

## S-PRG フィラー含有歯磨材がマイクロコスモバイオフィームに与える影響

神奈川歯科大学 口腔治療学講座 保存修復学分野<sup>1</sup>, 神奈川歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野<sup>2</sup>,  
○富山 潔<sup>1</sup>, 向井義晴<sup>1</sup>, 熊田秀文<sup>2</sup>, 椎谷 亨<sup>1</sup>, 三宅 香<sup>1</sup>, 長谷川晴彦<sup>1</sup>,  
渡辺清子<sup>2</sup>, 浜田信城<sup>2</sup>, 寺中敏夫<sup>1</sup>

### Effect of the tooth paste containing S-PRG filler on the metabolism of microcosm biofilm

<sup>1</sup>Div. of Restorative Dent, Dept. of Oral Medicine, <sup>2</sup>Div. of Microbiology, Dept. of Infection Control,  
Kanagawa Dental College

○TOMIYAMA Kiyoshi<sup>1</sup>, MUKAI Yoshiharu<sup>1</sup>, KUMADA Hidefumi<sup>2</sup>, SHIYA Toru<sup>1</sup>, MIYAKE Kaori<sup>1</sup>,  
HASEGAWA Haruhiko<sup>1</sup>, WATANABE Kiyoko<sup>2</sup>, HAMADA Nobushiro<sup>2</sup>, TERANAKA Toshio<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

S-PRG フィラーを含有する修復材や歯面処理材は、フッ化物、ストロンチウムおよびホウ酸などのイオンを放出し、近接した歯質の脱灰抑制や抗菌性などの効果を発揮するとの研究報告がある。一方、歯面に形成されたバイオフィームは抗菌剤などが浸透しにくく、その効果を得にくいことが知られている。今回我々は、S-PRG フィラーを含有させた歯磨材のマイクロコスモバイオフィームに及ぼす効果を分析することを目的として、マイクロコスモバイオフィームモデル (Caries Res, 2010) の長期培養モデルを応用し、バイオフィームの糖代謝、生菌数および象牙質の脱灰様相に与える影響についての検討を行なった。

#### 【材料および方法】

被験材料にはウシ下顎中切歯の歯根部の歯頸部直下から直径 6 mm 厚さ 1 mm の円盤状象牙質を用い、試料 2 枚の表面が両側となるように耐熱性の接着剤にて貼りわせ、バイオフィーム形成用試片とした。また、スタンダード被験材料としてガラスを用いた。本実験に使用した歯磨材は粒径 1 $\mu$ m の SPRG フィラーを 5% の割合で含有する歯磨材および 950ppmF 含有歯磨材 (製品 A) の 2 種類である。実験群は、① ガラス群 (G)、② 950 ppm F 含有歯磨材・ガラス群 (950G) ③ S-PRG フィラー含有歯磨材・ガラス群 (SPG) ④ 対照象牙質群 (D)、⑤ 950 ppm F 含有歯磨材・象牙質群 (950D)、⑥ S-PRG フィラー含有歯磨材・象牙質群 (SPD) の 6 群とした (n = 6)。バイオフィームの培養には、1 被験者から採取した刺激唾液を用いたマイクロコスモバイオフィームモデルを使用した。培養液には McBain 2005 (0.2% スクロース含有) を用い、培養液の交換を 10 時間、14 時間の間隔で 1 日 2 回行なう連続嫌気培養を 8 日間行なった。バイオフィームの培養 3 日目において、3 倍希釈した歯磨材に 5 分間浸漬後、バイオフィームを CPW 液により十分に洗浄してから 8 日目まで培養を続けた。交換済みの培養液に対しては pH の測定 (9618-10D, F-71, Horiba) を行なった。その後、実験終了時に血液寒天培地を用いて生菌数測定を行なった。さらに培養終了後の象牙質試片より厚さ 300  $\mu$ m の薄切切片を作製し、Transversal Microradiography (TMR) を撮影後 (PW3830, PANalytical)、ミネラル喪失量 (IML) および病巣深度 (LD) を測定 (TMR2000, Inspektor) した後、One-way ANOVA および Tukey の検定により有意水準 5% にて統計学的分析を行ない、各群の脱灰様相を比較検討した。

#### 【結果】

象牙質上バイオフィームに対して両歯磨材処理 (950D, SPD) を行った後の培養液 pH は、培養終了時まで一貫して D 群に比較して有意に低かったが ( $p < 0.05$ )、歯磨材間で有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。また、培養終了時における生菌数は、SPD が 950D に比較して低い傾向を示した。TMR 分析において、D 群のミネラルプロファイルでは表層はほとんど認められず、脱灰も顕著であった。950D 群においても表層は認めるものの明らかな病巣が認められた。一方 SPD 群は、D 群および 950D 群に比較して表層および病巣体のミネラル密度は高く維持されていた。SPD 群の IML および LD は D 群および 950D 群に比較して有意に低い値となった ( $p < 0.05$ )。

#### 【考察】

象牙質試料において 2 種類の歯磨材処理間には培養液 pH の差は認められなかったが、生菌数では SPD 群が低い傾向を示し、また IML および LD の比較においても SPD 群が 950D 群に比較して有意に低くなったという本結果は、S-PRG フィラーがストロンチウムイオンやホウ酸イオンを徐放し、これらが緩衝作用あるいは抗菌作用を表すとともに、同時に徐放されるフッ化物イオンと相まって優れた脱灰抑制を誘導した可能性を示唆している。

【結論】マイクロコスモバイオフィームに SPRG フィラー含有歯磨材による処理を行なうことにより、顕著に脱灰を抑制することが確認されたことから、本歯磨材が齲蝕予防に関して優れた効果を有する可能性が示唆された。また、本モデルは齲蝕予防を目的とした歯磨材、抗菌剤および充填材料などの評価に有用であることが示された。

再石灰化されたエナメル質表層下脱灰層を再度脱灰したときの性状変化に関する研究  
第2報 微細構造と元素分布の変化について

愛知学院大学歯学部保存修復学講座

○林 真希, 村上景子, 堀江 卓, 富士谷盛興, 千田 彰

Changes in characteristics of demineralized enamel subsurface lesion treated with remineralization  
Part 2 Morphological changes and elemental distribution

Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○HAYASHI Maki, MURAKAMI Keiko, HORIE Taku, FUJITANI Morioki, SENDA Akira

【研究目的】

再石灰化した表層下脱灰層を再度脱灰したときのミネラル量の変化については、いくつかの報告がある。しかし、これらのほとんどは再石灰化した表層下脱灰層のみを検討しており、表層下脱灰層より下方の深層部を含めた検討はほとんど見受けられない。演者らは、再石灰化したエナメル質表層下脱灰層を再度脱灰した場合、表層下脱灰層より下方の深層部の方が酸の侵襲を強く受けることを報告した(第136回本学術大会)。そこで本研究では、再石灰化されたエナメル質表層下脱灰層を再度脱灰した場合のエナメル質の性状変化をより詳細に検討することを目的に、表層下脱灰層調製後、再石灰化後および再脱灰後における微細構造と元素分布の変化を観察した。

【材料および方法】

新鮮ウシ抜去前歯唇側エナメル質から5×4×3mmのブロックを切り出し、唇側面(#2000仕上げ)に設けた3×2mmの矩形面以外をネイルバーニッシュでマスキングし、試片とした。試片全体を脱灰ゲル(0.1M乳酸, 8% methylcellulose, pH 4.6, 37°C)に10日間浸漬して表層下脱灰層を調製した。次に、CPP-ACPペースト(MI Paste, ジーシー, 以下MIと略す)およびAPFゲル(フルオール・ゼリー, 東洋製薬, 以下Fと略す)を用いて再石灰化を施した。すなわち、MI群は1日2回(1回:30分)、F群は1日1回(30分)それぞれ定時に7日間塗布し、処理時間以外は唾液基準ミネラル溶液(1.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20mM HEPES, 150mM NaCl, pH 7.0, 37°C)に保管した。再石灰化処理後、再び人工脱灰液<sup>\*)</sup>(50mM 酢酸, 1.5mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 4.6, 37°C)に6日間浸漬し、再度の脱灰を施した。表層下脱灰層調製後、再石灰化後、および再脱灰後の各試片を通常に従いアルコール脱水・包埋後、#15000仕上げの側視断面観察面を調製し、走査電子顕微鏡(以下SEMと略す)観察を行うとともに、電子線マイクロアナライザー(以下EPMAと略す)を用いてCaおよびPの分布状態を分析した。

【結果および考察】

SEM観察:MI群、F群ともに同様の結果が得られた。すなわち、表層下脱灰層では、エナメル小柱と小柱鞘がともに脱灰されていたが、深層部では、小柱鞘のみが選択的に脱灰されていた。しかし、再石灰化後の試料では、表層下脱灰層とその深層部におけるエナメル小柱の境界がいずれも不明瞭に変化していた。ところが、再脱灰後の試料においては、表層下脱灰層ではほとんど変化は認められなかったが、深層部では無機成分の乏しい小柱鞘は比較的脱灰されず、本来脱灰されにくいエナメル小柱が選択的に脱灰されていた。

EPMA分析:MI群、F群ともに同様の結果が得られた。すなわち、表層下脱灰層では、無機成分の濃度低下が認められたが、再石灰化処理を施すと、それらの濃度は上昇した。ところが、再脱灰後の試料においては、表層下脱灰層の濃度変化は認められなかったが、さらにその深層部では、エナメル小柱部において選択的に濃度低下が認められた。

以上の観察結果より、これらの現象について次のように推察された。すなわち、まず、最初の脱灰(表層下脱灰)は主として小柱鞘部で起こり、その後の再石灰化処理で当該部に選択的にミネラルが取り込まれ、耐酸性が獲得されたものと考えられた。そのため、深層部では何ら影響を受けていないエナメル小柱部で相対的に耐酸性の低下が起こり、その結果、再度の脱灰でエナメル小柱が選択的に脱灰されたものと考えられた。

【結論】

再石灰化した表層下脱灰層を再度脱灰すると、表層下脱灰層より下方の深層部の方が酸の侵襲を強く受けることが前報告と同様に明らかとなった。また、その際、エナメル小柱が選択的に脱灰されることが新たに判明した。

【参考文献】

<sup>\*)</sup> 富永貴俊, 他:エナメル質再石灰化病巣の物理的・化学的安定性;日歯保存誌 51, 226-234, 2008.

## 歯根象牙質へのシリカコーティング

神奈川県立歯科大学口腔治療学講座保存修復学分野<sup>1</sup>, コンタミネーション・コントロール・サービス<sup>2</sup>

○田中隆博<sup>1</sup>, 山口益司<sup>1</sup>, 竹田仁一<sup>1</sup>, 高島志保<sup>1</sup>, 進藤豊彦<sup>2</sup>, 寺中敏夫<sup>1</sup>

### Silica film coating on root dentin

Division of Restorative Dentistry, Department of Oral Medicine, Kanagawa Dental College<sup>1</sup>

Contamination Control Services<sup>2</sup>

○TANAKA Takahiro<sup>1</sup>, YAMAGUCHI Masuji<sup>1</sup>, TAKEDA Jinichi<sup>1</sup>, TAKASHIMA Shiho<sup>1</sup>,  
SHINDO Toyohiko<sup>2</sup>, TERANAKA Toshio<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

根面齲蝕は社会の高齢化進展に伴って増加傾向にあり、その対策は重要なテーマである。我々は、これまでに本学会学術講演会にてエナメル質に塗布したペルヒドロポリシラザン (PHPS) に過酸化水素水 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) を滴下し、炭酸ガスレーザーを照射すると低温でシリカ薄膜を形成することが可能であり、表面を単に被覆するだけでなく、優れた耐摩耗性や耐酸性を母材のウシエナメル質に付与できるような機能的シリカ薄膜コーティングが可能であると報告した。本研究の目的は、シリカ薄膜を根面コーティング材として応用することにより根面齲蝕の予防を目的とする新規の方法を確立することである。

#### 【材料および方法】

- 1) 試料：ウシ下顎中切歯の歯根部の歯頸部直下および直下から 5 mm 根尖側の位置を水平に切断し、得られた円筒状試片を 2 分割 (Isomet<sup>TM</sup>, Buehler, USA) した後、#600~#2,000 耐水研磨紙および 0.5 μm ダイヤモンドスラリー (マルトー) にて研磨、超音波洗浄を 15 分間行い、象牙質試片を得た。
- 2) 歯面前処理・コーティング方法：メガボンドプライマー (クラレメディカル) を試片に 20 秒間塗布し、エアブローを行った。その後、PHPS (コンタミネーション・コントロール・サービス) をマイクロブラシにて塗布し、光照射 (Optilux LCT, Kerr) を 20 秒間行った。さらに PHPS を塗布して 5 分間自然乾燥後、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 20 μl 滴下し、炭酸ガスレーザー (OPELASER 03S, ヨシダ製作所) を 0.5 W, 照射距離 10 mm で 1 分間照射し、シリカへの転化処理を行った。
- 3) フーリエ変換赤外分光 (FT-IR) 分析：成膜されたシリカ薄膜の転化状態をフーリエ変換顕微赤外分光光度計 (AIM-8800, 島津製作所) にて分析した。測定条件は、ATR 法にて波数範囲 4,600~650cm<sup>-1</sup>, 分解能 4cm<sup>-1</sup>, 積算回数 100 にて行った。得られたスペクトルからシリカ転化の指標となる 1,050cm<sup>-1</sup> 付近と 800cm<sup>-1</sup> 付近の Si-O に帰属するピークならびに未反応 PHPS の残存を示す 830cm<sup>-1</sup> 付近の Si-N および 2,170cm<sup>-1</sup> 付近の Si-H に帰属するピーク強度を比較した。
- 4) 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察：シリカ薄膜の象牙質との接合状態の形態学的な検討を行うため、歯軸方向に歯根を切断、金蒸着を施し、SEM (SUPERSCAN SS-550, 島津製作所) を用いて、加速電圧 10kV の条件で観察した。

#### 【結果および考察】

FT-IR 分析の結果、PHPS 塗布直後は、未反応 PHPS の残存を示す 830cm<sup>-1</sup> 付近の Si-N および 2,170cm<sup>-1</sup> 付近の Si-H に帰属する吸収ピークが認められた。一方、シリカ転化後では Si-N および Si-H のピークは消失し、1,050cm<sup>-1</sup> 付近と 800cm<sup>-1</sup> 付近の Si-O に帰属する吸収ピークが明瞭となり、シリカ転化が認められた。SEM 観察では、歯根象牙質表面を約 1 μm の膜厚のシリカ薄膜が被覆し、かつ平滑な表面であることが観察された。また、シリカ薄膜と象牙質の界面は良好な接合状態を示していた。

以上の結果から、過酸化水素水と炭酸ガスレーザーを用いることにより、歯根象牙質表面に低温で緻密なシリカ薄膜を成膜することが可能であることが示された。

今後は、直接引張試験やサーマルストレス試験を行い、シリカ薄膜と象牙質との接合状態の評価を行う予定である。また、シリカから歯質へと傾斜機能材料的構造を示すシリカコーティング法についても検討していく所存である。



(5,000 倍)

図 シリカコーティング後の歯根象牙質断面

### Effect of Casein as a Model of Salivary Protein on Hydroxyapatite Growth In Vitro

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Department of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, <sup>2</sup>Global Center of Excellence, International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University  
○ROMERO Maria Jacinta R. H.<sup>1</sup>, NAKASHIMA Syozi<sup>1</sup>, NIKAIDO Toru<sup>1</sup>, SADR Alireza<sup>1,2</sup>, TAGAMI Junji<sup>1,2</sup>

#### アパタイト成長に及ぼす唾液タンパク質モデルであるカゼインの影響

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座 う蝕

制御学分野, <sup>2</sup>グローバル COE プログラム歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点

○ロメロ マリア ハシタ ロザリオ<sup>1</sup>, 中嶋省志<sup>1</sup>, 二階堂 徹<sup>1</sup>, サドル アリレザ<sup>1,2</sup>, 田上順次<sup>1,2</sup>

**Background and Purpose.** Human salivary macromolecules such as proline-rich proteins (PRP's) and statherin have been attributed to inhibition of hydroxyapatite (HA) precipitation preventing spontaneous mineral accretion at the tooth surfaces with the exception of dental calculus thereby affecting the remineralization process (Caries Res 42, 2008, Fujikawa et al). However, numerous in vitro studies have been carried out without salivary proteins as their isolation and inclusion involve time-consuming and complicated processes. Due to such circumstances, efforts to find a substance that can mimic the effects of salivary proteins in vitro can be well justified. Casein is a phosphoprotein with a structure similar to PRP's and statherin and may thus be a potential substitute for salivary proteins in vitro. This study aims to investigate the influence of incorporation of casein in artificial saliva through HA seeded crystal method and observation of precipitations on enamel and dentin surfaces with scanning electron microscopy (SEM).

