

S-PRG coating 材による人工齲蝕乳歯エナメル質白斑部の再石灰化効果

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科小児歯科学¹,
日本大学歯学部保存修復学講座²
○ 細矢由美子¹, 安藤 進², 遠藤 肇², 宮崎眞至²

Remineralization efficacy of PRG coating material on white spot lesion for artificial caries of primary tooth enamel

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Medical and Dental Sciences, Department of Pediatric Dentistry¹, Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry²
○ Yumiko Hosoya¹, Susumu Ando², Hajime Endo², Masashi Miyazaki²

【研究目的】

イオン徐放性 S-PRG フィラー含有歯面 coating 材 (SI-R21104:松風社)を人工脱灰により形成した乳歯エナメル質白斑部に塗布し、塗布面の組織/物性変化を測定し、本材の再石灰化効果を観察した。

【材料および方法】

抜歯後に生理食塩水中に冷凍保存した健全乳臼歯 (長崎大学歯学部倫理委員会認証) 10 歯を使用した。頬面を非切削エナメル質部とし、中央より左側を PRG coating 材塗布部 (unground/ PRG 部), 右側を塗布無し部 (unground/ non-PRG 部) とした。舌面中央部に、狭い幅の非切削エナメル質部を設け、本部位をコントロール部とした。コントロール部以外の舌面を一層切削し、左側を PRG coating 材塗布部 (ground/ PRG 部), 右側を塗布無し部 (ground/ non-PRG 部) とした。コントロール部と隣接面をマニキュアで coating 後, 10% EDTA 中で 7 時間と塩化カリウムと燐酸二水素カリウムを含む pH 4.75 の乳酸緩衝液中で 3 日間脱灰した。仕様書に従って SI-R21104 を歯面に 15 秒間すり込むように塗布し (PRG 部), 1 分間放置後に余剰部を拭き取った。浸漬液の種類により 3 群を設け (1 群: 人工唾液, 2 群: 脱灰液, 3 群: 蒸留水), 1 週間浸漬後に歯軸に垂直に切片を切り出して鏡面研磨した。

<DIAGNOdent (Kavo 社)による測定>: ground/ non-PRG 部と unground/ non-PRG 部に対し, 処置前, 脱灰後と浸漬終了後の DIAGNOdent 値を測定した。

<Nano-indentation test>: Nano-indentation tester ENT-1100 (エリオニクス)により, 超微小硬さ (H) とヤング率 (Y) を測定した。測定は 10 μm 間隔にエナメル質表面 (計測点 1) から歯髄方向に行った。

<SEM/EDX 分析>: PRG 塗布もしくは非塗布エナメル質表面 (計測点 0), 表面直下 (計測点 1), 表面から 5 μm (計測点 2) 間隔に 25 μm 下方 (計測点 6) までの部位に対し, SEM/EDX 分析と SEM 撮影を行った。

統計処理には ANOVA Fisher's PLSD ($\alpha=0.05$)を用いた。

【成績ならびに考察】

<DIAGNOdent 値>: すべての Group で処置前と比較し, 脱灰後と浸漬後の値は有意に高かった。Group 1 の unground/non-PRG 部のみにおいて, 浸漬後が脱灰後より有意に低く, 人工唾液による再石灰化の可能性が観察された。

<Nano-indentation test>: Group 1 では, ground/ PRG 部の計測点 1 の H は下方の計測点より有意に高かったが, 計測点 2-5 の硬さが他の処理部位より有意に低かった為に相対的に有意差が生じたと思われる。Group 3 では, ground/ PRG 部のみについて, 計測点 1 の H と Y が下方の計測点より有意に高かった。Group 2 では, unground/ PRG 部と ground/ PRG 部の計測点 1 の H と Y は下方の計測点より有意に低く, PRG 塗布にも関わらず脱灰の進行が疑われた。

<SEM/EDX 分析>: すべての Group で, unground/ non-PRG 部の計測点 0 の Ca/P は下方より有意に低く, 脱灰の影響が強かった。Group 3 では, ground enamel については, PRG 塗布の有無に関わらず計測点間に有意差が見られなかった。一方, unground enamel については, PRG 塗布無しの場合には, 計測点 0 と 1 の Ca/P は下方より有意に低く, 塗布有りの場合には計測点 0 の Ca/P は下方より有意に高かった。

脱灰液浸漬群では脱灰液により coating 材が溶解し, 塗布無し部に作用した可能性があり, 人工唾液群では人工唾液による再石灰化作用は coating 材が塗布されていない部位で効率よく発揮される事が推察された。水中ではこれらの作用がほとんど生じない為, unground enamel では coating 材による効果が positive に生じたと思われる。

【結論】

PRG coating 材が乳歯エナメル質白斑部に対して再石灰化効果を有する可能性が観察された。

【文献】

1) R. Murayama *et al.*, *Dent Mater J.* 31:954-959, 2012.

PRG バリアコートの根面象牙質再石灰化効果

第3報：塗布直下および隣接部位における獲得耐酸性

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

○椎谷 亨¹⁾、向井義晴¹⁾、富山 潔¹⁾、飯塚純子¹⁾、長谷川晴彦¹⁾、倉持江里香¹⁾、藤野富久江²⁾、寺中敏夫¹⁾

Effect of PRG barrier coat on root dentin remineralization *in vitro*

3rd report: Acquired acid resistance of dentin at adjacent and underneath areas

Dept. of Oral Medicine, Div. of Restorative Dentistry, Kanagawa Dental College¹⁾,

Dept. of Dental Hygiene, Shonan College²⁾

○SHIYA Toru¹⁾、MUKAI Yoshiharu¹⁾、TOMIYAMA Kiyoshi¹⁾、IIZUKA Junko¹⁾、HASEGAWA Haruhiko¹⁾、
KURAMOCHI Erika¹⁾、FUJINO Fukue²⁾、TERANAKA Toshio¹⁾

【研究目的】高齢者の残存歯増加に伴い、露出歯根面の齧蝕が臨床的に大きな問題となっている。我々は前回第 137 回日本歯科保存学会学術大会において、PRG バリアコート塗布が、その隣接歯面再石灰化部位に優れた耐酸性を誘導することを報告した。今回、塗布直下および隣接歯面各 2 か所における獲得耐酸性を比較することにより、本材の有効性を検討した。

【材料および方法】ウシ下顎中切歯の歯根部を歯頸部直下およびそれより 5mm 根尖側の位置で低速切断機を用いて水平断し、円筒状象牙質歯片を作製後、ワイヤー式精密切断機にて歯軸方向に 2 分割した。

1. 脱灰象牙質試料 (基準病巣) の作製: 耐酸性バーニッシュにより被験面を 2x3 mm に規定し、脱灰液 (1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 50 mM acetic acid, 0.2 ppm F, pH 5.0) に 37°C で 36 時間浸漬した。

2. 材料の塗布: 被験面 (2x3 mm) の半側 (1x3 mm) に対し、以下の 1) ~3) の材料塗布を行った。1) V 群: S-PRG フィラー非含有コート材 (S-PRG フィラーを含まない以外はバリアコートと全く同じ成分のコーティング材; 松風)。2) P 群: PRG バリアコート (S-PRG フィラー含有フッ化物徐放性予防的歯面コーティング材; 松風)。3) X 群: レジン添加型ガラスアイオノマーセメント系のクリンプロ™XT バーニッシュ (3M ESPE)。なお、塗布および再石灰化液浸漬を行わない群を基準病巣群 (B 群) とした。各群の試料数は n=6 とした。

3. 再石灰化: B 群以外の 3 群は、プラスチック製容器の底部に試料を固定後、8% Methocel MC gel (Fluka)、およびその上に再石灰化溶液 (1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 130 mM KCl, 20 mM Hepes, pH 6.7) を注入する二層法で 37°C、4 週間静置した。

4. 耐酸性試験 (acid resistance test; 以下 ART): 50 mM acetic acid 脱灰液 (0 ppm F、pH 5.0) に 3 日間浸漬した。

5. 平均ミネラル喪失量 (IML; vol% x μm) 測定: ART 後の試料から薄切片を作製し、TMR 撮影 (PW 3830、管電圧 25 kV、管電流 15 mA、照射時間 20 分) 後、分析用ソフト (TMR 2000) を用いて、B 群は被験面中央部、また V、P および X 群では、① 塗布面に隣接した露出象牙質面、② 塗布面端部材料直下象牙質面、③ 塗布面端部から 700 μm 離れた露出象牙質面、④ 塗布材料内側直下象牙質面 (端部より 700 μm 内側) の、それぞれ幅 300 μm におけるミネラルプロファイルを作成し、IML を算定した。各群間における IML の比較には、One-way ANOVA および Games-Howell の検定 (有意水準 5%) の統計分析を用いた。

【成績】B 群では、表層および病巣体部を有する典型的な脱灰病巣が形成された。塗布面に隣接した露出象牙質面では、P 群、X 群が V 群より有意に低かった (p<0.05)。塗布面端部材料直下では、V、P、X 各群でそれぞれ 4668.8, 3923.0, 3920.4 であったが、3 群間で有意差は認められなかった (p>0.05)。また、塗布面端部から 700 μm 離れた露出象牙質面では、V 群に比較して X 群は有意に低かったが (p<0.05)、P 群は有意差を示さなかった (p>0.05)。端部より 700 μm の材料内側では、3 群とも近似したミネラルプロファイルを示したが、表層から 25~60 μm の病巣体部における P 群のミネラルプロファイルは、有意差は認められないものの、3 群の中で最も高い mineral volume% を示した。

【考察】材料に隣接した露出象牙質面は、材料から遊離されるフッ化物イオン等を取り込みやすいが、材料内側直下ではこれらイオンの供給が十分にあったとしても液層からのカルシウムイオンやリンイオンの供給が阻害されるため、材料固有の特性は表れにくいものと考えられた。

【結論】*in vitro* において PRG バリアコートを象牙質表層下脱灰病巣に塗布した後、再石灰化、ART を行い、塗布直下および隣接歯面各 2 か所の脱灰様相を観察したところ、塗布面に隣接した露出象牙質面において最も耐酸性が獲得されており、それはレジン添加型ガラスアイオノマーセメントに匹敵する耐酸性であった。

歯面コート材による象牙質脱灰抑制効果のマイクロ CT 解析

¹東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 歯蝕制御学分野, ²東京医科歯科大学 歯と骨の GCOE
○ローダ イナ^{1,2}, 半場秀典¹, 中嶋省志¹, 二階堂徹¹, 田上順次^{1,2}

Effect of tooth coating materials on inhibition of bovine dentin demineralization -Micro computed tomography assessment-

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

²Global Center of Excellence, Tokyo Medical and Dental University

○LODHA Ena^{1,2}, HAMBА Hidenori¹, NAKASHIMA Syozi¹, NIKAIIDO Toru¹, TAGAMI Junji^{1,2}

Background and Purpose. Exposed dentinal surface as a result of caries or non caries lesions are subjected to continuous demineralization and remineralization process. However, if demineralization dominates, it may lead to progression of caries lesions into the pulp. As the “Minimal intervention” concept becomes widely spread various products with tooth surface protection, anti-cariogenic or remineralizing effects attract an increasing attention. Recently, tooth surface coating materials with different ingredients were developed and marketed as a desensitizing agent. The purpose of this study was to evaluate the effect of two tooth coating materials on inhibition of dentin demineralization over time by using micro-computed tomography (micro-CT).

Materials and Methods. The dentin specimens were prepared by cutting bovine root into blocks (3 mm x 5 mm x 3 mm). The surface was covered with nail varnish, leaving a window (2 mm x 4 mm) exposed on the polished surface. The specimens were distributed into the following four application groups; de-ionized water (NC, negative control); Teethmate Desensitizer (TMD, Kuraray Noritake Dental, tetracalcium phosphate and dicalcium phosphate anhydrous); Nanoseal (NS, Nishika, fluoroaluminocalciumsilicate glass-containing material); and Duraphat (DP, Colgate, fluoride varnish) as a positive control. After the treatment, the specimens were immersed in a de-mineralizing solution (pH5.0). Micro-CT (Inspexio SMX-100CT, Shimadzu) scans (1024 x 1024, 5 μm/pixel) of all specimens were taken before/after demineralization. Gray scale values were converted into mineral density values (gHAp·cm⁻³) using hydroxyapatite phantoms. Mineral density changes were analyzed by 3D analysis software. Mean mineral loss (ML) were determined using micro-CT. ML values were statistically analyzed by ANOVA.

Results and Discussion. Micro-CT assessment enabled nondestructive analysis of local changes in mineral density of demineralization. ML values in all the treatment groups (TMD, NS and DP) were smaller than those in the NC group after demineralization. However, DP (the positive control group) demonstrated significantly more effective to inhibit the demineralization.

Conclusion. The application of Teethmate Desensitizer and Nanoseal to the exposed dentin surfaces resulted in inhibition of dentin demineralization. Quantitative assessment using micro-CT demonstrated to be useful for detecting mineral density changes.

ヒト象牙芽細胞機能複合体の刺激象牙質形成への貢献

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
歯髓生物学分野¹、う蝕制御学分野²、グローバルCOEプログラム国際教育研究拠点³
○池田英治¹、半場秀典²、田上順次^{2,3}、須田英明^{1,3}

Contribution of Human Odontoblasts as an Electrical Syncytium to Tertiary Dentin Formation
Pulp Biology and Endodontics¹, Cariology and Operative Dentistry², Global COE program³, Graduate
School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
○IKEDA Hideharu¹, HAMBА Hidenori², TAGAMI Junji^{2,3}, SUDA Hideaki^{1,3}

【研究目的】

象牙芽細胞が歯髓最表層に整列し、単極性の長い突起を象牙細管内に伸ばしていることは刺激感受に有効である。我々はこれまでヒト象牙芽細胞が個々に機能するというよりも、electrical-、dye-couplingを介して機能複合体として協調して働くことを証明してきた。さらに象牙芽細胞が感覚神経終末を変形させるとされている象牙細管内の動水力学的水圧に対して、体積や形状を変化させ、細胞膜イオンチャンネルの開閉と細胞内、細胞間シグナル伝達を引き起こすことを本学会で発表してきた。この研究では、ヒト象牙芽細胞の三次元的細胞間結合網を明らかにするとともに、刺激象牙質形成をmicro-CTを用いて観察、解析することを目的とした。

【材料および方法】

実験1. 矯正治療の一環として抜去された新鮮ヒト小白歯を用いた。試料としてはそれらの歯冠部を使用し、厚さ50-150 μm、水平方向に対して30°に傾いた象牙質-歯髓ディスクを作製した。実験にはDual patch-clamp法を用い、象牙芽細胞間の電気カップリングを確認した。さらに、一つの細胞に加えた電流刺激の広がり解析するとともに、電気泳動法を用いて注入したlucifer yellowの広がりを観察した。

実験2. くさび状欠損のあるヒト抜去歯を用い、Micro-CTにて歯髓側に添加した刺激象牙質を三次元的に観察、解析した。

【成績】

実験1. 電氣的結合率は細胞間距離が増加するほど減少した。また、電流刺激に対する電圧変化の減衰と潜時の延長が距離依存的に徐々に生じ、波形の複雑化がみられた。Lucifer yellowは水平、垂直両方向に広がる事が確認できた。

実験2. Micro-CT像では、添加象牙質は歯髓側象牙細管開口部のみでなく、三次元的に漸次厚みを減衰させる広がりをみせた。

【考察】

本研究により、ヒト象牙芽細胞層には象牙質を介した刺激に対して、被刺激部位直下だけではなく、三次元的に広がるネットワークで応答することが示された。我々の以前の研究で得られた、機械的歪みを生じた象牙芽細胞内、隣在し合う象牙芽細胞間においてCa²⁺伝播が盛んに行われるという結果と結び合わせると、象牙芽細胞突起で検知された情報は周囲象牙芽細胞にも伝播されることで三次元的に広く共有され、広範囲の刺激象牙質形成に繋がる事が電気生理学および形態学的に示唆された。

【結論】

細胞間連絡を有する象牙芽細胞は、広い電氣的機能複合体を形成し、象牙質/歯髓複合体の防御機構に重要な働きをしていると考えられる。

ラット臼歯歯髄における樹状細胞のサブポピュレーション

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¹ 歯蝕制御学分野² 歯髄生物学分野
○荒牧音¹、川島伸之²、島田康史¹、鈴木規元²、大槻昌幸¹、須田英明²、田上順次¹

Identification of several subpopulations of DCs in rodent dental pulp

¹Cariology and Operative Dentistry, ²Pulp Biology and Endodontics, Department of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
○Oto ARAMAKI¹, Nobuyuki KAWASHIMA², Yasushi SHIMADA¹, Noriyuki SUZUKI², Masayuki OTSUKI¹, Hideaki SUDA² and Junji TAGAMI¹

