

歯髄再生を目指した bFGF と simvastatin の同時徐放化ゼラチンの作製

京都大学再生医科学研究所生体材料学分野¹⁾

鶴見大学歯学部歯内療法学講座²⁾

○森戸 亮行^{1,2)}、松井 誠¹⁾、吉田 拓正²⁾、田畑 泰彦¹⁾、細矢 哲康²⁾

Gelatin hydrogels capable for dual release of bFGF and simvastatin-micelle for dental pulp regeneration
Department of Biomaterials, Field of Tissue Engineering, Institute for Frontier Medical Sciences,
Kyoto University¹⁾,

Department of Endodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine²⁾

○MORITO AKIYUKI^{1,2)}, MATSUI MAKOTO¹⁾, YOSHIDA TAKUMASA²⁾, TABATA YASUHIKO¹⁾, and HOSOYA NORIYASU²⁾

【研究目的】歯髄再生は歯科臨床において大きな目標であり、これまでも様々な研究が行われている。特に、歯髄幹細胞 (DPSCs) に関しては多くの研究があり、この細胞移植による歯髄再生が期待されている。しかしながら、その臨床応用には多くの問題点がある。例えば、幹細胞単離において抗体の使用が必要であるが、この手技が煩また雑であり感染のリスクがある。細胞自体のがん化の可能性などの問題もある。加えて細胞回収と増殖等にかかるコストも考えなければならない。このように幹細胞移植による歯髄再生治療への期待は大きい。現時点では臨床応用に対する考慮すべき改良点があり、他の治療方法も考える必要がある。本研究の目的は、細胞を用いることなく歯髄再生を可能とする技術を研究開発することである。これまでも basic fibroblast growth factor (bFGF) や simvastatin が歯髄再生に関与していることが知られている。そこで本研究ではこれらの活性物質をゼラチンハイドロゲルから徐放化することを試みた。これらの物質が徐放化により体内に存在している歯髄幹細胞の機能を賦活化することで歯髄の再生を試みる。

【材料および方法】重量平均分子量2,000の乳酸オリゴマーおよび重量平均分子量20,000と100,000のゼラチン(等電点5.0, 新田ゼラチン株式会社から供与)を用いて乳酸オリゴマーグラフトゼラチンを作製した。乳酸オリゴマーをジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解させた後、N,N'-disuccinimidyl carbonateと4-(dimethylamino)pyridineを加え、乳酸オリゴマーの末端官能基を活性化させた。次に、この溶液にゼラチンのDMSO溶液を滴下、6時間室温で反応させた。反応液を蒸留水に対して3日間の透析を行った後、凍結乾燥し乳酸オリゴマーグラフトゼラチンを得た。トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 吸光光度法にて乳酸オリゴマーグラフトゼラチンの乳酸導入率を求めた。乳酸オリゴマーグラフトゼラチン (10 mg/10 ml) と simvastatin (1 mg/ml) の DMSO 溶液を混合した後、透析、凍結乾燥を行って simvastatin 内包乳酸オリゴマーグラフトゼラチンを調製した。simvastatin 内包乳酸オリゴマーグラフトゼラチン中の simvastatin 内包率は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて測定した。simvastatin 内包乳酸オリゴマーグラフトゼラチン (10 mg) とゼラチン (100 mg) を蒸留水に溶解し、凍結真空乾燥を行った。その後、140°C で48時間、ゼラチンの熱架橋を行い、simvastatin 含有ゼラチンハイドロゲルを得た。ゼラチンハイドロゲルからの simvastatin の徐放性は以下のように評価した。ハイドロゲルをコラゲナーゼ (373 ng/ml リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH 7.4) 溶液中に投入し、経時的に PBS 中に放出された simvastatin を吸光光度法にて定量した。次に、simvastatin 含有ゼラチンに100 μg bFGFを滴下し、simvastatin と bFGF とを含有したゼラチンハイドロゲルを作製した。in vitro, in vivo におけるゼラチンハイドロゲルの分解と bFGF の徐放も評価した。

【結果】乳酸オリゴマーの分子量に関係なく、乳酸オリゴマーグラフトゼラチンの作製が可能であった。その中で乳酸オリゴマー/ゼラチン=8/1 (モル/モル) 比で合成を行った時に乳酸オリゴマー導入率が最大となった。また、simvastatin 内包率に関しても、同様のモル比で作製したグラフトゼラチンで最も高かった。ゼラチンハイドロゲル分解ならびに simvastatin と bFGF の徐放試験の結果、ハイドロゲルは2週間で分解され、それにもない bFGF ならびに simvastatin が徐放された。

【考察】ゼラチンへの乳酸オリゴマーの導入率によりグラフトゼラチンへの simvastatin 内包率が異なる事がわかった。これは疎水性の乳酸オリゴマーと親水性のゼラチンとのバランスが疎水性である simvastatin との相互作用に影響を与えることを示している。in vitro における分解と徐放試験では物質はハイドロゲル分解とともに徐放されることが確かめられた。一方、in vivo においてゼラチンハイドロゲルは2週間で分解された。このことから in vivo においても、ゼラチンハイドロゲルの分解とともに、bFGF ならびに simvastatin が同時に徐放されることが考えられる。ゼラチンハイドロゲルの歯髄腔への移植した際には、その部位で bFGF と simvastatin が徐放され、周辺に作用することが予想される。歯髄腔内での bFGF や simvastatin の歯髄幹細胞および象牙芽細胞への作用について報告する。

【結論】2週間で分解され、bFGF と simvastatin を同時に徐放化できるゼラチンハイドロゲルの作製が可能となった。

α -TCP/Te-CP セメントの直接覆髄薬としての評価

- 1) 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野
- 2) 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔生化学分野
- 3) 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科理工学分野

○長谷川智哉¹⁾、川木晴美²⁾、武田進平¹⁾、河野哲¹⁾、玉置幸道³⁾、土井豊³⁾、近藤信夫²⁾、吉田隆一¹⁾

Evaluation of α -TCP/Te-CP cement as a direct pulp capping material

- 1) Department of Endodontics, Asahi University School of Dentistry
 - 2) Department of Oral Biochemistry, Asahi University School of Dentistry
 - 3) Department of Dental Materials Science, Asahi University School of Dentistry
- Hasegawa Tomoya¹⁾, Kawaki Harumi²⁾, Takeda Shinpei¹⁾, Kawano Satoshi¹⁾, Doi Yutaka³⁾, Tamaki Yukimiti³⁾, Kondoh Nobuo²⁾, Yoshida Takakazu¹⁾

【研究目的】

歯髄の長期保存は歯科保存治療において重要な課題の1つである。直接覆髄薬として主に水酸化カルシウム製剤が用いられているが、強アルカリ性で歯髄刺激が強く、歯髄の広範囲な壊死を引き起こす可能性が指摘されている。そこで我々は、生体親和性が高いと報告されているリン酸カルシウムを主成分とする α -リン酸三カルシウム/リン酸四カルシウム (α -TCP/Te-CP) 粉末を材料として覆髄薬に応用すべく、試作セメントの物理化学的性質やラット露髄モデルへ応用した実験結果を本学会 (135~137 回) にて報告してきた。今回は、 α -TCP/Te-CP セメントの作成条件について、培養歯髄細胞を用いた in vivo 評価とラット露髄モデルを用いた in vitro の評価を行い、覆髄薬として応用する際の α -TCP/Te-CP セメントに用いる練和液の最適化を試みた。

【材料および方法】

α -TCP/Te-CP セメントは、炭酸カルシウムと第二リン酸カルシウム二水塩をモル比 5:6 で機械混合したものを、1500°Cで5時間加熱し、得られた焼結塊を粉碎したものをセメント粉末とした。練和液には正リン酸、リン酸二水素ナトリウム、クエン酸の水溶液を用い、pH等の物性および、ヒト歯髄由来幹細胞(hDPSC)の培養による評価を行った。対照として水酸化カルシウム製剤であるダイカル®を用いた。さらに、物性およびhDPSCの培養結果からリン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液として絞り込み、ダイカル®を対照として、ラット上顎第一臼歯露髄モデルに覆髄薬として応用し、経時的に取り出した組織よりパラフィン包埋切片を作製して組織化学的、免疫組織化学的に評価した。

【結果】

練和液として正リン酸、リン酸二水素ナトリウム、およびクエン酸の水溶液を用い pH を評価したところ、正リン酸およびクエン酸では練和直後あるいは練和後経時的に pH が低下し 7.0 を下回った。また、練和後のセメント存在下で hDPSC を培養したところ、正リン酸およびクエン酸を用いた場合では、培養液の pH が弱酸性域に低下し、セメントが崩壊したことから、リン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液として選択した。そこで、1M リン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とする A 群、2M リン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とする B 群とし、ダイカル®を対照として (D 群)、ラット露髄モデルに応用し評価したところ、術後 7 日で、D 群の歯髄では TUNEL 陽性の細胞が多数みられたのに対し、A、B 群ではほとんどみられなかった。また、術後 4 週では、A、B および D 群の術部に、露髄部を被蓋する硬組織様の組織が形成されていた。そこで、これら A、B および D のセメントを浸漬した培地を作製して、セメント浸漬培地の細胞毒性、hDPSC の形態に及ぼす影響、および細胞増殖に対する影響について検討したところ、A、B 群では細胞毒性は認められず、細胞の形態、細胞増殖についても基本培地を用いた群 (NC) と同等であったが、D 群では強い毒性が認められ、細胞増殖も有意に阻害されていた。

【結論および考察】

ラット歯露髄モデルによる評価からリン酸二水素ナトリウム水溶液を練和液とする α -TCP/Te-CP セメントはダイカル®と比較して歯髄組織に対して顕著な有害性を示さず、ダイカル®と同等の露髄部を被蓋する硬組織様の組織形成能を示した。また細胞培養系を用いた実験から、 α -TCP/Te-CP セメントは細胞毒性を示さず、生体親和性に優れた材料であることが示された。以上より、リン酸二水素 Na 水溶液を練和液とする α -TCP/Te-CP セメントが、歯髄組織に対し低刺激性の覆髄薬として有用であることが示唆された。

歯髄由来幹細胞と象牙質顆粒の骨補填材としての評価

1) 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野

2) 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔生化学分野

○小栗健策¹⁾、川木晴美²⁾、田中雅士¹⁾、森 春菜¹⁾、河野 哲¹⁾、近藤信夫²⁾、吉田隆一¹⁾

Evaluation of dental pulp stem-cells and dentin particles as a bone substitute

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

2) Department of Oral Biochemistry, Division of Oral Structure, Function and Development, Asahi University School of Dentistry

○Oguri Kensaku¹⁾, Kawaki Harumi²⁾, Tanaka Masashi¹⁾, Mori Haruna¹⁾, Kawano Satoshi¹⁾, Kondoh Nobuo²⁾, Yoshida Takakazu¹⁾

【研究目的】

我々は生体材料としての象牙質に着目し、粉砕して得た材料を根尖封鎖材として応用するために研究を行い、細粒化した象牙質をアピカルバリアーとして根尖部に適用すると、凝塊を形成し硬組織様の dentinal plug を形成することを動物実験にて示し、生体材料としての有用性を報告してきた(Yoshida et al., 日歯保存誌 1986 他)。そこで今回は象牙質に対する細胞応答を検討するために、ヒト歯髄幹細胞(hDPSC)、ヒト骨髄由来幹細胞(hBMSC)、およびヒト脂肪由来幹細胞(hASC)を用いて、象牙質や既存の人工骨補填材に対する in vitro、in vivo における幹細胞の動態変化について比較検討した。

【材料および方法】

- 1 抜去歯の保存: 実験に用いた抜去歯は患者の同意のもと、朝日大学歯学部倫理委員会の承認(第 23111 号)に基づいて採取した。
- 2 象牙質、 β -TCP、HA 顆粒の作製: 抜去歯から象牙質のみを取り出し、粉砕して整粒した。比較対照である β -リン酸三カルシウム(β -tricalcium phosphate: β -TCP)、水酸化アパタイト(hydroxyapatite:HA) としてオスフェリオン®(OS)、ネオボーン®(NB)にも同様の処理を行った。作製した各顆粒はオートクレーブにて滅菌し実験に用いた。
- 3 顆粒上に対する細胞応答の検討: 各顆粒存在下で幹細胞の増殖および遊走を評価した。
- 4 象牙質および材料・幹細胞凝集複合体の作成と細胞動態の解析: 滅菌した各材料 20mg と幹細胞をともに 7 日間培養した。生成された凝集複合体の一部を 4%PFA にて固定してアルカリフォスファターゼ(ALP)活性染色を行った。さらに、一部より RNA を抽出、精製しリアルタイム PCR 法により I 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖(coll1a1)、アルカリフォスファターゼ(alp)およびオステオカルシンの mRNA 発現変化を検討した。
- 5 凝集複合体のマウスへの埋植: 4 で作成した凝集複合体をそれぞれヌードマウス皮下に埋植し、3 週間後に摘出した。摘出した試料よりパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびピクロシリウスレッド染色を施し、埋植物と周囲組織の形態を顕微鏡下で観察した。

【結果】

細胞増殖を検討した結果、播種後 48 時間で象牙質顆粒が他の材料と比較して有意に細胞増殖を促進した。次に骨補填材・幹細胞凝集複合体における細胞数を評価したところ、材料間で有意な差はみとめられなかった。さらに、凝集複合体の ALP 染色をおこなったところ、NB 群が最も濃染され、次いで象牙質群でも濃染された。一方、OS 群では ALP 染色性はほとんどみとめられなかった。さらに各凝集複合体について骨芽細胞分化マーカー遺伝子の発現を検討したところ、象牙質群と NB 群でマーカー遺伝子発現の有意な上昇がみられ、特に象牙質群では I 型コラーゲンの発現が顕著に上昇した。これらの凝集複合体を埋植した皮下組織の組織学的解析から骨補填材単体よりも凝集複合体の方で骨補填材周囲に骨芽細胞様に分化した細胞が多数みられ、その多くがヒト由来細胞であった。また凝集複合体の ALP 染色性が高いほど、移植後に形成された組織中のオステオカルシン陽性細胞が多数みられる傾向にあった。

【結論および考察】

象牙質顆粒は三種の幹細胞に対し増殖を促進し、幹細胞の骨芽細胞への分化において良好な足場として機能していることが示唆された。また、細胞源としては骨髄由来幹細胞が最も顕著に骨芽細胞分化能を示したが、歯髄由来幹細胞も ALP 濃染性を示し、歯由来の生体材料である象牙質は歯髄由来幹細胞と共に、骨再生療法における有用な生体材料であることが示唆された。

アルギン酸に懸濁した骨髄細胞による多孔質ハイドロキシアパタイト担体内骨形成 — 歯髄・象牙質複合体再生への基礎的研究 —

大阪歯科大学 口腔治療学講座
○藪内崇督、柿木栄幸、好川正孝

Osteogenesis in porous hydroxyapatite scaffolds with bone marrow cells in alginate gel — Fundamental study for regeneration of pulp·dentine complex —

Department of Endodontics, Osaka Dental University
○Takayoshi Yabuuchi, Hideyuki Kakigi, Masataka Yoshikawa

【緒言】 一般に、生体内で多孔質ハイドロキシアパタイト (HA) を担体として用いての骨形成には 1×10^7 cells/ml あるいはそれ以上の濃度の骨髄細胞 (BMCs) の懸濁液が必要とされている。歯髄・象牙質複合体の再生にとって幹細胞が重要な役割を有するが、歯科領域では BMCs の採取源は限られている。口腔内から得られる幹細胞は骨髄から得られる幹細胞の数に比較すると極めて少数で、その幹細胞を効果的に増殖・分化させて骨ないし象牙質形成を導かなければならない。そのためには、多孔質 HA 担体の気孔中への BMCs の付着が骨形成のために最も重要な因子とすることができるかもしれない。多孔質 HA 担体の気孔で幹細胞を定着させ、骨芽細胞あるいは象牙芽細胞に分化させる方法として、種々の化学物質の担体へのコーティングを試みて、その効果が確認されている。この研究において、さらに気孔に幹細胞を定着させて増殖・分化の誘導を確実にするためのアルギン酸ゲルの効果を検討する目的で、アルギン酸ゲルに懸濁したラット骨髄細胞 (rBMCs) を播種した多孔質 HA をラット背部皮下組織に埋入して組織学的検索を行った。

【材料と方法】

6 週齢の雄性 Fischer 344 の大腿骨から rBMCs を採取し、 1×10^6 cells/ml の濃度の細胞懸濁液を培養液 (MEM) で調整した。また、4 %濃度のアルギン酸ゲルを調整し、そのゲルに 1×10^6 cells/ml となるように rBMCs を懸濁した。高さ 10 mm、直径 8 mm の円柱状 HA、そして、高さ 10 mm、直径 8 mm で内径 2 mm あるいは 4 mm の中空を有する円筒状 HA を担体として準備した。これらの 3 種類の担体に MEM あるいはアルギン酸ゲルに懸濁した rBMCs を播種し、7 週齢の雄性 Fischer 344 の背部皮下に埋入した。8 週後に皮下から担体を摘出し、固定、脱灰ののち、パラフィン包埋して $9 \mu\text{m}$ の連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。各担体について 10 枚の切片を無作為に取り出し、それぞれの気孔の総数および骨を含む気孔の数を光学顕微鏡下で数え、全気孔に対する骨を含む気孔の割合を百分率で表した。この結果は Welch's test で統計学的に分析して有意差を検定した ($P < 0.01$)。

【結果と考察】

MEM に懸濁した rBMCs を播種した円柱状の HA では骨を含む気孔は極めて少数であったが、アルギン酸ゲルに懸濁した rBMCs の播種で 54 %の気孔に骨形成が認められた。内径が 2 mm の中空部を有する円筒状の HA において、rBMCs を MEM に懸濁して播種した結果、ほとんどの気孔に骨形成を認めなかったが、アルギン酸ゲルに懸濁した rBMCs の播種によって 73 %の気孔に骨形成を生じた。内径が 4 mm の中空部を有する円筒状の HA では、MEM に懸濁した rBMCs で少数の気孔に骨形成を認め、アルギン酸ゲルに懸濁した rBMCs の播種によって 76 %の気孔に骨が形成された。MEM に懸濁した rBMCs で骨が形成された気孔はいずれの担体においても 11.2 %未満だった。アルギン酸ゲルに懸濁した rBMCs によって有意に多くの気孔に骨が形成される結果が得られた。

アルギン酸ゲルによって rBMCs が気孔内に確実に保存されたことが示された。また、中空部を有さない HA において、その中央部で骨の形成がほとんど認められないことが明らかにされた。栄養供給のためのルートとして、円筒状 HA の中空部が骨形成に貢献したと推察される。

【結論】 アルギン酸ゲルに懸濁した BMCs によって HA の大部分の気孔で骨が形成された。アルギン酸ゲルが HA の気孔に BMCs を保持して顕著な骨形成に貢献したと結論される。

Matrix trioxide aggregate (MTA) の 歯髄細胞接着・増殖・アポトーシスに及ぼす効果の検討

広島大学大学院 医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻 顎口腔頸部医科学講座 健康増進歯学研究室¹

九州大学大学院 歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野²

医療法人本山歯科医院(広島大学大学院 健康増進歯学研究室 非常勤講師)³

○永安慎太郎¹、鈴木茂樹¹、星野博昭¹、小武家誠司¹、本山智得³、西村英紀²

The effects of Matrix trioxide aggregate (MTA) on adhesion, migration,
and apoptosis of dental pulp cells

Department of Dental Science for Health Promotion Division of

Cervico-Gnathostomatology Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences¹

Section of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation Faculty of Dental Science, Kyushu University²

Motoyama Dental Clinic(Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences Part-time Lecturer)³

○Shintaro Nagayasu¹, Shigeki Suzuki¹, Hiroaki Hoshino¹, Seiji Kobuke¹, Tomotoku Motoyama³, Fusanori Nishimura²

<研究目的>

Matrix trioxide aggregate (MTA) は水酸化カルシウム製剤と比較して高い被蓋硬組織形成能を有することから、近年、主用途である穿孔部の閉鎖のみならず、直接覆髄材としても用いられるようになってきている。破折や軟化歯質除去、支台歯形成時の露髄を歯髄組織の物理的損傷と捉えれば、治癒反応初期に、損傷組織への周囲残存組織からの歯髄細胞の遊走が歯髄保存的処置の可否に重要であり、更に遊走してきた歯髄細胞が基質に接着し、増殖や分化といった細胞機能を発現することが組織修復に必須である。そのような背景から、直接覆髄材が歯髄細胞に対して接着・増殖誘導能を持つか否かは、露髄後組織修復の予後を大きく左右すると考えられる。これまでの基礎的研究報告から、MTAには細胞接着誘導能があり、接着細胞の硬組織形成細胞への分化を促進するスキャホールドとなり得ることも報告されている。しかし細胞が、その足場となる基質上に接着・伸展し機能するには、インテグリンに代表される細胞表面分子による足場の認識が必須である。MTAはコラーゲンを始めとする有機性基質と異なり無機質であるため、各種インテグリンリガンドタンパク質に含まれるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) といったインテグリン認識配列は存在せず、その細胞接着能やその後の細胞増殖能に与える影響についてこれまで十分に明らかにされていない。そこで、本研究では MTA の歯髄細胞に対する接着や接着後の増殖、アポトーシス誘導能を、CR 及び間接覆髄や裏層に用いられているガラスイオノマーセメント (GIC) を対照群として検討した。また、MTA の細胞接着誘導能を歯髄組織の主要な接着タンパク質の一つである fibronectin と比較し、その接着メカニズムについて更なる検討を加えた。

<材料及び方法>

無処理 96 ウェルプレートに MTA, CR, GIC, または fibronectin でコートし、血清非存在下でヒト歯髄細胞をコート済みウェルに播種し、1.5 hr 後の接着細胞数を定量した。さらに細胞接着分子である integrin 分子群に対する中和抗体並びに integrin inhibitor にてヒト歯髄細胞を前処理し、歯髄細胞の MTA への接着における integrin の関与についても検討した。MTA, CR, GIC 上での細胞増殖能の検討は、播種後 1.5 時間後に 10%血清培地に交換し、72 時間後まで検討した。アポトーシス誘導能はカスパーゼ 3/7 活性を指標に検討した。

<結果>

血清非存在下で歯髄細胞を MTA, CR, GIC 上に播種し、1.5 hr 後にこれら基質へのヒト歯髄細胞接着数を検討した結果、MTA はヒト歯髄細胞の接着を誘導したが CR および GIC は誘導しなかった。一方、ヒト歯髄細胞の MTA への細胞接着数を fibronectin と比較すると、MTA のヒト歯髄細胞接着誘導能は有意に低かった。更に、ヒト歯髄細胞の fibronectin への接着はインテグリン依存的であったが、MTA への接着にはインテグリンが関与していないことが示唆された。MTA に接着したヒト歯髄細胞は播種後 72 hr においても接着していることが明らかとなったが、その細胞数は播種後と比較し、経時的に減少した。CR や GIC に播種したヒト歯髄細胞では、カスパーゼ 3/7 活性の著しい上昇が認められたが、MTA 上に播種したヒト歯髄細胞ではカスパーゼ 3/7 活性の上昇は見られなかった。

<考察>

これまで、MTA は生体内において、塗布層直下での壊死層形成およびその下層での新生象牙芽細胞分化を誘導することは知られているものの、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。本実験で示された MTA の初期の細胞接着を誘導しアポトーシスを抑制するという生物学的特性によって、MTA が早期に象牙芽細胞を修復の場に固定し細胞死を防ぐことで二次象牙質の形成に寄与するという可能性が示唆された。

MTAによるATF6を介した骨芽細胞の石灰化促進作用

¹奥羽大学歯学部口腔機能分子生物学講座,

²ゲンズデンタルオフィス,

³奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯内療法学分野

○前田 豊信¹, 原元 信貴², 有馬 英夫³, 木村 裕一³

MTA promotes mineralization in osteoblastic cells via ATF6 expression.