**Materials and Methods.** In the HA seeded crystal method, 200 ml fresh solutions of 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 100 mM NaCl were prepared with the combination of fluoride(F: 0, 0.5 and 1.0 ppm) and Hammersten casein (Cas:0, 50, 100, 200 ppm). Solutions were kept at 37°C in a water bath with constant stirring at an initial pH 6.3. After the addition of 250 mg of HA powder, pH change was recorded at 5-minute intervals for 4 hours. All procedures were performed twice to verify repeatability. A control solution without F, casein and HA powder was also tested. For the SEM observation of surface precipitate, 2 mm x 2 mm bovine enamel and dentin blocks embedded in resin and hand-polished up to #4000-grit SiC paper were used and immersed in remineralizing solutions (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM acetate, 100 mM NaCl, 0.02% NaN<sub>3</sub>; pH 6.3, 37°C) with similar fluoride and casein concentrations as the seeded crystal method for 14 and 28 days. The solutions were refreshed every 7 days.

**Results and Discussion.** A dose-dependent inhibition of pH decrease was observed in the HA seeded crystal growth method (Fig. 1), indicating the inhibition of HA crystal growth by casein addition with and without the presence of fluoride. SEM observation showed a marked morphological change in the precipitates with and without casein in the solutions. Defined crystalline structures, possibly fluorapatite, present on the enamel and dentin surfaces immersed in solutions with fluoride alone were no longer seen in specimens immersed in solutions with casein (Fig. 2).

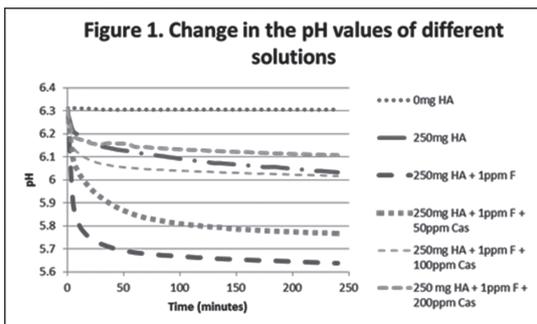
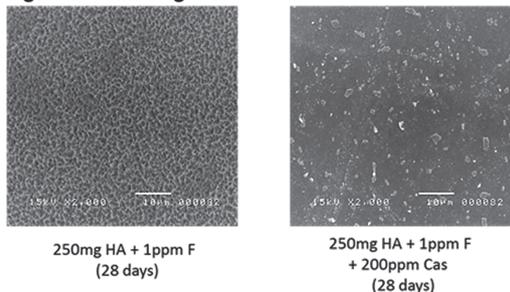


Figure 2. SEM images of enamel



**Conclusion.** Results of this study showed that casein inhibited HA crystal growth, indicating a potential to be a substitute for salivary proteins in vitro. This could be better verified with future demineralization and lesion remineralization studies.

## OCTによる乳歯の脱灰状況の観察

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>、総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>  
長崎大学大学院医歯薬総合研究科小児顎口腔発達管理学分野<sup>3</sup>、すずき歯科クリニック<sup>4</sup>

○村山良介<sup>1</sup>、吉田ふみ<sup>1</sup>、浅野和正<sup>1</sup>、池田昌彦<sup>1</sup>

黒川弘康<sup>1,2</sup>、安藤進<sup>1,2</sup>、宮崎真至<sup>1,2</sup>、細矢由美子<sup>3</sup>、鈴木敏裕<sup>4</sup>

### Determinations of demineralization of primary tooth by means of OCT

Department of Operative Dentistry<sup>1</sup>, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center<sup>2</sup>

Nihon University School of Dentistry, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences<sup>3</sup>, Suzuki Dental Clinic<sup>4</sup>

○MURAYAMA Ryosuke<sup>1</sup>, YOSHIDA Fumi<sup>1</sup>, ASANO Kazumasa<sup>1</sup>, IKEDA Masahiko<sup>1</sup>

KUROKAWA Hiroyasu<sup>1,2</sup>, ANDO Susumu<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>, HOSOYA Yumiko<sup>3</sup>, SUZUKI Toshihiro<sup>4</sup>

#### 【緒言】

光干渉断層画像化法 (Optical Coherence Tomography, 以後, OCT) は, 非侵襲的に組織の精密断層像を得るとともに, 他の医療用画像技術と比較しても高解像度を有していることから, 歯科臨床への応用が期待されている。これまで演者らは, 歯質における脱灰抑制および再石灰化傾向を, OCT を用いて検討し, 第 133 回日本歯科保存学会春季学術大会において発表した。今回, OCT の効果的な臨床使用術式を確立するための基礎的研究の一環として, 乳歯における脱灰, 再石灰化の状況を, OCT を用いて観察を行った。さらに, OCT から得られた二次元グラフデータは, ピーク波形の全エネルギーのうち, 86.5%が含まれる指標である  $1/e^2$  幅を用いて数値化し, 脱灰の状況を解析した。また, 脱灰抑制および再石灰化の傾向をみるため, 歯面表面に, 各種イオンを放出するコーティング材である PRG バリアコート (松風) を応用し, 観察を行った。

#### 【材料および方法】

ヒト抜去乳歯の歯根部を切断し, 歯冠部歯髄を除去, その後歯冠部エナメル質を清掃し, これを測定用試片とした。これら試片の表面に対して, PRG バリアコートを塗布したもの (以後, AP 群), あるいは塗布を行わないもの (以後, NA 群) の 2 条件を設定し, 試片の保管は 37°C 人口唾液もしくは乳酸緩衝液 (pH4.7) とした。実験を通じ, 保管期間はそれぞれ 28 日とした。なお, 試片の数は各条件についてそれぞれ 5 個とした。保管中の試片については, 試作 OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用い, その経時的変化を観察した。所定の保管期間が終了した試片については, PRG バリアコートを探針にて除去し, レーザ顕微鏡 (VK-8700, KEYENCE) を用いてコート材除去後の表面性状の観察を行った。

#### 【成績および考察】

実験で得られた OCT 画像と, 二次元グラフデータを示す (図 1, 2)。AP 群, NA 群ともに, 人工唾液浸漬条件においては, 浸漬期間の延長に伴い, 表面のシグナル強度は低下する傾向がみられたのに対し, 脱灰液浸漬条件では, シグナル強度は増加する傾向がみられた。一方, NA 群の脱灰液浸漬条件においては, OCT 像の表面シグナル強度は増加し,  $1/e^2$  幅は減少する傾向がみられた。また, レーザ顕微鏡画像では, 人口唾液浸漬条件において, 削除痕の平坦化が認められたのに対し, 脱灰液浸漬条件では, 表面性状の粗造化が進行した結果が得られた。シグナル強度の変化を浸漬期間でみた場合, 人口唾液浸漬期間の延長における表面のシグナル低下および, 内部シグナル増加傾向は, エナメル質表面の光学的性質の変化に起因していると考えられる。すなわち, エナメル質表面での散乱光が減少したことによって, 光線の深部到達性が増し, さらに内部での光干渉性が向上し, 検出が可能になったと考えられる。 $1/e^2$  幅を用いた解析では, ピーク値 AP 群の人口唾液浸漬条件において, 優位に増加する傾向がみられた。これは, 先に述べた表面での散乱の減少および深部到達性の向上によって, 低シグナルの検出頻度が増加したことにより, OCT 像での深部可視化が向上したことを表していると考えられる。

#### 【結論】

本実験の結果から, 乳歯の脱灰状況における OCT のシグナル強度および  $1/e^2$  幅は, 浸漬条件と期間に依存することがわかった。これらのことから, OCT による脱灰状況の観察に対する  $1/e^2$  幅の応用は効果的であることが示唆された。

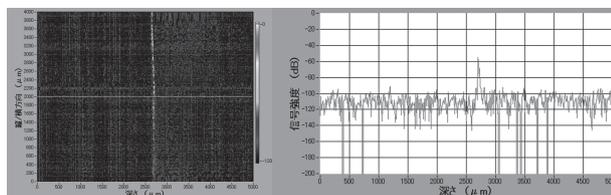


図 1. OCT 画像

図 2. 二次元グラフデータ

## ナノシールを用いた象牙細管封鎖性に関する研究 - 超音波透過法を用いた検討

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>

○遠藤 肇<sup>1</sup>, 高見澤俊樹<sup>1,2</sup>, 高橋史典<sup>1,2</sup>, 坪田圭司<sup>1,2</sup>,  
陸田明智<sup>1,2</sup>, 瀧川智義<sup>1,2</sup>, 宮崎真至<sup>1,2</sup>, 天野 晋<sup>1</sup>

### Evaluation of Nanoseal for Dentin Hypersensitivity by Means of Ultrasonic Device.

<sup>1</sup>Department of Operative Dentistry, <sup>2</sup>Division of Biomaterials Science, Dental Research Center,  
Nihon University School of Dentistry

○ENDO Hajime<sup>1</sup>, TAKAMIZAWA Toshiki<sup>1,2</sup>, TAKAHASHI Fuminori<sup>1</sup>, TSUBOTA Keishi<sup>1,2</sup>,  
RIKUTA Akitomo<sup>1,2</sup>, TAKIGAWA Tomoyoshi<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>, AMANO Susumu<sup>1</sup>

#### 【緒言】

象牙質知覚過敏症に対する処置には、これまで多くの方法が提案されてきた。とくに、患部に塗布することでその疼痛を軽減する知覚過敏抑制材は、様々なタイプの製品が臨床応用されている。しかし、即効性に優れるとともに、持続的な効果を有する知覚過敏抑制材は少ないのが現状である。そこで演者らは、日本歯科薬品から新たに開発されたフルオロアルミノカルシウムシリケート含有歯面コート材(ナノシール, 日本歯科薬品)を用い、象牙細管封鎖性ととも脱灰抑制効果について検討した。すなわち、ナノシールを歯質に塗布し、歯質に生じた変化を非破壊的に物質の状態変化を測定可能である超音波透過法を用いて検討した。さらに、レーザー顕微鏡観察, 走査型電子顕微鏡(SEM)観察から、その象牙細管封鎖性について評価するとともに、元素分析を併せて行い、考察資料とした。

#### 【材料および方法】

##### 1. 象牙質知覚過敏試片の製作

ウシ抜去下顎前歯の唇側象牙質を4×4×1 mmのブロックとして切り出し、耐水性SiCペーパーの#2,000まで順次研磨した。これら試片に対して超音波洗浄を30分間作用させ、象牙細管の開口を伴う知覚過敏モデルを製作した。

##### 2. pHサイクル試験

口腔内環境をシミュレートするために、37℃人工唾液(pH 7.0)の浸漬保管に先立ち、pHサイクルを設定した。

- 1) 0.1 M 乳酸緩衝液(pH 4.75)に10分間浸漬(以後、De群)
- 2) 脱灰液への浸漬に先立って、ナノシールを1度塗布し、水洗する群(以後、NS群)
- 3) 脱灰液への浸漬に先立って、ナノシールを塗布、水洗し、これを7日毎に行う群(以後、Repeat群)
- 4) ナノシールを塗布、水洗した後、実験期間を通じて人工唾液への浸漬のみを行う群(以後、Control群)

なお、pHサイクルは1日2回、28日間行った。

##### 3. 超音波伝播時間の測定およびレーザー顕微鏡観察

超音波測定装置(Model 5900, Panametrics)を用いて、縦波で発せられる超音波の伝播時間を測定し、縦波音速を求めた。また、所定期間の浸漬が終了した試片について、レーザー顕微鏡を用いて表面性状の経時的変化を観察した。

##### 4. SEM観察および元素組成分析

FE-SEM(ERA8800-FE, Elionix)を用いて、試片の断面を観察し、象牙細管内へのナノシールの浸透性を評価した。また、象牙質に生じた変化については元素分析(EDAX Genesis, Elionix)を併せて行った。

#### 【成績および考察】

NS群およびControl群では、Baselineと比較してその音速に有意差は認められなかったが、脱灰溶液に浸漬したDe群では、他の条件と比較して経時的に音速が低下する傾向が認められた。また、Repeat群では音速の上昇が認められ、他の条件と比較して有意に高い値を示した。このことから、ナノシールの象牙質面への塗布は、優れた脱灰抑制および細管封鎖性を示すことが明らかとなった。

#### 【結論】

フルオロアルミノカルシウムシリケート含有歯面コート材ナノシールは、脱灰抑制効果を示すととも象牙細管の封鎖によって象牙質知覚過敏の抑制に寄与する可能性が示唆された。

生活歯ホームホワイトニングにおける知覚過敏抑制材の効果  
日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>,  
○ 色川敦士<sup>1,2</sup>, 坪田圭司<sup>1,2</sup>, 高見澤俊樹<sup>1,2</sup>, 黒川弘康<sup>1,2</sup>, 陸田明智<sup>1,2</sup>,  
升谷滋行<sup>1,2</sup>, 瀧川智義<sup>1,2</sup>, 安藤 進<sup>1,2</sup>, 宮崎真至<sup>1,2</sup>

The effect of the consciousness sensitive control material in vital-tooth home whitening  
Department of Operative Dentistry<sup>1</sup>, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center<sup>2</sup>  
Nihon University School of Dentistry

