

## 感染性心内膜炎発症患者における歯周病の進行度に関する横断的疫学調査

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯周歯内治療学分野  
○ 二宮雅美, 大石慶二, 橋本万里, 成石浩司, 永田俊彦

### A Cross-Sectional Study on the Progression of Periodontitis in Infective Endocarditis Patients

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

○ NINOMIYA Masami, OISHI Keiji, HASHIMOTO Mari, NARUISHI Koji, NAGATA Toshihiko

#### 【研究目的】

感染性心内膜炎 (infective endocarditis : IE) は心内膜や弁膜に細菌が感染することで発症し、細菌集簇を含む疣腫 (vegetation) を形成する全身性敗血症性疾患である。発症頻度は 10 万人あたり年間 1~5 例程度で、それほど頻度の高い疾患ではないが、的確な診断のもと適切な治療が奏効しないと重篤な合併症 (塞栓症、脳合併症、動脈瘤など) を引きおこし死に至る。細菌の感染経路として、口腔内細菌による血行感染が疑われているが、その詳細については不明な点が多く、クリニカルエビデンスは十分といえないのが現状である。

本研究では、徳島赤十字病院心臓血管外科と同院内にある山之内歯科・口腔外科に協力を頂き、同病院を受診した心臓弁膜症患者において、IE の発症歴の有無を調査するとともに、口腔内診査、X 線写真による歯槽骨レベルの診査、および指尖採血による歯周病原細菌の血清抗体価の測定を行うことで、歯周病の進行と IE 発症リスクとの関係を疫学的に明らかにすることを目的とした。

#### 【研究の方法】

研究を実施するにあたり、徳島赤十字病院臨床研究倫理審査委員会に申請し承認を得た。被験者は、徳島赤十字病院心臓血管外科を受診した心臓弁膜症患者のうち、本研究に同意が得られた 78 名 (男性 40 名 ; 64.2±14.4 歳、女性 38 名 ; 70.4±12.0 歳) を対象とした。徳島赤十字病院へ外向検診を行い、1) 患者の背景 : 年齢、性別、全身既往歴 (IE 発症歴、他の疾患歴)、喫煙歴、2) 歯科臨床検査 : 残存歯数、要抜歯数、パノラマ X 線写真による骨吸収率 (Schei の骨吸収率)、3) 指尖採血による歯周病原細菌の血清抗体価 (DEMECAL 血液検査セット : 株式会社リージャー) を調査した後、臨床データベース化した。IE 発症群と未発症群から得られたデータは、Wilcoxon の順位和検定を用いて有意差の有無を評価した。また、IE 発症と関連する因子を解析するために、ロジスティック回帰分析を行った。

#### 【結果】

被験者のうち 7 名 (男性 5 名、女性 2 名) に IE 発症歴があった。残存歯数を測定した結果、IE 発症群は 11.4±4.8 本であるのに対し、IE 未発症群は 20.7±7.0 本で、IE 発症歴のある患者は有意に残存歯数が少なかった。また、要抜歯数を測定した結果、IE 発症群は 3.9±2.1 本であるのに対し、IE 未発症群は 1.6±2.4 本で、IE 発症歴のある患者は有意に要抜歯数が多かった。X 線写真による診査では、IE 発症群の骨吸収率は 64.3±16.5% であるのに対し、IE 未発症群は 34.5±16.4% で、IE 発症歴のある患者は有意に骨吸収が進行していた。一方、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P.g*) の血清抗体価は IE 発症群の 100%、IE 未発症群の 43.6% の被験者において基準値 (基準値 1.68 ; 参考文献 JDR 91(12),2012) より高値であった。しかし、IE 発症群の抗体価は 4.8±3.3、IE 未発症群は 5.8±13.1 であり、その平均値には有意差は認められなかった。ロジスティック回帰分析では、残存歯数および骨吸収率が IE 発症と関連していた。

#### 【考察および結論】

以上の結果から、感染性心内膜炎を発症した心臓弁膜症患者は、歯槽骨吸収が進行しており、残存歯数が少なく要抜歯数が多い傾向が認められ、歯周病が進行していた。また、歯周病原細菌 (*P.g*) に対する血清抗体価が基準値より高値の被験者の割合が多かったことから、感染性心内膜炎の発症と歯周感染に関連がある可能性が示唆された。

謝辞 : 本研究の遂行にあたり、ご協力を頂きました徳島赤十字病院心臓血管外科・福村好晃先生および山之内歯科・口腔外科・山之内浩司先生に深謝致します。

## スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は S1PR2 受容体を介して 骨芽細胞における Smad1/5/8 リン酸化及び Runx2 発現を促進する

九州大学大学院歯学研究院 歯周病学分野  
○東 克匡、松崎 英津子、橋本 陽子、西村 英紀

### Spingosine-1-phosphate induces phosphorylation of Smad1/5/8 and up-regulates Runx2 expression through S1PR2 in osteoblast-like cells

Department of Periodontology, Faculty of Dental Science, Kyushu University  
○Katsumasa Higashi, Etsuko Matsuzaki, Yoko Hashimoto, Fusanori Nishimura

#### 【研究目的】

スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) は血漿中に多く存在する脂質メディエーターの一つである。S1P は S1PR1-5 の 5 種類の S1P 受容体と、それに共役する G タンパク質を介しシグナルを伝達し、分化・増殖など多彩な細胞応答を引き起こす。これまでに、S1P の破骨細胞前駆細胞の遊走制御を介した骨吸収抑制作用が明らかとなっているが、演者らは、S1P が PI3K/Akt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路を介して、骨芽細胞における alkaline phosphatase (ALP) 発現を促進することを明らかにした。

現在、骨芽細胞における S1P シグナル伝達経路に関与する S1P 受容体の検索を行っているが、S1P による PI3K/Akt/ $\beta$ -catenin シグナル伝達経路の活性化には、S1PR1 が重要であることを報告した (第 139 回日本歯科保存学会学術大会)。一方、ALP の発現調節には、S1PR1 及び S1PR2 が関与していることが明らかとなった。すなわち、S1P による ALP の発現調節には、PI3K/Akt/ $\beta$ -catenin 経路のみならず、S1PR2 を介したシグナル伝達経路が関与する可能性がある。

ALP の発現調節には、BMP-2 シグナル伝達経路が関与することが知られており、この経路においては Smad1/5/8 リン酸化が重要な役割を果たしている。近年、S1P が ERK1/2 リン酸化を介し BMP-2 シグナル伝達経路を促進するという報告があるが、演者らは S1P が BMP-2 非存在下で ERK 非依存性に、Smad1/5/8 リン酸化を増加させることを確認した (第 140 回日本歯科保存学会学術大会)。

そこで本研究では、Smad1/5/8 リン酸化と、同シグナルの標的遺伝子であり ALP の上流に存在する Runx2 の発現に着目し、S1P の影響について検討した。また、これに関与する S1P 受容体の検索を行うこととした。

#### 【材料および方法】

実験にはマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。細胞をプレートに播種し、翌日無血清培地に交換、さらに 24 時間培養した。その後、S1P (2  $\mu$ M) を添加した。

S1P 受容体刺激伝達の阻害には、S1PR1、S1PR2 siRNA 及び S1PR1、S1PR2 の阻害剤 W146、JTE-013 を用いた。

タンパク質発現については Western blot 法、mRNA 発現については real-time RT-PCR 法を用いて検討した。

#### 【結果および考察】

MC3T3-E1 細胞において、S1P は Smad1/5/8 リン酸化及び Runx2 mRNA、タンパク質発現を増加させた。また、S1P による Smad1/5/8 リン酸化の促進と Runx2 発現増加は、S1PR2 の阻害により減少したが、S1PR1 の阻害では影響が認められなかった。

以上の結果から、骨芽細胞における S1P による Smad1/5/8 リン酸化の促進及び Runx2 発現増加には S1PR2 が関与する可能性が示された。

S1P は、S1PR2 とそれに共役する G<sub>12/13</sub> タンパク質を介して RhoA/ROCK 経路を活性化することが知られている。一方、RhoA/ROCK の活性化と Smad1/5/8 リン酸化との関与が報告されていることから、現在、S1P による S1PR2 を介した Smad1/5/8 リン酸化を媒介するシグナルとして、RhoA/ROCK に着目し、検討を行っている。

#### 【結論】

骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 において、S1P は S1PR1-PI3K/Akt/ $\beta$ -catenin 経路のみならず、S1PR2 を介したシグナルにより Smad1/5/8 リン酸化及び Runx2 発現を増加させ、ALP 発現増加に関与する可能性がある。

### 骨芽細胞様分化における Activin A の作用は前骨芽細胞と歯根膜細胞とで相反する

<sup>1</sup>九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野、<sup>2</sup>九州大学病院歯内治療科、

<sup>3</sup>アデレード大学歯学部歯周病学講座

○杉井英樹<sup>1</sup>, 前田英史<sup>2</sup>, 友清淳<sup>3</sup>, 和田尚久<sup>2</sup>, 門野内聡<sup>1</sup>, 長谷川大学<sup>1</sup>, 濱野さゆり<sup>1</sup>, 祐田明香<sup>1</sup>, 吉田晋一郎<sup>1</sup>, 赤峰昭文<sup>1,2</sup>

#### Activin A reversely works between human pre-osteoblastic cells and periodontal ligament cells on their osteoblastic differentiation.

<sup>1</sup>Department of Endodontology and Operative Dentistry, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University, <sup>2</sup>Department of Endodontology, Kyushu University Hospital,

<sup>3</sup>Colgate Australian Clinical Dental Research Centre, School of Dentistry, University of Adelaide.

○Hideki Sugii<sup>1</sup>, Hideo Maeda<sup>2</sup>, Atsushi Tomokiyo<sup>3</sup>, Naohisa Wada<sup>2</sup>, Satoshi Monnouchi<sup>1</sup>, Daigaku Hasegawa<sup>1</sup>, Sayuri Hamano<sup>1</sup>, Asuka Yuda<sup>1</sup>, Shinichiro Yoshida<sup>1</sup>, Akifumi Akamine<sup>1,2</sup>

【研究目的】Activin A (ACTA)は、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )superfamilyに属する inhibin $\beta$  の 2 量体タンパクであり、細胞増殖、遊走、分化を通して様々な組織の治癒に関与していることが明らかにされている。第 138 回歯科保存学会にて私達は、ACTA の発現が、傷害を受けた歯根膜組織において傷害 3 日後に上昇し、さらに ACTA はヒト歯根膜細胞 (HPDLCs) の骨芽細胞様分化を抑制する一方、線維芽細胞様分化を促進したことから、ACTA が歯周組織の治癒に働く可能性があることを示唆する報告を行った。そこで本研究では、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$ ) がヒト前骨芽細胞の ACTA 発現に及ぼす影響を解析し、さらに ACTA がヒト前骨芽細胞の分化に及ぼす影響を、その阻害薬である Follistatin (FST) を用いて HPDLCs に及ぼすそれと比較することを目的とした。

【材料および方法】矯正治療を目的に本院を受診し、本研究に同意を得られた患者の抜去歯より歯根膜組織を採取し、10%Fetal Bovine Serum 含有の $\alpha$ -MEMにて4-7継代培養した歯根膜細胞(HPDLC)、ならびに前骨芽細胞としてヒト骨肉腫細胞株(Saos2, Riken)を本研究に用いた。(1) Saos2 における Activin receptor- I a, - I b, - II a, - II b の遺伝子発現を半定量的 RT-PCR 法にて、また抗 ACTA 抗体を用いて免疫細胞化学的染色法にて解析を行った。(2) 炎症病態下での前骨芽細胞における inhibin $\beta$  の遺伝子発現を解析するために、炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$ ) にて刺激した Saos2 における inhibin $\beta$  の遺伝子発現について定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。(3) ACTA および FST の存在下で、Ca を含有した骨芽細胞誘導培地にて培養した HPDLCs または Saos2 における骨関連遺伝子 (BSP, OCN, RUNX2) の発現解析ならびに Alizarine red S 染色を行った。なお本研究は九州大学大学院歯学研究院倫理委員会の承認を得て実施された。

【結果】(1) Saos2 において、4 種類の Activin receptor の遺伝子発現、および抗 ACTA 抗体に対する陽性反応を認めた。(2) IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$  刺激 (24, 48 時間) した Saos2 は、inhibin $\beta$  の発現を有意に促進した。(3) ACTA は骨芽細胞誘導培地にて培養した HPDLCs における骨関連遺伝子の発現ならびに Alizarin red S の陽性反応を抑制したが、FST との同時投与により、骨芽細胞誘導培地にて培養した群と同程度まで回復した。一方、同条件下で、ACTA は Saos2 の骨関連遺伝子の発現ならびに Alizarin red S の陽性反応を促進し、FST との同時投与でその促進効果は消退し、骨芽細胞誘導培地にて培養した群と同程度の値を示した。また、FST のみを投与した骨芽細胞誘導培地にて培養した HPDLCs および Saos2 において、骨関連遺伝子の発現ならびに Alizarin red S の陽性反応は非投与群と比較して有意な差を認めなかった。

【考察】Saos2 は ACTA を発現しており、さらに炎症性サイトカイン刺激によって、HPDLCs と同様に Saos2 においても、ACTA の発現を促進したことから、炎症条件下では骨芽細胞が ACTA の発現を亢進することが示唆された。また、ACTA は HPDLCs の骨芽細胞様分化に対して抑制的に働く一方、Saos2 においては促進的に働き、FST は、これらに対して阻害的に働くものと考えられる。したがって、ACTA の骨芽細胞分化に対する影響は、受容体の種類または細胞内シグナル伝達の違いによって異なるものと推察される。

【結論】(1) Saos2 は ACTA 蛋白質および 4 種類の Activin receptor 遺伝子を発現している。(2) Saos2 は炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$  または TNF- $\alpha$ ) 刺激下で、inhibin $\beta$  の遺伝子発現を促進する。(3) ACTA は HPDLCs の骨芽細胞様分化を抑制する一方、Saos2 の骨芽細胞様分化を促進する。また両細胞において、FST により ACTA の作用は阻害される。

## S-PRG フィラー抽出液によるマウス歯周炎モデル予防効果の解析

東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野

○小林 洋子、安倍 翔大、折本 愛、齋藤 正寛

### Effect of S-PRG Filler Eluate on the Ligature-induced Mouse Periodontitis Model

Division of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry

○IWAMATSU-KOBAYASHI Yoko, ABE Shota, ORIMOTO Ai and SAITO Masahiro

#### 【研究目的】

う蝕および歯周炎治療において、抗菌性歯科材料を用いて口腔内の細菌活性を抑制することでう蝕および歯周炎の予防を目指した保存治療技術が開発されている。これらの歯科材料の中でも S-PRG フィラー(松風社製)は、コンポジットレジンなどに配合することにより、フッ素、ストロンチウム、ホウ素、ナトリウム、アルミニウム、ケイ酸イオンを徐放・再取り込みが可能であり、プラークの形成を阻害や歯周病原菌 (*P. Gingivalis*, *F. Nucleatum*) の活性化を抑制することが知られている。しかし、これまで動物疾患モデルを用いて抗菌性歯科材料の静菌効果は解析されていないため、in vivo における細菌感染の抑制効果は明らかにされてこなかった。

そこで、S-PRG フィラー抽出液に含まれる金属イオンの静菌効果を解析する目的に、マウス歯周炎モデルに着目した。歯周炎モデルとして、歯周病原菌を歯肉に数日おきに局所投与あるいは摂取させて歯肉へ菌を定着させるモデルと、絹糸を結紮することで歯肉溝に細菌を持続的に付着させて歯周炎を誘発するモデルがある。本研究では、マウス第二臼歯に結紮を行うことで迅速な骨吸収を伴う歯周炎モデルを用いて、S-PRG フィラー抽出液による歯周炎予防効果を解析したので報告する。

#### 【材料および方法】

①S-PRG フィラー抽出液の作製：S-PRG フィラー抽出液は、等量の蒸留水中で 24 時間、室温にて攪拌した後、濾過ならびに遠心により上清を分離することで作製した。

②マウス歯周炎モデル：生体内で歯周炎を再現するために、生後 8 週齢の C57BL/6 マウス下顎第二臼歯歯肉溝に全身麻酔下で実体顕微鏡を用いて S-PRG フィラー抽出液を浸漬した 5-0 絹糸を挿入した。コントロールとして、S-PRG フィラー抽出液浸漬なしの絹糸を用いた。手術 14 日後に屠殺し、下顎を摘出し、マイルドホルムにて固定を行った。

③画像解析：マイクロ CT を撮影し、骨吸収量を定量的に解析した。マイクロ CT は㈱クレハ分析センターに依頼し、3次元解析ソフト(AVIZO)を用いて解析した。

④組織解析：試料を蟻酸-クエン酸脱灰し、通法に従い、厚さ 5  $\mu$  m のパラフィン連続切片を作成した。H-E 染色を施し、光学顕微鏡(Leica CTR6000)にて観察した。

#### 【結果】

①画像解析：M2 結紮による歯周炎誘発を解析するため、マイクロ CT を用いて観察したところ、結紮 3, 7, 14 日で経時的に M1 および M2 の骨吸収量が増加し、歯槽骨頂端-セメントエナメルジャンクション(ABC-CEJ)の距離が結紮 14 日後で有意に増加していた。結紮 14 日後において、S-PRG フィラー抽出液を浸漬した糸を結紮した群では、コントロール群でみられる骨吸収と比較して歯槽骨吸収の抑制が観察された。

②組織解析：H-E 染色の結果から、マウス歯周炎モデルにおいて、M2 周囲ならびに M2 分岐部の歯槽骨に吸収がみられ、歯根上部の歯根膜線維配列の乱れと好中球の細胞浸潤が観察され、歯周組織の全体的な破壊が確認された。S-PRG フィラー抽出液を浸漬した糸を用いた群では、コントロールと比べて、いずれの破壊程度も軽度であった。

【考察】本研究結果により、S-PRG フィラー抽出液の各種イオンはマウス歯周炎モデルにおいて静菌効果による組織破壊を抑制している可能性を示した。今後さらに、歯周組織の破壊に関する炎症細胞浸潤あるいは破骨細胞の組織学的解析、S-PRG フィラー局所投与方法の開発、歯周炎モデルを引き起こす細菌叢に対する S-PRG フィラーの影響、ならびに歯周組織への金属イオン取り込みの解析等が必要であることが示唆された。

【結論】S-PRG フィラー抽出液は、マウス歯周炎モデルにおける歯槽骨吸収を抑制し、歯周炎予防効果を有することが確認された。

## *Streptococcus sanguinis* が産生する過酸化水素は好中球の細胞死を誘導する

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)<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 (口腔細菌学教室)<sup>2</sup>  
○住岡龍一<sup>1, 2</sup>、中田匡宣<sup>2</sup>、野杵由一郎<sup>1</sup>、川端重忠<sup>2</sup>、林美加子<sup>1</sup>

### Hydrogen peroxide produced by *Streptococcus sanguinis* induces neutrophil cell death

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

Department of Oral and Molecular Microbiology, Osaka University Graduate School of Dentistry<sup>2</sup>

○SUMIOKA Ryuichi<sup>1, 2</sup>, NAKATA Masanobu<sup>2</sup>, NOIRI Yuichiro<sup>1</sup>,  
KAWABATA Shigetada<sup>2</sup>, HAYASHI Mikako<sup>1</sup>

#### 【目的】

歯科治療や口腔清掃後に一過性の菌血症は日常的に起こるとの報告がある (1, 2)。特に心疾患ハイリスク患者では、菌血症が感染性心内膜炎の原因になる。これまで感染性心内膜炎の病巣から、*Streptococcus sanguinis* を含む mitis group streptococci が高頻度に分離されてきた。

*S. sanguinis* はピルビン酸オキシダーゼ (SpxB) の酵素活性により H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を産生する。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による貪食細胞 DNA の傷害は、免疫能低下による感染性心内膜炎の発症に寄与する可能性がある (Figure 1)。そこで本研究では、mitis group streptococci の特徴である H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 産生能に着目し、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が主要な血中貪食細胞である好中球の生存と菌体貪食に及ぼす影響について検討した。

#### 【材料および方法】

*S. sanguinis* SK36 株を親株として、*spxB* 欠失株を作製した。まず、野生株と *spxB* 欠失株の過酸化水素産生量をペルオキシダーゼ法で測定した。次に、健常ヒト末梢血およびヒト好中球に各菌株を感染させ、経時的に生存菌数を算出した。過酸化水素の好中球に対する細胞毒性を検討するため、ヒト好中球に各菌株を感染させた後、経時的に細胞障害の指標となる乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の培養上清への放出量を測定した。さらに、ヒト好中球に各菌株を感染させ、DNA の蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡により好中球の細胞死形態を観察した。

#### 【結果および考察】

*spxB* 欠失株の過酸化水素産生量は、野生株と比較して有意に減少した。ヒト末梢血および好中球への感染実験において、*spxB* 欠失により菌体の生存率は低下した。また、*spxB* 欠失株による好中球の LDH 放出量は、野生株と比較して有意に減少した。これらの結果から、*S. sanguinis* が産生する過酸化水素は、好中球による殺菌への抵抗性に寄与することが示唆された。また、蛍光顕微鏡にて感染好中球を観察した結果、NETs (Neutrophil extracellular traps) を含む好中球の細胞死が認められた。NETs は、感染等により活性化された好中球が細胞死と同時に放出する細胞外殺菌機構であり、細胞外空間における細菌の捕獲と排除に関与する。以上の結果から、*S. sanguinis* が産生する過酸化水素は NETs を含む好中球の細胞死を誘導し、好中球の殺菌に抵抗することが示唆された。

文献 (1) Wilson, W. *et al.*, 2007, *Circulation* 116: 1736-1754.

