象牙芽細胞様細胞(KN-3)の石灰化における機械刺激センサーTRPV4 チャネルの影響

福岡歯科大学　[1)]口腔治療学講座　歯科保存学分野、[2)] 生体構造学講座 機能構造学分野、
[3)]九州歯科大学　口腔機能学講座　口腔保存治療学分野

○畠山純子[1)]、畠山雄次[2)]、鷲尾絢子[3)]、諸冨孝彦[3)]、北村知昭[3)]、阿南壽[1)]

Mechano-sensor TRPV4 contributes to mineralization in odontoblast cells (KN-3)

[1)]Departments of Operative Dentistry and Endodontology, Fukuoka Dental College
[2)]Departments of Molecular Cell Biology and Oral Anatomy, Fukuoka Dental College
[3)]Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Kyushu Dental University
○Junko Hatakeyama[1)], Yuji Hatakeyama[2)], Ayako Washio[3)], Takahiko Morotomi[3)], Chiaki Kitamura[3)], Hisashi Anan[1)]

【緒言】

TRPV4 チャネルは、非選択的陽イオンチャネルであり、低浸透圧、機械的刺激、27℃以上の温度刺激、アラキドン酸代謝物などでチャネルが開口し細胞内に Ca^{2+}が流入する事が知られている。歯にメカノストレスが加わると、その生体反応により象牙質の石灰化が認められる。この反応性象牙質石灰化過程において、 象牙細管にカルシウムが送り込まれるが、その作用機序は不明であった。近年、そのメカニズムの一端をになう要素として、象牙芽細胞の細胞膜に存在するナトリウム・カルシウム交換体が示された。一方、象牙芽細胞にメカノセンサーである TRPV チャネルが存在し、石灰化過程において機能的な働きをしている可能性が報告された。これらの研究から、メカノストレス受容による TRPV チャネルの活性化により、象牙芽細胞により象牙質にカルシウムの排出がなされ、反応性象牙質形成が起こると、予想される。そこで我々は、メカノストレスにより活性化されることが知られている TRPV4 チャネルに着目し、象牙芽細胞において TRPV4 刺激を与えたときの石灰化の程度を検討した。

【材料と方法】

本研究では、ラット歯髄由来象牙芽細胞様細胞株、KN-3 細胞（九州歯科大学口腔保存治療学分野 北村知昭教授より供与）を用いた。KN-3 細胞における TRPV４の発現を、PCR および蛍光免疫組織化学法を用い確認した。TRPV4 動態の KN-3 細胞増殖に与える影響を検討するために、TRPV4 の抑制剤である RN1734、または促進剤である 4α-PDD (4α-Phorbol 12,13-Didecanoate)を用いた。それぞれの薬剤を細胞培地に添加培養後、1, 2, 3, および 4 日後に細胞増殖試験を行った。またコンフルエント後、石灰化誘導培地(Ascorbic Acid, 50 μg/ml および β-glycerophoshate,10 mM を添加した。)に RN1734 または 4αPDD を添加して培養後 3 日後に細胞を回収して RNA を抽出後、石灰化に関与する事が知られている DSPP、DMP1,Collagen Type1,Runx2、ALP、Osterix、Osteocalcin について検討した。また 3 および 7 日後に ALP 活性を、また、２日ごとに培地交換し 28 日後にアリザリンレッド染色を行い、TRPV4 の象牙芽細胞石灰化能に与える影響について評価した。

【結果と考察】

PCR 法および蛍光免疫組織化学法にて KN-3 細胞に TRPV4 が発現することを認めた。4α-PDD 、または RN1734 の添加により、KN-3 細胞の細胞増殖に差は認められなかった。KN-3 細胞への TRPV4 促進剤である 4α-PDD の添加により、石灰化関連遺伝子の濃度依存的発現の上昇、アルカリフォスファターゼ活性の増加とアリザリンレッド染色において有意な石灰化の促進を認めた。しかし TRPV4 抑制剤である RN1734 の添加で濃度依存的な抑制を認め、アルカリフォスファターゼ活性の抑制とアリザリンレッド染色による石灰化の促進は認められなかった。これらのことから、メカノセンサーTRPV4 は象牙芽細胞様細胞の硬組織形成に関与する可能性が示唆された。

学会外共同研究者　城戸瑞穂　（佐賀大学医学部　解剖神経学）

LPS 刺激ヒト歯髄細胞における TRPA1 の発現は NO/p38 MAPK シグナルにより誘導される

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
○田澤　建人，川島　伸之，倉本　将司，　奈良　圭介，野田　園子，藤井　真由子，橋本　健太郎，興地　隆史

Expression of TRPA1 is induced by NO/P38MAPK signals in LPS-stimulated human dental pulp cells

Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)
○TAZAWA Kento, KAWASHIMA Nobuyuki, KURAMOTO Masashi, NARA Keisuke, NODA Sonoko, FUJII Mayuki, HASHIMOTO Kentaro, OKIJI Takashi

【緒言】

Transient receptor potential (TRP) A1 チャネルは冷刺激に対して応答するポリモーダル受容器として知られている。ヒト正常歯髄組織において TRPA1 の発現は認められない[1]が、深在性う蝕下の象牙芽細胞において発現が誘導されると報告されている[2]。しかし、歯髄細胞における TRPA1 発現誘導メカニズムの詳細はいまだ不明である。本研究は、LPS 刺激ヒト歯髄細胞を用い、TRPA1 発現誘導のメカニズムを明らかにするとともに、発現誘導された TRPA1 の機能を解析することを目的とした。

【材料および方法】

１．う蝕を有する歯における TRPA1 発現を検討する目的で、健全および深在性う蝕を有する抜去歯を 4%パラホルムアルデヒド固定後、17%EDTA にて脱灰したのち、凍結切片（10um）を作成し、抗 TRPA1 抗体を用いて免疫蛍光抗体染色（間接法）を行った（倫理審査番号 D2014-039）。

２．TRPA1 発現誘導メカニズムの検討する目的で、抜去歯より分離したヒト歯髄細胞(hDPCs)を 10% FBS 添加αMEM にて培養し(倫理審査番号 D2014-039)、LPS(100 ng)を添加 24 時間、48 時間後に抽出した RNA より cDNA を作製し、TRPA1 に対する特異的プライマーを用いて定量 PCR を行った。一酸化窒素 (NO)産生の測定にはグリース試薬を用いた。NO ドナーとして NOR5(100 μM)、iNOS 阻害薬として 1400W (1 μM)、p38 MAPK 阻害薬として SB202190 (1 μM) を用いた。

３．TRPA1 の機能を検討する目的で、10% FBS 添加αMEM にて培養したマウス株化歯乳頭細胞(MDPs)に TRPA1 作動薬（icilin, 20 μM）を添加し、72 時間後に抽出した RNA より cDNA を作製したのち、オステオカルシン(OC)、オステオポンチン(OPN)に対する特異的プライマーを用いて定量 PCR を行った。さらに石灰化誘導培地にて培養し、形成された石灰化結節をアリザリンレッド S にて染色し ImageJ にてデンシトメトリー解析を行った。

統計解析は Student t 検定もしくは一元配置分散分析を用いて行った。有意水準は 5%とした。

【結果および考察】

１．健全歯の象牙芽細胞にはほとんど TRPA1 発現を認めなかったが、う蝕直下の象牙芽細胞においては TRPA1 発現が認められたことから、外来侵襲に反応して象牙芽細胞は TRPA1 を発現する能力を有していると推察された。

２．LPS 刺激により hDPCs における *TRPA1* mRNA 発現は有意に増加した。また、*iNOS* mRNA 発現および NO 産生も有意に増加した。NOR5 添加により *TRPA1* mRNA の発現が増加した。また、1400W および SB202190 添加により LPS により誘導された *TRPA1* mRNA 発現は有意に抑制された。以上の結果より、LPS 刺激により産生が誘導される NO が、p38 MAPK シグナルの活性化を介して *TRPA1* mRNA 発現誘導に関与していることが推察された。

３．icilin 添加により、MDPs における *OC* および *OPN*mRNA の有意な発現上昇が認められた。さらに icilin 添加により石灰化結節形成の有意な亢進が認められた。すなわち、炎症時に発現が誘導される TRPA1 は、歯髄細胞の硬組織形成細胞への分化および石灰化に関与している可能性が高いと推察された。

【結論】

ヒト歯髄細胞において、LPS 刺激により NO/p38 MAPK シグナルが活性化され、TRPA1 発現が誘導された。TRPA1 シグナルの活性化は歯髄細胞の硬組織産生細胞への分化を誘導し、石灰化結節形成を促進した。

【参考文献】

1. Tazawa K et al., Arch Oral Biol. 2017 Mar;75:55-61.
2. El Karim IA et al., J Endod. 2016 Apr;42(4):589-95.

ヒト歯髄細胞の象牙芽細胞様分化におよぼす sFRP1 の影響について

[1]九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯科保存学研究分野、
[2]九州大学病院歯内治療科、[3]九州大学大学院歯学研究院 OBT センター、[4] 九州大学病院口腔総合診療科
○一法師啓太[1]、友清淳[2]、長谷川大学[2]、濱野さゆり[1,3]、吉田晋一郎[2]、杉井英樹[2]、
有馬麻衣[1]、野津葵[1]、和田尚久[4]、前田英史[1,2]

Odontoblast-like differentiation of human dental pulp cells treated by sFRP1

[1]Department of Endodontology and Operative Dentistry, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University,
[2]Department of Endodontics, Kyushu University Hospital, [3]OBT center, Faculty of Dental Science, Kyushu University,
[4]Division of General Dentistry, Kyushu University Hospital
○Keita Ipposhi[1], Atsushi Tomokiyo[2], Daigaku Hasegawa[2], Sayuri Hamano[1,3], Shinichiro Yoshida[2], Hideki Sugii[2],
Mai Arima[1], Aoi Nozu[1], Naohisa Wada[4], Hidefumi Maeda[1,2]

【研究目的】現在、臨床に用いられる覆髄材料として水酸化カルシウム製剤および MTA セメントが挙げられるが、これらの材料よりも効率的にデンティンブリッジ形成を誘導する覆髄材料の開発が求められている。Wnt/β-catenin シグナルは、多彩な作用を有するシグナル伝達系であり、歯髄組織においては、歯髄幹細胞の象牙芽細胞様分化を抑制することが報告されている (Scheller et al. 2008)。secreted Frizzled Related Protein 1 (sFRP1) は、Wnt タンパクに直接結合することで、それらが受容体 Frizzled に結合することを抑制する Wnt シグナルのアンタゴニストとして知られている。しかしながら、その歯髄細胞分化に与える影響については未だ報告がない。そこで本研究では、ヒト歯髄細胞の象牙芽細胞様分化におよぼす sFRP1 の影響を明らかにし、sFRP1 の新規覆髄材としての可能性を検証することとした。

【材料および方法】(1) Wistar ラット (8 週齢、雄性) から上顎臼歯部の切片を作製し、抗 sFRP1 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。(2) 本研究に同意が得られた患者 (5N; 24 歳男性、3R; 24 歳男性) の抜去歯より採取した歯髄細胞をそれぞれ HDPC-5N および-3R、歯根膜細胞を HPDLC-5N および-3R、また歯肉線維芽細胞を HGF-5N および-3R とした。それぞれの細胞を 10% fetal bovine serum (FBS) / alpha modification of Eagle's MEM (α-MEM) (CM) にて継代培養し、mRNA を回収したのち、半定量的 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) にて *sFRP1* の遺伝子発現を比較検討した。(3) HDPC-5N および-3R に *sFRP1* の siRNA を導入したのち、CM および DM (2 mM CaCl□添加 CM) にて培養し、培養後の石灰化物形成をアリザリンレッド S 染色 (ARS 染色) 法にて、象牙芽細胞関連遺伝子 (*DSPP,DMP-1,* および *Nestin*) 発現を定量的 RT-PCR にて解析した。(4) HDPC-5N および-3R を、CM、DM、および 100 ng/ml sFRP1 添加 DM (DM+sFRP1) にて培養し、培養後の石灰化物形成を ARS 染色法にて、象牙芽細胞関連遺伝子発現を定量的 RT-PCR にて解析した。なお本研究は九州大学医系地区部局ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の許可を得て、患者様の同意の上で行った。また、本研究は九州大学動物実験委員会の承認の下で行った。

【結果と考察】(1) ラットの組織切片において、歯根膜組織および歯髄組織に sFRP1 の陽性反応が認められた。特に象牙芽細胞において、強い陽性反応が認められた。(2) 半定量的 RT-PCR の結果、HDPC-5N および-3R における *sFRP1* の発現量は、HPDLC ならびに HGF と比較して上昇した。(3) DM にて培養を行った HDPC-5N および-3R は、CM にて培養を行ったものと比較して、石灰化物形成および象牙化細胞関連遺伝子発現を有意に亢進し、*sFRP1* の発現量も有意に上昇した。一方、HDPC-5N および-3R において *sFRP1* の発現抑制を行った結果、DM での培養により亢進した石灰化物形成および象牙芽細胞関連遺伝子発現は有意に抑制された。(4) DM+sFRP1 にて培養を行った HDPC-5N および-3R は、DM にて培養を行ったものと比較して、石灰化物形成および象牙芽細胞関連遺伝子発現を有意に亢進した。

以上の結果より、sFRP1 は歯髄組織、特に象牙芽細胞に強く発現することが示唆された。また、sFRP1 は歯髄細胞の象牙芽細胞様分化を促進することが示唆された。

コンドロイチン硫酸を含むアルギン酸ナトリウムゲルから作製した新規スポンジの担体としての硬組織形成能の評価

大阪歯科大学　口腔治療学講座
○宮本綾乃，　好川正孝，　前田博史

Evaluation of hard tissue forming ability as a scaffold of the novel sponge made with sodium alginate gel containing chondroitin sulfate

Department of Endodontics, Osaka Dental University
○MIYAMOTO Ayano, YOSHIKAWA Masataka, MAEDA Hiroshi

【緒　言】

骨の再生にとって、担体は幹細胞の増殖と分化を誘導する場として重要である。歯の硬組織欠損や歯槽骨の吸収を組織工学の手法で再生するために、欠損部の形状に容易に適合させ得る性状の担体が望ましい。そこで、形状を容易に付与できる生体材料としてアルギン酸ナトリウム(AL)から成るスポンジに着目し、AL ゲルから凍結真空乾燥によって AL スポンジを作製した。

担体としてのスポンジ内に幹細胞の接着を促進させるために、AL スポンジを基礎として細胞外マトリックスであるコンドロイチン硫酸 A ナトリウム(Chs)を AL ゲルに添加したスポンジを試作した。今回は、AL スポンジおよび Chs を含む AL ゲルから作製したスポンジ気孔内での硬組織形成を評価した。

【材料と方法】

1. スポンジの作製

AL を超純水に溶解して AL ゲルを調整した(4 %、8 %および 10 %濃度)。さらに、10 %濃度の AL ゲルに 1 %、5 %あるいは 10 %の濃度に Chs を加えたゲルを調整した。それぞれのゲルを 1 %塩化カルシウム溶液中に 6 時間浸漬後、真空凍結乾燥して 6 種の AL スポンジ(4 %AL-S、8 %AL-S、10 %AL-S、1 %Chs-AL-S、5 %Chs-AL-S、10 %Chs-AL-S)を作製した。これらのスポンジの微細構造を走査型電子顕微鏡で観察した。

2. 担体への骨髄細胞の播種と培養

6 週齢の雄性 Fischer344 ラットの大腿骨から骨髄細胞(rBMCs)を採取した。初代培養後に 1×10^6 cells/ml の細胞懸濁液を調整し、AL スポンジに rBMCs を播種するために懸濁液 200 μl を浸潤させ、1 時間後にスポンジを培養液に浸漬させて 3 週間培養した。

3. 担体内の硬組織形成の評価

培養上清に含まれるオステオカルシン(OC)を免疫化学的に定量した。さらに担体を磨砕して得た遠沈上清を用いて ALP 活性を生化学的に測定した。

【結果と考察】

1. 走査型電子顕微鏡(SEM)での AL スポンジの観察

真空凍結乾燥によって AL ゲルは多孔質構造になった。気孔径は 4 %AL-S で 100-250μm、8 %AL-S および 10 %AL-S で 350-500μm であった。10%Chs-AL-S の気孔壁は他のスポンジの気孔壁表面と比べて粗であり、Chs の修飾によって気孔表面に形成された微細な凹凸が細胞の気孔壁への付着を促進した可能性が考えられる。

2. アルカリフォスファターゼ(ALP)量

スポンジ作製のための AL ゲルの濃度に比例して ALP 値は有意に高くなった。また、Chs の添加は ALP 活性を高め、10 %AL-S と比べて 5 %Chs-AL-S、10 %Chs-AL-S は有意に高い値を示した。

3. オステオカルシン(OC)量

Chs の添加により OC 値は高くなる傾向にあり、10 %Chs-AL-S は 10 %AL-S と比較して有意差がみられた。AL ゲル濃度および Chs 濃度が高いスポンジでは多くの骨形成を生じることが示唆された。

【結論】

AL スポンジは骨形成のための担体として有用であり、AL ゲルの濃度、そして、AL ゲルへの Chs 添加とその濃度が rBMCs による AL スポンジ担体内での骨形成に影響を及ぼすと結論された。

GDNF 及び VEGF を分泌する細胞封入ディバイスのヒトセメント芽細胞生存能への影響

[1]九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野
[2]Gloriana Therapeutics Inc., USA, [3]広島大学大学院医歯薬保健学研究院歯髄生物学研究室,
○宮下桂子[1], 鷲尾絢子[1], 諸冨孝彦[1], Wahlberg Lars[2], Emerich Dwaine[2], 西藤法子[3], 北村知昭[1]

Effects of GDNF and/or VEGF-Secreting Cells Encapsulated Devices on the Survival of Human Cementoblasts

[1]Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Science of Oral Functions, Kyushu Dental University, [2]Gloriana Therapeutics Inc., USA, [3]Department of Biological Endodontics, Institute of Biomedical & Health Science, Hiroshima University,
○ MIYASHITA Keiko[1], WASHIO Ayako[1], MOROTOMI Takahiko[1],
WAHLBERG Lars[2], EMERICH Dwaine[2], SAITO Noriko[3], KITAMURA Chiaki[1]

【目的】

我々は歯髄・根尖歯周組織の局所的再生療法に関する研究を進めているが，局所的な組織再生誘導では残存している細胞の生存維持が重要となる．細胞生存に必須の成長因子を持続的に供給するシステムとして Encapsulated Cell Biodelivery（ECB）がある．ECB は特定の成長因子を分泌する細胞を多孔性カプセルに封入したディバイスを生体内局所に移植する方法であり，ディバイスから特定の成長因子を持続的に供給することで疾患の進行を抑制する．ECB のひとつとしてアルツハイマー病やパーキンソン病の進行抑制を目的とした治療用ディバイスが米国 Gloriana Therapeutic 社により開発された．本ディバイスには一定量の VEGF を分泌するヒト網膜色素上皮細胞（ARPE19 細胞）から GDNF を恒常的に多量に分泌するよう遺伝子改変された細胞が充填されており，細胞から分泌された GDNF がディバイス表面の微小孔から生体局所に溶出するよう設計されている．これまでに我々は細胞封入ディバイスから持続的に分泌される GDNF および VEGF が低血清下における象牙芽細胞様細胞の生存能・増殖能や分化能を維持すること，中でも GDNF が象牙芽細胞様細胞の機能維持において主要な役割を果たしていることを明らかにした（Saito N *et al.*, J Regen Med, 2017）．今回，根尖歯周組織の局所的再生療法の確立を目的として，本ディバイスがセメント芽細胞に与える影響について検討した．

【材料と方法】

実験には Gloriana Therapeutic 社より供与された GDNF 分泌ディバイスおよび遺伝子改変されていない ARPE19 細胞が封入されたディバイス（ARPE ディバイス）（直径 0.7mm、長さ 7.0mm）を用いた．各ディバイスは Human Endothelial SFM 無血清培地に浸漬し一定期間毎に培地交換することで分泌能を維持した．ヒト抜去歯歯根表面から樹立されたヒトセメント芽細胞様細胞株（以後 HCEMs，広島大学・高田教授より供与）はαMEM 培地にて FBS 存在下で継代維持した．HCEMs を 24-well plate に 1×10^4 cells / well 播種し 24 時間（10%FBS 含有αMEM）培養後，培地を各ディバイスの維持培地が全培養液の 50%（FBS 最終濃度 0.5%）になるよう調製した刺激培地と交換した．一定期間毎に新しい刺激培地に交換して 7 日間培養後，Trypan Blue 染色により生細胞数を測定した．また，HCEMs を各ディバイスとともに FBS 濃度 0.1% にて 7 日間共培養し，Trypan Blue 染色により生細胞数を測定した．

【結果】

各ディバイスの維持培地で 7 日間，FBS 濃度 0.5%で HCEMs を培養したところ，ディバイス上清による刺激細胞群では細胞増殖が認められた．また，FBS 濃度 0.1%にて HCEMs を各ディバイスとともに 7 日間共培養したところ，ディバイスの存在する共培養群では生存細胞数は有意に増加していた．

【考察】

今回，GDNF や VEGF を分泌するディバイスがヒトセメント芽細胞様細胞株（HCEMs）の生存に与える影響について検討したところ，ディバイス存在下では HCEMs の生存が維持延長されることが明らかとなった．以上の結果は，本ディバイスから持続的に分泌される GDNF あるいは VEGF がセメント芽細胞の生存能に影響を与えることを示唆している．

【結論】

GDNF や VEGF を分泌する細胞封入ディバイスはヒトセメント芽細胞様細胞の生存を延長する．

Aspirin が BMP 誘導性骨芽細胞分化に与える影響

[1]広島大学 大学院医歯薬保健学研究科 歯髄生物学研究室
[2]東北大学大学院歯学研究科 歯内歯周治療学分野
○平田−土屋志津[1]、鈴木茂樹[2]、西藤法子[1]、本山直世[1]、柴 秀樹[1]

Effects of Aspirin on BMP-induced osteoblastogenesis.

[1]Department of Biological Endodontics, Hiroshima University
[2]Department of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry
○HIRATA-TSUCHIYA Shizu[1], SUZUKI Shigeki[2], SAITO Noriko[1], MOTOYAMA Naoyo[1], SHIBA Hideki[1]

【目的】

近年、いろいろな疾患の発症に慢性炎症が関与していることが注目されており、歯内療法においても根尖歯周組織に生じた骨欠損の再生を確実にするためには、感染制御と再生療法技術に加え慢性炎症制御が重要であると考えている。これまでに我々は、炎症のシグナル伝達経路である NF-κB と骨誘導因子 BMP シグナルのクロストークに着目し、NF-κB サブユニットである p65 が Smad4 と結合することで BMP シグナルを抑制していることを明らかにした（*Mol Endocrinol*, 2014）。今回着目した非ステロイド性抗炎症剤（NSAIDs）の分類の一つであるサリチル酸系は、シクロオキシゲナーゼ活性を阻害し、プロスタグランジン（PGs）の産生を抑制することで鎮痛消炎作用を示すことが知られている。その中でも Aspirin は、古くから臨床の現場や市販薬として使用されており、さらに、NF-κB の転写活性に重要である IKK 複合体の活性を阻害して NF-κB シグナルを抑制することが報告されている。そこで本研究では、Aspirin の骨芽細胞分化に与える影響を調べることで、炎症抑制・組織再生・鎮痛を同時に行う新たな骨組織再生療法の開発を目指すことを目的としている。

【材料と方法】

骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1 細胞）に NF-κB ルシフェラーゼ発現プラスミドを遺伝子導入し、Aspirin で前処理後、炎症性サイトカイン TNFα（10 ng/ml）で刺激後にルシフェラーゼ活性を測定し、NF-κB の転写活性を分析した。次に Aspirin で前処理後、BMP4（25 ng/ml）で分化誘導後にアルカリホスファターゼ（ALP）活性を測定した。また、骨分化マーカーである Runx2、Osterix、および Osteocalcin のプライマーを用いてリアルタイム PCR を行い、発現を分析した。

【結果】

MC3T3-E1 細胞を TNFαで刺激すると NF-κB の転写活性が著しく上昇したが、Aspirin の添加によって Aspirin 濃度依存的に NF-κB の転写活性上昇が抑制された。次に、MC3T3-E1 細胞を BMP4 で刺激すると ALP 活性が促進されたが、Aspirin 添加によりその活性は抑制傾向にあった。また、細胞を BMP4 と Aspirin で刺激したところ、Aspirin 存在・非存在下に関わらず Runx2 や Osteocalcin の遺伝子発現に有為な差は認められなかった。しかし、Osterix の遺伝子発現は Aspirin 存在下で有意に増加した。

【考察】

Aspirin は TNFα刺激による NF-κB の転写活性を抑制することが示唆された。また Aspirin は、BMP4 誘導性の Runx2 や Osteocalcin の遺伝子発現に影響せず、ALP 活性においてはむしろ抑制する傾向にあった。しかし、Osterix の遺伝子発現は Aspirin によって増加したことから、Aspirin は Osterix の発現を介して BMP 誘導性の骨芽細胞分化に影響を与える可能性が示唆された。

STAT3 を介したヒト iPS 細胞の低酸素培養における多能性維持

[1)]長崎大学大学院　医歯薬学総合研究科　歯周歯内治療学分野, [2)]長崎大学
○杉本　浩司[1)]、松裏　貴史[1)]、中園　史子[1)]、山田　志津香[1)]、林　善彦[2)]

Maintenance of pluripotency in human iPS cells under hypoxia via STAT3

[1)] Department of Periodontology and Endodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
[2)]Nagasaki University
○SUGIMOTO Koji[1)], MATSUURA Takashi[1)], Nakazono Ayako[1)], Yamada Shizuka[1)], HAYASHI Yoshihiko[2)]

［研究目的］

hES 細胞では STAT3 (Signal Transducers and Activator of Transcription3)を活性化させると LIF 依存的にリプログラミングすることがわかっている(Chen H et al.,2015)。さらに ES 細胞では STAT3 の活性が抑制されたときに、多能性を維持できないことも報告されている(Wang D et al.,2017)。STAT は細胞増殖、分化および生存などの過程を制御するタンパク質で、STAT3 は非活性化状態においては細胞質に存在するが、JAK が活性化されることによって機能する。我々は STAT3 による HIFs の活性化がヒト iPS 細胞の Stemness の維持にも関与しているのではないかと考えた。本研究では低酸素培養がヒト iPS 細胞に与える影響および、STAT3 を介した HIF の活性化と未分化能維持における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。STAT3 抑制剤として細胞質 STAT3 阻害物質である S31 201(AXN)および非ペプチド性低分子 STAT3 阻害物質である Stattic(AXN)を用いた。

S31 201 および Stattic を DMSO にて希釈後、それぞれ最終濃度 20mM になるように調整した。それぞれを ReproStem に添加し阻害剤未添加群、DMSO 添加群、S31 201 添加群、Stattic 添加群としてヒト iPS 細胞を 5%O_2 で培養。培養 3 日目にヒト iPS 細胞の形態観察を行った。さらに Trizol reagent(Life Technologies,CA)にて細胞を回収した。5%O_2 での Stat3 の発現量ならびに Stat3 阻害剤添加時の Stat3 発現量を Real-time PCR にて確認した。さらに Stattic および S31 201 添加による Stat3 抑制時の HIF-2α の発現量を確認した。

[結果]

Stattic 添加群では、201B7, 253G1 ヒト iPS 細胞どちらにおいてもコロニー形成は見られず、細胞は凝集していなかった。S31 201 添加群ではコロニーの形成は認めたが、阻害剤未添加群および DMSO 添加群の iPS 細胞コロニーと比較してコロニーサイズは小さかった。

Stattic および S31 201 を添加し、Stat3 抑制時の HIF-2α の発現量を確認した。すると、201B7 細胞では Stattic 添加群で 7%、S31 201 添加群で 57%に発現量は減少していた(Fig6D)。253G1 細胞では Stattic 添加群で 14%、S31 201 添加群で 37%に発現量は減少していた。

Stattic および S31 201 添加し、Stat3 抑制時に未分化マーカーである Nanog の発現量を Real-time PCR を用いて確認した。201B7, 253G1 ヒト iPS 細胞どちらにおいても、Stattic 添加群ではコントロール群と比べて、有意に Nanog の発現量は減少していた。S31 201 添加群でも同様に Nanog の発現量は減少していた。

[まとめ]

今回、我々はヒト iPS 細胞の多能性の制御と Stat3 の関係性について検討したところ、低酸素環境下で Stat3 を阻害することで、HIF-2α の発現が抑制され、未分化マーカーの発現が減少した。このことから、ヒト iPS 細胞は低酸素環境下では JAK/Stat3 経路を介して、HIF-2α の発現を促進し、未分化状態を維持しているのではないかと推察される。

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）

ヒトセメント芽細胞のインテグリンサブユニット発現に関する研究

神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔機統合医療学講座　歯髄生物学分野[1]
口腔科学講座生化学分野[2]

○木庭大槻[1]、合田征司[2]、石井信之[1]

The study of Integrin subunit expression on human cementoblast cells

Depertment of Pulp Biology and Endodontics[1], Oral Biochemistry[2]
Kanagawa Dental University
○Koba Taiki[1] , Goda Seiji [2], Tani-Ishii Nobuyuki [1]

【研究目的】

細胞外マトリックスは、細胞機能を調節するのに重要な役割を果たす不溶性局所メディエーターと考えられている。細胞とマトリックス間の情報は、膜貫通タンパク質ファミリーであるインテグリンを介して伝達される。 セメント芽細胞は骨芽細胞と多くの分子特性を共有しているが、セメント芽細胞によるインテグリン発現は明らかにされていない。 本研究は、ヒトセメント芽細胞のインテグリンサブユニットを解析し、セメント芽細胞の基質および細胞接着メカニズムを明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

ヒトセメント芽細胞（HCEM；広島大学高田教授から供与）および骨芽細胞様細胞（MG63）の不死化細胞系を本研究で使用した。HCEM は 10%FBS 添加 α-MEM を用いて継代培養し、MG63 は 10%FBS 添加 DMEM を用いて継代培養した。インテグリンサブユニットの発現は、フローサイトメーター（FACSCalibur : Becton Dickinson）によって解析した。 CD49a、CD49b、CD49c、CD11a、CD51、CD29、CD18 および CD61（インテグリンサブユニット：α1、α2、α3、αV、β1、β2 およびβ3）の表面マーカーに対する FITC または Alexa 標識抗体で直接染色した。各抗体について、10^6 個の細胞を 1%FBS 含有 PBS に再懸濁し、氷上で 200μl の抗体溶液中で 30 分間インキュベートした。HCEM, MG63 共に 1×10^4 細胞を標品として解析し、Becton Dickinson ソフトウェアを用いて平均強度を決定した。

【結果】

ヒトセメント芽細胞は α2、α3、αV、β1 サブユニットを発現し、特に α3、β1 サブユニットは高度に発現した。α1 および β3 の発現は低く、サブユニット β2 は HECM 細胞表面上で検出されなかった。 これらの発現パターンは、MG63 と同様の傾向が認められた。

【考察】

ヒトセメント芽細胞によるインテグリンサブユニット発現を解析した結果、骨芽細胞と同様のインテグリン発現が認められ、細胞外マトリックスおよび細胞接着に重要な役割を示すことが示唆された。

【会員外共同研究者】
渡辺清子　神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座微生物学分野
浜田信城　神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座微生物学分野

ラットにおけるパルプ・リバスクラリゼーション治療実験モデルの開発

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
○白柏麻里、枝並直樹、吉羽邦彦、大倉直人、吉羽永子、遠間愛子、竹内亮祐、野杁由一郎

Development of the procedures for pulp revascularization in the rats

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan
○SHIRAKASHI Mari, EDANAMI Naoki, YOSHIBA Kunihiko, OHKURA Naoto, YOSHIBA Nagako, TOHMA Aiko, TAKEUCHI Ryosuke, NOIRI Yuichiro

【緒言】 歯髄壊死や根尖性歯周炎に罹患した根未完成歯の治療は、これまでアペキシフィケーションが適応されてきた。しかしながら、その治癒形態は歯根の長さ・象牙質厚さの成長が起こらない不十分なものである。近年、この欠点を克服した治療法としてパルプ・リバスクラリゼーションが注目を集めており、既に多くの臨床報告がなされている。一方で、パルプ・リバスクラリゼーションの治癒メカニズムは依然として未解明な部分が多く、治療法の改良や術式の確立を妨げている。創傷の治癒は、生体内で起こる複雑かつ連鎖的な反応によって達成されるため、そのメカニズムの解明には動物実験による *in vivo* 研究が欠かせない。特にラットを用いた研究は、分子生物学的・遺伝子工学的実験手法が確立されており、様々な解析が可能な点で有用性が高い。そのため我々は、ラットにおけるパルプ・リバスクラリゼーション治療実験モデルの開発が、その治癒メカニズムの解明に必要であると考えた。今回は治療実験モデル開発の第一段階として、根管形成・洗浄・貼薬により歯髄を除去した歯根にパルプ・リバスクラリゼーションを行い、経過を三次元 X 線画像的および病理組織学的に観察したので報告する。

