンセメントに付加するためには、含有量は 3% また 4% 必要であることが分かった。クロルヘキシジン含有によって、セメントの接着性、機械的物性が劣化すると危惧されるので、今後検討が必要である。



(Fig.1) Cumulative release for 5 weeks (A) *Streptococcus mutans* and (B) *Enterococcus faecalis*



(Fig.2) Antibacterial effects of chlorhexidine-incorporated Super-Bond C & B against (A) *Streptococcus mutant* and (B) *Enterococcus faecalis*

軟化根管象牙質の再硬化に関する基礎的研究 (第3報) 根管内細菌に対するナノ化ハイドロキシアパタイトの影響

日本大学松戸歯学部 ¹再生歯科治療学講座、²歯科生体材料学講座、³感染・免疫学講座
⁴鶴見大学歯学部 歯科理工学講座
○菊地信之¹、平田亮太郎²、染井千佳子¹、牧村英樹¹、木村功¹、谷本安浩³、早川 徹⁴、長濱文雄¹、和田守康¹

Rehardening of softened root canal dentin - 3rd report- Effect of nano-scale hydroxyapatite on intracanal bacteria

Departments of ¹Renascent Dentistry, ²Microbiology and Immunology and ³Dental Biomaterials
Nihon University School of Dentistry at Matsudo
Department of ⁴Dental material
Tsurumi University School of Dental Medicine

○KIKUCHI Nobuyuki¹, HIRATA Ryotaro², SOMEI Chikako¹, MAKIMURA Hideki¹, KIMURA Koh¹,
TANIMOTO Yasuhiro³, HAYAKAWA Toru⁴, NAGAHAMA Fumio¹, WADA Moriyasu¹

【目的】

感染根管を処置する場合、軟化象牙質の完全除去が原則である。取り残しは疾患の原因の放置であるとともに、補綴物の保持低下につながる。逆に、完全除去による歯質の菲薄化は補綴物装着後、歯質の亀裂や破折を起こし、抜歯となる危険性がある。

第1報においては急速脱灰液(K-CX)による人工軟化象牙質は、ナノ化ハイドロキシアパタイト(HA)を作用させることで軟化根管象牙質深部まで浸透し、ほぼ intact の象牙質の硬さまで再硬化することが判明した。第2報では再硬化された人工軟化根管象牙質のコアレジンの接着性について検討し、intact 象牙質の約 60%まで接着強さの回復が認められたことを報告した。これらのことは、軟化根管象牙質の保存を示唆するものである。

感染根管象牙質には数種類の細菌が存在し、HAは細菌の種類に関わりなく付着するという報告がある。また、完全に細菌を封鎖すれば細菌が減少するという報告もある。そこで、第3報では、ナノ化 HA が細菌に付着することによって、再硬化された人工軟化根管象牙質が細菌によってどのような影響をおよぼすかについて検討した。

【材料および方法】

実験1: ナノ化 HA 応用による再硬化および硬さの測定

屠殺直後の牛歯歯根 70 本を抜去後、歯髄を除去して直ちに冷凍保存した。使用直前に流水下で解凍後、即時重合レジン(ユニファストII, GC)に包埋した。

まず#80 K 型ファイルを用いて根管象牙質の表面のファイリングを行った。生成したスメアー層を除去する目的で 15%EDTA を 5 分間、NaOCl を 1 分間で処理後、根管のみに塩酸系の急速脱灰液(K-CX、藤沢薬品工業、pH1.4~2.0)を 10 時間作用させ人口軟化象牙質を作成した。唾液を根管内にいれ、人工感染根管象牙質を作製した。試作のナノ化の HA 粒子(サンギ)と精製水(pH6.7~6.9)を 1:2 の割合で混和してペースト状にしたものを根管内に充填した。湿箱中に 1 日放置後、歯軸方向に切断し、ダイヤモンドペーストをつけたバフ(表面粗さ 6 μm、1 μm、0.25 μm)で滑沢に仕上げ超音波洗浄を行った。そして、微小硬度計(HMV-2000、島津製作所)で荷重 25g 荷重時間 15 秒の条件下で根管壁から歯根表面にむかって 100 μm 間隔でヌーブ硬さ(KHN)を測定した。測定部位は切断面の歯冠側 3 分の 1 のところに設定した。

実験2: 根管内表面の観察

切断試料を水洗および超音波で洗浄後、アルコール系列による脱水、酢酸イソアミル固定、臨界点乾燥(Critical Point Dryer、日立)を行った。次に 200 秒、20 ミリアンペアの条件下で白金蒸着(JFC-1600、JEOL)後、電界放射走査電子顕微鏡(Field-emission scanning electron microscopy: FE-SEM、JSM-6340F、JEOL)で観察した。

【結果および考察】

細菌の存在の有無にかかわらずナノ化HAの作用によって再硬化が認められた。

電子顕微鏡による観察では、ナノ化HAは根管内象牙質に侵入し、そして数多くのナノ化HA粒子が細菌表面に付着している像が認められた。

しかし、ナノ化HAの封鎖による抗菌作用については不明である。今後、さらにナノ化HAによる封鎖期間と細菌数について検討する必要がある。

Propidium monoazide (PMA)を用いた Real-time PCR 法による 根管内細菌の定量化の試み

九州歯科大学口腔機能科学専攻口腔治療学講座齲蝕歯髄疾患制御学分野¹

九州歯科大学口腔機能科学専攻医療人間形成学講座総合診療学分野²

○永吉雅人¹, 寺下正道², 北村知昭¹

Quantification of Bacteria Associated with Endodontic Infections using Propidium Monoazide (PMA)
with Real-time PCR *In vitro*

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

Division of Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental College²

【研究目的】

歯内治療において根管充填は、自覚的・他覚的症状の消失とともに、根管内無菌化が獲得されてから行うことが原則とされている。根管内無菌化の測定法として嫌気培養システムなどが挙げられるが、操作が煩雑であること、判定まで1〜2週間かかること、血液寒天培地の管理、保存にコストがかかる等の理由で一般的に行われているとはいえない。

今回我々は、迅速で精度の高い根管内細菌検出法の確立を目的として、PCR阻害作用があり、かつ細胞膜透過性のない蛍光染色剤 Propidium monoazide (PMA)を用いて染め分けた生菌と死菌を real-time PCR 法で分析して得られた Ct 値と、CFU count 法等の従来の生菌と死菌を判別する方法によって得られた値との相関について検討した。

【材料および方法】

難治性根尖性歯周炎の原因菌の1つとされている *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) 菌液に 70%エタノールを 20 分間作用させたものを死菌群とした。死菌と生菌を一定の割合に調整した菌液に対し、1)CFU count 法、2)生菌と死菌を染め分ける蛍光色素である Live/dead BacLight を用いて観察する方法、および 3) PMA を作用させた菌液を real-time PCR で分析する方法を用い、各測定法により得られた値の相関を比較検討した。次に、根管洗浄薬である 3%EDTA 溶液や 2.5%次亜塩素酸ナトリウム溶液作用後の菌液についても同様の方法で検討を行った。

【結果】

70%エタノールを *E. faecalis* に作用させ、死菌と生菌を一定の割合に調整した菌液を PMA 作用後に real-time PCR を行った。その結果、PMA は real-time PCR による検出過程にほぼ影響を与えることないこと、および本法では短時間で死菌と生菌を明確に区別できることが示された。また、real-time PCR より得られた Ct 値と CFU count 法で得られたコロニー数は高い相関を示していた。次に、次亜塩素酸ナトリウム溶液および EDTA 溶液を *E. faecalis* に作用させ、同様の実験を行った。その結果、Live/dead BacLight を用いた染色法では、次亜塩素酸ナトリウム溶液の *E. faecalis* に対する高い殺菌効果と EDTA 溶液の低い殺菌効果が短時間で示されたが、菌数定量化は困難であった。一方、PMA を用いた real-time PCR 法による分析では、各サンプルの Ct 値は明確な違いを示し、CFU count 法のコロニー数も高い相関を示した。

【考察】

以上の結果より、PMA は *E. faecalis* の死菌のみを染色してその PCR 法での増幅を阻害する一方、生菌の染色体 DNA の増幅にほぼ影響を与えることがないことが示され、PMA による染色と real-time PCR 法を併用することで、短時間で生菌のみの定量的検出が可能になることが示唆された。今後、*E. faecalis* 以外の歯髄疾患および根尖性歯周組織炎関連の病原菌について、解析を行っていく予定である。

【結論】

PMA 染色法と real-time PCR 法の併用法により、短時間で根管内細菌を定量化できる可能性がある。

FGF-2 徐放能を有する接着性レジンの開発 —レジンモノマー存在下での FGF-2 の作用発現の検討—

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)
○竹田かほる、今里 聡、騎馬和歌子、恵比須繁之

Development of adhesive resin with FGF-2 releasing property

- Effects of FGF-2 on osteoblastic cells in the presence of resin monomers -

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Kahoru TAKEDA, Satoshi IMAZATO, Wakako KIBA, Shigeyuki EBISU

【目的】

かつては抜歯適応とされてきた歯根破折や穿孔をきたした症例でも、最近では、接着性レジンを用いて封鎖または再建し、可能な限り保存を試みる頻度が増加している。しかしながら、周囲組織の十分な治癒が得られないなど、これらの保存的治療の成功率は必ずしも高いとは言えないのが現状である。そこでわれわれは、骨芽細胞や未分化間葉系細胞に対する親和性にとくにすぐれていることが判明した 4-META/MMA 系レジン (Imazato *et al.*, *J Biomed Mater Res* 2006, 2009; *Dent Mater J* 2010) を対象に、Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) 徐放能を付与し、組織再生誘導作用を備えた接着性レジンを開発するプロジェクトに着手した。本研究では、まず、骨芽細胞様細胞培養系で、4-META/MMA 系レジン主要構成モノマー存在下での FGF-2 の作用発現について検討した。

【材料及び方法】

マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞を、10% FBS 含有 α -MEM 培地を用いて 96 穴プレートに 2×10^4 cells/well の濃度で播種し、37°C, 5% CO₂ 下にて 12 時間培養後、以下の実験を行った。

