カルプロテクチンはヒト歯肉線維芽細胞の TLR 4 を介して炎症性関連因子 の発現を亢進する

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 歯周歯内治療学分野 ○西川泰史,成石浩司,梶浦由加里,Lew Jung-Hwan,木戸淳一,永田俊彦

Calprotecin Promotes the Expression of Inflammation-related Molecules through TLR4 in Human Gingival Fibroblasts

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School

OYasufumi Nishikawa, Koji Naruishi, Yukari Kajiura, Jung-Hwan Lew, Jun-ichi Kido, Toshihiko Nagata

【目的】

カルプロテクチンは S100A8 と S100A9 分子の複合体として構成され、炎症反応において多様な役割を果たす分子である。また、カルプロテクチンの標的レセプターは、Toll 様レセプター4 (TLR4) と Receptor for AGEs (RAGE) であることが知られている。我々は、ヒト歯肉線維芽細胞において TLR4 mRNA が恒常的に発現する知見を見出した。さらにカルプロテクチンは、MAPK 系や NF-kB 系を介して IL-6 や MCP-1 等の炎症関連因子の発現を亢進することを報告した(第 58 回春季日本歯周病学会学術大会)。そこで本研究では、ヒト歯肉線維芽細胞におけるカルプロテクチンの炎症関連因子の産生機序において、TLR4 が果たす役割を明らかにするために、TLR4 遺伝子発現をノックダウンした細胞を樹立し、カルプロテクチンによる細胞内シグナル伝達系の動態および炎症関連因子の発現に及ぼす影響を調べた。

【材料及び方法】

- 1. 細胞: ヒト歯肉線維芽細胞は, $CRL-2014^{IM}(ATCC)$ を用いた。 ウシ胎児血清 10%含有 DMEM 培地で 2~3 代で継代培養を行い,サブコンフルエントの状態で実験に供した。
- 2. 試薬:リコンビナント S100A8, S100A9 は ATGen 社から購入した。カルプロテクチンは Kwon らの記載 (MolCells, 2103) に従って調製した。TLR4 siRNA は Ambion 社から購入した。
- 3. TLR4 遺伝子ノックダウン細胞の樹立: TLR4 遺伝子のノックダウンは、通法に従い TLR4 siRNA を歯肉線維芽細胞に遺伝子導入して行った(transient)。TLR4 遺伝子の抑制効果は RT-PCR 法を用いて評価した。
- 4. 細胞内シグナル系の動態と炎症関連因子産生の評価:上記の TLR4 遺伝子ノックダウン細胞を S100A8, S100A9 およびカルプロテクチン(各 50 nM)で 30 分間刺激した後,全細胞蛋白を回収し,通法に従って Western blotting 法によって p38MAPK,JNK,ERK および NF- κ B のリン酸化動態を調べた。また,同様の条件で細胞を s100A8,S100A9 およびカルプロテクチンで 24 時間刺激した後,培養上清を回収し,通法に従って ELISA 法により MCP-1 および IL-6 の産生動態を調べた。
- 5. 統計解析:各群における有意差は、統計解析ソフト SPSS (IBM) を用いて ANOVA Turkey HSD 検定によって解析し、P 値が 0.05 未満を有意差有りと判定した。

【結果】

- 1. TLR4 遺伝子ノックダウン細胞(ヒト歯肉線維芽細胞)を樹立した。
- 2. TLR4 siRNA を遺伝子導入した細胞では、陰性対照と比較して、カルプロテクチンによる p38MAPK, JNK, ERK および IkB のリン酸化が抑制された。
- 3. TLR4 siRNA を遺伝子導入した細胞では、陰性対照と比較して、カルプロテクチンによる MCP-1 および IL-6 の産生が有意に抑制された。

【考察及び結論】

カルプロテクチンは、TLR4を介してヒト歯肉線芽細胞の MAPK および NF-κB 経路を活性化し、MCP-1 と IL-6 の産生を亢進することが明らかとなった。このカルプロテクチンによる炎症関連因子の産生機序は、歯周病の悪化機序の一端を反映している可能性がある。

マウス実験的歯周炎モデルにおけるタバコ煙濃縮物およびニコチンの影響

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 〇久保田 実木子、柳田 学、長谷川 詩織、森 健太、 山下 元三、山田 聡、北村 正博、村上 伸也

The effects of cigarette smoke condensate and nicotine on periodontal tissue destruction in a mouse periodontitis model

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan OMIKIKO KUBOTA, MANABU YANAGITA, SHIORI HASEGAWA, KENTA MORI, MOTOZO YAMASHITA, SATORU YAMADA, MASAHIRO KITAMURA and SHINYA MURAKAMI

【目的】

歯周病の危険因子には細菌因子、宿主因子、環境因子があり、なかでも喫煙は主要な環境因子の一つといわれている。喫煙者は非喫煙者と比較して歯周病の罹患率が高く、経時的にも歯槽骨吸収がより進行していくことが知られている。さらに喫煙者に対する歯周基本治療の効果は非喫煙者と比較して低く、喫煙は歯周治療後のアタッチメントの獲得を抑制し、歯周組織再生に対しても負の影響を及ぼすことが報告されている。ニコチンはタバコ煙に高比率で含まれており、タバコ煙含有物質のうちで最も研究されてきた。喫煙が生活習慣病の重要な危険因子となることの報告は多くなされているが、タバコ煙およびニコチンが歯周組織の破壊や治癒にどのように関与するのか未だ十分には明らかになっていない。本研究ではマウス実験的歯周炎モデルを作製し、タバコ煙やニコチンの全身投与が歯周組織や所属リンパ節にどのような影響を及ぼすかに加えて、吸収された歯槽骨の回復に及ぼす影響を検討した。

