

## μCT を用いた日本人上顎中切歯における根管形態の微細構造学的研究

東京歯科大学歯内療法学講座<sup>1)</sup>、鶴見大学解剖学講座<sup>2)</sup>、  
東京歯科大学解剖学講座<sup>3)</sup>、東京歯科大学組織・発生学講座<sup>4)</sup>

○山田 雅司<sup>1)</sup>、藤井理絵<sup>1)</sup>、田宮 資己<sup>1)</sup>、岩澤 弘樹<sup>1)</sup>、倉持仁<sup>1)</sup>、番場 桃子<sup>1)</sup>、塩崎 一成<sup>2)</sup>、  
松永 智<sup>3)</sup>、笠原 典夫<sup>4)</sup>

**Microstructural study of root canal morphology in Japanese maxillary central incisors using μCT**

Department of Endodontics, Tokyo Dental College<sup>1)</sup>,

Department of Anatomy, School of Dental Medicine, Tsurumi University<sup>2)</sup>,

Department of Anatomy, Tokyo Dental College<sup>3)</sup>,

Department of Histology & Developmental Biology Tokyo Dental College<sup>4)</sup>

○Masashi Yamada<sup>1)</sup>, Rie Fujii<sup>1)</sup>, Yoshiki Tamiya<sup>1)</sup>, Hiroki Iwasawa<sup>1)</sup>, Jin Kuramochi<sup>1)</sup>, Momoko Bamba<sup>1)</sup>,  
Kazunari Shiozaki<sup>2)</sup>, Satoru Matsunaga<sup>3)</sup>, Norio Kasahara<sup>4)</sup>

【緒 言】上顎前歯は様々な要因から、根管治療が必要とされることの多い歯種である。単根管が多いため単純な形態と捉えられがちだが、副根管が存在し複雑な根管系を有することも報告されている。しかし日本人の根管系に関する報告は少なく、いまだ不明な点が多い。本研究では、超高撮像分解能を有する μCT を用いて上顎中切歯の三次元形態を網羅的に把握した上で、Vertucci の分類を用いた日本人上顎中切歯の根管形態を分類し、その発生頻度について明らかにすることを目的とした。

【方 法】試料として、東京歯科大学解剖学講座所蔵の日本人上顎中切歯を 50 本用いた。本研究は東京歯科大学倫理委員会の承認を得て実施した（東京歯科大学倫理審査委員会 承認番号 924）。μCT (Scanco Medical, Brüttisellen Switzerland) にて撮像後、画像分析ソフトウェア (TRI/3D-BON; RATOC System Engineering Co., Tokyo, Japan) を用いて、上顎中切歯の三次元立体構築および主根管と副根管の観察を行った。スライス画像と立体構築像を用いて、上顎中切歯の根管形態を Vertucci 分類で分類し、分類した形態の発生頻度と、副根管の発生頻度を算出し、副根管の発生部位を調査した。また、設定したスライス面で根管形態を観察し、形態的特徴を調査した。

【結 果】形態分類は全て Type I であった (100%)。副根管は非常に多くの試料で観察された (66%)。特に根尖側で多く認め (24.4%)、歯根中央と根尖側 1/3 など複数の部位で認められることも多かった (27.3%)。根管断面の観察の結果は、根管上部のスライス面では円形や三角形など多様な形態を呈していたが、根尖側付近のスライス面では円形や楕円形を呈していることが観察された。

【考 察】過去に報告があった日本人に関する上顎中切歯のデータと比較して、非常に多くの副根管が観察された。これは、μCT が、古典的な透明歯牙標本を用いた研究と比較して、副根管の細微さから検出率に差異が生じたためと考えられた。根管形態に関しては、根管上部は多様な形態を呈しているため、手術用顕微鏡を用いて、確実に視認しながら拡大を行う必要があると考えられた。根尖付近の根管形態は楕円形を呈することもあるが、視認が難しく、副根管が存在することも多いため、化学的清掃が十分に行える大きさに拡大する必要があると考えられた。

【結 論】日本人上顎中切歯の主根管の根管形態は全て単根単根管だが、根管上部の断面形態は様々な形態を呈していた。しかし、根管中央部から根尖の副根管の存在が多いため、根管治療時は化学的清掃が十分に行えるように、根尖部の拡大を考慮すべきであると示唆された。

### 歯根膜における 5 型コラーゲンの組織学的解析

新潟大学大学院医歯学総合研究科 う蝕学分野

○井田貴子, 大倉直人, Gomez Kasimoto Susan Kiara, Rosa Baldeon-Gutierrez,  
枝並直樹, 竹中彰治, 野杵由一郎

#### Histological characteristics of type V collagen in periodontal ligament tissue

Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

○Takako Ida, Naoto Ohkura, Gomez Kasimoto Susan Kiara, Rosa Baldeon-Gutierrez,  
Naoki Edanami, Shoji Takenaka, and Yuichiro Noiri

#### 【目的】

細胞外基質を構成する主要な分子であるコラーゲンは、多様な生命現象を支えており、古くから研究が行われてきた。線維型マイナーコラーゲンの一種である 5 型コラーゲン(Col5a1)は、コラーゲンの豊富な結合組織において 1 型コラーゲンなどと協同して構造維持に寄与する。特に、歯根膜は発生由来が異なることから、それらの生物学的性質が異なると予想される細胞が複数存在するため、機能解析を困難にしている。5 型コラーゲンは、歯根膜組織においても存在することが報告されているが<sup>1)</sup>、その機能については未だ不明な点が多い。我々は、これまでに歯根膜細胞を用いた *in vitro* 試験にて、Col5a1 が骨分化および線維形成に与える影響を解析してきた(第 157 回秋季学術大会にてポスター発表)。本研究では、ラット歯根膜組織における 5 型コラーゲンの局在解析を基に、歯根膜組織における Col5a1 の組織学的特性を明らかにすることを目的とした。

#### 【材料および方法】

8 週齢雄性 Wistar 系ラット (n=5) を屠殺後、4%PFA にて灌流固定を行い、上顎骨を摘出し、脱灰パラフィン包埋組織標本を作製した。上顎第一臼歯を観察領域とし、Col5a1 の局在について、3,3'-Diaminobenzidine (DAB) による酵素抗体法による免疫染色を行った。染色後、光学顕微鏡で 10 倍および 20 倍にて観察し、免疫陽性反応の細胞数の比較を根分岐部および根中央部に対して行った。また、細胞特性を明らかにするために、Col5a1 と上皮マーカー (keratinocyte) および間葉マーカー ( $\alpha$  SMA) をそれぞれ合わせた蛍光免疫二重染色法による解析を行った。蛍光顕微鏡で 10 倍および 20 倍にて観察し、共発現細胞数を算出した。統計解析は student's t-test (有意水準 5%) を用いた。なお、本研究は新潟大学動物倫理委員会の承認を得て行った(承認番号 SA00725)。

#### 【結果と考察】

Col5a1 の局在解析では、根中央部と比較して根分岐部において、象牙質表面に近接して島状の陽性細胞群が有意に多く観察された ( $p < 0.0001$ )。Col5a1 と keratinocyte および  $\alpha$  SMA による蛍光免疫二重染色では、根分岐部において Col5a1 と keratinocyte の二重陽性反応が有意に多く認められた一方で ( $p < 0.01$ )、根分岐部および根中央部ともに Col5a1 と  $\alpha$  SMA との二重陽性反応がほとんど認められなかった。これらの結果から、Col5a1 陽性細胞は上皮の性質を持っていると考えられ、その形態からマラッセの上皮遺残である可能性が示された。Col5a1 がマラッセの上皮遺残に発現する意義としては、1 型コラーゲンと協調して歯根成長に寄与する可能性や上皮間葉転換の制御に寄与する可能性が考えられる。

#### 【結論】

歯根膜組織において、5 型コラーゲン陽性細胞の分布傾向は部位によって異なっていた。特に、根分岐部に限局的に存在しており、かつ島状の形態を呈していることから、マラッセの上皮遺残であることが示唆された。

#### 【謝辞】

本研究は JSPS 科研費 20K18595 および 22K09997 の助成を受けて行った。

なお、本研究に関して開示すべき利益相反関係にある企業などはない。

#### 【参考文献】

1) D. M. Hudson *et al.*, J. Periodontal Res., 2017

## EBV LMP-1 は歯根肉芽腫における IL-6 の発現誘導に関与する

日本大学歯学部歯科保存学第II講座<sup>1</sup>, 日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門<sup>2</sup>

○宮田泰伎<sup>1</sup>, 新井智美<sup>1</sup>, 鬼澤彩香<sup>1</sup>, 鶴岡梨奈<sup>1</sup>, 鈴木裕介<sup>1,2</sup>, 武市 収<sup>1,2</sup>

### EBV LMP-1 in Periapical granulomas is involved in the production of IL-6

Department of Endodontics<sup>1</sup>, Division of Advanced Dental Treatment<sup>2</sup>, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

○Taiki Miyata<sup>1</sup>, Tomomi Arai<sup>1</sup>, Ayaka Onizawa<sup>1</sup>, Rina Tsuruoka<sup>1</sup>, Yusuke Suzuki<sup>1,2</sup>, Osamu Takeichi<sup>1,2</sup>

#### 【背景および目的】

Epstein-Barr virus (EBV) は、世界人口の 90%以上に感染しているヒトヘルペスウイルスで、悪性腫瘍や自己免疫疾患への関与だけではなく根尖性歯周炎や慢性歯周炎への関与も報告されている。EBV は B 細胞に潜伏感染後、潜伏感染を維持する LMP-1 タンパクや再活性化時に発現する ZEBRA タンパクや BZLF-1 遺伝子などを発現する。LMP-1 は潜伏期に高頻度に発現するが、溶解時にも発現するという報告がされている。演者らは、歯根肉芽腫中において炎症性サイトカインと ZEBRA タンパクや BZLF-1 遺伝子の相関性について明らかにし、再活性化した EBV がサイトカインの発現を誘発する可能性について本学会学術大会にて報告してきた。しかし、EBV がどのように根尖性歯周炎の発症と進行に関与しているかは明らかにされていない。そこで本研究では、EBV LMP-1 と炎症性サイトカインである IL-6 の関係性を検討するために、採取した歯根肉芽腫を試料とし、病理組織学、免疫組織化学的および分子生物学的に検索することを企図した。なお、本研究は日本大学歯学部倫理委員会（倫許 EP21D012）の承認に基づいて実施された。

#### 【材料および方法】

1. 供試試料の採取：口腔内診査およびエックス線診査に基づいて、慢性根尖性歯周炎と診断された患者のうち、根尖切除または抜歯が適応とされた患者から摘出された根尖病変を供試した。同様に水平埋伏智歯の抜去時に採取した健全歯肉組織をコントロールとして用いた。なお、被験者には採取した組織を本研究に使用することを説明し、文書にて同意を得た。採取した組織は速やかに二分割し、一方は 10%ホルマリンを用いて 24 時間固定後、パラフィン包埋を行った。もう一方は OCT-compound (Tissue-TEK) に包埋後、液体窒素を用いて凍結保存した。
2. 病理組織学的検索：パラフィン薄切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を用いて病理組織学的検索を行い、歯根肉芽腫と診断した組織を以降の実験に供試した。
3. 免疫組織化学的検索：パラフィン薄切片を使用し、B 細胞による LMP-1 および IL-6 発現の局所を検索するため、蛍光二重免疫染色法を行った。
4. 分子生物学的検索：凍結した試料から total RNA を抽出し相補的 DNA を作製後、Real-time PCR 法を用いて LMP-1 および IL-6 の遺伝子発現量を検索した。また Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いてサンプル間の標準化を行った。
5. 統計学的分析：Real-time PCR 法で得られた LMP-1 と IL-6 発現量についてピアソンの相関係数を用いた統計分析を行い、有意水準 0.05 にて相関性の検討を行った。