【方法】 5 週齢の雄性 Wistar 系ラットに全身麻酔を施し、実体顕微鏡視野下で以下の処置を行った。

・*処置 1 回目*：下顎第一臼歯にラバーダム防湿を行い、直径 0.6mm のカーバイドバーを用いて髄腔開拡を行った。近心根管を 25 号 K ファイルで形成するとともに、5%次亜塩素酸ナトリウムによる根管洗浄を行った。その後、ペーパーポイントを用いて止血を行い、水酸化カルシウム製剤の貼薬および水硬性セメントによる仮封を行った。対合歯である上顎第一臼歯は咬合の影響を排除するために抜歯した。処置直後にマイクロ CT を撮影し、水酸化カルシウム製剤の填入状態を確認した。

・*処置 2 回目*：処置 1 回目から 2 日後に、ラバーダム防湿下にて下顎第一臼歯の仮封を除去した。続いて、17%EDTA 溶液および超音波チップを用いて水酸化カルシウム製剤を除去した。生理食塩水による根管洗浄およびペーパーポイントによる根管乾燥の後、10 号 H ファイルでオーバーインスツルメンテーションをすることで、根尖部歯周組織から出血させ、根管内に血餅を形成させた。血餅上にケイ酸カルシウムセメントを貼付し、コンポジットレジンにて窩洞を封鎖した。

・*三次元 X 線画像による観察*：処置 2 回目の当日および 1，2，4 週間後にマイクロ CT の撮影を行った。

・*病理組織学的観察*：処置 2 回目から 4 週間後にラットを灌流固定し、処置歯を周囲組織と共に摘出した。10% EDTA 溶液により試料の脱灰を行い、厚さ 10μm の凍結切片を作成し病理組織学的観察を行った。

【結果】 処置 2 回目から 1 週間後には、マイクロ CT 画像において根管内に硬組織様の不透過像を認めた。処置 2，4 週間後では、根管内の不透過像がより鮮明になるとともに、処置前と比較して歯根の伸長が確認された。

組織学的観察では、根管内に血管および軟組織の形成を認めるとともに、骨・セメント質様の硬組織形成を認めた。根尖部では象牙質に連続した厚いセメント質の形成が見られた。

【考察】 実体顕微鏡下で処置を行うことで、ラット臼歯においても臨床に近似した手技によるパルプ・リバスクラリゼーションが可能であった。病理組織学的観察から、根管内に骨・セメント質様硬組織形成が確認されたことは、これまでのヒト・大型動物での報告と同様であり、ラットを用いたモデルによりパルプ・リバスクラリゼーションの治癒メカニズム解析が可能であることが示唆された。マイクロ CT による 3 次元 X 線画像解析は、同一個体における経時的な硬組織形成過程を観察可能であり、治癒メカニズムの解明において有用な手法であると考えられた。

今後は、より臨床における病態を反映するために、根尖病巣を伴う感染根管における治療モデルの開発が必要であると考える。

新規熱処理合金製 NiTi ロータリーファイルの機械的特性

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
○中務太郎，時田大輔，牧圭一郎，木村俊介，西条美紀，海老原新，興地隆史

Mechanical properties of a newly developed heat-treated NiTi rotary instrument

Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University (TMDU)
○NAKATSUKASA Taro, TOKITA Daisuke, MAKI Keiichiro, KIMURA Shunsuke, NISHIJO Miki, EBIHARA Arata, OKIJI Takashi

【目的】近年，熱処理加工を加えたニッケルチタンロータリーファイル（以下「NiTi ファイル」）では，回転疲労耐性，柔軟性が向上したとする報告がある（Zupanic *et al.* IEJ. 2018）．本研究では，独自の熱処理加工が施された新規試作 NiTi ファイル（マニー）の回転疲労耐性，曲げ特性について，他の熱処理加工された NiTi ファイルと比較検討を行った．

【材料および方法】1. 実験群：新規試作 NiTi ファイル（#25, 0.06 taper; 21 mm；以下 MN），HyFlex EDM® (#25, 0.08~0.04 taper; 25 mm; Coltene, Switzerland；以下 HEDM), Vortex Blue® (#25, 0.06 taper; 25 mm; Dentsply Sirona, Switzerland；以下 VB), ProTaper NEXT® X2 (#25, 0.06 taper; 25 mm; Dentsply Sirona；以下 PTN）の 4 種の NiTi ファイルを用いた．

2. 回転疲労試験：自作型回転疲労試験機およびDentaport ZX (モリタ製作所) を使用し，回転疲労試験を行った（各群n=10）．回転数はMNおよびVBは500 rpm, HEDMは400 rpm, PTNは300 rpmとした．曲率半径は5 mm，曲率角度は60°に設定し，破折までの時間を計測したのち，NCF (number of cyclic to failure) を，回転数（rpm）×破折までの時間（秒）として算出した．

3. 曲げ試験：自作型片持ち梁式抗曲試験機を使用し，曲げ試験を行った（各群n=10）．ファイル先端から7 mmの位置を支点とし，2 mmの位置に荷重をかけ，変位量が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. 統計学的解析：回転疲労試験および曲げ試験の計測値を，Games-Howell Testにて有意水準5%で解析した．

【結果】回転疲労試験では，MNにおけるNCFはPTNと比較して有意に大きかったが，HEDM, VBとは有意差を認めなかった(Figure 1)．曲げ試験では変位量0.5 mmにおいてMNの荷重量はPTNと比較して有意差は認めず，HEDMの荷重は他の3群と比較し有意に小さい値となった（Table 1）．変位量2.0 mmにおいてMNの荷重は他の3群と比較して有意に小さい値となった．

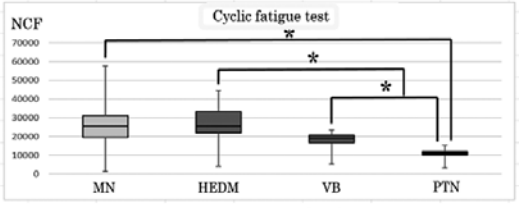

Figure 1. Number of cycles to failure (NCF) of the tested nickel-titanium files *P< 0.05 (Games-Howell Test).

Bending test

Group	0.5 mm deflection	2.0 mm deflection
MN	0.30 (0.14, 0.34)[a]	0.61 (0.42, 0.80)[a]
HEDM	0.13 (0.11, 0.17)[b]	0.74 (0.61, 0.78)[b]
VB	0.42 (0.31, 0.52)[c]	1.13 (0.96, 1.34)[c]
PTN	0.24 (0.20, 0.25)[a]	1.08 (0.91, 1.16)[c]

Table 1. Bending load values (N) at a deflection of 0.5 and 2.0 mm.
Values indicate the median (minimum, maximum).
Groups with the different letters are significantly different (P< 0.05; Games-Howell Test).

【考察】回転疲労試験の結果より，MN の NCF は HEDM および VB と同等で PTN と比較して有意に高値を示したことから，MN が優れた回転疲労耐性をもつことが推察された．曲げ試験から MN は超弾性領域において高い柔軟性を持つことが推察された．

【結論】新規試作 NiTi ファイルは，本実験条件下では，他の熱処理加工されたファイルとともに優れた回転疲労耐性を持ち，超弾性領域において高い柔軟性を示すことが示唆された．

WaveOne Gold の切削応力における各種グライドパスの影響

神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔機統合医療学講座　歯髄生物学分野
○下島かおり、山田寛子、宇都宮舞衣、武藤徳子、石井信之

Effect of the Glide Path Establishments on the Torque Generation to WaveOne Gold during Instrumentation:

Depertment of Pulp Biology and Endodontics, Kanagawa Dental University
○Shimojima Kaori, Yamada Hiroko, Utsunomiya Mai、
Muto Noriko, Tani-Ishii Nobuyuki

【研究目的】

Ni-Ti ファイルはステンレスファイルと比較して、柔軟性に優れ本来の根管形態を維持した根管形成が可能である。しかしながら、ファイル破折リスクを考慮して常に適切な操作を必要とする。グライドパス形成は、根管口から根尖孔までの円滑なファイル誘導路を作成することで、Ni-Ti ファイルによる根管形成時の切削応力を減少させ、ファイル破折を未然に防止することが期待されている。従来の研究報告において、応力ひずみ値測定による根管形成過程の切削トルク値(回転力 N cm)を測定した研究報告は少ない。本研究は、WaveOne Gold Glider と ProGlider によるグライドバス形成によって、WaveOne Gold による根管形成時の切削応力(トルク値)、切削時間、切削量（中央値変位量）を比較検討することを目的とした。

【材料および方法】

本研究には J 字型根管模型(Endo-training resin block, Dentsply Maillefer)45 本を、WaveOne Gold Glider (Dentsply Maillefer)群(n=15)、ProGlider (Dentsply Maillefer)群(n=15)、グライドパス未形成群(n=15) の 3 群に分類し WaveOneGold (Dentsply Maillefer)による根管形成を行った。根管形成時に X Smart iQ を使用し、最大トルク値、総トルク値、および切削時間を測定した。根管形成変位量は形成前後の J 字型根管模型をデジタル画像で重ね合わせ、得られたデータを PC に取り込み計測用ソフトを使用し計測を行った。計測箇所は根尖から 1,2,3,5, および 8mm の位置で測定し各群で比較検討した。

【結果】

WaveOne Gold 形成時の最大トルク値は WaveOne Gold Glider 群（2.8Ncm)、ProGlider 群（2.8 Ncm), グライドパス未形成群(2.7 Ncm）であった。また、形成時の総トルク値は WaveOne Gold Glider 群（12.0 Ncm)、ProGlider 群(11.4 Ncm)、 グライドパス未形成群(13.2 Ncm)であった。形成時間は WaveOne Gold (22.3 秒）,ProGlider 群(22.7 秒)、グライドパス未形成群 (27.0 秒)であった。中央値変位量はグライドパス形成群と比較し、グライドパス未形成群は全ての計測点で変位量が増加した。

【考察】

Ni-Ti ファイルは正確な根管形成を迅速に行うために導入されたが、常にファイル破折に留意する必要がある。WaveOne Gold Glider と ProGlider によるグライドバス形成によって、 根管形成時の切削トルク値減少により形成時間短縮とファイル破折の危険性が減少し、中央値変位量も減少することから本来の根管形態を維持した根管形成が完了すると考えられた。Ni-Ti フアイルによる根管形成において、WaveOne Gold Glider と ProGlider を用いたグライドパス形成は有用であることが示された。

Ni-Ti ファイルで拡大した根管とガッタパーチャポイント間の抵抗に関する考察

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
○新井恭子[1)]、湊　華絵[1)]、山田理絵[1)]、清水公太[2)]、北島佳代子[1, 2)]

Consideration about the resistance between root canal shaped by Ni-Ti files and single gutta-percha point

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
○ARAI Kyoko[1)], MINATO Hanae[1)], YAMADA Rie[1)], SHIMIZU Kota[2)] and KITAJIMA Kayoko[1, 2)]

【目的】

根管充塡は、根尖最狭窄部まで緊密に封鎖することが求められる。規格化されたステンレススチールファイルで拡大形成された根管に対して側方加圧根管充塡やシングルポイント根管充塡を行う場合は、マスターアピカルファイルと同サイズのマスターポイントを選択する。マスターポイント試適時は、作業長まで挿入したポイントを引き抜く際の軽い抵抗感（タグバック）でアピカルカラーに適合したポイントであるかを判断する。一方、Ni-Ti ファイルの多くは国際標準規格とは異なる規格の形状が採用され、ファイルと同じ形状のポイントでのシングルポイント根管充塡や垂直加圧根管充塡、オブチュレーションシステムによる専用のガッタパーチャ材を用いた根管充塡法などが行われている。今回われわれは、RECIPROC（VDW、以下 RE）で拡大形成した根管に対するガッタパーチャポイント試適時の抵抗について検討した。

【材料および方法】

実験には透明樹脂根管模型（(株) ホクシンエレクトロニクス）を使用し、RE の R25（25mm、先端直径/テーパー：#025/08）を X-smart plus（DENTSPLY Maillefer）に取り付けて、作業長を 10.0mm として直線根管と湾曲根管を１個ずつ拡大した。拡大後は超音波洗浄を 15 分間行い、切削片を除去した。ポイント試適には#025/04、#025/06、#025/08 のガッタパーチャポイントを用い、ランダムに各群６回ずつ試適を行った。ポイント試適時の荷重測定には荷重簡易試験スタンド（FGS-50X-L、日本電産シンポ（株））を使用し、模型をスタンドに取り付けた状態でデジタルフォースゲージ（FGP-5、日本電産シンポ（株））でポイント引き抜き時の最大荷重を測定した。得られた結果は t-検定で統計処理を行った。

【結果】

ポイント引き抜き時の最大荷重の平均値は、直線根管では#025/04 で 9.5±9.4gf、#025/06 で 15.5±12.0gf、#025/08 で 14.0±10.4gf で、すべての群間で有意差はみられなかった（$p<0.05$）。湾曲根管では#025/04 で 10.0±6.1gf、#025/06 で 15.3±8.0gf、#025/08 で 23.2±9.6gf で、#025/04 と#025/08 の間に有意差が認められた。

【考察】

今回拡大に使用した RE はテーパーが 08 で、同じテーパーのガッタパーチャポイントをポイント試適に使用した場合、直線根管では他のテーパーのガッタパーチャポイントと有意差がなかった。このことから、テーパーが大きく拡大された根管では、根管壁とポイント全体が適合していてもポイントを引き抜いた時の抵抗感が得られにくいということが考えられる。また、直線根管の方が湾曲根管よりも標準偏差が大きいことから、荷重のばらつきは直線根管の方が大きいことが示唆された。湾曲根管で#025/08 群と#025/04 群に有意差があったのは、根尖部だけではなく湾曲部全体での抵抗が加わったことが考えられる。Ni-Ti ファイルで拡大した根管の場合は、ガッタパーチャポイントの抵抗が弱いことが推察されるため、接着性シーラーや硬化膨張するシーラー等の使用が有用であると考えられる。

【結論】

RECIPROC を用いて拡大形成を行った根管に対してシングルポイント根管充塡を行う場合、ポイント試適時の抵抗感が得られにくいことが示唆されたことから、緊密な根管充填を行うためにより効果的なシーラーを選択する必要があると考えられる。

ProTaper Next の切削応力における各種 EDTA 製材の影響

神奈川歯科大学大学院歯学研究科　口腔統合医療学講座　歯髄生物学分野
○鈴木二郎，藤巻龍治，石井信之

Effect of various EDTA on the torque generation to ProTaper Next during instrumentation

Department of Oral Interdisciplinary Medicine Division of Pulp Biology Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University
○SUZUKI Jiro , FUJIMAKI Ryuji , TANI-ISHII Nobuyuki

【研究目的】

Ni-Ti ファイルはステンレススチールファイルと比較して，柔軟性に優れ本来の根管形態を維持した根管形成が可能である長所を有するが，ファイル破折のリスクを考慮して根管治療時の EDTA 製材併用は，化学的清掃効果ならびに潤滑効果を有することで，根管形成器具への負荷が減少し，切削時応力を軽減することで金属疲労と剪断変形の抑制効果が期待される．

本研究では，根管形成時の各種 EDTA 製材が切削応力に及ぼす影響について，応力に対応するエンドモーター電流値測定によりトルク値を算出するとともに，歪応力可視化によって解析することを目的とした．

【材料および方法】

供試根管模型は，40 本の J type プラスチック製湾曲根管模型（Dentsply Sirona）を 4 群に分け，EDTA 製材 Glyde(Dentsply Sirona)，EDTA アクアジェル(Pentron Japan)または RC-Prep（白水貿易）で満たし，対象群には精製水を使用した．その後 Ni-Ti ファイル（Dentsply Sirona）をメーカー指示に従い根管拡大形成を行った．

実験 1：根管形成時の切削応力に対応するモーター電流値測定

プラスチック製湾曲根管模型を術者が視認できない状態で#10 K ファイル（マニー）にて作業長を決定後，各々の切削補助材を併用した根管形成を行い，Apex より-5mm,-3mm,-1mm および Apex でのモーター電流値をデーターロガー（midi LOGGER GL820,GRAPHTEC）にて測定，Proglider(Dentsply Sirona)使用によるグライドパス時と ProTaper NEXT X1・X2(Dentsply Sirona)使用による根管拡大時の抵抗変化よりトルク値を算出，また作業時間についても検証を行った．

実験 2：根管形成時応力の可視化

実験 1 と同様の条件で根管形成を行い，プラスチック製根管模型の応力陰影を偏向歪検査装置(MRV330)にて撮影した．

なお統計学的解析については，*Non-repeated measures ANOVA* および *Bonferroni* 法による多重比較を行った．

【結果】

実験 1

・各群とも根管形成の進捗に伴いトルク値の上昇が認められ Apex 部で最大となった．

・EDTA アクアジェルを用いた X1 ファイル群では，Apex-1mm および Apex 部においてファイル潤滑によるトルク値変化を認めたが，統計学的有意差は認められなかった．

実験 2

・対照群下での根管形成では，内側湾と外側湾間での不均一な応力陰影を認めたのに対し，EDTA 製材使用群では，ほぼ均等な陰影を示す症例が散見された．

【考察および結論】

本研究結果より，根管形成時に EDTA 製材を使用することは，切削応力減少によるファイル保護作用，根尖湾曲部でのスムーズな根管形成による作業時間短縮と根尖孔部トランスポーテーション抑制効果が示された．

試作アルカリ性 EDTA 溶液における根管象牙質接着性に及ぼす影響に関する研究

神奈川歯科大学大学院歯学研究科　口腔統合医療学講座　歯髄生物学分野 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)，二瓶 智太郎 2)，石井信之 1)

The Studies of Effects on Root Canal Dentin Adhesive in Trial Alkaline EDTA Solution

Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University 1)
Division of Clinical Biomaterials , Department of Oral Science, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University 2)
○FUJIMAKI Ryuji 1), SUZUKI Jiro 1), OHASHI Katsura2), NIHEI Tomotarou2)，TANI-ISHII Nobuyuki 1)

【研究目的】

歯内療法における根管洗浄は，機械的に除去できない感染源を化学的に除去する重要な操作で，機械的清掃とともに，重要な治療ステップである．EDTA 製材は，根管内に残留した無機質の溶解作用を担い臨床頻用されている．演者らは第 146 回本学会にて，アルカリ性に調製した試作 EDTA 溶液で洗浄した根管象牙質では，無機質脱灰作用とスミヤー層の効果的除去を示すことを報告した．

本研究では試作 EDTA 溶液による根管象牙質表面の洗浄処理が、根管充填後の支台築造時に使用するレジンセメント接着性に及ぼす影響を解析した．

【材料および方法】

実験にはウシ下顎前歯を用いた．冷凍保存ウシ歯を解凍後、歯頚部で歯冠部と歯根部を低速精密切断機（ISOMENT,BUEHLER）で切断分割し，流水洗浄後の歯根部を用いた．調整したウシ下顎前歯歯根の歯髄を抜去後、歯軸方向に歯根を 2 分割し，根管内象牙質が上面となるように常温重合レジンに包埋した．耐水研磨紙＃600 を用いて表面が平面となるまで研磨を行い，象牙質表面に実験的にスミヤー層を付与し接着試験用試料とした．

実験．根管象牙質表面における引張接着試験

接着試験用試料は溶液別に，試作 EDTA 溶液（EDTA 群），スメアクリーン（SC 群），未処置（コントロール群）の 3 群に分類し，各溶液をマイクロブラシにて象牙質面に塗布し 2 分間処理した後，水洗，乾燥を行った．その後，各試料に接着面積を規定するため直径 3ｍｍの穴の開いた厚さ約 60μｍのメンディングテープ（3M）を貼付した．接着用レジンセメントにはパナビア V5（クラレノリタケ）を用いて，業者指示通りにトゥースプライマーにて被着象牙質面を 20 秒間処理後、エアーにて乾燥させ，セメントを直径 5ｍｍのステンレス製接着子に盛り、手指にて被着面に圧接し，その後 1 ㎏の荷重を垂直に５分間負荷した．負荷中に余剰セメントの除去及び左右２方向から可視光線照射器にて各 30 秒間光照射し硬化させた．その後，直ちに 37℃100%湿度環境中に 24 時間保管した．保管後、卓上型万能試験機 EZ Test（EZ-S500N 島津製作所）を用いてクロスヘッドスピード 1.0mm/min にて引張接着試験を行った．統計学的解析は，*One-way ANOVA* および *Bonferroni* 法による多重比較検定を行った．

【結果および考察】

引張接着試験の結果，EDTA 群，コントロール群，SC 群の順に接着性が高い結果となり，SC 群と比較し EDTA 群は有意に高い接着強さを示したが（$p<0.05$），コントロール群と比較したとき，EDTA 群，SC 群では有意な差はみられなかった（$p>0.05$）．

試作 EDTA 溶液による根管洗浄後の象牙質表面は，支台歯築造時におけるレジンセメントの接着性を増強することが示された．

超音波洗浄による根管スミヤー層の除去における周波数の影響

鶴見大学歯学部歯内療法学講座
○小野 京、宮本永浩、田井康晴、吉田拓正、山口貴央
山本 淳、小野 駿、細矢哲康

Influence of vibration frequency on removal of the root canal smear layer by ultrasonic cleaning

Department of Endodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine
○ONO Miyako, MIYAMOTO Nagahiro, TAI Yasuharu, YOSHIDA Takumasa, YAMAGUCHI Takao,
YAMAMOTO Jun, ONO Shun, HOSOYA Noriyasu

【目　的】

根管拡大・形成により根管壁に形成されるスミヤー層は、根管の無菌化や根管封鎖に影響を与える。スミヤー層の除去には EDTA 溶液による洗浄が有効であるが、超音波洗浄法との併用により短時間での効果的な除去が報告されている[1)]。本研究の目的は、効率的なスミヤー層の除去方法を検討するために、超音波振動の周波数がスミヤー層の除去に与える影響を観察することである。

【材料と方法】

歯根の湾曲が少ない単根抜去歯 40 本を被験歯とした。歯頚部で抜去歯を切断し、NiTi ロータリーファイル（Hyflex™ EDM, Coltene）で＃40 まで根管拡大・形成を行った。拡大形成中は、根管内を生理的食塩液で満たし、ファイル交換時と拡大形成終了後に 6%NaClO で洗浄を行った。根管拡大形成を行った被験歯を、無作為に 10 本ずつ分類し、以下のように根管洗浄を行った。1 群：洗浄針（30G×25mm; Endo Irrigation Needle-2）を付与したシリンジを用いて 17%EDTA 溶液(4.0ml/min)で洗浄、2 群：17%EDTA 溶液を根管に満たし、30,000Hz の超音波振動を加えて洗浄、3 群：17%EDTA 溶液を根管に満たし、40,000Hz の超音波振動を加えて洗浄、4 群：6%NaClO による洗浄、ならびに 40,000Hz の超音波洗浄を加えた洗浄をコントロール群とした。実験群（1～3 群）は、各群 15 秒と 30 秒の 2 通りの洗浄時間とし、各条件 5 本ずつ行った。コントロール群（4 群）は 30 秒間の洗浄を行った。2 群と 3 群では洗浄中に随時 EDTA 溶液を追加し、常に根管内を満たした状態とした。各条件で洗浄後、十分量の 6%NaClO (2.0ml) で根管を洗浄し、頬舌的に分割した。根管壁に残存したスミヤー層の状況を走査型電子顕微鏡で観察し、歯冠側、中央部、根尖側に分類して Torabinejad らの方式[2)]にて評価した。評価は本研究の目的を知らない 2 名の歯科医師が担当し、評価結果は Kruskal-Wallis 検定を用いて統計学的分析を行った($p<.05$)。本研究は鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承諾を得て行われた(No.1306)。

【結果と考察】

1～3 群においては、15 秒に比べ 30 秒の洗浄で有意に除去効果が向上した。4 群においては、6%NaClO ならびに超音波振動を付与しても除去されなかった。1～3 群では、根尖側に比べ歯冠側での除去効果が有意に向上した。2 群ならびに 3 群では、根管内のすべての部位において超音波振動を加えることで有意に除去効果が向上し、根尖側ならびに中央部においては、2 群に比べ 3 群の除去効果が有意に高かった。

【結　論】

EDTA 溶液による根管洗浄はスミヤー層の除去に効果的であり、さらに超音波振動を加えることで、除去効果が向上した。また、周波数の増加とともに除去効果が向上したことから、40,000Hz の超音波発生装置の応用がスミヤー層の除去には効果的であることが示唆された。

1. 鈴木重紀 他. 2 つの根管洗浄法を用いた EDTA 製剤の効果的な作用時間 ―スミヤー層除去効果と象牙質浸食の評価―. 日歯内療誌 2016;37:156-162.
2. Torabinejad M. *et al.*: A New Solution for the Removal of the Smear Layer. J Endod 2003;29: 170-175.

日本の歯科大学・歯学部附属病院における根管洗浄に関する調査 第1報　アンケート結果

朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯科保存学分野
○木方一貴，田中雅士，長谷川智哉，和仁 護，赤堀裕樹，堺 ちなみ，竹内雄太，三上恵理子，
加藤友也，瀧谷佳晃，斎藤達哉，吉田隆一，河野 哲

A Survey on Root Canal lrrigation at University School of Dentistry in Japan 1. Questionnaire Findings

Department of Endodontics, Division of Oral Functional Science and Rehabilitation,
Asahi University School of Dentistry
○KIHO Kazuki, TANAKA Masashi, HASEGAWA Tomoya, WANI Mamoru, AKAHORI Hiroki, SAKAI Chinami, TAKEUCHI Yuta,
MIKAMI Eriko, KATO Tomoya, TAKITANI Yoshiaki, SAITO Tatsuya, YOSHIDA Takakazu, KAWANO Satoshi

【緒言】

歯内療法は、ニッケルチタンロータリーファイルや、歯科用コーンビーム CT、実体顕微鏡などの応用により、近年大きく変化してきた。使用器具や器材は変化しても、機械的清掃のみでは根管内の無菌化は達成できず、根管洗浄や根管貼薬が必要であるという考えは、現在も続いている。しかし、根管洗浄に用いる根管洗浄器や根管洗浄剤は多種多様であるため、根管洗浄の方法も様々であると推測できる。そこで今回、日本の歯科大学・歯学部附属病院に対して、実際に臨床で用いる根管洗浄法に関するアンケート行い、その実態を調査したため報告する。

【方法】

2018 年 6 月に調査を実施した。日本の歯科大学および歯学部 29 校の歯内療法に関わる 34 講座に対して、代表者宛に「臨床で用いられている根管洗浄法についての調査」と題しアンケートを送付し、回答を求めた。質問内容は根管洗浄実施の有無、実施するタイミング、使用器具や薬剤などの計 13 項目とした。

【結果】

2018 年 7 月 23 日現在、29 校 34 講座中、26 校 29 講座にご回答頂き、アンケート回収率は 85%であった。まず、根管洗浄を行うかという項目に対しては 29 講座全てが行うと回答。根管洗浄を行うタイミングに関しては、『拡大サイズの上昇時に毎回必ず行う』が 31%（9 講座）、『拡大サイズの上昇時に適宜行う』が 79%（23 講座）、『拡大中は行わず、最終拡大終了後（貼薬前）に行う』が 3%（1 講座）だった。

根管洗浄器は、『シリンジを使用する』が 93%（27 講座）、『超音波発振装置を使用する』が 90%（26 講座）、『可聴域振動装置を使用する』が 14%（4 講座）、『その他』は 1 講座であった。

根管洗浄器として『シリンジを使用する』と回答した 27 講座の内訳として、ルートキャナルシリンジを用いるは 30%（8 講座）、シリンジと先端開口型洗浄針を用いるが 67%（18 講座）、シリンジと側孔開口型洗浄針を用いるが 30%（8 講座）であった。シリンジに用いる薬剤としては、次亜塩素酸ナトリウムは 96%（26 講座）。EDTA は 96%（26 講座）、過酸化水素水は 30%（8 講座）、生理食塩水は 33%（9 講座）、精製水は 4%（1 講座）、クエン酸は 4%（1 講座）であった。根管洗浄器として『超音波発振装置を使用する』と回答した 26 講座の内訳は、市販のファイルタイプのチップを用いるは 73%（19 講座）、スプレッダータイプのチップを用いるは 62%（16 講座）であった。また超音波発振装置使用時には、次亜塩素酸ナトリウム、EDTA、チェアーからの給水、精製水および水道水が使用されていた。『聴域振動装置を使用する』の回答は 4 講座と少なかったが、使用するチップや洗浄液は、超音波発振装置の結果と同様であった。根管洗浄器で『その他』を選択した内容としては、ブローチ綿栓で薬液を根管内に入れて十分に浸すとの回答を得た。

【結論】

今回の日本の歯科大学・歯学部附属病院における根管洗浄に関するアンケート調査にご回答頂いた全ての講座が根管洗浄を実施しており、根管洗浄が必要であるという認識は共通していた。その方法は多くの講座でシリンジのみではなく、超音波発振装置や可聴域振動装置を併用していた。根管洗浄剤の種類に関しては、次亜塩素酸ナトリウムや EDTA を多くの講座が使用していた。単一薬剤のみを根管洗浄剤として使用している講座は少なく、症例に応じて適宜他の根管洗浄剤を併用していることが判明した。

なお、第 149 回秋季日本歯科保存学会においては、最新のデータを示す予定である。

Bioactive Glass配合バイオセラミックス系根管用シーラー「ニシカキャナルシーラーBG」を用いた根管充填症例の短期調査

九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野
○鷲尾絢子，三浦弘喜，諸冨孝彦，吉居慎二，藤元政考，末松美希，宮原宏武，宮下桂子，高倉那奈，村田一将，北村知昭

Short-term Surveillance of Cases with Bioactive Glass-containing Bioceramics-based Root Canal Sealer “Nishika Canal Sealer BG”

Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Department of Oral Functions, Kyushu Dental University
○WASHIO Ayako, MIURA Hiroki, MOROTOMI Takahiko, YOSHII Shinji, Fujimoto Masataka, Suematsu Miki, MIYAHARA Hirotake, MIYASHITA Keiko, TAKAKURA Nana, MURATA Kazumasa, KITAMURA Chiaki

【研究目的】

Bioactive Glass配合バイオセラミックス系根管用シーラー「ニシカキャナルシーラーBG」は抜髄等のイニシャルトリートメントから感染根管治療等のリトリートメントまで使用可能な日本発のバイオセラミックス系根管用シーラーである．今回，2017年11月発売時からの短期間においてニシカキャナルシーラーBGを用いて根管充填を行った症例に関する調査を行った．

【材料および方法】

九州歯科大学附属病院保存治療科および一般開業歯科医院（1件）を受診し，抜髄処置あるいは感染根管処置が必要と診断され同意を得た患者で，当分野の歯内治療用クリティカルパスに則って治療を行い根管充填まで至った症例を対象とした．対象症例の治療部位，AAEにより提唱されている診断名，処置内容，根管充填方法，根管充填時と直後における術後疼痛の有無を調査した．また，根管充填後3ヶ月および6ヶ月を経過した症例についても疼痛の有無および術後経過を調査した（九州歯科大学倫理委員会　承認番号；17-39）．

【結果】

調査期間における対象症例の治療部位の割合は前歯41%，小臼歯24%，大臼歯35%であった．診断名別では，症候性不可逆性歯髄炎15%，無症候性不可逆性歯髄炎5%，歯髄壊死2%，急性根尖膿瘍1%，慢性根尖膿瘍14%，症候性根尖性歯周炎34%および無症候性根尖性歯周炎29%であり，抜髄処置が20%，感染根管処置が80%であった．根管充填法別では，側方加圧根管充填16%，マルチポイント法（加圧なし）52%，シングルポイント法32%であった．術後疼痛については，根管充填中に違和感を訴える症例がごく少数認められたが，術直後には症状は消失していた．また，術後3ヶ月および6ヶ月を経過した症例では不快症状や再発は認められなかった．

【考察】

今回の調査期間では治療部位は前歯部が多く感染根管処置の割合が高かった．これらの症例に対しニシカキャナルシーラーBGを用いた根管充填を実施し，術後疼痛の有無および臨床経過を分析した．その結果，根管充填法の違いに関わらず術中および術後疼痛はほぼ認められず術後経過も良好であった．以上より，短期間の臨床成績ではあるが，ニシカキャナルシーラーBGが有用な根管用シーラーであること，また本シーラーに関する *in vitro* および *in vivo* の研究成果が臨床において反映されていることを示唆している．

【結論】

発売開始から短期間におけるニシカキャナルシーラーBGを用いた根管充填症例を調査したところ，良好な治癒経過が得られていることが明らかとなった．今後も引き続き長期間の臨床経過を追う予定である．

