

## バイオフィルム形成 *Streptococcus intermedius* のゲノム解析

大阪歯科大学 細菌学講座<sup>1</sup>  
大阪歯科大学 口腔治療学講座<sup>2</sup>

○山根一芳<sup>1</sup>、山中武志<sup>1</sup>、真下千穂<sup>1</sup>、吉田匡宏<sup>2</sup>、林 宏行<sup>2</sup>、南部隆之<sup>1</sup>、円山由郷<sup>1</sup>、福島久典<sup>1</sup>

### Genome sequencing and analysis of biofilm-forming *Streptococcus intermedius*

Department of Bacteriology<sup>1</sup> and Department of Endodontics<sup>2</sup>, Osaka Dental University

○YAMANE Kazuyoshi<sup>1</sup>, YAMANAKA Takeshi<sup>1</sup>, MASHIMO Chiho<sup>1</sup>, YOSHIDA Masahiro, HAYASHI Hiroyuki<sup>2</sup>, NAMBU Takayuki<sup>1</sup>, MARUYAMA Hugo<sup>1</sup>, FUKUSHIMA Hisanori<sup>1</sup>

【背景】細菌はバイオフィルムを形成することで周囲の環境から自身を保護し、長期に生き残ることができる。歯科領域においても細菌感染症の慢性化、難治化がしばしば問題となっており、原因の1つとして原因菌のバイオフィルム形成性の関与が示唆されている。我々はこれまでに、難治性の根尖性歯周炎病巣より分離した *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), *Rothia mucilaginosa*, 閉鎖性の骨膜下膿瘍から分離した *Streptococcus intermedius* (*S. intermedius*) に著明なバイオフィルム構造をもつ菌株が存在し、これらの菌株が形成するバイオフィルムが病巣での細菌残存因子になっていることを報告してきた。*S. intermedius* はアングイノサス群に属するレンサ球菌で、口腔内の常在細菌叢に存在するアングイノサス群レンサ球菌は日和見感染症の原因菌として口腔や深部臓器に化膿性疾患を引き起こすことが知られている。また、慢性歯周炎や上部消化器癌との関連性も疑われるなど、臨床的に重要な細菌であることが再認識されている。

【目的】本研究では *S. intermedius* のバイオフィルム形成に関与する遺伝子を明らかにすることを目的に、口腔膿瘍から分離した *S. intermedius* のゲノムをシーケンシングし、遺伝子解析した。

#### 【材料および方法】

##### 1. 供試菌

バイオフィルムを形成する *S. intermedius* 臨床分離株 (H39 株) を供試した。

##### 2. ゲノムシーケンシング

MagExtractor (TOYOBO) で H39 株のゲノム DNA を抽出、精製した。精製したゲノム DNA から GS Rapid Library Prep Kit (Roche Diagnostics) を用いてライブラリーを作成した。GS Junior Titanium emPCR Kit を用いてライブラリー DNA を鋳型として、ビーズ上に DNA を増幅したのち GS Junior Titanium Sequencing Kit を用いて GS Junior System でパイロシーケンスした。

##### 3. 遺伝子解析

得られたシーケンシングデータを GS *de novo* Assembler を用いてアセンブルし、contig を構築した。Contig 内の塩基配列から the Gene Locator and Interpolated Markov ModelER (Glimmer) を用いて CDSs を予測し、データベース上で同一性の高い配列を検索した。

【結果と考察】ゲノム遺伝子をパイロシーケンス法で解析した結果、35,026,349bp の塩基をシーケンシングできた。また、平均リード長は 457bp であった。アセンブルの結果、55 の contig を構築することができ、その内 500bp 以上の長さの contig が 44 得られた。遺伝子予測の結果、バイオフィルム形成に関与すると考えられている多糖の新生経路、分泌輸送経路の遺伝子、バイオフィルム形成調節に関与すると考えられているストレス応答系の遺伝子と同一性の高い領域が観察された。H39 株のバイオフィルム形成は glucose によって増強されることが分かっており、ゲノム内には *B. subtilis* でバイオフィルム形成に重要な働きをしている  $\alpha$ -phosphoglucomutase のホモログが存在することが明らかになっている。今回の解析でこの遺伝子の周囲には *Pseudomonas aeruginosa* でバイオフィルム形成時に発現が増加する遺伝子のホモログも存在することが分かり、これらの遺伝子群がバイオフィルム形成に関わっていることが示唆された。

本研究は科学研究費補助金 基盤研究 (C) (23592724)、若手研究 (B) (23792118) の助成を受けたものである。

## 難治性根尖性歯周炎に関わるバイオフィーム構成細菌種と臨床症状との関係

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)

○ 藪根敏晃、野杵由一郎、山本れいこ、山口幹代、朝日陽子、前菌葉月、永山智崇、呉本勝隆、  
騎馬和歌子、林 美加子、恵比須繁之

### The relationship between Extraradicular Biofilm-forming Bacteria and Clinical Symptoms Associated with Refractory Periapical Periodontitis

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry  
○YABUNE Toshiaki, NOIRI Yuichiro, YAMAMOTO Reiko, YAMAGUCHI Mikiyo, ASAHY Yoko, MAEZONO Hazuki,  
NAGAYAMA Tomotaka, KUREMOTO Katsutaka, KIBA Wakako, HAYASHI Mikako, EBISU Shigeyuki

#### 【研究目的】

我々は、根尖孔外に形成されたバイオフィームが根尖性歯周炎の難治化の一因であることを報告してきた<sup>1),2)</sup>。根尖孔外バイオフィームの構成細菌に関し、これまでに培養法による細菌種の同定の報告はあるが、口腔内には VNC (Viable but Non-Cultivable) 細菌を含め、これまでに同定されていない細菌あるいは培養が困難な細菌種が存在する可能性が示唆されており、根尖孔外バイオフィームの構成細菌に関してもこれまでに検出されていない細菌が存在すると思われる。そして、難治性根尖性歯周炎患者より採取した試料から 16S rRNA 遺伝子解析による分子生物学的手法を用いて、根尖孔外の細菌バイオフィームを構成する細菌種を同定した<sup>2)</sup>。そこで本研究では、根管内外および根尖孔外バイオフィーム構成細菌種を以前と同一の方法で同定するとともに、各種臨床症状との関連性を検討した。

#### 【材料および方法】

大阪大学歯学部附属病院保存科を受診した根尖性歯周炎罹患患者のうち、本研究に関して同意の得られた患者に術前診査を行い、バイオフィーム試料を採取した。難治性根尖性歯周炎と診断された 15 歯の抜去歯、歯根端切除術により切断された 13 歯片、ならびに根尖孔外に溢出したガッタパーチャポイント 2 本から採取したバイオフィームを根尖孔外のバイオフィーム試料 (計 30 試料) とした。これらのバイオフィーム試料は、採取後直ちに生理食塩水にて洗浄し、キュレットにて根尖孔外相当部を搔爬して採取した。難治性根尖性歯周炎の診断基準は、再感染根管治療を行っても臨床症状の改善、あるいは X 線的に根尖病巣の縮小傾向が認められないものとし、歯根破折あるいは根尖に至る歯周ポケットを有する歯は本研究から除外した。一方、通常の感染根管治療を行い、K-file のファイリング操作により根管内から採取し、最終的に非難治性根尖性歯周炎と診断された 27 歯の試料を根管内バイオフィーム試料とした。

得られたバイオフィーム試料から、InstaGene Matrix を用いて細菌 DNA を抽出し、PCR にて 16S rRNA 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物を pDrive cloning vector にサブクローニングし、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  に形質転換した。各試料につき 96 クロオンを無作為に選択し、ミニプレップにてプラスミドを精製し、BigDye Terminator cycle sequence kit を用いてシーケンスを行った。BLAST program にて得られた塩基配列を解析し、細菌種を同定した。98~100%の相同性を示したものを同一細菌種とし、90~98%の相同性を示したものは同一細菌属、90%未満のものは除外した。また、試料採取した歯の臨床所見についても記録した。

#### 【結果および考察】

難治性根尖性歯周炎罹患歯から得られた 30 試料の根尖孔外バイオフィームから検出された細菌は、頻度の高いものから順に *Uncultured bacterium* (30 試料)、*Porphyromonas gingivalis* (18 試料)、*Prevotella sp.* (17 試料)、*Bacteroides sp.* (17 試料)、*Tannerella forsythia* (16 試料)、*Fusobacterium nucleatum* (14 試料)、*Peptostreptococcus sp.* (11 試料)、*Eubacterium sp.* (10 試料) であった。また、13 試料からは *P. gingivalis* と *T. forsythia* が共に検出された。*Prevotella sp.* が根尖孔外から検出された症例では、自発痛の既往、発赤・腫脹の既往、打診痛が平均より高い頻度で発現した。また、*Bacteroides sp.* では自発痛の既往が比較的高い頻度でみられた。

また、非難治性根尖性歯周炎歯の根管試料 (計 27 試料) から検出された細菌は、頻度の高いものから順に *Uncultured bacterium* (27 試料)、*Prevotella sp.* (13 試料)、*Eubacterium sp.* (12 試料)、*P. gingivalis* (11 試料)、*Slackia exigua* (旧 *Eubacterium exiguum*) (11 試料)、*Bacteroides sp.* (10 試料) であった。

本研究で用いた 16S rRNA 遺伝子解析による細菌同定法により、従来の培養法では培養困難であった糖非分解性偏性嫌気性グラム陽性細菌の *Eubacterium sp.*、*Slackia exigua* ならびに *Uncultured bacterium* が検出された。

難治症例では非難治症例に比べて、排膿の既往、腫脹・発赤の既往、瘻孔と発赤・腫脹の出現頻度が高かった。*P. gingivalis* と *T. forsythia* は根尖孔外から同時に高頻度 (13/30) で検出され、この 2 細菌種の共存が、根尖性歯周炎の難治化に密接に関連していることが明らかとなった。

#### 【参考文献】

- 1) Noiri Y *et al.* *J Endod* 28: 679-683, 2002.
- 2) Noguchi N *et al.* *Appl Environ Microbiol* 71: 8738-8743, 2005.

## 根尖性歯周炎病巣に認められる細菌の菌種間相互作用

<sup>1)</sup>東京歯科大学歯科保存学講座 <sup>2)</sup>東京歯科大学微生物学講座  
○堀内 章<sup>1)</sup> 額賀智之<sup>1)</sup> 浅井知宏<sup>1)</sup> 石原和幸<sup>2)</sup>

### Synergistic effect among periodontopathic bacteria in apical periodontitis

<sup>1)</sup> Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College  
<sup>2)</sup> Department of Microbiology, Tokyo Dental College  
○Akira Horiuchi<sup>1)</sup> Tomoyuki Nukaga<sup>1)</sup> Tomohiro Asai<sup>1)</sup> Kazuyuki Ishihara<sup>2)</sup>

#### 研究目的

根尖性歯周組織炎の主要な原因は、根管細菌である。根尖の病巣から認められている菌は多種にわたるが、病巣部からの検出率の高いものとして、*Streptococcus*, *Parvimonas*, *Fusobacterium*, *Prevotella/Porphyromonas* 等がある。これらの細菌により根尖部に形成されたバイオフィームは、難治性の根尖性歯周炎の原因の 1 つと考えられている。慢性歯周炎のバイオフィーム構成細菌とその形成についての研究は多いが、根尖部においてはまだ少なく、明らかにされていない点が多い。*Parvimonas micra* は、根尖性歯周炎病巣および難治性歯周炎病巣に認められる嫌気性グラム陽性球菌である。本菌は根尖病巣からの検出率が高いものの、その病原性および根尖病巣でのバイオフィーム形成性に関しては明らかにされていない。本研究は、*P. micra* に焦点を当て、他菌種との間での共培養による *P. micra* の増殖の変化および共凝集を検討することにより、本菌のバイオフィーム形成能について解析することを目的とした。

#### 方法

菌種として *P. micra* JCM 12970, *Fusobacterium nucleatum* TDC 100, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, *Streptococcus mutans* Ingbritt, *Prevotella intermedia* TDC 19B, *Capnocytophaga ochracea* ATCC 33596, *Staphyrococcus epidermidis* TDC 86 を供試した。培養はヘミン (5 μg/ml) およびメナジオン (0.5 μg/ml) を添加した Brain heart infusion broth (BHI) を用いた。菌を液体培地に摂取し 37°C にて 2 日間嫌気下にて予備培養した。Type1 collagen でコートされた 12 ウェルプレート各 well (outer well) に予備培養した *P. micra* 菌液を接種した。さらに、底部が 0.4 μm の孔径の membrane より構成されている well (inner well) を outer well 内にセットし、そこに前培養した partner strain を接種した。対象としては、*P. micra* を単独で培養したものを作製した。それぞれの菌と共培養した *P. micra* の増殖を、660 nm の吸光度により 4 日間測定し、共培養による増殖速度の変化を解析した。菌種間の共凝集は、2 種の菌をそれぞれ coaggregation buffer に懸濁し 660 nm の吸光度を 2.0 にあわせた後に混合し 1 時間後まで静置し、凝集程度を Cisar らの visual scale によって判定した。

#### 結果および考察

供試した菌株のうち *P. gingivalis* ATCC 33277, *F. nucleatum* TDC 100, *S. epidermidis* TDC 86, *P. intermedia* TDC 19B, *C. ochracea* ATCC 33596 が *P. micra* JCM 12970 の増殖を促進した。*S. mutans* Ingbritt は *P. micra* の増殖に影響を与えなかった。促進効果が認められた菌種の組み合わせのうち *P. gingivalis* では *P. micra* の増殖が単独培養に比べ 2 日目に 2.18 倍、*F. nucleatum* と *P. micra* の共培養では、4 日目に 1.92 倍、*P. intermedia* では 3 日目 1.64 倍、*S. epidermidis* では 4 日目に 1.49 倍であった。また、共凝集については、供試菌株のうち *P. micra* JCM 12970 と共凝集したものは *P. gingivalis* ATCC 33277, *F. nucleatum* TDC 100 の 2 菌種であった。

これらの結果より、*P. micra* は、*P. gingivalis*, *F. nucleatum* との共凝集と増殖促進作用により根尖部でのバイオフィーム形成に関与することが示唆された。

イオン導入法における薬剤の抗菌効果と通電性に関する検討

鶴見大学歯学部・口腔微生物学講座  
○加藤大輔、小山隆夫、前田伸子

In-vitro Evaluation for Microbicidal Effects of Iontophoresis, and a Relationship with electrical resistance.

Department of Oral bacteriology, Tsurumi Univ. School of Dental Medicine

○Daisuke Kato, Takao Oyama, Nobuko Maeda

【目的】根尖部における微生物の残存が、難治性根尖性歯周炎の原因であることは周知の事実であり、今までに多くの種類の微生物の検出が報告されている。今まで我々は、根尖性歯周炎実験モデルを用いて、いくつかの微生物に対する根管消毒剤やイオン導入法の抗菌効果について検討し、薬剤への反応は微生物種によって多種多様であることを、これまでの日本歯科保存学会で報告した。今回我々は根管模型を用いて、イオン導入法における各薬剤の抗菌効果と、さらに薬剤の通電性について検討した。

【方法】被検菌株として *Candida albicans* ATCC18804 株、*Staphylococcus aureus* 209P 株を用いた。また比較対象として *Escherichia coli* ATCC25922 株を使用した。被検菌株は Tryptic Soy 寒天培地上で培養後、およそ  $10^6$  cfu/ml となるよう調整した。根管模型を用いた根尖部病巣モデルは、根尖部病巣に相当する腔に、滅菌生食寒天  $30\mu\text{l}$ 、被検微生物含有羊脱繊維血添加寒天  $30\mu\text{l}$ 、滅菌生食寒天  $70\mu\text{l}$  の順に重層し、実験的根尖部病巣とした。イオン導入はカントップ・ジュニアを用いて、通電した場合と貼薬のみの場合で、それぞれの薬剤を比較検討した。イオン導入には、薬剤は 38% フッ化ジアンミン銀溶液 (DSF)、アンモニア銀溶液 (ASH)、カントップ用ヨード・ヨード亜鉛液 (IZI) を用いて、それぞれ 1mA の定電流で一定時間 (5分・10分・25分・50分) 作用させた。イオン導入後、あるいは貼薬後に根尖部病巣モデルから被検細菌を回収し、適宜希釈後コロニー数 (log CFU/ml) を測定した。また通電性については、電圧計にて 1 分間隔で電圧を測定し、抵抗値 ( $\Omega$ ) を算出した。

【結果と考察】どの微生物に対しても、DSF は通電した方が、全体的に高い抗菌効果が得られた。また、通電時の抵抗値も低い値で一定であった。これは、薬剤が通電により高い抗菌性を保持したまま、迅速に病巣局所に到達するためであると考察される。一方で、同じ銀系薬剤である ASH は、十分な抗菌性が得られなかった。また、通電開始から数分で抵抗値が上昇し始めた。そのために薬剤が病巣に十分に行き渡らず、抗菌性が得られなかった可能性が示唆された。また抵抗値の上昇は、根尖局所の温度上昇に繋がり、それが術中の疼痛発生の原因になるかもしれない。IZI 使用時では、抵抗値は低く安定しているものの、これも十分な抗菌性検を發揮することはなかったことから、薬剤自体の抗菌性が弱いことが示唆された。以上のことから、イオン導入法における根管消毒剤の選択は、過去の我々の実験結果からも、抗菌性が高くかつ抵抗値の低い DSF を用いるのが最も有効であると思われる。イオン導入法は、複雑な根管形状の歯牙などに対しても、確実に薬剤を病巣に到達させることが可能であると考察され、難治症例においても非常に有用な手段の一つであると考えられる。

【結論】イオン導入法において、優れた抗菌性と通電性を併せ持つ薬剤は DSF であった。

## 次亜塩素酸電解水の細胞傷害性とその作用機序の解析

明海大学 歯学部 機能保存回復学講座 歯内療法学分野<sup>1</sup>, 病態診断治療学講座 薬理学分野<sup>2</sup>,  
口腔生物再生医学講座 歯周病学分野<sup>3</sup>  
○井出祐樹<sup>1</sup>, 中村裕子<sup>1</sup>, 梅村直己<sup>2</sup>, 小林健二<sup>1</sup>, 小谷依子<sup>1</sup>, 高橋哲哉<sup>1</sup>, 坂上 宏<sup>2</sup>, 申 基喆<sup>1,3</sup>

**Analysis of Cytotoxic Mechanism of Hypochlorous-acid Electrolyzed Water**  
Division of Endodontics, Department of Restorative and Biomaterials Sciences<sup>1</sup>,  
Division of Pharmacology, Department of Diagnostic and Therapeutic Sciences<sup>2</sup>,  
Division of periodontology, Department of Oral Biology and Tissue Engineering<sup>3</sup>,  
Meikai University School of Dentistry

○ Ide Yuki<sup>1</sup>, Nakamura Yuko<sup>1</sup>, Umemura Naoki<sup>2</sup>, Kobayashi Kenji<sup>1</sup>, Kotani Yoriko<sup>1</sup>, Takahashi Tetsuya<sup>1</sup>,  
Sakagami Hiroshi<sup>2</sup> and Shin Kitetsu<sup>1,3</sup>.

### 【目的】

次亜塩素酸電解機能水(Hypochlorous-acid Electrolyzed Water:HEW)は、炭酸(H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)と塩化ナトリウム(NaCl)溶液を電気分解することによって生成される中性(pH:7.2)で高濃度の有効塩素濃度(650ppm)を有する電解水である。その殺菌効果は、陰イオンの活性酸素と次亜塩素酸(HClO)によるものと考えられている。近年、その高い殺菌作用とバイオフィーム除去効果、環境および生体への安全性から次亜塩素酸ナトリウム溶液に代わる根管洗浄剤として期待されている。これまで我々が行った研究においても、*E. faecalis*のバイオフィーム形成細菌に対して高いバイオフィーム除去効果および抗菌効果が認められた。一方で、本溶液は宿主細胞に対する傷害性を有することも認められている。しかし、傷害性に関する詳細な検討は行われていない。そこで、安全かつ有効に使用することを目的に、本研究では、HEWによる細胞死の様態をウェスタンブロット、フローサイトメトリーを用いて解析した。また、メカニズムを解明するため、抗酸化剤による細胞死の抑制について検討を行った。

### 【材料および方法】

HEWは、パーフェクトペリオ生成装置(パーフェクトペリオ株式会社)により、実験直前に生成したものをを用いた。標的細胞としてヒト歯髄線維芽細胞(HPC)および末梢血好中球(PMN)を用いた。本研究の遂行は、明海大学倫理委員会の承認を得た後(承認番号A0209, A0210)、ガイドラインに従って行った。HPCは、4~6継代の細胞を実験に用いた。PMNは、全身的に特記すべき既往歴のない健康な研究員の末梢血よりMono-Poly resolving medium(Flow Laboratories Inc, USA)を用いた密度遠心勾配法によって分離・調製した。

(細胞死の様態)HPCでは、各濃度のHEWにより刺激し、cPARPの検出によるアポトーシス誘導性の有無をウェスタンブロット法により解析した。PMNでは、各濃度のHEWで処理した細胞をAnnexin V-fluorescein isothiocyanate(FITC)およびpropidium iodide(PI)で染色し、フローサイトメトリーにより解析した。

(細胞死のメカニズム)抗酸化剤として、EDTA, NACおよびGSHを用い、HEWによる細胞傷害性に対する抑制効果を検討した。対象にはPMNを用いた。細胞傷害性は、cell counting Kit-8およびトリパンブルー色素排除試験にて算出した。さらに、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。

### 【結果】

HEWで刺激されたHPCのウェスタンブロット解析による結果、cPARPは検出されなかった。フローサイトメトリー解析による結果、PMNはHEWの濃度に依存して、FITCとPIの両方に染色されることが認められた。抗酸化剤による影響を検討した結果、NACおよびGSHなどSH基を有する抗酸化剤は、HEWによるPMNの細胞傷害作用を有意に抑制することが認められた。

### 【考察および結論】

本研究における結果から、HEWのHPCに対する細胞死の様態はアポトーシスによるものではなく、ネクロシスの様態を呈する可能性が高いことが示された。一方、PMNでは、FITCとPIの両方に染色される細胞が多く認められたことから、細胞膜の内側に局在するフォスファチジルセリン(PS)とAnnexin-Vが結合し、アポトーシス性の細胞死が誘導された後、アポトーシスの進行に伴い細胞膜の構造が崩壊して二次的な細胞壊死の状態に至った可能性がある。根尖周囲に浸潤した好中球のネクロシスによる細胞死は、各種酵素や活性酸素の放出を招き、炎症を増悪させる可能性があり、アポトーシスへ誘導されることが望ましいと考えられる。抗酸化剤により細胞死が抑制されたことから、HEWに含まれる活性酸素が細胞死に強く関わっている可能性が高い。今後、細胞死に関する詳細な検討を加え、HEWの生体に対する安全性を確立していきたいと考えている。

## 微酸性電解水の *Enterococcus faecalis* に対する殺菌効果

鶴見大学歯学部歯内療法学講座、\* 口腔微生物学講座

○池野正典、中野雅子、小澤寿子、高尾亜由子\*、前田伸子\*、細矢哲康

Effects of slightly acidic electrolyzed functional water on *Enterococcus faecalis*

Department of Endodontology, Tsurumi University, School of Dental Medicine

○Ikeno Masanori, Nakano Masako, Ozawa Toshiko, Takao Ayuko, Maeda Nobuko, Hosoya Noriyasu

### 目的

2~6%の希塩酸の電気分解により生成する微酸性電解水は、生体や環境への安全性と高い殺菌消毒効果で注目されている。鶴見大学歯学部附属病院では、2010年7月水回路のバイオフィーム汚染の防止を目的として、微酸性電解水を供給する歯科用チェアユニットを設置した。ユニット水の微生物学的検査を継続しているが、現時点まで水回路汚染は認められていない。また、水道水を供給している水回路から検出された従属栄養細菌に対し微酸性電解水は殺菌効果を示すことを、第134回日本歯科保存学会春季学術大会にて発表した。今回は、さらに歯科診療時の治療部位への消毒効果を検証する目的で、感染根管から分離される細菌の一つである *Enterococcus faecalis* (ATCC19433)(以下 *E.f.*) を使用し、本ユニットより採水した微酸性電解水の *in vitro* での殺菌効果を検討した。

### 材料と方法

微酸性電解水(有効塩素濃度:10~30ppm、pH6.3~6.8)は、生成装置(3%希塩酸を電気分解)を搭載した歯科用チェアユニット(SPACELINE EMCIA 3型、モリタ製作所)のコップ給水部より採取直後のものを用いた。

<浮遊菌に対する殺菌作用> *E.f.* 浮遊懸濁液(10<sup>7</sup> CFU/ml)に滅菌水または微酸性電解水を1分間接触、0.5%チオ硫酸ナトリウム液で中和した。試料を適宜希釈後、Tryptic-Soy (TS)寒天培地に塗抹、37°Cで培養し生残菌コロニー数を算定した。

<バイオフィームに対する殺菌作用> 96穴平底マイクロプレートにTS培地または1%ウサギプラズマ添加TS培地を分注し、*E.f.*懸濁液(5×10<sup>5</sup>CFU/ウェル)を接種、37°Cで好気または嫌気培養した。5日後、ウェルから培養上清を除去、PBS洗浄後、滅菌水または微酸性電解水を作用させた。作用時間は1分間とし、液を交換しない場合と1分間に4回液を交換する条件で比較した。作用時間終了後、中和とPBS洗浄を行い、Alamar Blue (Invitrogen)・TS混合液をウェルに添加し37°Cで培養、蛍光強度変化(励起波長:530nm, 蛍光検出波長590nm)により生残菌の代謝活性を評価した。