¹Department of Oral Function and Molecular Biology, Ohu University School of Dentistry,

²Gens Dental Office,

³Division of Endodontics, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry

○MAEDA Toyonobu¹, HARAMOTO Nobutaka², ARIMA Hideo³, KIMURA Yuichi³

【目的】 Mineral trioxide aggregate (MTA) は我が国では主に直接覆髄剤として用いられているが、海外では根分岐部穿孔や逆根管充填などにも適用され、良好な成績をおさめている。MTA は *in vitro* で象牙芽細胞や骨芽細胞の分化・石灰化を促進することが知られているが、この機序について不明な点が多い。本研究では *in vitro* において、小胞体ストレスセンサーとして知られる ATF6 に着目して MTA の石灰化機序について解析を試みたので報告する。

【材料および方法】 MTA (White type, ProROOT MTA, DENTSPLY) を α MEM 培地に十分な時間混和して、上清を分取した。これを元の MTA の量を基準として、1.0 または 2.5 μ g/mL を MC3T3-E1 細胞に添加した。経時的に mRNA 発現を RT-qPCR で、タンパク質発現をウエスタンブロット法と ELISA またはザイモグラフィーにより解析を行った。統計処置は Fisher's PLSD または Student's t test にて行った。

【結果】 MTA の 1.0 または 2.5 μ g/mL の添加で、MC3T3-E1 細胞は培養 16 日目まで有意な石灰化を示した。この石灰化は、ALP 活性の亢進を伴うものであった。一方、骨基質中に最も多いコラーゲンの分解酵素である MMPs の発現と活性も MTA によって増加した。それにも関わらず、基質中のコラーゲンの蓄積は増加した。また、石灰化の起点となり得る主要な非線維性タンパク質の 1 つであるオステオカルシン (OCN) の発現も、MTA によって増加した。

このうち OCN の上流には、通常 BMP シグナルが想定されるが、本研究では BMP-2、BMP-4 や Osterix、Runx2 の発現には MTA は影響を及ぼさなかった。ところが、最近 BMP-2 の下流で OCN 遺伝子発現機構を制御することが解明された ATF6 の発現が MTA で有意に増加した。そこで、この ATF6 が本研究で転写因子として本当に機能するのかを確認するために、p50 ATF6 を強制発現させて確認したところ p50 の増加と共に OCN の発現は増加した。次に、OCN プロモーターに直接結合する p50 を確認するためにクロマチン免疫沈降を行った結果、MTA の添加によって OCN プロモーター領域に結合する p50 の増加が認められた。さらに、この増加する p50 の産生が既知の経路であることを確認するために、site-2 proteases (S2P) の特異的インヒビターを細胞毒性の認められない濃度で持続添加した結果、ATF6 の遺伝子発現は有意に増加したが、OCN の発現は有意に減少した。さらに MTA による OCN の発現促進と石灰化促進も完全に消失した。最後に、doxycycline (DOX) に応答して ATF6 の shRNA が安定的に発現するクローンを作成した。この細胞株では、DOX 非添加により MTA による OCN の誘導と石灰化促進が確認できたが、DOX 添加で、MTA による OCN の発現促進と石灰化促進は完全に消失した。

【考察】 MTA はポルトランドセメントに由来しており、非常に豊富なカルシウムが含まれ、また強アルカリ物質として知られている。本研究で用いた MTA に含まれるカルシウムは、MTA 2.5 μ g/mL において 2.3 μ M であった。またこの濃度では培地中の pH には、MTA は変化を及ぼさなかった。このことから、骨芽細胞における MTA の石灰化促進機構は、MTA 由来のカルシウムの蓄積または pH の上昇ではないと考えられる。この少なくとも 1 つは、III 型コラーゲンの合成促進を伴う、I 型コラーゲン合成促進機構が示唆された。また、別の 1 つとして BMP-2 シグナルを介さない ATF6 の発現促進を介した、OCN の発現亢進が確認できた。しかしながら、無機質を主成分とする MTA がどのようにして ATF6 の発現を促進しているのか依然として不明な点も多く、今後の検討課題である。

【結論】 MTA により、骨芽細胞の石灰化が有意に亢進した。この原因の一つとして、ATF6 の発現促進を介した OCN の発現促進が挙げられる。

ハイドロキシアパタイト／スポンジから成るハイブリッド担体における骨髄細胞による骨形成

大阪歯科大学 口腔治療学講座
○好川正孝、柿木栄幸、辻則正、藪内崇督

Bone Formation by Bone Marrow Cells in Hybrid Scaffold composed of hydroxyapatite / Sponge
Department of Endodontics, Osaka Dental University
○Masataka Yoshikawa, Hideyuki Kakigi, Norimasa Tsuji, Takayoshi Yabuuchi

【目的】 一般に、生体内での骨形成には多孔質ハイドロキシアパタイト (HA) が担体として用いられてきた。担体内での十分な骨形成を得るために必要な多数の幹細胞を採取できるセルソースが未だに確立されていない歯科領域においては、歯髄・象牙質複合体の再生を可能にするには少数の幹細胞から確実に骨形成を誘導しなければならない。多孔質 HA 担体での骨形成にとって重要な因子の一つは、HA 担体気孔壁への幹細胞の付着である。そして、種々のアミノ酸コーティングが多孔質 HA 担体気孔に細胞の付着を導いて骨形成を促進することがこれまでに確認された。一方、形状の賦与が容易なスポンジは歯髄・象牙質複合体の再生にとって担体として有効な素材である。スポンジへの幹細胞の付着も困難で、これまでの研究で HA 担体の気孔中に得られる骨の量と比較してその効率はかなり低い結果が得られている。そこで、スポンジを担体として用いて骨形成を効果的に誘導する方法を検討する目的で本研究を行った。スポンジ内への幹細胞の定着を図るために円筒状の多孔性 HA 担体を外郭とし、その中心部にホルマリン処理ポリビニルアルコールスポンジ (PVF スポンジ) を挿入してハイブリッド担体を作製した。そして、そのスポンジ部分にラット由来骨髄細胞を播種してラット背部皮下組織に埋入し、この担体における骨形成を評価した。

【材料と方法】 直径 5mm、高さ 10mm 円柱状ホルマリン化ポリビニルアルコール (PVF) スポンジを、外径 8mm、高さ 10mm の円筒状 HA の内径 5mm の中空部に挿入して、これをハイブリッド担体とした。このハイブリッド担体のスポンジに 6 週齢の雄性 Fischer 344 ラットの大腿骨から採取した骨髄細胞 1.5×10^6 個を播種し、CO₂ インキュベータに 2 時間保存した。その後、一部のハイブリッド担体からは PVF スポンジを取り出した。すなわち、骨髄細胞を播種したハイブリッド担体、骨髄細胞を播種したハイブリッド担体から取り出した PVF スポンジ、骨髄細胞を播種したあとに PVF スポンジを除去した円筒状の HA、そして、骨髄細胞を含まない PVF スポンジ、の 4 種のラット背部皮下への埋入体を準備した。これらをそれぞれ 7 週齢の雄性 Fischer 344 ラット背部に形成した皮下ポケットに埋入した。6 週後に各埋入体を皮下から摘出し、それぞれに含まれるアルカリフォスファターゼ (ALP) とオステオカルシン (OC) の定量を行い、得られた値は平均・標準偏差値で表し、Tukey-Kramer test で有意差を判定した ($p < 0.01$)。また、各埋入体のパラフィン切片を作製してヘマトキシリン・エオジン染色およびトルイジンブルー染色を施し、組織学的に骨形成を光学顕微鏡下で観察した。

【結果と考察】 骨髄細胞播種ハイブリッド担体の ALP は $827.54 \pm 111.73 \mu\text{M}/\text{scaffold}$ 、OC は $2.86 \pm 0.23 \mu\text{g}/\text{scaffold}$ 、骨髄細胞を播種したあとに PVF スポンジを除去した円筒状 HA での ALP は $926.6 \pm 55.7 \mu\text{M}/\text{scaffold}$ 、OC は $1.70 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{scaffold}$ であった。ハイブリッド担体の OC 量と骨髄細胞を播種した PVF スポンジを除去したあとの HA の OC 量とに有意差を認めた。一方、骨髄細胞を播種した PVF スポンジで認められた ALP は $0.23 \pm 0.04 \mu\text{M}/\text{scaffold}$ で OC は $16.11 \pm 0.26 \mu\text{g}/\text{scaffold}$ 、細胞を含まない PVF スポンジでは ALP が $15.64 \pm 0.37 \mu\text{M}/\text{scaffold}$ 、OC が $0.20 \pm 0.04 \mu\text{g}/\text{scaffold}$ であり、得られた値は極めて低かった。組織学的検索で、ハイブリッド担体ではスポンジ内に顕著な骨の存在が認められ、また、スポンジから移動した細胞によると思われる骨形成が HA 部分の多くの気孔に認められた。骨髄細胞を播種した PVF スポンジを除去したあとの HA の気孔にも骨形成が認められた。しかし、骨髄細胞を播種してハイブリッド担体から取り出した PVF スポンジには骨形成を認めなかった。スポンジを HA 中空部に置くと、スポンジ内の細胞懸濁液の移動は限られて、スポンジ内および周囲の HA 気孔中で幹細胞が定着し、その増殖と分化が進んで骨が形成されたと考えられる。

MTI-IIによるBMP誘導性骨芽細胞分化への影響

¹九州歯科大学 口腔保存治療学分野

²聖マリアンナ医科大学 大学院 疾患プロテオソーム・分子病態治療学

○平田-土屋志津¹、岡本一起²、諸富孝彦¹、北村知昭¹

Effects of MTI-II on BMP-induced osteoblastogenesis.

¹Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Kyushu Dental University

²Clinical Proteomics and Molecular Medicine, St. Marianna University Graduate School of Medicine

○HIRATA-TSUCHIYA Shizu¹, OKAMOTO Kazuki², MOROTOMI Takahiko¹, KITAMURA Chiaki¹

【目的】重篤な根尖性歯周炎では炎症が根尖部歯槽骨まで達し大きな骨欠損を伴う。骨欠損の再生には適切な歯内治療を行っても長期間を要することが多い。近年、発癌や動脈硬化症の発症に慢性炎症が関与することが注目されている。歯内治療においても十分にコントロールされていない慢性炎症が根尖部に持続していることが難治性の根尖性歯周炎の原因の一つになっていることが考えられる。そこで根尖歯周組織に生じた骨欠損の再生を確実にするためには、感染制御と再生療法技術に加え、慢性炎症制御が重要と言える。今回、直接的に炎症の主たるシグナル伝達経路であるNF-κBシグナルを抑制するステロイド受容体コアクチベーターのMacromolecular Translocation Inhibitor II (MTI-II)に着目し、BMP誘導性の骨芽細胞分化に対するMTI-IIの影響について検討した。

【材料と方法】骨芽細胞様細胞であるヒト骨肉腫細胞MG-63にMTI-II発現プラスミドを遺伝子導入後、位相差顕微鏡下で細胞形態を観察し、遺伝子導入による影響を検討した。次に、NF-κBルシフェラーゼ発現プラスミドを遺伝子導入し、MTI-IIの酸性アミノ酸領域を利用したペプチド(MTI-IIペプチド)で前処理した後、炎症性サイトカインTNFα(10 ng/ml)で刺激後にルシフェラーゼ活性を測定し、NF-κBの転写活性を分析した。また、MTI-IIペプチドとTNFαで刺激後、全RNAを調整し、逆転写酵素を用いてcDNAを合成し、NF-κB標的遺伝子としてMatrix metalloproteinase-2,9 (MMP-2,9)とInterleukin-6,8 (IL-6,8)のプライマーを用いてリアルタイムPCRを行い、発現を分析した。さらに、マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1をMTI-IIペプチドとTNFα, BMP4 (10 ng/ml)で刺激し、48時間後に骨芽細胞の初期分化マーカーであるアルカリホスファターゼ(ALP)活性測定を行った。

【結果】MTI-II発現プラスミドを遺伝子導入したMG-63細胞を位相差顕微鏡で観察したところ、コントロールの細胞と比べて、形態の特徴や細胞増殖能に有意差は認められなかった。一方、MG-63細胞をTNFαで刺激すると、NF-κBの転写活性が著しく上昇した。しかし、MTI-IIペプチドで刺激するとMTI-IIの濃度依存的にNF-κBの転写活性の上昇が解除・抑制された。また、細胞をTNFαで刺激しても、MMP-2の発現に変化はあまり認められず、MTI-IIペプチドで刺激した細胞でもMMP-2の発現変化は認められなかった。一方MMP-9は、TNFαの刺激によって発現増加が認められたが、MTI-IIペプチドで刺激した細胞では、MMP-9の発現増加が解除・抑制された。同様に、IL-6,8は、TNFαの刺激によって発現増加が認められたが、MTI-IIペプチドで刺激した細胞では、IL-6,8の発現増加が解除・抑制された。さらに、MC3T3-E1細胞はBMP4刺激によって著明なALP活性上昇が誘導されたが、TNFαで刺激するとその活性は抑制された。しかし、MTI-IIペプチドで刺激するとその抑制は解除された。

【考察】今回の結果は、MTI-IIが骨芽細胞様細胞の形態や増殖能に影響を及ぼすことなく、TNFα刺激によるNF-κBシグナルを抑制することで、BMP誘導性の骨芽細胞分化を促進することを示している。このことから、MTI-IIがBMPによる骨形成の有効な補助薬となる可能性が示唆された。

【結論】MTI-IIは、NF-κBシグナルを阻害することでTNFα刺激によるBMP誘導性骨芽細胞分化の抑制を解除する。

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

必須微量元素ホウ素の培養骨芽細胞細胞膜への影響

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齶蝕学分野

○大久保賢亮、井川 一成、山本裕也、山田志津香、林 善彦

The effect to cell membrane on osteoblasts cultured in supplementation
with an essential trace element, boron

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

○Kensuke Ookubo, Kazunari Igawa, Yuya Yamamoto, Shizuka Yamada,
Yoshihiko Hayashi

【緒言】

周期表 5 番目の元素であるホウ素は、3A 族の非金属元素であるが、金属と非金属の両方の特徴をもっている。生物への影響に関しての研究は極めて古く、1942 年 Alexander が、かぼちゃへの影響を形態学的、生理学的に調査している。動物においては、植物とは異なり石灰化との関連で重要な微量元素とされており、最近では、ホウ素の影響を細胞レベルで検討した報告も行われている。我々の教室では、スーパーボンドシーラーの構成成分 TBB に含まれるホウ素 (B) による培養骨芽細胞増殖・分化への影響をすでに確認している (第 140 回日本歯科保存学会学術大会にて発表)。今回は、細胞膜への影響を検討するため、すべての動物細胞に普遍的に存在する $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ に注目して実験を行ったので報告する。

【材料と方法】

1) 至適ホウ素濃度

NOS-1 (ヒト骨肉腫由来骨芽細胞株) 細胞を使い、低濃度 TBB を培地に添加した MTT アッセイの結果から、0.125mM 添加無血清 α -MEM 培地で細胞の増殖傾向を確認できた。そこでホウ素を 0.1mM 培地に添加した条件で培養実験を行った。

2) 細胞の培養

0.1mM ホウ素を添加無血清 α -MEM 培地で NOS-1 細胞を 35mm ガラスボトムカルチャーディッシュ (World Precision Instruments, Ltd., FD35-100) に 6×10^5 個となるように播種した。対照群には、ホウ素無添加培地を用いた。細胞は、5% CO_2 培養器内で通常どおり培養を行った。

3) 細胞内 Ca^{2+} 測定

細胞は 3 日間培養し、細胞内 Ca^{2+} 測定試薬である Fluo 4-AM (同仁化学) を細胞内へとりこませたのち、培養皿は共焦点レーザー顕微鏡 (ライカ TCS SL) ステージに取り付けた顕微鏡ステージ用 CO_2 (5%) 培養器 (Okolab S.r.L., NA, Italy) 内へ装着し観察・撮影を行った。蛍光観察条件は、それぞれ励起波長: 495nm、蛍光波長: 518nm を参考とした。

4) ウワバインによる $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ の阻害

ホウ素の細胞膜への影響を検討するため、 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ に注目して特異的な阻害剤であるウワバイン (Sigma) を 0.5mM となるよう緩衝液に加え細胞を顕微鏡ステージ用 CO_2 (5%) 培養器 (Okolab S.r.L., NA, Italy) 内で 15 分間培養した。その後、3) の条件で細胞内 Ca^{2+} を測定した。

5) Ca^{2+} 蛍光の相対強度変化の解析

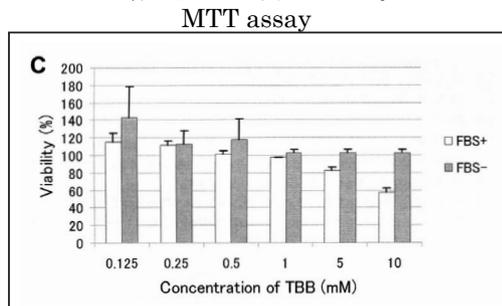
ウワバインを添加後 15 分間培養のち、細胞 20 個程度の視野を 5 秒に 1 回の割合でスキャンを 10 分間行った。この 10 分間におけるホウ素添加群、非添加群に生じる相対的蛍光強度の変化は最小二乗法で回帰直線として求めた。

【結果と考察】

ウワバインをはじめ強心ステロイド類は、 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ に特異的に結合しその発現や活性を阻害する。 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ が阻害されると Na^+ が細胞外に排出されず、細胞内の Na^+ 濃度が上昇する。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体は、一般に Na^+ の細胞内への輸送と共役して細胞内 Ca^{2+} の細胞外への排出を行っているため、ウワバインによって細胞内 Na^+ 濃度が上昇して電気化学的勾配が減少すると Ca^{2+} の排出が遅れるため、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する。今回、ホウ素添加群において、回帰直線から相対的蛍光強度上昇が弱い傾向を認めた。したがって、細胞膜におけるウワバインの $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 阻害効果は、ホウ素の存在下で培養することによって抑制されていることが明らかとなった。

謝辞

本研究は、日本学術振興会科学研究費 (挑戦的萌芽研究、課題番号: 25670812) の助成によって実施している。



象牙質・幹細胞凝集複合体を用いた歯周組織再生療法

1) 朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野

2) 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔生化学分野

○田中雅士¹⁾、川木晴美²⁾、小栗健策¹⁾、森 春菜¹⁾、河野 哲¹⁾、近藤信夫²⁾、吉田隆一¹⁾

Periodontal regeneration using dentin-stem cell complex

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

2) Department of Oral Biochemistry, Division of Oral Structure, Function and Development,
Asahi University School of Dentistry

○Tanaka Masashi¹⁾, Kawaki Harumi²⁾, Oguri Kensaku¹⁾, Mori Haruna¹⁾, Kawano Satoshi¹⁾,
Kondoh Nobuo²⁾, Yoshida Takakazu¹⁾

【研究目的】

超高齢社会の到来により、歯科領域でも腫瘍、歯周病や根尖病変等による骨欠損のみならず、機能面、審美面への影響の大きい加齢による骨量減少などに対する骨補填材を用いた骨造成を必要とする症例が増えてきている。骨欠損の治療に用いる骨補填材としては、自家骨移植がゴールドスタンダードであるが、その代用材料として歯科あるいは整形外科領域では、ハイドロキシアパタイト（以下HA）、β-リン酸三カルシウム（以下β-TCP）等のリン酸カルシウム系骨補填材が臨床応用されており、骨伝導能を示す材料として報告されているが、生体吸収性や親和性における問題点も同時に指摘されている。一方、象牙質は骨に類似した生体硬組織であり、抜去歯から自家移植への供給可能な生体材料としての可能性を有している。本研究では、象牙質を骨補填材として応用するために、これに幹細胞を組み合わせた複合材料を作製し、マウス皮下での骨様組織誘導能について検討した。

【材料および方法】

実験に用いた抜去歯は患者の同意のもと、朝日大学歯学部倫理委員会の承認（第 23111 号）を得て採取し、抜歯直後に-80℃で凍結保存した。これらの抜去歯から象牙質顆粒を作製し、整粒したのち、オートクレーブを用いて滅菌した。比較対照としてオスフェリオン（オリンパス社）、ネオボーン（MMT 社）を同様に処理した。作製した顆粒とヒト骨髄由来幹細胞（hBMSC）を7日間培養し、骨補填材顆粒・幹細胞凝集複合体を作製した。そして、ヌードマウス（6週齢、雄性、体重：約 25g 骨補填材は 20 mg 埋植）の左側背部皮下に埋植し、3週間後に摘出して通法に従いパラフィン包埋切片を作製し、組織化学的、免疫組織化学的検討を行った。次に、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いて、細胞遊走能および増殖能に対する象牙質顆粒の作用について検討した。

【結果】

ネオボーンやオスフェリオン移植群に比べ、象牙質顆粒移植群では、顆粒間にコラーゲン線維形成が顕著に誘導され、血管進入も有意に増加していた。同様の結果は、各補填材・幹細胞複合体を移植した場合にも観察され、後者では前者に比べコラーゲン線維形成および血管進入がさらに増強されていた。また、骨補填材顆粒・幹細胞凝集複合体移植群では骨様組織の形成が顕著であり、組織内ではオステオカルシン陽性細胞が多数観察され、その多くがヒト核陽性で、hBMSC に由来する細胞であった。次いで、血管進入に果たす象牙質の作用を検討するため、HUVEC の遊走と増殖について検討したところ、象牙質顆粒は HUVEC の遊走および細胞増殖を顕著に促進した。HUVEC の増殖促進では、象牙質が細胞と直接接触しない象牙質浸漬培地を用いた実験系でも同様の結果が得られた。

【結論および考察】

象牙質顆粒は、比較に用いた人工補填材に匹敵する骨様組織誘導能を示し、コラーゲン線維の産生と血管進入では人工骨補填材よりも優れていた。また、実験に用いた3種の骨補填材顆粒は、それぞれ骨髄由来幹細胞を骨芽細胞様に分化させる足場として機能しており、顆粒単体を用いるよりも、あらかじめ細胞を培養した骨補填材顆粒・幹細胞凝集複合体を移植材として用いると新生骨形成が促進される可能性が示唆された。以上のことから、象牙質を自家移植が可能な骨補填材料として利用することは、抜去歯の活用法として有望であることが示された。

臨床グレード歯髄幹細胞の GMP 準拠培養加工

国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部¹
愛知学院大学 歯学部 顎口腔外科学講座²

○大迫 洋平¹、庵原 耕一郎¹、村上 真史¹、中山 英典²、中島 美砂子¹

GMP-compliant Cell Processing of Clinical-grade Dental Pulp Stem Cells

Department of Dental Regenerative Medicine, Center for Advanced Treatment for Dental and Oral Disease,
National Center for Geriatrics and Gerontology¹, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Aichi-Gakuin
University, School of Dentistry²

○OSAKO YOHEI¹, IOHARA KOICHIRO¹, MURAKAMI MASASHI¹, NAKAYAMA HIDENORI²,
NAKASHIMA MISAKO¹

【背景】

当研究室では、不可逆性歯髄炎を対象疾患とし、自己歯髄組織由来幹細胞を用いた歯髄再生治療の臨床研究を行なってきた。抜去歯（不用の智歯）より採取し患者に移植する歯髄幹細胞の培養加工にあたっては、医薬品と同様に安全性と高度な品質の保証が求められる。本演題では、臨床グレードの歯髄幹細胞の GMP (Good Manufacturing Practice) 準拠細胞培養加工について発表する。

【方法】

まず、培養加工にかかる標準作業手順書 (SOP) を作成した。SOP は、高品質な歯髄幹細胞を安定的に取得するため、以下の要件を網羅している。

- 1) 抜去歯の細胞培養加工施設への輸送法
- 2) 膜遊走分取法による歯髄幹細胞 (MDPSCs) の分取・増幅法
- 3) 増幅した MDPSCs の特性検査 (細菌・ウイルス・マイコプラズマ・エンドトキシン検査)、および品質規格検査 (幹細胞マーカー発現、生存率等) の方法と、出荷判定基準
- 4) 最終細胞加工物 (移植用 MDPSCs) の細胞培養加工施設からの輸送法
- 5) 培養加工に用いる施設設備の管理、試薬資材の管理、衛生管理など

培養加工の現場においては、SOP をインプットしたコンピュータ (工程管理システム) を用いた厳密な作業管理体制を構築するとともに、製造管理責任者の監督の下、製造者と作業記録者を合わせて 3 人 1 組で培養加工作業を実施することとした。これにより、細胞培養加工施設設備のリアルタイムモニタリング、SOP の遵守、交差汚染防止、および万一の不測の事態への的確な対応を可能とした。

以上の体制のもと、清浄度クラス 100 のアイソレータ (細胞培養加工装置) 内において、不用の智歯から歯髄細胞を分離・初代培養し、膜分取遊走法により MDPSCs を分取した。分取後 7 代目 (MDPSCs 7th) まで増幅した細胞を最終細胞加工物とし、細胞凍結液に懸濁して -80 °C にて保存した。最終細胞加工物に対しては、SOP で定めた特性検査および品質規格検査を実施し、安全性と幹細胞性の基準に合格していることを確認した後、抜後根管内への移植に用いた。

【結果】

今回実施した 5 例の細胞培養加工すべてで、以下の特性検査および品質規格検査基準を満たす MDPSCs が培養加工できた。

- 1) 細胞数 1.0×10^6 以上
- 2) 生存率 75% 以上
- 3) 細胞表面マーカー発現 (フローサイトメトリー): CD29 70% 以上, CD44 70% 以上, CD105 70% 以上, CD31 2% 以下
- 4) 特性検査 (日本薬局方準拠): 無菌試験 陰性, ウィルス試験 陰性, マイコプラズマ否定試験 陰性, エンドトキシン試験 1.0 EU/mL 未満
- 5) 染色体・核型試験 (Q-band 核型解析): 異常を認めず

【結論と今後の展開】

本研究によって、ヒトへの幹細胞移植に使用可能な、安全かつ高品質な歯髄幹細胞を製造するための体制 (施設設備、物品・人員管理、SOP 等) を整備・樹立した。本演題の細胞培養加工は、協力研究機関である愛知学院大学の細胞培養加工施設にて行なったが、次期多施設臨床研究は国立長寿医療研究センター細胞培養加工施設 (Cell Processing Center: CPC) にて実施する。多施設臨床研究では、協力研究機関 (愛知学院大学、東京医科歯科大学、長崎大学、および鹿児島大学) から国立長寿医療研究センターへ抜去歯を輸送し、CPC において歯髄幹細胞を培養加工し、細胞加工物を協力研究機関に輸送して移植する歯髄再生治療の有効性試験を行なう予定である。

このため現在は、国立長寿医療研究センター CPC に合わせて SOP を改訂し、CPC にて実際に細胞培養加工を行い細胞加工物の同等性を検討するなど、多施設臨床研究の準備を進めている。

Lipopolysaccharide 刺激後のブタ Malassez 上皮遺残細胞の動態

東京歯科大学歯科保存学講座

○佐古 亮、村松 敬、小林 史枝、杉内 亜紀奈、佐野 陽祐、
月野和 隆、間 奈津子、末原 正崇、古澤 成博

Response of porcine epithelial rests of Malassez stimulated by lipopolysaccharide

Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College

○Ryo Sako, Takashi Muramatsu, Fumie Kobayashi, Akina Sugiuchi, Yousuke Sano,
Takashi Tsukinowa, Natsuko Aida, Masataka Suehara, Masahiro Furusawa

【目的】

Malassez 上皮遺残細胞は歯根膜中のセメント質側に存在している歯源性上皮であり、刺激がなければ増殖しないとされている。根尖性歯周炎は細菌感染により生じる炎症性疾患であるが、罹患した際には Malassez 上皮遺残細胞が増生し、時として歯根嚢胞が形成される。しかしながら Malassez 上皮遺残細胞と細菌刺激との関係は不明な点が多い。

本研究では培養したブタ Malassez 上皮遺残細胞をグラム陰性菌の細胞壁成分である lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、細胞活性、増殖能および、toll like receptor 4 (TLR4)、NF- κ B の発現を検索した。

【材料および方法】

実験には、ブタ由来 Malassez 上皮遺残細胞(北海道医療大学・安彦善裕教授より供与)を用いた。細胞は Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, Life Technologies 社) に 10% FBS を添加して培養した。刺激物質には *E. coli* 由来 LPS (Sigma-Aldrich) を 1 μ g/ml の濃度で使用した。細胞活性の検索のためには、96 well Plate に 1 \times 10⁴ cells/well の密度で播種した後、LPS を添加し、1, 3, 5 日目に、WST-1 により測定した。細胞増殖能のためには、35 mm dish に 1 \times 10⁴ cells を播種し、LPS を添加後、1, 3, 5 日目の細胞数をコーンターカウンターにて計測した。TLR4、NF- κ B の発現の検索は、35 mm dish に 1 \times 10⁵ cells を播種し、LPS 添加してから 1, 3, 6, 12, 24, 72 時間後に TRIzol にて RNA を抽出し、定量ならびに逆転写後、TLR4 と NF- κ B に対する TaqMan Probe を用いて定量的 Real-Time PCR 法にて検索した。対照群としては LPS の代わりに D-MEM を添加したものをを用いた。

【結果】

LPS を添加された Malassez 上皮遺残細胞の活性は、添加時より 5 日までは経日的に上昇がみられた。一方、細胞増殖能については経日的に細胞数の減少がみられた。定量的 Real-Time PCR 法では LPS 対照群(非添加群)を基準として比較を行った場合、TLR4 の発現は添加後 1 時間では約 1/5、3 時間では約 1/10、6 時間では 1/3 の発現となった。同様に、NF- κ B では、添加後 1 時間では約 1/7、3 時間では約 1/10、6 時間では約 1/20 の発現を示したが、12 時間以降では非添加群と同程度を発現したのちに再び減少した。

【考察】

今回の結果からは対照群(LPS 非刺激群)と比較して LPS 刺激群では Malassez 上皮遺残細胞は増殖が低下したが、その一方で細胞活性が高くなっていた。これは Malassez 上皮遺残細胞が何らかの機能を発現するために増殖を低下させたと考えられた。

LPS 刺激に対して LPS 受容体の発現やサイトカイン産生や骨吸収促進因子の放出が抑制されたが、このことから Malassez 上皮遺残細胞は炎症を限局させる方向に反応していると考えられた。また LPS 刺激後 12h で TLR4、NF- κ B は発現の上昇を認め、その後 NF- κ B は大きく減少したが、これは負のフィードバック現象による炎症の調節が行われている可能性が考えられた。