- 1) FGF-2 添加濃度の決定：市販の二種の rhFGF-2 (Invitrogen; Calbiochem) またはトラフェルミン (フィブラストスプレー, 科研製薬) を 5, 10, 25, 50, 100 ng/mL で添加した培地に交換して 24 時間培養後、細胞の増殖を MTT assay にて評価した。また、100 μ g/mL ascorbic acid と 5 mM β -glycerol phosphate を添加した分化誘導培地に 5 ng/mL の各 FGF-2 を加えて 3 日間培養し、その後 FGF-2 非添加で 7 または 14 日間まで培養を行い、Alkaline Phosphatase (ALP) 活性の測定を行った。これらより、以後の実験における FGF-2 の添加濃度を確定した。
- 2) レジンモノマー存在下での FGF-2 の作用の検討：5~100 μ g/mL の 4-MET あるいは 5~50 μ g/mL の MMA を溶解させた培地に、実験 1) で決定された濃度の FGF-2 を加えて 24 時間培養し、細胞の増殖を MTT assay にて評価した。また、FGF-2 と各モノマーを添加した分化誘導培地に交換して 3 日間培養し、その後、FGF-2、モノマーとも非添加の条件で 7 または 14 日間まで培養を行い、ALP 活性を測定した。

【結果】

- 1) 3 種のいずれの FGF-2 でも、5~100 ng/mL のすべての濃度において、FGF-2 非添加の場合と比べて細胞増殖が有意に促進された (ANOVA, Fisher's PLSD test, $p < 0.05$) が、FGF-2 の濃度による効果の差はみられなかった。一方、ALP 活性については、5 ng/mL FGF-2 添加群では、培養 7 日目まで非添加群と比べて有意な低下が認められた。これらの結果より、本培養系における FGF-2 添加濃度を 5 ng/mL に確定した。
- 2) 4-MET、MMA とともに、すべての被験濃度において、モノマー非存在下の場合と同様に、FGF-2 添加群で細胞増殖の有意な促進 (ANOVA, Fisher's PLSD test, $p < 0.05$) が認められた。また、ALP 活性についても、いずれの濃度の 4-MET、MMA 存在下でも、培養 7 日目までは FGF-2 添加による低下が確認された。

【考察および結論】

4-MET または MMA の存在下でも、FGF-2 の培地への添加は MC3T3-E1 細胞の増殖を促進し、7 日目まで持続的に ALP 活性を抑制した。これらの結果は、4-META/MMA 系接着性レジンから未重合モノマーが溶出する環境においても、FGF-2 がその機能を発現できる可能性を示しており、FGF-2 徐放能を備えた接着性レジンが実現可能であることを示唆している。現在、FGF-2 の具体的な徐放デザインについて検討を加え、効果的に作用を発現できる新規レジンの試作を行っているところである。

低栄養条件下における熱刺激の象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響

¹福岡歯科大学口腔治療学講座歯科保存学分野, ²九州歯科大学齲蝕歯髓疾患制御学分野, ³総合診療学分野
○諸富孝彦¹, 西藤法子², 鷲尾絢子², 北村知昭², 寺下正道³, 阿南 壽¹

Effect of Heat Stress on Clonal Odontoblast-like Cells under Starvation Condition

¹Section of Operative Dentistry and Endodontology, Fukuoka Dental College.

²Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics,

³Division of Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental College.

○ MOROTOMI Takahiko¹, SAITOU Noriko², WASHIO Ayako², KITAMURA Chiaki²,
TERASHITA Masamichi³, and ANAN Hisashi¹.

【研究目的】 生活歯の形成時には、麻酔の奏功を確実にするために血管収縮薬の添加された局所麻酔薬が多く用いられるが、これは歯髄内の血流を一定時間著しく減少させることが報告されている。血流低下に伴う虚血状態は組織を低酸素状態および低栄養状態に陥らせる。以前我々は低酸素状態が歯髄細胞に細胞周期の停止を引き起こし、さらに apoptosis を誘導することを報告している。

過度の熱刺激は細胞に障害を与えることが知られているが、浸潤麻酔下の虚血状態における窩洞形成で生じる発熱は、障害を増大させると考えられるが、虚血と熱刺激の相互作用についての報告はこれまでにない。

本研究では局所麻酔による血流量低下を想定し、低栄養状態として低濃度のウシ胎仔血清 (FBS) 含有培養液中で歯髄由来細胞株に熱刺激を与え、その後の影響について検討した。

【材料と方法】 実験には象牙芽細胞様の特徴を有するラット下顎切歯歯髄由来細胞株 (KN-3 細胞) を用いた。KN-3 細胞を 9.0×10^3 cell/cm² の密度で培養 dish および 96 穴プレートに播種し、1% FBS 添加培地 (α -MEM) で 43°C、45 分間の熱刺激を加えた。熱刺激後、細胞数の変化を MTS assay により確認した。また、フローサイトメトリーにより細胞周期の変化を確認した。次に、RT-PCR 法により熱ショックタンパク (HSP) 25 と炎症マーカーの発現の変化を確認した。さらに p-ニトロフェニルリン酸基法により ALP 活性を、von Kossa 染色により石灰化能を確認した。対照群としては 1% FBS 添加培地における非熱刺激群、10% FBS 添加培地による非熱刺激群および熱刺激群を用いた。

【結果】 熱刺激後 12 時間の時点で KN-3 細胞は減少したが、その後増殖に転じた。このとき、増殖能は有意に 10% FBS 添加培地群の方が高かった。HSP25 の発現は熱刺激後 12 時間まで強く認められた。TUNEL 陽性細胞は、1% FBS 添加培地群では非熱刺激および熱刺激群ともに認められたが、10% FBS 添加群では熱刺激群のみに確認された。細胞周期を確認すると、1% FBS 添加培地群では熱刺激前より細胞周期停止傾向が確認された。熱刺激後に 10%および 1% FBS 添加培地群で細胞周期の停止とその後の死細胞の増加、さらに細胞周期の回復が確認されたが、1% FBS 添加培地群では細胞周期停止が強く、回復も遅れることが確認された。また、死細胞数も多かった。

炎症マーカーの発現は 1% FBS 添加培地群で発現が強く、消失も遅れた。熱刺激後の ALP 活性は、10% FBS 添加培地群では熱刺激による影響に有意差を認めなかったが、1% FBS 添加培地群では熱刺激による活性の低下が確認された。石灰化誘導培地に交換後 2 週および 4 週目では、10%および 1% FBS 添加培地群ともに熱刺激による影響は認められなかった。

【考察】 熱刺激後 KN-3 細胞は一過性に減少したが、低栄養条件下ではその後の増殖能が劣った。また、apoptosis 誘導や細胞周期停止、炎症応答も低栄養条件下の方が熱刺激による影響を大きく受けていた。さらに熱刺激後 1 週間までの ALP 活性も低栄養条件下でのみ有意に低下していた。以上から、熱刺激による象牙芽細胞様細胞への影響は、低栄養条件下では増強されることが示唆された。

【結論】 熱刺激による象牙芽細胞様細胞 (KN-3 細胞) への影響は低栄養条件下において増大する。

635 nm および 810 nm 半導体レーザー照射によるヒト歯髄培養細胞の 象牙芽細胞分化と dentinogenesis 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) 日本大学口腔科学研究所
松井 智^{1,2)}, 小峯千明¹⁾, 五味博之¹⁾, 山浦賀弘¹⁾, 松島 潔^{1,2)}

Stimulatory Effects of 635 or 810 nm Laser Irradiation on Odontoblast Differentiation and Dentinogenesis of Human Dental Pulp Cells

1) Department of Endodontics, 2) Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.
Satoshi Matsui^{1,2)}, Chiaki Komine¹⁾, Hiroyuki Gomi¹⁾, Yoshihiro Yamaura¹⁾, Kiyoshi Matsushima^{1,2)}

【目的】

現在、露髄が生じた歯髄に対して、水酸化カルシウム製剤や MTA などの覆髄材料を用いた直接覆髄法が広く行われている。しかし、歯髄組織の壊死層の形成や修復材料との非接着性などの課題も多く残されている。よって、覆髄材料を使用しない歯髄保存療法の確立は、歯髄象牙質複合体を回復させる手法の範囲を拡大させるものとして有用であると考えられる。演者らは、レーザー照射後のメカニカルフォースと dentinogenesis との関連について研究を続けている。これまでの研究において、ヒト歯髄培養細胞やラットの露髄面に 810 nm の半導体レーザー照射を行うことで、歯髄の硬組織形成が dentinogenesis を反映し、促進することを報告してきた。しかし、歯髄象牙質複合体の回復に最も適した半導体レーザーの波長は定まっておらず、レーザーを用いた歯髄保存療法を確立するためには、波長の違いによる細胞の応答や象牙質形成タンパク質に対する発現を確認する必要があると考える。今研究では、635 nm および 810 nm の半導体レーザー照射を行い、ヒト歯髄培養細胞における象牙芽細胞への分化と dentinogenesis への反映について検討を行った。

【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 22 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ヒト歯髄培養細胞として実験に用いた (承認番号 EC-025)。細胞播種後 24 時間後の細胞に対して 635 nm の試作型半導体レーザーおよび 810 nm の半導体レーザー (OSADA LIGHTSURGE-3000 長田電機工業株式会社製) を 635-nm/50 mW, 635-nm/100 mW, 810-nm/100 mW, 810-nm/1000 mW の条件で 10 分間照射を行った。また、レーザー照射を行っていない細胞をコントロール群とした。照射後、石灰化誘導培地にて培養を行った。

実験の評価方法として、24, 48, 72 時間後の細胞増殖試験、1, 3, 6 日目の mRNA の発現 (RT-PCR 法: HSP27, DSPP, BMP-2, ALP および OCN)、10, 20, 30 日目の ALP 染色、4, 8, 12, 16, 20 日目の ALP 活性、30 日目のアリザリン染色および von Kossa 染色にてレーザー照射後の dentinogenesis について解析を行った。

【結果及び考察】

48 時間後の細胞増殖試験において、コントロール群と比較し、635-nm/50 mW 群、810-nm/100 mW 群および 810-nm/1000 mW 群において有意な細胞増殖が認められた。mRNA 発現においては、810-nm/1000 mW 群においてレーザー照射後 1 日目の HSP27 および 3 日目の DSPP の発現増強が認められた。635-nm の照射を行った細胞群では、OCN の発現増強が認められた。ALP 染色では、コントロール群と比較し、810-nm/1000 mW 群で最も強い ALP 陽性反応が認められ、次いで 810-nm/100 mW 群、635 nm のレーザー照射を行った 2 群の順であった。ALP 活性では、全群で 16 日目をピークに上昇が認められ、16 日目の活性において、コントロール群とレーザー照射を行った全群との間に有意差が認められた。また、アリザリンレッド S 染色および von Kossa 染色においては、コントロール群と比較し、レーザー照射を行った全群において濃染が認められた。

以上の結果から、ヒト歯髄培養細胞に 635 nm および 810 nm のレーザー照射を行うことで、両波長のレーザーともに dentinogenesis を反映し、歯髄の石灰化物形成を促進させる効果が認められたが、635 nm では、硬組織の形成や成熟に関与するタンパク質の発現が促進され、810 nm では、象牙芽細胞の分化を促進することで歯髄の硬組織形成を促進させている可能性が示唆された。今後、Smads, Osterix および Nestin などの初期分化過程の挙動をターゲットに検索していく予定である。