(2) Wray, D. *et al.*, 2008, *Br Dent J* 204: 555-557.

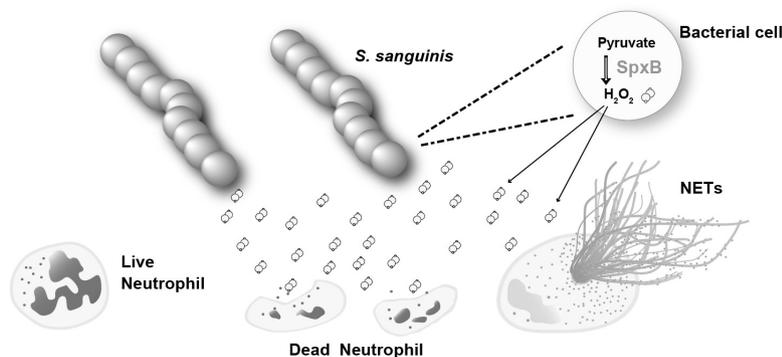


Figure 1: Hydrogen peroxide produced by *Streptococcus sanguinis* induces neutrophil cell death.

## 口腔内カメラの映像を見ながら行う窩洞形成 第1報：ミラーを見ながら行う従来の窩洞形成との比較

鶴見大学歯学部保存修復学講座<sup>1</sup>  
藤江デンタルクリニック<sup>2</sup>

○藤江 英宏<sup>1,2</sup>, 藤江 進<sup>2</sup>, 英 将生<sup>1</sup>, 齋藤 渉<sup>1</sup>, 林 応璣<sup>1</sup>, 桃井 保子<sup>1</sup>

### Cavity Preparation with Live Video Captured by an Intraoral Camera Report 1: a Comparison with Conventional Cavity Preparation Using a Dental Mirror

Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine<sup>1</sup>  
Fujie Dental Clinic, Yokohama, Japan<sup>2</sup>

○FUJIE HIDEHIRO<sup>1,2</sup>, FUJIE SUSUMU<sup>2</sup>, HANABUSA MASA<sup>1</sup>, SAITO WATARU<sup>1</sup>, HAYASHI OKI<sup>1</sup>, MOMOI YASUKO<sup>1</sup>

【緒言】一般に上顎大臼歯の窩洞形成を直視で行おうとした場合、窩底面や近心壁など見えない部分が多くなる。また、術者は不自然な前傾姿勢を強いられることになる。そこで一般的には左手にミラーを持ち、ミラーで見ながら窩洞形成する方法が推奨されている。しかし、その方法は簡単な技術ではない。私たちは左手に口腔内カメラを持って撮影しその動画映像を見ながら右手で治療する方法を考案し、第133回本学術大会で報告した。今回の研究では歯学部の学生を対象者としてマネキンを用い、デンタルミラーで人工歯を見ながら行う窩洞形成と口腔内カメラのビデオ映像を見ながら行う窩洞形成のどちらが正確であるかを調べた。

【材料および方法】鶴見大学歯学部保存修復学の授業および実習を終了した4年生、24人を対象者とした。対象者は授業で7時間、ミラーで見ながら窩洞形成するトレーニングを行い、さらに実験の直前にも30分間のトレーニングを受けた。一方、口腔内カメラを使った窩洞形成のトレーニングは実験前に2時間30分行った。実験では左上6番の人工歯(A2AN-95、ニッシン)がマネキンに装着され、対象者は12時の位置からタービンハンドピースにインレー形成用のダイヤモンドポイント(301、松風)を装着して窩洞形成する。この人工歯は咬合面が平坦になっていて、中央に十字のラインが描かれている。対象者はその十字のラインの内側を削り、ラインからはみ出して切削しないように指示された。1本目の人工歯はデンタルミラーを左手に持ってミラーで人工歯を見ながら形成させた。2本目の人工歯は口腔内カメラ(サテライトスコープDP6 ver. 2、アールエフ)を左手に持ち人工歯を撮影し、液晶テレビ(アクオスLC-13S1-S、シャープ)に映った人工歯のビデオ映像を見ながら右手で窩洞形成させた。なお、テレビの映像は作業しやすくするために、上下反転映像を使用した。評価方法としては形成後に2人のインストラクターがそれぞれの対象者が2つの方法で窩洞形成した人工歯を肉眼で見比べ、どちらの方法で形成した人工歯が十字のラインからはみ出しが少ないかを基準に優劣を判断した。統計解析は $\chi^2$ 乗検定を用いて行った。窩洞形成の時間については対象者が窩洞形成を終了したと自分で判断するまでの時間を測定した。2つの方法にかかった時間についてはウイルコクソンの符号付順位和検定を行った。

【結果】2人のインストラクターの判断は24人の対象者すべてについて一致し、次のようになった。24人の対象者の内、21人は口腔内カメラのビデオ映像を見ながら窩洞形成した方が優れていた。残りの3人はミラーで見ながら窩洞形成した方が優れていた。口腔内カメラで見ながら行う窩洞形成はミラーで見ながら行う窩洞形成と比較して有意水準0.1%で有意に優れていた。窩洞形成にかかった時間についてはミラーを見ながら行った場合、2分38秒(±79秒)、口腔内カメラのビデオ映像を見ながら行った場合、2分30秒(±52秒)であった。有意差水準5%で有意差は認められなかった。

【考察】口腔内カメラを左手に持って撮影し、そのビデオ映像を見ながら右手で窩洞形成する方法では見える映像が明るく数倍～20倍に拡大されている上に、ミラーと比較して視野も広くて死角も少ないため作業しやすい。また、診療姿勢にゆとりがあり、椅子の背もたれに背中を付けた、ごく自然で疲れない姿勢で作業できる。また、今回の実験で比較的容易に短時間でマスターできることが示唆された。以上のようにこの手法は利点が多く、今後、窩洞形成のみならず、多くの歯科治療分野で取り入れられることが期待される。

【結論】口腔内カメラのビデオ映像を見ながら行う左上6番の窩洞形成はミラーで見ながら行う窩洞形成と比較して事前のトレーニング時間が短いにもかかわらず、有意に正確であることが示された。

## オフィスブリーチング後のエナメル質に対するフッ化物歯面塗布の効果

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯科保存学教室<sup>1</sup>、兵庫医科大学歯科口腔外科学講座<sup>2</sup>  
○福山麻衣<sup>1</sup> 川本千春<sup>1</sup> 橋本直樹<sup>1</sup> 大木彩子<sup>1</sup> 松田康裕<sup>1</sup> 池田考績<sup>1</sup> 清水明彦<sup>2</sup> 佐野英彦<sup>1</sup>

### Effect of topical fluoride application on enamel after office-bleaching

Department of Restorative Dentistry, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine<sup>1</sup>, Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine<sup>2</sup>  
○FUKUYAMA MAI<sup>1</sup>, KAWAMOTO CHIHARU<sup>1</sup>, HASHIMOTO NAOKI<sup>1</sup>, OKI SAIKO<sup>1</sup>, MATSUDA YASUHIRO<sup>1</sup>, IKEDA TAKATSUMI<sup>1</sup>, SHIMIZU AKIHIKO<sup>2</sup>, SANO HIDEHIKO<sup>1</sup>

#### 【目的】

近年、審美的な関心により、ホワイトニングのニーズが高くなってきている。その一方で、オフィスブリーチングでは高濃度の過酸化水素を主成分とし、エナメル質表層を脱灰されると言われている。その脱灰抑制のため、ホワイトニング直後のエナメル質へのフッ化物歯面塗布が有効と考えられる。本研究ではオフィスブリーチング材の Hi-Lite (松風) によるホワイトニング後のエナメル質表面に対し、フッ化物歯面塗布がおよぼす影響を押し込み硬さ試験と TMR 分析を用いて経時的に評価した。

#### 【材料および方法】

##### 1) 試料の作製

ヒト下顎前歯を頬舌的に半切し、分割面をネイルパーニッシュにより被覆した。試料の処理方法により以下の4群に分けた。(1) コントロール群: 処理を行っていない群 (C)、(2) ホワイトニング群: ホワイトニングのみを行った群 (W)、(3) PRG パーニッシュ群: ホワイトニング直後にイオン除放性 S-PRG フィラー含有パーニッシュタイプ 1 (松風) を塗布した群 (W/PRG)、(4) フローデン A 群: ホワイトニング直後にフローデン A (サンスター) を塗布した群 (W/F)。

ホワイトニングは 35% 過酸化水素 (Shofu Hi-Lite; 松風) を用いて、添付指示書に従い 3 回の塗布を行った。その後、各群の試料は口腔内の環境を想定した pH サイクル環境下で保管した。pH サイクルには脱灰溶液 (0.2M 乳酸、3.0mM CaCl<sub>2</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH4.5)、再石灰化溶液 (0.02M HEPES、3.0mM CaCl<sub>2</sub>、1.8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、130mM KCl、pH7.0) を用いた。サイクル数は 1 日に 6 回で、各サイクル間のインターバル、及び pH を稼働させない時間 (約 8 時間) は再石灰化溶液に浸漬した。

##### 2) 押し込み硬さ試験

カリオテスター (三栄エムイー) を用い、圧子はエナメル質用 (R=10 μm) を使用した。測定は pH サイクルを開始した最初の 24 時間は 1 サイクル毎、その後 1 週間は 1 日毎、その後は 1 週間毎 4 週間まで行った。硬さは、圧子が押し込まれた深さ (D μm) を求め、清水らによる換算式  $KHN=6839D^{-1.409}$  により、ヌーブ硬さ (KHN) に換算した。

##### 3) TMR (Transverse Microradiography) によるミネラル分析

前述の 4 群と同様の処理を行った試料は、pH サイクル浸漬前に歯軸に平行に切断し、厚さ 200 μm に調整した。材料を塗布した面を除く全ての歯面をワックスにて被覆し、pH サイクル環境下に浸漬した。TMR は試料作製後、pH サイクル 2、4 週後に撮影し、画像解析ソフトを用いて解析し、エナメル質の脱灰量 IML (integrated mineral loss) (Vol% × μm) の変化を検討した。IML の増加量 (Δ IML) は Kruskal-Wallis 検定を用いて統計解析を行った。(p < 0.05)

#### 【結果および考察】

押し込み硬さ試験ではホワイトニングを行った全ての群でホワイトニング直後に硬さは減少するが、フッ化物歯面塗布材料を使用した群 (W/PRG 群・W/F 群) では pH サイクル 1 サイクル後にホワイトニング前の硬さに戻り、その後の硬さは一定であった。それに対し、フッ化物歯面塗布材料を使用していない群 (C 群・W 群) では pH サイクル 4 サイクル後まで減少し、その後の硬さは一定であった。Δ IML は 4 週間後、W 群は C 群、W/PRG 群と比較し有意に高い値を示した。また、W/F 群は他の群と有意差を認めなかった。TMR 画像観察では、C 群、W 群で表層に軽度の脱灰が認められ、W/PRG 群においてはほとんど脱灰を認めなかった。W/F 群は主に表層下脱灰を認めた。

W/PRG 群は押し込み硬さの値が高く、TMR による評価でも脱灰量が少ないため、脱灰が抑制されたと示唆される。

## 試作ユニバーサル接着システム (GBU-500) の基本的接着性能

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>

○辻本暁正<sup>1,2</sup>, 鈴木崇之<sup>1</sup>, 土屋賢司<sup>1</sup>, 植田浩章<sup>1</sup>,  
金澤智恵<sup>1</sup>, 平井一孝<sup>1</sup>, 高見澤俊樹<sup>1,2</sup>, 宮崎真至<sup>1,2</sup>

### Bonding Performance of Experimental Universal Adhesive System (GBU-500)

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry<sup>1</sup>,

Division of Biomaterials Science, Dental Research Center<sup>2</sup>,

○TSUJIMOTO Akimasa<sup>1,2</sup>, SUZUKI Takayuki<sup>1</sup>, TSUCHIYA Kenji<sup>1</sup>, UETA Hirofumi<sup>1</sup>,

KANAZAWA Tomoe<sup>1</sup>, HIRAI Kazutaka<sup>1</sup>, TAKAMIZAWA Toshiki<sup>1,2</sup>, MIYAZAKI Masashi<sup>1,2</sup>

#### 【研究目的】

近年、歯質接着システムとして、シングルステップアドヒーズの臨床使用頻度が増加している。これらのアドヒーズには、更なる歯質接着性の向上およびユニバーサル化への臨床的要求も増加し、新たな製品の開発が望まれている。試作ユニバーサル接着システム (GBU-500) は、歯面処理時間が短縮されるとともに複数の被着体に対して接着を可能としたシングルステップアドヒーズであり、既存の製品と比較してその臨床操作性をより簡便化したものである。これによって、更なるテクニックセンシティブ因子の低減化が望めるとともに複数の被着面を有する補修修復などへの臨床応用が可能となるものと期待される。

そこで、試作ユニバーサル接着システム (GBU-500) の歯面処理時間が歯質接着性に及ぼす影響および補修修復を想定し、セラミック、ジルコニアおよび歯科用合金に対する接着性について検討した。

#### 【材料および方法】

##### 1. 接着システムおよび被着試片

シングルステップアドヒーズは、GBU-500 (以後 GU, GC), G-Bond Plus (以後 GB, GC), 歯面処理時間の影響を検討するための対照として Clearfil tri-S Bond ND Quick (以後 CT, Kuraray Noritake Dental) および異なる被着体に対する接着性を検討するための対照として Scotch Bond Universal Adhesive (以後 SU, 3M ESPE) の、合計 4 製品を用いた。

被着試片としては、ウシ下顎前歯の歯冠部エナメル質および象牙質、IPS empress CAD (以後 EP, Ivoclar Vivadent), IPS e.max CAD (以後 EM, Ivoclar Vivadent), IPS e.max ZirCAD (以後 EZ, Ivoclar Vivadenti) およびキャストウェル M. C. 12% ゴールド (以後 PD, GC) の 6 種類とした。

##### 2. 接着試験

ウシ下顎前歯歯冠部エナメル質および象牙質の平坦面を SiC ペーパーの #600 まで研磨を行い、被着面とした。これらの被着体に対し、アドヒーズ処理を 0, 5 および 10 秒間行い、エアブローし、光照射を行った。次いで、直径 2.4 mm のデュラコン型を静置し、レジンペーストを填塞、光照射し、接着試験用試片とした。これらの試片は、37°C 精製水中に 24 時間保管後、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いて剪断接着強さを測定した。

また、シングルステップアドヒーズの異なる被着体に対する接着性の検討を行うため、EP, EM, EZ および PD の平坦面を SiC ペーパーの #600 で研磨し、15 秒間リン酸エッチング後、水洗を行い、被着面とした。これらの被着体に対し、通法に従って接着試験用試片を製作し、24 時間保管後、万能試験機を用いて剪断接着強さを測定した。

##### 3. 接合界面およびアドヒーズ処理面の SEM 観察

通法に従って試片を製作し、FE-SEM (ERA-8800FE, Elionix) を用いて、加速電圧 10kV の条件で観察した。

#### 【成績および考察】

供試したシングルステップアドヒーズのエナメル質および象牙質に対する接着強さは、GU で歯面処理時間の影響は認められないものの、GB および CT で歯面処理時間の延長に伴って有意に高い値を示した。また、供試したシングルステップアドヒーズの異なる被着体に対する接着強さは、いずれの製品においても EZ において有意差は認められなかった。一方、GU における EP, EM および PD に対する接着強さは、GB および SU と比較して有意に高い値を示した。このことは、アドヒーズの組成成分および配合率の違いに影響を受けた可能性がと考えられた。

#### 【結論】

試作ユニバーサル接着システム (GBU-500) の歯質に対する接着強さは、アドヒーズの歯面処理時間に影響を受けなかった。また、これらの接着システムは、セラミック、ジルコニアおよび金属に対しても良好な接着性を示した。

## Er:YAG レーザーアブレーション法によって形成されたアパタイト膜の象牙細管封鎖効果

近畿大学生物理工学部<sup>1</sup>, 大阪歯科大学歯科保存学講座<sup>2</sup>

○本津茂樹<sup>1</sup>, 山本衛<sup>1</sup>, 加藤暢宏<sup>1</sup>, 西川博昭<sup>1</sup>, 保尾謙三<sup>2</sup>, 吉川一志<sup>2</sup>, 山本一世<sup>2</sup>

Dentinal tubule sealing effect of the apatite film deposited by the Er:YAG laser ablation method.

Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University<sup>1</sup>,

Department of Operative Dentistry, Osaka Dental University<sup>2</sup>

○ HONTSU Shigeki<sup>1</sup>, YAMAMOTO Ei<sup>1</sup>, KATO Nobuhiro<sup>1</sup>, NISHIKAWA Hiroaki<sup>1</sup>, YASUO Kenzo<sup>2</sup>,

YOSHIKAWA Kazushi<sup>2</sup>, YAMAMOTO Kazuyo<sup>2</sup>

### 【研究目的】

現在、象牙質知覚過敏症の治療にはレジン塗布法やレーザー照射法により象牙細管を封鎖する方法が用いられているが、前者は有機成分によるアレルギー反応の問題や生体親和性の問題があり、後者はレーザーの照射出力の設定が難しく、高エネルギーだと患部の炭化が起り、低エネルギーだと治療効果が認められないという問題がある。象牙細管の封鎖は、象牙質上に歯質の主成分であるハイドロキシアパタイト(HAp)で人工エナメル質を形成して行うことが理想であるが、HAp 同士の固着は非常に困難なため、HAp による封鎖は未だ実現するには至っていない。これまで歯科分野では、「Er:YAG レーザーは歯質や歯石の削除に使用するもの」との認識であったが、我々はこの Er:YAG レーザ(波長: 2940nm)を、口腔内レーザーアブレーション(PLD)法に応用することで、歯質上に直接 HAp 膜を形成することを試みている。本研究では、エナメル質の喪失により生じる象牙質知覚過敏症の治療法として、小型の PLD ユニットを作製し、Er:YAG-PLD 法によって作製した HAp 膜の象牙細管の封鎖効果について評価したので報告する。

### 【材料および方法】

Fig.1 に実験に使用した小型 Er:YAG-PLD ユニットを示す。用いた Er:YAG レーザーは Erwin AdvErl(モリタ製作所)で、レーザーエネルギーは 250 mJ、繰り返し速度は 10 pulses/s、コンタクトチップは C400F(改造型)、照射時間は 10min とした。HAp 前駆体のリン酸カルシウム系ターゲットとして 7mm×7mm、厚さ約 3 mm の $\alpha$ -リン酸三カルシウム( $\alpha$ -TCP)を用いた。膜堆積用の



Fig 1. Compact Er:YAG laser ablation unit.