G-CSF を用いた膜遊走分取法は間葉系幹細胞の再生誘導能を高める

国立長寿医療研究センター 歯科口腔先進医療開発センター 再生歯科医療研究部¹、
名古屋大学医学部 泌尿器科学講座²、愛知学院大学歯学部 小児歯科学講座³
○広瀬 雄二郎^{1,2}、村上 真史¹、林 勇輝^{1,3}、大迫 洋平¹、中島 美砂子¹

Augmentation of regenerative potential of mesenchymal stem cells by granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) induced mobilization

Department of Dental Regenerative Medicine, Center of Advanced Medicine for Dental and Oral Diseases, National Center for Geriatrics and Gerontology¹, Department of Urology, Nagoya University Graduate School of Medicine², Department of Pediatric Dentistry, School of Dentistry, Aichi Gakuin University³
○Hirose Yujiro^{1,2}, Murakami Masashi¹, Hayashi Yuki^{1,3}, Yohei Osako¹, Nakashima Misako¹

【研究目的】

間葉系幹細胞は様々な疾患の治療に応用できる可能性があり、全身の様々な組織より分離できるとの報告がある。我々は幹細胞の中でも CD105⁺ 歯髄幹細胞 (第 132 回日本歯科保存学会発表) 及び CD31⁺ SP 歯髄・骨髄・脂肪幹細胞 (第 134 回学会発表) は幹細胞性が高く再生能に優れた細胞集団であることを示してきた。しかし、これらのフローサイトメーターを用いた細胞分離法では、安全性の確保が困難で臨床応用できない。そこで我々は新規に膜遊走分取法を開発し、ヒト及びブイヌ由来の歯髄から、臨床応用可能で、幹細胞性が高く、歯髄再生能力に優れた歯髄幹細胞を分離することに成功した (第 136 回学会発表)。しかし、幹細胞の供給源として自家の不用歯には限界がある。よって本研究では、現行の細胞治療において広く細胞供給源として利用されている骨髄・脂肪に対する膜遊走分取法有用性を検討した。

【方法】

1. 幹細胞分取：ブタ同一個体由来の歯髄・骨髄・脂肪組織から、酵素処理により細胞を分離、培養し、コロニーを形成させた (未分取歯髄・骨髄・脂肪幹細胞：DPSCs, BMSCs, ADSCs)。さらに、未分取幹細胞より膜遊走分取法を用いて幹細胞を分離した (膜分取歯髄・骨髄・脂肪幹細胞：MDPSCs, MBMSCs, MADSCs)。
2. 膜分取幹細胞の特徴化：幹細胞マーカーの発現、血管誘導・神経栄養因子発現、増殖能、遊走能および血管・神経分化能を膜分取幹細胞と未分取幹細胞で比較した。
3. Trophic 効果の比較：各組織由来膜分取・未分取幹細胞の培養上清を回収し、NIH3T3 に対する増殖促進能、遊走促進能、抗アポトーシス能、HUVECs に対する血管誘導能、TGW cells に対する神経誘導能および hPBMCs に対する免疫抑制能をそれぞれ比較した。
4. 異所性歯根移植モデルを用いた *in vivo* における歯髄再生能の評価：6mm に分割したブタの歯を抜髄後、各幹細胞をコラーゲンとともに注入したものを、SCID マウスの皮下に移植した。3 週間後、標本作製し、HE 染色にて歯髄再生量を比較した。さらに、細胞密度および血管密度を免疫組織学的に検討した。

【結果】

幹細胞マーカーの発現、血管誘導・神経栄養因子発現、増殖能、遊走能および血管・神経分化能は、膜分取歯髄・骨髄・脂肪幹細胞の方が各未分取幹細胞より優れていた。また、*in vitro* における trophic 効果についても、膜分取歯髄・骨髄・脂肪幹細胞の培養上清の方が、各未分取幹細胞の培養上清よりも高かった。歯根異所性移植モデルでは、膜分取歯髄・骨髄・脂肪幹細胞移植群が各未分取幹細胞移植群と比較して、再生歯髄組織量が大きく、組織中の細胞密度、血管密度ともに高かった。

【結論】

以上の結果から、幹細胞性が高く再生誘導能に優れた幹細胞を、膜遊走分取法により歯髄からだけでなく骨髄・脂肪からも分離できることが示された。また、膜分取幹細胞が未分取幹細胞を移植した場合に比べ歯髄再生能が優れていた理由として、血管誘導・神経栄養因子発現および trophic 効果が高いためであることが示唆された。

歯髄の炎症は Toll-like Receptor4の働きを介して舌の異常疼痛を誘導する

¹⁾日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座

²⁾日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門

○大原 絹代^{1,2)}, 清水 康平^{1,2)}, 井比 陽奈¹⁾, 林 誠^{1,2)}, 小木曾 文内^{1,2)}

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

¹⁾Departments of Endodontics, Nihon University School of Dentistry,

²⁾Divisions of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

○Kinuyo Ohara^{1,2)}, Kohei Shimizu^{1,2)}, Haruna Ibi¹⁾, Makoto Hayashi^{1,2)} and Bunnai Ogiso^{1,2)}

【研究目的】歯髄に炎症が惹起されると、歯痛だけでなく顔面や舌の痛みを発症する症例に遭遇することがある。近年、三叉神経節(TG)の衛星細胞や神経節細胞に発現するToll-like receptor (TLR) が神経の興奮性変調に対して重要な役割を担っていることが報告されており、舌の異常疼痛発症に関与する可能性がある。しかし、TLR の関与メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では、歯髄炎モデルラットの舌に引き起こされる異所性痛覚過敏に注目し、三叉神経節細胞に発現するTLR4の神経活動増強および異常興奮拡大に関する神経機構を明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】SD系雄性ラット(9w)の左側下顎第一臼歯を露髄させ、歯髄にComplete Freund's adjuvant (CFA)を投与した後に仮封し、歯髄炎モデルを作製した。歯髄処置前から処置後21日目まで、浅麻酔下にて左側舌背部に熱あるいは機械刺激を与え、頭部引っ込み反射閾値を測定した。また舌外側部に逆行性トレーサーであるFluoroGold (FG)を0.5μl投与した後に歯髄処置後3日目で同モデルラットを灌流固定し、舌を支配するTG細胞におけるTLR4発現について免疫組織学的手法を用いて解析した。

また、歯髄炎モデルラットのTG内にTLR4アンタゴニスト(LPS-RS)を3日間持続投与し、舌への熱刺激あるいは機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の変化を解析した。その後、舌外側部に逆行性トレーサーであるFGを0.5μl投与し、TLR4の内因性リガンドであるHSP70を標識物質(Alexa Fluor 594)にて可視化し、歯髄に投与して仮封を行った。処置後3日目に、TGを光学顕微鏡にて観察し、HSP70陽性細胞の有無を確認した。また、TLR4の外因性リガンドであるLPSを歯髄に投与し、頭部引っ込み反射閾値を測定した。

さらに、舌にFGを投与し、TG細胞におけるTRPV1発現について免疫組織化学的に検討した。また、舌にTRPV1アンタゴニスト(SB366791)を投与し、30分ごとの舌への熱刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の変化を解析した。

【結果】CFA処置後、舌の熱および機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の有意な低下が認められ、この閾値低下は9日間続いた。また、歯髄炎発症後、TG細胞においてTLR4発現が多数観察された64.7%は舌へのFG投与によってラベルされたFG陽性細胞であった。CFA投与後、LPS-RSの三叉神経節内への持続投与により、舌の熱および機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の低下が抑制された。また、HSP70あるいはLPSの歯髄投与により、歯髄へのCFA投与と同様、投与後3日目において頭部引っ込み反射閾値の有意な低下が認められた。さらに、Alexa Fluor 594で標識されたHSP70を歯髄に投与することによって、多くのFG非陽性細胞がAlexa Fluor 594陽性を示した。舌を支配する小型のTG細胞において、多くのTRPV1陽性細胞を認めた。また、舌へのSB366791投与により、舌の熱刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の低下が抑制された。

【考察及び結論】以上の結果から、歯髄炎発症後Hsp70は歯髄組織に発現し、TG細胞体に軸索輸送された後、歯髄を支配しているTG細胞体から細胞外分泌されることにより舌を支配しているTG細胞のTLR4と結合し、舌を支配しているTG細胞の興奮性が増強されたものと考えられた。また、M1歯髄および舌を二重支配するTG細胞の存在により、歯髄炎によるTG細胞の興奮性増強とともに同細胞が二重支配している舌の痛覚異常発現にも関与すると考えられ、これら2つのメカニズムが歯髄炎後の舌の異所性異常疼痛発症機構の一部を担っているものと推論された。

咬筋痛に誘導される歯髄痛覚過敏発症の神経機構解明

¹⁾ 日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座

²⁾ 日本大学歯学部総合歯学研究所機能形態部門

○渡瀬 哲郎^{1,2)}, 清水 康平^{1,2)}, 鶴町 保^{1,2)}, 上原 輝映¹⁾, 小木曾 文内^{1,2)}

**Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain
following pathological masseter muscle pain**

¹⁾ Departments of Endodontics, Nihon University School of Dentistry,

²⁾ Divisions of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of
Dentistry

○Tetsuro Watase^{1,2)}, Kohei Shimizu^{1,2)}, Tamotsu Tsurumachi^{1,2)}, Teruei Uehara¹⁾
and Bunnai Ogiso^{1,2)}

【研究目的】悪習癖や顎関節症により咀嚼筋に慢性痛が発症すると、顔面領域だけでなく歯や歯周組織に異常疼痛を誘導する症例に遭遇することがあるが、これは適切な診断と治療を行う上で大きな問題となっている。このような疼痛異常の発症メカニズムとして、三叉神経節および三叉神経脊髄路核の神経細胞の異常興奮が考えられているが、その神経機構に関しては不明な点が多く残されている。そこで本研究では、咬筋痛によって引き起こされる歯髄痛覚過敏発症における中枢機構の一端を解明することを目的とした。

【材料及び方法】SD系雄性ラット(7w)をペントバルビタールナトリウム(50 mg/kg)の腹腔内投与(i.p.)によって深麻酔した後、右側咬筋を被覆する皮膚組織内に双極電極を挿入した。その後咬筋に電気刺激(10 mA, 200 μ s, 30 min/day)を与えることにより過収縮を引き起こして咬筋痛モデルを作製した。同モデルラットの咬筋へ圧刺激を与え、逃避反射閾値を経日的に記録した。2%イソフルラン麻酔下でモデルラットの同側上顎第一臼歯歯髄へカプサイシン投与し、反射性顎舌骨筋活動の変化を記録した。さらに、刺激開始後14日目に三叉神経脊髄路核内のAstrocyteの活性状態を免疫組織化学的に解析した。

【結果】咬筋の圧機械刺激に対する逃避反射閾値は、Sham群に比較して咬筋痛モデルにおいて3日目から有意な低下を示し、35日目にはピークに達した。またこの閾値低下は、電気刺激を停止した3週間後には有意に回復した。また、咬筋刺激後14日目に、上顎第一臼歯歯髄へのカプサイシン投与による反射性顎舌骨筋活動は、sham群に比較して咬筋痛モデルにおいてカプサイシン投与後2分間で有意な増加を示した。さらに、同時期においてsham群に比較して咬筋痛モデルでは三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)での有意なAstrocyteの発現増加が認められた。

【考察及び結論】以上のことより、咬筋の持続的電気刺激によって、咬筋に機械痛覚過敏(咬筋痛モデル)が発症することが明らかになった。また、咬筋痛モデルラットのVcにおいてAstrocyteの発現増加が引き起こされることから、咬筋痛モデルラットにおいて観察される歯髄痛覚過敏発症にはVcに発現するAstrocyteが関与する可能性が示された。

口腔内カメラ SOPRO Care へのマルチファイバ内視鏡応用による根管観察法の検討

¹九州歯科大学口腔保存治療分野

²アクテオン ソプロ

○吉居 慎二¹, 藤元 政考¹, Alain Mazuir², 北村 知昭¹

Study of the Root Canal Observation Method by Application of Multi-Endoscopy on the Intraoral Camera SOPRO Care

¹Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Kyushu Dental University

²ACTEON SOPRO, FRANCE

○YOSHII Shinji¹, FUJIMOTO Masataka¹, MAZUIR Alain², KITAMURA Chiaki¹

【研究目的】

現在の歯科臨床は、歯科用顕微鏡およびコーンビームCTなどの機器が実用化されたことにより、診断・治療の精度が飛躍的に向上した。しかしながら、根管深部根管壁の歯質診断（側枝や亀裂の検出）、さらには根尖病巣の状態を即時に診断することはこれらの機器を用いても困難である。本研究の最終目標は、従来観察が困難であった歯の根管深部や根尖歯周組織、および歯周ポケット深部の齶蝕・炎症を高解像度で容易に検出する診断装置の開発である。これまでに我々は、1本のイメージファイバで光照射と画像取得を行うシングルファイバ内視鏡と、光照射用光ファイバと画像取得用イメージファイバを同じプローブに収めたマルチファイバ内視鏡を開発し成果を得てきた。今回の研究では、齶蝕や炎症を検出できる口腔内カメラとして既に市販されているSOPRO Care (Acteon, フランス)を用い、SOPRO Care 先端の画像取得部に開発したマルチファイバ内視鏡のプローブを取り付けた根管観察装置を作製し、各種サンプルを観察して得られた画像について比較検討した。

【材料と方法】

光照射用光ファイバと画像取得用イメージファイバを同じプローブに収めたマルチファイバ内視鏡を用いた。マルチファイバ内視鏡はプローブ外径が600 μmであり、その中に直径280 μm・画素数6000 pixelsのイメージファイバ1本と、直径50 μmの光ファイバ15本を内包している。マルチファイバ内視鏡の画像取得用イメージファイバの先端をSOPRO Careの画像取得部にレンズを介して接続し、マルチファイバ内視鏡のイメージファイバのプローブ側で取得した画像情報をSOPRO Careへ伝達することで画像取得を行なった。また外部からの光照射は、マルチファイバ内視鏡の光ファイバ先端をハロゲンライトに接続することでファイバ内へ光を入射し、プローブから出力させることでサンプルへの照射を行なった。以上の装置を用い、平面サンプルおよび抜去歯の根管壁の観察を行い、SOPRO Careに付属のソフトウェアであるSOPRO Imaging上で取得した画像の検討を行なった。

【結果】

SOPRO Careにマルチファイバ内視鏡を接続した装置により、平面の観察サンプルおよび抜去歯の根管壁の各画像を取得し、SOPRO Imaging上で比較検討した。その結果、本装置を用いて取得した画像は、これまでに作製していたマルチファイバ内視鏡により取得した画像と比較して差は認められず、鮮明な画像を取得することができた。

【考察】

SOPRO Careにマルチファイバ内視鏡を接続した装置により根管内の鮮明な画像を取得することができた。以上の結果は、マルチファイバ内視鏡プローブの汎用性と口腔内カメラの可能性を示唆している。

【結論】

口腔内カメラ SOPRO Careへマルチファイバ内視鏡プローブを応用した観察装置は根管観察に有用であることが示された。今後、画像取得範囲の向上を図るとともに、SOPRO Care自体の光源から照射光を取得し、根管内および根尖病巣の即時かつ直感的な画像診断を可能にする内視鏡の開発を行なう予定である。

青色LEDを装備する試作口腔内内視鏡システムの歯内治療への応用

昭和大学歯学部歯科保存学講座総合診療歯科学部門
○伊佐津克彦、池田 哲、高島 英利、長谷川篤司

Application to endodontic treatment of experimental oral endoscope system equipped with a blue LED

Department of Conservative dentistry, Division of Comprehensive Dentistry,
Showa University School of Dentistry
○ISATSU Katsuhiko, IKEDA Satoshi, TAKASHIMA Hidetoshi, HASEGAWA Tokuji

【研究目的】

口腔内内視鏡システムが市販に至り、主に診察、診断への臨床応用が始まっている。現在、歯内治療における髓腔内、根管内の精査において歯科用顕微鏡の応用が一般的であるが、我々は内視鏡もこれに準ずる解像性能を示すことを報告した。(第138回日本歯科保存学会) さらに、歯科用顕微鏡の視点が口腔外の対物レンズ先端であるために治療時には、術者手指と器具が施術対象物と対物レンズ先端の間に視野を遮らないように介入しなければならず、高い施術技能と限定された器具が求められるが、内視鏡の視点はスコープ先端であるために術野を確認しながら従来通りに治療器具を動作させられる可能性があり、歯内治療における臨床応用の可能性をも報告した。(第139回日本歯科保存学会) 一方、我々は波長約405nmの青色励起光を利用して、その励起蛍光でう蝕象牙質と健全象牙質を識別できることを報告し(第131回、第132回、第133回)、さらにう蝕象牙質を励起蛍光で認識しながら除去するシステムを報告した(第134回、第140回)。さらに、波長約405nmの青色励起光によって根尖病変からの滲出液などを含んだペーパーポイントから赤い励起蛍光が発現することを確認し、励起蛍光が歯内及び根尖病変の評価に有用であることを報告した(第139回)。

本研究では青色LEDを装備した口腔内内視鏡を試作して青色励起光が根管内の(除去すべき)罹患歯質を認識できる可能性を検討したので報告する。

【材料および方法】

試作口腔内内視鏡システムは市販口腔内内視鏡(Oral Scope 00S-1:オサダ社)の白色LEDを青色LEDに交換し、観察用ソフト OSADA Oral Scope Viewer に青色LED用のプログラム試作 ScopeViewer を搭載して構成した。エックス線診断により根尖病巣が確認されたヒト抜去歯を水道水中で保存し、抜去後3週間以内に実験に供した。

抜去歯はニッシン社製人工歯列模型内に植立され、常温重合レジンにて固定された。当該歯の髓腔開拓を通法通り行い、根管孔明示は直径1.1mmのピーソーリーマー(LARGO Peeso Reamer #3)まで行なった。根管孔明示後、手用リーマーで根管の穿通を行い、3%次亜塩素酸ナトリウムと1%過酸化水素水で洗浄した後、観察用試片とした。

試作内視鏡システム先端の根管内観察用ファイバースコープ(直径0.9mm)をピーソーリーマーで拡大した付近まで挿入しながら、髓腔内および根管内の観察を行った。

【成績】

青色LEDからの励起光は髓腔内および根管内の罹患歯質から赤い励起蛍光を発現させて認識できることが確認された。

【考察および結論】

根管内での赤い励起光の範囲などをさらに明確にするためには内視鏡の解像度や焦点深度だけでなく、画像ソフトによる視認性向上の支援なども必要と考えられた。

歯内治療、特に根管壁に感染罹患歯質の存在する症例の感染根管治療に口腔内内視鏡を応用することで、より確実な機械的根管清掃が可能になることが示唆された。

赤外線サーモグラフィを用いた歯根破折診断法の検出限界

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,
大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部², 神戸大学大学院工学研究科機械工学専攻³,
○松下真美¹, 久保美寿穂², 大谷直矢³, 三浦治郎², 竹重文雄², 阪上隆英³, 林美加子¹

Verification of the root fracture diagnostic method with infrared thermography
Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry¹,
Division for Interdisciplinary Dentistry, Osaka University Dental Hospital²,
Department of Mechanical Engineering, Kobe University Graduate School³,
○Manami Matsushita¹, Mizuho Kubo², Naoya Ohtani³, Jiro Miura², Fumio Takeshige²,
Takahide Sakagami³, Mikako Hayashi¹

【研究目的】

歯根に生じる破折は歯科臨床において予後不良となるケースが多い。また、初期の歯根破折における診断法は確実性に乏しく、特に微小亀裂の正確な確定診断を下すには不十分である。工業界では亀裂の非破壊検査の一つにVibroIR法¹があり、超音波振動により亀裂面に生じた摩擦熱を赤外線サーモグラフィで計測する方法である。我々はVibroIR法¹を用いた方法により歯根亀裂が検出されることを報告した²。本研究では、微小亀裂の検出条件を詳細に検討するためヒト抜去歯を用いた歯根亀裂モデルを作成し、試料の亀裂幅と深さについて検討を行い、その検出限界を評価した。

【材料および方法】

1. 歯根亀裂モデルの作成

本研究の趣旨に同意した患者 (大阪大学 研究倫理審査委員会 承認番号 H25-E8) の抜去歯をエポキシレジンに包埋した。硬化後、1mm、2mm、3mmの厚さに歯軸方向に対して垂直に試料を薄切した。次に根管治療を行い、実体顕微鏡で観察しながら、テーパー付き圧子で根管内に荷重負荷をかけて亀裂を発生させた。

2. 赤外線サーモグラフィ解析

歯科用超音波治療器に超音波チップ (直線型チップ) を取り付け、根管壁に出力 0.30W の超音波振動を与えて亀裂面に生じた摩擦熱を、赤外線サーモグラフィにて記録した。

3. 亀裂の幅および深さの測定

薄切切片上に1目盛が200 μm のグリッドを置き、光学顕微鏡下で亀裂幅と深さを撮影した。得られた画像から画像ソフトを用いて、亀裂幅の測定を行った。歯根亀裂の深さの測定について亀裂線と垂直なるように、切断面を設定し、マイクロカッターを用いて切断し、同法で亀裂の深さの測定を行った。

【結果】

赤外線サーモグラフィ解析による歯根亀裂検出法²において、視診やX線写真では検出困難な幅 4.1~50 μm の亀裂が検出可能であった。また、亀裂の深さに関しては0.79~3.22mmの検出を行ったが、検出限界と亀裂深さとの相関は認められなかった。以上より、亀裂の検出に関してはその深さに関わらず、幅 4.1~50 μm の亀裂が検出できた。

【考察および結論】

幅が狭い亀裂に関して検出が可能であったのは、幅が狭いことから接触点が増え、総発熱量が多くなるため亀裂の検出が可能であったと考えられる。そのため、亀裂発生直後の比較的浅い亀裂でも亀裂幅が狭い条件であれば、赤外線サーモグラフィによる計測可能な摩擦熱が発生するため、亀裂深さに依存しないということが示唆された。本研究の結果から、今まで歯科用マイクロスコープやデンタルX線写真では検出が困難である亀裂初期の浅い歯根亀裂に対してもサーモグラフィを用いた検出方法が有効であることが示唆された。

【参考文献】

1. Sakagami et al. Development of a new diagnosis method for incipient caries in human teeth based on thermal images under pulse heating, JSME Vol. 45, 93-98, 20032.
 2. Matsushita et al. Detection of dental microcracks using infrared thermography JOE Vol. 39, 88-91, 2013
- 本研究は日本学術振興会研究費補助金 (若手 (B) 25861797) の補助の下に行われた。

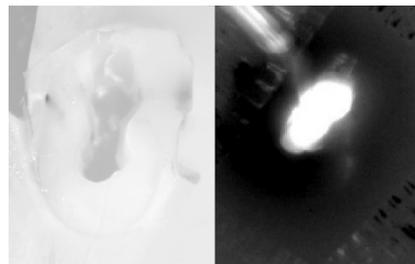


figure: detection of the dental crack
right: with an optical micrograph it is not clear to detect microcracks.
left: image on thermography microcracks detected.

励起蛍光を応用した根尖病変の評価

昭和大学歯学部歯科保存学講座総合診療歯科学部門
○瀧野浩之、伊佐津克彦、勝又桂子、山田理、長谷川篤司

Assessment of endodontic lesion by using of light-induced fluorescence

Department of Conservative dentistry, Division of Comprehensive Dentistry,
Showa University School of Dentistry

○TAKINO Hiroyuki, ISATSU Katsuhiko, KATSUMATA Keiko, YAMADA Michi, HASEGAWA Tokuji

【研究目的】

感染根管治療においては、根管内の機械的、化学的清掃によって根管内に残存する壊死組織や感染歯質、炎症性滲出液の分解産物が十分に除去された後、根尖周囲組織、根管内および象牙細管内微生物の減少を正確に評価し、現症に適した処置を実施できることが根管治療成功のカギとなる。

一般に根管充填の時期については、複数の臨床兆候や検査結果を勘案して決定される。根尖周囲組織、根管内および象牙細管内の無菌性（菌数の十分な減少）は根管内細菌培養検査によって評価され、炎症性滲出液の存在はカタラーゼ反応の有無によって評価されている。これらのうち、根管内細菌培養検査は即日の判定ができないため、現症と評価にタイムラグが生じることが避けられず、現症に適した処置の実施が遅延する可能性が危惧される。我々は、第133、135、136、138、139回保存学会で、数種の歯周病原菌を培養したコロニーが波長405nmの青色励起光によって赤い励起蛍光を発すること、歯周病患者のプラークや根尖病変からの滲出液などを含んだペーパーポイントが波長405nmの青色励起光によって赤い励起蛍光を発することも報告している。

本研究では、139回保存学会で報告したLED光源に比較して、より強い光を照出するレーザー光源を用いて、根尖周囲組織、根管内および象牙細管内微生物に波長405nmの青色励起光を照射した場合の励起蛍光が根尖病変の評価、いかえれば根管内の即時細菌検査となる可能性を根管治療中の根管内に静置しておいたペーパーポイントの観察によって検討したので報告する。

【材料および方法】

試作励起蛍光撮影装置 市販一眼レフカメラのレンズフード内にレンズに直接映り込まないように波長405±10nmのレーザー光源（最大出力5mW）を装着して試作撮影装置を作製した。

資料の採取 対象は、感染根管症例とした。

各被験症例において、臨床症状と治療経過を考慮して最適と考えられる根管貼薬を選択した。今回の治療時にはまず、①自発痛の有無、②打診痛の程度、③根尖部圧痛の有無、④瘻孔の有無、⑤根管からの排膿または出血の有無について、診察してプロトコールに結果を記載した。次に、仮封を除去して、根管内にEDTAを満たしたうえ超音波スケーラーにて貼薬した薬剤を除去、その後滅菌生理食塩水を根管内に滴下後、ペーパーポイントを根管内に約30秒静置、⑥腐敗臭を確認した後、レンズフード先端が接地してフードが暗箱となるようにカメラを設置し、⑦ペーパーポイントからの励起蛍光を撮影後、カタラーゼ反応を観察した。

【成績および結論】

今回、対象とした根管数は52根管で、励起蛍光を示したのは、6根管であった。その内、打診が認められたものが各5症例、カタラーゼ反応を示したものが各5症例であり、打診、カタラーゼ反応がともに認められたのは4症例であった。多くの症例で治療開始時には腐敗臭、根管内細菌培養検査陽性、カタラーゼ反応陽性と診断されたが、症状の改善に伴い、腐敗臭、根管内細菌培養検査、カタラーゼ反応が陰性になっていくのが観察された。近年、水酸化カルシウムを根管内貼薬することが増え、従来用いていた綿栓を用いた評価を行うことが難しくなっている。従って、今回仮封除去後に、静置したペーパーポイントに対して波長405nmの青色励起光を照射することで、根管内を評価できたことは、励起蛍光が根管内の即時評価に応用できる可能性が考えられる。今後は根管内細菌培養検査の結果や根充後の予後を併せて検討し、根管内の評価に応用しうる可能性を検討したいと考えている。