○IROKAWA Atsushi<sup>1,2</sup>, TSUBOTA Keishi<sup>1,2</sup>, TAKAMIZAWA Toshiki<sup>1,2</sup>, KUROKAWA Hiroyasu<sup>1,2</sup>, RIKUTA Akitomo<sup>1,2</sup>,  
MASUTANI Shigeyuki<sup>1,2</sup>, TAKIGAWA Tomoyoshi<sup>1,2</sup>, ANDO Susumu<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>

#### 【緒言】

有髄歯のホームホワイトニングは、歯質を切削することなく保存的な審美性を改善する方法として高い関心を集めている。しかし、10%過酸化尿素を用いたホームホワイトニング中に生じる知覚過敏は、軽度のものを含めると約60%に生じるとされている。この知覚過敏発生のメカニズムは明らかではないが、知覚過敏抑制材の適応によって、過敏症状が抑制されるものと考えられる。しかし、本邦においては知覚過敏抑制材の使用とホワイトニング効果に関する研究は少ない。そこで演者らは、知覚過敏抑制材を使用した際の知覚過敏の抑制効果および色調変化について実際の臨床的な検討を行った。

#### 【材料および方法】

本臨床研究では、知覚過敏抑制材としてウルトラライズ(ULTRADENT)を、ホームホワイトニング材としてオパールエッセンス 10%レギュラー(ULTRADENT)を使用した。

臨床研究の開始にあたっては、日本大学歯学部臨床研究倫理委員会の承認を得取、平成24年2月から4月までに日本大学歯学部附属歯科病院に来院し、本研究の主旨を説明し、同意を得られた23~59歳の男性6名、女性28名(平均年齢は32歳)合計34名を対象とした。その選択基準として、上下顎前歯にそれぞれ6本歯の以上ホワイトニング可能な有髄歯を有するとともに、唇面1/3以上を含む歯冠修復物がないものとした。また、除外基準として、う蝕、重度の歯周病、重度の全身的慢性疾患の治療中、妊娠中または授乳中、その他歯科医師が不適当としたものとした。

上下顎6前歯を対象部位とし、上顎においては、ウルトラライズを填入したトレーを30分間装着し、その後ホームホワイトニングを行った。一方、下顎においては、ホームホワイトニングを先行させて、知覚過敏が発現した場合、ウルトラライズを適用することとした。ホワイトニング期間は1日2時間、14日間とし、知覚過敏の程度はホワイトニング開始から4週目までVerbal Rating Scaleを用いて4段階(0:痛くない, 1:少し痛む, 2:かなり痛む, 3:耐えられないほど痛む)で週の平均で記録した。その際、歯と歯肉の知覚過敏を区別した。また色調変化の測色は、歯科用分光光度計Crystaleye Spectrophotometer (OLYMPUS)を用い、術前、漂白開始1週目、2週目および4週目に行った。上顎左側中切歯および下顎右側中切歯の歯表面の分光反射率を測定することでL\*a\*b\*値を算出し、その数値を用いてそれぞれの歯の色差を求めた。

#### 【成績および考察】

知覚過敏は、ホワイトニング1週目では7症例(21%)に認められた。このうち、Scale 1が6症例で18%、Scale 2が1症例で3%であった。2週目においては8症例に認められ、Scale 1が8症例で24%であった。4週目では2症例に認められ、Scale 1が2症例で6%であった。知覚過敏はホワイトニング期間では、約20%に認められたが、その後4週目には減少する傾向が認められた。歯肉刺激は4症例に認められ12%であった。上下顎においては、1週目で上顎4例、下顎3例、2週目では上顎4例、下顎4例、4週目では、上顎1例、下顎1例であり、上下顎での差は認められなかった。

色調変化の測定結果においては、ホワイトニング1週目の色差 $\Delta E$ は上顎では2.75(1.87)、下顎では2.87(1.19)、2週目の上顎では3.39(2.17)、下顎では3.44(1.00)、4週目では3.08(1.47)、下顎では3.22(1.37)であった。いずれも下顎のほうが色差は大きかったが、上下顎での有意差は認められなかった。

#### 【結論】

ウルトラライズを使用した際の、ホームホワイトニングの臨床評価を行ったところ、知覚過敏の発生が減少する傾向を示すことが明らかとなった。また、ウルトラライズの使用は、色調変化に影響を及ぼさないことが判明した。

## 光干渉断層装置を用いた歯質の観察 ～ホワイトニング前後の歯質の変化について～

昭和大学歯学部歯科保存学講座美容歯科学部門<sup>1</sup>, 株式会社吉田製作所<sup>2</sup>  
昭和大学歯学部歯科保存学講座歯科理工学部門<sup>3</sup>, 昭和大学歯学部歯科放射線学教室<sup>4</sup>  
○松尾涼子<sup>1</sup>, 千田真弓<sup>2</sup>, 鹿熊秀雄<sup>2</sup>, 宮崎 隆<sup>3</sup>, 岡野友宏<sup>4</sup>, 真鍋厚史<sup>1</sup>

### Teeth surface observation after bleaching by optical coherence tomography

Department of Conservative Dentistry, Division of Aesthetic Dentistry and Clinical Cariology,  
Showa University School of Dentistry<sup>1</sup>  
The Yoshida Dental MFG.CO., LTD<sup>2</sup>

Department of Conservative Dentistry, Division of Oral Biomaterials and Technology,  
Showa University School of Dentistry<sup>3</sup>

Department of Radiology, Showa University School of Dentistry<sup>4</sup>

○MATSUO Ryoko<sup>1</sup>, CHIDA Mayumi<sup>2</sup>, KAKUMA Hideo<sup>2</sup>,  
MIYAZAKI Takashi<sup>3</sup>, OKANO Tomohiro<sup>4</sup>, MANABE Atsufumi<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

近年、白くて美しい歯は人々の QOL の向上には欠かせない要因となり、審美歯科に対する関心の高まりとともにホワイトニングを希望する患者も増加してきている。ホワイトニング剤の歯質に対する影響はいまだ不明な点が多く、ホワイトニング剤によりエナメル質を保護するペリクルは除去され、エナメル質表面になんらかの影響を及ぼしていると考えられている。また、漂白処置後に問題となる知覚過敏の発生や色の後戻りなどの問題を回避するために、漂白処置後は適切な歯面処理材を用いて処置を行うことが重要であると考えられる。本研究は光干渉断層装置 (Swept-Source Optical Coherence Tomography; 以下 SS-OCT) を用いて、オフィスホワイトニング処置後のヒト抜去歯を人工唾液 (Saliveht, 帝人ファーマ) に浸漬させた際に生じる歯質の変化を経時的に観察を行った。

#### 【材料および方法】

試料は歯冠部唇側面に齶蝕がなく修復充填物や亀裂のない変色ヒト抜去歯を合計 10 本用いた。なお、本研究で使用した抜去歯は本学歯学部医の倫理委員会の承認を得たものである (承認番号 2011-035 号)。抜歯後すみやかに歯石等の沈着物をスケーラーにて除去し、歯面清掃後 ShadeEyeNCC (松風) にて測色し、吉田製作所製試作 SS-OCT を用いてホワイトニング処置前の試験面を唇側から撮影した。37°C 人工唾液あるいは精製水に保管したのちに、オフィスホワイトニング剤として 35% 過酸化水素を主成分とする Shofu Hi-lite (松風) を使用し、健全エナメル質唇面に設定した試験面を使用説明書に示されている術式に準じオフィスホワイトニング操作を行った。ホワイトニング操作は 1 日 3 回のホワイトニング操作とし、7 日間ごとに行い 6 日間計 18 回行った。さらにオフィスホワイトニング処置後の試料を 37°C の人工唾液あるいは精製水に 8 週間保管した。オフィスホワイトニング処置後と 37°C の人工唾液あるいは精製水に浸漬して 4 週間後と 8 週間後に再び ShadeEyeNCC にて試料の測色と SS-OCT を用いてホワイトニング処置前と同部位の試料撮影を行った。

#### 【結果および考察】

SS-OCT を用いたホワイトニング処置前後のエナメル質の観察において、ホワイトニング処置後のエナメル質、エナメル象牙境、象牙質浅層の光強度は弱くなる傾向を示した。4 週間人工唾液に浸漬した試料はホワイトニング処置直後と比較してエナメル質、エナメル象牙境、象牙質浅層の光強度がやや強くなる傾向を示し、SS-OCT 画像はホワイトニング処置前の画像に近づく結果が得られた。8 週間後は 4 週間後と比較して変化が認められなかった。オフィスホワイトニング処置直後は粗造となったエナメル質表層で SS-OCT から照射された光は、より多く散乱し光透過性が亢進する傾向が認められた。同時にエナメル質、象牙質表層ではオフィスホワイトニング剤に含まれる過酸化水素から発生したフリーラジカルによって  $\beta$ -カロテンなどの有機着色物質が分解され、光透過性が亢進したことで反射強度が減少し、SS-OCT 受光部で捉える光が弱くなったと考えられた。その後 4 週間の人工唾液への浸漬によりホワイトニング処置直後よりも反射光が増加する傾向が認められた。オフィスホワイトニング処置により脱灰化様を呈したエナメル質表層に人工唾液中の Ca イオンが沈着し再石灰化したことが示唆された。

## ラマン分析によるボンディング-コンポジットレジン界面の重合挙動の解析

<sup>1</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 う蝕制御学分野

<sup>2</sup> グローバル COE プログラム 歯と骨の分子疾患化学の国際教育拠点

○坂野若詠<sup>1</sup>、中島正俊<sup>1</sup>、田上順次<sup>1,2</sup>

### Analysis of the bonding – resin interface by laser Raman spectroscopy

<sup>1</sup> Cariology and Operative Dentistry, Department of Oral Health, Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences,

Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup> GCOE Program ; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases

○SAKANO Wakae<sup>1</sup>, NAKAJIMA Masatoshi<sup>1</sup>, Tagami Junji<sup>1,2</sup>

#### <緒言>

1 ステップセルフエッチング接着システムにおいては、酸性モノマー、疎水性および親水性モノマー、水、有機溶媒が1 ボトルの中に混和されており、ボンディング材塗布後、余剰な水や溶媒はエアブローにより除去する必要がある。しかし、ボンディング材中には重合後も水や有機溶媒が残存し、疎水性である光重合型コンポジットレジンとの共重合性が低下することが危惧されている。

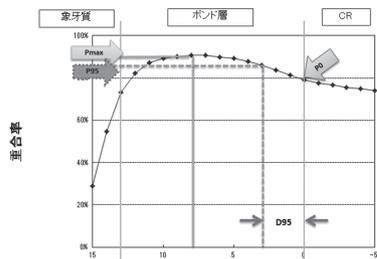
しかしながら、ボンディング材と光重合型コンポジットレジン界面の共重合性に関する報告は少ない。そこで本研究では、微小な範囲での重合挙動観察が可能な顕微レーザーラマン分析器を使用し、1 ステップ及び2 ステップセルフエッチングシステムの象牙質接着界面部におけるボンディング材の重合率を調べ評価検討した。

#### <材料と方法>

抜去ヒト大臼歯咬合面のエナメル質を削除し象牙質を露出させ、#600 耐水研磨紙を用いて研削し、高さ 2 mm、内径 8 mm のプラスチックリングを固定して被着面を規定した。接着システムとして、1 ステップ Clearfil S<sup>3</sup> Bond ND (TS; クラレノリタケデンタル社製)、Clearfil SE ONE (SO; クラレノリタケデンタル社製)及び2 ステップ Clearfil Mega Bond (SE; クラレノリタケデンタル社製) 接着システムを用いた。象牙質被着面に対し各接着材を業者指示通り処理し、光硬化させた (Optilux 501 ; Kerr 社製)。その後充填用コンポジットレジン Clearfil Majesty (トランスルーセント色、クラレノリタケデンタル社製) をリング内に充填し、20 秒間光照射を行った。24 時間、37℃ の水中保管後、2.0 × 2.0 mm のビーム型の試料を作成し epoxy resin 中に包埋後、鏡面研磨を行い、顕微レーザーラマン装置 (LabRAM ARAMIS ; 堀場製作所製) にて象牙質方向よりボンディング材-CR 界面方面へ 1 μm/point の連続測定を行った。ボンド硬化前後における C=C 結合のピーク高さ (1640 cm<sup>-1</sup>) と硬化前後でピークが不変とされる芳香族のピーク高さ (1608 cm<sup>-1</sup>) を求め、これを基準として右の計算式を使用し重合率を算出した。

$$\text{重合率} = 1 - \left( \frac{\text{硬化後の (C=C ピーク / 芳香族ピーク)}}{\text{硬化前の (C=C ピーク / 芳香族ピーク)}} \right) \times 100 (\%)$$

#### <結果>



Adhesives	TS	SO	SE
最大重合率 (%) Pmax	82.2(1.2) <sup>A</sup>	88.6(3.5) <sup>B</sup>	88.1(0.5) <sup>B</sup>
ボンド-CR界面部における重合率 (%) PO	56.7(5.9) <sup>A</sup>	78.2(4.0) <sup>B</sup>	78.5(3.1) <sup>B</sup>
最大重合率より95%部からボンド-CR界面部までの距離 (μm) D95	5.9(2.0) <sup>A</sup>	2.7(1.8) <sup>B</sup>	7.0(2.0) <sup>A</sup>
最大重合率からボンド-CR界面部までの重合率の減少率 (%) R	2.9(0.5) <sup>A</sup>	1.4(0.4) <sup>B</sup>	0.7(0.3) <sup>F</sup>

Groups identified by the different superscript letters are significant different in the same row (p<0.05).

得られた結果は、t-test を使用し有意水準 5% にて統計処理を行った。ボンディング層中の Pmax (最大重合率) 及び PO (CR 界面部における重合率) は共に、TS が SO、SE より有意に低い重合率を示した。また R (CR 界面部までの重合率の減少率) における、3 種の接着システムの間で有意差が認められた。一方で D95 (重合率減少エリアの厚さ) については、SO は TS、SE より有意に小さかった。

#### <考察並びに結論>

顕微レーザーラマン装置にてボンディング層-コンポジットレジン接合部の重合率を測定した結果、三種のボンディング材全てでコンポジットレジン接合部に向けてボンディング材の重合率が低下することが判明した。また、コンポジット界面部において、TS、SO、及び SE は、それぞれ異なる重合挙動を示すことが明らかになった。これはボンディング材中に残存した水や溶媒、及び重合触媒の違いに影響されたものと考えられる。

新規 LED 光照射器についての研究  
-ボンディング材に与える影響-

大阪歯科大学歯科保存学講座

○黄地智子, 恩田康平, 谷本啓彰, 西田尚敬, 横田啓太, 初岡昌憲, 河村昌哲, 山本一世

Study on newly LED curing light unit

- Influence on bonding resin -

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University

○OUCHI Satoko, ONDA Kohei, TANIMOTO Hiroaki, NISHIDA Hisataka, YOKOTA Keita,  
HATSUOKA Yoshinori, KAWAMURA Masatetsu, YAMAMOTO Kazuyo.