【研究目的】自然免疫応答における中心的役割を担っている樹状細胞 (DC) は、病原微生物に共通して存在する特有の分子構造 (PAMPs, pathogen-associated molecular patterns) を認識する受容体: パターン認識受容体 (PRR, pattern recognition receptor) を有し、自然免疫応答における中心的役割を担っている。DC の成熟には PRR からのシグナルが重要であり、成熟した DC は T 細胞を活性化し獲得免疫を誘導する。免疫応答の質と量は、DC の産生するサイトカインや共刺激分子の種類や量に依存するが、それは DC のサブセットおよび存在する局所環境に大きく左右される。これまでに、皮膚・腸管粘膜・鼻腔粘膜などにおいて数種の DC サブセットが報告され、各サブセットはそれぞれ異なる機能があることが報告されている。我々は、頬粘膜にも数種の DC サブセットが存在し、所属リンパ節に遊走していることを報告した (Biochem Biophys Res Commun. 2011)。しかし、歯髄における DC の各サブセットについては、未だ解明されていない。そこで今回我々は、ラット臼歯歯髄における DC の局在及びそのサブクラスの同定を免疫組織化学的に試みたので報告する。

【材料および方法】Wistar 雄ラットの下顎第一臼歯を実験材料に用いた (n=5)。第一臼歯を含む左右下顎を切除し、4%パラフォルムアルデヒドにて固定 (4°C, over night) 後、15%EDTA 溶液にて脱灰を行い (4°C, 3 wks)、OCT コンパウンドにて包埋後、クライオスタットにて厚さ 5-6µm の凍結切片を作成した。一次抗体として抗 CD11c, 抗 CD68, 抗 CD86, 抗 CD103, 抗 MHC ClassII 抗体 (Serotec) を用い、ビオチン標識抗マウス IgG (Vector) を二次抗体として使用し、さらに Avidin Biotin Complex (ABC: VECTASTAIN Elite ABC Kit, R.T.U.) を作用させ、最後に DAB (3, 3'-diaminobenzidine, ImmPACT DAB Peroxidase Substrate) にて発色した。核染色にはヘマトキシリンあるいはメチルグリーンを使用した。

【結果】MHC ClassII 陽性細胞はラット臼歯歯髄の象牙芽細胞層に多く集積していたが、歯髄中心部にも散在していた。CD11c 陽性細胞は象牙芽細胞層にも存在していたが、歯髄中心部の血管周囲にも存在を認めた。CD103 陽性細胞は歯髄中心部の血管周囲に主に陽性像を認めた。CD86 陽性細胞は象牙芽細胞層に主に集積を認めた。CD68 陽性細胞は歯髄全体にその存在が認められた。

【考察】今回我々の得られた免疫染色像の結果より、ラット臼歯歯髄における DC は、最表層の象牙芽細胞層に存在する MHC ClassII+, CD11c+, CD103- の DC と、その下の血管周囲に存在する MHC ClassII+, CD11c+, CD103+ の DC が存在する可能性が示唆された。ラット臼歯歯髄における DC には、少なくとも二つのサブセットが存在し、それぞれの局在が異なっていた。この二つの DC は歯髄内における機能的相違についてはいまだ不明であるが、歯髄における象牙細管経路の外来侵襲に対する生体防御に関与している可能性が推察された。すなわち皮膚、粘膜と同様の免疫防御システムがラット臼歯歯髄においても常備されている可能性が示唆された。

【結論】ラット臼歯歯髄において局在の異なる 2 種の DC サブポピュレーションを同定した。

SOCS3 は Wnt シグナル伝達経路を阻害することにより骨芽細胞への分化を抑制する

¹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)
○松下健太¹、伊藤祥作¹、池田峻¹、山本由美子¹、山内裕香子¹、林 美加子¹

SOCS3 induced by LIF suppresses osteoblast differentiation through inhibiting β -catenin

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology,
Osaka University Graduate School of Dentistry
○MATSUSHITA Kenta¹, ITOH Shousaku¹, IKEDA Shun¹, YAMAMOTO Yumiko¹,
YAMAUCHI Yukako¹, HAYASHI Mikako¹

【研究目的】

骨髄ストローマ細胞には、未分化間葉系幹細胞が含まれており分化誘導培地にて培養することにより様々な種類の細胞へ分化誘導することができる。この骨髄ストローマ細胞に含まれる未分化間葉系幹細胞は、骨芽細胞・線維芽細胞・象牙芽細胞などの歯・歯周組織に関連する細胞へ分化しうる細胞であると考えられている。我々は、これまでに IL-6 ファミリーサイトカインのうち Leukemia Inhibitory Factor (LIF) が骨髄ストローマ細胞の骨芽細胞への分化を抑制することを明らかにし (第 134 回本学術大会)、LIF-STAT3 シグナル伝達経路の下流で働く Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) が重要な役割をしていることを報告した (第 137 回本学術大会)。しかしながら、骨芽細胞の分化を制御しているシグナル伝達経路と SOCS3 の関係性については依然として不明であった。そこで今回、我々は、骨髄ストローマ細胞から骨芽細胞への分化に対する SOCS3 の働きについて、シグナル伝達経路の観点からその制御機構のメカニズムの一端を明らかにしたので報告する。

【材料と方法】

1. C57BL/6J マウスの大腿骨と頸骨から骨髄細胞を調整し、10%FBS 含有 α -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、この付着細胞を骨髄ストローマ細胞とした。10%FBS 含有 α -MEM と 50 μ g/ml ascorbic acid、10 mM β -Glycerophosphate、 10^{-8} M Dexamethasone にて骨芽細胞分化誘導培地を調整し、これに 50 ng/ml 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 7 日間培養した後、細胞を細胞溶解バッファー [20 mM Tris HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、1% NP40、500 μ M sodium vanadate、1 mM dithiothreitol、5 μ g/ml aprotinin、5 μ g/ml leupeptin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] にて溶解し、30 分間の遠心分離 (14,000rpm, 4°C) 後に、上清を回収し、これをタンパク抽出液とした。タンパク抽出液を 3 \times sodium dodecyl sulfate (SDS) サンプルバッファーにて希釈し、100°C で 5 分間加熱処理した。SDS-PAGE にてサンプルを展開し、ニトロセルロースメンブレンに転写した。ニトロセルロースメンブレンをブロックエースにてブロッキングした後、抗 β -catenin 抗体および抗 β -actin 抗体と反応させた。これに西洋わさび過酸化酵素 (HRP) 標識抗 IgG 抗体を反応させ、ECL キットを用いて発光シグナルを増幅した後、X 線フィルム に現像した。
2. 骨髄ストローマ細胞を LIF (50 ng/ml) で刺激後、上記と同様に細胞溶解バッファーにて回収したタンパクに対して、セファロースビーズに抗 β -catenin 抗体を吸着させたものを 4°C で 24 時間反応させて、免疫沈降し回収したタンパクを SDS-PAGE にて展開し、メンブレンに転写した。これに抗 SOCS3 抗体を反応させ、上記と同様に IgG 抗体を反応させて、ECL キットを用いてシグナルを現像した。

【結果】

1. LIF を含む培地で培養したものでは LIF を含まない培地で培養したもの比べると、 β -catenin タンパクは減少していた。
2. 免疫沈降にて β -catenin タンパクと SOCS3 タンパクは会合していることが明らかとなった。

【結論】

以上の結果から、LIF は、LIF-STAT3 シグナル伝達経路により SOCS3 の発現を誘導し、SOCS3 が β -catenin と会合して Wnt シグナル伝達経路を抑制的に制御することにより骨芽細胞への分化を抑制することが明らかとなった。

(本研究の一部は、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)

P. gingivalis LPS刺激によるTHP-1細胞からのThrombospondin 1発現

¹東京医科歯科大学大学院 歯医学総合研究科 歯周病学分野
○御給美沙¹、小林宏明¹、南原弘美¹、和泉雄一¹

THP-1 cells produce Thrombospondin 1 stimulated by *P.gingivalis* LPS

¹Department of Periodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

OMisa Gokyu¹, Hiroaki Kobayashi¹, Hiromi Nanbara¹, Yuichi Izumi¹

【背景および研究目的】

歯周病は歯周病原細菌による慢性炎症性疾患であり、歯周病における歯肉結合組織の炎症や骨の破壊には細菌に対する生体の炎症反応が深く関わっていると考えられている。歯周病原細菌の中で高頻度に観察される細菌として *P.gingivalis* があげられるが、生体におけるその反応には不明な点が多い。我々は、*P.gingivalis* LPSが単球系細胞THP-1に与える影響を調べるためDNAアレイにて解析を行った。その結果、発現に変動が見られた遺伝子の中でThrombospondin 1(TSP-1)に着目した。TSP-1は生体内において血管新生や炎症に関与する多機能細胞外マトリックスタンパク質であり、炎症部位における免疫応答の調節に関与している。しかしながら、歯周炎局所でのTSP-1発現に関しては報告がなく、歯周病原細菌*P.gingivalis*における反応も不明な点が多い。本研究の目的は、歯周炎局所におけるTSP-1の発現を調べることで、そして*P.gingivalis* LPSによるTHP-1細胞からのTSP-1発現に関して調べることである。

【材料および方法】

- ・THP-1細胞をInvivoGen社製*P.gingivalis* LPSにて刺激し、4時間後にmRNAを回収した。cDNAに逆転写後、3D-gene社製DNA micro arrayを用いて解析を行った。TSP-1 mRNAの発現解析はrealtime RT-PCR法にて行った。また、TLR2刺激因子としてPam2CSK4を、TLR4刺激因子として*E. coli* LPSを用いた。また、IFN- γ 、IL-4、IL-17A、IL-17Fにて共刺激を行い、TSP-1 mRNA発現を計測した。
- ・東京医科歯科大学歯学部附属病院歯周病外来の歯周炎患者から、歯周外科時に歯肉組織を採取し、歯肉組織でのTSP-1 mRNA発現を解析した。本研究は、東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て行った。

【結果】

- ・DNA micro arrayにより、発現変動が認められる遺伝子が多数確認された。
- ・THP-1細胞において*P.gingivalis* LPS刺激により、濃度依存的・時間依存的にTSP-1 mRNA発現が認められた。また、Pam2CSK4や*E. coli* LPSにて刺激した結果、どちらにおいてもTSP-1 mRNA発現の亢進が認められた。IFN- γ やIL-4刺激ではTSP-1 mRNA発現は亢進したが、IL-17A、IL-17Fでは変化は認められなかった。
- ・歯周炎局所においては、炎症歯肉においてTSP-1 mRNAの発現が認められた。その発現は健康な部位に対して炎症部位で発現亢進が認められた。

【考察および結論】

P.gingivalis LPSがTHP-1細胞からのTSP-1発現を誘導していることが明らかとなった。また、TSP-1の発現はTLR2を介するものとTLR4を介するものが考えられる。歯周炎環境下において、IL-4とIFN- γ の存在がTSP-1発現を亢進することが考えられる。そして歯周炎局所においてTSP-1の発現が認められたことから、歯周病原細菌刺激により誘導されたTSP-1が歯周炎の疾患進行および生体への影響に関与している可能性が示唆された。

***Porphyromonas gingivalis* 感染は NKT 細胞のサイトカイン産生を誘導する**

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔保健学分野¹,
新潟大学医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野², 新潟大学医歯学総合病院 歯科総合診療部³
○山田 ひとみ^{1,2}, 中島 貴子³, 宮沢 春菜^{1,2}, 奥井 隆文², 多部田 康一², 山崎 和久¹

Chronic stimulation with *Porphyromonas gingivalis* induced cytokine-producing NKT cells

Laboratory of Periodontology and Immunology, Division of Oral Science for Health Promotion¹, Division of Periodontology²,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital³
○Yamada H^{1,2}, Nakajima T³, Miyazawa H^{1,2}, Okui T², Tabeta K², Yamazaki K¹

【背景および目的】

Natural Killer T(NKT)細胞はNK細胞マーカーであるNK1.1とT細胞レセプターの両方を発現しているリンパ球で、活性化によりIFN- γ , IL-4, IL-10などのサイトカインを産生し、組織恒常性の維持や自己免疫疾患の発症抑制に関与している。感染免疫においては、抗原の種類、感染経路、感染回数によりNKT細胞のサイトカイン産生パターンが異なることが知られている。NKT細胞は、抗原提示細胞のCD1d拘束性に糖脂質分子を認識して活性化される。海綿由来糖脂質をもとに化学合成された α -galactosylceramide(α GC)がNKT細胞の特異的リガンドであるが、細菌を構成する糖脂質もNKT細胞に認識されることが報告されている。

我々はヒト歯周炎組織へNKT細胞が浸潤しており、その周囲にはCD1d陽性のB細胞が多数認められることを報告した(Amanuma R *et al.*, J. Periodont Res. 2006)。またマウスの*Porphyromonas gingivalis*慢性口腔感染モデルでは、NKT細胞欠損マウスで歯槽骨吸収が抑制される。一方 α GC投与によりNKT細胞を活性化したマウスでは歯槽骨吸収が促進された。この時の血清中の急性期タンパク血清アミロイドA(SAA)、破骨細胞活性化サイトカインRANKL、そして抗*P. gingivalis*抗体価レベルの上昇が認められ、*P. gingivalis*慢性感染においてNKT細胞は全身の炎症レベル亢進と抗体産生亢進に関与していることが示唆された(Aoki-Nonaka Y *et al.*, J. Periodont Res. 2013. In press)。

本研究では、*P. gingivalis*感染に対してNKT細胞がどのようなサイトカイン産生パターンを示し、免疫応答のバランス制御に寄与するのかを、マウスの*P. gingivalis*感染モデルを用いて明らかにする。

【材料及び方法】

6週齢のC57BL/6マウスに*P. gingivalis*W83株 1×10^8 CFUと α GCを単独あるいは組み合わせて腹腔より投与した。投与は1回または3日おきに3回行った。最終投与後にマウスを安楽死させて肝臓から単核球を分離し、フローサイトメトリーにてNKT細胞のIFN- γ 、IL-4産生を解析した。また、3回投与後の血清を採取し、ELISAにてIFN- γ 、IL-4レベルを測定した。

【結果と考察】

*P. gingivalis*1回感染ではNKT細胞はIFN- γ 、IL-4いずれも産生しなかったが、3回感染後にはIFN- γ ⁺NKT細胞、IL-4⁺NKT細胞が認められ、全NKT細胞中に占める割合はいずれも4%程度であった。 α GCとの重複投与群ではIL-4⁺NKT細胞の割合は*P. gingivalis*単独感染群に比較して1.5倍に増加したが、IFN- γ ⁺NKT細胞の割合に増加は認められなかった。血清中のIFN- γ レベルは*P. gingivalis*3回感染群で上昇するが、 α GC群では変化は認められなかった。一方、血清中のIL-4レベルは α GC群で上昇するが、*P. gingivalis*単独感染群では不変であった。このことから*P. gingivalis*慢性感染時にNKT細胞は特異的リガンド α GCで刺激されたときと同様にIFN- γ とIL-4を産生するが、血清のサイトカインレベルへ直接的には反映されないことが明らかになった。またNKT細胞が活性化される状況において、*P. gingivalis*感染がNKT細胞のIL-4産生を増強することが明らかになった。今回の実験系では*P. gingivalis*慢性感染群において血清レベルでIL-4は検出されなかった。しかし先に我々が報告しているようにNKT細胞欠損マウスでは、*P. gingivalis*慢性口腔感染時の血清抗*P. gingivalis*抗体価上昇がきわめてわずかである。このことを考え合わせると、抗体産生に必要なTh2型免疫応答への制御には感染局所や臓器に存在するNKT細胞が産生するIL-4が重要な役割を果たしている可能性が示唆される。

***Porphyromonas gingivalis* 口腔感染マウスモデルにおいて
小胞体ストレスは破骨細胞形成に関与し歯槽骨吸収を誘導する**
新潟大学大学院医学総合研究科 口腔保健学分野¹, 歯周診断・再建学分野²,
新潟大学医学総合病院 歯科総合診療部³, 日本学術振興会特別研究員⁴

○土門久哲^{2,4} 山田ひとみ^{1,2} 宮内小百合^{1,2} 宮沢春菜^{1,2} 中島貴子³ 多部田康一² 山崎和久¹

**Up-regulation of endoplasmic reticulum stress is associated with osteoclastogenesis in orally
Porphyromonas gingivalis-infected mice**

Laboratory of Periodontology and Immunology, Division of Oral Science for Health Promotion¹, Division of Periodontology²,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital³

Research Fellow of Japan Society for the Promotion of Science⁴

○Domon H^{2,4}, Yamada H^{1,2}, Miyauchi S^{1,2}, Miyazawa H^{1,2}, Nakajima T³, Tabeta K² and Yamazaki K¹