【材料および方法】

実験動物には生後 5 週齢 C57BL/6 マウスを用いた。同マウスを、マウス体重 20 g 当たりタバコ煙濃縮物 720 μ g を投与する群、ニコチン 16 μ g を投与する群、コントロールとして PBS を投与する群の 3 群に分け、上記物質を腹腔内に投与後、全身麻酔下で上顎左側第二臼歯部歯頸部に絹糸で結紮を行い結紮側とし、上顎右側第二臼歯には処置をせず非結紮側とした。

絹糸結紮後7日目に全ての群のマウスから回収した上顎骨をマイクロCT撮影し、結紮側および非結紮側の第二臼歯周辺の歯槽骨を観察した。また、セメントエナメル境から残存歯槽骨頂の距離をはかり、歯槽骨吸収量を測定した。

マイクロ CT 撮影後に上記歯周組織の切片を作製し、HE 染色および TRAP 染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

上記と同様の実験方法で、絹糸結紮後7日目に全ての群のマウスから顎下リンパ節を摘出し、単核球を回収し、Rankl遺伝子の発現をreal-time PCR解析で検討した。

さらに、上記と同様のマウスを用い、以下の実験を行った。マウスにマウス体重 20~g 当たりニコチン $16~\mu~g$ を投与する群とコントロールとして PBS を投与する群の 2 群に分け、腹腔内投与後、上記と同様の部位に絹糸を結紮し、結紮後 7 日目に絹糸を除去した。絹糸除去後に、再度ニコチンあるいは PBS を投与し、除去後 10~0 日目に歯周組織をマイクロ CT で観察し、歯槽骨の回復量を測定した。実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、有意水準を 5~%に設定し、p~位が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

【結果および考察】

絹糸結紮後7日目において、非結紮側ではいずれの群においても歯槽骨の破壊が観察されなかった。一方、結紮側では全ての群で歯槽骨の吸収が惹起された。PBS 投与群と比較してタバコ煙濃縮物あるいはニコチン投与群では歯槽骨吸収量が有意に増加した。組織学的解析により、結紮側において全ての群で炎症細胞の上皮内への浸潤が認められたが、PBS 投与群とタバコ煙濃縮物あるいはニコチン投与群に有意な差はなかった。骨吸収に関与する破骨細胞を観察すると、PBS 投与群と比較してタバコ煙濃縮物あるいはニコチン投与群では結紮部位周囲歯槽骨で有意に増加した。全ての群において、非結紮側と比較して、結紮側では骨吸収に関与する Rank1 遺伝子発現が顎下リンパ節において認められ、特にタバコ煙濃縮物投与群では顕著であった。絹糸除去後の歯槽骨回復実験では、PBS 投与群と比較して、ニコチン投与群において歯槽骨の回復が有意に減少した。

以上の結果より、今回の実験で作製したマウス歯周炎モデルにおいて、タバコ煙成分がマウス顎下リンパ節での Rankl 遺伝子発現を介して絹糸結紮周囲歯槽骨表面での破骨細胞の分化誘導を促進し、歯槽骨破壊を促進する可能性が強く示唆された。さらにニコチンの全身投与は歯周組織の治癒を遅滞させることが示された。

炎症性サイトカインによるアメロチン遺伝子の転写の調節

日本大学松戸歯学部歯周治療学講座 ¹、日本大学松戸歯学部口腔科学研究所 ² 〇山﨑瑞穂 ¹、岩井泰伸 ¹、能田佳祐 ¹、松井沙莉 ¹、加藤彩子 ¹、高井英樹 ^{1,2}、中山洋平 ^{1,2}、小方頼昌 ^{1,2}

Regulation of Amelotin Gene Transcription by Inflammatory Cytokines

Department of Periodontology¹ and Research Institute of Oral Science², Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan.

OMizuho Yamazaki¹, Yasunobu Iwai¹, Keisuke Noda¹, Sari Matsui¹, Ayako Kato¹, Hideki Takai^{1, 2}, Yohei Nakayama^{1, 2} and Yorimasa Ogata^{1, 2}

【研究目的】アメロチン(AMTN)は近年発見されたエナメルタンパク質で、エナメル質形成の成熟期に分泌され、

成熟期エナメル芽細胞の基底層および接合上皮の内側基底板にタンパク質発現が限局していることから、接合上皮とエナメル質との接着に関与する可能性が示唆されている。今回我々は、炎症歯周組織中でのヒト AMTN の転写調節機構を解明するため、上皮細胞における AMTN 遺伝子発現に対する炎症性サイトカインの影響について検索を行った。【材料および方法】ヒト歯肉癌由来上皮細胞様細胞 (Ca9-22) をコンフルエントになるまで 10% FCS を含む aMEM 培地で培養後、無血清の aMEM で 12 時間培養し、interleukin-1β (IL-1β; 1 ng/ml) または tumor necrosis factor-a (TNF-a; 10 ng/ml) で 24 時間刺激を行った。回収した Ca9-22 細胞から全 RNA を抽出し、AMTN mRNA 量の変化を定量 PCR で検索した。TNF-a または IL-1β で刺激した Ca9-22 細胞からタンパク質を抽出し、AMTN および Cytokeratin19 (CK19) のタンパク質発現量の変化をウェスタンブロットで解析した。種々の長さに調整したヒト AMTN 遺伝子プロモーターを挿入したルシフェラーゼコンストラクトを作製し、Ca9-22 細胞に導入後、TNF-a または IL-1β で 12 時間刺激し、AMTN プロモーターの転写活性に対する影響を解析した。さらに、-353AMTN ルシフェラーゼコンストラクト中の C/EBP(1)、C/EBP(2)および YY1 応答配列にミューテイションを挿入し、転写活性の変化を検索した。さらに、細胞内シグナル伝達経路を検索する目的で、-353AMTN コンストラクトを導入した Ca9-22 細胞に種々のリン酸化阻害剤を作用させ、転写活性に対する阻害剤の影響を解析した。TNF-a または IL-1β で刺激した Ca9-22 細胞から核内タンパク質を抽出し、AMTN 遺伝子プロモーター中の応答配列との結合をゲルシフトアッセイで解析した。また、C/EBP(2)配列に結合する