### 結果

(1) *E.f.* 浮遊菌は、微酸性電解水を1分間作用させることにより生菌数が検出限界以下になった。

(2) バイオフィームへの殺菌効果では、液を交換しない群では滅菌水処理に比べ、微酸性電解水処理で代謝活性が10~30%に低下した。しかし、プラズマ添加培養群においては効果が減弱した。微酸性電解水の交換を4回行った群では、代謝活性は滅菌水処理時の3%以下となり、プラズマ添加培養群に対しても同程度の有効性が維持された。

### 考察・結論

微酸性電解水は *E.f.* 浮遊菌に対して1分で殺菌効果を示したがこれまでの報告を考慮すると、より短時間で殺菌効果を示すと思われる。プラズマ添加条件で形成されたバイオフィームには作用が不十分であり、頻繁に液を交換した場合にのみ強い殺菌効果が得られた。したがって臨床での使用を想定した場合は多量の微酸性電解水による局所洗浄が必要である。また、超音波洗浄機器を介して水流とともに根管洗浄を行う場合には、根管内の消毒に微酸性電解水をユニット水として使用するメリットが期待される他、微酸性電解水は歯周病菌や齲蝕菌への殺菌効果を示すことから広範囲な治療効果が期待できる。一方で、有機質成分存在下での効果の減弱は考慮すべきであり、現在作用時間など、条件の至適化を検討中である。

## 生体に安全な薬剤と超音波洗浄を併用した時のスメア一層除去効果の検討

昭和大学歯学部歯内治療学講座<sup>1</sup>

昭和大学歯学部歯科理工学講座<sup>2</sup>

○鈴木重紀<sup>1</sup> 山田嘉重<sup>1</sup> 増田宜子<sup>1</sup> 宮崎隆<sup>2</sup>

### Effect of removing the smear layer by using of a ultrasonic irrigation with several safety medicines

The Department of Endodontology, Dentistry of Showa University<sup>1</sup>

The Department of Dental Materials and Devices, Dentistry of Showa University<sup>2</sup>

○Shigenori Suzuki<sup>1</sup> Yoshishige Yamada<sup>1</sup> Yoshiko Masuda<sup>1</sup> Takashi Miyazaki<sup>2</sup>

#### <研究目的>

リーマー・ファイルなどによる機械的拡大により根管壁にスメア一層が付着することが知られており、スメア一層を除去することが根管洗浄の目的の一つとして考えられている。現在、根管洗浄は一般的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液単独あるいは、EDTAとの併用で用いられることが多い。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は非常に優れた有機質溶解作用、殺菌作用を持つことから広く用いられている。一方、腐食作用が強く危険性が生じることが報告されている。そこで、本研究では、生体に安全と思われる薬剤と超音波洗浄を組み合わせることで効果的な根管洗浄結果が得られるかを検討した。

#### <材料および方法>

11本の根管未処置のヒト永久抜去歯(単根)をセメント・エナメル境にて歯冠を切断し、歯冠側1/3をGates-Glidden drillにて根管口の明示を行った。その後K-Fileを用いて#60まで根管拡大を行い、Fileの拡大号数を上げるごとに5%NaOClにて根管洗浄を行った。5秒ごとに薬液を補充しながらOSADA ENACを用い、超音波洗浄(US)を60秒行った。観察試片作製にあたり、歯根を頬舌的に分割し根管壁面を露出させた。脱水および蒸着後、走査型電子顕微鏡を用いて各試料の中央部および根尖部の根管壁面を中心に3000倍の倍率で観察した。スメア一層の残存状態をHulsmannら(1997)のスコアで判定した。実験グループは、対照群 生理食塩水+US、Group A オゾンナノバブル水(AQUA NANO DENTAL)+US、Group B キトサン水溶液(スーパーグリーン)+US、Group C 10%クエン酸溶液+US、Group D 重曹水溶液+USとした。

#### <成績>

対照群：根中央部・根尖部ともにスメア一層が広範囲にあり、象牙細管の開口をほとんど確認されなかった。

Group A：根中央部においてまばらにスメア一層が認められるが象牙細管が部分的に開口していた。

根尖部は密なスメア一層で覆われていた。

Group B：根中央部・根尖部ともにスメア一層が広範囲にあり、象牙細管の開口をほとんど確認されなかった。

Group C：根中央部・根尖部ともにスメア一層が少量散在していたが、広範囲で象牙細管の開口を確認された。

Group D：根中央部・根尖部ともにスメア一層がまばらに存在し、象牙細管が部分的に開口していた。

#### <考察>

根中央部の洗浄効果に対して、Group A,C,Dでは、チップ中央部に相対する壁面のスメア一層の除去が顕著であった。これはファイルの振動の腹部から発生したAcoustic streamingが壁に衝突した部位に相当することから洗浄の機序にAcoustic streamingが大きく関与しているのではないかとと思われる。

根尖部の洗浄効果に対して、Group A,Bでは、ほとんどスメア一層を除去することができなかったが、チップが接したと思われる壁面のみスメア一層の除去が確認できた。Group Cでは、クエン酸によるスメア一層の溶解も加わったため、根尖部までスメア一層がある程度除去できたものと考えられる。Group Dでは、スメア一層の除去は認められたがGroup Cより顕著でなかった。

#### <結論>

クエン酸水溶液では超音波洗浄と併用することで効果的な洗浄効果を得ることが確認された。しかし、それ以外の水溶液では期待しうる洗浄効果は得られなかった。今後は生体への安全性を考慮し、さらなる検討を予定している。

## ウォータージェットポンプを用いたスミア層除去に関する検討

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座

○小倉陽子 前田宗宏 勝海一郎

### Removal of Smear Layer by Water Jet Pump

Department of Endodontics and Operative Dentistry

Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo.

○Ogura Y., Maeda M. and Katsuumi I.

#### 【目的】

この実験の目的は、ウォータージェットポンプを用いた切削象牙質面のスミア層除去の効果を検討したものである。

#### 【材料および方法】

実験には、象牙質にう蝕のないヒト単根抜去歯9本を使用した。咬合面にダイヤモンドバーを用いて縦2mm×横2mm×深さ2mmの窩洞を形成したのち、歯を3本ずつ3群に分け、以下の条件で窩洞内の処理を行った。

Gr1：直径0.1mmの噴出口を持つ試作ウォータージェットポンプ装置による3分間の洗浄（水圧5MPa, 蒸留水噴出量120ml）

Gr2：27Gの洗浄針を装着したシリンジによる3分間の洗浄（蒸留水120ml）

Gr3：洗浄なし（コントロール）

各群とも、洗浄は噴射口またはシリンジの先端が象牙質窩底部から垂直的に10mmの位置になるよう固定して行った。洗浄後、走査電子顕微鏡（SEM）で窩底の象牙質の状態を試料ごとに任意の点（3カ所）を1000倍で撮影し、得られた観察画像から象牙細管の開口状態の判定を行った。判定は、歯内療法を専門とする研究者5名が以下の判定基準に基づき行った。

判定基準

0：スミア層なし。細管は開口し、スミア層は完全に除去されている。

1：部分的なスミア層の除去。象牙細管の輪郭が観察可能である。

2：薄いスミア層による表面の被覆。象牙細管の位置はクラックにより示されるが、輪郭の確認は困難である。

3：分厚いスミア層による被覆。象牙細管の輪郭の確認は不可能である。

統計学的解析は、判定結果をもとにKendallの検定により5名の評価者間の一致度で評価した。

#### 【結果および考察】

いずれの群においてもスミア層が完全に除去されたものはなかった。Gr1では、窩底面の切削片やデブリスが除去され、象牙細管の開口が認められるもの、もしくは細管の存在が確認できる状態まで洗浄されたものが多く、判定値の平均は1.84であった。Gr2, Gr3では切削片やデブリスが多く残存し、象牙細管を確認することが困難なものが多かった。判定値の平均はGr2が2.80, Gr3が2.64であった。なお、評価者間には一貫性が確認された（ $W=0.288$ ）。

今回の結果から、象牙質表面のスミア層除去の一法としてウォータージェット技法の応用の可能性が示唆された。今後、さらに検討を行う予定である。

薬液を応用した NiTi ファイル破折片の除去に関する研究  
—薬液への間欠的な浸漬が腐食に及ぼす影響—

<sup>1</sup>明海大学歯学部 機能保存回復学講座 歯内療法学分野  
<sup>2</sup>明海大学歯学部 口腔生物再生医工学講座 歯周病学分野  
○高橋哲哉<sup>1</sup>, 小林健二<sup>1</sup>, 牛込瑛子<sup>1</sup>, 小谷依子<sup>1</sup>, 中村裕子<sup>1</sup>, 申 基詰<sup>1,2</sup>

A Study on Removing Broken NiTi Files by Using Solution  
— Effect of Intermittent Immersion to Solution on the Corrosion of NiTi Files —

<sup>1</sup>Division of Endodontics, Department of Restorative and Biomaterials Sciences,  
<sup>2</sup>Division of Periodontology, Department of Oral Biology and Tissue Engineering,  
Meikai University School of Dentistry  
○TAKAHASHI Tetsuya<sup>1</sup>, KOBAYASHI Kenji<sup>1</sup>, USHIGOME Eiko<sup>1</sup>,  
KOTANI Yoriko<sup>1</sup>, NAKAMURA Yuko<sup>1</sup> and SHIN Kitetsu<sup>1,2</sup>

**【緒言】** 根管内で破折した NiTi ファイルの除去に関する報告は少なく、除去方法は確立されていない。そのため我々は、根管内から NiTi ファイル破折片を容易に除去する方法の確立を目的とし、薬液の応用により破折片を腐食させる基礎的研究を行ってきた。これまでに、2種類の薬液を NiTi ファイル破折片に作用させた場合、3~24時間の浸漬によって破折片は腐食溶解を示し、薬液温度の上昇により腐食溶解に要する時間は短縮することを報告した (the 15th Biennial Congress of the ESE in Rome, 2011)。今回、NiTi ファイル破折片を薬液に連続的および間欠的に浸漬して、経時的な重量変化を測定し、X線マイクロアナライザーによる表面構造の観察を行った。そして薬液への間欠的な浸漬が NiTi ファイル破折片の腐食に及ぼす影響について検討を行った。

**【材料および方法】** NiTi ファイルは、ProTaper®(Dentsply Maillefer) #25/F2を使用した。ファイルは全て未使用のものを用い、それぞれ先端から5mmの部位をバイスで固定し、回転して破断させたものを試料とした。浸漬薬液には、10%次亜塩素酸ナトリウム溶液に19%塩化ナトリウムを加えて調製した薬液(以下NCN)、pH4.5に調整したリン酸酸性2%フッ化ナトリウム溶液(以下APF)および脱イオン水(以下control)を、1試料当たり5ml用いた。  
<連続的な浸漬>試料は各薬液にそれぞれ浸漬し、37°Cに設定した恒温槽中で保存した。そして、1、3および6時間後の重量を測定した。また、X線マイクロアナライザー(JCMA-733, JEOL)を使用して、3時間浸漬した試料の形態学的変化を観察した。

<間欠的な浸漬>試料は各薬液にそれぞれ浸漬し、37°Cに設定した恒温槽中で1時間保存した後取り出し、重量を測定した。そして23時間後、新たに調製した薬液に浸漬し、37°Cに設定した恒温槽中でさらに1時間保存して取り出し、重量を測定した。以上の操作を総浸漬時間が6時間となるまで行った。また、X線マイクロアナライザーを使用して、総浸漬時間が3時間となった試料の形態学的変化を観察した。

**【結果および考察】** NCNに連続的に浸漬した場合、重量は1時間後より急速に減少し、SEMによる観察ではファイル破断側から先端側に向かって進行する崩壊像が認められた。また、間欠的に浸漬した場合、重量は連続的な浸漬と同様の傾向で減少し、SEMによる観察でも同様の崩壊像を示した。一方、APFに連続的に浸漬した場合、重量は緩やかに減少し、SEMによる観察ではファイル全体の表面に小孔が認められた。また間欠的に浸漬した場合も、重量の緩やかな減少と、ファイル全体の表面に小孔が認められた。またcontrolではいずれの浸漬方法でも腐食は認められなかった。以上より、間欠的な浸漬を行った場合においても、連続的に浸漬した場合と同様の腐食溶解が認められた。このことから、長時間薬液に浸漬しないでも数回にわたる浸漬で同様の効果が得られることが確認され、臨床における1回の治療時間を考慮した場合でも、NiTi ファイル破折片の腐食溶解が可能であると思われた。実際の臨床応用として考えた場合、さらなる時間短縮が必要となるが、使用薬液の温度上昇によりこの腐食溶解の反応速度は促進することを、これまでの研究で確認しているため、今後はこの点を踏まえて条件設定を考慮していく予定である。

**【結論】** NiTi ファイル破折片はNCNおよびAPFへの間欠的な浸漬においても、腐食溶解を示した。このことから、臨床における1回の治療時間を考慮した場合でも、NiTi ファイル破折片の腐食溶解が可能であり、臨床応用の可能性があることが示唆された。今後、さらに臨床応用に適した条件を模索していく必要があると考えている。

## クエン酸溶液による超音波根管洗浄が水酸化カルシウム除去と 根管充填シーラーの接着に及ぼす影響

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  
○鷲巣 太郎, 菅谷 勉, 川浪 雅光

### Effect of ultrasonic irrigation with citric acid on removing calcium hydroxide and adhesion to root canal sealer.

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science, Graduate School  
of Dental Medicine, Hokkaido University.

○Taro Washizu, Tsutomu Sugaya, Masamitsu Kawanami

【目的】水酸化カルシウムは良好な殺菌作用や生体親和性により、根管貼薬に広く用いられている。一方、水酸化カルシウムが根管内に残存すると、接着性レジンシーラーを用いた根管充填では封鎖性が大きく低下する。本研究の目的は、水酸化カルシウム貼薬後の根管に接着性レジンシーラーが接着可能となる除去方法を検討することである。

#### 【材料と方法】

実験1 根管貼薬した水酸化カルシウムの効果的な除去方法の検討

牛歯を根管形成後、長軸方向に2分割し、破折部の間隙幅が300 $\mu$ mとなるようにして復位、固定し、機械的洗浄器具が直接到達できないモデルを作製した。水酸化カルシウム貼薬後、超音波スケーラー（ソルフィー、モリタ）に#50Uファイル（マニー）を接続し、次の方法で超音波洗浄を行った（各群n=4）。①W群：注水下で30秒または60秒（W30秒群・W60秒群）、②G群：10%クエン酸-3%塩化第二鉄溶液（表面処理剤グリーン、サンメディカル）を根管に満たして30秒または60秒（G30秒群・G60秒群）、③G+N群：②の後に10%次亜塩素酸ナトリウム（ネオクリーナー、ネオ製薬、以下NC）を根管に満たして30秒（G30秒+N群・G60秒+N群）、④CA群：20%クエン酸（ウルトラデントクエン酸20%、ウルトラデント）を根管に満たして30秒または60秒（CA30秒群・CA60秒群）、⑤CA+N群：④の後にNCを根管に満たして30秒（CA30秒+N群・CA60秒+N群）。

洗浄後、歯根を再分割して光学顕微鏡による水酸化カルシウム残存率の計測とSEM観察を行った。水酸化カルシウム残存率の計測は、根管壁では根尖部および根尖から1、2、4、6、8mmの6部位、間隙部は根尖から1、2、4、6、8mmの部位をさらに根管壁から根表面側に0~0.5mm、0.5~1.0mm、1.0~1.5mmにわけた15部位、合計21部位で行った。

実験2 水酸化カルシウム除去後の象牙質面の被接着性の検討

実験1と同様に根管貼薬した水酸化カルシウムを次の方法で超音波洗浄した。①W60秒群、②G60秒群、③G60秒+N群、④C群：水酸化カルシウム貼薬も超音波洗浄を行わない。洗浄後、歯根を再分割して、G60秒+N群とC群は芳香族スルフィン酸塩（アクセル、サンメディカル）処理10秒を行い、4群ともグリーン処理5秒後、間隙部にスーパーボンド根充シーラー（サンメディカル）を塗布、24時間後に、微小引張試験（各群n=50）と色素侵入試験（各群n=10）を行った。

【結果】実験1の結果、G60秒+N群の水酸化カルシウムの残存量は他群と比較して有意に少なく残存率は1%以下であった。実験2の結果、微小引張強さはW60秒群6.9 $\pm$ 3.2MPa、G60秒群9.7 $\pm$ 2.8MPa、G60秒+N群16.2 $\pm$ 3.8MPa、C群18.9 $\pm$ 7.1MPaで、G60秒+N群はW群、G60秒群と比較して有意に高く（p<0.05）、C群との間に有意差は認められなかった（p>0.05）。色素侵入距離はW60秒群1409.2 $\pm$ 62.7 $\mu$ m、G60秒群1133.9 $\pm$ 83.7 $\mu$ m、G60秒+N群442.6 $\pm$ 79.1 $\mu$ m、C群376.7 $\pm$ 106.2 $\mu$ mで、G60秒+N群はC群との間に有意差はなく（p>0.05）、W60秒群およびG60秒群より有意に小さかった（p<0.05）。

【考察】この結果は表面処理剤グリーンのpHがウルトラデントクエン酸20%と比較して低いこと、基材を含まないため流動性に優れているためと考えられた。さらにNCを併用したことで、過脱灰になった象牙質面では有機質を除去し、接着可能な象牙質面を得ることができたと考えられた。

【結論】歯面処理材グリーン60秒とネオクリーナー30秒の超音波洗浄により効果的な水酸化カルシウムの除去が可能であり、水酸化カルシウムを貼薬しない場合と有意差がない色素侵入率と微小引張強さが得られる。

## 歯科用マイクロスコープ光源が視覚機能に及ぼす影響

神奈川県立歯科大学口腔治療学講座歯内療法学分野<sup>1</sup>、神奈川県立歯科大学附属横浜クリニック総合歯科学講座<sup>2</sup>、  
神奈川県立歯科大学附属横浜クリニック眼科<sup>3</sup>  
○三橋 晃<sup>1</sup>、小泉忠彦<sup>2</sup>、原 めぐみ<sup>2</sup>、原 直人<sup>3</sup>、石井信之<sup>1</sup>

### The Effect of Optical Function under the Microscopic Dental Treatment.

Kanagawa Dental College Department of Oral Medicine Division of Endodontics<sup>1</sup>,  
Yokohama Dental and Medical Clinic,

Department of Comprehensive Dentistry<sup>2</sup>, Department of Ophthalmology<sup>3</sup>

○Akira Mitsuhashi<sup>1</sup>, Tadahiko Koizumi<sup>2</sup>, Megumi Hara<sup>2</sup>, Naoto Hara<sup>3</sup>, Nobuyuki Tani-Ishii<sup>1</sup>

#### [研究目的]

歯科用マイクロスコープの普及に伴い、精度と予知性の高い歯科診療が可能になってきた。マイクロスコープに使用する光源はハロゲン、キセノンそしてLEDランプがある。現在、ハロゲンランプが一般的に使用されているが、キセノンランプによる術野の明視化は、高倍率における精密歯科診療に極めて有用である。光源量が高いキセノンランプはハロゲンランプと比較して眼精疲労が生じやすいと考えられている。しかしながら、マイクロスコープ光源が術者の視覚機能に影響を示した報告はない。本研究では、マイクロスコープを使用した歯科診療条件下で使用前後の視覚機能を評価するために、視力、焦点調節機構の変化を解析した。

#### [材料および方法]

実験には、歯科用マイクロスコープ使用経験者1名と未使用経験者5名の合計6名(年齢21歳~44歳)を被験者とした。被験者は、眼科外来にて術前の焦点調節機能検査、および明度を評価するコントラスト視力検査を測定した。被験者は抜去歯を用いた30分間のマイクロスコープ下での歯内療法を行い、術直後、30分後、1時間後に視力検査を行った。1週間後にマイクロスコープ光源をキセノンランプからハロゲンランプに交換し、光源の視覚機能への変化を各検査項目にて比較検討した。また、ハロゲンランプとキセノンランプの射出光照度を、ライトガイド射出光および顕微鏡下射出光の条件下で測定した。

#### [成績]

光源量の高いキセノンランプおよび通常診療に使用するハロゲンランプを用いて歯内療法後の視覚機能検査結果を解析した。焦点調節機能検査は焦点調節反応時間(潜時)は、緊張時および弛緩時でキセノンランプとハロゲンランプの光源量による変化は認められなかった。焦点調節反応量(利得)は、マイクロスコープによる歯内療法直後に遅延反応が認められ、作業1時間後に回復する傾向を示したが光源間の変化はなかった。コントラスト視力検査結果はマイクロスコープ作業直後に測定値が有意に変動した。視力検査結果は時間の経過と共に回復傾向が認められたが光源間の差は認められなかった。各光源の照度測定結果はライトガイド射出光測定で、キセノンランプはハロゲンランプの11.2倍の照度を示し、顕微鏡下射出光においても6.9倍の照度を示した。

#### [考察および結論]

マイクロスコープによる歯科診療は診療直後に焦点調節機能と明度調節機能が遅延したが、一時的な変化で時間の経過と共に回復した。キセノンランプはハロゲンランプに比較し、11.2倍の照度を示したが、視覚機能はキセノンランプとハロゲンランプ光源間の差はなく、時間経過とともに回復傾向が認められた。すなわち、マイクロスコープによる歯科診療は視覚機能に影響を与えないことが示唆された。

会員外研究協力者; 中平賢吾(神奈川県立歯科大学4年生)、 応藤光浩(同4年生)、 村田陽太郎(同4年生)、 西村 孔(同4年生)、 若菜 裕(同4年生)、 桂田祐慎(同1年生)

東京歯科大学水道橋病院における歯科用マイクロスコープ使用の現状  
—特に歯内療法処置について—

東京歯科大学 口腔健康臨床科学講座<sup>1)</sup>

埼玉県立大学保健医療福祉学部健康開発学科口腔保健科学専攻<sup>2)</sup>

○古澤成博<sup>1)2)</sup> 吉田 隆<sup>1)2)</sup> 早川裕記<sup>1)</sup> 大田 恵<sup>1)</sup> 細川壮平<sup>1)2)</sup> 河野誠之<sup>1)</sup>

Uses of Dental Operating Microscope in Endodontics at TokyoDentalCollege Suidoubashi Hospital

1) Department of Clinical Oral Health Science, Tokyo Dental College

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

○FURUSAWA Masahiro, YOSHIDA Takashi, HAYAKAWA Hiroki, OOTA Kei, HOSOKAWA Sohei, Kouno Masayuki

## 目 的

我が国において日常臨床、特に歯内療法処置に歯科用マイクロスコープが応用されるようになってから既に約20年が経過している。当病院においても紹介患者を中心にマイクロスコープを応用した治療が行われており、殊に歯内療法処置においては、なくてはならない器材のひとつになりつつある。そこで今回我々は、当病院での歯内療法領域における歯科用マイクロスコープの使用状況について調査し、検討を行ったので報告する。

## 方 法

東京歯科大学水道橋病院総合歯科における平成21年から平成23年までの3年間の歯科用マイクロスコープの使用状況について、特に微小外科的歯内療法処置を除いた処置、すなわち一般的な歯内療法処置である髓室内からの処置についての症例数を調査し、その使用状況について検討した。

## 結 果

3年間のマイクロスコープを用いた歯内療法処置数は、平均316症例であった。それらの内訳の3年間の平均は、狭窄根管や槌状根の処置などの感染根管処置が208.3例と最も多く、続いて破折小機器の除去が26.0例、穿孔部封鎖処置が24.3例、歯牙破折の処置が15.3例、根管充填材の除去が14.5例でその他メタルコアの除去などが27.7例であった。

## 考 察

歯科用マイクロスコープを通常の歯内療法処置に用いた場合、未処置根管の探索、根管口の探索、根管内の清掃状態の確認、根尖孔の確認、槌状根の処置などに有効とされている。今回は大多数例が紹介医からの処置依頼による難治性根尖性歯周炎の症例であったため、当然のことながら再治療が大多数を占めていた。感染根管処置の症例では、根管口の探索を依頼された症例は少数例に止まり、未処置根管の探索や根管内の清掃状態の確認、さらには槌状根の処置が多く認められていた。狭窄根管における根管の穿通を依頼されたケースも散見されたが、マイクロスコープ下での根管の穿通は偶発症発生の危険性もあることから、断念した症例が若干例認められた。一方、根管内小機器の破折、歯牙の亀裂、破折や穿孔部の確認などの偶発症に対するものが比較的多く認められた。また、根管充填材の除去に関しては14.5例と症例数が少なかった。以上から、再治療を行う際の根管の穿通に関してはマイクロスコープが必ずしも有効ではない点、および根管充填材の除去におけるマイクロスコープによる有効性が、未だ紹介医に浸透していないものと思われた。なお、破折小機器の除去や穿孔部の封鎖、さらには歯牙破折の処置が多く認められたことから、これらの症例にはマイクロスコープの有用性が高いとの認識が周知されていることが確認された。

## OCT を用いた歯髄腔の観察

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  
○吉岡俊彦 白金由紀子 小松恵 石村瞳 海老原新 須田英明

### Observation of the pulp chamber using OCT

Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences,  
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University  
○YOSHIOKA Toshihiko, SHIRAKANE Yukiko, KOMATSU Kei, ISHIMURA Hitomi,  
EBIHARA Arata, SUDA Hideaki

#### 【緒言】

根管治療時の髄腔開拓は、レントゲン写真上での歯髄腔の位置を参考にしながら行われる。しかし、歯髄腔の狭窄、歯軸の類舌的な傾斜、補綴物の存在等により歯髄腔の三次元的な方向の把握が困難な症例に遭遇することがある。その結果、髄腔開拓を誤った方向に進めてしまった場合に穿孔が起きてしまう恐れがある。

また、歯髄に近接するう蝕治療の際、歯髄保存の成否は露髄の有無に大きく左右される。事前にう蝕除去による露髄が予測される場合には暫間的間接覆髄処置 (AIPC) を選択することも可能となる。しかしながら術中に歯髄腔までの象牙質の厚みを把握することは困難で、偶発的に露髄し、抜髄適応となる症例もある。