【研究目的】

小胞体は新規に合成された分泌タンパクおよび膜タンパクの修飾や立体構造を整える場であるが、異常な高次構造をもったタンパクが生成される場合がある。小胞体内にそれら異常なタンパクが蓄積した状況は小胞体ストレスと呼ばれる。それに対し細胞は翻訳の抑制、小胞体シャペロンの誘導、異常タンパクの分解等の小胞体ストレス応答により小胞体の機能を維持する。小胞体ストレスは神経変性疾患、糖尿病、虚血性脳疾患、動脈硬化など、様々な疾患の病態に深く関与していることが報告されており、近年、炎症との関連についても報告されつつある。我々はこれまで小胞体ストレス関連遺伝子発現が、歯周炎罹患患者の歯肉組織において有意に上昇していることを報告したが、そのメカニズムは不明である。そこで今回我々は、歯周炎の病態形成における小胞体ストレス応答の役割を解明するため、*Porphyromonas gingivalis* 口腔感染マウスモデルを用いて解析を行った。

【材料および方法】

6週齢のC57BL/6マウスに10⁹ CFUの*P. gingivalis* W83株を週2回、計10回口腔感染させた。感染後、上顎の歯槽骨吸収を測定するとともに上顎臼歯部周囲歯肉を採取して全RNAを抽出しcDNAを合成した。BiP, XBP1, ATF4, CHOPの各小胞体ストレス関連分子、炎症性サイトカイン、破骨細胞関連遺伝子発現についてReal-time PCR法にて定量解析を行った。また、小胞体のタンパク折り畳み機構を改善するケミカルシャペロンである4-フェニル酪酸をマウスに投与しつつ*P. gingivalis*を10回口腔感染させ、同様の解析を行った。

また、*in vitro*において小胞体ストレスの破骨細胞形成へ及ぼす影響を確認するため、ヒトCD14⁺細胞を分離し、M-CSFおよびRANKL添加培地にて破骨細胞様多核巨細胞へ分化する系を確立し、同培地へ4-フェニル酪酸もしくは小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを加えて破骨細胞様多核巨細胞形成に及ぼす影響をTRAP染色にて検討した。

【成績】

P. gingivalis 口腔感染群において歯槽骨吸収が誘導されるとともに、歯肉組織中におけるBiP, XBP-1の遺伝子発現が有意に上昇していた。一方で、4-フェニル酪酸投与-*P. gingivalis* 口腔感染群では小胞体ストレス関連遺伝子発現が抑制されるとともに*P. gingivalis* 口腔感染による歯槽骨吸収が抑制された。さらに同群では*P. gingivalis* 口腔感染群と比較して歯肉中の炎症性サイトカイン発現に差は認められなかったが、破骨細胞関連遺伝子発現の有意な減少が認められた。*In vitro*では4-フェニル酪酸添加によりRANKL誘導性の破骨細胞様多核巨細胞形成が抑制されたが、ツニカマイシン単独では破骨細胞様多核巨細胞形成が促進されなかった。

【考察と結論】

P. gingivalis 口腔感染により歯肉組織中における小胞体ストレス関連遺伝子発現が有意に上昇することがマウスモデルにおいても確認された。4-フェニル酪酸投与により歯槽骨吸収は抑制されたが、歯肉組織中における炎症性サイトカイン発現に大きな差は認められなかった。その一方、破骨細胞関連遺伝子発現が有意に減少したことにより、歯周炎において小胞体ストレスは破骨細胞形成に直接的に関与している可能性が推察できた。また、*in vitro*で4-フェニル酪酸の添加がRANKL誘導性の破骨細胞様多核巨細胞形成を抑制したこと、ツニカマイシン単独では破骨細胞様多核巨細胞形成が促進されなかったことより、破骨細胞形成において小胞体ストレス応答関連シグナルが必要であるが、それだけでは十分でないことが明らかとなった。以上より、歯周炎において小胞体ストレスは破骨細胞形成に関連し、歯槽骨吸収を誘導する可能性が示唆された。破骨細胞形成における小胞体ストレス応答の関連についての詳細なメカニズムについては今後さらなる解析が必要である。

フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントに関する基礎的研究(第3報)

—リン酸カルシウム粉末の大きさが反応生成物に及ぼす影響について—

日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座¹, 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門²,
米国国立標準技術院パフフェンバーガー研究所³

○尾形英大¹, 林 誠^{1,2}, 小森規雄^{1,2}, 羽鳥啓介^{1,2}, 牧野公亮¹, 高木章三³, Laurence C.CHOW³,
小木曾文内^{1,2}

Fundamental of Fluorapatite-forming Calcium Phosphate Cements part III

— Effect of the particle size of calcium phosphate on fluorapatite-forming reaction —

Departments of Endodontics¹ division of Advanced Dental Treatment², Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, ADA Foundation Paffenbarger Research Center, National Institute of Standards and Technology³

○Hidehiro OGATA¹, Makoto HAYASHI^{1,2}, Norio KOMORI^{1,2}, Keisuke HATORI^{1,2}, Kousuke MAKINO¹, Shozo TAKAGI³, Laurence C.CHOW³, Bunnai OGISO^{1,2}

【研究目的】

近年、リン酸カルシウムセメントを主成分とした多種の骨補填材が臨床に広く使用されている。1982年にBrownとChowによって開発されたCalcium Phosphate Cement (CPC)は、Dicalcium Phosphate Anhydrous (CaHPO₄:DCPA)とTetracalcium Phosphate (Ca₄(PO₄)₂O:TTCP)の等モル比からなり、水分の介在により硬化し最終産物がHydroxyapatite (HA)になることで知られている。一方、Inoue、Grzannaらなどの報告からフロライド(F)を含有するHAは骨芽細胞の分化と骨形成を促進するとの報告がある。このことから、演者らはフルオロアパタイト(FA)置換型CPC(FA-forming CPC)を試作し、第135、136回保存学会にて報告した。そこで本研究では、FA-forming CPCの一成分であるTTCP粉末の大きさが反応生成物に及ぼす影響、硬化時間、Diametral tensile strength (DTS)、気孔率、およびX線回折について検討を行った。

【材料および方法】

TTCP粉末の大きさをTTCP-S (4.0 ± 0.1 μm) およびTTCP-L (20.4 ± 0.2 μm)として、それぞれ調製した。これらの粉末を用いてフッ化ナトリウム配合量を各5段階(F/Ca = 0 (control)、0.05、0.1、0.2、0.4)に変化させたセメントを試作し、0.5 Mのリン酸溶液を用いてP/L = 2.5になるように混和した。その後、ステンレスの型(直径6 mm、厚さ3 mm)に充填し、2枚のフリットガラス版で挟み、37°C、湿度100%の環境下のインキュベータ内で4時間保管した。セメント硬化後、試料をステンレス型から外し、同様の環境下でPhysiologic-like solution (PLS) (1.15M CaCl₂, 133 mM NaCl, 1.2 mM KH₂PO₄, 50 mM HEPES, pH=7.4) (10 mL/disc)に20時間浸漬した。硬化時間の測定はGilmore needle methodを用いた。DTSはINSTRON 5500R Testing Machineを用い、速度は10mm/minとして算出した。気孔率は被検材料を24時間乾燥させ、密度より算出した。X線回折は、vertically-mounted diffractometer system (D/MAX 2000, Rigaku, Danvers, MA)を用いた。測定結果はTwo-way ANOVAを用いて、P < 0.05にて統計処理を行った。

【成績】

硬化時間は両粉末サイズともにcontrolと比較し有意に速くF/Ca比の影響は認められなかった(F/Ca比=0.4(TTCP-L)を除く)。F/Ca比=0.05~0.2ではTTCP-SはTTCP-Lより有意に速かった。DTSは両粉末サイズともにcontrolと比較し有意に低く、F/Ca比の増加にともなって低い値を示した。粉末サイズがDTSに及ぼす影響はF/Ca比によって異なっていた。気孔率は両粉末サイズともにcontrolからF/Ca比=0.1まで有意差は認められなかったが、F/Ca比=0.2および0.4では有意に増加した。粉末サイズが気孔率に及ぼす影響はcontrolからF/Ca比=0.2までTTCP-SはTTCP-Lより有意に高かった。X線回折では、両粉末サイズともに未反応なTTCP量を確認し、F/Ca比の増加にともなって高くなった。

【考察および結論】

以上の結果より、フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントの理工学的特性は、構成成分の一つであるTTCP粉末の大きさに影響を受け、粉末粒径が小さくなることで反応する表面積が増大することに起因すると推測された。また、フッ化ナトリウム配合量の違いも理工学特性に影響を与えるという演者らの先の報告と併せ、骨補填材としてより有用性が高い構成成分を解析することによって、フルオロアパタイト置換型リン酸カルシウムセメントは臨床応用できる可能性が示唆された。

歯髄組織工学に向けた棒状三次元細胞集合体の作製

大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔機能再建学講座 (歯科理工学教室)¹,
大阪大学歯学部附属病院 口腔総合診療部²
○佐々木淳一¹、毛利有希子^{1,2}、竹重文雄²、今里 聡¹

Fabrication of Rod-shaped 3D Cell Construct for Dental Pulp Tissue Engineering
Department of Biomaterials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry¹
Division for Interdisciplinary Dentistry, Osaka University Dental Hospital²
○SASAKI Jun-Ichi¹, MOHRI Yukiko^{1,2}, TAKESHIGE Fumio², IMAZATO Satoshi¹

【研究目的】

組織工学的手法による再生技術の開発は、新たな歯科医療体系の要になると考えられている。これまで、われわれは温度応答性高分子 poly N-isopropylacrylamide (pNIPAAm) ゲルを用いてマウス由来骨髄間葉系幹細胞 (BMSC) を培養することにより、球状の細胞集合体を作製できることを報告してきた¹⁾。この pNIPAAm ゲルは、造形したモールドを用いて調整するため形態の制御が容易であり、球形以外の種々の形態の細胞集合体の作製が可能である。

移植用の歯髄組織を *in vitro* において構築することを目標に、本研究では、まずその基盤技術の開発として、BMSC およびマウス由来線維芽細胞 (L929) の棒状集合体の作製を試みた。

【材料と方法】

Free Form ソフトウェアおよび三次元プリンタ (Eden, Objet, Israel) を用いて造形したモールドに NIPAAm 溶液と polyethylene glycol dimethacrylate の混合溶液を流し込み、4°C で 8 時間静置して直方体の凹み (1.5 x 10 x 1.5 mm) を有する pNIPAAm ゲル製の培養チャンバーを作製した。このゲルに BMSC または L929 を播種し、それぞれ 24 時間または 48 時間培養後、周囲温度を 25°C に低下させることによってゲルを膨張させて細胞集合体を取り出した。L929 については、FBS 10% 含有 DMEM 培地を用いて、シーソー型バイオリアクター上でさらに 7 日間培養を継続し、23~27G の注射針を通過させて棒状成形と太さの制御を行った。

各細胞集合体を構成する細胞の生死は、Live/Dead 染色により評価した。また、パラフィン包埋薄切切片を作製し、HE 染色により内部構造の観察を行った。

【結果および考察】

BMSC については、pNIPAAm ゲルで 24 時間培養することによって棒状の集合体を得られた (Fig. 1)。一方、L929 については、ゲル上とバイオリアクターで培養後も球状または不定形の集合体を形成するに留まったが、注射針を通して射出することで棒状となった。さらに、通過させる注射針の直径を変化させることで、太さの制御も可能であった。二種の細胞では細胞間接着の強さに違いがあるため、異なる成形方法が必要となったものと考えられる。

一方、Live/Dead 染色の結果、細胞集合体の外層の細胞は活性を維持しているが、内層の細胞の多くが代謝活性を有していないことが分かった。また、HE 染色では、中心部の細胞の核が消失している像が観察され、酸素供給や培地栄養の不足によりネクロシスを起こしているものと推察された。

【結論】

pNIPAAm ゲルでの培養により、あるいはゲルで培養した細胞を射出することにより、細胞集合体の三次元的形態を制御でき、BMSC および L929 の棒状細胞集合体の作製が可能であった。

今後は、歯髄細胞の集合体作製やさらなるサイズ制御に取り組むとともに、血管系の共培養等により内部の細胞の生存率を向上させる手法の開発を行う予定である。

【参考文献】

- 1) Sasaki JI, *et al.* *In vitro* reproduction of endochondral ossification using 3D mesenchymal stem cell construct. *Integrative Biology* 4(10), 1207-1214, 2012.

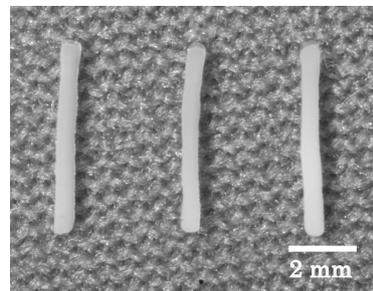


Fig. 1. Rod-shaped 3D cell constructs of BMSC.

多血小板血漿が象牙芽細胞様細胞の抗炎症能と分化能に与える影響.

¹九州歯科大学口腔治療学講座齲蝕歯髓疾患制御学分野

²九州歯科大学健康増進学講座感染分子生物分野

○廉 昶勲^{1,2}, 鷲尾 絢子¹, 北村 知昭¹

Effect of Platelet Rich Plasma on the Anti-inflammatory Potency and Differentiation of Odontoblast-like Cells (KN-3 cell).

¹Div. of Pulp Biology, Operative Dentistry and Endodontics, Kyushu Dental University

²Div. of Infections and Molecular Biology, Kyushu Dental University

○YEOM Kyounghun^{1,2}, WASHIO Ayako¹, KITAMURA Chiaki¹

【研究目的】

多血小板血漿 (Platelet rich plasma:PRP) は自家血から調製され、血漿中に血小板が高濃度で凝縮されており、血小板由来増殖因子 (PDGF)、トランスフォーミング増殖因子 (TGF- β)、血管内皮増殖因子 (VEGF)、上皮増殖因子 (EGF) のような成長因子を放出することで創傷治癒と組織再生に有効であると考えられている。歯科では歯槽提増大術、上顎洞底挙上術など口腔外科、歯周外科などで応用されている。

本研究では、歯髓と根尖歯周組織の創傷治癒・再生における PRP の影響を調べるため、象牙芽細胞様の特徴を有するラット下顎切歯歯髓由来細胞株 KN-3 細胞を用い、PRP が KN-3 細胞の抗炎症作用を有する物質の産生と硬組織形成能に与える影響を検討した。

【材料および方法】

PRP は 3.8%クエン酸ナトリウムを入れたシリンジで肘静脈から 30 ml 採血し、4 °C、2000 rpm で 5 分間遠心分離後、血漿のみ新しいチューブに分注し、4 °C、2000 rpm で 20 分間再度遠心分離を行い、最下層の分画を PRP として回収し、実験に用いた。

KN-3 細胞に PRP を添加して培養後、mRNA を抽出し、抗炎症反応を誘導する IL-1ra、Lactoferrin および炎症性サイトカインである IL-1beta の遺伝子発現を real time RT-PCR で解析した。また、象牙芽細胞分化への影響を検討するため、PRP 添加後の KN-3 細胞における象牙芽細胞分化マーカーである Dentin sialophosphoprotein (DSP) および Dentin matrix protein-1 (DMP-1) の発現を real time RT-PCR で解析した。DSP および DMP-1 については蛋白レベルでの発現を Western blotting 法に検討した。

さらに、PRP 添加後の KN-3 細胞が示す石灰化能を Alizarin red S 染色により検討した。

【結果】

PRP の添加により、KN-3 細胞では IL-1ra および Lactoferrin mRNA の発現が一過性に亢進した。この亢進は PRP の濃度依存的であり、5%PRP 刺激で最大の発現誘導が観察された。一方、IL-1beta の遺伝子発現に有意な変化はなかった。

また、DSP、DMP-1 の mRNA の発現も PRP の添加により濃度・時間依存的に発現上昇し、DSP については蛋白質レベルでの発現亢進も観察された。

さらに、Alizarin red S の染色性はコントロール群と比べ、PRP 添加群で有意に増強していた。

【考察】

今回の結果より、PRP が抗炎症作用を発現する物質の亢進とともに象牙芽細胞への分化誘導能を持つことが示された。

【結論】

以上の結果から、歯髓の創傷治癒・再生療法に有用であることが示唆された。

最終糖化産物(AGE)は RAGE-MAPK 経路を介してラット培養歯髄細胞の 石灰化物形成を促進する

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯周歯内治療学分野

○中島由紀子, 稲垣裕司, 木戸淳一, 永田俊彦

Advanced Glycation End-product Increases Calcification through RAGE-MAPK pathway in Cultured Rat Dental Pulp Cells.

