

テオブロミンおよび S-PRG フィラー含有歯面コート材の予防効果と特性

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野歯冠修復学¹⁾
テキサス大学ヘルスサイエンスセンターサンアントニオ校²⁾, ルイジアナ州立大学ヘルスサイエンスセンター³⁾

○日下部修介^{1,2)}, 堀田正人¹⁾, 中本哲夫³⁾, H. Ralph Rawls²⁾

Enhanced Protective Effect of Tooth Coating Materials Containing Theobromine and/or S-PRG Filler

¹⁾Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation,
Asahi University School of Dentistry
University of Texas Health Science Center at San Antonio²⁾, Louisiana State University Health Sciences Center³⁾
○KUSAKABE Shusuke^{1,2)}, HOTTA Masato¹⁾, NAKAMOTO Tetsuo³⁾, H. Ralph Rawls²⁾

【研究目的】

齲蝕予防には歯面コーティング材がその一助となり、コーティング材に齲蝕を抑制する機能を発揮させることが有効と考える。歯面コーティング材には、フッ化物を含有するもの、多種類のイオンを徐放し、抗プラーク性などを有するS-PRGフィラーを含むもの等が市販されているが、齲蝕予防・抑制効果を十分に発揮できるものはない。欧米では、歯の再石灰化を促し、歯質を強化する効果が強いと報告されているカカオに含まれる物質、テオブロミンが注目されている。また、テオブロミンはフッ化物より生体に安全で、齲蝕や象牙質知覚過敏症の予防に有効であるとされている。そこで、テオブロミンおよびS-PRGフィラーを含有させた歯面コーティング材を開発・試作し、その齲蝕予防・抑制効果が増強されるかどうかその特性について検討した。

【材料および方法】

1. 供試コーティング材料

以下の①～④の歯面コーティング材を試作し、実験に供試した。

①S-PRGフィラー含有コーティング材, ②S-PRGフィラー含有コーティング材+5.0%テオブロミン, ③シリカフィラー含有コーティング材+5.0%テオブロミン, ④シリカフィラー含有コーティング材

2. 実験方法

1) 乳酸中におけるコーティング材の緩衝能試験

直径10mm, 厚さ1mmのテフロンモールドにそれぞれのコーティング材を硬化させたディスクを試料とした。これらの試料をpH4.0の乳酸溶液中に浸漬し、pHの変化を24時間中、さらに2日後～4日後までのpHを測定した(n=5)。

また、これらの試料を1日ごとに新たなpH4.0の乳酸溶液に置き換えた時の2日後～4日後までのpHも測定した(n=5)。

2) エナメル質・象牙質の硬さ測定

ヒト新鮮抜去歯のエナメル質および歯根象牙質に対して、耐水研磨紙(#600～#1500)を用いて、平坦な平面を作製した。各コーティング材を塗布し、光照射器にて硬化させて、ロックウェルスーパーフィシャル硬さ試験機(Wilson)にてそれぞれコーティングしたエナメル質および歯根象牙質に対して3回ずつ硬さを測定した。測定後、人工唾液(Bijl and Waal)中に4週間保管し、再度硬さを測定し、その変化率($\Delta\%$)=[人工唾液浸漬後の平均硬さ-浸漬前の平均硬さ]/[浸漬前の平均硬さ]×100を算出した(n=5)。得られた値は、一元配置分散分析と多重比較検定Schefféを用いて有意差検定($p<0.05$)を行った。なお、本実験で使用した抜去歯は、朝日大学歯学部倫理委員会の承諾(受付番号23112)を得たものである。

3) コーティング材の硬さの測定

直径3/8インチ, 厚さ1/16インチのテフロンモールドにそれぞれのコーティング材を硬化させたディスクを試料とし、デュロメータ硬さ試験機(Type D, PTC Instruments)にてコーティング材の硬さを測定した。硬さは、試料をpH4.0の乳酸溶液中に浸漬し、浸漬前および1～4日後の測定を行った。

【結果および考察】

1. コーティング材の緩衝能

4日後のそれぞれのコーティング材のpHは、①6.78±0.09, ②6.82±0.07, ③3.82±0.08, ④3.67±0.10であった。S-PRGフィラー含有のコーティング材のpHは経時的に上昇した。また1日ごとに乳酸溶液に置き換えた時の4日後のコーティング材のpHは、①5.98±0.09, ②6.06±0.08, ③4.40±0.04, ④4.36±0.05であった。S-PRG含有のコーティング材は乳酸溶液を1日ごとに置き換えることでpHは若干減少したものの、S-PRG非含有のコーティング材のpHは僅かに上昇する傾向を認めた。

2. エナメル質・象牙質の硬さ

それぞれコーティングした歯の変化率(エナメル質/歯根象牙質)は、①2.64±0.36/3.56±1.12, ②5.56±2.30/7.39±1.57, ③3.34±1.00/5.34±0.94, ④-1.32±2.14/0.72±1.68, Control(コーティング材なし)-1.51±1.93/0.36±1.28であった。エナメル質および象牙質の硬さは、④およびControl以外は有意に増加した($p<0.05$)。

3. コーティング材の硬さの測定

それぞれのコーティング材の硬さ(浸漬前/浸漬後)は、①69.5±4.85/68.0±2.73, ②68.6±4.53/66.7±2.05, ③68.3±3.99/59.9±2.77, ④69.5±3.66/58.2±2.07であった。S-PRGフィラー含有のコーティング材は乳酸溶液中においても大きな変化を認めなかった。

以上のことから、S-PRGフィラーを含有する歯面コーティング材は、酸中和能を有し、酸性下においてもコーティング材に大きく影響を及ぼさない可能性が示唆された。またテオブロミンはS-PRGフィラーよりコーティング下で歯質を強く再石灰化させる可能性があり、両者が合わさると相乗効果が期待できることが示唆された。

PMTC ペーストの使用が人工着色物除去効果に及ぼす影響

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

○竹中宏隆¹, 川本 諒^{1,2}, 五條堀眞由美¹, 佐々木奈央¹,
遠藤 肇¹, 高見澤俊樹^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 松村正鴻³

Influence of Polishing with PMTC Pastes on Stain Removal Effectiveness.

¹Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry,

²Division of Biomaterials Science, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry,

³Matsumura Dental Clinic

○TAKENAKA Hirotaka¹, KAWAMOTO Ryo^{1,2}, GOJUBORI Mayumi¹, SASAKI Nao¹,
ENDO Hajime¹, TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, MATSUMURA Masahiro³

【目的】

近年、口腔内疾患を予防するという観点から、臨床において機械的歯面清掃 (PMTC) が行われている。PMTC は、プラークおよびプラークリテンションファクターの除去を目的としており、審美的な要求からもペーストを用いて歯質表面に沈着した着色物を除去する頻度も増加している。その目的のために、製品によってさまざまな成分や粒径の異なる研磨粒子が配合されているものの、着色除去効果に関する報告は皆無である。そこで演者らは、PMTC ペーストの使用が人工着色物除去効果に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】

1) PMTC ペースト

供試した PMTC ペーストは、クリンプロクリーニングペースト PMTC 用 (3M ESPE, CP), コンクールクリーニングゲジェル (ウェルテック, CJ), リナメルトリートメントペースト (サンギ, RT), PRG フィラー含有試作歯面研磨材 (松風, PG), メルサージュレギュラー (松風, MR), メルサージュファイン (松風, MF) およびメルサージュプラス (松風, MP) の合計 7 製品とした。

2) 試片の製作

ウシ下顎前歯の唇側エナメル質を 10×10×1 mm のブロック体として切り出し、その表面を耐水性 SiC ペーパーの #2000 まで順次研磨した。これら PMTC 用試片に対し 10 倍に希釈したインスタントコーヒーに 10 分間浸漬し、人工着色試片を作製した。着色操作は 1 日 2 回、7 日間行い 24 時間乾燥させた後、実験に用いた。なお、試片の数は各条件について 6 個とした。

3) 歯面清掃器具

コントラアングルハンドピースに歯面清掃用ブラシ (メルサージュブラシ No.1, 松風) を装着し、各 PMTC ペーストを 0.1g 用いて回転数 2,000 rpm, 荷重 250 gf の条件で 15 秒間を行った。また、蒸留水を滴下して同様に刷掃したものを Control とした。

4) 着色除去率の測定

着色除去率は、人工着色物除去後の試片表面をデジタルカメラで撮影した後、画像解析用ソフトを用いて人工着色物が残存している面積を計測して算出した。

5) PMTC ペーストの観察

各 PMTC ペーストについて、その希釈液を定性濾紙 (No. 1, アドバンテック東洋) を用いて濾過した後に 37℃ インキュベーターで乾燥させた。得られた乾燥粉末に対して、通法に従って金蒸着を施した後に走査電子顕微鏡 (ERA-8800FE, エリオニクス) を用いて研磨粒子を観察した。

【成績および考察】

歯面清掃による人工着色物の除去率は、用いるペーストによって異なるものであった。とくに、MR は他の製品と比較して、除去率が大きくなる傾向が認められた。また、走査電子顕微鏡による研磨粒子の観察では、製品によってその粒径は異なり、MR で最も大きかった。

【結論】

本実験の結果から、人工着色物の除去効果は用いるペーストによって異なることが明らかとなった。これは、配合されている研磨粒子の成分および粒径が影響しているものと示唆された。

保存修復学臨床実習における Er:YAG レーザー実習の教育効果について

北海道医療大学 歯学部 口腔機能修復・再建学系 う蝕制御治療学分野

○泉川昌宣, 猪熊孝憲, 伊藤修一, 油井知雄, 松田 康裕, 斎藤隆史

Educational effectiveness of Er:YAG laser training in clinical training of operative dentistry.

Division of Clinical Cariology and Endodontology, School of Dentistry, Health Sciences University
of Hokkaido, Hokkaido, Japan

○Masanobu Izumikawa, Takanori Inokuma, Shuichi Ito, Tomoo Yui, Yasuhiro Matsuda, Takashi Saito

【目的】

日常臨床においてレーザーを用いた処置を行う機会が増加しレーザーを学生が目にする機会も多い。本学ではレーザーに関する知識および操作法を習得させるべく Er:YAG レーザーを用いたう蝕除去実習を第5学年の臨床実習に導入している。本実習を通じてレーザーに関する教育効果を検討することを目的とした。

【材料および方法】

北海道医療大学歯学部臨床実習生（平成 27 年度 5 年生, 39 名）を対象とした。

実習は 7～8 名ずつの少人数制で行った。実習開始前に座学にてレーザーの種類と特徴、安全管理についての講義を行った。

下顎右側第一大臼歯咬合面に C2 程度のう蝕を想定したう蝕除去実習用人工歯「う蝕検知液可染性う蝕付ホーニング歯（ニッシン）」を用いて Er:YAG レーザー（アーウィンアドベール Evo；モリタ製作所）によるう蝕除去実習を行った。レーザーを使用する際の照射条件は 60mJ, 10pps, 注水下とした。象牙質う蝕部位にう蝕検知液を塗布し水洗後に可染部の除去を行った。

実習開始前と実習終了後にレーザー実習に対する無記名アンケート調査を行った。

【結果】

プレアンケートでレーザーに関して興味を持っていると感じていたのは 66%であった。レーザーに関する予備知識を持っていたのは 17%でポストアンケートでは 36%に増加した。レーザーの扱い方についてプレアンケートで難しくないと思っていた学生は 11%であったがこれはポストアンケートでは 29%であった。レーザーによる硬組織切削に対する理解度は、理解していると回答した学生はプレアンケートでは 11%に対しポストアンケートでは 84%であった。将来、レーザーを臨床で使いたいと思うかとの質問ではプレアンケートで 66%、ポストアンケートでは 74%が使用したいと回答した。

自由記載項目では、天然歯や軟組織に対する処置の実習を希望する学生や前歯部隣接面、歯頸部齲蝕を想定した実習を希望する意見が得られた。またレーザーを使用することに対する有効性に関する意見や提案を記載する学生がみられた。反面、回転切削器具よりも切削効率が劣ることを実感している意見も多数得られた。

【考察】

2008年の診療報酬改定によりレーザーによる「う蝕歯無痛の窩洞形成加算」の算定が可能となり、臨床におけるレーザーの使用機会が増加し、歯科医師国家試験に出題される傾向にある。本学では保存修復学臨床基礎実習に歯科用レーザー実習を導入して学生のレーザーに対する知識や手技の習得に努めてきた。

本実習を通じて学生のレーザーに関する意識の変化が見られた反面、う蝕除去に対するレーザーの必要性については実習前後で明確な変化は確認できなかった。ほぼすべての学生が本実習で初めてレーザーを使用した、その取扱いに不慣れであったこと。またう蝕除去実習用人工歯のう蝕形態も初心者向がレーザーでう蝕除去を行うには難易度が高く設定されている為う蝕除去に必要な以上の時間を費やした為と考える。今後、う蝕除去実習用人工歯の改良を行う必要があると考える。

レーザーによる齲蝕除去は歯学教育モデル・コアカリキュラムにおいて水準 3(原則として指導者の歯科医療行為の介助にとどめるもの)であり、臨床実習の現場で学生が直に触れることの少ない器具となっている。本実習を行うことによってレーザーによる切削原理や機器特性の理解、安全性への考慮を体験し、知識と経験の習得が行えると期待される。

ヒト歯髓由来線維芽細胞における XAV 刺激による MMPs の産生

大阪歯科大学 歯科保存学講座¹, 神奈川歯科大学口腔科学講座²

○竹内 撰¹、小正 玲子¹、岩佐 一弘¹、井村 和希¹、藤原 秀樹¹、合田 征司²、山本 一世¹

Production of MMPs by XAV Stimulation in Human Dental Pulp Fibroblast Like Cells

Dept. of Operative dentistry Osaka Dental Univ.¹

Dept. of Oral Sience Kanagawa Dental Univ.²

○TAKEUCHI Osamu¹, KOMASA Reiko¹, IWASA Kazuhiro¹, IMURA Kazuki¹,
FUJIWARA Hideki¹, GODA Seiji², YAMAMOTO Kazuyo¹.

【目的】

歯髓炎が進行に伴い MMPs などの細胞外マトリックス分解酵素が産生され、組織が破壊され歯髓壊死へと移行する。なかでも MMP-3 は、MMP-1, 7, 8, 9, 13 を活性化し組織破壊へと進行していく。しながら、歯髓組織での炎症性サイトカインと MMP-3 が関与する組織破壊のメカニズムは明らかでない。

また単球/マクロファージから産生される Interleukin-1 β (IL-1 β) は、好中球や血管内皮細胞に作用し、炎症反応を引き起こすサイトカインである。その機能はアポトーシス誘導や炎症反応亢進、創傷治癒など働きは様々である。

β -catenin は cadherin の細胞質ドメインに結合している分子の 1 つである。 β -catenin は cadherin をアクチンフィラメントにつなぎ、細胞接着活性に大きな役割を果たしている。Wnt は細胞膜受容体に結合することにより① β -catenin 経路、② PCP 経路、③ Ca²⁺ 経路により細胞内シグナル経路を活性化し、細胞増殖、分化、運動、を制御することは知られている。また Wnt1 は JNK の活性化を介して pro-matrix metaroprotease3 の発現を誘導する。

そこで今回我々は、Tankyrase 阻害剤である XAV939 を用いてヒト歯髓由来線維芽細胞における β -catenin 経路と MMPs 産生への影響についての研究を行ったのでここに発表する。

【方法および結果】

- 1) 本研究に参加同意を得た患者様の抜去歯より歯髓組織を採取・継代培養後 3~10 世代をヒト歯髓由来線維芽細胞として本研究に共した。
- 2) ヒト歯髓由来線維芽細胞を IL-1 β 50ng/ml 単独刺激と XAV939 (0, 1, 5, 10, 15, 20 μ M) 共刺激下で 24 時間培養後、上清中の MMPs の発現を Western Blotting で確認した。また XAV939 単独での刺激では MMP-3 の発現は認めなかった。 β -catenin は XAV 刺激濃度依存的に減少した。IL-1 β 刺激により発現した MMP-3 は XAV939 共刺激により濃度依存的に上昇した。 β -actin の発現に変化はなかった。
- 3) DQ コラーゲン (インビトロジェン社) を用いてヒト歯髓由来線維芽細胞による MMPs 産生と分解基質の特定を行った。DQ コラーゲン上にヒト歯髓由来線維芽細胞を播種し、IL-1 β 及び XAV939 にて 24 時間刺激し共焦点レーザー顕微鏡下にて観察をした。
この実験系では、酵素による切断が起こると蛍光を発する様に標識されている。IL-1 β 及び XAV 刺激により蛍光を認めた。
- 4) さらに DQ コラーゲンをを用いて、IL-1 β 、XAV939 刺激に加え MMPs 阻害剤である GM6001 にて共刺激を行い、共焦点レーザー顕微鏡下にて観察した。GM6001 添加により MMPs による DQ ゼラチン、DQ コラーゲンの分解は完全には抑制されなかったが、IL-1 β 、XAV939 単独刺激と比較して分解は抑制された。

【結論】

ヒト歯髓由来線維芽細胞において、 β -catenin の発現は XAV 刺激により濃度依存的に減少した。また β -catenin 発現の減少に反して MMP-3 の産生は上昇した。XAV 刺激による β -catenin 減少は β -catenin への影響はなかった。

DQ コラーゲン、DQ ゼラチンの分解は XAV939 刺激により促進した。また GM6001 により分解は抑制された。

以上のことからヒト歯髓由来線維芽細胞における MMPs の発現は β -catenin 経路が関与していることが示唆された。

衝突摩耗試験を応用した Tooth Wear 挙動の解析

日本大学歯学部保存学教室修復学講座¹, 総合歯学研究所生体工学研究部門²,
日野浦歯科医院³, 横須賀共済病院⁴

○島村 稔¹, 安藤 進¹, 今井亜理紗¹, 田村ゆきえ¹,
高見澤俊樹^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}, 日野浦 光³, 宮 直利⁴

Analysis of Tooth Wear Behavior by Using Impact Wear Machine

Department of Operative Dentistry¹, Division of Biomaterials Science Dental Research Center²,
Nihon University School of Dentistry, Hinoura Dental Clinic³, Yokosuka Kyosai Hospital⁴
○SHIMAMURA Yutaka¹, ANDO Susumu¹, IMAI Arisa¹, TAMURA Yukie¹,
TAKAMIZAWA Toshiki^{1,2}, MIYAZAKI Masashi^{1,2}, HINOURA Ko³, MIYA Naotoshi⁴

【緒言】

Tooth wear は、齧蝕によらず、酸蝕、摩耗あるいは咬耗などが相互に影響することで歯質の欠損を生じる多因子性の疾患である。Tooth wear の発症機序を検討することは、その予防法の確立に必要であると考えられるものの、リスク因子がどのように影響を及ぼしているかについての基礎的研究は少なく、十分に解明されていないのが現状である。

そこで演者らは、口腔内におけるエナメル質の咬合運動をシミュレートした衝突摩耗を負荷し、wear 量の測定および表面に生じた亀裂およびその伸展の観察を行うことで、とくに初期における tooth wear 挙動の検討を行った。

【材料および方法】

ウシ (2~3 歳齢) 下顎前歯歯冠部エナメル質を、常温重合アクリルレジンに包埋し、耐水性 SiC ペーパーの# 400 ~2,000 までを用いて、直径 6 mm 程度のエナメル質平坦面が得られるように研磨し、これを衝突摩耗用エナメル質試片とした。試片は蒸留水および脱灰溶液に浸漬し、衝突摩耗試験機 (K655-06, 東京技研) を用いて、ステンレスロッドをアンタゴニストとし、垂直落下距離 5 mm, 荷重 2.5 kgf の条件で垂直落下 1 回を 1 サイクルとした衝突摩耗を 1 ~1,500 回まで負荷した。負荷前後のエナメル質表面の変化を形状測定レーザマイクロSCOPE (VK-9700, キーエンス, 以後, LMS), SEM (ERA-8800 FE, Elionix) および OCT 装置 (モリタ東京製作所) を用いて観察するとともに、スラブ硬さ試験機 (松沢精機) を用いて測定を行った。

【成績および考察】

摩耗量および摩耗深さは、浸漬溶液によって異なる傾向を示した。すなわち、蒸留水 (以後, DW) および脱灰溶液 (以後, DL) 浸漬群での摩耗量は、 $2.7 \sim 11.6 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ および $6.6 \sim 85.6 \times 10^4 \mu\text{m}^3$ であった。一方、摩耗深さは、 $1.4 \sim 2.3 \mu\text{m}$ および $2.1 \sim 10.6 \mu\text{m}$ であった。いずれの浸漬溶液においても衝突回数 500 回以上で有意に大きくなる傾向を示した (Fig)。LMS 観察からは、初回の衝突による大小の衝撃亀裂が全試片に認められ、そのうち約半数に衝突によって生じた圧痕内に放射状に走る大きな亀裂を認めた。これらの亀裂は、摩耗回数の増加に伴ってエナメル小柱に沿った方向に拡大伸展し、マイクロクラックを引き起こすことが示された。また、衝突回数 1,500 回の OCT イメージにおいては、DW と比較して DL の衝突部位のシグナルが強くなる傾向を示した。これは、DL の摩耗量が DW と比較して大きく、衝突部位の形態変化が大きかったために、光線の反射、散乱状態が変化したためと考えられた。

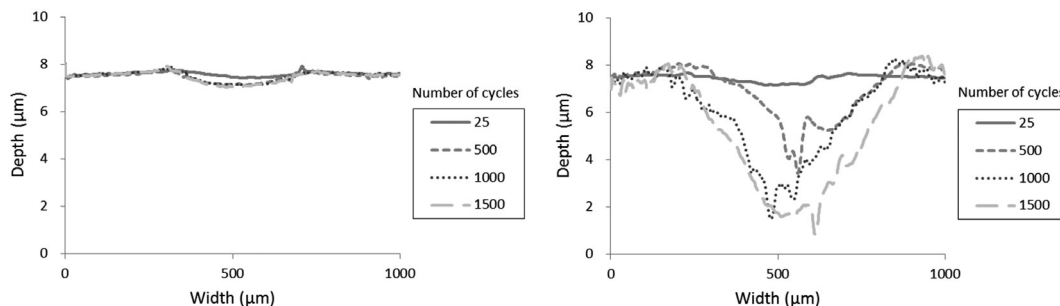


Fig. Surface profile comparative measurement on wear scars in DW (Left) and DL (Right).