#### 【結果】

1. 病理組織学的検索では 45 サンプル中、40 サンプルが歯根肉芽腫であった。
2. 免疫組織化学的検索の結果、歯根肉芽腫中の炎症細胞に LMP-1 と IL-6 の共発現を認めた。一方、健全歯肉中の細胞では発現は認められなかった。
3. 分子生物学的検索および統計学的分析の結果、LMP-1 と IL-6 遺伝子発現に有意な相関関係がみられた。

#### 【考察】

本研究により、EBV LMP-1 は歯根肉芽腫における IL-6 発現の誘導に関与する可能性が示唆された。

## フィブリンゲルによる M2 マクロファージ誘導を介した骨再生の解析

<sup>1</sup>九州歯科大学口腔機能学講座口腔保存治療学分野

<sup>2</sup>京都大学大学院医学研究科 形成外科学 細胞バイオテクノロジーグループ

○相原良亮<sup>1</sup>, 鷲尾絢子<sup>1</sup>, 田畑泰彦<sup>2</sup>, 北村知昭<sup>1</sup>

### Analysis of Bone Regeneration via the Induction of M2-Macrophage by Fibrin Hydrogel

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

<sup>2</sup> Cell Biotechnology Group, Department of Plastic and Reconstructive Surgery,  
Graduate School of Medicine, Kyoto University

○AIHARA Ryosuke<sup>1</sup>, WASHIO Ayako<sup>1</sup>, TABATA Yasuhiko<sup>2</sup>, KITAMURA Chiaki<sup>1</sup>

#### 【目的】

根尖性歯周炎などで生じた骨吸収は一般的には適切な歯内療法で治癒するが、炎症応答・免疫応答が亢進し骨吸収がクリティカルサイズ (直径 10 mm) を超えると癒痕化し骨組織が元に戻らない。これまで、根尖歯周組織骨欠損部の再生誘導を目的として各種細胞の足場となる再生医用材料の応用が注目されてきた。一方、組織再生において炎症の制御は不可欠であることが知られている。骨欠損が生じている局所を炎症応答が亢進しているステージから組織再生可能なステージへと移行させなければ、再生医用材料を欠損部局所に埋入しても組織は再生されない。近年、組織再生におけるフィブリンゲルの役割に関する研究が行われており、フィブリンゲルは炎症応答において急性炎症を惹起させる M1 マクロファージ優位の状態から組織再生に重要な役割を果たしているとされる M2 マクロファージ優位の状態に誘導されることが報告されている。本研究の最終目標は、再生医用材料を適確に機能させるため、フィブリンゲルが M2 マクロファージを誘導するメカニズムを解析し、根尖歯周組織骨欠損部における炎症優位な状態から組織再生可能な状態に局所環境を転換する方法を確立することである。今回、フィブリンゲルがラット頭蓋冠における骨再生に及ぼす影響と未分化マクロファージの分化能への影響を検証するとともに、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を実施した。

#### 【材料と方法】

<in vivo 実験系>10 週齢の F344 雄ラットの頭蓋冠矢状縫合を中心とした両側に直径 5 mm の円状骨欠損をトレフィンバーにて作製した (ラット頭蓋冠骨欠損モデル)。骨欠損部位にフィブリンゲルを埋入した部位を埋入側、何も埋入しない部位を未処置側とした。施術から 11 週間後にラットを安楽死させ、頭蓋冠を回収後、軟エックス線撮影にて骨欠損の再生程度を撮影し、Image J を用いて測定・比較を行なった。また当該部位の HE 染色にて骨再生の程度を計測・比較を行った (九州歯科大学動物実験委員会許可 No. 21-21)。<in vitro 実験系>8 週齢マウス骨髄細胞から分化させた未分化マクロファージをフィブリンゲルと共培養し、マクロファージにおける遺伝子発現状態を RNA-seq にて解析した (九州歯科大学動物実験委員会許可 No. 22-007)。

#### 【結果】

ラット頭蓋冠骨欠損モデルにおいて、フィブリンゲル埋入側が未処置側より骨再生が促進されているのが認められた。軟エックス線写真撮影での計測では、フィブリンゲル埋入側で骨再生 (面積) が有意に促進 (約 1.3 倍) されており、同様に HE 染色でも再生した骨の長さがフィブリンゲル埋入側で有意に増加 (約 2 倍) していた。また、フィブリンゲルと共培養した未分化マクロファージの RNA-seq 解析では、コントロール群と比較して様々な遺伝子群の変化が見られた。

#### 【考察】

本研究では、フィブリンゲルは未分化マクロファージを M2 型に分化させ、ラット頭蓋冠骨欠損モデルにおける骨欠損部の創傷治癒を促進することが明らかとなった。以上の結果は、根尖歯周組織骨欠損部において、フィブリンゲルが炎症応答亢進ステージから組織再生ステージへと移行させ骨再生を誘導する可能性を示唆している。

#### 【結論】

フィブリンゲルは未分化マクロファージを M2 型に分化させ、ラット頭蓋冠骨欠損部の創傷治癒を促進する。

## 歯髄血管再生療法 (pulp revascularization) の治癒過程におけるレプチン受容体 発現細胞の局在

東京歯科大学保存修復学講座

○羽毛田 真佑花, 五十嵐 章智, 田代 憲太郎, 村松 敬

### Localization of leptin receptor expressing cells during the healing process of pulp revascularization

Department of Operative Dentistry, Cariology and Pulp Biology, Tokyo Dental College

○HAKETA Mayuka, IKARASHI Takatoshi, TASHIRO Kentaro, MURAMATSU Takashi

#### 【緒言】

根未完成失活歯の根管治療として、従来アペキシフィケーションが行われてきた。しかし、根管の菲薄化と歯根成長の停止が欠点として報告されている。近年では、これらの欠点を克服した歯髄血管再生療法 (pulp revascularization) が注目されている。我々はこれまでに歯髄血管再生療法モデルマウスを作製し、詳細な治癒過程を検討してきた。その結果、根尖より侵入した血管と線維芽細胞が根管内で増殖し、新生硬組織が形成されることを明らかとした (Komada *et al.*, 2020)。しかし、歯髄血管再生療法の治癒過程において形成される新生硬組織の組成の由来や、形成に関与する間葉系幹細胞は不明である。

レプチン受容体 (以下、LepR) 発現細胞は骨髄系の間葉系幹細胞として知られ、歯周組織における骨芽細胞の主要な供給源であり、抜歯窩の治癒過程に寄与したことが報告されている (Zhang *et al.*, 2020)。しかし、LepR を発現する細胞が歯髄血管再生療法後の治癒過程にどのように関与するのかわからない。そこで本研究では、歯髄血管再生療法後の LepR 発現細胞を細胞系譜解析法により追跡することを目的とした。

#### 【材料および方法】

本研究は東京歯科大学動物実験委員会の承認を得て実施した (承認番号: 242302)。LepR-CreERT2/flox-stop-flox-Tomato マウスを作出した。まず、生後 4 週でタモキシフェンを腹腔内投与 (0.15mg/g) した。次に、生後 5 週齢で三種混合麻酔薬による全身麻酔下にて、上顎右側第一臼歯 (M1) に対してダイヤモンドポイント (メリーランド社) およびカーバイドパー (コメント社) を用いて近心咬合面を削合し露髄させた。実体顕微鏡下にて、#8K ファイルを用いて近心根管歯髄の除去および機械的清掃、10%次亜塩素酸ナトリウム水溶液と 3%EDTA を用いた化学的清掃を行った。その後、#8K ファイルを用いて近心根管内経路で、根尖孔外より根管口部まで出血させ、血餅を形成させた。血餅上部を MTA セメント (モリタ社) で被覆し、窩洞をフロアブルコンポジットレジン (クラレノリタケデンタル社) で封鎖した。術後 1 時間、7 日、14 日に 4%パラホルムアルデヒド溶液で灌流固定を行い、上顎骨を採取した。モールス液で 24 時間脱灰後、厚さ 12 $\mu$ m の凍結切片標本を作製し、共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM880 NL0, Zeiss) にて観察した。また、形態観察ではヘマトキシリン・エオジン染色を行い、正立顕微鏡 (Axio Imager M2) を使用して観察した。対照群は反対側の上顎左側第一臼歯近心根 (無処置) とした。

#### 【結果および考察】

実験群において、術後 1 時間、7 日、14 日では LepR の存在を示す Tomato 陽性細胞が歯肉上皮直下の結合組織および歯槽骨骨髄面に接するように認められた。根管内では術後 7 日、14 日の根管中央部にわずかに認められるに過ぎなかった。

以上の結果から、歯髄血管再生療法後に根管内に侵入する幹細胞は、骨髄系の間葉系幹細胞の可能性は低いと考えられ、他の間葉系幹細胞の関与が示唆された。

(会員外研究者: 東京歯科大学口腔科学研究センター 溝口 利英, 伊藤慎一郎)

## WNT10a が培養歯髄細胞において象牙質形成に与える影響の 3 次元培養による解析

<sup>1</sup>明海大学歯学部機能保存回復学講座保存治療学分野

<sup>2</sup>Section of Endodontics, Division of Regenerative and Reconstructive Science,  
School of Dentistry, UCLA

○加藤 邑佳<sup>1,2</sup>, 藤澤 秀男<sup>1</sup>, 山田 明日香<sup>1</sup>, 橋本 里歩<sup>1</sup>, Insoon Chang<sup>2</sup>, 横瀬 敏志<sup>1</sup>

### Analysis of the effect of WNT10a on dentin formation in cultured dental pulp cells by three-dimensional culture system

<sup>1</sup>Division of Endodontics and Operative Dentistry Department of Restorative and Biomaterials Sciences

<sup>2</sup>Section of Endodontics, Division of Regenerative and Reconstructive Science,  
School of Dentistry, UCLA

○Yuka Kato<sup>1,2</sup>, Hideo Fujisawa<sup>1</sup>, Asuka Yamada<sup>1</sup>, Riho Hashimoto<sup>1</sup>, Insoon Chang<sup>2</sup>, Satoshi Yokose<sup>1</sup>

**【目的】**これまで培養歯髄細胞(象牙芽細胞様細胞)の培養にアテロコラーゲンを用いた 3 次元培養システムを用いた研究は著者が知る限り見られず、象牙質様石灰化物形成を観察するための手法として組み入れることは、これまでの 2 次元培養と比較して、より生体と類似した環境を作り出せると考え、非常に有効である。そこで、Wnt10a がラット培養歯髄細胞の象牙質形成に与える影響について、アテロコラーゲンを用いた 3 次元培養システムを用いて解析を行い、どのような挙動が見られるかを検討した。

**【方法】**全ての実験は、明海大学実験動物倫理委員会の承認(A2130)を得て行った。

8 週齢の雌 SD ラットの下顎切歯歯髄を取り出し、0.1% コラゲナーゼ、0.05% トリプシン、4 mM 2 Na・EDTA を含む PBS を酵素液として、酵素処理法で歯髄細胞を分離後、必要な細胞数に達するまで培養し、本実験に使用した。コラーゲンゲルに対してリコビナントヒト Wnt10a を 100ng/ml の濃度で添加した群(Wnt10a 群)、生理食塩水を添加した群(Control 群)を作成した。そこに培養歯髄細胞を  $5 \times 10^5$  cell/well で混和し、6 well plate に播種した。培養歯髄細胞は、直ちにインキュベーター内へ静置し、アテロコラーゲンゲルが完全に固まったことを確認した。培地は、10%仔牛血清、 $\beta$ グリセロリン酸、アスコルビン酸を含んだ $\alpha$ MEMを使用し、2日に1度培地交換を行った。培養15日目に、アルカリフォスファターゼ(ALP)染色、及びVon Kossa染色を行った。また、培養歯髄細胞からtotal RNAを抽出し、cDNAを作成後、Real-Time PCRを行い象牙芽細胞分化のマーカーである*Dspp*, *Bgp*, 及び象牙質形成に関わるWntシグナルカノニカル経路のリガンドである*Wnt10a*のmRNA発現を検索した。