電氣的根管長測定可能な新しい根管治療トレーニングツールの開発と基礎実習への応用

¹⁾日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第1講座、

²⁾日本歯科大学大学院 新潟生命歯学研究科硬組織機能治療学、³⁾日本歯科大学新潟病院 総合診療科

○北島佳代子^{1,2)}、新井恭子^{1,2)}、飯野華絵²⁾、横須賀孝史³⁾、佐藤友則³⁾、松田浩一郎³⁾、

北野芳枝¹⁾、朝比奈壮郎¹⁾、反町香子¹⁾、三好敏朗¹⁾、五十嵐 勝^{1,2)}

Development of the new endodontic training tool allowed using apical locator and application to the pre-clinical training

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

²⁾Advanced Operative Dentistry-Endodontics, The Nippon Dental University Graduate School of Life

Dentistry at Niigata, ³⁾Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital

○KITAJIMA Kayoko^{1,2)}, ARAI Kyoko^{1,2)}, IINO Hanae²⁾, YOKOSUKA Takashi³⁾, SATOH Tomonori³⁾, MATSUDA Koichiro³⁾, KITANO Yoshie¹⁾, ASAHINA Takeo¹⁾, SORIMACHI Kyoko¹⁾, MIYOSHI Toshiro¹⁾ and IGARASHI Masaru¹⁾

【目的】本学第4学年の歯内療法学実習では、根尖孔閉鎖型の透明根管模型を手で把持し、直視下で根管拡大形成から根管充填までを行った後、電氣的根管長測定可能な顎模型をファントームに装着し、作業長決定法を加えた実習を行っている。しかし、ファントームに装着した模型上では、電氣的根管長測定時に挿入したファイルの視認ができなため、その原理と作業長決定法を十分理解できない学生もみられる。そこで、根尖孔開口型透明根管模型を用いて電氣的根管長測定実習を行うためのトレーニングツールを考案したので、歯内療法学実習への応用を加えて報告する。

【材料と方法】根管模型は、象牙質の硬さに類似した透明樹脂製模型とし、切削感や切削粉が天然歯に近似する材質を条件とした。根管は根尖部に湾曲を伴い、根尖孔が模型底部に開口する形態とした。根管の断面は円形とし、現在市販されている透明ブロックの規格とした。模型スタンドは生理食塩液を介在させて電気回路を作るものとし、繰り返し使用可能で、着脱部を取り替えて多歯種に応用できるものとした。それらの条件を満たす根管模型と模型スタンドを用い、根管長測定の実施とファイルポジションでのエックス線撮影を行った。

【結果】完成した根管模型は、エポキシレジン製の四角柱(10mm×10mm×13mm)で、根尖孔開口型の透明根管模型(13-20-35、(株)ホクシンエレクトロニクス)である。上面に下顎第一小臼歯の歯冠が付属しており、02テーパーで20度の湾曲を有し、根管壁周囲0.1mmが赤色レジンとなっている。根尖孔の直径は0.15mmで底面に開口している。一方、今回考案した電氣的根管長測定が可能な模型スタンド(歯根模型スタンドINT-001、(株)ホクシンエレクトロニクス)は、外形が直径40mm、高さ30mmの円柱ドーム状のプラスチック製で、中央に直径12mm、高さ18mmの円柱状のくぼみを有し、その底面に金属ねじが固定されている。金属ねじは裏面に貫通し、電気コードに接続している。模型スタンドのくぼみには、装着する模型の基底面形態に合った開口部を有する着脱可能なラバー製のコネクタを入れ、模型を固定する。コネクタをセットした模型スタンドに根尖孔開口型の模型を装着する時、底面の金属ねじと模型底面の間の空隙に生理食塩液を注入することで、電気コードと根管内に挿入したファイルの間に電気回路を形成する。電氣的根管長測定器を接続し、ファイルを根尖方向に挿入していくと、メーターはスムーズに作動し、根尖孔を正確に指示した。この位置でデジタルエックス線写真撮影を行うと、ファイルの先端と根尖孔が一致し、良好な画像が得られた。

【考察】本スタンドは、小型の透明根管模型を固定できるため、手で把持するより安定した状態で実習を行うことが可能である。また、根尖孔開口型の模型を用いると電氣的根管長測定を実施でき、スタンドに装着したままのエックス線撮影にも支障はなく、電氣的根管長測定位置をエックス線写真で確認することができた。さらに、根管模型の着脱も容易で、メーター値と実際のファイルポジションを肉眼的に観察することも可能であるため、作業長決定法を理解しやすくと考えられた。さらにコネクタを改良することにより、歯根形態の付与された根管模型や天然歯での電氣的根管長測定実習への使用も期待できる。本ツールは、植立顎模型を作製せずに1歯単位でトレーニングできるため、実習初心者のみならず、病院実習生や臨床研修医、歯科医師等の独自トレーニングにも広く活用できることが期待される。

【結論】新しく開発した根管治療トレーニングツールは、電氣的根管長測定が可能で、ファントームに装着した顎模型での実習に先立ち、電氣的根管長測定法の原理と作業長決定法を理解するための簡便なツールとして歯内療法学実習への応用に有効であると考えられた。

髄腔模型歯を用いた根管形成と根管充填実習の評価

¹⁾奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯内療法学分野, ²⁾奥羽大学歯学部口腔衛生学講座

○佐藤穂子¹⁾, 佐々木重夫¹⁾, 山崎信夫¹⁾, 山田眞義¹⁾, 車田文雄²⁾, 齋藤高弘²⁾, 木村裕一¹⁾

Evaluation of endodontic practice of root canal shaping and root canal filling using artificial pulp cavity models

¹⁾Division of Endodontics, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry

²⁾Department of Preventive Dentistry, Ohu University School of Dentistry

○SATO Yasuko¹⁾, SASAKI Shigeo¹⁾, YAMAZAKI Nobuo¹⁾, YAMADA Masayoshi¹⁾, KURUMADA Fumio²⁾,
SAITO Takahiro²⁾, KIMURA Yuichi¹⁾

【緒言】奥羽大学歯学部歯学科では、4年次の歯内療法学基礎実習において手に持って行う透明根管模型を用いた根管形成と根管充填を行った後、臨床を想定して髄腔模型歯をマネキンに装着して根管形成と根管充填を行っている。そこでこの実習における各模型の根管形成および根管充填の結果について詳細に分析し評価した。

【材料および方法】平成25年度本学歯学部第4学年の学生47名が実施した人工歯を対象とした。歯冠付き透明根管模型上顎左側第一大臼歯(26)(S3-JC22U6, ニッシン), 髄腔模型歯の上顎右側中切歯(11), 上顎左側第一小臼歯(24), 上顎左側第一大臼歯(26), 下顎右側第一大臼歯(46)(B22X-500, ニッシン)の5本を使用した。実習内容は、歯冠付き透明根管模型では各根管を根尖孔相当部より1.5mm上方に#50のサイズでアピカルシートを、その上方1.5mmから歯冠側へ0.5mmずつ作業長を短くしながら#100までフレアー形成を行った。根管形成にはリーマー、HファイルおよびKファイル(MANI)の専用切削器具を用い、リーマー、Hファイルの順にフレアー形成まで行った後、Kファイルで根管壁を滑沢化させた。髄腔模型歯は上下顎模型(D50-OH.C.18, ニッシン)にそれぞれ植立してマネキンに装着、ラバーダム防湿を行った状態で根管形成、根管充填を行った。模型歯先端に通電ペーストを塗布し、電気的根管長測定器(Root ZX, モリタ)にて生理学的根尖孔相当部まで測定して作業長とし、各根管を透明根管模型と同様の太さに専用切削器具を用いて根管形成を行った。根管充填はすべての模型歯で根管形成したアピカルシートの長さ、号数のガッタパーチャポイント(GC)とシーラー(キャナルス, 昭和薬品化工)を用い、側方加圧根管充填法で行った。

根管形成の評価は根尖孔の破壊の有無、切削片による目詰まりの有無を透明根管模型では直視で、各髄腔模型歯では検印表に記載されている作業長までシート形成した太さのリーマーが挿入できるかにより確認した。根管充填の評価はシーラーのまたは根管充填材の溢出および死腔の有無を透明根管模型では直視で、各複製根髄腔模型歯では根管充填後に撮影したデジタルエックス線写真により確認した。透明根管模型上顎左側第一大臼歯と髄腔模型歯の上顎左側第一大臼歯のそれぞれ3根管における根管形成と根管充填の結果をカイ2乗検定を用いて危険率5%で統計処理を行った。また、根管形成および根管充填された4歯種の髄腔模型歯においてカイ2乗検定を用いて比較検討した。さらに歯内療法学基礎実習を複数回行っている学生(留年生)と初めて行う学生のグループに分け、比較検討した。

【成績および考察】#50のサイズにアピカルシートの形成ができた模型は透明根管模型近心頬側根管66.0%, 遠心頬側根管72.3%, 口蓋根管70.2%, 髄腔模型26は近心頬側根管85.1%, 遠心頬側根管80.9%, 口蓋根管83.0%であった。適切に根管充填された透明根管模型近心頬側根管は87.2%, 遠心頬側根管85.1%, 口蓋根管85.1%, 髄腔模型26は近心頬側根管68.1%, 遠心頬側根管70.2%, 口蓋根管44.7%であった。透明根管模型26と髄腔模型26において各根管における根管形成および根管充填を比較検討したところ近心頬側根管の根管形成と近心頬側根管および口蓋根管の根管充填に有意差が認められた。適切に根管形成かつ根管充填された髄腔模型歯の割合を比較検討したところ各模型歯間で有意差は認められなかった。実習を複数回行った経験のある学生と初めて行った学生の比較では髄腔模型46遠心根管形成のみ有意差が認められた。

透明根管模型は最初に行った模型歯であるため、手技を直視で行える状態であっても専用切削器具の扱いに慣れていないため実習書の指示通りに形成された模型が7割程度と少なく、顎模型に植立されている状態であっても上顎右側中切歯, 上顎左側第一小臼歯を根管形成後に実習を行い手技に慣れたため上顎左側第一大臼歯の根管形成は良好な結果になったと考えられる。4歯種の複製根髄腔模型の根管形成や根管充填で有意差は認められなかったが、根管数や何本目を実習を行ったことが結果に影響を及ぼしたと考えられる。

【結論】根管形成の成績は、形成した根管数が多くなるほど良好な結果を示すことが示唆された。根管充填は経験した根管数より顎模型への植立の有無や充填状態を直視で確認できるかが結果の良否に影響することが示唆された。

マイクロフォーカスX線CT装置による下顎切歯根管形態の評価 (第5報)

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座
○西田太郎、勝海一郎

Evaluation of Root Canal Morphology in Mandibular Incisor by Micro-focus X-ray CT Device, Part 5

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

○NISHIDA Taro, KATSUUMI Ichiroh

【はじめに】

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

本研究はマイクロフォーカスX線CT装置を用いて連続的な断層撮影を行い、三次元画像を構築後、歯根近遠心側の陥凹について調べた。

【材料および方法】

実験にはヒト抜去下顎切歯 50 本を用いた。歯根外形を肉眼的に観察後、マイクロフォーカスX線CT装置 (ELE-SCAN, 日鉄エレックス) を用い、管電圧 80kV、管電流 $70\mu\text{A}$ 、スライス厚 $52.9\mu\text{m}$ の条件にて、根尖から歯冠部まで連続的に断層撮影を行った。得られた断層像は画像処理ソフト (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング) により三次元構築を行い、以下について分析を行った。

1. 歯根の陥凹

三次元構築した全体像を基に、歯根の陥凹の有無と根管の分岐を調べた。

2. 歯根陥凹部の体積

歯根側面が陥凹した歯は、陥凹部を挟んで唇側と舌側の最大豊隆部で囲まれた部分を抽出し、その体積を計測した。歯根陥凹部の体積と根管形態の関係を、有意水準 5%にて Wilcoxon の順位和検定により統計分析を行った。

【結果】

1. 歯根の陥凹

歯根の陥凹は 50 歯中 24 歯で認められ、そのうち 18 歯は単根管歯であった。2 根管歯は 6 歯全てで陥凹を認めた。

2. 歯根陥凹部の体積

歯根陥凹部の体積の平均は単根管歯で $0.94\pm 1.40\text{mm}^3$ 、2 根管歯で $3.82\pm 2.24\text{mm}^3$ であり、最大は 7.46mm^3 であった。統計分析の結果、2 根管歯では歯根陥凹部の体積が有意に大きいことを認めた ($p<0.05$)。

【まとめ】

本研究により、下顎切歯歯根の陥凹により、根管の分岐の存在を明らかにできる可能性が窺われた。臨床において、根管治療の際は、髓腔内だけでなく歯根表面を十分に触知、観察し治療にのぞむ必要性が認められた。

周囲インプラント体に及ぶ根尖性歯周炎を生じた静注BP製剤投与患者に対して非外科的に
治療を行った一症例

東京歯科大学 歯科保存学講座

○山田 雅司、宮吉 教仁、関谷 紗世、村松 敬、古澤 成博

A case of nonsurgical endodontic therapy for the patients taking I.V. bisphosphonates with symptomatic
apical periodontitis spreading to an adjacent dental implant

Department of Endodontics, and Clinical Cariology, Tokyo Dental College

○YAMADA MASASHI, MIYAYOSI NORIHITO, SEKIYA SAYO, MURAMATSU TAKASI,
FURUSAWA MASAHIRO

【緒言】

静注 BP 製剤投与患者において、隣在歯の根尖性歯周炎により生じたと診断された、インプラント体周囲への骨欠損に対して、非外科的な歯内療法処置によって治癒を導くことができた症例について報告する。

【症例】

患者は 51 歳女性。上顎左側前歯部の自発痛と歯肉腫脹と、21, 23 歯と 22 部インプラントの保存治療を主訴として来院された。多発性骨髄腫の転移予防のために BP 製剤（ゾレドロン酸）の静脈投与を受けていた。21 歯、23 歯は共に打診痛、咬合時痛、根尖部圧痛を認め、動揺度 2 度、プロービングデプスは全周 3mm 以内であった。21、22 根尖部歯肉にサイナストラクトを認めた。22 部インプラント周囲の歯肉に発赤、腫脹は無く、動揺も認められず、プロービングデプスは全周 1mm で、歯頸部でのオステオインテグレーションの損失は認めなかった。

デンタルエックス線写真と CBCT 所見より、21、23 根尖部から、22 部インプラント部を含む透過像を認めた。以上の所見から、21、23 歯の根尖性歯周炎は認められるもののインプラント体への感染の可能性は少ないと診断した。患者へは、保存治療と外科的治療のリスクを説明したところ非外科的な治療を希望されたため、21、23 歯に対して非外科的歯内療法処置である根管治療を開始した。

【経過】

根管充填後、テンポラリークラウンにて経過観察を行った後、治癒傾向が認められたため歯冠補綴を行った。補綴半年後において 21、23 歯の臨床症状は、自覚症状は認めず、打診痛、咬合時痛、根尖部圧痛は無く、プロービングデプスは全周 2mm 以内、動揺も無く、サイナストラクトは消失した。エックス線写真所見において、根尖部透過像は縮小傾向を認めていた。咬合等の機能にも問題は無く、治癒中と診断された。また 22 部インプラントも著変を認めなかった。

【考察およびまとめ】

今回の症例では、根尖性歯周炎由来の大きな骨欠損を認め、インプラント周囲骨も吸収していたが、インプラント体まで感染が波及していなかったために、根尖性歯周炎の治療にともない周囲骨も再生したものと考えられた。早期における感染源の可及的除去と予防が BP 製剤による顎骨壊死に大きく影響を与えるため、インプラントに近接する根尖性歯周炎はインプラント周囲炎との鑑別と、インプラント体への感染の有無の診断と迅速な治療が予後に大きく影響を及ぼすものと思われた。

下顎巨大病変に対する歯内療法・外科的アプローチ

日本歯科大学附属病院総合診療科¹⁾、口腔外科²⁾、日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座³⁾

○北村和夫¹⁾、酒井康雄²⁾、荘司洋文²⁾、山崎孝子¹⁾、石井隆資¹⁾、永井圭子¹⁾、大西小雪¹⁾、勝海一郎³⁾

Endodontical and surgical approach to mandibular huge lesion.

Division of General Dentistry¹⁾ and Oral Surgery²⁾, The Nippon Dental University Hospital,
and Department of Endodontics³⁾, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo

○KITAMURA K¹⁾、SAKAI Y²⁾、SHOJI H²⁾、YAMAZAKI T¹⁾、ISHII T¹⁾、NAGAI K¹⁾、
OHNISHI K¹⁾、KATSUUMI I³⁾

【緒言】

下顎骨内にできる病変には大きく分けて、嚢胞と腫瘍の二つがある。しかし、下顎骨内にできる嚢胞様病変はさまざまで、診断に苦慮することがある。今回、下顎骨内に大きな病変を有する歯の治療を行う機会を得、若干の知見を得たので報告する。

【症例】

患者：26歳、女性。

主訴：下顎前歯部の違和感。

既往歴：特記事項なし。

家族歴：特記事項なし。

処置と経過：平成13年2月、本学附属病院口腔外科にエナメル上皮腫の疑いで紹介来院した。下顎前歯部唇側歯肉に膨隆がみられ、波動を触知した。エックス線により、下顎右側第二小臼歯部から左側犬歯部にまで及ぶ大きな透過像を認めた。下顎右側第二小臼歯から左側犬歯までの8歯は、歯髄電気診の結果、すべて生活歯であった。下顎腫瘍の臨床診断下、下顎前歯部の欠損部より生検を施行したところ、嚢胞と診断された。下顎右側第一・第二小臼歯はポケットと嚢胞が交通しているため保存不可能と判断し抜歯、抜歯窩より下方の組織を採取し再度生検を行ったが、嚢胞の診断であった。口腔外科より下顎右側犬歯から左側犬歯までの下顎前歯6本の抜髄を依頼され、総合診療科で根管充填まで行った。その後、口腔外科にて全身麻酔下で、嚢胞摘出と下顎右側犬歯から左側犬歯までの根尖切除術を施した。手術検体の病理組織検査の結果も術前と同様に嚢胞であった。術後は一過性に右側オトガイ神経領域の知覚異常が出現したので、アデノシン三リン酸ナトリウムと複合ビタミン剤を8週間投与し、症状は回復した。定期的な経過観察により骨の新生を認め術後4年までは順調に経過しているのを確認したが、患者の都合により来院が途切れた。

術後12年経過した平成25年11月に下顎右側臼歯部に隆起を認め、X線検査で嚢胞様透過性病変が認められ、他院での生検によりエナメル上皮腫と診断された。その後本年4月、本学附属病院口腔外科で下顎右側第一大臼歯・犬歯の抜歯と腫瘍摘出術を施した。腫瘍摘出術を施した手術検体の病理組織検査の結果はエナメル上皮腫であり、現在経過観察中である。

【考察】

嚢胞様病変には歯原性と非歯原性、腫瘍性と非腫瘍性のものがある。今回、嚢胞と診断して処置し、良好に経過していた症例が12年後にエナメル上皮腫と診断され、再手術を行うことになった症例を経験した。改めて13年前の病理切片を観察すると、腫瘍の一部と考えても矛盾しない組織所見が認められた。嚢胞様病変の診断は難しく、口腔外科、口腔病理、歯科放射線との連携の重要性が再認識された。今後、他科との連携を強め、さらに多くの症例に対して評価を進める予定である。

掌蹠膿疱症と診断された患者の根管治療症例

¹⁾奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯内療法学分野

²⁾奥羽大学歯学部口腔衛生学講座

○佐々木重夫¹⁾, 佐藤穂子¹⁾, 山崎信夫¹⁾, 山田真義¹⁾,
車田文雄²⁾, 齋藤高弘²⁾, 木村裕一¹⁾

A Case of Root Canal Treatment of Patient Diagnosed as Pustulosis Palmaris et Plantaris

¹⁾Division of Endodontics, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry

²⁾Department of Preventive Dentistry, Ohu University School of Dentistry

○SASAKI Shigeo¹⁾, SATO Yasuko¹⁾, YAMAZAKI Nobuo¹⁾, YAMADA Masayoshi¹⁾,
KURUMADA Fumio²⁾, SAITO Takahiro²⁾, KIMURA Yuichi¹⁾

【緒言】 手掌・足底に無菌性の膿疱が反復して出現する掌蹠膿疱症 (Pustulosis Palmaris et Plantaris; 以下, PPP と略す) は 40 歳から 60 歳代の女性に多く見られる皮膚疾患であるといわれ, 原因は不明な点が多いが, 歯科領域においては齶蝕や歯周病, 根尖病巣などの細菌性慢性疾患や歯科用金属によるアレルギーが重要視されている. 今回, PPP の診断を受けた 53 歳の女性患者の歯科治療を経験したので報告する.

【症例】 患者: 53 歳女性. 主訴: 右上奥歯の歯茎の腫れ. 現病歴: 1 週間前に 6 (4, 5 年前に根管治療の既往有) 頬側歯肉部の腫脹を認める. 既往歴: 4, 5 年前より高血圧症および高眼圧症で福島県立医科大学附属病院院外投薬治療中 (ディオバン錠®, ネオメドロール EE 軟膏®, カルナクリン錠®, キサラタン点眼液® 処方) であり, 同院皮膚科で PPP と診断された. PPP に対する投薬治療はなされていないが, 歯科領域における口腔内金属の除去と齶蝕治療の施術による PPP の改善傾向の可能性について指摘される. 口腔内診査において 1 | 2 | 3 , 4 に C₂ 程度の齶蝕とエックス線写真所見において 7 | 6 | 6 , 5 | 5 | 7 の慢性化膿性根尖性歯周炎による根尖部透過像が確認された. 歯周組織に関する問題点の所見は認められなかった. なお, 本症例の報告に際しては患者の承諾を得ている.

【処置および経過】 初診時の医療面接において春季から夏季にかけて手掌に膿疱が強く出現し, 夏季以降に症状は緩和する傾向にあった. また, 足底部に膿疱が出現することはないとのことであった. 歯科治療術前に金属に対するパッチテスト (金属 15 種, 48 時間および 72 時間後判定) を行ったところ, Co および Ni のみに陽性反応が認められたが, 日常より好んで手指に Au や Pt の装身具 (指輪) を装着していた. 根尖性歯周炎と診断された歯に対しては感染根管治療および根管充填後に金銀パラジウム合金を用いた歯冠修復, 齶蝕歯に対してはコンポジットレジン修復を施術した. なお, 歯科治療に際して血圧とともに眼圧が高くなるとの訴えが認められたため, モニター管理下で歯科治療を行うことがあった. 歯科治療後の経年的な経過観察において手掌の膿疱の出現頻度は少なくなったものの緩解には至っていない.

【考察および結論】 PPP は手掌足底に限局する無菌性の膿疱を特徴とし頭部, 肘, 膝にも乾癬と似た皮疹を生じる難治性皮膚疾患で細菌アレルギー説 (病巣感染), 乾癬説, 金属アレルギー説, 季節的なものなどが原因としてあげられているが現在まで発症メカニズムについては明らかにされていない. 慢性扁桃炎, 歯周病や無症状性の根尖病巣など口腔内の慢性病変が原因の一端である可能性を示唆した報告もなされており, 病態や症状の改善として扁桃の摘出, 根尖病巣に対する治療や抜歯が挙げられている. PPP 患者では皮膚局所の特異抗原に対する自己免疫疾患様のシステムが働いている可能性があり, 持続する炎症により自己免疫が惹起されたりすることが考えられる. また, 口腔における病巣中の細菌が血中に迷入して菌血症を引き起こすことによって, 抗原あるいは一部の菌体成分に対する免疫反応が亢進し, 局所の病変の進展に関与しているとの報告もある¹⁾. 病巣感染を処置しても緩解しない症例には金属アレルギーを検討した上で歯科用金属の除去治療を行うのが通例であるとされているが, その関連性には否定的な意見もあり²⁾, 本症例の金属に対するパッチテストにおいてもアレルゲンとして多くの報告がなされている Co および Ni のみの陽性反応だけであり, 日常より手指に Au, Pt の装身具を装着しているため, 金属アレルギーが原因となっている可能性は低いと考えられた. しかし, PPP は遅延型のアレルギーともいわれており, 金属から溶出した金属イオンが, 生体が本来持っているタンパク質と結合し, アレルギーの原因となるタンパク質に変質させる可能性があるため, 患者が望むのであれば抗原因子となり得る歯科用金属を使用しない歯冠修復を行うなどの検討も必要であると考えられた.

【文献】 1) 川島伸之, 長澤敏行, 石川 烈, 須田英明. 掌蹠膿疱症と辺縁性および根尖性歯周炎. 日歯保存誌 2003 ; 46 : 626-637. 2) 藤井佳朗. 歯科的対応が異なった掌蹠膿疱症の 2 例. 日歯保存誌 2000 ; 43 : 74-78.