【結論】

蒸留水および脱灰溶液に浸漬されたエナメル質に衝突摩耗を負荷した結果、衝突摩耗量および摩耗深さは、摩耗回数の増加および酸の影響によって増加することが示された。

フッ化物処理ハイドロキシアパタイトにおける歯質結合フッ素の分析 -フッ化物溶液の濃度および処理時間による影響

¹朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科理工学分野

²北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学分野

³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)

○奥山克史¹、松田康裕²、山本洋子³、駒田裕子¹、玉置幸道¹

Analysis of tooth-bound fluoride on fluoride-treated hydroxyapatite -Effects of concentrations and treatment periods of the fluoride solution

¹Department of Dental Materials Science, Asahi University School of Dentistry

²Division of Clinical Cariology and Endodontology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

³Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Katsushi OKUYAMA¹, Yasuhiro MATSUDA², Hiroko YAMAMOTO³, Yuko KOMADA¹, Yukimichi TAMAKI¹

【緒言】

演者らは各種フッ化物含有歯科材料より歯質へ取り込まれるフッ素について、試料を 1M KOH 処理後 In-air マイクロ PIXE/PIGE を用いることで、歯質と結合し、ハイドロキシアパタイトからフルオロアパタイトへ置換されたフッ素濃度の測定およびフッ素分布の評価ができることを第 143 回日本歯科保存学会で報告した。その際、適用した材料やその適用期間によりフルオロアパタイトに置換されている割合が異なることを認めている。本研究ではハイドロキシアパタイトに取り込まれるフッ素濃度とフルオロアパタイトに置換されるフッ素量との関連性について検討を行った。

【材料と方法】

ハイドロキシアパタイト粉末 (キシダ) 400mg を NaF でフッ素濃度 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000ppmF にそれぞれ調整した再石灰化溶液 (pH:7.0) 15mL に浸漬し、室温中で震盪させながら保存した。24 時間後、上澄を除去した残りを脱イオン水で 3 回洗浄した後、濾過、乾燥させフッ化物処理アパタイト粉末を得た。得られた粉末より 200mg 取り出し、1M KOH 10mL 中に入れ、室温中で震盪させながら 24 時間保存した。24 時間後上澄の KOH を採取し、残った粉末を 100mL 脱イオン水で 5 分間洗浄後、さらに 2 回脱イオン水で洗浄し、濾過、乾燥後、KOH 処理アパタイト粉末を得た。採取した KOH から 1mL を取り出し、1M HNO₃ 溶液 1mL を追加した後、フッ素イオン電極 (9609BNWP, Orion) を用い、溶液中のフッ素濃度を測定した。また KOH 処理アパタイト 20mg を 1M HCl 1.5mL で溶解し、そのうち 0.3mL 採取後 15% CH₃COONa 溶液 2.7mL を添加し、KOH 同様にフッ素イオン電極でフッ素濃度を測定した。得られたフッ素濃度よりフッ化物処理アパタイト粉末 1mg から KOH に溶解したフッ素量、および KOH 処理アパタイト粉末 1mg に含まれているフッ素量に換算した。さらに 10 および 100ppmF 溶液に関しては、24 時間の他 6, 12 時間、2, 7, 14, 30 日間溶液中に保存し、それぞれについて 24 時間保存群同様、KOH 中および KOH 処理アパタイト中のフッ素濃度を測定した。測定は各群 9 試料用い、フッ素量については Games-Howell test で有意水準 5 % にて統計解析を行った。

【結果および考察】

24 時間保存群では、浸漬溶液のフッ素濃度が大きくなるに従い、KOH および KOH 処理アパタイト中のフッ素量はともに増加することを認めた。全体のフッ素量 (KOH 中のフッ素量と KOH 処理アパタイトのフッ素量の和) に対する KOH 処理アパタイトのフッ素量の割合は、浸漬溶液のフッ素濃度が大きくなるにつれ、減少していく傾向にあった。高濃度溶液浸漬では多量のフッ素が一度に供給されることで、フルオロアパタイトに置換できるフッ素量を超えてしまい、フッ化カルシウムなどの KOH 可溶性フッ化物を多く形成されていることがその原因と考えられる。浸漬時間による比較では、10, 100ppmF とともに KOH 中のフッ素量が浸漬時間の増加に伴い減少する傾向を認めたが、KOH 処理アパタイト中のフッ素量は 100ppmF 群についてのみ、浸漬時間の増加に従って、フッ素量の増加を認めた。また、10, 100ppmF 両群で、浸漬時間の増加に従い全体量に対する KOH 処理アパタイトのフッ素量の割合が増加していく傾向を示した。フルオロアパタイトへの置換は長期にわたり行われていくことが示唆された。

S-PRG フィラー溶出液がポリマイクロバイアルバイオフィルムの群集構造に与える影響 — 次世代型シーケンスによるバイオフィルム菌叢の網羅的解析 —

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 う蝕制御修復学分野¹, 微生物感染学分野²

○ 石澤将人¹, 富山 潔¹, 長谷川晴彦¹, 浜田信城², 向井義晴¹

The effects of S-PRG eluate on the microbial community structure of polymicrobial biofilms — Comprehensive analysis of bacterial flora by next generation sequencer —

¹Div. of Cariology and Restorative Dentistry, ²Div. of Microbiology, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University,
○ ISHIZAWA Masato¹, TOMIYAMA Kiyoshi¹, HASEGAWA Haruhiko¹, HAMADA Nobushiro², MUKAI Yoshiharu¹

【研究目的】Surface pre-reacted glass ionomer (S-PRG) フィラーは、多種イオンを放出する機能性フィラーであり、現在、充填材や歯磨剤など、歯科疾患の予防を目的とした機能材料などに使用されている。第 144 回本学会において、我々は、リアルタイム PCR 法を用いて、ポリマイクロバイアル(PM)バイオフィルム中の全細菌、*Streptococcus* 属、*Veillonella* 属、*Actinomyces* 属の定量分析を行ない、S-PRG 溶出液が、それぞれの菌属の遺伝子コピー数を減少させることを報告した。今回、次世代シーケンス・アンプリコン解析により、S-PRG 溶出液が PM バイオフィルムにどのような影響を与えたのかを PM バイオフィルム中の菌叢を網羅的に比較、検討した。

【材料および方法】1) 試料作製：直径 12 mm, 厚さ 0.15 mm のガラス円板を 24 well culture plate に適合する Lid に取り付け付けたクランプに固定後、オートクレーブによる滅菌を行ない、PM バイオフィルム形成用試料とした。2) 試験培養液の作製：S-PRG フィラーを蒸留水に懸濁して各種イオンを溶出させた上清の S-PRG 溶出液 (110.5 ppm F 含有) を用いて、S-PRG フィラー溶出液含有培養液 (50mM PIPES, 0.2% sucrose 含有) を作製した (PRG 群)。また、S-PRG フィラー溶出液と同濃度のフッ化物を含む NaF 含有培養液 (50mM PIPES, 0.2% sucrose 含有) を作製した (F 群)。3) PM バイオフィルムの培養：健全な被験者 1 名から採取した刺激唾液を 50 倍希釈となるよう Buffered McBain (50mM PIPES, 0.2% sucrose 含有) 培養液中加入して 24 well 中に分注した後、培養液中にガラス円板を懸架し、嫌気条件下 (37 °C, CO₂ : 10 %, H₂ : 10 %, N₂ : 80 %) で 10 時間、培養を行なった。その後、14 時間、10 時間のタイムスケジュールで培養液 (唾液非含有) を交換し、継続して 48 時間まで嫌気培養を行なった。4) 各試験培養液の PM バイオフィルム形成への影響：培養開始から 24 時間および 34 時間の時点で、各種試験培養液に交換して、培養開始から 48 時間後まで嫌気培養を行なった。コントロール群には標準培養液を用い、他群と同様に嫌気培養を行なった (Cont 群)。5) 円盤状ガラス試片に付着している各処理後、あるいは非処理の PM バイオフィルムを次世代シーケンサー (MiSeqTM, Illumina, USA) を用いて、各サンプル由来の 16S rDNA からシーケンスデータを得て、部分塩基配列を決定し、次世代シーケンス・アンプリコン解析を行なうことにより、PM バイオフィルムサンプルに由来する菌群の帰属分類群を推定した。サンプル間の比較解析は、Metagenome@KIN software (World Fusion) を用いて、二次元、三次元主成分分析およびクラスター解析 (クラスターリング手法: 群平均法, 距離関数: ピアソンの相関係数) により、各群のバイオフィルム構造にどのような変動が生じているのかを比較、検討した。

【結果】中性環境下で 24 時間培養して形成した PM バイオフィルムを標準培養液、フッ化物含有培養液、あるいは S-PRG フィラー溶出液を混入させた培養液で 48 時間の時点で培養を継続し、次世代シーケンスを用いてバイオフィルムの菌叢を比較したところ、PRG 群では、Cont 群、F 群と比較して菌叢が大きく変化が生じた。また F 群でも Cont 群と比較して菌叢の変化が生じた。*Streptococcus salivarius* は Cont 群と比較した PRG 群において、菌叢の割合が増加した。*Veillonella* 属の *Veillonella dispar* は PRG 群では他群と比較して減少した。

【結論及び考察】中性環境下で PM バイオフィルム形成を行なうことにより、S-PRG フィラー溶出液群、NaF 溶液群そして非処理群はともに、異なる菌叢を示した。PRG 群では、*Streptococcus* 属の *Streptococcus salivarius* が増加し、*Veillonella* 属の *Veillonella dispar* が減少した。*Streptococcus salivarius* の病原性に関する報告はきわめてまれであるだけでなく、*salivarius* が抗菌物質としての enosin を産生し、上気道炎感染の予防に役立っているという報告がある。また、*Veillonella* 属のいくつかの菌種はバイオフィルムの形成に深く関わっていることを示唆していることから、S-PRG フィラー溶出液群では菌叢の健全度が増したとも考察できる。また NaF 群においても *Veillonella dispar* がやや減少する傾向が認められ、バイオフィルムの形成が Cont 群よりも抑制された要因であると考えられた。

ERIC プライマーを用いた *S. sobrinus* 血清型 *d* のバンディングパターンの差異

¹ 日本大学松戸歯学部保存修復学講座 ² デンタルクリニック伏見 ³ 鈴木歯科医院
○¹ 岡田珠美、¹ 岡野智子、^{1,2} 伏見幸男、^{1,3} 鈴木英明

The differentiations of banding patterns of *S. sobrinus* serotype *d* with ERIC primers.
¹Department of Operative Dentistry, Nihon University, School of Dentistry at Matsudo.
²Dental Clinic Fushimi, ³Suzuki Dental Office.
○¹Tamami Okada, ¹Tomoko Okano, ^{1,2}Sachio Fushimi, ^{1,3}Hideaki Suzuki

【緒言】

演者らは、初期齲蝕の発症に深い関わりを持つ *S. mutans* (血清型 *c, e* および *f*) と *S. sobrinus* (血清型 *d* と *g*) の遺伝子型の差異を Repetitive extragenic palindromic PCR (rep-PCR) 法を用いて研究を行っている。遺伝子型の差異を調べる方法としては PFGE (pulsed field gel electrophoresis) が gold standard であるが、高価であり、特別な器具や技術を必要とし、結果が出るまでに時間が掛かるという欠点がある。この PFGE と比較して rep-PCR 法は操作が簡便であり、特別な機械・技術を必要とせず、安価で短期間に結果が得られるという利点があるため、高齲蝕罹患患者を識別する上で重要な方法となり得る可能性がある。この rep-PCR 法に市販プライマーである ERIC プライマーを用いて *S. mutans* と *S. sobrinus* の標準株およびヒト口腔分離株に応用したところ、種々のバンドを得ることができ、*S. mutans* と *S. sobrinus* の標準株ではそのバンディングパターンに差異が認められたことを第 134 および 135 回本学会で報告した。さらにヒト口腔より分離した *S. mutans* 血清型 *f* は標準株のそれとは異なったバンディングパターンを持つ株があり、その齲蝕原性についても第 136, 140 および 142 回本学会で報告した。今回は *S. sobrinus* 血清型 *d* と *g* 株についてバンディングパターンの差異を調べた結果、血清型 *d* のヒト口腔分離株に標準株とは異なる株が存在したので報告する。

【材料および方法】

本学微生物免疫学講座所有の *S. sobrinus* 血清型 *d* と *g* の標準株それぞれ 2 菌株とヒト口腔より分離し、各種生化学的方法で血清型の同定を終了している *S. sobrinus* 血清型 *d* と *g* の各 6 菌株の合計 16 菌株を本実験に供した。前培養菌を Brain Heart Infusion 液体培地を用いて一夜ローソク培養を行った (37°C)。得られた菌液より遠心分離機にて菌体を回収し、市販 DNA 抽出キット (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen) を用いて DNA を抽出、濁度計を用いて濃度を調節した。市販プライマー ERIC 1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') と ERIC 2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Integrated DNA Technologies) およびバッファーコンポーネント (EPICENTER Technologies) を使い、通法に従い PCR を行った。得られた増幅産物の分離は 2% のアガロースゲル使用の電気泳動により行った。電気泳動後、エチジウムブロマイドにて染色、画像撮影を行った。得られた画像よりバンディングパターンの差異を 2 血清型間で比較・検討した。

【結果および考察】

- 1) すべての標準株およびヒト口腔分離株の DNA から得られたバンディングパターンは数種のバンドを有していた。
- 2) ヒト口腔分離株のバンディングパターンは *S. sobrinus* の標準株と類似したパターンであった。
- 3) *S. sobrinus* の標準株は血清型 *d* と *g* 共に 2000bp, 1800bp, 1100bp, 800bp, 600bp, 550bp, 250bp の 7 か所に染色されるバンドが認められた。
- 4) 一方でヒト口腔分離株では、血清型 *d* の 6 菌株中の 5 菌株に 1100bp にバンドが認められなかった。これに対して血清型 *g* は濃度に違いはあるが 6 菌株全てが標準株と同様に 7 か所に強く染色されるバンドが認められた。

以上の結果から、ERIC プライマーを用いた rep-PCR 法で認められた *S. sobrinus* 血清型 *d* のバンディングパターンは他の血清型 *g* と異なるパターンを有する株が多いことが分かった。今後は、より多くのヒト口腔分離菌株血清型 *d* についてバンディングパターンを調べ、1100bp にバンドが無い株の割合を確認するとともに、WIG 合成能、試験管ガラス壁への固着能試験などの齲蝕原性について血清型 *d* の 1100bp にバンドが認められる株や血清型 *g* と比較検討する。

オゾン併用した歯の漂白システムによる漂白効果の検討

大阪歯科大学 ¹歯科保存学講座, ²細菌学講座
○澤井健司郎¹, 吉川一志¹, 王 宝禮², 山本一世¹

Evaluation of the effects of a tooth bleaching system incorporating Ozone

¹Department of Operative Dentistry, ²Department of Bacteriology, Osaka Dental University
○SAWAI Kenshiro¹, YOSHIKAWA Kazushi¹, WANG Pao-li², YAMAMOTO Kazuyo¹

【緒言】

2000 年, FDI によりミナマルインターベンションが提唱され, 以来, 歯を削ることなく歯を白くできる漂白法が広く盛んに研究されるようになり, 新しい漂白剤も多く開発されてきた. 歯を切削せずに色調を改善する漂白は, 機械的歯面清掃では改善されない外因性着色や軽度のテトラサイクリン歯による変色の場合, office bleaching 法や home bleaching 法が選択される. office bleaching 法において, 従来は高濃度過酸化水素水を主成分とした漂白剤を使用してきたが, 現在では二酸化チタンを触媒として過酸化水素水の濃度を減少させる製品がいくつか市販されている. 一方オゾン(ozone)は, 3つの酸素原子からなる酸素の同素体であり, オゾン水は食品の洗浄・殺菌に用いられており, 安全性が高いとされている. オゾンの水中での分解過程では, オゾンは漂白の重要な因子である OH ラジカルに変化するとされている. 本研究では, オゾンを配合することで過酸化水素水の濃度を減少させた漂白剤を試作し, その漂白効果への影響を検討したので報告する.

【材料と方法】

冷凍保管牛歯を解冻し, 歯根を切断して歯髄を除去した後, 煮出した紅茶を着色液とし, 被験歯を7日間浸漬し, 変色試料とした. 術前に変色試料の歯冠部中央で歯科用色彩計(シェードアイ, 松風)にて測色を行った後に, Table1 に示す漂白剤を用いて漂白処理を行った. 漂白処理方法については, 漂白剤を塗布し, 漂白用 LED 照射器(コスモブルー, GC)で10分照射し, この操作を3回同一部位に行い, 漂白処置後, 再度測色を行なった(1回目術後). その後生理食塩水中に保管し, 7日間毎に合計4回漂白処置を行い, 漂白処置後, 再度測色を行なった(2~4回目術後)測定結果は, 色彩分析ソフト(彩チェック ver. 4.0, コニカミノルタ)にて CIE L*a*b*に変換し, L*a*b*を求め, 漂白前との色差を表す ΔE^*ab を算出し, 漂白による術前・術後の色の变化から漂白効果を判定した. 得られた測定結果は一元配置分散処理および Tukey の検定により統計処理を行った (n=5) (P<0.01).

【結果および考察】

実験により得られた ΔE^*ab の結果を Fig. 1 に示す.