各種遺伝子発現量はMann-Whitney U 検定を行い、結果は平均値±標準偏差(SD)で示し、 $P < 0.05$ にて有意差を検定した。

**【結果】**培養15日目のALP及びVon Kossa染色の結果から、両群ともにALP陽性、Von Kossaに染食された石灰化結節を認めた。また、Wnt10aを添加した群は、Control群と比較して、石灰化結節を多く認めた。培養15日目のReal-Time PCRの結果から、Wnt10 $\alpha$ 群では、controlと比較して*Dspp*, *Bgp*, *Wnt10a*全てにおけるmRNAの発現量が有意に増加した。

**【考察】**Wnt10a群は、Control群と比較して、ALP陽性石灰化結節の形成の増加を認め、象牙質マトリックスタンパク質のマーカーである*Dspp*, *Bgp*のmRNA発現量が有意に増加した。すなわち、Wnt10aを添加することにより、既に生体で知られていることと同様にアテロコラーゲンを用いた3次元培養においても、象牙質様石灰化物形成の亢進を再現することが確認できた。

したがって、アテロコラーゲンを用いた象牙質形成を再現させる3次元培養システムは、実際の歯髄組織と同様に、Wnt10aの作用が培養歯髄細胞に反映することから、アテロコラーゲンを用いた3次元培養システムの解析が有用であることが示された。

**【結論】**アテロコラーゲンを用いた3次元培養システムの解析は、Wnt10aの作用を培養歯髄細胞に反映することを通して、有用であることが示された。

## Effects of F-Spondin on the mineralization of human dental pulp stem cells

<sup>1</sup>*Department of Endodontology and Operative Dentistry, Faculty of Dental Science, Kyushu University,*

<sup>2</sup>*Department of Endodontology, Kyushu University Hospital<sup>2</sup>,*

○Bara Mardini<sup>1</sup>, Hideki Sugii<sup>1</sup>, Serina Soeno<sup>1</sup>, Ryosuke Tachibana<sup>1</sup>, Sayuri Hamano<sup>1</sup>, Daigaku Hasegawa<sup>2</sup>,  
Shinichiro Yoshida<sup>2</sup>, Junko Obata<sup>2</sup>, Tomohiro Itoyama<sup>2</sup> and Hidefumi Maeda<sup>1,2</sup>

**Background:** The formation of reparative dentin is widely recognized as a defensive response by the dental pulp cells to various stimuli, such as bacterial invasion, tooth preparation, or restorative materials. This type of dentin is morphologically and biologically distinct from primary and secondary dentin, being primarily formed by odontoblast-like cells. Despite its clinical significance, the underlying biological mechanisms governing reparative dentin formation remain unclear. F-Spondin (SPON1) is the extracellular matrix protein and primarily known to regulate neuronal outgrowth in the embryonic central nervous system. Furthermore, SPON1 also modulates key signaling pathways of bone remodeling, specifically TGF- $\beta$  and BMP, as a negative regulator of bone mass. These reports suggest that SPON1 is related to regulating the formation of reparative dentin, but the effects of SPON1 on reparative dentin formation have not been fully understood. Thus, this study analyzed the expression pattern of SPON1 in dental pulp tissue and the effect of SPON1 on mineralization of human dental pulp stem cells (HDPSCs).

**Materials and Methods :**Immunohistochemical analysis (IHC) was performed to evaluate the expression pattern of SPON1 in dental pulp tissue using an anti-SPON1 antibody in the mandibular incisors and molars from SD rats (8weeks old, male). HDPSCs were purchased from RIKEN. Recombinant human SPON1 protein (100 ng/ml) was added to HDPSCs for analyzing its impact on the mineralization. After 7 days of culture with  $\alpha$ MEM/10% FBS (CM), CM containing 2 mM CaCl<sub>2</sub> (DM) or DM containing with SPON1 (DM + SPON1), Alizarin Red S staining was subsequently performed to assess mineralization. All procedures were performed in compliance with the requirements of the Institutional Animal Care and Use Committee at Kyushu University (approval numbers: A23-055-0).

**Results:** IHC showed that the positive staining against an anti-SPON1 antibody was highly observed in the odontoblast layer of rat molars. Furthermore, in the mandibular incisor samples, the positive reaction against an anti-SPON1 antibody was detected in both preodontoblasts and odontoblasts, but not in cervical loop region. Alizarin red S staining showed that mineralization of HDPSCs was significantly lower in DM + SPON1 group than in DM group.

**Discussion:** The high expression of SPON1 in both preodontoblasts and odontoblasts suggests that SPON1 plays a key role in regulating odontoblastic differentiation. SPON1 inhibited mineralization of HDPSCs, suggesting that SPON1 may act as a negative regulator of odontoblastic differentiation. These findings suggest that SPON1 could be an important modulator in the formation of reparative dentin.

**Conclusion:** SPON1 was expressed in odontoblasts in rat molars and expressed in preodontoblasts and odontoblasts, not in cervical loop region in rat mandibular incisors. SPON1 inhibited the mineralization of HDPSCs.

## 塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) の局所応用が歯周組織治癒に及ぼす影響 —骨粗鬆症状態下での検討—

<sup>1</sup>東京歯科大学歯周病学講座, <sup>2</sup>東京歯科大学口腔科学研究センター  
○森 心汰<sup>1,2</sup>, 銅冶 賢吾<sup>1,2</sup>, 今村 健太郎<sup>1,2</sup>, 齋藤 淳<sup>1,2</sup>

## The effect of local application of fibroblast growth factor-2 on periodontal healing: A study in osteoporotic condition

<sup>1</sup>Department of Periodontology Tokyo Dental College,  
<sup>2</sup>Oral Health Science Center Tokyo Dental College  
○Shinta Mori<sup>1,2</sup>, Kengo Doya<sup>1,2</sup>, Kentaro Imamura<sup>1,2</sup>, Atsushi Saito<sup>1,2</sup>

### 【目的】

骨粗鬆症は歯周病の重症度を高め、歯周病治療後の歯周組織治癒を妨げることが報告されている。シグナル分子である塩基性線維芽細胞増殖因子 (FGF-2) は歯周組織治癒の促進効果が確認されており、再生療法に使用されている。しかし、歯周炎を有する骨粗鬆症患者に対する FGF-2 の使用が歯周組織治癒に及ぼす影響については未だ不明な点が多い。

本研究は、FGF-2 の局所使用が骨粗鬆症状態の歯周組織治癒に与える影響を基礎的に検討することを目的に行った。

### 【材料および方法】

10 週齢雌性 Wistar ラットを卵巣摘出 (OVX) による骨粗鬆症群とコントロール群に割り当て、OVX 後 8 週で、上顎第一臼歯近心の歯槽骨に外科的に歯周組織欠損を作製し、根面をルートプレーニングしたのち、欠損内に FGF-2 + hydroxypropyl cellulose (HPC)、または HPC のみを投与した。術後 2, 4 週でマイクロ CT および組織学的解析を行った。また、各群のラット大腿骨より採取した骨髄由来間葉系幹細胞 (BMSCs) を FGF-2 添加/非添加で培養し、培養 1 日で共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による細胞形態の観察を行った。培養 1, 3, 5 日で WST-8 にて細胞生存/増殖率の計測を行い、培養 3, 7 日で qRT-PCR にて骨芽細胞分化を評価した。

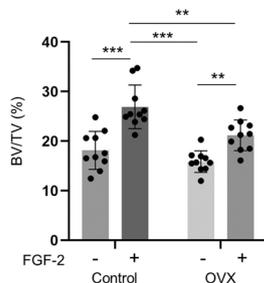
### 【結果】

*In vivo* では術後 2, 4 週におけるマイクロ CT 解析において、コントロール群、OVX 群ともに FGF-2 の使用は HPC 単独と比較し、骨体積率と骨梁数は有意に大きな値を、骨梁間隙は小さい値を示した。術後 4 週における骨体積率、骨梁幅は、FGF-2 を投与したコントロール群が OVX 群よりも大きな値を示した。組織学的所見ではコントロール群、OVX 群への FGF-2 の局所使用は HPC 単独投与に比べて、術後 2, 4 週において、新生骨様構造物の歯冠側方向への伸展や、新生血管様構造物がより大きい傾向を示した。術後 4 週における新生骨は、FGF-2 を投与したコントロール群で最も高いレベルを示していた。

*In vitro* において、CLSM による観察では OVX 群で FGF-2 の添加は、非添加に比べて、培養 1 日の時点で伸長した細胞突起を有する線維芽細胞様細胞がより多く観察された。また、OVX 群において FGF-2 の添加は培養 1, 3, 5 日で細胞生存/増殖率を有意に上昇させた。qRT-PCR では、FGF-2 の添加は非添加と比較して培養 3, 7 日で、*Alp* の発現を抑制した。

### 【考察・結論】

FGF-2 の局所使用は、OVX 群において歯周組織の治癒を促進することが示唆された。また、FGF-2 の添加は BMSCs の増殖を刺激するだけでなく、骨芽細胞分化も調節することが示された。これらの結果により、FGF-2 は骨粗鬆症のような骨代謝が低下した条件下でも歯周組織治癒を一定の範囲で促進することが示唆された。



**FIGURE** Quantitative analysis of micro-CT data by 3-D structural analysis software.

Bone volume/Total volume (BV/TV) were compared between groups at 4 weeks. Data shown as mean  $\pm$  SD (n = 10). \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.001 by 2-way ANOVA with Tukey post-test.

## リグロス®投与による歯周組織再生誘導効果の中長期的予後解析

大阪大学大学院歯学研究科 口腔治療学講座<sup>1</sup>

大阪大学大学院医学系研究科保健学専攻 再生誘導医学協働研究所<sup>2</sup>

○今井 昂<sup>1</sup>, 沢田 啓吾<sup>1,2</sup>, 北村 正博<sup>1</sup>, 中村 友美<sup>1</sup>, 池上 久仁子<sup>1</sup>, 阪下 裕美<sup>1</sup>, 森本 千晶<sup>1</sup>, 生川 由貴<sup>1</sup>, 松本 修治<sup>1</sup>, 村田 真里<sup>1</sup>, 富永 翔太郎<sup>1</sup>, 青木 舞華<sup>1</sup>, 村橋 美保<sup>1</sup>, 川口 美紅<sup>1</sup>, 桑添 天見<sup>1</sup>, 鈴木 清太郎<sup>1</sup>, 平岡 康弘<sup>1</sup>, 尾田 祐紀<sup>1</sup>, 島袋 善友<sup>1</sup>, 杉本 彩<sup>1</sup>, 田中 友晃<sup>1</sup>, 吉田 悠作<sup>1</sup>, 前田 昂佑<sup>1</sup>, 額瀨 友斗<sup>1</sup>, 柏木 陽一郎<sup>1</sup>, 三木 康史<sup>1</sup>, 藤原 千春<sup>1</sup>, 岩山 智明<sup>1</sup>, 山下 元三<sup>1</sup>, 村上 伸也<sup>1</sup>, 竹立 匡秀<sup>1</sup>

### Long-term prognostic analysis of the periodontal tissue regenerative effects of Regroth administration.

Osaka University Graduate School of Dentistry Department of Periodontology and Regenerative Dentistry<sup>1</sup>

StemRIM Institute of Regeneration-Inducing Medicine, Osaka University<sup>2</sup>