転写因子を検索する目的で、抗体を使用したスーパーシフトアッセイを行った。

【結果と考察】Ca9-22 細胞を TNF-lpha で刺激すると、AMTN mRNA 量は 24 時間後に有意に増加した。IL-1eta で刺激する と AMTN mRNA 量は継時的に増加し、24 時間後に最大となった。また、AMTN タンパク質量は TNF-α または IL-1β で刺激すると継時的に増加し、12 時間後に最大となった。-211AMTN および-353AMTN ルシフェラーゼコンストラク トを導入した Ca9-22 細胞を $TNF-\alpha$ で刺激すると転写活性が上昇した。 $IL-1\beta$ 刺激では、-211AMTN コンストラクトで 転写活性が増加し、-353AMTN コンストラクトで最も転写活性が上昇した。ミューテイションルシフェラーゼコンス トラクトである-353AMTN mC/EBP(1)、-353AMTN mC/EBP(2)または-353AMTN mYY1 を Ca9-22 細胞に導入し、TNF-α または IL-1B で刺激すると、転写活性の上昇は部分的に抑制された。-353AMTN コンストラクトを導入した Ca9-22 細 胞にリン酸化阻害剤を作用させ、TNF- α または IL- 1β で刺激すると、チロシンリン酸化阻害剤、ERK1/2 阻害剤および PI3 キナーゼ阻害剤により転写活性の上昇が抑制された。ゲルシフトアッセイの結果、Ca9-22 細胞から抽出した核内タ ンパク質の YY1 配列への結合は、TNF-α 刺激 3 および 12 時間後に増加した。C/EBP(2)配列への核内タンパク質の結 合は、IL-1β 刺激 6 および 12 時間後に増加し、YY1 配列への核内タンパク質の結合は IL-1β 刺激 6 時間後に増加した。 C/EBP(2)配列への核内タンパク質の結合の特異性を解析するために、非標識の 40 倍濃度の C/EBP(2)で競合実験を行っ た結果、バンドの消失が認められた。抗 C/EBPβ 抗体を使用すると C/EBP(2)配列と核内タンパク質の結合が消失し、 他の抗体を使用した場合では変化は認められなかった。以上の結果から、上皮細胞におけるヒト AMTN 遺伝子の発現 は、TNF-α および IL-1β により調節されており、チロシンリン酸化、MAPK 系、PI3K 系のシグナル伝達を通じ、転写 因子 C/EBPβ および YY1 を介して調節されていることが明らかになった。現在、TNF-α および IL-1β に応答するプロ モーター配列および誘導される転写因子についてさらに詳細に検索を進めている。

次亜塩素酸ナトリウム溶液を半導体レーザーにて活性化させた根管洗浄における 根管側枝への軟組織溶解作用

○渡辺聡,本郷智之,井手彩集,八尾香奈子,佐竹和久,海老原新,興地隆史 東京医科歯科大学大学院 医歯学総合研究科 □腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野

Diode Laser Activation of Sodium Hypochlorite for Lateral Root Canal Soft Tissue Dissolution

OWATANABE Satoshi, HONGO Tomoyuki, IDE Ayai, YAO Kanako, SATAKE Kazuhisa, EBIHARA Arata, and OKIJI Takashi

Pulp Biology and Endodontics, Department of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

【目的】

根管洗浄にはシリンジ洗浄 (conventional irrigation, 以下 CI) や超音波洗浄 (passive ultrasonic irrigation, 以下 PUI) 等が行われているが、近年レーザーを用いた根管洗浄(laser-activated irrigation, 以下 LAI) の有効性が報告されている。また、コンピューター制御でチップ先端処理を行い同部への熱エネルギー集中を可能とした半導体レーザーが開発された。本研究では、同レーザーを用いた LAI における軟組織溶解作用を基礎的に検討することを目的とした。

【材料および方法】

模型底部から 6 mm, 12 mmの位置に 2 つの側枝を有する J タイプ規格根管模型 (Thermafil Training Bloc, Dentsply Maillefer)を模擬根管 (n=42) として用いた. この側枝部にメチレンブルーで染色したブタ下顎骨付着軟組織を満たし、以下の 6 群 (n=7) に分け 20 秒×3 回根管洗浄を行った.