槌状根管を保有した下顎第二大臼歯の歯内療法 (症例報告)

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座¹⁾、口腔解剖学講座²⁾
○樋口直也¹⁾、加藤彰子²⁾、大野紀和²⁾、中田和彦¹⁾

Endodontic treatment of the mandibular second molar with a C-shaped root canal (A case report)
Departments of Endodontics¹⁾ and Oral Anatomy²⁾, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
○Naoya Higuchi¹⁾, Akiko Kato²⁾, Norikazu Ohno²⁾, Kazuhiko Nakata¹⁾

目的

槌状根は、アジア人の下顎第二大臼歯において約30%認められることが知られており、槌状根管を示すことが多いと報告されている(B. Fan *et al.*, 2004)。また、槌状根管は、その根管系の複雑性から、根管治療が難しいと言われていた(H. G. Cooke & F. L. Cox, 1979, D. C. Melton *et al.*, 1991, N. Walid, 2000)。

今回、下顎第二大臼歯において、根管数の多い槌状根管の症例を経験したため、文献的考察を含めて報告する。

症例

患者は、42歳、男性。数日間におよぶ下顎左側大白歯部の自発痛を主訴に来院された。「7はセメントが充填されていた。また、「5が欠損しており、「456のブリッジが装着されていた。診査の結果、「4は生活歯で、異常は認められず、「6は根管治療が施されており、軽度の垂直および水平性の打診痛が認められたものの、歯肉に異常所見は認められなかった。「7は温熱痛と軽度な冷痛、垂直および水平性の打診痛が認められた。また、「7の電気歯髄診での反応は、対照歯(7)より閾値がやや上昇していた。術前のデンタルX線写真を含めた診査の結果から、「7のセメント下の二次う蝕による急性化膿性歯髄炎と診断した。

初診当日は、応急処置として「7冠部歯髄除去を行うことを説明し、患者の同意を得た。浸潤麻酔とラバーダム装着後、セメントを除去したところ露髄し、直後に露髄面からわずかな排膿を認め、その後出血に変わった。また、露髄面の周囲に軟化象牙質が存在していた。軟化象牙質と天蓋および冠部歯髄を除去したところ、槌状根管であることが確認された。

再来院時、軽度の打診痛以外は改善されていた。浸潤麻酔とラバーダム装着後、4本のファイルが挿入可能であったため、4根管として抜髄処置を行った。抜髄には、化学的清掃剤として次亜塩素酸ナトリウムおよびEDTAを用い、根管洗浄には超音波を使用した。GPを試適し、術中デンタルX線写真を撮影した。貼薬剤には、Ca(OH)₂を使用した。

マイクロスコープ下で根管形態の診査を行ったところ、さらに未処置根管を1根管発見した。未処置根管を拡大形成後、すべての根管にGPを再試適し、術中デンタルX線写真を再度撮影した。また、複雑な根管系全体の把握のために歯科用コーンビームCTの撮像を行った。その結果、ファイル挿入可能と思われる根管は5根管で、セメント-エナメル境より根尖側2mmの高さから、根尖孔より歯頸側1mmの高さまで槌状根管であることが分かった。

臨床症状の改善が確認されたため、側方加圧法で根管充填を行い、術後デンタルX線写真を撮影した。その後、4壁残存していたため、コンポジットレジンで充填し、歯冠修復を行った。

術後1年が経過し、デンタルX線写真を含めた予後診査を行った結果、臨床症状もなく予後良好であった。

考察

「7であったため、槌状根管も想定していたが、術前デンタルX線写真では確定は困難と思われる。槌状根管は、挿入可能ファイル数が通常2~3本と報告されているが(B. Fan *et al.*, 2009)、今回の症例では5本挿入可能であった。根管の見落としを避けるため、歯科用コーンビームCTでの複雑な根管系の把握やマイクロスコープによる根管口の確認が必要であると思われる。また、内側の壁の厚さが薄いことが報告されており(W. Lin *et al.*, 2004)、根管拡大形成時に注意すると同時に、イスマスやフィンに切削粉や歯髄が残存すると報告されているため(D. C. Melton *et al.*, 1991)、十分な化学的清掃と超音波洗浄を行った。根管充填方法については、槌状根管における基礎的研究は少なく、一般的な根管の症例を長期間調査した研究のメタアナリシス分析でも、側方加圧法と垂直加圧法の間に有意な差が認められていないため(L. Peng *et al.*, 2007)、症例により各術者がより適した方法を選択すれば良いと思われる。

日本大学歯学部附属歯科病院歯内療法科を受診した患者の実態調査

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ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,
日本大学歯学部³

○平野 頼是^{1,3}, 武市 収^{1,2,3}, 柴崎 郁恵^{1,3}, 小澤 いつか^{1,3}, 東海林 暁子^{1,3},
小森 規雄^{1,2,3}, 小木曾 文内^{1,2,3}

Survey of patients in Department of Endodontics at Nihon university school of dentistry dental hospital

Departments of Endodontics¹, Division of Advanced Dental Treatment², Nihon University School of Dentistry³

○Yoriyuki Hirano^{1,3}, Osamu Takeichi^{1,2,3}, Ikue Shibasaki^{1,3}, Itsuka Ozawa^{1,3}, Akiko Syouji^{1,3},
Norio Komori^{1,2,3}, Bunnai Ogiso^{1,2,3}

【研究目的】

日本大学歯学部附属歯科病院歯内療法科における, 当科受診患者の, 治療内容等に関する疫学調査を実施し, 専門診療科としての診療状況について, 分析を加える。

【材料および方法】

調査対象: 2009年1月5日から2011年12月28日までの3年間に, 本学歯学部附属歯科病院歯内療法科に来院した患者で, 調査年月内に根管治療が開始され, 治療が終了した1119症例を対象とした。

調査内容: 患者のカルテおよびデンタルエックス線写真を資料とし, 患者の年齢, 性別, 患歯の部位, 診断名別, 紹介状の有無, 治療の内容, 治療終了までの来院回数, 来院期間について調査し, 分析を行った。

【結果および考察】

患者の年齢の割合は, 40代(21%)が最も多く, 次いで50代(20%), 60代(18%), 30代(16%)であった。また, その全体の58%が女性であり, 42%が男性であった。

患歯の部位別調査の結果, 上下顎ともに, 第一大臼歯, 第二大臼歯の割合が多く, 特に右側下顎第一大臼歯(8%)が最も多かった。これは, 大臼歯の根管の複雑性による技術的難度が高いことや, 治療自体に多くの時間を要するため, 当科への依頼が多かったものと考えられた。

診断別では, 歯髄炎が23%, 根尖性歯周炎が77%で, 紹介状を持参した患者は, 全体の36%であった。これは, 紹介元歯科医院ですでに処置を行っているため, 根尖性歯周炎症例が多くなったことが考えられた。また, 治療の内容においても, 感染根管処置(再治療)が51%と最も多く, さらに感染根管処置(初回)が25%, 抜髄が23%, 外科療法が1%であった。また, 再治療の内容について, デンタルエックス線所見より根管充填材が不十分であるため(21%), 不快症状を認めため(21%), 他医院で治療を行ったが症状が改善しない(20%)が多数を占めた。

治療回数については, 5回以下(62%)が最も多く, 次いで6~10回(27%), 11~15回(7%)であった。治療期間については, 30日以下が42%, 31~60日が27%, 61~90日が11%であった。

【結論】

2009年1月5日から2011年12月28日までの3年間の調査を行った結果, 感染根管処置の再治療の割合が最も多く, さらに紹介状の内容からは, 第一, 第二大臼歯など技術的難度の高い治療が多かった。これらのことから, 患者ならびに紹介医は, 当該領域に関する専門的な知識や技術を有した歯科医師による治療, マイクロスコープやコーンビームCTなどの先進的な器具器材を用いた診断, 治療による, 予知性の高い治療を期待しているものと考えられた。

ラット根尖孔外バイオフィームモデルの改良

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)

²⁾大阪大学大学院工学研究科マテリアル生産科学専攻

○呉本勝隆¹, 野杻由一郎¹, 米田直道¹, 松井沙織¹, 石本卓也², 中野貴由², 恵比須繁之¹, 林美加子¹

Modified extraradicular biofilm model in rat

¹⁾Osaka University Graduate School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry and Endodontology

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

○KUREMOTO Katsutaka¹, NOIRI Yuichiro¹, YONEDA Naomichi¹, MATSUI Saori¹,

ISHIMOTO Takuya², NAKANO Takayoshi², EBISU Shigeyuki¹, HAYASHI Mikako¹

【研究目的】

我々のグループは、実験的根尖病巣を形成したラットの下顎第一臼歯にガッタパーチャポイント (GP) を根尖孔外まで挿入することによって、実験的に根尖孔外バイオフィームを形成することに成功した¹⁾。このモデルを用いて根尖孔外バイオフィームを形成させた後、マイクロ CT にて経時的・三次元的に根尖病巣体積を計測したところ、GP を挿入し根尖孔外バイオフィームを形成した被験歯では、根尖孔外バイオフィームを形成していない対照歯に比べ、露髄後 8 週以降の根尖病巣体積が有意に拡大した。しかしこのモデルでは、根尖孔外に形成されたバイオフィームの他に、根尖孔外まで挿入された GP も病巣拡大の原因となった可能性がある。さらに、根尖孔外バイオフィームと難治化との関連を解明するために、根尖孔外バイオフィームを形成した後に根管治療を行うモデルが必要である。そこで本研究では、根尖孔外バイオフィーム形成の足場として用いた GP をバイオフィーム形成後に除去するモデルを作製し、根尖孔外に挿入された GP が根尖病巣に及ぼす影響について検索した。

【方法】

本研究は大阪大学歯学研究科および工学研究科の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 週齢雄性 Wistar 系ラットを実験に用いた。ラットの下顎両側第一臼歯をラウンドバーにて露髄させ、露髄後 4 週に GP を根尖孔外まで挿入し、2 週後に GP を引き抜く実験群、GP を引き抜かない陽性対照 (PC) 群、GP を挿入しない陰性対照 (NC) 群の 3 群に群分けした。露髄後 4 週から 8 週までそれぞれの群の根尖病巣をマイクロ CT (R_mCT2, RIGAKU) で撮影し、骨形態解析ソフト (TRI 3D-BON, RATOC) を用いて根尖病巣体積を経時的・三次元的に計測した。また、露髄後 8 週にラットを屠殺した後、下顎第一臼歯を抜去し、全ての群で根尖孔外バイオフィームの存在を走査型電子顕微鏡 (SEM) にて確認した。

【結果】

SEM 観察の結果より、全ての実験群・PC 群にて根尖孔外バイオフィームの形成が確認されたが (右図)、NC 群では根尖孔外バイオフィームは観察されなかった。実験的根尖性歯周炎の根尖病巣体積は露髄後 6 週において、全ての群で有意な差はなかったが、露髄後 8 週において、実験群・PC 群では NC 群に比べて有意に増大した ($p < 0.05$)。実験群と PC 群の間に有意差は認められなかった。

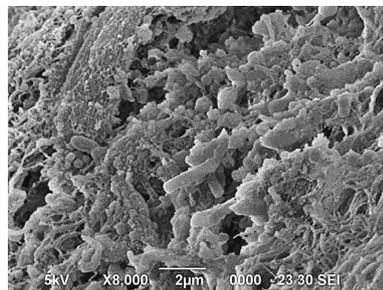
【考察および結論】

GP を引き抜いた実験群で根尖孔外バイオフィームの存在が確認されたことから、本手法により GP の突出が影響ない根尖孔外バイオフィームモデルが開発されたと考えられる。また、実験群と PC 群で根尖病巣体積に有意差が認められなかったことから、根尖孔外バイオフィームが形成されている根尖病巣内では、根尖孔外に挿入された GP は病巣拡大に影響しないことが示唆された。

【参考文献】

1) Kuremoto K, Noiri Y, Ishimoto T, Yoneda N, Yamamoto R, Maezono H, Nakano T, Hayashi M, Ebisu S. *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。



SEM image of an experimental group at week 8
Biofilms composed of rods or cocci with an extracellular matrix-like structure are shown on the periapical root surface.

心臓植込み型電子機器装着患者の歯科治療時の安全性の検証

岩手医科大学・歯学部・歯科保存学講座・う蝕治療学分野¹⁾

岩手医科大学・歯学部・口腔医学講座・関連医学分野²⁾

○工藤義之¹⁾, 櫻井秀人¹⁾, 岡田伸男¹⁾, 野田 守¹⁾, 中居賢司²⁾

Verification of Safety During Dental Treatment of Patients with Implantable Heart Device

Division of Operative Dentistry and Endodontics, Department of Conservative Dentistry¹⁾,
Department of Internal Medicine of Dentistry²⁾

School of Dentistry, Iwate Medical University

○Kudo Yoshiyuki¹⁾, Sakurai Hideto¹⁾, Okada Nobuo¹⁾, Noda Mamoru¹⁾, Nakai Kenji²⁾

【緒言】

本邦では、疾病構造の変化や高齢化に伴い致死的不整脈や重症心不全例が増加しており、徐脈性不整脈、致死的不整脈への非薬物的治療法として、ペースメーカー (PM)、植込み型除細動器 (ICD) などの心臓植込み型電子機器が使用されている。これらの電子機器の進歩は著しく、装着者が歯科を受診する機会も増加している。電子機器装着患者への歯科医療機器の使用についてはガイドラインに定められているが、歯科病変の診断や治療には通電機器類 (Type2) を使用せざるを得ないのも現状である。今回、多チャンネル高分解能心電計 (ドリーム ECG) を用いて心臓植込み型電子機器装着患者の歯科治療時の不整脈惹起について検討したので報告する。本研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認 (No. 01206) を得て行なった。

【症例概要, 考察】

対象は岩手医科大学歯科医療センターを受診者で、根管治療のため超音波機器ならびに電氣的根管長測定器の使用、浸潤麻酔が必要であった ICD 装着者 2 名、PM 装着者 1 名とした。治療前に循環器内科専門医と歯科麻酔専門医が十分な問診を行ない、4 週間以内に 1) ICD 作動、2) 致死的不整脈、3) 心筋虚血、4) 心不全 (NYHA III 以上) がないことを確認し、ドリーム ECG を装着し、治療中の循環器動態を測定した。治療に際しては循環器内科専門医と歯科麻酔専門医が立ち会い、不測事項発生時への十分な対応のために AED や救急薬品を設置した。

Case	Age Sex	Heart Diseases	Implanted Device	Dental Treatment	Used Dental Devices Used Drugs
1	54 Y Male	Old Myocardial Infarction Ventricular Fibrillation	ICD	36 Infected Root Canal Treatment	Apex Locator (Root ZX) Ultrasonic Units (ENAC:OE10-W)
2	86 Y Male	Ventricular Tachycardia	ICD	42, 43 Pulpectomy	Apex Locator (Root ZX) Local Anesthetic
3	80 Y Female	Severe Aortic Stenosis Sick Sinus Syndrome	PM	26 Infected Root Canal Treatment	Apex Locator (Root ZX) Ultrasonic Units (ENAC:OE10-W)

いずれの症例でも、ドリーム ECG モニターで若干のノイズ増加を認めたものの、致死的不整脈や再分極指標の異常を認めなかった。

【結論】

電氣的根管長測定器、超音波機器根管治療が禁忌とされる ICD あるいは PM 装着患者において、十分な問診、歯科治療時の適切な循環動態の把握により、安全な治療遂行の可能性が示唆された。また、循環動態の把握にドリーム ECG が有効であると思われた。

本研究の一部は科学研究費補助金 (基盤研究C:24592879) で行なわれた。

歯肉の内縁上皮におけるタイトジャンクション構成タンパクの局在

岡山大学病院 総合歯科

○塩津 範子, 河野 隆幸, 桑山 香織, 武田 宏明,
大塚 恵理, 小野 早和子, 渡邊 翔, 鳥井 康弘

Distribution patterns of tight junction associated proteins in mouse inner epithelium

Comprehensive Dental Clinic, Okayama University Hospital

○SHIOTSU Noriko, KONO Takayuki, KUWAYAMA Kaori, TAKETA Hiroaki,
OHTSUKA Eri, ONO Sawako, WATANABE Sho, TORII Yasuhiro

【目的】

一般に、腸管などの単層上皮細胞にはタイトジャンクション (TJ)といわれる細胞間接着装置が存在し、この接着装置は上皮の接着複合体のうち最も細胞頂部寄りに位置する。TJの機能は隣接する細胞を密着させることにより、バリア機能とフェンス機能に関与している。TJの構成タンパクにはオクルディン (OCD)とクローディンファミリー (CLDs)があり、特に後者は組織・細胞特異的に発現することが知られている。また、近年、単層上皮のみならず重層扁平上皮である皮膚においてもTJの存在が報告されている。歯肉の上皮は重層扁平上皮であり、歯肉縁を境に内側にある歯肉溝上皮と付着上皮からなる内縁上皮と、外側にある咀嚼粘膜の外縁上皮に分けられる。歯周病が発症および進行するためには、歯周病原細菌が歯周ポケット内の内縁上皮から侵入し、感染が成立する必要がある。したがって、内縁上皮において、バリア機能やフェンス機能に関与するTJの分布を調べることは、歯周病原細菌の侵入に対する防御のメカニズムを理解する上で重要であると考えられる。そこで、本研究では、内縁上皮におけるTJの構成タンパクであるOCDとCLDsの発現および局在を観察した。

【方法】

8週齢マウスの歯を含めた上顎歯周組織を採取し、コンパウンドに凍結包埋した。凍結包埋試料はcryofilm (SECTION-LAB Co. Ltd.)を用いて5 μ mの未脱灰凍結切片を作製し(川本法)、蛍光免疫染色を行った。一次抗体として抗OCD goat ポリクロナール抗体と抗CLD-1, -2, -3, -4, -5 rabbit ポリクロナール抗体を、二次抗体として抗goat IgG Alexa 488 rabbit 抗体と抗rabbit IgG Alexa 488 goat 抗体を用いた。核染色はHoechst 33342を用いて行い、ベクターシールド (Vector Laboratories)で封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM780型 ZEISS)で観察を行った。

【結果および考察】

歯肉溝上皮と付着上皮ともに、表層ではOCD, CLD-1, -4に陽性反応を示さなかったが、第一層と第二層の細胞間では陽性反応を示し、その反応は点状であった。また、点状の反応部位より下層の細胞間では、CLD-1, -4のみ網目状に陽性反応を示した。CLD-2, -3, -5はいずれの部位においても反応を認めなかった。

すなわち、TJの構成タンパクであるOCD, CLD-1, -4は歯肉溝上皮と付着上皮ともに発現していたが、その局在には差異を認めた。このような構成タンパクの局在の差異は同じ重層扁平上皮である皮膚および口蓋でも認められており、OCDとCLDsが共存している部位にTJが存在するといわれている。したがって、内縁上皮においてもOCDとCLD-1, -4の両者が陽性の部位である第一層と第二層にTJが存在すると推測され、歯周病原細菌の侵入の防御をしている可能性が考えられる。

【結論】

歯肉溝上皮と付着上皮にTJの構成タンパクであるOCD, CLD-1, -4が存在することが明らかとなった。

【謝辞】

本研究の実施にあたり御指導いただいた、岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔形態学分野 山本敏男教授に感謝いたします。

真菌由来代謝産物(+)-terrein は interleukin-6 誘導性 colony stimulating factor-1 の遺伝子発現を抑制する

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
○山本総司¹, 大森一弘², 後藤絢香¹, 池田淳史², 松永一幸¹, 山本大介², 山本直史², 前田博史¹, 高柴正悟¹

Synthetic (+)-terrein suppresses interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor-induced mRNA expression of colony stimulating factor-1 in human gingival fibroblasts.

¹Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry, and Pharmaceutical Sciences, and ²Department of Periodontics and Endodontics, Okayama University Hospital

○YAMAMOTO Satoshi¹, OMORI Kazuhiro², GOTO Ayaka¹, IKEDA Atsushi², MATSUNAGA Kazuyuki¹, YAMAMOTO Daisuke², YAMAMOTO Tadashi², MAEDA Hiroshi¹, TAKASHIBA Shogo¹

【目的】

歯周炎は、歯槽骨を破壊する骨吸収性疾患であり、その罹患率の高さ（国民全体の80%以上）を考えると国民病の一つと言える。超高齢化社会を迎えた我が国において、口腔機能を維持することは健康寿命を延伸する上でとても大切である。そのためにも、成年期・高齢期における歯の喪失原因第1位である歯周炎の効率的な予防・治療法を開発することが求められている。

真菌の一つである *Aspergillus terreus* が産生する代謝産物(+)-terrein は、抗炎症効果を有することが示唆されている (Lee et al, *J Endod*, 2008)。我々は、ヒト歯肉線維芽細胞 (human gingival fibroblasts; HGFs) において、有機化学的に合成した(+)-terrein が炎症性サイトカインの一つである interleukin-6 (IL-6) の細胞内シグナル伝達を抑制し、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) の産生を抑制する、という知見を報告した (第56回春季日本歯周病学会春季学術大会)。IL-6 は、歯周病や関節リウマチといった炎症性骨吸収を主病態とする疾患の発症・進展に深く関与していることが報告されており、炎症性骨吸収の進行を抑制する上で非常に重要なターゲット因子の一つである。しかし、(+)-terrein が IL-6 誘導性のタンパク質発現に及ぼす影響は不明な点が多い。

そこで、本研究では、化学合成した(+)-terrein が、IL-6 誘導性のタンパク質の mRNA の発現 (特に炎症および成長因子関連) に及ぼす影響について、PCR array を用いて網羅的に検討することを目的とした。

【材料および方法】

細胞および培養: 細胞は、臨床的に健康なヒト歯肉から分離・培養した線維芽細胞様細胞を HGFs として用い、ウシ胎児血清を10%の割合に含む DMEM (Invitrogen) を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。(岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 倫理委員会承認番号: No. 661)

(+)-terrein の合成: (+)-terrein は、Altenbach らの報告を一部改変し、有機化学的に合成したものをを用いた。なお、合成した(+)-terrein の構造は、核磁気共鳴 (NMR) 装置およびエクス線結晶解析装置を用いて解析し、天然由来の(+)-terrein と同じ構造であることを確認している (岡山大学 大学院自然科学研究科 萬代大樹博士提供)。

細胞刺激: HGFs は、(+)-terrein (10 μM) で30分間前処理した後、リコンビナントヒト IL-6 および可溶性 IL-6 受容体 (sIL-6R) (R&D, 各 50 ng/ml) を添加して、細胞を刺激した。

mRNA の回収: 12穴マルチプレートに 5 × 10⁴ 個/well の HGFs を播種し、サブコンフルエントの状態まで培養した後、上記条件下で細胞を刺激した。刺激12時間後、RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて全 RNA を回収した。なお、本研究では、何も添加していない群 (対照群)、IL-6/sIL-6R で12時間刺激した群 (IL-6/sIL-6R 群)、(+)-terrein のみ添加した群 (terrein 群)、(+)-terrein で30分間前処理後、IL-6/sIL-6R で12時間刺激した群 (terrein + IL-6/sIL-6R 群) の4実験群を設定した。

PCR array を用いた mRNA 発現の網羅的解析: (+)-terrein が IL-6/sIL-6R 誘導性 mRNA の発現に及ぼす影響は、RT² ProfilerTM PCR Array Human Growth Factors (84 遺伝子, Qiagen) を用いて解析した。Array 結果の解析は、Qiagen PCR Array Data Analysis を用いて解析した。実験精度が高い (OKAY) と判断されたターゲット因子をまず抽出し、その発現量の変化が5倍以上あった因子について、定量性 real-time PCR 法を用いて mRNA の発現をさらに検討した。

統計解析: 各実験結果の差の検定には Student's *t*-test を用い、P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

HGFs において、

- (+)-terrein のみの添加では、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF1)、小胞体アミノペプチダーゼ (ERAP1) の mRNA 発現が抑制される傾向に、酸化ストレス誘導性成長阻害因子 (OSGIN1)、血小板由来血管内皮細胞増殖因子 (TYMP) の mRNA 発現が促進される傾向にあった。
- (+)-terrein は、IL-6/sIL-6R 誘導性の VEGF-A の mRNA 発現を抑制する傾向を確認し、さらに、BDNF、骨形成タンパク質 (BMP1)、コロニー刺激因子 (CSF1)、そして ERAP1 の mRNA 発現が抑制される傾向にあった。
- 定量性 real-time PCR 法を用いて解析したところ、(+)-terrein は、IL-6/sIL-6R 誘導性の VEGF-A および CSF1 の mRNA 発現を有意に抑制した (p<0.05)。

【考察・結論】

CSF1 は、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) とも呼ばれ、骨吸収を担う破骨細胞の分化に関与する重要な因子の一つである。本研究結果から、(+)-terrein は、従来報告した IL-6 誘導性 VEGF の発現を抑制するのみではなく、M-CSF の発現も抑制する効果が示唆された。

以上の結果から、慢性炎症性骨吸収を主病態とする歯周病の治療または予防薬としての(+)-terrein の可能性が示唆された。

歯周病感染器官培養モデルを用いた抗菌療法確立を目指す基礎研究

九州大学 大学院 歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野
○竹下 正章、讃井 彰一、福田 隆男、濱地 貴文、西村 英紀

Establishment of novel antibiotic periodontal therapy using organ culture model
Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science,
Kyushu University
○TAKESHITA MASAOKI, SANUI TERUKAZU, FUKUDA TAKAO, HAMACHI TAKAFUMI, NISHIMURA FUSANORI

【目的】

慢性歯周炎に対する治療法の標準治療はスケーリング・ルートプレーニングを中心とした機械的除去療法であり、抗菌剤の併用は補助的なものと考えられてきた。しかしながら日本人糖尿病患者の血糖コントロール改善に及ぼす歯周治療の効果を検討したヒロシマスタディでは、局所抗菌療法を併用した治療がスケーリング・ルートプレーニングを中心とした機械的除去療法のみ群に比べ、炎症マーカーとして知られる高感度c-反応性蛋白(CRP)値がより低下し、それに伴いヘモグロビンA1cの改善効果も大きいことが示された(Munenaga Y et al., Diab Res Clin Pract, 2013)。これを受け、演者らは機械的除去のみでは組織内に侵入した感染細菌を完全に除去できず、感染菌が残存する可能性があるとの仮説を設けた。そこで、各種抗菌薬の組織内への浸透性ならびに、組織内歯周病細菌に対する抗菌効果を検討するため、①マウス真皮を用いた感染器官培養モデルを確立させること、②確立したモデルを用いて組織内に浸透する抗菌薬の歯周病細菌に対する作用を迫及すること、を目的として本研究を行った。

【材料及び方法】

歯周病原細菌として、*Porphyromonas gingivalis* W50、*Prevotella intermedia* ATCC25611、*Fusobacterium nucleatum* ATCC10953の3種類を用いた。また、抗菌薬としてアジスロマイシン、セフジニル、ミノサイクリン、メトロニダゾールの計4つを用いた。さらにコントロールとしてペニシリン・ストレプトマイシンを用いた。まず、Brain Heart Infusion培地中で培養した各歯周病原細菌に対して各抗菌薬1 µg/ml(ペニシリン・ストレプトマイシンは100 IU/100 µg)が一定の増殖阻止効果を及ぼすことを確認した。器官培養法の確立には、ddYマウスを用い、背面真皮を採取しトリミングした後に、あらかじめ一定の濃度に培養した各歯周病原細菌を器官内部にシリンジを用い注入し、各抗菌薬入りの培地で24時間培養した。培養後、常在菌を除去するためにペニシリン・ストレプトマイシン入りの抗菌薬で組織表面を処理した後、洗浄しホモジナイズして血液寒天培地に播種しコロニー形成菌のColony Forming Unitを計測した。計測したコロニーからInstaGene Matrix(BIO-RAD)を用いてDNAを回収後、PCR法によりコロニー形成菌が目的の歯周病原細菌であることを確認した。PCR用のプライマーは過去の報告を参考に設計し、各歯周病細菌の検出効果を確認した後に、実験に供した。一連の検証に関して、常在菌の介入とペニシリン・ストレプトマイシンの作用の確認のために歯周病原細菌を注入していないものと、ペニシリン・ストレプトマイシンを使用したものをコントロールとして用いた。

【結果および考察】

器官培養前後にペニシリン・ストレプトマイシン処理を施すことで、マウス皮膚に常在する常在菌の繁殖を抑えることを確認できた。そこで、この方法を用いて各種抗菌薬が各歯周病単独感染モデルに及ぼす影響を検討した。各歯周病原細菌に対して、液体培地で培養したものに比べ、器官培養を用いた場合、抗菌効果が発揮されにくい抗菌薬があることが判明した。これは、組織内に浸透する効果が各抗菌薬で異なることに由来するものと考えられた。また、現在臨床の場でしばしば用いられているミノサイクリンは、今回用いた器官培養モデルでは組織内に浸透する効果としては低い可能性が示唆された。今後、今回確立した器官培養法を用い、より効果的な抗菌療法確立に向け、混合感染である歯周病を想定した研究に発展させたいと考えている。

ヒト・ケラチノサイトでの酸化ストレスによる細胞老化とオートファジー

福岡歯科大学¹総合歯科学講座・高齢者歯科学分野、²生体構造学講座・病態構造学分野、
³総合歯科学講座・総合歯科学分野

○山口 真広¹, 大野 純², 萩尾 佳那子³, 内藤 徹¹

Cellular senescence and autophagy in human keratinocytes by oxidative stress

¹Department of General Dentistry, Division of Geriatric Dentistry, ²Department of Morphological Biology, Division of Pathology, ³Department of General Dentistry, Division of General Dentistry, Fukuoka Dental College

○Masahiro Yamaguchi¹, Jun Ohno², Kanako Hagio³, Toru Naito¹

【研究目的】

細胞老化は、細胞が受ける様々なストレスによる分子レベルでの損傷が少しずつ蓄積し、細胞の機能低下が経年に渡り持続し、それらの細胞が構築する器官・臓器の活動が衰退していくものと理解される。しかしながら、細胞は老化に対しても、一定の恒常性機構を発揮することが推測される。近年、細胞内の主要なタンパク分解経路の一つで、細胞質構成成分をライソゾーム酵素により分解するオートファジーの細胞老化への関与が注目されている。そこで、本研究では、酸化ストレスによる細胞老化へのオートファジーの役割を検討した。