Optical coherence tomography(OCT)は、非侵襲的に組織の精密断層像を得ることが可能な医療撮像用新技術である。本研究ではヒト抜去下顎前歯を用い、象牙質内の歯髄腔が OCT 撮像で観察が可能であるかを検討した。

#### 【材料および方法】

実験には、ヒト抜去下顎前歯 30 本を用いた。予め歯科用コーンビーム CT(Finecube®, 吉田製作所)撮像を行い、切縁から歯髄腔までの距離が 4 mm 以下となるように低速切断機(Isomet®, Buehler)にて歯冠切除を行った。次いで、マイクロ CT(SMX-100CT, 島津製作所)撮像を行い、切断面から歯髄腔までの距離を測定し、SL とした。その後、切断面を OCT(Santec OCT-2000®, Santec)にて撮像を行った。OCT 像による判定は、象牙質内部に歯髄腔が観察できない場合には「観察不可」、歯髄腔が観察できた場合には「観察可」とし、切断面から歯髄腔までの距離の測定を行い、OL とした。なお、切断面に歯髄腔が観察できる場合には「露髄」と判定した。OCT 撮像後、歯科用実体顕微鏡(OPMI® pico, Zeiss)を用い、切断面を拡大し、観察しながら 10 号 K ファイル(Zipperer)を用いて「ファイル挿入不可」「ファイル挿入可」を判定した。「ファイル挿入不可」と判定された場合には、切断面をさらに約 1mm 削除し、上記と同様にマイクロ CT・OCT・ファイル挿入判定を行った。これを各歯「ファイル挿入可」と判定されるまで繰り返し行った。

#### 【結果】

根管までの距離 SL が 2mm 以上では 33 本中 30 本が観察不可、3 本が観察可、SL が 1mm 以上 2mm 未満では 25 本中 11 本が観察不可、14 本が観察可、SL が 1mm 未満では 30 本中 30 本が観察可、SL が 0mm では 29 本中 29 本が露髄と判定された。観察可と判定された SL の最大値は 2.39、観察不可と判定された SL の最小値は 1.33 であった。SL が 0.1mm であった試料 1 本でファイル挿入可と判定された、それ以外の試料では SL が正の数るときファイル挿入不可、SL が 0 のときファイル挿入可と判定された。SL と OL の相関係数は 0.65 となり、正の相関関係が認められた。

#### 【考察】

OCT 撮像により、象牙質内部の歯髄腔の位置が正確に把握できれば、髄腔開拓時の穿孔や不必要な歯質切削を予防できるだけでなく、石灰化している根管口や、上顎大臼歯近心頬側根の 2 根管性など臨床的に発見が困難な根管探索への応用も期待できる。また、う蝕治療の際に偶発的な露髄を防ぐことができたり、AIPC 処置へ移行したり、歯髄保存の応用症例を広げることが期待される。

#### 【結論】

OCT を用いることで象牙質内に覆われた歯髄腔を観察できることが示唆された。

## マイクロフォーカスX線CT装置による下顎切歯根管形態の評価 (第1報)

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座  
○西田太郎、勝海一郎

**Evaluation of Root Canal Morphology in Mandibular Incisor by Micro-focus X-ray Device**  
Department of Endodontics & Operative Dentistry, The Nippon Dental University, School of Life  
Dentistry at Tokyo  
○Nishida Taro, Katsuumi Ichiroh

### 【研究目的】

下顎切歯は単根歯であるが、歯根が強度に偏平しており、唇舌的な根管の分岐や湾曲、さらには根尖分岐などが認められ、治療難度の高い歯種とされる。

本研究は、マイクロフォーカスX線CT装置を用い、連続的な断層撮影を行い、三次元像を構築後、下顎切歯の根管形態の詳細な分析を行った。

### 【材料及び方法】

実験にはヒト抜去下顎前歯 50 本を用いた。歯根外形を肉眼的に観察後、マイクロフォーカスX線CT装置 (ELE-SCAN, 日鉄エレックス) を用い、管電圧 80kV、管電流 70  $\mu$ A、スライス厚 52.9 $\mu$ m の条件にて、根尖から歯冠部までを連続的に断層撮影を行った。また、根尖部の詳細な画像を得るためにスライス厚 21.1 $\mu$ m、他同条件にて根尖部約 6 mm について追加撮影を行った。得られた断層像は画像処理ソフト (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング) により三次元構築を行い、根管の走行、分岐などの分析を行った。

根管の走行は、三次元構築した全体像を基に Weine の分類法により区分した。根管の湾曲度は、根管の長軸と根尖-根管湾曲点を結んだ線がなす角度から求めた。三次元構築した根尖部の断層像から、根尖孔の開口位置を尖端、頬側、舌側、近遠心側に分類した。根管は、唇舌方向と近遠心方向の最大幅径を根尖孔開口部、開口部から 1、2、3、4、5mm の各位置で計測した。根管の偏平度は最大近遠心径を最大唇舌径で除して、根尖孔開口部、開口部から 1、2、3、4、5mm の各位置で求めた。

### 【結果とまとめ】

根管の走行は、Weine の分類で I 型は 88% (n=44)、II 型は 10% (n=5)、III 型は 2% (n=1) 認めた。なお、III 型を示した試料は網状根管を呈していた。また、根尖分岐は 22% (n=11) で認められた。根尖分岐は 2 分岐が 7 歯、3 分岐が 3 歯、5 分岐が 1 歯認められた。

唇舌的に、湾曲が認められない根管が 15% (n=8)、湾曲度 10 度以下の弱い湾曲根管が 36% (n=19)、10 度から 30 度の中程度の湾曲根管が 48% (n=25) で、30 度以上の強度の湾曲根管はみられなかった。なお唇舌的に 2 か所で湾曲する根管を 2 歯認めた。近遠心的には、湾曲が認められない根管が 38% (n=20)、湾曲度 10 度以下の弱い湾曲根管が 38% (n=20)、10 度から 30 度の中程度の湾曲根管が 23% (n=12) で、30 度以上の強度の湾曲根管はみられなかった。なお、近遠心的に 2 か所で湾曲する根管を 2 歯認めた。

根尖孔の開口位置は、唇舌的に、歯根の先端付近に開口する歯が 30% (n=15)、唇側が 58% (n=29)、舌側が 12% (n=6) であった。また、近遠心的には、歯根の先端付近に開口する歯が 60% (n=30)、近遠心側が 40% (n=20) であった。

唇舌的根管幅径は根尖孔開口部で 0.40mm、開口部から 1mm : 0.44mm、2mm : 0.49mm、3mm : 0.60mm、4mm : 0.75mm、5mm : 0.90mm であった。また、近遠心的根管幅径は根尖孔開口部で 0.28mm、開口部から 1mm : 0.25mm、2mm : 0.27mm、3mm : 0.29mm、4mm : 0.32mm、5mm : 0.34mm であった。

根管の偏平度は根尖孔開口部で 0.78、開口部から 1mm : 0.64、2mm : 0.61、3mm : 0.56、4mm : 0.49、5mm : 0.43 であった。

本研究により下顎切歯根管形態の複雑性がうかがわれたが、今後、根尖孔の開口位置や分岐などについて詳細な検討を行う予定である。

## マイクロフォーカスX線CT装置による上顎側切歯根管形態の評価 (第3報)

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座

○天野亮子, 勝海一郎

### Evaluation of Root Canal Morphology in Maxillary Lateral Incisor Using Micro-focus X-ray CT Device, Part3

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

○Amano R, Katsuumi I

#### 【はじめに】

上顎側切歯は、前歯の単根管歯であるにもかかわらず、根管充填後の予後が劣り治療の難しい歯種とされている。第1・第2報ではマイクロフォーカスX線CT装置により連続的な断層像を撮影して三次元像を構築し、上顎側切歯の根管の走行や湾曲度、根管の扁平度について分析を行った。その結果、根管は近遠心的に圧平され、側枝やS字状湾曲根管の存在など、上顎側切歯歯髓腔形態の複雑さが窺われた。今回は、根尖部の根管形態についてさらなる詳細な観察と分析を行った。

#### 【材料および方法】

実験には、第1報・第2報で使用したヒト上顎側切歯抜去歯20本を用いた。マイクロフォーカスX線CT装置(ELE-SCAN、日鉄エレックス)を用い、管電圧80kV、管電流60 $\mu$ A、スライス厚16.9 $\mu$ mの条件で根尖側5mmの連続的な断層撮影を行った。得られた断層像は画像処理ソフト(TRI/3D-BON、ラトックシステムエンジニアリング)により三次元構築を行い、側枝・根尖分岐の分岐位置、根尖孔の位置と径、根尖狭窄部の形態について分析した。

1. 分岐位置については、根管の軸が垂直になるよう角度を調節し、側枝・根尖分岐ともに、分岐地点から根尖端までの垂直的な距離を求めた。また、根尖5mm以降の側枝については、第1報で構築した三次元画像を用いて観察を行った。

2. 三次元画像を頬舌・近遠心方向から観察し、根尖端から解剖学的根尖孔中央までの距離・根尖孔径・根管の軸と垂直に交わる根尖孔-根管径を測定し、さらに根尖側3mmの根管形態を観察し、〈はっきりした狭窄部が存在〉〈微弱的ながら狭窄部が存在〉〈狭窄部なし〉の3種に分類した。その際、根尖分岐している根管については、ファイルが最も挿入しやすいと思われる根管を用いて測定を行った。

#### 【結果とまとめ】

##### 1. 根尖端から分岐部までの距離

20歯中11歯、計22か所で分岐が見られ、その内根尖側1mm以内で分岐したものは9.1%、1~2mmでは50.0%、以下2~3mm(13.6%)、3~4mm(4.5%)、4~5mm(22.7%)となり、5mmより歯冠側では認められなかった。

##### 2. 根尖孔の位置と直径、根尖狭窄部の形態

解剖学的根尖孔が根尖端から頬舌的に変位している歯は7歯で、変位した距離の平均は0.64mmであった。近遠心的に変位していた歯は19歯、変位した距離の平均は0.38mmであり、ほぼ根尖端付近で開口していた。

また、解剖学的根尖孔径の平均は頬舌径が0.50mm・近遠心径が0.45mm、根管の軸と垂直な根尖孔-根管径は頬舌径が0.43mm・近遠心径0.34mmとなり、ISO規格ファイルの35番・40番に相当することがわかった。

頬舌・近遠心方向から見た合計40の根管のうち、はっきりとした狭窄部が見られたのは15、微弱的な狭窄部が見られたのが12、狭窄部が見られなかったのが13根管であった。また頬舌・近遠心両方に狭窄部がみられた歯は8本(40%)、片方に見られたのは11本(55%)、狭窄部が見られなかったのは1本(5%)となり、作業長基準点の設定の難しさが窺われた。

## 歯科用コーンビーム CT 画像診断に苦慮した難治性根尖性歯周炎の一症例： 下顎骨隆起の影響

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座<sup>1</sup>， 歯科放射線学講座<sup>2</sup>

○石塚恭子<sup>1</sup>， 中田和彦<sup>1</sup>， 内藤宗孝<sup>2</sup>， 柴田直樹<sup>1</sup>， 今泉一郎<sup>1</sup>， 有地榮一郎<sup>2</sup>， 中村 洋<sup>1</sup>

### A case report of difficulty in diagnostic imaging using dental cone-beam computed tomography for persistent apical periodontitis: Influence of mandibular bone torus.

Departments of Endodontics<sup>1</sup>, Oral and Maxillofacial Radiology<sup>2</sup>, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○ Kyoko Ishizuka<sup>1</sup>, Kazuhiko Nakata<sup>1</sup>, Munetaka Naitoh<sup>2</sup>, Naoki Shibata<sup>1</sup>, Ichiro Imaizumi<sup>1</sup>, Eiichiro Ariji<sup>2</sup>, Hiroshi Nakamura<sup>1</sup>

#### [緒言]

顎口腔顔面領域の様々な疾患に対する診断および治療における歯科用コーンビーム CT の有用性が数多く報告されている。歯科用コーンビーム CT は、3 次元的画像の撮影が可能であり、患部の精査が可能となるが、歯科用コーンビーム CT 画像の解析に際しては、正確な読影を必要とすることは言うまでもない。今回、患歯の周囲に大きな骨隆起が存在していたことから、歯科用コーンビーム CT 画像診断に苦慮した難治性根尖性歯周炎の症例を経験したので報告する。

#### [症例]

患者は 43 歳の女性。2012 年 1 月 21～22 日にかけて眠れない程の強い疼痛を下顎左側第一大臼歯部に自覚した。翌日、近在の歯科医院にて下顎左側第一大臼歯の全部鑄造冠を除去され、抗菌剤および解熱鎮痛消炎剤を処方された。しかし、症状の改善が認められず、1 月 24 日に精査加療を希望し本学歯学部附属病院口腔外科を受診した。口内法およびパノラマ X 線撮影および口腔内診査により左側下顎骨骨膜炎と診断を受け、3 日間抗菌剤を静脈点滴注射され、消炎処置を施された。その後、自発痛は治まったが同部に違和感が残っていたため、同歯の急性根尖性歯周炎に対する感染根管治療を当科にて開始した。垂直打診、頬側根尖部圧痛および頬側歯頸部歯肉の腫脹を認めた。頬側根分岐部のポケットは 5mm であった。メタルコアを除去しマイクロスコープ下にて破折の有無を確認したが、破折の特定には至らなかったため根管治療を続けた。根管治療を 4 回繰り返したが、頬側根尖部腫脹および頬側根尖部圧痛の改善は全く認められなかった。そこで、病変の広がり、根管数、根管の形態および根管の走行などの精査のために、歯科用コーンビーム CT (3DX マルチイメージマイクロ CT、モリタ社) を撮影した。その結果、近心根頬側に破折を疑う骨吸収像を認め、さらに、歯根嚢胞を疑う骨吸収像を認めた。同時に、患歯に隣接した歯牙様の不透過像を確認した。そこで、歯科放射線科医に助言を受けたところ、骨との連続性が不鮮明な歯牙様の形態を呈した不透過像との見解を得た。今後の治療方針について口腔外科医と協議したところ、2004 年～2007 年にかけて下顎左側第二大臼歯を原因歯とする左側下顎骨骨膜炎の既往もあるため、数年にわたる強い炎症による骨の分離が起きている可能性が高く、水平埋伏過剰歯では無いとの見解を得た。最終的に、根管治療での治癒の見込みは無く、患歯の抜歯および骨の搔爬が必要と判断して、患者に説明し同意を得た。骨への侵襲を最小限に抑えるために、分割抜歯を選択した。頬側歯肉を剥離したところ、下顎左側第二小臼歯の遠心部から下顎左側第二大臼歯の近心部にかけて大きな骨隆起が確認できた。患歯の近心根頬側からは歯冠大の歯根嚢胞を摘出した。舌側歯肉を剥離したが、舌側歯槽骨には異常所見は認められなかった。

#### [考察および結論]

今回の症例では、大きな骨隆起が歯科用コーンビーム CT 画像上において歯牙様の不透過像もしくは分離骨様に読影されることがわかった。抜歯後、実際の歯および骨の状態を確認してから改めて歯科用コーンビーム CT 画像を解析すると、骨の連続性をわずかに認める部分を確認できた。ハレーションによる歯科用コーンビーム CT のアーチファクトの影響は体表近くの硬組織で強く受けやすいため、本症例においても頬側皮質骨の位置の特定が困難となった。本症例のように下顎に大きな骨隆起を認める際には、患歯およびその周囲全体を十分に精査する必要があることが示唆された。

歯科保存領域におけるCone-Beam-CTによる活用—診断治療に有用であった3症例—  
松本歯科大学歯科理工学講座<sup>1</sup> 松本歯科大学歯科放射線学講座<sup>2</sup> 松本歯科大学歯科保存学第2講座<sup>3</sup>  
松本歯科大学歯科保存学第1講座<sup>4</sup>

○河瀬雄治<sup>1</sup>, 内田啓一<sup>2</sup>, 田口 明<sup>2</sup>, 永沢 栄<sup>1</sup>, 佐藤将洋<sup>3</sup>, 西田英作<sup>4</sup>, 窪川恵太<sup>4</sup>, 武藤昭紀<sup>4</sup>,  
三木 学<sup>4</sup>, 海瀬聖仁<sup>4</sup>, 河合 悠<sup>4</sup>, 吉成伸夫<sup>4</sup>, 山本昭夫<sup>3</sup>, 笠原悦男<sup>3</sup>

**Application of Cone-Beam-CT in Conservative Dentistry  
-Three cases useful for diagnostic treatment-**

Department of Dental Materials, Matsumoto Dental University<sup>1</sup>

Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Matsumoto Dental University<sup>2</sup>

Department of Endodontics and Operative Dentistry, Matsumoto Dental University<sup>3</sup>

Department of Periodontology, Matsumoto Dental University<sup>4</sup>

○Yuji Kawase<sup>1</sup>, Keiichi uchida<sup>2</sup>, Akira Taguchi<sup>2</sup>, Sakae Nagasawa<sup>1</sup>, Masahiro Sato<sup>3</sup>, Eisaku Nishida<sup>4</sup>,  
Keita Kubokawa<sup>4</sup>, Akinori Mutou<sup>4</sup>, Manabu Miki<sup>4</sup>, Kiyohito Kaise<sup>4</sup>, Yuu Kawai<sup>4</sup>, Nobuo Yoshinari<sup>4</sup>,  
Akio Yamamoto<sup>3</sup>, Etsuo Kasahara<sup>3</sup>

**【緒言】**

一般の歯科診療における口内法エックス線写真やパノラマエックス線写真は撮影の投影方向が限定されており、像の重なりがおこり詳細な歯の形態や根管形態を検討することが困難なことが多く、口内法やパノラマ撮影法などの画像検査では矢状断面、水平断面における解剖学的位置関係や形態の検討は行えることができない。しかしながら Cone-Beam-CT (以下 CB-CT とする。)での画像検査では高解像度による3次元画像が得ることができ、歯科保存領域においてもその有用性は非常に高く、診断効果を発揮することから広く活用されてきている。今回われわれは、診断治療において CB-CT 有用であった3症例について画像と共に報告する。

**【症例】**

**症例1：内部吸収の診断**

55歳の女性。下顎左側第一大臼歯部の頰側の腫脹を主訴に来院。パノラマエックス線写真では、下顎左側第一大臼歯部の歯根膜腔拡大と近心根尖部に透過像と骨硬化像を認めた。CB-CT画像では、近心根に顕著な内部吸収と根尖部周囲に骨硬化を伴う根尖病変を認めた。保存不可能と判断し抜去を行い経過観察中である。

**症例2：下顎管の診断**

歳の女性。下顎左側臼歯部の咬合時疼痛を主訴に来院。口内法エックス線写真では、下顎左側第二大臼歯では歯根膜腔拡大を認め、近心根の遠心方向への湾曲を認めた。CB-CT画像では、下顎左側第二大臼歯部近心根は舌側方向へ湾曲しており根尖病変を認める。下顎管は分枝を認め、さらに分枝しており下顎左側第二大臼歯部の根尖病変との連続性を認めた。マイクロスコープによる根管拡大・形成を行い経過観察中である。

**症例3：根管形態の診断**

12歳の男児。上顎前歯部の口蓋裂部および齶蝕の精査目的にて来院。咬合法エックス線写真では、側切歯は矮小歯であり、上顎左側中切歯、側切歯部に骨欠損を認めた。隣接面部には齶蝕による透過像は認めなかった。CB-CT画像では、上顎左側中切歯部では2根2根管の形態を認めた。また齶蝕や根尖病変を思わせる所見は認めなかった。唇顎口蓋裂による顎口腔機能の治療を優先するため、定期的な経過観察中である。

**【考察・まとめ】**

歯内療法領域においても CB-CT による歯内保存治療や歯周治療における診断や治療方針の決定あるいは経過観察などの広く使用されようになってきている。CB-CT を活用することは、被曝線量も少なく高解像度の画像を得られることや二次元的な口内法エックス線写真やパノラマエックス線写真からは得られなかった、歯の状態や形態あるいは位置関係や解剖学的な構造物の三次元的な関係を把握できるため、歯内療法や歯周療法においても重要な検査法であると考えられた。

## 上顎洞底に大きな膨隆を伴う第一大臼歯の根尖病巣の一症例

日本歯科大学新潟病院 1), 水沼歯科医院 2)  
○塩沢恵美 1), 横山剛之 1), 水沼秀樹 2), 江面 晃 1)

### A Treatment Case of First Molar Periapical Lesion with a Large Swelling at the Bottom of Maxillary Sinus.

The Nippon Dental Univ. Niigata Hospital, Mizunuma Dental Clinic  
○SHIOZAWA Megumi, YOKOYAMA Goshi, MIZUNUMA Hideki, EZURA Akira

#### < 緒言 >

慢性の根尖性歯周疾患は口腔内の自覚症状は少なく、鼻症状や頬部の違和感で受診し、判明することがある。また感冒などで一時増悪した際に頭痛・頭重感などの症状から他科医療機関を受診して歯性上顎洞炎を疑われることが多い。

我々は平成 22 年度第 132 回春季保存学会にて下顎の著明な根尖病巣を有した大臼歯の保存症例について報告した。今回、無症状で経過していたが全部鑄造冠脱離を主訴に受診した際に上顎洞底が挙上する大きな根尖病巣が認められた左上顎第一大臼歯の根管治療を経験したので報告する。

#### < 患者情報 >

患者：20 歳代 女性

主訴：左側上顎第一大臼歯の全部鑄造冠脱離

経過：14 歳頃、う蝕のため根管処置行い、歯冠修復を全部鑄造冠で行った。

咬合時の違和感や鼻症状などはなく、日常生活に支障となる症状はみとめなかった。

X 線所見：左上顎第二小臼歯部から第二大臼歯部までの広範囲な上顎洞底の挙上がみられ、上顎洞内にアスリガラス状の陰影を認める。CT 所見では、左上顎洞内に母指頭大の不透過像を認める。

診断名：左側上顎第一大臼歯起因歯根嚢胞

治療経過：初回到根管充填剤除去を行ったところ、口蓋根より大量の排膿を認めた。通法に従い K ファイルにて穿通、55 号まで拡大後 CP 貼薬とし、ペニシリン系抗菌薬を 3 日分処方した。2 回目(1 週間後)に疼痛などは消失したが、口蓋根より拍動性の大量の漿液性滲出液を認めたため CP を貼薬した。3 回目(3 週間後)、4 回目(4 週間後)では少量の漿液性滲出液を認めたため引き続き CP 貼薬とした。しかし、その他の自覚的、他覚的症狀は認められなかった。

5 回目(6 週間後)には漿液性滲出液が微量であったため貼薬を FC に変更し、6 回目(8 週間後)に根管内最近嫌気培養試験(以下 S-培)を行った。7 回目(9 週間後)の S-培結果は陽性であったため、再度 S-培を行うこととし、FC 貼薬とした。8 回目(10 週間後)には S-培結果で根管の無菌性を確認したため G ポイントとキャナルス N にて側方加圧充填を行った。

約 1 年後、経過観察のため CT 撮影おこなったところ、嚢胞の縮小と骨の造成を認め経過良好である。

#### < 考察 >

本症例は根尖病巣により著明な膨隆を有するにもかかわらず、歯性上顎洞炎を疑う一般的な鼻症状や頭痛といった所見が認められなかった。上顎第一大臼歯口蓋根の場合、約 24.0%の割合で上顎洞内に根の突出がみられるといわれており、歯性上顎洞炎の起因歯になりやすいとされている。今回の歯根嚢胞の原因は根尖部の再感染だと考えられる。本症例のような上顎洞内に著明な膨隆を示す根尖病巣を有する大臼歯では、歯科的にも耳鼻科的にも外科処置が第一選択となることが多いが、本症例のように通法に従った根管治療で保存可能なことが示唆された。

### 下顎前歯部の広範囲に認められた歯根嚢胞の一症例

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

○ 二宮雅美, 生田貴久, 永田俊彦

#### A Case Report of Expanded Radicular Cyst in Mandible Anterior Teeth

Department of Periodontology and Endodontology,

Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School

○ NINOMIYA Masami, IKUTA Takahisa, NAGATA Toshihiko

#### 【緒言】

歯根嚢胞は、慢性根尖性歯周炎に続発して発症する歯源性嚢胞の一種であり、顎骨内に生じる嚢胞として発症頻度が一番高い。そのほとんどが無症状で経過するため、局所の歯肉腫脹や感染による疼痛が出てはじめて自覚されることが多い。一方、画像診断で歯根嚢胞と診断された症例のうち、約1%は歯源性腫瘍であったという報告(日本口腔検査学会雑誌, 2(1), 50-53, 2010)があることから、病理検査と併せて確定診断することが重要である。

今回我々は、徳島大学病院歯科第二保存科を受診した患者で、右側下顎中切歯の慢性根尖性歯周炎が原因となり、下顎正中部の広範囲にわたって歯根嚢胞が形成されている症例に遭遇した。その治療経過を含めて報告する。

#### 【症例】

患者は50歳女性。2011年3月に下顎前歯部の歯肉腫脹、圧痛を自覚して本院を受診した。口腔内所見より、42~32根尖相当部の唇側歯肉に弾性硬の腫脹が認められ、波動、圧痛も認められた。患部を穿刺すると、褐色の漿液性内容物が吸引できた。X線写真より、下顎歯槽部を中心に43近心部から32遠心部までの広範囲に及ぶ境界明瞭な拇指頭大のX線透過像が認められた。また、41は根充歯であったが、43、42、31、32は根管治療の痕跡はなかった。CT画像では、病巣により唇舌側皮質骨が菲薄化し、特に唇側皮質骨は42遠心部から32遠心部まで広く欠損している像が認められた。しかし、歯髄診断の結果では、失活していたのは41、31の2歯だけであった。患部に外傷などの既往はない。全身既往歴は、2003年から高血圧と甲状腺機能低下症で投薬治療を受けており、2005年に子宮頸部嚢胞の手術歴(現在は経過観察中)がある。