非外科的歯内療法により治癒を認めた両隣在歯根尖を含む歯根肉芽腫の症例

日本大学松戸歯学歯内療法学講座
○岡部　達、神尾直人、葉山朋美、深井譲滋、和田　健、松島　潔

Asuccessful case of non-surgical endodontic treatment for radicular granuloma including bilateral apical foramen

Department of Endodontics Nihon University School of Dentistry at Matsudo
○Tatsu Okabe, Naoto Kamio, Tomomi Hayama, Joji Fukai, Ken Wada, Kiyoshi Mtsushima

〈緒言〉

日常臨床において根尖部に大きなＸ線透過像を有する根尖病変に遭遇することがある。根尖部のＸ線透過像が大きい場合、根尖部の病変は嚢胞化している可能性が高いとされており、一般的に歯根嚢胞は通常の根管治療では治癒しにくく外科的歯内療法が有効であるとされている。しかしながらＸ線的に正しく根尖病変が歯根嚢胞であるかを判断するのは難しく、外科的歯内療法の適応であるか否かを判定するのに苦慮することも少なくない。今回、両隣在歯根尖を含むほど大きな透過像を有するものの、根管治療前に病理生検により歯根肉芽腫との確定診断が得られ、原因歯に対する非外科的歯内療法のみで良好な治癒結果を得たので報告する。

〈症例〉

主訴：患者は 15 歳の女性。上顎左側側切歯唇側歯肉の腫脹を主訴に近隣開業医を受診したところ、腫瘍性病変の可能性を指摘され当院口腔外科に紹介来院した。臨床所見：歯冠部に齲蝕治療等の既往を思わせる所見は認めないが、軽度打診痛を認め歯髄電気診に反応は認めなかった。また、頬側歯肉に瘻孔を認め同部より排膿を認めた。エックス線所見：パノラマＸ線写真上で上顎左側中切歯から上顎左側犬歯に及ぶ透過像を認め、頭部ＣＴ撮影による追加撮影を行ったところ、上顎左側側切歯根尖を中心としたφ15.0ｍｍ×16.7ｍｍ×14.6ｍｍの鼻口蓋管と接する内部不均一な低濃度域を認め、皮質骨の膨隆も認めた。病理検査：画像所見よりエナメル上皮腫および歯原生角化嚢胞の疑いが認められたことから当院口腔外科にて病理生検を施行。組織切片より歯根肉芽腫との診断がえられた。

〈治療〉

当初、外科的な肉下種の摘出術が予定され上顎左側側切歯の感染根管治療、上顎左側中切歯および上顎左側犬歯の抜髄処置を当院保存科に依頼された。しかしながら、上顎左側中切歯および上顎左側犬歯ともに正常に歯髄電気診に反応することから、まず上顎左側側切歯の感染根管治療のみ行い病変の経過観察を行うこととなった。根管治療は通法通り無麻酔にて根管口明示を行い、根管拡大・洗浄の後水酸化カルシウム製剤による貼薬を行った。2 回目来院時には瘻孔の消失を認め、やや根尖が未完成の傾向にあったためアペキシフィケーション目的に 1 か月毎の水酸化カルシウム製剤の貼薬交換を行うこととした。根管治療開始約 6 か月後に病変確認を目的に口内法エックス線写真およびパノラマエックス線写真を撮影したところ、明らかな透過像の縮小を認めた。根管治療開始 12 か月後に頭部ＣＴ撮影を行ったところ低濃度域はφ7.0ｍｍ×6.5ｍｍ×11.0ｍｍとなり皮質骨の膨隆も消失した。根管治療開始 14 か月後に根尖の閉鎖を確認したうえで根管充填処置を行い、外科的処置は行わずそのまま経過観察をすることとなった。

〈考察および結論〉

歯根嚢胞は通常の根管処置では治癒しないことも少なくなく、外科的歯内療法が併用されることがあるが、日常臨床において臨床所見やエックス線診査による画像所見では歯根嚢胞であるかの判別をつけることは非常に困難である。Lalonde は歯根嚢胞と歯根肉芽腫との鑑別において、透過像の直径が 9.5ｍｍ～16.0ｍｍ以上のものは歯根嚢胞の可能性が高いとしている。しかしながら、本症例では 16.0ｍｍ以上の骨欠損が認められながらも根管治療前の病理組織生検で歯根肉芽腫の確定診断を得ることができた。このことから、我々は通常の根管処置による病変の反応性は高いものと判断し、原因歯のみの感染根管治療のみで経過観察を行うこととした。その結果、根尖部透過像著明な縮小が認められ、外科処置およびそれに伴う両隣在歯の抜髄処置を回避することができた。

本症例では、他の腫瘍性病変の疑いが認められたために病理生検が行われたが、根管処置前の病理組織診断が歯内療法学的な処置方針の決定に非常に有効であったと示唆される。

Fusobacterium nucleatum は歯根肉芽腫に潜伏感染した Epstein-Barr Virus を再活性化する

日本大学歯学部歯科保存学第 2 講座[1],日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門[2]
日本大学歯学部細菌学講座[3],日本大学歯学部総合歯学研究所生体防御部門[4]
○氷見一馬[1]，武市収[1,2]，羽鳥啓介[1,2]，牧野公亮[1]，工藤洋[1]
田村隆仁[1]，田中一[3,4]，今井健一[3,4]，小木曾文内[1,2]

Fusobacterium nucleatum reactivates Epstein-Barr virus latently infected with periapical granuloma

Department of Endodontics[1], Division of Advanced Dental Treatment[2], Department of Microbiology[3] and Division of Immunology and Pathobiology[4], Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry
○Kazuma Himi[1], Osamu Takeichi[1,2], Keisuke Hatori[1,2], Kosuke Makino[1], Hiroshi Kudo[1]
Takahito Tamura[1], Hajime Tanaka[3,4], Kenichi Imai[3,4], Bunnai Ogiso[1,2]

【背景】 当講座では，ウイルス感染が根尖性歯周炎の病態に与える影響について検索を行っており，Epstein-Barr Virus (EBV)が歯根肉芽腫組織に浸潤した B 細胞に感染していることや潜伏感染した EBV が *Porphyromonas endodontalis* の代謝産物である酪酸によって再活性化することなどを明らかにした。我々は第 147 回本学会学術大会において、難治性根尖性歯周炎関連細菌である *Fusobacterium nucleatum* が EBV を再活性化させている可能性を報告した。摘出した歯根肉芽腫中においても再活性化の指標となる BZLF1(前初期遺伝子)の増幅や ZEBRA(BZLF1 合成蛋白)の発現が認められ EBV が再活性化している可能性が示唆されるが、未だ詳細は不明である。

【研究目的】 実際の歯根肉芽腫中においても EBV が再活性化されていることを明らかにするため，摘出した歯根肉芽腫から EBV の LMP1（膜タンパク）及び ZEBRA の発現を検索した。また、*F. nucleatum* の代謝産物により EBV が再活性化されていることを明らかにするため，EBV 感染 B 細胞である Daudi 及び B95-8-221 を用いて BZLF1 の発現及び活性を検索した。

【材料及び方法】

1.供試試料：根管治療を繰り返しても治癒せず，日本大学歯学部付属歯科病院に紹介された患者(42 名)を被験者とし，口腔内診査(打診痛，咬合痛，根尖部圧痛，瘻孔の有無)及びエックス線診査に基づき，外科的歯内治療が適応とされた患者から根尖病巣組織を採取した。また，完全水平埋伏智歯の抜去の際に採取した健常歯肉組織をコントロールとして用いた。採取試料は直ちにホルマリン固定した後パラフィン切片を作製した。全ての試料に対して HE 染色を行い，歯根肉芽腫と病理診断された組織を本研究に用いた。試料の採取にあたっては歯学部倫理委員会の承諾を得て実施した。(倫許 EP16D026)

2.Real-time PCR 法：EBV 感染 B 細胞である Daudi を用いて,, *F. nucleatum* の培養上清を 12 時間及び 24 時間添加した後，各々細胞から mRNA を抽出し cDNA に変換後，BZLF1 特異的プライマーを用いて Real-time PCR 法にて BZLF1 遺伝子を検出した。また、Steel test を用いて有意水準 0.05 の条件で統計学的検定を行った。

3.免疫組織化学的検索：パラフィン切片を用いて、抗ヒト LMP1 マウスモノクローナル抗体及び抗ヒト ZEBRA マウスモノクローナル抗体を用いて，各々酵素抗体法により染色を行い、両者を検索した。また上記 2 種類の抗体及び抗ヒト CD79a ウサギモノクローナル抗体を用いて蛍光抗体法により蛍光二重染色を行った。

4.Luciferase assay ：BZLF1-Luc プラスミドが組み込まれた EBV 感染細胞である B95-8-221 細胞を用いた。B95-8-221 細胞に *F.nucleatum* の培養上清を 12 時間及び 24 時間添加した後, Luciferase assay により BZLF1 活性を検討した。また、Steel test を用いて有意水準 0.05 の条件で統計学的検定を行った。

【成績】

1: Control（無刺激 EBV 感染細胞）と比較し *F. nucleatum* の培養上清を添加した EBV 感染細胞から有意な BZLF1 活性 (Luciferase assay) 及び BZLF1 発現(Real-time PCR 法) を認めた。

2: 歯根肉芽腫中において免疫組織化学的検索より，LMP1 及び ZEBRA の発現細胞の局在が確認された。

【結論】EBV 感染細胞に *F. nucleatum* の培養上清を添加したところ，有意な EBV 再活性化のシグナルである BZLF1 の活性と発現を認めた。また，免疫組織化学的検索より，LMP1 及び ZEBRA の発現細胞の局在が確認された。したがって，歯根肉芽腫中の *F. nucleatum* が EBV を再活性化させていることが示唆された。

大臼歯の髄腔開拡における可視化治療について
- 超小型 CMOS ビデオスコープの解像度 -

鶴見大学歯学部歯内療法学講座[1)]、鶴見大学短期大学部歯科衛生科[2)]
○山崎泰志[1)]，小林一行[2)]、田井康晴[1)]、山本　要[1)]、吉田拓正[1)]、久世哲也[1)]、細矢哲康[1)]

Visualization treatment on access cavity preparation of molars
- Resolution of the microminiature CMOS videoscope -

Department of Endodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine[1)],
Department of Dental Hygiene, Tsurumi Junior college[2)]
○YAMAZAKI Yasushi[1)], KOBAYASHI Kazuyuki[2)], TAI Yasuharu[1)], YAMAMOTO Kaname[1)],
YOSHIDA Takumasa[1)], KUZE Tetsuya[1)], HOSOYA Noriyasu[1)]

【目　的】

臨床における歯の切削は、エアータービンやマイクロモーターハンドピースが用いられることが多い。確実で精密な切削には、手術用顕微鏡や拡大鏡が利用されるが、ハンドピースヘッドや手指により直視できないため中断と確認が繰り返される。正確かつ安全で効率的な切削を行うためには、リアルタイムでの切削状況の可視化が望まれる。歯内療法においても MI の配慮が求められるが、適切な髄腔開拡と根管口明示は、その後の治療や成績に大きく影響する。

本研究では、歯科治療における適切な切削のための可視化治療を目的に、ハンドピースヘッドに装着する超小径 CMOS ビデオスコープの有効性を検討した。

【材料と方法】

被験器材には、超小型 CMOS ビデオスコープ（AX-1，オーテックス）を用いた。本器材は、画素数：160,000 pixel、画角：90°，被写界深度：3-20mm，フレームレート：60fps のスペックを有し、0.95×0.95×2.5mm の超小型 CMOS カメラを搭載している。CAD/CAM で作成した ABS 樹脂製のホルダーで、AX-1 の CMOS カメラ本体をハンドピース（トルクテック等速コントラ CA-DC，モリタ）に装着し、ラウンドバーによる切削部位が観察できるように調整した。なお、比較として手術用顕微鏡（TERA-21，イナミ）と歯科用口腔内カメラ（Penviewer，モリタ）を用いた。

通常では、直視による観察が困難な上顎第一大臼歯頬側近心根の根管口明示を想定し、髄腔付人工歯（A12A-500#26、ニッシン）を水平位のファントームに固定した。AX-1 と Penviewer はモニター画像、TERA-21 は 10 倍下、ミラー反射で、各器材 5 本ずつ、髄腔開拡と根管口明示を行い動画として記録した。切削部位の可視化状況について、切削に携わらない臨床医が記録動画から評価した。解像力についての評価は、テストターゲット（USAF1951，エドモンド・オプティクス・ジャパン）を、視軸に対して垂直になるように設置し、５名の評価者により解像度を測定した。なお、焦点調整は各評価者が行った。得られた結果から、1 元配置分散分析（危険率５％）を用いて統計学的検索を行った。

【結　果】

ラウンドバー先端ならびに切削状況は、AX-1 では観察開始から終了まで確認が可能で、TERA-21 および Penviewer では、ハンドピースヘッドに遮られる状況がしばしば認められた。なお、評価者間における差はなかった。

テストターゲットによる解像力の評価では、AX-1 の解像力は TERA-21 に比べ有意に劣っていたが、Penviewer との明らかな差はなかった。

【考　察】

TERA-21 は視線を固定した状態にあり、直視以上に器材により視野が遮られる。また、Penviewer は口腔内での移動が容易ではあるが、ハンドピースヘッドに遮られる状況もあった。しかし、切削部位の近くに設定した AX-1 は、切削片等による汚染で視界が妨げられ、冷却用のタービン水などによっても撮影が困難になると考えられる。今後は、カメラの設置位置やレンズの清掃についても追加して検討する必要がある。

AX-1 および Penviewer は CMOS カメラ画像であり、光学系レンズのみの TERA-21 のような鮮鋭な画像を得るのは困難である。さらに、画素数、モニターの解像度ならびに画像処理ソフトの性能が、解像度におよぼす影響は大きい。今回の被験器材でも、解剖学的構造の観察には十分な解像度を有することから、別途に専用ホルダーを用意することで、手用器具による処置の確実な可視化も可能と思われる。

【結　論】

超小型 CMOS ビデオスコープは、ハンドピースに装着した状態での切削状況の撮影ならびに解剖学的形態を識別する十分な解像度を有していることから、可視化治療を目的とした臨床応用への有効性が示唆された。

愛知学院大学歯学部附属病院歯内治療科における歯科用コーンビーム CT 検査の実態調査 － 第 2 報　2015 年と 2016 年の分析 －

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座
○長谷奈央子，稲本京子，柴田直樹，中田和彦

A survey of cone-beam computed tomography at endodontic clinic of Aichi Gakuin University Dental Hospital -Part2: Analysis of the CBCT performed 2015 and 2016-

Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
○Naoko Hase, Kyoko Inamoto, Naoki Shibata, Kazuhiko Nakata

【研究目的】歯科用コーンビーム CT（CBCT: Cone-Beam Computed Tomography）は，任意の部位を三方向断面から立体的に観察することができるため，歯内療法領域において診断精度と治療の予知性の向上に革新的な進歩をもたらしている．近年，パノラマ装置に CBCT の機能を搭載した複合機も登場し，平成 24 年度（2012 年）の診療報酬改定に伴い CBCT 検査が保険適用されたことにより，一般の歯科医院でも急速にその普及が進んでいる．その一方，CBCT 撮像は，口内法およびパノラマエックス線撮影より多くの被曝線量を伴う検査であるため，その有効症例を選択し，ルーティンな撮像は避けるべきである．愛知学院大学歯学部附属病院歯内治療科では，2002 年より臨床研究として CBCT 検査を実施し，さまざまな臨床例を通じてその有効性や適応症の設定を試みている．その第 1 報として，2002 年から 2014 年までの結果を第 148 回本学会学術大会で報告した．今回は，2015 年および 2016 年に実施された CBCT 検査に関する実態を調査し，分析を行った．なお，本研究は，愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認（承認番号：206, 429）を得ている．

【対象および方法】2015 年 1 月 1 日から 2016 年 12 月 31 日までの 2 年間に，愛知学院大学歯学部附属病院歯内治療科を受診し，CBCT 検査が必要であると判断され，かつ本研究の趣旨に同意が得られた患者症例を対象とした．CBCT 検査を行った歯科医師に対して質問票によるアンケート調査を実施し，症例件数，患者性別・年代，撮像部位・目的，適用症例の内訳，得られた画像情報，撮像後の処置方針の項目を分析した．

【結果】CBCT 検査数は，2015 年が 74 件，2016 年が 159 件であった．性別は，2015 年，2016 年ともに女性が 66.7%，男性が 33.3%であった．撮像目的では，「病変と解剖学的構造（上顎洞，下顎管，オトガイ孔など）との三次元的関係」（2015 年 17.3%，2016 年 17.5%），「根尖病変の三次元的進展の確認」（2015 年 15.9%，2016 年 15.2%），「根尖病変の有無の確認」（2015 年 11.8%，2016 年 11.9%）が多かった．また，本来の撮像目的以外に得られた情報として，「皮質骨の欠損」，「臨在歯の根尖病変」，「上顎洞粘膜の肥厚」，「根尖孔外の異物の存在」，「根管の狭窄」，「周囲の骨硬化」，「根尖孔の破壊」などがあった．撮像後の処置方針として，根管充塡後に補綴処置へ移行していた症例（2015 年 44%，2016 年 50%）があった一方で，撮像後に抜歯となった症例も存在した（2015 年 24%，2016 年 12.1%）．その他には，経過観察（2015 年 9.3%，2016 年 17.9%），外科的歯内治療（2015 年 13.3%，2016 年 7.9%），治療途中（2015 年 2.7%，2016 年 3.0%），その他（2015 年 6.6%，2016 年 8.5%）であった．

【考察および結論】当科では，CBCT 検査が保険診療に導入される前から，適応症の設定を試みていたため，前回の結果と比較しても，撮像目的に大きな差はみられなかった．例年，根尖病変の進展程度を把握する目的が高い割合を示しており，その有効性も高く評価されている（2015 年 45%, 2016 年 44%）．また，CBCT 画像診断により，外科的歯内治療や抜歯の処置方針が決定し，無益な根管処置の継続を回避できた症例もあった．さらに，得られた三次元画像データから，撮像目的以外の病的変化が存在した症例も認められため，撮像領域全体の十分な精査の重要性が再確認された．CBCT 検査は，当科に依頼される様々な難症例に対して実施されていることから，病態を分析し，データを蓄積していくことで，より正確な診断や的確な治療方針の決定に繋がると考えられる．したがって，今後も CBCT 検査の実態調査を継続し，CBCT 撮像に関する適切な症例選択のあり方を提言し，また各症例の治療経過を詳細に分析し，CBCT 画像診断と歯内療法のアウトカムの関連性などについても検討していく予定である．

簡易乾熱滅菌への熱輻射光源応用に関する検討

日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座
○三枝慶祐、五十嵐　勝

Study on Application of Thermal Radiation Light Source to Endodontic Dry Heat Sterilization

Department of Endodontics、
The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Tokyo
○Keisuke SAIGUSA、 Masaru IGARASHI

【緒言】

歯科治療において無菌的処置を施すことは、治療成績の向上はもちろんのこと、患者、術者を介した感染予防の上でも重要な原則の一つである。特に歯内治療においては、血液や唾液、細菌感染の及んだ壊死組織等による汚染を取り扱う治療が多いことから、スタンダードプリコーションに則り処置を行い、必要に応じて術中に器具の滅菌消毒を行う必要がある。このことは、慢性疾患の根管治療後の急性化を防止する上でも重要なことである。

実際の歯内治療では、使用頻度の高いリーマーやファイル、その他の歯科用小器具は、使用前にガス滅菌や高圧蒸気滅菌等で滅菌使用するが、一旦手指や唾液、あるいは感染歯質等に接触した場合、器具の細菌汚染は明らかで、これらの器具は処置中に繰り返し使用するため、治療行為中の頻回の滅菌が必要となる。

従来からチェアサイドで行うことのできる簡易乾熱滅菌器が多く発表されている。簡易乾熱滅菌装置には溶融金属としてモルテンメタルなどの Sn-Pd 合金や Sn-Ag 合金を使用した器機、食塩等を媒体にした器機、ガラスビーズ小球を用いたビーズ滅菌器、石英底付円筒を用いた電気炉型式乾熱滅菌器、真鍮ブロックにスリットを入れ加熱する滅菌器等の乾熱滅菌器がある。ところが、溶融金属を使用する滅菌器の場合、溶融金属によって根管の閉塞が起き、金属の飛散による火傷の可能性もある。その他の滅菌器では、それぞれ滅菌可能温度とされている 260℃まで媒体温度が上昇するのに時間を要するため、準備に時間を要する問題がある。さらに浅層と深層の温度較差が生じるなど、改良すべき点とされてきた。さらに滅菌器全体の過重による歯科用ユニットのテーブルバランスの問題や、装置転倒時の媒体の流出、食塩法では食塩の潮解凝固など、いずれの滅菌器も様々な問題が残されている。また近年滅菌概念が浸透していることから、診療室における歯科医療行為以外の在宅訪問診療での滅菌の必要性もあり、携帯性も求められるようになった。

そこで今回われわれは、従来型に比べ滅菌対応可能な時間まで短時間でセットアップできるものとして、熱輻射光源への利用の可能性を検討する目的で、被滅菌物の温度上昇を調べることとした。

【材料および方法】

実験に使用した光源は、家庭用 100V を電源とし、通常のコンセントを使用するもので、特別な規格を必要としないランプとした。そのランプには、熱輻射光源とするハロゲンランプを内蔵したハロゲンランプスポットヒーター(Fintech Tokyo 社製)を使用し、ヒーターの焦点距離の位置に被滅菌物を配置した。ヒーター焦点は 10mm仕様のものを用いた。照射は双方向とし、被滅菌物としてΦ0.5 熱電対状温度センサーを使用し、温度データは PC に記録した。測定は経時的に行い、100、200、300℃に達するまで要した時間を計測した。ハロゲンランプの破損を防止するため冷却後、スイッチ off 後の室温までの温度下降についても記録した。測定場所は室温 25℃湿度 55%環境とし、無風状態で計測を行った。

【結果および考察】

光照射された熱電対状温度センサーは、過去に滅菌可能とされている 260℃に短時間で到達した。これにより、熱輻射光源による短時間での被検物周囲温度が急速に上昇することが示された。このことは、滅菌操作が短時間の内に準備が可能であり、重量を軽減できれば携帯性にも優位となる可能性が示された。今後は、装置の縮小化と各種微生物に対する滅菌効果の判定を行う予定である。

愛知学院大学歯学部附属病院歯内治療科の初診紹介患者に関する実態調査
－ 根管処置を困難とする因子の分析 －

愛知学院大学歯学部歯内治療学講座
○江幡　香里、稲本　京子、柴田　直樹、中田　和彦

Survey on new patients referred to the endodontic clinic of Aichi Gakuin University Dental Hospital
- Analysis of difficulty factors encountered during root canal treatment -

Department of Endodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
○Kaori Ebata, Kyoko Inamoto, Naoki Shibata, Kazuhiko Nakata

【研究目的】

愛知学院大学歯学部附属病院は、臨床歯科医学の教育研究機関であるとともに、高次医療機関として東海地方で中心的役割を果たしている。そのため、外部の医療機関から専門的な診査や診断、あるいは治療の依頼も多く、歯内治療科にも多くの患者が紹介により来院している。我々は第 143 回、146 回本学会学術大会において、本学歯学部附属病院歯内治療科宛ての紹介状を持参して来院した初診患者を対象に、各種の医療情報を調査し、初診紹介患者の実態について報告した。そこで本研究では、特に紹介元で根管処置が困難とされた因子の傾向を分析した。なお本研究は、愛知学院大学歯学部倫理委員会の承認（承認番号：412）を得ている。

【対象および方法】

2014 年 4 月 1 日から 2017 年 3 月 31 日までの 3 年間で、愛知学院大学歯学部附属病院歯内治療科宛ての紹介状を持参し来院した患者 1543 名を対象とした。基本情報、依頼部位、臨床症状および紹介元で根管処置が困難とされた因子として、①歯根破折 ②根管内異物（器具破折） ③穿孔 ④根管閉鎖 ⑤根管彎曲 ⑥根管口不明 ⑦内部・外部吸収 ⑧浸潤麻酔の不奏功について調査を行った。

【結果】

紹介患者の来院人数は、各年度とも約 500 名で、男女比は約 3：7 の割合であり、各年同様の傾向を示した。当科へ紹介された全 1543 症例のうち、根管処置を困難とする因子を伴った症例の依頼は 490 件（31.8%）だった。そして、その症例内訳として、①「歯根破折」に関する記載があった紹介状のうち、当科で精査した結果、実際に歯根破折が確認できた症例は 24/72 件（33.3%）であった。以下同様に、②「根管内異物（器具破折）」 88/97 件（90.7%）、③「穿孔」 38/55 件（69.1%）、④「根管閉鎖」 76/141 件（53.2%）、⑤「根管彎曲」 7/26 件（27.0%）、⑥「根管口不明」 15/48 件（31.3%）、⑦「内部・外部吸収」 10/19 件（52.9%）、⑧「浸潤麻酔の不奏功」 0/32（0%）であった。なかでも、根管内異物（器具破折）と穿孔を合計した“医原性の偶発症”が、根管処置を困難とする因子を伴っていると紹介された症例（全 490 件）のうち約 3 割（153 件）を占めた。なお、浸潤麻酔に関しては、依頼があったすべての症例で奏功した。

【考察および結論】

根管処置を困難とする因子を伴った症例の依頼には、医原性あるいは非医原性の因子が認められた。根管内破折器具除去や穿孔部封鎖といった偶発症への対応には、マイクロスコープや歯科用コーンビーム CT 等の特殊機器を必要とする場合も多く、当科の専門性を期待した依頼であったと考えられる。しかし、“医原性の偶発症”は、術者自身の注意深い器具操作、解剖学的知識および歯内治療の基本原則を遵守することで、多くの場合、未然に防止が可能である。また、浸潤麻酔の不奏功に関しては、当科では全症例で奏功したことからも、急性歯髄炎に対しては一旦歯髄鎮静した後、あらためて浸潤麻酔を行う等で対応が可能であったと推測される。

今後も、初診紹介患者に対する実態調査を継続し、高次医療機関として、社会ニーズの変化に対応していく必要がある。

高脂肪食の摂取は歯周組織に炎症性変化を及ぼす

広島大学大学院医歯薬保健学研究科歯周病態学研究室
○田利美沙子，藤田剛，芥川桂一，松田真司，加治屋幹人，應原一久，水野智仁，栗原英見

Effect of High Fat Diet on inflammatory response in periodontal tissue

Department of Periodontal Medicine, Graduate School of Biomedical & Health Science, Hiroshima University
○Misako Tari, Tsuyoshi Fujita, Keiichi Akutagawa, Shinji Matsuda, Mikihito Kajiya, Kazuhisa Ouhara, Noriyoshi Mizuno, Hidemi Kurihara

【目的】

歯周炎は宿主寄生体相互作用によって引き起こされる慢性炎症性疾患である。その発症・進行は様々な要因によって制御される。糖尿病は歯周炎のリスクファクターの一つであり、その機序として、宿主の易感染性と歯周組織における最終糖化産物（AGEs）の関与が示唆されている。一方、近年、糖尿病発症メカニズムとして高脂肪食の摂取が腸管で Ccl2（マクロファージを遊走させるケモカイン）と Ccr2（Ccl2 のレセプター）依存的に腸管の上皮バリアを破壊し、腸に持続的な慢性炎症を引き起こすことが報告された。このことから本研究では、高脂肪食の摂取が血中の成分を介して歯周組織で炎症を惹起する可能性があるとの仮説を立て、高脂肪食の摂取が歯周組織に与える炎症性変化について検討した。

【方法】

BALB/cAJcl マウス、2 型糖尿病モデルマウスである KK/TaJcL マウス（4 週齢から 5 週齢、雄）を使用した。それぞれを 2 群に分け、普通食（NC 群）、高脂肪食（HFD 群）を 8 週間与えた。マウス歯肉を採取し、Ccl2、Ccr2、IL-1β、TNF-α、歯肉上皮の接着因子である E-cadherin の mRNA 発現を real time PCR によって調べた。さらに、KK/TaJcl マウスの血清を採取し、CRP、IL-6、総コレステロール、遊離コレステロール、LDL コレステロール、HDL コレステロール、中性脂肪の濃度を ELISA 法で測定し NC 群と HFD 群で比較した。

【結果】

KK/TaJcl マウスの歯肉において、NC 群と比較して HFD 群で Ccl2、Ccr2、IL-1β の mRNA で発現が高かった。TNF-α mRNA の発現は両群間で差は認めなかった。また、E-cadherin mRNA 発現は HFD 群で低かった。BALB/cAJcL マウスでは HFD 群で IL-1β mRNA のみ NC 群よりも優位に高く、Ccl2、Ccr2 では発現が高い傾向を認めた。一方で、KK/Tajcl マウスの血清中で IL-6、CRP の濃度に両群間に有意な差は見られなかったが、総コレステロール、遊離コレステロールの濃度は HFD 群で有意に高かった。

【考察】

これまで糖尿病マウスで歯周病が進行することが報告されてきたが、本研究結果によって糖尿病モデルマウス以外のマウスにおいても高脂肪食の摂取が歯周組織の炎症の発症に関与している可能性が示唆された。また、KK/TaJcl マウスの血中の IL-6、CRP の濃度は NC 群、HFD 群で優位な差を認めなかったことから、肥満が歯周病に影響を及ぼす経路として血中のアディポカインを介さない経路が存在する可能性が示唆された。

歯髄細胞由来 SSEA-3 陽性細胞の特性解析

鶴見大学歯学部歯周病学講座
○長野　孝俊、船津　太一朗、五味　一博

Characterization of SSEA-3 positive cell from pulp cells

Department of Periodontology, Tsurumi University School of Dental Medicine
○Takatoshi Nagano, Taichiro Funatsu, Kazuhiro Gomi

【目的】

近年、ヒト間葉系組織に多分化能を有するが腫瘍性を持たない Muse(Multiliniage-differentiating stress enduring) 細胞が報告された。この細胞は、体組織の間葉系組織中のどこにでも存在しているとされており、細胞の表面抗原である SSEA-3 と CD105 の両陽性細胞として分離することが出来るとされている。

Muse 細胞は体のあらゆる細胞に分化するだけでなく、分化誘導をかけずにそのまま血管内に投与するだけで傷害部位に集積し、自発的にその組織に応じた細胞に分化することによって組織修復・再生を行うことが出来る細胞であり、腫瘍性を持たないことからも再生医療への早期の応用が期待されている。

本研究は歯髄細胞より SSEA-3 陽性細胞を分取し、それらの細胞の特性を解析することを目的として行った（倫理委員会承認番号：1113)。

【材料と方法】

LONZA より購入した歯髄幹細胞をオーバーコンフルエントに達するまで通常培養し、回収した細胞を抗 SSEA-3 抗体にて一次染色、FITC で二次染色を行い FACS にて歯髄幹細胞由来 SSEA-3 陽性細胞を得た。分取した細胞を 6 穴プレートに播種し増殖培地にて増殖能を計測するとともに、これらの細胞を単一細胞で 96 穴プレートに播種し、自己複製能の観察を行った。また増殖した細胞より採取した RNA を用いて 3 胚葉性の遺伝子発現を観察した。

さらに、採取した SSEA-3 陽性細胞を用いて 6 穴プレート上で石灰化誘導培地を用いて石灰化誘導実験を行い、石灰化誘導 1 週、2 週、3 週でのウェルの ALP 染色、アリザリンレッド染色を行い細胞の石灰化度を評価した。

【結果と考察】

LONZA 歯髄幹細胞中に 0.4%前後の SSEA-3 陽性細胞の発現を認めた。分取した陽性細胞の細胞増殖能を検討したところ、通常の細胞と遜色ない増殖能を観察した。続いて、歯髄幹細胞由来 SSEA-3 陽性細胞において単一細胞からのクラスター形成、さらにクラスターからクラスターへの自己複製能が確認された。さらに、採取した RNA から 3 胚葉性の遺伝子発現を確認した。

また、石灰化誘導実験においては 1 週、2 週、3 週と石灰化の進行に伴ってウェルの ALP 染色、アリザリンレッド染色はより高濃度に染色された。

今回の結果により、歯髄幹細胞から自己複製能を持ち 3 胚葉性の遺伝子を発現している細胞を分離することが可能であることが分かった。また、今回使用した歯髄幹細胞集団はほとんどが間葉系細胞と考えられ、CD105 の発現も予想されることから、Muse 細胞に近い特性を持つ細胞であることが考えられる。石灰化誘導実験では、誘導が進むにつれ濃く染色されていることからも、骨形成能をもった細胞に分化していることが示唆された。

便宜抜歯や智歯抜歯で得られる抜去歯は医療廃棄物であり、それら抜去歯から歯髄や歯根膜等の組織を得ることができる。現在、主に骨髄細胞を用いた細胞再生医療が行われているが、それらに比べ低侵襲で細胞を得られるメリットがあるため、今後新たな細胞源として歯髄組織の有効性が期待される。