【材料・方法】

1) ヒトケラチノサイト(KC)への酸化ストレス刺激: ヒト KC には HaCaT 細胞を用いて、10%FBS 含有 DMEM で培養した。細胞老化の誘導は、細胞を過酸化水素で処理をする酸化ストレス刺激により行った。10~500 μ M 過酸化水素を培地に 2 時間添加して、実験群とした。過酸化水素非添加の細胞をコントロールとした。過酸化水素刺激細胞およびコントロール細胞は、(1) 細胞生存率、(2) 細胞免疫染色 (ICC) 法および (3) Western blotting (WB) 法により分析を行った。

2) 細胞老化の判定: 過酸化水素刺激細胞および非刺激細胞に対して、(1) H₂DCFDA による細胞内活性酸素種 (ROS) の検出、(2) senescence associated β galactosidase (SA β Gal) の検出および (3) p16, p21 発現の検出により行った。

3) オートファジー誘導の判定: (1) monodansylcadaverine (MDC) によるオートファゴゾームの検出、(2) オートファジー関連遺伝子 (Atg5, Atg12, Beclin-1 および LC3) の ICC 法および WB 法による検出および (3) PI3KC3 複合体・阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) および Wortmannin (Wm) によるオートファジー抑制の検討。

4) オートファジーによる細胞老化の調節: 細胞に 3-MA による前処理を行い、1) ~ 3) の検討を行った。

【結果・考察】

1) 過酸化水素刺激による HaCaT 細胞における細胞老化の誘導: (1) 濃度依存性に細胞生存率の低下を認めた。また、サイトケラチン発現などの細胞染色性についても、高濃度過酸化水素により刺激した細胞では、サイトケラチンの染色性が減弱した。すなわち、高濃度による過酸化水素刺激は HaCaT 細胞の生存・増殖および同細胞の保持する性状に影響を与えることがわかった。本実験では、100~180 μ M 過酸化水素の刺激で生存率および細胞性状の保持が良好であった。(2) 刺激細胞への H₂DCFDA 細胞染色において、細胞内 ROS が検出された。すなわち、刺激細胞では酸化ストレスによる変化が生じていることが明らかとなった。(3) 細胞内 SA β Gal の発現および WB 法による p16, p21 発現が、刺激細胞で認められた。この結果は、同細胞群では増殖刺激応答を失い、細胞分裂能が G1 あるいは G2 期に停止している老化細胞の状態を示している。

2) 老化細胞でのオートファジー誘導: 刺激細胞群では、MDC 陽性オートファゴゾームが認められた。オートファゴゾームは、GFP-LC3 トランスフェクトによっても細胞内凝集物として検出された。細胞老化によるオートファジーが誘導されることが明らかとなった。

3) オートファジー抑制による細胞老化の促進: 3-MA 前処理による細胞への過酸化水素刺激では、通常の刺激細胞に比べて細胞老化が促進されることが、細胞生存率および SA β Gal 発現と p16, p21 発現の増強により示された。

【結論】

以上の結果から、ヒト KC への過酸化水素刺激により、細胞老化とそれに伴ったオートファジーが誘導されることが明らかとなった。オートファジー抑制による細胞老化の促進結果から、オートファジーがアンチエイジングに関与する可能性が示唆された。

LPS 刺激によるヒトケラチノサイトでのオートファジー誘導

福岡歯科大学¹総合歯科学講座・総合歯科学分野、²生体構造学講座・病態構造学分野、
³総合歯科学講座・高齢者歯科学分野

○萩尾 佳那子^{1,2}, 大野 純², 山口 真広³, 山田 和彦¹, 谷口 奈央¹, 米田 雅裕¹, 廣藤 卓雄¹

An induction of autophagy in LPS-stimulated keratinocytes

¹Department of General Dentistry, Division of General Dentistry, ²Department of Morphological Biology, Division of Pathology, ³Department of General Dentistry, Division of Geriatric Dentistry, Fukuoka Dental College

○Kanako Hagio^{1,2}, Jun Ohno², Masahiro Yamaguchi³, Kazuhiko Yamada¹, Nao Taniguchi¹, Masahiro Yoneda¹, Takao Hirofuji¹

【研究目的】

口腔粘膜上皮は、内因性および外因性ストレスに曝されながら恒常性を保っている。とくに、歯周組織の被覆上皮組織および歯周ポケット接合上皮を構成するケラチノサイト (KC) は、細菌からの lipopolysaccharide (LPS) 刺激に対する対応法を保持している可能性がある。ストレス適応手段として、細胞は、オートファジー (自食作用) による生存プログラムを展開することが知られている。そこで、本研究では、LPS 刺激 KC におけるオートファジーの誘導機序を検討した。

【材料・方法】

1) ヒト KC への LPS 刺激: ヒト KC には HaCaT 細胞を用いて、10%FBS 含有 DMEM で培養した。大腸菌由来 LPS を各濃度で培地に添加して、16 時間反応させた。コントロールには、LPS 非添加群および LPS 阻害剤の Polymyxin B (PMB) を LPS に混合して検討した。コントロール細胞および LPS 刺激細胞は、(1) 細胞生存率、(2) 細胞免疫染色 (ICC) 法および (3) Western blotting (WB) 法に用いた。

2) オートファジー誘導の判定: (1) monodansylcadaverine (MDC) によるオートファゴゾームの検出、(2) オートファジー関連遺伝子 (Atg5, Atg12, Beclin-1 および LC3) の ICC 法および WB 法による検出および (3) PI3KC3 複合体・阻害剤である 3-methyladenine (3-MA) および Wortmannin (Wm) によるオートファジー抑制の検討。

3) Toll-like receptor 4 (TLR4) シグナルのオートファジー誘導への関与: LPS 刺激 HaCaT 細胞での TLR4 発現を WB 法で検索した。

【結果・考察】

1) LPS 刺激による HaCaT 細胞でのオートファジー誘導: (1) コントロールと比較して、各濃度での LPS 刺激による細胞生存性への影響はなかった。また、サイトケラチン発現などの細胞染色性についても、LPS 添加による変化はみられなかった。すなわち、LPS 刺激は HaCaT 細胞の生存・増殖および同細胞の保持する性状に影響を与えないことがわかった。(2) LPS 刺激細胞への細胞染色で、MDC 陽性オートファゴゾームが認められた。オートファゴゾームは、GFP-LC3 トランスフェクトによっても細胞内凝集物として検出された。LPS 刺激細胞において、オートファジー関連遺伝子の WB 法によるタンパク発現が認められた。これらの発現は、PMB+LPS 添加群において減弱した。以上の結果は、LPS 刺激により、HaCaT 細胞でオートファゴゾームが形成、すなわちオートファジーが誘導されることを示した。また、PMB による抑制効果は、オートファジー誘導が LPS 刺激に特異的であることを示唆した。

2) 3-MA あるいは Wm によるオートファジー発現の抑制: ICC 法および WB 法により、LPS 刺激細胞でのオートファジー誘導は、PI3KC3 複合体・阻害剤である 3-MA あるいは Wm 添加により抑制された。PI3KC3 複合体の阻害によるオートファジーの抑制効果は、3-MA あるいは Wm によるオートファゴゾームの形成を阻害している可能性を示唆した。

3) LPS 刺激 HaCaT 細胞での TLR4 発現: LPS 刺激により、TLR4 発現が認められた。また、同発現は PMB+LPS 添加群において減弱した。したがって、TLR4 発現は LPS 刺激に特異的であることが明らかとなった。

【結論】

以上の結果から、ヒト KC は LPS 刺激により、LPS/TLR4 経路を利用したオートファジー機序を展開することが明らかとなった。この機序により、刺激環境下での適応現象を図っている可能性が示唆された。

交感神経刺激誘発心筋肥大の *Porphyromonas gingivalis* による増悪

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 ¹歯周病学分野、²循環制御内科学分野
³東京大学 先端臨床医学開発講座

○佐藤博紀¹ 鈴木淳一³ 青山典生¹ 磯部光章² 和泉雄一¹

Porphyromonas gingivalis Deteriorates the Isoproterenol-induced Cardiomyocyte Hypertrophy

Departments of ¹Periodontology and ²Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University, ³Department of Advanced Clinical Science and Therapeutics, The University of Tokyo

○Hiroki Sato¹, Jun-ichi Suzuki³, Norio Aoyama¹, Mitsuaki Isobe², Yuichi Izumi¹

【研究目的】

拡張型心筋症や虚血性心疾患などの心疾患は進行すると心不全に陥る。心不全は心機能が低下し生体機能維持に必要な血流量を排出できない状態である。心機能の低下はリモデリングとよばれる現象の進行とともに起こる。リモデリングとは傷害を受けた心筋細胞が脱落した部位を、線維組織が埋めることで心臓の機能を維持しようとする病理組織学的な変化である。それに先行して、心機能低下を代償するための心筋細胞の肥大が起こる。その病理過程の進展において交感神経刺激が重要な役割を演じている。臨床においては、この心不全の増悪を阻止するために、交感神経刺激遮断剤が用いられ、その結果、患者の長期予後が改善される事が知られている。

歯周病は歯周組織の進行性の破壊を伴う慢性疾患である。歯周病は全身的な慢性炎症の原因の一つとも考えられ、歯周病はこれまで数多くの心血管疾患との関連性が報告されている。培養細胞を用いた報告により、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が、心筋細胞の肥大と細胞死を誘発することが知られている。本研究では、*P. gingivalis* に感染させたマウスにイソプロテレンール (ISO) で過剰に交感神経刺激して心筋に傷害を誘発することで、*P. gingivalis* が交感神経刺激下の心筋細胞に与える影響を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

生後7週令の C57BL/6J マウス (雄) の背部皮下に矯正用ステンレスワイヤーを用いて作製したコイル型のチャンバーを埋入した。埋入2週後から 10^8 CFU/mL の *P. gingivalis* 懸濁液 0.1 mL を週に1回、4週間にわたり注入した。初回の *P. gingivalis* 注入と同日に ISO が入った浸透圧ポンプを腰背部皮下に埋入し、 $30 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$ の排出量で4週間留置した。浸透圧ポンプ埋入から4週後に心機能、心拍数測定を行い、また心臓と血液を採取して分析を行った。測定項目は心エコーによる FS (左室内径短縮率)、EF (左室駆出率)、心拍数、血圧、心体重量比、ELISA 法での抗 *P. gingivalis* IgG 抗体価、病理切片上での心筋細胞面積とした。

【結果】

P. gingivalis の感染を裏付けるため、血清中の抗 *P. gingivalis* IgG 抗体価を測定した結果、細菌を注入した実験群の抗 *P. gingivalis* IgG 抗体価は対照群に比べて有意に高かった。また、心筋細胞の肥大を評価するために、採取した心臓を同じ高さで水平断し鍍銀染色を行った。切片上で各サンプルから心筋細胞をランダムに100個選出し、その面積を計測し比較したところ、*P. gingivalis* 感染群では対照群と比較して有意に心筋細胞面積が大きかった。一方、FS (左室内径短縮率)、EF (左室駆出率)、心拍数と血圧、心体重量比は実験群と対照群との間に差がなかった。

【考察・結論】

P. gingivalis 感染が、ISO による交感神経刺激での心筋細胞傷害を誘導したマウスで、心筋細胞の肥大を亢進することが示唆された。一方で、心機能や血圧には2群の間で差がみられなかった。これは *P. gingivalis* によって心筋細胞の肥大が観察されたものの、それに対して代償機構が働き心機能を維持しているためと考えられる。長期的な *P. gingivalis* 持続感染により、心臓におけるリモデリングと、その後の心機能低下が生じる可能性がある。

これまで *P. gingivalis* が心筋細胞に与える影響に関する報告は in vitro での実験で複数あったが、in vivo の系で現象を確認したものはなかった。今回、実際にマウス歯周病原細菌が心筋肥大に影響を起こすことを確認できたことは、これまでの歯周病と心肥大との関連性を支持するものである。

β-グリチルレチン酸配合市販歯磨剤は THP-1 細胞の炎症性サイトカイン産生を抑制する
サンスター(株)

○田代亜衣香 終 茜 林よし子

A toothpaste containing β-Glycyrrhetic acid decreases the proinflammatory cytokines in THP-1 cells.
Sunstar Inc.

○Aika Tashiro, Akane Hiiragi, Yoshiko Hayashi

【背景・目的】

歯周病の発症、進行過程において様々なサイトカインが関与していることが知られており、その中でも TNF-α 及び IL-6 は、炎症性サイトカインとして歯周組織の免疫応答を活性化させている。

カンゾウ由来成分である β-グリチルレチン酸 (以下 β-GR) は、マウスマクロファージ細胞 (RAW264.7) に対して炎症性サイトカインの産生を抑制することが報告されている抗炎症物質である。β-GR は広く市販歯磨剤に配合されている。そこで本研究において、β-GR 配合市販歯磨剤がヒトマクロファージ様細胞の炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。

【材料と方法】

ヒト単球性白血病由来細胞 (THP-1) を 100 nM Phorbol 12-myristate 13-acetate 共存化で 96-well プレートに播種し、10%FBS 含有 RPMI-1640 培地で 48 時間培養してヒトマクロファージ様細胞へと分化させた。その後 1%FBS 含有 RPMI-1640 培地に置換し 24 時間培養したのち、同培地によって 1/4000 に希釈した β-GR 配合市販歯磨剤を 2 時間処理した。処理した薬剤を取り除いた後、LPS で刺激を与えた。LPS は *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 からフェノール抽出し、粗精製したもの (0.5 μg/ml) を用いた。4 時間後に細胞上清を回収し、炎症性サイトカイン (TNF-α 及び IL-6) の量を ELISA 法によって測定した。

【結果】

THP-1 細胞からの TNF-α 及び IL-6 産生量は LPS 刺激によってコントロールと比較して増加した。一方、β-GR 配合市販歯磨剤を処理した群において、処理しなかった群と比較して LPS 刺激後の TNF-α 及び IL-6 は有意に抑制された。

【結論】

β-GR 配合市販歯磨剤処理後の THP-1 細胞は炎症性サイトカインの産生が有意に抑制されていることが示された。

TLR2 および TLR4 リガンド投与マウス歯肉における炎症性および抗炎症性サイトカインの発現
長崎大学大学院医歯薬総合研究科歯周疾患病因・再生解析学分野¹、福岡歯科大学口腔医療センター²
○尾崎 幸生¹、吉村 篤利¹、金子 高士²、鶴飼 孝¹、吉永 泰周¹、Jorge Montenegro¹、Ziauddin SM¹、白石 千秋¹、
中村 弘隆¹、藏本 明子¹、原 宜興¹

**The expression of pro- and anti-inflammatory cytokines in mouse
gingiva induced by TLR2 and/or TLR4 ligand**

Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences Department of Periodontology¹, Fukuoka Dental
College Center for Oral Diseases²
○Yukio Ozaki¹, Atsutoshi Yoshimura¹, Takashi Kaneko², Takashi Ukai¹, Yasunori Yoshinaga¹, Jorge Montenegro¹,
Ziauddin SM¹, Chiaki Shiraisi¹, hirotaka Nakamura¹, Akiko Kuramoto¹, Yoshitaka Hara¹

【研究目的】

歯周炎における炎症の主要な原因はプラーク中の細菌であり、菌体に含まれるペプチドグリカン(PGN)は Toll Like Receptor (TLR)2 を介して、リポ多糖体 (LPS)は TLR4 を介して自然免疫系を活性化する。当教室の岸本らは、PGN と LPS をマウス歯肉に投与した場合、それぞれ単独で結合組織に炎症性細胞浸潤を誘導するが、これらを同時に投与した場合、炎症性細胞浸潤は相乗的に促進され、歯槽骨前縁に多くの破骨細胞が出現することを報告した(J. Periodontal Res. 2012; 47: 446-454)。代表的な炎症性サイトカイン TNF- α は、組織の炎症反応の拡大に中心的役割を果たし、破骨細胞の分化を促進する。逆に、抗炎症性サイトカイン IL-10 は、炎症反応を抑制し、破骨細胞の分化も抑制する。一方、自然免疫系の活性化は、T 細胞の分化にも影響を与える。Th17 によって産生される IL-17 は、好中球の局所への浸潤を促進し、骨吸収とも深く関連することが示されているが、近年、TLR2 および TLR4 の活性化が Th17 の誘導にも影響することが示された。しかしながら、種々の菌体成分によって刺激された歯周組織の炎症と歯槽骨の吸収に、これらのサイトカインが、どのように関与しているかは明らかでない。よって、PGN および LPS により、それぞれ TLR2 と TLR4 を単独または同時に刺激した際の歯肉における TNF- α 、IL-10、IL-17 の発現を比較検討することにより、これらのサイトカインを介した局所の炎症反応および歯槽骨吸収への影響について検討する。

【材料および方法】

8 週齢の雄性マウスの下顎第一臼歯近心歯肉に、*S. aureus* 由来の PGN および *E. coli* 由来の LPS を、それぞれ単独または同時に 1 回につき 5 μ g/3 μ l、13 回隔日投与した。最終投与から 1 日後に屠殺し、下顎を摘出、固定・脱灰、パラフィン包埋して 4 μ m の組織切片を作製し、抗 IL-17、抗 TNF- α 、抗 IL-10 抗体で免疫染色を行った。免疫染色後、マイクロメーターを用いて歯槽骨前縁の根尖から歯冠側方向へ骨に沿って縦 750 μ m×横 500 μ m の部位の全細胞数とそれぞれのサイトカイン陽性細胞数を測定した。

【成績】

対照の PBS 投与群では弱い炎症性細胞浸潤のみ見られたものの、IL-17、TNF- α 、IL-10 陽性細胞は、ほとんど観察されず、骨吸収も認められなかった。PGN および LPS 投与群では、炎症性細胞の浸潤が認められ、単位面積あたりの全細胞数に占める TNF- α および IL-10 の陽性細胞率は、両サイトカインとも PGN+LPS 刺激>LPS 刺激>PGN 刺激の順であり、単位面積あたりの IL-17 陽性細胞率は、PGN 刺激>LPS 刺激>PGN+LPS 刺激の順に多かった。

【考察】

本研究において、TNF- α 陽性細胞の発現率は、炎症性細胞の浸潤および破骨細胞出現率と一致していたことから、歯肉の炎症は TNF- α 等の炎症性サイトカインを介して拡大した可能性が高い。TNF- α 陽性細胞の発現率が高い組織では、IL-10 陽性細胞の発現率も高かったが、炎症性サイトカインが過剰に作用しないように抗炎症性サイトカインも同時に発現させる生体系のネガティブフィードバック機構が機能しているものと考えられる。IL-17 陽性細胞の発現率は、炎症性細胞の浸潤および破骨細胞出現率と一致しておらず、歯肉の炎症への影響は限定的であったと思われる。

【結論】

炎症に係るサイトカインの出現率は、TLR2 と 4 の刺激の種類の違いにより異なり、TNF- α と IL-10 は TLR2+TLR4 および TLR4 刺激で高く、破骨細胞の出現率とほぼ一致していた。一方、IL-17 は TLR2 刺激で高かった。

金クラスターの歯科用光照射器による光励起が培養細胞および細菌へ及ぼす影響

1 北海道大学大学院歯学研究科歯周・歯内療法学教室

2 関西大学化学生命工学部

○西田 絵利香¹, 宮治 裕史¹, 川崎 英也², 山本 真希², 宮田 さほり¹, 川浪 雅光¹

Effects of gold clusters photoexcited by dental curing light on culture cells and bacteria.

1 Department of Periodontology and Endodontology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine.

2 Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University.

○Erika NISHIDA¹, Hirofumi MIYAJI¹, Hideya KAWASAKI², Maki YAMAMOTO², Saori MIYATA¹, Masamitsu KAWANAMI¹

【研究目的】

光線力学療法 (PDT; Photo Dynamic Therapy) とは、光感受性物質を生体内へ応用して光を照射することで活性酸素を発生させ、それによって標的の細胞や細菌を死滅させる治療法である。一般にメチレンブルーなどの有機光増感剤が用いられ、歯周病治療などに臨床応用されている。金クラスター (Au₂₅(SR)₁₈, 径 0.9 nm) は金原子が 25 個からなる粒子で、光励起で活性酸素の一種である一重項酸素を生成する。金クラスターは水溶性、低毒性であり、高い光安定性を有する。また有機光増感剤が近赤外 (650-900 nm) で光励起するのに対して、金クラスターは紫外可視 (400-650nm) でも光励起できることから、広く普及している LED 歯科重合用光照射器を用いて PDT を施術できる可能性がある。今回、新規 PDT の開発を目標として、金クラスターを歯科用光照射器で光励起させ、細胞や細菌に対する影響を評価した。

【材料および方法】

金クラスターは塩化金酸、カプトプリル、テトラオクチルアンモニウムブロミドを含む水・エタノール混合溶液に、NaBH₄を添加して作製した。評価には金クラスター+光照射群、金クラスター群、光照射群、コントロールの4群を設定した。はじめに細胞培養試験を行った。金クラスター+光照射群では 500 μg/ml の金クラスターを α-MEM (10%FBS, 1% 抗生剤含有) に混和し、MC3T3-E1 細胞の懸濁液を作成してディッシュに播種後、すぐにディッシュ裏面から光照射 (1000mW/cm², 420-480nm, ペンキュアー, モリタ) を 1 分間行った。37°C, 5%CO₂ 下で 1 時間あるいは 24 時間培養した後、細胞形態を SEM にて観察した。同様の群分けで 1, 3, 7 日間培養後の細胞増殖量を測定した。金クラスター含有培地の交換および光照射は培養開始時、および 1, 3, 5 日目に行った。次に細菌培養試験を行った。BHI 培地 (1% スクロース含有) に 500 μg/ml の金クラスターを混和後、*S. mutans* の懸濁液を作成してディッシュに播種、すぐに光照射を行った。37°C 嫌気下にて 24 時間培養後に細菌増殖量を測定した。

【結果と考察】

細胞培養 1 時間後の SEM 観察では、金クラスター+光照射群でも細胞は付着伸展しており、初期付着は良好であった。24 時間後の SEM 観察でも、金クラスター+光照射群で若干の死細胞を認めたが、細胞の付着伸展に大きな差はなく良好であった。金クラスターの初期細胞傷害性は低いことが示された。

細胞増殖性の測定の結果、コントロールに比較して 7 日目において各群ともに有意に細胞増殖量は減少し、特に金クラスター+光照射群で低く、増殖量はコントロールの 50% 程度に抑制された。

細菌培養試験ではコントロールに比較して各群とも増殖抑制を認め、金クラスター+光照射群はコントロールの 60% 程度であった。したがって、細菌に対する金クラスター+光照射の効果は早期から発現するものと思われた。

【結論】

金クラスターを歯科用光照射器を用いて光励起することで、培養細胞および細菌の増殖が抑制された。

マウス腰背部皮下に移植した羊膜上培養歯髓由来細胞シート の免疫組織学的検討

京都府立医科大学大学院 医学研究科 歯科口腔科学¹、免疫学²
康生会 北山武田病院 歯科口腔外科³

○本城賢一^{1,2}、山本俊郎¹、足立圭司¹、大迫文重¹、雨宮 傑¹、坂下淳宏³、喜多正和²、金村成智¹

Immunohistochemical analysis of implanted pulp-derived cells cultured on
human amniotic membrane sheet in lower back subcutaneous of mice
Department of Dental Medicine¹ and Immunology², Kyoto Prefectural University
Medicine, Graduate School of Medical Science

Department of Dentistry, Kouseikai Takeda Kitayama Hospital³
○ HONJO Ken-ichi^{1,2}, YAMAMOTO Toshiro¹, ADACHI Keiji¹, OSEKO Fumishige¹,
AMEMIYA Takeshi¹, SAKASHITA Nobuhiro³, KITA Masakazu², KANAMURA Narisato¹

【研究目的】

これまでに、羊膜の細胞培養基質としての有用性に注目、羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮由来細胞シートならびに培養歯根膜由来細胞シートの作成方法を確立している。そのうち培養口腔粘膜上皮由来細胞シートは、当科にて臨床応用を行い、拒絶反応等の異常なく良好な結果を得、羊膜が細胞培養の基質として適していることを報告している。

次に、歯髓由来細胞は、歯の内部に位置し外部からの有害刺激が少ないこと、従来、抜歯後に医療廃棄物として処理されていた智歯から比較的簡便に入手が可能であること、幹細胞が多く含まれていることから再生療法の細胞ソースとして有用性が高いと考えられるため、羊膜を基質とした羊膜上培養歯髓由来細胞シートを作成、第136回春季本学術大会にて報告した。今回我々は、作成した同細胞シートを骨分化誘導、ヌードマウス腰背部皮下に移植し、免疫組織学的検討を加えたので報告する。

【材料および方法】

便宜抜歯により抜去された智歯をセメントエナメル境で横断、歯髓組織のみを無菌的に採取した。歯髓組織を細分した後、10%ウシ胎仔血清 (FBS) と抗菌薬を添加した DMEM を用い初代培養を行った。その後 3~4 継代培養、羊膜上にこれら歯髓由来細胞を播種。Control 培地 (10% FBS/DMEM 抗菌薬添加培養液) または骨分化誘導培地 (10% FBS/DMEM 抗菌薬添加培養液、 β -グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメサゾン) を用いて約 4 週間培養、羊膜上培養歯髓由来細胞シートを作成、免疫組織学的検討を行った。

次に、7 週齢雄 BALB/C ヌードマウスの腰背部皮膚を切開剥離、Control 培地または骨分化誘導培地を用いて約 4 週間培養して作成した同細胞シートを静置、縫合した。移植約 4 週間後、ペントバルビタール麻酔下で軟 X 線装置 (Softex Co., Kanagawa, Japan) を用い、画像評価を行った。また、ペントバルビタール麻酔薬過剰投与により安楽死させたマウスより移植片を採取、免疫組織学的検討を加えた。

なお、当研究の実施および歯髓組織と羊膜の利用については、該当患者に対して本研究の内容ならびに安全性の説明を行い、同意を得た上で実施した。また、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の許可を得ている (RBMR-C-1207-1)。

【成績】

骨分化誘導同細胞シートは、アリザリンレッド S 染色において高い染色性を示すとともに、免疫組織化学的検討において Osetocalcin の発現性を認めた。また、ヌードマウス腰背部皮下へ移植した骨分化誘導同細胞シートは、軟 X 線所見にて不透過像を認め、アリザリンレッド S 染色において高い染色性を示し、さらに、免疫染色にて Osteocalcin 陽性を認めた。

【考察】

ヌードマウス腰背部皮下に移植した骨分化誘導同細胞シートは、軟 X 線所見にて不透過像を認め、アリザリンレッド S 染色において高い染色性を示し、免疫染色にて Osteocalcin 陽性であったことから、移植後も石灰化した組織が維持されていることが考えられた。

本結果から、組織再生誘導法に骨分化誘導同細胞シートを遮断膜として用いることは、スペースメイキングだけでなく、組織再生誘導の際に、従来法と比べ、より骨新生が期待できるものと思われる。