この研究の一部は、平成 21-23 年度文部科学省科学研究費補助金若手研究 (B) (課題 No. 21791866 S. M.) および平成 20-22 年度日本学術振興会科学研究費基盤研究 (C) (課題 No. 20592239 K. M.) の一部を使用して行われた。

ヒト歯髄細胞におけるサイトカイン発現に対する Prostaglandin $F_{2\alpha}$ の影響

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

○中西 正、武川大輔、平尾功治、湯本浩通、高橋加奈子、松尾敬志

Effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on cytokine expression in cultured human dental pulp cells

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

○Tadashi NAKANISHI, Daisuke TAKEGAWA, Kouji HIRAO, Hiromichi YUMOTO,
Kanako TAKAHASHI and Takashi MATSUO

【研究目的】

プロスタグランディン(PG) $F_{2\alpha}$ は、脂質メディエーターの代表格である PG 類の一つであり、シクロオキシゲナーゼ (COX) の作用により産生された PGH_2 に PGF 合成酵素が働くことで産生され、全身の組織や臓器において多彩な生理活性作用を発揮する。歯髄においても、誘導型 COX である COX-2 や $PGF_{2\alpha}$ の発現・産生が炎症歯髄組織で亢進していることが報告されており (Nakanishi ら 2001, Cohen ら 1985, Miyauchi ら 1996)、歯髄炎の病態形成に深く関与することが示唆されている。一方、我々はこれまでに歯髄の自然免疫応答機構を解明するため、Toll-like receptor (TLR) に代表される自然免疫に関与するレセプター群 (Pattern Recognition Receptors ; PRRs) の培養歯髄細胞における発現ならびにその機能について解析を行い、その結果、TLR2 を介したシグナルが歯髄細胞において優位に作動していることを報告してきた (Hirao ら 2009)。しかしながら、TLR2 シグナルにより活性化された歯髄細胞に対し、 $PGF_{2\alpha}$ がどのような影響を及ぼすかについては明らかにされていない。

そこで、本研究では TLR2 リガンド刺激された歯髄細胞におけるサイトカイン発現に対し、 $PGF_{2\alpha}$ が与える影響について検討した。サイトカイン発現については、種々の細胞で $PGF_{2\alpha}$ による発現誘導性が確認されている vascular endothelial growth factor (VEGF) ならびに interleukin-6 (IL-6) に着目した。

【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、細切後 outgrowth した細胞を歯髄細胞とし、5~10 代継代したものを実験に供した。

2. サイトカイン発現に対する $PGF_{2\alpha}$ の影響の解析

歯髄細胞を 24 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、TLR2 リガンドである Pam3CSK4 (Invivogen) ならびに $PGF_{2\alpha}$ (Cayman Chemical) にて一定時間刺激し、培養上清中の VEGF, IL-6 濃度を ELISA kit (R&D systems) を用いて測定した。また、 $PGF_{2\alpha}$ 受容体 (FP receptor) の発現を検討するため、付着細胞からタンパクを回収し、特異抗体 (Santa Cruz) を用いた Western blot 法にてその発現を解析した。

【結果および考察】

Western blot 法により、歯髄細胞は FP receptor を無刺激時においても発現していることが確認された。歯髄細胞に $PGF_{2\alpha}$ を単独に作用させたところ、VEGF ならびに IL-6 の産生が僅かながら亢進した。TLR2 リガンド刺激により歯髄細胞からの産生が上昇した IL-6 に対し、 $PGF_{2\alpha}$ は相乗的にその産生を増強させた。また、TLR2 リガンド刺激時の VEGF 産生に対する $PGF_{2\alpha}$ の効果は相加的であった。これらの結果より、 $PGF_{2\alpha}$ は歯髄細胞の TLR2 を介した経路におけるサイトカイン産生を調節している可能性が示唆された。

【結論】

TLR2 リガンド刺激により歯髄細胞から産生された VEGF ならびに IL-6 を $PGF_{2\alpha}$ は増強させる。

大豆イソフラボンによるラット歯髄細胞の分化・石灰化誘導について

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系う蝕制御分野

○林 敬次郎、半田 慶介、小池 俊之、成田 憲亮

Mohammad Ali Akbor Polan、斎藤 隆史

Induction of rat dental pulp cells differentiation and calcification by soy isoflavone
Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
Keijiro Hayashi, Keisuke Handa, Toshiyuki Koike, Kensuke Narita
Mohammad Ali Akbor Polan, Takashi Saito

【緒言】

天然成分である大豆イソフラボンは、フラボノイドに分類され食品添加物やサプリメントとして摂取される健康食品であり、抗酸化作用、乳がんの抑制、腎機能の改善などの生理活性効果が期待されている。加えて、その構造はエストロゲンと類似しているためエストロゲン様作用を有し、骨組織で優位に発現するエストロゲンレセプターβ (ERβ) との高親和性から、組織特異性が高く骨粗鬆症の予防や改善に有効であるといわれている。また、大豆イソフラボンは安全性が高く、ビスホスホネート系骨粗鬆症治療薬で引き起こされる顎骨壊死等の副作用は報告されていない。現在多くのサイトカインが歯髄の石灰化に有効であり、直接覆髄材として臨床応用されているが、天然成分でかつ安全性が確認された石灰化誘導物質の報告は少ない。そこで今回、我々は大豆イソフラボンの骨芽細胞分化促進作用に着目し、大豆イソフラボンのひとつであるゲニステインがラット歯髄細胞の分化・石灰化に関係するかについて検討することとした。

【材料および方法】

1)細胞

12週齢雄ウィスターラットより両側下顎中切歯歯髄を採取し、collagenase A (Roche)を用いて段階的に酵素消化して細胞を採取した。得られたラット歯髄細胞(Rat Dental Pulp Cells, 以下, RDP)は、10% fetal bovine serum (以下, FBS, Invitrogen, USA)及び抗生剤 (Penicilin-Streptomycin Solution Hybri-Max™, Sigma) 抗真菌薬 (Amphotericin B, Sigma) を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium(以下, DMEM, Sigma)で24時間、37℃、5%CO₂存在下にて培養した。その後、抗生剤・抗真菌薬を含まない10%FBS 含有 DMEM で2日おきに培地交換を行い必要細胞数まで培養し以下の実験に供した。

2)形態観察および細胞増殖能の測定

12well プレートに RDP を 3×10⁴cells/well の濃度で播種し、10%FBS 含有 DMEM 培地で24時間、37℃、5%CO₂存在下で培養後、各種濃度のゲニステイン(Wako)を添加した。添加後、光学顕微鏡にて形態観察を行うとともに、液体培地に Alamar Blue(Biosource)を 10μl 添加し6時間、37℃、5%CO₂存在下にて培養。その後、プレートリーダー (BIO-RAD, iMark) にて比色測定を行った。

3)石灰化能の測定

24well プレートに RDP を 4×10⁴cells/well の濃度で播種し、10%FBS 含有 DMEM 培地で48時間、37℃、5%CO₂存在下で培養後、各種濃度のゲニステインを添加した。その後、①Total RNA を抽出し、RT-PCR 法によって象牙質形成関連遺伝子群(Type I collagen, Bone sialoprotein 等)の発現および ERβの発現の検討、②分化・石灰化誘導の指標として、プレートは10%ホルムアルデヒドで20分間固定し、0.1mg/ml Naphthol AS-MX phosphate (Sigma), 0.5% N,N-dimethyl formamide(Sigma), 2mmol/l MgCl₂(和光純薬)及び 0.6mg/ml Fast Blue BB salt(Sigma)を含む 0.1mol/l Tris-HCl buffer (pH8.5)を用い、室温にて30分間染色し ALPase 活性を評価した。

【結果および考察】

各種濃度のゲニステイン添加(0.1μM, 1μM, 10μM, 100μM)を行ったところ、ゲニステイン 100μM 添加群では細胞増殖が優位に抑制されたが、他の濃度では細胞増殖に変化は観察されなかった。1μM および 10μM ゲニステイン添加後における RDP は、17日目において強い ALPase 活性が観察された。また、象牙質形成関連遺伝子群および ERβの遺伝子発現の上昇がゲニステイン 1μM 添加群で認められた。このことから、ゲニステイン添加によって、RDP は石灰化が誘導される可能性が示唆された。

グルコースが糖尿病ラット由来歯髄細胞の石灰化物形成とオステオポンチン産生に及ぼす影響

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

○中島由紀子、稲垣裕司、板東美香、廣島佑香、木戸淳一、永田俊彦

Glucose Affects Calcification and Osteopontin Expression in Cultured Dental Pulp Cells Derived from Type 2-Diabetes Rat

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School

○Yukiko Nakajima, Yuji Inagaki, Mika Bando, Yuka Hiroshima, Jun-ichi Kido and Toshihiko Nagata

【研究目的】 糖尿病患者の歯髄では高頻度で歯髄腔の狭窄や不定形の石灰化物の形成が認められる。我々の研究室では、ラット株化歯髄細胞培養系で培地中のグルコース濃度を変化させると、50mMの高濃度でALP活性の有意な上昇や、骨基質タンパクのひとつであるオステオポンチン(OPN)の発現に有意な増加が認められること、また健常ラットと比較して2型糖尿病ラットの歯髄で病的石灰化物の増加やその周囲でOPNの発現が上昇していることを報告した(J Endod 36, 1014-20, 2010)。さらに我々は第128回秋季学術大会において、2型糖尿病ラット由来の歯髄細胞培養系では健常ラットと比較してグルコース非存在下で石灰化物形成およびOPN発現の増加が認められることを報告した。これらのことから、糖尿病患者の歯髄細胞は健常者の歯髄細胞と比較して石灰化能とOPN産生能が高く、そこに高血糖状態が加わることによって歯髄細胞のOPN産生が健常者に比べ増加し、歯髄の病的石灰化をより促進することが示唆された。そこで本研究ではこの仮説を検証するために、2型糖尿病ラット由来歯髄細胞培養系と健常ラット由来歯髄細胞培養系で培地中のグルコース濃度を変化させ、両者の石灰化量を比較するとともにOPNの発現量の相違についても調べた。