○Akira Imai<sup>1</sup>, Keigo Sawada<sup>1,2</sup>, Masahiro Kitamura<sup>1</sup>, Tomomi Nakamura<sup>1</sup>, Kuniko Ikegami<sup>1</sup>, Hiromi Sakashita<sup>1</sup>, Chiaki Morimoto<sup>1</sup>, Yuki Narukawa<sup>1</sup>, Shuji Matsumoto<sup>1</sup>, Mari Murata<sup>1</sup>, Shotaro Tominaga<sup>1</sup>, Maika Aoki<sup>1</sup>, Miho Murahashi<sup>1</sup>, Miku Kawaguchi<sup>1</sup>, Amami Kuwazoe<sup>1</sup>, Seitaro Suzuki<sup>1</sup>, Yasuhiro Hiraoka<sup>1</sup>, Yuki Oda<sup>1</sup>, Yoshitomo Shimabukuro<sup>1</sup>, Aya Sugimoto<sup>1</sup>, Tomoaki Tanaka<sup>1</sup>, Yusaku Yoshida<sup>1</sup>, Kousuke Maeda<sup>1</sup>, Yuto Kouketsu<sup>1</sup>, Yoichiro Kashiwagi<sup>1</sup>, Koji Miki<sup>1</sup>, Chiharu Fujihara<sup>1</sup>, Tomoaki Iwayama<sup>1</sup>, Motozo Yamashita<sup>1</sup>, Shinya Murakami<sup>1</sup>, Masahide Takedachi<sup>1</sup>

【目的】2016年12月に塩基性線維芽細胞増殖因子(FGF-2)を有効成分とする歯周組織再生剤リグロス®の販売が開始され、8年以上が経過した。本研究では、リグロス®販売開始後の約7年間に大阪大学歯学部附属病院(口腔治療・歯周科)で実施されたリグロス®を用いたフラップ手術の中長期的治療成績を後向きに解析した。

【材料と方法】本研究では、大阪大学歯学部附属病院(口腔治療・歯周科)にて辺縁性歯周炎と診断され、2017年1月から2023年6月までの期間にフラップ手術時にリグロス®を投与した患者の中で、投与部位の術前と術後のデンタルX線写真の比較が可能な318部位を解析対象とした。本研究のすべての被験者は、歯周基本治療後にフラップ手術(リグロス®投与)を実施し、サポートペリオドンタルセラピー(SPT)またはメインテナンスに移行した。そして、術前と最近来院時の動揺度、プロービングポケット深さ(PPD)、プロービング時の出血(BOP)の有無の比較に加え、デンタルX線写真を用いて、術前と術後の骨欠損形態(深さ・幅・角度)と骨増加率を計測し、リグロス®投与による歯周組織再生誘導効果を評価した。なお、本臨床研究は大阪大学大学院歯学研究科倫理審査委員会の承認を受けて実施した(承認番号:R5-E22-2)。

【成績】本研究の被験者集団は181名(平均年齢56.56歳、男性69名、女性112名)で、平均観察期間は984日(82日~2541日)であった。術前のPPDは平均 $5.98 \pm 1.48$ mmであったが、術後は平均 $3.90 \pm 1.34$ mmに減少し、平均 $2.08 \pm 1.61$ mmの有意な改善を認めた。BOP陽性部位は、術前70.13%であったが、術後は32.70%に有意な減少を認めた。また、術前に1度以上の動揺を認めた歯は全被験歯の25.47%であったが、術後は14.15%に有意に減少した。骨欠損部の骨増加率は、平均 $44.41 \pm 30.71$ %で、骨欠損深さは術前 $4.74 \pm 2.11$ mmから術後 $2.71 \pm 1.68$ mmへ、骨欠損幅は術前 $2.71 \pm 1.09$ mmから術後 $1.86 \pm 0.97$ mmへと有意な減少を認めた。一方、術前と術後の骨欠損角度は、それぞれ $44.26 \pm 17.97^\circ$ および $45.86 \pm 20.13^\circ$ で両者に有意差を認めなかった。また、術前の骨欠損形態(深さ・幅・角度)と骨増加率の相関解析を行った結果、骨欠損の幅と角度については骨増加率との相関関係は認めなかったが、術前の骨欠損深さと骨増加率に有意な負の相関関係を認めた。

【結論と考察】本研究(平均観察期間が984日:約3年)で示されたリグロス®投与後の骨増加率は平均44.41%でリグロス®開発時の第Ⅲ相試験(観察期間9ヶ月、平均骨増加率37.10%)と比較高い値を示したことから、リグロス®の歯周組織再生誘導効果が長期間維持されることが確認された。また、術前の骨欠損深さと新生骨形成に負の相関関係を認めたことから、術前の骨欠損の深さがリグロス®投与による歯周組織再生誘導効果に影響を与えることが示唆された。

## GelMA-RF ハイドロゲルを用いた新規老齢細胞移植治療の開発

愛知学院大学歯学部歯周病学講座

○鈴木結子, 後藤亮真, 小林 周一郎, 西田英作, 後藤久嗣, 菊池 毅, 林 潤一郎, 三谷章雄

### Development of a novel aged cell transplantation therapy using GelMA-RF hydrogel.

DEPARTMENT OF PERIODONTOLOGY, SCHOOL OF DENTISTRY,

AICHI GAKUIN UNIVERSITY

○Yuiko Suzuki, Ryoma Goto, Shuichiro Kobayashi, Eisaku Nishida, Hisashi Goto, Takeshi Kikuchi,  
Junichiro Hayashi, and Akio Mitani

【背景】再生医療において足場材料として応用されているハイドロゲルの中でも Gelatin Methacryloyl (GelMA) は、光照射によって架橋、ゲル化し、調節可能な機械的性質を持つ生体適合材料である。従来 GelMA は紫外線照射によって硬化させる為、生体細胞への有害性が問題となっている。そこで我々は歯周組織再生を目指し、生体細胞への有害性のない可視光線領域で励起する光感受性物質 riboflavin (RF) を GelMA に混和し、光重合型レジン充填治療の際に使用される照射器を用いて光照射を行うことで硬化する、新規 GelMA ハイドロゲル (GelMA-RF) を開発した。GelMA-RF の圧縮弾性率は骨芽細胞の分化に適したものに調整し、歯槽骨再生に特化した足場材とした。この GelMA-RF と前骨芽細胞を用いて、GelMA-RF での3次元培養の有用性を検証、報告してきた。

【目的】歯周病は高齢者が多く罹患する疾患である為、細胞移植を臨床応用していく場合、高齢患者より採取した自家細胞を用いる頻度は高くなり、老齢個体由来前骨芽細胞を用いた場合でも良好な成績となる歯周組織再生療法の開発が必要である。そこで、上顎骨骨欠損部に対し、GelMA-RF に老齢ラットから採取した前骨芽細胞を包埋し移植することで、歯周組織再生療法への応用の可能性を検証することとした。さらに、GelMA-RF と前骨芽細胞を用いた再生療法における再生メカニズムを明らかにするために、若年ラット由来の前骨芽細胞との比較解析も含めた、より詳細な検討も行うこととした。

【方法】①: 70 週齢雄性 SD ラットの下顎骨を取り出し、顎骨のコラゲナーゼ処理を行い、採取した前骨芽細胞を培養した。調整した GelMA-RF に前骨芽細胞を混和し、ラットに作成した上顎骨骨欠損部に填塞した。その後、光照射器 (395~480nm) を用いて骨欠損内で硬化させ、歯肉弁を復位し、移植後6週間まで経過を観察した。

②: 7 週齢及び 70 週齢の雄性 SD ラットの下顎骨より採取した前骨芽細胞を GelMA-RF に混和し、同光照射器を用いて硬化させた GelMA-RF 内で2週間培養、骨分化誘導を行った。培養後、Calcein を用いた骨分化能の評価、エネルギー分散型 X 線分光法 (EDS) による骨分化析出物質の元素分析、qPCR による骨マーカー遺伝子発現解析を行った。

③70 週齢雄性 SD ラットの下顎骨より採取した前骨芽細胞を調整した GelMA-RF に混和し、ラットに作成した大腿骨の規格化された骨欠損部に填塞した。その後、光照射器を用いて骨欠損内で硬化させ、移植後4週間まで経過を観察した。

【結果】①GelMA-RF に老齢ラット由来前骨芽細胞を包埋したものを移植した群では、何も移植していない control 群と比較して、移植後2,4,6週において骨体積率の有意な増加を認めた。②蛍光顕微鏡にて Calcein の沈着は7週齢/70週齢ラット両群共に同様であった。EDS による元素分析の結果、7週齢/70週齢ラット両群共に GelMA-RF 表面に石灰化物様組織を認めた。Ca, P の蓄積は7週齢群に比べ数値は劣るが、70週齢ラット群でも検出された。qPCR 解析の結果、7週齢/70週齢ラット両群ともに Bsp の遺伝子発現は骨分化誘導しないものと比較し有意に亢進していた。③大腿骨への移植では、GelMA-RF に老齢ラット由来細胞を包埋させた群は、移植後1週目と2週目の骨欠損部において、control 1週目2週目との有意な骨体積率の増加を認めた。

【結論】老齢ラット由来前骨芽細胞を用いた場合でも GelMA-RF ハイドロゲル内での石灰化や骨様組織への分化が認められた。高齢者歯槽骨由来前骨芽細胞と GelMA-RF の併用療法の有益性が示唆された事により今後、骨再生医療の選択肢の1つになる事が期待される。

## 自己効力感の向上効果と歯周組織再生療法を含めた歯周治療が奏功した症例 ～糖尿病の発見と医科歯科連携～

1) 日本鋼管福山病院、2) 広島大学大学院医系科学研究科歯周病態学研究室  
○永原 隆吉<sup>1)</sup>、岩田 倫幸<sup>2)</sup>、應原 一久<sup>2)</sup>、水野 智仁<sup>2)</sup>

### A case of the improvement of self-efficacy and the periodontal therapy including the periodontal regenerative therapy: the discovery of diabetes and the medical-dental collaboration

1) Nippon Kokan Fukuyama Hospital, 2) Hiroshima University Graduate School of Biomedical and Health Sciences Department of Periodontal Medicine

○Takayoshi Nagahara<sup>1)</sup>, Tomoyuki Iwata<sup>2)</sup>, Kazuhisa Ouhara<sup>2)</sup>, Noriyoshi Mizuno<sup>2)</sup>

**【緒言】** 潜伏した糖尿病患者は数多く、特に高齢者では歯周病と共に自覚症状が伴わない患者は少なくない。歯科受診を機に医科歯科連携によって潜在性的高齢者の糖尿病と歯周病を発見し、改善することは極めて重要である。歯周治療によってHbA1cを改善できると報告されている中で、HbA1c レベルと自己効力感(個人がある状況において必要な行動を効果的に遂行できる能力に対する信念のこと)、歯磨き習慣、ブラークコントロールとの強い相関関係が認められており、本症例では糖尿病と歯周病の治療が奏功した実症例を経験したので報告する。

**【症例の概要】** \*患者からは学会大会で症例資料等を利用することの同意を取得済みである。

患者:72歳 女性(初診日2020年1月)。主訴:最近、口が渇く。内科・整形外科も含めて一括して病院で歯科治療を受けたい。全身既往歴:高血圧症(Ca拮抗剤)、変形性関節症(SNRI;セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害剤)、BMI:27.34kg/m<sup>2</sup>。口腔既往歴:約1か月前に近隣歯科医院で6<sup>┐</sup> 垂直性歯根破折のため、抜歯した。その後、当病院の内科・整形外科がかかりつけのため、歯科も病院内にあることから一元管理を希望され、日本鋼管福山病院の歯科に来院された。

**【口腔内所見・診断】** 歯石沈着を伴う6mm以上の深いPPDには出血を伴い、上顎臼歯部には根分岐部病変も認められた。また、全顎的な発赤・腫脹が認められた他に口渇感の訴えもあった。6<sup>┐</sup>の垂直性歯根破折の既往や、過蓋咬合と<sup>┐</sup>6に歯冠部亀裂もあり、ブラキシズムを含めた強い咬合力が疑われた。また、他医院での6<sup>┐</sup> 抜歯後1ヶ月が経過したのだが、抜歯窩治癒不全が認められた。レントゲン所見では全顎的な水平性骨吸収像の他に、<sup>┐</sup>6/<sup>┐</sup>7遠心部に垂直性骨吸収像も認められた。歯周組織検査の結果は、4-5mm PPD=57.4%、6mm以上 PPD=31.5%、BOP=92.6%、PISA=2667.7mm<sup>2</sup>、PCR=68.5%で、広汎型慢性歯周炎(Stage III/Grade C)と診断した。