【結論】

培養歯髓由来細胞および同細胞シートは骨分化能を有することが示された。また、同細胞シートはヌードマウスへの移植が可能であり、移植後、石灰化組織を形成するとともに一定期間維持し、歯周組織再生への応用の可能性が示唆された。

骨髄由来間葉系幹細胞のセメント芽細胞分化に及ぼす Wnt3a の影響

¹広島大学大学院医歯薬保健学研究科 基礎生命科学部門 生体材料学
²広島大学大学院医歯薬保健学研究科 応用生命科学部門 歯周病態学

○間 悠介^{1,2)} 栗原 英見²⁾ 加藤 功一¹⁾

Effect of Wnt3a on the cementoblast differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

¹Department of Biomaterials, Division of Basic Life Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

²Department of Periodontal Medicine, Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

○Yusuke Aida^{1,2)}, Hidemi Kurihara²⁾, Koichi Kato¹⁾

【研究目的】

歯周組織はセメント質、歯周靭帯、歯槽骨といった軟組織及び硬組織で構成されている。これらの複雑な組織を細胞移植治療によって再生させるために、多分化能を有する骨髄由来間葉系幹細胞 (MSCs) はその細胞源として有用である。MSCs から骨芽細胞への分化誘導は数多く報告されているが、特定の増殖因子を用いてセメント芽細胞や歯根膜細胞へ分化誘導したという報告は少ない。生体外での MSCs のセメント芽細胞への分化誘導は、効率的な歯周組織再生に重要であると考えられる。これまでに、セメント芽細胞の分化マーカーである Cementum Protein 1 (CEMP-1) や Cementum Attached Protein (CAP) の歯根膜細胞における発現が、リチウムイオンの作用で亢進することが報告されており、これは古典的 β -catenin/Wnt 経路の活性化に関与していることが知られている。そこで本研究では、同経路の活性化に寄与すると考えられる Wnt3a に着目し、MSCs のセメント芽細胞への分化に及ぼす Wnt3a の影響を調べることを目的とした。

【材料及び方法】

理研より分譲された不死化ヒト MSCs (UE6E7T-3) を DMEM に 10% 牛胎児血清 (FBS)、1 μ g/ml bFGF、2 mM L-グルタミン、100 units/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを添加した維持培地で培養した。その後、培地を α -MEM に 10% FBS、2 mM L-グルタミン、100 units/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシン、0.1 nM デキサメサゾン、100 mM β -グリセロフォスフェート、50 μ g/mL アスコルビン酸を添加した骨誘導培地に交換し、ここへ種々の濃度の Wnt3a (0 ~ 200 ng/mL) を添加して培養した。1 週間培養後に細胞を回収し、CEMP-1、CAP、Alkaline phosphatase (ALP)、Osteocalcin (OCN) の mRNA 発現量を real-time PCR によって測定し、また、Alizarin Red 染色によってカルシウムの沈着の有無を調べた。mRNA 発現解析は未分化 MSCs についても同様に行った。

【結果】

不死化ヒト MSCs において CEMP-1 の mRNA 発現を認めた。この MSCs 培養系に Wnt3a を加えた結果、CEMP-1 の mRNA 発現量が濃度依存的に上昇し、200 ng/mL の Wnt3a を加えた場合にコントロールに比べ有意に高い値を示した。また、CAP、ALP、OCN に関しても上昇傾向を示した。MSCs の培養液を維持培地から骨分誘導培地にすることによってカルシウムの沈着が促進されたが、それらの培地に Wnt3a を添加してもカルシウム沈着量に変化はなかった。

【考察】

Wnt3a は不死化ヒト MSCs における CEMP-1、CAP といったセメント質・骨関連タンパクの mRNA 発現を亢進することから、MSCs のセメント芽細胞誘導剤として有効であることが示唆された。また、Alizarin Red 染色の結果で、CEMP-1 が発現しているだけではカルシウムの沈着が認められないことから、in vitro において CEMP-1 を発現しており、かつ、カルシウムの沈着を認めるセメント芽細胞に分化するためには培養液の組成も重要であると考えられる。

ヒト歯肉線維芽細胞における nicotine による形態変化についての検討

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座

○ 五十嵐-武内 寛子、沼部幸博

Nicotine-induced alterations in human gingival fibroblasts cell

Department of Periodontology, Nippon Dental University School of Life Dentistry at Tokyo

○Hiroko Igarashi-Takeuchi and Yukihiro Numabe

【目的】喫煙は歯周組織の健康維持に有害であるという多くの報告があることから我々は、タバコの含有物質の一つである nicotine がヒト歯肉線維芽細胞に与える影響、特に形態的变化に着目して検討を行った。

【方法】健康歯周組織より樹立したヒト歯肉線維芽細胞(HGF)を用い、1 μ g/ml 濃度 nicotine 含有 0.5%FBS DMEM F-12 にて 24 時間培養後、光学顕微鏡、電子顕微鏡にて形態観察を行った。免疫蛍光染色により Actin および小胞体(ER)の染色を行った。さらに、HGF への Nicotine の影響を見るために培地に ³H-nicotine を添加し 24、48 時間培養後、液体シンチレーションカウンターにて測定を行った。

【成績】1 μ g/ml 濃度 nicotine 含有 0.5%FBS DMEM F-12 にて 24 時間培養後、細胞が紡錘形に伸びその細胞に空胞用構造物が光学顕微鏡により認められた。エポキシ樹脂包埋にて切片を作製し電子顕微鏡観察を行ったところ、その空胞用構造物は細胞内に局在していることが確認された。さらに、その空胞様構造物が細胞内小器官であるか確認するために、小胞体(ER)を染色したところ変化は認められなかった。しかし、細胞骨格である Actin 染色にて空胞様構造物を避けるような像が認められた。液体シンチレーションカウンターによって nicotine 作用時間依存的に ³H-nicotine 量の増加が認められた(p<0.05)。

【結論】Nicotine 1 μ g/ml を作用することによって、HGF の細胞内に空胞用の形態的变化が引き起こされた。その形態変化は空胞様を呈し、細胞内に局在すること、また ³H-nicotine を作用させることで優位に増加したことから nicotine の細胞内への取り込みが証明された。我々は、2014 年春季日本歯科保存学会にて、Nicotine 1 μ g/ml を作用し細胞内に空胞用構造物が認められた後に nicotine 刺激を除去することにより増殖能、細胞遊走能が回復することを報告していることから、今後はこの可逆性の反応の経路について検索を行っていく予定である。

高グルコース下によるヒト歯根膜由来血管内皮細胞の *in vitro* 解析

¹ 日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座

² 日本歯科大学新潟病院総合診療科

³ 日本歯科大学先端研究センター再生医療学

○丸山昂介¹⁾、清水 豊²⁾、佐藤 聡^{1), 3)}

Analysis of effect of high glucose on human periodontal ligament endothelial cells *in vitro*

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

² Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital

³ Division of Cell Regeneration and Transplantation, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata

○Kosuke Maruyama¹⁾, Yutaka Shimizu²⁾, Soh Sato^{1), 3)}

【目的】血管は、生命の維持に関わる重要な器官の一つであり、全身の各臓器や組織に血液を供給している。血管を構成している血管内皮細胞は、血管の弛緩、血液透過性、血管の新生などの機能を有し、血管の恒常性を維持する重要な役割を担っている。口腔内の2大疾患の一つである歯周病は、細菌によって形成されるバイオフィルムを原因とした慢性疾患である。近年では、歯周病原細菌が歯周組織の血管を介して全身に広がり、心疾患や糖尿病といった全身疾患に影響を与えていることが報告されている。その中でも糖尿病は、歯周病の病態と相互に関係していることが知られおり、歯周病は糖尿病の第6の合併症とも言われている。しかし、糖尿病に罹患した場合の歯周組織における微小血管の病態生理に関する報告はない。そこで本研究では、歯周組織と糖尿病の関連性をさらに解明するために、ヒト歯根膜由来血管内皮細胞を高グルコース条件で培養した際の性状変化について *in vitro* にて検討を行った。

【材料および方法】ヒト歯根膜由来血管内皮細胞は、抜歯の際に除去された歯周組織より歯根膜細胞を獲得し、継代培養後、抗CD31抗体コーティング・マグネットビーズにて分離した。獲得した血管内皮細胞は、高血糖群 (11mM/dl, 22mM/dl) とコントロール群 (5.5mM/dl) に分け、それぞれ培養を行った。培養した細胞は、細胞増殖能、フローサイトメトリーによってアポトーシス陽性細胞の割合を測定した。測定は、培養2, 6日に行った。また、マトリゲル基底膜マトリックスを基質とした培養により、管腔形成の経時的変化を観察した。また、血管内皮細胞の炎症性マーカーである intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) の発現を、Real-time PCR およびELISA法により測定した。測定は、培養2, 6日に行った。コントロールには、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた。(日本歯科大学新潟生命歯学部倫理審査委員会：許可番号：ECNG-H-163)

【結果および考察】ヒト歯根膜由来血管内皮細胞は、高血糖群では、コントロール群と比較して、細胞増殖速度が遅く、アポトーシス陽性細胞の割合が有意に増加した。管腔形成の経時的変化の観察では、高血糖群にて、管腔の形成速度が遅延する傾向を認めた。また、ICAM-1とVCAM-1の発現の検討では、Real-time PCR, ELISA法ともに高血糖群において有意に発現の増加を認めた。この結果より、高グルコース条件下でのヒト歯根膜由来血管内皮細胞は、炎症状態を呈し、恒常性を維持することが困難であることが示唆された。

【結論】本研究より、糖尿病による高血糖状態は、歯周組織の微小血管障害を惹起し、歯周病の病態を悪化させると考えられる。

羊膜上培養ヒト歯根膜由来細胞シートの *in vivo* 骨再生の検討

¹京都府立医科大学大学院 医学研究科 歯科口腔科学,
²医仁会武田総合病院, ³京丹後市立久美浜病院, ⁴宇治徳洲会病院
○雨宮 傑¹, 本城賢一¹, 遠藤悠美^{1,2}, 市岡宏顕¹, 足立圭司^{1,3},
西垣 勝¹, 山本俊郎¹, 中村 亨^{1,4}, 金村成智¹

In Vivo Study of the Osteogenic Potential of Human Periodontal Ligament Cell Sheet Cultured on Amniotic Membrane

¹Department of Dental Medicine, Graduate School of Medical Science, Kyoto Prefectural University of Medicine

²Ijinkai Takeda General Hospital, ³Kumihama Hospital, ⁴Uji-Tokushukai Hospital

○AMEMIYA Takeshi¹, HONJO Ken-Ichi¹, ENDO Yumi^{1,2}, ICHIOKA Hiroaki¹, ADACHI Keiji^{1,3}, NISHIGAKI Masaru¹,
YAMAMOTO Toshiro¹, NAKAMURA Toru^{1,4}, KANAMURA Narisato¹.

【研究目的】

近年、歯周組織の再生にヒト歯根膜由来細胞 (PDL 細胞) を適当な基質を用いて *in vitro* にて培養・増殖させ、移植することで歯周組織の再生を試みる研究が散見される。羊膜は抗炎症・感染抑制作用等を有し、様々な細胞の培養基質として適していることがわかっており、これまでにわれわれは、羊膜を基質とした培養 PDL 細胞シートの作製に成功し (Adachi *et al*, Oral Dis, in press), また移植後においても歯根膜としての性質を保持していることを報告した (2012 年度春季学術大会 (136 回))。これらの研究成果をふまえ、骨再生能を有した新規培養 PDL 細胞シートの開発を最終目標に、羊膜上に PDL 細胞の骨分化誘導培養を行ったところ、同培養シートは骨芽細胞関連のタンパク発現を認め、新生骨形成能、すなわち歯周組織再生を促進する細胞を有していることがわかった (雨宮ら, 日歯医学会誌, 2013)。そして今回われわれは、上記にて得られた培養シートの *in vivo* における細胞動態について検討を加え、若干の知見が得られたので報告する。

【材料および方法】

羊膜は、帝王切開時の胎盤より採取し研究に供した。また PDL 細胞は、抜去した智歯より歯根膜組織を採取し初代培養後、3~4 代継代したものを研究に使用した。継代培養した PDL 細胞は、羊膜上に播種し、約 3 週間、骨分化誘導培地上で培養を行った。上記にて得られた培養シートを、BALB/c ヌードマウス腎被膜下への移植を行い、4 週間後に摘出し、H-E 染色、アリザリンレッド染色、ならびに免疫染色を行った。なお本研究は、本学医学倫理審査委員会 (C-1111) ならびに本学動物実験委員会 (M25-268) の許可を得た。

【結果】

骨分化誘導培養を行った羊膜上培養 PDL 細胞は、移植後 (4 週) において紡錘形の PDL 細胞が層状に増殖していた。免疫染色像では、間葉系細胞マーカーである vimentin、骨芽細胞マーカーである bone Gla-protein (osteocalcin) の発現を認めたが、石灰化物質の形成は認めなかった。

【考察および結論】

PDL 細胞は、骨形成を行う骨芽細胞に分化する能力を有しているとされる。これまでにわれわれは、*in vitro* の環境下で作製した羊膜上培養 PDL 細胞シートには、骨芽細胞関連タンパクが存在していることを明らかにしてきた。そして今回、*in vivo* の環境下における培養シートの硬組織へ分化・形成についての検討を行うべく、実験動物への移植実験を行った。移植実験に際しては、細胞動態の観察に安定した再現性を得るために、培養細胞を一箇所に留めることが可能である腎被膜下への細胞シート移植を実施した。結果として、移植後において PDL 細胞は増殖し、vimentin, bone Gla-protein (osteocalcin) の発現を認め、*in vivo* の環境下においてもその性質を保持していることが示され、羊膜上培養 PDL 細胞シートは骨再生能を有した細胞シートである可能性が示された。しかしながら本検討においては、石灰化物質の存在は認められず、今後、移植長期における骨無機質の新生や血管新生等の検討を行っていく必要があると考えている。

本研究は、[JSPS 科研費 25861966](#) の助成を受けて行った。

Shikonin がヒト歯根膜由来細胞の IL-6 および IL-8 産生に与える影響

¹⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 歯科保存学分野
²⁾徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔保健支援学分野
○ 進藤智¹⁾、細川義隆¹⁾、細川育子¹⁾、尾崎和美²⁾、松尾敬志¹⁾

The effect of shikonin on IL-6 and IL-8 production from human periodontal ligament cells

¹⁾Department of Conservative Dentistry, The University of Tokushima Graduate School,
²⁾Department of Oral Health Care Promotion, The University of Tokushima Graduate School
○ Satoru Shindo¹⁾, Yoshitaka Hosokawa¹⁾, Ikuko Hosokawa¹⁾, Kazumi Ozaki²⁾, Takashi Matsuo¹⁾

【研究目的】

歯周炎は歯周病関連細菌により惹起される慢性炎症性疾患であり、細菌に対する免疫応答が歯周組織破壊に関与している事が報告されている。

炎症性サイトカインであるIL-6は破骨細胞を活性化する事で歯槽骨吸収に関与している事が明らかとなっている。また、IL-8はCXCケモカインの一種であり、好中球をはじめとする白血球を炎症局所に浸潤・集積させる事により歯周組織破壊に関与している事が示唆されている。

shikoninは漢方薬生薬である紫根に含まれている成分であり、抗菌作用、抗癌作用、抗炎症作用などの生理活性作用があることが報告されているが、歯周組織構成細胞の炎症性サイトカイン産生に与える影響に関しては報告が少なく不明な点が多い。本研究では、IL-1 β あるいはTNF- α が誘導するヒト歯根膜由来細胞 (HPDLC) のIL-6およびIL-8産生に与えるshikoninの影響に関して検討を行い、さらに炎症性サイトカイン産生に関与しているといわれている、NF- κ Bに着目して実験を行った。

【材料および方法】

HPDLCはLonza社より購入し、10%FBSを含むDMEM培地にて培養し実験に用いた。shikoninにてHPDLCを1時間処理後、IL-1 β あるいはTNF- α 刺激を行い、IL-6およびIL-8産生をELISA法にて、NF- κ Bの活性化をwestern blot法にて解析を行った。また、IL-1 β あるいはTNF- α が誘導するIL-6およびIL-8産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにシグナル伝達阻害物質にて前処理後、IL-1 β あるいはTNF- α 刺激を行いIL-6およびIL-8産生に関してELISA法を用い検討した。

【成績】

shikonin処理はIL-1 β あるいはTNF- α が誘導したIL-6およびIL-8産生を有意に抑制した。また、shikonin処理はIL-1 β あるいはTNF- α が誘導したI κ B- α のリン酸化および分解を抑制した。さらに、NF- κ B inhibitorは有意にIL-1 β あるいはTNF- α が誘導したIL-6およびIL-8産生を抑制した。

【考察および結論】

今回の結果より、IL-1 β あるいはTNF- α 刺激によるIL-6およびIL-8産生がHPDLCに誘導されることで、歯周炎病変局所において破骨細胞活性化による歯槽骨吸収ならびに好中球をはじめとする白血球の過剰な浸潤・集積を引き起こす可能性が示された。また、shikoninはNF- κ Bを介するシグナル伝達経路を阻害することにより、IL-1 β あるいはTNF- α 刺激HPDLCのIL-6およびIL-8産生を抑制する事が明らかとなった。この結果より、紫根に含まれるshikoninは破骨細胞活性化、好中球をはじめとする炎症性細胞の歯周炎病変局所への浸潤、集積を減少させることで、歯周炎における炎症性骨吸収を抑制できる可能性が示唆された。

高齢双生児者における歯周病細菌抗体価と遺伝要因の解析

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)¹

顎口腔機能再建学講座 (歯科補綴第二教室)²

○東山弥生¹、山下元三¹、三木康史¹、池上久仁子¹、津島賢一郎¹、川口佳保理¹、久保田実木子¹、小河大¹、西原千尋¹、藤原健太¹、池永有里¹、森永泰樹¹、北垣次郎太¹、柳田学¹、野崎剛徳¹、久留島悠子²、榎木香織²、松田謙一²、池邊一典²、北村正博¹、前田芳信²、村上伸也¹、大阪大学ツインリサーチグループ

Analysis of IgG antibody traits for periodontal bacteria in plasma among elderly twins

1) Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry 2) Department of Prosthodontics, Osaka

University Graduate School of Dentistry 3) Center for Twin Research, Osaka University Graduate School of Medicine

○Yayoi Higashiyama, Motozo Yamashita, Koji Miki, Kuniko Ikegami, Kenichiro Tsushima, Kahori Kawaguchi, Mikiko Kubota, Dai Ogawa, Chihiro Nishihara, Kenta Fujiwara, Yuri Ikenaga, Taiki Morinaga, Jirouta Kitagaki, Manabu Yanagita, Takenori Nozaki, Yuko Kurushima, Kaori Enoki, Kenichi Matsuda, Kazunori Ikebe, Masahiro Kitamura, Yoshinobu Maeda and Shinya Murakami, Osaka University Twin Research Group

[研究目的] 歯周炎は、歯周病原性細菌が歯周組織局所に感染することで発症する。しかしながらその病態は、加齢の過程で暴露される様々な環境因子の修飾を受け形成されることが知られている。これまでに我々は、高齢の一卵性双生児者 (MZ) ならびに二卵性双生児者 (DZ) における表現系の類似度を比較・解析し、歯列形態についてはMZにおいて差異が少なく遺伝的要因が大きい一方、歯周病の重篤度は遺伝的要因よりも環境要因の影響が大きいことを報告してきた (平成25年度保存学会春季学術大会)。しかしながら前回の報告の被験者には70歳以上の残存歯の少ない双生児者が多く含まれ、加齢の過程での環境因子の影響が過大に評価された可能性がある。そこで本研究では、これまでの高齢双生児者に環境因子の暴露の比較的少ない若年層の双生児者を調査対象に加え、歯周病の重篤度、口腔内の形態的特徴および歯周病原性細菌の感染状況に関する遺伝因子ならびに環境因子による影響を統計学的に検討することを目的とした。

[材料と方法] 大阪大学大学院医学研究科附属ツインリサーチセンターにおいて検診を受けた双生児のうち、卵生診断された148組を被験者とした。そして、各被験者に対し、以下の①～⑥の検査を実施し、各双生児ペア間における級内相関係数の検定を行った。①全残存歯数 ②プロービング深さ (PPD) ③BOP部位率 (%) ④平均歯槽骨吸収率: パノラマレントゲン写真をもとに、Scheiのルーラーを用い歯槽骨の吸収率をスコア化(1, 2, 3, 4)。⑤歯列弓幅径長さ ⑥歯周病原性細菌の抗体価検査: 凍結保存末梢血血清を用い *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *E. corrodens* に対する抗体価を測定、標準値を算出。

[結果] 双生児集団の特徴は、平均年齢 58.1 歳 (21-88 歳)、(MZ: 130 組, DZ: 18 組、男: 95 人、女: 201 人、喫煙経験: 無: 198 人 有: 52 人 喫煙者: 34 人 無回答: 12 人) 平均現在歯数 22.7 本、平均歯槽骨吸収率スコア 1.67、平均 PPD 2.67mm であった。歯列弓幅径長さに関する級内相関係数は、上顎 (MZ: 0.28, DZ: 0.14)、下顎 (MZ: 0.24, DZ: 0.12) で、遺伝的要因による影響が大きいことが明らかとなった。現在歯数、平均歯槽骨吸収率、平均 PPD に関する級内相関係数はそれぞれ (MZ: 0.72, DZ: 0.76)、(MZ: 0.71, DZ: 0.70)、(MZ: 0.44, DZ: 0.47) となり、これらの項目に関しては環境要因による影響がやや大きい傾向がみられた。血清中細菌抗体価については、*P. g* については有為な検出値を得たが、級内相関係数は、(MZ: 0.015, DZ: 0.078)、*A. a.*, *P. i.*, *E. c.* は、ほぼ検出限界付近の低値であった。

[考察並びに結論] 口腔の形態的要素である顎骨歯列弓の大きさは、高齢者においても遺伝的要因による影響が大きいことが示唆された。その一方で、歯周病の進行については、加齢の過程で暴露される環境要因のみならず遺伝要因による影響もあることが推察された。前回の報告と異なる結果が得られた理由として母集団の平均年齢69.8歳 (37-87歳) から平均年齢58.1歳 (21-88歳) への大幅な低下が考えられる。*P. g* 抗体価については、全ての血清試料から有為な値を得たが、ペア間における分散が大きく、結果として級内相関係数が低値となった。今後、遺伝的素因が同一の一卵性双生児集団における歯周病パラメータと各種細菌抗体価との連鎖解析を行い、相対危険度を算出する予定である。

[謝辞] 本研究は大阪大学ツインリサーチグループによる総合的研究の一環として実施されたものであり、その御支援に感謝を申し上げます。

PS リポソームと生体活性ガラスを応用した骨欠損修復法の開発

福岡歯科大学 口腔治療学講座 歯科保存学分野

○松本典祥, 畠山純子, 赤尾瑛一, 泉健太郎, 西崎竜司,
中山英明, 水上正彦, 泉 利雄, 阿南 壽

The bone defect repair by PS liposomes and bioactive glass

Department of Operative Dentistry and Endodontics, Fukuoka Dental College

○Noriyoshi Matsumoto, Junko Hatakeyama, Eiichi Akao, Kentaro Izumi, Ryuji Nishizaki,
Hideaki Nakayama, Masahiko Minakami, Toshio Izumi, Hisashi Anan

【緒言】

細胞膜リン脂質の phosphatidylserine (PS) を含むリポソーム (PS リポソーム) は破骨細胞前駆細胞から成熟破骨細胞への成熟を抑制し, 慢性関節リウマチの動物モデルにおける骨破壊を抑制することが知られている (Wu et al, 2010 J Immun, Price 2010 Nature Rev Rheumat). また, 生体活性ガラス (bioactive glass 以下 BAG) は, 骨伝導能があり, 骨芽細胞の活性を高めることや破骨細胞増加の抑制により骨補填材としての期待が寄せられていることが知られている (Salako et al, 2003 Dent Traumatology). われわれはこれまで, ラット頭頂骨モデルを用いて BAG の良好な生体親和性について本学会にて報告してきた. 今回ラット頭蓋冠骨欠損モデルを用いて, PS リポソームと生体親和性に富む BAG が骨窩洞内の骨形成に及ぼす影響について μ CT を用いて検索した.

【材料および方法】

1. BAG の作成 : SiO_2 ; 53 wt%, CaO ; 20 wt%, Na_2O ; 23 wt%, P_2O_5 ; 4 wt% の組成のガラスを熔融法によって合成した後, 粉碎してふるいを通し, 粒径 $100 \mu\text{m}$ 以上の粉末を得た後, 乾熱滅菌 (200°C , 20 分) を行った.
2. PS リポソームの調整 : PS リポソームは Wu らの方法に基づいて行った (Wu et al, 2010 J Immun, Price 2010 Nature Rev Rheumat). すなわち, phosphatidylcholine (PC) と PS の乾燥リン脂質フィルムを molar ratio 7:3 の割合で PBS に溶解し, 氷上で 10 分間超音波振動を与えて溶解した. $0.22 \mu\text{m}$ のフィルター滅菌を行い, 調整から 3 日以内に実験に供した.
3. 動物実験 : 10 週齢雄性 Wistar ラット 37 匹を用いた. イソフルラン (フォーレン吸入麻酔液, アボットジャパン) による吸入麻酔後, ラット頭頂部を剃毛し切開線を入れ, 皮膚および骨膜を剥離反転した. 注水下でトレフィンバー (GC 社製, 直径 5 mm) により, 円形の骨欠損を作製した. 欠損部に ①BAG を 6 mg + PBS $10 \mu\text{l}$ 埋入 ②BAG 6 mg + リポソーム $10 \mu\text{l}$ 添加 ③コントロール群として何も埋入しない の 3 種類を施した. その後, 骨膜と皮膚をそれぞれ縫合した. 処置の 2, 4, 8 週間後に屠殺し, 4% paraformaldehyde 水溶液で灌流固定を行い, 頭部を取り出した後, μ CT (SKYSCAN, Bruker Corporation 社製) にて解析を行った.

【結果】

1. BAG および BAG + PS リポソーム添加による体重の変化は認められなかった.
2. 処置後 2 週齢における骨欠損部に, BAG 周囲に硬組織の形成像はほとんど認められなかった. 処置後 4 週齢では, BAG を核にして, 新規の硬組織様石灰化物が少数, 散在性に認められた. 8 週齢では, 骨欠損部に BAG を中心にして不透過性の充進した像が多数認められた. コントロール群では, 実験期間を通して骨欠損部には硬組織の形成は認められなかった.

【結論】

BAG と PS リポソームの併用により, 骨形成が促進される可能性が示唆された.

(学会外研究分担者)

高山扶美子, 武洲, 中西博 (九州大学 歯学研究院 口腔機能分子科学)

抗がん剤誘発性疼痛における PAF 阻害薬の鎮痛効果

¹⁾広島大学大学院医歯薬保健学健康増進歯学, ²⁾広島文化学園大学大学院看護学研究科薬理学, ³⁾広島大学大学院医歯薬保健学健康増進歯学, ⁴⁾日本薬科大学薬物治療学

○ 本山 直世¹⁾, 森田 克也²⁾, 栗原 英見³⁾, 土肥 敏博⁴⁾

Usefulness of TCV-309, a selective Platelet-Activating Factor (PAF) antagonist, on chemotherapeutic agents-induced painful neuropathy

¹⁾Dept. Dent. Sci. Health Promot., Hiroshima Univ. Inst. Biomed. & Health Sci., ²⁾Dept. Pharmacol., Hiroshima Bunka Gakuen Univ., ³⁾Dept. Periodontal Medicine., Hiroshima Univ. Inst. Biomed. & Health Sci., ⁴⁾Dept. Clinical Pharmacol., Nihon Pharmaceutical Univ.