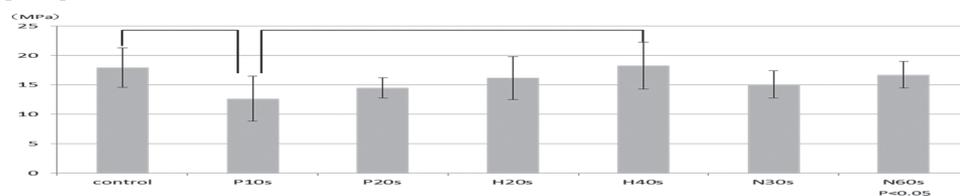
【目的】

近年 MI が広く浸透し, II 級窩洞であってもコンポジットレジン(以下 CR)修復を行う機会も増えている.しかし II 級窩洞は,従来の光照射器ではヘッド部が大きく窩底,特に歯肉壁までヘッドを近接させることが困難であり,照射距離が長くなってしまう.今回,ヘッドが小さく(直径 2.1mm)歯肉壁まで近接させて光照射を行うことができる新規 LED 光照射器(以下,MI ヘッド)がモリタから開発され,2012 年度 本学会春季学術大会において CR の重合性に与える影響について検討し,ペンキュア(モリタ)と同等の接着強さを得られることを報告した.今回,従来型 LED 光照射器のペンキュアと MI ヘッドを比較して,CR 修復における照射距離がボンディング材の重合に与える影響について検討を行った.

【材料及び方法】

抜去牛歯の象牙質被着面をモデルトリマー及び耐水研磨紙 (#600) で作成し,被着面積を直径 3mm に規定した.被着面に直径 3mm,高さ 2mm の治具を付け,その周りを被着面から高さ 6mm となるよう金属性の治具で覆った.メガボンド(クラレ ノリタケ デンタル)を用いて製造者指示に従い歯面処理後,治具上 6mm の高さから①ペンキュア 10 秒(以下 P10s), ②ペンキュア 20 秒(以下 P20s),MI ヘッドを用いて被着面に近接させ③ハイパワー20 秒(以下 H20s),④ハイパワー40 秒(以下 H40s),⑤ノーマルパワー30 秒(以下 N30s),⑥ノーマルパワー60 秒(以下 N60s)の 6 条件で光照射を行った.その後クリアフィルマジスティ LV(クラレ ノリタケ デンタル,シェード A3)を治具の高さ 2mm まで充填し 6mm の治具上からペンキュアにて 20 秒光照射を行った.なお,6mm の治具で覆わずメガボンドを用いて歯面処理を行いペンキュアにて 10 秒光照射後,CR 充填を行いペンキュアにて 20 秒光照射を行ったものを control とした.24 時間 37°C 水中保管後,万能試験機 (IM-20 INTESCO) を用いて CHS0.3mm/min にて引張接着強さを測定した.なお各照射条件につき 8 試料とし,得たデータを一元配置分散分析および Tukey の検定により統計処理を行った.

【結果】



【考察】

隣在歯の存在する II 級窩洞の場合,側方開放面に豊隆を付与した金属性の隔壁により一時的に閉鎖し単純窩洞化して修復を行う.その場合,金属性の隔壁のため光照射は咬合面の方向からしか行えず,照射器の形状によっては対合歯との距離により最も良いと思われる位置での光照射が不可能となり,歯肉壁までの照射距離が長くなってしまうか,もしくは角度がついてしまうことにより光量が減少することが考えられる.本実験では照射距離が長い場合,業者指示の時間照射するだけではボンディング材を十分に重合させることができず,接着強さが control に比べ低くなったと考えられる.照射時間を長くした場合や,MI ヘッドを用いてより接着面に近接させて光照射を行った場合,control と同等の接着強さを得られた. II 級コンポジットレジン充填の歯肉壁など照射器からの距離が大きくなる部位を十分に重合させるためには,光照射時間を長くするか,光源を被着部位に近づける必要があり,MI ヘッドの使用によりボンディング材の十分な重合が得られたと考えられる.今後は照射角度等についても検討していく予定である.

【結論】

MI ヘッドは II 級窩洞の歯肉壁のボンディング材を重合できることが示唆された.

## フロアブルレジンによる歯頸部修復の接着実態

日本歯科大学 生命歯学部<sup>1</sup> 歯科保存学講座<sup>2</sup> 接着歯科学講座  
○丸山沙絵子<sup>1,2</sup>, 勝海一郎<sup>1</sup>, 河合貴俊<sup>2</sup>, 山田 正<sup>2</sup>, 原 学<sup>2</sup>, 柵木寿男<sup>2</sup>, 奈良陽一郎<sup>2</sup>

### Actual behavior of cervical restoration using flowable resin composite

<sup>1</sup>Department of Endodontics, <sup>2</sup> Department of Adhesive Dentistry,  
School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

○MARUYAMA Saeko<sup>1,2</sup>, KATSUUMI Ichiroh<sup>1</sup>,  
KAWAI Takatoshi<sup>2</sup>, YAMADA Tadashi<sup>2</sup>, HARA Manabu<sup>2</sup>, MASEKI Toshio<sup>2</sup>, NARA Yoichiro<sup>2</sup>

**【研究目的】**フロアブルレジンとは供給型式のダイレクトアプリケーションシリンジによって窩洞への直接填入が可能であり、取り扱いの容易さなどからも臨床に多用されている。また最近では、優れた物性の兼備によって適応症例も広がっている。一方、歯頸部は齶蝕や摩耗症の好発部位であり修復頻度が高く、同時に審美性も求められることから、コンポジットレジン修復の最適ののひとつといえる。しかし当該部位は、咀嚼や咬合力によって応力集中しやすいことから、修復に際してはユニバーサルレジンより弾性率の低いフロアブルレジンの選択応用が望ましいと考えることができる。そこで本研究では、フロアブルレジンによる歯頸部修復の接着実態について、ユニバーサルレジンと対照として、口腔内環境想定複合ストレス負荷試験によって辺縁封鎖性と接着信頼性の観点から評価検討した。

**【材料および方法】**被験歯には、本学研究倫理委員会の承認を得てヒト抜去健全下顎小臼歯 16 本を用いた。材料として、修復用レジンにはフロアブルレジンの Filtek Supreme Ultra Flow (F: 3M ESPE) とユニバーサルレジンの Filtek Supreme Ultra (U: 3M ESPE) を、レジン接着システムには Adper Single Bond Plus (3M ESPE) を使用した。はじめに被験歯に対し、歯頂側壁がエナメル質と象牙質によって、歯肉側壁が象牙質のみによって構成される歯頸部規格化 V 字状窩洞を形成した。ついで、製造者指定の歯面処理、F または U による窩洞一塊充填、光照射、37℃湿ボックス中の 24 時間保管を経て、Soflex® XT(3M ESPE)による一連の研磨を行った。その後、修復試料は複合ストレス、すなわち 5℃/55℃間 (各 20 秒間浸漬) 200 セットのサーマルサイクリングと 12kgf × 1 万回 (90 回/分) の繰り返し荷重による同時負荷を加えた。**漏洩評価:** ストレス負荷後の試料は、直ちに 37℃1%メチレンブルー水溶液中に 1 時間浸漬し、歯軸と平行に窩洞中央部で半切研磨後、色素浸透状態の評価を行い、一修復試料から得た近心・遠心両試料結果のうち、色素浸透がより進行した試料のスコアを代表値(n=8)として採択した。なお、漏洩試験結果は Kruskal-Wallis の検定と Wilcoxon の符号付順位検定による分析を行った。**接着信頼性評価:** 漏洩評価後、近心・遠心 2 試料それぞれから厚さ 1.0mm の板状切片を切り出し、歯肉側壁中央部の象牙質面に対する  $\mu$ -TBS 値測定のために、最狭窄部幅・厚さ・平行部長さ各 1.0mm、被着面積 1.0mm<sup>2</sup> の規格化ダンベル状試料を作製し、テストスピード 1.0mm/min 下の測定(n=16)を行った。得られた  $\mu$ -TBS 値は、メジアンランク法によるワイブル分析によって統計学的解析を行った。

**【成績】漏洩評価:** Fig.1 に微小漏洩結果を示す。歯頂側壁において F の漏洩は認められず、U より有意(p<0.05)に小さい漏洩を示した。一方、歯肉側壁における漏洩は F と U いずれも窩壁の 1/4 未満に止まり、漏洩は同等であった。窩壁間では、F の漏洩は歯肉側壁が歯頂側壁より有意(p<0.05)に大きく、U においては窩壁の違いによる有意差は認められなかった。**接着信頼性評価:** F / U の平均  $\mu$ -TBS 値はそれぞれ 23.62 / 20.78 MPa であった。Fig.2 に F と U の  $\mu$ -TBS 値に対する累積破壊確率の違いを示す。ワイブル係数(m 値)は F: 4.11, U: 1.29 であり、F 値は U 値より有意(p<0.01)に大きく、システム固有の接着強さ獲得のための信頼性に優れていた。また、累積破壊確率 10%における推定破壊応力値は、F が U より有意(p<0.05)に大きい値を示した。

**【考察および結論】**本研究の結果、辺縁封鎖性の観点では、フロアブルレジンの選択応用はユニバーサルレジンよりエナメル質が存在する歯頂側窩縁部の封鎖性向上に寄与することが推察できた。これは、歯肉側窩壁より大きな垂直的圧縮応力が作用していると考えられる歯頂側壁に対する弾性率の効果が現れたものと考えられる。また、m 値と臨床的意義が高いと推測できる累積破壊確率 10%における推定破壊応力値が大きなフロアブルレジンの選択応用は、ユニバーサルレジンより確実な接着強さの獲得と同時に、接着破壊への耐久性に優れていることが考えられ、歯頸部修復の予後向上に寄与すると考えられる。本研究は学術研究助成基金助成金(課題番号 23592815)の一部支援を受け実施した。

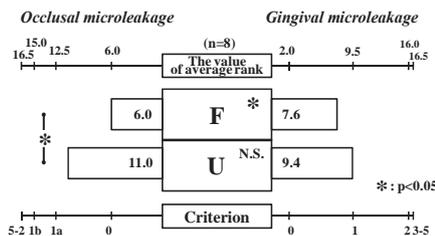


Fig.1 Difference in the microleakage between F and U restorations

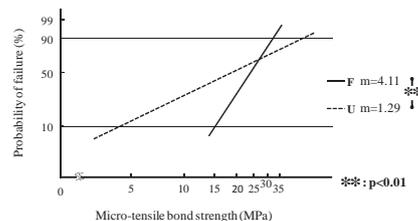


Fig.2 Difference in the probability of failure against  $\mu$ -TBS between F and U restorations

## 新規接着システム PrimeFil の接合界面の観察と臨床応用

虎の門病院歯科

○陶山雄司、森上 誠、杉崎順平、宇野 滋、山田敏元

### Interfacial Observation and Clinical Performance with a newly developed adhesive system “PrimeFil<sup>TR</sup>”

Department of Dentistry, Toranomon Hospital

○SUYAMA Yuji, MORIGAMI Makoto, SUGIZAKI Jumpei, UNO Sigeru, YAMADA Toshimoto

#### 【研究目的】

従来の接着システムにおいて、臨床ステップを簡略化した all-in-one システムが普及している。これはエッチング、プライミング、ボンディング処理を同時に行い、その簡便性から多くの臨床家に好まれている。トクヤマデンタルにより開発された PrimeFil は専用のペーストレジンを使用することにより、ボンディング処理を必要としない、つまり光照射の必要がないシステムが登場した。そこで今回我々は、PrimeFil について歯質との接合界面の様相を SEM ならびに TEM を用いて観察し、さらに臨床応用を行い検討したので報告する。

#### 【材料および方法】

##### 1. 歯質接合界面の SEM 観察

健全なヒト抜去大臼歯を用い、歯冠部エナメル質、象牙質を含む平坦面を被着面とした。これらの被着面に対して、水洗、乾燥後 PrimeFil を被着面に塗布し、20 秒間放置する。次に、弱圧または中圧のエアで 5 秒間乾燥後、PrimeFil CR ペーストを塗布・充填して光硬化したものを接着試片とした。なお、比較対象として、1 ステップセルフエッチングシステムである Bond Force (トクヤマデンタル) を製造者指示に従って用いた。接着試片は水中に 24 時間保管後、垂直に切断され、接着界面が露出するようにエポキシ樹脂に包埋・硬化後研磨し、SEM 観察用の試料とした。試料はイオンシャワー装置 (EIS-200ER, エリオニクス) を用いて 1keV, 1.8mA/cm<sup>2</sup> の条件でアルゴンイオンエッチングを 35 秒間施した後、白金蒸着を行い、FE-SEM(ERA-8800FE, エリオニクス) を用いて PrimeFil と正常エナメル質、象牙質との接合界面の様相について観察、写真撮影を行った。

##### 2. 歯質接合界面の TEM 観察

SEM 観察と同様の方法で接着試片を作製し、通報に従って 60-80nm の超薄切片を作製し、未脱灰・未染色の状態 (JEM-200EX, JEOL) を用いて PrimeFil と正常象牙質との接合界面の様相について TEM 観察を行い、写真撮影を行った。

##### 3. 臨床応用

虎の門病院外来受診患者に対して PrimeFil と PrimeFil CR ペーストを用いて齲蝕修復処置、審美修復を行い、臨床的に評価した。

#### 【成績ならびに考察】

SEM 観察像において PrimeFil と歯質との界面における接合状態は極めて良好でエナメル質、象牙質との接合界面全面にわたってギャップの形成は認められなかった。象牙質との界面においては 1 $\mu$ m 以下の幅でアルゴンイオンによってより粗造感を増した層が観察され、この部分がハイブリット層であると考えられた。一方 Bond Force は樹脂含浸層と思われる層は認められなかった。

TEM 観察における象牙質との界面像においても同様に PrimeFil による脱灰の影響でアパタイト結晶が減少した象牙質表層にレジン成分が含浸した樹脂含浸層が 200~300 $\mu$ m の厚で観察された。Bond Force も同様に象牙質との接合界面の象牙質最表層には 200~300 $\mu$ m の厚の象牙質とは構造を若干異とする層が認められたが、PrimeFil と比較して、より多くのアパタイト結晶の残留が観察された。

臨床的にも PrimeFil の操作性は極めて簡便で審美的な修復が可能で合った。

#### 【結論】

本研究より、PrimeFil は歯質に対する良好な接着性能を有していることが明らかになり、臨床で使用するうえでも有望なコンポジットレジン充填システムであることが示唆された。

## OCT を用いたシーラント填塞状態の観察

日本大学歯学部保存学教室修復学講座<sup>1</sup>, 総合歯学研究所生体工学研究部門<sup>2</sup>,  
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 小児顎口腔発達管理学分野<sup>3</sup>