**【治療経過】** 口渇感やPISA、抜歯窩治癒遅延などを医科へ情報提供した。口渇感に対してはSNRIが消炎鎮痛剤へ変更された。また、血液検査(随時血糖値=218mg/dL、HbA1c=7.2%)から糖尿病が発見されたため、食事・運動療法(生活指導)と歯周基本治療が同時に開始された。セルフケアによるPCRの顕著な改善に連動して、歯肉腫脹の減少(Ca拮抗剤の変更なし)やPISAとHbA1cも改善され、残存した深い歯周ポケットには歯周組織再生療法を含む歯周外科治療が実施可能になった。口腔機能回復治療後のSPT 継続下で歯周組織は安定しており、薬物療法なしで良好な血糖コントロールが維持されている。

**【考察・まとめ】** 未治療の糖尿病患者は数多く潜伏しており、特に高齢者では歯周病と共に自覚症状がなく生活している患者は少なくない。本症例は歯科受診を機に、問診や口腔内検査における情報を医科へ提供した結果、初期糖尿病と診断された。「良好な口腔清掃習慣は、糖尿病に関する患者の自己効力感を高め、糖尿病の発症や悪化を予防できる可能性がある(レベル4、推奨度グレードB:糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン2014)」とされており、本症例では、初診時 PCR=68.5%が 17.6%→13.2%→6.5%→4.6%(2020年11月)と歯肉腫脹も改善され、初診時 PISA=2667.7mm<sup>2</sup>も 475.9mm<sup>2</sup>(2020年11月)へと減少、それに従ってHbA1cも初診時7.2%が5.6%までに食事・運動療法と歯周基本治療で改善できた。医科のカルテを確認すると、その改善の背景には、口腔衛生習慣の確立と歯周組織の炎症、および糖尿病の改善に自己効力感の向上が寄与しており、それが糖尿病と歯周病の治療の奏功の源になったと考察される。生活習慣指導(食事・運動療法)と歯周治療により血糖コントロールが良好に改善され、現在も維持できている。

## *Fusobacterium nucleatum* 迅速検出キットの開発のための基礎的研究

徳島大学大学院医歯薬学研究部歯周歯内治療学分野<sup>1</sup>  
徳島大学病院 口腔インプラントセンター<sup>2</sup>

○植村勇太<sup>1</sup>, 仲村大輔<sup>1</sup>, 稲垣裕司<sup>1</sup>, 秋月皆人<sup>1</sup>, 西川泰史<sup>2</sup>, 木戸理恵<sup>1</sup>, 湯本浩通<sup>1</sup>

**Basic Studies on the Development of Rapid Detection Kit Targeted for *Fusobacterium nucleatum***  
Department of Periodontology and Endodontology, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences<sup>1</sup>  
Oral Implant Center, Tokushima University Hospital<sup>2</sup>

○Yuta UEMURA<sup>1</sup>, Daisuke NAKAMURA<sup>1</sup>, Yuji INAGAKI<sup>1</sup>, Minato AKIZUKI<sup>1</sup>, Yasufumi NISHIKAWA<sup>2</sup>,  
Rie KIDO<sup>1</sup>, Hiromichi YUMOTO<sup>1</sup>

### 【背景】

歯周病原性の高い細菌として、Red Complex と称される *Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*), *Treponema denticola* (*T.d.*)や *Tannerella forsythia* (*T.f.*) が知られているが、グラム陰性嫌気性菌である *Fusobacterium nucleatum* (*F.n.*) は近年、多種の口腔内細菌との共凝集能とその細菌間コミュニケーションの制御により、口腔バイオフィルムの成熟と Red Complex 菌の歯周病原性を亢進させることでも注目されている。さらに、*F.n.*は、歯周疾患のみならず、早産、低体重児出産、関節リウマチ、子宮内膜症、口腔癌や大腸癌にも関与することが示唆されている。また、*F.n.*の外膜タンパク質である FadA は、細胞接着因子である E-カドヘリンに結合して細胞内シグナル経路の活性化を介して、炎症や発癌を誘発すると報告されている。このように、*F.n.*菌は、歯周病などの口腔疾患のみならず全身疾患にも関与していることから、*F.n.*を標的とした迅速検出キットの開発は、歯周病のみならず全身疾患の予防にも貢献できると考えられる。そこで、*F.n.*を迅速に検出する Kit の開発に向けての基礎的研究成果を報告する。

### 【方法】

*F.n.* JCM8532 株を 5 µg/mL の hemin と 1 µg/mL の menadione を添加した Brain Heart Infusion (BHI: Becton Dickinson, Sparks, MD, USA) を 2 日間嫌気培養した。FadA 遺伝子配列に基づいて Primer pair を 3 種類作製(FadA #1, #2, #3)した。培養した *F.n.*菌体懸濁液を 95°C, 10 分熱処理後、作製した Primer pair を用いて、PCR を行い、アガロース電気泳動にて、増幅効率などを確認した。また、*P.g.*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Enterococcus faecalis* などの口腔内細菌懸濁液を用いて PCR を行い、Primer pair の特異性を確認した。特異性の確認には、各菌種特異的 16S rRNA に基づいた Primer pair も使用した。次に、*F.n.*菌の定量的解析を目的に、上記で確認した *F.n.*特異的 primer pair と SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いて、CFX96TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)にて real-time PCR を行った。さらに、口腔内での検出を想定して、各年代の被験者から、食後・食間・ブラッシング後に採取した唾液で *F.n.*を懸濁して real-time PCR を行い、口腔内の環境による *F.n.*検出に及ぼす影響を確認した。ヒト唾液採取に関しては、徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理委員会の承認を得ている(承認番号 329-11)。

### 【結果】

作製した 3 種類の primer pair による増幅効率と特異性を確認した結果、FadA #1 が最も感度および特異性が良好であった。次に、*F.n.*菌を PBS にて 10~10<sup>6</sup> 倍希釈して real-time PCR を行った結果、FadA #1 primer pair は、16S rRNA に基づいた Primer pair と同様に 10<sup>6</sup> 倍希釈まで遺伝子の増幅を確認した。さらに、*F.n.*菌をヒト唾液にて 10~10<sup>6</sup> 倍希釈して real-time PCR を行った結果、年齢や口腔内状態(食後・食間・ブラッシング後)に左右されず、10<sup>6</sup> 倍希釈まで FadA の検出が可能であった。

### 【結論】

本研究で用いた FadA #1 primer pair は、唾液サンプルを用いた口腔内の *F.n.*を迅速に検出することに有用であると考えられた。今後、*F.n.*迅速検出キットの開発を目指して臨床研究を計画している。

## グアニル酸結合タンパク質 Gbps が *Fusobacterium nucleatum* 感染時の病態へ与える影響

<sup>1</sup>大阪大学大学院歯学研究科 歯科保存学講座

○森田 真吉<sup>1</sup>、大嶋 淳<sup>1</sup>、阿部 翔太郎<sup>1</sup>、田中 伸武<sup>1</sup>、林 美加子<sup>1</sup>

### Impact of Guanylate-binding proteins (Gbps) on the pathogenesis of *Fusobacterium nucleatum* infection

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

○Masayoshi MORITA<sup>1</sup>, Jun OHSHIMA<sup>1</sup>, Shoutaro ABE<sup>1</sup>, Nobutake TANAKA<sup>1</sup>, Mikako HAYASHI<sup>1</sup>

#### 【緒言】

辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎は、口腔領域の代表的な感染症であり、その一因として *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) の関与が示唆されている。本菌は他の口腔細菌と比較して強い炎症誘導能を持ち、病原性の解明が急務である。我々は先行研究で、マウス骨髄由来マクロファージにおいて、グアニル酸結合タンパク質 (Guanylate-binding proteins, 以下 Gbps) が *F. nucleatum* 感染時の IL-1 $\beta$  の産生に重要であることを明らかにした (第 159 回日本歯科保存学会学術大会)。そこで本研究では、実際に病態へ与える影響を評価するために、辺縁性歯周炎マウスモデルを用い、本菌が引き起こす炎症が病態に与える影響について検討を加えた。

#### 【研究方法と結果】

本研究は大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った (承認番号: 動歯 R06-05-021-0, (遺) 05128)。

#### 1. *F. nucleatum* 感染を用いた歯周病モデルマウスの構築

8 週齢雄性 Gbps 欠損 (GbpsKO) C57BL6J マウスおよび野生型 (WT) C57BL6J マウスを実験に使用した。それぞれのマウスの上顎右側第二臼歯周囲に 7-0 絹糸を結紮し、実験開始時の歯槽骨を micro-CT で撮影した。結紮した絹糸は 3 日後に除去した。細菌感染は、*F. nucleatum* ATCC23726 株を 2 日に 1 回 10<sup>9</sup> CFU/mL の濃度となるように 2% 塩化メチルセルロース (CMC) に溶解して経口投与した。14 日後にと殺後 micro-CT を撮影し、WT マウスへ *F. nucleatum* を感染させた際に歯槽骨の吸収が有意に起こっていることを確認した。

#### 2. Gbps が歯周病の進展に与える影響の検討

1. で検討した条件で、歯槽骨吸収量をセメントエナメルジャンクション (CEJ) から歯槽骨頂までの距離を測定することで、骨吸収量の定量を行った。また、第二臼歯周囲の歯肉を採取後、RNA およびタンパクを抽出し、定量的逆転写 PCR (RT-qPCR) で IL-1 $\beta$  の転写発現変動を、ウェスタンブロットで Gbps の発現を確認した。また、上顎歯槽骨より薄切切片を作製し、病理学的解析も行った。ウェスタンブロットおよび免疫染色の結果より、WT マウスの病変局所では *F. nucleatum* 感染時に Gbps の発現が認められた。また、GbpsKO マウスでは WT マウスと比較して *F. nucleatum* 感染時の骨吸収を認めなかった。さらに RT-qPCR の結果より、GbpsKO マウスでは IL-1 $\beta$  の発現上昇も抑制されており、歯周病の進展に Gbps が重要であることが示された。

#### 3. ヒトマクロファージ様細胞株を使用した IL-1 $\beta$ 放出に関する検討

2. の結果より *F. nucleatum* 感染時に Gbps が重要であることが明らかとなったため、ヒト細胞株でも検討を行った。マクロファージ様細胞株 (THP-1) に対して CRISPR-Cas9 システムを応用し、ヒト GBPs で最も重要とされる GBP1 の欠損細胞を作製した。野生株および欠損株に *F. nucleatum* を感染させ、24 時間後の RNA を抽出し RT-qPCR を行った。同様の実験系で細胞上清を回収し、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: 酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) によって実際に細胞から放出されるサイトカイン量を定量評価した。その結果、欠損株では IL-1 $\beta$  の放出が有意に抑制されており、GBP1 が本菌感染時の炎症誘導に重要であることが明らかとなった。

#### 【結論および考察】

本研究の結果より、*F. nucleatum* 感染時に Gbps がその炎症惹起メカニズムに重要であり、歯周病の重症化に関与する可能性が示された。今後、Gbps を標的とした本菌に対する新たな治療・予防アプローチの開発が期待される。

本研究の一部は JSPS 科研費 (JP24K22184, JP22KJ2187) の補助のもとに行われた。

## 歯周病の新たなマーカーとしてのホモシステイン値の有用性と全身疾患との関連を 解明するための横断研究

- 1) 松本歯科大学歯科保存学講座 (歯周) 2) 松本歯科大学大学院 歯学独立研究科健康増進口腔科学講座 口腔健康分析学  
3) 松本歯科大学病院 初診室 (総合診断科・総合診療科)  
4) 松本歯科大学大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学講座 臨床病態評価学