【結論】

歯髄幹細胞から SSEA-3 陽性細胞を分離することができ、それらの細胞は 3 胚葉性の遺伝子を発現することが示され、石灰化能を有する細胞であることが明らかとなった。

(本研究の一部は、科学研究費補助金：基盤研究（C）一般、課題番号：16K11844 の助成を受け行われた。)

歯種による歯肉溝滲出液(GCF)の成分の多様性の探索

[1]昭和大学歯学部歯周病学講座, [2]昭和大学薬学部基礎薬学講座生物化学部門
○竹丸 真以[1], 澤田 直子[2], 板部 洋之[2], 山本 松男[1]

Comparison of protein profiles of gingival crevicular fluids collected from incisors, canines and molars

[1] Department of Periodontology, Showa University School of Dentistry,
[2] Department of Pharmaceutial Sciences Division of Biological Chemistry
○Mai Takemaru[1], Naoko Sawada[2], Hiroyuki Itabe[2], Matsuo Yamamoto[1]

歯肉滲出液(GCF)は歯と歯肉の間にある歯肉溝に滲出する血漿由来の体液で、非侵襲的に口腔内から採取可能である。GCF は様々な抗菌物質を含み、好中球やマクロファージなども滲出し、歯周組織の生体防御機構としての働きをもつことが知られている。また GCF 中の炎症性サイトカインの変動は数多くの研究で調べられ、GCF が歯周組織の状態を反映することが明らかにされてきた。

進行の早い侵襲性歯周炎の病態に、中切歯と第一大臼歯に限局して歯周組織破壊が進む症例があることは以前より知られていたが、そのメカニズムについてはほとんど明らかになっていない。そこで歯種ごとの歯周組織の特性を知る一つの手がかりとして、GCF が利用できる可能性を考えた。これまでに歯種による GCF 成分の特徴について検討した報告はない。本研究では、歯種によって GCF の成分が異なるかどうかを探索することを目的とした。

本研究は健康な歯周組織を有する健康な成人男性を対象として行い、同一被験者の上顎中切歯、犬歯、第一大臼歯の頬舌側近遠心よりペーパーポイントを用いて GCF を採取した。3 歯種の GCF 中のタンパク成分について、SDS-PAGE によるバンドパターンの比較し、液体クロマトグラフ質量分析(LC-MS/MS 分析)によりそれぞれのバンド中のタンパク質を同定した。また、網羅的かつ定量的に微量サンプル中のタンパク質プロファイルを検討するために、同位体標識タグ（iTRAQ 法）を用いた LC-MS/MS 解析を行った。iTRAQ 法を用いることで、異なるサンプル中の同じタンパク質の存在量の比率を数値化して求めることが出来る。

GCFに含まれるタンパク質をSDS-PAGEにより調べた。それぞれのバンドに含まれるタンパク質を質量分析法により同定した。GCF中の主要なタンパク質は血清アルブミン、セロトランスフェリン、補体C３、ミエロペルオキシダーゼ、S100タンパクA8、A9などであった。同一被験者の３歯種のGCFについて比較したところ、歯種によらずバンドパターンは非常によく似ていたが、一部のバンドの濃さ、強さに違いがみられた。

また、iTRAQ法を用いたGCFタンパク質の網羅的解析によって、セロトランスフェリンやS100A8,9などを含めて100種前後のタンパク質が同定できた。これらのタンパク質について歯種間の量比を示す分析結果が得られ、セロトランスフェリン、S100タンパクA8、補体C3、アポリポタンパク質A1などいくつかのタンパク質で量比の異なるものが散見された。この傾向はSDS-PAGEの結果とも一致した。これまでは歯種によりGCFの成分が異なる可能性はほとんど議論されてこなかったが、歯種によるタンパク質パターンの特徴が存在すれば、歯や歯周組織の新たな知見となり、将来的には歯種による治療法の最適化などの基盤になる可能性がある。

今後、サンプル数を増やすとともに、さらに精査していく予定である。

歯周病原細菌が膵がんに与える影響

[1]北医療大 歯 保健衛生，[2]北医療大 がん予防研，[3]北医療大 歯 臨床口腔病理
○植原　治[1,2]，平木大地[3]，藏滿保宏[2]，虎谷斉子[1]，安彦善裕[3]，千葉逸朗[1]

The effects of periodontal pathogenic bacteria on pancreatic cancer

[1] Div Dis Control Mol Epidemiol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent,
[2] Research Institute of Cancer Prevention, HSUH, [3] Div Oral Med Pathol, HSUH Sch Dent
○Osamu Uehara[1,2], Daichi Hiraki[3], Yasuhiro Kuramitsu[2], Seiko Toraya[1], Yoshihio Abiko[3], Itsuo Chiba[1]

【研究目的】

膵がんの 5 年生存率は全ての癌の中で最も低く，本邦における癌の部位別死因の第 4 位である。その死亡者数は，年々増加している．膵臓は，小さな臓器であるため浸潤のスピードが速いこと，血管，神経やリンパ管に囲まれているため遠隔転移しやすいことも予後を悪くしている．膵がんの発症には，慢性膵炎に加え，アルコールの消費や肥満などの環境要因も膵がんの発症に関係する危険因子とも考えられているが，原因は未だ解明されていない．歯周病は糖尿病，感染性心内膜炎，自己免疫疾患などの全身疾患に関連する危険因子となることが報告されている．近年，歯周病と膵がんとの関連を示す疫学研究がいくつか報告されているが，そのメカニズムは明らかになっていない．本研究では，*P. gingivalis* の LPS（PG-LPS）を全身投与するモデルを用いて膵がんの発症や進行への影響について網羅的に探索し，さらに膵がん患者から採取した膵がん組織の細菌叢解析を行なった．

【材料および方法】

［実験 1］実験に際し，本学動物実験センターの承認を得た．6〜8 週齢のマウス（C57BL/J）に生理食塩水で調製した PG-LPS を 5 mg/kg になるよう腹腔内投与し 3 日毎（84 h）に 1 回，1 ヶ月間（10 回）投与した．各群 5 匹飼育し，LPS 溶液と同量の生理食塩水を投与した群を対照群（Control）とした．最終投与より 3 日後にマウスを屠殺し，膵臓を摘出した．摘出した膵臓より Total RNA を抽出，cDNA を合成し，DNA マイクロアレイによる mRNA 発現の網羅的解析を行った．発現が上位であった遺伝子発現の再現性を Real-time RT-PCR にて解析した．また，薄切標本を作製し H&E 染色による組織像の観察，遺伝子発現が上位であった分子の免疫染色を行った．

［実験 2］膵がん組織への口腔内細菌の感染を明らかにするため，膵がん（膵管内乳頭粘液性腫瘍）患者から採取した膵がん組織 DNA に対して，次世代シーケンサーを用いたメタ 16S 解析を行った．膵がん組織 DNA の利用にあたり，本学予防医療科学センター倫理委員会の承認を得た（承認番号 : 第 2017-011 号）．膵がん組織 DNA を 16s rRNA の V3-4 領域を PCR にて増幅し，そのアンプリコンをもとに次世代シーケンサーMiSeq を用いデータを取得した．取得したデータからメタ 16S 解析を行った．

【結果および考察】

［実験 1］網羅的解析の結果，Control 群と比較して PG-LPS 群では Regenerating islet-derived 3G（Reg3G）の発現が 73 倍であった．Real-time RT-PCR で遺伝子発現の解析においても再現性が認められた（*p<0.05）．免疫染色においても PG-LPS 群では，ランゲルハンス島周辺部のα細胞相当部に Reg3G 陽性細胞が確認された．Reg3G は，膵臓腫瘍マーカーの転写の増強，抗腫瘍免疫の抑制および膵臓腫瘍マーカーの抑制を含む複数の機序を介してマウス膵臓の炎症関連癌の進行を促進することが報告されている．また，Reg3G は，膵がんに特異的に増加が認められることが分かっている．PG-LPS 投与により Reg3G が発現することで，膵がんの進行に関与することが考えられる．

［実験2］細菌叢解析の結果，膵がん組織DNAにFusobacterium属，Porphyromonas属およびPrevotella属などの歯周病原細菌が検出された．膵がん患者の膵臓に歯周病原因菌が血中を通って膵臓に到達していると考えられる．

【結論】

歯周病原細菌は，膵臓の Reg3G の発現を増加させ，膵がんの発症や進行に関与することが推察された．歯周病のコントロールは，膵がんの予防や進行抑制のための新しいアプローチになる可能性がある．

＊本研究の一部は，厚労科研費（201706022A）および科研費（15K20647）の助成により行われた．

キサントフモールの *P. gingivalis* および歯肉上皮細胞への影響

[1] 北医療大 歯 臨床口腔病理，[2] 北医療大 歯 保健衛生，[3] 北医療大 がん予防研，[4] 北医療大 健康科学研
○平木大地 [1]，植原　治 [2,3]，虎谷斉子 [2]，高井理衣 [4]，藏滿保宏 [3]，安彦善裕 [1]

The effects of Xanthohumol on *P. gingivalis* and gingival epithelial cells

[1] Div Oral Med Pathol, Health Sci Univ Hokkaido Sch Dent, [2] Div Dis Control Mol Epidemiol, HSUH Sch Dent,
[3] Research Institute of Cancer Prevention, HSUH, [4] Research Institute of Health Sciences, HSUH
○Daichi Hiraki [1], Osamu Uehara [2,3], Seiko Toraya [2], Rie Takai [4], Yasuhiro Kuramitsu [3], Yoshihiro Abiko [1]

【研究目的】

近年，ビールの健康増進効果が明らかになりつつある．ビールの健康増進効果には，心臓病，骨粗しょう症，認知症の予防効果に加え，抗がん，アンチエイジング作用がある．ビールに含まれているホップ自体に抗酸化作用，エストロゲン作用，鎮静作用，さらにはがんの化学的予防作用があると報告されているため，ホップが健康増進効果の主因であるとも考えられる．ホップは，生体に対し安全性を有するとともに，デンタルプラークの原因となる口腔細菌に対する抗菌作用や宿主の抗炎症作用などの複合的な作用により歯周炎の予防効果が期待できる．しかし，ホップが歯周病原細菌 *P. gingivalis* や歯肉上皮細胞に対してどのようなメカニズムで作用するかについては明らかにされていない．本研究では，ホップの成分であるキサントフモールの *P. gingivalis* への抗菌作用および歯肉上皮細胞への抗炎症作用について検討した．

【材料および方法】

［実験 1］歯周病原細菌 *P. gingivalis* へのキサントフモールの影響について，次世代シーケンサーを用いた RNA-Seq による網羅的解析と定量的 RT-PCR を組合せ，細菌転写産物の解析を行った．*P. gingivalis* W83 株に Xanthohumol（XN，東京化成工業）を作用させた．XN の添加濃度は，あらかじめ最小発育阻止濃度（MIC）を測定し，その濃度を基準とした．XN 添加した BHI 培地と未添加の BHI 培地を用いて *P. gingivalis* を 4 h 嫌気培養後，RNA の抽出を行った．抽出した RNA の枯渇処理を行い, 次世代シーケンサーHiSeq を用いて RNA-Seq を行った. 得られたデータのマッピング後，遺伝子発現の解析および発現領域を確認した．

［実験 2］ヒト歯肉上皮前駆細胞（HGEP，CELLnTEC）を専用培地（CnT-Prime, Epithelial Culture Medium）で培養した．添加試薬は，*P. gingivalis* ATCC33277 由来 LPS（WAKO，1 μg/ml，DDW で溶解）および XN（0, 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100 μg/ml，エタノールで溶解）を用いた．XN の HGEP の増殖活性を WST-1 試薬で測定した．増殖に影響のない濃度の XN，LPS，超純水およびエタノールの添加で 4 h 培養した．培養細胞より RNA を抽出した後，ΔΔCq 法を用いた real-time PCR により炎症性サイトカイン（IL-1β，IL-6 および TNF-α）の mRNA 発現解析を行った．また，ELISA を用いて培養上清中の IL-1β，IL-6 および TNF-α を測定した．

【結果および考察】

［実験 1］24 時間培養後の XN の MIC は，2.0 μg/ml であった．トランスクリプトーム解析で発現が低下していたものに，Fe-S cluster assembly protein SufB，Fe-S cluster assembly protein SufD および Fe-S cluster assembly ATPase SufC などの遺伝子が認められた．これらの遺伝子は，鉄の取り込みや鉄-硫黄クラスターの形成において重要な役割を果たしていると考えられることから，XN は，*P. gingivalis* の発育に必要な鉄の取り込みを阻害する可能性が示唆された．

［実験 2］XN の細胞増殖活性は，24 時間後 XN 10 μg/ml および 100 μg/ml に増殖活性の低下が認められた．遺伝子発現の変化は，LPS を添加することにより，IL-1β，IL-6 および TNF-α の発現上昇が認められた．XN を添加することにより，IL-1β，IL-6 および TNF-α の発現低下が認められた（$p<0.05$）．ELISA についても同様の結果が認められた．

【結論】

ホップの成分であるキサントフモールは，歯周病予防や進行抑制の効果を有することが示唆された．

＊本研究の一部は，科研費（15K11125）の助成により行われた．

咽頭上皮細胞における歯周病原細菌刺激による炎症性サイトカイン発現に対する咽頭常在菌の役割

[1]愛知学院大学歯学部歯周病学講座　[2]愛知学院大学歯学部微生物学講座
○近藤　智裕[1]，　林　潤一郎[1]，　大野　祐[1]，　佐々木　康行[1]，　長谷川　義明[2]，　三谷　章雄[1]

Role of pharynx indigenous bacteria to inflammatory cytokines by periodontal pathogenic bacteria on pharyngeal epithelial cells

[1]Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University,
[2]Department of Microbiology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University
○Tomohiro Kondo[1], Jun-ichiro Hayashi[1], Tasuku Ohno[1], Yasuyuki Sasaki[1],
Yoshiaki Hasegawa[2], Akio Mitani[1]

[目的]

歯周病治療により歯周組織から歯周病原細菌を除去しても、数ヶ月で再定着が生じてしまうことが知られている。その理由の一つとして、歯周病原細菌が咽頭部や上気道といった口腔以外の領域にも棲息していることが挙げられ、それらの細菌が口腔やプラークに伝播・回帰している可能性が考えられる。我々はこれまでに口腔以外の領域として咽頭部に着目し、咽頭細菌叢にも歯周病原細菌が存在することを確認した。

歯周病原細菌が持つ病原因子により咽頭部の組織が刺激を受ければ、それらの細菌を排除するように免疫応答を示すはずであるが、実際には炎症を生じず定着を許容している。このことから、同部には歯周病原細菌が炎症を惹起せず存在できるような何らかの機構が働いていると考えられる。そこで本研究では、咽頭に数多く棲息する常在菌が炎症反応抑制の鍵となるのではないかと考え、代表的な咽頭常在菌の一つで、プロバイオティック作用等を示すことが知られている *Streptococcus salivalius* を用いて検討を開始した。

[材料及び方法]

ヒト咽頭上皮細胞（Detroit562：CCL-138 株 ATCC）を用いて、歯周病原細菌として *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 を、咽頭常在菌として *Streptococcus salivalius* HHT を用いて以下の実験を行った。

① *P. gingivalis* の培養上清（OD 値＝0.7）にて刺激を行い、IL-8 の遺伝子発現を qPCR 法にて確認した。最終濃度は 0, 0.5, 1, 2, 4%で行い、時間は 0, 1, 3, 6, 9 時間で行った。

② *S. salivalius* の培養上清（OD 値＝0.7）にて刺激を行い、IL-8 の遺伝子発現を qPCR 法にて確認した。最終濃度は 0, 0.5, 1, 2, 4%で行い、時間は 0, 1, 2, 4, 7, 10 時間で行った。

③ ①、②で得られた結果をもとに、*S. salivalius* 培養上清（最終濃度 4%）において 1 時間前処理後、*P. gingivalis* 培養上清（最終濃度 4%）で 1 時間刺激を行い、IL-8 の遺伝子発現を qPCR 法、タンパク産生を ELISA 法にて確認した。

[結果及び考察]

① *P. gingivalis* 培養上清刺激 1 時間で、有意な IL-8 の遺伝子発現の増強を認めた。これにより *P. gingivalis* 培養上清刺激による咽頭上皮細胞の炎症応答が確認できた。

② *S. salivalius* 用培地のみ刺激と比較して、*S. salivalius* 培養上清刺激では有意な IL-8 の遺伝子発現の増強は認められなかった。

③ *S. salivalius* 培養上清で 1 時間前処理後、*P. gingivalis* 培養上清 1 時間刺激した場合、前処理しない場合と比較し、IL-8 の遺伝子発現の減弱とタンパク産生の減少を認めた。

以上の結果より、咽頭上皮細胞において、*S. salivalius* が存在することにより *P. gingivalis* に起因する炎症反応を抑制する可能性が示唆された。

Porphyromonas gingivalis によるマスト細胞由来 interleukin-31 を介した歯肉上皮細胞の claudin-1 ダウンレギュレーション作用

東北大学　大学院歯学研究科　口腔分子制御学分野 [1)]、口腔診断学分野 [2)]、歯内歯周治療学分野 [3)]、国立長寿医療研究センター　口腔疾患研究部 [4)]
○多田　浩之 [1)]、西岡　貴志 [2)]、根本　英二 [3)]、松下　健二 [4)]

Porphyromonas gingivalis Enhances IL-31 Production in Human Mast Cells Resulting in Down-regulation of Claudin-1 Expression in Human Gingival Epithelial Cells

[1]Division of Oral Immunology, [2]Division of Oral Diagnosis, [3]Division of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry, [4]Department of Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology
○Hiroyuki Tada[1)], Takashi Nishioka[2)], Eiji Nemoto[3)], Kenji Matsushita[4)]

【緒言】

Interleukin-31 (IL-31)はマスト細胞、Th2 細胞、樹状細胞やマクロファージなどから産生される gp130/IL-6 サイトカインファミリーに属するサイトカインである。IL-31 は IL-31 受容体を持つ上皮細胞に作用すると、炎症性サイトカインやケモカインの産生を誘導され、アトピー性皮膚炎、気管支炎、肺炎や腸炎など皮膚や粘膜における慢性炎症の病態か関わることが明らかにされている。慢性歯周炎患者の炎症歯周組織にはマスト細胞が集積することが示唆されているが、慢性歯周炎の病態形成におけるマスト細胞の役割については十分に明らかにされていない。我々は、本学会において *Porphyromonas gingivalis* 感染によりマスト細胞は interleukin (IL)-31 を産生することを発表した。

歯肉上皮細胞はタイトジャンクションを担う分子である claudin-1 を発現しバリア機能を担い、感染防御に関わる。本発表では *P. gingivalis* 感染においてマスト細胞が産生する IL-31 による歯肉上皮細胞の claudin-1 ダウンレギュレーション作用について検討した。

【材料と方法】

(1) 細胞: ヒトマスト細胞株 HMC-1 細胞(Mayo Clinic, Joseph H. Butterfield 教授より分与)は 10% FBS, 1.2 mM α-thioglycerol 添加 IMDM 培地で、ヒト歯肉上皮細胞株 Ca9-22 (JCRB 細胞バンク)は E-MEM 培地で継代培養し実験に供試した。

(2) 細菌: *P. gingivalis* W83 および ATCC 33277 野生型株ならびに KDP136 ジンジパイン欠損株 (長崎大学・中山浩次教授より恵与)を TSB 培地で培養し実験に供試した。

(3) Claudin-1 発現解析: Ca9-22 細胞に *P. gingivalis* 生菌を感染後、同細胞の claudin-1 発現を蛍光免疫染色法、リアルタイム PCR 法、フローサイトメトリー法ならびにウェスタンブロッティング法で解析した。

(4) 歯肉上皮バリア機能: Transwell フィルターに培養した Ca9-22 細胞に添加した FITC-dextran の透過量を蛍光プレートリーダーで測定した。

【結果と考察】

Ca9-22 細胞は構成的に claudin-1 を発現することを蛍光免疫染色法にて確認した。Ca9-22 細胞に *P. gingivalis* を感染させると、claudin-1 mRNA 発現ならびに claudin-1 タンパク発現が著明に亢進した。*P. gingivalis* による Ca9-22 細胞の claudin-1 発現亢進は、HMC-1 細胞またはリコンビナントヒト IL-31 の共存下で抑制された。そこで Ca9-22 細胞を *P. gingivalis* 刺激 HMC-1 細胞の培養上清で前処理したところ、*P. gingivalis* による Ca9-22 細胞の claudin-1 発現亢進作用は抑制されたことから、*P. gingivalis* によりマスト細胞が産生する IL-31 は歯肉上皮細胞の claudin-1 発現をダウンレギュレーションさせることが示唆された。歯肉上皮バリア機能について、Transwell フィルターに培養した Ca9-22 細胞を *P. gingivalis* ならびに HMC-1 細胞と共に培養すると、IL-31 依存的に FITC-dextran 透過量が亢進した。

【結論】

P. gingivalis 感染において、歯肉上皮細胞は claudin-1 発現を亢進させ歯肉上皮バリア機能を高めることで感染防御に寄与する。他方、*P. gingivalis* 感染によりマスト細胞から産生される IL-31 は、歯肉上皮細胞の claudin-1 発現亢進を阻害することで歯肉上皮バリアの破綻に関わることが示唆された。

Carnosic acidはヒト口腔上皮細胞のIL-27誘導CXCR3リガンド産生を抑制する

徳島大学大学院医歯薬学研究部　歯科保存学分野[2)]徳島大学大学院医歯薬学研究部　口腔保健支援学分野
○細川育子[1)]、細川義隆[1)]、尾崎和美[2)]、松尾敬志[1)]

The effect of carnosic acid on CXCR3 ligands production in IL-27-stimulated human oral epithelial cells

[1)]Department of Conservative Dentistry, Tokushima University Graduate School,[2)]Department of Oral Health Care Promotion, Tokushima University Graduate School
○Ikuko Hosokawa[1)], Yoshitaka Hosokawa[1)],Kazumi Ozaki[2)], Takashi Matsuo[1)]

【研究目的】

歯周炎は歯周病関連細菌により惹起される慢性炎症性疾患であり、歯周病関連細菌に対する過剰な免疫応答が歯槽骨吸収をはじめとする歯周組織破壊に関与している事が報告されている。特に、歯周炎病変局所に多量に浸潤している炎症性細胞が歯周組織破壊の中心的役割を担っている事が示唆されている。

Carnosic acidはローズマリーやセージに含まれる生理活性物質であり抗癌作用や抗酸化作用がある事が報告されている。しかしながら、carnosic acidの抗炎症作用に関しては報告が少なく、歯周組織構成細胞に対する影響に関する報告はない。

本研究では、carnosic acidが歯周組織構成細胞の一つであるヒト口腔上皮細胞のIL-27が誘導するTh1細胞浸潤に関与するCXCR3リガンド（CXCL9, CXCL10, CXCL11）産生に与える影響に焦点を絞り検討を行った。また、carnosic acidがケモカイン産生に関与しているシグナル伝達経路に与える影響に関して明らかにする事も目的とし、特にIL-27が誘導するSTAT1, STAT3およびAktのリン酸化に及ぼす影響に着目し実験を行った。

【材料および方法】

ヒト口腔上皮細胞株としてTR146細胞を用いた。TR146細胞はMark Herzberg博士（ミネソタ大学）より供与して頂いたものを使用し、10%FBSを含むHam's F12培地にて培養し実験に用いた。TR146細胞をcarnosic acid存在下あるいは非存在下にて24時間IL-27刺激を行い、培養上清中のCXCL9, CXCL10およびCXCL11産生をELISA法にて、細胞内シグナル伝達物質（STAT1, STAT3およびAkt）の活性化をwestern blot法にて解析を行った。また、IL-27が誘導するケモカイン産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにシグナル伝達経路阻害物質にて前処理後にIL-27刺激を行い、CXCL9, CXCL10およびCXCL11産生に関してELISA法を用い検討した。

【成績】

Carnosic acidはIL-27が誘導したTR146細胞のCXCL9, CXCL10およびCXCL11産生を濃度依存的に抑制した。また、carnosic acidはIL-27が誘導したSTAT1, STAT3およびAktのリン酸化を減弱させた。さらに、IL-27が誘導したCXCL9, CXCL10およびCXCL11産生はSTAT1, STAT3およびAktのシグナル伝達阻害物質により有意に抑制された。

【考察および結論】

今回の結果より、carnosic acidはTR146細胞のSTAT1, STAT3およびAktのシグナル伝達経路を阻害する事により、IL-27が誘導するCXCR3リガンド産生を減弱できる事が明らかとなった。この事はcarnosic acidを歯周炎病変局所に投与する事により口腔上皮細胞のCXCR3リガンド産生を抑制する事でTh1細胞の浸潤および集積が減少される事により歯周炎病変局所で抗炎症作用を発揮できる可能性が示された。

線維芽細胞における仮足形成因子の探索

[1]九州大学病院　口腔総合診療科
○祐田　明香[1], 和田　尚久[1]

Identification of Cell Extension Formation Proteins in Fibroblast Cells

[1]Division of General Dentistry, Kyushu University Hospital, Kyushu University, Fukuoka, Japan
○ASUKA YUDA[1], NAOHISA WADA[1]

[目的]近年、傷害された歯周組織や歯髄組織における創傷治癒の組織修復の足場として、細胞外マトリックスが注目されている。細胞はラメリポディア（葉状仮足）およびフィロポディア（糸状仮足）と呼ばれる仮足を形成する。細胞外マトリックスのリモデリング、創傷治癒の際、細胞が仮足を形成することが重要な役割を担っている。しかしながら、仮足形成の因子、またそのメカニズムについて十分な解析はなされていない。そこで本研究では、マウス線維芽細胞株における仮足形成因子をプロテオミクス解析にて検索し、選定した因子がマウス線維芽細胞株の仮足形成に及ぼす影響について解析を行った。
[材料及び方法](1)マウス線維芽細胞株（NIH3T3）における仮足形成因子の選定：コラーゲンコーティングを行ったメンブレン上にて NIH3T3 を 4、8 時間培養後、上部（細胞体）および下部（仮足）で、細胞体と仮足に分離し、プロテオミクス（Mass spectrometry）解析にて細胞体側と仮足側のタンパク発現を比較し仮足形成因子を検索および選定した。(2)NIH3T3 における仮足形成因子の発現解析：コラーゲンコーティングを行ったメンブレン上にて NIH3T3 を 4、8 時間培養後、免疫蛍光染色および Western blot 法を行い、仮足形成因子の発現を評価した。(3)NIH3T3 における仮足形成因子の仮足形成部位での発現強度、仮足形成の数・長さ、コラーゲンリモデリング、細胞外周囲コラーゲン分解に及ぼす影響の解析：siRNA にて選定した因子をノックダウンさせた NIH3T3 を、フローティングコラーゲンゲル(Mohammadi et al., Biomaterials, 2014)上にて 6 時間培養後、免疫蛍光染色を行い仮足形成部位での仮足形成因子の発現強度、仮足形成の数・長さの測定、細胞外周囲コラーゲン分解産物である 3/4 コラーゲンを ImageJ ソフトウェアにて解析を行った。またコラーゲンリモデリングを、共焦点レーザー顕微鏡における画像より、リモデリング時、コラーゲンが直線化する性質を利用し(Mohammadi et al., Soft Matter, 2014)、ImageJ ソフトウェアにて解析を行った。(4)キナーゼインヒビターが NIH3T3 における仮足形成因子の発現強度に及ぼす影響の解析：以前に報告された仮足形成を抑制する 4 つのキナーゼインヒビター(TGX221、SB431542、Fasudil-HCl、SIS3)(0.01 ul)(Yuda et al., SLAS Discov, 2018)を添加した培地中にて NIH3T3 をフローティングコラーゲンゲル上で 6 時間培養後、免疫蛍光染色を行い、仮足形成部位での仮足形成因子の発現強度を ImageJ ソフトウェアにて解析を行った。
[結果](1)NIH3T3 を 4、8 時間培養後、細胞体および仮足のプロテオミクスの解析の結果、仮足側で有意に認められる因子として importin-5(IPO5)、ENH isoform 1b (PDLIM5)、26S protease regulatory subunit 6B(PSMC4)の 3 因子が選定された。(2)抗 IPO5、PDLIM5、PSMC4 抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果、仮足側および細胞体側で陽性反応が認められた。さらに、Western blot 法を行った結果、細胞体より仮足側で IPO5、PDLIM5、PSMC4 の発現が上昇することが認められた。(3)siIPO5 は、仮足形成部位で IPO5 の発現強度を有意に減少し、仮足形成数、コラーゲンリモデリングならびに細胞外周囲コラーゲン分解を有意に減少させた。siPDLIM5 は、仮足形成部位で PDLIM5 の発現強度を有意に減少し、仮足形成数およびコラーゲンリモデリングを有意に減少させた。siPSMC4 は、仮足形成部位で PSMC4 の発現強度を有意に減少し、仮足形成数、コラーゲンリモデリングならびに細胞外周囲コラーゲン分解を有意に減少させた。(4)SIS3 および Fasudil-HCl は、仮足形成部位で IPO5、PDLIM5 ならびに PSMF4 の発現強度を有意に減少させた。また SB431542 は仮足形成部位で PDLIM5 の発現強度を有意に減少させた。
[考察]本研究の結果から、IPO5、PDLIM5 ならびに PSMC4 は、NIH3T3 の仮足形成を誘導し、さらに、TGF-β RI キナーゼ、Smad3 ならびに ROCK-II のシグナリングの阻害剤である SB431542、SIS3 ならびに Fasudil-HCl が、仮足形成部位で IPO5、PDLIM5 ならびに PSMC4 の発現強度を減少させたことから、IPO5、PDLIM5 ならびに PSMC4 は TGF-β RI キナーゼ、Smad3 ならびに ROCK-II のシグナリングを介して NIH3T3 の仮足形成を導く可能性が推察された。
[結論]IPO5、PDLIM5 ならびに PSMC4 は、線維芽細胞の仮足の形成において必要とされ、さらに、TGF-β/Smad3 および ROCK シグナリングは IPO5、PDLIM5 ならびに PSMC4 における仮足形成を誘導することが示唆された。
研究協力者:　Christpher McCulloch (Matrix Dynamics Group, Faculty of Dentistry, University of Toronto)

歯肉線維芽細胞における非神経性コリン作動系の発現

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学（口腔治療学教室）
○三木康史、山下元三、北村正博、村上伸也

Expression of non-neuronal cholinergic system in human gingival fibroblasts

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, JAPAN
○Koji MIKI, Motozo YAMASHITA, Masahiro KITAMURA and Shinya MURAKAMI

[目的]

アセチルコリンは中枢および末梢神経系におけるコリン作動性神経伝達物質であることが知られている。アセチルコリンは最も早く同定された神経伝達物質であり、中枢神経系では脳内の神経伝達物質として働き、末梢神経系では運動神経の神経筋接合部、交感神経および副交感神経の節前線維の終末、副交感神経の節後線維の終末などのシナプスで伝達物質として働く。近年上皮細胞、内皮細胞、免疫細胞および心筋細胞のような哺乳動物の非神経性の細胞においてもアセチルコリン構成要素が発現しているとの報告されており、その重要性が注目されている。

非神経性アセチルコリンは、限局された微小環境に存在するアセチルコリン受容体に作用して、細胞増殖・細胞間接着・遊走・分化あるいは炎症の制御などの微細な調節に関与していることが明らかになってきた。これまでに我々は、歯根膜細胞、歯肉上皮細胞にコリン作動系構成要素が発現していることを報告してきたが、今回の研究では、これらの分子群が歯肉線維芽細胞においても発現しているか否かを、RT-PCR 法および免疫組織化学染色法を用いて検索した。

[方法]

1, RT-PCR

ヒト歯肉線維芽細胞(ScienCell Research Laboratories から購入)を、10%FCS および 60μg/ml カナマイシン(和光純薬)含有α-MEM 中で、5%CO_2、37℃、湿度 95%の気相下で培養し、RNABee™(TEL-TEST, Inc., Friedndwood, TX, USA)を用いて RNA を抽出した後、以下に示すコリン作動系構成要素の発現を RT-PCR 法を用いて検索した。

・アセチルコリン合成酵素である choline acetyltransferase (ChAT)
・アセチルコリンの貯蔵に関与する vesicular acetylcholine transporter (VAChT)
・アセチルコリンの主な分解酵素である acetylcholinesterase (AChE)
・アセチルコリンの遊離や取り込みに関与しているとされる oraganic cation transporter (OCT)
・ニコチン受容体 (nAChR) およびムスカリン受容体(mAChR)

2, 免疫組織化学染色

培養したヒト歯肉線維芽細胞の培地を吸引、PBS にて洗浄後 4%パラホルムアルデヒド含有 PBS で固定、透過処理、ブロッキングを行った後、ChAT, AChE, VAChT を一次抗体として 16-18 時間反応させた。その後 PBS で洗浄し、Alexa Fluor488 標識抗ウサギ IgG あるいは Cy3 標識抗マウス IgG を二次抗体として 90 分間反応させた後、PBS 洗浄後、蒸留水で洗浄し、核染色のため DAPI 入りの封入剤で封入後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