色差値 ΔE^*ab については, 毎回の術前・術後の色差値 ΔE^*ab の変化はすべての条件において1回目有意に大きかった. 術前と4回目術後の色差値 ΔE^*ab の変化は TION が 50.0 で最も大きく, 続いてオゾン 6% が 44.2, オゾンジェル 3% が 37.8 であった. すべての条件間で有意差は認められなかった. 今回, オゾンを併用することにより過酸化水素濃度を減少させても漂白効果が期待できることが示唆された. (大阪歯科大学・動物実験員会 (承認番号 13-03021))

Table 1 Materials

Material	Manufacturer	Code
① Ozone Whitening Agent + 3 % H ₂ O ₂	VMC	Ozone (3%)
② Ozone Whitening Agent + 6 % H ₂ O ₂	VMC	Ozone (6%)
Ozone Whitening Agent		
Ozone gel		
(Glycerol + Ozone concentrations : 4000ppm)		
Thickener : Xanthan gum 0.1 g		
pH regulator : Na ₂ CO ₃ 0.1 g		
③ TION in office (2.3 % H ₂ O ₂) (Control)	GC	TION

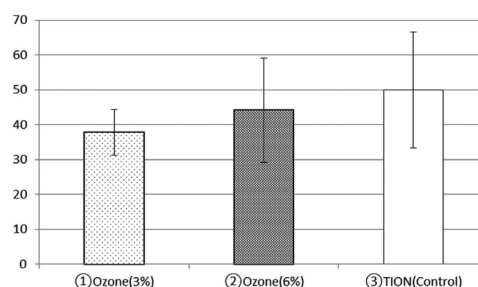


Fig. 1 ΔE^*ab

Mineral trioxide aggregate による骨芽細胞の分化促進に及ぼす Calcium-sensing receptor の関与

¹ 日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野

日本大学歯学部 ² 歯科保存学第Ⅱ講座, ³ 生化学講座, ⁴ 衛生学講座

日本大学歯学部 総合歯学研究所 ⁵ 高度先端医療研究部門, ⁶ 機能形態部門

○安川拓也¹, 林 誠^{2,5}, 羽鳥啓介^{2,5}, 田邊奈津子^{3,6}, 川戸貴行^{4,6}, 小木曾文内^{2,5}

Osteogenic Gene Expression Induced by MTA via Calcium-Sensing Receptor

¹ Division of Applied Oral Sciences, Nihon University Graduate School of Dentistry, Tokyo, Japan

Departments of ² Endodontics, ³ Biochemistry, ⁴ Oral Health Sciences, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

Division of ⁵ Advanced Dental Treatment, ⁶ Functional Morphology, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan

○Takuya Yasukawa¹, Makoto Hayashi^{2,5}, Keisuke Hatori^{2,5}, Natsuko Tanabe^{3,6}, Takayuki Kawato^{4,6} and Bunnai Ogiso^{2,5}

【研究目的】

Mineral trioxide aggregate (MTA) は歯根端切除術の逆根管充填材, 穿孔封鎖材および直接覆髄剤などに応用できる歯内治療用セメントとして広く認知されている。これまで, MTA の臨床的有用性を裏付ける基礎研究において, 本材から遊離する Ca^{2+} が硬組織形成細胞の分化に寄与すると報告されている。

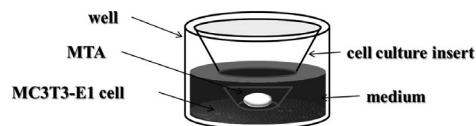
一方, 骨芽細胞に発現している Calcium-sensing receptor (CaSR) は細胞外 Ca^{2+} 濃度を感知し, 骨芽細胞の分化を促進することが知られている。そこで, MTA から遊離する Ca^{2+} でも骨芽細胞上に発現する CaSR を介して分化に影響を与えようと考え, 以下の研究を行った。

【材料及び方法】

被験材料は MTA (Pro Root, DENTSPLY), 使用細胞はマウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。被験材料を製造者指示通りに混和後, Insert cell culture 法にて MC3T3-E1 細胞と培養した。なお, 培養期間は medium を交換する一般的な期間である 3 日と設定し, 被験材料を設置しないものを control とした。

実験 1: MTA からの遊離 Ca^{2+} 濃度と細胞増殖に与える影響

培養 3 日間における MTA から遊離する Ca^{2+} 濃度および MTA が MC3T3-E1 の細胞増殖に与える影響について Calcium E-test Wako および Cell counting kit-8 を用いて測定した。



実験 2: MTA が MC3T3-E1 細胞の分化に与える影響

MC3T3-E1 細胞の分化に関与する遺伝子として Runx2 および type I collagen の遺伝子発現を, また CaSR の遺伝子発現も併せて real-time PCR 法で検討した。

実験 3: CaSR アンタゴニストの影響

CaSR ブロッカーである NPS2143 を使用し, 上記の遺伝子発現に与える影響について real-time PCR 法にて検索した。

実験 4: カルシウムキレート剤の影響

Ca^{2+} キレート剤である EGTA を使用し, 上記の遺伝子発現に与える影響について real-time PCR 法にて検索した。

【結果】

実験 1 では, MTA からの遊離 Ca^{2+} 濃度は経時的に増加し, 3 日後には 2.5mM に達した。また, 細胞数は control 群および MTA 群とも経時的に増加し, 3 日後には MTA 群は control 群より細胞数は有意に高くなった。実験 2 では, Runx2 および type I collagen の遺伝子発現は培養 2 日および 3 日目で control 群より MTA 群で有意に高かった。また, CaSR の遺伝子発現は培養 1 日目で有意に MTA 群は control 群より高くなった。実験 3 および 4 では, MTA によって増加した Runx2 および type I collagen の遺伝子発現は, NPS2143 および EGTA によって有意に減少し, control レベルまで低くなった。

【考察及び結論】

以上のことから MTA から遊離した Ca^{2+} が MC3T3-E1 細胞に発現する CaSR を介して, 骨芽細胞の分化を促進する可能性が示唆された。

(本研究は, 日本大学歯学部倫理審査委員会の承認を得ている (倫 2011-13))

Lipopolysaccharide 存在下におけるマウス歯乳頭細胞の mineral trioxide aggregate に対する反応性

国立大学法人 東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野

*東北大学 大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野

○倉本将司、川島伸之、Alamuddin Yassin Bakhit、橋本健太郎、野田園子、奈良圭介、斉藤正寛*、興地隆史

Effects of mineral trioxide aggregate on mouse dental papillae cells treated with lipopolysaccharide

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

*Department of Restorative Dentistry, Division of Operative Dentistry, Graduate School of Dentistry,
Tohoku University

○Masashi Kuramoto, Nobuyuki Kawashima, Alamuddin Yassin Bakhit, Kentaro Hashimoto, Sonoko Noda,
Keisuke Nara, Masahiro Saito, Takashi Okiji

【緒言】

Mineral trioxide aggregate (MTA) はポルトランドセメント由来のケイ酸三カルシウム、ケイ酸二カルシウムを主成分とする覆髄材で、直接覆髄で水酸化カルシウムと同等以上の良好な成績が報告されている。しかしながら、炎症歯髄の MTA に対する応答については知見に乏しい。そこで本研究ではその追究の端緒として、歯髄細胞としての特性を有するマウス歯乳頭細胞(mouse dental papillae cells; MDPs)を対象とし、lipopolysaccharide (LPS) 存在下での MTA に対する反応性について検討した。

【材料と方法】

試料の作成: ProRoot MTA (MTA、デンツプライ三金) を添付文書の指示にしたがい練和し、直径 0.8mm、高さ 0.4mm のプラスチックチューブに充填後、37℃、5%CO₂、湿度 100%の環境下で 24 時間硬化させたのち、10 mL の α MEM (和光純薬) に浸漬し、24 時間震盪後ろ過滅菌を行い、MTA 抽出液とした。これを非希釈 (MTAx1)、2 倍希釈 (MTAx2) あるいは 4 倍希釈 (MTAx4) し、以下の実験に供した。

細胞毒性: MDPs を 3.0×10^3 cell/well で 96 穴ディッシュに播種し、24 時間後に LPS (100ng/ml, *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich) を含むサンプル希釈液 (FBS 不含) に交換、その後 48 時間経過後に Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) にて細胞数を測定した。ANOVA および Dunnett 法にて有意水準を 5%で検定を行った。

炎症性メディエーター発現: MDPs を 1.0×10^5 cell/well で 12 穴ディッシュに播種し、24 時間後に LPS を含むサンプル希釈液添加培地に交換し、さらに 2 時間経過後に細胞から抽出した RNA を cDNA に逆転写 (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, Thermo) した後、炎症性メディエーター (*Interleukin (IL)-1 α* , *IL-6*, *Tumor necrosis factor (Tnf)- α*) 発現をリアルタイム PCR (GoTaq qPCR Master Mix, Promega, CFX96, BioRad) にて解析した。

【結果と考察】

細胞毒性: LPS のみを添加した MDPs と比較して、LPS+MTAx4 ではほとんど細胞数に変化が無かったが、LPS+MTAx1、LPS+MTAx2 においては有意に細胞数が減少した ($p < 0.05$)。従って、MTA より放出される何らかの因子が高濃度存在すると、細胞増殖は抑制されるものと推察される。

炎症性メディエーター発現: *IL-1 α* , *IL-6*, *Tnf- α* mRNA 発現は、本実験条件ではどの群においても有意差を認めなかった。しかしながら、より長時間作用させた場合の MTA の作用についても検討する必要があると考えられる。

【結論】

LPS 存在下における MDPs の細胞数は、高濃度 MTA 抽出液の添加により減少した。LPS により誘導される MDPs からの炎症性メディエーター産生は、MTA 抽出液処理 (2 時間) による影響を受けなかった。

ラット切歯歯髄組織の幹細胞関連因子発現およびMAP1B/CD146発現細胞に対するLPS刺激の影響

新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野¹
東京医科歯科大学大学院(TMDU)医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座歯髄生物学分野²
○末山有希子¹、金子友厚²、伊藤崇史¹、興地隆史²

Effects of LPS Stimulation on Stem Cell-related Factors and MAP1B/CD146 Expressing Cells in Rat Incisor Pulp Tissue

¹ Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences. ² Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)
○SUEYAMA Yukiko¹, KANEKO Tomoatsu², ITO Takafumi¹, OKIJI Takashi²

(目的)

我々は、MAP1B および CD146 を発現する幹細胞様細胞がラット歯髄に多数分布することを報告した。しかし炎症性刺激が幹細胞の動態や遺伝子発現に及ぼす影響の詳細は不明である。そこで本研究では、幹細胞の遊走・増殖因子 Stem cell factor (SCF)、Stromal cell-derived factor-1(SDF-1)、MAP1B、CD146 に着目し、lipopolysaccharide (LPS) により歯髄炎を誘発したラット切歯歯髄組織を検索対象として、これら因子の発現状況および MAP1B/CD146 二重陽性細胞数の変化を経時的に解析した。

(方法)

本研究は新潟大学動物実験倫理委員会の承認を得て実施された。Wistar 系雄性ラット($n = 52$)に全身麻酔を施した後、上顎右側切歯を切削、露髄させ LPS を貼付したのち、窩洞を水硬性セメント (Cavition; GC) で封鎖した。LPS 刺激 3、12、48 時間経過後に切歯歯髄を摘出し、固定、凍結包埋、薄切後、MAP1B と CD146 に対する免疫二重染色法を行い、二重陽性細胞数を定量した。また上述と同様に施術した組織に対し、全 RNA を抽出後、real time PCR 法を用いて SCF、SDF-1、MAP1B、および CD146 mRNA の発現解析を行った。さらに同様の組織における SCF、SDF-1 のタンパク発現を、抗 SCF および抗 SDF-1 抗体を使用した western blot 法により検討した。

(結果)

歯髄組織の CD146 mRNA 発現は炎症の急性期である LPS 刺激 3 時間経過後に、正常歯髄組織と比較して有意に上昇した。しかし、12 時間後顕著に減少し、炎症の消退した 48 時間後では正常歯髄組織と比較して有意差は認められなかった。一方、MAP1B mRNA 発現は 3 時間経過後に正常組織と比較して有意な増加を示した後、48 時間経過後まで有意に高い値を維持した。また、SCF および SDF-1 mRNA 発現は LPS 刺激後、正常歯髄組織と比較して 3 時間から 48 時間経過後まで徐々に有意な増加を示した。Western blot においても、real time PCR の結果と同様に LPS 刺激後 SCF および SDF-1 発現の上昇が観察された。MAP1B/CD146 二重陽性幹細胞様細胞数も LPS 刺激後に正常歯髄組織と比較して有意な増加が認められた。

(考察)

炎症の急性期である LPS 刺激 3 時間経過後において、本研究で検索対象とした幹細胞遊走・増殖関連因子が有意な発現上昇を示したことから、LPS 刺激によるこれらの遺伝子の発現亢進がラット切歯実験的歯髄炎の成立に何らかの関与をしているものと推察された。また幹細胞遊走関連因子である SCF および SDF-1 のタンパクおよび遺伝子の経時的発現と、MAP1B/CD146 二重陽性細胞数の経時的増加が同様な傾向を示したことから、MAP1B/CD146 二重陽性細胞の増加には、SCF および SDF-1 といった幹細胞遊走因子が関与する可能性が示唆された。

(結論)

ラット歯髄を LPS で刺激すると、幹細胞遊走・増殖関連因子の発現上昇とともに MAP1B/CD146 二重陽性細胞の増加が生じた。

ヒト iPS 細胞の培養初期における低酸素および HIF(Hypoxia Inducible Factor)の働き

¹⁾長崎大学大学院 医歯薬学総合研究科 齶蝕学分野

²⁾長崎大学歯学部・大学病院総合歯科臨床教育学

○杉本 浩司¹⁾、吉澤 祐²⁾、林 善彦¹⁾

Effects of HIF(Hypoxia Inducible Factor) in hypoxic cultivation of human iPS cells

¹⁾Department of Cariology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

²⁾ Department for Clinical Education in General Dentistry, Nagasaki University School of Dentistry , University Hospital(Dental Division)

○SUGIMOTO Koji¹⁾, YOSHIZAWA Yuu²⁾, HAYASHI Yoshihiko¹⁾

[研究目的]

ヒト iPS 細胞はマウス iPS 細胞に比べ、培養、分化誘導、凍結保存などの操作に熟練を要することが、研究を進めていくうえでのマイナス要因となっている。

我々の教室では 4 遺伝子と 3 遺伝子導入マウス iPS 細胞を用いて、解凍後の細胞生存率向上を目的に、低酸素培養下での増殖・分化に関して検討を行い、低酸素培養の有用性を明らかにした。また、低酸素環境下では、幹細胞や ES 細胞では HIF(hypoxia inducible factor)の働きにより未分化状態が維持されていることが報告されているが、ヒト iPS 細胞でも HIF の働きによる同様な現象が推察されている。そこで、本研究では低酸素環境下でのヒト iPS 細胞への HIF の働きについて検討を加えた。

[材料および方法]

実験には理研 CELL BANK より購入したヒト iPS 細胞(201B7, 253G1)を用い、酸素濃度 5%を低酸素条件に設定した。MEF を播種した Dish 上に、ヒト iPS 細胞を 5%および 20%O₂ の条件下で 14 日間、bFGF 添加 Repro Stem 培地で培養した。形態学的観察に加え、ALP 染色後に染色されたコロニー数の測定、未分化マーカー発現の RT-PCR 解析を行った。さらに、siRNA でトランスフェクションし、HIF α 発現をノックダウンしたヒト iPS 細胞を 5%O₂ 下で 7 日間培養した。siRNA 導入後 7 日目に細胞を回収し、細胞形態、未分化マーカー mRNA の発現量を比較した。

[結果]

201B7, 253G1 ヒト iPS 細胞どちらにおいても、低酸素条件下では 20%O₂ 下より 14 日目での ALP 染色された未分化状態のコロニー数は有意に多かった。低酸素条件下では 20%O₂ 下より未分化マーカー遺伝子 Nanog、Sox2、Oct4 の発現量も増加していた。

siRNA を導入後、HIF1 α をノックダウンした群では、201B7, 253G1 細胞ともに対照群と同様に iPS 細胞のコロニーを形成した。253G1 細胞では HIF2 α をノックダウンした群で、コロニーは形成するもののコロニーサイズが減少していた。HIF3 α をノックダウンした群では、HIF1 α をノックダウンしたときと同様に、対照群と同じように iPS 細胞のコロニーを形成した。

HIF1 α をノックダウンした群では、未分化マーカーである Nanog の発現量は対照群と有意差はなかった。HIF2 α 、HIF3 α をノックダウンした群では、対照群と比較して、Nanog の発現量は有意に減少していた。

[まとめ]

低酸素環境下では、マウス iPS 細胞と比較して細胞生存率が低い解凍後のヒト iPS 細胞の増殖を増大させることができた。また、ヒト iPS 細胞でも HIF の働きにより未分化状態が維持されていることが明らかにできた。今回の結果から、HIFs のうち特に HIF 2 α 、HIF3 α の働きにより iPS 細胞の未分化多能性は調節されていると考えられる。

参考文献

Sugimoto K, Yoshizawa Y, Yamada S, Igawa K, Hayashi Y, Ishizaki H, Effects of Hypoxia on Pluripotency in Murine iPS Cells, Microscopy Research and Technique, 76(10), 1084-1092, 2013.

(大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会承認番号：1515)

様々な添加剤がケイ酸カルシウム系セメントに与える物理的影響

¹ 日本大学松戸歯学部歯内療法学講座 ² 日本大学口腔科学研究所
○馬場俊晃¹, 辻本恭久^{1,2}, 松島 潔^{1,2}

Effect of various additives on physical properties to calcium silicate cement

¹ Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
² Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○BABA Toshiaki¹, TSUJIMOTO Yasuhisa^{1,2}, MATSUSHIMA Kiyoshi^{1,2}

[Introduction] 本研究は歯科用ケイ酸カルシウム系セメント (CSC) の欠点とされる操作性に関わる物理試験について、様々な剤料を添加することにより検討した。

[Materials & Methods] ISO 規格 6876-2012 : Dental root sealing materials に記載される物理試験を行った。本研究において供試した試料はすべて粉液比 1 : 0.4 で練和した。

flow test 1 : 粉として、ポルトランドセメント (PC) にエックス線不透過性重金属 (RA) を 20% 添加した CSC を用いた。RA として粒径 25~35 μ m の Bi₂O₃ (B0), 粒径 10~40 μ m の ZrO₂ (Z01), および粒径 1~10 μ m の ZrO₂ (Z0s) の 3 種類を検討した。液として PW を用いた。

flow test 2 : 粉として、PC に Zos を 18%, MC を 2% 添加した CSC を供試した。MC は粘度の異なる 3 種類のものを検討した。液として PW を用いた。

working time test : 粉として PC に、Zos を 18%, 低粘度の MC を 2% 添加した CSC を用いた。液として PW, および 0.5~1.5wt% クエン酸を用いた。

[Results] flow test において、RA の粒径が細かいほど、また、MC の粘度が低いほど高い flow 値を得た。working time test において、クエン酸の濃度が高いほど長い操作時間を得た。

[Conclusions] Zos を 18%, 低粘度の MC を 2% 添加した PC を、1.5wt% のクエン酸で練和した試料において、22mm 以上の flow 値と、16 分以上の working time が認められ、Dental root sealing materials としてある程度の要件を満たす物性が得られた。

ポリリン酸誘導マトリックスメタロプロテアーゼ-13 は
ヒト骨髓由来間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を制御する

○ 長谷奈央子, 尾関伸明, 山口秀幸, 檜山太希, 川合里絵, 茂木眞希雄*, 中田和彦
愛知学院大学歯学部歯内治療学講座
*愛知学院大学薬学部薬学総合教育講座

**Polyphosphate-induced Matrix Metalloproteinase-13-mediated
Osteoblastic Differentiation in Human Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells**

○Naoko Hase, Nobuaki Ozeki, Hideyuki Yamaguchi, Taiki Hiyama, Rie Kawai, Makio Mogi* and Kazuhiko Nakata
Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
* Department of Integrative Education of Pharmacy, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University

【研究目的】

我々はこれまでに、ポリリン酸（平均鎖長 65 程度）誘導マトリックスメタロプロテアーゼ（Matrix Metalloproteinase: MMP）-3 がマウス人工多能性幹細胞（iPS 細胞）由来の象牙芽細胞様細胞およびラット歯髓由来線維芽細胞様細胞に対して、それぞれ細胞増殖および分化を制御することを報告した（Ozeki et al., *Biosci Trends*. 2015, Hiyama et al., *Biosci Trends*. 2015, Ozeki et al., *Exp Cell Res*. 2015）。さらに、ヒト骨格筋幹細胞由来骨芽細胞において、炎症性サイトカイン Interleukin-1 β で誘導される MMP-13 が細胞増殖を制御することを報告した（Ozeki et al., *Exp Cell Res*. 2014, Ozeki et al., *Int J Mol Sci*. 2016）。