○大谷 有希<sup>1,2)</sup>, 林 佑樹<sup>2)</sup>, 出分 菜々衣<sup>2)</sup>, 郭 子揚<sup>1,2)</sup>, 中村 卓<sup>2)</sup>, 内田 啓一<sup>3,4)</sup>, 吉成 伸夫<sup>1,2)</sup>

### Cross-sectional study to elucidate the usefulness of homocysteine levels as a new marker for periodontal disease and the relationship between periodontal disease and systemic diseases

- 1) Department of Cariology, Endodontology and Periodontology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University  
2) Oral Health Science, Department of Oral Health Promotion, Oral Science Course, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine 3) Department of Diagnostic and Oral Dentistry, Matsumoto Dental University Hospital  
4) Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine, Matsumoto Dental University  
○Yuki Ohtani<sup>1,2)</sup>, Yuki Hayashi<sup>2)</sup>, Nanae Dewake<sup>1)</sup>, Kuo Tzu-Yang<sup>1,2)</sup>, Suguru Nakamura<sup>2)</sup>, Keiichi Utida<sup>3,4)</sup>, Nobuo Yoshinari<sup>1,2)</sup>

【目的】歯周病は炎症性疾患であり、心臓血管疾患、糖尿病、神経変性疾患、自己免疫疾患、癌など全身の炎症関連性疾患と関連すると報告されている。一方、歯周病は Silent Disease と言われるように自覚症状が少ない。それゆえ、罹患率が非常に高く、患者が口腔内の違和感に気づいた時には症状が進んでおり、治療が難しくなる場合が少なくない。従って、歯周病を予防、早期発見し、治療を行うことが重要であるが、歯周病の診断は、歯周組織の肉眼的観察、プローブなどの検査器具による歯周ポケットの測定、X線写真による歯槽骨の吸収の確認などに基づいて実施されるため、専用の歯科器具・機器や、熟練した歯科医の歯周病学の臨床的知見・経験が必要となる。さらに、通常の歯周病の診断のための歯周ポケット検査は痛みや苦痛を伴い、術者間での誤差や検査時間が長いことなどいくつかの問題点が挙げられるため、より簡易的で術者間誤差の少ない新たな検査法が探索されている。また、令和4年度の医師・歯科医師・薬剤師調査によれば医療施設従事者に勤務する歯科医師の約9割が歯科診療所に勤務しており、医育機関を除く病院に勤務している歯科医師は約3%であるため歯科医師が医師と密にコミュニケーションができる機会が少なく、歯周ポケット測定は歯周病診断に限定される検査のため、共通理解が可能な血液検査は医科歯科連携を推進することができると考えられる。

ホモシステインとは必須アミノ酸であるメチオニンの代謝過程で生成されるアミノ酸の一種であり、代謝されずに蓄積することで、動脈硬化や血栓性病変などの心疾患の危険因子となることが明らかとなっている。このため、動脈硬化のリスク予測マーカーとして保険収載されている。本研究では血漿ホモシステイン値が歯周病のマーカーとしても使用できるのではないかと考え、横断研究を施行し、血漿ホモシステイン値と歯周病、関連する全身疾患の関係を検討した。

【方法】松本歯科大学病院健診センターにて健康診断を目的として受診され、研究の同意が得られた100名を対象とした。歯周病セルフチェックアンケート<sup>1)</sup>を行い、30点以上は歯周病リスクが高いと評価した。通常健康診断の検査項目として身長、体重、全身既往歴、血圧、HbA1c、CRP、パノラマX線撮影、口腔内検査を施行し、追加検査として採血での血漿ホモシステイン値の測定と、歯周組織検査を施行した。ホモシステイン値は男性7.0~17.8nmol/ml以上、女性5.3~15.2nmol/ml以上を高値とした。歯周組織検査はCPI (Community Periodontal Index)を用いた。統計解析はSpearmanの順位相関検定を使用した。

なお、本研究は松本歯科大学倫理委員会の承認を受け実施した(許可番号 第0373号)。

【結果】研究対象者100名(男性:52名,女性:48名)のうちデータが全てそろっている人数は82名(男性:45名,女性:37名)であった。男性の平均年齢は55.0±10.0歳,女性は55.7±7.9歳であった。歯周病に罹患している人数は25名,ホモシステイン値高値の人数は6名であった。また、高血圧症の人数は20名,糖尿病に罹患している人数は5名であった。ホモシステインは男女差があるため、男女に分けて分析したところ、男性ではホモシステイン値と最大CALは有意な傾向を示した(p=0.053)。さらに全身疾患との関係を調べるためチャールソン併存疾患指数を用いてホモシステイン値と併存疾患指数を分析したところ、男女ともに有意差を認めた(p<0.05)。ホモシステイン値と各検査値との関係は男女とも収縮期血圧で相関がみられた(p<0.05)。また、男性でホモシステイン値と尿素窒素(BUN)、空腹時血糖、拡張期血圧で相関が認められた(p<0.05)。女性ではホモシステイン値とクレアチニンで相関がみられた(p<0.05)。

【考察】ホモシステイン値は筋肉量と関係しているという報告があり、平均値に男女差がある。今回の統計でも男女に分けて解析を行ったところ、男性でホモシステイン値が有意に高く、口腔内の検査項目では最大Clinical Attachment Levelとホモシステイン値が相関する傾向が認められた。今回は健康意識が高い集団を対象としたため、ホモシステイン値が高い人が少なかった。ホモシステイン値と併存疾患指数では有意差を認めたため今後は対象者を変えて調べていく必要があると考える。

1) 山本 龍生. 山口 徹. 種市 浩志. 小川 秀人. 大矢 享. 鴨志田 義功. 高橋 紀樹. 阿部 智. 村田 ゆかり. 小林 五月. 平田 幸夫. 神奈川県・神奈川県歯科医師会作成の「歯周疾患セルフチェック」パンフレットのCommunity Periodontal Index部分 診査代用法としての可能性. 口腔衛生学会誌 2010; 60: 584-590.

## Flotillin は Alzheimer 型認知症モデルマウスの唾液中で増加する

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微生物学講座
3. 日本歯科大学新潟生命歯学部歯周病学講座
4. 日本歯科大学新潟病院総合診療科

○川上 惇<sup>1</sup> 丸山昂介<sup>2</sup> 八板直道<sup>3</sup> 佐藤遥香<sup>1</sup>  
鈴木優矢<sup>1</sup> 両角祐子<sup>3,4</sup> 佐藤 聡<sup>1,3,4</sup>

### Flotillin is Increased in the Saliva of Alzheimer's Disease Mouse Models

1. Periodontology, Graduate School of Life Dentistry at Niigata, The Nippon Dental University
2. Department of Microbiology, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata
3. Department of Periodontology, The Nippon Dental University School of Life Dentistry at Niigata
4. Comprehensive Dental Care at Niigata Hospital, The Nippon Dental University

○Sunao Kawakami<sup>1</sup>, Kosuke Maruyama<sup>2</sup>, Naomichi Yaita<sup>3</sup>,  
Haruka Sato<sup>1</sup>, Yuya Suzuki<sup>1</sup>, Yuko Morozumi<sup>3,4</sup>, Soh Sato<sup>1,3,4</sup>

#### 【緒言】

認知症は、慢性あるいは進行性の脳疾患によって生じ、複数の高次脳機能障害からなる症候群である。代表的な認知症に、Alzheimer 型認知症 (Alzheimer's disease : AD)、血管性認知症、Lewy 小体型認知症、前頭側頭型認知症があり、AD は認知症全体の 6 割以上を占めている。近年、認知症と全身疾患との関連が明らかになっており、さらに AD と歯周病との関係も報告されている。歯周病原細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は、血液脳関門の血管透過性を高めることで脳に侵入し、炎症を引き起こし、脳内の amyloid beta (A $\beta$ ) 沈着を促進し、認知機能を低下させることが報告されている。また、AD 患者において歯周病の重症化が報告されている。AD 患者における歯周病悪化の原因は、認知機能低下に伴う不十分な口腔衛生管理が要因と推測されるが、AD の脳内分子病態が口腔内へ与える影響は十分には解明されていない。近年、AD 関連タンパク質である A $\beta$ 、tau タンパク質は、AD に罹患した場合、血清と唾液中に含まれるタンパク質量が変動することが報告されていることから、AD 患者の血清と唾液中のタンパク質量には関連があることが推測される。また、AD 患者の血清中において、シグナル伝達と膜タンパク質相互作用に関与しているタンパク質である flotillin の濃度の減少が報告されているが、AD が唾液中の flotillin に与える影響についての報告はない。本研究では、唾液中における flotillin の変動を AD モデルマウスを用いて明らかにすることを目的とした。

#### 【材料および方法】

研究は、AD モデルマウス (amyloid precursor protein- knock in mouse models) と野生型マウス (C57BL/6J) を用いた。それぞれのマウスを 2 ヶ月飼育群と 9 ヶ月飼育群に分け、各群雄雌 6 匹ずつを飼育した。唾液の採取にあたり、3 種混合麻酔薬 (塩酸メドゾジ 1 mg / mL、ミタゾラム 5 mg / mL、酒石酸ブトフェノール 5 mg / mL) をマウス体重 1 kg あたり 10mL で腹腔内注射した。次に、唾液分泌の促進を目的としてピロカルピン塩酸塩 (0.05 mg / mL) をマウス体重 1 kg あたり 10mL にて腹腔内注射した。その後マウスを腹臥位にし、マイクロピペットを用いて口腔内より全唾液を 30 分間採取した。採取した唾液の量とタンパク質濃度を測定し、各サンプルのタンパク質を同量に調製した。唾液中の flotillin 濃度は western blotting 法を用いて分析した。各群のバンドのシグナルは画像処理ソフトウェア Image J を用いて定量分析した。なお、動物実験は日本歯科大学新潟生命歯学部動物倫理審査委員会 (承認番号: 257) のもと施行した。統計学的分析には Kruskal-Wallis 検定、多重比較には Steel-Dwass 検定を行った。

#### 【結果】

flotillin 濃度は、AD モデルマウスにおいて 2 ヶ月飼育群と比較し、9 ヶ月飼育群で有意に高かった ( $p < 0.05$ )。しかし、野生型マウスの 2 ヶ月飼育群と 9 ヶ月飼育群の間に、flotillin 濃度に有意な差は認めなかった。

#### 【考察】

本研究において、flotillin 濃度は AD モデルマウスの 2 ヶ月飼育群と比較し 9 ヶ月群において有意な増加を認めた。AD モデルマウスは、月齢とともに脳内の A $\beta$  沈着の顕著な増加が報告されていることから、脳内の A $\beta$  沈着が唾液中の flotillin 濃度に影響を与えたと考えられる。

今後は唾液中に増加した flotillin が歯周組織へ与える影響を解明していく。

#### 【参考文献】

Takashi Saito, et al. Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nature* 2014 May;17(5):661-3

## RANKL とは異なる骨吸収促進因子の検索についての検証

- 1 医療法人社団社会福祉法人健恒会 船橋日大前さくらパーク歯科  
 2 日本大学松戸歯学部保存修復学講座  
 ○細野隆也<sup>1</sup>、植竹貴弘<sup>1</sup>、神谷直孝<sup>2</sup>、小峯千明<sup>2</sup>

### Investigation into the search for osteoclast-activating factors different from RANKL

- 1 Medical & Social Welfare Corporation Kenkohkai Funabashi Nchidaimae Sakura Park Dental Clinic  
 2 Department of Conservation and Restorative Dentistry, Nihon University School of Dentistry, Matsudo  
 ○Takaya Hosono<sup>1</sup>, Takahiro Uetake<sup>1</sup>, Naotaka Kamiya<sup>2</sup>, Chiaki Komine<sup>2</sup>

#### 【目的】

骨芽細胞様の性質を持つ骨肉腫細胞から産生される破骨細胞活性化因子の過去の検索を考察した。

#### 【方法】

骨芽細胞のモデルとして、ラット骨肉腫細胞 MSK 細胞株を用いた。この培養上清をサンプルとし、限外濾過、濾過ゲルカラムクロマトグラフィー、高速逆相分配クロマトグラフィーによる分画、抗血清による活性阻害を行った。骨吸収活性測定法は骨組織を使った簡便な方法を用いた。(Fig.1)