#### 【治療経過】

術前に病巣部の部分生検を行った結果、変性した重層扁平上皮と上皮下にリンパ球などの炎症性細胞浸潤や肉芽組織、線維性組織が認められたことから、歯根嚢胞の診断を得た。そのため、失活歯である41、31の根管治療後に嚢胞摘出術を行うこととした。41、31の根管治療時に、31からの排膿は認められなかったが、41から褐色の漿液性の排膿が毎回、多量に認められた。2011年5月に41、31の根管充填を行い、同日に鎮静麻酔下にて嚢胞摘出術を行った。歯肉弁を剥離すると、42~32部にかけて唇側皮質骨は欠損しており、鶏卵大より少し大きめの嚢胞が認められた。骨面と嚢胞との境界を剥離子にて確認しながら注意深く嚢胞を摘出し、病巣に接していた41、31の根尖を切除して接着性レジンで封鎖した後、歯肉弁を復位に戻して縫合した。術後数日は患部の軽度疼痛や腫脹感があったが、1週間後には症状は消失した。その後の術後経過は良好であり、術後3か月目のX線写真では、術部周辺より歯槽骨の再生像が認められ病巣の縮小傾向が確認された。現在、術後9か月以上経過するが、歯槽骨の再生と病巣の縮小傾向はさらに進み、再発所見は確認されていない。

#### 【まとめ】

本症例は、当初、病巣部の大きさが下顎正中部の広範囲に及んでいたため、歯源性腫瘍の可能性も考えられたが、X線写真と病理検査の結果から、41の慢性根尖性歯周炎が進展して生じた歯根嚢胞の症例と診断した。問診から、41の根管治療を受けた時期が3年前とのことから、自覚症状がないまま数年で病巣が大きく進行していったものと推測された。嚢胞摘出術と歯根端切除により原因歯である41を抜歯しないで保存処置を図ったため、再発の可能性もあり、今後も引き続き長期的経過観察を行っていく予定である。

## 歯内歯 (Oehlers の分類 Type3) と根未完成外傷歯にロールポイント法を応用した 2 症例

大阪歯科大学 口腔治療学講座

○池永英彰、三宅将太、藤平智広、島銀一郎、林宏行

**Dens in dente and immature tooth obturated by rolled gutta-percha cone technique**

Department of Endodontics, Osaka Dental University

○IKENAGA Hideaki, MIYAKE Syota, FUJIHIRA Tomohiro, HATA Gin-ichiro, HAYASHI Hiroyuki

### 【緒言】

太い根管を緊密に充填する目的で、これまでさまざまな方法が考えられてきた。近年各種の根管充填用器材や装置の開発に伴い、専用のガッタパーチャ材を用いた新たな根管充填法が行われている。その中でロールポイント法は、ガッタパーチャを寄り合わせて根管の太さにあうポイントを作製し太い根管に応用する充填法であり、あまり一般的な方法ではないとされてきた。今回我々は、太い根管を有する歯内歯および外傷歯の根管にロールポイント法で作製したポイントをさらに火炎上で軟化しそれぞれの根管に適合させた自作のポイントを用い、根管充填を行った結果、臨床的に良好な結果を得たので、ここに報告する。

### 【症例】

(症例 1) 患者は 38 歳女性。10 年前に歯根嚢胞の診断で根尖部の外科的処置を受けた。平成 22 年 4 月に頬側歯肉に腫脹を認め、再度上顎左側側切歯と犬歯の根尖搔爬および歯根端切除を行ったが頬側歯肉の腫脹が消失せず、同年 10 月紹介され当科に依頼された。エックス線検査の結果、上顎左側犬歯が原因歯であり、歯内歯 (Oehlers の分類 Type3) であることが明らかとなった。根管と陥入部の立体的構造および陥入部の封鎖を確認するために 3DX 撮影を行った結果、根管の形態は複雑であり根尖が大きく開いていること、根管と陥入部は完全に分離しており、陥入部の根尖側の開口部は緊密に封鎖されていることが確認された。3DX の診断結果に基づいて、根管は根尖の緊密な封鎖を考慮した感染根管治療を行うこととし、陥入部は開口部の緊密な封鎖が確認されたため、再治療は行わないと決定した。感染根管治療を開始、根管充填材を除去、根管通過法を行うと瘻孔から薬液の溢出が確認された。練板上で加熱したスパチュラを用い加熱軟化させながら No. 140 のポイントを 3 本より合わせ作製したポイントを用い、再度加熱し適度に軟化し根管に挿入・除去を 2、3 度行い、根管形態に合わせて調整した自作のポイントと水酸化カルシウム系シーラーを用いた側方加圧法にて根管充填を行った。2 年後の経過観察では、臨床症状はなく、経過良好であった。

(症例 2) 患者は 19 歳女性。上顎左側中切歯の根尖部歯肉の腫脹・圧痛を主訴に当科に依頼され来院した。患者は、小学 6 年生の時てんかんの発作で転倒、上顎左側中切歯を打撲、近医にて歯冠形態修正を受けた。当科来院 1 か月前に上顎左側中切歯の根尖部歯肉の腫脹を自覚し開業医を受診、エックス線検査によって根未完成歯と診断、専門医による根管治療が必要ため、髄室開拓・根管開放し、以後の治療を当科に依頼された。紹介医における初診時エックス線検査では、根管は太く、根管壁も極薄の根未完成歯で、根尖部には直径約 10mm の透過像が認められた。症例 1 と同様の方法で作製した自家製メインポイントと水酸化カルシウム系シーラーを用いて側方加圧法にて、根管充填を行った。エックス線検査の結果、作業長は適正であったが、根尖 1/4 部の遠心根管壁に死腔と思われる空隙の存在が疑われたが概ね良好な根管充填であった。1 年 6 か月後の経過観察では、病変内に歯槽骨の添加が確認でき、臨床症状はなく、経過良好であった。

### 【まとめ】

今回、太い根管を有する歯内歯と打撲歯の根管充填に、ロールポイント法で作製したポイントを軟化させて根管に適合させた適合性の良い調整したポイントを使用して緊密な根管充填を行い、臨床的に良好な結果を得た。症例 2 では、3DX によって 3 次元的構造を把握したうえで治療法を決定し、経過観察には症例 1、2 ともに 3DX 撮影を行い、根尖病変の治癒状況とともに根管充填の緊密性を再確認した。近年熱可塑性ガッタパーチャやMTAを用いた新たな根管充填法が行われており、太い根管にもそれら根管充填法が応用されている中で、今回行ったロールポイント法で作製したポイントを軟化させ根管に適合させ使用する方法は、今後根管充填用シーラーの選択、根管充填法の改良を再考する余地はあるが、臨床的には、良好な結果が得られ、有効な方法であることが示唆された。

## 根管穿孔の処置に関する研究

鶴見大学歯学部 附属病院総合歯科 2、歯周病学講座\*  
○山口博康、矢作保澄、市古敬史、小林一行\*、八島章博\*、高水正明  
**A study about treatment of root perforation**

Tsurumi University School of Dental Medicine  
Department of General Dentistry and Clinical Education.  
Department of Periodontics\*

○YAMAGUCHI Hiroyasu, YAHAGI Hozumi, ICHIKO Takashi, KOBAYASHI Kazuyuki\*, YASHIMA Akihiro\*,  
TAKAMIZU Masaaki.

感染根管治療中の穿孔は、髓床底部の石灰化した根管口の探索中あるいは根管内の残存歯質の厚さが把握できず感染象牙質除去中に生じ、これらの確実な診断および修復法については構築されていない。

穿孔部は、臨床的に直視が困難であり、陈旧性の症例では肉芽が根管内に入り込むため、処置には出血が伴い確実な閉鎖操作が困難である。近年、マイクロスコープ観察下による診療精度が向上し、レーザー治療による穿孔部の止血、組織蒸散、さらに修復操作が可能となった。そこで本調査では穿孔の診断、治療術式およびその予後についての評価規準を構築する目的で、鶴見大学歯学部附属病院総合歯科 2 において認められた症例についてその結果を報告する。

### 術式

髓床底、根管壁穿孔部位は山口らのクラス 1 に従って分類した<sup>1)</sup>。穿孔部の診断および処置について、拡大鏡またはマイクロスコープを使用した。出血、肉芽の認められる症例については高出力レーザー (Nd:YAG、半導体) を使用し止血、肉芽を蒸散した。

接着操作における処置法および使用した材料については各症例ごとに記録した。

<クラス 1>: 髓床底または根管壁でクラックおよび穿孔が認められ、周囲組織の交通が生じている症例

a: 髓床底もしくは歯冠部のみが原因となっている症例

b: 根管壁のみが原因となっている症例

c: 髓床底と根管壁が連続して原因となっている症例

### 結果

26 症例中、大白歯が 18 歯、小臼歯 5 歯、前歯 3 歯であった。クラス 1-a (n=6)、クラス 1-b (n=16)、クラス 1-c (n=4) であった。出血、肉芽が伴う症例においては高出力レーザーを用いて肉芽の蒸散、止血後、21 症例ではスーパーボンド、3 症例においては低粘性レジン、1 症例で MT A、1 症例で垂直加圧根管充填を使用した。

### 考察

根管穿孔部の封鎖法ではマイクロスコープを使用することで確実なマージンの設定、止血、修復が可能となることから有効と考えられる。肉芽組織除去には、高出力レーザーによる確実な止血、封鎖操作が得られることが分った。根管穿孔の処置では、マイクロスコープおよびレーザー照射により良好に経過すると考えられ、今後術後経過について報告する。

### 参考文献:

- 1) 山口ら 8020 研究報告書 105-115, 2010.

本研究は科学技術研究費 基礎研究 (A): 課題番号 21249091 に基づいて行われた。

## 歯内療法と三叉神経痛

日本歯科大学附属病院総合診療科、生命歯学部歯科保存学講座\*  
○磯田浩太、北村和夫、石井隆資、山崎孝子、阿川透久、清水章矢、山添悠貴、勝海一郎\*

Endodontics and trigeminal neuralgia

Division of General Dentistry, The Nippon Dental Univ. Hospital, Department of Endodontics & Operative Dentistry\*, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo  
○ISODA K, KITAMURA K, ISHII T, YAMAZAKI T, AGAWA T, SHIMIZU F, YAMAZOE Y, KATSUUMI I\*

### 【はじめに】

三叉神経痛は電撃痛様発作や瞬間的疼痛、トリガーポイントの存在など特徴的な所見を示すことが知られている。しかしながら、なかには明らかな所見を示さず、適切な診断・治療を受けていない症例が多数存在する。今回我々は、歯内疾患の症状が優先されて診断に苦渋した三叉神経痛の一例に遭遇し、興味ある知見を得たので報告する。

### 【症例】

患者：54歳女性

主訴：上顎右側小臼歯部の違和感

現病歴：数ヶ月前より上顎右側小臼歯部の違和感及び右顔面部の痺れを自覚し、X-5年、当科受診となった。当院口腔外科へ三叉神経痛疑いにて対診を行うも、典型的症状でないため否定された。再度口腔内を精査し、保存不可と判断された上顎右側第二小臼歯の抜歯後、上顎右側第一小臼歯の抜髄処置を施行するも疼痛は消失せず、X-4年、患者は受診を中断した。中断時に大きな症状の変化はみられなかったが、X年、同部に自発痛及び咬合痛が出現したため、当科再受診となった。

既往歴：特記事項なし

家族歴：特記事項なし

現症：上顎右側小臼歯部に強い自発痛を訴え、上顎右側第一小臼歯に顕著な打診痛及び咬合痛を認める。患歯は、仮封用セメントで封鎖されており、根管には汚染された綿栓が認められた。また、X線検査の結果、同歯根尖部に境界明瞭な透過像を認める。

診断：上顎右側第一小臼歯の急性化膿性根尖性歯周炎

### 【治療及び経過】

X年4月より通法どおり感染根管治療を開始し、X年6月、打診痛(－)咬合痛(－)根管感染所見(－)となり側方加圧充填法により根管充填を施行した。

その後、強い自発痛は消退したものの、5年前から自覚している右顔面部の軽度の痺れは依然自覚していたが、根管治療後の違和感として数か月間経過観察を行った。しかしながら、右側頬部接触時の瞬間的疼痛(VAS30/100)を認めため、再考察を行い右側三叉神経痛第Ⅱ枝と診断しカルバマゼピン100mg/day投与を開始したところ疼痛症状は消退した。現在100mg/dayにてコントロール良好である。

### 【考察】

本症例においては、急性化膿性根尖性歯周炎と三叉神経痛が併発したものと考えられる。急性化膿性根尖性歯周炎により三叉神経痛症状がマスクされ、さらに症状の原因は歯科疾患であるとの先入観が強かったことから三叉神経痛の発見が遅くなってしまったものと考えられる。三叉神経痛患者の多くは最初に歯科を受診することが多いとの報告があり、それは歯科的原因を除外するために適切なことであると考えられる。しかし、口腔顔面部疼痛の原因を歯のみに照準を合わせ、原因が特定できないまま不用意な歯科治療を施行してしまうケースも少なくないとの報告もある。初期の段階において、特徴的所見がみられない三叉神経痛も存在するため、より注意深い診査と継続した経過観察の必要性が再認識された。今後、歯内療法と三叉神経痛の関わり方についてさらに検討を加える予定である。

## 慢性根尖性歯周炎に起因した口腔顔面領域における疼痛異常の神経機構

<sup>1)</sup> 日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座

<sup>2)</sup> 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

○清水 康平<sup>1,2)</sup>, 林 誠<sup>1,2)</sup>, 小森 規雄<sup>1,2)</sup>, 矢崎 直香<sup>1)</sup>, 小木曾 文内<sup>1,2)</sup>

### Mechanisms of orofacial hyperalgesia in periapical periodontitis

<sup>1)</sup> Departments of Endodontics, Nihon University School of Dentistry,

<sup>2)</sup> Divisions of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

○Kohei Shimizu<sup>1,2)</sup>, Makoto Hayashi<sup>1,2)</sup>, Norio Komori<sup>1,2)</sup>, Naoka Yazaki<sup>1)</sup> and Bunnai Ogiso<sup>1,2)</sup>

【研究目的】 歯髄炎や慢性根尖性歯周炎を発症した患者は様々な疼痛表現を示すが、しばしば鈍痛や口腔顔面の違和感などの異常感覚を訴える。また治療終了後、病因が取り除かれたにもかかわらず、症状が完全に消失しない症例も存在する。このような症例は、これまで患者の心因的要因、あるいは不十分な治療によるものと考えられてきた。しかしながら、最近の疼痛研究からこのような症状を誘導する一つの要因として、末梢あるいは中枢神経系の興奮性異常があると考えられるようになった。すなわち、末梢神経が感作されて神経の活動性増強が長時間持続すると、中枢神経系の活動性亢進が起り、ついで中枢神経系が感作されて結果的に異常疼痛が発症すると考えられているが、この発症機構に関しては不明な点が多く残されている。そこで本研究では、慢性根尖性歯周炎発症時における顎顔面組織の侵害刺激に対する疼痛変化を検索することにより、異所性疼痛異常の発現機構の一端を解明し、異所性疼痛発症の中枢処理機構について明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】 SD系雄性ラット(8~9w)をisoflurane(1.0~2.0%)で麻酔した後、右側上顎第一臼歯歯髄をカーバイトパーにて露髄後、Complete Freund's adjuvant (CFA)に浸漬したデンタルペーパーポイントの先端2mmを歯髄腔に刺入し、グラスアイオノマーセメントにて仮封を行った(CFA群)。同様にsalineを浸漬したポイントを刺入した群をVehicle群とした。その後、同部位を*in vivo* Micro X-ray CT System R\_mCT (R\_mCT, Rigaku)にて断層撮影を行い、根尖部骨欠損の拡大状態における経時的变化を三次元的に観察した。また、歯髄腔内CFA投与後、同歯相当部の顔面領域における機械あるいは熱刺激に対する逃避閾値の経時的变化を検索した。さらに、歯髄腔内CFA投与後3日と6週において、化学的刺激による顔面領域の痛覚過敏の変化を検索するため、3mM カプサイシン 100 $\mu$ lを、CFAポイントを刺入した歯髄と同側の咬筋に投与し、同側顎二腹筋前腹から筋放電量を記録し、顎反射の亢進を判定した。

【結果】 断層撮影像から根尖部における骨欠損の拡大はCFA投与後6週付近でピークに達していることが確認された。機械刺激に対する逃避閾値は、歯髄腔内CFA投与後1日から3日において、CFA群でVehicle群と比較して有意な低下を示していたが、投与後7日目でどの群も同程度の値まで回復した。熱刺激に対する逃避閾値は、歯髄腔内CFA投与後3日から6週以上にわたって有意な低下を示し、その回復は認められなかった。同側咬筋へのカプサイシン投与により反射性に誘発される顎二腹筋活動は、歯髄腔投与後3日あるいは6週ともに、CFA群においてVehicle群と比較して有意に大きい値を示していた。また、その筋放電の持続時間は歯髄腔CFA投与後3日では約1分間程度であったのに対し、6週では約5分間の持続時間の延長が認められた。

【考察および結論】 以上より、ラット臼歯CFA投与によって歯髄炎から根尖性歯周炎が誘導される過程で、CFA投与後1日から3日において顔面領域の機械および熱刺激に対する逃避閾値の有意な低下が認められたことから、この時期には同領域に異所性のmechanical allodyniaおよびhyperalgesiaが発症した可能性があると考えられた。一方、根尖部骨欠損が顕著であった時期、すなわち歯髄腔内CFAポイント刺入後6週では、同側咬筋へのカプサイシン投与によって誘導される反射性顎二腹筋活動の有意な亢進が認められたことから、根尖性歯周炎が発症することにより、顔面領域に異所性のhyperalgesiaが引き起こされた可能性があると考えられた。以上より、歯髄炎から根尖性歯周炎が誘導される過程では異所性疼痛発症には異なる中枢処理機構が存在していると考えられた。

## ガッタパーチャ漏出液が好中球機能に及ぼす影響

日本歯科大学新潟生命歯学部 微生物学講座<sup>1</sup>、新潟病院総合診療科<sup>2</sup>  
○葛城啓彰<sup>1</sup>、貝津 徹<sup>2</sup>、塩沢恵美<sup>2</sup>、江面晃<sup>2</sup>

The effect of Gutta-percha leakage fluid on PMN function  
Dept. of Microbiology<sup>1</sup>, Comprehensive Dental Care Unit<sup>2</sup>  
Nippon Dental University, school at Niigata  
○KATSURAGI Hiroaki, KAIZU Tooru, SHIOZAWA Emi, EZURA Akira

【目的】ガッタパーチャポイントのチェアサイドでの滅菌法の検討過程でガッタパーチャ自身からの溶出成分が周囲組織に影響を及ぼす可能性が示唆されたため、その細胞刺激作用について好中球を用いて検討することを目的とした。

### 【方法】

1. ガッタパーチャポイントには、現在、日本で流通している代表的5種類のガッタパーチャポイント#50を用い、37°C超純水中に各1本/ml、24時間静置し、ガッタパーチャ漏出液とした。
2. 細胞毒性試験  
ガッタパーチャ漏出液の細胞毒性を継代培養した3種類の株化細胞(L929細胞、3T3細胞、KB細胞)について、Almar blue(Invitrogen, CO.Carlsbad CA)法を用いて行いFluoroskan Ascent F1(大日本製薬、大阪)で計測した。
3. 好中球の分離  
実験へのインフォームドコンセントを得た健康者ヒト末梢血より静脈血を採取し、ポリモルフオペレップ(コスモバイオ、東京)を用い比重遠心法にて好中球を分離し、リン酸緩衝液(PBS)にて3回洗浄後、ハンクス緩衝液(HBSS、Sigma)にて細胞数を $1 \times 10^7$ /ml調整し好中球の機能測定実験に用いた。
4. 好中球機能の測定  
好中球機能の測定には、食細胞機能検査用マイクロビーズ(TORAY, 東京)を用いた。計測はルミホトメーターTD4000およびFluoroskan Ascent C1を用いて行った。好中球の食細胞機能反応系にガッタパーチャ漏出液を1~25w/w%になるように添加し、コントロール群(ガッタパーチャ漏出液無添加群)と比較検討した。活性酸素産生測定後、塗沫標本を作製し、乾燥・固定後、ギムザ染色を行い好中球の貪食率・貪食数を計測した。
5. ガッタパーチャ漏出液のICPS-7500分析  
本学先端研究センターにてガッタパーチャ漏出液の誘導結合プラズマ(Inductively Coupled Plasma)分析をICPS-7500(島津製作所、東京)にて実行した。

### 【結果】

1. 細胞毒性効果  
ガッタパーチャ抽出液は1~50w/w%の範囲で細胞毒性を示さなかった。この結果に基づき、好中球の機能測定実験に用いるガッタパーチャ抽出液の濃度を1~25w/w%とした。
2. 好中球機能に及ぼす影響  
ガッタパーチャ抽出液は、1~25%で濃度依存的に好中球からの活性酸素産生を増加させた。一方、好中球の貪食率・貪食数には影響を与えなかった。
3. ICP分析結果  
ICPS分析の結果、ガッタパーチャ漏出液中に1.6~1.8ppmの亜鉛を検出した。

### 【考察】

ガッタパーチャは生物学的安定性が高い材料ではあるが、その漏出液は、細胞毒性はないと考えられるが、細胞刺激効果があり好中球からの活性酸素産生を増強する効果が認められた。この結果は、根管充填後の術後疼痛や炎症発現に関与しているものと考えられる。

**CFA 誘導性歯髄炎により発症する舌の機械痛覚過敏に対する Toll-like Receptor4の関与**

<sup>1)</sup> 日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座

<sup>2)</sup> 日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門

○大原 絹代<sup>1),2)</sup>, 清水 康平<sup>1),2)</sup>, 武市 収<sup>1),2)</sup>, 鶴町 保<sup>1),2)</sup>, 會田 泰代<sup>1)</sup>, 小木曾 文内<sup>1),2)</sup>

**Toll-like receptor 4 in the trigeminal sensory neurons is involved in tongue-referred pain following tooth pulp inflammation**

<sup>1)</sup> Departments of Endodontics, Nihon University School of Dentistry,

<sup>2)</sup> Divisions of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

○Kinuyo Ohara<sup>1)2)</sup>, Kohei Shimizu<sup>1)2)</sup>, Osamu Takeichi<sup>1)2)</sup>, Tamotsu Tsurumachi<sup>1)2)</sup>,  
Yasuyo Aida<sup>1)</sup> and Bunnai Ogiso<sup>1)2)</sup>

【研究目的】歯髄に炎症が引き起こされると、歯痛だけでなく顔面や舌の痛みを発症する症例に遭遇することがあるがそのメカニズムは明らかでない。近年、三叉神経節(TG)の衛星細胞や神経細胞に発現する Toll-like receptor(TLR)が神経の興奮性変調に重要な役割を果たしていることがわかってきたが、その神経機構に関しては不明な点が多く残されている。そこで本研究では、歯髄炎によって舌に引き起こされる異所性疼痛に対する TLR4 の役割を解明することを目的とした。

【材料及び方法】SD 系雄性ラット(9w)の左側下顎第一臼歯を露髄させ、歯髄を Complete Freund's adjuvant (CFA)にて刺激後仮封し、CFA 誘導性歯髄炎モデルを作製した。歯髄処置前から処置後 21 日目まで、浅麻酔下にて左側舌背部に熱あるいは機械刺激を与え、頭部引っ込み反射閾値を測定した。歯髄処置後 3 日目に同モデルラットを灌流固定した後、TG における TLR4 発現を免疫組織学的手法にて解析した。さらに、歯髄処置後 TLR4 アンタゴニスト(LPS-RS)を 3 日間 TG 内へ持続投与し、舌への熱刺激あるいは機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値および TG における TLR4 発現を解析した。また、舌外側部に逆行性トレーサーである FluoroGold(FG)を 0.5  $\mu$ l 投与し、舌を支配する TG 細胞における TLR4 発現についても解析した。

【結果】CFA 処置後、舌への機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値が低下したが、熱刺激に対する頭部引っ込み反射閾値に変化は認められなかった。また、免疫組織化学的に TG 細胞において TLR4 発現が観察され、CFA 処置後 LPS-RS の三叉神経節内への持続投与により、舌への機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の低下が抑制された。また、FG によってラベルされた TG 細胞および FG 非陽性細胞において TLR4 発現が認められた。

【考察及び結論】以上の結果から、歯髄の炎症により活動性を増した TG 細胞は、舌を支配する TG 細胞に対して直接的に、あるいは衛星細胞を介して興奮性の亢進を誘導する可能性が示された。さらに、TG 内における興奮性の伝播においては、TG 細胞に発現した TLR4 が関与することが明らかになった。

## ブタ下顎第1後臼歯歯根形成初期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  
○新井恭子、山田理絵、北島佳代子、松田浩一郎、五十嵐 勝  
**Immunohistochemical observation of the initial formation**

### of the porcine mandibular first molar tooth

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

○ARAI Kyoko<sup>1)</sup>, YAMADA Rie<sup>2)</sup>, KITAJIMA Kayoko<sup>1)</sup>, MATSUDA Koichiro<sup>2)</sup> and IGARASHI Masaru<sup>1)</sup>