そこで本研究では、間葉系幹細胞に対するポリリン酸の効果を検索するため、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞ならびに MMP-13 small interfering RNA (siRNA) を用いて検討した。

【材料および方法】

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA より購入して使用）にポリリン酸（平均鎖長 65 程度, 0.05~0.5 mM）を添加し、ELISA 法による細胞増殖, Real-time PCR 法による MMP-13 遺伝子, Western-blot 法による MMP-13 タンパク質発現, 免疫沈降法を用いた MMP-13 酵素活性ならびに骨芽細胞分化と石灰化マーカーの発現を評価した。MMP-13 siRNA を用いた MMP-13 遺伝子のノックダウンにより、ポリリン酸誘導 MMP-13 による骨芽細胞分化の評価を行った。

【結果】

ポリリン酸（0.1 mM）添加において、ヒト骨髓由来間葉系幹細胞の増殖の亢進, MMP-13 遺伝子と MMP-13 タンパク質発現, ならびに MMP-13 酵素活性が統計的有意（ $p < 0.05$ ）に認められた。さらに、骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシンおよびオステオポンチンの遺伝子ならびにタンパク質発現の亢進が認められた。その一方で、ポリリン酸（0.1 mM）添加による石灰化の亢進（アルカリホスファターゼ活性ならびにアリザリンレッド染色）は認められなかった。MMP-13 siRNA 処理により、骨芽細胞分化マーカーの発現抑制が確認された（ $p < 0.05$ ）。

【考察および結論】

ポリリン酸はヒト骨髓由来間葉系幹細胞において、骨芽細胞分化は誘導するが、その作用は限定的であり石灰化を誘導するに至らないことが示唆された。そして、この分化機構は MMP-13 によって制御されることを明示した。本研究結果は、これまでの我々の報告と同様に、MMP-13 が骨組織再生に関与する生理的機能を有し、ポリリン酸が根尖性歯周炎に代表される骨破壊疾患の治療に有用な成分となる可能性が示唆された。

ナノインデンテーションにおける象牙質コラーゲン線維の物性評価

大阪大学歯学部附属病院 口腔総合診療部
○久保 美寿穂、三浦治郎、清水真人、松田祐輔、竹重文雄

Evaluation of the mechanical properties of dentin collagen using the nano indentation

Division for Interdisciplinary Dentistry, Osaka University Dental Hospital
○KUBO Mizuho, MIURA Jiro, SHIMIZU Masato, MATSUDA Yusuke, TAKESHIGE Fumio

【目的】

象牙質は、加齢に伴い破折耐性が低下することが報告されているが、象牙質コラーゲン線維と加齢に伴う脆性に関する報告は少ない。コラーゲン線維は、血中由来のグルコースなどの還元糖により糖化という影響を受ける。この産生物は AGEs (Advanced Glycation Endproducts) と呼ばれ、多くの非酵素的架橋をコラーゲン線維内に形成するため、コラーゲン線維の伸展性が失われる。この反応は生体内の至る所で起こっており、特に動脈硬化や骨折のリスク因子となることが知られている。象牙質内のコラーゲン線維においても、AGEs が蓄積することが報告されており [1、2]、加齢によりコラーゲン線維の物性が変化し、歯の脆性に大きく関与していると考えられる。本研究は、加齢による象牙質コラーゲン線維のヤング率の変化を、ナノインデンテーション法を用いて明らかにすることを目的とした。

【方法】

本研究は、大阪大学歯学研究科倫理審査委員会の承認のもと、口腔保健の観点から保存不能と判断され、実験の目的と方法を患者に説明し了承を得た歯を対象とした。

齦蝕に罹患していない若年者(20～30 歳)の歯(n=7)と、高齢者(65 歳以上)の歯(n=7)を用意する。セメントエナメル境にて歯冠と歯根象牙質に分けて試料として用いた。試料を 10%EDTA にて 4 週間脱灰し、2%PFA で 2 時間固定する。その後 2 週間乾燥させ、試料をレジンにて台座に固定した。ミクロトームブレードを用いて試料表面の凹凸を除去し、測定を行った。測定は、バーコビッチ圧子を用いてナノインデンター(Nano Indenter G200)により押し込み試験を行い、得られた荷重-変位曲線からヤング率を計算する。

【結果】

若年者のコラーゲン線維のヤング率は 1GPa 前後で、高齢者では 2GPa 前後であった。また、若年者と高齢者のコラーゲン線維ともに、歯髄側象牙質からエナメル質側象牙質へ向かうにつれヤング率は高くなる傾向がある。若年者よりも高齢者のコラーゲン線維は硬くなっており、歯冠象牙質と歯根象牙質ともに同様の傾向が見られた。

【考察及び結論】

象牙細管は歯髄から放射線状に伸びていることから、歯髄側象牙質からエナメル質側象牙質へ向かうにつれ、細管の密度が低下し相対的にコラーゲン線維の比率が増加する。そのため、若年者と高齢者ともに、歯髄側象牙質からエナメル質側象牙質へ向かうにつれヤング率が増加したと考えられる。また、若年者と高齢者のコラーゲン線維のヤング率を比較すると高齢者の方が高く、エナメル質側象牙質、歯髄側象牙質ともに高齢者の方が高かった。これらの結果から、免疫染色における象牙質内の AGEs の陽性部位 [1] と関連があると考えられ、象牙質コラーゲン線維は加齢により AGEs の修飾を受け、硬くなり象牙質の脆性の変化に関与していることが示唆された。

- [1]Miura J, Nishikawa K, Kubo M, Fukushima S, Hashimoto M, Takeshige F, Araki T.
Accumulation of advanced glycation end-products in human dentine. Archives of oral biology 59 (2014) 119-124
[2]Fukushima S, Shimizu M, Miura J, Matsuda Y, Kubo M, Hashimoto M, Aoki T, Takeshige F, Araki T.
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

Heparin-LL37 複合体による抗菌作用の検討

広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 歯髄生物学的研究室
○吉田 和真, 鈴木 茂樹, 中西 惇, 永安 慎太郎, 小武家 誠司, 柴 秀樹

Antimicrobial ability of Heparin-LL37 hybrid

Department of Biological Endodontics, Institute of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University
○Kazuma Yoshida, Shigeki Suzuki, Jun Nakanishi, Shintaro Nagayasu, Seiji Kobuke and Hideki Shiba

＜研究目的＞ LL37 は塩基性の 37 アミノ酸残基からなる抗菌ペプチドで、ヒト自然免疫に関与する Cathelicidin に分類され、human-cathelicidin-18 (hCAP18) がプロテアーゼによって切断された後の C 末端ペプチドである。LL37 は限局したスペクトルを持つ抗菌剤とは異なり、様々な細菌に対して高い抗菌活性を有し、抗菌剤耐性細菌の出現等のリスクが無いことから感染性疾患への臨床応用が期待されている。LL37 は細菌の Lipopolysaccharide (LPS) に高い結合能を持ち、LPS に結合した LL37 は endocytosis によって細菌内に取り込まれ、その高い塩基性によって細菌を傷害し抗菌作用を発揮するとされている。LL37 の *in vitro* における抗菌作用は 1 μ M 程度で明らかである一方で、10 μ M 程度の高濃度では抗菌活性のみならず細胞障害性も有することが報告されている。哺乳類細胞障害性の発現メカニズムの詳細は不明であるが、endocytosis によって取り込まれた LL37 の高い塩基性によって細胞障害性が生じると考えられている。このような背景から LL37 の臨床応用を実現するには投与局所において至適濃度を長期間維持する手法の開発が必要である。

一方で、LL37 は LPS のみならず、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸などのグリコサミノグリカン (GAG) にも結合する。そこで我々はこの LL37 の GAG への結合に着目し、GAG と LL37 の複合体 (GAG/LL37) は、宿主細胞表面では GAG の保護作用により LL37 の細胞障害性発現が抑制されるが、細菌表面では LPS との高い親和性によって GAG/LL37 複合体から LL37 が乖離し抗菌作用を発揮すると推定した。本研究においては GAG の一種である Heparin と合成 LL37 ペプチドを種々の濃度で結合させた複合体を作製し、高い抗菌作用を有しつつも細胞障害性を示さない GAG/LL37 複合体を作製することを目的とした。

＜材料および方法＞ 哺乳類細胞株は、MG63 (ヒト骨肉腫細胞株) を使用した。37°C、5% CO₂ 雰囲気下、10%FBS 添加 DMEM 培地にてサブコンフルエントまで培養後、継代し、実験に供した。96 well プレート 1 well あたり 2.0x10⁵ 個/ml の濃度の FBS 含有細胞懸濁液 100 μ l 播種し、24 時間後、FBS 非含有 DMEM 培地にて洗浄後、24 時間インキュベーションし、種々の濃度の Heparin-LL37 複合体を加えた。刺激 24 時間後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定し、crystal violet 染色によって細胞生存率を評価した。大腸菌株は、HST08 *Escherichia coli* competent cell を Kanamycin 耐性遺伝子含有ベクターでトランスフォーメーションしたものを使用した。LL37 および各種試薬を 10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8) にて混合後、ローテーターによって転倒混和し 1 時間反応させた。O.D. 600:0.5~0.6 の大腸菌懸濁液を 10 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 6.8) にて 100 倍に希釈し、大腸菌希釈液と Heparin-LL37 複合体を 1:20 の割合で混合した。その後、37°C にて 2 時間保温後、50 μ g/ml Kanamycin 含有 LB 寒天培地に適量播種し、37°C で 1 晩培養し、CFU によって LL37 の抗菌活性を評価した。

＜結果＞ 大腸菌および MG63 細胞は LL37 単独刺激により生存率が著しく低下した。しかし Heparin-LL37 複合体は Heparin と LL37 の混合比によっては、大腸菌の生存率は低値を示すが、MG63 細胞の生存率が改善される至適混合比が存在した。

＜考察および結論＞ 本研究から LL37 の抗菌活性を維持しつつ、哺乳類細胞の生存率を改善する Heparin-LL37 の至適混合比が存在した。このように作製した Heparin-LL37 複合体は LL37 単独と比べて細胞障害性が低い新規の抗菌剤であることが判明した。また、これまでに LL37 はサイトカイン産生や血管新生に関与することが示されている。Heparin-LL37 複合体はより効果的に細胞機能を制御する因子になり得る可能性が考えられた。

ヒトセメント芽細胞を Lipopolysaccharide で長期刺激した際の 硬組織形成関連遺伝子のメチル化

東京歯科大学 歯科保存学講座
○小林史枝、村松 敬、佐古 亮、古澤成博

Long-term lipopolysaccharide stimulation induces DNA methylation of mineralized tissue formation-related genes in human cementoblast.

Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College
○Fumie KOBAYASHI, Takashi MURAMATSU, Ryo SAKO, Masahiro FURUSAWA

【目 的】

根尖性歯周炎において、根管治療後の理想的治癒形態は、根尖部が新生セメント質により覆われる骨性癒痕治癒であるが、難治性の根尖性歯周炎の中には根尖が硬組織で覆われることなく経過するものが存在する。これまでの研究では根管治療時の根尖部の過拡大が原因で骨性癒痕治癒が起こりにくいということが報告されてきた。近年、細菌感染により宿主細胞の遺伝子にエピジェネティックな変化が起こることが報告されるようになってきたが、セメント芽細胞が細菌刺激をうけることで同様な変化を起こすのかは明らかとなっていない。本研究では、セメント芽細胞にグラム陰性菌の細胞壁成分である lipopolysaccharide (LPS) で長期刺激を与えた際の硬組織形成関連遺伝子の DNA メチル化と硬組織形成能を検討した。

【材料及び方法】

実験には、テロメラーゼを導入したヒトセメント芽細胞 (HCEM, 広島大学・高田 隆教授より供与) を用いた。培地には α -MEM (10% FBS, 100IU penicillin-streptomycin 添加) を使用し、35mm ディッシュに 1×10^5 個の密度で細胞を播種した。24 時間後、培養液に *E. coli* 由来 LPS (Sigma-Aldrich 社) を $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加し、1 か月後に細胞から DNA を抽出し、Epitect Plus Bisulfite kits (Qiagen 社) にてバイサルファイト処理を行った。その後、SYBRGreen を用いた定量的 real-time PCR にて *Bone morphogenetic protein 2* (*BMP2*), *Bone morphogenetic protein 4* (*BMP4*), *SOST/sclerostin*, *Gap junction protein alpha 1* (*GJA1*) の DNA メチル化を検索した。なお対照群としては LPS の代わりに α -MEM を添加したものをを用いた。硬組織形成能の検索には LPS を添加した硬組織誘導培地 (10mM β -glycerolphosphate, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ L-ascorbic acid, 10nM Dexamethasone 添加) にて 2~3 週間、HCEM を培養後、4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、アリザリンレッド染色 (Wako 社) ならびに ALP 染色 (Wako 社) を行った。また、ALP 活性の検討については Lab Assay™ALP (Wako 社) を用いて吸光度 (波長 405nm) を測定した。

【結 果】

定量的 real-time PCR の結果、LPS 添加群は対照群と比較して、*GJA1*, *BMP2*, *BMP4* に有意に高メチル化 (hypermethylation) がみられた ($P < 0.05$)。一方、*SOST* では明らかな有意差は認められなかったが LPS 添加群は対照群と比較して低メチル化 (hypomethylation) がみられた。アリザリンレッド染色ならびに ALP 染色においては LPS 添加群では対照群と比較して強い染色性を示す傾向が見られた。また、ALP 活性についても LPS 添加群は LPS 非添加群と比較して有意差は認められなかったものの低下傾向がみられた。

【考察】

これまでの研究ではセメント芽細胞の硬組織形成関連遺伝子をエピジェネティックな観点から調べた報告はない。*BMP2*, *BMP4* は Smad 経路に関与しセメント質の増殖と分化を促進し、*SOST* は Wnt- β catenin 経路と Smad 経路を抑制することが知られている。また、*GJA1* は眼歯指症候群の原因遺伝子であり、発現低下により硬組織形成不全をきたすことが報告されている。本研究の結果からは、セメント芽細胞が LPS の長期刺激を受けることにより *GJA1*, *BMP2*, *BMP4* の hypermethylation, *SOST* に hypomethylation といった硬組織形成関連遺伝子にエピジェネティックな変化が生じることが明らかとなり、これによりセメント質形成が阻害されることが示唆された。

根尖性歯周炎と Wnt/ β -catenin シグナルとの関連性についての解析

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)
○成瀬陽菜¹, 伊藤祥作¹, 山内裕香子¹, 伊藤勇紀¹, 林 美加子¹

The analysis of the relevance between periapical periodontitis and Wnt/ β -catenin signaling pathway.
Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○NARUSE Haruna¹, ITOH Shousaku¹, YAMAUCHI Yukako¹, ITOH Yuuki¹, HAYASHI Mikako¹

【目的】

根管内からバクテリアなどが根尖孔外に侵入にするとマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞により貪食されT細胞を活性化する。活性化したT細胞は様々な液性因子を分泌し、抗体産生を誘導し、バクテリアの侵入を阻止する。また、分泌された液性因子は、骨芽細胞や破骨細胞前駆体などにも作用し、破骨細胞の分化を促進する。その結果、根尖周囲歯槽骨の吸収が生じる。このように、宿主側の免疫応答、そして免疫応答によって引き起こされる骨恒常性の破綻により根尖性歯周炎が生じる。ところで、Wnt/ β -catenin シグナル経路は、免疫応答や骨恒常性の両方に関与していることがこれまでに報告されている。そこで、免疫応答や骨恒常性を制御する Wnt/ β -catenin シグナル経路と根尖性歯周炎発症との関連性について *in vivo* の実験系にて解析し、新しい知見が得られたので報告する。

【方法】

Wnt/ β -catenin シグナル経路阻害薬 IWR-1 投与群と非投与群との根尖病変の比較

1. 8 週齢の C57BL/6J マウスを全身麻酔下にて、左側第一大臼歯を 1/4 ラウンドバーにて天蓋除去を行った後、#8 の K ファイルを用いて根尖の破壊を行った。
2. 露髄当日から 1 日 1 回、尾静脈から以下の溶液を連続投与した。
 - 1) IWP-1 投与群: DMSO に IWP-1 を溶解したものを PBS にて希釈した溶液 (IWP-1: 2.5 μ mol/ kg)
 - 2) IWP-1 非投与群: DMSO を PBS にて希釈した溶液
3. 根尖病変体積の測定
露髄後、経時的にマイクロ CT (理学メカトロニクス, R_mCT2) 撮影を行った。根尖病変体積は骨形態計測ソフト (RATOC, TRI 3D-BON) を用いて算出し、3 次元の評価を行った。
4. 病理組織学的観察
上記実験に供したマウスを還流固定した後、下顎骨を採取し、脱灰を行った。その後組織切片を作成し病理組織学的観察を行った。
5. 統計学的解析
病巣体積の統計学的有意差の検定は Student's *t* 検定を用い、危険率を 5% で評価した。

なお、本研究における全ての動物実験は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の審査を受け、承認のもとに実施した (受付番号: 動歯-21-002-0 および動歯-26-011-0)。

【結果および考察】

マイクロ CT による定量解析の結果から、露髄 2 週間における IWP-1 投与群と非投与群の近心根の根尖病巣の平均体積はそれぞれ 1.72 $\pm$ 0.43mm³、2.08 $\pm$ 0.20mm³ であり、統計学的有意差が認められた ($p < .05$)。また、露髄 3 週間におけるそれぞれの近心根の根尖病巣の平均体積は 1.88 $\pm$ 0.53mm³、3.74 $\pm$ 1.08mm³ であり、IWP-1 投与群の方が有意に大きかった ($p < .05$)。以上の結果から、Wnt/ β -catenin シグナル経路は、病変の拡大と関係していることが *in vivo* における解析の結果、明らかとなった。今回得られた知見は、Wnt/ β -catenin シグナルを制御することで根尖性歯周炎を治癒へと導くことができる可能性があることを示唆している。今後、根尖性歯周炎の発症と Wnt/ β -catenin シグナル経路の関連について更なる検討が必要と思われる。

【結論】

Wnt/ β -catenin シグナル経路の阻害により、根尖性歯周炎の病変拡大が生じることが明らかとなった。

マクロファージからの TNF- α 産生を誘導する歯髄細胞特異的因子の探索

広島大学 大学院医歯薬保健学研究院 歯髄生物学的研究室

○ 永安慎太郎、鈴木茂樹、中西惇、吉田和真、土屋志津、本山直世、小武家誠司、柴 秀樹

Exploration of a dental pulp cell-derived specific factor inducing TNF- α production from macrophages

Department of Biological Endodontics, Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University
○Shintaro Nagayasu, Shigeki Suzuki, Jun Nakanishi, Kazuma Yoshida, Shizu Tsuchiya, Naoyo Motoyama, Seiji Kobuke and Hideki Shiba

【研究目的】

歯髄炎の初期反応では、歯髄に浸潤したマクロファージから腫瘍壊死因子 (TNF)- α が分泌され炎症反応が亢進する。これまでに歯髄細胞とマクロファージの共培養系を用いた実験から lipopolysaccharide 刺激時に tumor necrosis factor (TNF)- α などの炎症性サイトカイン産生が相乗的に亢進することが明らかにされている (Yonehiro J, et al. *Int. Endod. J.* 2012.)。我々の研究室では歯髄細胞の培養上清をマクロファージに添加した場合、マクロファージからの TNF- α 産生能が顕著に亢進し、ヒト歯肉線維芽細胞とヒト歯周靱帯細胞の培養上清では亢進しないことを示した。これらの結果は、歯髄細胞が分泌する何らかの因子がマクロファージの炎症を惹起する可能性を示唆している。Exosome は種々の細胞から放出され、タンパク質や核酸などを含み、細胞間の情報伝達に重要な役割を果たしている。本研究では、歯髄細胞の培養上清中の Exosome によるマクロファージからの TNF- α 産生誘導について調べた。また、歯髄培養上清による TNF- α 産生誘導への NF- κ B の関与も検討した。