[結果]

ヒト歯肉線維芽細胞において ChAT, AChE, VAChT, OCT, mAChR1-5 および複数の nAChR などさまざまなコリン作動系構成要素の発現が RT-PCR 法および免疫組織化学染色で確認された。

[結論]

歯肉線維芽細胞は、アセチルコリンの合成、貯蔵、分解などのさまざまな必要性コリン作動性の構成要素を有していることが明らかとなった。これらの結果は、歯肉線維芽細胞が非神経性コリン作動系を介して歯周組織における恒常性の維持に関与する可能性があることを示唆している。

本研究は平成 28 年度科学研究費（T16K11828 基盤研究(C)）の助成を受けて行った。

GDNF は未分化なヒト歯根膜細胞のシュワン細胞様分化を誘導する

[1]九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、[2]九州大学病院 歯内治療科、
[3]九州大学大学院歯学研究院 OBT 研究センター、[4]九州大学病院 口腔総合診療科
○糸山知宏[1]、吉田晋一郎[2]、友清淳[2]、長谷川大学[2]、濱野さゆり[1,3]、杉井英樹[2]、
有馬麻衣[1]、野津葵[1]、和田尚久[4]、前田英史[1,2]

Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) induces schwann cell-like differentiation of undifferentiated human periodontal ligament cells

[1]Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University,[2]Department of Endodontology, Kyushu University Hospital, [3]OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University,[4]Division of General Oral Care, Kyushu University Hospital
○Tomohiro Itoyama[1], Shinichiro Yoshida[2], Atsushi Tomokiyo[2], Daigaku Hasegawa[2], Sayuri Hamano[1,3], Hideki Sugii[2], Mai Arima[1], Aoi Nozu[1], Naohisa Wada[4], Hidefumi Maeda[1,2]

【研究目的】シュワン細胞は、神経線維や皮膚組織をはじめとした末梢組織の再生に関与していることが報告されているが、歯周組織再生におけるシュワン細胞の役割については、これまでに報告はない。当研究室では、傷害を与えた歯周組織において Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)の発現が上昇し、歯根膜細胞から分泌された GDNF が、神経前駆細胞の神経細胞分化を促進することを報告している(Yoshida et al., 2016)。そこで歯周組織傷害部位において発現上昇する GDNF が、ヒト歯根膜幹細胞のシュワン細胞分化ならびに組織修復に関与しているのではないかと仮説を立てた。本研究では、GDNF が未分化なヒト歯根膜細胞のシュワン細胞様分化に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】本研究への同意が得られた患者の抜去歯牙より採取した歯根膜細胞(HPDLC-3U; 25 歳、女性)と、当研究室で樹立したヒト不死化歯根膜細胞株 1-17 細胞(Tomokiyo et al., 2008)を本研究で使用した。1-17 細胞を 1 mM β-mercaptoethanol で 24 時間、35 ng/ml all-trans-retinoic acid で 72 時間刺激したのち、10 ng/ml PDGF、10 ng/ml bFGF、14 μM Forskolin、および 10 ng/ml GDNF を 14 日間添加して培養し(GNDF 群)、GDNF が 1-17 細胞のシュワン細胞様分化に及ぼす影響について検討した。また、ヒト類上皮悪性シュワン細胞腫細胞株 YST-1 (Riken BRC)を陽性対照として用いた。(1)ラット歯根膜傷害モデル(SD ラット、5 週齢、雄性)の左側上顎臼歯部切片を用いて、抗 S100B 抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。(2)1-17 細胞、GDNF 群、YST-1 におけるシュワン細胞関連因子(S100B, GFAP, MPZ, p75NTR)の発現を定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。また、GFAP ならびに S100B のタンパク発現を、免疫蛍光染色により解析した。(3)GDNF 群の培養上清を用いて、HPDLC-3U またはヒト前骨芽細胞(Saos2)を培養し、HPDLC-3U における線維芽細胞関連因子(Collagen Ⅲ, Fibrillin-1, Periostin)の発現、ならびに Saos2 における骨芽細胞関連因子(Osteocalcin, Osteopontin, Osterix, Runx2)の発現を定量的 RT-PCR 法を用いて解析した。本研究は九州大学大学院歯学研究院生命倫理委員会ならびに九州大学動物実験委員会の承認の下行った。

【結果】(1)免疫蛍光染色の結果、傷害 7, 10, 14 日後の歯周組織において S100B 陽性細胞が観察された。(2)GDNF 群におけるシュワン細胞関連因子の発現は、無刺激の 1-17 細胞と比較して有意に上昇していた。また GFAP, MPZ および S100B の発現は、YST-1 と比較して有意な上昇を認めた。さらに免疫蛍光染色の結果、GDNF 群は YST-1 と同様に GFAP および S100B のタンパク発現が認められた。(3)GDNF 群の培養上清を用いて HPDLC-3U を培養した結果、線維芽細胞関連因子の遺伝子発現が上昇した。Saos2 では骨芽細胞関連因子の遺伝子発現が上昇した。

【考察】歯周組織傷害部位の創傷治癒が進むにつれて、シュワン細胞数が増加することが示唆された。GDNF は、未分化なヒト歯根膜細胞のシュワン細胞様分化を促進することが示唆された。また GDNF が傷害部位で上昇することに加え、GDNF を用いて分化誘導したシュワン細胞様細胞の培養上清が、HPDLC-3U の線維芽細胞関連因子ならびに Saos2 の骨芽細胞関連因子の発現を上昇したことから、GDNF で誘導されたシュワン細胞が歯周組織の創傷治癒に関与する可能性が示唆された。

【結論】(1)傷害を与えた歯周組織においては、S100B 陽性細胞数が上昇する。(2)GDNF は、1-17 細胞における GFAP, MPZ, p75NTR および S100B の遺伝子発現ならびに GFAP と S100B のタンパク発現を促進する。(3)GDNF を用いて 1-17 細胞を分化誘導したシュワン細胞様細胞の培養上清は、HPDLC-3U における線維芽細胞関連因子の遺伝子発現および Saos2 における骨芽細胞関連因子の遺伝子発現を促進する。

不死化ヒト歯肉線維芽細胞およびヒト歯根膜線維芽細胞における カンナビノイドレセプターの発現について

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座
○三代　紗季、五十嵐(武内)寛子、沼部 幸博

Expression of Cannabinoid receptor on immortalized human gingival fibroblasts and human periodontal ligament cells.

The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Tokyo Department of Periodontology
○Saki Mishiro、Hiroko Igarashi-Takeuchi、Yukihiro Numabe

【目的】

カンナビノイドは麻に含まれる生理活性物質であり、身体に広範囲に分布するカンナビノイド受容体 CB1 および CB2 に結合し様々な作用をもたらすことが報告されている。CB1 は主に中枢神経系に発現しているのに対し、CB2 は免疫系細胞に多く発現していることがわかっている。

近年 CB1、2 に続く第 3 のカンナビノイド受容体として GPR55 が同定された。GPR55 は破骨細胞上に多く発現し骨代謝に関係することが示唆されているほか、特定の癌に対するバイオマーカーとしての可能性が報告されるなど、多方面で注目を浴びている。また、骨代謝だけでなく抗炎症作用にも関与する可能性も示唆され始めており、歯周病原細菌の感染によって引き起こされる慢性炎症である歯周病との関連があると考えられる。しかし、歯周組織における GPR55 の発現とその役割に関しては不明な点が多い。

そこで今回我々は、ヒト歯周組織構成細胞における GPR55 の発現について検討を行った。

【材料と方法】

10%FBS 添加 DMEM/F12 にて不死化ヒト歯肉線維芽細胞(hTERT)およびヒト歯根膜線維芽細胞(HPDL)をそれぞれ培養し、GPR55 発現の有無を蛍光免疫染色にて観察した。また、各細胞を 35㎜ dish に 1×10^4cells/ml となるよう播種し、対数増殖期の状態とコンフルエント状態になるよう培養した後、リアルタイム RT-PCR にて GPR55 mRNA の発現を、ウェスタンブロット法にて GPR55 蛋白発現の検討を行った。

【結果と考察】

蛍光免疫染色の結果、GPR55 は hTERT、HPDL においてびまん性に発現しているのが認められた。両細胞ともにコンフルエント状態の細胞と比較し、対数増殖期にある細胞において GPR55 mRNA の発現が多く認められた。また、HPDL と比較して hTERT において多くの発現傾向を示した。一方、GPR55 の蛋白発現に関しては、対数増殖期と比較しコンフルエント状態の細胞で発現の増強が認められ、両細胞ともに同様の傾向を示した。対数増殖期に mRNA の発現が増強しコンフルエント状態では減少したことと、タンパクの発現が相反する傾向を示した結果は矛盾は生じない。

【結論】

今回我々は、hTERT および HPDL における GPR55 発現を新規に確認した。これにより、歯周組織においても GPR55 を介したカンナビノイドの作用が存在する可能性が考えられる。今後、カンナビノイドの GPR55 を介した歯周組織における抗炎症作用の可能性を検討していく。

LGR4 が未分化なヒト歯根膜細胞の増殖能、走化性および骨芽細胞様分化に及ぼす影響

[1]九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、[2]九州大学病院 歯内治療科、
[3]九州大学病院 口腔総合診療科、[4]九州大学大学院歯学研究院 OBT 研究センター
○有馬麻衣[1]、長谷川大学[2]、吉田晋一郎[2]、御手洗裕美[3]、友清淳[2]、濱野さゆり[1,4]、杉井英樹[2]、
和田尚久[3]、前田英史[1,2]

The effect of LGR4 on proliferation, chemotaxis, and osteoblastic differentiation of immature human periodontal ligament cells

[1]Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University, [2]Department of Endodontology, Kyushu University Hospital,
[3]Division of General Dentistry, Kyushu University Hospital,
[4]OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University
○Mai Arima[1], Daigaku Hasegawa[2], Shinichiro Yoshida[2], Hiromi Mitarai[3], Atsushi Tomokiyo[2], Sayuri Hamano[1,4], Hideki Sugii[2], Naohisa Wada[3], Hidefumi Maeda[1,2]

【研究目的】G-タンパク共役型受容体の 1 種である Leucine-rich repeat-containing GPR (LGR)4 は、生体内の様々な組織に発現しており、骨のリモデリング、自然免疫、幹細胞代謝、およびエネルギー代謝といった多様な生物学的プロセスにおいて重要な役割を担っている。過去に LGR4 は腸管上皮幹細胞の維持、および細胞増殖の調節に重要であると報告されている（Mustata et al.,2015）が、歯周組織における LGR4 の役割については未だ報告はない。

そこで本研究では、歯根膜細胞における LGR4 の発現様式、ならびに LGR4 が未分化なヒト歯根膜細胞の増殖能、走化性、および骨芽細胞様分化に及ぼす影響について検討した。

【材料および方法】当研究室にて樹立したヒト不死化歯根膜細胞（Fujii et al., 2006）から、限外希釈法により約 80 種類の細胞株を作製し、その中から骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞への分化能を有し、かつ各種幹細胞マーカーを高発現する、未分化なヒト歯根膜細胞株（2-14 細胞株）を各種解析に用いた。

(1) LGR4 発現解析

①未分化なヒト歯根膜細胞における LGR4 の発現解析　2-14 細胞株における LGR4 の遺伝子およびタンパク発現を、それぞれ半定量的 RT-PCR 法、抗 LGR4 抗体を用いた蛍光免疫染色法にて解析した。

②骨芽細胞分化誘導下における LGR4 の発現解析　骨芽細胞分化誘導培地（2 mM β-GP, 50 mg/ml AA, 10^{-7} M Dex 含有 10% FBS/αMEM）にて 1, 3, 7 日間培養した 2-14 細胞株における LGR4 の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した。

(2) LGR4 が未分化なヒト歯根膜細胞の増殖能および走化性に及ぼす影響　siRNA による LGR4 のノックダウンが 2-14 細胞株の増殖能および走化性に及ぼす影響について解析するため、以下の解析を行った。

①増殖能解析　増殖能解析として、WST-1 proliferation assay、 Cell cycle flow cytometry analysis、および Cell cycle 関連遺伝子発現の定量的 RT-PCR を行った。

②走化性解析　走化性解析として、Transwell assay を行った。

なお、本研究は九州大学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て実施された。

【結果】(1) 半定量的 RT-PCR 法、ならびに抗 LGR4 抗体による蛍光免疫染色法の結果、2-14 細胞株において LGR4 の遺伝子およびタンパク発現を認めた。(2) 骨芽細胞分化誘導培地にて培養した 2-14 細胞株の LGR4 遺伝子発現を解析した結果、骨芽細胞様分化の進行に伴い LGR4 の遺伝子発現が低下した。(3) 増殖能解析の結果、LGR4 をノックダウンした 2-14 細胞株において、細胞増殖の抑制、セルサイクルにおける S 期、G2/M 期の減少、DNA 合成や細胞分裂に関与する CyclinA2, CyclinE1 の遺伝子発現の低下を認めた。(4) 走化性解析の結果、LGR4 をノックダウンした 2-14 細胞株において、走化性の抑制を認めた。

【考察】本研究の結果から、LGR4 は未分化なヒト歯根膜細胞に発現しており、その増殖能ならびに走化性に関与することが明らかとなった。また、骨芽細胞様分化に伴い未分化なヒト歯根膜細胞株の LGR4 発現が低下することから、骨芽細胞様分化と LGR4 発現には関連がある可能性が推察された。

【結論】(1) 未分化なヒト歯根膜細胞における LGR4 の発現は骨芽細胞様分化の進行に伴い低下する。(2) LGR4 をノックダウンした未分化なヒト歯根膜細胞において、増殖能および走化性が低下する。

IL-35 は IL-17A が誘導するヒト歯周靭帯細胞の IL-6 および IL-8 産生を抑制する

広島大学大学院医歯薬保健学研究科歯髄生物学研究室
○進藤 智、吉田和真、中西 惇、西藤法子、永安慎太郎、本山直世、柴 秀樹

IL-35 suppresses IL-6 and IL-8 productions in IL-17A-stimulated human periodontal ligament cells

Department of Biological Endodontics, Institute of Biomedical and Health Science, Hiroshima University
○Satoru Shindo, Kazuma Yoshida, Jun Nakanishi, Noriko Saito, Shintaro Nagayasu, Naoyo Motoyama, Hideki Shiba

【目的】

歯周炎は歯周病原性細菌によって惹起される炎症性疾患であり、宿主の過剰な免疫応答によって骨を含む組織破壊を引き起こすことが知られている。炎症性サイトカインである IL-6 は破骨細胞を活性化し骨吸収に関与することが報告されている。また、IL-8 は CXC ケモカインの一種であり、好中球をはじめとする白血球を炎症局所に浸潤・集積させる事により歯周組織破壊に関与している事が示唆されている。近年、Th17 細胞が IL-17A を介して炎症性疾患の骨吸収を誘導する事が報告され、歯周炎においても病態への関与が示唆されている。（Takahashi K *et al.*, J Clin Periodontol.2005 Apr;32(4):369-74） 過剰な免疫応答を抑制する制御性Ｔ細胞も歯周炎組織中に存在していることが知られており、制御性 T 細胞から産生される抗炎症性サイトカインとして発見された IL-35 が歯周炎歯肉溝浸出中にも発現していることが報告されている。(Mitani A *et al.*, J Periodontol . 86(2):301-9,2015） しかし、歯周組織構成細胞に対する IL-17A と IL-35 の相互作用に関する報告はない。

本研究では IL-17A が誘導する歯周靭帯細胞(HPDLC)の IL-6 および IL-8 産生に与える IL-35 の影響についてシグナル伝達機構も含めて検討した。

【方法】

HPDLCはLonza社より購入し、10%FBSを含むMEM-α培地にて培養し実験に用いた。HPDLCをIL-17Aにて刺激を行い、IL-35存在下あるいは非存在下におけるIL-6、IL-8産生をELISA法にて、細胞内シグナル伝達（MAPK-p38, ERK, JNK, NF-κB）の活性化をwestern blot法にて解析を行った。また、IL-17A誘導IL-6、IL-8産生に関与するシグナル伝達経路を解明するためにシグナル伝達阻害物質にて処理後、IL-17A刺激を行いIL-6およびIL-8産生をELISA法にて検討した。

【結果】

IL-35はIL-17A刺激HPDLCのIL-6およびIL-8産生を抑制した。また、MAPK-p38, ERKおよびNF-κB inhibitorは有意にIL-17Aが誘導したIL-6およびIL-8産生量を減少させた。IL-35はIL-17Aによって活性化されたNF-κB p-65、ERKのリン酸化を抑制した。

【考察】

今回の結果より、IL-17A 刺激による IL-6、IL-8 産生が HPDLC に誘導されることで、歯周炎病変局所において破骨細胞活性化による歯槽骨吸収、ならびに好中球の遊走を引き起こす可能性が示された。また、IL-35 は NF-κB および ERK を介するシグナル伝達経路を阻害することにより、IL-17A 刺激 HPDLC の IL-6 および IL-8 産生を抑制する事が明らかとなった。この結果より、制御性 T 細胞が産生する IL-35 は Th17 が産生する IL-17A によって促進される HPDLC からの IL-6 および IL-8 産生を抑制することで破骨細胞活性化および好中球の浸潤を制御し、歯周炎における炎症性骨吸収を制御している可能性が示唆された。

新規 NIK 阻害剤 Cpd33 の破骨細胞分化抑制効果の検討

[1]九州歯科大学　口腔保存治療学分野，[2]九州大学　口腔細胞工学分野，[3]九州大学　OBT 研究センター
○高倉 那奈[1,2]，松田 美穂[2]，日浦 史隆[2]，自見 英治郎[2,3]，北村 知昭[1]

The investigation of inhibitory effect of a new NIK inhibitor Cpd33 on osteoclast differentiation

[1]Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Kyushu Dental University, [2]Laboratory of Molecular and Cellular Biochemistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University, [3] Oral health Brain health Total health Research Center, Kyushu University
○TAKAKURA Nana[1,2], MATSUDA Miho[2], HIURA Fumitaka[2], JIMI Eijiro[2,3], KITAMURA Chiaki[1],

【目的】

歯周病や根尖性歯周炎，関節炎では過度な免疫応答によって，破骨細胞形成が亢進し骨吸収がおこる．近年，治療法や使用機器の進歩により治癒に至る症例は増加しているが，病態が進行し過大な骨欠損が認められる症例では通法のみでは治癒せず，難治化することも少なくない．骨吸収は破骨細胞の数の増加や過剰な骨吸収の亢進によって引き起こされる．免疫応答において主要な役割を果たす転写因子 NF-κB は、免疫応答中の遺伝子発現ならびに破骨細胞分化誘導因子 RANKL（Receptor activator of NF-κB）による破骨細胞形成を調節する．NF-κB の活性化経路には IκBα の分解を伴う古典的経路と NF-κB inducing kinase（NIK）の活性化による非古典的経路が存在する．RANKL はこれらの２つの経路を活性化する．我々は，NIK に変異を有し，p100 から p52 のプロセシングが起きない機能欠失型免疫不全マウス *aly/aly* マウスが，破骨細胞数の有意な減少を伴う軽度の大理石骨病を呈することを報告した．(MARUYAMA T *et al.*, 2010, J Bone Miner Res 25：1058)．この骨量の増加は主に破骨細胞数の減少に起因することから，NIK の機能を適度に阻害することで過度な骨吸収を抑制することを考えた．本研究では，新規 NIK 阻害剤 Cpd33 の破骨細胞形成に対する抑制効果について検討した．なお，本研究は九州大学動物実験委員会の承認を得て行った．

【材料及び方法】

5-6 週令の雄性 C57BL/6 マウスの脛骨および大腿骨より骨髄細胞を調製し，Cpd33 で前処理した後，RANKL で刺激し，破骨細胞を誘導した．培養７日目に酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色を行い，TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞として計測するとともに，カテプシン K や DC-STAMP などの破骨細胞分化マーカーの発現量の変化を Real-time PCR 法で確認した．また，骨髄細胞を Cpd33 で前処理した後，RANKL で刺激し，経時的にタンパク質を回収した．古典経路および非古典的経路の活性化はそれぞれ IκBα の分解と p100 のプロセシングをウェスタンブロッティング法で評価した．さらに，マウス骨髄間質細胞株 ST2 細胞と骨髄細胞を共存培養し，Cpd33 で前処理した後，1α,25（OH）$_2$D$_3$ およびデキサメタゾン添加により破骨細胞形成を誘導した．

【結果】

Cpd33 は濃度依存的に骨髄細胞から TRAP 陽性破骨細胞への分化を抑制し，さらに破骨細胞分化マーカーの発現を抑制した．Cpd33 は 1 μM の濃度で破骨細胞の分化をほぼ完全に抑制したが，この濃度では細胞障害性は確認されなかった．骨髄細胞および ST 細胞の共存培養も Cpd33 は RANKL および OPG の発現に影響することなく，破骨細胞形成を抑制した．また，Cpd33 は RANKL 刺激による IκBα の分解には影響せず，p100 のプロセシングを抑制した．RANKL 誘発破骨細胞形成および破骨細胞分化マーカーの発現を用量依存的に抑制したが，IκBα の分解は抑制しなかった．

【考察】

Cpd33 は NF-κB の非古典的経路を選択的に阻害し，細胞にダメージを与えることなく破骨細胞分化を抑制した．以上の結果より、Cpd33 は難治化した根尖性歯周炎や重度歯周炎の症例における，過度な免疫応答によって誘導される骨破壊に対する治療に有用であることが示唆された．

【結論】

Cpd33 は，NF-κB の非古典的経路を選択的に阻害することで破骨細胞分化を抑制する．

真菌二次代謝産物(+)-terrein はマウス実験的歯周炎モデルにおける歯槽骨吸収を抑制する

[1]岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野，[2]岡山大学病院 歯周科

○佐光秀文[1]，大森一弘[2]，中川沙紀[1,2]，坂井田京佑[1]，山本総司[2]，青柳浩明[1,2]，
小林寛也[1]，山城圭介[1]，山本直史[2]，高柴正悟[1]

Fungal secondary metabolite, (+)-terrein, suppresses alveolar bone resorption in mouse ligature-induced periodontitis model

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

○SAKO Hidefumi[1], OMORI Kazuhiro[2], NAKAGAWA Saki[1,2], SAKAIDA Kyosuke[1], YAMAMOTO Satoshi[2], AOYAGI Hiroaki[1,2], KOBAYASHI Hiroya[1], YAMASHIRO Keisuke[1], YAMAMOTO Tadashi[2], TAKASHIBA Shogo[1]

【目的】

我々は，真菌である *Aspergillus terreus* が産生する二次代謝産物(+)-terrein（TER）を有機化学的に合成することに成功し，炎症性サイトカインである IL-6 の細胞内シグナル伝達を有意に抑制する効果を報告した（Mandai *et al*, 2014）。IL-6 は，歯周病や関節リウマチといった炎症性骨吸収を主病態とする疾患の発症・進展に深く関与していることが報告されており，炎症性骨吸収の進行を抑制する上で非常に重要なターゲット因子の一つである。これまでに，TER が receptor activator of NF-κB ligand （RANKL）誘導性の破骨細胞分化を強力に抑制することを報告し，TER の骨吸収抑制薬としての可能性を示唆した（第 143 回秋季歯科保存学会）。しかし，TER の動物モデルにおける効果は未だ不明であり，TER の治療薬への応用を検討する上でその抗炎症効果を検証することは重要である。

そこで本研究では，マウス絹糸結紮歯周炎モデルを用いて，TER の *in vivo* における抗炎症作用および骨吸収抑制効果を検討した。

【材料および方法】

(+)-Terrein の合成：TER は，L-酒石酸から合成したものを用いた（岡山大学大学院自然科学研究科・萬代大樹博士提供；Mandai *et al*, 2014）。

マウス絹糸結紮歯周炎モデルの作製：雄性マウス（C57BL/6J，10 週齢）の上顎左側第二大臼歯に 6–0 絹糸を結紮し，*Porphyromonas gingivalis* W83 株（1×10^9 CFU，200 μL）を実験開始時および 1 週間後に絹糸に浸透させた。歯周炎の誘導と同時に，TER（30 mg/kg；Shibata *et al*, 2016）を週 2 回，腹腔内に投与した。対照群として，PBS を週 2 回，同様に腹腔内に投与した。歯周炎誘導開始 2 週間後に安楽死させ，上顎骨，肝臓，腎臓を採取し，4 %パラホルムアルデヒドにて 24 時間固定後，10 % EDTA を用いて 1 週間脱灰（上顎骨のみ）した後，パラフィンで包埋した。また，安楽死と同時に血液を採取し，血漿を分離後，-20˚C で保存した。（岡山大学動物実験委員会，承認番号：OKU-2016531）

組織学的評価：各組織の切片（4.5 μm）を作製した後，ヘマトキシリン・エオジン染色を行い，組織・病理学的に評価した。

エックス線画像評価：歯槽骨吸収量はマイクロ CT（Skyscan1174 v2, Brucker, MA, USA）を用いて，上顎左側第二大臼歯近心頬側根のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定し，画像解析ソフト（Image J, NIH, MD, USA）を用いて解析した。

ELISA：血漿中の TNF-α，IL-6，M-CSF 量は，市販の ELISA キットを用いて定量した。

統計解析：各結果は Student's *t*-test，または，one-way ANOVA を用いて，P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

【結果】

マウス絹糸結紮歯周炎モデルにおいて，TER は以下の影響を示した。

1. 歯槽骨の吸収を，約 30 %抑制した（$p<0.05$）。
2. 血漿中の TNF-αの産生を，抑制する傾向にあった（$p=0.056$）。
3. 投与期間中に体重変化をきたさず，肝および腎組織の細胞形態にも為害作用を示さなかった。

【考察・結論】

TER は，マウス絹糸結紮歯周炎モデルにおける歯槽骨吸収を抑制し，炎症性サイトカイン（TNF-α）の産生を抑制できる可能性が示唆された。また，目立った副作用もみられなかったことから，TER が慢性炎症と骨吸収を主病態とする歯周炎に対し，治療または予防薬として用いられる可能性が示唆された。

マウス臼歯への外傷性咬合による骨吸収における HMGB-1 の関与

[1)]長崎大学病院医療教育開発センター、[2)]長崎大学大学院医歯薬学総合研究科歯周歯内治療学分野
○鵜飼　孝[1)]，小山美香[2)]，山下恭徳[2)]，吉村篤利[2)]

Involvement of HMGB-1 in the bone resorption induced by mouse traumatic occlusion.

[1)]Medical Education Development Center, Nagasaki University hospital
[2)]Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate school of Biomedical Sciences
○[1)]Takashi Ukai, [2)]Mika Oyama, [2)]Yasunori Yamashita, [2)]Atsutoshi Yoshimura

【目的】

歯周疾患において細菌感染とならんで外傷性咬合は歯周組織破壊を促進する大きな要因の一つである。外傷性咬合により歯根周囲の垂直性骨吸収や根分岐部の骨吸収が進行することが報告されており、これらの骨吸収には receptor activator of NF-κB ligand (RANKL) が重要な働きをしていると考えられている。外傷性咬合時の骨吸収の前には歯根膜組織の変性が認められ、この変性が骨吸収に関連しているのではないかとも考えられる。実際、矯正力などの強いメカニカルストレスを付与した場合にも、圧迫側の歯根膜に変性が起こり破骨細胞の増加が認められる。その際の圧迫側の歯根膜に High Mobility Group Box 1 (HMGB-1) の増加が認められたことが報告されている。HMGB-1 は遺伝子転写制御、クロマチン構造維持、DNA 修復などの核内機能を持ったタンパクであるが、ダメージを受けた細胞から放出されて様々な機能を発揮することが知られている。HMGB-1 が骨吸収に促進的に関与するとの報告もあるが、外傷性咬合時の骨吸収への HMGB-1 の関与は報告されていない。

そこで本研究では、マウス外傷性咬合付与モデルを使用して根分岐部の骨吸収における HMGB-1 の影響を病理組織学的に検討することを目的とした。

【材料および方法】

マウスの上顎左側第一臼歯の咬合面にワイヤーを装着し、1, 2, 3, 5 日後に各 6 匹屠殺し、左側下顎骨を摘出した。また、HMGB-1 の働きを抑制するため抗 HMGB-1 抗体を腹腔投与したマウスにも同様にワイヤーを装着し、1 日ならびに 5 日後に各 6 匹屠殺した。なお未処置マウスを対照として用いた。摘出した組織を脱灰後パラフィン包埋して連続切片を作製し、破骨細胞同定のために酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色を行った。また RANKL 陽性細胞同定ならびに HMGB-1 発現の確認のため抗 RANKL 抗体あるいは抗 HMGB-1 抗体を用いた免疫組織学的染色を行った。そして根分岐部から下方 250μm の範囲の歯根膜ならびに根間中隔における破骨細胞数と RANKL 陽性細胞数を計測し、それらの経時的変化ならびに HMGB-1 抗体腹腔投与の影響を検討した。

【結果】

外傷性咬合付与 1 日後に根分岐部直下の歯根膜の硝子様変性が認められ、根分岐部組織に HMGB-1 の発現が増加した。この時歯根膜細胞ならびに骨細胞における RANKL 陽性細胞の割合が有意に増加した。その後、経時的に RANKL 発現細胞が増加したのに伴い、破骨細胞数が増加した。また抗 HMGB-1 抗体投与により HMGB-1 の働きを抑制したマウスでは、抗体投与していないマウスと比較して 1 日後の RANKL 発現細胞の割合が減少し、5 日後の破骨細胞数が減少した。

【考察および結論】

外傷性咬合付与により HMGB-1 の発現が増加し、抗 HMGB-1 抗体投与により破骨細胞の出現が減少したことより外傷性咬合による骨吸収に HMGB-1 が促進的に関与していることが考えられる。また抗 HMGB-1 抗体投与により RANKL の発現が減少したことから、HMGB-1 による外傷性咬合時の骨吸収促進には RANKL 発現の促進が関与していることが示唆された。

Advanced Platelet-rich fibrin (A-PRF)を用いた歯槽骨再生療法の組織学的研究

[1]神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔科学講座，[2]神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔統合医療学講座
○日髙恒輝[1,2]，向井義晴[2]，松尾雅斗[1]

Histological study of alveolar bone regeneration after application of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF)

Kanagawa Dental University Graduate School of Dentistry [1]Department of Oral Science,
[2]Department of Oral Interdisciplinary Medicine
○Kouki Hidaka[1,2], Yoshiharu Mukai[2], Masato Mastsuo[1]

【目的】

インプラント治療に際して，失われた骨量や骨高を確保するために，骨移植や骨再生誘導法(GBR 法)，歯槽骨温存療法(ソケットプリザベーション)など様々な手法や材料が用いられている。Advanced Platelet-rich fibrin (A-PRF；改良型多血小板フィブリン)もその一つで，自己血より精製されるフィブリンであるため他家移植や異種移植に比べて安全性が高く，さらに患者自身の PDGF，bFGF，VEGF などの各種成長因子が多く含まれており血管新生や，骨組織再生，組織治癒を促進する効果が高いとされる。また，同様の目的を持つ多血小板血漿(Platelet-rich plasma；PRP)と比較するとゲル状を呈するため骨造成の足場としての可能性も期待される。本研究ではビーグル犬抜歯窩モデルを用い，A-PRF の持つ骨再生能について組織学的検討を行なった。

【材料および方法】

実験動物はビーグル犬(メス，12 月齢，体重 9-10 kg，6 頭)にペントバルビツールによる全身麻酔(25 mg/kg)下で行った。抜歯前に静脈血 10ml を採血管に回収，遠心分離(200G，8 分)後に，10 分間静置し A-PRF を精製した。併行して上下顎両側前臼歯部の抜歯をおこない，右側を実験群として抜歯窩中に A-PRF を密に充填し，歯肉弁を縫合した。左側の抜歯窩には A-PRF を充填せず対照群とした。

術後 14 日および 30 日に組織標本(H-E 染色)，骨標本，免疫組織化学(抗 Osteocalcin 抗体，抗 Osteopontin 抗体)を用いた観察を行った。また，同時にエックス線画像を用いて骨新生率も測定した。本研究は神奈川歯科大学動物倫理委員会の審査合格後に使用規則を遵守して行われた(神奈川歯科大学動物実験倫理委員会承認 承認番号 16045 号)。

【結果】

組織学的観察では，術後 14 日の対照群は抜歯窩中に周囲既存骨(抜歯窩骨壁)より幼弱な骨形成が始まっていたが，抜歯窩中央は血餅で満たされており骨形成量は少なかった。実験群では抜歯窩内は中央部に至るまで幼若骨で満たされていた。術後 30 日の対照群では血餅は見られず，骨梁様の骨が形成されていたが配列は部分的であった。実験群では，骨再生は進んでおり，放射状に配列する骨梁が観察された。