#### 【結果】

本因子は分子量が約 1000 のペプチドであり、ウサギ抗ヒトブラジキニン血清でこの活性は阻害される物質であった。高速分配逆相クロマトグラフィーにおいて、ブラジキニンとは異なる位置に溶出された。本因子はブラジキニンに類似した未知のペプチドであった。(Fig.2)

#### 【考察】

本因子はブラジキニンに類似した未知のペプチドであり、RANKL とは異なる骨吸収促進因子であった。

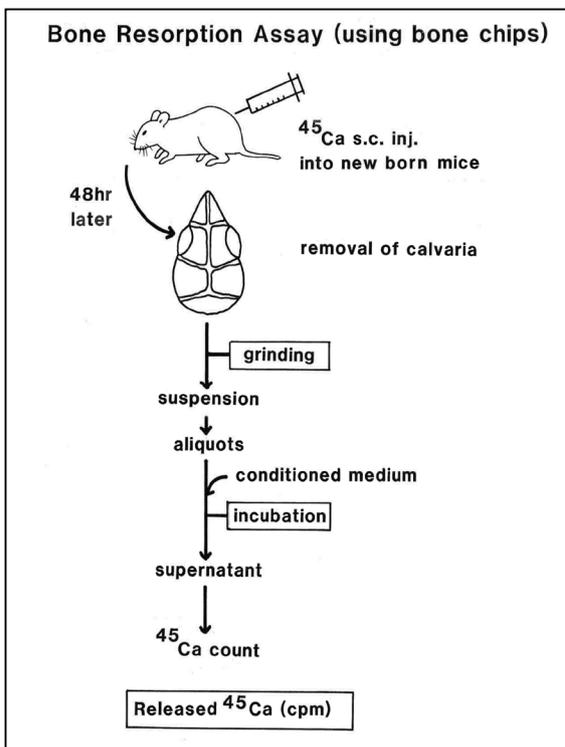


Fig.1

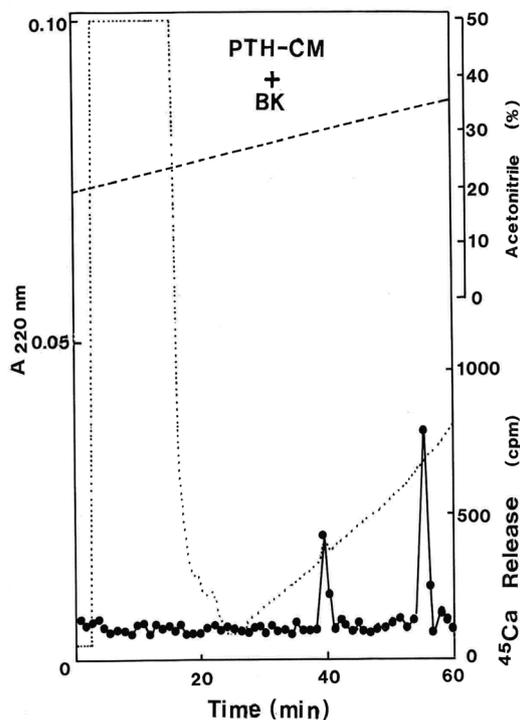


Fig.2

## テトラサイクリン系抗菌薬に耐性を持つ歯原因細菌 *Streptococcus mutans* の報告

広島大学 大学院医系科学研究科 歯髄生物学研究室<sup>1)</sup>、細菌学研究室<sup>2)</sup>

○西濱 早紀<sup>1)2)</sup>、武田 克浩<sup>1)</sup>、柴 秀樹<sup>1)</sup>

### Report of caries-causing bacteria *Streptococcus mutans* resistant to tetracycline antibiotics.

Departments of Biological Endodontics<sup>1)</sup> and Bacteriology<sup>2)</sup>

Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

○Saki Nishihama<sup>1)2)</sup>, Katsuhiko Takeda<sup>1)</sup>, Hideki Shiba<sup>1)</sup>

【目的】テトラサイクリン (TC) 系抗菌薬は広域スペクトル抗菌活性を有するため、感染症の治療に広く使用されている。歯科領域では、歯周病治療において、TC 系抗菌薬のミノサイクリンが知られている。感染症治療において、抗菌薬使用は薬剤耐性菌出現のリスクを抱えており、口腔感染症において、これまでに TC 耐性を獲得した歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* や *Prevotella intermedia* が確認されている。しかし、歯原因細菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) では、このような遺伝子の存在は十分に解明されていない。1980 年、TC 治療を受けていた歯周病患者から、TC 耐性 *S. mutans* が分離された (Hawley RJ *et al.*)。その後、TC 耐性決定因子は染色体上に存在し、Tn916 トランスポゾンの関与が示唆されたが、詳細なゲノム解析は報告されていない。本研究では、広島大学病院の患者から分離した *S. mutans* 臨床分離株からテトラサイクリン耐性遺伝子 *tet(M)* の保有を確認したことから、本菌の全ゲノム配列の決定およびほかの口腔内レンサ球菌のゲノムデータと比較を行い、耐性遺伝子の水平伝播の可能性の検証を行うことを目的とした。

【方法】広島大学病院の外来患者の口腔内から *S. mutans* HSM45 株を分離した。患者に TC 使用歴は確認されなかった。菌株は、Trypticase soy broth (TSB) (Becton, Dickinson and Company) 中、37°C、5%CO<sub>2</sub> で 1 日間培養した後に使用した。TC 感受性は微量液体希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。HSM45 のゲノム全塩基配列を決定し、公開されているゲノムデータと比較した。これらの実験は広島大学倫理委員会の承認を得て、規定されたガイドラインおよび規則に従って行われた (承認番号: E2022-2824)。

【結果】*S. mutans* HSM45 におけるテトラサイクリンとミノサイクリンの MIC はそれぞれ 32 および 16 μg/mL であった。Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の第 33 版における *Streptococcus* 属の *viridans* 種における TC の MIC ブレイクポイント (感受性: 2 μg/mL 以下、中間: 4 μg/mL、耐性: 8 μg/mL 以上) を参照すると、HSM45 はテトラサイクリン耐性であると判定された。ゲノム解析により、HSM45 は *tet(M)* 遺伝子を保有することが明らかになった。

*tet(M)* はリボソームタンパク質を TC から保護することで、TC 耐性を付与することが知られている。また、ヌクレオチド BLAST 解析によって、NCBI (米国国立生物工学情報センター) に登録されている *S. mutans* ゲノムには、*tet(M)* を持つ株は存在しないことが明らかとなった。HSM45-Tn916 遺伝子座とほぼ同一の遺伝子座は、他のグラム陽性菌種で確認された。例えば *Streptococcus pyogenes* 2907-07 株 (同一性 99.99%)、*Streptococcus agalactiae* 515 株 (同一性 99.99%)、*Parvimonas micra* PM102-KC-G-1 株 (同一性 99.99%)、および *Staphylococcus aureus* 株 TUM22707 (99.98% 同一) が挙げられた。

【考察】*tet(M)* を保有する Tn916 トランスポゾンは、*Enterococcus faecalis* で最初に特徴づけられ、*Clostridium difficile*、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌)、*Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌) など、複数のグラム陽性菌で見られる接合性トランスポゾンとして知られている。本研究では *S. mutans* HSM45 Tn916 の配列とほぼ同一の配列を持つ移動性遺伝因子が、咽頭および口腔内の細菌に存在することを初めて示した。Tn916 は宿主の相同組換えシステムを介さずに自己接合により遺伝子を別の宿主に移動させることが可能である。本研究で分離された *S. mutans* 株は、他の *S. mutans* 株や口腔内細菌に *tet(M)* 遺伝子を伝達する能力を持つ可能性が考えられる。

TC 系抗菌薬は口腔内疾患に適用される抗菌薬であり、過剰使用は、*S. mutans* と競合する口腔常在菌を死滅させ、間接的に TC 耐性を獲得した *S. mutans* の増殖を促進する可能性がある。口腔内細菌における TC 耐性の水平伝播は注視すべきであり、抗菌薬の過剰使用を避け、口腔内病原細菌の抗菌剤耐性を監視することが重要である。

(会員外共同研究者; 広島大学大学院医系科学研究科細菌学研究室 小松澤 均、松尾美樹)

***Streptococcus mutans* に特異的抗菌力を持つ  
バクテリオファージΦKSM96 の臨床分離株に対する抗菌感受性の多様性**

広島大学大学院医系科学研究科歯髄生物学研究室<sup>1</sup>, 広島大学大学院医系科学研究科細菌学研究室<sup>2</sup>

○山内悠実<sup>1,2</sup>, 西濱早紀<sup>1,2</sup>, 武田克浩<sup>1</sup>, 柴秀樹<sup>1</sup>

**Diversity in susceptibility of *Streptococcus mutans* specific bacteriophage,  
ΦKSM96, to the clinical isolates**

Departments of Biological Endodontics<sup>1)</sup> and Bacteriology<sup>2)</sup>

Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University

○YAMAUCHI Yumi<sup>1,2</sup>, NISHIHAMA Saki<sup>1,2</sup>, TAKEDA Katsuhiko<sup>1</sup>, SHIBA Hideki<sup>1</sup>

<目的>

*Streptococcus mutans* は口腔に常在しているう蝕原性細菌であり、近年全身疾患との関連性が指摘されている。特に、細胞接着因子 Cnm 保有株は脳血管障害との関連性が報告されている。う蝕の治療法は切削、充填が主体であり、*S. mutans* を選択的に排除するう蝕予防法は確立されていない。現在、口腔感染症を含む細菌感染症等における抗菌薬の不適切使用が薬剤耐性菌の出現を助長し、問題視されている。私たちは抗菌薬に代わる新しい抗菌性因子であるバクテリオファージ (ファージ) に着目し、研究を行っている。ファージは細菌種特異性の高い抗菌効果を持つことから、常在細菌叢に大きな影響を及ぼさず、また、薬剤耐性菌治療としても関心を集めている。本研究グループでは、以前 *S. mutans* に対して特異的抗菌活性を示す溶原化ファージ ΦKSM96 を分離した (iScience. 2023 Nov 14;26(12):108465.)。本研究では、ΦKSM96 の特性を明らかにするために、本学病院で分離した *S. mutans* 臨床株に対する ΦKSM96 の感受性と *S. mutans* 臨床分離株のゲノム情報との関連を調べた。

<方法>

臨床分離 *S. mutans* は、ボランティア (本学病院研究倫理承認番号: E2020-1998) および本学病院脳神経内科 (E2021-2581) 受診患者から分離した 100 株を使用した。*S. mutans* 株は、Trypticase Soy 液体培地 (TSB) を用いて 37°C、CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。ΦKSM96 粒子の精製は、*S. mutans* KSM96 株培養液をマイトマイシン C 処理し、16 時間培養後、培養上清をポリエチレングリコール 6000 処理することで行った。*S. mutans* に対する抗菌評価は、Soft-agar overlay assay を用いた。すなわち、Trypticase Soy 軟寒天に被験菌である *S. mutans* 菌の一晩培養株を少量添加し、Trypticase Soy 寒天培地に播種後、精製したファージ溶液を滴下し、37°C、CO<sub>2</sub> 存在下で 24 時間培養後の阻止円の形成の有無で評価を行った。*S. mutans* の全ゲノムデータを用いて、ファージの感受性と脳血管障害に関与する *cnm* 遺伝子等の病原性遺伝子、細菌表面抗原型との関連性を検討した。

<結果>

ΦKSM96 は多くの *S. mutans* 臨床分離株に対して阻止円の形成を認め抗菌活性を示したが、その感受性 (阻止円の大きさ) は多様性を認め、一部の株では感受性を示さなかった。ΦKSM96 は Cnm 保有株に対しても抗菌活性を認めた。ゲノム解析から ΦKSM96 の *S. mutans* に対する感受性と抗原型に一部関連を認めたが、*cnm* 遺伝子および表面抗原型との関連性はなかった。