- 1) LAI (蒸留水) 群: 980 nm 半導体レーザー (Alta MLS, Dental Photonics) および付属チップ (DS1-200, 同) を用い内蔵 コンピューター制御でチップ先端加工後,蒸留水を満たした模擬根管に 2 W (120 mJ, 16 pps) で照射した.
- 2) LAI (NaC10) 群:1) と同様の実験条件にて洗浄液に NaC10(次亜塩6%「ヨシダ」, ヨシダ製薬)溶液を用いた.
- 4) PUI (NaC10) 群:3) と同様の実験条件にて洗浄液に NaC10 溶液を用いた.
- 5) CI (NaC10) 群: 27G 洗浄針およびシリンジを用いて NaC10 溶液にて根管洗浄を行った.
- 6) NaC10 溶液静置群: NaC10 溶液を 60 秒間模擬根管内に満たした.

手術用顕微鏡(OPMI pico with MORA interface, Carl Zeiss)および医用動画記録システム(DATA Gen PRO for DENTAL, セプンスディメンジョンデザイン)にて洗浄中の画像を記録し、画像分析ソフト(Photoshop CS5, Adobe)にて側枝における実験前後の軟組織の面積を計測し、側枝における軟組織除去率を算出した。統計学的解析には一元配置分散分析および Tukey-Kramer 検定を用い、有意水準を 5%とした。

【結果】

軟組織除去率において、LAI (NaC10) 群および PUI (NaC10) 群は、それぞれ蒸留水を使用した群および CI (NaC10) 群よりも高く (p<0.05) 、LAI (蒸留水), PUI (蒸留水) 群と CI (NaC10) 群との間には有意差を認めなかった (p>0.05) . LAI (NaC10) 群は他の全群より有意に高い軟組織除去率を示した (p<0.05) .

【考察】

LAI は根管内にキャビテーション,高速の水流,衝撃波を発生させ,複雑な根管形態の清掃を可能にするといわれている.また,我々は過去に同一条件でLAIを行い,洗浄液の温度が最大50℃程度上昇したことを報告した.従って、本研究では,半導体レーザーによってNaC10溶液の撹拌と加温が生じ,軟組織溶解作用が向上した可能性が考えられる.

【結論】

本実験条件下において、NaC10溶液を半導体レーザーにて活性化させたLAIは従来の根管洗浄法(PUIおよびCI)よりも側枝内の軟組織に対し高い清掃効果を示すことが示唆された.

根尖病変と関連した根尖周囲歯根吸収部の走査型電子顕微鏡観察 ○大久保賢亮、大久保厚司、辻本真規、杉本浩司、山田志津香、林 善彦 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科齲蝕学分野

Scanning Electron Microscopy of Periapical Root Resorption Related to Clinicopathologically Different Conditions

O Kensuke Ookubo, Atsushi Ookubo, Masaki Tsujimoto, Kouji Sugimoto, Shizuka Yamada, Yoshihiko Hayashi

Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

【緒言】

大きな根尖病変に対して、根尖切除術と肉芽組織あるいは嚢胞の除去は有益な治療法である。特に、コンピューター断層撮影像(以下 CT)による病変の 3D 評価と同時に、歯根端切除時に手術用顕微鏡を利用することも一般的となり(平成 26 年 4 月から保険収載済み)、術後の臨床成績も向上している。しかし、根尖病変の術前 3D 評価と手術時所見、そして根尖周囲の外部吸収の程度などについての関係は不明な点が多いようである。そこで今回、3 種類の臨床的病態(不十分な処置、根尖部破折、明瞭な歯根吸収)と根尖周囲の歯根吸収の関連について、CT, 臨床症状,術中所見、および走査型電子顕微鏡(以下 SEM)観察所見との関連を検討した。本研究は、本学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認を得て実施し(承認番号 1501)、また、利益相反内容に該当しない。

【被験者と方法】

研究の内容を説明し、同意の得られた患者 21 名から、根尖切除部を採取した。すべての根尖切除術は、術前 CT 評価および手術顕微鏡の下で施行された。被験者の年齢、性、主訴、歯種、打診試験結果、CT による根尖病変の大きさと手術所見を記録した。

試料作製は、通法により固定、脱水、t-ブタノール置換後、凍結乾燥 (VFD-21S, 真空デバイス社、茨城)を行った。その後、試料はアルミニウム製試料台に載せ、カーボン蒸着 (JEE-400; JEOL Ltd, 東京)後、SEM (S-3500N; Hitachi Ltd, 東京) にて 観察を行った (電圧 20kV, 作業距離 15mm, 拡大率 30~2,000 倍で観察・撮影)。

術前 CT 所見と術中所見、SEM 所見から、3 種類の臨床的病態(不十分な処置・根尖部破折・明瞭なレントゲン的 歯根吸収)に分類し、以下の評価基準で根尖周囲吸収を検討した。

根尖周囲の歯根吸収については、以下の基準で吸収の程度・範囲・拡大パターンを評価した。各症例の最大値が 5 になるように 1)+3)及び 2)+3)として点数化した。

- 1) 根尖孔部の吸収(根尖孔の輪郭として定義し、吸収範囲で0から3までに分類)
- 2) 根尖孔周囲の吸収(輪郭部から外部の吸収領域と定義し、吸収範囲で0から3までに分類)
- 3) 根表面からの吸収深さ(歯根吸収の深さで 0 から 2 までに分類)

【結果】

肉芽腫性病変と比較し、嚢胞性病変で有意に大きな病変が観察された。さらに、SEM 観察所見において、嚢胞性病変における根尖周囲吸収は有意に高い値を示した(P<0.05)。また、3 種類の臨床的病態(不十分な処置・根尖部破折・明瞭なレントゲン的歯根吸収)において、明瞭なレントゲン的歯根吸収例の根尖周囲吸収は、不十分な処置・根尖部破折と比較して有意に高い値を示した(P<0.05)。病変周囲のセメント質表面には小球構造(直径 2-3 μm)を認めた。セメント質吸収は表面に小欠損部の形成によって始まる。欠損形成が進行するにつれて、吸収部に層板構造が現れ、小球の大きさはセメント質表面と比較し小さくなる。更なる吸収により、特に破折症例において典型的な小窩が観察された。大きな嚢胞性病変において、象牙質吸収部に最も吸収の進行した東状の破壊パターンを認めた。