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

○NAKAJIMA Yukiko, INAGAKI Yuji, KIDO Jun-ichi and NAGATA Toshihiko

【研究目的】 糖尿病患者では動脈硬化を合併し、血管壁に石灰化物を形成する 경우가多く、近年、最終糖化産物(AGE: Advanced Glycation End-product)の蓄積が血管の石灰化に促進的に作用していることが明らかにされている。一方、糖尿病患者の歯髄では高頻度で歯髄腔の狭窄や歯髄結石の形成が認められる。我々の研究室では現在までに、糖尿病ラットの歯髄で病的石灰化物の増加やその周囲で骨基質タンパク質のひとつであるオステオポンチン(OPN)の発現が上昇していることを報告した(*J Endod* 36: 1014-20, 2010)。加えて、糖尿病ラット歯髄組織では AGE 受容体(RAGE)や石灰化関連マーカーの発現が亢進していること、AGE を添加したラット培養歯髄細胞では石灰化誘導能が上昇していることを報告した(*J Endod*: in press, 2013)。これらの知見より、糖尿病の歯髄組織において AGE が石灰化を促進する作用をもつことが示唆された。また、AGE による石灰化促進作用には RAGE-MAPK 経路が関係していることが血管平滑筋細胞を用いた実験で多数報告されている。本実験では AGE が歯髄細胞の石灰化を促進するメカニズムを検証するために、AGE を添加したラット培養歯髄細胞に RAGE に対する低分子干渉 RNA(siRNA)や MAPK 阻害剤を添加し、石灰化関連マーカー発現の変化を調べた。

【材料および方法】 歯髄細胞は Kasugai らの方法に従い 9 週齢の雄性 Wistar 系ラットの上顎切歯より採取し、継代 3 代目がコンフルエントになるまで培養した後、50 µg/ml アスコルビン酸、2mM β-グリセロリン酸および 10%ウシ胎児血清含有 EMEM 培地に AGE を 50 µg/ml の濃度で添加した。AGE は Takeuchi らの方法に従い BSA とグリセルアルデヒドを用いて作製したものを使用し、コントロールとしてはグリセルアルデヒド無添加で作製した BSA 溶液を用いた。さらに RAGE に対する siRNA、あるいは MAPK 阻害剤として p38 阻害剤(SB203580)、ERK1/2 阻害剤(PD98059)、JNK 阻害剤(SP600125)をそれぞれ添加して 2 週間培養を行い、RNA を採取・抽出し、OPN およびオステオカルシン(OCN)の発現を real-time PCR 法で調べた。

【結果】 培養歯髄細胞に AGE を添加すると OCN の mRNA 発現量は有意に増加したが、RAGE に対する siRNA を添加するとその発現は BSA を添加した対照群と同じレベルにまで低下した。また、AGE の添加によって増加した OPN の mRNA 発現は、p38 阻害剤である SB203580 の添加によりその発現量が有意に低下し、PD98059 や SP600125 の添加では有意な変化は認められなかった。一方、AGE の添加によって増加した OCN の mRNA 発現は ERK1/2 阻害剤である PD98059 の添加によりその発現量が有意に低下し、SB203580 や SP600125 の添加では有意な変化は認められなかった。

【結論】 AGE 添加による培養歯髄細胞の石灰化促進には RAGE および MAPK 経路が関連しており、MAPK のうち OPN の発現には p38 が、OCN の発現には ERK1/2 が主に関連していることが示された。以上より糖尿病の歯髄組織における AGE 誘導性の病的石灰化は RAGE-MAPK 経路を介して引き起こされている可能性が示された。

Effects of phosphophoryn-derived RGD peptides on odontoblasts

○Jia Tang, Keisuke Handa, Kejiro Hayashi, MMA Polan and Takashi Saito
Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Purpose:

Calcium hydroxide has been considered as the gold standard in direct pulp capping. However, it has some unavoidable shortcomings like high alkalinity, porous reparative dentine formation and long reparation time. To overcome these problems, new biocompatible reagents that induce sound reparative dentine formation need to be developed. Dentin phosphophoryn is the most abundant extracellular matrix in dentin, and is reported to be involved in the initiation of mineralization of dentin. Previously, we showed the ability of phosphophoryn-derived RGD short peptides artificially synthesized for induction of differentiation of human bone marrow stem cells *in vitro*. The purpose of this study was to examine whether the peptides have any effects on the proliferation and differentiation of odontoblasts.

Materials and Methods:

Polystyrene cell culture dishes were coated with 200µg/ml of phosphophoryn-derived RGD peptides (RGD-1: SESDNNSSSRGDASYNSDES; RGD-2: ANSESDNNSSSRGDA; RGD-3: SRGDASYNSDESKD). The MDPC-23, a rat odontoblast-like cell line was cultured on the peptide-coated dishes with DMEM supplemented with 10% FBS. The cell-morphology and proliferation were evaluated. Furthermore, cells were analyzed for mRNA expression of dentinogenesis-related proteins by conventional RT-PCR and real-time PCR.

Results and Discussion:

These peptides did not affect the morphology or proliferation of MDPC-23. The RGD-3 significantly promoted the DSPP, DMP-1, ALP, OCN, BSP gene expressions at the concentration of 200µg/ml, while RGD-1 and RGD-2 showed comparatively weaker effect than RGD-3, still it was higher than control. It was previously reported that DPP promotes cell-differentiation via MAPK and Smad signal pathway after RGD motif binds to integrin existing on the cell surface. From the results of this study, it was speculated that peptide-conformation is important for induction of differentiation of odontoblasts.

Conclusion:

This study shows that 200µg/ml of RGD peptides have positive effect on the differentiation of MDPC-23, and that RGD-3 is the most potential in enhancing the odontogenic gene expression among the peptides. Further *in vitro* and *in vivo* studies are needed to verify our results. (This work was partly supported by Grant-in-Aid for Scientific Research (B) 23390436.)

酸性溶液がエナメル質の衝突摩耗性に及ぼす影響

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門²
青島歯科医院³, 松村歯科医院⁴

○市野 翔¹, 飯野正義¹, 井上直樹¹, 山路 歩¹, 陸田明智^{1,2},
安藤 進^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 青島 裕³, 松村正鴻⁴

Influence of Acid Solution on Impacting-Sliding Wear of Enamel

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science, Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry, Aoshima Dental Clinic³, Matsumura Dental Clinic⁴
○ICHINO Sho¹, IINO Masayoshi¹, INOUE Naoki¹, YAMAJI Ayumi¹, RIKUTA Akitomo^{1,2},
ANDO Susumu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, AOSHIMA Yutaka³, MATSUMURA Seikou⁴

【研究目的】

Tooth wear は、齲蝕とは異なる過程で歯質の欠損を生じる疾患であり、酸蝕、摩耗あるいは咬耗などの因子が複雑に影響しあうことによって発症すると考えられている。しかし、その発現機序の詳細に関しては、影響因子が複雑であることから、とくにその予防法を解明することは困難な課題であると考えられている。そこで演者らは、Tooth wear の予防法を確立する研究の一環として、pH を規定したリン酸水溶液がウシエナメル質の衝突摩耗に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

エナメル質としては、ウン(2-3 歳齢)の下顎前歯を用いた。歯冠部を常温重合レジンに包埋し、シリコンカーバイドペーパー (SiC) を用いて直径 6 mm 程度のエナメル質の平坦面が得られるように #400 から #2,000 で順次研削し、これを試片とした。これら試片の浸漬溶液としては、その pH を 3.0, 5.0 あるいは 7.0 と酸性域から中性域に規定した 3 種のリン酸水溶液を用いた。

衝突摩耗試験には、衝突摩耗試験機 (K655-06, 東京技研) を用いた。ステンレスロッドをアンタゴニストとし、37°C の溶液に浸漬した試片に対して、垂直的落下距離 5 mm, 水平的スライド距離 2 mm, 荷重 25N および 50N の 2 条件で、垂直落下 1 回と水平スライド 2 回を 1 サイクルとした衝突摩耗を 5,000 サイクルまで負荷した。その後、レーザー顕微鏡 (VK-9700, キーエンス), FE-SEM (ERA-8800FE, エリオニクス) およびヌープ硬さ試験機 (DMH-2, 松沢) を用いて表面性状を継続的に測定した。摩耗性状の分析には、レーザーカラー画像 (LC 像), 3D レーザー画像 (3D 像) およびラインプロファイル (P 像) を用いて体積摩耗 (ISW) 量および最大摩耗深さを求めた。また、表面硬さは溶液に浸漬前後の細粒ヌープ硬さ値 (KHN) を求めた。試片の数は各条件について 5 個とし、測定値の統計処理には、ANOVA および Tukey の方法を用いた。

【成績および考察】

溶液に浸漬前後の ISW 量および最大摩耗深さの変化は、溶液の pH および負荷荷重の違いによって特徴ある結果を示した。すなわち、酸性水溶液 (pH 3.0) 条件における衝突摩耗サイクル後の ISW 量および最大摩耗深さは、その他の溶液内での値より大きくなり、負荷荷重の増加に伴って、ISW 量および最大摩耗深さは大きくなる傾向も著名であった。

中性溶液 (pH 7.0) 条件での摩耗面観察は、疲労摩耗および摩擦摩耗が認められた (Fig. 1)。一方、酸性溶液 (pH 3.0) 条件では酸蝕によるエナメル小柱の明瞭化、衝撃に伴うエナメル小柱の破壊や亀裂および摩擦摩耗が混在した、いわゆる摩擦化学的摩耗が認められた (Fig. 2)。

KHN は、衝突摩耗回数の増加に伴って低下する傾向が認められた

【結論】

エナメル質のリン酸溶液中における ISW 量および最大摩耗深さは、pH の低下および負荷荷重の増加によって影響されることが判明した。また、中性溶液内での初期の wear 挙動は疲労性摩耗が、また酸性溶液内での wear 挙動は、摩擦化学的摩耗が摩耗機序の主体であったことから、Tooth wear の予防には初期段階で酸蝕を防ぐことの検討が必要であると示唆された。

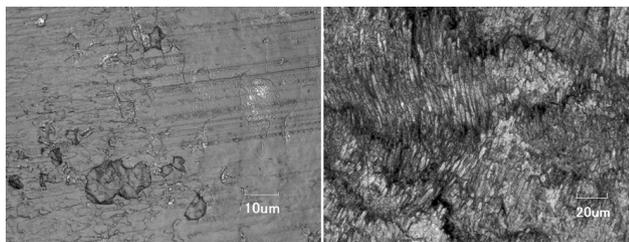


Fig. 1 Laser image in a neutral solution (pH 7.0)

Fig. 2 Laser image in an acid solution (pH 3.0)

ケイ酸カルシウムと高親水性モノマーを含有した新しい光硬化型直接覆髄材の 修復性治癒効果に関する研究

愛知学院大学歯学部保存修復学講座

○堅田和穂, 堀江 卓, 岸本崇史, 永瀬洋介, 杉尾憲一, 堅田尚生, 富士谷盛興, 千田 彰

A Study of Reparative Healing of the Exposed Pulp Directly Capped with a New Light-cured Resin-modified Pulp Capping Material Containing Calcium Silicate and Highly Hydrophilic Monomer

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

○KATADA Kazuho, HORIE Taku, KISHIMOTO Takafumi, NAGASE Yosuke, Sugio Kenichi, KATADA Hisao, FUJITANI Morioki, SENDA Akira

【研究目的】

偶発的露髄に対する処置として、水酸化カルシウム製剤や Mineral Trioxide Aggregate (以下 MTA) などを用いた直接覆髄が一般的に行われている。近年注目されている MTA は、良好な被蓋硬組織形成を有し、露髄創傷部の治癒効果が高いと報告され、当講座堀江らも高く評価している (日歯保存誌 52(5):393-401, 2009)。その一方で、実際の臨床使用においては、硬化時間が長く、操作が煩雑であるなどという問題点も有する。

このような背景のもと、MTA の主成分であるケイ酸カルシウム等の無機質酸化物に加え、非常に親水性の高いモノマーを含有し、さらに光硬化性と簡便な操作性を有する直接覆髄材が新たに開発された。そこで本研究は、この新しい直接覆髄材をラット臼歯の露髄窩洞に応用した場合の歯髄の病理組織学的変化を観察し、被蓋硬組織形成の様相を中心に覆髄材の修復性治癒効果について、MTA を使用した場合と比較検討した。

【材料及び方法】

本研究は愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認下 (承認番号 198 号) において愛知学院大学歯学部動物実験実施規程に基づいて遂行された。実験動物として 8 週齢の Wistar 系雄性ラット 20 匹を用い、ジエチルエーテル吸入にて麻酔導入を行い、ペントバルビタールナトリウム (ソムノベンチル®, 共立製薬) を腹腔内注射して全身麻酔を施した。上顎右側第一臼歯にラバーダムを装着し術野の隔離を行った後、近心小窩付近にラウンドのステールバー (ISO #006, メルファー) を用いて低速軽圧非注水下で露髄窩洞を形成した。露髄部を 10% 次亜塩素酸ナトリウム水溶液と 3% 過酸化水素水にて交互洗浄後、滅菌生理食塩水で洗浄しながら止血を確認し、TheraCal LC (Bisco) を用いて直接覆髄を施した (TCL 群)。また、反対側 (左側) の第一臼歯に、直接覆髄材としてプロルート MTA (デンツプライ三金) を用いて同様の処置を施し、対照とした (MTA 群)。これらの窩洞をスーパーボンド (サンメディカル) で封鎖し、咬合を避けるため対合歯を抜去した。7, 14 日後、過剰量のペントバルビタールナトリウムの腹腔内注射によりラットを屠殺し、被検歯を取り出した後、通法に従ってパラフィン連続切片を調製した。ヘマトキシリン・エオジン染色を施した切片を用いて、歯髄の病理組織学的変化を、被蓋硬組織形成の様相を中心に観察した。

【結果ならびに考察】

7 日後では、TCL 群および MTA 群のいずれにおいても、多くの被検歯の露髄部直下には軽度の炎症性細胞浸潤が認められたが、露髄面をほぼ完全に覆う被蓋硬組織が形成されていた。14 日後では、TCL 群、MTA 群ともに炎症性反応は消退し、露髄面は規則的な細管構造を有する新生被蓋硬組織により完全に覆われ、その厚みは増していた。MTA は、主成分であるケイ酸カルシウム等の水和反応により生じた水酸化カルシウムが持続的に溶出することにより、良好な修復性治癒効果を示すと考えられている。本研究に用いた新しい直接覆髄材においても含有されるケイ酸カルシウム等が同様に作用したものと推察され、TCL 群は MTA 群と同程度の良好な修復性治癒効果を示したと思われる。

【結論】

ケイ酸カルシウムと高親水性モノマーを含有した新しい光硬化型直接覆髄材は、操作が簡便であり、かつ、MTA と同程度の良好な修復能を有する覆髄材であることが明らかとなった。

MMA 系接着充填材の接着強さと耐酸性の評価

¹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

²歯と骨の COE

○品川 淳一¹、井上 剛¹、二階堂 徹¹、田上 順次^{1,2}

Assessment of Bond Strength and Acid Resistance of 4-META/MMA-TBB Resin Filling Materials

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

²Global COE Program; International Research Center for Molecular Science in Tooth and Bone Diseases
○Junichi Shinagawa¹, Go Inoue¹, Toru Nikaido¹, Junji Tagami^{1,2}

【研究目的】4-META/MMA-TBB レジン (スーパーボンド C&B、サンメディカル、以下 SB) は、機能的モノマーである 4-META と低分子モノマーである MMA、さらに TBB 触媒からなるユニークな接着システムとして臨床で広く使用されている。我々はこれまでにその長期接着耐久性や接着界面の耐酸-塩基抵抗性について検討してきた。今回 SB の特徴を活かした新たな接着性充填材料 (ボンドフィル SB、サンメディカル、以下 BF) が市販された。また NaF を配合した新しいポリマー粉末筆積 F3 (以下 F3) も開発された。そこで本研究の目的は、新規材料である BF の接着強さと耐酸性を SB と比較し、その性能を評価すると共に F3 の効果について検討することとした。

【材料及び方法】使用した接着材料は、SB と BF であり、SB 群では前処理材として、表面処理材グリーン (以下 10-3) またはティースプライマー (以下 TP) を使用した (SB/10-3、SB/TP)。一方、BF 群では前処理材として、TP を使用した (BF/TP)。さらに BF 専用粉材の代わりに F3 を使用した群を追加した (BF/F3/TP)。微小引張強さ試験：ヒト抜去歯の象牙質面を歯軸と垂直に露出させ #600 耐水研磨紙にて研削し、高さを約 1 mm に規制し SB または BF を筆積み法にて築盛、アクリルロッドを圧接して接着試験片とした。1 日水中保管後、ビーム法にてクロスヘッドスピード 1 mm/min にて微小引張強さ試験を行った。その後、SEM (JSM-5310LV、エリオニクス) にて破断面を観察した。接着界面の耐酸-塩基抵抗性の評価：ヒト抜去歯を用い Inoue らの方法 (2006) に準じて試料の作製を行い、SEM を用いて接着界面の観察を行った。