#### 【緒言】

歯は、外胚葉性間葉組織由来の細胞から成る歯胚によって形成される。歯胚はエナメル器、歯乳頭、歯小囊の3つに分けられ、エナメル器由来のヘルトウィッチ上皮鞘 (HES) が歯根形成に大きく関与している。上皮鞘は内外エナメル上皮が重なった二重構造を呈しており、その上皮層の内層に接する歯乳頭由来の間葉細胞は、上皮の誘導によって象牙芽細胞に分化し歯根象牙質の形成が始まる。歯根象牙質の形成が進行するに伴い象牙質を誘導する役割の終了したHESの上皮細胞は離散し、一部は網目状に残存して歯根膜の中に小さな細胞塊となり、この構造はMalassezの上皮残遺と呼ばれる。第133回大会において、五十嵐らは、生後6か月のブタ下顎第1後臼歯のHESから得られた上皮様細胞を用いて三次元培養を行い、上皮細胞の分化に伴う変化について検討し、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を発表した。今回われわれは、同時期のブタ下顎第1後臼歯の歯胚を用いて厚さ2μmのパラフィン連続切片を作製し、HESを含む歯根形成部の免疫組織学的観察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1後臼歯を摘出した。直ちに10%中性ホルマリン液で固定し、EDTA溶液で脱灰後にパラフィン包埋を行った。川本法によるパラフィン切片用の専用粘着フィルムを用いて厚さ2μmの連続切片を作製し、HE染色、アザン染色および免疫染色を行った。免疫染色に用いた切片は、パラフィン切片の抗体活性を高めるためにImmunosaver (日新EM社) で抗原賦活処理をした後、2.5%ウマ血清にてインキュベートし、Cytokeratin19 (CK19)、Involcrin (InV) を一次抗体としてマイクロウェーブ迅速試料処理装置 (MI-77、東屋医科器械) を用いて免疫染色を施した後、ヘマトキシリンにて対比染色を行った。

#### 【結果および考察】

薄切切片を作製する際に川本法を用いることで、形態が正確に保たれた薄い2μmの切片を作製することができ、HES部の形態をHE染色にて確認した。アザン染色では、HESは赤く染色され、歯根部歯髓の外胚葉性間葉細胞がHESに集まり象牙芽細胞へ分化し、歯根象牙質形成が始まる像が観察できた。免疫染色では、HES部のCK19の発現はわずかでInVの発現は明らかではなかったが、HESへ移行する部分のエナメル上皮では、歯根象牙質が形成している部位にCK19の発現が認められInVの発現はわずかにみられた。象牙質形成が開始している部位の象牙芽細胞では、InVの発現がみられた。

#### 【結論】

ブタ下顎第1後臼歯の歯根形成部では、CK19の発現がHESではわずかに、HESへ移行する部位のエナメル上皮では明らかに発現が認められた。今後は、更に細胞の特性を明らかにするとともに、歯根部の上皮細胞が歯肉組織の三次元培養と比較し分化機構の解明に役立てていくつもりである。

## Dentin Sialophosphoprotein 機能領域同定を目的とした改変型組み換えタンパクの作製

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 顎口腔頸部医科学講座 健康増進歯学分野

○小武家 誠司, 鈴木 茂樹, 西村 英紀

### The generation of modified recombinant DSPP proteins for exploring the functional domains.

Department of Dental Science for Health Promotion Division of Cervico-Gnathostomatology

Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences

○Seiji Kobuke, Shigeki Suzuki, Fusanori Nishimura

<研究目的>象牙質や骨組織を構成する有機質は主に I 型を主とするコラーゲンと種々の非コラーゲン性タンパク質よりなり、これらタンパク質が協調的に作用することにより石灰化が惹起される。Dentin sialophosphoprotein (DSPP) は象牙質に最も多量に存在する非コラーゲン性タンパク質で、骨組織にも発現を認める。ヒト DSPP 遺伝子異常がヒト象牙質形成不全症を引き起こすこと、更に Dspp 遺伝子欠損マウスにおいても同様の表現型を示すことから DSPP が硬組織形成において重要な役割を果たすことが明らかとなっている。また、DSPP はその高いカルシウム結合能から細胞外基質の石灰化に重要な因子であることが知られている。興味深いことに、近年の報告において DSPP は単に基質の石灰化に寄与する細胞外因子ではなく、積極的に細胞に働きかけ、細胞分化や形質転換を誘導する因子であることが明らかとなってきている。DSPP の C 末端開裂産物である Dentin phosphoprotein (DPP) は、我々の生体に存在するタンパク質の中で最も酸性度の高いタンパク質の一つであるとされる。その特徴として、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) からなるインテグリン結合配列を持つこと、また、そのアミノ酸配列中心に高度にリン酸化された約 200 の連続したセリン-セリン-アスパラギン酸繰り返し配列 (SSD repeat sequence) を持つことが挙げられる。また、DPP はその強い酸性度のために、哺乳類細胞でのリコンビナントタンパクの作製が非常に困難とされている。そこで本研究では、組み換えタンパクの効率良い作製方法を樹立し、インテグリン結合配列を類似アミノ酸で置換した非インテグリン結合型 DPP、SSD repeat sequence を短縮させた DPP などの改変型組み換えタンパクを作製し、DSPP の機能領域の同定を目的とした。

<材料および方法>1. 293EBNA 細胞 Epstein Barr Nuclear Antigen (EBNA) を導入したヒト胎児腎臓由来 293 細胞株を組み換えタンパク作製に使用した。2. DPP vector の作製: マウス切歯 cDNA から得た通常型 DPP 配列を pCEPpur $\Delta$  vector に組み込み、N 末端 6xHis タグ付き DPP 組み換えタンパク作製用 vector を樹立した。3. インテグリン結合領域改変型 DPP vector の作製: Mutagenesis kit を使用し、インテグリン結合領域である RGD 配列を RGE (アルギニン-グリシン-グルタミン酸) に置換した。4. 繰り返し配列改変型 DPP vector の作製: SSD repeat sequence を含む vector をコンピテントセルに導入し形質転換を行うと、一部コンピテントセルでは repeat sequence が配列からはじき出されるという特性を利用して作製した。5. 293EBNA 細胞への導入並びに培養上清の回収: 上記の vector をそれぞれ細胞に遺伝子導入後、puromycin (5 $\mu$ g/ml) にて選択培養を行い、得られた安定発現株から無血清培養上清を回収した。6. 組み換えタンパクの精製: Ni-NTA Agarose を用いた 6xHis タグを利用した粗精製の後に Sepharose Q Column を用いた分画を行った。目的分画を透析後、タンパク濃度を BCA 法にて測定し実験に供した。

<結果>通常型 DPP vector のコンピテントセル形質転換を行い、核酸配列を解析した結果、繰り返し配列が約 75%、50%、10% に短縮された改変型 DPP vector の作製に成功した。RGD 配列を含む繰り返し配列以外は完全に通常型 DPP vector と一致していた。これら改変型 DPP vector を導入した 293EBNA 細胞より DPP タンパクを精製した。DPP タンパクのサイズを抗 DPP 抗体によるウェスタンブロッティングで解析した結果、通常型 DPP タンパクでは約 66kDa に陽性バンドを認めたのに対して、約 75% 短縮型 DPP では 51kDa、約 50% 短縮型 DPP では 40kDa、約 10% 短縮型 DPP では 22kDa 付近にバンドを認めた。作製した組み換え DPP タンパクは Stains-all 染色で青紫色を呈し、りん酸化タンパク特異的染色である ProQ Diamond 染色にて陽性を示したことから、高度にりん酸化修飾を受けた組み換えタンパク作製に成功した。現在、これら得られた組み換えタンパクを用いて、骨芽細胞、象牙芽細胞や間葉系幹細胞の分化に与える影響について、更にはこれら組み換えタンパク質の in vitro における石灰化物形成能の評価を行っている。

**Expression of p38 MAP kinase family in the rat central nervous system is  
regulated by signals from the tooth pulp**

○CHOKECHANACHAISAKUL Uraiwan<sup>\*1</sup>, KANEKO Tomoatsu<sup>2</sup>, SUNAKAWA Mitsuhiro<sup>1,3</sup>,  
OKIJI Takashi<sup>2</sup>, SUDA Hideaki<sup>1,4</sup>

1 Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, 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

**Objectives**

We have recently reported that the bacterial infection and subsequent inflammation of the rat dental pulp may not only trigger neuro-immune interactions in the dental pulp, but also stimulate the thalamic tissues by activation of pulpal afferents via central nociceptive neurons. Most notably, we have detected an increased mRNA expression of p38 MAP kinase family, such as MAPK 13 and MAPK 14, in the thalamus following unsealed exposure of the pulp. The mechanism of this upregulation is, however, still unclear. Thus, in this study, we performed quantitative gene expression analysis of MAPK 13 and MAPK 14 in the rat thalamus after pulp exposure with or without pretreatment of local anesthetic injection.

**Materials & Methods**

Five-week-old Wistar rats (n = 6) were used. A local anesthetic (2% lidocaine with epinephrine (1:80,000); 0.3 ml) or normal saline (control) was infiltrated into the soft tissue surrounding the left mandibular first molar using a 1 ml-syringe with a 30-gauge ultra-fine needle. The left mandibular first molar was then pulp-exposed with no. 1/2 round bur. After 24 hours, the right side thalamus was retrieved, and total RNAs were extracted. Then, gene expression levels of MAPK 13 and MAPK 14 mRNAs were analyzed by using real-time PCR.

**Results**

Expression of both MAPK 13 and MAPK 14 mRNAs in the lidocaine-pretreated animals showed significantly lower levels than that in the normal saline-pretreated animals (P < 0.05, t-test).

**Conclusion**

In the thalamus, the upregulation of MAPK 13 and 14 mRNAs induced by tooth pulp exposure was abolished by the preinjection of lidocaine in the tooth surrounding tissue. This suggests that the expression of p38 MAP kinase family in the thalamus is regulated by signals from the tooth pulp.

## 骨芽細胞様細胞の炎症応答において MTI-II が示す抗炎症作用の検討

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

聖マリアンナ医科大学 大学院 疾患プロテオーム・分子病態治療学<sup>3</sup>

○平田-土屋志津<sup>1</sup>、岡本一起<sup>3</sup>、寺下正道<sup>2</sup>、北村知昭<sup>1</sup>

### Effects of MTI-II on anti-inflammatory in osteoblastic cells

Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics<sup>1</sup>,

Division of Comprehensive Dentistry<sup>2</sup>, Kyushu Dental College

Clinical Proteomics and Molecular Medicine, St. Marianna University Graduate School of Medicine<sup>3</sup>

○HIRATA-TSUCHIYA Shizu<sup>1</sup>, OKAMOTO Kazuki, TERASHITA Masamichi<sup>2</sup>, KITAMURA Chiaki<sup>1</sup>

【目的】 難治性根尖歯周組織疾患の要因として特定細菌の関与が示唆される一方で、細菌の検出されない難治症例に歯科医師はしばしば遭遇する。このような臨床結果から、難治症例では十分にコントロールされていない「慢性炎症」が根尖部に持続していることが想像できる。根尖歯周組織に生じた骨欠損の再生を確実にするためには、感染制御と再生療法技術に加え、慢性炎症制御が重要と言える。これまでに我々は、骨組織再生療法の確立を目的として、炎症反応時の主たるシグナル伝達経路である NF- $\kappa$ B シグナルと BMP シグナルの相互作用に着目し、それらの相互作用について報告してきた。今回、ステロイドコアクチベーターである Macromolecular Translocation Inhibitor II (MTI-II) に着目し、骨芽細胞様細胞における炎症応答抑制効果について検討した。

【材料と方法】 骨芽細胞様細胞であるヒト骨肉腫細胞 MG63 に MTI-II 発現プラスミドを遺伝子導入後、位相差顕微鏡下で細胞形態を観察するとともに WST アッセイにより細胞増殖能を測定し遺伝子導入による影響を検討した。次に、MTI-II 発現プラスミドおよび NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼ発現プラスミドを同時に遺伝子導入し、炎症性サイトカイン TNF $\alpha$  (10 ng/ml) で 12 時間刺激後にルシフェラーゼ活性を測定し、NF- $\kappa$ B の転写活性を分析した。さらに、MTI-II 発現プラスミド導入細胞を TNF $\alpha$  で刺激後、全 RNA を調整し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成し、NF- $\kappa$ B 標的遺伝子として Matrix metalloproteinase (MMP-9) のプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、MMP-9 の発現を分析した。

【結果】 MG63 細胞に MTI-II 発現プラスミドを遺伝子導入し、位相差顕微鏡で観察したところ、コントロールの細胞と比べて、形態的特徴や細胞増殖能に有為差は認められなかった。一方、MG63 細胞を TNF $\alpha$  で刺激すると、NF- $\kappa$ B の転写活性が著しく上昇した。しかし、MTI-II を過剰発現させると MTI-II 濃度依存的に NF- $\kappa$ B の転写活性の上昇が解除・抑制された。また、細胞を TNF $\alpha$  で刺激すると、MMP-9 の発現の増加が認められたが、MTI-II を過剰発現させた細胞では、MMP-9 の発現増加が解除・抑制された。

### 【考察】

今回の結果は、ステロイドコアクチベーター MTI-II が MG63 細胞の形態や増殖能に影響を及ぼすことなく、TNF $\alpha$  刺激に対する MG63 細胞の炎症応答を抑制することを示している。以上の結果は、MTI-II が難治性根尖性歯周炎等に対する抗炎症剤としての可能性を示唆している。

### 【結論】

ステロイドコアクチベーター MTI-II は、骨芽細胞様細胞 MG63 が示す TNF $\alpha$  刺激に対する炎症応答を抑制する。

特許番号：4874798 (日本、査定済)、US 7932226 (米国、査定済)、05755776.1 (EU、査定中)

## キトサンの血管内皮細胞に及ぼす影響について

昭和大学歯科病院・歯内治療科  
○亀田 歩、増田 宜子、鈴木 重紀

### Effect of chitosan on endothelial cells.

Showa University, Dental Hospital, Endodontics  
○Ayumi Kameda, Yoshiko Masuda, Shigenori Suzuki

(目的) キチンは甲殻類、昆虫類の外骨格や、多くの真菌類の細胞壁に含まれている。N-アセチル-D-グルコサミンを基本構成単位とする生体内高分子のアミノ多糖体である。このキチンを濃アルカリ中での煮沸処理等により脱アセチル化して得られたものがキトサンである。キトサンは抗菌作用、マクロファージ活性化作用、創傷治癒促進能力を有する生理活性物質として知られている。このような特性を利用して医学領域では既に火傷治療用の創傷保護材、組織再生材など様々な成形体として臨床応用されている。

第125回の日本歯科保存学会において我々はMTAによる組織親和性への影響を培養ラット歯髄細胞の形態変化について報告した。第127回日本歯科保存学会において培養ラット歯髄細胞のMTAによる象牙芽細胞様細胞分化への影響を共焦点レーザー顕微鏡を用いて水酸化カルシウム製剤と比較し免疫組織化学的に調べ、検討した。

同様にして血管内皮細胞を用いてキトサンによる組織親和性への影響をMTAと比較し共焦点レーザー顕微鏡を用いて免疫組織化学的に調べることにした。

(材料と方法) ラット血管内皮細胞(旭硝子)を5%CO<sub>2</sub>条件下にて $\alpha$ -MEM培地に10%FBSを加え、コラーゲンコートedのフラスコ75cm<sup>2</sup>で培養し、サブコンフルエントに達したら1x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>の濃度でコラーゲンコートedの6well plate (Transwell®, Corning Inc.)に継代した。培養液は2日ごとに交換した。敷石状を呈したところで、直径7mm、高さ3mmのキトサンブロックを37℃湿潤下24時間硬化させた後、培養ウェル中央に静置した。6well plateは、静置後5、14日後に10%ホルマリン固定を行った。免疫組織染色には、1次抗体として400倍希釈のウサギ抗ヒトTGF- $\beta$ 1抗体(Santa Cruz Bio., Inc.)、400倍希釈のヤギ抗ヒトActin抗体(Santa Cruz Bio., Inc.)を用いた。2次抗体として、1000倍希釈のCy-3抗ヤギIgG抗体(Vector Lab., Inc.)、1000倍希釈のFITC抗ウサギIgG抗体(ROCKLAND, Inc.)を用い共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

(結果) MTAでは5日後試料に近接したところでは細胞の数の減少が見られた。14日後では、細胞の増殖を認めたが、委縮したような細胞の変形が見られた。一方キトサンでは、5日後試料に近接したところでもMTAより細胞数は多かった。14日後ではさらに増殖が見られ、血管内皮細胞本来の紡錘形の形状をしていた。

(考察及び結論) 血管内皮細胞ではキトサンがMTA以上に組織親和性が高いことが示唆された。今後は、TGF- $\beta$ -1遺伝子の発現をRT-PCR等で調べ、キトサンの歯髄細胞への影響についても検討していく予定である。

### 歯根膜から得た上皮様細胞の幹細胞マーカー陽性 SP 分画細胞を用いた三次元培養の免疫組織学的解析

<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>、山田理絵<sup>2)</sup>、新井恭子<sup>1)</sup>、

<sup>2)</sup>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<sup>2)</sup>、五十嵐 勝<sup>1)</sup>

#### Immunohistochemical analysis after three dimensional culture using SP fraction cells of stem cell marker positive epithelial like cells derived from PDL

<sup>1)</sup>Department of Endodontics, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

<sup>2)</sup>Advanced Operative Dentistry · Endodontics, Graduate School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University

OKITAJIMA Kayoko<sup>1)</sup>, YAMADA Rie<sup>2)</sup>, ARAI Kyoko<sup>1)</sup>, MATSUDA Koichiro<sup>2)</sup> and IGARASHI Masaru<sup>1)</sup>

**【研究目的】**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、ヘルトウィッチ上皮鞘(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は歯根嚢胞の発現機序の解明や予防、治療法の確立のための関連研究の推進に重要である。そこで PDL から得られた上皮様細胞を Flow cytometry(FCM)にてソートし、得られた SP 分画細胞を三次元培養(3DC)し、その増殖所見と免疫染色後の所見について検討することを目的とする。

**【材料および方法】**生後6か月のブタ下顎乳歯前臼歯(2、3)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中央 1/3 の歯根膜組織を収集した。上皮細胞培養液 FAD を使用し、Mitomycin 処理を施した 3T3(ATCC、#CCL92)を feeder として添加し、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。幹細胞マーカーとして CD44、ならびに血管内皮細胞マーカーとして CD31 を用い、BD Vantage™ SE(日本 BD)を用いて FCM 解析を行った。CD31-/CD44+ population から SP 分画の細胞を回収した。3DC には、コラーゲン溶液に 10 倍濃度の DMEM を添加後 1N-NaOH で中和し、6well plate に 10%(V/V)FBS と 2~3 代継代した線維芽細胞 1.0×10<sup>5</sup> cells/well を加えてコラーゲンゲル内培養を行い、37°C CO<sub>2</sub> 下で 20 分間インキュベートし、ゲル表面に FCM 解析で得られた SP 分画細胞を播種し、24 時間後にナイロンシート上に移して、気相培養を行った。1、2、3 週後に 10%中性ホルマリンに浸漬固定後、厚さ 6μm の連続パラフィン切片を作製した。Immunosaver(日新 EM 社)で抗原賦活処理後、PAN Cytokeratin(PAN-CK)、Cytokeratin19(CK19)、Involcrin(InV)、integrin α6、integrin β4 を用いて免疫染色を行った。

**【成績】**歯根中央 1/3 の 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 FCM にてソートしたところ、CD31-/CD44+ population から高い幹細胞活性をもつ Side Population(SP)分画細胞が確認された。得られた SP 分画細胞の三次元気相培養では、数層の細胞からなる上皮様構造が確認され、表層部では細胞は扁平化し、角化傾向が認められた。基底部から表層におよぶ上皮組織全体に PAN-CK の強い発現が認められた。InV は、1 週例で細胞質内に点状に散在もしくは局在して発現し、経時的に細胞質内全体に広く発現が認められるようになった。CK19 は弱い発現がみられたが、integrin α6 と integrin β4 の特徴的な明らかな発現は確認できなかった。

**【考察ならびに結論】**歯根膜組織から得られた上皮様細胞の Flow cytometry 分析の結果、幹細胞活性を持つとされる SP 分画細胞が確認されたことから、歯根膜組織中に上皮幹細胞が存在することが確認された。SP 分画細胞は三次元培養によりそれ自体で角化層を伴う上皮様構造を形成し、上皮組織全体に cytokeratin を強く発現し、細胞質内には InV を発現することが示された。今後 Integrin の発現等をさらに詳細に検討する必要があるが、これらの細胞やこれらの細胞を用いた三次元気相培養は上皮組織に関する実験的研究に有用であることが示唆された。

本研究の一部は科学研究費基盤研究(C)(21592435)の助成を受けたものである。

## アルギン酸ナトリウム/リン酸カルシウム複合スポンジ状担体 での骨髄幹細胞による硬組織形成

大阪歯科大学 口腔治療学講座  
○薮内 崇督、柿木 栄幸、辻 則正、好川 正孝、林 宏行

Hard tissue formation by bone marrow cells in alginate/calcium phosphate composite sponge scaffolds  
Department of Endodontics, Osaka Dental University  
○YABUCHI Takayoshi, KAKIGI Hideyuki, TSUJI Norimasa, YOSHIKAWA Masataka, HAYASHI Hiroyuki

### 【研究目的】

硬組織の再生には主にハイドロキシアパタイトが担体に用いられている。しかし、ハイドロキシアパタイトは極めて硬く、歯の硬組織の部分的欠損の形状に合わせることは難しく、このような歯の欠損部の修復に使用するには適当ではない。臨床で歯の部分的欠損の再生を試みるにはその欠損部に容易に適合させ得る担体が望まれる。そこで、生体適合性に優れ、幹細胞の培養に使用されているアルギン酸ナトリウム(AL)を基材とするALゲルから容易に歯の様々な形状の欠損に合わせて成型が可能なスポンジ状担体を作製し、その担体内における硬組織形成を評価する目的で本研究を行った。また、構造強化を図るために $\alpha$ -リン酸三カルシウム(TCP)、あるいは $\beta$ -TCPを添加して複合スポンジ状担体(TCP/AL担体)を作製した。そして、これらの微細構造を走査型電子顕微鏡で観察した。さらに、アルギン酸ゲルから作製したこれらのスポンジ状担体における硬組織形成を評価するために、これらのスポンジ状担体内に骨髄細胞を播種して *in vitro* で硬組織を誘導し、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性とオステオカルシン量を測定した。

### 【材料および方法】

アルギン酸ナトリウム(AL)を超純水に混和・溶解し、4%(w/n)ALゲルを調整した。さらに、ALゲルに10%(w/n)濃度の $\alpha$ -TCPあるいは $\beta$ -TCPを添加して、10% $\alpha$ -TCP/4%AL複合ゲルおよび10% $\beta$ -TCP/4%AL複合ゲルを調整した。これらを外径8mm、内径6mm、高さ10mmの円柱状の金属リングに填入し凍結した後、0.5%(w/n)塩化カルシウム水溶液に浸漬して架橋した。架橋後、真空凍結乾燥によって3種類の担体(4%ALスポンジ状担体、10% $\alpha$ -TCP/4%AL複合スポンジ状担体、10% $\beta$ -TCP/4%AL複合スポンジ状担体)を作製した。担体の超微細構造を走査型電子顕微鏡で、また培養液中での担体の形状の変化を肉眼的に観察した。

6週齢の雄性Fischer344ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取し、初代培養を行った。担体1個につき $1 \times 10^6$ 個/200 $\mu$ lの骨髄細胞を播種して3週間培養を行った。培養後、担体内のALP活性を生化学的に、オステオカルシン量を免疫化学的に測定した。

### 【結果と考察】

2種類のTCP/4%AL複合スポンジ状担体におけるALP活性は4%ALスポンジ状担体よりも有意に高い値を示した。とくに、10% $\alpha$ -TCP/4%AL複合スポンジ状担体のALP活性は有意に高かった。また、オステオカルシン量も4%ALスポンジ状担体よりも有意に高い値を示し、10% $\alpha$ -TCP/4%AL複合スポンジ状担体は最も高い値を示した。真空凍結乾燥によってALゲルから作製されたALスポンジ状担体は培養液中で膨潤し、形状が維持できなかった。培養液中でのAL担体の形状維持のためには、ALゲルへのTCPの添加、または化学架橋が有効であった。それぞれの担体には硬組織形成のために必要な形状の気孔が存在しており、TCPを含むALゲルから作製したTCP/AL複合スポンジ状担体ではTCPが細胞の付着を増加させ、さらに、細胞の分化および硬組織形成に有効であったと考えられる。とくに、 $\beta$ -TCPより易溶性である $\alpha$ -TCPは無機イオンの溶出によって、担体内での硬組織形成を促進したものと考えられる。

### 【結論】

TCP/AL複合ゲルから作製した複合スポンジ状担体は硬組織形成に有効であった。とくに、10% $\alpha$ -TCP/4%AL複合スポンジ状担体はその気孔内で硬組織を効果的に形成したことが免疫化学的に示された。

## アメロブラスチンの上皮細胞増殖に対する影響

九州歯科大学口腔治療学講座齶蝕歯髓疾患制御学分野<sup>1</sup>, 医療人間形成学講座総合診療学分野<sup>2</sup>  
○西藤法子<sup>1</sup>, 鷲尾絢子<sup>1</sup>, 寺下正道<sup>2</sup>, 北村知昭<sup>1</sup>

### The influence and mechanism of ameloblastin in epithelial cells

Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics, Department of Cariology and Periodontology<sup>1</sup>, Division of Comprehensive Dentistry, Department of Clinical Communication and Practice<sup>2</sup>, Kyushu Dental College

○SAITO Noriko<sup>1</sup>, WASHIO Ayako<sup>1</sup>, TERASHITA Masamichi<sup>2</sup>, KITAMURA Chiaki<sup>1</sup>