【考察】

本研究は、3 種類の臨床的病態(不十分な処置、根尖部破折、明瞭な歯根吸収)の根尖周囲の歯根吸収について、CT 所見, 臨床症状, 術中所見、および SEM 観察所見との関連を検討した。根尖病変の術前 3D 評価、術中所見から嚢胞性病変では根尖周囲の吸収程度が強い傾向にあった。また、今回使用した評価法は、根面の吸収が強くなるほど高い値を示し、歯根の吸収程度を客観的に評価するうえで極めて有効な方法であることが分かった。さらに、SEM を使った観察から特徴のある根尖周囲の吸収性変化として、セメント質表面の小欠損部形成から象牙質内の強い破壊まで、吸収の進行過程による変化を明らかにすることができた。

リン酸処理の有無による各種ユニバーサルタイプ接着材 の接合界面の観察 虎の門病院歯科

○陶山雄司, 森上 誠, 宇野 滋, 山田敏元, 杉崎順平

Interfacial Observation of univerrsal type adhesives with or without phospholic acid etching

Department of Dentistry, Toranomon Hospital

OSUYAMA Y, MORIGAMI M, UNO S, YAMADA T, SUGIZAKI J

目的)

エナメル質や象牙質だけでなく、コンポジットレジン、金属、さらにはセラミックスやジルコニアに至るまで幅広い被着対象に対応できる汎用性のある接着性能をもつユニバーサルタイプの接着システムが一般の臨床に普及している。しかし特に海外ではこの"ユニバーサル"が、セルフエッチ、セレクティブエッチ、トータルエッチのどの歯面処理法を選択しても十分な接着が得られるという意味で用いられることもあり、その定義は今のところはっきりしていない。今回われわれは、現在市販されているユニバーサルタイプの接着システムについて、リン酸処理の有無による歯質との接合界面の様相について SEM を用いて観察したので報告する。

材料および方法)

健全なヒト抜去大臼歯を用い、歯冠部エナメル質、象牙質を含む平坦面を被着面とした。これらの被着面に対して、業者指示に従って接着材を塗布した試料(セルフエッチング試料)と、リン酸(K エッチャントシリンジ、Kuraray Noritake Dental)によるエッチング処理を 10 秒間行った後に接着材を塗布した試料(エッチング試料)を作製した。ユニバーサルタイプの接着材には Scotchbond Universal (3M ESPE)、Adhese Universal (Ivocla Vivadent)、ALL-BOND UNIVERSAL (BISCO)、CLEARFIL Universal Bond(Kuraray Noritake Dental)、G-Premio BOND (GC)、BeautiBond Multi (Shofu)、計 6 種類を使用した。接着試片は水中に 24 時間保管後、垂直に切断され、接着界面が露出するようにエポキシ樹脂に包埋・硬化後研磨し、SEM 観察用の試料とした。試料はイオンシャワー装置(EIS-200ER、エリオニクス)を用いて 1keV、1.8mA/cm² の条件でアルゴンイオンエッチングを 30 秒間施した後、白金蒸着を行い、FE-SEM(ERA-8800FE、エリオニクス)を用いて各種接着材とエナメル質、象牙質との接合界面の様相について観察、写真撮影を行った。

結果ならびに考察)

SEM 観察像において各種接着材の厚さはおよそ 5μm 以下であり、歯質との界面における接合状態は極めて良好で、エナメル質、象牙質との接合界面全面にわたってギャップの形成は認められなかった。エナメル質との接合界面においてエッチング試料では、表層がより脱灰された凹凸構造が明瞭に確認できた。象牙質との界面においてセルフエッチング試料では象牙質表層の脱灰は比較的弱く、ハイブリッド層は明瞭には観察されなかったのに対し、エッチング試料では象牙細管開口部が漏斗状に拡大され、脱灰された層に接着材が浸透したハイブイッド層が 2-3μm の幅で確認された。

結論)

本研究より,各種ユニバーサルタイプの接着材は界面の様相に差があるものの,リン酸処理の有無にかかわらず,歯質に対する良好な接着性能を有していることが明らかになった.

アクティブ処理の有無がユニバーサルアドヒーシブの象牙質接着性に及ぼす影響

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

○崔 慶一¹⁾, 高見澤俊樹^{1,2)}, 坪田圭司^{1,2)}, 寺井里沙¹⁾, 黒川弘康^{1,2)}, 安藤 進¹⁾, 宮崎真至^{1,2)}, 若松英輝³⁾

Influence of Active Action on Dentin Bond Strength of Universal Adhesive Systems

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

OSAI Keiichi¹⁾, TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2)}, TSUBOTA Keishi¹⁾, TERAI Risa¹⁾, KUROKAWA Hiroyasu^{1,2)}, ANDO Susumu¹⁾, MIYAZAKI Masashi^{1,2)}, WAKAMATSU Hideki³⁾