【材料および方法】 実験動物には2型糖尿病を自然発症するOtsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) ラットと、正常対照としてLong-Evans Tokushima Otsuka (LETO) ラットを用いた(大塚製薬株式会社・河野一弥博士より譲渡)。なお血糖値の測定を行い、糖尿病の発症が確認されたOLETFラットのみを用いた。Kasugaiらの方法に従い上顎切歯より歯髄を採取し、1週間コンフルエントになるまで培養した後、50μg/ml アスコルビン酸、2mM β-グリセロリン酸および25mM~50mMのグルコースを含む、EMEM培地+10%FBSにて細胞培養を行った。引き続き、2型糖尿病ラット由来歯髄細胞培養系および健常ラット由来歯髄細胞培養系で、プレートに形成された石灰化骨様結節に対してvon Kossa染色またはアリザリンレッドS染色を行い、歯髄細胞の石灰化量を比較した。またELISA法により培養液中に分泌されたOPNタンパクの定量を行った。

【結果】 2型糖尿病ラット由来歯髄細胞培養系および健常ラット由来歯髄細胞培養系ともにグルコースの添加により石灰化骨様結節の形成とOPN産生が増加したが、健常ラットと比較して糖尿病ラット由来の歯髄細胞培養系では石灰化骨様結節の形成量とOPN産生量が有意に亢進していた。

【考察と結論】 2型糖尿病ラット由来の歯髄細胞培養系ではグルコース非存在下、グルコース存在下のいずれの培養条件においても健常ラットと比較して石灰化量およびOPN産生量が有意に増加していた。以上の結果より、糖尿病患者の歯髄細胞は健常者の歯髄細胞と比較して石灰化能とOPN産生能が高く、そこに高血糖状態が加わることによって歯髄の病的石灰化がより促進されることが考えられる。

レーザー照射血管内皮細胞がラット培養歯髄細胞へ与える影響について — (第2報) 免疫組織化学的研究 —

昭和大学歯科病院・歯内治療科、昭和大学歯学部・口腔生化学教室²

○増田 宜子¹、山田 嘉重¹、宮本 洋一²、上條 竜太郎²

Effect of laser irradiated endothelial cells on rat cultured dental pulp cells.
—Immunohistochemical study—

Showa University, Dental Hospital, Endodontics, Showa University, School of Dentistry, Dept of Biochemistry²
MASUDA Yoshiko¹, YAMADA Yoshishige¹, MIYAMOTO Yoichi², KAMIJO Ryutaro²

(目的) 第131回の本学会において我々は、Mathieu らの方法 (参考文献; Mathieu S. *et al.*, 2005, Role of injured endothelial cells in the recruitment of human pulp cells. Arch. Oral Biol. 50:109-113) を応用し培養血管内皮細胞にレーザーによって無菌的に広範囲に損傷を与え、遊走した歯髄細胞を含む血管内皮細胞において RT-PCR 法によって早期に TGF- β 1 遺伝子の発現が認められることを報告した。今回、損傷を受けた血管内皮細胞と歯髄細胞の TGF- β 1 の発現を免疫組織学的に検討した。

(材料と方法) 5週齢の雄性 Wister ラット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 を加え培養した。一方ラット大動脈内皮細胞 (凍結細胞) (旭硝子) をラット内皮細胞成長培地 (旭硝子) にて培養した。それぞれコンフルエントになったら 1×10^4 cells/cm² の濃度で 6 well plate (Transwell®, Corning Inc.) の上段に歯髄細胞、下段に血管内皮細胞を継代した。上段の底は直径 8.0 μ m の孔のポリカルボネートの膜で覆われている。下段の血管内皮細胞には、Nd:YAG レーザーを 0.5 w, 20 pps, 30 秒照射し細胞に損傷を与えた。歯髄細胞は AcGFP1 蛍光蛋白質ベクターを導入し標識した。レーザー照射8、14日後に下段の遊走した歯髄細胞を含む血管内皮細胞を 10%ホルマリンにて固定した。免疫組織学染色には、1次抗体として 500倍希釈のウサギ抗ヒト TGF- β 1 抗体 (Santa Cruz Bio, Inc.) を用いた。2次抗体として 500倍希釈の Cy3-ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (abcam plc.) を用い共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。コントロールとして上段に歯髄細胞を培養せずレーザーを照射した血管内皮細胞と上段に歯髄細胞を培養しレーザーを照射しない血管内皮細胞を下段に培養したもの、血管内皮細胞のみを培養したものをを用いた。

(結果) レーザー照射8日後の血管内皮細胞において 緑色 (AcGFP1) で標識された歯髄細胞にて TGF- β 1 の発現が認められた。血管内皮細胞においても TGF- β 1 の発現がわずかに認められた。コントロール群では、TGF- β 1 の発現は認められなかった。レーザー照射14日後では、TGF- β 1 の発現が認められる血管内皮細胞の数が増加した。コントロール群では、レーザー照射血管内皮細胞、上段に歯髄細胞を培養した血管内皮細胞において TGF- β 1 の発現が認められた。

(考察及び結論) 血管に刺激が加わると早期に遊走した歯髄細胞にて TGF- β 1 が発現し血管内皮細胞における TGF- β 1 の発現も高められていた。遊走した歯髄細胞が TGF- β 1 を発現し共培養することによって TGF- β 1 の発現が促進されたと推測される。損傷を受けた血管内皮細胞が産生する因子についてさらに検討していく予定である。

ラット実験的歯髄炎における視床の N-methyl-D-aspartate receptors とグリア細胞との関係

1 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野

2 新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座 歯学分野

3 東京医科歯科大学歯学部附属病院 総合診療科 クリーンルーム歯科外来

4 グローバル COE プログラム; 歯と骨の分子疾患科学の国際教育拠点

○河村 隼^{1,4}, 金子友厚², 金子実弘¹, 興地隆史², チョックチャナチャイサクン ウライワン^{1,4}, 砂川光宏^{1,3}, 須田英明^{1,4}

Relationship between N-methyl-D-aspartate receptors and neuroglial cells of the thalamus in rat experimental pulpitis

1 Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences

2 Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences.

3 Clean Room, University Hospital, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

4 Global Center of Excellence (GCOE) Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases

○KAWAMURA Jun^{1,4}, KANEKO Tomoatsu², KANEKO Mitsuhiro¹, Okiji Takashi², CHOKECHANACHAISAKUL Uraivan^{1,4}, SUNAKAWA Mitsuhiro^{1,3}

and SUDA Hideaki^{1,4}

(目的)

これまでに我々は、ラット臼歯を一日露髄開放すると、ラット対側視床のグリア細胞群の分布密度とグリア細胞群の抗原提示細胞関連抗原の mRNA が、いずれも増加することを報告した (Kaneke et al., Journal of Endodontics, 2010). このグリア細胞群の活性化の背景には、N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) が関係すると予想されたものの、その詳細は不明であった。そこで本研究では、グリア細胞群と N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) との関係を追求するために、神経興奮性物質である mustard oil (MO) を歯髄に適用することにより実験的歯髄炎を誘発させ、視床内グリア細胞を免疫組織化学的に検索するとともに、視床組織に対する NMDAR 拮抗薬の作用を分子生物学的に解析した。

(方法)

実験には、9 週齢の雄性 Sprague-Dawley 系ラットを用いた。健常群 (コントロール) を除く全てのラット上顎左側第一臼歯を露髄させた後、MO を歯髄へ適用した。また、遺伝子発現解析群においては、NMDAR 拮抗薬として MK-801 を使い、MO 適用 10 分経過後に視床 MD 核へ直接投与した。

1) 免疫組織学的検索

一次抗体として OX6 (anti-rat class II MHC molecules) および anti-glial fibrillary acidic protein (GFAP) を用いた。MO 適用 60 分経過後の視床組織を左右別々に摘出し、ABC 法に従い免疫染色した後、一定領域に存在する各抗原陽性細胞の数を計測し、分布密度を算出した。また、健常群の視床組織についても同様の手法を用いて測定した。

ii) 遺伝子発現解析

健常時 (コントロール), MO 適用 10 分後, NMDAR 拮抗薬 MK801 投与 2 分後 (MO 適用 12 分後), MK801 投与 10 分後 (MO 適用 20 分後) の視床組織をそれぞれ左右別々に摘出し、TRIZOL (Invitrogen) を用いて RNA を抽出後、NMDAR のサブユニット NR2D, class II MHC alpha-chain, CD80, および GFAP mRNA の発現量を、リアルタイム PCR 法を用いて定量した。

(結果)

1) 免疫組織学的検索

OX6 陽性細胞は紡錘形の形状を呈したミクログリアとして、また、GFAP 陽性細胞は放射線状の形状を呈したアストロサイトとして同定された。健常時と MO 適用 60 分経過後の視床組織を比較したところ、OX6 陽性細胞あるいは GFAP 陽性細胞の分布密度には有意な変化は認められなかった。

2) 遺伝子発現解析

健常時, MO 適用 10 分後の同側視床と比較し, MO 適用 10 分後の対側視床では, NR2D, Class II MHC, CD80, GFAP mRNA の発現量が増加していた。また, MO 適用により増加していた NR2D mRNA の発現量は, 視床 MD 核内への NMDAR 拮抗薬 MK-801 投与 2 分後 (MO 適用 12 分後) に有意に減少した。さらに, MO 適用により増加していた Class II MHC, CD80, GFAP mRNA は, MK-801 投与 10 分後において有意に減少した。

(考察および結論)

以上の結果から, MO による実験的歯髄炎において, 視床の NMDAR がグリア細胞群の活性化・不活性化に何らかの働きを有することが示唆された。

ゼラチンスポンジが各種培養細胞株に与える影響

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

医療人間形成学講座総合診療学分野²

○鷺尾絢子¹, 寺下正道², 北村知昭¹

In vitro effects of gelatin sponge on several cell lines

Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics,
Department of Cariology and Periodontology¹, Division of Comprehensive Dentistry,
Department of Clinical Communication and Practice², Kyushu Dental College
○WASHIO Ayako¹, TERASHITA Masamichi², KITAMURA Chiaki¹

<目的>

我々の研究グループでは、歯髄創傷治癒メカニズムの解明と象牙質・歯髄複合体の再生療法確立を目的として、FGF-2 徐放性ゼラチンハイドロゲル粒子による再生象牙質誘導、および象牙芽細胞様細胞株 (KN-3 細胞) における BMP-2 誘導性 Smad シグナル伝達経路の活性化を明らかにしてきた。また、歯髄再生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 NGF 誘導性神経細胞分化を抑制することを明らかにしてきた。今回、歯髄再生誘導に利用可能なスキャフォールドであり、かつ FGF-2 および NGF を徐放するゼラチンスポンジを使用して、KN-3 細胞、PC12 細胞への影響を検討した。

<材料と方法>

KN-3 細胞、および PC12 細胞をゼラチンスポンジ内に静かに播種後 72 時間培養し、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察を行った。また、通常の培養用ディッシュに細胞播種し 3 時間経過後に培養液中にスポンジを浸漬し、72 時間培養後、位相差顕微鏡下での細胞形態の観察と WST-1 assay による細胞増殖能への影響を検討した。