象牙質として、ヒト抜去歯から切り出した象牙質ディスク(厚さ 1 mm)を用い、表面のスマイヤ層を除去する目的で蒸留水にて 10%に調整した次亜塩素酸ナトリウム水溶液(キシダ化学)を 30 秒間作用させ、流水下で 5 秒間水洗後、蒸留水で 1 分間の超音波洗浄を行い、象牙細管を開口させたものを用いた。次に、塩酸により pH を 4.0 に調整したリン酸カルシウム水溶液を象牙質ディスク上に塗布し、膜が均一になるようにチップを動かしながら、前述の成膜条件で $\alpha$ -TCP 膜を成膜した。堆積後に $\alpha$ -TCP 膜を HAp 化するために水を塗布するとともに、象牙細管内に常に水分が供給させている状態を保って静置した。堆積後 5 日目に象牙質透過抑制率の測定を行った。測定には、Pashley らが報告した象牙質透過抑制測定装置を用いた[1]。ディスク試料を装置に固定し、膜の堆積前後の Dentinal fluid の移動量を測定することでシート貼付による透過抑制率を算出した。試料数は 4 である。

### 【結果および考察】

堆積した $\alpha$ -TCP 膜は約 3 時間ではば HAp 膜になることを確認した。Fig.2 は膜堆積後の象牙質表面の写真であり、膜は半透明であった。得られたデータより求めた象牙質透過率抑制率は  $85.6 \pm 8.62\%$ であった。レジンを用いた場合の象牙質透過抑制率は一般的に 70~80%とされていることから、本手法で得られたアパタイト膜の封鎖効果は十分に大きいことがわかる。よって、Er:YAG-PLD 法によるアパタイト膜形成手法は、象牙質知覚過敏症の治療に有用な手段になると思われる。

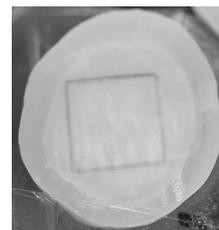


Fig 2. Dentin surface after film formation.

### References

[1] Pashley DH et al. *Arch Oral Biol*, 30, (1985) 731

## Er:YAG レーザー照射した象牙質に対して良好な接着性を示すレジン接着システムの開発 について

### — レジン添加型ガラスイオノマーセメントの接着性について —

愛知学院大学歯学部保存修復学講座

○鶴田あゆみ, 成橋昌剛, 堀江 卓, 松井 治, 富士谷盛興, 千田 彰

### A study of the development of the adhesive system specific to Er:YAG-lased dentin

### — Bonding performance of resin-modified glass-ionomer cements —

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

○Tsuruta Ayumi, Naruhashi Masayoshi, Horie Taku, Matsui Osamu, Fujitani Morioki, Senda Akira

#### 【緒言】

痛みを生じない程度の低出力で Er:YAG レーザー照射した象牙質面には構造欠陥や熱変性層が生じ、レジン接着は阻害されることが明らかにされている(播磨ら: 第 108, 109 回日本歯科保存学会). 一方, 修復用のレジン添加型ガラスイオノマーセメント (RMGI) の接着性についてはこれらと異なり低下しないとの報告がある(峯ら: 第 17 回日本レーザー歯学会). しかし, 接着試験後の破壊形態の詳細な分析などにより, 接着強さが低下しなかった理由の検討はなされていない. さらに, レジン修復時の接着材, あるいはライニングに用いる RMGI の Er:YAG レーザー照射象牙質に対する接着性についての研究はほとんどなく, とくに構造欠陥や熱変性層との関連や照射条件の相違が接着強さや破壊形態に及ぼす影響などについて詳細に検討した報告はない. そこで本研究は, Er:YAG レーザー照射象牙質に対し, 良好な接着性を示すレジン接着システムの開発を目的に, 各種条件で照射した象牙質に対する RMGI の接着性について, レジン系接着材の場合と比較検討した.

#### 【材料および方法】

新鮮抜去ウシ前歯唇側根面部に調製した象牙質平坦面 (#600) に, Er:YAG レーザー (アーウィンアドバール, モリタ) により低出力照射 (50 mJ/1 pps), 中出力照射 (150 mJ/1 pps) およびフィニッシング照射 (50 mJ/1 pps 照射後, 150 mJ/1 pps で仕上げ照射) を施した. 次いで, これら照射面ならびに非照射面を, Self-Conditioner/ Fuji Lining Bond LC (FLB 群), および Self-Conditioner/ Fuji Lining LC (FL 群), あるいは G-Bond Plus (G 群) で処理した後 Clearfil AP-X を充填し, 微小引張接着試験を行った. 得られた接着強さは Dunnet の多重比較検定および, Fisher の PLSD 法を用いて統計処理を行った ( $p=0.05$ ). また, 接着試験後の破壊形態 (実体顕微鏡にて), および接合界面の様相 (SEM にて) の観察も行った.

#### 【結果および考察】

G 群では, 低出力照射, 中出力照射およびフィニッシング照射のいずれのレーザー照射条件においても, 非照射の場合よりも有意に低い接着強さを示した ( $p<0.05$ ). また, 象牙質とレジンボンディング材との接合状態は良好でギャップ等は観察されなかったが, レーザー照射の影響を被った象牙質からボンディング材層にわたる亀裂が多数発生しており, それに起因したと思われる混合破壊 (象牙質とボンディング材) がほとんどの試片に認められた. したがって, レジンボンディング材の場合, レジンの重合収縮などによる歪みは接着界面に集中したものと考えられた. 一方, FLB 群および FL 群では, 低出力照射は非照射の場合よりも有意に低い接着強さを示したものの, 中出力照射およびフィニッシング照射は非照射とほぼ同等の接着強さを示した ( $p<0.05$ ). また, いずれのレーザー照射条件でも RMGI はレーザー照射象牙質と良好な接合状態を示したが, RMGI 内部における亀裂が多数認められ, 接着試験後の破壊形態として RMGI 内凝集破壊あるいは同部位から象牙質に及ぶ混合破壊が多く観察された. これらのことから, RMGI が内部歪みの緩衝層となり接着界面には集中しなかったと推察され, その結果安定した接着性が得られたものと考えられる.

#### 【結論】

本研究の条件下では, RMGI の接着性は, 照射条件に関わらず現用のレジン系レジン接着システムよりも安定することが判明した. したがって, レーザー照射象牙質に対するレジン接着システムとしての RMGI の有用性が示唆された.

## ポリマイクロバイアルバイオフィームに対するホームブリーチング剤の殺菌効果 —培養期間延長モデルにおける検討—

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 歯蝕制御修復学講座<sup>1</sup>, 神経組織発生学講座<sup>2</sup>, 歯学教育学講座<sup>3</sup>, 微生物感染学講座<sup>4</sup>  
○長谷川晴彦<sup>1</sup>, 富山 潔<sup>1</sup>, 河田 亮<sup>2</sup>, 熊田秀文<sup>3</sup>, 飯塚純子<sup>1</sup>, 倉持江里香<sup>1</sup>,  
椎谷 亨<sup>1</sup>, 東 一善<sup>2</sup>, 寺中敏夫<sup>1</sup>, 高橋 理<sup>2</sup>, 浜田信城<sup>4</sup>, 向井義晴<sup>1</sup>

### Antimicrobial effects of home-bleaching agents on polymicrobial biofilms

#### —Influence of extended biofilm culture period—

Department of Cariology and Restorative Dentistry<sup>1</sup>, Department of Histology<sup>2</sup>, Department of Education<sup>3</sup>, Department of Microbiology<sup>4</sup>,  
Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University

○HASEGAWA Haruhiko<sup>1</sup>, TOMIYAMA Kiyoshi<sup>1</sup>, KAWATA Akira<sup>2</sup>, KUMADA Hidefumi<sup>3</sup>, IIZUKA Junko<sup>1</sup>, KURAMOCHI Erika<sup>1</sup>,  
SHIYA Toru<sup>1</sup>, HIGASHI Kazuyoshi<sup>2</sup>, TERANAKA Toshio<sup>1</sup>, TAKAHASHI Osamu<sup>2</sup>, HAMADA Nobushiro<sup>4</sup>, MUKAI Yoshiharu<sup>1</sup>

【目的】過酸化尿素を主成分とするホームブリーチング剤がブラッシング後の残存したプラークに対して殺菌性を発揮するのであれば、歯の漂白効果だけでなく、齲蝕や歯周病予防効果も期待できる。第140回本学会において、多菌種で構成される口腔バイオフィームに近似した細菌叢を再現できる“ポリマイクロバイアルバイオフィームモデル”を用いて、24時間培養後のバイオフィームに対する過酸化尿素的殺菌効果を報告した。今回、培養期間を延長した72時間培養バイオフィームに対する過酸化尿素およびホームブリーチング剤の殺菌効果を検討した。

【材料及び方法】① 試料作製：特注で作製した24-well culture plateの上蓋内面に取り付けたクランプにカバーガラス（直径12mm, 厚さ0.15mm）を固定後、121°Cで15分間滅菌処理を行った。② ポリマイクロバイアルバイオフィーム作製：バイオフィームの形成は、健康な被験者1名の刺激唾液を用い、Exterkateらの方法（Caries Res 2010）に従った。即ち、唾液を添加させたbuffered McBain 2005（0.2% スクロース含有）培養液中にカバーガラスを懸架し、37°Cで72時間培養した。なお、培養液の交換は10時間および14時間で1日2回行った。③ 薬液の調整：滅菌蒸留水で希釈した0.5%, 2.5%, 5%, 10% 過酸化尿素水溶液（0.5 CP, 2.5 CP, 5 CP, 10 CP）および0.5% HiLite Shade Up（0.5 HS, 松風）ならびに0.5% Opalescence Regular（0.5 OR, Ultradent Products）を作製した。また、陽性コントロールとしてCORSODYL（0.2 CH, 0.2% グルコン酸クロルヘキシジン配合洗剤, GlaxoSmithKline）、0.2% フッ化ナトリウム溶液（0.2 NF）および陰性コントロールとして滅菌脱イオン水を用いた（Cont）。④ 生菌数の測定：カバーガラスに付着したバイオフィームを各薬液に浸漬した。処理時間はCont, 0.5 CP, 2.5 CP, 5 CPおよび10 CPを30分間、0.2 CHおよび0.2 NFを臨床の手順に従い5分間行った。処理後、Cysteine Peptone Water（CPW）にて3回洗浄し、CPW浸漬下で90秒間の超音波処理により付着バイオフィームを剥離、分散させた後、血液寒天（トリブチケースソイ寒天培地（TSA）培地上に播種して生菌数（CFU/ml）を算定した（各群 n=20）。算定値の統計処理はSpearmanの順位相関係数により、過酸化尿素的濃度と細菌数の関係性を有意水準0.1%にて評価した。また、ホームブリーチング剤の殺菌効果の比較を有意水準5%でGames-Howellにより行った。⑤ CLSM観察：Cont, 0.5 CP, 10 CP処理後、各バイオフィーム試料をLive/Dead染色用キットにて染色後、封入し、共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）にて各バイオフィームを表層、中間層、深層に分けて、過酸化尿素的濃度による生菌と死菌の状態を観察した。

【結果】CP間では濃度依存的に細菌数の減少が認められ、特に10 CPではTSA培地上で細菌の発育が認められなかった。ホームブリーチング剤である0.5 HSと0.5 ORはContと0.2 NFより有意な生菌数の減少が確認され、0.2 CHと同程度の殺菌効果が認められた。尚Contと0.2 NF間の有意な差は認められなかった。CLSM画像解析では10 CPがバイオフィームの深層においても多くの死菌が確認された。

【考察】過酸化尿素水溶液は72時間培養後のバイオフィームに対して生菌数とCLSM画像に濃度依存的な殺菌効果が確認された。この結果は、過酸化尿素的の分解過程で生じる過酸化水素由来のヒドロキシラジカルやヒドロペルオキシラジカルなどの強いフリーラジカルによるものと考えられる。今回使用したホームブリーチング剤は通常使用濃度の20倍希釈したものであり、処理時間も30分間という比較的短い作用時間にもかかわらず、0.2% クロルヘキシジンと同程度の殺菌効果が示された。以上の結果から、HiLite Shade UpとOpalescence Regularは齲蝕や歯周病予防にも効果が期待できるものと考えられた。

【結論】ホームブリーチング剤は、デンタルプラークに対する殺菌効果が認められたことから、漂白効果のみならず、齲蝕および歯周病の予防も期待できる。

## 各種修復材料におけるポリマイクロバイアルバイオフィルムの付着性 (II)

### —表面粗さの違いによる付着性—

<sup>1</sup> 神奈川県立歯科大学大学院歯学研究科臨床・バイオマテリアル講座, <sup>2</sup> 歯制御修復学講座, <sup>3</sup> 微生物感染学講座,

<sup>4</sup> 顎咬合機能回復補綴医学講座, <sup>5</sup> 横須賀・湘南地域災害医療歯学研究センター

○寺中文字<sup>1,5</sup>, 富山 潔<sup>2,5</sup>, 熊田秀文<sup>3,5</sup>, 三宅 香<sup>1,5</sup>, 芹田 枝里<sup>1,5</sup>, 大橋 桂<sup>1,5</sup>,

清水統太<sup>4,5</sup>, 向井義晴<sup>2,5</sup>, 浜田信城<sup>3,5</sup>, 二瓶智太郎<sup>1,5</sup>

### Polymicrobial biofilms formation on restorative dental materials (II)

<sup>1</sup>Dept. of Dental Clinical Biomaterials, <sup>2</sup> Dept. of Cariology and Restorative Dentistry, <sup>3</sup>Dept. of Prosthodontic Dentistry for Function of TMJ and Occlusion, <sup>4</sup>Dept. of Microbiology, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University,

<sup>5</sup>Institute for Research of Disaster Medicine in Yokosuka and Shonan

○TERANAKA Ayako<sup>1,5</sup>, TOMIYAMA Kiyoshi<sup>2,5</sup>, KUMADA Hidefumi<sup>3,5</sup>, MIYAKE Kaori<sup>1,5</sup>, SERITA Eri<sup>1,5</sup>, OHASHI Katsura<sup>1,5</sup>, SHIMIZU Tota<sup>4,5</sup>, MUKAI Yoshiharu<sup>2,5</sup>, HAMADA Nobushiro<sup>3,5</sup>, NIHEI Tomotaro<sup>1,5</sup>

【研究目的】一般的に、デンタルプラークは被着体の表面自由エネルギー (SFE) の影響により付着すると報告されている<sup>1)</sup>。さらに、歯表面へのプラーク付着は、SFE が 50 mN/m より低い場合に抑制されるという報告もある<sup>2)</sup>。

我々は、歯質の SFE を低下させ、プラークの付着ならびに脱灰を抑制させることを目的に、各修復材料に対する研磨後の表面粗さ、接触角、ならびに SFE を測定し、各材料の表面性状の違いについて研究を進めてきた<sup>3)</sup>。

本研究では、各種修復材料の粗さの違いに対する細菌付着性の違いを口腔内に近似した環境を再現できるポリマイクロバイアル (PM) バイオフィルムモデル<sup>4)</sup>を用いて検討した。

【材料および方法】実験には、Glass Cover Slips (以下、GL; Menzel, Braunschweig, Germany), Lava™ Plus Zirconia (以下、Zr; XL, 3M ESPE), VITABLOCS® Mark II for CEREC®/in Lab® (以下、VB; VITA), アパタイトペレット APP-100 (以下、HAP; PENTAX), キャストウェル M.C. (以下、Pd; 12%Gold, GC), URBAN (UB, Shofu), およびクリアフィル マジェスティ-ES2 (以下 CR; MX, Kuraray Noritake) の計 7 材料を供試とした。

GL 以外の各試料は、耐水研磨紙#600 まで研磨したものと (#600), 耐水研磨紙#2000 まで研磨後、さらにダイヤモンドスラリー  $\phi 0.5 \mu\text{m}$  まで研磨した 2 群を作製した(鏡面研磨)。それぞれ研磨終了後、表面付着物を除去するために 30 分間超音波洗浄した。GL は 1 mol/L NaOH と 1 mol/L HCl に各一昼夜浸漬後、30 分間超音波洗浄した。各試料表面を接触式表面形状機 (Surfcom590A, 東京精密) にて表面粗さの測定を行い、中心線平均粗さ (Ra) を求め、試料表面に蒸留水およびジヨードメタンをそれぞれ滴下し、室温 25°C の環境下で自動接触角計 (DCA-VZ 型, 協和界面科学) を用いて試料表面に対する接触角を測定し、得られた接触角値から SFE を算出した。バイオフィルムの形成と培養方法は、第 140 回本学会学術大会での発表と同様とした<sup>3)</sup>。培養終了後、2 ml の Cystein Peptone Water (CPW) 中に各試料を浸漬し、超音波処理にて試料から細菌を剥離、分散した。その後、CPW にて段階希釈し、血液寒天培地を用いて嫌気条件下 37°C, 4 日間培養して生菌数を算定し、1 mm<sup>2</sup> 当たりの PM バイオフィルムの付着量を算出した。なお各試料は 6 個とし、平均値と標準偏差を求め、有意水準 5% で One-way ANOVA および Tukey の検定を用い、各修復材料における PM バイオフィルムの付着性を比較検討した。また、実験開始 10 時間後と 24 時間後に培地の pH 測定 (9618-10D, F-71, Horiba) も行った。

【結果および考察】各培養時間における培地の pH は 7 材料ともそれぞれ近似しており差は認められなかった。この結果については、本研究で用いた培養液中に緩衝作用の強い PIPES を用いていることと培養時間が影響しているためと考えられる。各実験群の Ra は、GL は 0.007  $\mu\text{m}$ , 残りの 6 材料は鏡面研磨では 0.024~0.052  $\mu\text{m}$ , #600 では 0.055~0.370  $\mu\text{m}$  であった。また SFE は GL を除いて 6 材料とも 50 mN/m 以下であった。生菌数は、鏡面研磨と #600 間で有意差が認められたのは Zr, VB, HAP, CR および UB であった ( $p < 0.05$ )。その中でも Zr, VB, HAP は著明に低い値を示した。以上の結果より、各種修復材料上に形成された PM バイオフィルムは、SFE が各群とも近似しているにも関わらず生菌数に有意差が認められたことから、バイオフィルム形成には SFE 以外の性状が影響している可能性が示唆された。

【参考文献】 1) Quirynen M et al. J Dent Res 68:796-799, 1989.

2) Busscher HJ et al. Appl Environ Microbiol 48, 980-983, 1984.

3) 寺中文字ら. 2014 年度春季学術大会 P-45.

4) R.A.M. Exterkate et al. Caries Res 2010;44:372-379.