【結果及び考察】微小引張強さ試験の結果を表に示す。また接着界面の酸-塩基処理後の SEM 写真を図に示す。BF/TP 群では他の群に比べて有意に高い接着強さを示し、どの群においてもレジン内での凝集破壊が多く認められた。一方、SEM による接着界面の観察結果から、どの群においても Acid-base resistant zone の形成は認められなかった。さらに BF/TP 群においては象牙質移行部に Erosion の形成が認められた。BF は SB と比べてモノマー液に二官能性モノマーが添加され、さらにポリマー粉末にはフィラーが添加されている。BF/TP 群においては接着材の機械的強度が向上することで接着性が向上した反面、モノマーの浸透性が低下したことで Erosion が形成されたものと考えられる。しかし、BF/F3/TP においては、Erosion は認められず、象牙質への移行部にスロープ状の耐酸性層 (Sloped area) の形成が認められた。これは F3 に含まれる NaF の徐放作用によるものと考えられる。

【結論】BF は高い接着強さを示したが、SB に比べて耐酸性は低かった。しかし、粉材にフッ化物を配合することで耐酸性が向上する可能性が示唆された。

表 各群の微小引張強さ (MPa)

SB/10-3	SB/TP	BF/TP	BF/F3/TP
30.0 ± 6.8 ^a (n=24)	32.1 ± 8.6 ^b (n=30)	45.2 ± 14.3 ^{abc} (n=36)	32.7 ± 13.4 ^c (n=31)

統計処理: Games-Howell a, b, c: p<0.05

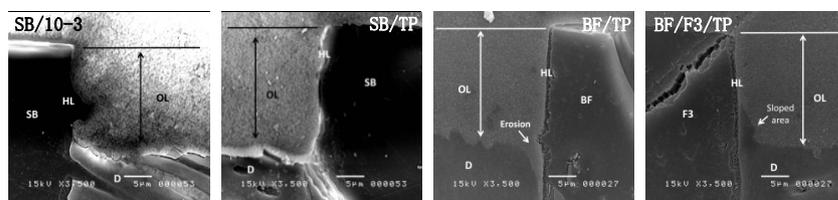


図 各群の酸-塩基処理後の SEM 写真(3500 倍)

エナメルマージン形態がコンポジットレジン修復物の色調に及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院摂食機能保存学講座 歯制御学分野

○会田麻美¹, 關奈央子², 中島正俊³, 田上順次⁴

Effect of enamel margin form on color change of resin composite restoration

¹Cariology and Operative Dentistry, Graduate school, Tokyo Medical and Deantal University

²Tokyou Medical and Dental University International Exchange Center

○Asami AIDA, Naoko SEKI, Masatoshi NAKAJIMA, Junji TAGAMI

<緒言>

光重合型コンポジットレジン修復における課題のひとつとして、天然歯との色調適合性があげられるが、患者の歯牙の色調をいかに正確に評価し、それと類似の色調のコンポジットレジンを選択しても、完全に色調をあわせることは容易ではない。コンポジットレジン半透明性の材料であり、周囲歯質の色調を反映して、色調が変化することが知られている。そこで、色調を合わせる臨床技術としてベベル付与が推奨されているが、その詳細については不明である。今回、ウシ抜去歯から作成したエナメル質板に形成した打ち抜き窩洞に、3種のエナメル色コンポジットレジンを充填し、ベベルの有無による色調の変化挙動について検討を行った。

<材料・方法>

実験材料として、3種のレイヤリング用光重合型コンポジットレジン(クリアフィルマジェスティ ES-2 Premium (A2E); クラレノリタケ, カローレ (WE); ジーシー, エステライトプロ (A2E); トクヤマデンタル)を用い、シェードはそれぞれ、A2を採択した場合に業者指示されたエナメル色を用いた。

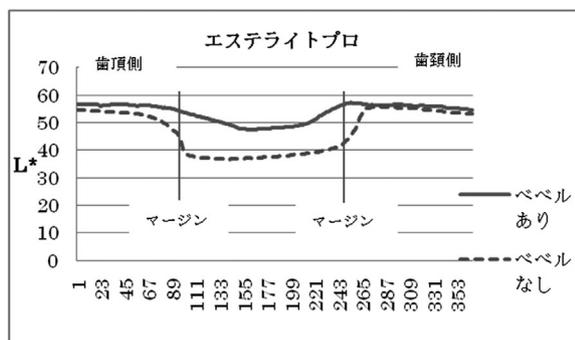
冷凍保存されたウシ抜去歯を用い、厚さ1mmのエナメル質板を切り出した後、中央部に45度のストレートベベルを付与した群、または付与しない群の2種の打ち抜き窩洞(径3mm)を形成した。業者指示に従い、クリアフィルボンド SE One (クラレノリタケ)にて接着処理後、コンポジットレジンを充填し、光照射器(Optilux 501, Demetron)を用いて、両面から20秒間ずつ光照射して、硬化させた。その後、37°C24時間水中保管後、研磨し、測色用試料とした。測色には、D₆₅光源下で、視覚全色域カメラ(YC900、パパラボ社製)を用いて、黒色基準板背景のもとデジタル撮影(画角 21×36 mm; 解像度 1920×1080)を行い、窩洞を含んで歯頂側から歯頸側エナメル質までの CIE L*a*b*値を連続的に算出した。今回使用した視覚全色域カメラ(YC900)は、得られた3バンドの等色関数を人間の目の感度である標準的な等色関数への線形変換に対応するカラーフィルターを搭載しており、ヒトの色に対する感度を忠実に再現することを目指している。

<結果および考察>

窩洞にベベルを付与しない場合、L*値はマージン部で急激に低下したが、ベベルを付与することによりL*値の変化は緩やかなものとなった。また、窩洞内のコンポジットレジンのL*値は、ベベルを付与することにより高い値を示した。その程度は、用いたコンポジットレジンにより異なっていた。一方、a*およびb*値については、ベベルの有無による明確な変化は本研究において確認できなかった。

<結論>

窩洞にベベルを付与することにより、コンポジットレジン修復物マージン部の明度変化は緩やかになり、コンポジットレジン修復物全体の明度も上昇した。



新規フロアブルレジンの機械的性質とその臨床応用

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門², 斎藤歯科医院³

○黒川弘康^{1,2}, 野尻貴絵¹, 浅野和正¹, 高見澤俊樹^{1,2},
瀧川智義^{1,2}, 安藤 進^{1,2}, 宮崎真至^{1,2} 斎藤充良³

Mechanical properties of newly developed flowable resin composite and clinical use

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry
SAITO Dental Clinic³

○KUROKAWA Hiroyasu^{1,2}, NOJIRI Kie¹, ASANO Kazumasa¹, TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2},
TAKIGAWA Tomoyoshi^{1,2}, ANDO Susumu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2} and SAITO Mitsuyoshi³

【緒言】

ペーストの操作性として、流れることを重要視したフロアブルレジンは多数市販されている。とくに最近では、レジンモノマー成分とともに含有されているフィラーの粒径、形状、配合率あるいはその表面処理などに改良を加えることで強度の向上を図った製品も多く開発され、くさび状欠損や咬合面小窩裂溝修復に留まらず、臼歯部の大型窩洞修復に用いることが可能な製品も市販されている。今回、新規フィラーの導入とともに、その表面処理技術の改良によって、優れた研磨性や操作性を有するだけでなく、フィラーの高密度充填を可能としたフロアブルレジンはクラレノリタケデンタルから市販された。そこで、この新規フロアブルレジンの機械的性質について評価するとともに、臨床応用について検討した。

【材料および方法】

新規フロアブルレジンとして、クリアフィルマジスティ ES フロー（クラレノリタケデンタル）および従来品であるクリアフィルマジスティ LV（クラレノリタケデンタル）の2製品を用いた。

評価項目としては以下の4項目とし、それぞれ測定を行った。

1. 曲げ強さ (MPa) および曲げ弾性率 (GPa)

2×2×25 mm のステンレス製割型にフロアブルレジンを充填し、加圧成形した後、製造者指示条件に従い2箇所に分割して照射し、測定用試片とした。この試片を、万能試験機 (Type 5500R, インストロン) を用いて3点曲げ強さ測定を行うとともに、応力-歪曲線の傾きから曲げ弾性率を試験機に付属するソフトウェアを用いて算出した。

2. 摩耗量

衝突摩耗試験機 (K655-06, 東京技研) を用いて衝突摩耗試験を行った後、形状測定レーザマイクロスコープ (VK-9710, キーエンス) を用いて摩耗量を測定した。

3. 光沢度

デジタル光沢度計 (GM-26D, 村上色彩技術研究所) を用い、入射角および受光角を 60° とし、黒ガラス標準板でキャリブレーションした後にいった。

4. フロアブルレジ硬化物のフィラー形状

金蒸着を施した後、フィールドエミッション走査電子顕微鏡 (ERA-8800FE, エリオニクス) を用いて、加速電圧 10 kV の条件で観察した。

さらに、日本大学歯学部附属歯科病院保存修復科に来院し、本研究の主旨を説明し、了解を得られた患者を被験者とし、クリアフィルマジスティ ES フローを用いて修復処置を行い、その臨床使用について評価した。なお、臨床応用にあたっては、日本大学歯学部倫理委員会の審査を経て承認を得ている。

【成績および考察】

クリアフィルマジスティ ES フローの曲げ強さは 152.1 MPa および曲げ弾性率は 9.4 GPa を示した。また、クリアフィルマジスティ ES フロー硬化物の SEM 観察からは、サブミクロンフィラーおよびナノフィラーをクラスター化した像が観察された。一方、臨床使用時の操作性は、糸引きが少なく、また、窩壁になじみながらも流れにくいことから、くさび状欠損や臼歯部咬合面の充填など、インジェクタブルレジンとしての使用にも有効であった。これらの性質は、新規フィラーの導入とともにフィラーの表面処理技術の改良が影響したものと考えられた。

【結論】

新規フロアブルレジンは、従来品と同程度の機械的性質を有しながら、良好な研磨性と容易な操作性とを示した。

試作フロアブルレジン修復システム (LLB-LF) の基本接着性能

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門²

日本大学歯学部保存学教室歯周病学講座³, 植原歯科医院⁴

○古市哲也¹, 吉田ふみ¹, 小倉由佳理¹, 岩佐美香¹, 利根川雅佳¹,

坪田圭司^{1,2}, 安藤 進^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 植原俊雄^{3,4}

Adhesive Performance of Experimental Flowable Resin Restorative System (LLB-LF)

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

Department of Periodontology³, Uehara Dental Clinic⁴, Nihon University School of Dentistry

○FURUICHI Tetsuya¹, YOSHIDA Fumi¹, OGURA Yukari¹, IWASA Mika¹, TONEGAWA Motoka¹,

TUBOTA Keishi^{1,2}, ANDO Susumu^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, UEHARA Toshio^{3,4}

【緒言】

臨床使用における簡便性を旨として開発された Primefil (以下 PF, トクヤマデンタル) は、プライマーへの光照射を必要としない修復システムである。すなわち、プライマー中に含まれる SR モノマーが歯質のカルシウムイオンに化学的に反応することで接着層を形成するとともに、専用のフロアブルレジンを用いることによって組成中の重合開始材と反応し、接着界面における重合硬化が進行する。したがって、操作が簡便でチェアタイムの短縮が図れると同時に、テクニクセンシティブ因子の軽減が望めるとともに、歯質と修復物の接合界面付近から重合が開始することから、安定した接着系の形成が期待されている。さらに、臨床操作性の向上を目指して、フロアブルレジンのフローを低流動化した修復システム LLB-LF (以下 LLB, トクヤマデンタル) が開発された。そこで演者らは、LLB の初期およびサーマルサイクル負荷後の歯質に対する接着強さを測定するとともに、その破壊形式を観察することによって、基本的接着性能について検討を行った。

【材料および方法】

供試した修復システムは、LLB に加え、市販の Bond Force と Estelite Flow Quick (以下 BF, トクヤマデンタル)、および PF の合計 3 製品とした。可視光線照射器としては、Optilux 501 (sds Kerr) を、その光強度を確認して使用した。被着体としては、ウシ下顎前歯の唇面エナメル質および象牙質を SiC ペーパーの #600 まで仕上げ、超音波洗浄を行ったものを用いた。次いで、被着面積を規定し、製造者指示条件にしたがってアドヒーズを塗布、レジンペーストを填塞、ストリップスを介して光照射を行い、接着試験用試片とした。接着強さの測定は、37 °C 精製水中に 10 分間保管した試片 (以下 10 分群)、24 時間保管した試片 (以下 24 時間群)、および 24 時間保管した後に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 秒に設定したサーマルサイクルを負荷した試片 (以下 TC 群) の 3 条件について、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いてその剪断接着強さの測定を行い、その平均値を各条件における接着強さとして評価した。24 時間群においては、被着歯面の湿潤状態を Dry 条件および Wet (プロットドライ) 条件の 2 群に分けて検討を行った。また、接着強さ測定後の破断試片については、実体顕微鏡を用いて歯質側破断面を観察し、破壊形式の判定を行った。アドヒーズ処理歯面および接合界面については、通法にしたがって SEM (ERA-8800FE, エリオニクス) 観察を行った。

【成績および考察】

LLB の 24 時間群の接着強さは、エナメル質および象牙質のいずれの被着面に対しても対照群と同等の良好な接着強さを示した。LLB の 24 時間群の破壊形式は、エナメル質では歯質あるいはレジンの凝集破壊が散見されたが、象牙質では接着界面付近からの破壊が大勢を占めた。また、LLB の TC 群の接着強さは、エナメル質において 24 時間群と同等の値を示したものの、象牙質においては低下する傾向を示した。このことは、エナメル質および象牙質の構造あるいは構成成分の違いによるものと考えられた。さらに、被着歯面の湿潤状態が LLB の接着性に及ぼす影響は、エナメル質および象牙質ともに Dry 条件と Wet 条件においても同等の接着強さを示したことから、歯面の湿潤状態の影響を受けにくいことが示唆された。LLB の接着機構において、いずれの条件においても機能性モノマーの化学的作用が向上した可能性が考えられた。

【結論】

本研究の結果、試作フロアブルレジン修復システム LLB はエナメル質および象牙質いずれの被着体に対しても安定した接着強さを示すことが明らかとなった。また、被着歯面が湿潤状態であっても良好な接着が得られることから、臨床においても有用性の高いことが示唆された。

ファイバーポスの維持力に及ぼす直接法・直接間接法の影響

東京歯科大学歯科理工学講座
○副島寛貴、河田英司、小田豊

Influence of direct or direct-indirect techniques on retention force of post
Department of Dental Materials Science, Tokyo Dental College
○Soejima Hirotaka, Kawada Eiji, Oda Yutaka

[研究目的]

歯内療法処置歯にファイバー強化型コンポジットレジンポスト (FRC ポスト) を用い支台築造する方法が広く応用されている。しかし、FRC ポストとコンポジットレジンで作製したポストの維持力に関する報告は少ない。演者らはこれまでに、牛歯根管処置歯に直接法または直接間接法でポストを植立し、その接着初期 (1 日) での維持力を評価し、従来型接着性レジンセメントでは直接間接法で植立した方が大きいことを報告した。本研究では、セメントの後重合を考慮し、14 日間経過後のポストの維持力に及ぼす FRC ポストの植立方法の影響を明らかにすることを目的とした。

[材料と方法]

根管径が 3 mm 以下の牛歯歯根に通法に従って根管充填した。ポストスペースは直径 3 mm のドリルにて深さ 4 mm になるように形成した後に、18% EDTA で洗浄した。FRC ポストには Fibrekleer Post (φ1.5 mm : ペントロンジャパン) を用いた。直接法では、ボンディング材にハイブリッドコート 2 (サンメディカル) を用いて FRC ポストとポストレジン (サンメディカル) でポストを作製する方法 (SB-D)、従来型接着性レジンセメントとしてパナビア F2.0 (クラレメディカル : PA)、セルフアドヒーシブタイプとして SA ルーティング (クラレメディカル : SA) で根管処置歯に直接 FRC ポストを植立する方法 (それぞれ PA-D および SA-D) で植立した。直接間接法では、根管に分離材 (スーパーボンドセップ) を塗布し、FRC ポストとポストレジンを充填し、10 秒間光照射した後に、ポストを取り出し、4 方向からさらに光照射した。硬化させたポストは、スーパーボンド C&B (サンメディカル : SB)、PA または SA で水洗乾燥した根管処置歯に各メーカーの指示通りに合着した (SB-ID、PA-ID、SA-ID)。各セメントの使用法はメーカーの指示通りとした。試料は 37°C の水中に 14 日間静置し、各条件で 7 個ずつとした。