【材料と方法】

供試細胞：マクロファージ：購入したヒト単球様細胞株 THP-1 を PMA で分化させ、マクロファージ様細胞とした。DP-1：ヒトテロメラーゼ逆転写酵素および simian virus 40 の SV40T 抗原の遺伝子導入によって不死化したヒト歯髄細胞 (本学大学院、口腔顎顔面再建外科 太田耕司先生から御供与)。ヒト歯髄細胞 (dental pulp cells : DPC) およびヒト歯肉線維芽細胞 (gingival fibroblasts : GF)：広島大学病院において、研究協力の同意の上で組織を採取し培養皿上で遊出してきた細胞。(本学臨床研究倫理審査委員会の承認 承認番号：81)。

培養上清の TNF- α 誘導能の確認：10%血清存在下で DP-1、DPC、GF をサブコンフルエントまで培養し PBS で洗浄、さらに、24 時間無血清で培養した後、それぞれの培養上清をマクロファージに作用させ、TNF- α 産生量を ELISA キットによって測定した。

Exosome の TNF- α 産生誘導能の検討：DP-1、DPC を 24 時間無血清で培養した後、それぞれの培養上清から Exosome を回収し(PureExo Exosome Isolation kit)、マクロファージに作用させ、TNF- α 産生量を ELISA キットによって測定した。

マクロファージにおける NF- κ B シグナル伝達の検討：DP-1 と DPC の培養上清をマクロファージに添加し 0,10,30,60 分後にサンプルを回収し NF- κ B サブユニット p65 のリン酸化蛋白をウェスタンブロット法にて検出した。

【結果】

GF と比較して DP-1、DPC の培養上清を添加したマクロファージから強い TNF- α 産生誘導が確認された。DP-1、DPC の培養上清から回収した Exosome を添加したマクロファージ培養系において、強い TNF- α 産生誘導が確認された。マクロファージの p65 のリン酸化は DP-1、DPC の培養上清添加によって顕著に促進した。

【考察】

以上の結果から、歯髄細胞の培養上清中の Exosome に含まれるタンパク質および核酸がマクロファージからの TNF- α 誘導因子の候補であること、さらに NF- κ B シグナル経路が TNF- α 産生誘導に関わる可能性が示唆された。

歯髄結石と大動脈石灰変性の関連について

鶴見大学歯学部 歯内療法学講座¹⁾、口腔解剖学講座²⁾

○関水健宏¹⁾、塩崎一成²⁾、千葉敏江²⁾、田井康晴¹⁾、細矢哲康¹⁾、下田信治²⁾

Studies on Dental Pulp Stones and Aortic Calcification

Department of Endodontology¹⁾ and Oral Anatomy²⁾,

Tsurumi University School of Dental Medicine, Yokohama, Japan

○T. Sekimizu¹⁾, K. Shiozaki²⁾, T. Chiba²⁾, Y. Tai¹⁾, N. Hosoya¹⁾ and S. Shimoda²⁾

【緒 言】

歯髄結石(象牙質粒)は真性歯髄結石と偽性歯髄結石に分類される。真性歯髄結石は象牙芽細胞による異所性の象牙質形成あり、偽性歯髄結石は歯髄の退行性変化や細菌等が原因と言われているが、未だ発生機序については不明な部分が多い。一方、大動脈硬化症においても異所性の石灰変性が認められ、大動脈の内膜および中膜において頻繁に石灰変性が生じる。大動脈における石灰変性の発生機序には、脂質代謝や炎症が大きく関わる内膜石灰化と血管平滑筋の軟骨細胞への分化が原因の中膜石灰化がある。本研究では、未だ不明な部分の多い歯髄結石の発生機序の解明を進めるために、解剖学実習で使用させていただいた解剖体において歯髄結石ならびに大動脈石灰変性の関連について調査した。

【材料と方法】

本研究で用いた被験歯と被験大動脈は、平成 27 年度鶴見大学歯学部解剖学実習のために献体していただいた 29 解剖体から摘出した。解剖体は引き取り後、通常処置である血管内へのホルマリン注入ならびにホルマリンプールでの数年の保管を経て研究に供した。29 解剖体(男性 11 体、女性 18 体、死亡時平均 87 歳)のうち、無歯顎の解剖体を除外した 16 解剖体(男性 5 体、女性 11 体)を被験解剖体とした。被験解剖体の歯数は合計 162 本であり、根管治療が施された歯を除いた 118 歯を試料とした。118 歯(上顎前歯 29 本、下顎前歯 50 本、上顎小臼歯 14 本、下顎小臼歯 18 本、上顎大臼歯 6 本、下顎大臼歯 1 本)に対して、マイクロ CT を用いて歯髄結石の発生状況を調査した。さらに有歯顎の 16 解剖体において、石灰変性が頻繁に生じる大動脈弓の彎曲部外湾から 30×30mm の血管壁組織を摘出した。マイクロ CT (100kV, 70pA) にて組織の石灰変性部を確定し、観察用の組織切片を作製した。上昇アルコール系列にて脱水、プロピレンオキシドで透徹後、EPON812 ならびにパラフィンにて包埋し試料とした。EPON 包埋試料はトルイジンブルー染色、パラフィン包埋試料はアリザリンレッド S 染色および von Kossa 染色を施し光学顕微鏡にて観察した。また変性部組織は、走査型電子顕微鏡ならびに電子プローブマイクロアナライザー(EPMA)による元素分析(Ca, P, Mg)を行った。解剖体からの試料の摘出ならびに研究試料の作製にあたっては、日本解剖学会の「臨床医学の教育及び研究における死体解剖のガイドライン」を遵守して実施した。また、本研究は鶴見大学歯学部倫理審査委員会(No.1322)の承認を得て実施した。

【結 果】

被験歯 118 本において歯髄結石は 32 本(上顎前歯 10 本、下顎前歯 12 本、上顎小臼歯 5 本、下顎小臼歯 1 本、上顎大臼歯 3 本、下顎大臼歯 1 本)で確認され発生率は 27%であった。歯種別の発生率は上顎前歯 34%、下顎前歯 24%、上顎小臼歯 36%、下顎小臼歯 6%であった。被験 16 解剖体において、大動脈に石灰変性が確認できたのは 9 解剖体(63%)であり、さらに歯髄結石が認められたのは 4 解剖体(44%)であった。大動脈における石灰変性は、マイクロ CT ならびに電子顕微鏡観察から、主に内膜と中膜の間で石灰変性が認められ、染色標本からも同様の結果が得られた。EPMA の元素分析では、石灰変性部は周囲に比較して Ca ならびに P 値の上昇が認められた。

【考察と結論】

代謝異常や炎症が関与する大動脈石灰変性を生じた場合には、他部位における異所性の石灰変性も十分に予想することができる。本研究の 16 解剖体においては、歯髄結石ならびに大動脈の石灰変性の発生状況における十分な関連は見出せなかったが、さらに被験歯種や状態を整えて観察を続ける必要がある。EPMA 分析から大動脈の異所性石灰変性においてはリン酸カルシウム系の無機成分の関与が示唆された。

骨補填材として応用した象牙質顆粒中の有効成分の探索

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

○奥野公巳郎¹⁾ 川木晴美²⁾ 田中雅士¹⁾ 河野 哲¹⁾ 近藤信夫²⁾ 吉田隆一¹⁾

Research and analysis of effective factors in the dentin particles applied 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

○Okuno Kumio¹⁾ Kawaki Harumi²⁾ Tanaka Masashi¹⁾
Kawano Satoshi¹⁾ Kondoh Nobuo²⁾ Yoshida Takakazu¹⁾

【研究目的】

近年、歯科領域において、骨再生療法を適用する症例が増加している。このような場合、リン酸カルシウム化合物をはじめとする人工骨補填材が臨床応用されている。一方、象牙質は骨に類似した組織であり、矯正治療の為の便宜的な抜去歯や抜去後の智歯などを保存するトゥースバンクなども注目されているが、そのほとんどは有効に活用されていない。そこで、我々は、抜歯後凍結保存された歯を骨補填材として利用することを想定し、操作性への考慮から、象牙質を顆粒状に加工した後にオートクレーブ滅菌を行って応用する方法を考案した。そして、あらかじめ幹細胞と滅菌象牙質顆粒とを共培養し、幹細胞の産生分泌する細胞外基質成分を含むハイブリッド材料の作製を試みた。その結果、滅菌象牙質顆粒がヒト骨髄由来幹細胞やヒト歯髄由来幹細胞の増殖と骨芽細胞様細胞への分化を促進することや、ハイブリッド材料に含まれる幹細胞が実験動物への埋植 4 週間後も生存し骨芽細胞様細胞に分化することを報告してきた。今回は滅菌後の象牙質顆粒に残存するタンパク質について検討を行った。

【材料および方法】

象牙質顆粒作製のため、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、整粒した後オートクレーブ滅菌した。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を用いてハイブリッド骨補填材料を作製し、ヌードマウス皮下への埋植後の評価と、各種顆粒存在下あるいは象牙質顆粒からの溶出物を含む培地での幹細胞や骨髄由来細胞の動態について検討した。また、象牙質顆粒よりタンパク質を抽出した試料、あるいは象牙質顆粒を浸漬した培地試料中のタンパク質の解析を行った。

【結果】

埋植後 6 週間で、骨補填材のみを埋植した群では象牙質顆粒埋植群のみ、顆粒周囲に一層の硬組織様組織形成が誘導され、ハイブリッド象牙質骨補填材でより顕著であった。また、象牙質顆粒存在下で実験に用いた幹細胞の増殖や骨髄由来細胞の破骨細胞分化促進がみられたことから、滅菌後の象牙質中のタンパク質について、新鮮象牙質を比較対照に検討したところ、滅菌象牙質ではタンパク質の溶出量が半減し、低分子化がみられたが、SDS-PAGE の結果では、新鮮象牙質より得た試料と同等の泳動パターンもみられた。さらに詳細な解析を行うため、等電点電気泳動による解析を行っている。

【結論および考察】

滅菌象牙質顆粒ハイブリッド材料が異所性に骨様組織誘導能を発揮したことから、象牙質顆粒にはオートクレーブ滅菌後も硬組織形成を促進する作用を発揮する成分が残されていることが示され、抜去歯の骨再生療法への活用が有望であることが示唆された。また、体性幹細胞を象牙質・幹細胞ハイブリッド骨補填材として用いることの有用性が示された。

青色励起光による感染根管内壁の観察

昭和大学歯学部歯科保存学講座総合診療歯科学部門
○漆畑葵、長谷川篤司

Investigation of the infected root canal wall under the blue inducing light source
Department of Conservative dentistry, Division of Comprehensive Dentistry,
Showa University School of Dentistry
○Aoi URUSHIBATA and Tokuji HASEGAWA

【研究目的】

感染根管治療を難治化させる原因は根尖孔外のバイオフィーム形成などであることは周知であるが、外科的アプローチ以外では依然として機械的、化学的清掃による根管内の無菌化に努めることが最重要であることは疑いない。一方、感染根管再発の原因の多くは緊密でない根充による細菌漏洩であり、根管内で脱灰、脆弱化された歯質は再石灰化の望めない点からも可能な限り除去するのが望ましいと考えられる。

演者らは、すでに歯内治療に応用できる内視鏡システムを発表しており、モニターで根管内を観察しながら選択された部位だけを機械的清掃できる可能性を示唆した。加えて内視鏡の光源を青色励起光にすることで、根管内壁に健全象牙質とは異なる赤色励起蛍光部が観察されることを報告した (第 144 回日本歯科保存学会)。

本研究は、感染根管の根管内壁で赤色励起蛍光を発現する歯質の解明を目的に、抜去歯断面で詳細に観察するとともに、発現する赤色励起蛍光の蛍光スペクトル特性や、歯質の機械的強度の変化をも計測して比較検討した。

【材料および方法】

根尖性歯周炎によって抜去されたヒト抜去大臼歯を蒸留水中に保管し、抜去後 20 日以内に観察に供した。抜去歯はトリマーを用いて歯の長軸に沿って根管開口部付近から根尖まで根管孔が連続して観察できる断面を露出させ、耐水研磨紙 #1000 まで研磨して観察試片を完成した。ガッタパーチャポイントなど根管内残遺物は探針、GP ソルベント (日本歯科薬品) などによって機械的・化学的に除去して根管壁を露出させた。

根管壁観察の一連の操作は暗箱内で行われ、カメラ観察専用顕微鏡 (ミツトヨ株式会社 機種番号 ; VMU-LB 378-513) と接続された CCD カメラおよび観察用ソフトウェア (センテック株式会社 StCamSWare v1.10)、パーソナルコンピュータ (DELL 社) を用いて LED 光源から照出された波長 405nm の青色励起光下で根管壁に沿って観察、撮影し、画像を保存した。

次に実体顕微鏡下での画像に基づいて、試作顕微鏡マルチ測光システム下で波長 407nm の青色励起光を照射し、緑色励起蛍光部と赤色励起蛍光部の蛍光スペクトルを分光分析した。

マイクロビッカース硬度は FUTURE-TECH 社 微小硬度計 FM300 にマイクロビッカース針を装着し、荷重 300gf を 10 秒間負荷した後に計測した。同一試片で緑色励起蛍光部、赤色励起蛍光部各 10 か所を測定し、平均値をその試片の計測値とした。

【結果および結論】

根尖性歯周炎で抜去された歯の割断面において、根管壁に沿って波長 405nm の青色励起光で観察したところ、通常の健全象牙質と同様に緑色励起蛍光を発現する部位と赤色励起蛍光を発現する部位とが確認できた。これらの 2 部位の励起蛍光を、試作顕微鏡マルチ測光システムを用いて分光分析すると、緑色励起蛍光では約 580nm 付近にピークを持つスペクトルを、赤色励起蛍光は約 620nm と約 680nm 付近に 2 つのピークをもつスペクトルを示した。

一方、これら 2 部位でマイクロビッカース硬度を計測すると赤色励起蛍光部では有意に低い硬度が計測された。

本研究では、赤色励起蛍光部への細菌感染の有無について検討していないものの、マイクロビッカース硬度の低下は、脱灰による象牙質壁内無機成分の密度低下によるものと容易に推測される。

この様な部位は、根管治療において根管内細菌減少を遅延させる原因となる可能性や、根管充填後の細菌漏洩の原因になる可能性が危惧され、早期に機械的・化学的に除去されることが望まれる歯質であると考察された。

(本研究は昭和大学歯学部医の倫理委員会 (2011-029) の承認を得て行われた。)

6 根管を有する下顎第一大臼歯の根管治療と歯科用コーンビーム CT の有用性

1) 岡山大学病院 歯周科, 2) 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野
○海老沼孝至¹⁾, 坪井綾香²⁾, 大久保圭祐²⁾, 下江正幸²⁾, 山本直史¹⁾, 高柴正悟²⁾

Cone beam computed tomography contributed to the Root Canal Treatment of Mandibular First Molar with 6 Root Canals

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

○EBINUMA Takayuki¹⁾, TSUBOI Ayaka²⁾, OKUBO Keisuke²⁾, SHIMOE Masayuki²⁾,
YAMAMOTO Tadashi¹⁾, TAKASHIBA Shogo²⁾

【緒言】

下顎第一大臼歯の根管は、通常近心 2 根管遠心 1 根管の計 3 根管であるが、遠心 2 根管の計 4 根管を有する場合も多く、さらに出現頻度は低いながらもそれ以上の根管を有する場合もあるので、根管治療時に見落とされやすい。今回、近心 3 根管と遠心 3 根管の計 6 根管を有する左側下顎第一大臼歯の根管治療に際し、歯科用コーンビーム CT が有効であった症例を経験した。

【症例】

患者：43 歳男性。主訴：36 の冷水痛。

現病歴：2015 年 8 月、36 遠心のレジン充填が脱離したが、症状がないため放置していた。10 月頃、冷水痛を自覚するようになり、2016 年 1 月には冷温痛、違和感を感じるようになったため、2 月に通院歴のある岡山大学病院歯周科を受診した。

口腔内所見：36 遠心咬合面の修復物が脱離しており、遠心歯頸部に髓腔に達する齲蝕が存在していた。

デンタル X 線所見：36 遠心歯頸部に歯髓腔と交通した透過像があり、近遠心根とも複数の根尖を疑うような歯根膜腔像の重なりがあった。

【病態と診断】

36 の遠心修復物が脱離し、発症した齲蝕を放置したことによって進行し、感染が歯髓に及んだ歯髓炎

【治療経過】

36 の髓腔開拓を行い、根管口を近心頰側に 1 つ、遠心頰側寄りに 2 つ発見した。しかし、根管口の位置と髓床底の様子から、さらなる根管の存在を疑い、歯科用コーンビーム CT (CBCT) 撮影を行った。その結果、近遠心にそれぞれ 1 根が存在し、それぞれの根に独立した 3 根管を有する計 6 根管 (Vertucci 分類 Type VIII; Vertucci, Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1984) が疑われた。また、近遠心根ともに薄く扁平で、スリット状の穿孔を防止するために根管拡大は最小限の範囲で行う必要があると考えた。

この画像所見に基づいて、歯科用手術用顕微鏡下で根管探索を行い、近遠心にそれぞれ 3 根管、計 6 根管を発見した。歯質が菲薄であることから手用ファイルによる拡大号数を最大 40 号までとして、ガッタパーチャポイントによる側方加圧根管充填を行った。

【考察】

下顎第一大臼歯の根管数は 3 根管が最も多く (61.3%)、次いで 4 根管 (35.7%)、5 根管 (1%) の順となっている (de Pablo et al, *J Endod*, 2010)。本症例のように、6 根管を有する下顎第一大臼歯は海外の症例報告ではわずかに散見される程度であり、日本人においては極めて稀であると考えられる。

本症例では、CBCT 撮影によって根管数のみならず、根形態が薄く扁平であるという特徴的な解剖学的形態を把握することができ、過度な拡大による穿孔を起こさず、より安全に根管治療を行うことができたと考える。

【結論】

CBCT 撮影は、極めて稀な根管数を有する歯の根管治療に有用であることが示唆された。

手用 SS ファイルを用いた根管形成におけるトルクコントロールの効果

奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯周病学分野
○東 春生, 鳥居 祥司, 高橋 慶壮

The effect of torque control on the root canal preparation by using SS hand instruments

Division of Periodontics, Department of Conservative Dentistry,
Ohu University School of Dentistry
○Haruo Azuma, Shoji Torii, Keiso Takahashi

【緒言】

古典的なステップバック法やクラウンダウン法にはファイルの回転トルク（回転角度）を制御するという概念が欠落していた。演者がこれまで経験的に実践してきたステップバック法では、根管内壁の外弯側を過剰に切削していたことを先の本学会で報告した。根管内壁を過剰切削して根管内の感染源を除去出来たとしても、根管内デブリの押し出しによる急発や根尖孔部を破壊すれば長期的には歯根破折のリスクを高める可能性が高い。

演者らは、手用ステンレススチール製 K ファイル（以下 SS ファイル）および各種 Ni-Ti ロータリーシステムで根管形成を行った際の根管形態の変化をマイクロ CT で比較・検討し、MI 概念に基づく理想的な根管形成の法則化を目指している。

本研究の目的は、ステップバック法による根管形成において、ファイル操作時の回転角度を変えた際の根管形成前後の形態変化をマイクロ CT 解析し、トランスポートーション量および根管内壁の切削面積および切削量を比較・検討することである。

【材料と方法】

天然歯を鋳型にして作製した上顎犬歯の透明根管模型（NISSIN 社）15 本を試料に用いた。あらかじめ、根管形成前の全ての模型をマイクロ CT 撮影した。根管形成法は手用 SS ファイル（K ファイル、ジッペラー社）を用いたステップバック法を選択した。臨床経験 10 年の歯科医師(HA)が全ての根管形成を行った。ファイルの回転角度を明視化してファイルを操作した。次に、根管形成時のファイル操作時の回転角度を 90°群および 30°群に設定し、turn & pull 運動で根管形成を実施した（各 n=5）。ファイルを交換するごとに水（1ml）で根管洗浄した。また各群の根管形成開始から終了までの時間を記録した。根管形成終了後、形成前後の画像を解析し、各模型の根管内壁の体積および形態変化を解析した。統計処理には ANOVA を用いた。

【結果】

根管形成の平均時間は 90°群および 30°群でそれぞれ 780, 853 秒であった。根尖側 1/3 において 90°群では 30°群より根管内壁が有意に多く切削されていた ($p<0.01$)。また、根尖側 1/3 におけるトランスポートーション量も 90°群が 30°群に比較して有意に高かった ($p<0.01$)。