【謝辞】本研究は、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 S1203004 (平成 24 年~26 年) により実施された。

デンタルバイオフィルムの形成と制御に関する包括的 *in situ* 解析～各細菌属の経時的定量解析～

<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>大阪大学歯学部附属歯科技工士学校  
○和気菜々子<sup>1</sup>, 朝日陽子<sup>1</sup>, 町博之<sup>2</sup>, 野杵由一郎<sup>1</sup>, 林美加子<sup>1</sup>, 恵比須繁之<sup>1</sup>

**Comprehensive *in situ* analysis about formation and control of dental biofilm**  
~Temporal quantitative search of each bacterial genus~

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

<sup>2</sup>Osaka University Dental Technology Institute

○WAKE Nanako<sup>1</sup>, ASAHY Yoko<sup>1</sup>, MACHI Hiroyuki<sup>2</sup>, NOIRI Yuichiro<sup>1</sup>, HAYASHI Mikako<sup>1</sup>, EBISU Shigeyuki<sup>1</sup>

<研究目的>これまで多種多様な *in vitro* バイオフィルム形成モデルが開発され、単一菌種あるいは複数菌種のバイオフィルムの構造や形成メカニズム、遺伝子発現、あるいは排除・抑制法に関する研究報告が行われている。しかし、ヒトのデンタルバイオフィルムは *in vitro* で形成されたバイオフィルムとは異なり、700 種以上の細菌種が存在し口腔内環境や宿主因子に影響される。従って、ヒト口腔内でデンタルバイオフィルムを形成、評価できるモデルを開発し、その形成メカニズムや制御・抑制法を検討することが重要である。そこで本研究では、我々が新規に開発した *in situ* バイオフィルムモデル<sup>1)</sup>を用いてデンタルバイオフィルムを形成し、その構成細菌の経時的定量解析およびいくつかの細菌属の経時的定量解析を行った。

<材料および方法>本研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理委員会の承認を受け、遂行された (承認番号 H24-E4)。同意の得られた被験者より試料を採取し実験に供した。口腔内装置中のアパタイトディスクを経時的 (12、24、48、60、72、96 時間) に採取した後、ディスク上に形成されたバイオフィルムを回収し、PowerSoil® DNA Isolation Kit にて DNA を抽出し、ユニバーサルプライマーを用いてリアルタイム PCR にて全細菌量の定量を行った。さらに、*Streptococcus* 属および *Fusobacterium* 属はそれぞれの特異プライマーを用いてリアルタイム PCR にて細菌量の定量を行った。

<成績及び考察>

1. バイオフィルム構成細菌について

バイオフィルム構成細菌の 1、12、24、48、60、96 時間後の細菌量は、それぞれ  $4.6 \times 10^5 (\pm 3.7 \times 10^5)$ 、 $3.7 \times 10^6 (\pm 2.4 \times 10^6)$ 、 $2.8 \times 10^6 (\pm 1.6 \times 10^6)$ 、 $3.5 \times 10^7 (\pm 2.5 \times 10^7)$ 、 $2.6 \times 10^7 (\pm 1.7 \times 10^7)$ 、 $1.1 \times 10^8 (\pm 7.0 \times 10^7)$  copies/mm<sup>2</sup>であった。これは生菌数の定量的解析結果<sup>1)</sup>と同様に、4 日後までにバイオフィルム構成細菌は 2 相性の増加傾向を示した。

2. *Streptococcus* 属と *Fusobacterium* 属について

*Streptococcus* 属の 1、12、24、48、60、96 時間後の細菌量は、それぞれ  $3.6 \times 10^4 (\pm 3.3 \times 10^4)$ 、 $2.4 \times 10^6 (\pm 2.2 \times 10^6)$ 、 $2.6 \times 10^6 (\pm 2.7 \times 10^6)$ 、 $2.6 \times 10^6 (\pm 4.7 \times 10^6)$ 、 $2.9 \times 10^6 (\pm 2.9 \times 10^9)$ 、 $1.1 \times 10^8 (\pm 1.5 \times 10^6)$  copies/mm<sup>2</sup>であった。*Streptococcus* 属は 12 時間までに急速な増加を示した。また、*Fusobacterium* 属の 1、12、24、48、60、96 時間後の細菌量はそれぞれ  $3.2 \times 10^3 (\pm 1.1 \times 10^3)$ 、 $1.0 \times 10^4 (\pm 4.2 \times 10^3)$ 、 $4.3 \times 10^4 (\pm 3.1 \times 10^4)$ 、 $1.9 \times 10^5 (\pm 1.7 \times 10^5)$ 、 $2.2 \times 10^5 (\pm 1.4 \times 10^5)$ 、 $6.8 \times 10^6 (\pm 7.1 \times 10^6)$  copies/mm<sup>2</sup>であった。*Fusobacterium* 属は経時的に増加傾向を示し、とくに 24~48 時間の間に急速な増加を示した。以上より、通性嫌気性菌である *Streptococcus* 属が急速に増加した後、バイオフィルム内が嫌气的環境になることで、その後偏性嫌気性菌である *Fusobacterium* 属が急速な増加を示したのではないかと考察される。

<結論>本研究により、ヒトの口腔内で形成したデンタルバイオフィルムの細菌数は 2 相性の増加傾向を示し、12 時間後までは *Streptococcus* 属が増加し、24~48 時間後には *Fusobacterium* 属が急速に増加することが示された。

(本研究の一部は科学研究費補助金 (基盤研究(B)課題番号 24390425, 基盤研究(C)課題番号 26462878) の補助の下に行われた)

<参考文献> 1. 和気菜々子ほか 日本歯科保存学会第 139 回学術大会、2013

## 多血小板血漿が象牙芽細胞様細胞 (KN-3 細胞) に与える影響

<sup>1</sup>九州歯科大学 口腔保存治療学分野

<sup>2</sup>九州歯科大学 感染分子生物分野

○廉 晃勲<sup>1,2</sup>, 鷲尾絢子<sup>1</sup>, 諸富孝彦<sup>1</sup>, 永吉雅人<sup>1</sup>, 北村知昭<sup>1</sup>

### Effect of Platelet Rich Plasma on the Odontoblast-like Cells (KN-3 cell)

<sup>1</sup>Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Kyushu Dental University

<sup>2</sup>Division of Infections and Molecular Biology, Kyushu Dental University

○YEOM Kyoungun<sup>1,2</sup>, WASHIO Ayako<sup>1</sup>, MOROTOMI Takahiko<sup>1</sup>, NAGAYOSHI Masato<sup>1</sup>, KITAMURA Chiaki<sup>1</sup>

#### 【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- $\beta$ )、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、歯髄再生における PRP の影響を明らかにするため、象牙芽細胞様の特徴を有するラット下顎切歯歯髄由来細胞株 KN-3 細胞を用い、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、上層の分画を乏血小板血漿 (Platelet poor plasma:PPP)、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 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 (DSPP) および Dentin matrix protein-1 (DMP-1) の発現を real time RT-PCR で解析した。さらに、PRP 添加後の KN-3 細胞が示す石灰化能を Alkaline Phosphatase (ALP) 活性、ALP 染色および 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 の mRNA の発現が濃度・時間依存的に亢進した。一方、IL-1beta の遺伝子発現に有意な変化はなかった。

また、DSPP、DMP-1 の mRNA の発現が一過性に亢進した。この亢進は PRP の濃度依存的であった。さらに、ALP 活性、ALP 染色および Alizarin red S の染色性は無添加のコントロール群、PPP 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。また、象牙芽細胞様細胞の石灰化能を増強する可能性が示唆された。

#### 【結論】

PRP は歯髄の創傷治癒・再生療法に有用である。

## 象牙芽細胞分化マーカー発現に対する炎症性サイトカインの影響

九州歯科大学 口腔保存治療学分野  
○中川愛加、諸富孝彦、永吉雅人、北村知昭

### Effects of inflammatory cytokines on expression of odontoblastic cell markers

Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Kyushu Dental University.  
○NAKAGAWA Aika, MOROTOMI Takahiko, NAGAYOSHI Masato, KITAMURA Chiaki

#### 【背景と目的】

歯髄に近接する象牙質齶蝕等によって誘発された局所的歯髄炎に対する治療法として歯髄保存療法がある。歯髄保存療法のひとつである覆髄法では、残存象牙質を介して間接的に、あるいは露出した歯髄に対して直接的に水酸化カルシウム等の薬剤を貼付し歯髄の再表層にある象牙芽細胞と近接する歯髄細胞の炎症応答を誘発することで、薬剤貼付部に相当した部位に反応性象牙質および修復象牙質の形成を促進することが知られている。しかしながら、炎症応答時の象牙芽細胞の挙動メカニズムについては詳細に解明されていない。これまでに我々は、樹立した象牙芽細胞様細胞 KN-3 細胞を用い、BMP-2 により Smad シグナル伝達経路が活性化されること、熱刺激により HSP25 および炎症性サイトカインの発現が誘導されることを明らかにしてきた。今回、炎症性サイトカインである IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  刺激に対する KN-3 細胞の応答について分子生物学的手法を使って検証した。

#### 【方法】

KN-3 細胞の増殖に対する炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  (各 10 ng/ml, 50 ng/ml) の影響を WST-1 assay によって検証した。次に、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , および IFN- $\gamma$  (各 10 ng/ml, 50 ng/ml, および 100 ng/ml) にて KN-3 細胞を刺激し、象牙芽細胞分化マーカーである象牙質シアロリントタンパク質 (Dentin Sialophosphoprotein ; DSPP) および象牙質マトリックスタンパク質 (Dentin Matrix Protein-1 ; DMP-1) の遺伝子発現を real time RT-PCR 法にて検証した。更に、IFN- $\gamma$  を前投与 (6 時間, 10 ng/ml) した KN-3 細胞の IL-1 $\beta$  刺激時における DSPP, DMP-1 の遺伝子発現を real time RT-PCR 法にて検証した。

#### 【結果】

KN-3 細胞の細胞増殖に対する炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の影響を WST-1 assay によって検証したところ、IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  は KN-3 細胞の増殖に影響を及ぼさなかった。一方、象牙芽細胞分化マーカーである DSPP および DMP-1 は、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の濃度依存的かつ時間依存的に遺伝子発現が上昇した。次に IFN- $\gamma$  で KN-3 細胞を刺激したところ、時間依存的に DSPP および DMP-1 の遺伝子発現が抑制された。興味深いことに、IFN- $\gamma$  を前投与した KN-3 細胞を IL-1 $\beta$  刺激を行ったところ、IL-1 $\beta$  による単独刺激によって誘導される DSPP および DMP-1 の遺伝子発現の上昇が著しく抑制された。

#### 【考察】

象牙芽細胞様細胞 KN-3 細胞において、炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  による刺激で象牙芽細胞分化マーカーである DSPP, DMP-1 の発現は誘導され、その発現誘導は IFN- $\gamma$  の前投与により著しく抑制されることが明らかになった。以上の結果は、象牙芽細胞の炎症当応答は各種サイトカインによって複雑に制御されていることを示唆している。

#### 【結論】

IFN- $\gamma$  は、象牙芽細胞様細胞である KN-3 細胞の IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  による DSPP および DMP-1 の発現増加を抑制する。

## ラット感染根管治療モデルの開発

<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

○米田直道<sup>1</sup>, 野杵由一郎<sup>1</sup>, 呉本勝隆<sup>1</sup>, 松井沙織<sup>1</sup>, 石本卓也<sup>2</sup>, 中野貴由<sup>2</sup>, 恵比須繁之<sup>1</sup>, 林美加子<sup>1</sup>

### Development of the model of root canal treatment 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

○YONEDA Naomichi<sup>1</sup>, NOIRI Yuichiro<sup>1</sup>, KUREMOTO Katsutaka<sup>1</sup>, MATSUI Saori<sup>1</sup>, ISHIMOTO Takuya<sup>2</sup>, NAKANO Takayoshi<sup>2</sup>, EBISU Shigeyuki<sup>1</sup>, HAYASHI Mikako<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

根尖性歯周炎が根管内の細菌感染によって惹起されることは、1965年 Kakehashi ら<sup>1)</sup>の動物実験により証明された。その結果、治療には根管内細菌を減少させることを目的とした感染根管治療が行われ、根尖歯周組織の炎症の消退がはかられる。根尖性歯周炎の病態の解明のため、これまで動物を用いた実験的根尖性歯周炎モデルが開発され、近年我々もラットにおいて根尖孔外バイオフィームによる実験モデルを開発した<sup>2)</sup>。それらの開発されたモデル上で、細菌学および組織学的に種々の解析が行われてきたが、小動物に完全な感染根管治療を行った報告はない。ラットの歯牙の近遠心径が約3-4mmと小さいことや、臼歯の根管が4根管ある上、頬舌側根は非常に小さく小動物では肉眼での治療が困難であるため、*in vivo*での感染根管治療の報告はイヌ等の大動物のみであった。しかし、多くのサンプル数を必要とする研究にはサンプル数確保および実験労力の観点から大動物は不向きである。そこで本研究では、実体顕微鏡、マイクロエンド用インスツルメント等を使用してラット実験的根尖性歯周炎モデルに対して感染根管治療を行い、その治療の成否を細菌学的にはリアルタイムPCRを用いて定量解析し、臨床的にはマイクロCTにて根尖病巣の体積変化を経時的・三次元的に観察することによって評価した。

#### 【方法】

本研究は大阪大学歯学研究科および工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:22-003-2, 23-2-1)。5週齢雌性Wistar系ラットを実験に用いた。ラットの左右下顎第一臼歯を1/2ラウンドバーにて露髄させ、口腔環境へ曝露することで根尖性歯周炎を惹起させた。露髄4週後に、特別発注したラット用クランプを用いてラバーダム防湿を行い、右側は手用Kファイル、Ni-Tiロータリーファイルを用いて根管拡大、根管形成を行った後、シングルポイント法および垂直加圧充填法にて根管充填し、仮封を行い治療群とした。左側は根管治療を行わず根管を開放し対照群とした。治療群および対照群への処置はすべて実体顕微鏡(Stemi DV4 SPOT, Carl Zeiss)下にて行った。根管治療直後および2, 4, 6週後にマイクロCT(R\_mCT2, RIGAKU)で撮影を行い、骨形態計測ソフト(TRI 3D-BON, RATOC)を用いて根尖病変体積の測定を行った。また、根管治療での細菌除去を確認するために、根管治療直後の歯牙を抜去し、凍結破砕後DNAを抽出し、ユニバーサルプライマーを用いてリアルタイムPCRを行い根管内の細菌量を定量した。治療群と対照群の統計学的有意差の検定はStudent's *t*-testを用いて危険率5%で評価した。

#### 【結果および考察】

根管充填後のマイクロCT画像より、ラット下顎第一臼歯の4根管に根管充填が良好に行えていることが確認された。そのようにして確認された治療群の根尖病巣はすべてが縮小傾向を示し、病巣体積は対照群と比較して有意に減少した( $p < 0.05$ )。また、リアルタイムPCRの結果から治療群の細菌量は対照群と比較して有意に減少した( $p < 0.05$ )。以上より、今回用いた手技により根尖性歯周炎を治癒させうる量まで根管内細菌を除去できており、ラットにおいてもヒトでの治療に近い成功率で感染根管治療が可能であることが明らかとなった。このラット感染根管治療モデルを応用することにより、さまざまな新規治療法の*in vivo*での評価がラットを用いて行えることが示唆された。

#### 【結論】

ラットにおける感染根管治療モデルの開発に成功した。

#### 【参考文献】

1) Kakehashi S *et al.* *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20: 340-349, 1965.

2) Kuremoto K *et al.* *Appl Environ Microbiol* 80: 3804-3810, 2014.

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。

## プラズマ処理水を用いた新しい殺菌技術

1) 大阪大学大学院工学研究科アトミックデザイン研究センター、2) 大阪府立産業技術総合研究所、3) 鶴見大学歯学部口腔微生物学講座、4) 鶴見大学歯学部保存修復学講座、5) 鶴見大学歯学部歯内療法学講座  
○北野勝久<sup>1,3)</sup>、井川聡<sup>2)</sup>、山崎弘光<sup>3)</sup>、白井エミ<sup>4)</sup>、田崎達也<sup>4)</sup>、大島朋子<sup>3,1)</sup>、山本要<sup>5)</sup>、細矢哲康<sup>5)</sup>、前田伸子<sup>3)</sup>、桃井保子<sup>4)</sup>

### Novel disinfection technique by the plasma treated water

<sup>1)</sup>Graduate School of Engineering, Osaka Univ., <sup>2)</sup>Technology Research Institute of Osaka Pref., <sup>3)</sup>Department of Oral Microbiology, Tsurumi Univ. School of Dental Medicine, <sup>4)</sup>Department of Operative Dentistry, Tsurumi Univ. School of Dental Medicine, <sup>5)</sup>Department of Endodontology, Tsurumi Univ. School of Dental Medicine  
○KITANO Katsuhisa<sup>1)3)</sup>、IKAWA Satoshi<sup>2)</sup>、YAMAZAKI Hiromitsu<sup>3)</sup>、USUI Emi<sup>4)</sup>、TASAKI Tatsuya<sup>4)</sup>、  
OHSHIMA Tomoko<sup>3, 1)</sup>、YAMAMOTO Kaname<sup>5)</sup>、HOSOYA Noriyasu<sup>5)</sup>、MAEDA Nobuko<sup>3)</sup>、MOMOI Yasuko<sup>4)</sup>

**大気圧低温プラズマ：** “プラズマ”とは固体、液体、気体に次ぐ物質の第4の状態の事であり、物質は非常に高温になることでイオンと電子に解離し、電離した状態のプラズマになる。高電圧の印加により生成されたプラズマは、化学的・物理的な活性が高く、半導体製作プロセス等で必須の技術として産業利用されている。一般的には真空圧力下で生成されるが、近年の技術開発により真空容器を必要としない大気圧下のプラズマ生成が容易となってきた。その中でも、大気圧低温プラズマは適用範囲が広く、著者らは LF (Low Frequency) プラズマジェット (Fig. 1) と呼ばれる新しい大気圧プラズマ生成方法を開発し[1]、各種のバイオ応用を進めている。

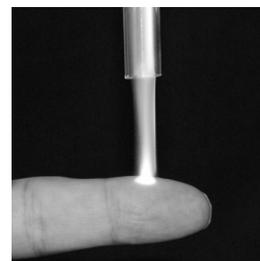


Fig. 1 LF plasmajet.

**低 pH 法による効果的プラズマ殺菌法：** 大気圧プラズマを人体組織へ照射して医療行為

を行う Plasma Medicine と呼ばれる研究分野は、現在、世界的に高い注目を集めており、我々はその中でも生成した化学活性種により人体に付着した有害な微生物を不活化するプラズマ消毒の研究を進めている。この領域では患部へ直接プラズマを照射し評価する *in vivo* 研究がほとんどであるが、人体はぬれ環境であるために液体に対する殺菌が重要である。これまで、液中の殺菌において、pH を 4.7 以下に調整することで D 値が 1/100 と劇的に効果が高まる「低 pH 法」を開発し[2]、歯科[3]や外科への臨床応用に向けた研究を進めているが、体液の pH が中性であるために、プラズマ消毒ではこの低 pH 法は必須の技術である。

**プラズマ処理水を用いた殺菌：** さらに研究を進める中、プラズマ処理した水が低 pH 条件下で高い殺菌活性があり、その半減時間が高い温度依存性を示すことが分かった。プラズマ処理水生成のための専用装置を製作することで[4]、高濃度のプラズマ処理水の生成に成功した。段階希釈したプラズマ処理水に菌液を混合することで処理水の殺菌力の評価実験を行った結果、計算上、100%のプラズマ処理水では、*B. subtilis* (芽胞) の菌数を  $10^{-22}$  に (Fig. 2)、*E. coli* では  $10^{-3000}$  にまで減少させる画期的な殺菌力があることが判明した。また、殺菌活性の半減時間は、室温で数分、冷凍すると数ヶ月であり、オゾンや安定化学種である過酸化水素、次亜塩素酸などとは異なる。実験で得られたアレニウスプロットから体温での半減時間は数秒と推察され、消毒で用いる際、残留毒性が少ない事が期待される。一般的な薬品で同等の殺菌力を得るためには劇薬が必要であるが、プラズマ処理水は上記の通り体温では数秒程度で失活するため、生体の表面のみを殺菌する消毒に好適な液体と考えられる。歯科医療の領域では、う蝕、歯周治療における消毒への適用を広く検討しており、各種モデルを構築しながら殺菌力・安全性の評価を進めていく予定である。

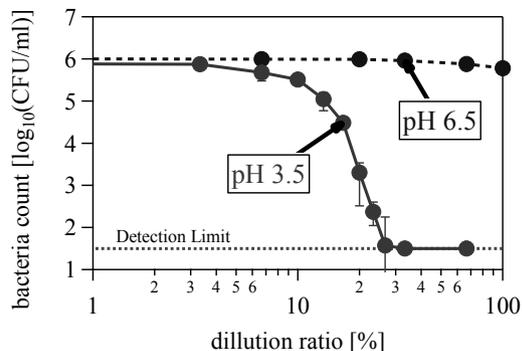


Fig. 2 Inactivation of *B. subtilis* (spore type) by the plasma treated water.