ポストを植立した根管処置歯はアクリルリングに固定した後に、万能材料試験機 (Autograph AG-I 20kN, 島津) を用い、クロスヘッドスピード 0.5 mm/min でポストの引抜き試験を行い、その最大荷重を維持力とした。引抜き試験後のポスト表面を光学顕微鏡 (VH-5000, Keyence) で破壊形態を観察、分類した。各種セメントにおいて、直接法と直接間接法で植立したポストの維持力は、t 検定により統計処理を行った ($\alpha=0.05$)。

[結果および考察]

ポストの維持力の平均は、SB-D : 185.7、SB-ID : 281.5、PA-D : 247.9、PA-ID : 267.4、SA-D : 139.1、SA-ID : 261.4 (単位 : N) となり、SB-D と SB-ID および SA-D と SA-ID に統計学的な有意差が認められた。引抜き試験後の破壊形態は SB-D では主にポストレジンと歯質の間での破壊を認め、PA-D および SA-D ではポストを形成しているセメントと歯質の間での破壊が 3 個であった。SB-ID および SA-ID ではポストレジンと歯質の間での破壊を 3 個認め、PA-ID では主にポストレジンの凝集破壊を含む混合破壊であった。

これまでの発表から接着初期での引抜き維持力と比較すると PA-D および SA-ID は 14 日間の浸漬により維持力の増加を示した。これは PA-D および SA-ID の 14 日後の破壊形態として混合破壊が増えたことからポストを形成するセメント自身の強さが向上したためと考える。今回の実験の結果から 14 日間の水中浸漬により SB-D はボンディング材と歯質間の接着強さが低下していると推測される。PA-D および SA-ID はともに、ポストを形成するセメント自身の強さの増加のみならず、根管壁との接着強さの増加がポストの維持力に影響したものと考える。

[結論]

異なった種類のセメントを用いて根管処置歯に植立した FRC ポストの維持力は、直接法・直接間接法にかかわらず水中保管することで増加するものと低下するものがあり、重合様式が関与しているものと示唆された。

[参考文献] 第 136 回保存学会春季学術大会抄録(P.64/B23-1710)、第 33 回歯内療法学会学術大会抄録(P.78/PO-15)

新規支台築造用レジンシステムにおける歯質接合界面のSEM観察

虎の門病院歯科

○杉崎順平、陶山雄司、森上 誠、宇野 滋、山田敏元

SEM observation on the resin / dentin interface of a newly designed core build-up system

Toranomon Hospital, Department of Dentistry

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

【研究目的】

近年、審美修復の増加や垂直性の歯根破折への懸念、金属アレルギーへの対応などにより、メタルコアよりも歯質に近似した弾性係数をもつコンポジットレジンを用いたレジンコアが選択される症例が増えてきている。それに伴い、各メーカーからはデュアルキュアタイプのボンディングシステムを含む支台築造用のレジンコアシステムが市販されている。このたび(株)松風から PRG 技術を応用した 2 種の流動性をもつオートミックスタイプのデュアルキュアレジンコアペースト(ビューティコアペースト、フローペースト)と 1 ステップタイプのデュアルキュアボンディングシステム(ビューティデュアルボンド)から構成される支台築造システムが市販された。今回われわれはこのシステムを用いた直接法による支台築造を行った際のレジンと象牙質との接合界面、またファイバーポストとの界面の様相について SEM 観察を行ったので報告する。

【材料と方法】

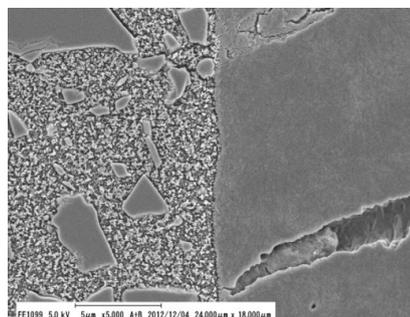
材料: 1. ビューティデュアルボンドはデュアルキュア型の 2 液 1 ステップタイプで、2 液を混和し歯面に塗布後 10 秒間の放置、弱圧〜中・強圧エアで乾燥後 10 秒間の光照射を行うというものである。

2. コア用レジンペーストはオートミックスシリンジにより直接根管内へ注入する。根管深部には流動性の高いフローペーストを用い、上部構造には流動性が低く賦形が容易なコアペーストを用いた。

方法: 単根のヒト抜去歯を歯頸部付近で切断し、抜髄操作後ファイバーポストドリルを用いて根管形成を行い、上記手順に従ってジーシーファイバーポストを用いてコアの築盛を行い接着試片とした。24 時間後試片は根管中央付近を通るように歯軸方向に縦断されエポキシ樹脂に包埋された。樹脂硬化後研磨された試片は通法に従いアルゴンイオンエッチングを施した後、レジンと象牙質との界面、ならびにレジンとファイバーポストとの界面を中心に FE-SEM を用いて観察を行った。

【結果および考察】

コア用レジンには 1-5 μm 程度の不定形なフィラーの間に 0.1 μm 程度の非常に細かなフィラーが高密度に充填されているのが観察された。また流動性の高いコアペーストの方がフローペーストと比べてフィラーの割合が多いのが確認された。象牙質との界面においてボンド層の厚さは極めて薄く、明瞭に判別できなかったものの、象牙質とは緊密な接合状態を示していた。コア用レジンとファイバーポストとの接合状態も良好で界面にギャップは観察されなかった。



レジンと根管内象牙質との接合界面

【結論】

(株)松風から市販された支台築造用コンポジットレジン“ビューティコア”は、2 種類の流動性を有したペーストにより容易に築盛が可能であり、しかもビューティデュアルボンドを用いることによって歯質やファイバーポストとの接着性も十分に満足できるものであることが判明した。また S-PRG 技術を応用したフッ素徐放性を有していることから臨床上有意義な材料である可能性が示唆された。今後、他社製品と比較した接着耐久性などについても検討していく予定である。

セルフエッチシステムの金属およびセラミックスへの接着耐久性

¹ 日本大学歯学部保存学教室修復学講座, ² 総合歯学研究所生体工学研究部門, ³ 福本歯科医院
○白土康司¹, 高橋史典¹, 清水裕亮¹, 遠藤 肇¹, 辻本暁正^{1,2},
坪田圭司^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 福本敬一³

Bonding durability of self-etch adhesive system on metals and ceramics

¹Department of Operative Dentistry, ²Division of a Biomaterials Science, Dental Research Center,
Nihon University School of Dentistry, ³Fukumoto Dental Clinic
○SHIRATSUCHI Koji¹, TAKAHASHI Fuminori¹, SHIMIZU Yusuke¹, ENDO Hajime¹,
TSUJIMOTO Akimasa^{1,2}, TSUBOTA Keishi^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2},
FUKUMOTO Keiichi^{1,3}

【研究目的】

接着システムの発展によって、操作ステップ数の簡略化が可能となった。最近では、歯質のみならず歯科用合金および歯科用セラミックスに対する接着性を有するものが製品化されている。とくに、MI の概念の普及に伴って、修復物をすべて除去することなく病変部のみを除去し、光重合型コンポジットレジンで修復を行う補修修復の頻度が増加している。この補修修復を行う際には、複数の被着体とコンポジットレジンとの間に確実な接着を得る必要があり、それぞれの被着体に適した前処理が必要とされてきた。しかし、臨床で被着体を厳密に区別して処理を行うことは困難であり、ステップ数の増加によってこれがテクニックセンシティブ因子になる可能性がある。このような背景のもと、様々な被着体に対し、最小限のステップにて接着を可能とする多目的接着システムである Scotchbond Universal Adhesive (3M ESPE) が製品化された。そこで演者らは、この多目的接着システムのセラミックス、金属に対する接着耐久性について、剪断接着試験および走査電子顕微鏡 (SEM) 観察を行うことにより検討した。

【材料および方法】

供試した接着システムは、多目的接着システムである Scotchbond Universal Adhesive (SUA) であり、比較として Rely X Ceramic Primer + Adper Easy Bond Self-Etch Adhesive (AEB, 3M ESPE) および GC Metal Primer or GC Ceramic Primer + GC C & B リペアーキット リペアーアドヒーシブ(GCR, GC)を用いた。コンポジットレジンとしては Clearfil AP-X(クラレノリタケ デンタル)を使用した。接着試験用試片の製作には、被着体に歯科用合金として 12%金銀パラジウム合金およびプレシヤスメタルを、セラミックスとしてはジルコニアおよび酸化アルミナを用いた。これらを常温重合型レジンに包埋し、表面を SiC ペーパー#600 まで研磨した。さらに表面に対してサンドブラスト処理を 5 秒間行った。被着面積を 4mm に規定し、製造者指示条件に従って表面処理を行った後、デュラコンモールドを固定しレジンペーストを充填、照射を行ったものを接着試験用試片とした。次いで、これらの試片は 37℃の精製水中に 24 時間保管、あるいは 24 時間保管後にサーマル試験機を用いて 5℃ - 55℃ (係留時間 30 秒間) を 1 サイクルとする温熱負荷を 10,000 あるいは 30,000 回負荷した後、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いてクロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件でその剪断接着強さを測定した。なお、試片の数は 10 個とし、それぞれの平均値および標準偏差を求めて、各条件間の有意差検定を有意水準 0.05 の条件で統計学的検定を行った。なお、各条件における破断面に関しては、通法に従って SEM 観察を行った。

【成績および考察】

24 時間後における金属に対する接着強さは、いずれの接着システムにおいても有意差は認められなかった。サーマルサイクル試験後については、24 時間後と比較して、サーマルサイクル回数の増加に伴って、その接着強さはいずれの接着システムにおいても低下する傾向が認められた。24 時間後におけるセラミックスに対する接着強さは、ジルコニアおよび酸化アルミナにおいて、SUA および AEB は GCR に比較して有意に高い接着強さを示した。サーマルサイクル試験後については 24 時間後と比較して、サーマルサイクル回数の増加に伴って、いずれのシステムにおいても低下する傾向を示したものの、SUA および AEB の低下傾向は GCR に比較して小さいものであった。

【結論】

本実験の結果から、多目的接着システムである Scotchbond Universal Adhesive は、金属およびセラミックスに対して、良好な接着耐久性を示すことが示された。

知覚過敏抑制材「ナノシール」による歯根面の脱灰抑制効果

¹大阪大学大学院歯学研究科 顎口腔機能再建学講座 (歯科理工学教室)

²大阪大学大学院工学研究科 マテリアル生産科学専攻

○宮嶋 宏行¹, 石本 卓也², 中野 貴由², 今里 聡¹

Effects of a desensitizing material Nanoseal to prevent demineralization of root surfaces

¹Department of Biomaterials Science, Osaka University Graduate School of Dentistry

²Division of Materials and Manufacturing Science, Osaka University Graduate School of Engineering

○Hiroyuki Miyajima¹, Takuya Ishimoto², Takayoshi Nakano², Satoshi Imazato¹

[研究目的]

超高齢社会を迎えて、歯をより長く保存し機能させることの必要性が高まる中、増加する高齢者の根面う蝕に対して効果的な予防法を確立することが重要な課題となっている。ナノシール (日本歯科薬品) は、Al-Ca-F-SiO₂ ガラスの水分散液とリン酸を等量混和して塗布することで、その凝集体が歯面に沈着するとともに、表層を脱灰しながら歯質由来の成分を取り込み、歯質と一体化した約 1 μm の薄膜を形成することを特徴とする無機系歯面処理材である。本材は、象牙質知覚過敏抑制を主用途として市販されたが、前述の反応による歯質の改質という材料特性を考慮すると、歯根面に塗布した場合にはう蝕の発生予防にも有効であるものと考えられる。そこで本研究では、根面う蝕予防におけるナノシールの有用性を検証することを目的として、酸による根面象牙質の脱灰に対する抑制効果を *in vitro* にて検討した。

[材料および方法]

ヒト抜去臼歯をエナメル-象牙質で切断し、5 × 5 × 5 mm の歯根ブロック試料を調製した。表面を耐水研磨紙にて研削して平坦にした後、ネイルバーニッシュを用いて 3 × 3 mm の開窓部を規定し、以下の脱灰試験に供した。

1. 酸への 72 時間浸漬による脱灰試験

開窓部にナノシールを塗布 (10 秒間を 2 回) した後、水洗し、ただちに pH 4.5 の酸性溶液に浸漬した。脱灰溶液を 24 時間ごとに交換しながら 37°C 下で 72 時間保管後、脱灰状態をナノシールを塗布せずに浸漬したコントロールと比較した。脱灰状態の評価は、マイクロフォーカス X 線 CT 装置 (SMX-100CT, 島津製作所) を用いて脱灰溶液浸漬前後に撮影を行い、二次元的および三次元的観察を行うとともに、得られた三次元データから、解析ソフト (TRI 3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング社) を用いて脱灰体積量を計測した。

2. pH サイクル系での脱灰試験

以下の 2 つの条件での脱灰状態を、前記 1 と同様の方法で評価した。

(I) 蒸留水を使用した pH サイクルによる検討: ナノシール塗布、非塗布 (コントロール) 試料を pH 4.5 の酸性溶液に 37°C で 24 時間浸漬した後、蒸留水 (pH 6.3) に 37°C で 24 時間浸漬した。次いで、酸性溶液に再度浸漬し、37°C で 24 時間保管した。

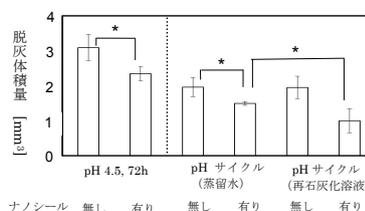
(II) 再石灰化溶液を使用した検討: (I) と同様のタイムスケジュールで、蒸留水の代わりに再石灰化溶液 (pH 7.0, 0.02 mol/l HEPES, 3.0 mmol/l CaCl₂, 1.8 mmol/l KH₂PO₄) を用いて試験を行った。

[結果および考察]

酸性溶液中で 72 時間連続的に脱灰を行った場合、ナノシールを塗布した群では、コントロールと比較して脱灰体積量が有意に少なかった (ANOVA, Student's *t* test, $p < 0.05$)。蒸留水を用いた pH サイクル系での実験においても、ナノシールを塗布した群ではコントロールと比較して脱灰体積量が有意に少ない結果となったが、再石灰化溶液を用いるとさらに脱灰が抑制された (右図)。ナノシールの塗布によって歯面に形成されたナノ粒子層は、酸に対するある程度のバリアとなる一方で、ナノシール層をイオンが透過し、表層直下に耐酸性層が形成されて脱灰を抑制したものと推察された。

[結論]

以上の結果から、ナノシールの塗布は根面象牙質の脱灰抑制に有効であることが示された。



象牙質知覚過敏抑制材 “ナノシール” の臨床評価

¹鶴見大学歯学部 総合歯科 ²医療法人財団 共生会 浅野歯科
○浅野倉栄 ^{1,2} 矢作保澄 ¹ 山口博康 ¹

Clinical Evaluation of Desensitizing Effectiveness of “Nanoseal”

¹ Department of General Dentistry and Clinical Education
Tsurumi University School of Dental Medicine
²Asano Dental Clinic
○Souei Asano^{1,2}, Hozumi Yahagi¹, Hiroyasu Yamaguchi¹

【目的】

新しい象牙質知覚過敏 (Dentin Hypersensitivity : Hys) 抑制材 ナノシールはブラシで歯面を擦る操作が必要なく、塗布して水洗するだけで、歯面にナノ粒子の層を形成し、象牙細管を封鎖してHys抑制効果を発現する新材料である。今回、我々は歯頸部及び露出根面のHysに対してナノシール適用による疼痛抑制効果を明らかにすべく、臨床評価を実施した。

【対象と方法】

Hysと診断された101症例を対象とし、歯頸部及び露出根面の象牙質にナノシールを塗布、水洗し、術前後の疼痛について評価を行った。診査は次回来院時 (1週間後) に行ない、冷氣刺激、擦過刺激による疼痛及び患者による飲食やブラッシング時など生活の中での誘発痛について、簡易型McGill痛みの質問表中のVisual Analogue Scale (VAS) 及び6段階に分類したPresent Pain Intensity (PPI) を用いて評価した。有効性はVAS値の変化とPPIの変化を加味して総合判定した。