実体顕微鏡による骨標本の観察においても，組織学的観察と同様な結果を示した。術後 14 日の対照群では，周囲既存骨より続く多孔な新生骨と，血餅による空洞が観察されたが，実験群ではより多くの新生骨が観察された。術後 30 日では両群とも骨の添加が進んでいたが，実験群でより明瞭な骨梁構造が見られた。

免疫組織化学的観察では，術後 14 日では対照群と実験群に大きな差は見られなかったが，術後 30 日においては実験群において，対照群よりも Osteocalcin，Osteopontin の発現を多く認めた。

骨新生率は 14 日，30 日ともに対照群(14 日：28.22±2.16，30 日：52.28±4.09)よりも実験群(14 日：67.77±12.10，30 日：79.90±2.22)で有意に高値を示した($P<0.05$)。

【考察および結論】

結果より，A-PRF を抜歯窩に適応することで，骨新生は明確に促進することが観察された。このことから，A-PRF はインプラント治療時における歯槽骨形態の保存・再生に有効であることが示唆された。

甘露飲エキスは破骨細胞と骨芽細胞の分化制御を介してラット実験的歯周炎の歯槽骨吸収を抑制する

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 歯周歯内治療学分野
○稲垣裕司、高木亮輔、西川泰史、木戸理恵、坂本英次郎、成石浩司、木戸淳一、湯本浩通

Kanroin (Gan-Lu-Yin) Extracts Prevent Alveolar Bone Resorption in Experimental Rat Periodontitis by controlling of osteoclast and osteoblast differentiations

Department of Periodontology and Endodontology, Institute of Biomedical Sciences,
Tokushima University Graduate School
○Yuji Inagaki, Ryosuke Takagi, Yasufumi Nishikawa, Rie Kido, Eijiro Sakamoto,
Koji Naruishi, Jun-ichi Kido, Hiromichi Yumoto

【目的】甘露飲エキスは、甘草、枳実、地黄、麦門冬、黄芩、茵陳蒿、枇杷葉、石斛、天門冬の 9 種の生薬から抽出した漢方製剤で、口内炎、舌の荒れや痛み、歯周炎に効能・効果があるとされている。しかし歯周炎に対する効能、特に歯槽骨代謝への影響は明らかでない。本研究では、歯周炎モデルラットを用いて甘露飲エキスの歯槽骨吸収抑制効果を *in vivo* で検討するとともに、破骨細胞と骨芽細胞に対する影響については *in vitro* で調べた。

【材料と方法】甘露飲エキスはサンスター株式会社より提供を受けた。8 週齢 Wistar 系雄性ラットを用い、結紮 1 週間前から甘露飲エキスを経口投与（60 mg/kg）した前投与群、結紮当日から経口投与した投与群、そして非投与群の 3 群に分けた（徳島大学動物実験委員会 動物実験計画書承認番号 T28-90 号）。ラットの上顎右側第 2 臼歯をナイロン糸で結紮して片側に歯周炎を惹起した後、結紮 20 日目に歯周組織を採取し、非結紮の左側第 2 臼歯を対照側としてマイクロ CT 解析を行い、3 群間で歯槽骨吸収レベルを比較した。また血液を採取し、ELISA キットを用いて血清中の骨代謝マーカーを定量した。次にマウスマクロファージ様細胞株 Raw264.7 細胞とマウス骨芽細胞前駆細胞株 MC3T3-E1 細胞を用いて、破骨細胞分化と骨芽細胞石灰化に対する甘露飲エキスの影響を検討した。sRANKL 50 ng/ml により Raw264.7 細胞を破骨細胞に分化誘導し、甘露飲エキスを 0.01～1 mg/ml の範囲で培地に添加して TRAP 染色を行い、形成された多核細胞の数を計測した。また細胞を回収して、NFATc-1、Cathepsin K および DC-STAMP の発現を Western Blotting で確認した。さらに MC3T3-E1 細胞を石灰化誘導培地で培養し、甘露飲エキスを 0.01～0.5 mg/ml の範囲で培地に添加してアリザリンレッド染色を行い、形成された石灰化結節を計測した。

【結果と考察】マイクロ CT 解析の結果、甘露飲エキス前投与群と投与群は、非投与群と比較して 30～40%の歯槽骨吸収の抑制が認められた（*P<0.01*）。しかし前投与群と投与群の間に有意差はなかった。また投与群と前投与群での血清中 NTx-1 については、非投与群と比較して有意な減少が認められた（*P<0.05* および *P<0.01*）。しかし Osteocalcin については 3 群間で有意差はなかった。Raw264.7 細胞では、甘露飲エキス 0.05 mg/ml 以上で濃度依存的に RANKL 誘導性の破骨細胞分化が有意に抑制された（*P<0.01*）。また甘露飲エキス 0.05～0.5 mg/ml の範囲で、NFATc-1 の発現に大きな変化はなかったが、Cathepsin K および DC-STAMP の発現が濃度依存的に抑制された。一方、MC3T3-E1 細胞において、甘露飲エキス 0.01～0.2 mg/ml の範囲で石灰化が濃度依存的に増加したが、0.5 mg/ml の濃度では細胞増殖と石灰化の抑制が認められた。以上の結果より、甘露飲エキスは破骨細胞への分化を抑制するとともに骨芽細胞の石灰化を亢進することによって、歯周炎の歯槽骨吸収を抑制することが示唆された。

長鎖ポリリン酸のマクロファージ活性化抑制作用とエンドトキシンショックモデルの致死率改善効果

[1]昭和大学歯学部　歯科保存学講座　美容歯科学部門, [2]昭和大学薬学部　基礎医療薬学講座　毒物学部門, [3]リジェンティス株式会社

○寺島実華子[1], 芦野　隆[2], 川添祐美[2,3], 柴　肇一[1,3], 沼澤　聡[2], 真鍋　厚史[1]

Effect of long-chain polyphosphates on a decrease in the endotoxin-induced lethality by inhibiting macrophage activation

[1]Department of Conservative Dentistry, Division of Aesthetic Dentistry and Clinical Cariology, Showa University School of Dentistry,
[2]Department of Pharmacology, Toxicology &Therapeutics, Division of Toxicology, Showa University School of Pharmacy,
[3]Regenetiss Inc.

○Mikako Terashima[1], Takashi Ashino[2], Yumi Kawazoe[2,3], Toshikazu Shiba[1,3], Satoshi Numazawa[2], Atsufumi Manabe[1]

【目的】

無機ポリリン酸（polyP）は、あらゆる生物種に普遍的に存在するリン酸重合化合物であり、その分子の長さによって異なった生体作用を示すことが知られている。特に分子量の大きい長鎖 polyP（平均リン酸重合度約 150, $polyP_{150}$）は、誘導型一酸化窒素合成酵素の発現や破骨細胞による骨吸収を抑制する作用があり、さらなる機能の存在が示唆される。リポポリサッカライド（LPS）はグラム陰性菌の細胞壁成分であり、サイトカインやフリーラジカルなどの炎症性メディエーターを誘導することで炎症を引き起こす物質である。臨床では、重度感染症による敗血症ショックなどの病態や歯周炎の発症にも密接に関与しており、歯科領域においても重要な標的である。そこで本研究は、LPS により誘発される致死性ショックにおける $polyP_{150}$ の作用に焦点をあて検討を行った。

【方法】

実験動物：ddY 系、雄性、8 週齢のマウスを用い、LPS および $polyP_{150}$ は、生理食塩水に溶解し尾静脈内に投与した。

生存分析：$polyP_{150}$ 投与 1 時間後に LPS を投与し、7 日後までの生存率を比較した。

生化学検査：LPS 投与 16 時間後に採血し、vetscan を用いて測定した。

免疫染色：LPS 投与 16 時間後に肺および肝を摘出し、F4/80 抗体で染色した。

TNFα 遺伝子発現：LPS 投与 3 時間後に肺および肝を摘出し、Real-time PCR 法で測定した。

細胞遊走：マウスの腹腔マクロファージを用いて、Boyden chamber assay で測定した。

MAP キナーゼリン酸化：マウスの腹腔マクロファージを用いて、ウエスタンブロットで測定した。

【結果】

$polyP_{150}$ のエンドトキシンショックにおける生存率改善効果の検討を行ったところ、LPS(50 mg/kg)単独群では投与 7 日後までの致死率が 80%だったのに対して、LPS 処置 1 時間前に $polyP_{150}$(0.1 mmol/kg、リン酸残基として)を前投与した群では致死率が 27%に低下した。そこで、LPS 投与 16 時間後の血液で生化学検査を行ったところ、LPS 単独群では AST, ALT, K^+, CK, BUN 値が上昇し、tCO_2 値は低下した。$polyP_{150}$ 前処置群では AST, ALT, K^+, CK 値の上昇が抑制され、tCO_2 値は回復した。生体内では炎症状態になると TNFα 等の炎症性メディエーターが産生され、マクロファージが活性化する。AST, ALT 値の上昇が抑制され tCO_2 値は回復したことから、肺と肝を採取して Real-time PCR 法を行ったところ、肺・肝ともに TNFα の遺伝子発現量に変化は認められなかった。一方、免疫染色を行ったところ、肺・肝ともに $polyP_{150}$ 前処置群では LPS 単独群と比較して F4/80 陽性細胞数が減少した。F4/80 陽性細胞数が減少したことから、マウスの腹腔マクロファージを採取し、TNFα 誘発マクロファージ遊走に対する $polyP_{150}$ の効果を検討したところ、$polyP_{150}$(10 μM)前処置群では TNFα (1 ng/mL)単独群と比較して、マクロファージの遊走が抑制された。次に、TNFα のシグナル伝達系である MAP キナーゼのリン酸化の変化を観察したところ、$polyP_{150}$ 前処置群では TNFα 単独群と比較して、JNK および p38 のリン酸化が抑制された。

【考察】

$polyP_{150}$は、炎症応答においてTNFα経路を抑制することでマクロファージの活性化を抑制し、LPSよる致死率を低下させたことが示唆された 。以上の結果より、$polyP_{150}$がエンドトキシンによる歯周炎の治療や致死性ショックの回避に応用できる可能性がある。

ヒト羊膜上培養歯髄由来細胞シートを用いた歯槽骨再生の評価

京都府立医科大学大学院 医学研究科 歯科口腔科学
○山野辺広中，山本俊郎，堀口智史，中井敬，山本健太，
大迫文重，雨宮傑，坂下敦宏，中村亨，金村成智

Assessment of alveolar bone regeneration by using dental pulp-derived cell sheet cultured on human amniotic membrane

Department of Dental Medicine, Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science
○YAMANOBE Hironaka,YAMAMOTO Toshiro,HORIGUCHI Satoshi,NAKAI Kei,YAMAMOTO Kenta,
OSEKO Fumishige,AMEMIYA Takeshi,SAKASHITA Nobuhiro,NAKAMURA Toru,KANAMURA Narisato

【研究目的】

これまでに、我々は羊膜の抗炎症および感染防御作用や細胞培養基質としての有用性に注目し、羊膜を基質とした培養口腔粘膜上皮由来細胞シートならびに培養歯根膜由来細胞シートの作成方法を確立してきた。歯根膜細胞と同様に、歯髄細胞は間葉系幹細胞を多く含み、非常に増殖能が高く、骨芽細胞への分化能も良好であることから、再生医療への応用が期待されている。そのため我々は、骨分化誘導歯髄由来細胞シートを作成し、免疫不全マウスならびに歯槽骨欠損モデル免疫不全ラットに移植し、免疫蛍光染色、X 線撮影、マイクロ CT などを用いて解析し、骨分化誘導した歯髄由来細胞シートの移植が歯槽骨欠損を抑制、改善することができるか検討した。

【材料および方法】

歯髄由来細胞は、抜去智歯より歯髄組織のみを採取後 3〜4 継代培養し、羊膜上に播種を行った。Control 培地(10% FBS/DMEM)、骨分化誘導培地(β-グリセロリン酸、アスコルビン酸、デキサメサゾン添加 10% FBS/DMEM)を用いて 4 週間培養後、細胞染色と組織学的検討を行い、羊膜上で培養された歯髄由来細胞シートの性状を評価した。次に、免疫不全マウスの腰背部皮膚を切開剥離、骨分化誘導歯髄由来細胞シートを静置および縫合した。移植 4 週間後、軟 X 線装置を用いて画像評価を行うとともに、移植片を採取、免疫組織学的検討を加えた。さらに、免疫不全ラットの上顎第 2 臼歯の歯頚部にワイヤーを 4 週間結紮、歯槽骨欠損モデルを作成した。そして、骨欠損部位に骨分化誘導歯髄由来細胞シートを同様に移植、移植 4 週間後および 8 週間後に移植片を採取、マイクロ CT にて検討を加えた。

【成績】

羊膜上で骨分化誘導した歯髄由来細胞は間葉系細胞マーカーである vimentin、細胞増殖マーカーである Ki-67 陽性を認め、細胞間には細胞間接着マーカーである Zo-1 の発現を認めた。さらに、間葉系幹細胞マーカーである CD44、CD105、CD146 の局在も認めた。骨分化誘導歯髄由来細胞シートは、Alizarin Red S 染色で高い染色性を示すとともに、免疫組織化学で Osteocalcin の発現を認めた。免疫不全マウス腰背部皮下に移植した骨分化誘導歯髄由来細胞シートは、軟 X 線所見にて不透過像を認め、Alizarin Red S 染色、von Kossa 染色で高い染色性と Osteocalcin 陽性を示し、異所性の骨形成を認めた。また、骨分化誘導歯髄由来細胞シートを移植した免疫不全ラットの骨欠損部位では、移植をしない骨欠損部位と比べ、骨量の回復を認め、その傾向は移植 4 週後だけでなく、8 週後でも維持された。

【考察および結論】

歯髄由来細胞は羊膜の基質上で骨芽細胞様細胞に分化することが可能であること、また羊膜上で骨分化誘導した歯髄由来細胞シートは、実験動物の皮下移植にて石灰化した組織が維持されるとともに、歯槽骨の骨欠損部位に留まり欠損を回復させることが判明し、それも一過性の回復ではなく維持されることが確認された。以上より、歯槽骨欠損に対する再生療法として、骨分化誘導歯髄由来細胞シートを用いる事により、組織修復が期待できる事が示された。

【参考文献】

1. Amemiya T,Nakamura T,Yamamoto T,*et al*.Autologous transplantation of oral mucosal epithelial cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate for intraoral mucosal defects.PLoS One. 10(4),e0125391, 2015.
2. Honjo K,Yamamoto T,Adachi T,*et al*.Evaluation of a dental pulp-derived cell sheet cultured on amniotic membrane substrate.Biomed Mater Eng 25(2),203-212,2015.

未分化なヒト歯根膜クローン細胞株およびハイドロキシアパタイト焼成体を用いた人工歯根作製について

[1]九州大学大学院歯学研究院 歯科保存学研究分野、[2]九州大学病院 歯内治療科、
[3]九州大学大学院歯学研究院 OBT 研究センター、[4]九州大学病院 口腔総合診療科
○小野太雅[1]、友清淳[2]、長谷川大学[2]、濱野さゆり[1,3]、吉田晋一郎[2]、杉井英樹[2]、
有馬麻衣[1]、小川真里奈[1]、野津葵[1]、和田尚久[4]、前田英史[1,2]

Preparation of artificial dental roots using undifferentiated clonal human periodontal ligament cell line with hydroxyapatite substance

[1]Department of Endodontics and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University [2]Department of Endodontics, Kyushu University Hospital [3]OBT Research Center, Faculty of Dental Science, Kyushu University [4]Division of General Dentistry, Kyushu University Hospital
○TAIGA ONO[1], Atsushi Tomokiyo[2], Daigaku Hasegawa[2], Sayuri Hamano[1,3], Shinichiro Yoshida[2], Hideki Sugii[2], Mai Arima[1], Marina Ogawa[1], Aoi Nozu[1], Naohisa Wada[4], Hidefumi Maeda[1,2]

【目的】現在インプラント治療で用いられるインプラント体は、生体不活性材料で構成されており、骨に直接結合することで支持を得ている。しかし、骨との間に歯根膜を介さないインプラント体では、咀嚼刺激による咬合圧の調整が困難であることから、歯根膜を有する人工歯根の開発が望まれている。近年、生細胞を三次元的に積層することで、複雑な構造の積層体を作製する 3D プリント技術が報告された(Yurie H et al. 2017)。そこで本研究では、未分化なヒト歯根膜クローン細胞株の三次元的積層により作製したチューブ型構造体と、生体活性材料の一種であるハイドロキシアパタイトの焼成体とを組み合わせることで、歯根膜を介して骨と間接結合する人工歯根を作製することを目的とした。

【材料および方法】

1. 未分化なヒト歯根膜クローン細胞株由来チューブ型構造体の作製： (1) 未分化なヒト歯根膜クローン細胞株 (1-17 細胞) を 10% fetal bovine serum 添加 αMEM (CM) 含有 U 底 96 well プレートに 2.5x10^4 cells / well ずつ播種したのち、培養を行った。培養開始直後および培養開始から 1, 2, 3 ならびに 4 日後に、well 内に形成されたスフェロイドを蛍光顕微鏡にて観察し、それらの直径を計測した。 (2) 次に (1) と同様の方法を用い 2 日間培養にて作製したスフェロイドを、三次元細胞積層システム (株式会社サイフューズ) を使用して 9×9 剣山上にチューブ型に積層した。積層体の培養は、灌流培養器および定量送液ポンプを用いて CM を灌流させながら行った。培養 10 日目に 9×9 剣山から積層体を分離し、それらを CM にて 1 日培養することで、1-17 細胞由来チューブ型構造体 (3D Tube) を作製した。また、3D Tube の中央にハイドロキシアパタイト焼成体 (HA) を挿入したのち、CM にて 7 日間培養することで、3D Tube-HA 複合体 (3D-HA Tube) を作製した。

2. 3D tube および 3D-HA Tube の構造解析：3D Tube および 3D-HA Tube を 4%パラホルムアルデヒドにて 1 日間固定した。固定後の 3D Tube および 3D-HA Tube を包埋・薄切することで 5 μm 切片を作製したのち、ヘマトキシリン–エオジン (HE) 染色を行い、3D Tube および 3D-HA Tube の構造解析を行った。

3. 3D Tube を構成する 1-17 細胞における歯根膜関連遺伝子の発現解析：3D Tube を構成する 1-17 細胞から mRNA を回収し、逆転写酵素を用いて cDNA を作製したのち、定量的 RT-PCR 法にて歯根膜関連遺伝子 (*CEMP1*、*COL1*、*COL12*、*FN1*、*PLAP1*、*POSTN*、*SDC1* および *SDC2*) の遺伝子発現を、3D Tube を構成していない 1-17 細胞と比較した。

4. 3D Tube および 3D-HA Tube における POSTN および CEMP1 の発現解析：2. にて作製した 3D Tube および 3D-HA Tube の 5 μm 切片を使用し、抗 POSTN 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) および抗 CEMP1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を用いて免疫組織化学的染色を行い、それらの POSTN および CEMP1 の発現比較を行った。

【結果と考察】1-17 細胞から作製したスフェロイドは、培養期間と共に直径が減少することが明らかとなった。また培養 1 日目ではスフェロイド内の 1-17 細胞は疎な状態であったが、2 日目以降では密な状態が確認された。HE 染色の結果、1-17 細胞が 3D Tube および 3D-HA Tube の外面から内面まで存在することが確認された。さらに 3D Tube を構成する 1-17 細胞は、3D Tube を構成していない 1-17 細胞と比較して *CEMP1*、*COL1*、*FN1*、*PLAP1*、*POSTN* および *SDC2* を有意に高発現した。また POSTN および CEMP1 は、3D Tube および 3D-HA Tube 全体に強く発現した。

以上より、1-17 細胞から積層体を作製する場合、培養 2 日目でのスフェロイドの使用が可能であることが示唆された。またチューブ型構造に積層することで 1-17 細胞の歯根膜細胞分化が促進されること、およびハイドロキシアパタイト焼成体は、チューブ型構造体内の 1-17 細胞における POSTN および CEMP1 発現に影響しないことが示唆された。

パルスジェットを用いた新たな歯周炎治療法の開発
～人工歯石の除去効果に関する検討～

[1]東北大学大学院歯学研究科口腔診断学分野、[2]東北大学大学院医学系研究科脳神経外科学講座
○[1]佐藤由加、[1]飯久保正弘、[1]西岡貴志、[2]中川敦寛

Effect of removing artificial dental calculus using pulse jet

[1]Department of Oral Diagnosis, Tohoku University Graduate School of Dentistry
[2]Department of Neurosurgery, Tohoku University Graduate School of Medicine
○[1]YUKA Sato, [1]MASAHIRO Iikubo, [1]TAKASHI Nishioka, [2]ATSUHIRO Nakagawa

【研究目的】

歯周基本治療において、歯石やプラーク等の付着物および不良肉芽の除去が必要不可欠である。付着物の除去には超音波スケーラーを用いることが多いが、超音波スケーラーは使用後に歯に微細な傷がつくことが報告されている。また、プラークの除去にはエアーフローを用いることもあるが、歯石の除去は不可能と言われている。我々はこれまでに、ピエゾ駆動により尖端 0.15 mm のノズルから極微量（約 1 μl）の強力な水流を発生させる治療機器としてパルスジェット（actuator-driven pulsed water jet ,以下 ADPJ）の技術開発に成功している。ADPJ は、出力を変えることにより任意の硬さの組織を選択的に粉砕することができ、さらに吸引も同時に行える利点を有しているため、脳神経外科領域ではメスとして脳腫瘍の手術への応用に成功している。その精度は、薄い被膜で覆われた神経・血管を温存したままに、より軟らかい腫瘍を粉砕・切除可能であることを確認している。よって、ADPJ の出力をコントロールすることで、健全歯質を傷つけることなく歯石を除去することや、健全な歯周組織を温存したままに不良肉芽を除去することが十分可能であると考えた。今回我々は、出力と歯石の除去効果の関係について明らかとすることを目的に、人工歯石を付着させた人工歯に対して様々な出力のパルスジェット噴射を行い、人工歯石の除去量および人工歯への傷の有無について検討を行った。

【材料および方法】

83 本の人工歯（株式会社ニッシン、A-PRO3A　インヴィクタス、右上１）に対して、表面に人工歯石（歯石セット、ニッシン社製）を付着させ、24 時間自然乾燥を行った後に実験に用いた。

① 人工歯石の除去効果：ADPJ の出力を 150 V、200 V、240 V に設定し、10 秒、20 秒、30 秒の噴射を行った（各条件、9 歯　計 81 歯）。歯石付着前（付着前）および歯石付着 24 時間後（付着後）、ADPJ 噴射 24 時間後（噴射後）に人工歯の重量計測（研精工業株式会社、FX-300i）を行い、（噴射後-付着後）×100 /（付着後-付着前）の計算式のもと、歯石の除去率を算出した。統計処理は、一元配置 ANOVA を行った後に TuKey-Kramer の HSD による多重比較検定を行い、危険率 0.05 以下を有意差ありとした。

② 人工歯への傷の有無の判定：ADPJ（240 V）および超音波スケーラーにて、人工歯石の除去を行った（各 1 歯、計 2 歯）後に、5%エバンスブルーにて 10 秒浸漬後水洗し、人工歯表面の傷の評価を視覚的に行った。

【結果】

① 人工歯石の除去効果：いずれの ADPJ の出力においても、10 秒噴射に比較して 30 秒噴射が有意に高い除去率を示した。また、いずれの噴射時間においても、ADPJ の出力を上げるに伴い、高い除去率を示す傾向がみられた。

② 人工歯への傷の有無の判定： ADPJ にて、人工歯石の除去を行った後の人工歯表面には、エバンスブルーは確認できなかった。一方、超音波スケーラーを用いた人工歯表面には、エバンスブルーによる線が複数確認できた。

【考察】

本実験結果より、ADPJ の出力を上げることで、人工歯石を効率的に除去できることが明らかとなった。また、ADPJ 噴射による歯石除去は、人工歯表面に傷を負わせないことが確認できた。以上の結果より、ADPJ は歯石除去に有効な装置であることが示唆された。今後は、本実験結果をもとに、実際のヒト抜去歯に付着した歯石の除去効果に関する研究を行う予定である。

乳酸菌配合タブレットの継続摂取が高齢者の口腔内環境に及ぼす影響

[1]福岡歯科大学総合歯科学講座, [2]福岡歯科大学口腔保健学講座, [3]たなべ保存歯科
○廣藤卓雄[1], 谷口奈央[2], 米田雅裕[1], 藤本暁江[1], 中島正人[1], 大曲紗生[1], 瀬野恵衣[1], 萩尾佳那子[1], 樋口拓哉[1], 田邊一成[3], 埴岡　隆[2]

Effect of continuous administration of lactic acid bacterium on oral environment in elderly people

[1]Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College
[2]Department of Preventive and Public Dentistry, Fukuoka Dental College
[3]Tanabe Preservative Dentistry
○Hirofuji T[1], Taniguchi N[2], Yoneda M[1], Fujimoto A[1], Nakajima M[1], Omagari S[1], Seno K[1], Hagio K[1], Higuchi T[1], Tanabe K[3], Hanioka T[2]

【目的】我々は、乳酸菌 *Lactobacillus salivarius* WB21 株を配合したタブレットやオイルの継続摂取の口臭や歯周炎に対する改善効果について、今までに実施した二重盲検ランダム化比較試験などで報告してきた[1)]。本研究では、地域参加型の健康な高齢者の口腔の健康管理における *L. salivarius* WB21 株配合タブレット継続摂取の有用性を明らかにするために、ランダム化二重盲検プラセボ対照クロスオーバー試験を実施した。

【方法】対象者は、筑紫南高年クラブ (福岡県筑紫野市) より募集した健康な高齢者ボランティア 33 名 (男性 19 名、女性 14 名、平均年齢 70.6 ± 3.7 歳) である。除外基準は、60 歳未満、無歯顎、歯科治療中 (メインテナンス除く)、過去 3 か月以内に抗生物質を服用、喫煙者、乳製品アレルギー、重篤な代謝疾患、悪性腫瘍がある者とした。研究参加者を無作為に 2 群にわけ、乳酸菌配合タブレットあるいはプラセボタブレットを 8 週間、一日 3 回食後 (ブラッシング後) に 1 錠舐めるよう指示した。続いて 8 週間の休止期間後、前回とは異なるタブレットを 8 週間舐めるよう指示した。それぞれの摂取時期の前後に、起床時より絶飲食、非口腔清掃の条件で、揮発性硫黄化合物濃度 (Oral Chroma CHM-1, NISSHA エフアイエス株式会社)、プラーク付着量 (Plaque Index)、歯肉出血 (CPI)、歯周ポケット (CPI)、舌苔付着量 (9 分割法)、唾液中の分泌型 IgA 濃度 (ELISA 法) を調べた。統計学分析は、群内比較を Wilcoxon signed-rank test、群間比較を Mann-Whitney *U* test を用いて行った。本研究は福岡学園倫理審査委員会の承認を得て実施した (第 310 号)。

【結果・考察】24 週間にわたる研究期間において、研究参加者のうち 3 名が本人や近親者の健康上の問題で脱落したため、30 名 (男性 18 名、女性 12 名、平均年齢 70.3 ± 3.8 歳) を分析対象者とした。揮発性硫黄化合物濃度、プラーク付着量、歯肉出血、舌苔付着量は、WB21 摂取期にもプラセボ摂取期にも減少し、WB21 摂取期において舌苔付着量に有意差がみられた。唾液中の分泌型 IgA 濃度は、WB21 摂取期にもプラセボ摂取期にも増加し、WB21 期において有意差がみられた。歯周ポケットについては、6 ミリ以上の深いポケットの数が WB21 摂取期に減少した。群間比較で有意差を認めた項目はなかった。

【結論】乳酸菌 *L. salivarius* WB21 株を配合したタブレットの 8 週間継続摂取は、健康な高齢者に対して舌苔付着量の減少と唾液中の分泌型 IgA の増加をもたらし、口腔の健康管理に有用である可能性が示唆された。

1) Suzuki N, Yoneda M, et al. Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 117(4) 462-470, 2014

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 C (課題番号 26463203) の助成により行われた。開示すべき COI 状態はない。

ヒト歯肉微小血管の形態観察

1)日本歯科大学大学院新潟生命歯学研究科歯周機能治療学 2)日本歯科大学新潟生命歯学部歯周学講座
3)日本歯科大学新潟病院総合診療科 4)日本歯科大学先端研究センター再生医療学
○外山淳史[1]　佐藤柚香里[1]　丸山昂介[2]　清水　豊[2,3]　両角祐子[2]　佐藤　聡[1,2,4]

Morphological observation of human gingival microvascular

1)Periodontology, Graduate School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University
2) Department of Periodontology, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata
3)Comprehensive Dental Care at Niigata Hospital, The Nippon Dental University
4) Division of Cell Regeneration and Transplantation, The Nippon Dental University
○Atsushi Toyama[1], Yukari Sato[1], Kosuke Maruyama[2], Yutaka Shimizu[2,3], Yuko Morozumi[2], Soh Sato[1,2,4]

【目的】

歯周組織には,血管が豊富に存在している。これらの血管は,分岐や吻合を行いながら,網目状を呈する毛細血管を形成することがわかっており,細菌感染に対する生体防御機構として機能している。

一方,喫煙は, 歯周病の環境因子からみた最大のリスクファクターとして強い関連性が示されている。喫煙により血中に取り込まれたニコチンは,毛細血管の収縮作用があることが知られている。しかし,喫煙が歯周組織に及ぼす影響について,ヒトの歯周組織微小血管の形態変化を観察した報告は少ない。

近年,血流を容易に非侵襲的に微小血管を観察できるマイクロスコープが開発され注目されている。血管観察マイクロスコープは侵襲を与えることなく,手指や歯肉の微小血管を観察することができる。

本研究では,喫煙による歯肉微小血管への影響について着目し,血管観察マイクロスコープを用いてヒト歯肉微小血管の形態を観察し,比較検討を行った。

【材料と方法】

対象は,日本歯科大学新潟病院職員,日本歯科大学新潟生命歯学部学生をとした。撮影は卓上・ハンディ兼用型血流スコープ Bscan-Z(GOKO 映像機器株式会社)を用いて行い、計測は計測ソフト IC Measure(GOKO 映像機器株式会社)を用いて行った。

事前に喫煙歴について聴取を行い,下顎右側側切歯辺縁歯肉中央部を撮影した。撮影後,血圧と心拍数を測定した。

撮影した静止画より微小血管の本数,微小血管の太さ,血管ループの形態に対して比較検討を行った。

【結果】

喫煙群,非喫煙群に分けて比較すると喫煙群で血管ループの形態の変化を多く認めた。血管ループは喫煙群で交差しているもの,吻合しているものを認めた。血管本数,血管の太さについては大きな変化は認めなかった。また,血圧と脈拍での血管本数,血管の太さ,ループの形態の大きな違いは認めなかった。

【考察】

本研究では,血管ループの形態以外大きな変化は認めなかった。喫煙により血中に入ったニコチンは末梢血管の収縮を引き起こすので,喫煙直後であれば血管の太さに変化があると考えられる。今後は喫煙後の継時的な観察が必要である。

海綿状歯肉増殖に対する非外科的治療

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座
○吉沼直人，長嶋秀和，高野麻由子，西田哲也，菅野直之，佐藤秀一

Non-Surgical Treatment of Spongiotic Gingival Hyperplasia: A Case Report

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry
○Naoto Yoshinuma, Hidekazu Nagashima, Mayuko Takano, Tetsuya Nishida, Naoyuki Sugano, Shuichi Sato

[緒言]海綿状歯肉増殖（Spongiotic Gingival Hyperplasia:以後,SGH）は若年者の前歯部唇側歯肉に生じる著明な歯肉の炎症性増殖であり,まれな歯肉病変である。臨床的に微小乳頭状か顆粒状の表面を有する孤立性の限局性病変で,鮮紅色の歯肉増殖を特徴とする。病因は不明であり,通常の歯周治療では改善されない場合が多い。Darling ら[1]は SGH 患者に外科治療を行い,再発率は約 29%であったと報告している。治療法は外科治療が多くみられるが，SGH の好発部位である前歯部唇側に外科治療を行うと術後に歯肉退縮による審美的問題を生じることが考えられる。本症例は上顎中切歯に発症した SGH 患者に対し,外科治療を行わずデキサメタゾン含有口腔用軟膏（以後，デキサメタゾン軟膏）の使用により症状が改善された症例を報告する。なお，報告にあたり患者からは事前に口頭および文書による同意を得ている。また記載すべき COI はない。

[症例]34 歳女性。主訴：上顎前歯部の歯肉の腫脹が気になる。

現病歴：当病院初診より 7 ヶ月前に転倒し 11 に歯冠破折が生じ，近医（紹介元）で補綴処置を開始した。転倒 1 ヶ月後に妊娠が判明したが，その 1 ヶ月後に流産した。同月に紹介元で補綴治療を再開し歯肉圧排を行いジルコニアクラウンの印象採得を行った。その後，頬側歯肉が腫脹し始めた。紹介元は生物学的幅の損傷を疑い，フラップ手術を行った。ジルコニアクラウンを仮着して経過観察を行っていたが，歯肉の腫脹が続いたため当病院を紹介され来院した。

現症:11 にジルコニアクラウンが仮着され,辺縁歯肉は海綿状に腫脹し,その表面は鮮紅色で,毛細血管が観察された。プロービングポケットデプスの測定は紹介元でフラップ手術を行って 1 ヶ月未満のため行わなかった。紹介元からの術前の検査データは唇口蓋側とも 2 ㎜以内，プロービング時の出血は陰性であった。また，歯の動揺は生理的範囲内であった。自覚症状として歯肉の掻痒感があった。

全身既往歴：流産，金属アレルギー　　診断名：海綿状歯肉増殖

[経過]初診時，11 唇側歯肉の掻痒感からブラッシングが困難で当該部の口腔清掃状態はやや不良であった。また，ブラッシング時に出血するとのことであった。11 唇側歯頚部に綿棒を用いてプラーク除去を指示し，さらに 1 日 3 回毎食後，デキサメタゾン軟膏を塗布するよう指導した。デキサメタゾン軟膏使用 1 ヶ月目で歯肉の腫脹は軽減したが，補綴物のマージンの露出が観察された。デキサメタゾン軟膏使用 3 ヶ月目で歯肉の腫脹および掻痒感は改善された。ブラッシング時の出血はなくなった。歯肉退縮により補綴物のマージンが露出した。この時点でデキサメタゾン軟膏の使用は中止した。1 ヶ月，2 ヶ月目で徐々に辺縁歯肉のクリーピングが生じ，歯肉退縮は改善傾向を認めた。

[考察]SGH の免疫組織化学的研究[2]からサイトケラチンの発現様式は接合上皮と類似し，歯肉溝の接合上皮が様々な機械的刺激により増殖する可能性を示唆した。本症例の患者は転倒,歯肉圧排などの機械的刺激が 11 接合上皮部に加わったことにより歯肉増殖を生じた可能性が考えられる。また，SGH の組織学的研究[1]から著明な好中球の浸潤が認められることから，強い抗炎症作用をもつ副腎皮質ホルモンが歯肉の発赤，腫脹に奏功したと考えられる。しかしながら,非外科的治療での長期の経過報告はなく，今後慎重に経過を観察する必要性がある。

[文献]

1) Darling MR, Daley TD, Wilson A, Wysocki GP. Juvenile spongiotic gingivitis. J Periodontol 2007; 78: 1235-1240.
2) Allon I, Lammert KM, Iwase R, Spears R, Wright JM, Naidu A. Localized juvenile sponsiotic gingival hyperplasia possibly originates from junctional gingival epithelium-an immunohistochemical study. Histopathology 2016; 68: 549-555.