### 参考文献

- [1] 北野勝久ら、応用物理学会誌、77(4)、pp383、(2008)。日本国特許第 4677530 号。米国特許 US8232729 号。
- [2] S. Ikawa. et al., Plasma Process Polymers, 7, 1, pp. 33, (2010)。日本国特許第 4408957 号。
- [3] H. Yamazaki et al., 30 (3), pp. 384, (2011)。白井ら、日本歯科保存学会 2013 年度春期学術大会、P2, (2013)。
- [4] 特願 2012-103800。特願 2013-109827。

## プラズマ処理水による根管消毒の有効性 -Candida に対する効果-

<sup>1)</sup> 鶴見大学歯学部歯内療法学講座、<sup>2)</sup> 鶴見大学歯学部口腔微生物学講座、  
<sup>3)</sup> 大阪大学大学院工学研究科アトミックデザイン研究センター、<sup>4)</sup> 大阪府立産業技術総合研究所  
○山本要<sup>1)</sup>、大島朋子<sup>2,3)</sup>、山崎弘光<sup>2)</sup>、北野勝久<sup>3,2)</sup>、井川聡<sup>4)</sup>、細矢哲康<sup>1)</sup>、前田伸子<sup>2)</sup>  
Disinfection effect on infected root canals by the plasma treated water -antifungal effect on candida-  
<sup>1)</sup>Department of Endodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine,  
<sup>2)</sup>Department of Oral Microbiology, Tsurumi University School of Dental Medicine,  
<sup>3)</sup>Graduate School of Engineering, Osaka University,  
<sup>4)</sup>Technology Research Institute of Osaka Prefecture  
○YAMAMOTO Kaname<sup>1)</sup>, OHSHIMA Tomoko<sup>2,3)</sup>, YAMAZAKI Hiromitsu<sup>2)</sup>, KITANO Katsuhisa<sup>3,2)</sup>,  
IKAWA Satoshi<sup>4)</sup>, HOSOYA Noriyasu<sup>1)</sup>, MAEDA Nobuko<sup>2)</sup>

### 【目的】

感染根管治療は、根尖性歯周炎の原因となる感染歯質を機械的ならびに化学的に除去し、根管を無菌状態にすることが目的である。しかしながら種々の方法や薬剤を応用しても感染のコントロールは容易ではなく、臨床的に難治性根尖性歯周炎にいたることも少なくない。

大気圧低温プラズマに関しては基礎的研究が進んでおり、多くの物理的ならびに化学的効果が認められている。一般にプラズマによる殺菌は実用化が進んでいるものの、細菌に直接照射する必要があり、生体組織や歯科臨床へはいまだ十分に応用されていない。著者らは、大気圧低温プラズマの歯科臨床への応用を目的に種々の検討を加えており、低 pH 環境下での使用による有効性[1]やプラズマ照射による活性種含有の処理水が *Enterococcus faecalis* の殺菌に有効[2]であることを本学会で報告している。

本研究では、上記のプラズマ処理水を用いて、難治性根尖性歯周炎罹患歯からも検出される *Candida* への殺菌効果に関して抜去歯感染モデルを用いて、より臨床に近い手技での検討を行ったので報告する。

### 【材料および方法】

う蝕のないヒト抜去前歯 40 本を手用ファイルで 60 号まで根管拡大形成後、根尖から 10mm の部位で歯軸に垂直に切断し被験試料を作成した。なお、被験試料は無作為に 20 本ずつ 2 群に分配した。*Candida albicans* ならびに *Candida glabrata* の標準菌株を用いて、それぞれ  $10^7 \sim 10^8$  CFU/ml の菌液を調整し、各群の根管内に挿入した 60 号のペーパーポイントに 10  $\mu$ l を浸透させた状態で 30°C、24 時間培養し感染根管モデルを作製した。プラズマ処理水は、大気中で純水に数分間プラズマ照射することで生成した。

生成したプラズマ処理水 1ml にクエン酸緩衝液 (pH3.5) 100 $\mu$ l 添加し、各群 16 本の被験試料の根管にシリンジを用いて注入し 1 分間放置した。なお、各群残った 4 本の被験試料は対照群として純水を注入し、同様に 1 分間放置した。滅菌ペーパーポイントにて根管乾燥を行った後、根管内に 20 $\mu$ l の滅菌水を注入し、さらにペーパーポイントを約 30 秒間挿入した。その後、ペーパーポイントを液体培地に挿入し、30°C で 48 時間培養を行った。液体培地における培養結果から、根管内の無菌化状況を観察することでプラズマ処理水の有効性に関して検討した。

### 【結果ならびに考察】

Table 1. The results of bacteriological examination of root canals

細菌培養試験の結果から、被験試料根管内の *C. albicans* ならびに *C. glabrata* に対して、プラズマ処理水の殺菌効果が認められた (Table 1)。

本研究で使用したプラズマ処理水は組織為外性がなく、残留毒性も少ないと予想されることから、根管治療への応用が期待される。被験試料の根管は、根管拡大形成時のスマヤー層に関しては未処理であり、象牙細管口が根管に露出した場合の影響、ならびに被験試料間における根尖分岐や側枝等の解剖学的な差を考慮する必要がある。

### 【結論】

低 pH 法によるプラズマ処理水の応用により、根管洗浄ならびに根管消毒への有効性が示唆された。

[1]S. Ikawa et al, Plasma Process. Polym., 7(1)33, (2010)

[2]山崎ら、日本歯科保存学会 2013 年度秋季学術大会、抄録集 p. 63 (2013)

## スリランカ・ペラデニア大学への従来型無償資金援助システムの成果と、求められる 次世代型国際協力システム

<sup>1</sup>はにデンタルクリニック, <sup>2</sup>京都大学大学院医学研究科人間健康科学専攻

○志賀 千尋<sup>1</sup>、上久保 靖彦<sup>2</sup>

### ODA to University of Peradeniya, and its role for the strategical future.

<sup>1</sup>HANI dental clinic, <sup>2</sup>Kyoto University Graduate School of Medicine Department of Human Health Sciences

○Chihiro Kondo-Shiga<sup>1</sup>, Yasuhiko Kamikubo<sup>2</sup>

スリランカ民主社会主義共和国（以下スリランカ）は、インド亜大陸にある北海道ほどの大きさの島国である。スリランカにおける悪性腫瘍のうち口腔癌が30%を占めるため歯科領域の充実が最も望まれてきた。唯一の歯科医師養成機関であるペラデニア大学は元来歯科医師養成用に設計されたものではなく、機材が老朽化し、日本国からの支援は、従来ハードインフラ建造に立脚しており、持続的な技術導入が乏しいことなどから、歯学部、実習病院の再整備、及び歯科医療従事者の資質と患者ケアの向上が求められてきた。スリランカ政府から日本国に無償資金協力要請があり、1998年2月から2003年1月までで総額22,45億円のプロジェクトが遂行された。筆者は、2013年11月スリランカ首相府の招きにより、ペラデニア大学および東部州アンバラの歯科施設を視察する機会を得たので報告する。ペラデニア大学歯学部は古都キャンディ郊外にあり病院棟と学部棟施設が日本の政府開発援助（ODA）により建造されている。診察室には溢れんばかりの患者が待ち、指導医と研修医がチーム診療に当たる。過去、日本の教育支援プロジェクトがあり貢献してきた。経年変化により施設に故障が見られたものの、JICAによる設置機器が至る所に置かれ、日本の設備的貢献は極めて顕著である。日本がスリランカに対して行ってきた支援の積み重ねが、日本に対する信頼強化に貢献していることは言うまでもない。学部棟では学生が英語のみで講義を受講しており、ブータンやバングラデッシュからの留学生が在籍する。日本から支援を受けたスリランカが、別の発展途上国の援助に回る、産業人材育成の成功例であることが垣間見られる。しかしながら口腔癌リサーチセンターなどの重要部署では、現在韓国による支援と運営がなされており、「ペラデニア大学歯学部の教育スタッフによって、近代的で国際的に標準化された歯科医師養成のための卒前教育システムが、無償資金協力によって整備された施設、機器を用いて自律的に運営される」という当初の日本国による支援目的は達成されていない。現在日本のプレゼンスはほぼ消失し、その後の持続的な技術協力支援は、不完全な状態である。東部州アンバラでは基幹病院の歯科診療所でも50年以上前のユニットでの診療が行われ、赤十字センターに隣接した診療所では、煮沸消毒による不完全な感染症対策が行われている。また衛生士国家資格が整備されておらず、歯科医師がその業務も並行して行う必要があるため、極めて非効率的な診療となっている。

四半世紀に及ぶ内戦が2005年に終結後、復興需要ならびに観光業の復活から、GDPは8%台の成長を続けるなど、スリランカは今急速な経済発展が続いている。アンバラなど農村部では依然としてインフラ整備が必要ではあるが、コロンボなどの都市部では経済成長著しく、首相府の直接的な要望として、新興市場に移行した同国においては新たに、1. 自国高度医療人材育成（とくに女性歯科医師や衛生士育成）、2. 日本型先進医療インフラの構築、3. 先進国企業（医療産業）の誘致など、の新しいニーズが存在し、最良のパートナー国としての日本の進出を求められている。すなわち、日本国による先進的歯科医療教育支援や歯科インフラの導入は、お互いの目標達成に向けた「共有リソース」として、永続的に協業できる関係（相互繁栄）、仕事を「発注する方」と「受注する方」という関係に縛られることなく、対等な関係（相互利益）をもたらすものとなりうる。さらにお互いを補完しあう「相互支援」によって稼働効率が向上する関係（相互補完）により、Win-Winであることが、次世代の真のパートナーシップであるといえよう。国際協力60年の歴史の中で、日本を取り巻く政治安全保障環境が急激に変化する中、従来型のODA拠出によるハードインフラ支援ストラテジーのみから脱却し、より戦略的に持続型教育支援、日本型のソフトインフラの導入、歯科衛生士の国家資格化へむけた支援などを、次世代の支援システムとして展開することが「未来への投資」に繋がると筆者は考える。

## 乳歯 white spot 部に塗布したナノシール歯面コート材と歯面の色彩ならびに組織変化

東北大学歯学部 口腔保健発育学講座 小児発達歯科学分野<sup>1</sup>, 日本大学歯学部 保存修復学講座<sup>2</sup>  
○ 細矢由美子<sup>1, 2</sup>, 遠藤 肇<sup>2</sup>, 高橋史典<sup>2</sup>, 黒川弘康<sup>2</sup>, 宮崎真至<sup>2</sup>

### Color and morphological changes of “Nanoseal” tooth surface coating material and white spot lesion on primary tooth enamel

Tohoku University Graduate School of Dentistry, Dept. of Oral Health and Development Sciences, Division of Pediatric Dentistry<sup>1</sup>, Nihon University School of Dentistry, Dept. of Operative Dentistry<sup>2</sup>  
○ Yumiko Hosoya<sup>1</sup>, Hajime Endo<sup>2</sup>, Fuminori Takahashi<sup>2</sup>, Hiroyasu Kurokawa<sup>2</sup>, Masashi Miyazaki<sup>2</sup>

**[ 研究目的 ]** : 従来用いられている乳歯初期齲蝕処置法中には、歯の変色を伴う方法が含まれている。審美的破壊は小児患者の精神衛生上問題であり、乳歯の特徴である色の美しさ(高い審美性)の回復は重要である。演者らは、審美的 coating 材の乳歯初期齲蝕に対する齲蝕進行抑制と再石灰化に関する研究を行ってきた。今回は、フルオロアルミノカルシウムシリケート含有 coating 材であるナノシール(日本歯科薬品)を人工脱灰により形成した抜去乳歯唇面エナメル質の white spot 部に塗布し、コート材と塗布歯面の色彩並びに組織変化を観察した。

**[ 材料および方法 ]** : <被験歯> : 倫理規定に従い、患者と保護者の承諾を得て収集し、抜歯後に生理食塩水で冷凍保存した乳犬歯 12 歯を用いた。 <観察方法> : 歯面を注水下にブラシコーンで清掃研磨後、唇面以外の部位をマニキュアで coating し、pH 4.75 の乳酸緩衝液中で総計 6 日間脱灰して white spot を形成した。脱灰後にマニキュアを除去し、製品の指示書に従い脱灰部にナノシールを塗布した Nanoseal 群(7 歯)と塗布なしのコントロール群(5 歯)を設けた。すべての歯を人工唾液中に 4 週間浸漬した。肉眼的観察、デジタルカメラ(Nikon D-100, 60mm f/2.8D)によるカラー写真撮影とレーザー齲蝕診断器の DIAGNOdent(Kavo 社)による測定を行った。カラー写真には画像補正用カラーチャート CasMatch(大日本印刷株式会社)を撮りこみ、Adobe Photoshop CS2 で画像の色調とサイズの補正を行い、色彩分析(Lab)を行った。さらに、測定部の直径が 1.5mm、照明受光方式が 45°/0° の高速分光光度計(CMS-35FS; 村上色彩技術研究所)で D65 光源 2 度視野にて測色(L\*a\*b\*, L\*C\*h)した。観察は、処置前、脱灰後、マニキュア除去後、コート材塗布直後、人工唾液浸漬後(1 週/4 週/8 週と 12 週後)に行った。統計処理には、ANOVA, Fisher's PLSD ( $\alpha=0.05$ )を用いた。

人口唾液浸漬 12 週後の試料の組織変化を走査電子顕微鏡(SEM: JSM-6340F; JEOL)で観察した。

**[ 成績並びに考察 ]** : 1). 肉眼的観察による色彩変化の観察は客観性に乏しかった。CasMatch を撮り込んだカラー写真による色彩分析は撮影誤差の影響が大きく、分析法そのものの精度が低かった。 2). 分光光度計を用いた場合の処置前に対する観察時期別の総合的色差( $\Delta E^*ab$ )は、Nanoseal 群では、マニキュア除去後(5.1), 塗布直後(5.3), 人口唾液浸漬: 1 週, 4 週, 8 週と 12 週後(5.1, 5.1, 5.4, 4.8)であり、コントロール群では、マニキュア除去後(4.2), 人口唾液浸漬: 1 週, 4 週, 8 週と 12 週後(5.4, 4.1, 6.2, 4.9)であった。両群ともに、塗布後の観察期間別の色差には有意差がなかった。 3). DIAGNOdent による測定値を観察時期別に比較すると、Nanoseal 群とコントロール群ともに脱灰後の値に対し、術前と人口唾液浸漬 12 週後の値が有意に低かった。術前と人口唾液浸漬 12 週後の間には有意差がなかった。ナノシールによる影響のみならず、人口唾液の影響も考えられる。 4). 人口唾液浸漬 12 週後の SEM 観察の結果、Nanoseal 塗布面の方がコントロール面よりもスムーズな試料が観察された。しかし、一部の試料では部分的に Nanoseal が剥がれ、コントロール面同様に脱灰由来と思われる粗造なエナメル質構造が観察された。

乳歯エナメル初期齲蝕部に対するフルオロアルミノカルシウムシリケート含有 coating 材であるナノシールの齲蝕進行抑制効と再石灰化については未だ不明な点が多いが、処置時間が短く塗布が簡単なので、低年齢あるいは非協力患児にも応用可能と思われる。

**[ 結論 ]** : 本観察結果から、ナノシール塗布による white spot 部の齲蝕進行抑制と再石灰化の有効性が推察された。本材の口腔内での耐久性や反復塗布の歯質への影響について、長期観察が必要である。

**[ 文 献 ]** : 1). Y. Hosoya *et al*: Effect of ammonium hexafluorosilicate application for arresting caries treatment on demineralized primary tooth enamel. J Oral Sci, 55: 115-21, 2013. 2). Y. Hosoya *et al*: Ability of Barrier Coat S-PRG coating to arrest artificial enamel lesions in primary teeth. Am J Dent, 26: 286-90, 2013. 3). Y. Hosoya *et al*: Effect of SI-R20401 to remineralize artificial incipient enamel lesions in primary teeth. J Oral Sci, 55: 301-31, 2013.

光干渉断層装置、共焦点レーザー走査型顕微鏡および実体顕微鏡を用いた抜去臼歯 White spot の観察

<sup>1</sup>東京医科歯科大学(TMDU) 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>東京医科歯科大学国際交流センター <sup>3</sup>国立長寿医療研究センター病院先端医療部口腔機能再建科

○指宿隆秀<sup>1</sup>、北迫勇一<sup>1</sup>、Alireza Sadr<sup>2</sup>、島田康史<sup>1</sup>、角 保徳<sup>3</sup>、田上順次<sup>1</sup>

Evaluation of enamel white spot lesions using Optical Coherence Tomography in comparison to Laser and Light Microscopy

<sup>1</sup>Department of Cariology and Operative Dentistry, Division of Oral Health Sciences, Graduate school of Medical and Dental Science, Tokyo Medical and Dental University (TMDU) <sup>2</sup>International Exchange Center, Tokyo Medical and Dental University <sup>3</sup> Department of Advanced Dental Research, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Disease, National Center for Geriatrics and Gerontology, National Hospital for Geriatric Medicine  
○Takahide Ibusuki<sup>1</sup>, Yuichi Kitasako<sup>1</sup>, Alireza. Sadr<sup>2</sup>, Yasushi Shimada<sup>1</sup>, Yasunori Sumi<sup>3</sup>, Junji Tagami<sup>1</sup>

[研究目的]

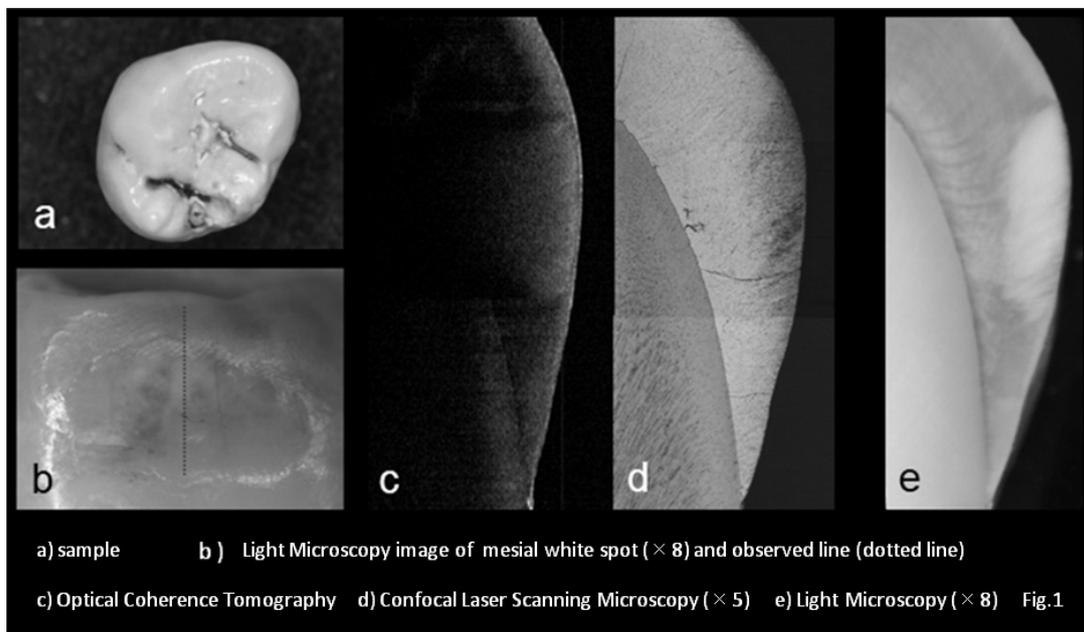
光干渉断層装置(以下 OCT)は、近赤外線光の干渉を用い断層画像を得る装置で、非破壊でリアルタイムに高解像度な歯の断層画像を得ることが出来る。演者らは、口腔内における隣接面う蝕診断に OCT を応用してきたが、white spot の検出は比較的困難であった。そこで本研究では、OCT、レーザー顕微鏡および実体顕微鏡を用い、抜去歯 white spot の OCT 断層画像と割断後の実像を比較することで、OCT を用いた初期エナメル質う蝕診断の可能性について検討を試みた。

[材料と方法]

本研究では、隣接面に white spot (ICDAS code 1-2・実質欠損なし)を有するヒト抜去臼歯 (14 本)を用いた。歯科用シリコン印象材を用いて、white spot 観察部位が床面と平行になるように固定した後、OCT (Dental OCT System Prototype 2、パナソニックヘルスケア)にて断層画像を撮影した。その後、OCT 観察ラインに合わせて割断し、耐水研磨紙および研磨ディスクを用いて割断面の研磨を行った後、レーザー走査型顕微鏡 (以下 CLSM ILM15, Lasertec Corporation) および実体顕微鏡 (LM, SMZ1000, NIKON) を用いて同割断面の実像を撮影し、white spot の断面形態および深度に関して OCT 画像と比較した。すなわち、各種画像における形態を、皿状型、層状型、両者の混合型いずれかに分類し、深度は Image J を用いて計測後その平均値を求め、各結果の相関関係を Pearson の相関分析を用い検討した。

[結果および考察]

図 1 に代表症例を示す。近心隣接面に white spot を認め、OCT 断層画像上では皿状型を呈した (図 1 c)。今回用いた抜去臼歯隣接面部の white spot は、接触点付近に生じたものが比較的多く、いずれの観察画像においても皿状型を呈することからう蝕原性の white spot と推測された。また、OCT、CLSM および実体顕微鏡像において脱灰部の形態および深度に比較的高い相関関係を認めた ( $p < 0.05$ , OCT/CLSM :  $R^2 = 0.64$ , OCT/実体顕微鏡 :  $R^2 = 0.84$ , CLSM/実体顕微鏡 :  $R^2 = 0.85$ )。以上より、OCT を用いた white spot の脱灰性状および深度評価の有効性が示され、臨床における初期エナメル質う蝕診断の改善に期待が寄せられた。