【考察および結論】

ファイル操作における turn & pull 運動の回転角度についてコンセンサスは得られていない。しかし、本研究結果から SS ファイル操作時の回転角度を 90°より 30°に設定したほうが根管の形態変化が有意に小さかったことから、ファイル操作時の回転トルクを制御することは根管系本来の形態を保持した根管形成を行うために必須と考えられた。このことは根管形成時の根管の直線化、レジヤトランスポートーションを防止するための有益な情報になり得る。現在、180, 60, 45 および 15°回転群を追加して根管形成時間、根管内壁の切削量および形態変化を解析中である。

本研究で使用した SS ファイル（ジッペラー社）は flexibility が高いため、市販されているファイル間の flexibility の違いが根管形成へ及ぼす影響についても検討する必要がある。

SS ファイルを用いた根管治療の質の担保には科学的に立証された理論に基づくファイル操作のトレーニングが不可欠である。透明模型を用いた根管形成をマイクロ CT 解析する実験系を利用すれば、歯科医師ごとの根管形成の「癖」が科学的に評価でき、技術向上に繋がる。

エンジン用根管拡大形成器具による偏平根管の切削効率の比較

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座
○吉田和貴, 前田宗宏, 勝海一郎

A comparison of cutting efficiency on engine-driven rotary instruments in oval-shaped canals
Department of Endodontics, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo
○YOSHIDA Kazutaka, MAEDA Munehiro, KATSUUMI Ichiroh

【はじめに】

根管拡大形成の目的は、複雑な根管系に存在する細菌や、歯髄残片などの有機物の除去と、緊密な根管充填が行えるよう根管形態を整えることにある。一般に、根管の拡大形成の良否は解剖学的形態に強く影響を受け、偏平な根管では拡大形成時に未切削部位が残存しやすいとされる。本研究では、偏平な根管形態を有する上下顎小臼歯を対象としてニッケルチタン製ロータリーファイルとステンレススチール製ロータリーファイルによる根管の拡大形成前後の形態変化をマイクロ CT を用いて比較、検討した。

【材料および方法】

実験には歯根が偏平傾向にあり単根管性のヒト抜去上下顎小臼歯 10 本を用いた。抜去歯の使用に際しては、日本歯科大学生命歯学部倫理審査委員会の承認 (NDU-T2015-50) を得た。根管の拡大形成には K3XF ファイル (SybronEndo) と ERT ファイル (マニー) を使い、駆動装置として X-スマートプラス (DentsplyMaillefer) を、K3XF ファイルでは回転数 350rpm に、ERT ファイルでは回転数 300rpm に合わせて使用した。根管洗浄には蒸留水を用いた。

髓室開拡大後の根管口部から #10 の K ファイルで根尖まで穿通し、#15 での誘導路を形成した。マイクロ CT (ScanXmate-L080H, コムスキャンテクノ株式会社) を使い、管電圧 80kV, 管電流 100 μ A, スライス厚 60.84 μ m の条件でエンジン用ファイル使用前の連続的な断層撮影を行った。作業長は解剖学的根尖から 1mm を減じた位置までとした。根管の拡大形成は以下の 2 群に分けて行った (n=5)。

K3XF ファイル群: #25/12, #30/04, #35/04, #40/04 の順に使用し、バックリングモーションで拡大形成を行った。#40/04 は作業長に到達したのを確認後、ブラッシングモーションで根管壁全周の拡大形成を行った。

ERT ファイル群: #40/14, #30/02, #40/02, #40/04 の順に使用し、拡大形成は K3XF ファイル群と同様に行った。

根管拡大形成後にマイクロ CT 撮影を行い、エンジン用ファイル使用前後の根管を画像処理ソフト (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った。根管容積を、根管全体、歯冠側 1/2, 根尖側 1/2 とに分けてそれぞれ計測を行った。拡大形成前後の根管容積の差を形成前の根管容積で除した値を根管容積増加率として算出し、K3XF ファイル群と ERT ファイル群の根管容積増加率を Welch の検定により統計処理を行った。

【結果とまとめ】

1. 根管全体の根管容積増加率の平均値は K3XF ファイル群で 16.7%, ERT ファイル群で 37.1%であった。
2. 歯冠側 1/2 の根管容積増加率の平均値は K3XF ファイル群で 13.7%, ERT ファイル群で 30.4%であった。根尖側 1/2 の根管容積増加率の平均値は K3XF ファイル群で 42.6%, ERT ファイル群で 97.9%であった。
3. 根管全体と根尖側 1/2 の根管容積増加率において、K3XF ファイル群と ERT ファイル群の間に統計学的有意差が認められた ($p < 0.05$)。

今回の実験結果から、偏平根管においては ERT ファイルが K3XF ファイルに比べて根管壁切削量が多くなることが明らかとなった。使用ファイルによる根管壁切削量の違いは、使用ファイルのサイズ構成が異なることによるものと推察された。今後、さらに詳細な検討を行う予定である。

ProTaper Gold および ProTaper NEXT の機械的特性の評価

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髄生物学分野
許靖, 〇時田大輔, 木村俊介, 牧圭一郎, 西条美紀, 宮良香菜, 海老原新, 興地隆史

Evaluation of mechanical properties of ProTaper Gold and ProTaper NEXT instruments

Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)
XU Jing, 〇TOKITA Daisuke, KIMURA Shunsuke, MAKI keiichirou, NISHIJO Miki, MIYARA Kana,
EBIHARA Arata, OKIJI Takashi

【研究目的】近年, ProTaper Universal (Dentsply Maillefer 以下「PTU」)と同一形状で Gold-wire に合金を変更した ProTaper Gold (Dentsply Maillefer 以下「PTG」), あるいは PTU の刃部形態を特有のらせん状に変更するとともに合金に M-wire を採用した ProTaper NEXT (Dentsply Maillefer 以下「PTN」) が開発されている。本研究では, PTG および PTN の機械的特性を PTU と比較しつつ評価した。

【材料および方法】

1. 実験群: PTG 群, PTN 群, PTU 群とした。
2. 回転疲労試験: 自作回転疲労試験装置を使用し, 曲率半径 5 mm, たわみ角度 38°の条件で破折までの回数 (以下「NCF: number of cycles to failure」)を算出した。PTG 群は F2, PTN 群は X2, PTU 群は F2 ファイル (各群 n = 7) を 300 rpm で回転させた。潤滑材としてシリコンオイル (KF-96-100CS, 信越化学) を用いた。
3. 曲げ試験: 上記と同一サイズのファイル (各群 n = 7) を被験試料とし, 自作片持ち梁式抗曲試験機を用いて, ファイル先端から支点まで 7 mm, 荷重点まで 2 mm の条件で変位量 0.5 mm および 2.0 mm における荷重を計測し, それぞれ弾性領域および超弾性領域の代表点とした。
4. 破折およびレッジ形成の頻度: J 字型透明湾曲根管模型 (Dentsply Maillefer; 各群 n = 7) を用い, 各群とも #10K ファイルで作業長 (17 mm) を確認後, 自作自動根管形成装置を用い, PTG および PTU 群は ProGlider (Dentsply Maillefer; 以下「PG」)→S1→S2→F1→F2, PTN 群では PG→X1→X2 で作業長まで形成した。なお, 根管形成は, 連続正回転 (300 rpm) かつ 2 秒間根尖方向移動, 1 秒間歯冠方向移動を 10 mm/min にて定速で繰り返すよう装置を設定し, RC-Prep™ (Premier) を根管内に満たして行った。7 根管を続けて形成したが, ファイルの変形および破折を目視で確認した場合, 交換した。また根管形成時にレッジを確認した時点でその根管形成は終了とした。
5. 統計学的解析: 一元配置分散分析および Games-Howell 法にて有意水準 5% で解析した。

【結果】回転疲労試験および曲げ試験の結果を Table 1~3 に示す。同一小文字英字間に有意差を認めた。

Table1: Cyclic fatigue test (NCF) (Mean±S.D.)

PTG	439±44.7 ^a
PTN	762±427.3 ^b
PTU	147±23.6 ^{a,b}

Table2: Bending test at 0.5 mm (N) (Mean±S.D.)

PTG	0.59±0.05 ^c
PTN	0.50±0.07 ^d
PTU	1.34±0.15 ^{c,d}

Table3: Bending test at 2.0 mm (N) (Mean±S.D.)

PTG	2.94±0.12 ^{e,f}
PTN	2.36±0.24 ^{e,g}
PTU	4.01±0.39 ^{f,g}

レッジ形成は PTU 群 F2 で 3 根管に生じた。またファイル破折は, PTG 群, PTN 群で各 1 本, PTU 群では 4 本生じた。

【考察】回転疲労試験では PTG, PTN とも PTU より NCF が有意に大きかったが, これは Gold-wire と M-wire の回転疲労耐性, 加えて PTN では刃部形態の変更を反映したものと考えられる。曲げ試験では弾性領域で PTG, PTN とも PTU より有意に曲げ荷重が小さかったが, これは上記と同様の理由と思われる。また, 超弾性領域では PTN が PTG より有意に曲げ荷重が小さい値となったが, これは PTN の刃部形態を反映した結果と考察される。一方, レッジ形成は PTU で生じたが同一形態である PTG では起きておらず, Gold-wire が根管追従性向上に寄与することが示唆される。また, PTN では刃部形態の変更と超弾性領域での優れた曲げ特性が, レッジ形成の回避につながったと考えられる。

【結論】本実験条件下では, PTG および PTN は, PTU と比較して回転疲労抵抗性および曲げ特性が優れており, 安全な根管形成が可能であることが示唆された。

エンジン用根管拡大形成器具による triangle 値の比較

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座
○永島万理子、勝海一郎

A Comparison of Triangle on Engine-driven Rotary Instruments

Department of Endodontics, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo
○NAGASHIMA Mariko, KATSUUMI Ichiroh

【目的】

ニッケルチタン製の WaveOne (Dentsply Maillefer, Switzerland) と RECIPROC (VDW, Germany) は、1 本のファイルが時計回り・反時計回りの往復回転運動を繰り返すことで、迅速かつ正確な根管形成が可能であり、高い切削効率が得られるとされている。また、triangle 値は根管の頂点の位置を表し、拡大形成前後でこの値の変化量が少ないほうが根管に追従し偏位の少ない拡大形成ができたことを示すとされている。本研究は、WaveOne、RECIPROC、ERT ファイル (マニー)、ステンレススチール製の K ファイル (マニー) で拡大形成されたヒト上顎側切歯抜去歯の triangle 値を比較・検討した。

【材料および方法】

実験には、ヒト上顎側切歯抜去歯 20 本を用いた。実験に先立ち、#10 の K ファイルで根尖まで穿通し誘導路 (glide path) を形成した後、ランダムに以下の 4 つの群 (各 n=5) に分けて拡大形成を行った。作業長は根管長マイナス 1mm とし、洗浄には 10%次亜塩素酸ナトリウム液と蒸留水各 2.5ml を用いた。また、専用モーターとしては WaveOne と RECIPROC は X-スマート (Dentsply Maillefer) を、ERT ファイルはトライオート ZX (モリタ) を使用した。

WaveOne 群 : WaveOne small で 2~3mm 振幅の弱圧によるペッキングモーションで拡大形成した後、根管内を洗浄しファイルに付着した切削片を除去した。

RECIPROC 群 : RECIPROC R25 で 2~3mm 振幅の弱圧による 3 回のペッキングモーションで拡大形成した後、ファイルと根管内の洗浄を行った。

ERT ファイル群 : ERT ファイルで使用順序に従い拡大形成した。また、ファイル交換時にファイルと根管内の洗浄を行った。

K ファイル群 : K ファイル #10~#25 で拡大形成し、号数を上げるごとに根管内の清掃を行った。

すべての拡大形成は次亜塩素酸ナトリウム湿潤下で行った。拡大形成前後にマイクロ CT (ELE-SCAN、日鉄エレクトクス) を用い、管電圧 80kV、管電流 60 μ A、解像度 512×512pixel、スライス厚 56 μ m の条件で連続的な断層撮影を行い、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って triangle 値を算出した。

【成績】

Triangle 値の平均変化量は、WaveOne 群では 4612.0、RECIPROC 群では 5706.4、ERT ファイル群では 4911.0、K ファイル群では 6580.0 であった。

【考察】

以上の結果より、エンジン用根管拡大形成器具を使って根管の拡大形成を行った場合に triangle 値の変化が少なく、拡大形成による根管の偏位が少なかった。以上から、エンジン用根管拡大形成器具の使用は、根管の拡大形成においてパーフォレーションや歯質の菲薄化を防止する可能性が考えられる。今後、さらに詳細な解析を進めていく予定である。

(なお、抜去歯の使用に際しては、日本歯科大学生命歯学部倫理委員会の承認 (NDU-T2015-11) を得た。)

3D プリンタで作製した樋状根管模型ブロックによる手用ファイル操作法の評価

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座
○関谷美貴, 前田宗宏, 勝海一郎

Evaluation of Hand Instrumentation Methods Using the C-shaped Root Canal Model Block Made by 3D Printer

Department of Endodontics, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo
○SEKIYA Miki, MAEDA Munehiro, KATSUUMI Ichiroh

【はじめに】

3D プリンタはコンピュータ上で作製した三次元データをもとに立体物を造形する装置であり, 歯科医療分野においてもさまざまな形での応用が期待されている。樋状根管は, 日本人における出現頻度の高さと変異に富んだ複雑な根管形態により, 歯内療法の高難易度な歯種とされる。

本研究は, 3D プリンタでヒト抜去歯とほぼ同形態の樋状根管模型ブロックを作製し, 手用ファイルの操作法による根管清掃性を評価した。

【材料と方法】

マイクロ CT (ELE-SCAN, 日鉄エレクトックス) を用いて断層撮影を行い, 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) によって三次元画像構築を行ったヒト抜去歯の画像データから, Fan らの分類で C1 (分岐や分割のない連続した“C”を示す) の樋状根管形態に最も近い 1 歯を選択した。抜去歯の使用に際しては, 日本歯科大学生命歯学部倫理委員会の承認 (NDU-T2015-33) を得た。

3D プリンタと造形用樹脂模型を用いて, ヒト抜去歯のセメントエナメル境から根尖までの根管形態を再現した樋状根管模型ブロックを作製後, 根管表面に赤色の油性顔料を一層塗布した。

ブロックは, 卒業 4 年目の術者 1 名が #15K ファイル (マニー) を用いて作業長 (根管長 - 1 mm) を決定した後, 根管形態を視認できないようブロック外周に不透明テープを巻いた状態で, 根管口の外形に沿って以下の 4 つの群 (各 n=5) で #25 まで根管形成を行った。ファイルを交換するごとに生理食塩水で根管内切削片を洗浄し, #15K ファイルを用いて目詰まりがないかを確認した。

A 群: 円周ファイリング

B 群: 円周ファイリング + ウォッチワインディング法

C 群: 円周ファイリング + ターンアンドブル法

D 群: 円周ファイリング + バランス・フォース法

根管形成後の根管表面に黄色の水溶性顔料を再度塗布し, 黄色顔料が見える部位を根管切削部位, 赤色顔料残存部位を根管未切削部位とした。マイクロスコープ (VHX-100, KEYENCE) を用いて, 5 倍の拡大下で各ブロックの 4 側面からそれぞれ撮影を行い, 各群における根管未切削部位について観察および比較を行った。

【結果とまとめ】

1. A 群と比較して, B・C・D 群は根管全周にわたり未切削部位が少なかった。とくに B 群では湾曲部と狭窄部における未切削部位が少なかった。
2. C 群・D 群では根管中心部と根尖部の未切削部位が少なかった。
3. すべての群で内湾壁に未切削部位が多く見られた。

以上の結果から, 樋状根管の根管壁全体を切削拡大するためには, 根管壁全周の切削に有用な円周ファイリングによる上下運動と, 湾曲部や狭窄部・根尖部の切削に有用な回転運動によるファイル操作法の併用が望ましいことが示された。しかし, いずれの拡大形成法においても根管未切削部位が存在したことから, 臨床において化学的清掃剤の併用が必要であることが示唆された。今後, さらに樋状根管歯の形態的特徴を踏まえた根管の拡大形成法や根管充填法の研究を進めていく予定である。

電解酸性機能水を利用した根管消毒法の検討

日本大学歯学部歯科保存第Ⅱ講座¹、病理学講座²、細菌学講座³
総合歯学研究所生体防御部門⁴、総合歯学研究所高度先端医療研究部門⁵
○岡村貞之介¹、五條堀孝廣^{2,4}、勝呂尚^{1,5}、田村宗明^{3,4}、浅野正岳^{2,4}、小木曾文内^{1,5}

Bactericidal Effect of acid electrolyzed functional water

Department of Endodontics¹, Pathology² and Microbiology³, Division of Immunology and Pathobiology⁴, Division of Advanced Dental Treatment⁵, Dental Research Center,
Nihon University School of Dentistry
○T.Okamura¹, T.Gojoubori^{2,4}, H.Suguro^{1,5}, M.Tamura^{3,4}, M.Asano^{2,4}, B.Ogiso^{1,5}

[目的]

電解酸性機能水 (acid electrolyzed functional water ; FW) は様々な細菌に対して殺菌効果があるとされている。今回我々は難治性根尖性歯周炎の原因菌の1つである *E.faecalis* (通性嫌気性グラム陽性の連鎖球菌) に注目し、*E.faecalis* に対する FW の殺菌作用について実験を行った。本研究では、1) FW を蒸留水で段階的に希釈し、*E.faecalis* に対する殺菌効率を比較するのに加え、2) FW の殺菌メカニズムについて解明することを目的とした。

[方法]

実験には、FW (pH2.7、酸化還元電位 1,100 mV 以上、有効塩素濃度 20～30 ppm、三浦電子社製)を用いた。

1. FW の殺菌効果の比較

5×10⁸ cfu/ml の菌数に調整した *E.faecalis* 10 μl を、FW 原液および蒸留水により段階的に希釈した FW (10、30、50、70、90 %になるよう希釈したもの) 1000 μl に懸濁し、30 秒間反応させた。懸濁液をそれぞれ 100 μl 採取し、Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地にプレーティング後、37 °C恒温槽にて 48 時間培養した。培養後コロニー数をカウントすることで各希釈液における *E.faecalis* の viability を測定した。

2. 各 FW 希釈液の pH 測定

FW の殺菌力の pH 依存性について検討する目的で、上記実験で使用した希釈液の pH を、pH メーター(HORIBA 社製)を用いて計測した。

3. 殺菌効果の検討

pH および有効塩素濃度を様々に変化させた FW を作製し、上記の 1. と同様の方法により殺菌効果により検討した。

[結果]

1. *E.faecalis* の viability は FW 10 %溶液で減少傾向を示し、FW 50 %溶液で viability はほぼ 0 %となった。
2. FW の蒸留水での希釈により段階的な pH の上昇が見られ、pH は弱酸性領域でも殺菌効果を有する可能性が示唆された。
3. いずれの電解水においても電解水 10 %溶液で viability の低下が観察された。また有効塩素濃度は 40 ppm までであれば殺菌効果が認められた。

[考察]

FW の殺菌力はわずか 10%から発揮された。またその殺菌効果は有効塩素濃度に依存することがわかった。*E.faecalis* に対する殺菌効果は、有効塩素濃度 10~15 ppm の条件で有効に発揮されていることが解った。しかし pH は弱酸性領域でも効果があると考えられた。今回の実験条件では FW 1000 μl に菌液 10 μl を懸濁後、100 μl のプレーティングを行った。懸濁した際のタンパク濃度は 5.97 μg/ml であった。殺菌効果を発揮する詳細については今後さらに検討していく必要がある。

EDTA 溶液の根管洗浄効果における最適濃度の検討

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 歯髄生物学講座¹⁾

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 口腔科学講座クリニカル・バイオマテリアル²⁾

○藤巻龍治¹⁾, 鈴木二郎¹⁾, 大橋 桂²⁾, 石井信之¹⁾

Study of The Optimum Value of The EDTA solution in The Root Canal Cleaning

Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University¹⁾

Division of Clinical Biomaterials, Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry,