【研究目的】 歯根肉芽腫や歯根嚢胞を含む難治性根尖病変成立過程に上皮細胞が重要な役割を果たすことから、歯周疾患治療同様、根尖性歯周疾患治療においても上皮細胞制御は重要なステップと言える。ブタ歯胚由来エナメルマトリックスタンパクであるエナメルマトリックスデリバティブ (エムドゲイン) は歯周治療における歯周組織再生誘導材料として用いられており、その臨床的有効性が広く知られている。エムドゲインの作用メカニズムとして、歯根膜に存在する未分化間葉細胞をセメント芽細胞に分化させることが報告されているが、詳細な検討は十分に行われていない。これまでに我々は、エムドゲインを逆相高速液体クロマトグラフィーにて分画化し、破骨細胞分化活性を持つ画分と上皮細胞の増殖抑制活性を有する画分をそれぞれ確認するとともに、上皮細胞の抑制活性を有する画分についてプロテオーム解析を行った結果、同画分にはアメロブラスチンが多く存在していることを明らかにしてきた。アメロブラスチンは歯の発生においてエナメル芽細胞で産生されるタンパク質であり、欠損マウスの観察結果からエナメル質形成やエナメル芽細胞の極性決定に関与していることが知られている。さらに近年の研究から、アメロブラスチンはエナメル質形成のみならず、細胞の分化維持、細胞極性、および増殖制御に積極的に関与していることが報告され、その生理機能に注目が集められている。

今回、われわれは上皮細胞増殖に対するアメロブラスチンの作用に注目し、リコンビナントのアメロブラスチンを精製し、*in vitro*での解析を行った。

【材料と方法】 アメロブラスチン発現プラスミド (pcDNA3.1-FLAG AMBN) を African green monkey の腎上皮細胞 (cos7 細胞) に導入後、抽出タンパク質に対して、Anti-FLAG M2 Affinity Gel Column を用いたカラム精製を行い、アメロブラスチンを単離精製した。精製の各ステップで得られた画分については、Anti-FLAG 抗体を用いた Western blotting 法でタンパク質発現を確認した。

次に、精製したリコンビナント・アメロブラスチンをマウス歯肉上皮細胞株 (GE-1 細胞) とヒト扁平上皮癌細胞株 (SCC-25 細胞) に添加後 48 時間培養し、Water soluble tetrazolium salt (WST) assay を用いて細胞増殖能に対するリコンビナント・アメロブラスチンの影響を分析した。

【結果】 pcDNA3.1-FLAG AMBN を導入した cos7 細胞より抽出・精製したリコンビナント・アメロブラスチンは、GE-1 細胞および、SCC-25 細胞に対して増殖抑制効果を示した。この増殖抑制活性は濃度依存的であり、アメロブラスチン 50  $\mu$ g/ml で 86 % (GE-1 細胞)、56 % (SCC-25 細胞) の細胞増殖抑制率を示した。

【考察】 今回、アメロブラスチンが上皮細胞の増殖に対する強い抑制活性を有することが明らかとなった。以上の結果は、歯周組織再生過程で用いられたエムドゲインが、セメント芽細胞分化誘導とともに、その成分であるアメロブラスチンにより歯根膜面に対する上皮細胞の侵入を阻害することで、歯槽骨や結合組織の再生を誘導する可能性を示唆している。今後、歯根肉芽腫や歯根嚢胞を含む難治性根尖病変成立過程における上皮細胞機能への影響を検討していく予定である。

【結論】 精製リコンビナント・アメロブラスチンは、*in vitro*実験系において上皮細胞の増殖抑制効果を示した。

## 実験的歯間分離によりマウスの歯髄に発現する硬組織関連因子

松本歯科大学歯科保存学第2講座  
○佐藤将洋 鍋山篤史 山本昭夫 笠原悦男

### Expression of hard tissue related factors in the mouse dental pulp after immediate teeth separation

Department of Endodontics and Operative Dentistry, Matsumoto Dental University  
○Sato Masahiro, Nabeyama Atsushi, Yamamoto Akio, Kasahara Etsuo

#### 【目的】

実験的歯間分離のメカニカルストレスが歯髄に及ぼす影響を、病理組織学的に検討するとともに、代表的な硬組織関連因子である Runx2 と ALP の免疫組織化学的発現状況を明らかにすることによって追究した。

#### 【方法】

- 1) 実験動物： 8 週齢で、体重 $35 \pm 5$ g (30~40g) の ddY 系雄性マウス計 36 匹を日本 SLC 株式会社 (浜松、日本) にて購入し、1 週間の経過観察の後、健康と考えられるもののみを使用した。
- 2) 実験方法： マウスはイソフルの吸入麻酔下にて実験を行った。開口状態下にて、マウスの歯間分離を行うために上顎右側の第一臼歯 (M1) と第二臼歯 (M2) の間に口蓋側からウェッジ (Anatomical WIZARD WEDGES: Water Pik, Inc. Ft. Collins, Colorado, U.S.A.) を挿入した。実験群はまず、歯間分離の時間を 30 分群 (18匹) と 3 時間群 (18匹) の 2 群に分け、その時間が経過した段階でウェッジを取り除いた。その直後、3 時間、9 時間、24 時間、3 日および 1 週間経過する毎に各3匹の試料採取を行った。試料採取には、前記と同様にイソフルの吸入麻酔下にて行い、当該部のマウス上顎右側臼歯部歯周組織を一塊にして摘出した。なお、対照群としては同じ実験動物の反対側の同部位を用い同様に検討した。
- 3) 病理組織学的検討および免疫組織化学的検討： 4%パラホルムアルデヒド0.05 M リン酸緩衝固定液にて4℃、24時間の浸漬固定を行った。その後、10% EDTA脱灰液にて3週間後、パラフィンにて包埋した。当該歯根の歯髄の横断像を得るように厚さ4 $\mu$ mの水平連続切片を作製し、病理組織学的ならびに免疫組織化学的検索を行った。免疫染色に先立ち、60℃のインキュベーターにて30分間の前処置後、キシレンにて脱パラフィンを行った。免疫組織学的検討には Dako Envision + Kit-K4006 (Dako, Glostrup, Denmark) を用いて行った。免疫染色では、一次抗体として Rabbit polyclonal Runx2 antibody (Runx2 [M-70]: SC-10758, 1:5000, Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA, USA)、Mouse monoclonal ALP antibody (ALP [B4-78]: MAB1448, 1:5000, R&D Systems, Inc, MN, USA) を用いた。免疫染色後の試料はヘマトキシリンにて対比染色を行った。また、陰性対照としては同じ実験プロトコールにて一次抗体の代わりに PBS を用いて染色した。

#### 【結果および考察】

今回の実験において、病理組織学的検討では、対照群と実験群の間に顕著な差異を認めることが出来なかった。

免疫組織化学的に、対照群の歯髄では血管内皮細胞や歯髄固有細胞に Runx2 と ALP の弱い発現があり、これは咀嚼や舌圧などの生理的メカニカルストレスに対して発現していると推察された。

実験群において、Runx2 では、歯間分離 30 分群、同 3 時間群の両群ともに Runx2 の発現は 24 時間後にほぼ最大を呈し、以後その発現は徐々に消退し、1 週間で対照群と同レベルになっていた。また、ALP においても、歯間分離 30 分群、同 3 時間群の両群ともに ALP の発現は 24 時間後にほぼ最大を呈し、その後発現は弱まり、1 週間で対照群と同レベルにまで低下していた。今回の実験系では、観察した部位は歯根部歯髄で、この部は高齢者では第3象牙質の増殖などによって根管狭窄が惹起される。この変化は一般的に加齢変化によるとされているが、その原因のひとつとして外部から歯根に作用するメカニカルストレスがある事が伺えた。しかし、今回の実験データ、すなわち Runx2 および ALP の免疫組織化学的発現を指標とするものでは、1 週以内に対照群レベルに発現低下していたので、臨床的なウェッジ挿入によって大きな傷害作用は起こさないと考えられた。

【会員外共同研究者】 川上敏行、中野敬介 (松本歯科大学 総合歯科医学研究所 硬組織疾患病態解析学ユニット)  
斎藤進之介 (松本歯科大学 歯科保存学第2講座)

## ヒト歯髄培養細胞の Smads リン酸化における PGE<sub>2</sub> の影響

日本大学松戸歯学部 歯内療法学講座<sup>1)</sup>

日本大学口腔科学研究所<sup>2)</sup>

○安達 泰佑<sup>1)</sup> 岡部 達<sup>1)</sup> 喜多詰 規雄<sup>1)</sup> 五味博之<sup>1)</sup> 酒井 きよ美<sup>1)</sup> 松島 潔<sup>1,2)</sup>

Effect of PGE<sub>2</sub> on Smads phosphorylation in human dental pulp cells

<sup>1)</sup>Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

<sup>2)</sup>Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

○Taisuke ADACHI<sup>1)</sup>, Tatsu OKABE<sup>1)</sup>, Norio KITADUME<sup>1)</sup>, Hiroyuki GOMI<sup>1)</sup>, Kiyomi SAKAI<sup>1)</sup>,

Kiyoshi MATSUSHIMA<sup>1,2)</sup>

### 緒言

歯髄は慢性う蝕や摩耗症、咬耗症などの軽度の外来刺激を受けると硬組織形成を促進し修復象牙質を形成する。坂本らはヒト歯髄培養細胞において低濃度のプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 刺激で硬組織形成能が促進され、高濃度 PGE<sub>2</sub> 刺激により抑制すると報告している (日本歯科保存学雑誌 第 46 巻 第 3 号)。このことから歯髄の硬組織形成と炎症は密接にかかわり合うものと考えられている。近年、歯髄における硬組織形成を促すため再生医療の研究多くがなされているが、臨床において覆髄処置が必要となる歯髄はすでに炎症が起きていることを考慮しなければならず、歯髄における炎症と硬組織形成メカニズムを解明することは、象牙質再生医療に必須と考えられる。

再生医療において Bone Morphogenetic Protein (BMP) は歯髄の硬組織形成を促進させると報告されており象牙質再生医療への応用に期待されており BMP のシグナル伝達は細胞膜に存在する BMP 受容体を介し、細胞内に存在する Smad により核内に伝達されている。しかし歯髄炎症時において Smad の発現に関する報告は少ない。そこで我々はヒト歯髄細胞において PGE<sub>2</sub> 刺激により歯髄炎を想定し Smad 発現におよぼす影響を検討した。

### 材料および方法

#### 1. 細胞培養

試料は日本大学松戸歯学部付属病院に治療のために来院し、矯正学的理由により抜去された第三大臼歯から歯髄を無菌的に取り出し、10%牛胎児血清 (10%FCS)、100 µg/ml penicillin G、100 µg/ml kanamycin sulfate (明治製菓社製)、0.3 µg/ml fungizone (Gibco 社製) を含む α-minimum essential medium (α-MEM, Gibco 社製) を用いて、37°C、5%CO<sub>2</sub>、95%気相下にて out growth し 5~9 代継代したものを実験に用いた。

#### 2. ヒト歯髄細胞の処理

炎症時の影響を検討するために、0.01、0.1、1 µM の濃度の PGE<sub>2</sub> (Cayman CHEMICAL 社製) を添加し、無刺激のものを control とした。

上記培養条件にて 10 cm culture dish にて培養を行い、6 時間後に CelLytic M Lysis Reagent (SIGMA 社製) を用いてタンパク質を回収を行い、3×SDS sample buffer および 30×DTT を用いて、100°C で 5 分間処理した細胞をサンプルとし、Western Blot 法により Smad の発現の変化を検索した。

### 結果および考察

6 時間値において特異型 Smad (以下 R-Smad) である Smad 1, 5, 8 の発現に変化は認められないものの、Smad 1, 5, 8 が BMP レセプターによりリン酸化された P-Smad 1, 5, 8 の発現が PGE<sub>2</sub> 濃度 0.1 µM 刺激にてピークを示し、1 µM にて減少を認めた。

R-Smad である Smad 1, 5, 8 は BMP 受容体によりリン酸化され、共有型 Smad (Co-Smad) である Smad 4 と R-Smad のいずれかが複合体を形成し、核内へと移行することによりシグナル伝達を行う。

抑制型 Smad (以下 I-Smad) である Smad 7 は R-Smad のレセプターによるリン酸化に競合したり、R-Smad に結合することによって R-Smad と Co-Smad の複合体形成を阻害することによってその作用を抑制する。

これらのことから高濃度の PGE<sub>2</sub> 刺激における硬組織形成抑制には細胞内における Smad のリン酸化の調節が深くかかわるものと思われた。

## Prostaglandin $F_{2\alpha}$ は歯髄細胞における炎症メディエーター発現を調節する

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

### Regulatory effect of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on inflammatory mediator expression in 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<sub>2</sub>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 $F_{2\alpha}$ 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, Miyuchi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。演者らはこれまでに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の歯髄炎における役割について解析し、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明らかにしてきた(Hiraoら2009)。さらに、TLR2シグナルにより活性化された歯髄細胞に対するPGF $F_{2\alpha}$ の影響について検討し、PGF $F_{2\alpha}$ がvascular endothelial growth factorならびにinterleukin-6の産生を亢進させることを本学会2010年度秋季学術大会(第133回)において報告した。

今回、歯髄炎の病態形成において炎症性細胞浸潤に関与すると考えられている炎症メディエーター(interleukin-8(IL-8), CXCL10, CCL20)に着目し、歯髄細胞におけるそれらの発現に対するPGF $F_{2\alpha}$ の影響について検討を行った。

#### 【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. 炎症メディエーター発現に対するPGF $F_{2\alpha}$ 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 $F_{2\alpha}$ (Cayman Chemical)にて一定時間刺激し、培養上清中のIL-8, CXCL10ならびにCCL20濃度をELISA kit(R&D systems)を用いて測定した。また、PGF $F_{2\alpha}$ 受容体(FP receptor)の発現についても検討を加え、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】

歯髄細胞にPGF $F_{2\alpha}$ を単独に作用させたところ、IL-8の産生が僅かながら亢進したが、CXCL10およびCCL20の産生亢進は認められなかった。また、TLR2リガンドを単独作用させると、これらすべての炎症メディエーター産生が上昇した。さらに、TLR2リガンド刺激した歯髄細胞にPGF $F_{2\alpha}$ を共刺激させたところ、CCL20産生は相乗的に増強された。一方、CXCL10産生はPGF $F_{2\alpha}$ 濃度依存的に抑制され、IL-8産生は影響を受けなかった。なお、歯髄細胞におけるFP receptor発現については、Western blot解析により一定の発現量が維持されていた。これらの結果より、PGF $F_{2\alpha}$ は歯髄細胞における炎症メディエーター産生を調節している可能性が示唆された。

#### 【結論】

PGF $F_{2\alpha}$ は、TLR2リガンド刺激により歯髄細胞から誘導されるCCL20産生を増加させるが、CXCL10産生を減少させる。

## 象牙芽細胞分化過程における SUMO 化修飾因子と Osterix の局在

<sup>1</sup>松本歯科大学 口腔解剖学第2講座, <sup>2</sup>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, <sup>3</sup>松本歯科大学 歯科保存学第2講座  
○細矢明宏<sup>1</sup>, 吉羽邦彦<sup>2</sup>, 吉羽永子<sup>2</sup>, 笠原悦男<sup>3</sup>, 中村浩彰<sup>1</sup>

### Localizations of SUMO Proteins, Ubc9 and Osterix during Odontoblast Differentiation

<sup>1</sup>Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University; <sup>2</sup>Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences; <sup>3</sup>Department of Endodontics and Operative Dentistry, Matsumoto Dental University  
○HOSOYA Akihiro<sup>1</sup>, YOSHIBA Kunihiko<sup>2</sup>, YOSHIBA Nagako<sup>2</sup>, Kasahara Etsuo<sup>3</sup>, NAKAMURA Hiroaki<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

象牙芽細胞の分化には、骨芽細胞分化と共通する Runx2, Osterix を始め多くの転写因子が関与していると考えられているが、象牙芽細胞特異的な分化調節機構は未だ不明である。一方、Small ubiquitin related modifier (SUMO) 化修飾は、ユビキチン化に類似したタンパク質翻訳後修飾であり、多くの転写因子に対して転写を調節することが報告されている。そこで本研究では、SUMO 化修飾の象牙芽細胞分化における機能を検討する目的で、歯の発生ならびに象牙質再生過程における SUMO タンパク質 (SUMO1, SUMO2/3) および SUMO 化修飾に必須の酵素である ubiquitin conjugating enzyme 9 (Ubc9) の局在を免疫組織化学的に観察した。また、これらの SUMO 化修飾因子と Osterix 局在の関連も併せて検討した。

#### 【材料および方法】

胎生 (E) 15 日～生後 (P) 4 週齢 Lewis 系ラット下顎第一臼歯を 4%パラホルムアルデヒドにて固定し、通法に従いパラフィン切片を作製後、SUMO1, SUMO2/3, Ubc9 及び Osterix の免疫局在を観察した。また、4 週齢ラット下顎第一臼歯近心面に深さ約 400 マイクロメートルの象牙質窩洞を形成し、形成 1 日～8 週後の歯髓組織における各因子の局在を検討した。

#### 【結果】

蕾状期 (E15) 歯胚において、SUMO タンパク質、Ubc9 及び Osterix の特異的な反応は認められなかった。帽状期 (E17) 歯胚では、SUMO タンパク質および Ubc9 はいずれもエナメル器と歯乳頭の一部の細胞において陽性反応を示したが、Osterix は陰性であった。象牙質形成が始まる鐘状期 (E20) になると、象牙芽細胞で SUMO タンパク質、Ubc9 および Osterix の陽性反応が認められたが、前象牙芽細胞ならびに歯髓細胞は陰性であった。歯根形成期 (P7-28) では、これらの因子は根尖部の象牙芽細胞で陽性反応を示したが、歯冠部の象牙芽細胞では反応がみられなかった。また、鐘状期と同様に、前象牙芽細胞及び歯髓細胞は陰性であった。次に、窩洞形成後の象牙質再生過程における SUMO 化修飾因子と Osterix の局在を検討した。形成 1 日後、窩洞直下の象牙芽細胞層とその近傍の歯髓組織に壊死がみられ、各因子の陽性細胞は認められなかった。4 日後、壊死組織の修復とともに、窩洞直下の歯髓組織に SUMO タンパク質、Ubc9 及び Osterix 陽性細胞の集積が観察された。7 日後、円柱状の象牙芽細胞が再生し修復象牙質が形成されるようになると、再生象牙芽細胞で各因子の陽性反応が認められた。再生象牙芽細胞におけるこれらの陽性反応は 4 週後まで観察されたが、8 週以降、再生象牙芽細胞の数が低くなると反応は消失した。

#### 【考察】

SUMO タンパク質、Ubc9 および Osterix は、歯の発生及び象牙質再生過程において分化直後の象牙芽細胞で局在が認められるが、象牙芽細胞の成熟化に伴い反応が消失することが明らかとなった。従って、SUMO 化修飾因子は幼若な象牙芽細胞において Osterix の転写を調節し、象牙芽細胞分化に重要な役割を担うことが示唆された。

## 熱刺激後に生存する象牙芽細胞様細胞は増殖能と基質形成能が亢進する

<sup>1</sup>福岡歯科大学口腔治療学講座歯科保存学分野, <sup>2</sup>九州歯科大学齶蝕歯髓疾患制御学分野, <sup>3</sup>総合診療学分野

○諸富孝彦<sup>1</sup>, 北村知昭<sup>2</sup>, 寺下正道<sup>3</sup>, 阿南 壽<sup>1</sup>

### Heat stimulation activates ability to proliferate and matrix production on surviving odontoblasts-like cells

<sup>1</sup>Section of Operative Dentistry and Endodontology, Fukuoka Dental College.

<sup>2</sup>Division of Pulp Biology, Operative Dentistry, and Endodontics,

<sup>3</sup>Division of Comprehensive Dentistry, Kyushu Dental College.

○Takahiko Morotomi<sup>1</sup>, Chiaki Kitamura<sup>2</sup>, Masamichi Terashita<sup>3</sup> and Hisashi Anan<sup>1</sup>

【研究目的】 歯髄は歯の知覚, 栄養, 免疫および修復を司る組織であり, 歯を保存する上で重要な役割を担う。一方, 歯髄は周囲を硬組織で囲まれた特殊な環境に存在する応諾性の低い組織であるため, 物理的, 化学的, そして細菌学的な刺激により重篤な炎症が引き起こされ, その結果壊死へ陥ることも少なくない。よって, 長期にわたる健康な歯の保存を可能とするために, 各種刺激の歯髄への影響を研究することは有意義である。

回転切削器具の使用により生じる発熱は, 窩洞形成時に歯髄を障害する重要な刺激因子のひとつである。これまでに我々は, 熱刺激によって歯髄由来細胞にアポトーシスが誘導されることを報告している。一方, 熱刺激後にも生存する細胞は増殖能と石灰化能を有し続けることや, 歯髄の障害後にも生き残った象牙芽細胞は, 活性化され反応性象牙質を形成することも報告されている。

今回我々は, ラット下顎切歯歯髄由来する象牙芽細胞様の特徴を有する細胞株 KN-3 を用いて, 熱刺激が象牙芽細胞様細胞に与える影響について詳細に検討した。

【材料と方法】 ラット下顎切歯歯髄由来細胞株 (KN-3) を細胞培養用ディッシュ (直径 60 mm) に播種し, 10% FBS 添加培地 ( $\alpha$ -MEM) で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境下にて 24 時間培養した。その後, 43°C, 45 分間の熱刺激を加えた。熱刺激直後, 12 時間, 1 日, 2 日および 3 日後に細胞を 0.5% トリパンブルーで染色し, 生細胞数を計測した。また熱刺激後 3 時間, 6 時間および 24 時間の時点でセルスクレーパーを用いて細胞を回収し, ウェスタンブロッティング法により各種のタンパク質発現量を確認した。サンプルバッファーでサンプルを懸濁後 SDS-PAGE によりタンパク質を分離し, PVDF メンブレンに転写した。メンブレンは室温にて 60 分間ブロッキングした後, 各種の 1 次抗体 (4°C, 12 時間) および 2 次抗体 (室温, 1 時間) と反応させた。メンブレンの洗浄には PBS-0.5% Tween20 を用いた。抗体反応後, シグナルを ECL Plus (GE Healthcare) で化学発光させ検出した。

【結果】 43°C, 45 分間の熱刺激直後より死細胞が確認され, 12 時間後には細胞数の減少が確認されたが, その後増殖に転じた。この間培養容器底面に付着した細胞には, 形態的な変化は認められなかった。細胞周期の進行に関与する Cyclin D1 および Cyclin E は, 熱刺激後 3 時間では減少傾向にあったものの 6 時間後には増加が確認された。熱刺激後の熱ショックタンパク (HSP) の発現量について, 代表的な HSP である HSP25, HSP70 そして HSP90 の発現を確認した。その結果, 3 種の HSP とも熱刺激後 3 時間から発現量が増加していた。特に HSP70 は熱刺激後顕著に発現量が増加し, 6 時間後をピークとして減少に転じた。一方, HSP25 および HSP90 は HSP70 ほどの強い増加は認められなかった。代表的な象牙芽細胞マーカーである象牙質シアロタンパク (DSP) の発現量は, 熱刺激後 3 時間の時点で減少が認められたが, その後 24 時間後まで増加していた。

【考察】 熱刺激後 12 時間では細胞数は減少していたが, 24 時間後には増殖が確認された。細胞周期を進行させる Cyclin D1 および Cyclin E の発現は, 熱刺激後 6 時間から増加した。このことから, 象牙芽細胞様細胞は熱刺激により強い傷害を受けるものの, 生存細胞においては増殖能が活性化されることが示唆された。また, 熱刺激後に各 HSPs の量が増加していたが, 特に HSP70 の増加が顕著であったことから, 熱刺激による障害から象牙芽細胞様細胞を保護する上で HSP70 の果たす役割の重要性が示唆された。DSP の発現は熱刺激後一時的に減少した後, 6 時間後からは刺激前よりも発現量が増加したことから, 熱刺激は象牙芽細胞の細胞外基質産生能を活性化することが確認された。歯科临床上, 各種の刺激が修復象牙質の形成を促すことは広く知られているが, 本研究結果より, 傷害を受けた象牙芽細胞や歯髄細胞は増殖能や基質産生能を向上させることによって, 積極的に反応性象牙質の形成を図る可能性が示唆された。

【結論】 熱刺激後にも生存した象牙芽細胞様細胞 (KN-3 細胞) は, 細胞増殖能や細胞外基質産生能が亢進した。

## 血管内皮細胞と歯髄細胞の共培養がラット培養歯髄細胞の石灰化へ与える影響について

昭和大学歯科病院・歯内治療科<sup>1</sup>、昭和大学歯学部・口腔生化学教室<sup>2</sup>

○増田 宜子<sup>1</sup>、山田 嘉重<sup>1</sup>、宮本 洋一<sup>2</sup>、上條 竜太郎<sup>2</sup>

### Effects of the co-culture of the endothelial cells and pulp cells on calcification of rat cultured dental pulp cells

Showa University, School of Dentistry, Dept of Endodontics<sup>1</sup>, Showa University, School of Dentistry, Dept of Biochemistry<sup>2</sup>

○MASUDA Yoshiko<sup>1</sup>, YAMADA Yoshishige<sup>1</sup>, MIYAMOTO Yoichi<sup>2</sup>, KAMIJO Ryutarō<sup>2</sup>

(目的) 第 133、135 回の本学会において我々は、血管内皮細胞と歯髄細胞の膜を介した共培養において TGF-β 1 遺伝子の発現について発表した。今回、膜を介さずに直接血管内皮細胞と歯髄細胞とを共培養した場合と膜を介した共培養とで石灰化培地による TGF-β 1、Osteocalcin 遺伝子の発現への影響を調べることにした。

(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%CO<sub>2</sub> 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。血管内皮細胞がコンフルエントになったら 1 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> の濃度で 6 well plate (Transwell<sup>®</sup>, Corning Inc.) の下段に継代し 7 日後に、コンフルエントになった歯髄細胞を上段に継代した。

上段の底は直径 8.0 μm の孔のポリカルボネートの膜で覆われている。37℃、5%CO<sub>2</sub> にて 1mM β-glycerophosphate とアスコルビン酸 (50 μg/ml) を添加した石灰化培地にて培養し 14 日後に下段の血管内皮細胞、上段の歯髄細胞の Total RNA を調整し cDNA を合成し TGF-β 1、Osteocalcin 遺伝子の発現を RT-PCR によって調べた。一方、血管内皮細胞を下段に継代した 7 日後に直接歯髄細胞を下段に継代しポリカルボネートの膜を介さない共培養も行った。上段に歯髄細胞を培養しない下段の血管内皮細胞と下段に血管内皮細胞を培養しない上段の歯髄細胞の培養を行い同様に測定した。コントロールとして石灰化培地を用いない培養も同様に行った。