<結果>

SEM 像から、ゼラチンスポンジは多孔質な構造を有していること、および KN-3 細胞、PC12 細胞の両者ともスポンジ表層に良好に接着していることが観察された。次に、通常の培養用ディッシュに細胞播種後、細胞上にゼラチンスポンジを浸漬し細胞増殖能と細胞形態変化を検討した。その結果、両細胞の細胞増殖能には大きな変化は認められなかった。一方、スポンジ下の細胞形態を位相差顕微鏡下で観察したところ、KN-3 細胞の形態は大きな変化を認めなかったが、PC12 細胞では NGF 非存在下にも関わらず神経突起が伸長しているのが観察された。

<考察>

以上の結果は、KN-3 細胞、PC12 細胞ともにゼラチンスポンジに良好に接着すること、および単層培養された各細胞へのゼラチンスポンジの重層は各細胞の機能に影響を与えることが示唆された。今後、ゼラチンスポンジ内外に存在する細胞の機能的変化を詳細に検討する予定である。

<結論>

FGF-2、NGF 徐放性ゼラチンスポンジは象牙芽細胞様細胞および PC12 細胞の分化・機能発現に影響を与える。

半導体レーザー照射後のラット臼歯における非コラーゲンタンパクの遺伝子発現

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座 歯学分野¹, 松本歯科大学口腔解剖学第二講座²

○重谷佳見¹, 大倉直人¹, 吉羽邦彦¹, 細矢明宏², 吉羽永子¹, 興地隆史¹

Gene Expression Analysis of Non-collagenous Proteins in GaAlAs Laser Irradiated Rat Molars

¹Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences, ² Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University

SHIGETANI Yoshimi^{1*}, OHKURA Naoto¹, YOSHIBA Kunihiko¹, HOSOYA Akihiro², YOSHIBA Nagako¹, OKIJI Takashi¹

【目的】

近年、歯科用レーザーの臨床応用が注目され、窩洞形成や象牙質知覚過敏処置等に適用されている。しかしながら、レーザー照射後の歯髄反応についての知見は未だ十分とはいえない。演者らはこれまで、半導体レーザー照射後に第三象牙質または骨様硬組織形成が生じることを組織学的・免疫組織化学的に明らかにしたが、この過程を遺伝子レベルで解析した報告はいまだ見当たらない。

本研究では、Real-time PCR を用いて、同レーザー照射後のラット臼歯における非コラーゲンタンパクの遺伝子発現の経時的变化を検索した。

【材料および方法】

生後 8 週齢 Wistar 系雄性ラットの上顎第一臼歯近心に、半導体レーザー装置（オサダライトサージ 3000）を用いて、出力 1.5W、60 秒 X 3 回の照射条件でレーザー照射を行った。コントロールには、非照射ラット上顎第一臼歯を用いた。照射 1, 3, 5, 7, 14 日後に抜歯を行い、歯冠部のみを摘出し、mRNA を抽出した。その後、Real-time PCR にて、osteopontin (OPN), osteonectin (ON), osteocalcin (OC), dentin sialophosphoprotein (DSPP), dentin matrix protein 1 (DMP-1), および bone sialoprotein (BSP) mRNA の発現解析を行った。さらには、HE 染色による組織学的観察を行うとともに、象牙芽細胞の分化マーカーである heat-shock protein 25 (Hsp-25)、および OPN、DMP-1 に対する酵素抗体染色を行った。

【結果】

OPN, ON, OC, DSPP, DMP1 の mRNA 発現レベルは、照射後上昇し、3 日後にピークを示し、その後次第に低下した。14 日後には mRNA 発現レベルは、コントロールと同等にまで低下した。

組織学的には、1-3 日後では象牙芽細胞を含む歯髄細胞の壊死が照射部を中心に拡大し、Hsp-25 は、壊死層周囲に強陽性反応を示した。5 日後では同部に細胞の再分布が観察され、7 日後には HSP-25 陽性の象牙芽細胞様細胞と少量の新生硬組織が認められた。14 日後では、第三象牙質または骨様象牙質が歯髄腔内で多量に形成されるとともに、OPN 陽性反応が新生硬組織の細管に沿って、また DMP-1 陽性反応が原生象牙質と新生硬組織の境界部近傍に認められた。

【考察】

新生硬組織形成細胞の出現に先立ち、BSP を除く非コラーゲンタンパク mRNA 発現が上昇したことから、これらのタンパクが新生硬組織形成細胞の分化過程、もしくはその後の硬組織形成に何らかの役割を演じることが示唆される。

【結論】

半導体レーザー照射後のラット臼歯では、OPN, ON, OC, DSPP, DMP1 の mRNA 発現レベルの亢進に続いて新生硬組織形成細胞が出現し、第三象牙質または骨様象牙質形成を伴う修復が生じた。

【謝辞】

本研究は、新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座硬組織形態学分野 大島勇人教授との共同研究である。

ヒドロキシアパタイト - bFGF を用いた歯根端切除後の治癒機転に関する病理組織学的研究

1) 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野

2) 河津歯科医院 3) 秋田歯科クリニック

○山田 麻衣子¹⁾, 関根 源太¹⁾, 森 春菜¹⁾, 河津 祐之²⁾, 秋田 康充³⁾, 吉田 隆一¹⁾

Pathohistological Study of Hydroxyapatite with bFGF as Bone Grafting Materials after Apicoectomy

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

2) Kawazu Dental Clinic 3) Akita Dental Clinic

○YAMADA Maiko, SEKINE Genta, MORI Haruna, KAWAZU Sukeyuki, AKITA Yasumitsu, YOSHIDA Takakazu
<緒言>

日常の診療において、根管拡大終了後も良好な治癒経過が得られない場合は、外科的歯内療法が選択される。しかし、我々は、適切な外科的処置後も、骨再生以前に線維性結合組織が骨創腔内へ侵入増殖し、術後の骨性治癒が遅延する事を報告した。ゆえに、骨創腔が大きい時は、適切な骨性治癒促進するような、骨削合部位あるいは開窓部位の上皮遮断と scaffold を確保する処置が必要である。そこで、今回我々は、骨補填材であるヒドロキシアパタイトと growth factor である bFGF 製剤を骨創腔に填入し、イヌ歯根端切除後の治癒機転に関して病理組織学的に検討したので報告する。

<材料および方法>

実験には被検動物として雑種成犬 (4 歳, 体重 10.0kg) を用い、以下の 1) ~ 4) の順に行った。なお、本実験は朝日大学動物実験委員会の承認を得ておこなった (承認番号: 動物倫理 07-010)。

1) 麻酔抜髄

ペントバルビタールナトリウム注射液 0.5 mg/kg を静脈内注射し、左右下顎第一・第二後臼歯類側歯肉にエピネフリン含有 2% 塩酸リドカイン 1.0ml 浸潤麻酔を行い、電気エンジンを用いて髓室開拡大後、6% 次亜塩素酸ナトリウム溶液と 3% 過酸化水素水による交互洗浄下で K ファイル #45 まで根管拡大を行い、同日にガッタパーチャとキャナルスで根管充填を行った。

2) 歯根端切除

根管充填後、直ちに同部の歯根端切除を行った。粘膜骨膜弁を形成し、根尖部相当部をラウンドバーで削除しダイヤモンドバーで歯根端切除術を行い、骨創腔 (φ4~5mm) を形成した。

3) 骨創腔補填

骨創腔に対し、何も填入しなかった群 (無填入群)、ヒドロキシアパタイト顆粒 (粒径 400~600 μm) (以下 AP) を填入した群 (AP 群)、ヒドロキシアパタイト顆粒とヒト bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子) 製剤 (フィブラストスプレー・科研製薬株式会社) を混和し填入した群 (AP-bFGF 群) の 3 群とした。

4) 病理組織学的観察

術後 3 ヶ月で屠殺し、通法に従いヘマトキシリン・エオジン染色 (以下、H-E 染色) をおこなった。

<結果ならびに考察>

無填入群の歯根断面は、疎な線維成分を有する肉芽組織で満たされ、付近の歯根膜線維と移行していた。しかし、歯根断面を覆うような骨の修復はみられなかった。

AP 群の歯根断面は、歯根膜から連続した線維組織ならびにセメント小腔とセメント細胞を有する層板を有するセメント質が直接覆っていた。

AP-bFGF 群の歯根断面は、AP 群の所見に加え填入したアパタイト周囲にエオジン好性の基質と表層には細胞成分を認め、それらは骨ならびに骨芽細胞とみなすことができた。

AP を填入することにより骨性治癒が認められた。AP-bFGF 群では AP 群に比べて骨性治癒を促進する傾向が認められたものの、AP 群と著明な差とはいえなかった。また、bFGF が歯根端切除後の治癒を阻害することはないと思われた。

<結論>

大きな骨創腔に対して、ヒドロキシアパタイトあるいは bFGF 製剤を混入したヒドロキシアパタイトを填入すると骨性の修復が期待でき、臨床的有用性が示唆された。

PMMA 系接着性レジンセメントに対する結合組織の反応

北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯周・歯内療法学教室
○森下 長、中塚 愛、洲崎真希、川村直人、菅谷 勉、川浪雅光

Connective tissue reaction of PMMA adhesive resin cements

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science,
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine
○MORISHITA Takeru, NAKATSUKA Megumi, SUNOSAKI Maki, KAWAMURA Naoto
SUGAYA Tsutomu and KAWANAMI Masamitsu

【目的】

接着性レジンセメントは、髄床底や根管壁の穿孔部の封鎖および直接覆髄などに用いられて良好な成績が報告されている。これらの治療成績を高めるためには象牙質と強く接着するだけでなく、生体親和性に優れることも必要である。接着性レジン中でも PMMA 系レジンでは生体親和性が高いとされていることから、現在市販されている接着性レジンセメント 2 種を選択し、結合組織に移植して組織反応を病理組織学的に検討した。

【材料および方法】

実験動物には、17 週齢の Wistar 系雄性ラット 5 匹を使用した。PMMA 系レジンセメントとしてスーパーボンド C&B (以下 SB、サンメディカル、ポリマー粉末: PMMA、モノマー液: MMA・4-META、キャタリスト: トリ-n-ブチルホウ素部分酸化物、表面处理材グリーン: クエン酸・塩化第二鉄) とマルチボンド II (以下 MB、トクヤマ、粉: PMMA・助触媒、液: MMA・UDMA・HEMA・ボレート触媒・MTU-6、プライマー: アセトン・リン酸モノマー・UDMA) を選んだ。ラットに全身麻酔を施し、背部皮下結合組織を露出させ、以下の 4 つの条件でレジンセメントを移植した。