(修復)

【2501】

### OCT を用いた POs-Ca およびフッ化物配合ガムによる口腔内 white spot の再石灰化臨床評価

<sup>1</sup> 東京医科歯科大学 (TMDU) 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> 東京医科歯科大学国際交流センター

<sup>3</sup> 国立長寿医療研究センター病院先端医療部口腔機能再建科

○杉浦美穂<sup>1</sup>、北迫勇一<sup>1</sup>、Alireza Sadr<sup>2</sup>、島田康史<sup>1</sup>、角 保徳<sup>3</sup>、田上順次<sup>1</sup>

Clinical application of optical coherence tomography for white spot lesions remineralization by chewing gum containing POs-Ca and fluoride

<sup>1</sup> Department of Cariology and Operative Dentistry, Division of Oral Health Sciences, Graduate school of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University(TMDU), <sup>2</sup> International Exchange Center, Tokyo Medical and Dental University, <sup>3</sup> Department of Advanced Dental Research, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Disease, National Center for Geriatrics and Gerontology, National Hospital for Geriatric Medicine

○Miho Sugiura<sup>1</sup>, Yuichi Kitasako<sup>1</sup>, Alireza Sadr<sup>2</sup>, Yasushi Shimada<sup>1</sup>, Yasunori Sumi<sup>3</sup>, Junji Tagami<sup>1</sup>

#### [研究目的]

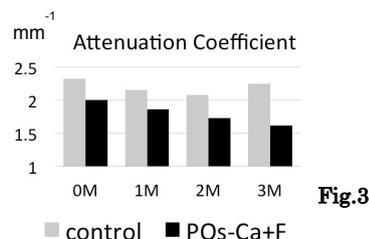
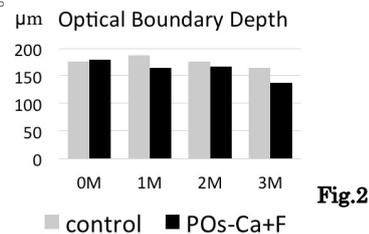
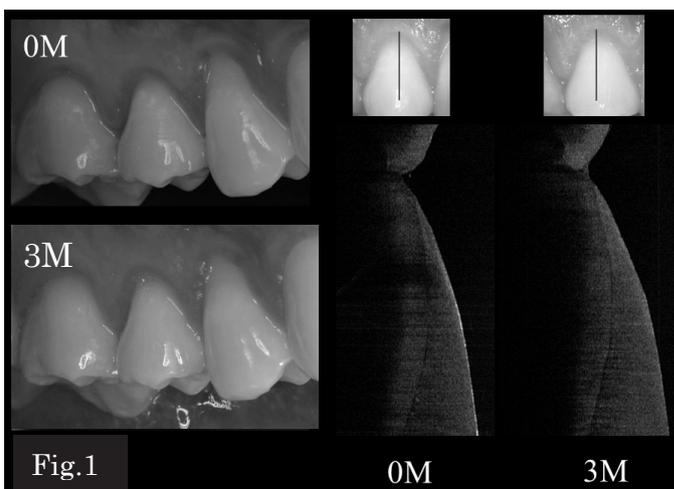
演者らは、第 140 回日本歯科保存学会にて、光干渉断層装置 (OCT) を用いたリン酸オリゴ糖カルシウム (POs-Ca) およびフッ化物配合ガムによる口腔内 white spot の再石灰化臨床評価について報告し、同ガムの口腔内 white spot に対する再石灰化効果をはじめ、OCT 画像による white spot 内層の構造変化および光学データを用いた定量的評価の可能性について示唆した。しかしながら、POs-Ca およびフッ化物配合有無による再石灰化効果の違いは不明である。そこで本研究では、POs-Ca 配合ガムおよびフッ化物配合有無が口腔内 white spot の再石灰化に与える影響について、RCT (ランダム化比較試験)・二重盲検下にて検討を加えたので報告する。

#### [材料と方法]

本臨床試験参加に同意が得られ white spot (ICDAS code 1-2) を有する被験者 22 名協力のもと、ランダムに 2 群に割り付けし、2 種ガム(コントロールガム・POs-Ca およびフッ化物配合ガム) いずれかを 1 回 2 粒・1 日 3 回・3 ヶ月間摂取させた。ガム摂取前後における white spot の表層および断面構造変化を、歯科用デジタルカメラ (NikonD5000、ソニックステクノ) ならびに OCT (Dental OCT System Prototype 2、パナソニックヘルスケア) を用い、摂取 3 ヶ月後まで月 1 回観察した。得られた各種画像から、white spot の再石灰化有無について比較検討した。さらに、OCT 断層画像から脱灰深さおよび減衰係数を算出し、OCT 画像データとあわせて検討した。なお、統計学的分析は、Repeated measures ANOVA および two-way ANOVA を用い危険率 5%にて行った。

#### [結果および考察]

POs-Ca およびフッ化物配合ガムの代表症例を Fig.1 に示す。ガム摂取前、口腔内写真で歯頸部付近に認められた white spot が 3 ヶ月後に消失傾向を示し、OCT 画像においてもガム咀嚼前後で内部構造変化が観察された。両ガムの経時的な脱灰深さの変化を Fig.2 に、減衰係数変化を Fig.3 に各々示す。脱灰深さは、POs-Ca およびフッ素配合ガムにおいて、試験前の平均値 (180±64μm) と 3 ヶ月後の平均値 (138±53μm) を比較した場合、両者間に統計学的な有意差を認めた ( $p<0.05$ )。なお、減衰係数については両ガム群ともに摂取前後の有意差を認めなかった ( $p>0.05$ )。以上より、本臨床試験では、ガム摂取による再石灰化程度に個体差がみられたものの、POs-Ca およびフッ素配合ガムの口腔内 white spot に対する再石灰化効果は、コントロールガムよりも高い可能性が示唆された。



### コンポジットレジン修復における窩底部象牙質う蝕の SS-OCT 3D 評価

<sup>1)</sup>東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科う蝕制御学分野、<sup>2)</sup>東京医科歯科大学国際交流センター、  
<sup>3)</sup>国立長寿医療研究センター病院

○松浦千尋<sup>1</sup>、島田康史<sup>1</sup>、サダルアリレザ<sup>2</sup>、田上順次<sup>1</sup>、角保徳<sup>3</sup>

### 3D assessment of dentin caries under composite restorations using SS-OCT

<sup>1)</sup>Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2)</sup>International Exchange Center, Tokyo Medical and Dental University,

<sup>3)</sup>National Center for Geriatrics and Gerontology

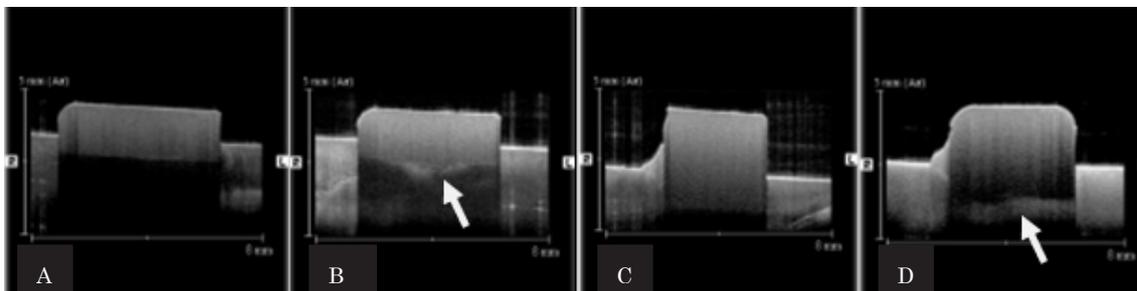
○MATSUURA Chihiro<sup>1</sup>, SHIMADA Yasushi<sup>1</sup>, SADR Alireza<sup>2</sup>, TAGAMI Junji<sup>1</sup>, SUMI Yasunori<sup>3</sup>

【諸言】臨床におけるう蝕の診断には、視診、レントゲン診査が多く用いられている。レントゲン診査は、進行したう蝕の検出には有用ではあるものの、コンポジットレジン修復下の二次う蝕の検出は困難であり、また、放射線被曝というデメリットがある。生体に無害な近赤外光を用いた波長走査型光干渉断層計 (SS-OCT) は、非破壊、非侵襲的に組織の精密断層像を得ることができる。本研究は新規 SS-OCT にて修復物の 3D 画像構築を行い、そこから断層画像を抽出し、コンポジットレジン修復下のう蝕の検出について評価した。

【材料及び方法】う蝕ならびに健全なヒト抜去歯をそれぞれ 20 本トリミングし、う蝕象牙質を含む平坦面と健全象牙質の平坦面を作製した。なお、本実験でのヒト抜去歯の使用に関しては、東京医科歯科大学倫理審査委員会の承認を受けている。その後、う蝕象牙質平坦面と健全象牙質平坦面を 2 群に分け (n = 10)、クリアフィルメガボンド (クラレノリタケデンタル) にてメーカー指示通りに処理を行い、エステライトΣクイック (A1、トクヤマデンタル) を厚さ 1mm または 2mm 充填し、試料とした。次に、新規試作 SS-OCT (吉田製作所) を用い、コンポジットレジン表面から試料の 3D 画像構築を行い、そこから断層画像を抽出し、評価に用いた。評価者は臨床経験 3 年以上の 10 名とし、断層画像から、1mm または 2mm 充填したコンポジットレジン修復下におけるう蝕の有無を判定した。得られた結果から、感度、特異、Az 値 (ROC 曲線) を求め、SS-OCT の有用性を検討した。

【結果】SS-OCT を用いて得られた修復物の 3D 画像構築から、接着界面の断層画像を抽出することができ、その画像からコンポジットレジン修復下における象牙質う蝕の有無を評価することができた。コンポジットレジン修復下に象牙質う蝕が存在する場合、SS-OCT 画像での輝度が上昇し、健全象牙質と区別することができた。コンポジットレジン修復の厚さが 1mm の場合、感度 : 0.97、特異度 : 0.92 であり、また、厚さ 2mm の場合、感度 : 0.87、特異度 : 0.88 であった。また、Az 値は 1mm : 0.95、2mm : 0.88 であった。1mm と 2mm の結果を比較すると、1mm の感度と Az 値は、2mm よりも有意に高かった (p < 0.05)。

【考察】コンポジットレジン修復下における象牙質う蝕の検出において、厚さ 1mm、2mm 共に感度、特異度、Az 値は高い数値が得られた。これは SS-OCT による 3D 画像構築から精度の高い断層画像を抽出し、コンポジットレジン修復下の象牙質う蝕の検査ができたことを示している。2mm において感度と Az 値がやや低下していたが、評価者が OCT 画像の特性を理解することにより改善できると思われる。また、今回使用したエステライトΣクイックは OCT の光透過性に優れており、修復物のモニタリングに有効であると思われる。



Figs. Cross-sectional view of resin-dentin interface obtained from 3D SS-OCT.

A: Intact dentin, resin 1mm, B: Caries dentin (arrow), resin 1mm, C: Intact dentin, resin 2mm, D: Caries dentin (arrow), resin 2mm

接着修復窩縁部に生じたエナメル質亀裂の SS-OCT 評価

<sup>1</sup>東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科う蝕制御学分野,<sup>2</sup>東京医科歯科大学国際交流センター

<sup>3</sup>国立長寿医療研究センター

○田端倫子<sup>1</sup>, 島田康史<sup>1</sup>, サドルアリレザ<sup>2</sup>, 田上順次<sup>1</sup>, 角保徳<sup>3</sup>

Assessment of enamel crack occurred at adhesive cavosurface margin using SS-OCT

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

<sup>2</sup>International Exchange Center, Tokyo Medical and Dental University

<sup>3</sup>National Center for Geriatrics and Gerontology

○TABATA Tomoko<sup>1</sup>, SHIMADA Yasushi<sup>1</sup>, SADR Alireza<sup>2</sup>, TAGAMI Junji<sup>1</sup>, SUMI Yasunori<sup>3</sup>

【緒言】コンポジットレジン修復のエナメル質窩縁に発生するホワイトマージンは、接着界面のギャップやエナメル質の亀裂であることが報告されている。特にエナメル質の亀裂は、コンポジットレジンの重合収縮応力が劈開性を有するエナメル質に作用し、エナメル小柱に沿って剥離することから、今日のコンポジットレジン修復においても発生し、その予防と対策が望まれている。波長走査型光干渉断層計 (Swept-source optical coherence tomography, SS-OCT) は非破壊的・非侵襲的な画像診断機器として注目されている。本研究は、コンポジットレジン修復の窩縁に発生したエナメル質亀裂を、SS-OCT を用いて評価した。

【材料及び方法】牛抜去歯 20 本を 2 群に分け、歯冠頰側中央部または歯冠歯頸側 1/3 の中央部に、ラウンドのダイヤモンドポイントとカーボランダムポイントを用い、直径 3 mm、深さ 2 mm の皿状窩洞を形成した。窩洞をさらに 2 群に分け (n = 5)、一方はリン酸エッチング(K エッチャントゲル、クラレノリタケデンタル) を行い、他方は行わずに、それぞれクリアフィルメガボンド (クラレノリタケデンタル) を用いて歯面処理し、コンポジットレジン (エステルイトフロークイック、シェード A2、トクヤマデンタル) を充填した。光照射はハロゲン照射器を用い (Optilux 501, Kerr)、光強度 550-600mW/cm<sup>2</sup> の条件で行った。その後、シリコンポイント (茶) にて研磨し、コンポジットレジンの余剰部を除去し、試料とした。作成した試料を 1 週間水中保管し、その後、新規 SS-OCT (吉田製作所) を用いて修復物の 3D 画像構築を行った。得られた 3D 画像から、窩縁部付近の断層画像を抽出し、窩洞周囲のエナメル質の亀裂の有無と拡がりについて、以下の 5 段階で評価し、比較した。

0 : エナメル質亀裂はみられない、1 : 窩縁 1/4 までに及ぶエナメル質亀裂、2 : 窩縁 1/4 から 1/2 までの亀裂、3 : 窩縁 1/2 から 3/4 までの亀裂、4 : 窩縁 3/4 よりも拡がった亀裂

【結果】新規 SS-OCT の 3D 画像構築を用いることにより、コンポジットレジン修復の窩洞周囲に発生したエナメル質亀裂を、非破壊的・非侵襲的に観察することができた。歯冠頰側中央部と比較し、歯頸部において多くのエナメル質亀裂がみられ、3/4 以上の拡がりが多くみられた。また、リン酸エッチングを行うと、エナメル質亀裂が増加し、範囲が拡がった。また、コンポジットレジンとエナメル質とのギャップは、ほとんどみられなかった。

【考察】SS-OCT 画像において、亀裂はシグナル強度の増加した白線となって表示され、健全なマージン部と区別することができた。剥離した部位に水や空気が浸入することから、エナメル質との屈折率の相違が生じ、レーザー光が反射し、強いシグナルが検出されたものと思われる。歯冠頰側中央部と比較し、歯頸部に多くのエナメル質亀裂がみられ、歯冠部と歯頸部における解剖学的相違が影響したものと思われる。また、エッチングによって一部のエナメル質が脆弱化し、剥離しやすくなると推察された。

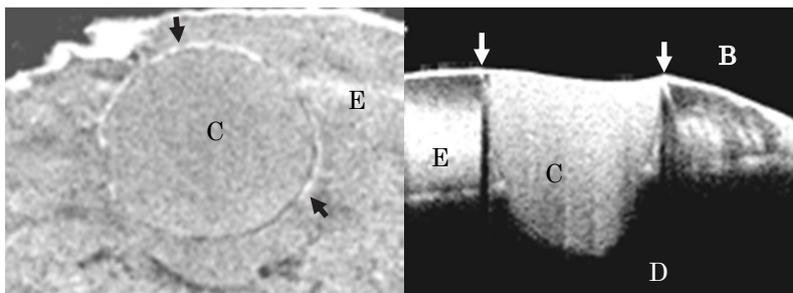


Fig. SS-OCT images obtained from composite resin restoration. A: Horizontal sectional view, B: Cross-sectional view. Arrow indicates presence of enamel crack. (C: composite resin, E: enamel, D: dentin)

## セルフエッチングアドヒーズブにおける *in vitro*, *in vivo* の接合界面の構造解析

虎の門病院歯科

○陶山雄司, 山田敏元, 森上誠, 宇野 滋, 杉崎順平

The TEM observation on the interfacial ultrastructure of a self-etching adhesive *in vitro* and *in vivo*

Department of Dentistry, Toranomon Hospital

○Suyama Y, Yamada T, Morigami M, Uno S, Sugizaki J

目的) 近年の接着システムの接着試験や接合界面解析の研究は抜去歯を用いた *in vitro* で行われることが多い。しかし、この *in vitro* の結果と *in vivo* の結果は異なる可能性があることが報告されている。そこで本研究はセルフエッチングアドヒーズブの歯質に対する接合界面における *in vitro*, *in vivo* の違いを、透過電子顕微鏡 (TEM) による観察を行い評価することを目的とする。

材料と方法) *in vivo* 試料としては抜去予定第三大臼歯に対し患者の了解を得て接着操作を行い、その後直ちに抜歯を行った歯を用い、*in vitro* 試料としてヒト新鮮抜去歯を用いた。ダイヤモンドバーで切削した象牙質を被着面とし、Clearfil Mega Bond (クラレノリタケデンタルジャパン) を業者指示に従い被着面に塗布し光重合を行った。処理後、Clearfil Protect Liner F (クラレノリタケデンタルジャパン) を充填、光硬化した。この接着試料より未脱灰、脱灰の超薄切片を作製した。これら試料を未染色あるいは染色 (リンタングステン酸) の条件で歯質との接合界面の TEM 観察を行った。

結果と考察) *in vitro* においてパー切削象牙質と Mega Bond の接合界面では、ギャップの形成は認められず、緊密な接合状態を示した。象牙質の表層に幅約 1 ミクロンの薄い一層が観察され、高倍率においてはその界面にアパタイトの残留が認められた。染色試料において象牙質表層に 1 ミクロンのアパタイトが溶解され、露出したコラーゲンが染色された電子密度の高い層が認められた。一方、*in vivo* 試料では緊密な接合状態が確認できるものの、表層の脱灰層は不明量であった。また、染色試料においても *in vitro* 試料と同様に電子密度の高い層が確認されたが、その厚さは約 0.5 ミクロンと *in vitro* 試料とは異なる像をていしていた。これは *In vitro* 試料と比較して *in vivo* 試料は生活反応がある状態で接着操作を行ったため、歯髄内圧の影響によりセルフエッチングプライマーの浸透深度や脱灰能に影響を及ぼした可能性が考えられる。

結論) *in vitro* 及び *in vivo* 試料においてセルフエッチングシステム Mega Bond は健全象牙質に対して緊密な接合状態を示した。またセルフエッチングシステムでは、歯髄内圧の影響により接合界面の形態が変化することが明らかになった。また、アパタイト結晶を観察するためには無染色試料が、コラーゲン線維の状態を観察するためには染色試料が適していることが示唆された。

## FCP-COMPLEX 処理した人工脱灰象牙質に対するレジン接着界面の評価

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院 医歯学総合研究科 う蝕制御学分野

○後村 純史、井上 剛、増子 律子、品川 淳一、二階堂 徹、田上 順次

### Evaluation on artificial caries affected dentin-adhesive interface with FCP-COMPLEX

Cariology and Operative Dentistry, Graduate school of Medical and Dental Sciences,

Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

○Junji ATOMURA, Go INOUE, Ritsuko MASHIKO, Junichi SHINAGAWA,

Toru NIKAIIDO, Junji TAGAMI

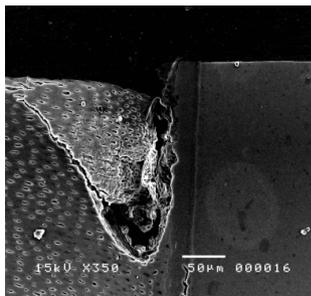
**【緒言】** う蝕治療に対するコンポジットレジン修復においては、う蝕影響象牙質が被着体となる。接着耐久性の向上は臨床成績に大きな影響を及ぼすことから、う蝕影響象牙質の強化は重要な課題となる。Chow, Takagi らは、歯の再石灰化に関する研究の中で、F<sup>-</sup>や Ca<sup>2+</sup>が沈殿せず安定して共存可能な条件を見出し、FCP Complex として報告した。一方、Joves ら(2013)は、接着試験の被着体として使用可能な人工う蝕影響象牙質モデルを作製した。増子ら(2014)は、牛歯を用いて作製した人工う蝕影響象牙質に対する FCP Complex 処理が耐酸性の向上に有効であることを報告している。そこで本研究においては、ヒト歯を用いて人工脱灰象牙質を作製し、FCP Complex 処理後の接着界面における耐酸性について ABRZ 観察し、接着性について微小引張り接着試験を行い評価した。