○ Naoyo Motoyama¹⁾, Katsuya Morita²⁾, Hidemi Kurihara³⁾, Toshihiro Dohi⁴⁾

【緒言】

がん化学療法における各種抗がん剤治療の副作用は多岐にわたるが、その一つに手足のしびれや疼痛といった感覚異常など末梢神経障害があらわれる。これは、化学療法をうける 7 割の患者が訴える症状であり、痛みを放置することで症状が増悪し、患者の QOL の低下や抗がん剤治療のスケジュールに悪影響を及ぼす場合がある。この痛みは従来の鎮痛薬が奏功せず、新しい治療法開発が待たれている。私達は、極微量の血小板活性化因子(PAF)を脊髄腔内投与することにより、非常に強い痛み反応を引き起こすことを見出し、脊髄における痛みの強力なメディエーターである可能性を示し¹⁾、PAF は、PAF 受容体-MAP kinase 系を刺激して、グルタミン酸の遊離を引き起こし、下流の NO/G-cyclase/PKG カスケードにより、抑制性グリシン受容体(GlyR) $\alpha 3$ 機能を抑制して、痛覚過敏とアロディニアを引き起こすこと、さらにこの過程に活性化ミクログリアが関与することを明らかにし、PAF が脊髄で痛みシグナル伝達の調節に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた²⁾。加えて、PAF 阻害薬ががん性疼痛を含む各種疼痛モデルにおいて長期間持続する鎮痛効果を示す^{3,4)}ことから、PAF 受容体が既存の鎮痛薬とは全く異なった作用機序を持つ新規鎮痛薬開発のターゲット分子となる可能性を示唆してきた。本研究では、PAF 阻害薬のがん化学療法時における様々な抗がん剤により誘発される痛みにおける有効性について検討した。

【方法】

実験には ddY 系雄性マウスを用い、現在臨床で使用されている各種抗がん剤を静脈内投与し痛みを誘発した。PAF 阻害薬として、PAF analog の TCV-309, benzodiazepine 誘導体の WEB 2086 を使用した。脊髄 PAF 受容体ノックダウンマウスは、PAF 受容体遺伝子の特異的配列から siRNA を作成し、脊髄腔内投与(i.t.投与)することにより作成した。疼痛関連行動は、アロディニアスコア；ペイントブラシで軽く撫でる触覚刺激に対する逃避行動の程度をスコア化したもの、アロディニア閾値；von Frey hairs フィラメントによる足趾刺激に対するマウス後足の逃避行動閾値により評価した。評価は薬物投与の前、及び投与後の特定の時点で実施した。研究は観察者に処置群を判別できない環境下で行った。

【結果ならびに考察】

各種抗がん剤を投与することで、長期間にわたる疼痛を誘発した。抗がん剤投与 3 日後に PAF 阻害薬 TCV-309 を静脈内投与すると、この疼痛は強力に抑制された。また、抗がん剤投与 30 日後に PAF 阻害薬を投与しても鎮痛効果を認め、連続投与すると鎮痛効果も長期にわたり持続した。さらに化学構造の異なる PAF 阻害薬、WEB2086 を静脈内投与した場合にも、TCV-309 と同様の疼痛緩和作用を認めた。PAF 受容体ノックダウンによっても、抗がん剤誘発性疼痛は強力に抑制された。抗がん剤投与前より PAF 阻害薬を投与すると抗がん剤による疼痛誘発の遅延がみられ、連続頻回投与することで痛みが誘発されないなど、先行除痛治療への有効性が示された。以上より、PAF 阻害薬は抗がん剤誘発性疼痛において長期間持続する強力な鎮痛効果を示すことを明らかにし、がん化学療法に付随する副作用軽減に PAF 阻害薬が有効なツールとなる可能性を示唆した。

【引用文献】

- 1) Morita K. et al., Pain
- 2) Morita K. et al., Pain
- 3) Motoyama N. et al., Eur J Pain 17:1156-67, 2013.
- 4) Morita K. et al., PLoS ONE 9(3):e91746, 2014.

細菌・ウイルスに対する次亜塩素酸ナトリウム希釈水の除菌効果

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 歯周病学分野
○関内孝侑、須田智也、和泉雄一

The decontamination effect of sodium hypochlorite dilution water against bacterium and viruses
Department of Peirodontology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and
Dental University (TMDU)
○Takayuki Sekiuti, Tomonari Suda, Yuichi Izumi

【目的】 歯科ユニットの給水管路内にバイオフィームが形成されることによって、ユニットから注水される水からはさまざまな細菌が検出されることがわかっており、病原微生物に汚染され、伝搬されるリスクが懸念される。したがって、歯科ユニットから供給される水を一定の品質に維持していくことは院内感染の観点からも重要である。これまでに機械的洗浄や次亜塩素酸ナトリウム、グルコン酸クロルヘキシジン、過酸化水素、フィルターを使用して歯科ユニットの水質を向上させる試みがなされているが、その方法はいまだ統一されていない。その中でも次亜塩素酸ナトリウムは、水道水や食物などにも応用され安全性が確立された消毒剤である。

本研究では、次亜塩素酸ナトリウム水溶液と水道水を混合して生成した次亜塩素酸ナトリウム希釈水（以下、希釈水）の微生物に対する除菌効果について検討した。

【材料と方法】 希釈水生成装置（モリタ東京製作所、FWG01）を用いて遊離塩素濃度 1, 2 及び 3mg/L の希釈水をそれぞれ生成し、各種細菌、ウイルスの増殖抑制効果について調べた。細菌種としては、*B. subtilis* NBRC3134（枯草菌（芽胞））、*E. coli* ATCC43895（大腸菌、血清型 O157:H7）、*L. pneumophila* GIFU9134（レジオネラ）、*M. mesophilicum* NBRC15688（メチロバクテリウム）、*P. gingivalis* JCM8525（歯周病原細菌）、*P. aeruginosa* NBRC13275（緑膿菌）、*S. enterica subsp. enterica* NBRC3313（サルモネラ）、*S. aureus subsp. aureus* NBRC12732（黄色ブドウ球菌）、*S. aureus* IID1677（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌；MRSA）、*S. mutans* IF013955（う蝕原因菌）、*V. parahaemolyticus* RIMD2210100（腸炎ビブリオ）、*C. albicans* NBRC1594（カンジダ）について、ウイルスとしては、インフルエンザウイルス、オーエスキュー病ウイルス、イヌアデノウイルス 2 型について調査を行った。各種細菌については、それぞれの培養条件に従い菌数が 10^7 - 10^9 /ml となるように各試験菌液を調整し、各濃度の希釈水 10ml に対して試験菌液を 0.1ml 接種し、室温で保存後に SCDLP 培地にて試験液中の生菌数について測定した。ウイルスに対する効果については各濃度の次亜塩素酸ナトリウム希釈水 300 μ l とウイルス 100 μ l を混和し、25°C の高温槽で 10 分間反応させた後、次亜塩素酸ナトリウム活性を失活させた反応液を作成し、その反応液を培養細胞に接種させ、細胞変性効果からウイルスの有無を判定するウイルス感染価測定法 (TCID₅₀) で評価した。

【結果と考察】 各濃度の希釈水と 1 分間接触させることでほとんどの細菌は検出限界以下まで細菌数が低下した。*B. subtilis*、*S. mutans*、*C. albicans* に関しては 30 分の接触でも検出限界以下までの低下は認められなかったが、3mg/ml の濃度において *B. subtilis* については 6 時間、*S. mutans*、*C. albicans* については 30 分間の接触で検出限界以下までの低下することが確認された。一方、ウイルスに関しては各濃度の希釈水で検出限界以下にまで低下していることがわかった。

【結論】 本研究の結果より希釈水は感染症や食中毒を引き起こす細菌、ウイルスの除菌に有効であり、歯科ユニットの給水管路内の衛生管理への効果が期待できることが示唆された。

超音波スケーラーを用いたスケーリングが高血圧症罹患高齢者の 自律神経活動に及ぼす影響

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

○小田中瞳、下地伸司、竹生寛恵、大寫理紗、菅谷 勉、川浪雅光

Influence of ultrasonic scaling on autonomic nervous activity in hypertensive elderly patients

Department of periodontology and endodontology, Division of oral health science,

Hokkaido university graduate of dental medicine

○Hitomi Odanaka, Shinji Shimoji, Hiroe Takefu, Risa Oshima, Tsutomu Sugaya and Masamitsu Kawanami

【目的】我が国は先進諸国に先駆け超高齢社会を迎えており、高齢者に対する歯科治療の必要性は年々増加している。高齢者の多くは全身的基礎疾患を有しており、それらに対する歯科治療は中枢神経系および循環器系の全身的偶発症を引き起こす危険性があるため、消極的になることがある。それらの患者に対して安心・安全な歯科治療を行うためには、歯科治療が全身状態に及ぼす影響を解明することが重要である。そこで我々は、歯科治療が全身状態に及ぼす影響を解析するための自律神経活動モニターシステムを開発してきた（日本歯科保存学会学術大会 2011 秋季、2014 春季）。本システムで使用している心拍変動解析を用いた自律神経活動の評価方法は歯科治療時の全身状態の変化を非侵襲的かつリアルタイムに捉えることができる。種々の歯科治療を行った際にどのような数値を示すかについてはこれまでにほとんど明らかにされていない。本研究の目的は、高血圧症罹患高齢者に対して超音波スケーラーを用いてスケーリングを行った際にどのような自律神経活動の変化を示すのかについて検討することである。

【対象と方法】被験者は北海道大学歯科診療センターに通院中の患者 20 名とした。本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会承認され（承認番号自 012-0212）、被験者には本研究の目的およびその内容を十分に説明し、同意の下で行った。デンタルユニット着席後、問診および血圧測定を行い、①高血圧高齢者群（すでに高血圧の診断を受けている、または本測定で収縮期血圧 140mmHg 以上または拡張期血圧 90mmHg 以上を示した 60 歳以上の患者）、②非高血圧高齢者群（それ以外の 60 歳以上の患者）の二群に分けた。次に超音波スケーラー（エナック、オサダ、出力 3）を用いてスケーリングを全顎に行った際の収縮期血圧、心拍数および交感神経活動の指標として LF/HF の測定を行い、それらの変動特性について検討を行った。血圧は 5 分ごとに測定を行い、心拍数および LF/HF は処置時間を前半、中盤、後半に分け、それぞれの平均値を算出した。また LF/HF についてはスケーリング開始時からうがいまでを 1 回目、それ以降のうがいまでを 2 回目とし、それぞれについて平均値を算出した。

【結果】処置中の血圧の経時的変化：収縮期血圧の平均値（mmHg）は高血圧高齢者群および非高血圧高齢者群のそれぞれについて測定開始時で 136±16、120±15、5 分後で 144±17、121±18、10 分後で 137±12、125±17、15 分後で 130±22、148±19 だった。処置中の心拍数の経時的変化：心拍数の平均値（bpm）は高血圧高齢者群および非高血圧高齢者群のそれぞれについて治療開始時で 75±10、64±14、治療前半で 77±9、63±13、中盤で 77±8、63±13、後半で 76±7、63±14 だった。処置中の交感神経活動（LF/HF）の経時的変化：LF/HF の平均値は高血圧高齢者群および非高血圧高齢者群のそれぞれについて 1 回目前半で 4.04±4.67、4.28±2.91、中盤で 4.07±4.28、3.18±1.76、後半で 2.66±1.38、2.23±1.50 だった。2 回目前半で 6.49±4.43、4.10±3.53、中盤で 8.09±5.58、1.89±1.49、後半で 3.58±2.48、2.14±2.13 だった。

【考察】血圧および心拍数は測定期間を通して大きな変化は認められなかった。交感神経活動の指標となる LF/HF は非高血圧高齢者では処置時間が長くなるにつれて下降する傾向がみられたのに対して、高血圧高齢者では上昇する傾向がみられた。高血圧高齢者の中でも特に、歯科に対して恐怖心がある者や嘔吐反射を有する者で著明な上昇がみられたため、今後はこれらのような特記事項を有する患者に焦点を当てて検討を行う必要がある。

【結論】高血圧症罹患高齢者に超音波スケーラーを用いたスケーリングを行った場合、高血圧非罹患高齢者と比べて処置時間が長くなるにつれて交感神経活動が上昇した。

唾液検査と質問紙調査を組み合わせた歯周病予防プログラムの有効性評価

¹(公財)ライオン歯科衛生研究所,

²愛知学院大学歯学部保存修復学講座,

○湯之上志保¹⁾, 森田十誉子¹⁾, 山崎洋治¹⁾, 石井孝典¹⁾, 富士谷盛興²⁾, 千田 彰²⁾

The effectiveness assessment of the periodontal disease prevention program consist of saliva tests and questionnaire surveys

¹The LION Foundation for Dental Health

²Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Aichi Gakuin University

○YUNOUE Shiho¹⁾, MORITA Toyoko¹⁾, YAMAZAKI Yoji¹⁾, ISHII Takanori¹⁾, FUJITANI Morioki²⁾, SENDA Akira²⁾

【研究目的】

成人を対象とした歯周病健診は、法的に実施が義務付けられておらず実施率は低いのが現状である。したがって、歯周病を簡易にスクリーニングし保健指導の実効性をもつ内容の健診法を考え、その実施率を高めることが必要であろうと考える。演者らは、洗口吐出液のヘモグロビン測定と自覚症状に関する質問紙調査の組み合わせが歯周病スクリーニング法として有効であること(日歯保誌, 2012)、また、洗口吐出液の濁度は総細菌数と高い相関性があり、口腔清潔度検査指標として有用であること(口腔衛生会誌, 2009)を報告した。今回、これらの実績を基に、唾液検査(ヘモグロビン、濁度測定)と質問紙調査を行い、その結果をレーダーチャートに示し、口腔環境の状態および保健行動の必要性をその場でフィードバックすることができる簡易な歯周病予防プログラムの実施を試みた。このプログラムが、受診者の口腔保健行動の変容に繋がるか否かを明らかにすることが本研究の目的である。

【対象および方法】

本研究の調査対象者は、四日市歯科医師会主催の母子歯科保健事業に参加した子どもの保護者のうち、本試験への参加に同意が得られた成人110名(男性3名, 女性107名, 平均年齢36.6歳, 24~69歳)である。唾液検査では、洗口吐出液のヘモグロビンおよび濁度を測定し、質問紙調査では、歯周病に関する自覚症状および口腔清掃習慣など12項目を評価した。これらの結果をレーダーチャートにまとめ、その場で歯科衛生士から個々の受診者に説明し、保健指導を行った。その2ヵ月後に、口腔保健行動に関する質問紙調査を郵送で実施した。また、8ヵ月後には、初回と同様に唾液検査および質問紙調査を行い、口腔保健行動および唾液検査値の変化を評価した。なお評価は、2ヵ月後の回答が得られた75名(男性1名, 女性74名, 平均年齢36.5歳)、8ヵ月後の回答と唾液サンプルが得られた61名(男性1名, 女性60名, 平均年齢37.3歳)、および2ヵ月後、8ヵ月後のいずれの試(資)料も得られた43名(女性, 平均年齢36.6歳)で行った。統計解析は、Wilcoxonの符号順位検定で行った。

【結果】

1. 口腔清掃習慣: 全ての調査期間で試(資)料の得られた対象者では、2ヵ月後に歯磨き時間、デンタルフロス使用頻度が高まる傾向にあったが、有意差は認められなかった。個別の調査期間で解析すると、2ヵ月後に歯磨き時間($p<0.1$)、デンタルフロス使用頻度($p<0.05$)において改善傾向が認められたが、8ヵ月後では差異は認められなかった。また、自由記載で歯や歯肉の健康のために新たに実行したこと(例えば、歯磨きを丁寧に行うようになった、デンタルフロスを使うようになった、等)を具体的に記載した者は、2ヵ月後で75名中38名(50.7%)、8ヵ月後で61名中20名(32.8%)であった。
2. 歯科医院への受療行動: 8ヵ月後の回答と唾液サンプルが得られた61名のうち23名(37.7%)が歯科医院を受診した。なお、最近1年間に歯科医院受診の既往のなかった受診者が30名いたが、そのうち5名(16.7%)が歯科医院を受診した。
3. 唾液検査: 濁度($p<0.05$)、ヘモグロビン($p<0.01$)は、初回に比較して8ヵ月後に有意な改善が認められた。
4. 自覚症状: 8ヶ月の間に、自覚症状の改善は認められなかった。

【結論】

本研究により、唾液検査と質問紙調査を組み合わせた歯周病予防プログラムの実施が、受診2ヵ月後に口腔保健行動の変容に繋がるということが明らかとなった。したがって、本プログラムは歯周病予防の動機付けに有用であり、さらに実施が簡易であることから、歯周病健診の実施率向上に寄与することが示唆された。

誤嚥性肺炎予防のための口腔細菌叢の解析

鶴見大学歯学部探索歯学寄附講座¹⁾, 虎の門病院歯科²⁾
○阿保備子^{1,2)}, 宇野 滋²⁾

Analysis of the oral microflora for the prevention from aspiration pneumonia

Department of Translational Research, Tsurumi University School of Dental Medicine¹⁾
Toranomon Hospital, Department of Dentistry²⁾
○Tomoko ABO^{1,2)}, Shigeru UNO²⁾

【緒言】近年、加齢に伴う高齢者の肺炎による死亡率の上昇が問題となっている（厚生労働省、人口動態統計）。高齢者肺炎の増加の背景には、様々な基礎疾患の影響や免疫力の低下が考えられる（Nakayama K. et al., Tuberculin responses and risk of pneumonia in immobile elderly patients. *Thorax*, 55: 867-869, 2000.）。さらに脳血管障害や脳変性疾患、あるいは認知症の患者が自覚のない不顕性誤嚥を起こしやすくなっていることなども要因の一つと考えられる（Yamaya. M. et al., Intervention to prevent pneumonia among older adults, *J. Am. Geriatr. Soc.*, 49: 85-90, 2001., Ohru T. et al. Care for older people, *Intern. Med.*, 42:932-940）。誤嚥性肺炎は、嚥下機能が低下し唾液とともに口腔・咽頭細菌の肺への吸引が起こるために発症する。誤嚥性肺炎予防の第一は、嚥下反射や咳反射の改善であるが、不顕性誤嚥による唾液中の細菌数を可及的に減らすことが重要と考えられる（Okuda, K. et al., Involvement of periodontopathic anaerobes in aspiration pneumonia, *J. periodontal*, 76: 2154-60, 2005）。本研究では、誤嚥性肺炎と診断された高齢者の口腔内バイオフィームについて、基礎疾患等を考慮しながらその細菌叢を解析した。

【対象および方法】本研究は、鶴見大学歯学部および虎の門病院の倫理委員会の承認を受けたのち実施した。研究協力者は、虎の門病院呼吸器内科の担当医より誤嚥性肺炎と診断されて入院している高齢者で、診療上の必要性から口腔ケアを施行する症例で、且つインフォームド・コンセントが得られた5名とした。期間は平成24年12月から平成26年6月までとした。術前に作成したプロトコールに則り、口腔内から採取したサンプルを用いて、う蝕検査（培養法）、歯周病関連菌検査（PCR-インベーター法）、さらに日和見検査（培養法）を行った。

【結果および考察】研究協力者は全て男性で、平均年齢は83.2歳、DMFT指数は26.6であった。全てのサンプルから *Fusobacterium nucleatum* が検出された。3名のサンプルから *Tannerella forsythia* が検出された。2名のサンプルから *Pseudomonas aeruginosa*, または *Candida sp.* が検出された。無菌顎、有菌顎に関わらず、検出された *Fusobacterium nucleatum* は歯周病原菌の一つとして知られているが、プラークや舌苔の形成だけではなくコアグラの形成にも関与していると考えられる。ほとんどの協力者が口腔ケアに関心がないことが原因の一つと考えられる。*Candida sp.* などの日和見感染菌も多く検出されていることから口腔ケアの重要性を理解してもらう必要がある。今後、さらに症例数を増やし、また、本研究で行った検査以外にも口腔内細菌叢の網羅的解析を行う予定である。これにより、口腔ケアが容易になり、さらには誤嚥性肺炎の予防に繋がると考えられる。

【謝辞】本研究は、JSPS 科研費 24792369 の助成を受けたものである。

口腔内プロテアーゼ活性と口腔状態の関連性

花王株式会社 パーソナルヘルスケア研究所
○山本 健吉、平石 牧子、藤中 英剛、矢納 義高

The relationship between oral protease activities and oral conditions.
R&D - Personal Health Care Products Research, Kao Corporation
○Kenkichi Yamamoto, Makiko Hiraishi, Hidetake Fujinaka, Yoshitaka Yanou

【目的】

口腔内には、生体由来、細菌由来の様々なプロテアーゼの存在が確認され、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの細胞外マトリックスの分解による歯周組織破壊に関与するプロテアーゼの存在が報告されている。また、これらプロテアーゼの中には、口腔粘膜の透過性を増加させることも報告されている。一方、*Porphyromonas gingivalis* は歯周病に関わる病原性細菌であり、システインプロテアーゼである Arg-gingipain (Rgp) と Lys-gingipain (Kgp) を産生する。これらのプロテアーゼは、歯肉繊維芽細胞に対して傷害を与え、歯周病の発症や進行に深く関与している。また、歯周組織のみならず血管内皮細胞の傷害による心循環系疾患にも関与することが報告されている。しかしながら、これらのプロテアーゼが歯周組織以外の口腔状態にどのような影響を与えているについて不明な点が多い。そこで本研究では、口腔内から検出される活性として Rgp 様活性と口腔状態の関連性について検討することを目的とした。

【方法】

全身疾患および重篤な口腔疾患を認めない 20 歳代～50 歳代男性 72 名 (平均年齢 43.7±8.5 歳) を対象に、前日からの口腔清掃および起床時から飲食を制限した上で、以下の評価・測定を実施した。口腔状態の評価として、口腔診査 (DMF, OHI, GI, BOP, PPD, WTCI)、口臭評価としてハリメーターを用いた VSC 量の測定を行った。座位 10 分間の安静時吐出唾液をサンプルとして、唾液分泌量、総細菌数 (Panasonic 社製細菌カウンタ)、総タンパク質濃度、Rgp 様活性 (基質: Boc-Phe-Ser-Arg-MCA; ペプチド研究所) を測定した。水含嗽によって回収した洗口吐出液をサンプルとして、粘膜剥離量 (洗口吐出液の沈渣量) の測定を行った。また、口腔の不快症状の評価として、評価当日の不快症状の有無について記入式のアンケート調査を行った。尚、本研究は花王株式会社ヒト試験倫理委員会の承認に基づいて実施した。

【結果】

Rgp 様プロテアーゼ活性は主に年齢、GI、総細菌数および粘膜剥離量と有意な正の相関関係、唾液分泌量との間に有意な負の相関関係が認められた。また、口腔の不快症状のうち、「口の中が乾いている」の該当者において、非該当者に比べて、Rgp 様活性、粘膜剥離量が有意に高く、唾液分泌量が有意に低かった。

【考察】

本検討より、Rgp 様活性は、歯肉の炎症状態のみならず口腔粘膜の剥離とそれに伴う「口の中が乾いている」といった口腔乾燥感に関連する可能性が示唆された。唾液中には様々なプロテアーゼの存在が確認されているが、本検討で測定された Rgp 様活性は、総細菌数と関連したことから考え、細菌由来のプロテアーゼ活性を反映しているものと推察された。一方、Rgp 様活性が唾液分泌量と負の相関関係を示したことから、Rgp 様活性の程度には唾液が持つプロテアーゼ阻害作用などの保護機能の低下が関連した可能性も考えられた。

【結論】

口腔プロテアーゼ活性のうち Rgp 様活性は、口腔粘膜の剥離と口腔の不快感である「口の中が乾いている」に関連する。

口腔の不快症状と唾液成分および口腔状態との関連性

花王株式会社 パーソナルヘルスケア研究所
○平石 牧子、山本 健吉、藤中 英剛、矢納 義高

The relationship between oral discomforts and salivary components or oral condition.

R&D - Personal Health Care Products Research, Kao Corporation
○Makiko Hiraishi, Kenkichi Yamamoto, Hidetake Fujinaka, Yoshitaka Yano

【目的】

ヒトは口腔疾患の有無に関わらず、日常生活において口腔内に様々な不快症状を感じることもあり、口腔内の様々な要因が影響していると考えられる。一方、唾液は、口腔内を健康な状態に保つ作用を有する様々な成分の存在が確認され、中でも抗菌や免疫等の機能を有するタンパク質成分の存在が知られている。しかしながら、口腔の不快症状が唾液成分および口腔状態の変化に起因するか不明な点が多い。そこで、本研究は口腔の不快症状と唾液成分および口腔状態との関連性を検討することを目的とした。

【方法】

全身疾患および重篤な口腔疾患を認めない40歳代、50歳代の男性43名（平均年齢 47.8 ± 4.5 歳）を対象とした。前日からの口腔清掃および当日起床時からの飲食を制限し、座位10分間の安静時吐出唾液の採取後、口腔診査（DMF, GI, BOP, PPD, OHI）および当日の口腔の不快症状に関するアンケート（自記式）調査を実施した。採取した吐出唾液は、唾液量の測定、プロテアーゼ活性の測定、および唾液成分解析に供した。唾液成分解析は、Q-TOF型質量分析装置を用いたプロテオーム解析にて、抗菌、免疫、プロテアーゼ阻害機能が知られているタンパク質11種類の同定および濃度算出を行った。解析は、口腔の不快症状の項目ごとに、該当者と非該当者間での各測定値を比較した（Mann-WhitneyのU検定、有意水準； $p < 0.05$ ）。なお、本研究は、花王株式会社ヒト試験倫理委員会の承認に基づいて実施した。

【結果および考察】

口腔の不快症状のうち、「口の中が乾いている」の該当者（20.9%）において、4種類の唾液タンパク質濃度が非該当者の濃度に比して有意に低かった。また、「口の中が乾いている」の該当者は、プロテアーゼ活性が非該当者より有意に高く、唾液量は低い傾向が見られた。「口の中がネバネバする」の該当者（32.6%）においては、唾液量が有意に低かった。

「口の中が乾いている」の該当者は、歯科指標においては非該当者と差が見られなかったことから、「口の中の乾き」（口腔乾燥感）は口腔疾患に因らない不快症状であると考えられた。また、「口の中が乾いている」の該当者は、プロテアーゼ阻害や抗菌、免疫に関わる唾液タンパク質濃度が有意に低く、プロテアーゼ活性が有意に高かったことから、口腔乾燥感は唾液機能による口中の保護作用の低下が関与する不快症状である可能性が示唆された。

【結論】

口腔乾燥感は、主に唾液タンパク成分およびプロテアーゼ活性が関連する不快症状である。

※会員外共同研究者：中村 俊、羽根岡 舞（花王株式会社 解析科学研究所）