- 1) SB 群: 結合組織表面を生理食塩水で水洗、エアブローし、SB を筆積み法で塗布した。
 - 2) GA+SB 群: 表面处理材グリーンを結合組織表面に塗布、5 秒後に生理食塩水で水洗、エアブローし、SB を筆積み法で塗布した。
 - 3) MB 群: 結合組織表面を生理食塩水で水洗、エアブローし、MB を筆積み法で塗布した。
 - 4) Pr+MB 群: プライマーを結合組織表面に塗布、20 秒後にエアブローし、MB を筆積み法で塗布した。
- 4 群とも直ちに皮膚弁を縫合し、1、2 週後に通法に従って薄切標本を作製、HE 重染色して、光学顕微鏡下で組織学的観察および組織学的計測を行った。組織学的計測は、画像解析ソフト(Image J)を用いて、0.01mm²内に 20 個以上の炎症性細胞浸潤が見られる結合組織の面積(S)、接するレジンセメントの長さ(L)を計測、炎症性細胞浸潤距離(S/L)を求めた。統計処理は、一元配置分散分析のうえ Tukey の多重比較を行い、有意水準を 5%とした。

【結果】

1)組織学的観察

1 週後、4 群ともリンパ球を主体とし、形質細胞やマクロファージをわずかに伴う炎症性細胞浸潤が観察され、線維は消失して毛細血管が多くみられた。レジンと結合組織の界面には、GA+SB 群ではヘマトキシリンに淡染する不定型の層が観察され、MB 群および Pr+MB 群ではヘマトキシリンに淡染する蜂窩織状の層が観察された。2 週後では、4 群とも炎症性細胞浸潤が 1 週後より減少し、とくに SB 群および GA+SB 群では、リンパ球が 1 層認められたのみで、ほぼ正常な結合組織が接していた。一方、MB 群および Pr+MB 群では広範囲に炎症性細胞浸潤が認められた。

2)組織学的計測

S/L は、1 週後 SB 群 $31.1 \pm 17.5 \mu\text{m}$ 、GA+SB 群 $37.6 \pm 27.8 \mu\text{m}$ 、MB 群 $61.2 \pm 28.6 \mu\text{m}$ 、Pr+MB 群 $103.0 \pm 86.2 \mu\text{m}$ で Pr+MB 群は SB 群、GA+SB 群に対して有意に高かった。2 週後はそれぞれ 17.6 ± 6.5 、 21.7 ± 12.7 、 47.6 ± 31.0 、 53.4 ± 16.5 で、MB 群、Pr+MB 群は SB 群、GA+SB 群に対して有意に高かった。

【考察】

SB では歯面処理材の使用にかかわらず炎症が少なかったことから、歯面処理材も起炎性は低かったと考えられる。一方、MB は 1 週後ではプライマーの影響が強く、2 週後には炎症はかなり軽減したが SB より強かったことから、水分が多い組織内では SB に比べて重合の程度が低下していたのではないかと考えられた。

高周波ラジオ波を用いた直接覆髄における修復象牙質の免疫組織学的観察

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系 齋藤 隆史

○半田 慶介、小池 俊之、林 敬次郎、成田 憲亮

Mohammad Ali Akbor Polan、齋藤 隆史

Immunohistological observation for reparative dentin inductive effect of the high frequency radio wave generator in direct pulp capping

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

School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Keisuke Handa, Toshiyuki Koike, Keijiro Hayashi, Kensuke Narita

Mohammad Ali Akbor Polan, Takashi Saito

【目的】

直接覆髄において、露髄部の出血に対しては通常、次亜塩素酸ナトリウムによる化学的洗浄後に綿球による圧迫止血が行われる。この際、露髄部の止血の成否が修復象牙質形成に影響を与え、臨床成績を大きく左右することが知られている。高周波ラジオ波メス(デントサージ IEC; エルマンジャパン)は、4MHz の高周波ラジオ波によって軟組織中の水分を蒸散し、同時に組織を凝固する機器として主に外科領域で切開等に用いられている。我々は第 131 回日本歯科保存学会学術大会において、高周波ラジオ波メスを用いた直接覆髄法は、従来の止血法に比較して修復象牙質形成に良好な影響を与えることを報告してきた。そこで本研究の目的は、高周波ラジオ波メスによって誘導された修復象牙質において HSP25 や Nestin などの象牙質再生に関係するタンパク質発現を免疫組織学的に検討することである。

【方法】

小池らの方法に従い、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、綿球にて露髄部の血液を軽く除去した後、高周波ラジオ波メスを用いて止血モード強度 1,3,5 および 7 で止血を行い、水酸化カルシウム製剤(MultiCal, Pulpdent 社)を貼付した。コントロール群は、通法により止血し、水酸化カルシウム製剤を貼付した。ラットを術後 14 日および 28 日に屠殺し、歯を顎骨ごと摘出し通法に従って組織切片を作成し、HE 染色による組織学的観察と免疫組織学的観察を行った。免疫組織学的検索では、3% H_2O_2 によって内因性ペルオキシダーゼを除去したあと、ZYMED HISTOMOUSE MAX KIT を用いて抗 nestin 抗体および抗 HSP25 抗体を 1%BSA で希釈し染色に用いた。

【結果および考察】

コントロール群における修復象牙質は、これまでの報告と同様に多孔性でトンネル状欠損・裂隙が多数存在していた。さらに、修復象牙質直下の象牙芽細胞層は不明瞭であった。これに対して、高周波ラジオ波メス止血モード強度 1 群は、術後 14 日において歯髄の炎症は弱いものの、修復象牙質の形成は不十分であった。強度 3 群および強度 5 群では、術後 14 日で修復象牙質の形成が認められ、28 日で細管構造を有する厚く良質な修復象牙質が形成されていた。また、歯髄の炎症はほとんど認められなかった。免疫組織学的な観察において誘導された修復象牙質は、nestin 陽性、HSP25 陽性反応を示した。術後 28 日では、コントロール群、強度 3 および強度 5 の間で修復象牙質形成量に有意差は認められなかった。しかし、強度 7 群では、術後 14 日で強い歯髄炎症反応を示し、修復象牙質もコントロール群と同様に多孔質であった。

これらの結果から、高周波ラジオ波メスによる止血は、創面一層のみ蒸散凝固することで水酸化カルシウム製剤の歯髄に対する為害作用の拡散を防止すると考察された。しかしながら、過度の強度での高周波ラジオ波メスの使用は、歯髄にダメージを与え、良質な修復象牙質形成を阻害すると考えられた。

【まとめ】

ラット直接覆髄モデルにおいて、適切な強度で用いられた高周波ラジオ波メスによる露髄部の止血法は、従来の止血法と比較して簡便であり、歯髄への為害作用が少なく、良質な修復象牙質の形成に寄与することが明らかになった。

ラット臼歯培養系における歯髄組織の変化に関する免疫組織化学的観察

¹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, ²松本歯科大学 口腔解剖学第二講座
○吉羽邦彦¹, 吉羽永子¹, 重谷佳見¹, 金子友厚¹, 細矢明宏², 興地隆史¹

Immunohistochemical Study on Tissue Alteration of Rat Dental Pulp in Tooth Culture

¹Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences;

²Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University

○YOSHIBA Kunihiro¹, YOSHIBA Nagako¹, SHIGETANI Yoshimi¹, KANEKO Tomoatsu¹, HOSOYA Akihiro², OKIJI Takashi¹

【研究目的】

歯髄は自然治癒能力を有しており、様々な外部侵襲に対して修復象牙質や被蓋硬組織を形成する。また、歯の再植および移植後の歯髄腔内に硬組織が形成されることが報告されているが、GFP 発現ラット臼歯の移植実験から、歯髄由来の細胞と血行を介して外部から移入した間葉系細胞の両者が関連して硬組織が形成されることが明らかにされている。一方、歯髄に組織幹細胞が存在することが報告されているが、歯髄創傷治癒過程におけるこれらの細胞の動態ならびに硬組織形成との関連性については不明な点が多い。

本研究では、象牙質・歯髄複合体の修復再生機構解明の一環として、歯髄創傷治癒過程における歯髄細胞の動態を検討する目的で、歯の器官培養系を確立し、この系における歯髄組織変化について組織学的、免疫組織化学的観察を行った。

【材料と方法】

材料には生後 4 週齢 Wistar ラット上顎第一臼歯を用いた。抜去後直ちにメンブレンフィルターに植立し、10%ウシ胎児血清、2mM β -glycerophosphate を含む DMEM にて、37°C、5%CO₂ 下にて培養した。培養 1, 2, 3, 5 日、1 週、2 週後に 4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定、10%EDTA にて脱灰後、8 μ m の凍結切片を作成し、H-E 染色による組織学的観察、ならびに抗 nestin 抗体、抗 α -smooth muscle actin (SMA) 抗体を用いて、酵素抗体法による免疫組織化学的観察を行った。なお、対照として抜去直後の上顎第一臼歯を同様に観察した。

【結果】

対照歯の歯根は形成途中で根尖は広く開いており、歯冠部ならびに歯根部の象牙芽細胞はともに nestin 陽性反応を示した。また歯髄における α -SMA 反応は血管周囲に沿って観察された。

培養臼歯においては、歯冠部歯髄は経時的に変性像を示し、象牙芽細胞層における nestin 陽性反応性は培養 1 日後に減弱し、2 日後から消失した。一方、歯根部では nestin 陽性反応が培養 2 週後においても観察された。

α -SMA 陽性反応は血管に沿って認められるとともに、培養 2 日後から根尖部の線維芽細胞様細胞に強い反応性が観察された。これらの細胞は培養 2 週後においても α -SMA 陽性反応を示していた。

【考察】

本研究の結果から、正常歯髄では観察されない α -SMA 陽性細胞が根尖部歯髄に出現することが示された。 α -SMA の発現が種々の幹細胞や創傷治癒過程で報告されていること、あるいはラット移植歯における歯髄腔内の骨様組織形成過程でその発現が観察されていることから、本研究で観察された α -SMA 陽性細胞は、歯髄組織修復過程に何らかの役割を果たしている可能性が示唆された。

【結論】

歯の器官培養系において、 α -SMA 陽性細胞が根尖部歯髄に出現することが示された。

ヘルトウィッヒ上皮鞘から得られた上皮様細胞を用いた三次元培養の免疫組織学的観察

- 1) 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第1講座
- 2) 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
○五十嵐 勝¹⁾、北島佳代子¹⁾、新井恭子¹⁾、山田理絵²⁾、松田浩一郎²⁾

Immunohistochemical observation of 3D culture used epithelial-like cells derived from Hertwig's epithelial sheath