○古宅真由美<sup>1</sup>, 横川未穂<sup>1</sup>, 利根川雅佳<sup>1</sup>, 市野 翔<sup>1</sup>,  
黒川弘康<sup>1,2</sup>, 安藤 進<sup>1,2</sup>, 宮崎真至<sup>1,2</sup>, 細矢由美子<sup>3</sup>

### Observation of Pit and Fissure Sealants Using Optical Coherence Tomography

Department of Operative Dentistry<sup>1</sup>, Division of Biomaterials Science Dental Research Center<sup>2</sup>,  
Nihon University School of Dentistry<sup>2</sup>, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences<sup>3</sup>

○KOTAKU Mayumi<sup>1</sup>, YOKOKAWA Miho<sup>1</sup>, TONEGAWA Motoka<sup>1</sup>, ICHINO Sho<sup>1</sup>,  
KUROKAWA Hiroyasu<sup>1,2</sup>, ANDO Susumu<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>, HOSOYA Yumiko<sup>3</sup>

#### 【緒言】

齲蝕予防においては個々のライフステージに合わせたアプローチが必要であり、乳歯あるいは萌出直後の永久歯に対しては、シーラントによる小窩裂溝部の予防填塞処置が有効とされている。これまでシーラントの歯面処理には、その被着対象が主に未切削エナメル質であることから、リン酸を用いるシステムが応用されてきた。しかし、症例によってはエナメル質表面が過度に脱灰される可能性があり、さらに小窩裂溝底部が象牙質まで達する場合、酸処理象牙質に対する接着性に不安が残るのが現状である。そこで、歯面処理にリン酸エッチングあるいはセルフエッチアドヒーズを応用した場合の、シーラントと歯質との接合界面に及ぼす影響について、光干渉断層画像診断法 (Optical Coherence Tomography, 以後 OCT) を用いて経時的に観察した。

#### 【材料および方法】

シーラントとして、クリンプロシーラント (3M ESPE) を用いた。また、歯面処理材としては、クリンプロシーラントに付属の 35%リン酸水溶液スコッチボンドエッチャント (3M ESPE), あるいはセルフエッチアドヒーズとしてスコッチボンドユニバーサル (3M ESPE) を用いた。

##### 1. 接合界面観察用試片の製作

ウシ下顎前歯歯冠部唇側面にエナメル質およびエナメル質から象牙質に達する 2 つの異なる深さの規格窩洞を形成、製造者指示に従って歯面処理を行った後、シーラントを填塞、照射を行い、これを接合界面観察用試片とした。

##### 2. OCT を用いた接合界面観察

接合界面観察用試片を 37°C の精製水中に 24 時間保管した後、サーマルサイクル試験装置 (B Type, トーマス科学) を用いて 5°C ~ 55°C を 1 サイクルとして、各温度における係留時間を 60 秒間に設定した温熱刺激を負荷した。この試片の断層像を、OCT を用いて非破壊にて経時的に観察することで、シーラントと歯質の接合界面付近の変化について検討した。本研究で用いた Time-domain OCT 装置 (モリタ東京製作所) は、マイケルソン型光学干渉計の応用技術によって構築されており、Super Luminescent Diode 光源からの近赤外光を対象物に入射し、屈折率の異なる構造あるいは境界面から反射してきた光を光学干渉計によって捉えることで、測定対象の内部構造を光強度と干渉周波数との情報に置き換えるものである。OCT による接合界面変化の観察時期としては、実験開始前および温熱刺激 5,000, 10,000, 50,000 および 100,000 回負荷の終了時とした。

##### 3. SEM およびレーザ顕微鏡観察

OCT 観察が終了した試片を縦断し、この縦断面を形状測定レーザマイクロスコープを用いて観察した後、通法にしたがって金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡 (ERA 8800FE, Elionix) を用いて接合界面の状態変化を検討、OCT イメージ像と比較、検討した。

#### 【成績および考察】

歯面処理材にリン酸を用いた場合の OCT イメージ像は、エナメル質および象牙質いずれにおいても、填塞直後から、シーラントと歯質との接合界面に線状のシグナルが観察された。サーマルサイクル負荷にともなって、シグナルの輝度の上昇が観察された。これは温熱刺激の負荷に伴い、シーラント材と歯質との接合界面においてギャップが生じたためと考えられた。

#### 【結論】

歯面処理方法の違いが歯質とシーラントの接合界面に及ぼす影響について、OCT を用いて観察することが可能であった。また、シーラントの歯質への接着耐久性は歯面処理法の影響を受けることが示唆された。

## 細胞外ヌクレオチドによる歯周組織破壊制御法の基盤研究

～NAD<sup>+</sup>および ADP-ribose による MMP 活性抑制作用の解析～

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野

○後藤和宏、根本英二、金谷聡介、島内英俊

### Inhibition of matrix metallo-protease expression by NAD<sup>+</sup> and ADP-ribose

Department of Periodontology and Endodontology

Tohoku University Graduate School of Dentistry

○K. Gotou, E. Nemoto, S. Kanaya, H. Shimauchi

#### 【研究目的】

マトリックスプロテアーゼ (MMP) は形態形成、血管形成、組織修復などに伴う組織リモデリングにおいて重要な役割を果たすが、その過剰な産生は細胞外マトリックスの分解を加速することから、歯周病、関節リウマチ、癌浸潤などの病態の進展に関与することが知られている。近年、細胞外β-nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) が炎症反応や免疫反応を調節することが知られるようになった。特に、細胞膜上に発現する酵素 (細胞膜表面酵素: ectoenzyme) である CD38/CD157 (ADP ribose hydrolase/ NAD glycohydrolase) および CD296 (ADP-ribosyltransferase) は、NAD<sup>+</sup>を基質としてそれぞれが特異的な細胞機能調節作用を発揮する。我々は、第132回 (2010年) 日本歯科保存学会学術大会において細胞外 NAD<sup>+</sup>が MMP の発現抑制作用を有することを報告した。今回、そのメカニズムの解析を行なったところ、NAD<sup>+</sup>の代謝産物である ADP-ribose も同様の抑制作用を示すことなどから、細胞膜上の NAD<sup>+</sup>代謝酵素の関与が示唆された。さらに、細胞外 NAD<sup>+</sup>による MMP 抑制機構における細胞内シグナリングの解析を行った。

#### 【材料および方法】

ヒト歯肉線維芽細胞: 東北大学病院にて、埋伏智歯抜歯に際してインフォームドコンセントを得て歯肉片を採取した。歯肉片を培養皿に播種し 10%牛胎児血清を含むα-minimum essential medium で培養し、組織片から増殖してきた細胞を継代し、5～10代の実験に供試した。コンフルエントとなった細胞を種々の濃度の NAD<sup>+</sup>存在下でヒトリコンビナント IL-1α (1 ng/ml, PEPROTECH) で6時間刺激を行い、以下の解析を行った。遺伝子発現は SYBR グリーンを用いた定量性リアルタイム PCR 法 (iCycler, BioRad) にて解析を行なった。培養上清中の MMP-1 および MMP-3 のタンパク量は ELISA 法 (R&D) にて測定した。細胞内シグナル分子のリン酸化解析はウェスタンブロット法により解析を行った。

#### 【結果】

- 1) NAD<sup>+</sup>存在下において、MMP-1 および MMP-3 の発現が遺伝子レベルおよびタンパクレベルにおいて抑制された。その抑制作用は濃度依存的であり、10 μM 以上の NAD<sup>+</sup>によって有意な抑制が認められた。
- 2) IL-1αによる MMP-1/-3 の発現誘導は、ERK1/2, p38, および JNK シグナル依存的であることが知られているが、NAD<sup>+</sup>は IL-1αによる ERK1/2, p38, および JNK のリン酸化に影響を与えなかった。
- 3) IL-1αによる MMP-1/-3 の発現誘導は、NF-κB シグナル依存的であることが知られているが、NAD<sup>+</sup>は IL-1αによる I-κB の分解に影響を与えなかった。
- 4) NAD<sup>+</sup>の代謝産物である ADP-ribose は NAD<sup>+</sup>と同程度の抑制作用を示した。

以上のことから、細胞外 NAD<sup>+</sup>による MMP-1/-3 抑制作用には、細胞膜上の NAD<sup>+</sup>代謝酵素が関与し、その本体は ADP-ribose である可能性が示唆された。また、本抑制作用は MAP kinase や NF-κB シグナルには依存しないユニークなシグナル経路を介することが明らかとなった。

#### 【考察および結論】

NAD<sup>+</sup>は、炎症反応における細胞障害、あるいは細胞膜チャンネル (connexin 43) を介して細胞外に遊離されることが知られている。従って、本研究の結果は、歯周組織には炎症性組織破壊に対する natural negative feedback 機構の存在を示唆するものであり、歯周組織破壊制御法に向けた新たなストラテジーにつながると考えられる。

### IL-17A は TNF- $\alpha$ が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生を増強する

<sup>1)</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯科保存学分野 <sup>2)</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔微生物学分野 日本学術振興会特別研究員 PD <sup>3)</sup>徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野

○ 細川義隆<sup>1)</sup>、細川育子<sup>1) 2)</sup>、尾崎和美<sup>3)</sup>、中江英明<sup>1)</sup>、松尾敬志<sup>1)</sup>

#### The effect of IL-17A on CCL20 production from TNF- $\alpha$ -stimulated human gingival fibroblasts

<sup>1)</sup>Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School, <sup>2)</sup>Department of Oral Microbiology, The University of Tokushima Graduate School, JSPS Research Fellow <sup>3)</sup>Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School

○Yoshitaka Hosokawa<sup>1)</sup>, Ikuko Hosokawa<sup>1) 2)</sup>, Kazumi Ozaki<sup>3)</sup>, Hideaki Nakae<sup>1)</sup> Takashi Matsuo<sup>1)</sup>

#### 【研究目的】

CC chemokine ligand 20 (CCL20)はCC chemokineに属するケモカインであり、CC chemokine receptor 6 (CCR6)を介して炎症性骨吸収への関係が示唆されているTh17細胞浸潤に関与している事が明らかとなっている。我々はすでにIL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ 刺激でヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) のCCL20産生が誘導される事を報告している (Clin Exp Immunol, 142, 285-91, 2005)。しかしながら、Th17細胞が産生するサイトカインであるIL-17AがTNF- $\alpha$ が誘導するHGFsのCCL20産生に及ぼす影響に関しては不明である。本研究では、IL-17AがTNF- $\alpha$ 刺激HGFsのCCL20産生に及ぼす影響をシグナル伝達経路も含めて検討した。

#### 【材料および方法】

HGFsは智歯抜歯時に正常歯肉組織よりout growth法により分離し、10%FBSを含むDMEM培地にて培養し実験に用いた。まず、HGFsをTNF- $\alpha$ 単独あるいはIL-17Aと共刺激し上清中のCCL20産生をELISA法により解析した。さらにTNF- $\alpha$ とIL-17Aが誘導するCCL20産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにMAPKsとNF- $\kappa$ Bに対するシグナル伝達阻害物質にて前処理後、TNF- $\alpha$ とIL-17A刺激を行いCCL20産生をELISA法にて確認した。さらに、細胞内シグナル伝達分子 (MAPKsおよびI $\kappa$ B- $\alpha$ ) のリン酸化をwestern blot法を用い解析を行った。

#### 【成績】

TNF- $\alpha$ 刺激で誘導されたHGFsのCCL20産生はIL-17A濃度依存的に増強された。また、TNF- $\alpha$ とIL-17Aの共刺激で誘導されたCCL20産生はp38 MAPK inhibitor, ERK inhibitorおよびNF- $\kappa$ B inhibitorで有意に抑制された。さらに、TNF- $\alpha$ 単独刺激と比較し、TNF- $\alpha$ とIL-17A共刺激においてHGFs内のp38 MAPKおよびI $\kappa$ B- $\alpha$ のリン酸化が亢進された。

#### 【考察および結論】

今回の結果より、IL-17AはTNF- $\alpha$ が誘導したCCL20産生を相乗的に増強することが明らかとなった。さらに、p38 MAPKとNF- $\kappa$ Bを介したシグナル伝達経路がこの相乗効果に関与している事が示唆された。我々はすでにIL-17A刺激によりIL-1 $\beta$ が誘導するHGFsのCCL20産生を増強することを報告している (Hum Immunol, 73, 26-30, 2012)。今回の結果よりTh17細胞は歯周炎病変局所においてIL-17Aを産生する事により、IL-1 $\beta$ やTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインと協調しHGFsのCCL20産生を増強し、Th17細胞のさらなる浸潤・集積を誘導することにより、歯槽骨吸収促進などさらなる歯周炎の増悪に関与している事が考えられた。

## *Actinomyces naeslundii* の歯槽骨吸収における病原因子について

神奈川県立歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野

○ 佐藤武則, 渡辺清子, 熊田秀文, 遠山歳三, 浜田信城

**The virulence factor of *Actinomyces naeslundii* in alveolar bone resorption**  
Division of Microbiology, Department of Infection Control, Kanagawa Dental College

### 【研究目的】

*Actinomyces naeslundii* はバイオフィーム形成に関係し歯周病の進行に関与する細菌の1つであると考えられている。しかしながら、本菌の歯槽骨吸収メカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究は *Actinomyces naeslundii* ATCC 12104 株を用いて歯肉上皮細胞への付着能について評価し、さらに本菌から抽出した菌体破砕物とペプチドグリカンの破骨細胞分化誘導能および炎症性サイトカイン産生能について検討した。

### 【材料および方法】

1. 供試菌および培養条件: *A. naeslundii* ATCC 12104 株および *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株は BHI 液体培地を用いて 37°C, 18 時間嫌気培養したものを使用した。
2. 歯肉上皮細胞への付着性: ヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) は健康者歯肉から分離したものを使用した。細胞数を調整した HGEC を 2 日間培養後、供試菌液を 90 分間作用させた。浮遊細胞を除去後、滅菌蒸留水で細胞を剥離して得られたものを希釈して血液寒天培地に塗抹し、7 日間嫌気培養後の生菌数から細胞付着率を算出した。
3. 破骨細胞分化誘導能: 破骨細胞分化支持細胞 (MC3T3-G2/PA6) と BALB/c マウス骨髄細胞を共培養したものに、*A. naeslundii* 菌体より抽出した超音波破砕画分 (SE)、ペプチドグリカン (PGN) ならびに対照として *Escherichia coli* LPS をそれぞれ添加した。その後 1 週間培養して TRAP 陽性細胞を破骨細胞として計測した。
4. 炎症性サイトカイン産生能: チオグリコレート培地を接種した BALB/c マウス腹腔内よりマクロファージを回収し、RT-PCR 法を用いて SE, PGN および *E. coli* LPS 添加群における IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  の mRNA の発現を比較した。

### 【成績】

1. 歯肉上皮細胞への付着能: HGEC に対して *A. naeslundii* は *P. gingivalis* と同程度の付着能を示した。
2. 破骨細胞分化誘導能: SE 添加群, PGN 添加群ならびに *E. coli* LPS 添加群では無刺激群 (コントロール) に比べて破骨細胞の増加が認められた。また, PGN 添加群 (10  $\mu$ g/ml) ならびに *E. coli* LPS 添加群は同程度の破骨細胞分化誘導能であることが明らかとなった。
3. 炎症性サイトカイン産生能: SE 添加群, PGN 添加群ならびに *E. coli* LPS 添加群では IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  の mRNA の発現が認められた。

### 【考察および結論】

*A. naeslundii* は線毛を有する細菌であることが知られており、本研究の結果、*P. gingivalis* と同程度の定着率を示したことから線毛を介した口腔内定着機構が歯槽骨吸収と関与しているものと示唆された。また細胞壁由来可溶性タンパク質を含む超音波破砕画分とペプチドグリカン刺激により、破骨細胞数の有意な増加およびサイトカイン産生が認められたことから、本菌には種々の骨吸収因子が存在することが示された。特にペプチドグリカンは歯周病における歯槽骨吸収において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

日本人歯周病患者を対象とした抗菌ペプチド遺伝子の SNPs 解析と疾患感受性の検討

<sup>1</sup>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

<sup>2</sup>株式会社ビー・エム・エル

○稲垣裕司<sup>1</sup>、斉藤 剛<sup>2</sup>、田中和也<sup>2</sup>、生田貴久<sup>1</sup>、中島由紀子<sup>1</sup>、木戸淳一<sup>1</sup>、永田俊彦<sup>1</sup>

Gene polymorphisms of antimicrobial peptides in Japanese periodontitis patients

<sup>1</sup>Department of Periodontology and Endodontology Institute of Health Biosciences,  
University of Tokushima Graduate School

<sup>2</sup>BML, INC.