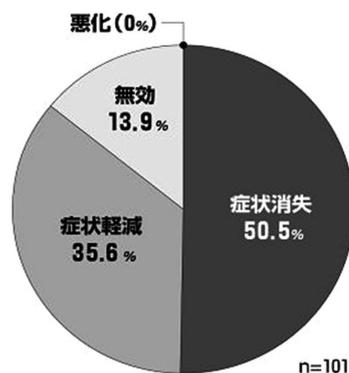
【結果】

- 1) VAS値の変化 : VASの平均値は術前の 32.7 ± 22.4 から 8.5 ± 9.7 に低下し、術前後で疼痛症状が有意に改善された (paired t-test : $p < 0.01$) .
- 2) PPIの変化 : PPIの平均スコアは術前の 1.7 ± 1.0 から 0.5 ± 0.5 に低下し、術前後での症状が有意に改善された (paired t-test : $p < 0.01$) .
- 3) 有効性の総合評価 : 101症例中、87症例 (86.1%) でナノシールのHys抑制効果が認められ、51症例 (50.5%) で症状が完全に消失した。
- 4) 安全性、利便性 : 全症例にわたって患歯、周囲歯肉および口腔粘膜への為害作用はなく、全身的副作用も認められなかった。操作性は良好で多少の唾液・血液であれば影響を受けず、隣接面や歯肉溝内にも使用できることが示された。

【結論】

Hys抑制効果と安全性、利便性が示され、ナノシールはHys抑制材として有用であると思われた。

分類	判定基準
症状消失	PPIが0(全く痛みなし)となった
症状軽減	PPIが1段階以上低下、もしくはVAS値が術前の50%以下に低下した
無効	PPIに変化がなく、VAS値が術前の50%以下に低下しなかった
悪化	術後のPPIが増加した



ナノシール適用後の有効性の総合評価

シングルファイル法とマルチファイル法における湾曲根管に 対する拡大形成の切削特性に関する研究

¹⁾ 日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学

²⁾ 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第1講座

○松田浩一郎¹⁾、新井恭子²⁾、北島佳代子²⁾、五十嵐 勝²⁾

Studies of shaping ability on single and multi file techniques in simulated curved canals

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

²⁾ Department of Endodontics, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University
○MATSUDA Koichiro¹⁾, ARAI Kyoko²⁾, KITAJIMA Kayoko²⁾ and IGARASHI Masaru²⁾

【目的】Ni-Ti合金製ロータリーファイル(以下Ni-Tiファイル)は超弾性を有し柔軟性に優れることから、根管の追従性が高く、根管の湾曲形態に沿った拡大形成が可能になると同時に、根尖部根管の偏位も少ない。近年、根尖孔の大きさを基準に1本のファイルを選択し、往復回転運動のできるロータリーエンジンに装着して使用するシングルファイル法が報告された。本研究は、拡大形成法の異なるファイルの切削特性を知るため、1本のファイルを往復回転運動で使用するRECIPROC(VDW、以下RE)とテーパの異なる複数本を正回転で使用するProTaper(DENTSPLY、以下PT)、および複数本を手用で使用するステンレススチール製Kファイル(ZIPPERER、以下SSK)を用い、透明樹脂製湾曲根管模型を拡大した時の作業時間、押し込み荷重、引き抜き荷重、根管形態変化および切削片の大きさについて比較検討した。

【材料と方法】実験に先立ちガラス管内に常温重合レジンでファイルを包埋し、自動精密切断機(ISOMET、BUEHLER、USA)でファイル先端部から1mm間隔で刃部終了部までの横断切片を作製し、デジタル画像撮影を行った。実験群はRE群(21mmのRE-R25の1本で拡大)、PT群(21mmのPT-S1、S2、F1、F2の4本で拡大)、SSK群(21mmのSSK-#15、20、25の3本で拡大)の3群とした。根管の拡大形成には、30度のJ字形湾曲を持つ透明樹脂製湾曲根管模型(ENDO-TRAINING-BLOC A0177、DENTSPLY)を27個使用した。拡大時の荷重測定には、測定可能範囲が $\pm 5,000$ gfのデジタルフォースゲージ(FGP-5、日本電産シンボ(株))を用い、測定間隔を100msecとし、拡大形成時間とともに記録した。拡大前と後の根管にメチレンブルー水溶液を注入し、模型の側方および後方から画像撮影を行い、拡大完了後の画像を画像処理ソフトで反転し、拡大前の画像と重ね合わせた後、画像解析ソフトを用い、側方では拡大された外湾部と内湾部の面積を、後方では左側と右側の面積を計測した。拡大形成中に排出された切削片は遠沈管に回収し、懸濁液を調整した後20 μ lをスライドガラスに滴下し、その個数と面積を画像解析ソフトで計測した。ステップ形成や根尖の詰まりで実験を中止した模型は、拡大前と中止時の重ね合わせ画像を作製して観察した。また、使用後のファイルは全て肉眼的に観察し、刃部の伸びの有無を確認した。拡大形成時間、押し込み荷重、引き抜き荷重における実験群の影響については一元配置分散分析を行った後、Games-Howellの方法で多重比較検定を行った。また、外湾部および内湾部の面積と左側および右側の面積については、対応のある二元配置分散分析を用い解析を行った。統計ソフトには、PASW Statistics 18(SPSS Japan、東京)を使用し、有意水準 α は0.05とした。

【結果および考察】総拡大形成時間は、3種類のファイル間すべてで有意差がみられ、REが最も短く、SSKはNi-Tiファイルの6倍以上であった。RE群、PT群はロータリーエンジンに装着し、ファイルを回転させることで切削を行うため、拡大形成を全て術者が手動で行うSSK群とは異なり、効率的に根管拡大を行うことができるためと考えられる。押し込み荷重と引き抜き荷重ともにPT、RE、SSKの順に有意に小さくなった。SSK群に比べNi-Tiファイル群で荷重が小さいのは、トルクコントロールエンジンを使用することによりファイルが自動的に根管内に進んでいくため、無理な力を加える必要がないためと考えられる。拡大形成後の根管形態変化は、SSKでは根管湾曲の外側と根管上部の内側に削り残しがあり、根管の直線化傾向がみられたのに対し、Ni-Tiファイルでは根管の全周にほぼ均等な切削が観察された。拡大形成中の根尖部への切削片の詰め込みやステップ形成は、SSKで生じたがREとPTではみられず、切削片の大きさはNi-Tiファイルの方が大きかった。

【結論】Ni-Tiファイルは湾曲根管の拡大形成を短時間に行うことができ、根管のほぼ均等な拡大形成ができるファイルであることが示された。

エアースケーラーによる根管治療
髓腔開拓から根管形成そして根管洗浄について

日本大学歯学部歯科保存学教室第2講座

日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

○明石俊和 林 誠 小木曾文内

Sabsonic Vibration for Access Cavity and Root Canal Preparation and Irrigation

Department of Endodontics , Nihon University School of Dentistry

○Toshikazu Akashi Makoto Hayashi Bunnai Ogiso

【はじめに】

振動系歯質切削器具には超音波振動と可聴域振動を利用した 2 種類の切削装置がある。ともに振動による歯質の切削であるが相違点はキャビテーション作用の有無である。とくに可聴域振動には切削効果が低く、またキャビテーション作用が発現しないので根管治療時の根管拡大・形成と洗浄には不向きとなっていた。しかし、歯科用エアースケーラーの進歩により現在は根管治療時の各種操作が行なえるまでに発展してきている。

すなわち、感染歯質除去、髓腔開拓に始まり側壁や髓角除去、根管口明示、根管拡大・形成などの操作には可聴域エンドチップの種類を目的別に選択し、根管治療時の各種操作を行なうことが出来る。

また、可聴域エンドチップを注水下で使用するとエンドチップの振動による水の攪拌と還流により根管口探索、根管内容物除去、再根管治療時の充填物除去、根管洗浄、拡大形成後の根管清掃が行なえる。

そこで可聴域振動装置であるナカニシ社製ティーマックス S970 エアースケーラーに各種可聴域エンドチップを装着し、髓腔開拓から根管口明示、根管拡大・形成、そして、根管系の洗浄・清掃について検討したので報告する。

【材料及び方法】

ティーマックス S970 エアースケーラーと専用可聴域エンドチップ V-S51D, V-S51, V-G71, V-G77 と試作可聴域エンドチップ V-NA1, V-NA2, V-NA3, V-NA4, V-NA5, V-NA6 を使用する。

A) ティーマックス S970 による根管形成手順と目的別可聴域エンドチップ

- 1) 髓室開拓と根管口明示 (V-G71, V-NA1, 2, 3, 4)
- 2) ストレートラインアクセスの確保 (V-G77, V-NA3, 4)
- 3) 作業長の決定 (#10 手用 K 型ファイル)
- 4) 根管のガイドグループ形成 (#10~#20 K 型ファイル, V-NA5, 6)
- 5) 根管上部 1/3 の根管形成 (V-S51D, V-NA3, 5, 6)
- 6) 根中央部 1/3 の根管形成 (V-S51D, V-NA5, 6)
- 7) 根尖部 1/3 の根管拡大・形成 (V-S51D, V-NA5, 6)
- 8) アピカルシート形成 (#35 K 型ファイル)

B) ティーマックス S970 による洗浄と可聴域エンドチップ

- 1) 髓室の洗浄 (V-G71, V-NA1, 2)
- 2) 根管洗浄 (V-S51)
- 3) 根管壁清掃 (V-G71, V-G77, V-NA1, 2, 3, 4)

【結果および考察】

- 1) 髓室開拓、根管口明示が出来る、2) 根管口上部 1/3 の根管形成が出来る、3) 根中央部 1/3 の根管形成が出来る、4) 根尖部 1/3 の根管形成が出来る、5) 根管洗浄が出来る、

可聴域エンドチップによる根管治療はヘット部が小さく患部の視野確保が容易であり、大白歯部の根管治療でも容易に操作することが出来る。すなわち可聴域エンドチップは感染歯質、髓腔開拓、髓角部、側壁除去、根管口の漏斗状拡大、エンド三角の除去が行える。また、回転切削より切削効果が劣ることにより過剰切削が予防できる。

ロータリー Ni-Ti シングルファイルや手用 K 型ファイルによる根管拡大は随時太いファイルに取替える必要がある。しかし、可聴域エンドチップによる根管形成は咬み込みによる切削ではなく振動による歯質破壊によるので、可聴域エンドチップは 1 種類 1 本で根管形成が完了する。また、可聴域エンドチップ振動時には超音波振動装置では発生するキャビテーションは発生しないが水の攪拌、還流作用により髓腔、根管洗浄が可能であった。

【結 論】

ティーマックス S970 エアースケーラーと各種可聴域エンドチップにより髓腔開拓から根管口明示、そして、根管形成・根管洗浄の操作が可能である。

低分子 BDNF 模倣化合物 LM22A-4 は TrkB シグナルを介して セメント芽細胞の分化を制御する

広島大学歯薬学総合研究科 先進医療開発科学講座 歯周病態学分野¹、
口腔顎顔面病理病態学²、広島大学病院 口腔検査センター³

○加治屋幹人¹、柏井 桂¹、竹下 慶¹、Nguyen Quon Trung¹、高田 隆²、北川雅恵³、藤田 剛¹、柴 秀樹¹、栗原
英見¹

Small molecule BDNF mimetic regulates cementoblast differentiation via TrkB signaling

○Mikihito Kajiya¹, Kei Kashiwai¹, Takeshita Kei¹, Nguyen Quon Trung¹, Takashi Takata², Masae Kitagawa³, Tsuyosi Fujita¹,
Hideki Shiba¹, Hidemi Kurihara¹

¹Department of Periodontal Medicine, ²Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Graduate School of Biomedical & Health
Sciences, Hiroshima University, ³Center of Oral Clinical Examination, Hiroshima University Hospital

<研究目的>

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、神経細胞のみならず、様々な細胞の増殖・分化をその高親和受容体である TrkB を介して制御することが知られている。これまでに、BDNF が TrkB-ERK シグナル伝達経路を介して歯周組織再生を促進することを、*in vivo*, *in vitro* の研究において明らかにしてきた(Takeda et al. 2005 *Tissue Eng*, Kajiya et al. 2008 *J Biol Chem*, Matsuda et al. 2012 *J Cell Physiol*)。一方、ごく最近になって、*in silico* スクリーニングの結果、BDNF の TrkB 活性化ドメインと類似構造体である化学物質 LM22A-4 が同定され、この LM22A-4 が神経系の細胞の TrkB を活性化し、神経保護作用を示すことが報告された (Massa SM et al., 2010 *J Clin Invest*)。これらの事実に基づき、BDNF 模倣化合物である LM22A-4 が歯周組織において TrkB-ERK シグナリングを活性化し、歯周組織再生を促進すると仮説を立てた。そこで、本研究では LM22A-4 のセメント芽細胞の分化に対する影響、およびその分子機構を明らかとするために実験を行った。

<材料と方法>

供試細胞は hTERT を導入し株化した不死化セメント芽細胞様細胞株(human cementoblast-like cells, HCEMs) (Kitagawa et al, 2006 *Bone*)を用いた。HCEMs に LM22A-4 (5 μM)を各種時間作用し、骨・セメント関連タンパク (Osteopontin (OPN), Alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC)) mRNA 発現をリアルタイム PCR にて、TrkB の構造変化を免疫沈降法にて、リン酸化 ERK の発現をウェスタンブロッティング法にて、ERK の局在を共焦点顕微鏡にて解析した。また、シグナル伝達経路の検討のため、Trk の阻害剤である K252a (100nM)もしくは MEK-ERK 阻害剤である U0126(10μM)は LM22A-4 作用の 30 分前に添加した。

<結果>

LM22A-4 は HCEMs における OPN, ALP, OC mRNA 発現を時間依存的に上昇させ、そのピークは 6 時間から 12 時間の間に認められた。また LM22A-4 作用 10 分後に、HCEMs において、TrkB のリン酸化、およびアダプター蛋白である Shc, GRB2, SOS1 との結合が確認された。同様に、LM22A-4 刺激がリン酸化 ERK の発現量を上昇させ、さらに ERK の核内への集積を促進した。また阻害剤である K252a および U0126 添加が、LM22A-4 によって促進した TrkB、ERK のリン酸化および OPN mRNA 発現の上昇を抑制した。

<考察および結論>

本研究から、BDNF 模倣化合物である LM22A-4 が TrkB-ERK シグナル伝達経路を活性化することによって、セメント芽細胞の分化を制御することが明らかとなった。LM22A-4 はセメント芽細胞の硬組織形成能を促進することによって歯周組織再生を誘導する可能性が示唆された。

サイトカインである BDNF(分子量 13.5kDa)と比較して、LM22A-4 は分子量 0.3kDa と非常に小さな分子であり、化学合成可能であるため、良好な組織浸透性や、安全かつ安価に合成されるなどの利点を有するため、サイトカイン療法に代わる、より有望な組織再生治療薬となり得る可能性が考えられる。

炎症性サイトカインはヒト歯肉上皮細胞において Lipid raft を介して発現する
広島大学大学院医歯薬保健学研究院 応用生命科学部門 歯周病態学
○今井遥香, 藤田 剛, 應原一久, 加治屋幹人, 内田雄士, 宮川剛史, 吉本哲也, 柴 秀樹, 栗原英見

**The influence of the expression of inflammatory cytokines via lipid raft
on human gingival epithelial cells.**

Department of Periodontal Medicine, Applied Life Sciences, Institute of Biomedical & Health
Sciences, Hiroshima University

○Imai H, Fujita T, Ouhara K, Kajiya M, Uchida Y, Miyagawa T, Yoshimoto T, Shiba H, Kurihara H.