(結果) 7 日後の RT-PCR の結果、石灰化培地を用いたものとコントロールとで TGF-β 1 遺伝子の発現に顕著な変化はなかったが、14 日後において膜を介した歯髄細胞において TGF-β 1 遺伝子の発現が減少し下段に血管内皮細胞を培養しない上段の歯髄細胞において増加が認められた。Osteocalcin 遺伝子の発現においては、石灰化培地を用い直接共培養するとコントロールと比較して発現が増加した。

(考察及び結論) 血管内皮細胞と歯髄細胞との膜を介した共培養と直接接した共培養とで石灰化培地にて石灰化を促進させた場合、TGF-β 1、Osteocalcin 遺伝子の発現に時期や発現量においてそれぞれ異なる影響が認められた。細胞間の距離によって遺伝子発現に相違があることがわかった。TGF-β 1、Osteocalcin 遺伝子の定量化と他の遺伝子発現についても石灰化培地を用いた場合と用いない場合において検討していく予定である。

## イヌ抜髄モデルにおける歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療法の有効性試験

<sup>1)</sup>国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部

<sup>2)</sup>愛知学院大学歯学部 小児歯科学講座、<sup>3)</sup>愛知学院大学歯学部 顎口腔外科学講座

<sup>4)</sup>愛知学院大学歯学部 歯内治療学講座、<sup>5)</sup>東北大学大学院歯学研究科 口腔保健発育学講座 顎口腔矯正学分野  
○庵原 耕一郎<sup>1)</sup>、石坂 亮<sup>1,2)</sup>、林 勇樹<sup>1,2)</sup>、堀部 宏茂<sup>1,3)</sup>、竹内 教雄<sup>1,4)</sup>、宮下 俊郎<sup>1,5)</sup>、中島 美砂子<sup>1)</sup>

### Preclinical efficacy evaluation of the pulp stem cell therapy following pulpectomy in dog mature teeth

<sup>1)</sup>Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute <sup>2)</sup>Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, <sup>3)</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, <sup>4)</sup>Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, <sup>5)</sup>Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Health and Development Sciences, Tohoku University Graduate School of Dentistry

○Koichiro Iohara<sup>1)</sup>, Ryo Ishizaka<sup>1,2)</sup>, Yuki Hayashi<sup>1,2)</sup>, Hiroshi Horibe<sup>1,3)</sup>, Norio Takeuchi<sup>1,4)</sup>, Syunro Miyashita<sup>1,5)</sup>, Misako Nakashima<sup>1)</sup>

#### 【研究目的】

私共はイヌの歯髄 CD105<sup>+</sup>細胞あるいは CD31<sup>+</sup>SP 細胞と SDF1 を抜髄後の根管内に自家移植すると歯髄が再生されることを発表した (第 132、134 回日本歯科保存学会)。しかし、歯髄 CD105<sup>+</sup>細胞や CD31<sup>+</sup>SP 細胞は抗体やフローサイトメトリーを用いるため、実際の臨床においては安全性やコストの面で問題が生じる。したがって、私共は幹細胞を分取する安全で高効率の新規の方法を開発した (本学会ポスター発表: 竹内教雄)。今回、臨床研究を行うための非臨床試験として、イヌの抜髄モデルを用いた歯髄再生に対するこの歯髄幹細胞の有効性を検討した。

#### 【材料と方法】

1. 歯髄幹細胞の分取: イヌ上顎犬歯を抜去し、安定かつ安全に細胞加工施設に輸送後、アイソレータ内で歯髄細胞を分離、培養した。2代目において、新規幹細胞分取法により歯髄幹細胞を分取し、増幅後凍結した。
2. 品質検査: フローサイトメトリーによる細胞表面抗原測定 (CD29, CD31, CD44), 細胞の生存率、細胞増殖を検討
3. 安全性検査: 各種細菌、マイコプラズマ、ウイルス、エンドトキシン検査
4. イヌ抜髄モデルにおける歯髄再生能の検索: 安定、安全に輸送した凍結した歯髄幹細胞を処置室にて融解した後、 $5 \times 10^5$  cells をコラーゲンに混合して遊走因子と共に根管内に自家移植した。
  - A. 形態学的解析: H-E、免疫染色 (BS-1 lectin, neurofilament, CD68, MHC class II)、in situ hybridization (*Dspp*, *enamelysin*)
  - B. X線解析: 移植後 3 ヶ月後における 根尖部閉鎖状態、根管石灰化状態の検討
  - C. 分子生物学的解析: Real-time RT PCR (*syndecan 3*, *Tenascin C*, *TRH-DE*, *periostin*)
  - D. in situ hybridization: 血管誘導因子、神経栄養因子 (*VEGF*, *GM-CSF*, *MMP*, *BDNF*, *GDNF*, *NGF*)

#### 【結果】

イヌ歯髄細胞から 2 代目で幹細胞を分取すると、約 5~6% が幹細胞として分取できた。この細胞をさらに増幅し凍結した後に検査すると、品質や安全性に異常はみられなかった。次に、イヌの歯の抜髄後の根管内にコラーゲン、遊走因子とともに歯髄幹細胞を移植すると、14 日において炎症性細胞や内部吸収がほとんどみられず、血管、神経を伴う歯髄組織の再生がみられた。また象牙質側壁には分化した象牙芽細胞がみられた。3 ヶ月後の X 線像では、根尖部の閉鎖と象牙質側壁への象牙質添加がみられた。歯髄幹細胞と遊走因子を共に移植したものはコラーゲンのみ、遊走因子のみ、歯髄幹細胞のみ、歯髄 total 細胞と遊走因子を移植した対照群と比べて、有意に歯髄再生量が増加した。再生された歯髄を Real-time RT-PCR にて解析すると、正常歯髄に高発現している *syndecan 3*, *Tenascin C*, および *TRH-DE* の発現が強くみられた。また移植した細胞は、血管誘導因子や神経誘導因子を発現していることが確認された。

#### 【考察】

これらの結果より抜髄後歯髄再生治療法において、新規分取法による歯髄幹細胞の有効性が示唆された。

## シリコーン膜を用いた加圧刺激によるヒト歯髄細胞の象牙芽細胞への分化誘導

- 1.国立長寿医療研究センター歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部
- 2.東北大学大学院歯学研究科口腔保健発育学講座顎口腔矯正学分野  
○宮下俊郎<sup>1,2</sup>, 村上真史<sup>1</sup>, 庵原耕一郎<sup>1</sup>, 山本照子<sup>2</sup>, 中島美砂子<sup>1</sup>

### Odontoblastic differentiation of human dental pulp cells by mechanical pressure on silicone membrane

1. Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute
2. Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Health and Development Sciences, Tohoku University Graduate School of Dentistry

○Shunro Miyashita<sup>1,2</sup>, Masashi Murakami<sup>1</sup>, Koichiro Iohara<sup>1</sup>, Teruko Yamamoto<sup>2</sup>, Misako Nakashima<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

近年、間葉系幹細胞に機械的刺激を加えると、骨や靭帯あるいは軟骨などへの分化誘導が促進される報告がされている。しかしながら、歯髄幹細胞に対する機械的刺激の効果に関する報告は少ない。これまでに私共は、歯髄細胞を用いた象牙質再生の研究を行って来た。しかしながら、再生した象牙質は骨様象牙質であり、細管構造を有するものではなかった。そこで本研究では、表面に象牙細管類似の細孔加工を施したシリコーン膜上でヒト歯髄細胞を培養し、偏側性加圧刺激を加えることにより、並列した象牙芽細胞へ分化誘導を促進する最適な条件の決定を行った。

#### 【材料および方法】

1. ヒト歯髄細胞の分離および培養
2. シリコーン膜への細胞播種：  
象牙細管の構造に類似した細孔（直径 5 $\mu$ m、深さ 10 $\mu$ m、ピッチ 10 $\mu$ m）を有するシリコーン膜(Poly dimethylsiloxane)にプラズマ処理およびコラーゲンコートをし、チャンバーに取り付けヒト歯髄細胞を播種し 16 時間培養を行った。
3. 加圧の条件：  
象牙芽細胞分化誘導培地に変え、押し圧測定用ロードセルを組み込んだステージ上にチャンバーを設置し、偏側性加圧装置(外部コントローラーによりインキュベータ内で駆動部装置が使用でき、加圧強さや加圧間隔が可変)を用いて下記のように加圧条件を変え、一定時間加圧刺激を加えた後に 6 日間培養を行った。
  - A. 加圧強さ (17.0, 19.6, 22.2kPa)
  - B. 播種細胞数 (2.0, 4.0, 7.5 $\times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>)
  - C. 加圧時間 (6, 9, 12 時間)
4. 分子生物学的解析：Real-time RT-PCR による象牙芽細胞マーカー (*DSPP*、*Enamelysin*)の解析。
5. 形態学的解析：共焦点レーザー顕微鏡により、シリコーン膜の細孔への象牙芽細胞の突起の伸長を確認。  
これにより、象牙芽細胞分化誘導のための最適条件を決定した。

#### 【結果】

Real-time RT PCR において、加圧強さ 19.6kPa、播種細胞数 4.0 $\times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>、加圧時間 9 時間で象牙芽細胞マーカー (*DSPP* および *Enamelysin*) の mRNA 発現が最も高かった。また、上記の条件下においては、シリコーン膜のほぼ 90% 以上の細孔に細胞が突起を伸長させていることを観察した。

以上のことから、加圧刺激によるヒト歯髄細胞の象牙芽細胞への分化誘導には、加圧強さ 19.6kPa、播種細胞数 4.0 $\times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup>、および加圧時間 9 時間が最適であることが明らかとなった。

#### 【考察】

象牙細管の構造に類似した細孔を有するシリコーン膜を用いて、適切な条件でヒト歯髄細胞に加圧刺激を加えることにより、短時間で並列した象牙芽細胞への分化誘導が可能であった。今後、象牙質再生研究あるいは象牙芽細胞分化研究において、短時間にかつ効率よく並列した象牙芽細胞へ分化させる方法として有用である可能性が示唆された。

## 新規幹細胞分取法を用いたヒト歯髄幹細胞の特徴化と歯髄再生能

<sup>1</sup>国立長寿医療研究センター歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部、<sup>2</sup>愛知学院大学歯学部 顎口腔外科学講座、<sup>3</sup>愛知学院大学歯学部 小児歯科学講座、<sup>4</sup>愛知学院大学歯学部 歯内治療学講座  
○村上 真史<sup>1</sup>、堀部 宏茂<sup>1,2</sup>、庵原 耕一郎<sup>1</sup>、石坂 亮<sup>1,3</sup>、林 勇輝<sup>1,3</sup>、竹内 教雄<sup>1,4</sup>、  
栗田 賢一<sup>2</sup>、中村 洋<sup>4</sup>、中島 美砂子<sup>1</sup>

## Characterization and pulp regeneration potential of pulp stem cells isolated by novel method

<sup>1</sup>Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, <sup>2</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, <sup>3</sup>Department of Pediatric Dentistry, <sup>4</sup>Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University  
○Masashi Murakami<sup>1</sup>, Hiroshi Horibe<sup>1,2</sup>, Koichiro Iohara<sup>1</sup>, Ryo Ishizaka<sup>1,3</sup>, Yuki Hayashi<sup>1,3</sup>,  
Norio Takeuchi<sup>1,4</sup>, Kenichi Kurita<sup>2</sup>, Hiroshi Nakamura<sup>4</sup>, Misako Nakashima<sup>1</sup>

### 【研究目的】

我々は、これまで、イヌを用いて、血管新生能、神経再生能に優れた歯髄幹細胞/前駆細胞である、CD31<sup>-</sup>SP及びCD105<sup>+</sup>細胞を分取し、イヌ抜歯後の根管内に移植することで、歯髄組織が再生することを明らかにしてきた。しかし、歯髄再生療法を臨床応用するためには、いずれもフローサイトメトリーで分取しなければならないため、安全性に問題がある。また、臨床応用可能なGMPレベルのCD105抗体ビーズは、非常に高価である。よって、これらの方法に替わる安全で効率的、しかも安価に幹細胞を分取・増幅する方法が必要である。そこで、我々は、臨床研究に向けて、GMP準拠の新規幹細胞分取法を開発している。本研究では、新規幹細胞分取法を用いたヒト歯髄幹細胞の特徴をヒト歯髄CD105<sup>+</sup>細胞および、未分取の歯髄total細胞と比較し、また、in vivoにおける歯髄再生能を比較検討した。

### 【材料および方法】

1. 歯髄幹細胞分取：患者から文書で同意を得た後、抜去歯の歯髄組織からtotal歯髄細胞を分離し、2代目で新規分取法により、歯髄幹細胞を分取した。CD105<sup>+</sup>細胞については、total歯髄細胞からフローサイトメトリーにて分取した。
2. 歯髄幹細胞の特徴化
  - (1) 幹細胞表面マーカーの発現：フローサイトメトリーにてCD29, 44, 73, 90, 105, CXCR4陽性率を解析した。
  - (2) 分子生物学的解析：Real time RT-PCRにて、幹細胞マーカー、血管新生、神経栄養因子mRNA発現を解析した。
  - (3) in vitroにおける多分化能の解析：血管、神経、骨・象牙質および、脂肪誘導能を比較した。
  - (4) 細胞増殖能：ヒト血清及び遊走因子に対する細胞増殖能を比較した。
  - (5) 遊走能：TAXIScan-FLにて遊走因子に対する遊走能を比較した。
3. in vivoにおける血管新生能：マウス下肢虚血モデルに各種細胞を移植し、2週間後にレーザードップラー解析およびBS1-lectin染色による免疫組織学的解析を行った。
4. SCIDマウスを用いた歯髄再生能の評価：ヒト抜去歯をスライス後、一端をセメントで封鎖し、歯髄幹細胞をscaffoldとしてコラーゲンと共に注入し、SCIDマウスの皮下に移植して、3週間後、歯髄再生能を比較した。形態をHE染色にて、神経再生能および、血管新生能を各々、PGP9.5, BS1 lectin染色により免疫組織学的に解析した。また、象牙質形成をin situ hybridization (DSPP, enamelysin)にて解析した。

### 【結果】

新規幹細胞分取法を用いた歯髄幹細胞は、未分取の歯髄細胞と比較して、幹細胞マーカーの発現が高く、血管誘導能、神経誘導能、増殖能、遊走能が高かった。よって、新規幹細胞分取法によりCD105<sup>+</sup>細胞と類似した、幹細胞の形質を保持した細胞を分取できることがわかった。この歯髄幹細胞を下肢虚血モデルマウスに移植すると、血管新生を促進し、血流の回復が認められた。さらに、ヒト抜去歯に注入してSCIDマウスの皮下に移植すると、CD105<sup>+</sup>細胞と類似して歯髄が再生された。

### 【結論】

GMP準拠の新規幹細胞分取法の歯髄再生に対する有効性が示唆された。

## 新規幹細胞分取法を用いたイヌ歯髄幹細胞の特徴化

<sup>1</sup>愛知学院大学歯学部 歯内治療学講座、<sup>2</sup>国立長寿医療研究センター歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部、  
<sup>3</sup>愛知学院大学歯学部 顎口腔外科学講座

○竹内 教雄<sup>1,2</sup>、庵原 耕一郎<sup>2</sup>、村上 真史<sup>2</sup>、堀部 宏茂<sup>2,3</sup>、中村 洋<sup>1</sup>、中島 美砂子<sup>2</sup>

### Characterization of canine pulp stem cells isolated by novel method

<sup>1</sup>Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University <sup>2</sup>Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, <sup>3</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○Norio Takeuchi<sup>1,2</sup>, Koichiro Iohara<sup>2</sup>, Masashi Murakami<sup>2</sup>, Hiroshi Horibe<sup>2,3</sup>, Hiroshi Nakamura<sup>1</sup>, Misako Nakashima<sup>2</sup>

#### 【研究目的】

私共はこれまで歯髄組織から分取した CD31<sup>+</sup>SP 細胞あるいは CD105<sup>+</sup>細胞は血管、神経再生能に優れ、イヌ抜歯後の根管内に移植することで、歯髄組織が再生することを明らかにした (第 132 回春季歯科保存学会)。しかし、幹細胞分取に使用するフローサイトメトリーや CD105 抗体ビーズは臨床応用にはコンタミネーションやコストの問題で困難である。そこで、これらの方法に替わる GMP 準拠の安全で効率的、しかも安価に幹細胞を分取・増幅する方法を開発している。本研究では、新規幹細胞分取法を用いた歯髄幹細胞と未分取の歯髄細胞の *in vitro* における各種形質を比較し、本方法の歯髄幹細胞分取における有用性を検討した。

#### 【材料および方法】

1. イヌ歯髄幹細胞の分取：イヌ抜去歯より歯髄組織を採取後、酵素処理にて歯髄細胞を分離培養した。2代目にて新規分取法によって歯髄幹細胞を分取し、培養・増幅した。
2. 細胞表面マーカー発現：フローサイトメトリーにて、CD29, 31, 44, 73, 90, 146, CXCR4 の陽性率を比較した。
3. 分子生物学的解析：Real-time RT-PCR において、幹細胞マーカー(*Sox2*, *Stat3*, *Bmi1*, *Rex1*, *CXCR4*)、血管誘導因子(*VEGF*, *GM-CSF*, *E-selectin*, *MMP3*)、神経栄養因子(*BDNF*, *GDNF*, *NGF*, *NPY*, *NT3*)の mRNA 発現を比較した。
4. *in vitro* における多分化能
  - ①血管誘導能：matrigel 上で三次元培養し、4時間後、管腔形成能を比較した。
  - ②神経誘導能：neurosphere 形成誘導及び神経誘導を行い、28日後免疫組織学的及び分子生物学的に比較した。
  - ③象牙質・骨誘導能：BMP2 添加培地にて 28日培養後、Arizarin Red 染色にて比較した。
  - ④脂肪誘導能：脂肪誘導用培地にて 28日培養後、Oil Red O 染色にて比較した。
5. 遊走能：TAXIScan-FL を用いて FBS に対する遊走能を比較した。
6. 増殖能：Tetra Color One を用いて FBS に対する細胞増殖能を比較した。

#### 【結果】

フローサイトメトリーでは、分取した歯髄幹細胞と未分取の歯髄total細胞は同様にCD29, 44, 90を発現していたが、CD105は歯髄幹細胞がより高い値を示した。さらに、歯髄幹細胞は歯髄細胞より幹細胞マーカー、血管誘導因子、神経誘導因子の発現が高いものが多かった。また、歯髄幹細胞は歯髄細胞に比べ高い多分化能を有していた。歯髄幹細胞は歯髄細胞と比べ、遊走能および増殖能が高い傾向が示された。

#### 【結論】

新規幹細胞分取法により分取された歯髄幹細胞は、未分取の歯髄 total 細胞よりも高い遊走能、増殖能および多分化能を示し、高効率な幹細胞分取法として有用であることが示された。

### 中高年齢イヌにおける自家歯髄幹細胞移植による抜髄後歯髄再生

1)国立長寿医療研究センター歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部、<sup>2)</sup>愛知学院大学歯学部 顎口腔外科学講座、<sup>3)</sup>愛知学院大学歯学部 歯内治療学講座、<sup>4)</sup>愛知学院大学歯学部 小児歯科学講座  
○堀部 宏茂<sup>1,2)</sup>、庵原 耕一郎<sup>1)</sup>、村上 真史<sup>1)</sup>、竹内 教雄<sup>1,3)</sup>、石坂 亮<sup>1,4)</sup>、林 勇輝<sup>1,4)</sup>、  
栗田 賢一<sup>2)</sup>、中島 美砂子<sup>1)</sup>

#### Dental pulp regeneration by autologous transplantation of pulp stem cells from middle and old age after pulpectomy in dogs

<sup>1)</sup>Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, <sup>2)</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, <sup>3)</sup>Department of Endodontics, <sup>4)</sup>Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Aichi Gakuin University  
○Horibe Hiroshi<sup>1,2)</sup>, Iohara Koichiro<sup>1)</sup>, Murakami Masashi<sup>1)</sup>, Takeuchi Norio<sup>1,3)</sup>, Ishizaka Ryo<sup>1,4)</sup>,  
Hayashi Yuuki<sup>1,4)</sup>, Kurita Kenichi<sup>2)</sup>, Nakashima Misako<sup>1)</sup>

【研究目的】私どもは、これまで、若齢のイヌの歯髄より幹細胞を分取し、根完成後の歯の完全抜髄後の根管に自家移植し、歯髄を再生させることに成功した。しかしながら、ヒトにおいては、抜髄処置は中高年齢者に多く、中高年齢者での歯髄再生治療が必要となる。一方、高齢の幹細胞は数が減少し、分化能・再生能および遊走能が低下するという報告がある。また、高齢の歯髄組織からは、得られる組織量および幹細胞のコロニー数が減少し、継代するにつれ分化能を失うという報告もある。さらに、幹細胞の分取法が分化能、細胞老化および増殖停止に影響を及ぼすともいわれている。私どもは、前回第135回学会にて、フローサイトメトリーにより分取した中高年齢由来のCD105<sup>+</sup>幹細胞は若年と比較して細胞形質や幹細胞の特徴の差がみられないことを発表した。本研究では、さらに、中高年齢の歯髄幹細胞を私どもが新規に開発した方法により分取し（本学会竹内らポスター発表）、その細胞形質を若齢と比較した。ついで、若齢と同様に、5歳のイヌの歯において、抜髄後の根管に自家移植による歯髄再生を検討し、中高年齢における自家歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療の有用性を推察した。

#### 【材料と方法】

1. 8ヵ月齢、5歳齢のイヌ抜去歯から total 歯髄細胞を分離し、2代目で新規法により歯髄幹細胞の分取を行った。
2. 細胞表面マーカー発現：フローサイトメトリーにて、CD29,31,44,73,90,105,146,CXCR4 の陽性率を比較した。
3. 分子生物学的解析：Real-time RT-PCRにて幹細胞マーカー、血管新生・神経栄養因子の mRNA 発現を比較した。
4. *in vitro*における多分化能の解析（血管誘導、神経誘導、象牙質誘導、脂肪誘導）
5. 遊走能：TAXIScan-FLにて遊走因子に対する遊走能を比較した。
6. 増殖能：イヌ血清および遊走因子に対する細胞増殖能を比較した。
7. 抜髄後歯髄再生  
A 抜髄処置 7~14 日後歯髄幹細胞  $5 \times 10^5$  個を遊走因子とともに根管に注入  
B 移植 14 日後抜髄 5 $\mu$ m パラフィン切片作製  
C 形態学的解析（H-E 染色、免疫染色、*in situ* hybridization）

【結果】若齢の total 歯髄細胞 2 代目では CD105 陽性率は約 10%であったが、中高年齢の total 歯髄細胞 2 代目では約 1%であり、幹細胞の割合が低いことが示唆された。6 代目において、中高年齢歯髄幹細胞は若齢と同様に、CD29,44,73,90 は 95%以上であり、CD31, CD146 はほぼ陰性であった。多分化能では、中高年齢歯髄幹細胞は若齢歯髄幹細胞と同様に、中高年齢と若年との差はみられなかった。また遊走能、増殖能や血管新生・神経栄養因子の mRNA 発現も両者において発現の差はみられなかった。中高年齢のイヌに歯髄幹細胞を移植すると、若齢と同様に、血管新生、歯髄再生がみられ、象牙質側壁には象牙芽細胞がみられた。

【考察・結論】中高年齢のイヌ歯髄組織は幹細胞含有量が低い、得られた歯髄幹細胞は若年と同様の幹細胞形質を示すことが明らかとなった。また中高年齢のイヌの歯髄幹細胞を用いて、若年と同様に抜髄後根管に自家移植すると、若年と同様に血管新生、歯髄再生が生じることが明らかとなった。よってこれらの結果より、中高年齢においても、自家移植による歯髄再生治療が可能であることが示唆された。

## ブタ歯髄・骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞異所性移植による再生歯髄組織の解析 および歯髄再生に及ぼす根管内微小環境の影響

<sup>1)</sup>国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部、

<sup>2)</sup>愛知学院大学 歯学部 小児歯科学講座、<sup>3)</sup>愛知学院大学 歯学部 歯内治療学講座

○林 勇輝<sup>1,2)</sup>、石坂 亮<sup>1,2)</sup>、庵原 耕一郎<sup>1)</sup>、村上 真史<sup>1)</sup>、中村 洋<sup>3)</sup>、福田 理<sup>2)</sup>、中島 美砂子<sup>1)</sup>

### Pulp regeneration after ectopic transplantation of porcine pulp and bone marrow and adipose CD31<sup>+</sup> SP cells, and potential effect of microenvironment of the root canal

<sup>1)</sup>Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute, <sup>2)</sup>Department of Pediatric Dentistry,

<sup>3)</sup>Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○Hayashi Yuki<sup>1,2)</sup>, Ishizaka Ryo<sup>1,2)</sup>, Iohara Koichiro<sup>1)</sup>, Murakami Masashi<sup>1)</sup>, Nakamura Hiroshi<sup>3)</sup>, Fukuta Osamu<sup>2)</sup>, Nakashima Misako<sup>1)</sup>

#### 【目的】

我々は歯髄幹細胞を用いた歯髄再生による新しい歯髄炎治療法の開発を行ってきた。その中で、ブタ同一個体由来の歯髄・骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞をブタ歯根に注入し、異所性に SCID マウスに移植することで、骨髄・脂肪でも歯髄と同様に歯髄様組織が再生することを報告した（第 134 回日本歯科保存学会発表）。本研究では、さらに、骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞移植により再生した組織を分子生物学および免疫組織学的に詳細に解析し、歯髄組織であることを同定した。また、骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞移植でも歯髄組織が再生する機序を明らかにするため、各種処理を加えたブタ歯根を用いて歯髄・骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞の異所性移植を行い、歯髄再生に及ぼす根管内微小環境の影響を検討した。