○Yuji Inagaki<sup>1</sup>, Tsuyoshi Saito<sup>2</sup>, Kazuya Tanaka<sup>2</sup>, Takahisa Ikuta<sup>1</sup>, Yukiko Nakajima<sup>1</sup>,  
Jun-ichi Kido<sup>1</sup> and Toshihiko Nagata<sup>1</sup>

【目的】

歯周病は遺伝的因子と環境因子が関与する多因子性疾患であり、近年、遺伝的因子として一塩基多型 (SNPs; Single Nucleotide Polymorphisms) が注目されている。一方、ヒトの口腔内は常に病原微生物にさらされており、感染に対しては自然免疫と獲得免疫の2つの免疫システムによって防御されている。これらの免疫システムのうち自然免疫は微生物の接触の初期段階から作動し、生体防御の一役を担っている。自然免疫において重要な役割を果たすのが抗菌ペプチドであり、真核生物では800種類以上の存在が知られている。現在までにいくつかのSNPsが歯周病の発症や進行に関連していることが明らかにされているが、抗菌ペプチドのSNPsと歯周疾患との関連性についての報告は少ない。また一般的にSNPsと疾患との関連性には人種や地域間での差が存在すると考えられている。そこで日本人の歯周病患者における抗菌ペプチドのSNPsを解析し、歯周病の発症や進行にどのような影響を与えているかを検討した。

【材料と方法】

徳島大学病院を受診した日本人の患者で、本研究の参加に同意の得られた者を被験者とした(徳島大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会 承認番号 H23-7)。侵襲性歯周炎の患者22名、重度慢性歯周炎の患者25名、中等度慢性歯周炎の患者13名、軽度慢性歯周炎の患者22名、および健常者21名(侵襲性歯周炎患者に対する対照群)、合計103名の血液試料からDNAを抽出して、抗菌ペプチドの既知の7SNPs( $\beta$ -ディフェンシン-1; rs1799946, rs1800972, rs11362, ラクトフェリン; rs1126478, およびカルプロテクチン; rs3795391, rs3806232, rs3885688)をインパーダー法により解析した。引き続き各SNPsについて統計処理を行い、オッズ比、95%信頼区間を求め、有意差を検定した。一方、被験者の一部から歯肉溝滲出液(GCF)を採取し、GCF中に発現している $\beta$ -ディフェンシン-1およびラクトフェリンをELISA法により定量した。さらに抗菌ペプチドのSNPs、その発現量、歯周病の病態(口腔内診査およびエックス線撮影から得られた被験者の臨床データ)の3者の相関について統計学的評価を行った。

【結果および考察】

$\beta$ -ディフェンシン-1のrs1800972 C/C保有者において、中等度～重度慢性歯周炎のリスクが有意に高かった(オッズ比3.692, 95%信頼区間1.114~13.114)。しかしそれ以外の6SNPsでは有意な差は認められなかった。また、被験者のGCF中に発現している $\beta$ -ディフェンシン-1およびラクトフェリンを定量した結果、rs1800972 C/C保有者のGCF中の $\beta$ -ディフェンシン-1濃度が有意に低かった。しかしその他の $\beta$ -ディフェンシン-1のSNPsおよびラクトフェリンのSNPでは有意な差は認められなかった。

【結論】

以上の結果より、 $\beta$ -ディフェンシン-1のrs1800972が日本人歯周病患者の疾患感受性に関連している可能性が示された。本研究は1施設のみで被験者を集めたため症例数が少なく、今後、多施設でスクリーニングを行えば、さらに信頼性の高い結果が得られるものと期待できる。

歯肉溝滲出液(GCF)を用いた歯周病罹患部位の診断と治療効果のモニタリングの有用性  
-歯周病迅速診断キット開発に向けて- (第六報)

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座<sup>1)</sup>,  
日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター・アイソトープ研究施設<sup>2)</sup>,  
岩手医科大学歯学部口腔機能保存学講座歯周病学分野<sup>3)</sup>, 日本大学松戸歯学部歯周治療学講座<sup>4)</sup>,  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科生体支持組織学系専攻生体硬組織再生学講座歯周病学分野<sup>5)</sup>,  
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<sup>6)</sup>  
○伊藤 弘<sup>1)</sup>, 沼部幸博<sup>1)</sup>, 関野 愉<sup>1)</sup>, 村樫悦子<sup>1)</sup>, 井口一美<sup>1)</sup>, 戸田智幸<sup>2)</sup>, 橋本修一<sup>2)</sup>,  
佐々木大輔<sup>3)</sup>, 八重柏 隆<sup>3)</sup>, 國松和司<sup>3)</sup>, 高井英樹<sup>4)</sup>, 目澤 優<sup>4)</sup>, 小方頼昌<sup>4)</sup>, 渡邊 久<sup>5)</sup>,  
萩原さつき<sup>5)</sup>, 和泉雄一<sup>5)</sup>, 廣島佑香<sup>6)</sup>, 木戸淳一<sup>6)</sup>, 永田俊彦<sup>6)</sup>

Utility of diagnostic methods for periodontal disease and monitoring therapeutic gain using GCF

-Development of kit for rapid diagnosis of periodontitis -part6

Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo<sup>1)</sup>,  
Dental Research Institute, Radio Isotope Center, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry Tokyo<sup>2)</sup>,  
Department of Conservative Dentistry and Oral Rehabilitation, Division of Periodontology, School of Medicine,  
Iwate Medical University<sup>3)</sup>, Departments of Periodontology, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University<sup>4)</sup>,  
Section of Periodontology, Department of Hard Tissue Engineering, Graduate School of Medical and Dental Science,  
Tokyo Medical and Dental University<sup>5)</sup>, Department of Periodontology and Endodontology,  
Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School<sup>6)</sup>  
○Hiroshi Ito<sup>1)</sup>, Yukihiro Numabe<sup>1)</sup>, Satoshi Sekino<sup>1)</sup>, Etsuko Murakashi<sup>1)</sup>, Hitomi Iguchi<sup>1)</sup>, Tomoyuki Toen<sup>2)</sup>,  
Shuichi Hashimoto<sup>2)</sup>, Daisuke Sasaki<sup>3)</sup>, Takashi Yaegashi<sup>3)</sup>, Kazushi Kunimatsu<sup>3)</sup>, Hideki Takai<sup>4)</sup>, Masaru Mezawa<sup>4)</sup>,  
Yorimasa Ogata<sup>4)</sup>, Hisashi Watanabe<sup>5)</sup>, Satsuki Hagiwara<sup>5)</sup>, Yuuichi Izumi<sup>5)</sup>, Yuka Hiroshima<sup>6)</sup>, Jun-ichi Kido<sup>6)</sup>,  
Toshihiko Nagata<sup>6)</sup>

【目的】

歯周治療後における歯周組織の維持・安定には、質の高い SPT の継続と医療従事者による正確な病状把握が重要である。PPD と BOP は、歯周病診断に重要なツールであるものの、歯周病発症後の状態を評価しているに過ぎない。我々は、PPD と BOP に加えることにより、診断精度を向上可能な GCF 中に観察される生化学的マーカーの検索を行ってきた。その過程で、歯周病の状態が重度にも拘らず BOP 陰性を示す部位が散見され、PPD と BOP 両検査の限界が見出された。そこで、BOP 検査は機械的刺激に対する出血の有無であることから、出血反応・出血履歴に焦点を絞り、歯周病の発症・進行に有用なマーカー検出を目的とした。

【材料と方法】

被験者は非喫煙者の SPT 期患者 184 名とし、歯冠修復物のない上下顎前歯部 401 部位から GCF を採取した。検査項目は、臨床パラメータとして、PII, GI, CAL, PPD, BOP, GCF 量 (periotron<sup>®</sup>値) を評価した。採取した GCF は、生化学検査として特に出血反応・出血履歴に対する指標をヘモグロビン(Hb)として測定を行なった。なお、本研究は倫理委員会の承認 (承認番号 2111) のもと遂行された。

【結果】

BOP 陰性にも拘らず Hb 陽性である試料や BOP 陽性にも拘らず Hb 陰性である試料が各々 84 試料, 54 試料であった。一方 BOP 陰性 Hb 陰性である試料や BOP 陽性 Hb 陽性である試料は各々 217 試料, 46 試料であった。

【考察】

本研究結果から、BOP 陰性を示す場合においても Hb の存在が観察される試料が観察された。すなわち視覚的に判別できないポケット内の出血反応・出血履歴が Hb 陽性として観察されることである。この Hb の存在は、血管の開口がポケット内に生じていることと、同時にポケット内の組織が脆弱であることを間接的に示すものである。以上より、GCF 中の Hb 測定は歯周病の発症・進行前の診断ツールとなる可能性が示唆された。

本研究は、文部省科学研究費助成金：基盤研究 C、課題番号：20592437、日本歯科医師会・新医療機器・医療技術産業ビジョンプロジェクトの助成を受けて行われた。

Er:YAG レーザーおよび電気メスによる歯肉処置後の歯周組織の創傷治癒の比較

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院 生体支持組織学講座 歯周病学分野

<sup>2</sup>東京医科歯科大学 ナノメディスン (DNP) 講座

<sup>3</sup>東京医科歯科大学グローバル COE プログラム歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点

○澤辺正規<sup>1</sup>、青木 章<sup>1</sup>、小牧基浩<sup>2</sup>、岩崎剣吾<sup>2</sup>、荻田真弓<sup>1,3</sup>、和泉雄一<sup>1,3</sup>

Gingival Healing Following Er:YAG Laser Ablation Compared to Electrosurgery in Rats

<sup>1</sup>Department of periodontology, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>Department of Nanomedicine (DNP), Tokyo Medical and Dental University

<sup>3</sup>Global Center Excellence(GCOE) Program, International Reserch Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases, Tokyo Medical and Dental University

○SAWABE Masanori<sup>1</sup>, AOKI Akira<sup>1</sup>, KOMAKI Motohiro<sup>2</sup>, IWASAKI Kengo<sup>2</sup>, OGITA Mayumi<sup>1,3</sup>, IZUMI Yuichi<sup>1,3</sup>

【背景】 近年、Er:YAG レーザーは歯周治療において歯肉処置やポケット治療など様々な応用がなされている。レーザーは従来の機械的な治療法と異なり、殺菌効果や生物学的効果などの付加的効果を有し、レーザー治療ではより良好な治療効果が得られることが報告されている。しかしながら、Er:YAG レーザーによる歯肉処置後の詳細な治癒過程についての報告は少ない。

【目的】 本研究の目的は歯肉の Er:YAG レーザーおよび電気メス処置による歯周組織、歯根面および歯髄への影響を比較し、術後の治癒過程について比較することである。

【材料と方法】 28 匹の 9 週齢オスの SD ラットを用い、全身麻酔下で上顎左右第一大臼歯近心の頬側近心隅角から口蓋側近心歯肉に Er:YAG レーザー (VersaWave; Hoya Photonics, Fremont, CA, USA) (10.4 J/cm<sup>2</sup>/pulse, 30Hz) あるいは電気メス (Operer DS-M, モリタ製作所, 京都) を用いて歯槽骨まで及ぶ欠損を作製した。術直後、術 6 時間後、1 日後、3 日後、6 日後、10 日後に屠殺し、パラホルムアルデヒドで固定後、EDTA を用いて脱灰、4 μm のパラフィン切片を作製し、その治癒過程を観察した。肉眼的観察およびヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色、アザン染色標本を用いて形態組織科学的評価をおこなった。また、熱傷害性タンパク Heat shock protein 70 (72/73) (Hsp70)、Heat shock protein 47 (Hsp47) および PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) について免疫組織科学的評価をおこなった。

【結果】 Er:YAG レーザーおよび電気メス処置で作製した歯肉欠損の大きさおよび深さに差はなかった。Er:YAG レーザー処置は電気メス処置と比較して熱傷害が非常に少なく、術直後の変化層の厚さは電気メス処置と比較して有意に小さかった。処置部位に面した歯根表面の変性層は電気メス処置で大きくなる傾向にあった。Er:YAG レーザー処置では術後 6 時間以降から治癒が進み安定した治癒過程を辿ったが、電気メス処置では、潜在的な熱傷害により術後 1 日まで組織の崩壊が生じた後、再上皮化が始まった。Er:YAG レーザー処置では術後 3 日に上皮化がほぼ完了し、術後 10 日には欠損作製部に十分な新生結合組織が形成され、いずれも電気メス処置よりも迅速であった。術後 10 日の上皮の根尖側への進展は術前と比較し電気メス処置で有意に長かった。細胞のストレス反応によって生じる Hsp70 の発現は欠損作製部位周囲の結合組織および歯根膜、歯髄内にみられた。6 時間後から 3 日後に電気メス処置では作製欠損周囲から遠位の結合組織内に顕著な発現が見られたが、Er:YAG レーザー処置ではその発現は欠損の近傍であり非常に少なかった。また、歯髄内における Hsp70 の発現は 1 日後および 3 日後にみられ、電気メス処置側でその発現は顕著であったが、Er:YAG レーザー処置側ではほとんど観察されなかった。タンパク合成と関連して生じる Hsp47 の発現は創傷治癒過程において健全側から欠損側に向かって発現が移動し、術後 10 日でその発現は欠損作製部位にほぼ限局したが、この現象は Er:YAG レーザー処置で早期に認められた。細胞増殖に関連してみられる PCNA は Hsp47 と同様な発現を示し、特に残存上皮基底層における発現は両側ともに術後 1 日から顕著にみられた。Er:YAG レーザー処置では術後 6 日にはほぼ術前と同程度までに PCNA の発現が減少したが、電気メス処置では発現が継続し、術後 10 日ではほぼ同程度となった。