無料歯科健康イベント参加者の口臭に関する意識調査

1）日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座
2）日本歯科大学新潟病院総合診療科
3）日本歯科大学先端研究センター再生医療学
○丸山昂介[1)]　高塩智子[2)]　清水　豊[2)]　両角祐子[1)]　佐藤　聡[1，3)]

Free dental health event participants the survey on attitude toward halitosis

1) Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University
2) Comprehensive Dental Care, The Nippon Dental University Niigata Hospital
3) Division of Cell Regeneration and Transplantation, The Nippon Dental University
○Kosuke Maruyama[1)]　Tomoko Takashio[2)]　Yutaka Shimizu[2)]　Yuko Morozumi[1)] Soh Sato[1,3)]

【目的】

日本歯科大学新潟病院いき息さわやか外来では,創設当時より新潟市歯科医師会主催の健康イベント内にブースを設け，イベントに参加された方の口臭測定を行なっている．平成 27 年と 28 年の歯科健康イベントに参加され，口臭測定を行なった方に対してアンケート調査を行なった．その結果，興味深いデーターが得られたので，口臭測定結果と共に報告する．

【方法】

平成 27、28 年に新潟市内のショッピングセンターで開催された無料歯科健康イベントに参加し，口臭測定を行なった 376 名（男性：141 名　女性：215 名　年齢：10 歳未満から 80 代）を対象とした．

口臭測定前に，アンケートにて口臭に関する意識調査を行なった．アンケート項目は，性別・年代・職業・口臭が気になるか・どういう状況で気になるか・口臭対策は行なっているかである．アンケート後に、ハリメーター（インタースキャン社）にて口臭測定を行なった．

【結果および考察】

対象となった参加者の年代は様々であり，10 歳未満 82 名，20 歳代 25 名，30 歳代 71 名，40 歳代 91 名，50 歳代 21 名，60 歳代 37 名，70 歳代 20 名，80 歳代 8 名であった。各年代でバラツキがあるが，ショッピングセンターという場所柄，親子連れでの参加が多かった．口臭が気になると答えた方は 110 名であり、時々気になるは 184 名，全然気にならない 67 名であった。口臭が気になる場面は複数回答で多い順に朝起きた時 181 名，人と話す時 129 名，食後 71 名，緊張した時 45 名，職場や学校 42 名，一日中 22 名であった．口臭対策としてなにを行なっているかとうい項目に対しては，歯磨きをよくしている 131 名，特に何もしていない 105 名，ガムを使用している 87 名，舌清掃をしている 76 名，うがいをよくしている 60 名，話す時手で口を隠す 19 名，病院に行っている 7 名，食事や間食を減らしている 5 名であった．舌清掃をどのような方法で行なっているかという質問に対しては，歯ブラシ・舌ブラシ・ガーゼ・指等様々な方法が上がった。口臭対策として舌清掃が有効であるという認識は以前より増加していると思われるが，舌清掃は様々な方法で行われているのが現状であり，適切な清掃方法は未だに認識されていないと考える．口臭測定の結果は，10ppb～573ppb であった．口臭を認知できる 150ppb 以上の値が出た方は，28 名であった．

今回の意識調査の結果では，口臭に関して気になっている方の割合が比較的多いように考えられる．一方で，実際に口臭対策としての知識は広く知れ渡っている状態ではなかった．

歯周外科手術が SPT 期の歯周組織検査におよぼす影響

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座 [1)]，日本歯科大学 [2)]，東京都 [3)]
○伊藤　弘 [1)]，沼部幸博 [1)]，上原　直 [1)]，呉　亜欣 [1)]，橋本修一 [2)]，永田達也 [3)]，濱田　亮 [3)]

The influence of a periodontal surgery on the periodontal tissue examination in SPT period

Department of Periodontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo[1)],
The Nippon Dental University[2)], Tokyo-to[3)]
○Hiroshi Ito[1)], Yukihiro Numabe[1)], Sunao UEHARA[1)], Ya-Hsin Wu[1)], Shuichi Hashimoto[2)],
Tatsuya Nagata[3)], Makoto Hamada[3)]

【目　的】

Supportive periodontal therapy (SPT) に移行した場合, 質の高いセルフケアの継続と医療従事者による各患者に適したプログラムの提供が健康な歯周組織の維持安定に極めて重要となる。そのための戦略として，患者の歯周病の状態を把握するための probing depth (PD) と bleeding on probing (BOP) は，極めて有効な検査項目であることが世界的に認知されている。我々は，PD と BOP の両検査に gingival crevicular fluid (GCF) 成分解析の併用が，より精度の高い検査結果の獲得に有効であると報告し，チェアサイドへの応用を検討してきた。一方，これらの検査結果に影響をおよぼす因子として，術者の検査に対する技量や GCF 検査の精度，さらには被験者の宿主因子や環境因子などがあげられる。今回の報告では，歯周治療の履歴に焦点を充て，特に歯周外科手術の有無が，歯周組織検査と GCF の生化学的検索結果におよぼす影響について検討を行った。

【材料および方法】

被験者は，日本歯科大学附属病院に来院中の全身的に健康であり非喫煙者である SPT 患者とし，臨床パラメータは，plaque index (PlI)，GCF 量 (Periotron® 8000)，gingival index (GI)，PD，clinical attachment level (CAL)，BOP，歯槽骨吸収率 (Schei O. et al.) とした。SPT 移行時期は，動的歯周治療終了後 3 か月に再評価検査を行い，病状安定と判断した場合とした。被験歯は，上下顎前歯部および小臼歯の単根歯とし，健常部位 [PD≦4mm，BOP(-)] と病変部位 [PD≧4mm，BOP(+)] を対象とする split-mouth design とした。GCF の生化学検索項目は，aspartate aminotransferase (AST) 量 (Wako kit)，蛋白質量 (BCA kit) とした。GCF の採取は，PlI 測定後，perio paper®を検査部位のポケットに抵抗感があるまで挿入し，30 秒間静置し採取した。なお、perio paper® に出血が視認された試料は除外対象とした。

【結果および考察】

被験者は，男性 39 名，女性 37 名，63.4 ± 10.8 歳であり，平均残存歯数は 22.4 ± 4.0 本であった。歯周治療の既往として，動的歯周治療期間は 29.1 ± 18.1 か月，SPT 期間は 62.0 ± 85.0 か月であった。また，動的治療としての歯周外科手術は全てフラップ手術であった。健常部位と病変部位における全臨床パラメータと生化学検索項目に対する，非歯周外科手術群と歯周外科手術群との比較では，統計学的に有意な差は認められなかった。この結果は，動的治療後 3 か月の治癒期間によるものと推察され，この治癒期間の経過は，特に歯周外科手術の既往の有無に対する臨床的・生化学的な変化に影響をおよぼさなくなる可能性を示唆するものと考えられた。

【参考文献】

1) Hiroshi Ito, Yukihiro Numabe, Shuichi Hashimoto, et al: Odontology, 102, 50–56, 2014.
2) Hiroshi Ito, Yukihiro Numabe, Shuichi Hashimoto, et al: Journal of Periodontology, 87, 1314-1319, 2016.
3) Sunao UEHARA, Hiroshi Ito, Yukihiro Numabe, Shuichi Hashimoto: J Jpn Soc Periodontol, 60, 26-34, 2018.

【倫理的配慮】

本研究は日本歯科大学倫理委員会承認の下遂行された（承認番号 NDU-T2014-56）。

【利益相反】

開示すべき利益相反はない。

【資金源】

文部省科学研究費助成金：基盤 C，課題番号： 17K11996・17K11995，平成 30 年度日本歯科大学生命歯学部研究 project の援助を受けた。

口腔内細菌が原因で発症した感染性心内膜炎患者に対して包括的歯周治療を行った一症例

徳島大学大学院医歯薬学研究部　歯周歯内治療学分野
○二宮雅美，生田貴久，成石浩司，湯本浩通

A Case Report of Comprehensive Periodontal Treatment for a Patient with Infective Endocarditis Caused by Oral Bacteria

Department of Periodontology and Endodontology,
Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School
○NINOMIYA Masami, IKUTA Takahisa, NARUISHI Koji, YUMOTO Hiromichi

【緒言】

感染性心内膜炎は，心内膜や弁膜の損傷部に細菌が感染することで発症する重篤な感染症である。いったん発症すると適切な医療処置が施されない場合，塞栓症などの重篤な合併症を引き起こし死に至る。細菌の感染経路として，肺炎や尿路感染症のほか，口腔レンサ球菌や歯周病原細菌などの口腔内細菌による感染が指摘されている。

今回我々は，口腔内細菌が原因で発症した感染性心内膜炎患者に対して，細菌検査の評価を行いながら，歯周基本治療を中心とした包括的治療を行い，長期間再発予防を図っている一症例を報告する。

【症例】

患者は 72 歳男性。2011 年 8 月に，上顎前歯部の動揺と歯肉出血を主訴として徳島大学病院・歯科に来科された。全身既往歴として，高血圧，高尿酸血症，僧帽弁閉鎖不全症，三尖弁逆流症があり，2011 年 2 月には感染性心内膜炎を発症して同院心臓血管外科に緊急入院した。血液培養検査から，口腔レンサ球菌 *S.Sanguinis* が検出されたため，抗菌薬による点滴治療を 1 か月間継続し，病状が回復した後に僧帽弁置換術，三尖弁輪縫縮術を行って退院となった。その後，担当医から再発予防のために歯科受診を勧められ来科された。口腔内所見では，全顎的に歯肉の発赤が認められ，12～24 部に動揺が認められた。12～23 部には不適合な連結前装冠が装着されており，15，13，25，44～34 部に咬耗が認められ過蓋咬合であった。47，26，27 部は挺出し，22,24 部に深在性根面う蝕が認められた。口腔清掃状態は PCR=76%と非常に不良であり，4mm 以上の歯周ポケットは 62.5%，BOP 陽性率は 69%であった。X 線写真では、11，12 部に歯根破折，21，23 部は歯内歯周病変，22，24 部に根面う蝕がみられ，上顎前歯部（12～24 部）に重度の骨吸収像が認められた。細菌検査の結果では，レンサ球菌や歯周病原細菌の *A.actinomycetemcomitans, P.gingivalis, T.forsythia, T.denticola, F.nucleatum* が有意に高く検出された。

【診断】外傷性咬合を伴う慢性歯周炎（12～24 部 重度歯周炎），11,12 部 歯根破折，22,24 部 根面う蝕

【治療経過】

術前に，心臓血管外科担当医に対して患者の病状や投薬状況の確認を行い，「感染性心内膜炎の予防と治療に関するガイドライン」にそって歯周基本治療を進めていった。口腔清掃指導を行い，抗菌薬（ｻﾜｼﾘﾝ：ｱﾓｷｼｼﾘﾝ）投与下で SRP，12～24 部の抜歯処置を行った。服用薬のワーファリンに関しては，医科担当医に問い合わせを行い，PT-INR 値が 2.0 であったため継続したまま抜歯を行った。抜歯は６歯を２回に分けて抜歯し，２週間以上あけてから次の抜歯を行うように配慮した。最終補綴として，26，27 FMC 装着，17,16，12～24，36,37 欠損部は咬合挙上型の義歯を装着することで過蓋咬合や外傷性咬合の改善を図った。その結果，口腔衛生状態は改善し，細菌検査の結果も全て基準値以下となり、全顎的に認められた歯肉の炎症や歯周ポケットは著明に改善した。血清 CRP 値は，抜歯翌日の血液検査で上昇が認められたが，２日後には改善しその後異常は認められていない。動的治療終了後も，現在まで定期的に supportive periodontal therapy を継続しており，感染性心内膜炎の再発予防を長期間サポートしている。

【まとめ】

感染性心内膜炎の発症因子として，口腔内細菌の関与が一番高いことが指摘されている（Circulation Journal,77,2013）。本症例も、2011 年に感染性心内膜炎を発症した際の起因菌として，血液培養検査で *S.sanguinis* が検出されているが，患者の口腔内状況から，歯周病の進行も伴って口腔レンサ球菌が体内に侵入しやすい口腔環境が形成されていたものと推察される。感染性心内膜炎は，心疾患の既往のある患者で，高齢者や糖尿病などの免疫機能が低下している場合や口腔衛生状態が不良な場合に，その発症リスクが高まることが指摘されている。そのため，患者の口腔衛生管理を行うことは，生命を維持するうえでも非常に重要であると思われる。

今後の医療面接に関わる資格保有のための一考察（キャリア領域を中心として）

奥羽大学歯学部口腔衛生学講座[1)]、歯科保存学講座[2)]
○車田文雄[1)]、佐藤穏子[2)]、佐々木重夫[2)]、木村裕一[2)]

A consideration for qualified possession related to future medical interview (With career area as the center)

Dept. Preventive Dentistry and Conservative Dentistry OHU University School of Dentistry
○Fumio KURUMADA, Yasuko SATOH, Shigeo SASAKI, Yuichi KIMURA

【 緒 言 】

先の 148 回本学会において、日本の「心理学に関する資格」を種々分類し、今後現場において苦慮する場合が少なからずあり、益々増加傾向が予想される発達障害者等を含めた多用な患者に対して、保存治療医としての一課題（ダブルライセンス）の重要性の知見を報告したが、今回はそれに引き続き患者のキャリア領域に注視し、口腔内の訴えに限らず本人の生活歴を含めた病歴聴取を円滑にするため知見（シュロスバーグの４S）を得たのでここに報告する。

【 方法および結果 】

心理職資格を、国家資格、大学･大学院･高等教育機関の資格、学会認定民間資格、団体認定民間資格に前回同様分類した。①国家資格･･･公認心理師（昨年 9 月施行、今年日本初の心理職国家資格者誕生予定、文科省・厚労省共管）のみ。②大学･大学院･高等教育機関の資格･･･ガイダンスカウンセラー、学校心理士、臨床心理士等。③学会認定民間資格･･･応用心理士、音楽療法士、認定カウンセラー等。④ 民間法人･団体認定民間資格･･･カウンセリング心理士、教育カウンセラー等。現在約 77 資格

以上のように相当な心理職があるが、特に教育機関の歯科医師のプロフェッショナルな見地（心身症は身体病（口腔疾患等）であるため身体的治療も大切であるが、その発症や経過には心理的因子が密接に関係しているので、治療上心理的側面への配慮が重要であり、心身両面から治療することになる。また、歯科心身症に特化するだけではなく、一般的に医療面接をする際にはホスピタリティのあるインタビューが必須ともなることからすれば、少なくとも上記①及び②の資格を取得していると現場での患者に対する診療がよりスムースに行われる可能性は大である。

【 考察および結論 】

1. 歯科保存領域では、特に自臭症（口臭関連）や歯科恐怖症の患者に対するアプローチが要求されると考えられ、心療内科医等のチーム医療も視野には入れるが、先ずは上記心理職の有している歯科医師がインテークも含め、カウンセリングマインドの診療をすることが患者とのラポール構築に発展すると考える。

2. また医療系大学でも発達障害の学生が徐々に入学し、彼らに対し合理的配慮（障がいに合った支援）が法的に位置づけられたことを根拠にすれば、発達障害者等を含めた多用な学生に対してもカウンセラー等だけが関わるのではなく、上記同様の心理職歯科医師も対応することが望ましいと考える。

3. 患者との医療面接は言語的なアプローチだけでは問題の洞察に至ることが困難な場合も多く、そのため言語的と並行して非言語的なアプローチを用いたりすることが重要と考える。

4. 患者の主訴に対する「自身、状況、支援、戦略：４S」の側面をキャリア領域から歯科医師が「気づきの促し」を行うことが、患者からの情報提供に役立つと考える。（４S に関しては本紙面上では限りがあるため、詳細は当日の示説にて発表）

以上のように相当な心理職があるが、特に教育機関の歯科医師（教員）は、患者の QOL の重要性から患者の心理的側面への配慮が重要である。ただし心理的因子の関与の度合いはケースにより様々であり、家族関係や学内の状況の調整を必要とすることもある。さらには幼児期に遡り生育歴を検討し直すことが必要な場合もあることからすれば、少なくとも上記①及び②の資格と併せてキャリアコンサルタント（国家資格）を取得していると現場での患者に対する医療面接がよりスムースに行われる可能性は大である。

歯科用チェアユニット水の汚染に対する微酸性電解水の効果
- 7 年間にわたる調査 -

鶴見大学歯学部歯内療法学講座 [1]、口腔微生物学講座 [2]
○中野雅子 [1]、高尾亞由子 [2]、前田伸子 [2]、細矢哲康 [1]

Effects of slightly acidic electrolyzed water supply on contamination of dental chair water
- Investigation for 7 years -

Depts. of Endodontology[1] and Oral Biology[2], Tsurumi University School of Dental Medicine
○Nakano Masako[1], Takao Ayuko[2], Maeda Nobuko[2], Hosoya Noriyasu[1]

【目　的】

歯科用チェアユニット水の微生物汚染の対策は、歯科臨床における重要な課題である。汚染のおもな原因は、歯科用チェアユニット（以下ユニット）の水回路内部に形成される従属栄養細菌のバイオフィルムと考えられている [1]。

本研究では、鶴見大学歯学部附属病院でユニット水の汚染対策として使用している、ユニット水回路に微酸性電解水（SAEW）を常時給水するシステムを評価するために、ユニット水の遊離残留塩素濃度、従属栄養細菌数ならびに水回路への影響に関する 7 年間にわたる調査の結果を分析した。

【材料と方法】

附属病院保存科に設置した SAEW 生成装置搭載ユニットから、ユニット水を 7 年間にわたり定期的（毎月/設置～5 年、数か月間隔/6,7 年）に計 59 回採水し、遊離残留塩素濃度と従属栄養細菌数を測定した。採水はハイスピートハンドピース（HS-1）、超音波スケーラーならびにコップ給水から行った。対照は、水道水を給水する同ユニットのハイスピードハンドピース(HS-2)とし、採水はフラッシング前後で実施した。なお HS-1 と HS-2 の稼働は、積算タイマーによって均等となるように調整した。塩素濃度は周囲の温度に影響されることから、地域行政が発表する採水日の平均気温を参考にした。SAEW が水回路におよぼす影響を調査するために、ユニット水における溶出試験 (鉛、６価クロム、フッ素、亜鉛、銅、有機物) を行なった。

本ユニットの臨床使用にあたっては、患者毎に研究目的、システムならびに SAEW に関する説明を行い許諾を得た。治療終了後には、使用前に行った説明の理解度、うがい時における SAEW の違和感（味、臭い）、SAEW を給水する本ユニットの継続使用の可否についてアンケート調査を行った。得られた結果から、遊離残留塩素濃度と従属栄養細菌数について Friedman 検定にて統計学的検索を行った($p<.05$)。また、遊離残留塩素濃度と従属栄養細菌数ならびに気温と遊離残留塩素濃度の関係について順位相関係数を求めた。

本ユニットに関する研究ならびに臨床使用は、鶴見大学歯学部倫理審査委員会の承認を得た（No. 818）。

【結　果】

HS-1、超音波スケーラー、コップ給水における 7 年間の遊離残留塩素濃度は 17.8±4.8 ppm であり、従属栄養細菌数は 55 回の採水で 10^1 CFU/ml 以下であったが、4 回で $10^2 - 10^3$ CFU/ml が検出された。HS-2 は、フラッシング前で遊離残留塩素濃度が 0.25±0.15 ppm、従属栄養細菌数が $10^1 - 10^4$ CFU/ml であった。フラッシング後は、それぞれ 0.32±0.16 ppm、$10^1 - 10^4$ CFU/ml であった。SAEW の遊離残留塩素濃度はフラッシング後の HS-2 より有意に高く、従属栄養細菌数は有意に減少した。HS-2 におけるフラッシングでは、遊離残留塩素濃度に差は認められなかったが、従属栄養細菌数はフラッシング後で有意に減少した。SAEW では気温と遊離残留塩素濃度に相関は認められなかったが、水道水では負の相関が認められた。SAEW における溶出試験では、全項目で水道水に定められる基準値以下であった。アンケート調査の回答では、目的とシステムについて理解できたが 89%、SAEW に違和感はないが 88%（味）ならびに 92%（臭い）であった。また本ユニットの継続使用を拒否する回答はなかった。

【結　論】

ユニット水として SAEW を 7 年間にわたり調査した結果、歯科臨床において歯科用チェアユニットの水回路へ微酸性電解水を常時給水するシステムは、ユニット水の微生物汚染対策として有効であることが示唆された。

1) Coleman DC. *et al.*: Biofilm problems in dental unit water systems and its practical control. J Appl Microbiol 106: 1424-1437, 2009.

地域高齢者における現在歯数および舌圧と食品栄養素摂取との関連性

[1]公益財団法人ライオン歯科衛生研究所，[2]弘前大学大学院医学研究科歯科口腔外科学講座，
[3]弘前大学大学院医学研究科オーラルヘルスケア学講座，[4]弘前大学大学院医学研究科社会医学講座
○森田十誉子[1)]，山崎洋治[1)]，佐竹杏奈[2)]，田村好拡[2)]，徳田糸代[3)]，小林 恒[2)]，中路重之[4)]

The association between the number of teeth and tongue pressure and intake of food nutrients in community elderly

[1]The Lion Foundation for Dental Health
[2]Department of Dentistry and Oral Surgery, Hirosaki University Graduate School of Medicine
[3]Department of Oral Health Care, Hirosaki University Graduate School of Medicine
[4]Department of Social Medicine, Hirosaki University Graduate School of Medicine
○Toyoko Morita[1)], Yoji Yamazaki[1)], Anna Satake[2)], Yoshihiro Tamura[2)], Itoyo Tokuda[3],
Wataru Kobayashi[2)], Shigeyuki Nakaji[4)]

【目的】

口腔の健康は，食事を口から食べ栄養を摂取する上で非常に重要であり，健康の維持向上および生活の質（ＱＯＬ）の向上にも大きく寄与すると考えられている。その中で，歯および舌は、咀嚼，食塊形成，食塊移送，嚥下などの摂食・嚥下プロセスで重要な役割を演じている。これまで，現在歯数と食品および栄養素摂取の関連性に関する先行研究はみられるが，舌機能との関連性について検討した報告は少ない。

そこで，本研究は，食品摂取および栄養素摂取における現在歯数および舌圧の影響を比較することを目的とした。

【方法】

2016 年岩木健康増進プロジェクトに参加した地域住民のうち，60 歳から 86 歳の女性 230 名を対象とした（悪性腫瘍，脳卒中，心筋梗塞の既往歴を有する者およびステロイド服用者は除外）。対象者に対し，口腔内診査，簡易型自記式食事歴法質問票（BDHQ）調査を行なった。口腔内診査は歯科医師により現在歯数を診査した。舌圧は舌圧測定器（JMS 舌圧測定器、ジェイ・エム・エス）を用いて測定した。

統計解析は、現在歯数が 20 本以上，19 本以下の 2 群に分け，舌圧は最大舌圧が 30kPa 以上、それ未満に分けて、食品品目および栄養素の摂取量との関連性について年齢を共変量にした共分散分析を用いて行った.

【結果】

１．食品品目の摂取：現在歯数が 19 本以下の人は 20 本以上の人に比べて，めしの摂取は有意に多く，キャベツなどの生野菜、きのこ、ハム、普通乳の摂取は有意に少なかった。一方、舌圧低下の人は，舌圧正常の人に比べて，めしの摂取は有意に多く，にんじん、かぼちゃの摂取は有意に少なった。

２．栄養素の摂取：現在歯数が 19 本以下の人は 20 本以上の人に比べて，炭水化物，炭水化物エネルギー比率は有意に高く，脂質エネルギー比率は有意に少なかった。一方、舌圧低下の人は，舌圧正常の人に比べて，αカロテンの摂取が有意に少なかった。

以上の結果より、現在歯数と舌圧は，どちらも食品品目および栄養素の摂取に重要と考えられるが，舌圧よりも現在歯数のほうが、影響される食品品目および栄養素の種類が多かった。

【結論】

地域在住高齢者の女性において、現在歯数は舌圧よりも食品品目および栄養素の摂取に強く影響しており，現在歯数の維持は、栄養摂取において重要であることが示唆された。

骨導音計測による食リズム評価

大阪大学大学院　歯学研究科　口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）[1]
大阪大学歯学部附属病院　医療情報室[2]
○山田　朋美[1]、野崎　一徳[2]、林　美加子[1]

Novel evaluation method of mastifactory function using bone conducted sound

Department of Restarative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry[1]
Division of Medical Information, Osaka University Dental Hospital[2]
○YAMADA Tomomi[1], NOZAKI　Kazunori[2] and HAYASHI　Mikako[1]

【研究背景および目的】

健康寿命の延伸に向けて、スローガン「噛ミング30（カミングサンマル）」（目安として一口30回噛む）が厚生労働省において提唱され、歯と口の健康を守り、食べ方を通した食育の重要性が高まっている。

我々は、これまでに「歯から伝わる骨導信号」に着目した研究をすすめ、歯の切削時に患者が知覚する骨導および気導切削音の同時計測や、周囲騒音に左右されない睡眠時の歯ぎしり音の評価システムを構築してきた。「食」を客観的にとらえるシステムができれば、咀嚼機能の解析や歯周病と関連のある糖尿病の改善や自発的な健康づくりに向けた行動変容を起こすことが期待できる。骨導計測を応用することで、歩数計や携帯型心電計のように、日常生活の「食リズム（食事中の咀嚼回数・リズム、噛む力、飲食の頻度や総時間）」をどこでも自動連続記録できる新たな測定法および評価システムの開発ができると考えている。本研究では、噛み応えの異なる食品を用いて骨導音計測による咀嚼回数および咀嚼リズムの判定の可能性を検証した。

【方法】

十分な説明による同意を得た被験者に超小型骨導センサを装着し、上下の歯のタッピング時および様々な硬さの食品の咀嚼時における歯から骨を介してセンサに伝わる骨導信号を多チャンネルデータレコーダ（Onosokki,DS2100）にて収録した。同時に被検者の前方20センチに設置したスマートフォン（Apple, iPhone X）にて被検者の気導音の録音を行った。得られた気導および骨導音データは PC 上の解析ソフトウエア（Onosokki, Oscope professional）にて音響処理および波形解析を行い、咀嚼および嚥下時の継時的な波形の特徴および変化量から咀嚼の頻度やリズムを評価した。

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科および大阪大学歯学部附属病院の倫理委員会にその研究目的ならびに方法について申請し事前に承認を得たうえで実施した（承諾番号：H29-E-38）。

【結果と考察】

せんべいなどの硬い食材の場合、噛みはじめは気導音中の咀嚼に伴う信号の確認は容易だが、嚥下前の食塊が軟らかい状態となると気導音に含まれる咀嚼信号の取得は困難となる。一方、骨導計測手法では嚥下直前までの咀嚼回数やリズム評価が可能であった。グミやマシュマロといった小さくやわらかい食材においては、噛みはじめから気導では音として知覚できずロの動きも小さくなるが、骨導信号では回数やリズムの評価が可能であった。食材が介在すると、上下の歯の接触のみであるタッピング音とは異なる音響特性が認められることがわかった。現在の咀嚼数をカウントするデバイスは主に顎の動きを計測するものであり大きく顎を動かさない場合の精度についての検討が必要であるが、骨導音計測手法ではごくわずかな顎の動きであっても咀嚼運動が確認できた。引き続き、幅広い「食」関連情報を取得できるデバイス開発にむけ研究をすすめる予定である。

本研究は、JSPS 科研費　挑戦的研究（萌芽）17K19907 の助成を受けて行ったものである。

口腔内細菌に対する新たな消毒法に関する基礎的研究
-大気を利用したプラズマ発生装置による口腔内消毒法の検討-

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座[1]，日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門[2]，日本大学歯学部細菌学講座[3]，日本大学歯学部総合歯学研究所生体防御部門[4]，神奈川歯科大学大学院口腔科学講座光歯科医学分野[5]，長田電機工業株式会社[6]
○平野 頼是[1]，林 誠[1,2]，田村 宗明[3,4]，吉野 文彦[5]，吉田 彩佳[5]，小林 慶美[1]，井比 陽奈[1]，増渕 光暁[6]，今井 健一[3,4]，小木曾 文内[1,2]

Preliminary study of new disinfection method for oral bacteria
-Study of the oral disinfection method by plasma device apparatus using the air-

Departments of Endodontics[1]， Division of Advanced Dental Treatment[2]，Departments of Microbiology[3] and Departments of Immunology and Pathobiology[4]，Dental Research Center， Nihon University School of Dentistry，Photomedical Dentistry Division，Department of Oral Science，Kanagawa Dental University Graduate School[5]，Osada Electric Co.,Ltd[6]
○Yoriyuki Hirano[1]，Makoto Hayashi[1,2]，Muneaki Tamura[3,4]，Fumihiko Yoshino[5]，Ayaka Yoshida[5]，Yoshimi Kobayashi[1]，Haruna Ibi[1]，Mitsuaki Masubuchi[6]，Kenichi Imai[3,4]，Bunnai Ogiso[1,2]

【研究目的】

代表的な口腔内疾患として，齲蝕，根尖性歯周炎，歯周病が挙げられ，これらの疾患の主な原因菌としては，齲蝕では *Streptococcus mutans*，根尖性歯周炎では *Entercoccus faecalis*，および歯周病では *Porphyromonas gingivalis* などが知られている。演者らは，本学会にて大気を利用したプラズマ発生装置より生成される活性酸素種（ROS）として一重項酸素（$^1O_2$）を検出し，難治性根尖性歯周炎の代表的な原因菌である *E. faecalis* に対して殺菌に効果があることを報告した。そこで本研究では，本プラズマ発生装置の照射条件を改善し，生成された $^1O_2$ による *S.mutans*，*E. faecalis*，*P. gingivalis* に対する殺菌効果について検討した。

【材料および方法】

1） プラズマ発生装置

プラズマ発生装置として，従来のプラズマ生成にはアルゴンガスやヘリウムガスなど，人体に影響のある気体を利用しており，臨床応用が困難であったが，長田電機工業株式会社が開発したプラズマ生成をより簡便に行い，臨床に応用できるよう大気を利用したプラズマ殺菌装置：OSADA PLADIS（長田電機工業社製，OP-1V，出力7.5kV）を使用した。