【緒言】

ユニバーサルアドヒーシブは、エッチ&リンスあるいはセルフエッチいずれのモードでも使用が可能である。そのため、操作の単純化とともに齲蝕除去後の窩洞状態からエッチングモードを選択できるという利点を有する。しかし、このアドヒーシブの塗布法においては、その塗布時間、回数あるいは操作法は製品によってそれぞれ異なるものである。演者らは、これまでアクティブ処理の有無がユニバーサルアドヒーシブのエナメル質接着性に及ぼす影響について検討してきた。その結果、セルフエッチモードにおいては、アクティブ処理によってエナメル質接着性は向上する傾向を示したものの、エッチ&リンスモードでのアクティブ処理は、製品によってはその接着性が低下することを明らかとした。そこで今回演者らは、ユニバーサルアドヒーシブの臨床使用術式の確立を目的として、異なるエッチングモードを応用した際に、アクティブ処理の有無が象牙質接着性に及ぼす影響について検討を行った。

【材料および方法】

供試したユニバーサルアドヒーシブは、Scotchbond Universal(SU、3M ESPE)、All-Bond Universal(AB、Bisco),G-Premio Bond(GP、GC)および Adhese Universal(AU、Ivoclar Vivadent)の、合計 4 製品とした。接着試験に際しては、ウシ歯 冠部象牙質を SiC ペーパーの#600 まで研磨を行い被着象牙質面とした。被着面に対してそれぞれの製造者指示条件に 従いアドヒーシブの塗布を行った。その際、アクティブ処理指示製品についてはこれを行わない群(inactive)、アクティブ処理の指示がない製品についてはこれを行った群(active)を加えた。次いで、内径 2.38 mm の Ultradent 接着試験 用治具を歯質表面に固定し、レジンペーストを填塞、照射を 30 秒間行ったものを接着試験用試片とした。また、アドヒーシブ塗布に先立ってリン酸処理を 15 秒間行った条件についても同様に接着試片を製作した。試片は 37℃精製水中に 24 時間保管後、万能試験機(Type5500R、Instron)を用いてクロスヘッドスピード毎分 1.0 mm の条件で剪断接着 強さを測定した。また、剪断接着試験後の破断試片については、その破壊形式の判定のために、実態顕微鏡を用いて 10 倍の倍率で歯質側およびレジン側破断面を観察し、界面破壊、レジンあるいは象牙質の凝集破壊および混合破壊として分類した。なお、試片の数は 10 個としてその平均値および標準偏差を求め、有意水準 0.05 の条件で統計学検定を行った。

また、それぞれの条件における処理面および象牙質接合界面について、通法に従って走査型電子顕微鏡(SEM)観察用試料を製作し、加速電圧 10 kV の条件で SEM 観察した。

【成績および考察】

供試したユニバーサルアドヒーシブの象牙質接着強さは、用いた製品によってその接着強さは異なるものの、いずれのアドヒーシブにおいてもエッチ&リンスあるいはセルフエッチモードに関わらずアクティブ処理を行った条件で、これを行わない条件に比較して接着強さが高くなる傾向を示した。アクティブ処理の目的は、塗布されたアドヒーシブを撹拌することによって化学的接着性能の向上とともにレジンモノマーの浸透性を高めるものと考えられている。本実験結果からも、象牙質に対するアクティブ処理によってユニバーサルアドヒーシブの接着強さが向上したところからその有効性が示唆された。

【結論】

エッチ&リンスあるいはセルフエッチいずれのモードにおいても、アクティブ処理はユニバーサルアドヒーシブの象 牙質接着強さを向上させる傾向を示した。

親水性多官能アミド系モノマーを含有した新規ワンステップセルフエッチングシステム の象牙質接着性能

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座う蝕制御学分野 ○久野 裕介、荒岡 大輔、高橋 真広、保坂 啓一、中島 正俊、田上 順次

Microtensile bond strength to dentin of a newly developed one-step self-etch system containing hydrophilic amide monomer

Cariology and Operative Dentistry, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University
OKUNO Yusuke, ARAOKA Daisuke, TAKAHASHI Masahiro, HOSAKA Keiichi, NAKAJIMA Masatoshi, TAGAMI Junji

【研究目的】ワンステップセルフエッチングシステム (1-SEA) の多くは、HEMA などの親水性単官能モノマーを配合し、重合硬化後も親水性の挙動を示すことから、吸水によって起こる接着界面の劣化や機械的強度の低下によって象牙質接着性能は影響を受けると考えられている。クラレノリタケデンタル社より開発された、硬化後には高い機械的強度を示すと考えられる親水性多官能アミド系モノマーを含有する新規 1-SEA、SKB-100 の象牙質への初期微小引張り接着強さ (µTBS)、ならびに溶媒除去後のボンド硬化体の引張り強さ (UTS) と吸水率 (WS) を、他の 1-SEA、ツーステップセルフエッチングシステム (2-SEA) と比較検討したので報告する。

【材料及び方法】本実験には、SKB-100 に加え、クリアフィルボンド SE ONE (以下 SE ONE)、2-SEA であるクリアフィル メガボンド (以下 MB)(全て同社製)を用いた。ヒト健全抜去大臼歯歯冠中央を歯軸に対して垂直に切断し平坦面を作製後、 \sharp 600 の耐水研磨紙を用いて仕上げ、被着象牙質被着面とした。前述 3 種のボンディングシステムを、業者指示に従って接着操作を行い(塗布後の処置時間は SKE-100;0 秒、SE ONE;10 秒、MB プライマー;20 秒)、同社製クリアフィル AP-X を築盛し、24 時間 37℃に水中保管後、被着面積 $1.0 \times 1.0 \text{mm}^2$ のビーム状試片を作製し、クロスヘッドスピード 1 mm/min でマイクロテンサイル法を用いて μ TBS を測定した。また、1 -SEA の 2 種についてはエアブローにより溶媒を除去したものを、2 -SEA の MB についてはボンドを用いて、あらかじめ用意したシリコンモールドに注入し光重合させ、 $1.0 \times 1.0 \times 1.$