Kanagawa Dental University²⁾

○FUJIMAKI Ryuji¹⁾, SUZUKI Jiro¹⁾, OHASHI Katsura²⁾, TANI-ISHII Nobuyuki¹⁾

【研究目的】

歯内療法における根管形成と根管洗浄は、根管内感染源除去に不可欠でその成否が治療予後に影響を及ぼす。根管壁表面に生じるスミヤー層は、根管洗浄液の浸透を阻害するとともに、根管充填物の封鎖性を低下させると報告され、EDTA 製剤などで除去する必要がある。EDTA 溶液における効果的脱灰作用は pH の変化によって変動するがスミヤー層の除去と同時に過剰脱灰を阻止することが必要で、現在までに EDTA の最適濃度は明らかにされていない。本研究は、pH および濃度の異なる新規 EDTA 溶液を作用させた根管象牙質の表面硬さを評価し、EDTA 溶液の最適化に向けた検討を行うことを目的とした。

【材料および方法】

実験 1. ナノインデンテーション法(超微小押し込み硬さ試験)による脱灰象牙質の評価

ヒト単根抜去歯の歯冠を切除後、垂直方向に切断し、断面が上面となるように歯科用レジンに包埋した。耐水研磨紙(～#2000)を用いて健康象牙質を露出させ、表面が平面となるまで研磨を行ない、象牙質表面にスミヤー層を実験的に誘導した。露出させた象牙質表面の半面をテープで覆い、残り半分に対し新規 EDTA 溶液(pH12.3 0.43mol/L EDTA, 日本歯科薬品㈱)を 1, 2, 5, 10, 60 分間と経時的に作用させ、各時間の根管象牙質表面硬さを、超微小押し込み硬さ試験機(ENT-1100a エリオニクス)を用い、押し込み硬さ(HIT)、マルテンス硬さ(HM)および押し込み弾性率(EIT)の測定を行った。なお、統計学的解析は *Unpaired t-test* ($P<0.01$) を用いて行った。

実験 2. 脱灰象牙質の電顕の評価

実験 1 終了後の試験片に白金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡(SS-550, 島津製作所)にて、任意の点(3 か所)を撮影し、根管象牙質表面の観察を行い検討した。

【結果】

実験 1. EDTA 処理の経時的变化において HIT 値では有意差は認められなかったが、HM 値では 60 分後、EIT 値においては 10, 60 分後で処理前と比べ有意差が認められた。

実験 2. 適切な象牙細管の開口とスミヤー層除去効果が観察されたが、過剰な脱灰象牙質の微細構造は認められなかった。

【考察および結論】

EDTA 濃度の高い新規 EDTA 溶液は、pH 調整によりカルシウムイオンに対するキレート力が増強され適切なスミヤー層除去効果を有していたが、根管象牙質に長時間作用させた場合、根管象牙質に対して統計学的に有意差が出ることを確認した。しかしながら臨床的な作用時間内(1～15 分)であれば、根管口部、根管中央および根尖部において、処理後の象牙質硬さの変化や、スミヤー層の除去効果などに差は認められなかった。

(なお、本研究は神奈川歯科大学研究倫理審査委員会承認【承認番号 326】の下実施した)

ラット歯根未完成歯の抜髄後に行ったリバスキラリゼーションの組織学的観察 —第2報—

1) 日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科 硬組織機能治療学

2) 日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第1講座

○飯野華絵¹⁾、新井恭子²⁾、北島佳代子²⁾、山田理絵²⁾、五十嵐 勝^{1, 2)}

Histological observations of revascularization after pulpectomy of immature rat teeth -part2-

1) Advanced Operative Dentistry-Endodontics, The Nippon Dental University

Graduate School of Life Dentistry at Niigata

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

○IINO Hanae¹⁾, ARAI Kyoko²⁾, KITAJIMA Kayoko²⁾, YAMADA Rie²⁾ and IGARASHI Masaru^{1, 2)}

【緒言】不可逆性歯髄炎は歯髄除去療法が適応されるが、歯根未完成歯では根尖の位置が定まらないため、抜髄に困難を伴う。そこで根尖部付近までの歯髄を摘出し、アペキシフィケーションに準じて水酸化カルシウムが根管貼薬される。この場合、根尖組織が生存して残存しているため、治療後は歯根尖の継続した成長が期待できるが、貼薬された根管は太いま残存する。一方、リバスキラリゼーションでは、根管内に血餅を誘導し、血餅上部にMTAや水酸化カルシウムを貼薬することにより、その後根管内に硬組織形成がみられ歯根の成長も期待できる。第144回日本歯科保存学会において、ラット歯根未完成歯の抜髄例にリバスキラリゼーションを行い、術後2週で根尖部に線維性組織の形成がみられ、術後4週で限局した線維性組織と、根管口部から根尖部までの広い範囲の根管壁に骨様硬組織形成が起こることを報告した。今回われわれは1週例の短期症例と水酸化カルシウムを貼薬した症例を追加し比較検討したのでその結果を報告する。

【方法】実験動物として6週齢のWistar系雄性ラット(n=56)を使用し、上顎右側第一臼歯(M1)の近心根管を用いた。全身麻酔後、ラバーダム防湿下で髓室開拓、歯冠部歯髄の除去を行った。6%次亜塩素酸ナトリウムと3%過酸化水素水で髓室内を交互洗浄し、近心根管の歯髄を作業長3.5mmで#10、15、20のHファイル及び抜髄針を用いてマイクロスコープ下で摘出後、NiTiファイル(PROTAPER® F1、DENSPLY)で根管拡大を行った。根管内が空虚になったことを確認後、根管を生理食塩液で洗浄した。#10のHファイルでオーバーインストルメントして出血を起こし、根管口まで血餅形成確認後、血餅上にMTAまたは水酸化カルシウムを貼付し、上部をレジン系裏層材で裏層後、コンポジットレジン充填を行った。近心根以外の根管は生活断髄を行った。術後1週、2週、4週に4%パラホルムアルデヒド溶液にて全身灌流固定を行い、被験歯を根尖歯周組織を含めて摘出し、さらに浸漬固定を行った。10%EDTAで脱灰し、通法に従いパラフィン包埋後、厚さ6μmの連続切片を作製し、HE染色を施し光顕にて観察した。なお本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理委員会の承認(承認番号NDUN-189)を得て実施された。

【結果】充填物脱離や歯根破折のあった11症例を除いた45症例について観察を行った。全症例において根管内組織および根尖歯周組織に炎症所見、感染所見はみられなかった。術後1週では両群ともに根尖孔の閉鎖はみられなかった。水酸化カルシウム群の根管内には、根管口から根尖1/3まで無構造な所見を呈す組織がみられた。術後2週では両群とも根尖孔は狭窄化を示していた。術後4週では両群とも根尖孔閉鎖と歯根の伸長、歯根の肥厚化がみられた。MTA群では根管内の線維性組織は一部に限局してみられ、根管口部から根尖部までの根管壁には硬組織形成がみられた。水酸化カルシウム群では根尖1/3で線維性組織と根管壁に沿った硬組織形成がみられた。

【考察】水酸化カルシウム群では根管口から根尖1/3まで根管内に無構造部位があり、その影響で組織再生は起こらなかったと考えられる。また根尖部1/3にみられた線維性組織と硬組織はMTA群の組織所見と類似していたことから、根尖部からの出血で形成した血餅は、根尖部組織に継続する線維性組織を経て、硬組織形成することが考えられる。今後は免疫染色を用いて根管内の組織を詳細に検討する予定である。

【結論】ラット歯根未完成歯の抜髄後に行ったリバスキラリゼーションによって歯根の伸長、根尖孔の閉鎖、根管内の硬組織形成がみられた。

エンドレズをラット臼歯の根管充填に用いた後の根尖歯周組織の創傷治癒に関する組織学的観察

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
○山田理絵¹⁾、飯野華絵²⁾、新井恭子¹⁾、北島佳代子¹⁾、五十嵐 勝^{1, 2)}

Histological observations of periapical healing after using EndoREZ for root canal filling in rat molars

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
○YAMADA Rie¹⁾, IINO Hanae²⁾, ARAI Kyoko¹⁾, KITAJIMA Kayoko¹⁾ and IGARASHI Masaru^{1, 2)}

【緒言】

根管充填は拡大形成と消毒で無菌状態となった根管空隙に、細菌や有害物質が歯根尖や歯冠側から侵入しないように緊密な封鎖を行うことを目的として行われる。その根管充填剤には、根管内で長期にわたり物理的、化学的に安定で、生体に無害で組織親和性のあることなどが必須である。

今回われわれは、ラットの歯根未完成歯に対するメタクリレート樹脂ベースの根管充填用シーラーであるエンドレズ (ULTRADENT) の生体親和性を検索する目的で組織学的観察を行った。

【材料と方法】

実験には、6週齢のWistar系雄性ラット (n=18) を用いた。全身麻酔を施した後、手術台に固定し、上顎第一臼歯 (M1) に対しラット用クランプを用いてラバーダム防湿を行い、術野の消毒を行った。手術用マイクロスコープ下でφ0.5mmラウンド型ダイヤモンドポイントを用いて髓室開拓を行った後、マイクロエクスキャベーターで冠部歯髄を除去し、6%次亜塩素酸ナトリウムと3%過酸化水素水で交互洗浄した。作業長3.5mmでHファイルと抜髄針で根管歯髄を除去後、Ni-Tiロータリーファイル (ProTaper F1, DENTSPLY) で根管の拡大形成を#20まで行い、再度交互洗浄し、最後に生理食塩液で洗浄した。滅菌ペーパーポイントで根管内を乾燥後、シングルポイント法で根管充填を行った。実験群の根管充填用シーラーは、メタクリレート樹脂ベースの根管充填用シーラーエンドレズ (ULTRADENT) を用い、ミキシングしたシーラーをペーパーポイントで根管壁に塗布し、作業長1.5mmのエンドレズポイント (#20, ULTRADENT) にシーラーを塗布し根管内へ挿入し、40秒間の光照射を行った。その後、光重合型裏層材キャビオス (ネオ製薬工業) で髓床底全体を裏層後、コンボジットレジン修復を行った。コントロール群はニシカキャナルシーラーユージノール系ノーマル E-N (日本歯科薬品) とガッタパーチャポイント (#20, ZIPPERER) で同様に根管充填を行った。実験期間は2週と4週とした。

実験期間終了後、ラットを安楽死させ、被験歯とその周囲組織を一塊として取り出し、4%パラホルムアルデヒドに浸漬固定した。10%EDTA溶液で脱灰した後、通法に従ってパラフィン包埋を行い、厚さ6μmの連続パラフィン切片を作製した後、HE染色を行い、顕微鏡にて組織学的観察を行った。なお、本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部 動物実験委員会の承認 (承認番号: NDUN-190) を得て実施された。

【結果と考察】

酸化亜鉛ユージノール含有根管充填用シーラーは、臨床で広く使用されている。そこでコントロールとしてキャナルシーラーユージノール系ノーマル E-N とガッタパーチャポイントを用い、2週で根尖孔部に硬組織様構造がみられたが炎症性細胞浸潤が観察された。4週では、根尖部に硬組織様構造が観察された。

一方被験材のエンドレズは親水性、緊密性が特徴のメタクリレート樹脂ベースの根管充填用シーラーである。エンドレズで根管充填を行った実験群では、2週で根尖孔部に硬組織様構造がみられ、4週では根尖孔部を覆うように硬組織様組織の形成が観察された。根尖歯周組織の炎症所見は2週、4週ともに観察されず、良好な治癒経過であると考えられる。

【結論】

メタクリレート樹脂ベースの根管充填用シーラーであるエンドレズは、歯根未完成の抜髄根管歯に対して、歯周組織の骨性治癒形態をとる根管充填用シーラーであることが示唆された。

根尖歯周組織に対する新規バイオガラス配合根管充填用シーラーの生体親和性

¹九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野, ²ながよし歯科医院, ³鞍手北歯科医院
○諸富孝彦¹, 花田可緒理¹, 鷲尾絢子¹, 吉居慎二¹, 市丸-末松 美希¹, 永吉雅人², 西野宇信³, 北村知昭¹

Biocompatibility of Newly-developed Bioactive glass root canal sealer to periapical tissue

¹Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Department of Science of Oral Functions,
Kyushu Dental University, ²Nagayoshi Dental Clinic, ³Kurate Kita Dental Clinic
○MOROTOMI Takahiko¹, HANADA Kaori¹, WASHIO Ayako¹, YOSHII Shinji¹, ICHIMARU-SUEMATSU Miki¹,
NAGAYOSHI Masato², NISHINO Takanobu³, KITAMURA Chiaki¹

【目的】

現在、根管充填にはガッタパーチャポイントと根管充填用シーラー（根充シーラー）を併用する方法が広く用いられている。根充シーラーに求められる性質は気密性や封鎖性、操作性、接着性、エックス線不透過性、安定性、除去の容易性、そして組織親和性を有することなど多数が挙げられるが、現時点ではこれら全ての所用性質を高次元で満たす製品は存在しない。バイオガラス（生体活性ガラス：Bioactive glass）は骨伝導性を有する無機材料であり、軟組織とも高い親和性を持つことから骨補填材料として臨床の場で用いられている。我々はバイオガラスの有する優れた性質に着目し、国内企業と共にバイオガラス配合根充シーラーNSY-222を開発し、*in vitro*研究による性能評価を行い本学会学術大会にて報告してきた（第142回および第144回日本歯科保存学会学術大会）。本研究では、NSY-222の生体親和性についてラット下顎臼歯を用いた動物実験により評価した。

【材料および方法】

本研究は九州歯科大学動物倫理委員会の承認を得て行った（実験承認番号：14-016）。雄性7週齢のWistar系SPFラットに全身麻酔を施し固定後、スチールラウンドバー（#1）を用いてラット下顎左右第一臼歯の髓室開拓を行い、K-fileを用いて遠心根を抜髄後、#25まで根管形成を行った。0.1%アドレナリン含浸ペーパーポイントを根管内に挿入して止血し、10%次亜塩素酸ナトリウムと3%過酸化水素水にて交互洗浄後、滅菌生理食塩水にて洗浄した。根管内はペーパーポイントで乾燥し、NSY-222、および比較群として酸化亜鉛非ユージノール系根充シーラーを左右無作為に填塞した。髓室はSuper-Bond C&B（サンメディカル）にて封鎖し、咬合による影響を避けるため対合歯を削合した。処置後の実験動物には粉末飼料と水とを自由に与え、術後1週間目に全身麻酔下で4%パラホルムアルデヒド/PBSにて灌流固定を行った後に下顎骨を摘出し、再度4%パラホルムアルデヒド/PBSにより浸漬固定した。Morse's法による脱灰後、通法に従い5 μm厚のパラフィン切片を作成した。切片はヘマトキシリン-エオジン染色を施した後、光学顕微鏡を用いて観察した。

【結果】

術後1週間の時点においてNSY-222填塞群では、根充シーラー直下の根尖孔付近に石灰化組織の形成が確認された。また、石灰化組織周囲には炎症性細胞の浸潤が確認された。一方、酸化亜鉛非ユージノール系根充シーラー填塞群では、炎症性細胞の浸潤はNSY-222填塞群と比較して著しい差は認められなかったが、石灰化組織様の構造物の存在は確認されなかった。

【考察】

本研究の結果より、NSY-222は根尖周囲の歯周組織に硬組織形成を誘導し、根尖孔の閉鎖を促進する可能性が示された。根充シーラーは組織親和性を有し、根尖歯周組織の生物学的治癒を促すことが所用性質のうちでも特に重要である。以上の結果は、NSY-222は*in vivo*動物実験系においても根充シーラーとしての良好な性質を有することを示唆している。

【結論】

新規バイオガラス配合根管充填用シーラーNSY-222の生体親和性と有用性が示唆された。

ホルモクレゾールがスーパーボンド根充シーラーと象牙質の接着強さに与える影響

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

○鷲巣太郎, 菅谷 勉

Influence of formocresol on bond strength of Super Bond Sealer to dentin.

Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science, Hokkaido University

Graduate School of Dental Medicine.

○Taro Washizu, Tsutomu Sugaya

【目的】

根管治療ではさまざまな根管貼薬剤が用いられるが、根管貼薬剤は根管充填用シーラーの硬化や封鎖性に影響を及ぼすことが報告されている。とくに、ホルモクレゾール (FC) はレジンの重合を阻害するため、FC 貼薬は接着性レジン系根管充填用シーラーに大きな影響を及ぼすと考えられる。しかし、FC 貼薬後、時間が経過して FC が揮発した場合、どの程度影響が残るのかについては不明の点が多い。

そこで本研究では、FC を貼薬した象牙質への接着性レジン系シーラーの接着に対する影響について検討を行った。

【材料と方法】

ウシ下顎前歯 9 本を使用し、根尖より 10~15mm の位置で歯軸方向に直行するように歯根部を切断した。さらに、歯軸方向に 4 分割にした後に、耐水研磨紙 #600 で根管壁の象牙質を平滑にし、5mm×5mm の象牙質片を作製した。作製した象牙質片は根管壁を除いてネイルバーニッシュを塗布した。17%EDTA と 10%次亜塩素酸ナトリウムで被着面を洗浄し、次の 3 群に分けた。①コントロール群: 貼薬を行わなかった ②FC 群: ホルモクレゾール FC ネオ (FC、ネオ製薬) を浸したガーゼを被着面に静置し、サンプルチューブ内に 1 週間密封した。③揮発群: FC 群と同様の処置後、37℃、湿度 100%中に 1 週間静置した。3 群とも被着面を水洗、乾燥後、ただちにシーラーを接着した。

シーラーにはスーパーボンド根充シーラー (サンメディカル) を用い、歯面処理剤グリーンで 10 秒間処理後、水洗、エアードライを行って、メーカー指示に従ってモノマー液、キャタリスト、ポリマー粉末を混和して被着面に塗布、PMMA レジンブロックを接着した。モノマーの揮発を防止するため、アルジネート印象材で全体を被覆し、24 時間後に、各試料中央部から 1mm×1mm のスティックを切り出し (各群 n=12)、クロスヘッドスピード 1mm/min で微小引張試験を行うとともに、破断様式の分類を行った。

【結果と考察】

微小引張強さは、コントロール群が 17.8±6.3MPa、FC 群が 5.7±2.1MPa、揮発群が 23.1±5.8MPa であった。FC 群はコントロール群、揮発群と比較し有意に微小引張強さが低下し ($p<0.05$, Dunnett's test)、半数が微小引張試験の試料作製中に非着面からシーラーが脱離した。それに対して、揮発群はコントロール群に比べて有意に ($p=0.026$ Dunnett's test) 高い引張強さを示した。

本実験の結果、FC が象牙質表面に残存している場合、著しいレジンの重合阻害を引き起こし、引張強さが低下したと考えられたが、十分に揮発させた場合にはコントロール群より大きな引張強さを示したことから、ホルマリンによって象牙質の有機成分を固定することは、接着強さの向上に役立つ可能性が示唆された。

しかし、根管貼薬後の根管を開放することは非現実的であることから、FC 貼薬後の貼薬剤や貼薬期間、さらに接着の長期耐久性への影響についても検討することが必要と考えている。

S-PRG フィラー含有試作根管充填用シーラーの細胞毒性および骨芽細胞分化誘導能の検討

国立大学法人 東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院医歯学総合研究科 口腔機能再構築学講座 歯髓生物学分野

○若林安見子、川島伸之、Alamuddin Yassin Bakhit、橋本健太郎、野田園子、奈良圭介、興地隆史

Cytotoxicity and osteoblast-differentiation induction of a prototype S-PRG filler-containing endodontic sealer

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

○Yasumiko Wakabayashi, Nobuyuki Kawashima, Alamuddin Yassin Bakhit, Kentaro Hashimoto, Sonoko Noda, Keisuke Nara, Takashi Okiji

【緒言】

S-PRG (Surface pre-reacted glass ionomer) フィラーは、 F^- 、 Sr^{2+} 、 Al^{3+} 、 Na^+ 、 BO_3^{3-} 、 SiO_3^{2-} などの多種イオン徐放能を示すことが知られている。この S-PRG フィラーを根管充填用シーラーに応用することにより、各種イオンの生体活性に基づき根尖周囲の歯槽骨再生の誘導が促されることが期待される。そこで、S-PRG フィラー含有試作根管充填用シーラーの細胞毒性および骨芽細胞分化誘導能について株化骨芽細胞を用いて検討した。