【結論】

Er:YAG レーザーは電気メスと比較して組織の熱傷害が小さく、本レーザー処置による歯肉組織の治癒は電気メス処置より早期に、良好な治癒過程を辿ることが明らかになった。

## 脂肪細胞への分化を LIF は促進する

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)  
○池田 峻、伊藤祥作、松下健太、山本由美子、山内由香子、林 美加子

### LIF enhances adipocyte differentiation

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry  
○IKEDA Shun, ITOH Shousaku, MATSUSHITA Kenta, YAMAMOTO Yumiko, YAMAUCHI Yukako,  
HAYASHI Mikako

#### 【研究目的】

骨髄ストローマ細胞は分化誘導培地にて培養することにより、骨芽細胞、脂肪細胞、ならびに軟骨細胞といった様々な種類の細胞へと分化誘導することが可能である。これは骨髄ストローマ細胞中に未分化間葉系幹細胞が含まれているためと考えられている。今回、我々はその骨髄ストローマ細胞から脂肪細胞への分化における LIF の働きについて解析したので報告する。

#### 【材料と方法】

1. C57BL/6J マウスの大腿骨と脛骨から骨髄細胞を調整し、10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM 中で培養した。培養 3 日目に PBS にて浮遊細胞を除去した。そして 2 週間培養後、この付着細胞を回収し、骨髄ストローマ細胞として実験に用いた。10%FBS 含有  $\alpha$ -MEM と  $50 \mu\text{g/ml}$  ascorbic acid、 $10^{-5}\text{M}$  rosiglitazone(BRL-49653)にて脂肪細胞分化誘導培地を調整し、これに LIF を含むものと含まないものを作成した。骨髄ストローマ細胞をこれらの培地中で培養した後に Oil Red O 染色を行った。Oil Red O 陽性コロニー数および吸光度測定を行い、脂肪細胞への分化を評価した。
2. 上記の LIF 含有、非含有脂肪細胞分化誘導培地にて骨髄ストローマ細胞を培養した。15 日間培養後、セパゾールを用いて RNA を回収し逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。この cDNA に対して脂肪細胞分化マーカーである PPAR- $\gamma$  と FABP4(aP2)について real-time PCR をを行い、mRNA 発現量を比較検討した。
3. 骨髄ストローマ細胞を LIF(100ng/ml)にて刺激し、タンパク回収し Western blotting 法にてリン酸化 STAT3 タンパクの検出を行った。

#### 【結果】

1. LIF を含む脂肪細胞分化誘導培地にて培養した骨髄ストローマ細胞の Oil Red O 陽性コロニー数は、LIF を含まない脂肪細胞分化誘導培地にて培養した骨髄ストローマ細胞と比較して有意に増加していた。
2. 脂肪細胞分化マーカーの発現量は、LIF の添加によりその発現量が上昇していた。
3. LIF 刺激によりリン酸化 STAT3 の発現量が増加した。

#### 【結論】

以上の結果から LIF は JAK-STAT3 シグナル伝達経路を介して脂肪細胞への分化を促進していることが明らかとなった。

※本研究における初代培養系マウス骨髄細胞を用いた実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会での承認を得て実施されている。

※本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金 (若手研究 (A)24689070) の補助の下に行われた。

## PLAP-1 ノックアウトマウスの作製と解析

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)  
○粟田敏仁, 山田 聡, 山羽聡子, 梶川哲宏, 尾崎亘弘,  
阪下裕美, 北村正博, 島袋善夫, 村上伸也

### Generation and analysis of PLAP-1 knock-out mice

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry  
Toshihito Awata, Satoru Yamada, Satoko Yamaba, Tetsuhiro Kajikawa, Nobuhiro Ozaki,  
Hiromi Sakashita, Masahiro Kitamura, Yoshio Shimabukuro, Shinya Murakami

#### 【目的】

PLAP-1 はヒト歯根膜組織の網羅的遺伝子発現解析により同定された遺伝子であり、分子量約 40kDa のプロテオグリカン様構造をとる Extracellular matrix タンパクをコードしている。さらに、PLAP-1 は Small leucine-rich repeat proteoglycan family に属することから、様々なサイトカインシグナルの調節制御に関わることが報告されている。歯周組織においては、PLAP-1 が歯根膜において歯胚の発生初期より高い発現を認めること、また *in vitro* における実験の結果より PLAP-1 が BMP-2 のアンタゴニストとして機能し、歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化を制御することが示唆されている。しかしながら、各種サイトカインと PLAP-1 との関係について、また *in vivo* での PLAP-1 の機能については、未だ詳細な解析はなされていない。そこで我々は、PLAP-1 遺伝子を欠失した PLAP-1 ノックアウト(KO)マウスを作製し、*in vivo* での表現型の解析を行うこととした。本研究では、野生型 (WT)および PLAP-1 KO マウス胎仔骨格標本の作製、また WT および PLAP-1 KO マウスから分離した Mouse Embryonic Fibroblasts (MEFs) を用いて、BMP-2 刺激による反応性について解析を行ったので報告する。

#### 【材料および方法】

PLAP-1 KO マウスの作製においては、PLAP-1 遺伝子の第 2 エクソンを Neo に置換した PLAP-1 ノックアウトベクターを構築し、C57BL/6 由来の ES 細胞へトランスフェクションし、遺伝子相同組換えを行った。薬剤選択により ES 細胞クローンを単離し、ゲノム PCR およびサザンブロット法にて相同組換えクローンを同定した。同クローンをマウス胎盤胚へインジェクションすることで ES 細胞キメラを作製し、同キメラから germ line transmission を経て F1 マウスを樹立した。マウス胎仔骨格標本は、PLAP-1<sup>+/+</sup>マウス同士をかけあわせた妊娠 15.5 日目のマウスから胎仔を取り出し、95% Ethanol で固定後、アセトンに 2 日間浸し、Working staining solution (Alizarin Red, Alcian blue, 酢酸, Ethanol 混合溶液) で染色し、1% KOH 水溶液にて軟組織を溶解することで作製した。WT および PLAP-1 KO マウスの MEFs は胎生 13.5 日の胎仔から Trypsin-EDTA 処理により分離し、10% FCS 含有 D-MEM 培地にて培養を行い、継代数 3-5 を実験に用いた。6 well dish に  $2 \times 10^5$  個/well で播種した WT および PLAP-1 KO マウスの MEFs を無血清培地で一晚 starvation を行い、濃度 0, 1.25, 2.5, 5, 10 (ng/ml) の BMP-2 で刺激し、0hr, 1hr, 2hr, 4hr 後に全 RNA を抽出した。その後 real time PCR 法によって BMP-2 早期誘導性遺伝子である *Id-1* の mRNA 発現量を検討した。

#### 【結果と考察】

PLAP-1 KO マウスの樹立に成功した。PLAP-1 KO マウスは繁殖可能で、見かけ上、正常であった。マウス胎仔の骨格標本において、WT および PLAP-1 KO マウスに明らかな硬組織・軟骨組織の差異はみられなかった。MEFs を BMP-2 で刺激することにより、PLAP-1 KO 群では WT 群と比べてより高い *Id-1* 遺伝子の発現上昇を認めた。

#### 【結論】

PLAP-1 KO マウスは、*in vivo* における PLAP-1 機能の解明に有効であることが示された。今後、PLAP-1 KO マウスの表現型について詳細な解析をすすめ、*in vivo* での PLAP-1 の生理的役割を検討する。また、歯周組織の発生や修復再生時に重要な FGF-2 や TGF- $\beta$  などの増殖分化因子と PLAP-1 との相互作用について、KO MEFs を用いた *in vitro* の解析を行い、サイトカインシグナル制御のメカニズムを明らかにする予定である。

## 根尖孔外バイオフィームモデルにおけるラット根尖病巣のマイクロ CT 解析

<sup>1</sup>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)

<sup>2</sup>大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻

○呉本勝隆<sup>1</sup>, 野村由一郎<sup>1</sup>, 石本卓也<sup>2</sup>, 永山智崇<sup>1</sup>, 騎馬和歌子<sup>1</sup>, 前歯葉月<sup>1</sup>,  
山本れいこ<sup>1</sup>, 米田直道<sup>1</sup>, 中野貴由<sup>2</sup>, 林 美加子<sup>1</sup>, 恵比須繁之<sup>1</sup>

### Micro-CT analysis of experimental periapical lesion with extraradicular biofilms in rat

<sup>1</sup>Osaka University Graduate School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry and Endodontology

<sup>2</sup>Osaka University Graduate School of Engineering, Division of Materials and Manufacturing Science

○KUREMOTO Katsutaka<sup>1</sup>, NOIRI Yuichiro<sup>1</sup>, ISHIMOTO Takuya<sup>2</sup>, NAGAYAMA Tomotaka<sup>1</sup>, KIBA Wakako<sup>1</sup>, MAEZONO Hazuki<sup>1</sup>,  
YAMAMOTO Reiko<sup>1</sup>, YONEDA Naomichi<sup>1</sup>, NAKANO Takayoshi<sup>2</sup>, HAYASHI Mikako<sup>1</sup>, EBISU Shigeyuki<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

我々のグループは主要な口腔感染症のひとつである根尖性歯周炎の難治化には、根尖孔外バイオフィームが関与することを報告したが<sup>1,2)</sup>、その病態とバイオフィームの進展関係については現時点では未解明である。病巣局所での骨吸収の進行状況を解明するためにラット等を用いた実験的根尖性歯周炎モデルが開発され、現在までに組織所見やデンタルX線写真を用いた解析が行われてきた。しかし、デンタルX線写真は2次元的解析であり、骨吸収の全貌を明らかにするという点では不十分である。一方、組織観察では実験動物を屠殺した後に試料を作製するため、同一個体の経時的な観察は不可能であった。そこで本研究では、根尖孔外バイオフィームを形成させたラットの根尖性歯周炎モデルを用い、マイクロCTを用いて3次元かつ経時的に根尖病巣を解析した。

#### 【方法】

本研究は大阪大学歯学研究科動物実験委員会の承認を得て実施した(承認番号:動歯22-003-1)。5週齢Wistar系雄性ラット12匹を実験に用いた。ラットの左右下顎第一臼歯をラウンドバーにて露髄させ、露髄後1,2,3,4週にマイクロCT(理学メカトロニクス,R<sub>m</sub>CT2)で撮影を行い、根尖病巣の経時的観察を行った。露髄4週後に右側のみガッタパーチャポイントを根尖孔外まで挿入し実験群とし、左側はガッタパーチャポイントを挿入しない対照群とした。露髄6週後、8週後においても各々6匹ずつマイクロCT撮影を行った後、屠殺し、左右第一臼歯を抜歯した。抜去歯の根尖付近および根尖孔外ガッタパーチャポイントを走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察するとともに、根尖病巣の3次元解析を、骨形態計測ソフト(RATOC, TRI 3D-BON)を用いて行った。

また、アガロース電気泳動法にて抜歯した歯牙の根尖孔付近セメント質および根尖孔外ガッタパーチャポイントに存在する細菌遺伝子の存在を評価した。

#### 【結果および考察】

実験的根尖性歯周炎の根尖病巣は実験群、対象群とも露髄4週後にピークに達し、その後減少傾向を認めた。露髄後8週において実験群の根尖病巣は対照群に比べ増大した( $p < 0.05$ )。

SEM像の観察結果より、露髄6週、8週後ともに実験群では根尖孔外バイオフィームの存在が確認できた(右図)。

アガロース電気泳動法においても実験群で根尖孔外サンプルより細菌遺伝子が検出され、今回解析した根尖病巣には根尖孔外バイオフィームが関与していることが示された。

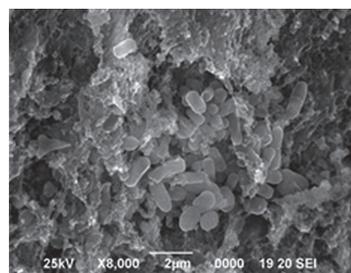
#### 【結論】

根尖孔外バイオフィームは根尖病巣をより進展させる可能性が示された。

#### 【参考文献】

- 1) Noiri Y, Li L, Ebisu S : *J Dent Res* 80: 1930-1934, 2001.
- 2) Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S : *Appl Environ Microbiol* 71: 8738-8743, 2005.

(本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金(基盤研究(B)24390424)の補助の下に行われた。)



露髄6週後の根尖孔外バイオフィーム SEM 像  
(ガッタパーチャポイント上 x8,000)

## 大豆イソフラボンによるラット歯髄細胞の分化・石灰化機序の検討

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学分野  
○林 敬次郎、半田慶介、小池俊之、Mohammad Ali Akbor Polan、Jia Tang、斎藤隆史

### A study on the mechanism of differentiation and calcification by soy isoflavone in rat dental pulp cells

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

○Keijiro Hayashi, Keisuke Handa, Toshiyuki Koike, Mohammad Ali Akbor Polan, Jia Tang, Takashi Saito

【目的】天然成分である大豆イソフラボンはフラボノイドに分類され、食品添加物やサプリメントとして摂取されている健康食品であり、様々な生理活性効果が期待されている。加えて、その構造がエストロゲンと類似しているためエストロゲン様作用を有し、特に骨組織で優位に発現するエストロゲンレセプター $\beta$  (以下ER $\beta$ ) との高親和性から、骨粗鬆症の予防や改善に有効であるとされている。我々はこれまでに、大豆イソフラボンのひとつである genistein が、*in vitro* におけるラット歯髄細胞 (Rat Dental Pulp Cells, 以下、RDP) の増殖・分化誘導能、および *in vivo* における修復象牙質形成能を有することを報告してきた (日本歯科保存学会、第 134 回春季学術大会)。しかし、genistein による RDP の分化および石灰化機構に関する詳細は解明されていない。そこで本研究では、genistein がどのようなメカニズムで RDP を分化・石灰化へと誘導しているのか検討することとした。

【材料および方法】12 週齢 wistar 系雄性ラットの両側下顎中切歯から歯髄組織を採取し、細菌性コラゲナーゼにて段階的に酵素消化することにより RDP を得た。RDP は  $4 \times 10^5$  cell/dish の濃度で 60mm dish に播種し 10% FBS を含む DMEM で 37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下にて 24 時間培養後、以下の実験に供した。1. RDP に genistein を 0.01、0.1、1、10、100 $\mu$ M (以下 G0.01、G0.1、G1、G10、G100) 添加し 48 時間培養後、細胞を剥離回収した。サンプルを遠心分離操作後、得られた上清から Tyrosine Kinase (以下 TK) 活性および p38 活性を ELISA 法により測定した。2. 各種濃度の genistein 添加培地で 24 時間培養後、10ng/ml PDGF 含有培地に交換し 10 分間培養した。その後細胞を回収し Akt 活性を ELISA 法で測定した。3. 各種濃度の genistein を添加し 10 日および 17 日間培養後、各サンプルの total RNA を抽出し、Runx2、ALPase、ER $\alpha$  および  $\beta$  の mRNA 発現量を Real time PCR 法により定量した。