- 1) Department of Endodontics, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University
- 2) Advanced Operative Dentistry・Endodontics, Graduate School of life Dentistry at Niigata,
The Nippon Dental University
○IGARASHI Masaru¹⁾, KITAJIMA Kayoko¹⁾, ARAI Kyoko¹⁾, YAMADA Rie¹⁾ and MATSUDA Koichiro¹⁾

【緒言】

ヘルトウィッヒ上皮鞘 (HES) はエナメル器由来の上皮性の構造物で、歯冠部のエナメル質、象牙質の形成がほぼ終了した頃、エナメル器の自由縁から内・外エナメル上皮が密接した状態で伸長してくる。HES の上皮鞘に包まれた歯乳頭の間葉細胞のうち、上皮鞘に接する細胞は上皮の誘導によって象牙芽細胞に分化し歯根の形成にあたる。歯根象牙質の形成を終了すると上皮細胞は離散消失するが、一部は歯根膜の中に小さな細胞塊となって Malassez の上皮残渣となる。この、歯根膜内に残った上皮細胞は慢性根尖性歯周炎の中の歯根嚢胞の形成に、関与するといわれ嚢胞内腔壁をなす上皮層と周囲の炎症性肉芽組織、結合組織層の三層構造を示す。同じ口腔粘膜上皮を由来とする HES や残渣細胞の特徴を知るとは、歯根嚢胞の形成過程の解明や歯根嚢胞の治療法確立に重要な意味を持つと考えられる。本研究では、HES から得られた上皮様細胞を用いて3次元培養を行い、同じ外胚葉系に由来する歯肉上皮をコントロールとして上皮細胞の分化に伴う変化について比較検討を行ったので報告する。

【材料および方法】

生後6か月のブタ下顎骨を入手し、骨削後に顎骨内に埋伏している下顎第二大臼歯を摘出した。歯冠を包むエナメル器上皮組織を除去して歯冠部を露出し、歯根象牙質形成端にある HES を実体顕微鏡下で採取した。およそ 2 X 2 mm の大きさに細分後、DMEM と Ham's F12 を 3:1 で混合し各種添加物を混合した上皮細胞培養液 FAD を使用して初代培養を開始した。その際 Mitomycin 処理を施した 3T3 を feeder layer として加えて共培養を行った。12well プレートに調合したコラーゲンゲル表面に、第2継代した上皮細胞を $8 \times 10^5/\text{cm}^2$ の割合で播種し、24 時間後にナイロンシート上に移し気相培養を開始した。その後 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 日、2, 3, 4 週後に標本を採取し、半側を 10% 中性ホルマリン液で固定後にパラフィン包埋、残り半側は OCT コンパウンドを用いて凍結包埋を行った。免疫染色に用いた薄切切片は、パラフィン切片の抗体活性を高めるために Immunosaver (日新 EM 社製) にて抗原賦活処理を行った後、2.5% ウマ血清にてインキュベートし、一次抗体として Cytokeratin19 (CK19), PAN Cytokeratin (PCK), involucrin (IV) を応用した。その後二次抗体として En Vision + mouse/rabbit in humidity chamber、DAB にてインキュベートし、最後にヘマトキシリンにて対比染色を行った。また H-E 染色も併せて行い、ブタ歯肉を対照として比較検討を行った。

【結果および考察】

HES の初代培養では2週後に上皮細胞様の敷石状を示す外生細胞がみられた。三次元培養後の培養物は経時的に厚さが薄くなったが、大きさや色調の変化はみられなかった。組織学的には対照のブタ歯肉は表面に角化層があり、下層に顆粒層、棘細胞層、基底細胞層の層を伴う重層扁平上皮構造を呈していたが、HES の三次元培養組織は数層の多層構造は示すものの角化層はみられず、2週以降は上皮細胞の離散化所見がみられるようになった。免疫組織では PCK では対照と同様に全層で強い反応がみられたが、IV では対照が基底層や周囲に発現がみられたのに対し、3D 培養では全層に発現がみられた。CK19 ではわずかに表層に発現がみられたが、3D 培養ではわずかな発現で3週まではみられず、それ以降も弱いものであった。

以上のことから、HES から得られた上皮様細胞はブタ歯肉の上皮細胞と比較して組織構造や免疫応答において異なることが示された。

歯根膜から得た上皮様細胞の FACS を用いた幹細胞マーカー陽性細胞の分離とその細胞培養後の形態観察

¹⁾ 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第 1 講座

○北島佳代子¹⁾、新井恭子¹⁾、山田理絵²⁾、

²⁾ 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

松田浩一郎²⁾、五十嵐 勝¹⁾

Isolation of stem cell marker positive epithelial like cells derived from PDL
and observation of morphologic character after cell culture

1) Department of Endodontics, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

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

○Kayoko Kitajima¹⁾, Kyoko Arai¹⁾, Rie Yamada²⁾, Koichiro Matsuda²⁾, Masaru Igarashi¹⁾

【緒言】

歯冠部のエナメル質と象牙質の形成が終了する頃、エナメル器の自由縁から内・外エナメル上皮が密接しながら伸長し、ヘルトウィッヒ上皮鞘 (HES) が形成される。この上皮鞘に接する歯乳頭の間葉細胞は上皮の誘導によって象牙芽細胞に分化し、HES は歯根形成の誘導的役割を果たす。歯根象牙質の形成が終了すると上皮細胞は離散消失するが、一部は Malassez の上皮残遺 (ERM) となって歯根膜の中に小さな細胞塊として残留する。慢性根尖性歯周炎において根尖歯周組織に持続的に刺激が加わるとこの上皮残遺は増殖を開始し、歯根嚢胞の嚢胞壁上皮を形成すると考えられている。このように ERM は静止状態にあるものではなく増殖能を残しており、最近の研究では ERM における幹細胞様特性の有無が注目されている。嚢胞壁の上皮の存在は、歯根嚢胞に対する根管治療を困難にする要因の 1 つとなっていることから、これらの細胞を分離し、その細胞特性を知ることが歯根嚢胞の発現気所の解明や予防、治療法の確立のための関連研究の推進に重要である。しかし、PDL から得られた上皮様細胞には ERM から増殖した細胞のほか、血管内皮細胞が関与したものが含まれていると考えられるため、それらの細胞を分離する必要がある。そこで今回われわれは、幹細胞マーカーと血管内皮細胞マーカーを用いて Fluorescence activated cell sorting (FACS) にて細胞のソートを行い、さらに分離されたそれぞれの細胞を培養し、その増殖所見について観察したので報告する。

【材料および方法】

生後 6 か月のブタの下顎乳臼歯 pm1 と pm2 を抜去し、Penicillin、Streptomycin、Amphotericin B を通常の 2 倍量含む PBS で洗浄し、実体顕微鏡下で歯根の歯頸側 1/3、根中央 1/3、根尖側 1/3 の 3 部位の歯根膜組織を収集した。DMEM と Ham's F2 を 3:1 で混合した上皮細胞培養液 FAD を使用し、Mitomycin 処理を施した 3T3 を feeder として添加し、各々初代培養を行った。派生した細胞から Trypsin を用いて線維芽細胞様細胞を除去した後、trypsin-EDTA を用いて上皮様細胞のコロニーを剥離、回収し、継代培養を行った。FACS 解析には BD Vantage™ SE (日本 BD) を用い、DNA 結合色素 Hoechst33342 ならびに Verapamil と、幹細胞マーカーとして CD44、ならびに歯根膜内の血管内皮細胞を目的細胞から分離するためのマーカーとして CD31 を用いた。得られた CD31⁺/CD44⁺、CD31⁺/CD44⁻、CD31⁻/CD44⁺、CD31⁻/CD44⁻ の 4 つの細胞群のうち、血管内皮細胞を除外した細胞群をさらに Mitomycin 処理した 3T3 を feeder として添加した FAD を用いて継代し、形成されたコロニーの形態を観察した。

【結果および考察】

PDL から得た上皮様細胞に幹細胞マーカー CD44 と血管内皮細胞を除外するために CD31 を用いて FACS にてソートしたところ、歯頸側 1/3、根中央 1/3、根尖側 1/3 の 3 群ともに CD31⁻/CD44⁺ の細胞群において、高い幹細胞活性をもつ Side Population (SP) 分画が確認された。SP 分画の細胞数はいずれも 5 % 以下と少なかった。また、得られた CD31⁻/CD44⁺ の細胞群の継代培養では、通常の上皮細胞の敷石状形態とは異なる網状構造が観察された。以上のことから、細胞数は極めて少ないが歯根膜内には幹細胞様特性を示す細胞が存在することが示唆された。

歯の凍結保存がヒト歯根膜細胞活性に与える影響

— 一時的な保存環境変化の分析 —

¹ 日本大学松戸歯学部再生歯科治療学講座 ² 歯科矯正学講座 ³ 歯科臨床検査医学講座

○染井 千佳子¹, 平手 友里恵², 石倉 和明³, 牧村 英樹¹, 菊地 信之¹, 木村 功¹, 山口 大²

長濱 文雄¹, 葛西 一貴², 和田 守康¹

Effect of the tooth cryopreservation for the cell activity of human periodontal membrane

— Analysis for temporarily storage condition —

Departments of ¹Renascent Dentistry, ²Orthodontics and ³laboratory medicine for dentistry

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○SOMEI Chikako¹, HIRATE Yurie², ISHIKURA Kazuaki³, MAKIMURA Hideki¹, KIKUCHI Nobuyuki¹, KIMURA Koh¹,

YAMAGUCHI Masaru², NAGAHAMA Fumio¹, KASAI Kazutaka² and WADA Moriyasu¹

【緒言】

歯の長期凍結保存では抜歯後の歯の保存状態が重要である。短時間で凍結保存が出来れば良いが、開業医で抜歯した場合は、長時間保存条件が制限されることになる。凍結保存するまでの詳細な条件設定については未だに不明瞭な点が多い。そこで、本研究では凍結保存の温度設定が歯根膜に与える影響を検討した結果、興味ある結果を得たので報告する。

【材料及び方法】

1. 実験方法

ヒト歯根膜細胞は、研究の同意を得た患者で、矯生治療の目的で抜去された健康な歯から歯根膜組織を無菌的に取り出し、FBS10%含有α-MEM培地を用いて37℃、5%CO₂の条件で培養を行い、3～5回継代したものをを用いた。保存液は、セルバンカー2（日本全薬工業）を使用し、保存期間は48時間、保存温度は室温(20℃)、4℃、-18℃の3つの条件とした。

まず試料を、プログラムフリーザで-40℃まで緩速凍結（毎分約-1℃の速度）を、続いて-80℃で24時間凍結保存を行い、更に-150℃で2週間凍結保存を行った。コントロールとして、細胞を、直ちにプログラムフリーザで-40℃まで冷却し、その後-80℃で保存した後、-150℃の超低温冷凍庫で保存した。