**【材料および方法】** 人工脱灰象牙質の作製に関しては、Joves ら (2013) の報告を基に行った。脱イオン水、2%NaF 又は FCP Complex (1.2M NaF, 2M CaCl<sub>2</sub>, 0.2M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) をそれぞれ 3μl、20 秒間塗擦し 10 秒間水洗、乾燥した。ABRZ 観察：各溶液塗布試料にクリアフィルメガボンド (クラレノリタケデンタル) を用い、エステライトフロークイック (A2, トクヤマデンタル) でサンドイッチ状に挟んで光硬化させた。試料は 37°C 24 時間水中保管後、人工脱灰液 (pH4.5) に 90 分間、さらに 6%NaOCl に 20 分間浸漬した。アルゴンイオンエッチング (EIS-1E エリオニクス, 1.0kV 0.6mA 40 秒) 後、SEM 観察した。微小引張り接着試験：各溶液塗布試料にクリアフィルメガボンドを業者指示通りに接着操作を行い、コンポジットレジン (エステライトフロークイックおよびクリアフィル AP-X ; A2, クラレノリタケデンタル) を築盛、1×1mm のビーム状試料を作製し試験片とした。24 時間水中保管後、クロスヘッドスピード 1 mm/min にて微小引張り接着試験を行った (EZ Test、島津製作所)。得られたデータは、One-way ANOVA を用いて、統計処理を行った。

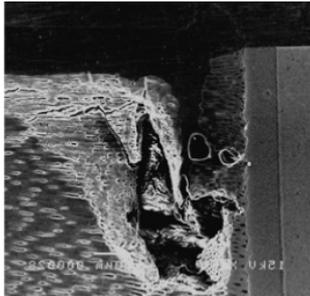
**【結果および考察】** 脱イオン水及び NaF ではボンディング層直下にそれぞれ幅約 10 μm、30 μm の明瞭な ABRZ が観察されたが、さらに深部では脱灰の影響を受けていた。それに対し FCP Complex では、ABRZ は約 30 μm で深部への脱灰の影響は見られず、FCP Complex が浸透した結果、耐酸性が向上したと考えられる。この結果は、増子らの報告と同様であり、FCP の有効性の確認出来た。微小引張り接着試験において、各溶液の平均値は、脱イオン水 : 48.5(±12.6) MPa、NaF : 44.8(±8.5) MPa、FCP Complex : 43.9(±13.9) MPa であり、統計学的有意差は認められなかった。

**【結論】** FCP Complex の人工脱灰象牙質に対する塗布は、初期の接着強さにおける影響は認められなかったが、NaF に比べて高い脱灰抑制性の可能性が示唆された。

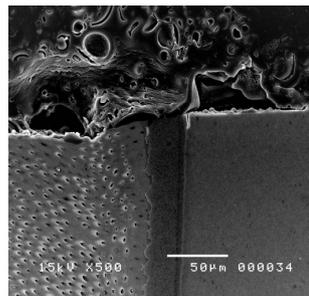
Deionized water (×350)



NaF (×350)



FCP-COMPLEX (×500)



## 新規接着性レジンセメントシステムと新規ハイブリッド型レジンブロックを用いた CAD/CAM アンレー修復の接着挙動

日本歯科大学 生命歯学部 接着歯科学講座  
○石井詔子 前野雅彦 小川信太郎 河合貴俊 中村昇司 柵木寿男 奈良陽一郎

### Bonding behavior of CAD/CAM onlay restoration using latest adhesive resin cement system and latest high-cured hybrid resin composite block

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

○ISHII Noriko, MAENO Masahiko, OGAWA Shintaro, KAWAI Takatoshi,  
NAKAMURA Shoji, MASEKI Toshio, NARA Yoichiro

【目的】近年の接着性レジンセメントシステムは、堅固な接着着性能の獲得を見据え、自己接着能の付加、デュアルキュア能の改善をはじめとする多面的な改良開発が進んでいる。また、Digital Dentistry の発展・普及により、歯科用 CAD/CAM システムの臨床活用は目新しいものではなく、特に切削加工用ブロックについては、様々な母材・構造・形状のものが市販され、本年 4 月には、ハイブリッド型コンポジットレジンを用いたブロックによる小臼歯部全部被覆冠が健康保険導入されるに至っている。そこで今回、新規接着性レジンセメントシステムと新規ハイブリッド型レジンブロックを用いた CAD/CAM アンレー修復の接着挙動について着目し、切削加工用ブロックの違いと動的荷重ストレスの有無による影響を含め、微小引張接着強さ ( $\mu$ -TBS) を指標として評価検討を行った。

【材料および方法】歯科用 CAD/CAM システムには、CEREC (CEREC AC と MC XL, SIRONA Dental Systems) を用いた。新規レジンセメントシステムとしては、前処理材であるセラミックプライマー-II と自己接着能を具備する G-CEM LinkAce (GC, LA) を選択し、対照システムとして、前処理材である Clearfil Ceramic Primer と自己接着能を具備しない Clearfil Esthetic Cement (Kuraray Noritake Dental, EC) を使用した。切削加工用ブロックには、新規高重合ハイブリッド型コンポジットレジンブロック : CERASMART (GC, C) を選択し、対照として長石系セラミックブロック : VITABLOCS Mark II CEREC/inLab (VITA, V) を用いた。被験歯には、本学部倫理委員会の承認を経て、ヒト抜去健全下顎大臼歯 30 本を準備し、修復に用いるブロックとセメントとの組み合わせによって 3 種修復条件 (C-LA, V-LA, V-EC) に区分 (n=10) した。まず、CEREC による形態コピー用光学印象の事前採得後に、フラットエンドダイヤモンドポイント (FG103, 松風) による規格化窩洞 (Fig. 1) を形成した。ついで、象牙質レジンコーティング、光学印象を経て MODB アンレーを作製し、各窩洞に対し、製造者指定の方法によるアンレーの臨床的接着を行った。その後、各試料半数に対し動的荷重ストレス (37°C 水中 157N/30 万回) を負荷 (S+群) し、残る半数を非負荷群 (S-群) とした。ついで、硬組織ミクロームにて 1 修復試料から断面積 1.0×1.0mm のビーム状試料 4 本を調整し、クロスヘッドスピード 1.0mm/min の条件下にて  $\mu$ -TBS 値の測定を行った。 $\mu$ -TBS 値は、Mann-Whitney の U 検定による統計学的分析 (n=20) を行った。

【成績および考察】 Fig. 2 に、3 種修復によるストレスの有無条件下の平均  $\mu$ -TBS (95%信頼区間) 値を示す。S-条件では C-LA  $\geq$  V-EC > V-LA の順に、S+条件では C-LA  $\geq$  V-EC  $\geq$  V-LA の順に大きな値を示した。分析の結果、C-LA による接着は、アンレー体接着当初の状態として捉えることができる S-条件下では、V-EC と同等かつ V-LA より大きな  $\mu$ -TBS 値を示す状態であるのに対し、一定の咀嚼環境を経た状態として捉えることができる S+条件下では、V-EC・V-LA との間に有意差が認められない状態となっていた。これら接着挙動は、動的荷重ストレス負荷によって有意な減弱現象を生じてしまう C-LA と V-EC、および接着強さを堅持する V-LA による修復較差に基づくものと考えられる。特に新規レジンセメントシステム LA は、接着当初において、長石系セラミックブロック V より新規ハイブリッド型レジンブロック C に対し優れた接着強さ獲得能を有している。しかし、動的荷重ストレスの負荷によって、長石系ブロックとの接着は数値的に堅持されるものの、新規レジンブロックとの接着、加えて自己接着能を具備しないセメント EC と長石系ブロックとの接着 (V-EC) は有意な侵襲を受けることが確認できた。このブロックによる差異は、ストレスの有無によっても変化している。特に、臨床的環境を想定した S+条件に注目した場合、3 種修復の接着破壊に要する応力値は同等ではあるものの、レジンセメントとの接着には、ミリング面の無機質/レジン比率や表面微小形状などを影響因子とする“接着の質”に違いがあることが考えられる。CAD/CAM 歯冠部修復の接着挙動は、用いるレジンセメントと切削加工用ブロックとの組み合わせによって異なることが明らかになった。今後、両者材料の追加を含め検証を続ける予定である。

本研究は学術研究助成基金助成金 (課題番号 26462899) の一部支援を受けた。

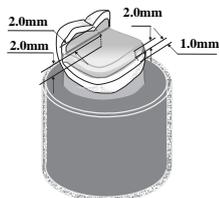


Fig.1 Standardized MODB cavity

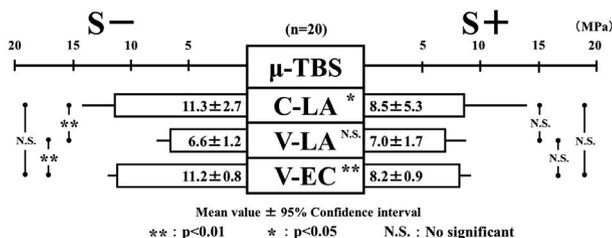


Fig.2 Mean  $\mu$ -TBS of three CAD/CAM restorations with / without dynamic cyclic load stress

## エナメル質表層下脱灰層へのストロンチウムとフッ化物の取り込み

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 う蝕制御学分野  
○半場 秀典, 中村 圭喜, 中嶋 省志, 二階堂 徹, 田上 順次

### Uptake of Sr and F in enamel subsurface lesions

Department of Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences,  
Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

○HAMBA Hidenori, NAKAMURA Keiki, NAKASHIMA Syozi, NIKAIIDO Toru, TAGAMI Junji

#### 【研究目的】

初期う蝕, いわゆる表層下脱灰病変に対するアプローチとして再石灰化療法が期待されている. カルシウム (Ca) やリン (P) をいかに脱灰部に浸透させ, 速やかに健全な歯質へと再石灰化させるかが課題である. 天然のエナメル質は成熟の過程で口腔内の種々のイオンによって置換され, 結晶の欠陥を補う. フッ化物 (F) はハイドロキシアパタイト内の OH と置換しやすく, フルオロアパタイトとして存在し, 脱灰しにくい結晶となる. 一方, ストロンチウム (Sr) は Ca と類似した化学的性質を持ち, ハイドロキシアパタイト内の Ca と置換しやすく, 生じたストロンチウムアパタイトはハイドロキシアパタイトより溶解性が低く, また脱灰層に対して, Sr と F の作用は拮抗せず, Sr が付加的に作用するという報告がある. そこで, 本研究の目的は再石灰化液中に含まれる Sr と F がエナメル質表層下脱灰層に及ぼす経時的なミネラル変化を検討することを目的とした. 解析には非破壊的に同一試料の経時的観察および解析を行うことができる高解像度マイクロ CT 装置を用いた.

#### 【材料および方法】

ウシ下顎切歯を精密低速切断機 (Isomet, Buehler) にて 4×4×3 mm のエナメル-象牙質ブロックを切り出し, エナメル質表面が露出するようにエポキシ樹脂にて包埋した. エナメル質側面を耐水研磨紙#2000 まで研削後, 2 x 2 mm の処理面をネイルバーニッシュにて規定した. 試料は脱灰液 (17.8 mM Ca, 8.8 mM P and 100 mM lactic acid, pH 4.3) に 7 日間浸漬し, 約 150 μm の表層下脱灰層を作製した. 処理する再石灰化条件として以下の 6 群を設定した. 再石灰化液 (1.5 mM Ca, 0.9 mM P, 130 mM KCl, and 20 mM HEPES, pH 7.0) に対して, (1) [0 ppmF, 0 ppmSr] (コントロール), (2) [0.1 ppmF, 0 ppmSr], (3) [1 ppmF, 0 ppmSr], (4) [0 ppmF, 10 ppmSr], (5) [0.1 ppmF, 10 ppmSr], (6) [1 ppmF, 10 ppmSr] の溶液となるよう調整した. 各群の試料は各再石灰化溶液中に 1-3w 浸漬した. 試料のミネラル変化を測定するため, 高解像度マイクロ CT 装置 (SMX-100CT, 島津製作所) にて脱灰前後, 再石灰化溶液浸漬 1w, 2w, 3w 後に同試料の同一部位を撮影した. 脱灰層の 3D 解析には, 3D 骨梁構造計測用ソフト (TRI/3D-BON/DIF, Ratoc) と歯質評価用ソフト (TRI/3D-BON/TMD, Ratoc) を用いて, 表層からの深さ方向への CT グレースケール値およびミネラル (vol%, μm) の変化率を計測した. 得られた測定値は有意水準 5%にて統計処理を行った.

#### 【結果および考察】

マイクロ CT 解析の結果, コントロールである [0 ppmF, 0 ppmSr] 群は 1-3w で緩徐なミネラル上昇を示した. Sr を含む群では歯質よりエックス線不透過性の高い部分が脱灰深層で検出され, 1-3w と深層から表層へのミネラル上昇を示した. 特に [0 ppmF, 10 ppmSr] 群はすべての群の中で最大の不透過層の形成を認めた. このことから, Sr が深層から取り込まれることが示唆された. また, F を含む群では脱灰表層の顕著なミネラル上昇を示し, F が脱灰表層に取り込まれていることが示唆された. Sr と F を含む群では F 単独の群よりも, 表層と深層にエックス線不透過性に高い層の形成を認めた. 本実験条件下において, 再石灰化溶液中の Sr は F と異なるメカニズムで表層下脱灰層の深層から取り込まれることが示唆された. Sr のエックス線不透過性は Ca のそれより高いことから, 今回の結果について硬さ試験や EDS を用いた元素分析を行い, Sr の影響を確認する予定である.

## エナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化過程における重炭酸イオンの影響

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 う蝕制御修復学講座

○倉持江里香, 飯塚純子, 長谷川晴彦, 國松雄一, 菌部悠子, 松島 大, 椎谷 亨, 富山 潔, 向井義晴

### Effect of bicarbonate ion in remineralization process of subsurface enamel lesions

Dept. of Cariology and Restorative Dentistry, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University

○KURAMOCHI Erika, IIZUKA Junko, HASEGAWA Haruhiko, KUNIMATSU Yuichi, SONOBE Yuko,  
MATSUSHIMA Dai, SHIYA Toru, TOMIYAMA Kiyoshi, MUKAI Yoshiharu

【研究目的】第 139 回本学会において口腔内と同様に重炭酸イオンが存在する条件での再石灰化層の炭酸基とリン酸基の変化について報告した。ヒト安静時唾液の濃度と同等の 5 mM の重炭酸塩を添加した再石灰化溶液を用いた再石灰化層と重炭酸塩非添加の再石灰化液を用いた再石灰化層は、同様な再石灰化量と炭酸基/リン酸基比の減少を示した。一方、刺激時唾液と同等の 50 mM の重炭酸塩を添加した再石灰化液を用いた再石灰化層は、有意な炭酸基の増加と若干の再石灰化の抑性を認め、歯面上に析出物が認められた。そこで本研究の目的は、再石灰化期間中に容器を溶液で満たした条件でのエナメル質表層下脱灰病巣における炭酸基およびリン酸基の変化を顕微ラマン分光法と再石灰化の状況を Transversal Microradiography (以下 TMR) にて確認することとした。

【材料および方法】ウシ下顎中切歯より切り出した直径 5 mm の円盤状エナメル質片を耐水研磨紙で 2,000 番まで研磨後、耐酸性パーニッシュにて試験面を 2×3 mm に規定、容器底部に試料を固定し脱灰液(0.1 M lactic acid, 8% methylcellulose, pH 4.6, 37 °C)で 10 日間浸漬し表層下脱灰病巣を作製した。その後、炭酸水素ナトリウムを添加することにより重炭酸塩濃度をそれぞれ 5 mM, および 50 mM に調整した再石灰液 (1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.9 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 130 mM KCl, 20 mM Hepes, pH7.0)で容器を満たし、密閉状態で 10 週間浸漬した。なお、溶液は 1 週間ごとに交換した。実験群は、1) Dem 群: 脱灰病巣作製のみ, 2) Sound 群: 非処理エナメル質, 3) Cont 群: 重炭酸塩非添加再石灰液浸漬, 4) Rest 群: 5 mM NaHCO<sub>3</sub> 添加再石灰化液浸漬, Stim 群: 50 mM NaHCO<sub>3</sub> 添加再石灰化液浸漬とした。各群の試料数は 12 (顕微ラマン分析用 (n=6), TMR 用 (n=6)) とした。顕微ラマン分析用試料は歯軸方向に垂直に切断し、断面を耐水研磨紙 2,000 番で研磨後、DW にて水洗し顕微ラマン分光光度計 (Nicolet Almega XR, Thermo Fisher scientific) を用いて、露光時間 10 秒, 露光回数 10 回, 励起波長 780 nm, 出力レベル 10 mW, グレーティング 360 lines/mm, アパーチャー 50 μm の条件にて測定を行った。測定は、1 試料において深度別に表層より 10 μm を表層付近, 40 μm を病巣体部と規定し、各深度について 6 点行った。その後、1,070 cm<sup>-1</sup> を炭酸基のピーク, 960 cm<sup>-1</sup> をリン酸基のピークとしてラマン強度を数値化し、炭酸基/リン酸基比を比較検討した。TMR 用試料は樹脂包埋後、薄切切片とし TMR 撮影 (PW3830, 管電圧 25 kV, 管電流 15 mA, 照射時間 20 分) を行い、ミネラル喪失量 (以下 IML) を算出した。統計分析は、one-way ANOVA および Games-Howell test により有意水準 5% で行った。

【結果】顕微ラマン分析の結果、炭酸基/リン酸基比は表層付近および病巣体部ともに、Sound 群に比較し Rest 群は有意差なく、Stim 群は有意に上昇した。また、Cont 群は有意に低い値を示した。Rest 群の IML は Cont 群と有意差はなく Dem 群に比較し有意に減少していることから再石灰化が生じていることが確認された。Stim 群は、Cont 群および Rest 群に比較し、有意差はないもののやや高い IML を示したが歯面に析出物は確認されなかった。

【考察】安静時唾液を想定した 5 mM 重炭酸塩添加再石灰化液浸漬の Rest 群は、非処理エナメル質と同等の炭酸基/リン酸基比を示したことから、一定の重炭酸イオンが常時存在する口腔内に近い環境においては、再石灰化に抑制的な作用は示さないものの、濃度依存的に表層下脱灰病巣に取り込まれるものと考えられた。今回、再石灰化溶液を容器に満たし、液中からの二酸化炭素の放出を抑える環境で実験を行ったため、Stim 群においても pH が上昇せず、析出が生じなかったものと考えられ、より口腔内近い環境が再現できたものと思われた。

【結論】再石灰化溶液に含まれる重炭酸イオンはエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化過程で病巣中に取り込まれるが再石灰化を有意に抑制する影響は認められなかった。

## 腫瘍壊死因子抑制薬治療前後における歯周・血清蛋白プロファイル

新潟大学大学院医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野<sup>1</sup>

新潟大学医歯学総合病院 歯科総合診療部<sup>2</sup>

○小林哲夫<sup>1,2</sup>、横山智子<sup>1</sup>、岡田 萌<sup>1</sup>、吉江弘正<sup>1</sup>

### Periodontal and serum protein profiles before and after medication of tumor necrosis factor inhibitor

Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences<sup>1</sup>

General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Medical and Dental Hospital<sup>2</sup>

○Tetsuo Kobayashi<sup>1,2</sup>, Tomoko Yokoyama<sup>1</sup>, Moe Okada<sup>1</sup>, Hiromasa Yoshie<sup>1</sup>