【結果及び考察】得られた結果を下表に示す (Table 1)。MB には及ばないものの、SKB-100 が SE ONE よりも高い μ TBS を示したのは、硬化後に SE ONE と比較して高い機械的強度を示すボンド層の影響が考えられる。 さらに、SKB-100 は、WS が SE ONE よりも低く、MB と同等の値を示し、1 か月までの吸水による UTS の低下についても SE ONE よりも小さく、MB と同等であることから、硬化後に MB 同等の機械的強度と疎水性を示す SKB-100 は、接着耐久性の向上にも寄与する可能性が示された。0 秒という処置時間にもかかわらず、SE ONE よりも高い μ TBS を示したのは、硬化前に HEMA よりも高い親水性を示すアミド系モノマーによる高い象牙質浸透性の効果が推測される。

| Test Adhesive (waiting time) | uTBS (MPa) | UTS(dry) (MPa) | UTS(24h-wet) (MPa) | UTS(1m-wet) (MPa) | Water sorption (μg/mm³) |
|------------------------------|---------------|-------------------|-----------------------|------------------------------|-------------------------|
| SKB-100 (0sec) | 76.0±4.6 A | 46.0±12.3 Aba | 42.9±4.7 Aa | 40.0±4.8 ^{Aa} | 65.2±0.9 ^A |
| SE ONE (10sec) | 63.9±4.9 B | 40.4±9.5 Aa | 27.3±3.0 Bb | 25.0 ± 2.1 Bb | 103.1 ± 8.7^{B} |
| MB (20sec) | 86.5±5.9 ° | 48.4±6.4 Ba | 44.4±4.4 Aab | $40.8 \pm 4.2^{\mathrm{Ab}}$ | 65.8±2.4 ^A |

Table 1. The μ TBSs, UTS (dry, 24h-wet and 1m-wet groups), and WS, of each adhesive system. Within the same column, different capital superscripts show statistical differences (p<0.05). Within the same row, different lowercase superscript letters show statistical differences (p<0.05).

【結論】本研究より、親水性多官能アミド系モノマーを含有する 1-SEA、SKB-100 は、短時間処置にも関わらず、MB には及ばないものの、SE ONE よりも高い良好な接着性能が示した。その長期耐久性にはさらなる検討が必要である。

白斑の表面硬さは病変の深度や表層下脱灰病変の軟化度を反映する

兵庫医科大学歯科口腔外科学講座 ○清水明彦

The Surface Hardness of White-spot Suggests the Depth and Softening of the Lesion

Department of Dentistry and Oral Surgery, Hyogo College of Medicine Okkihiko Shimizu

【緒 言】

ICDAS code 2 の白斑 (視診でう窩を認めない白斑) のエナメル質表面の硬さは、健全エナメル質のおよそ 1/2 以下に低下していることが報告された (山本ら、2015 年春季保存学会)。一方、白斑の断面を観察すると、う蝕病変がエナメル質に留まっている白斑もあれば、病変がエナメル質を超えて象牙質に波及している白斑も存在する。

本研究の目的は、白斑の表面硬さが病変の深度と関係しているかどうか、また白斑の表面硬さが表層下脱灰病変部の軟化の程度と関係しているかどうかを検討することである。

【材料と方法】

10%中性ホルマリン中に保管されたヒト抜去大臼歯の中から、平滑面に ICDAS code 2 の白斑を認める歯を選んだ(兵庫医科大学倫理審査委員会 No. 586)。被験歯を一側からすり減らしながら白斑面とほぼ直交するする断面を観察し、う蝕がエナメル質に留まっている白斑と、病変が象牙質に波及している白斑について、それぞれ白斑の表面硬さを測定した。また、白斑の断面をう蝕検知液(クラレノリタケデンタル)で染色し、う蝕病変がエナメル質に限局しているものについて、白斑表面とそれに対応する表層下脱灰病変部の硬さを測定した。

硬さの測定には、先端曲率半径 10μ mのエナメル質用圧子を装着したカリオテスター(三栄エムイー)を使用し、圧子の押し込み深さをヌープ硬さに換算した。

【結 果】

白斑の表面硬さは、う蝕病変がエナメル質内に留まっている場合は $142\pm25~\text{KHN} (n=19)$ であったが、う蝕病変が象牙質に進行している場合は $96\pm15~\text{KHN} (n=16)$ であった。また、白斑表面の硬さとそれに対応する表層下脱灰病変部の硬さは、それぞれ $132\pm26~\text{KHN} (n=12)$ 、 $63\pm27~\text{KHN} (n=12)$ であった(硬さ値はいずれも平均値 $\pm \text{SD}$)。

【考 察】

ICDAS code 2 の白斑病変が、エナメル質を超えて象牙質に波及しているか否かを、視診で鑑別することは極めて困難であろう。しかし今回の研究で、う蝕病変が象牙質に波及している白斑の表面硬さは、病変がエナメル質に留まっている場合に比べ有意に低いことが分かった。これは、う蝕病変が象牙質まで波及している場合、エナメル質は表層下部からエナメル象牙境に至る全層においてう蝕による脱灰を受けており、もはや表層部の再石灰化に必要な量のミネラルを供給できる余裕がなくなっているためと考えられる。