2） 活性酸素の測定

24 ウェルプレート内に生成する活性酸素を測定するためのスピントラップ剤として 100 μM 2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinl（4-Hydroxy TEMPO）：50 μl，蒸留水（DW）：50 μl，Phosphate buffered saline（PBS）：400 μl を混和し，その溶液表面よりプラズマ発生装置ハンドピース先端が 1，3，5mm 離れた位置で，それぞれプラズマ照射を 1，3，5，7 分間行ったものを $^1O_2$ 測定用試料とした。試料は電子スピン共鳴（ESR）法を用いて測定されたスピンアダクトから信号強度（signal intensity）を測定した。

3） プラズマ照射による口腔内病原菌に及ぼす影響

S.mutans ATCC 25175 株， *E. faecalis* JCM5803 株，*P. gingivalis* ATCC33277 株を供試し，菌懸濁液作成後，2）の条件下にてプラズマ照射を行い，菌液を希釈し *S.mutans* および *E. faecalis* を Brain Heart Infusion 寒天培地に，*P. gingivalis* を Brain Heart Infusion 寒天培地+hemin（5ppm）+menadione（0.5ppm）に塗抹培養後，colony forming unit（CFU）を測定した。

【結果および考察】

活性酸素測定の結果より $^1O_2$ がプラズマ照射時間依存的に検出され，溶液面からの距離が短いものほど有意に高い信号強度が認められた（$P>0.01$）。

プラズマ照射により *S.mutans* は照射時間 3 分で，*E. faecalis* は照射時間 7 分で，*P. gingivalis* は照射時間 1 分で高い殺菌効果が認められた。

【結論】

以上の結果から，プラズマ発生装置の使用により生成された $^1O_2$ により *S.mutans*，*E. faecalis*，*P. gingivalis* に対する殺菌効果を示したことから，同装置を用いた新たな口腔内消毒法への応用が示唆された。

血小板活性化因子(PAF)合成酵素 LPCAT2 阻害薬の難治性疼痛の発症と維持における役割

1)広島大学大学院医歯薬保健学研究科歯髄生物学，2)広島文化学園大学大学院看護学研究科薬理学
○本山　直世 1)，森田　克也 2)，永安　慎太郎 1)，平田-土屋 志津 1)，西藤　法子 1)，進藤　智 1)，
柴　秀樹 1)，土肥　敏博 2)

Role of spinal LPCAT2, an inducible PAF synthesis enzyme on development and maintenance on chronic pain in mice models

1)Dept. Dent. Sci. Bio. Endo., Hiroshima Univ. Inst. Biomed. & Health Sci., 2)Dept. Pharmacol., Hiroshima Bunka Gakuen Univ.
○Naoyo Motoyama1), Katsuya Morita2), Shintaro Nagayasu1), Shizu Hirata-Tsuchiya1), Noriko Saito1), Satoru Shindo1), Hideki Shiba1), Toshihiro Dohi2)

【緒言】

従来の NSAIDs をはじめとする鎮痛薬が奏功しない難治性疼痛に対して，新しい治療法・治療薬の開発が待たれている．血小板活性化因子(PAF)は，種々の組織で細胞外からの刺激に応答してアラキドン酸と同時に産生され，炎症・免疫系細胞の活性化や気管支収縮作用など多彩な生理・病態生理に関係するオータコイドとして注目されている．私達は，PAF が脊髄で痛みシグナル伝達の調節に重要な役割を果たしており，脊髄抑制性グリシン受容体(GlyR)α3 機能を抑制して，強力なアロディニアや痛覚過敏を引き起こすこと(Pain138(3):525-36,2008)，PAF 受容体阻害薬が神経障害性疼痛やがん性疼痛等原因の異なる様々な疼痛モデルで強力かつ長期間持続性の鎮痛効果を示すことを報告してきた(Eur J Pain 17:1156-67, 2013; PLoSOne 9(3):e91746, 2014)．近年，PAF 合成酵素(LPCAT)1 および 2 がクローニングされた．LPCAT1 は恒常的に発現して PAF の生理機能に関係しており，LPCAT2 は誘導型酵素で病態生理に機能する(Shindo et al., J Biol Chem, 2007)．PAF は免疫担当細胞やグリア細胞を活性化し，これらの細胞では PAF 受容体刺激により PAF が産生遊離されるという positive feedback loop が存在することも知られている．本研究では，難治性疼痛の発症と維持（難治化）における LPCAT2 の役割と LPCAT2 阻害薬の鎮痛作用について，様々な疼痛モデルマウスを用いにて検討した．

【方法】

ddY 系雄性マウスおよび C3H/HeN マウスを用い，各種実験的疼痛モデルを作成した．脊髄 LPCAT1 および LPCAT2 ノックウンは，特異的 siRNA の脊髄腔内投与による RNA 干渉により行った．LPCAT2 阻害薬 TSI-01 は脊髄腔内及び静脈内投与した．疼痛関連反応の評価は，ペイントブラシによる軽い触角刺激によるアロディニアスコアと von Frey hairs フィラメントによる足蹠刺激に対するマウス後足の逃避反射閾値によって行った．がん性疼痛はアロディニアスコアおよびアロディニア閾値，Guarding behavior（安静時に患肢を持ち上げる行動），および Limb-use abnormality（体動時に患肢を不自然に使う行動)によって評価した．

【結果および考察】

神経障害性疼痛モデル，がん性疼痛モデルにおいて LPCAT2 の持続した発現量の増加を認めた．LPCAT1 発現は変動しなかった．神経障害性疼痛モデルにおいて，脊髄 LPCAT2 及び PAF 受容体ノックダウンにより其々強力な鎮痛作用を示した．脊髄 LPCAT2，及び PAF 受容体ノックダウンマウスに神経障害を惹起しても観察期間(90 日間以上)を通して疼痛関連行動の消失を認めた．神経障害前或いは後の TSl-01 単回投与，PAF 受容体阻害薬(TCV-309)連続頻回投与によっても同様の鎮痛作用を認めた．これらの処置は慢性炎症性疼痛モデル，がん性疼痛モデル，抗がん剤誘発神経障害に伴う疼痛モデルにおいても同様の鎮痛効果を見出し，LPCAT2 阻害薬が鎮痛薬としてだけでなく，先行除痛のための重要な薬物となる可能性が示された．

加えて，PAF 脊髄腔内投与により長期間（２ヶ月以上）にわたるアロディニア応答を引き起こした．LPCAT2 ノックダウンや TSI-01 の前処置は PAF 誘発アロディニア応答の維持を消失させたが，アロディニア応答の発現には影響しない等，PAF が PAF 受容体を活性化してアロディニア（疼痛）の発症と LPCAT2 の誘導を介した持続した PAF 合成がアロディニア（疼痛）の維持（難治化）に重要な役割を果たすことを示唆する知見を得ている．

以上のことから，各種難治性疼痛の発症・維持に脊髄 LPCAT2 の発現誘導が重要な役割を果たすことが示唆された．LPCAT2 拮抗薬が様々な難治性疼痛に対して有効な新規鎮痛薬・治療法開発のシーズとなる可能性を明らかにした．

着色抑制紅茶に浸漬した歯の色調変化について
第二報 新規試作茶飲料の評価

[1]鶴見大学歯学部保存修復学講座 [2]キリン株式会社飲料技術研究所
○堀 彩香[1] 大森かをる[1] 工藤あずさ[2] 小川由佳[1]
鈴木深保子[2] 若林英行[2] 桃井保子[1] 山本雄嗣[1]

Study on tooth discoloration immersed in experimental stain-suppressive tea
Part 2 Evaluation of newly developed tea

[1]Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine
[2]Research Laboratories for Beverage Technologies, R&D Division, KIRIN Company, Limited
○HORI Ayaka[1], OHMORI Kaoru[1], KUDO Azusa[2], OGAWA Yuka[1], SUZUKI Mihoko[2]
WAKABAYASHI Hideyuki[2], MOMOI Yasuko[1], YAMAMOTO Takatsugu[1]

【目的】

演者らは，日本歯科保存学会 2017 年春季学術大会(第 146 回)において，着色を抑制するとされるコラーゲンを添加した試作茶飲料にウシ歯を浸漬し，その色調変化を通常茶飲料の場合と比較して，試作茶飲料が有意に着色を抑制したことを報告した．今回は，新たにコラーゲンの処方を変更した試作茶飲料と，コラーゲン無添加でメタリン酸ナトリウムを添加した試作茶飲料を調製し，前回と同様の評価を行った．

【材料と方法】

凍結保存したウシ前歯を室温で自然解凍し使用した．歯根を切断し根管口を封鎖したウシ歯の歯冠部唇面の着色を超音波スケーラーで除去した後，ペースト（メルサージュ，松風）とラバーカップで研磨し試料とした．この後，試料を Table 1 に示すコラーゲン添加試作茶飲料（EG）コラーゲン無添加試作茶飲料(EH)，通常茶飲料(Tea)および蒸留水(DW)に浸漬し 37℃で保管した．浸漬液は 3 日毎に交換した．測色は，分光色差計（SE2000，日本電色）と歯科用分光測色計（Crystaleye，オリンパス）を用い，浸漬前と浸漬 21 日後に各試料の中央部で行った．測定値から L*，a*，b*の差（⊿L*，⊿a*，⊿b*）および⊿E*ab（色差）を求め，各項目内で一元配置分散分析と Tukey の多重比較で統計処理した（α＝0.05，n＝5）．

Table 1 Solution tested in this study

	Component	Code	Tannin Conc. (mg/100g)	pH
Experimental tea-G	Darjeeling tea L-ascorbic acid Collagen	EG	40	6.29
Experimental tea-H	Darjeeling tea $(NaPO_3)_n$ L-ascorbic acid	EH	40	6.22
Tea	Darjeeling tea L-ascorbic acid	Tea	40	6.33
Distilled water	—	DW	—	—

Stain-suppressive tea and tea are produced by KIRIN Company.

【結果および考察】

結果を Table 2 に示す．EG と EH の⊿E*ab は，Tea に比べ統計的有意差は無かったが小さい傾向にあり，DW と有意差の無い値であった．一方，⊿L*，⊿a*，⊿b*は，EG，EH，DW で有意差はなく， Tea より有意に小さくなった．EH に添加したメタリン酸ナトリウムはキレート効果によりポリフェノールの着色を除去するとされ [1]，またコラーゲンはポリフェノールを吸着することにより着色抑制効果を発揮するとされているが，今回の結果では両者の着色抑制効果に相違は認められなかった．

Table 2 Color difference (⊿E*ab) in ⊿L*, ⊿a* and ⊿b* after 21-day immersion

	⊿E*ab	⊿L*	⊿a*	⊿b*
EG	4.31 (2.51)^{ab}	-0.11 (3.84)^{a}	1.21 (0.84)^{a}	2.62 (1.79)^{a}
EH	5.07 (4.08)^{ab}	-0.13 (2.27)^{a}	-0.07 (0.55)^{a}	4.10 (4.59)^{a}
Tea	18.58 (9.27)^{a}	-12.66 (5.33)^{b}	5.38 (3.08)^{b}	12.25 (7.40)^{b}
DW	2.32 (1.29)^{b}	0.94 (1.87)^{a}	0.60 (0.34)^{a}	-1.55 (1.12)^{a}

Means with the same alphabet are not statistically different (p>0.05).

【結論】

新たに試作した 2 種の施策茶飲料に浸漬したウシ歯の色調変化は，⊿L*，⊿a*，⊿b*おいて通常茶飲料より小さく，蒸留水と同等であったことから，2 種の試作茶飲料は着色抑制効果を有することが示された．

研究に関連し，COI を開示すべき企業は，キリン株式会社である．

【参考文献】

1) Porciani PF, Perra C, Grandini S.Effect on dental stain occurrence by chewing gum containing sodium tripolyphosphate -a double-blind six-week trial. J Clin Dent 2010; 21:4-7.

試作茶飲料の歯面への着色抑制効果
-二重盲検クロスオーバーによるランダム化比較試験-

[1]鶴見大学歯学部保存修復学講座 [2]キリン株式会社飲料技術研究所
○大森かをる[1] 工藤あずさ[2] 堀 彩香[1] 小川由佳[1] 内田一恵[1] 岩木達哉[1]
鈴木深保子[2] 中嶋桂子[2] 若林英行[2] 桃井保子[1] 山本雄嗣[1]

Efficacy of prototype tea beverage on suppressing tooth staining
-Randomized controlled trials with double blind crossover study-

[1]Department of Operative Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine
[2]Research Laboratories for Beverage Technologies, R&D Division, KIRIN Company, Limited
○OHMORI Kaoru[1], KUDO Azusa[2], HORI Ayaka[1], OGAWA Yuka[1], UCHIDA Ichie[1], IWAKI Tatsuya[1],
SUZUKI Mihoko[2], NAKASHIMA Keiko[2], WAKABAYASHI Hideyuki[2], MOMOI Yasuko[1], YAMAMOTO Takatsugu[1]

【目的】

ポリフェノール類を多く含む紅茶は歯の着色の原因の筆頭に挙げられている．演者らは，着色を抑制するとされるコラーゲンを含有する試作紅茶にウシ歯を浸漬し，その着色抑制効果を報告した（日本歯科保存学会 2017 年春季学術大会第 146 回）．今回は，ヒトを対象に二重盲検クロスオーバーによるランダム化比較試験で，試作茶飲料の着色抑制効果を検証した．

【材料と方法】

本研究は，鶴見大学歯学部倫理審査委員会承認のもとに実施された（承認番号：1526）．研究の対象者は，鶴見大学歯学部短期大学部歯科衛生科 1 年生で，研究の主旨に同意し事前の口腔内診査とアンケートにより選択基準に該当する 20 名を選抜した．検査時に歯面の状態に偏りがないよう対象者を 2 グループに分け，2 種類の茶飲料(500mL ペットボトル)を準備した.試作茶飲料（飲料 1）は，通常茶飲料（飲料 2）にウシ由来コラーゲン 1g を配合したものとした．対象は，上下顎前歯 12 本の唇面とした．第 1 期試験の開始前日，12 歯面をポリッシング後に口腔内写真撮影と歯科用分光測色計（Crystaleye，オリンパス）を用い歯面の測色を行った．対象者は，翌日より飲料 1 または飲料 2 を，1 日 1 本 3 週間摂取し，最終日に再び口腔内写真撮影と歯面の測色を行った．その後ポリッシングして第 1 期終了とし，47 日のウォッシュアウト期間を経て，第 2 期試験を同様に行った．ここでは，第 1 期と異なるもう一方の飲料を摂取させた．着色程度の評価は，試験前後の歯の色差（ΔE^*ab），明度差（ΔL^*），色相の差（Δa^*, Δb^*）の判定および 18 名の歯科医師による写真での肉眼判定とした．結果の分析は，クロスオーバーデザインの適切性を順序効果および時期効果として，試作茶飲料と通常茶飲料摂取時の比較を処置効果として，一般線形モデルを用いて解析した．分析には統計解析ソフト SPSS（IBM, 2010 Ver.22 for Windows)を使用した．

【結果および考察】

対象者 20 名のうち 4 名が除外対象となったため，最終的に 16 名を比較検討した．ΔE^*ab は，飲料 1 で 2.9±0.9，飲料 2 で 3.3±0.9 であり，飲料 1 が飲料 2 より低い値を示したが統計的有意差は認められなかった．ΔL^*は，飲料 1 が 1.6±1.0，飲料 2 が 2.2±0.9，で，飲料 1 が有意に低かった．Δa^*とΔb^*は，飲料 1 で-0.6±0.4，-1.5±0.8，飲料 2 で-0.9±0.3，-1.7±0.7 でありΔa^*には統計的有意差が認められた．肉眼判定では，飲料 1 の方で色差が小さいとした者が多かったが，統計的有意差は認められなかった．

【結論】

試作茶飲料(茶渋付着低減茶飲料)の着色抑制効果を，二重盲検クロスオーバーによるランダム化比較試験で通常茶飲料と比較検討した結果，3 週間の摂取では，色差ΔE^*abに統計的有意差は認められなかったが，明度差ΔL^*および色相の差Δa^*に統計的有意差が認められた．前報の *in vitro* 評価と同様に，ヒトを対象とした本試験において，コラーゲン含有試作茶飲料は，着色抑制効果を有することが示唆された．

本研究に関連し，COI を開示すべき企業は，キリン株式会社である．

ピロリドンカルボン酸を配合した新規歯磨剤の根面う蝕抑制効果に関する研究

[1]鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科保存学分野
[2]東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再建工学分野
[3]東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科う蝕制御学分野
○星加知宏[1]，池田正臣[2]，髙　裕子[1]，西谷登美子[1]，勝俣　環[1]，永山祥子[1]，勝俣愛一郎[1]，保坂啓一[3]，田上順次[3]，西谷佳浩[1]

Study on the effect of suppressing root caries on new dentifrice formulated with pyrrolidone carboxylic acid

[1]Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
[2]Oral Prosthetic Engineering, Graduate School Tokyo Medical and Dental University
[3]Department of Cariology and Operative Dentistry, Graduate School Tokyo Medical and Dental University
○HOSHIKA Tomohiro[1], IKEDA Masaomi[2], TAKASHI Yuko[1], NISHITANI Tomiko[1], KATSUMATA Tamaki[1], NAGAYAMA Shoko[1], KATSUMATA Aiichiro[1], HOSAKA Keiichi[3], TAGAMI Junji[3], NISHITANI Yoshihiro

【研究目的】我が国では 2010 年に超高齢社会を迎え，MI の概念の普及，口腔衛生状態の向上により若年者でのう蝕の減少，高齢者の残存歯数の増加が認められている．その一方で高齢者の根面う蝕の増加が問題となっている．歯肉退縮によって露出した根面象牙質う蝕ではハイドロキシアパタイトの脱灰のみならず象牙質コラーゲンの細菌由来コラゲナーゼによる分解が生じている．本研究では，従来のフッ化物配合歯磨剤に象牙質コラーゲンへ影響するピロリドンカルボン酸（PCA）を配合した新規歯磨剤 Check-Up rootcare(ライオン株式会社)の効果について，従来型歯磨剤 Check-Up standard（ライオン株式会社）と比較し検討を行った．

【材料及び方法】

鹿児島大学病院保存科外来を受診した初期の根面齲蝕を有する患者で，本研究への参加に同意を得られた被験者 20 名に対し，鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認（＃27-244）のもと，次の研究を行った．被験者の口腔清掃具の種類、使用回数，歯磨剤の使用量，嗜好品の有無を聞き取り調査し，う蝕をダイアグノデント（カボデンタルシステムズジャパン株式会社）にて測定したのち，PCA を配合した新規歯磨剤か PCA 無配合の従来型歯磨剤を被験者に無作為に割り当て、提供した．その後，歯磨剤使用 3 か月後に再度ダイアグノデントの値を測定した．口腔清掃の回数，歯磨剤の使用量，洗口剤使用の有無，嗜好品の有無，PCA 配合の有無によるダイアグノデント値の経時的な変化については t-test および Paired t-test を用いて危険率 5%にて検定した．また，口腔清掃の回数，歯磨剤の使用量，洗口剤使用の有無，嗜好品の有無と PCA 配合歯磨剤を使用した被験者数に偏りがないかを確認するため、Chi-square test を用いて，危険率 5%にて検定した．

【結果】

口腔清掃の回数，歯磨剤の使用量，洗口剤使用の有無，嗜好品の有無の各群間の 3 か月後のダイアグノデント値に有意差は認められなかった（$p>0.05$）．PCA 配合の有無では，歯磨剤使用前の群間のダイアグノデント値に有意差は認められなかったが，歯磨剤使用 3 か月後では，PCA 配合群は PCA 無配合群に比べ，有意に低いダイアグノデント値を示した（$p<0.05$）．また，歯磨剤使用前後間のダイアグノデント値には有意差は認められなかった（$p>0.05$）．一方，口腔清掃の回数，歯磨剤の使用量，洗口剤使用の有無，嗜好品の有無と PCA 配合歯磨剤を使用した被験者数には有意な偏りは認められなかった（$p>0.05$）．

【考察および結論】

歯磨剤使用 3 か月後，PCA 配合群のダイアグノデント値は，約 12.6 であり，PCA 無配合群の約 17.3 に比べ，有意に低い値を示した．これは，PCA 配合群と PCA 無配合群ともに，歯磨剤使用前後間のダイアグノデント値に有意差は認められなかったことから，PCA 配合の歯磨剤使用群では，ダイアグノデント値の上昇を抑制したことが原因と考えられる．

PCA 配合の有無によるダイアグノデント値

	PCA無配合	PCA配合
歯磨剤使用前	14.3±3.9	11.7±4.8
歯磨剤使用3か月後	17.3±5.0[a]	12.6±4.6[a]

平均値±標準偏差，同じ英小文字は有意差有を示す（$p<0.05$）

塩化セチルピリジニウムで処理したハイドロキシアパタイト上の *Streptococcus mutans* バイオフィルムの経時的観察

[1]サンスター株式会社 オーラルケア研究開発部、[2]筑波大学 生命環境科学研究科、[3]筑波大学 生命環境系
○秋山智寛[1]、山口依里香[1]、犬伏順也[1]、武藤真輝[2]、尾花望[3]、野村暢彦[3]

Temporal observation of *Streptococcus mutans* biofilm on hydroxyapatite treated with cetylpyridinium chloride

[1]Sunstar Inc. [2]Graduate school of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
[3]Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba
○TOMOHIRO AKIYAMA[1], ERIKA YAMAGUCHI[1], JUNYA INUBUSHI[1], NAOKI MUTO[2], NOZOMU OBANA[3], NOBUHIKO NOMURA[3]

【緒言】

歯周病やう蝕を予防する手段の一つとして、塩化セチルピリジニウム（CPC）を配合した液体製剤が使用されている。CPC はカチオン性の殺菌剤であり、殺菌力に優れ、且つ、歯の主成分であるハイドロキシアパタイト（HA）に静電的に滞留する性質を有している。そのため、早期から液体製剤に配合され、これまでに臨床的なプラーク付着抑制効果も報告されている。しかしながら、CPC が滞留した HA 上におけるバイオフィルム（BF）の形成抑制の過程を詳細に解析した報告は少ない。そこで、本研究では、HA ディスク上の CPC の滞留の有無が、BF の 3 次元構造形成に及ぼす影響を共焦点レーザー顕微鏡法（CLSM）と反射光顕微鏡法（CRM）（引用 1）により非破壊的に経時観察することを目的とした。比較薬剤として、CPC 以外の殺菌剤や殺菌剤配合の液体製剤 6 種についても同様に検証を行った。

【材料と方法】

（実験１：BF 形成過程の観察）供試菌として、赤色蛍光タンパク質（RFP）ラベルした *Streptococcus mutans* UA159（*S.m.*）株を用いた。培地は前培養には Brain Heart Infusion（BHI）培地、BF 形成には 5%スクロース添加 BHI 培地を用いた。ペリクル形成用の唾液は、滅菌無刺激唾液（9 名の健康者から採取）を用いた。供試薬剤として、殺菌剤：CPC、イソプロピルメチルフェノール（IPMP）、チモール、殺菌剤配合の液体製剤：A、B、C（CPC 配合、それぞれ異なる製剤）、D（チモール配合）、E（IPMP 配合）、F（グルコン酸クロルヘキシジン配合）を用いた。対照として蒸留水を用いた。6 穴プレートの底面に HA ディスクを設置し、唾液処理によりペリクルを形成させた。蒸留水で HA ディスクを洗浄後、供試薬剤を 1 分間処理した。その後、蒸留水で HA ディスクを洗浄し、*S.m.*の培養液（OD_{600}=0.01）を添加し、37℃、好気条件で培養した。BF 形成過程の観察は、殺菌剤処理群は顕微鏡により培養開始から 10 分間隔で 8 時間撮影した。液体製剤処理群は、8 時間後に Syto9/PI 蛍光染色を行い、生菌および死菌を顕微鏡により観察した。

（実験２：BF 形成量の測定）実験 1 と同様に BF 形成を行った。培養後の HA ディスクを 1N NaOH に入れ、付着した BF を分散溶解した。OD_{540} 値を測定し、HA ディスク上の BF 形成量とした。

【結果】

蒸留水、チモール、IPMP で処理した HA 表面上では、培養開始直後から速やかに BF の形成が認められた。一方、CPC 処理した HA ディスク表面上では、8 時間の培養後においては、所々菌の付着が認められたものの、菌の付着していない HA ディスク表面が多く観察された。液体製剤処理群の中で、CPC の配合された 3 製剤のうち、2 製剤は BF の形成抑制効果が認められた。

【考察】

CPC の BF 形成抑制効果は、その正電荷により HA ディスクに滞留することで発揮されたと考える。一方、電荷を持たないチモールまたは IPMP は、HA ディスクに滞留することができないため、BF の形成が認められたと考える。また、CPC の配合された 3 製品の BF 形成抑制効果の違いは、CPC 以外の添加物の影響により処方中の CPC の活性が阻害されたために生じた可能性がある。

【結論】

CPC で処理した HA ディスク上の BF 形成抑制過程の観察に成功し、CPC の臨床的効果を支持する結果を得た。

【引用】

1. Y. Yawata, K. Toda, E. Setoyama, : *J. Biosci. Bioeng.*, 110, 377(2010)

ナノバブルの辺縁性歯周炎治療への応用

[1]国立長寿医療研究センター　幹細胞再生医療研究部
[2]国立長寿医療研究センター　口腔疾患研究部
○庵原　耕一郎[1]、松下　健二[2]、中島　美砂子[1]

Potential Utility of Nanobubbles for Marginal Periodontitis

[1]Department of Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology
[2]Department of Oral Disease, National Center for Geriatrics and Gerontology
○Koichiro Iohara[1], Kenji Matsushita[2], Misako Nakashima[1]

【目的】

口腔ケアは虫歯や歯周病の予防による歯の健康維持のみならず、超高齢社会において、口腔内細菌や毒素による誤嚥性肺炎、認知症、心筋梗塞、脳梗塞等の防止など、口腔から全身に及ぶ様々な感染症の予防に重要と考えられている。その一方で、歯科医師、歯科衛生士による口腔清掃指導は、歯ブラシでの物理的プラーク除去を主としている。しかしながら、実際、高齢者や介護者が長時間、物理的ブラッシングを行うことは難しい。また、年齢とともに、歯周ポケットが深くなり、歯と歯の間の隙間が大きくなり、また歯頚部にも虫歯ができるため、通常のブラッシングでは除去できないプラークが堆積し慢性炎症を引き起こす原因となりうる。私共は、抗生剤とナノバブルを併用して、薬剤を象牙細管内に深く浸透させる「ナノバブル薬剤導入法」を開発し、根管内を短時間に無菌化できる可能性を明らかにした(第 142 回本学会)。 ナノバブルは薬剤の浸透度を高める効果が高いため、通常治療できない部位まで殺菌できる。よって、本研究では、まず *in vitro* でナノバブルの歯周病原因細菌のバイオフィルムに対する効果を検討後、イヌ *in vivo* の歯周ポケット内細菌への効果を検討した。

【材料と方法】

1. *in vitro* 歯周病モデルとして、*Porphyromonas gingivalis* の培養液にハイドロキシアパタイトディスクを浸漬し、48 時間培養してバイオフィルムを形成した。その後、ナノバブルを 10 分間作用させ、その除去効果を走査電子顕微鏡（Keyence:VE9800）にて観察した。また、ナノバブルに薬剤（コンクールあるいは塩化ベンザルコニウム）を併用した場合の除去効果も観察した。また、48 well 細胞培養プレートにて *Porphyromonas gingivalis* を 6 日間培養し、バイオフィルムを形成させた。これにナノバブル、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンザルコニウム（ナノバブル希釈）を５分間作用させた。作用後、Live/Dead BacLight Bacterial Viability Kits component (Invitrogen)にて染色し、蛍光顕微鏡（Keyence:VE7000）にて観察した。

2. 高齢ビーグル犬の歯のポケット深部 3 か所のプラークをペーパーポイントで採取し、その細菌数を測定した。次に塩化ベンザルコニウム入り Hydroxypropyl Cellulose（HPC）ゲル、塩化ベンザルコニウム HPC ゲル（ナノバブル希釈）を歯周ポケットに注入し、24 時間後に細菌数を測定した。

【結果】

in vitro において、ナノバブルの歯周病治療への応用を検討したところ、歯周病の原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に対してコンクールは歯周病菌に対して除菌する効果はあったがナノバブルによりその効果は促進されなかった。一方、塩化ベンザルコニウムは歯周病菌に対してナノバブルの除菌促進効果が見られた。また、*in vivo* イヌ歯周病モデルにおいて塩化ベンザルコニウム含有ゲルおよび塩化ベンザルコニウム含有ゲルナノバブルを歯周ポケットに注入するとナノバブルを含有させた方がより細菌数の減少がみられた。

【結論および考察】

これらの結果により、塩化ベンザルコニウム含有ナノバブルは歯周病に応用できる可能性が示唆された。今後、この研究を非臨床研究および臨床研究へと続けていくことで、通常の塗布やうがいでは届きにくい、中高齢者の複雑な形態の歯や修復物の間や縁下の歯周ポケット、インプラント周囲組織までも薬効成分が到達できる含嗽材の開発が期待できる。また *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原因菌が血管内に入ると心臓や大動脈、静脈などで血栓ができやすくなり、心臓病や脳梗塞のリスクが高まる。本研究により、歯周病による抜歯や口腔内細菌による全身的感染症を防止する中高齢者の効率的な治療が開発できる可能性が示唆された。

歯周基本治療時のアロマテラピーが若年成人の自律神経活動に及ぼす影響

[1]北海道大学大学院歯学研究院口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室
[2]医療社団法人北楡会札幌北ビル歯科クリニック
○竹生寛恵[1]，下地伸司[1]，川浪雅光[2]，菅谷　勉[1]

Effect of Aromatherapy during Initial Periodontal Therapy on autonomaic nervous activity in Healthy Young Adults

[1]Department of Periodontology and Endodontology, Division of Oral Health Science, Hokkaido University Faculty of Dental Medicine
[2]Medical Corporation Hokuyukai Sapporo Kita Biru Dental Clinic
○Hiroe TAKEFU[1], Shinji SHIMOJI[1], Masamitsu KAWANAMI[2], Tsutomu SUGAYA[1]

【目的】

歯科治療に対して恐怖心や不安感を有している患者は多く，それらを軽減させることは，安心・安全な歯科治療を行うために重要である．そのための簡便な精神鎮静法の一つとしてアロマテラピーがあるが，歯科領域ではまだ十分には検討されていない．本研究の目的は，健全な若年成人に対して歯周ポケット検査および超音波スケーラーを用いたスケーリングを行った際の自律神経活動の変化に対するアロマテラピーの効果について，自律神経活動モニターシステムを用いて評価することである．

【対象と方法】

被験者は健全な若年成人ボランティア 15 名(北海道大学病院所属の歯科医師,男性 10 名,女性 5 名,平均年齢 26.1±1.1 歳）とした．本研究は北海道大学大学院歯学研究院臨床・疫学研究倫理委員会の承認を得ており（承認番号 2016 第 4 号），被験者には本研究の目的およびその内容を十分に説明し，同意の下で行った．同一被験者に対して精神鎮静法を行わない非精神鎮静群，アロマテラピーを行うアロマテラピー群，音楽鎮静法を行う音楽鎮静群，アロマテラピーと音楽鎮静法の両方を行う併用群の 4 群を設けた．4 群を行う順序は，中央割付法でランダム化して決定した．

最初に，質問票（DAS）を用いて歯科治療に対する恐怖心を評価した．次に 4 群とも安静状態（3 分間）を保った後に，処置前座位（3 分間），処置前仰臥位（3 分間），歯周ポケット検査（3 分間），スケーリング（5 分間）および処置後仰臥位（3 分間）を順に行い，その際の血圧，心拍数および自律神経活動を評価した．精神鎮静法を行った 3 群では安静状態から処置終了まで精神鎮静法を施行した．また，処置前後の不安感について VAS による評価を行った．自律神経活動は，心電図の R-R 間隔を高周波成分（HF）と低周波成分（LF）に周波数解析することで，交感神経活動（LF/HF）を評価した．

【結果と考察】

血圧，心拍数および VAS は，各処置段階で 4 群間に有意差は認められなかったが，LF/HF は非精神鎮静群で歯周ポケット検査時およびスケーリング時に処置前座位時より有意に低い値を示した．一方，アロマテラピー群，音楽鎮静群，併用群の 3 群は処置前座位時および仰臥位時で非精神鎮静群に比べて有意に低い値を示し，3 群間に有意差はなかったことから，アロマテラピーは音楽鎮静法と同程度に歯周基本治療開始前の恐怖心や不安感を軽減することができたが，アロマテラピーと音楽鎮静法を併用してもさらに効果を高めることはできないと考えられた．

【結論】

アロマテラピーは歯周ポケット検査および超音波スケーラーを用いたスケーリング前の座位時において交感神経活動を低下させるのに有効であった．