#### 【目的】

腫瘍壊死因子 (TNF) の過剰産生は、関節リウマチ (RA) ならびに歯周炎に共通した病因の 1 つであることが知られている。近年、TNF 抑制治療は RA の臨床的改善と歯周組織の炎症状態の改善傾向をもたらすことが報告されているが、ヒト型抗ヒト TNF- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) モノクローナル抗体であるアダリムマブ (ADA) の歯周炎に対する効果については未だ評価が成されていない。そこで今回は、歯周炎を併発している RA 患者を対象に、ADA 治療前後における歯周・RA 状態、血清サイトカイン濃度および網羅的蛋白解析結果の比較を行った。

#### 【材料および方法】

新潟県立リウマチセンターを受診されインフォームドコンセントが得られた歯周炎を併発している RA 患者 20 名を対象とした。ベースライン時と 3 カ月後の再評価時に、歯周・RA 検査、血清検査、ならびに血清プロテオーム解析を行った。歯周検査として、歯肉炎指数 (GI)、プロービング時の出血 (BOP)、プロービングポケット深さ (PPD)、臨床的アタッチメントレベル (CAL) を、RA 検査として、疾患活動度 (DAS28) を、血清検査としては、リウマトイド因子 (RF)、抗環状化シトルリン化ペプチド抗体 (抗 CCP 抗体)、C 反応性蛋白 (CRP)、マトリックスメタロプロテアーゼ-3 (MMP-3)、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の血清濃度を各々 ELISA 法にて測定した。さらに、6 名から得た同量血清を混和後、高含量タンパク質を除去し、SYPRO Ruby 染色にて 2 次元電気泳動を行った。ADA 治療の前後で発現スポット強度に有意差が認められたスポットをゲルから取り出し、mass spectrometer による質量分析および MASCOT データベースを照会してタンパク質同定を行った。

#### 【結果および考察】

研究期間中、口腔内・RA 状態での副作用は特に認められなかった。ベースライン時と比べて再評価時では、プラークコントロールレベルは同等で RA 投薬も一定であったにもかかわらず、GI、BOP、PPD、DAS28-CRP、RF 濃度、抗 CCP 抗体濃度、CRP 濃度、MMP-3 濃度、TNF- $\alpha$  濃度、IL-6 濃度が各々有意に低下していた。したがって、ADA 治療によって、全身炎症レベルが緩和され RA 状態や歯周状態の臨床的改善をもたらされたことが考えられる。局所の炎症への影響については歯肉溝浸出液のサイトカイン濃度を測定しておらず、今後の検討課題である。プロテオーム解析の結果、ADA 治療前後で有意差が認められたものは計 9 スポット、5 タンパク質：serum amyloid A (SAA)、alpha-1-acid glycoprotein (AGP)、complement component 4 (C4)、complement factor H (CFH)、phospholipase D (PLD) であり、いずれのスポットの発現強度もベースライン時と比べて再評価時で有意に低下していた。SAA と AGP は急性期タンパク質であり、RA 患者および歯周炎患者で血清レベルが増加し、TNF 抑制治療により血清レベルが減少することが報告されており本結果と一致する。また、C4 と CFH も急性期タンパク質で補体経路の構成因子であり、TNF 抑制治療により補体活性化の抑制を認めた報告と本結果は矛盾しない。以上の結果から、ADA 治療により RA 患者の歯周状態が改善される可能性が示唆された。

会員外共同研究者：中園 清博士、村澤 章博士、伊藤 聡博士、小林大介博士 (新潟県立リウマチセンター)  
大房 健博士、山縣 彰博士 (東和環境科学株式会社プロフェニックス事業部)

## 歯根膜細胞における低酸素誘導因子による PLAP-1 発現制御

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)  
○山本 智美、竹立 匡秀、沢田 啓吾、山羽 聡子、森本 千晶、山田 聡、村上 伸也

### HIF-1 Regulates PLAP-1 Expression in Periodontal Ligament Cells

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan  
○YAMAMOTO SATOMI, TAKEDACHI MASAHIDE, SAWADA KEIGO, YAMABA SATOKO, MORIMOTO CHIAKI, YAMADA SATORU,  
MURAKAMI SHINYA

#### 【研究目的】

組織の低酸素状態に対する応答は低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF) の活性化を介して、恒常性の維持のみならず炎症や創傷治癒、組織の再生過程において重要な役割を担うことが報告されている。我々の研究室では歯根膜特異的分子である PLAP-1 (Periodontal Ligament Associated Protein-1) が歯根膜細胞の細胞機能を制御することにより歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担う分子の一つであることを明らかにしてきた。本研究では、低酸素状態が PLAP-1 分子の発現に及ぼす影響とその発現制御メカニズムについて明らかにすることを目的とした。

#### 【材料および方法】

##### 1. 低酸素環境での培養がヒト歯根膜細胞 (HPDL) の PLAP-1 発現に及ぼす影響に関する解析

酸素分圧の調整が可能である O<sub>2</sub>-Co<sub>2</sub> インキュベーターを用いて、HPDL を低酸素下 (1%O<sub>2</sub>) に 12 時間培養した後 mRNA を回収し、PLAP-1 遺伝子の発現を real-time PCR 法にて検討を行った。また、同条件にて 48 時間培養した際の培養上清中の、PLAP-1 タンパクの発現を抗 PLAP-1 抗体を用いたウエスタンブロット法にて検討した。

##### 2. HIF-1 がヒト歯根膜細胞の PLAP-1 発現に与える影響に関する解析

HPDL の低酸素下での HIF-1 $\alpha$  タンパクの発現上昇を抗 HIF-1 $\alpha$  抗体を用いたウエスタンブロット法にて確認した。歯根膜細胞における低酸素下での PLAP-1 の発現上昇への HIF-1 $\alpha$  の関与について検討を行うため、HIF-1 $\alpha$  分解阻害剤 Deferoxamine (DFO) あるいは HIF-1 転写活性阻害薬 chetomin 存在下にて HPDL を培養し、上記方法と同様に PLAP-1 の発現を遺伝子レベル、タンパクレベルで解析した。

##### 3. PLAP-1 遺伝子上流に存在する HRE 配列と HIF-1 との結合に関する解析

PLAP-1 の転写開始点から 995bp と 939bp 上流に Hypoxia Responsible Elements (HRE) 配列 (5' -ACGTG-3' あるいは 5' -GCGTG-3' ) が存在する。この領域と HIF-1 との結合を Human/Mouse HIF-1 $\alpha$  Chromatin Immunoprecipitation Kit (R&D systems) を用いてクロマチン免疫沈降法 (ChIP assay) にて検討した。

#### 【結果】

HPDL を低酸素環境で培養することにより、PLAP-1 の遺伝子発現とタンパク発現の上昇ならびに HIF-1 $\alpha$  タンパクの発現上昇を認めた。また、DFO 添加により HIF-1 $\alpha$  タンパクの蓄積を確認するとともに PLAP-1 の発現上昇を認めた。さらに低酸素誘導性の PLAP-1 発現の上昇はケトミン存在下で有意に抑制された。また、クロマチン免疫沈降において PLAP-1 の promoter 領域の HRE 配列と HIF-1 $\alpha$  との結合を認めた。

以上の結果より、低酸素下にて歯根膜細胞は HIF-1 $\alpha$  依存性に PLAP-1 の発現を誘導することが明らかとなった。

#### 【考察】

低酸素下で発現誘導された PLAP-1 は低酸素応答において重要な役割を担うことが知られる TGF- $\beta$  に抑制的に作用することにより同応答に積極的に関与しているのではないかと考え、現在同分子の低酸素下における機能について解析を行っている。

## FGF-2 存在下で分化した単球は M2 マクロファージに類似した形質を有する

大阪大学大学院 歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)  
○長谷川詩織、柳田学、久保田実木子、森健太、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也

### Monocytes differentiated with FGF-2 display similar characteristics of M2 macrophages

Osaka University Graduate School of Dentistry Department of Periodontology  
○Shiori Hasegawa, Manabu Yanagita, Mikiko Kubota, Kenta Mori, Motozo Yamashita, Satoru Yamada,  
Masahiro Kitamura and Shinya Murakami

#### 【目的】

サイトカインや細胞増殖因子を局所応用することにより、歯周組織再生を誘導する試みがなされている。当研究室では、FGF-2 の局所投与が有意な歯周組織再生を誘導し得ること、FGF-2 による幹細胞増殖促進、細胞外基質産生制御や血管新生などの微小環境の整備が歯周組織再生促進に関与する可能性を報告してきた。しかしながら、創傷部に遊出してくる血球系細胞に対する FGF-2 の作用の詳細は明らかにされていない。近年、マクロファージは周囲環境に応じて多彩な機能を獲得することが知られており、機能的には大きく二つの亜群に分類される。すなわち、抗菌・抗ウイルス・抗腫瘍活性を有する M1 マクロファージと組織修復・血管新生・免疫制御能を持つ M2 マクロファージの存在が示されている。本研究ではヒト末梢血液より分離した単球を FGF-2 存在下で培養することにより、どのような機能を具備したマクロファージ様細胞に分化するかを検討することにより、FGF-2 誘導性歯周組織再生機構の一端を解明することを目的とした。

#### 【方法】

1. ヒト末梢血から単核球分画を分離し、磁気標識 CD14 抗体を用いて CD14 陽性単球を分離・採取した。M1/M2 マクロファージへの分化については Verreck らの方法に従った (PNAS 2003 p4560-5)。すなわち、得られた CD14 陽性単球を GM-CSF (5ng/ml)、M-CSF (25ng/ml) あるいは FGF-2 (2-50ng/ml) 存在下で 6-7 日培養し、得られた細胞をそれぞれ M1 マクロファージ (M1-MF)、M2 マクロファージ (M2-MF)、FGF-マクロファージ様細胞 (FGF-MF) とした。
2. 位相差顕微鏡にて分化したマクロファージの形態を観察した。
3. M1/M2 マクロファージマーカーの発現をリアルタイム PCR 法にて定量した。
4. M1-MF、M2-MF、FGF-MF における IL-10 タンパク分泌量を ELISA 法にて検討した。

#### 【結果】

1. M1-MF は 目玉焼き様 (fried egg-like shape) 形態、M2-MF 及び FGF-MF は紡錘型 (spindle-like shaped) に形態を示す細胞が多く認められた。
2. FGF-MF において M2-MF のマーカーである CD163、IL-10 の mRNA 発現が強く認められた。一方、M1-MF で発現が強く認められる炎症性マーカーについて FGF-MF のおいて強い発現を認めなかった。(しかしながら、同じく M1-MF で強く発現している VEGF-A、PDGF の発現に関して、FGF-MF において強い発現を認めた。)
3. FGF-MF は M2-MF と同様に LPS 刺激により IL-10 タンパクを産生した。M1-MF からは IL-10 タンパクの産生を認めなかった。

#### 【結論】

FGF-MF は M1-MF は M2-MF と全く同じ性質を具備しているわけではないものの、IL-10 の強い発現を認めることから M2-MF の亜群としての性質を持っている制御性 MF であると考えられる。FGF-MF は創傷により損傷した組織の炎症反応を速やかに収束させて歯周組織再生の次のステップへ向けて微小環境を整えている可能性が考えられる。

### ***Porphyromonas gingivalis* 経口単回投与によるマウス腸内細菌叢の変動**

新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔保健学分野<sup>1</sup>, 歯周診断・再建学分野<sup>2</sup>, 歯学教育研究開発学分野<sup>3</sup>

○中島 麻由佳<sup>1,2</sup>, 有松 圭<sup>1,2</sup>, 高橋 直紀<sup>1,2</sup>, 皆川 高嘉<sup>1,2</sup>, 山田 ひとみ<sup>1,2</sup>,  
松田 由実<sup>1,2</sup>, 佐藤 圭祐<sup>1,2</sup>, 多部田 康一<sup>2</sup>, 中島 貴子<sup>3</sup>, 山崎 和久<sup>1</sup>

#### **Single oral administration of *Porphyromonas gingivalis* and alteration of gut microbiota.**

Laboratory of Periodontology and Immunology, Division of Oral Science for Health Promotion<sup>1</sup>,

Division of Periodontology<sup>2</sup>, Division of Dental Educational Research Development<sup>3</sup>,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Nakajima M<sup>1,2</sup>, Arimatsu K<sup>1,2</sup>, Takahashi N<sup>1,2</sup>, Minagawa T<sup>1,2</sup>, Yamada H<sup>1,2</sup>,

Matsuda Y<sup>1,2</sup>, Sato K<sup>1,2</sup>, Tabeta K<sup>2</sup>, Nakajima T<sup>3</sup>, Yamazaki K<sup>1</sup>

#### 【研究目的】

歯周炎は動脈硬化疾患や糖尿病などのメタボリックシンドローム関連疾患のリスク因子であることが、これまでの疫学的調査および動物実験により明らかにされている。そのメカニズムとして、歯周炎組織を介した菌血症や、局所で産生された炎症性サイトカインにより惹起された全身の軽微で持続的な炎症の影響などが考えられているが、いずれも決定的であるとは言えない。

一方、腸内細菌叢の変動がメタボリックシンドローム関連疾患の発症や進行に関わっていることが近年明らかになりつつある。腸内細菌叢の平衡破綻により腸管の透過性が亢進し、血液中のエンドトキシンレベルが上昇し全身性に炎症が誘導されることで、それらの疾患の発症や進行につながると考えられている。我々はマウスに *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を口腔より複数回投与し、嚥下された *P. gingivalis* が腸管の細菌叢の変化とそれに伴う代謝性内毒素血症を引き起こすことで、肝臓・脂肪組織に炎症を誘導し、インスリン抵抗性を惹起することを明らかにし、歯周炎がメタボリックシンドローム関連疾患に影響を及ぼす新たなメカニズムとして報告した(Arimatsu K *et al.*, *Sci Rep.* 2014)。今回、更なる詳細なメカニズムの解明を目的として、歯周病原細菌の単回投与を行い、腸管の細菌叢の変化および腸管透過性、さらに血液・肝臓組織中への細菌の播種について解析を行った。

#### 【材料及び方法】

6週齢雄の C57BL/6 マウスにカルボキシメチルセルロースに懸濁した *P. gingivalis* W83 株  $1 \times 10^9$  CFU を口腔よりフイーディングニードルを用いて1回投与した。投与から2日後に盲腸内容物および糞便を採取し、細菌叢の網羅的解析をメタ 16S ribosomal RNA 解析にて行った。また、血清中のエンドトキシンレベルを *Limulus amoebocyte lysate* 試験にて測定した。さらに、Real-time PCR 法にて腸管組織におけるタイトジャンクション関連タンパクの遺伝子発現の変化の解析、および血液・肝臓組織中における *P. gingivalis* 特異的 16S rRNA, Universal 16S rRNA 遺伝子の定量を行った。

#### 【結果と考察】

*P. gingivalis* 単回投与を行った群の腸内細菌叢において Bacteroidetes 門に属する菌の比率が有意に上昇し、Firmicutes 門に属する菌の比率が有意に減少した。この細菌叢の変動は、先に我々が報告した *P. gingivalis* 複数回投与による腸内細菌叢の変動と同様の傾向であった。*P. gingivalis* 投与群の腸管において、タイトジャンクション関連タンパクの遺伝子発現 (*tjp-1*, *occludin*) の減少が認められたことから、腸管透過性が亢進している可能性が示唆された。また、血清中のエンドトキシンレベルの上昇が認められた。さらに、Sham 投与群と比較して *P. gingivalis* 投与群の肝臓組織において Universal 16S rRNA 遺伝子の検出量の上昇が認められたが、血液中において検出量の上昇は認められなかった。Sham 投与群および *P. gingivalis* 投与群の肝臓組織および血液中に *P. gingivalis* 特異的 16S rRNA 遺伝子は検出されなかった。

#### 【結論】

*P. gingivalis* をわずか1回口腔から投与するだけで血清中エンドトキシンレベルが上昇し、肝臓組織中への細菌到達量が増加した。これらの変化は、腸内細菌叢が変動すると共に腸管透過性が亢進することで引き起こされる可能性が示された。

歯肉溝滲出液における出血反応と酵素活性との関係

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座<sup>1)</sup>,  
日本歯科大学附属病院総合診療科<sup>2)</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>3)</sup>,  
日本歯科大学生命歯学部<sup>4)</sup>, 東京都<sup>5)</sup>

○伊藤 弘<sup>1)</sup>, 沼部幸博<sup>1)</sup>, 関野 愉<sup>1)</sup>, 村極悦子<sup>1)</sup>, 石黒一美<sup>1)</sup>,  
小川智久<sup>2)</sup>, 戸円智幸<sup>3)</sup>, 橋本修一<sup>4)</sup>, 永田達也<sup>5)</sup>, 濱田 亮<sup>5)</sup>

Relationship of bleeding reaction and enzyme activity in GCF

Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo<sup>1)</sup>,  
The Nippon Dental University Hospital, General Dentistry<sup>2)</sup>

Dental Research Institute, Radio Isotope Center, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry Tokyo<sup>3)</sup>,  
The Nippon Dental University, School of Life Dentistry Tokyo<sup>4)</sup>, Tokyo-to<sup>5)</sup>

○Hiroshi Ito<sup>1)</sup>, Yukihiro Numabe<sup>1)</sup>, Satoshi Sekino<sup>1)</sup>, Etsuko Murakashi<sup>1)</sup>, Hitomi Ishiguro<sup>1)</sup>,  
Tomohisa Ogawa<sup>2)</sup>, Toshiyuki Toen<sup>3)</sup>, Shyuichi Hashimoto<sup>4)</sup>, Tatsuya Nagata<sup>5)</sup>, Makoto Hamada<sup>5)</sup>

【目的】

歯周病の診査・診断に必要な不可欠なツールとして Probing pocket depth (PPD) と bleeding on probing (BOP) がある。しかしながら、PPD と BOP の両検査精度には限界があり、歯肉溝滲出液 (gingival crevicular fluid; GCF) の成分解析を加えることが、精度の高い診断結果獲得に寄与することを報告してきた。今回我々は、組織脆弱性を BOP の有無、出血傾向を GCF 中の hemoglobin (Hb) の有無から設定し、それらに対する酵素活性の傾向を考察した。

【材料および方法】

- 1、被験者：定期的に SPT を受診している非喫煙者 64 名 (男性 28 名, 女性 36 名, 年齢±標準偏差; 58.5±15.0 歳) とした。
- 2、検索部位：歯冠修復のない上下顎前歯部 103 部位とした。
- 3、臨床パラメータ：plaque index (PII), gingival index (GI), clinical attachment level (CAL), PPD, BOP, GCF 量とした。  
GCF 採取は、余剰なプラークを除去後簡易防湿にてペリオペーパー(OraFlow)を同一部位に対して 3 回軽い抵抗感があるまで挿入を行い、ペリオトロン 8000 (OraFlow)にて測定を行った。GCF 量は検量線にて算出した。なお、ペリオペーパーに出血が認められた試料は除外した。
- 4、GCF 酵素活性：
  - ①エラスターゼ活性：Glutamic acid-Proline-Valine-*p*-nitroanilide を用いた酵素活性にて測定した。
  - ②AST 活性：Wako kit を用いた。
  - ③ALP 活性：Bessey-Lowly 法を応用した。
- 5、Hb 検出法 (出血反応)：ヒトモノクローナル抗体を用いた IC 法 (ワカモト製薬) とルミノール法を用いた。
- 6、倫理的配慮：本研究は日本歯科大学生命歯学部倫理委員会承認のもと遂行された (承認番号：2111)。

【結果および考察】

脆弱な歯周組織を示す BOP(+)と出血を示す Hb(+)の両方を示す BOP(+)Hb(+)群は、それ以外の群と比較して、歯周組織由来の AST 活性と ALP 活性は有意に高く、組織損傷が極めて大きいことを表す結果となった。一方、炎症性細胞由来のエラスターゼ活性では有意差は認められなかった。このことから、両群間で炎症初期に認められる好中球浸潤に差はないものの組織損傷には差があることが明らかとなった。つまり、AST 活性と ALP 活性は、歯周病の重篤度に相関し上昇するために組織損傷に有効な指標となり、一方エラスターゼ活性は、歯周病の発症段階から慢性期にかけて観察されることが示された。歯周病の今後、歯周組織検査との併用には、各酵素活性の特性を考慮した考察が必要と考えられた。

【資金源】

本研究は文部省科学研究費助成金：基盤研究 C, 課題番号：23593072・25463267 と平成 26 年度日本歯科大学生命歯学部研究プロジェクトの一部助成を受けて行われた。