一方、白斑の表層下脱灰病変部の硬さは、白斑の表面硬さの約 1/2 であったことから、もし白斑の表面硬さと表層下病変部の硬さが相関しているのなら、例えば表面硬さの上昇が認められた白斑では、表層下の脱灰病変部でも硬さが上昇(再硬化、再石灰化)していると推定されるであろう。

以上のように、平滑面白斑の表面硬さを調べることにより、う蝕病変が象牙質に波及しているか否かが鑑別できるだけでなく、白斑病変内部の再石灰化も評価できる可能性が示唆された。

【まとめ】

- 1. ICDAS code 2の平滑面白斑において、う蝕が象牙質まで進行している場合は、う蝕がエナメル質に留まっている場合に比べ、白斑の表面硬さは有意に低下していることが示された。
- 2. 白斑の表層下脱灰病変部の硬さは、白斑の表面硬さのおよそ半分であることが示された。
- 3. これらは、白斑の表面硬さが白斑の内部の状態を反映しており、白斑の表面硬さからは、う触病変が象牙質に 波及しているか否かの鑑別診断が可能であり、白斑の表面硬さをモニタリングすれば、その白斑病変の進行、 停止、回復(再石灰化)を客観的に評価できると期待される。

UVA 活性リボフラビンによるヒト象牙質の脱灰抑制効果

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. 大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部

〇上村 怜央¹, 八木 香子¹, 新野 侑子¹, 松田 祐輔², 三浦 治郎², 林 美加子¹

Ultraviolet-A-activated riboflavin treatments inhibit human dentin demineralization

1.Osaka University Graduate School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry and Endodontology 2.Osaka University Dental Hospital, Division for Interdisciplinary Dentistry OReo UEMURA¹, Kyoko YAGI¹, Yuko SHINNO¹, Yusuke MATSUDA², Jiro MIURA², Mikako HAYASHI¹

[研究目的]

日常臨床で遭遇する失活歯の歯根破折を防ぐ方法の一つとして、象牙質の強化が挙げられる。我々は、これまでに ヒト象牙質の機械的強度が加熱や長波長紫外線(UVA)照射により著しく増加することを発見した。[Hayashi et al: J Dent Res, 2008, 2010] また第 142 回本学術大会において、眼科領域において既に臨床利用されている UVA 活性リボフラビン の応用が、象牙質の機械的強度を増加させることを報告した。今回は、さらにこの UVA 活性リボフラビンを応用することにより、SDS-PAGE 分析およびウェスタンブロッティングを用いて象牙質コラーゲンにおける架橋形成の確認、および μ CT を用いて耐酸性の向上が認められるかを検索した。

[材料および方法]

う触および破折のないヒト抜去大臼歯の歯冠中央部より、厚さ 1.0 mm の円盤試料を、低速精密切断機 (ISOMET2000, BUEHLER)を用いて採取した。リボフラビン溶液は、リボフラビン-5'-モノホスファートナトリウム(東京化成工業株式会社)を蒸留水に溶解させて 0.1%溶液を作製した。UVA 照射は、LED 紫外線照射装置(ZUV-C30H, オムロン)を用いて、波長 365 nm、出力 1600 mW/c㎡、照射時間 10 分の条件で行った。

SDS-PAGE 分析においては、同一歯から得られた円盤試料を、それぞれコントロール群、処理後粉砕群、粉砕後処理群に分類し、UVA 活性リボフラビンによる処理および破砕機(μ T-01, TAITEC)による試料の粉砕を行った。粉末化した象牙質試料を 1M HC1 にて分解し、SDS-PAGE 分析、および抗コラーゲン I 抗体を使用してのウェスタンブロッティングを行った。

次に μ CTによる耐酸性の評価においては、円盤試料を半切後 500 μ m の厚さに切断し、象牙細管の走行と垂直になる面を脱灰面と設定した。試料をコントロール群、実験群に分類し、試験前に μ CT を撮影した。その後 UVA 活性リボフラビン処理を脱灰面に施したのち、脱灰面以外をスティッキーワックスにて被覆した。脱灰溶液 (0.2 mol/1 Lactic acid, 3.0 mmol/1 CaCl₂, 1.8 mmol/1 KH₂PO₄, pH5.0) 中に 3 日間浸漬後、スティッキーワックスを除去したうえで μ CT 撮影に供し、それぞれの群において脱灰前後でのミネラル密度の変化を比較検討した。

[結果および考察]

ウェスタンブロッティングにおいて、処理後粉砕群および粉砕後処理群はコントロール群と比較し、ブロードなバンドが示す位置が高分子量側に変位していることがわかった。これにより、UVA活性リボフラビン処理が象牙質コラーゲンへの架橋を形成することが確認された。また、 μ CT 撮影においては、UVA活性リボフラビン処理により、通常と比較して脱灰が抑制されうることが示された。これらより、象牙質う蝕を想定した場合、耐酸性が向上することでう蝕の進行抑制につながることが示唆された。

[参考文献]

Hayashi et al., Heat treatment strengthens human dentin. J Dent Res 2008, 87(8) 762-6.

Hayashi et al., Effects of rehydration on dentin strengthened by heating or UV. J Dent Res 2010, 89(2) 154-8.

Shuichiro Fukushima, Masato Shimizu, Jiro Miura *et al.*, Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin. Biomed Opt Express 2015, 6(5) 1844-56 本研究の一部は科学研究費補助金(基盤(B) 25293387, 15K15700, 基盤(C) 25462957) の補助の下に行われた。