【材料と方法】

細胞毒性：S-PRG フィラー含有試作根管充填用シーラー (S-PRG：松風)、S-PRG フィラー非含有試作根管充填用シーラー (非 S-PRG：松風)、AH Plus (AH：デンツプライ三金)、キャナルス N (CN：昭和薬品化工) をメーカー指示にしたがい練和し、直径 8mm、高さ 3mm のシリンダー状の容器に填入した。次いで、非硬化サンプルにおいては填入直後に、硬化サンプルにおいては CO_2 インキュベーター (37℃、湿度 100%) 中で 5 日間保管後に、3ml の α MEM (和光純薬) に浸漬し、24 時間振とう後、濾過滅菌した。株化骨芽細胞 (MC3T3-E1) を 3.0×10^3 cell/well で 96 穴ディッシュに播種し、6 時間後に FBS (HyClone；10%) を含むサンプル希釈液に交換、その後 24, 48, 72 時間経過後に Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所) にて細胞数を測定した。

骨芽細胞マーカー発現：MC3T3-E1 細胞を 8.0×10^4 cell/well で 12 穴ディッシュに播種し、24 時間後にサンプル希釈液添加培地 (Advanced MEM, Thermo；3%FBS) に交換し、72 時間経過後に細胞から抽出した RNA を cDNA に逆転写 (RevertAid H Minus Reverse Transcriptase, Thermo) した後、骨芽細胞マーカー (alkaline phosphatase: *Alp*、integrin-binding sialoprotein: *Ibsp*) 発現をリアルタイム PCR (GoTaq qPCR Master Mix, Promega, CFX96, BioRad) にて解析した。

石灰化誘導：株化骨芽細胞 (Kusa A-1) を $1.0 \sim 1.5 \times 10^4$ cell/well で 48 穴ディッシュに播種し、サンプル希釈液添加石灰化誘導培地 (ascorbic acid; 0.2mM, beta-glycerophosphate; 3mM, Advanced MEM, 2%FBS) 中で培養し、4, 5, 6, 7 日経過後に細胞をメタノールで固定後、アリザリンレッド S 溶液 (和光純薬) で染色した。

【結果】

細胞毒性：硬化サンプル群では 4 倍希釈群において、AH、CN とともにコントロール (シーラー非添加) と同等の細胞増殖活性を示したが、S-PRG および非 S-PRG では有意な細胞増殖の抑制が認められた (ANOVA & Tukey Kramer test, $p < 0.05$)。16 倍希釈群においては、どのシーラーにおいても細胞増殖抑制作用は認められなかった。一方、未硬化サンプル群では 4 倍希釈群において、どのシーラーにおいてもコントロールに対して細胞増殖抑制作用が認められたが、CN の細胞増殖抑制作用は比較的軽微であった。

骨芽細胞マーカー発現：S-PRG (512 倍希釈) は非 S-PRG (512 倍希釈) と比較して *Alp*、*Ibsp* 発現の有意な亢進を示した (Student's t-test, $p < 0.05$)。

石灰化誘導：S-PRG (512 倍希釈) は非 S-PRG (512 倍希釈) と比較してより多くの石灰化結節形成を認めた。

【結論】

S-PRG フィラー含有試作根管充填用シーラーは未硬化の状態では骨芽細胞の増殖を抑制したが、硬化後ではこの増殖抑制は軽微となった。また、S-PRG フィラー含有試作根管充填用シーラーは骨芽細胞における骨芽細胞マーカー発現および石灰化結節形成を亢進した。

直接覆髄材としてのバイオガラス配合セメントの可能性

九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野

○花田可緒理, 諸富孝彦, 鷲尾絢子, 北村知昭

Possibility of the bioactive glass cement as a direct pulp capping agent

Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Department of Science of Oral Functions,
Kyushu Dental University¹

○HANADA Kaori, MOROTOMI Takahiko, WASHIO Ayako, KITAMURA Chiaki

【目的】 バイオセラミックスの1種であるバイオガラスは、体内に埋入されると表層部分から周囲の組織に造骨が促進される物質が溶出し、表面にハイドロキシアパタイト微結晶が生成する。さらに、バイオガラスは骨だけでなく軟組織とも高い親和性を示し感水性等の生体安定性に係る活性が比較的低いため、製品開発が比較的容易であるという利点がある。我々は国内企業と共にバイオガラスを配合したセメント（以後NSY-222）の開発を進めており、これまでの研究で、NSY-222は象牙芽細胞様細胞株（KN-3細胞）に対し細胞増殖や形態に影響せず高い生体親和性を示すことを明らかにした（JBMR part B. 2015;103(2):373-80）。また、牛歯根管内にNSY-222を充填し界面を電界放出形走査電子顕微鏡（FE-SEM）で観察した結果、象牙細管内にセメントから析出したハイドロキシアパタイトのタグ様構造が形成されることを明らかにした（第142回, 第144回日本歯科保存学会）。今回の研究では、バイオガラスセメントの応用・展開をさらに広げることを目的に、NSY-222の覆髄材としての可能性を検討した。

【材料および方法】 本研究は九州歯科大学動物倫理委員会の承認（15-024）を得て行った。9週齢の雄性Wistar系SPFラットに5%ペントバルビタールナトリウム（40mg/kg）で腹腔内注射による全身麻酔を施した後、自作規格窩洞形成装置に固定した。HPスチールラウンドバー（#1/2）を用いて拡大鏡（×8）下でラットの上顎第一臼歯歯冠近心面に同一規格の窩洞を形成し、#15のK-fileにて点状露髄させた。露髄部を10%次亜塩素酸ナトリウムと3%過酸化水素水にて交互洗浄後、滅菌生理食塩水にて洗浄した。止血確認後コットンロールにて露髄面及び窩洞を乾燥させ、水酸化カルシウム製剤（Dycal[®]）、NSY-222、およびMTA系セメント（プロルートMTA[®]）のそれぞれを無作為に左右別々に直接覆髄した。覆髄後、窩洞周囲を高粘度リン酸エッチング材にて30秒エッチング処理し、水洗・乾燥後、Super-Bond C&Bにて封鎖した。また、咬合による影響を避けるため対合歯を削合した。覆髄処置から2週間後、ラットを4%パラホルムアルデヒド/PBSにて灌流固定し、組織を取り出した。取り出した組織をover nightで浸漬固定し、エタノール上昇系列で脱脂を行い、Morse's法による脱灰後、通法に従い4 μmのパラフィン切片を作成しヘマトキシリン-エオジン染色を施し、光学顕微鏡を用いて観察した。さらに画像解析ソフトImage Jを用いて修復象牙質形成量を面積で相対評価した。

【結果】 術後2週間では、すべての材料において露髄面全面を覆う修復象牙質の形成が確認され、修復象牙質辺縁に存在する細胞は象牙芽細胞に類似した形態を示した。また、修復象牙質周囲には血管の新生が認められた。修復象牙質と覆髄材料の間には壊死層を認めたが、広範囲にわたる歯髄の炎症もしくは歯髄壊死に陥った症例は認めなかった。プロルートMTA[®]群において形成された修復象牙質は無細胞性で辺縁が比較的明瞭であり象牙細管を認めたのに対して、Dycal[®]群およびNSY-222群では有細胞性で辺縁は不明瞭なものが多く象牙細管の侵入は認められなかった。Image Jを用いた修復象牙質形成量の面積比較では、3種類の材料群間に有意差を認めなかった。

【考察】 本研究からNSY-222は直接覆髄材として応用すると、露髄面に修復象牙質形成を誘導することが明らかとなった。さらにNSY-222により形成誘導された硬組織量は、現在直接覆髄材として臨床上広く利用されているDycal[®]やプロルートMTA[®]と同等であったことから、NSY-222の直接覆髄材としての有用性が示唆された。

【結論】 バイオガラス配合したセメントNSY-222の直接覆髄材としての有用性が示唆された。

新規ケイ酸カルシウム系セメントの開発 (第2報)

—水分率が圧縮強さに及ぼす影響—

1 山本貴金属地金株式会社, 2 北海道医療大学歯学部 口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野,

3 北海道医療大学歯学部 口腔機能修復・再建学系 生体材料工学分野

○中野貴文¹, 加藤喬大¹, 松浦理太郎¹, 安楽照男¹, 榊原さや夏², 遠藤一彦³

The development of new calcium silicate-based cements (Part2)

—Influence of water content on compressive strength of cements—

Yamamoto Precious Metal Co., Ltd.¹, Division of Pediatric Dentistry², Division of Biomaterials and Bioengineering³,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

○Takafumi Nakano¹, Takahiro Kato¹, Ritaro Matsuura¹, Teruo Anraku¹, Sayaka Sakakibara², Kazuhiko Endo³.

【目的】

プロルート MTA (デンツプライ三金) に代表されるケイ酸カルシウム系セメント (MTA セメント) は, 抗菌性, 封鎖性, 生体親和性, 硬組織誘導性などの優れた機能を有しており, 直接覆髄, 穿孔封鎖, 逆根管充填など様々な用途で使用され, 良好な臨床成績が報告されている. しかし, 水和反応に要する時間が長く, 硬化時間の短縮が課題となっている. また, MTA セメントの圧縮強さは, 歯質やグラスアイオノマーセメント (約 150 MPa) と比べると低く, 強度の改良も求められている. 前報では MTA セメントの主成分である白色ポルトランドセメントに対して球状シリカ微粒子とジルコニア微粒子を添加した試作 MTA セメントの, 練和時の水分率が硬化時間に与える影響について検証し, 水分率が低下するほど硬化時間が短縮化されることを報告した. 本報では, 水分率が圧縮強さに与える影響について検証した.

【材料および方法】

JIS T6610 を参考にし, 試作 MTA セメント粉末をガラス板上に採取し, 蒸留水を 18, 20, 23 mass% の水分率となるように添加し, それぞれを 30 秒間練和した. 練和後, 練和泥をステンレス鋼製の分割型 (直径 4 mm, 高さ 6 mm) に充填し, 温度 37°C, 相対湿度 100 % の環境下で 3 時間静置した. その後, 試料 (n=3) を型から取り外し, 37°C の蒸留水中に 1 日または 1 週間浸漬し, 小型万能試験機 (Ez-Graph, 島津) を用いて圧縮強さを測定した.

【結果および考察】

試作 MTA セメントは, ベアリング効果を有する球状シリカおよびジルコニア微粒子を添加することで, 18 mass% の少量の水分でもペースト状に練和することが可能であった. そこで, 18, 20, 23 mass% の水分率の試作 MTA セメントの圧縮強さを検討したところ, Fig に示す通り, 蒸留水浸漬 1 日後の圧縮強さは, 水分率を少なくするほど高くなる傾向が認められた. また, 蒸留水浸漬 1 週間後では, 1 日後よりも値が大きく上昇したが, 1 日後と同じ傾向が認められた. これは, ケイ酸カルシウム系セメントの主成分であるポルトランドセメントが, 水分率が

が多くなるに従い空隙率が大きくなり, 圧縮強さが低下するという性質を持つため, 試作 MTA においても同様の現象によって水分率が圧縮強さに大きく影響を及ぼしたと考えられる. 蒸留水浸漬 1 週間後において水分率が 18 および 20 mass% の試作 MTA セメントでは, 圧縮強さがグラスアイオノマーセメントと同等レベルまで向上することが明らかとなった. 一般にポルトランドセメントの水和反応には, 最低でも 20 mass% の水 (粉 100 g に対して 25 ml の水) が必要とされているが, 本研究では水分率が 18 mass% でも, 硬化体の圧縮強さは大きな値を示した. この理由は, 試作 MTA セメント粉末には水和反応に関与しない球状シリカおよびジルコニア微粒子を約 30% 含有しており, ポルトランドセメントの成分に対する実効的な水分率は約 24 mass% であったため, 水和反応が十分に進行し緻密な硬化体を形成したためと考えられる. 以上の結果から, 試作 MTA セメントの水分率を調整することで, より強度の求められる部分への適応拡大の可能性が示唆された.

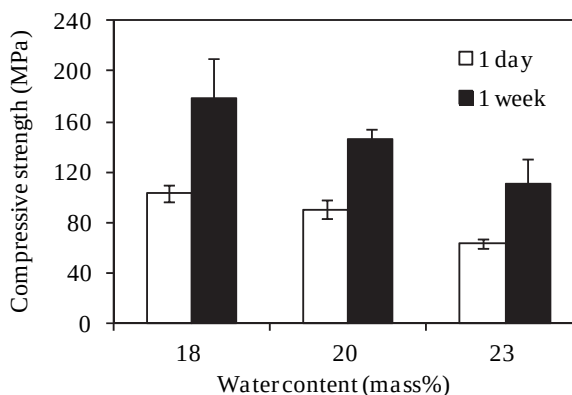


Fig Influence of water content on compressive strength of cements

ユージノール濃度を低減した酸化亜鉛ユージノールセメント のユージノール遊離動態

¹ 日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座、² 日本歯科大学

○前田 宗宏¹、橋本修一²、勝海一郎¹

Release of eugenol from the zinc oxide eugenol mixture containing low concentration eugenol

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

²⁾ The Nippon Dental University

○ Maeda M¹, Hashimoto S² and Katsuumi I¹

【はじめに】

酸化亜鉛ユージノールセメントは歯髄鎮痛消炎剤、根管充填用シーラーなどに応用されるが、高濃度のユージノールがセメントから遊離すると、生体に有害作用を生じることが指摘されてきた。これまで、第141, 142, 144回の本学会において酸化亜鉛ユージノールセメントの液成分であるユージノールに脂肪酸などを加えることでユージノール濃度を低減させ、水酸化カルシウムを添加した試作酸化亜鉛ユージノールセメント(OSP-E)の物性および血清浸漬時の硬化度などについて報告した。今回は、³Hで標識したユージノールを用いて、セメントから遊離するユージノールの動態について検討を行った。

【材料および方法】

1. ユージノールの放射性標識化合物の調製

ユージノールの放射性標識化合物は、New England Nuclear社においてユージノール(Aldrich, USA)を触媒交換法により³Hで標識し、精製したものを使用した。³H-ユージノールを1.0mCi/mlで実験に使用した。

2. 試作低濃度ユージノールセメントの組成(15%ユージノール含有)

試作粉末(和光純薬)の全量は1.004gとした。

OSP-E1用粉末: 酸化亜鉛 0.45 g、ロジン 0.2 g、水酸化カルシウム 0.2 g、硫酸バリウム 0.15 g、酢酸亜鉛 0.004 g

OSP-E2用粉末: 酸化亜鉛 0.5 g、ロジン 0.2 g、水酸化カルシウム 0.1 g、硫酸バリウム 0.2 g、酢酸亜鉛 0.004 g

液剤: オレイン酸(和光純薬)1容、イソステアリン酸(和光純薬)1容、プロピレングリコール(和光純薬)2容の比率で混和した17mlの溶液(OSP)に、3mlの³H-ユージノール(19kBq)を加え液剤を調製した。各粉末と液剤とをそれぞれ粉液比5で練和した(OSP-E 1, 2)。

3. コントロールセメントの組成(100%ユージノール含有)

コントロール用粉末: 酸化亜鉛 0.8 g、ロジン 0.2 g、酢酸亜鉛 0.004 g

液剤: 17mlのユージノール(Sigma, USA)に、3mlの³H-ユージノール(19kBq)を加え液剤を調製した。粉液比5で練和したセメントをコントロールセメントとした(ZOE)。

4. セメントから遊離するユージノール量の測定

練和から30分経過後のセメント(OSP-E1, OSP-E2およびZOE)を内径8mm、深さ4mmの円筒形プラスチック製容器に填塞し(表面積0.502cm²)、50mlの生理食塩液に浸漬した(試料数:2)。室温下で外液を90rpmで攪拌し、外液を経時的に0.1mlずつ採取した。採取した試料に10mlのシンチレーションカクテル(Aquasol-2, Perkin-Elmer)を加え、液体シンチレーションカウンタ(LSC-6100, ALOKA)で放射能量を測定した。

【成績】

1. ZOE, OSP-E1, OSP-E2のいずれも、セメントから遊離するユージノール量は、経時的に増加する傾向が認められた。
2. 各セメント群ともに浸漬後3時間以降で遊離量が増加する傾向が認められた。
3. 各セメント群ともに浸漬後96時間で最大値を示し、遊離量はOSP-E2>OSP-E1>ZOEの順であった。

【考察およびまとめ】

今回の実験で使用したOSP-Eセメントは粉末に水酸化カルシウムを添加することで、硬化時の表面pHがアルカリ側に傾く特性を有している。一方で、ZOEに比較して水中での崩壊度が大きい(第142回大会既報)ため、セメント表層での崩壊に伴いユージノールの遊離量が増加する可能性が示唆された。

形成ガイドを用いた下顎切歯の髓室開拓

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座
○西田太郎, 小倉陽子, 前田宗宏, 勝海一郎

Access Cavity Preparation on Mandibular Incisor by Using Preparation Guide

Department of Endodontics, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo
○NISHIDA Taro, OGURA Yoko, MAEDA Munehiro, KATSUUMI Ichiroh

【はじめに】

根管治療を行う際、歯冠部からの適切な髓室開拓窩洞の形成が必要である。下顎切歯の髓室開拓は歯冠舌側面から行うが、根管舌側壁に象牙質の張り出しがあり、適切に象牙質の削除を行わないと舌側の第二根管を見逃すことがある。また、過度な切削は歯質保存のために避けなければならない。従来、根管治療の際には二次元的なエックス線写真が診断に用いられていた。歯科用 CBCT が術前に用いられるようになり、三次元的な根管の湾曲や分岐を把握することが容易になった。近年、3D プリンタが様々な分野で用いられており、インプラント手術において埋入方向の位置付けガイドの作成に用いられている。

本研究では、下顎切歯の髓室開拓窩洞形成ガイドを作成し、このガイドを用いた髓室開拓の評価、検討を行った。

【材料と方法】

実験には、あらかじめ根管の解剖学的形態を把握したう蝕のないヒト抜去下顎切歯を用いた。抜去歯の使用に際しては、日本歯科大学生命歯学部倫理委員会の承認 (NDU-T2011-20) を得た。

試料はマイクロ CT (ScanXmate-L080H, Comscan) を用い断層撮影を行い、三次元画像処理ソフト (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング) を用い三次元構築を行った。三次元画像上で根管を抽出し、歯軸方向に三等分する横断面を作成し、その中央を通る直線を根管の軸方向とした。根管の軸方向の延長線と歯冠の交差する点を舌側面、切縁、唇側面に判定した。

三次元画像処理ソフト上で、根管の軸方向の延長線上に直径 2.0mm の髓室開拓窩洞を設計した。縦 14.0mm, 横 14.0mm, 厚さ 12.5mm の直方体に直径 2.0mm の誘導孔を設計し、髓室開拓窩洞形成ガイド (ACPG) のボリュームデータを作製した。設計したボリュームデータを STL データに変換し、光造形方式 3D プリンタ (Nobel 1.0, XYZ Printing) を用い光硬化性樹脂 (Photopolymer Resin Clear, XYZ Printing) による ACPG の造形を行った。被切削歯に ACPG を固定し、長さ 28mm の #1557 サージカルバー (マニー) と 5 倍速コントラアングルを用い ACPG の誘導孔に沿って、髓角に到達する深さまで髓室開拓を行った。髓室開拓後、マイクロ CT を用い断層撮影を行い、三次元画像処理ソフトを用い観察、検討を行った。

【結果とまとめ】

1. 根管の軸方向は歯冠の切縁と交差した。
2. 髓室開拓窩洞形成ガイドを使用することで髓角までの髓室開拓が行えた。

以上の結果から、ACPG を用いることで穿孔の危険性の少ない根管へのアクセスが行える可能性が示された。一方で、注水性を考慮し ACPG の口径を太く設定したため、誘導孔内のバーの操作性や固定に注意が必要であった。しかし、硬組織に支持を求めるためその有用性は高いと考える。3D プリンタによるガイド作成では、CT と 3D プリンタの精度が髓室開拓窩洞の精度につながるため、今後さらに詳細な検討を行う予定である。