#### 【材料と方法】

1. 歯根内に歯髄・骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞を注入し、異所性移植後の再生歯髄様組織解析
  - 1) 歯髄再生量：HE 染色後、統計学的解析
  - 2) 血管新生量：RECA1 染色後、統計学的解析
  - 3) 神経再生量：PGP9.5 染色後、統計学的解析
  - 4) 移植細胞の血管誘導・神経栄養因子発現：in situ hybridization および GOT2 免疫染色の二重染色
  - 5) 移植細胞の増殖：Ki67 および GOT2 免疫染色の二重染色
2. 再生組織が歯髄であることの証明：Real-time RT-PCR あるいは in situ hybridization (歯髄マーカー mRNA 発現)
3. 各種処理後の歯根内に歯髄・骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞を注入し、異所性移植後の再生歯髄様組織解析  
各種処理法：①0.6N 塩酸脱灰処理、②①をさらに 4.0M グアニジン塩酸処理、③湿潤下オートクレーブ処理(蛋白質完全失活)  
1 および 2 と同様に検討

#### 【結果・考察】

歯髄・骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞移植による再生歯髄様組織において、再生量は歯髄が最も多く、ついで脂肪、骨髄の順であった。また血管・神経では歯髄が最も多く、ついで骨髄、脂肪の順であった。骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞移植による再生組織中の歯髄マーカーの mRNA 発現は歯髄 CD31<sup>+</sup>SP 細胞移植による発現と類似していた。また、GOT2 との二重染色により、移植細胞は RECA1 や PGP9.5 陽性ではなく、血管誘導因子あるいは神経栄養因子を発現していることが明らかとなった。また、移植細胞は Ki67 陽性細胞と重ならなかった。したがって、これらの結果より、移植細胞は血管・神経に直接分化するのではなく、これらの細胞から分泌された因子がパラクリン的に作用して、歯根外の宿主の細胞を歯根内に遊走させ、増殖、分化を誘導する可能性が示唆された。

塩酸処理およびグアニジン塩酸処理した根管内には、血管・神経を有し、歯髄マーカーを発現している歯髄組織が再生されたが、オートクレーブ処理した根管内には再生しなかった。このことから、微小環境のなかでも、歯髄再生には根管内の物理的因子は関与せず、根管内の Growth/Differentiation factors あるいは遊走因子が重要であることが示唆された。

#### 【結論】

歯髄・骨髄・脂肪 CD31<sup>+</sup>SP 細胞移植による再生組織は再生量に差がみられたが、形態学的および分子生物学的に差はなく、完全に歯髄であることが証明された。また、歯髄再生には BMP 以外の根管内微小環境が必要である。

## 量子ドットを使ったD-グルコサミンの細胞内移行のナノイメージング解析 第2報：細胞内小器官への分布状況

1 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野、2 (株) ケア・フォー バイオ事業部、3 産業技術総合研究所 生産計測技術研究センター

○井川一成1、謝 明芳2、大庭英樹2、3、林 善彦1

### Nano-imaging analysis for the intracellular transportation of D-glucosamine using quantum dot The second report: The distribution into cell organelles

1Department of Cariology, Nagasaki University Graduate school of Biomedical Sciences, 2Biotechnology Division of Care Four Company Ltd., 3Measurement Solution Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

○Igawa Kazunari1, Xie Ming-Fang2, Ohba Hideki2,3, Hayashi Yoshihiko1

**はじめに** D-グルコサミン (MW:約 215) はキチンの完全加水分解物で、変形性関節炎に効果があるとされており、欧米を含め世界的に利用されている。そのため健康食品としてのキトサンの中でも、最も販売量が多いとされている。当教室では、キチン/キトサンに関して 12 年以上にわたり基礎的、臨床的研究をおこなってきた。初期炎症反応が弱く、かつ種々な生理活性作用を有する D-グルコサミンに注目している。現在、D-グルコサミンの細胞内への移行および細胞内での動態を解明する研究に着手している。すなわち、細胞内に取り込まれた低分子量の生理活性物質 (今回は D-グルコサミン) の細胞内動態の検討に量子ドットイメージングというナノテクノロジーを応用するものである。今回、その第2報として、量子ドットの細胞内小器官への分布状況を検討したので報告する。

#### 材料と方法

1)D-グルコサミンと量子ドットの結合: 0.1g D-グルコサミンを1mLのPBSに溶解し、4℃で一晩静置する。15nmのカルボキシル化量子ドット (セレン化カドミウム、CdSe粒子、コロイド法によって作製) 50 $\mu$ Lを加えて攪拌後、さらに0.1M EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩) 溶液 100 $\mu$ Lを加え静かに混ぜた。

2)培養細胞の調整: NOS-1細胞 (株化ヒト骨肉腫由来芽細胞) をガラスボトムカルチャーディッシュ (World Precision Instruments, Ltd., FD35-100) に  $2 \times 10^5$  個程度となるように播種した (10%FBS 添加  $\alpha$ -MEM を使用)。細胞は、CO<sub>2</sub>(5%)培養器内で通常どおり培養を行った。

3)D-グルコサミン結合量子ドットの取り込み: 量子ドットの細胞への取り込みは、D-グルコサミン濃度が 0.2%となるよう調整した培地で継代直後から培養した。培地は3日目に交換した。

4)細胞小器官の染色: Organelle-ID™ RGB reagent (EMZ-53007) にてリソゾーム、ミトコンドリアを生体染色した。

5)観察: 量子ドットの観察は、細胞は、顕微鏡ステージ CO<sub>2</sub>(5%)培養器 (okalab) 内で通常どおり培養を行った。細胞播種後 1, 2, 5, 7日目に細胞は、顕微鏡ステージ CO<sub>2</sub>(5%)培養器 (okalab) 内で培養しながら共焦点レーザー顕微鏡 (ライカ TCS SL) にて観察・撮影を行った。細胞小器官の蛍光観察条件は、ミトコンドリア及びリソゾームについてそれぞれ Excitation: 488nm, 543nm, Emission: 560nm, 667nm の波長を参考とした。

**結果** 量子ドットは輝度の極めて強い黄緑色の蛍光 (FITC に近似) として細胞内に明瞭に観察できた。量子ドットの NOS-1 細胞内での残留は、培養7日目においても頻度は少ないが認められた。同一視野内の細胞で、量子ドットを取り込んでいる細胞と、取り込んでいない細胞がみられた。また、培養5日、7日後においても、核内への移行は観察できなかった。量子ドットと細胞小器官と関係は、ほぼリソゾームの分布と一致していた。

**まとめ** 今回、初めて量子ドットに結合した D-グルコサミンの培養芽細胞への長時間にわたる取り込み状況と細胞小器官への分布状況をイメージングできた。量子ドット単体では細胞への取り込みはないことはすでに確認されている。また、量子ドットとの結合は、カルボキシル基とアミノ基との結合であり細胞内へ入っても解離することはないと考えられるので、今回の観察は D-グルコサミンの細胞膜内及び細胞小器官への移行を示していることとなる。今後は、膜内通過時間、さらには細胞外への排出状況 (細胞への有害性を含めて) などを検討する必要がある。さらに、細胞内での単糖の代謝による変化を観察するために、細胞が培養皿上で増殖のち量子ドットを取り込ませるなど実験系の工夫も必要である。

**文献** 大庭英樹、謝 明芳: 蛍光性量子ドットの合成と生命科学・医療への応用の可能性について。レーザー研究 38 (6): 433-439, 2010.

## 肝細胞による代謝活性を試みた *in vitro* 発生毒性試験法の開発

大阪歯科大学 歯科理工学講座  
○今井 弘一, 武田 昭二

**An Attempt to development of *in vitro* embryotoxicity test with the metabolic activity by hepatic cells**  
Department of Biomaterials, Osaka Dental University  
○Koichi IMAI, Shoji TAKEDA

【緒言】 歯科生体材料がヒトの正常な発生に及ぼす影響は重要なチェック項目である。 *In vitro* 発生毒性試験法の Embryonic Stem Cell Test 法がドイツ連邦で 1997 年に開発された。 この方法はすでに欧米を中心とした国際バリデーショで正確な予知性も確認されているが、マウス由来の ES 細胞には化学物質におけるヒトの代謝活性の影響を結果に反映できないことが最大の欠点とされている。 これを解決するため、演者らは、ヒトおよびマウスの浮遊肝細胞を用いて代謝活性による *in vitro* 発生毒性試験への影響を調べた。 また、樹立株細胞のヒト肝癌由来の HepG2 細胞についても調べた。

### 【実験材料・方法】

マウス由来の ES-D3 細胞が安定した細胞分化が可能な 3 次元培養を行った。 肝由来浮遊細胞はヒト由来およびマウス由来の細胞(Celsis IVT 社)を用いた。 対照群は肝細胞を用いなかった。 ES-D3 細胞を懸滴培養法で Embryoid Bodies (EBs) を製作した。 使用した培地は ES-D3 細胞用培地に肝細胞用培地を等量加え血清をさらに加えて最終血清濃度を容積比 20% とした。 試験液はヒトへの生殖・発生毒性がすでに知られている thalidomide を用いた。 以下, thalidomide 添加群を S 群, 無添加群を NS 群とした。 7 日間静置培養後に EB が分化してテラトーマ状となった中で心筋に分化し鼓動が鏡見下で認められた well 数を全体の well 数の百分率とした。 また培養液の LDH 量を測定した。

### 【結果と考察】

鼓動率は対照群と比べて、ヒトおよびマウス由来浮遊肝細胞で NS 群より S 群がやや低い値を示した。 また, HepG2 細胞では NS 群と S 群で差が認められなかった。 なお, LDH 量はいずれも対照群と有意差が認められなかった。

Thalidomide は、1960 年代に動物実験によって一般の細胞毒性レベルが低い安全な睡眠薬として販売されたが、四肢欠損やアザラシ肢症などが多発したため大きな社会問題となったことは有名である。 血管新生阻害作用がその原因とされているが、催奇形性の可能性がある化学物質を未然に予知できる生殖・発生毒性試験が当時は存在しなかったことが大きな原因と考えられる。 従来、生殖・発生毒性試験は動物実験が主体であったが、数多く合成される新規化学物質の安全性試験をすべて動物実験で行うことは EU における REACH(Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)法でも不可能とされ、ヒトでの生殖・発生毒性リスクを正確かつ簡単にスクリーニングできる *in vitro* 発生毒性試験を開発については社会的要請が大きい。 生殖・発生毒性は全身毒性であることから代謝活性が無視できない。 最近、ヒト肝細胞の培養技術が進んだことから、肝臓をホモジネートした従来の S-9 MIX の利用より生細胞を使用した方が利点が大いと考えられる。

今回の結果から、浮遊肝細胞で代謝活性因子が反映された *in vitro* 発生毒性試験が可能であることが判明した。 しかし、S 群と NS 群の差はヒト由来、マウス由来共に約 10% 程度の差が認められたのみであり、EB 形成後の細胞分化段階にのみ代謝活性因子を加えたことが原因と考えられた。 実験のすべての段階において肝細胞による代謝活性の影響が反映できるような実験系の構築も必要であると考えられる。

今後、この方法の確立によって、安心・安全な歯科修復材料開発に向けて、生殖・発生毒性面についても十分なアプローチが必要であり、歯科修復用材料についても原料化学物質の embryotoxicity を開発段階でチェックすることができる可能性が大きい。

## ヒト歯髄幹細胞の安全性試験

<sup>1)</sup>国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部  
<sup>2)</sup>愛知学院大学歯学部 顎口腔外科学講座、<sup>3)</sup>愛知学院大学歯学部 小児歯科学講座  
<sup>4)</sup>名古屋大学大学院医学系研究科附属神経疾患・腫瘍分子医学研究センター、<sup>5)</sup>愛知学院大学歯学部 歯内治療学講座  
○山本 翼<sup>1,2)</sup>、庵原耕一郎<sup>1)</sup>、林 勇輝<sup>1,3)</sup>、武井佳史<sup>4)</sup>、堀部宏茂<sup>1,2)</sup>、大迫洋平<sup>1)</sup>、栗田賢一<sup>2)</sup>、  
中村 洋<sup>5)</sup>、中島美砂子<sup>1)</sup>

### Preclinical safety evaluation of dental pulp stem cells

<sup>1)</sup>Department of Dental Regenerative Medicine, Center for Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute

<sup>2)</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, <sup>3)</sup>Department of Pediatric Dentistry

<sup>4)</sup>Center for Neurological Diseases and Cancer, Nagoya University Graduate School of Medicine, <sup>5)</sup>Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University,

○Tsubasa Yamamoto<sup>1,2)</sup>, Koichiro Iohara<sup>1)</sup>, Yuki Hayashi<sup>1,3)</sup>, Yoshifumi Takei<sup>4)</sup>, Hiroshi Horibe<sup>1,2)</sup>, Yohei Osako<sup>1)</sup>, Kenichi Kurita<sup>2)</sup>, Hiroshi Nakamura<sup>5)</sup>, Misako Nakashima<sup>1)</sup>

#### 【研究目的】

当研究室ではフローサイトメトリーやマグネットビーズ法に代わる新規歯髄幹細胞分取法を開発し、本法を用いて分取した歯髄幹細胞のイヌ抜髄後根管内への自家移植による歯髄再生に成功した。本研究ではヒト臨床研究を行う前の非臨床試験として、ヒト培養自己歯髄幹細胞 SOP(Standard Operational Procedure)に則り、愛知学院大学 GMP (Good Manufacturing Practice) 準拠の細胞加工施設で分離、培養した歯髄幹細胞の安全性を検討した。

#### 【材料および方法】

1. ヒト歯髄幹細胞の分取：ヒトの歯を抜髄後、安定かつ安全に細胞加工施設に輸送後、アイソレーター内で歯髄細胞を分離、培養した。2代目で新規幹細胞分取法により歯髄幹細胞を分取し、7代目まで培養した。
2. 細菌、真菌、エンドトキシン、マイコプラズマの否定試験、ウイルス・マイコプラズマの否定試験：歯輸送液、新鮮培地、および7代目細胞培養液上清、凍結用培地と細胞洗浄用生理食塩水の混合液の細菌、真菌、エンドトキシン、マイコプラズマ否定試験、また凍結細胞のウイルス・マイコプラズマ否定試験を行った。
3. がん化試験：全身麻酔下で免疫不全マウス(NOD/SCID マウス、KSN nude マウス)の精巣にヒト歯髄幹細胞を移植した。また、KSN nude マウスにおいては、右鼠径部皮下に同細胞を移植した。移植 16 週間後のパラフィン切片を作成し、HE 染色を行った。
4. 染色体異常・核型異常試験：Q バンド解析法で作成したヒト歯髄幹細胞の染色体標本について、Hoechst33758 液で処理し、次いでキナクリンマスタード液で染色後、蛍光顕微鏡にて染色体画像を取得した。

#### 【結果】

今回検討した条件において、ヒト歯髄幹細胞は細胞の出荷時、移植前において細菌、マイコプラズマ、ウイルスの検出はみられなかった。また、ヒト歯髄幹細胞は精巣および皮下において腫瘍形成の所見は全くみられなかった。M 期細胞に対する Q バンド核型解析を施行したところ、染色体異常・核型異常は見られなかった。

#### 【結論】

新規幹細胞分取法にて分取した歯髄幹細胞の安全性が確認された。

## 心電図 R-R 間隔の周波数分析を用いたストレスモニタの有用性

東京医科歯科大学<sup>1</sup> 歯学部付属病院 歯科総合診療部,<sup>2</sup>大学院医歯学総合研究科  
包括診療歯科学講座 歯科医療行動科学分野,<sup>3</sup>医歯学教育システム研究センター  
○梅森 幸<sup>1</sup>, 礪波健一<sup>1</sup>, 新田 浩<sup>2</sup>, 荒木孝二<sup>3</sup>, 俣木志朗<sup>2</sup>

### The possibility of stress monitor using R-R interval of ECG

○Sachi Umemori<sup>1</sup>, Ken-ichi Tonami<sup>1</sup>, Hiroshi Nitta<sup>2</sup>, Kouji Araki<sup>3</sup>, Shiro Matakai<sup>2</sup>

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

【目的】安全・安心の医療の実践のためには、歯科治療中の患者のストレスを軽減することが望ましい。我々は歯科治療中の患者のストレスを、交感神経の興奮を反映しているとされる皮膚電位水準を用いてモニタし、分析を行ってきた。既報の結果より、患者への処置直前に何を行うかの説明をする「声かけ」の有無が患者のストレスに及ぼす影響は、心理テストによって求められるその患者のストレス対処様式に関係することが明らかになっている<sup>1)</sup>。しかしながら、皮膚電位水準は個体差や測定環境の影響を受けやすく、調整に時間がかかり、測定条件の簡便化が課題として残された。近年、心電図の R-R 間隔(心拍周期)を周波数分析することにより生理的ストレスのモニタリングを行う、生体管理情報モニタ(Relax 名人, クロスウェル)が開発された。このモニタは、両手首にクリップ式の電極を装着するだけで自律神経の状態を測定できるため、歯科治療中のストレスモニタリングに簡便に用いることができる。そこで本研究では、皮膚電位水準を用いた既報と同様の方法で、模擬治療下の被験者の生理的ストレスを生体管理情報モニタにより計測し、本装置における生理的ストレスの検出能力を検討した。

【材料および方法】年齢 23~79 歳の、歯科医療従事者ではない男性 4 人、女性 13 人、合計 17 人を被験者とした。事前に被験者のストレス対処様式(問題解決型もしくは情動中心型)を、ラザルス式ストレスコーピングインベントリーの心理テストを用いて調査した。次に、生体管理情報モニタを用い、模擬治療下で心電図の R-R 間隔を測定した。被験者に与える刺激の種類は、「打診」、「歯肉へのエア」、「口腔内でのタービンの空回し」の 3 種類とし、さらに、刺激直前の「声かけ」ありとなしの 2 条件を設定した。模擬治療では、刺激の種類と声かけの条件を組み合わせた合計 6 つの刺激条件を均等に無作為な順番で、被験者に連続して 12 回刺激を与え、R-R 間隔を逐次周波数分析した。低周波成分(0.04~0.15Hz, 以下 LF)と高周波成分(>0.15Hz, 以下 HF)を記録し、各刺激に対応する LF、HF の変化量の絶対値を求めた。統計解析には一般化推定方程式を用い、LF、HF、LF/HF(緊張度)、LF+HF(不安度)と、ストレス対処様式、声かけの有無、ストレス対処様式と声かけの有無の交互作用との相関を検討した。

【結果および考察】心電図の R-R 間隔の周波数分析によって得られる LF は、頸動脈洞等の圧受容器を介した血圧性変動に関係する交感、副交感神経の興奮を反映し、HF は肺の圧受容器を介した呼吸性変動に関係する副交感神経の興奮を反映するとされる<sup>2)</sup>。本研究で用いた生体管理情報モニタでは、相対的な交感神経の興奮を示す LF/HF を緊張度、交感神経、副交感神経双方の興奮を示す LF+HF を不安度と定義し、モニタしている。得られた結果では、HF はいずれの項とも統計的に有意な相関を認めなかったが、LF、緊張度、および不安度は、ストレス対処様式が問題解決型の被験者では声かけにより低く、情動中心型の被験者では声かけにより高くなった( $P < 0.01$ )。これは、皮膚電位水準を用いた既報の傾向と一致するものである。皮膚電位水準は手掌の精神性発汗を反映するものであるが、精神性発汗は局所の末梢血流量と密接に関連することが知られている<sup>2)</sup>。末梢血流量は血圧変動と関連するため、血圧調整に関連する自律神経の働きを反映した LF、LF を用いて導き出される緊張度、不安度と皮膚電位水準との間に同様の傾向を認めたと思われる。

【結論】心電図の R-R 間隔の周波数分析を用いた生体管理情報モニタは、被験者の心理特性と生理反応との関連を検出する能力をもち、歯科治療中の患者のストレスモニタリングに有用である可能性が示唆された。

#### 【参考文献】

- 1) 尾崎 卓. 歯科治療時の処置内容の予告は患者のストレスに影響する: 口腔病学会誌 77 巻 1 号, 59-66, 2010 年
- 2) 日本自律神経学会 編, 自律神経機能検査, 文光堂, 164-168, 2007 年

## 局所通電ブラシ毛と抗菌性歯磨剤とによる歯垢成長阻止に関する研究

福岡歯科大学<sup>1</sup>、福岡医療短期大学<sup>2</sup>、パナソニック株式会社アプライアンス社<sup>3</sup>  
○<sup>1</sup>埴岡 隆、<sup>2</sup>松尾忠行、<sup>3</sup>永山正仁、<sup>3</sup>大塚理沙

### Electrified toothbrush-bristles with antibacterial dentifrice may inhibit growth of dental plaque.

Fukuoka Dental College<sup>1</sup>, Fukuoka College of Health Sciences<sup>2</sup>,  
Appliances Company, Panasonic Corporation<sup>3</sup>  
○<sup>1</sup>Takashi Hanioka, <sup>2</sup>Tadayuki Matsuo, <sup>3</sup>Masayoshi Nagayama, <sup>3</sup>Risa Otsuka

【背景・目的】イオン化した薬物の輸送を促進するため電場をかけるイオントフォレシスが実用化されている。抗菌性を有する塩化セチルピリジニウムは歯磨剤中ではイオン状態で存在するため、口腔に低電流を供給する機能を有するイオン式音波振動歯ブラシの使用は歯磨剤中の塩化セチルピリジニウムの輸送に影響を及ぼすと考えられる。本研究では、局所通電ブラシ毛を装備し低電流供給機能を強化した改良型音波振動歯ブラシを塩化セチルピリジニウム含有歯磨剤とともに使用した場合の歯垢成長阻止効果を調べることを目的とした。

【対象・方法】研究説明に対し参加の同意を得た被験者 20 名(歯科衛生士学生)のうち 16 名が最終的に研究に参加した。上下左右前歯の各ブロックの修復物のない 2 歯の健全な唇面を対象歯面とした。研究計画は倫理委員会の承認を受けた。実験デザインは局所通電ブラシ毛を採用し改良型音波振動歯ブラシと従来型イオン式音波振動歯ブラシの 2 種類の歯ブラシ使用によるクロスオーバーデザインとした。被験者を歯ブラシ使用順の 2 群に無作為に割り振った。各セッションでは、抗菌剤を含有した歯磨剤を用いイオン式音波振動歯ブラシによるブラッシングを 5 日間継続した後、ブラッシングを中止し、24 時間、歯垢を成長させた。両セッションの後の歯垢付着状況(OHI)が著しく異なる者は歯垢成長評価の対象外とした。デジタル写真画像上で、染色された歯垢を計測し、標準化した歯垢成長レベルを比較した。中切歯と側切歯の歯頸部中央を基準として歯肉辺縁部からの歯垢の成長の高さをデジタル画像上で画像処理ソフトを用いてピクセル単位で計測した。次いで、被験歯の歯冠長を絶対的な基準として歯垢の成長量を規格化し、評価した。各代表歯について歯垢成長量を算出し、8 歯の平均値を個人の代表値とした。実験群と対照群の個人の歯垢成長の差の検定には、一変量分散分析モデルを用い、個人識別番号の他、セッション回数、歯磨剤重量を独立変数として解析モデル投入した。有意水準は 5%とした。

【結果】16 名全ての被験者が 2 回のセッションを終了した。2 回の OHI の歯垢スコアの差が 2.13 だった 1 名を除く 15 名(OHI の差は 0.4 未満、平均年齢 19.5±0.5 歳)の歯垢成長を評価した。ブラッシング中止後の歯垢の成長は、対照歯ブラシを使用した場合は歯冠長に対する割合は 4.072%であったが、一方、実験歯ブラシを使用した場合の歯垢成長は 1.313%だった。セッションの順序および使用歯磨剤量を調整しても、実験歯ブラシを使用した場合の歯垢成長は対照歯ブラシの使用後の歯垢成長と比べて有意に少なかった ( $P < 0.05$ )。実験歯ブラシを使用した後の 24 時間後の歯頸部の歯垢の成長は、対照歯ブラシの使用と比べて約 68%成長が抑制された。1 回目と 2 回目のセッションにおける歯垢の成長程度を比較したところ、1 回目は 1.840%であり、2 回目は 3.546%と約 2 倍に歯垢の成長は増加したが、この差は有意ではなかった ( $P > 0.05$ )。また、歯垢の成長程度の個人差および歯磨剤の使用量はともに有意ではなかった ( $P > 0.05$ )。

【考察】実験歯ブラシと対照歯ブラシの違いは、低電流供給機能の違いのみであることから低電流供給機能の違いが、歯垢の付着に影響を及ぼしたと考えられる。また、本研究では、歯垢清掃を中止してからの歯垢の成長を比較しているので、歯垢の付着状況の違いは歯垢の成長の違いを反映している。したがって、低電流供給機能の強化により、塩化セチルピリジニウムの定着が促進され、辺縁歯肉部歯面の歯垢の成長を阻止する効果が得られたと言える。本研究は探索的研究であるため、歯垢の評価者は評価前にとどの写真が実験群の歯ブラシ使用後のものか対照群の歯ブラシ使用後のものかわかっていた点は、本研究の結果の解釈の限界として挙げられる。被験者はどの歯ブラシかは知らされなかったが、評価者も使用した歯ブラシがわからないようなダブルブラインド試験を実施する必要がある。

【結論】本研究により従来製品に比して歯垢の成長阻止効果が認められたことから、元来音波振動歯ブラシのもつ優れた歯垢除去効果に加えて歯垢成長を阻止する効果が加わり、局所通電ブラシ毛を装備し低電流供給機能を強化した改良型音波振動歯ブラシの使用は、口腔の健康保持増進に寄与するものと期待される。