【結果】genistein 添加による TK 活性は、低濃度 (G0.01~G10) において control に対し 90~65%まで濃度依存的に抑制していたが、高濃度 (G100) では約 10%まで抑制していた。また、p38 活性は G1 をピークとして全ての genistein 添加群で上昇していた。Akt 活性は G1~G10 で濃度依存的に抑制されていた。G0.1~G10 群における Runx2、ALPase、ER $\beta$  の mRNA 発現量は、control と比較して 2 倍以上増加しており、特に G1 では 5~6 倍まで増加していた。一方、ER $\alpha$  の mRNA 発現量はすべての添加群で大きな変化はみられなかった。

【考察】genistein は、細胞の成長と増殖のシグナル伝達に関わる TK の阻害剤として広く知られており、TK に含まれる分子のひとつである Akt を阻害することにより細胞増殖を抑制していると考えられる。本研究の結果より、低濃度 (G0.01~G10) では、Akt の阻害効果が弱く、細胞を分化に向かわせるが、高濃度 (G100) では細胞増殖を完全に阻害すると考察される。また、genistein のエストロゲン様作用は ER $\alpha$  よりも ER $\beta$  に高い親和性を有しており、RDP においては G1 をピークとして ER $\beta$  の mRNA 発現量を上昇させたと考えられる。さらに、ER $\beta$  は下流の p38 の活性上昇に関与し、p38 は、骨芽細胞の分化を制御する Runx2 および分化マーカーである ALPase の発現に関与していると報告されている。このことから、ER $\beta$  の mRNA 発現量の増加は p38 の活性を上昇させ、p38 は Runx2 および ALPase の mRNA 発現量を増強させることにより、RDP を石灰化へ誘導すると推察される。

【結論】低濃度 (G0.01~G10) の genistein 添加は、Akt の活性を弱く抑制することにより RDP の増殖を僅かに抑え、分化する方向に向かわせると同時に、ER $\beta$  の mRNA 発現量を増強させ p38 の活性を亢進し、Runx2 および ALPase の mRNA 発現量を増加させることにより RDP を分化・石灰化へと誘導する可能性が示唆された。

## Negative Pressure 法における根管洗浄液の流れの数値流体力学的解析 : 吸引針のデザインによる影響

東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野  
○古畑和人、和達礼子、小林千尋、須田英明

### CFD Study of Irrigant Solution Using Negative Pressure Method : Effects of Needle Design

Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
Tokyo Medical and Dental University  
○FURUHATA Kazuto, WADACHI Reiko, KOBAYASHI Chihiro, SUDA Hideaki

#### 【緒言】

根管治療を成功に導くうえで、根管洗浄は重要なステップの一つである。根管洗浄を効果的に行うためには根尖付近まで洗浄液を供給することが求められる。一方、根管洗浄で用いられる次亜塩素酸ナトリウム溶液は、根尖孔や根管口からの漏洩により重篤な副作用を生じる場合がある。このジレンマを解消するために、我々は根管内吸引洗浄法 (Intracanal Aspiration Technique: IAT) を開発し、その安全性を評価してきた。IAT や EndoVac System などに見られる、吸引針を根尖付近に設置して根管を陰圧にすることで根管洗浄液を根尖付近へ誘導する Negative Pressure 法 (以下 NP 法) は、その安全性と効率性から近年注目されている。

#### 【目的】

NP 法における根管洗浄で、各種デザインの吸引針を用いたときの根管洗浄液の挙動を比較・調査した研究は見当たらない。本研究の目的は、IAT のために開発された iNP-40 ニードル (みくに工業, 長野, 以下 iNP40)、EndoVac System (SybronEndo, USA) のマイクロカニューレ (以下 EVM)、並びにこれらと同等の外径を持つ 29G の洗浄針 (ISO 規格, 以下 29G) を用いた NP 法における根管洗浄液の挙動を、数値流体力学 (CFD: Computational Fluid Dynamics) 的に解析することである。

#### 【材料および方法】

吸引針モデルとして iNP40、EVM、29G を、根管モデルとして根管長 15mm、根尖孔径 0.4mm、根管のテーパ 0.06 の三次元モデルをそれぞれ作成した。吸引針は、根管中央を通り、針先端が根尖孔から 3mm 離れた位置に設置した。3種類の吸引針に対して作成した各モデルに対し、CFD における計算領域のメッシュを作成した。吸引圧は 15kPa とし、洗浄液には 25°C の水を想定した。計算は、非圧縮定常乱流ソルバを用い、十分に解が収束するまで繰り返し行った。洗浄液量は、単位時間あたりに吸引針から流出した洗浄液量を測定した。また、計算終了後、定常状態における流速分布と流線を可視化した。

#### 【結果】

洗浄液量は、iNP40、EVM、29G において、それぞれ 0.12、0.023、0.0067 ml/s となった。洗浄液の動きは、iNP40 および 29G では吸引針先端から約 0.5mm 根尖側まで、EVM では吸引針先端から約 0.5mm 歯冠側までの範囲で観察された。

#### 【考察】

3種の吸引針は外径が近いので、洗浄液量に影響を及ぼしているのは主に吸引針内部のデザインである。洗浄液量が iNP40 で最大となったのは、先端部が他の針と比較して肉薄で内径が大きいため、根管洗浄液の粘性の影響が最小となったためと考えられる。さらに、iNP40 が二段の拡大管であることも、内径が一定の他 2種の吸引針と比較し、洗浄液量が増加した要因と考えられる。一方、EVM は先端部側面の 12 個の開口部径が 0.1mm と小さいため、粘性の影響を受けやすく、流量が減少したと思われる。29G は、3種の中で最も肉厚で、内径が小さいため粘性の影響を強く受けたと思われる。

可視化した洗浄液の速度分布から、吸引針開口部のデザインが洗浄範囲に影響することが明らかになった。EVM の場合、根尖付近まで洗浄液を供給するためには、根尖まで、あるいは根尖孔をわずかに越えた位置まで針先を挿入する必要があると思われる。針先の設置位置が同じ条件では、iNP40 と 29G は EVM よりも 1mm 程度洗浄液が根尖側に到達しやすいと考えられる。

#### 【結論】

本研究で用いた CFD は、根管洗浄液の挙動の解析に有用と考えられた。NP 法では、吸引針のデザインにより流量および流体の挙動が異なることが示された。

根尖部骨欠損の歯科用コーンビームCTを用いた3次元的形態評価  
東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野

○小松 恵, 吉岡俊彦, 石村 瞳, 海老原 新, 須田英明

**The morphological evaluation of periapical lesions using Cone-beam CT in three dimensions**

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

[緒言]

垂直性歯根破折 (VRF) と根尖性歯周炎 (per) は、臨床症状および根尖部X線透過像の形態が類似することがあるため、鑑別が困難な場合が少なくない。我々のこれまでの研究では、デンタル X 線写真上の透過像あるいは歯科用コーンビームCT (以下 CBCT) での近遠心・頬舌断面画像の骨欠損の形態について数値化・評価を行い、VRF の診断に用いてきた。このような2次元の評価に対し、本研究ではVRFとperの骨欠損の形態を近遠心・頬舌・水平の3方向から描出することによって3次元構築し、VRFとperの骨欠損の形態を比較・検討した。

[材料および方法]

東京医科歯科大学歯学部附属病院むし歯外来を受診し、同外来にてCBCT (FineCube®, 吉田製作所) 撮像を行った患者を調査対象とした。被験歯は上下前歯小白歯のうち、CT画像にて確認の上、根尖孔が1つのものとした。根尖周囲外科手術を行い、歯科用顕微鏡にて破折線の有無を確認し、破折線が確認された場合には、VRFと診断し、破折線が認められなかった場合には、perと診断した。VRFは12症例、perは15症例で、全27症例であった。術前のCBCT画像は近遠心・頬舌・水平断面画像の3方向から評価した。すなわち、3次元解析ソフト (Amira5.3, Visage Imaging, オーストリア) を用いて、それぞれの方向で最小スライス厚 (110 μm) の2次元断面像から骨欠損を描出した。

○水平断面像における描出: 各症例において、上記ソフト Magic Wand ツールを用い、一定の範囲内で画素値を設定して、骨欠損部の描出を行った。このとき、歯根や歯根膜腔の拡大は含めなかった。

○近遠心および頬舌断面像における修正: 水平断面像で得られた像をもとに、近遠心および頬舌断面像において、骨欠損部を逸脱して描出している部分を修正した。

評価1: 上記の方法で描出した骨欠損部の3次元構築モデル (以下 TDM) を作成し、解析を行った。TDMの重心 (x1, y1, z1) と根尖孔の位置 (x2, y2, z2) を3次元座標で求め、両者間の距離を算出して、Lとし、TDMの体積をVとした。VRFおよびperにおけるLとVの相関関係について、単回帰分析およびスピアマン試験を用い、有意水準5%にて統計学的解析を行った。

評価2: 各症例において、TDMの異方性、伸長度、扁平度を算出した。異方性は球体からの領域偏差を計測しており、球体に近いほど値が0に近づき、伸長度および扁平度はそれぞれ細長い形状、扁平な形状に近づくほど値が0に近づくという特徴をもつ。各指標ごとにVRF群、per群の平均値を求め、t検定を用いて有意水準5%で統計学的解析を行った。

[結果]

評価1: VRFにおいてはLとVに関して相関関係を認めなかったが、perにおいて統計学的に有意な正の相関関係を認めた。

評価2: 3指標 (異方性、伸長度、扁平度) において、VRF症例およびper症例間で統計学的有意差を認めた。

[考察および結論]

LとVとの関係は、TDMの形態が球形に近いほど相関関係を示す。VRFとperはその病変の成り立ちが異なることから、LとVの相関関係に相違があると考えられる。つまり、VRFの場合、一般に破折線に沿って病変が進展するため、歯根側方を含む複雑な形態を呈する。そのため、LとVの相関関係は認められなかったと推察された。一方、perの場合、根尖を中心に病変が進展することから、LとVに正の相関が認められたものと推察された。また、3次元骨欠損形態の指標に差が認められたことから、異方性、伸長度、扁平度の3指標がVRFおよびperの鑑別に有用である可能性が示唆された。

## 実験的ラット歯髄炎における炎症性細胞浸潤に対する MMP-3 の影響

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野  
<sup>2</sup>グローバル COE プログラム 歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点  
<sup>3</sup>国際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  
○瀧本晃陽<sup>1,2</sup>、川島伸之<sup>1</sup>、鈴木規元<sup>1</sup>、小泉 悠<sup>1</sup>、山本弥生子<sup>1</sup>、中島美砂子<sup>3</sup>、須田英明<sup>1,2</sup>

### Effects of MMP-3 on Infiltration of Inflammatory Cells in Experimentally-induced Rat Pulpitis

<sup>1</sup> Pulp Biology and Endodontics, Department of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup> Global Center of Excellence (GCOE) Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases

<sup>3</sup> Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology, Research Institute

○TAKIMOTO Koyo<sup>1,2</sup>, KAWASHIMA Nobuyuki<sup>1</sup>, SUZUKI Noriyuki<sup>1</sup>, KOIZUMI Yu<sup>1</sup>, YAMAMOTO Mioko<sup>1</sup>, NAKASHIMA Misako<sup>3</sup>, and SUDA Hideaki<sup>1, 2</sup>

#### 【研究目的】

matrix metalloproteinase (MMP)-3 は、細胞外マトリックスを分解するタンパク分解酵素の一つである。MMP-3 は、歯髄幹細胞において高く発現しており、血管新生作用や創傷治癒に深く関与していると考えられている。炎症歯髄にもその発現は認められているが、MMP-3 の抗炎症作用について検討した報告は少ない。これまで我々は、MMP-3 添加で LPS 刺激によるマクロファージからの一酸化窒素産生が抑制され (第 131 回日本歯科保存学会秋季学術大会)、炎症性メディエーター発現が抑制されることを報告した (日本歯科保存学雑誌第 55 巻第 3 号)。本研究では、歯髄炎における MMP-3 の抗炎症効果についてさらに検討する目的で、マクロファージの株化細胞および実験的ラット歯髄炎モデルを用いて、LPS 添加によって惹起されるケモカインの発現および炎症性細胞の浸潤が MMP-3 を添加することによりどのように変動するかについて、分子生物学的・免疫組織学的解析を行った。

#### 【材料および方法】

ケモカイン mRNA 発現の検討: マウスのマクロファージ由来の RAW264 細胞を 24 穴プレートに  $1 \times 10^6$  cells / well の密度で播種し、24 時間前培養後、LPS(100ng/ml)単独、または LPS および MMP-3(100ng/ml)を添加し、20 時間培養した。無添加サンプルをコントロールとした。その後、RAW264 から total RNA を抽出後、cDNA を合成した。得られた cDNA を用いて、特異的プライマーを使用し real-time PCR を行い、ケモカイン mRNA 発現を比較した。

ラット実験的歯髄炎モデル: Wistar ラット 6 週齢の雄に対し、全身麻酔下にて上顎左右切歯を露髄させ、LPS(10 $\mu$ g/ml) 0.5 $\mu$ l を滅菌したペーパーポイントにより断髄面に貼付した。一方、MMP-3 貼付群として、LPS と同時に MMP-3(100 $\mu$ g/ml) 0.5 $\mu$ l を適用した。LPS 単独あるいは LPS+MMP-3 貼付後、水硬性仮封材にて仮封し、9 時間後、切歯を摘出した。

免疫組織化学染色: 摘出した切歯は 4%パラホルムアルデヒドにて 1 晩浸漬して固定し、15%EDTA 溶液中にて 4 週間脱灰し、凍結切片を作製した。一次抗体にマウス抗ラット MHC class II 抗体 (OX6) を用い、一晚作用後、二次抗体にはビオチン標識抗マウス IgG 抗体を用いた。切片はメチルグリーンで核染色を行い、脱水、透徹、封入した。

#### 【成績】

RAW264 に LPS を添加すると、代表的なケモカインの一つである MCP1 の mRNA 発現が有意に増加したが、LPS と同時に MMP-3 を添加するとその増加は有意に抑制された。

ラット切歯を断髄後、断髄面に LPS を貼付したところ、コントロール群と比較して MHC Class II 陽性の炎症性細胞の浸潤が認められた。LPS と同時に MMP-3 をラット歯髄に貼付すると、LPS 単独貼付群と比較して MHC Class II 陽性細胞の浸潤が抑制された。

#### 【考察】

MMP-3 は、炎症性細胞の遊走・浸潤を抑制する作用を有しているものと推察され、歯髄炎の治療薬として応用できる可能性を示唆している。

#### 【結論】

MMP-3 は、LPS 刺激により誘発される RAW264 からの MCP1 mRNA 発現を抑制し、LPS 刺激で惹起させたラット歯髄炎モデルにおいて、炎症性細胞の浸潤を抑制した。