2. 歯根膜培養細胞における活性化因子の遺伝子発現

保存終了後、37℃の恒温槽で解凍した細胞からRNAの抽出を行い、使用したRNA量をβ-actinの発現量に対する比で評価した。プライマーはβ-actin, collagen Type I, osteocalcin および osteonectin を使用した。

3. ヒト歯根膜培養細胞増殖、活性の検討

保存終了後、解凍した細胞の増殖ならびに細胞活性の定量には、細胞増殖キットI（Roche 製）を用いたMTT法で行った。また、電子顕微鏡下の形態学的観察も行った。

【結果および考察】

超低温冷凍庫は、管理上および設備費用の点から開業医での設置は困難であることから、抜歯後の一時的な歯の保存温度および保存時間については本実験条件が考えられた。

今回の実験結果から室温(20℃)、4℃、-18℃の3つの条件のうち-18℃の条件が、すべての実験方法において最も高い活性値を示した。

通常我々は、プログラムフリーザを使用し毎分約-1℃の速度で-40℃まで冷却している。その後-80℃で保存した後、-150℃の超低温冷凍庫で保存する方法をとっている。普段使用している冷凍庫(-18℃)で一次保存を行うとコントロールの7割以上の歯根膜の活性維持が得られたことから、歯の凍結保存の方法として使える可能性があると思われる。また、凍結保存解凍によって低下した歯根膜の活性は、移植後の組織の治癒過程において見られる成長因子や、成長因子を多く含んだ物質を凍結歯の移植時に併用することで、期待できるのではないかとと思われる。

今回の実験により、抜歯後通常の冷凍庫での一時的保存が可能であるという事がわかり、一般歯科診療でも治療の一環として選択肢の幅を拡大する可能性が示唆される。今後更に歯の凍結保存技術を向上させるための実験が必要であり、凍結保存歯を用いた移植、再植法の術後における歯周組織再生にどのような影響を及ぼすかについても検討していきたい。

マウス胎仔歯胚および顎骨における SOST の発現と局在

奥羽大学歯学部歯科保存学講座修復学分野
中貴弘、横瀬敏志

Immunohistochemical Localization of SOST in the Developing Fetal Mouse Tooth Germ and Jawbone.
Division of Operative Dentistry Department of Conservative Dentistry Ohu University School of
Dentistry
Takahiro Naka and Satoshi Yokose

【目的】 SOST 遺伝子は、骨硬化症 (Sclerosteosis) の原因遺伝子として発見され、その症状としては頭蓋骨の肥厚化や下顎骨、肋骨、すべての長幹骨など全身の骨に異常が生じると言われている。近年、SOST 遺伝子産物である Sclerostin が骨細胞中に特異的に発生し、BMP シグナルや Wnt シグナルを抑制することで骨代謝を調整していることが明らかになった。一方、この遺伝子の異常によって生じる疾患である Van Bucham 病および骨硬化症では、部分的無歯症や萌出遅延、歯の形態異常が認められることも報告されている。これらの異常は、歯の形成期に何らかの異常が生じることによるものであろうが、詳細な検討はなされていないのが現状である。マウス胎仔歯胚 (以下 TG) は、胎生 11.5 日 (以下 E11.5) に口腔上皮組織が肥厚し、神経堤細胞由来の外胚葉性間葉組織と相互作用を繰り返しながら複雑な形態構築が行われる。形態学的には、E13.5 からの Bud stage、E14.5 からの Cap stage、E16.5 からの Bell stage を経て、歯の形態を構築する。一方、上下顎骨の発生は E14.5 頃より開始され、とくに歯槽骨に関しては TG の周囲に形成されることから、TG の発生と何らかの関係があるものと推察される。そこで今回、我々は石灰化組織の形成に重要な関与を果たすと言われている SOST に着目し、TG およびその周囲に形成される上下顎骨の発生においてどのような関与を果たすのかを検討する一環として、SOST の発現を、免疫組織化学的手法を応用し、形態学的に検討することで知見を得たので報告する。

【材料と方法】 実験には、E12.5~18.5 の ICR 系マウス胎仔および出生後 3 日 (P3) の ICR 系マウスを用いた。母体より摘出した胎仔および P3 のマウスを、10% 中性緩衝ホルマリンにて固定後、E14.5~P3 マウスは EDTA にて脱灰を行い、エタノール系列で脱水、キシレンにて透徹を実施した後、パラフィンに包埋し矢状断にて連続切片を作成した。同切片を用いて、抗マウス由来 SOST ヤギポリクロナール抗体を一次抗体とし、avidin biotin complex 法を用いた免疫組織化学的染色を行った。染色を行った切片は、ヘマトキシリンにて二重染色を行った後、光学顕微鏡下で観察を行った。

【結果と考察】 免疫組織化学的染色の結果、E12.5~13.5 の胎仔では、TG およびその周囲組織に抗 SOST 抗体陽性像は認められなかった。E14.5 では、TG 周囲に上下歯槽骨の形成が開始されている所見が認められ、骨基質内部に骨細胞の存在が観察された。抗 SOST 抗体陽性像は、形成された歯槽骨の骨細胞ならびに上下顎切歯 TG の Odontoblast に認められた。E16.5~E18.5 においても同様な所見が認められた。新生マウスの歯胚においては、臼歯 TG の Odontoblast にも染色陽性像が認められた。

以上の結果より、SOST は TG 発生の初期ではなく、硬組織形成が開始された後の Odontoblast の機能調節因子として関与を有する可能性が示唆された。

【結論】 SOST は、TG および顎骨の発生に関与する可能性が示唆された。

ヒト歯根膜由来細胞で BMP-2/BMP-7 の骨分化誘導機序における non-Smad の調節メカニズムの検討

¹⁾東京歯科大学歯科保存学講座 ²⁾東京歯科大学生化学講座 ³⁾東京歯科大学口腔科学研究センター
⁴⁾東京歯科大学小児歯科学講座

○手銭親良 ¹⁾³⁾ 間 奈津子 ¹⁾³⁾ 落合宏美 ²⁾ 山本康人 ²⁾ 山下治人 ⁴⁾ 東 俊文 ²⁾³⁾ 中川寛一 ¹⁾

Investigation of the regulation mechanism of non-Smad in the bone differentiation-inducing mechanism of BMP-2/BMP-7 in a human periodontal ligament derived cells.

¹⁾Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College ²⁾ Department of Biochemistry, Tokyo Dental College ³⁾ Tokyo Dental College Oral Health Science Center ⁴⁾ Department of pediatric dentistry, Tokyo Dental College

○Chikara Tezen ¹⁾³⁾, Natsuko Aida ¹⁾³⁾, Hiromi Ochiai ²⁾, Yasuhito Yamamoto ²⁾, Haruto Yamashita ⁴⁾,
Toshifumi Azuma ²⁾³⁾, Kan-Ichi Nakagawa ¹⁾

【目的】歯根膜には未分化な間葉系細胞が多く認められ、再生医療への応用が期待される。今回、演者らはヒト歯根膜由来細胞を材料に、BMP-2/BMP-7 で誘導される骨分化誘導過程でのマーカータンパク質の発現を定量的 Real-Time PCR 法を用いて解析し non-Smad 経路の関与について明らかにする。

【材料および方法】ヒト歯根膜由来細胞 (HPDL 細胞, Lonza, Switzerland) を 1×10^5 cells/cm² で 12 well プレートに播種し、未分化維持培養液 SCGM (Lonza) で 12 時間培養後、骨芽細胞分化誘導培地 {OBM: α - MEM (invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2% FBS, 50 μ g/ml L-アスコルビン酸 (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan), 10 mM β - グリセロリン酸 (Wako)} に培地を交換した。MAPK 系阻害剤として ERK 阻害剤 (FR180204, Calbiochem, Darmstadt, Germany)、JNK 阻害剤 (SP600125, calbiochem) を用いた。ERK 阻害剤は、Dimethyl sulfoxide (DMSO) にて溶解し、ストック溶液 10 mM を作製した。JNK 阻害剤は DMSO にてストック溶液 25 mM を作製した。HPDL 細胞をコントロール群、BMP-2/BMP-7 (100 ng/ml) 処理群、BMP-2/BMP-7 (100 ng/ml) + FR180204 (終濃度 25 μ M) 処理群、BMP-2/BMP-7 (100 ng/ml) + SP600125 (終濃度 25 μ M) 処理群に分け、37℃ の 5%CO₂ インキュベーター内で 48 時間および 96 時間培養した。96 時間培養群の一部は PBS で 2 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒド緩衝液で 5 分間固定した。PBS で 3 回洗浄後、BCIP/NBT 溶液 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用い 1 時間、暗所で Alkaline Phosphatase (ALP) を染色した。Real-Time PCR 反応は、Premix Ex Taq™ reagent (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用い、95℃ 10 秒、(95℃ 5 秒、60℃ 34 秒) $\times$ 40 サイクルで行い、骨分化マーカー {Runx2, Alkaline Phosphatase, Type I collagen (COL1A1)、Bonesialo protein (BSP)、Osterix (OSX)、Osteocalcin (OCN)} の発現を定量的に検出した。

【結果】コントロールと比較し ALP 染色像は BMP-2/BMP-7 処理群で増強した。ERK 阻害剤処理群は BMP-2/BMP-7 単独処理群とほとんど変化がなかった。JNK 阻害剤処理群は ALP 活性が著しく抑制された。定量的 Real-Time PCR の結果は、各時間において、BMP-2/BMP-7 処理群ではコントロールと比較し RUNX2 が 3~4 倍、ALP が 15~25 倍、COL1A1 が 4~7 倍、OSX が 300~350 倍、BSP が 200~700 倍、OCN が 30~140 倍の発現上昇を認めた。BMP-2/BMP-7 + ERK 阻害剤処理群は BMP-2/BMP-7 単独に比べ、後期骨分化マーカーである BSP、OCN に著しい減少が認められたが、前期骨分化マーカーである Runx2、ALP、COL1A1 には有意な変化は認められなかった。BMP-2/BMP-7 + JNK 阻害剤処理群は、全ての骨分化マーカーにおいて BMP-2/BMP-7 単独群に比べ著しい発現の低下を認めた。

【まとめ】ヒト歯根膜由来細胞 (HPDL 細胞) は BMP-2/BMP-7 により骨分化誘導が促進された。BMP-2/BMP-7 の作用は、ERK 阻害剤処理により骨分化後期のマーカーである BSP、OCN の発現のみが抑制され、JNK 阻害剤処理によつては全ての骨分化マーカーの発現が抑制された。

【結語】BMP-2/BMP-7 によるヒト歯根膜由来細胞の骨分化誘導は、MAPK 系キナーゼにより調節されている。