【目的】歯周病は歯周病原細菌感染に対する宿主の免疫応答の結果として歯周組織が破壊される疾患である。歯肉上皮細胞は歯周病原性細菌の侵入に対して、物理的なバリアーとして、あるいは抗菌ペプチドなどを産生することによって防御的に機能する一方で、細菌刺激に対して炎症性サイトカインを産生し炎症の惹起に関与している。したがって歯肉上皮細胞の機能制御は、歯周病における炎症の抑制に関与する可能性がある。細胞膜は均一な脂質二重膜ではなく、いくつかの脂質が集合したマイクロドメインを形作っている。これらのマイクロドメインは caveolae や lipid raft と呼ばれ、多くの生理活性物質の受容体などが存在し、膜を介したシグナル伝達、細菌やウイルスの感染などに重要な役割を持ち、細胞膜における情報変換の中心的な部位と考えられている。本研究では歯周病治療における lipid raft の標的分子としての可能性を探索するため、歯周病原細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A.actinomycetemcomitans*)または tumor necrosis factor (TNF)- α 刺激における歯肉上皮細胞の lipid raft の炎症性サイトカインの発現への関与について検討した。

【材料および方法】不死化したヒト歯肉上皮細胞 OBA9 (大阪大学、村上伸也教授より供与)を実験に用いた。培地は Hu-mediaKB2 に insulin, human epidermal growth factor, gentamicin, hydrocortisone hemisuccinate を添加したものをを用いた。*A.actinomycetemcomitans* は 1%ホルマリンで 4°C、12 時間処理し、死菌としたものをを用い、TNF- α は RSD 社の human recombinant TNF- α を用いた。OBA9 をコンフルエントの状態まで培養し、*A.actinomycetemcomitans* (1×10^8 cell/ml)または TNF- α (50 ng/ml)を添加する 30 分前に lipid raft の主な構成脂質であるコレステロールを除去する Methyl- β -cyclodextrin(M β CD)または抗真菌薬の amphotericin B を作用させ、12 時間後に total RNA を回収した。IL-6, IL-8 mRNA 発現は、real-time PCR 法で解析した。

【結果および考察】M β CD 単独では 2mM 以下の濃度では歯肉上皮細胞において IL-6, IL-8 発現に影響を与えなかった。*A.actinomycetemcomitans* 刺激によって歯肉上皮細胞の IL-6, IL-8 の mRNA 発現が増加したが、M β CD の前処理によってその発現促進は抑制された。一方、TNF- α 刺激下では M β CD 作用においても炎症性サイトカインの発現促進を抑制しなかった。また、細胞膜に作用する抗真菌薬である amphotericin B も *A.actinomycetemcomitans* 刺激下の IL-6, IL-8 発現促進を抑制した。これらの結果から、lipid raft はヒト歯肉上皮細胞において、*A.actinomycetemcomitans* 刺激による炎症性サイトカインの発現に関与するが、TNF- α 刺激における炎症性サイトカインの発現には関与しないことが示唆された。

T-RFLP 法による高感度な細菌叢解析法確立のための Pilot Study

¹⁾ 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病態学分野, ²⁾ 岡山大学病院歯周科
○松永一幸¹⁾, 工藤値英子²⁾, 河田有祐²⁾, 前田博史¹⁾, 高柴正悟¹⁾

Pilot Study for Establishment of High Sensitive Analysis of Bacterial Flora

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

²⁾ Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital

○Kazuyuki Matsunaga¹⁾, Chieko Kudo²⁾, Kawata Yusuke²⁾, Hiroshi Maeda¹⁾, Shogo Takashiba¹⁾

【緒言】

感染性心内膜炎のような感染部位からの検体採取が困難な疾患では、一般的に、血液培養検査による起炎菌同定が行われている。しかし、血液培養では培養困難な微生物も存在するため、起炎菌の同定が困難な症例も少なくない。したがって、DNA を用いて細菌群を網羅的に解析することは、より多くの菌種・菌属同定を可能にし、起炎菌同定に繋がる可能性がある。

DNA を用いた細菌群の構造解析法には、DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法, TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) 法, T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 法およびマイクロアレイ法がある。これらの手法は、対象とする細菌群のうち高頻度に存在するものほど検出されやすい傾向にある。これは、DNA を用いた解析の前処理として行うことが多い PCR (Polymerase Chain Reaction) 法によって、細菌群内における細菌間の DNA 量差が拡大することに起因する。そこで今回、感染性心内膜組織での存在が報告されている歯周病原細菌を用いて、上記問題点を解決して T-RFLP 法による高感度な細菌叢解析法を確立したので報告する。

【材料および方法】

表 1: サンプルの調整基準 (copies/μl)

サンプル群	Aa	Pg	Pi
NFW	0	0	0
#1	0.4×10 ⁶	0.4×10 ⁵	0.4×10 ⁴
#2	0.4×10 ⁶	0	0.4×10 ⁵
#3	0.4×10 ⁶	0.4×10 ⁶	0.4×10 ⁶

1. 歯周病原細菌サンプル群の調整: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC4371 (Aa), *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277 (Pg) および *Prevotella intermedia* ATCC25611 (Pi) の歯周病原細菌の菌株を、前田らの手法 (Maeda et al., *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003) を用いて嫌気培養後、InstaGeneMatrix (Bio-Rad) を使用して DNA 抽出を行った。次に 3 菌種の DNA 濃度を表 1 に従って混和し、サンプル群を調整した。その後、調整した各サンプル群について、リアルタイム PCR 法を用いて菌種 DNA 量の確認を行った。

2. DNA normalization: Trimmer-2 cDNA normalization kit (Evrogen) を用いて DNA normalization を行った。

① DNA 溶液を 12μl ずつに分注し、各サンプルに 4μl の 4×Hybridization buffer を添加し、これらを PCR チューブに 4μl ずつ分注し、ミネラルオイル (SIGMA) を添加後、98°C で 2 分間熱変性した。

② その後一本鎖 DNA を 68°C で 5 時間再会合させ、duplex-specific nuclease (0.25 倍, 0.5 倍, 1 倍希釈) を用いて 68°C, 40 分間、2 本鎖 DNA を分解した。

3. DNA 量の定量: リアルタイム PCR 法 (Maeda et al., *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2003) を用いて、サンプル群間の DNA 量を定量し、DNA normalization 前後における DNA 量を比較した。

4. T-RFLP 法による菌種特異的 DNA の検出: T-RFLP 法 (Wael et al., 岡山歯誌, 2010) に従って、16S rRNA 遺伝子を標的として蛍光標識したプライマーを用いた PCR 法で DNA を増幅し、制限酵素 *Msp* I (TaKaRa) を用いて断片化した。ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて、各 DNA 断片の蛍光強度を測定した。この結果を比較することにより、用いた細菌の同定力を検討した。

【結果】

DNA normalization 後において、

1. 全てのサンプル群でそれぞれの歯周病原細菌の DNA 量は、DNA normalization 前よりも減少した。
2. また、菌種間の DNA 量の差も減少した。
3. T-RFLP 法による DNA 検出では、細菌種間の DNA 量差が大きい場合に検出が困難であった細菌種を検出できることが容易になった。

【考察および結論】

本研究では、DNA normalization によって細菌種間の DNA 量をある程度均一化できた。このように DNA 量を均一化すると、T-RFLP 法によって同定できる細菌種の数が増加することが明らかとなった。このことは、血液培養法では培養困難な細菌種の同定を可能にし、細菌叢内の細菌種の同定力の向上に繋がると考える。今回の検討では、1 種類の制限酵素を使用した。バックグラウンドノイズの低減と同定可能な細菌種を増加させるためにも、今後は複数の制限酵素間での比較検討が必要と考える。さらに、DNA normalization において使用する duplex-specific nuclease の適正濃度も調整することも今後の課題と考える。なお、T-RFLP 法では細菌の菌属までの同定に限られるため、最終的にはクローンライブラリー法を併用して細菌種を確実に同定する予定である。

カキタンニンのポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する抗菌効果

神奈川歯科大学 口腔治療学講座 保存修復学分野¹, 神奈川歯科大学 感染制御学講座 微生物学分野²,
東京理科大学 基礎工学部 生物工学科³, リリース科学工業株式会社⁴

○富山 潔¹, 向井義晴¹, 齋藤正寛³, 二瓶智太郎¹, 椎谷 亨¹, 飯塚純子¹, 長谷川晴彦¹, 倉持江里香¹,
寺中文字¹, 三宅 香¹, 熊田秀文², 渡辺清子², 中村健一⁴, 奥原正國⁴, 邊見篤史⁴, 浜田信城², 寺中敏夫¹

Antibacterial effect of the tannic acid extracted from astringent persimmon on polymicrobial biofilms

¹Div. of Restorative Dent, Dept. of Oral Medicine, ²Div. of Microbiology, Dept. of Infection Control, Kanagawa Dental College, ³Faculty of Industrial Science and Technology, Dept. of Biological Science and Technology, Tokyo University of Science, ⁴Rilis Co., Ltd.
○TOMIYAMA Kiyoshi¹, MUKAI Yoshiharu¹, SAITO Masahiro³, NIHEI Tomotaro¹, SHIYA Toru¹, IIZUKA Junko¹,
HASEGAWA Haruhiko¹, KURAMOCHI Erika¹, TERANAKA Ayako¹, MIYAKE Kaori¹, KUMADA Hidefumi², WATANABE Kiyoko²,
NAKAMURA Kenichi⁴, OKUHARA Masakuni⁴, HENMI Atsushi⁴, HAMADA Nobushiro², TERANAKA Toshio¹

【研究目的】

抗菌性を謳った修復材、歯面処理材および洗口剤などは、それぞれ特有の抗菌成分により、単一あるいは数種類の病原細菌への抗菌性や近接した歯質の脱灰抑制などに効果を発揮するとの研究報告がある。一方、浮遊菌と異なる性質を有するバイオフィルムは、抗菌作用を受けにくいことがわかっている。ポリフェノールに属するタンニンは、レンサ球菌、特に *S. mutans* の増殖を抑制することが報告されている。今回我々は、ポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する渋柿由来のタンニン酸を含有させた抗菌剤 (Pancil® PS-M: リリース科学工業株式会社) の抗菌効果を分析することを目的として、Exterkate らによる短期モデル (Caries Res, 2010) を応用し、ポリマイクロバイアルバイオフィルムの生菌数に与える影響について検討した。

【材料および方法】

ポリマイクロバイアルバイオフィルム形成用材料には直径 12 mm の円盤状ガラス試片を用いた。処理剤には、Pancil® PS-M および Corsodyl (0.2 vol% グルコン酸クロルヘキシジン: SmithKline) を滅菌脱イオン水により希釈した溶液を用いた。実験群は、非処理群 (陰性対照, cont), ② 5.0 mg/ml Pancil® PS-M 群 (1.0 mg/ml カキタンニン含 5P), 7.0 mg/ml Pancil® PS-M 群 (7P), 10.0 mg/ml Pancil® PS-M 群 (10P), 0.05%グルコン酸クロルヘキシジン (陽性対照, CHX) の 5 群とした (n=6)。ポリマイクロバイアルバイオフィルムの培養には、1 被験者から採取した刺激唾液を用いたポリマイクロバイアルバイオフィルムモデルを使用した。培養液には buffered McBain 2005 (0.2%スクロース, 50 mM PIPES) を用い、培養液の交換を 10 時間の時点で 1 回行なう嫌気培養 (CO₂: 10.0%, H₂: 10.0%, N₂: 80.0%, 37°C) を 24 時間行なった。培養 24 時間の時点で各処理剤 (5P, 7P, 10P, CHX) あるいは滅菌脱イオン水 (cont) に 5 分間浸漬後、ポリマイクロバイアルバイオフィルムを Cysteine Peptone Water にて洗浄して血液寒天培地に 4 日間培養し、実験終了時に生菌数の算定を行なった。算出した生菌数は 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、各群の抗菌効果を比較検討した。

【結果】

24 時間培養したポリマイクロバイアルバイオフィルムに 5P, 7P, 10P および CHX 各群の薬液を用いて薬液処理を行った結果、すべての薬液処理群におけるバイオフィルムの生菌数は cont と比較して有意に低く (cont= 6.96 × 10⁸, 5P= 1.49 × 10⁸, 7P= 1.15 × 10⁸, 10P= 7.53 × 10⁷, CHX= 8.47 × 10⁷, p < 0.05), Pancil® PS-M 処理はいずれの濃度においても CHX と同程度の抗菌効果を示した。各 Pancil® PS-M 群間で有意差は認められなかった (p>0.05) が、抗菌効果は濃度依存的に高くなる傾向が認められた。

【考察】

タンニン酸は、口腔レンサ球菌の中でも *S. mutans* に吸着し易く、*S. mutans* の発育阻止への効果や、歯質および修復物への付着抑制能の高いことが指摘されている。また、グルコン酸クロルヘキシジンは抗菌スペクトルが広く、特に *S. mutans* の発育阻止への効果が持続的であることが報告されている。今回、Pancil® PS-M 処理は、単一あるいは数菌種の浮遊菌やバイオフィルムに比較して抗菌剤の浸透が生じにくく、効果が及びにくいとされるポリマイクロバイアルバイオフィルムに対して、0.05%グルコン酸クロルヘキシジンと同程度の抗菌効果が示された。

【結論】

24 時間培養したポリマイクロバイアルバイオフィルムに Pancil® PS-M 処理を行なうことにより、バイオフィルム内の細菌の増殖を抑制することが確認されたため、本抗菌剤が口腔感染症に優れた効果を有する可能性が示唆された。

口腔常在レンサ球菌が産生する細胞外ヌクレアーゼの機能解析

大阪大学大学院 歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)¹
大阪大学大学院 歯学研究科 口腔分子感染制御学講座 (口腔細菌学教室)²
○住岡龍一¹、中田匡宣²、森田知里²、野杵由一郎¹、川端重忠² & 林美加子¹

Functional analysis of extracellular nuclease from oral commensal *Streptococcus*

Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry¹

Department of Oral and Molecular Microbiology, Osaka University Graduate School of Dentistry²

○SUMIOKA Ryuichi¹, NAKATA Masanobu², MORITA Chisato¹, NOIRI Yuichiro²,
KAWABATA Shigetada² & HAYASHI Mikako¹

【研究目的】

スケーリング・ルートプレーニング、PMTCといった一般的な歯科治療にとどまらず、日常の口腔清掃後におこる口腔内常在菌による菌血症が、亜急性細菌性心内膜炎の発症に関与することがあると考えられている。実際、心臓の病巣局所からは *Streptococcus sanguinis* をはじめとする口腔レンサ球菌が高頻度に分離される。他の口腔レンサ球菌種と比較して、*S. sanguinis* は多様な細胞壁架橋型の表層タンパクを産生することから、亜急性細菌性心内膜炎の発症過程において、これらの表層タンパクが血流での免疫回避や心組織への定着に機能する可能性がある。近年、好中球による細胞外殺菌機構として NETs (Neutrophil extracellular traps) が注目されており、口腔領域では歯周疾患との関係が報告されている。NETs は感染などにより活性化された好中球が細胞死と共に放出する網目状の構造物である。クロマチンや抗菌因子を含んでおり、細胞外空間における細菌の捕獲と排除に関係する。本研究では、*S. sanguinis* のヌクレアーゼドメインを有する表層タンパクに着目し、SWAN (*S. sanguinis* wall-anchored nuclease) と名付けた。今回、SWAN のヌクレアーゼ活性と NETs による殺菌への抵抗性を検討した。

【実験方法】

S. sanguinis SK36 株の染色体 DNA を用い、*swan* 遺伝子の^{上流と下流の DNA 断片を PCR 法で増幅・連結し、温度感受性プラスミドに挿入した。このプラスミドを SK36 株にエレクトロポレーション法で導入し、*swan* 欠失株を作製した。欠失の確認は部位特異的 PCR 法で行った。SWAN タンパクの細胞表層での発現を検討するため、野生株と *swan* 欠失株の細胞壁画分を抽出し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開後、抗 SWAN マウス抗血清を用いたウェスタンブロット法により SWAN タンパクを検出した。異種発現系を構築するため *Lactococcus lactis* の *swan* 遺伝子発現組換え株を作製した。そして、*S. sanguinis* 株と *L. lactis* 株の DNase 活性を検討するため、サケ精子 DNA を含む増殖寒天培地に菌を播種し、48 時間の培養を行った。1N の塩酸を反応させ、コロニー周囲の DNA 分解部位に生じるハローを指標に菌株の DNase 活性を検討した。次に、ヒスチジンタグを N 末端側に付与した組換え SWAN タンパクを作製した。組換え SWAN タンパクを用いて核酸分解能を電気泳動法により確認し、酵素活性の至適 pH および金属イオンの要求性を同様の方法で検討した。また、SWAN のホモログで保存されている推定活性残基 H527、D580、H623 および D656 をアラニンに置換した点変異組換えタンパクを作製し、一元放射状酵素拡散法 (single radial enzyme diffusion ; SRED assay) によりヌクレアーゼ活性を測定した。NETs を構成する DNA を SWAN が分解するかを確認するために、ヒト好中球に NETs を誘導し、組換え Swan タンパクを添加後、DNA の蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。さらに、*S. sanguinis* が SWAN 活性により NETs から殺菌を回避するかを検討するため、NETs に野生株もしくは欠失株を感染させ、経時的に生菌率を測定した。*L. lactis* 組換え株についても同様の解析を行った。}

【結果と考察】

野生株の細胞壁画分において SWAN は検出された。また、*swan* の欠失により菌体の DNase 活性は低下したことから、SWAN は *in vivo* において、細胞表層に発現するヌクレアーゼとして機能することが示唆された。一方、組換え SWAN タンパクは Mg^{2+} と Ca^{2+} の共存下で NETs DNA を含む各種 DNA と RNA を分解し、中性付近の pH で最も高い酵素活性が認められた。推定活性残基である H527、D580、H623 および D656 の点変異により酵素活性は消失したことから、これらの残基がヌクレアーゼ活性に必須であると推察された。NETs への感染実験では、野生株と比較して、SWAN 欠失株の生存率は有意に低下した。さらに、*L. lactis* を用いた同様の解析では、SWAN の発現により菌生存率は上昇した。よって、SWAN のヌクレアーゼ活性により、*S. sanguinis* は NETs による殺菌を回避することが示唆された。