<考察>

本研究から、ΦKSM96 は Cnm 保有株を含む *S. mutans* に対して抗菌活性を有することが明らかとなり、う蝕予防に加え、脳血管障害に有効である可能性が示唆された。しかし、その活性は多様性を認め、抗原性との関連性があった。今後、*S. mutans* のすべての臨床分離株に対して抗菌活性を得るためには、*S. mutans* 菌特異的ファージを複数分離し、それらを混合したファージカクテルの作製が必要であると考えている。一方、ΦKSM96 に非感受性の *S. mutans* の存在を認めたことから、今後は *S. mutans* のファージに対する耐性システムの検証が必要である。

(会員外共同研究者; 広島大学大学院医系科学研究科細菌学研究室 小松澤 均、松尾美樹)

## 塩化セチルピリジニウムと酸化グラフェンを用いた複合体の新規抗菌剤への応用

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 歯科・歯周科部門,  
3) 岡山大学 学術研究院 医歯薬学域 歯周病態学分野

○加納 玄<sup>1)</sup>, 大久保 圭祐<sup>2)</sup>, 平井 公人<sup>3)</sup>, 信田 有希<sup>3)</sup>, 中村 心<sup>3)</sup>,  
池田 淳史<sup>2)</sup>, 大森 一弘<sup>3)</sup>, 高柴 正悟<sup>3)</sup>

### Graphene Oxide to improve the persistence of effectiveness of existing antimicrobial substances

1) Dept. of Pathophysiology - Periodontal Science, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University  
2) Dept. Periodontics and Endodontics, Division of Dentistry, Okayama University Hospital  
3) Dept. of Pathophysiology - Periodontal Science, Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University  
○KANO Gen<sup>1)</sup>, OKUBO Keisuke<sup>2)</sup>, HIRAI Kimito<sup>3)</sup>, SHINODA-ITO Yuki<sup>3)</sup>, NAKAMURA Shin<sup>3)</sup>,  
IKEDA Atsushi<sup>2)</sup>, OMORI Kazuhiro<sup>3)</sup>, TAKASHIBA Shogo<sup>3)</sup>

キーワード：口腔バイオフィルム, 抗菌物質, 酸化グラフェン, 医療機器, 院内感染

#### 【目的】

超高齢社会に突入した我が国では、社会変化に伴って種々の支援が必要となる要介護者や、医療現場では加齢変化に伴った全身状態への配慮、易感染者への対応が必要となる場面が増加している。歯科・口腔領域においては、高齢者、要介護者、そして易感染者に留意すべき課題として、院内感染を防ぐ診療環境の整備や、口腔内における感染制御などが挙げられる。これらの解決には、高い抗菌水準と幅広い適応が期待できる材料の開発が必要である。

そこで我々は、カーボンナノシートである酸化グラフェン (Graphene Oxide : GO) の性質に着目した。GOは安価な黒鉛を原料に合成可能で、多量の極性官能基や高い比表面積を持ち、膜形成や化学修飾が可能である。さらに、先行研究では、抗菌物質として汎用されている塩化セチルピリジニウム (Cetylpyridinium Chloride : CPC) と GO の複合体 (CPC-GO) の作製に成功し、CPC の徐放性が示唆された (Fujii R. *et al.*, *Carbon*, 2020)。

本研究では、CPC-GO を実際に試験体へ処理することで、CPC-GO の細菌に対する有効性と試験体表面への滞留性について検討した。

#### 【材料・方法】

1. 試験溶液の調整： GO は、岡山大学異分野基礎科学研究所から供与された。そして、GO (1.0 % (w/v)) に CPC (シグマアルドリッチ) を反応させ、CPC-GO を作製した。濃度調製には、99.5 %エタノール (EtOH : シグマアルドリッチ) を用いた。対照溶液には、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS ; pH 7.4 : サーモフィッシャー), CPC, GO, EtOH を用いた。
2. 試験体とその表面処理： 試験体は、2種類のサイズのシリコンシート (10×10×1 mm, 20×20×2 mm : 三商) を用いた。シリコンシートは、0.5 mL の各試験溶液に 30 分間浸漬して、PBS で 2 回洗浄し、エアダスター (ホーザン) で試験体表面を十分に風乾した。
3. 細菌とその培養方法： Brain Heart Infusion 培地 (日本 BD) を用いて *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) を培養 (37°C, 6時間) した。試験体を 4 mL/枚の菌液 (1×10<sup>5</sup> CFU/mL) 中に浸漬し、12 時間培養した。
4. アデノシン三リン酸 (ATP) 量の測定： 細菌の ATP 量は、ルシフェール HS キットおよびルミテスター C-110 (キッコーマンバイオケミファ) を用いて測定した (検出範囲：1×10<sup>-16</sup>~3×10<sup>-11</sup> mol ATP)。細菌以外の ATP は、キット付属の試薬で分解した。
5. 光分析法： 試験体表面の分子構造の評価は、ラマン分光計 (NRS-3100 : 日本分光) を用いた (波長：532 nm, 測定時間：10 秒, 測定範囲：100~4,000 cm<sup>-1</sup>)。また、試験体表面からの CPC の溶出量の評価は、紫外可視近赤外分光光度計 (PS-4000 : 日本分光) を用いた (測定範囲：190~300 nm)。具体的には、0.4 mL の試験溶液を滴下後に自然乾燥させた試験体を 16 mL の純水中に浸漬し、1 時間後と 48 時間後に吸光度を測定した。
6. 統計解析： One-way ANOVA (GraphPad Prism) を用いた。統計学的有意差の判定基準は、 $p < 0.05$  とした。

#### 【結果】

1. CPC-GO の抗菌効果： CPC-GO は、CPC が 0.1 % (w/v) 以上の濃度において、陰性対照群より有意に細菌 ATP 量を抑制した。また、CPC が 0.1 % (w/v) 未満の濃度においても同様の傾向を示したが、有意差はなかった。
2. 抗菌試験後の試験体表面における分子構造の変化： CPC-GO で処理した試験体表面では、GO 単体で処理した試験体と同様に、1,450 cm<sup>-1</sup>、及び 1,580 cm<sup>-1</sup> 付近で特徴的なラマンスペクトルのピークが観察された。その一方で、CPC 単体で処理した試験体では、特徴的なピークは観察されなかった。
3. CPC-GO における CPC 溶出量の分析： CPC 単体で処理した試験体では、260 nm 付近に吸収スペクトルのピークが観察されたが、CPC-GO で処理した試験体では、48 時間後においても同様のピークは観察されなかった。その一方で、GO, CPC の順に独立して処理した試験体においては、CPC 単体で処理した試験体と同様のピークが観察された。

#### 【考察・結論】

上記の結果から、CPC-GO は物体表面において GO を介して滞留し、CPC が持つ抗菌効果を持続させる可能性が示唆された。ただし、本研究で用いた試験体はシリコンのみで限定的な条件であることから、今後は CPC-GO の汎用性について検証を行い、具体的な応用可能性を模索する。

会員外協力者：仁科 勇太 (岡山大学異分野基礎科学研究所)

## 各種イオン混合溶液によるヒト歯髄幹細胞の分化誘導効果

日本歯科大学新潟生命歯学部 歯科保存学第2講座

○宮野 侑子、佐藤 史明、鈴木 雅也

### The effects of ionic liquid mixtures on induction of differentiation of human dental pulp stem cells

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

○MIYANO Yuko, SATO Fumiaki, SUZUKI Masaya

#### 【緒言】

6種のイオンを徐放する Surface Pre-reacted Glass-ionomer (以下 S-PRG) フィラーが配合されたコンポジットレジン (以下 CR) が臨床で使用されている。当講座では、ラット歯の露髄面に S-PRG フィラー配合 CR を適応した研究において、第三象牙質の形成が促進される所見を認めたことから、イオン徐放性 CR 覆髄剤の開発に向けた研究を進めている。これまでに、ヒト歯髄幹細胞 (Human Dental Pulp Stem Cells, 以下 hDPSC) と生体外の細胞培養モデルを用いた研究<sup>1)</sup>で、S-PRG フィラーから徐放されるイオンのうち、 $\text{Sr}^{2+}$  (以下 Sr) または  $\text{SiO}_3^{2-}$  (以下 Si) の添加が象牙芽細胞様細胞 (Odontoblast-Like Cells, 以下 OLC) への分化を、 $\text{BO}_3^{3-}$  (以下 B) の添加が硬組織の形成を促すことを報告した。しかし、複数のイオンが混在した場合の影響については、いまだ解明されていない。

本研究の目的は、hDPSC の OLC への分化と硬組織形成を誘導する最適なイオンの混合比率を検索するため、イオン混合溶液による hDPSC の OLC への分化誘導効果を評価することである。

#### 【材料と方法】

10%ウシ胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地に、継代数5代目の hDPSC (Lonza) を  $1.0 \times 10^4/\mu\text{L}$  の濃度で播種し、30%コンフルエンスになるまで培養した。イオン混合溶液 (Sr - Si - B) の濃度 (mM) は、LHH (0.25 - 1.0 - 0.5)、LHL (0.25 - 1.0 - 0.05)、LLH (0.25 - 0.1 - 0.5) および LLL (0.25 - 0.1 - 0.05) の4種類とした。対照群 (C) はイオン非添加とした。なお、各イオン溶液 (50 mM) は (株) 松風より提供を受けた。培地にイオン混合溶液を添加してから7日 (D7)、D14 および D21 の細胞を試料とした ( $n = 6$ )。リアルタイム PCR は、Perfect Real Time (Takara) と Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて測定した。遺伝子発現は  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法で定量化し、GAPDH mRNA レベルに正規化した。プライマーは、象牙芽細胞マーカー遺伝子である nestin を使用した。得られたデータは、培養期間ごとにデータの等分散性に応じて Kruskal-Wallis test と Scheffe's post-hoc test を用いて統計的に検定した ( $\alpha = 0.05$ )。

#### 【結果と考察】

nestin の発現量の平均値 (標準偏差) は、D7 で LHH : 0.005 (0.004)、LHL : 0.010 (0.005)、LLH : 0.124 (0.088)、LLL : 0.030 (0.032)、C : 0.071 (0.115)、D14 で LHH : 0.400 (0.217)、LHL : 0.025 (0.011)、LLH : 0.025 (0.008)、LLL : 0.007 (0.003)、C : 0.018 (0.020)、D21 で LHH : 0.093 (0.041)、LHL : 0.066 (0.053)、LLH : 0.100 (0.080)、LLL : 0.007 (0.004)、C : 0.021 (0.023) であった。D7 では LLH 群が LHH 群よりも有意に高値を示し ( $p = 0.0457$ )、D14 では LHH 群が LLL 群 ( $p = 0.0011$ ) および C 群 ( $p = 0.0323$ ) よりも有意に高値を示した。D21 では、LHH 群が LLL 群 ( $p = 0.0385$ )、LLH 群が LLL 群 ( $p = 0.0497$ ) よりも有意に高値を示した。すべての培養期間において、LLL 群と C 群の nestin の発現量は低い傾向にあったが、C 群は全ての培養期間を通してほぼ一定の発現がみられた。LLH 群の発現量は、時間経過に伴い二峰性を示した。

単一イオンの影響を評価した当講座の過去の研究<sup>1)</sup>において、D21 に Si 群と B 群の nestin の発現量の上昇がそれぞれ認められたが、本研究においても過去の報告とおおむね一致する結果が得られた。一方、イオンの濃度による nestin の発現量および発現時期の違いは過去のデータと合致する点は少なかった。nestin は OLC の分化段階に応じて発現が増強することから、各種イオンの混合が hDPSC の OLC への分化に何らかの影響を与えたと考えられる。

本研究は JSPS 科研費 23K19760 の助成を受けたものである。

参考文献： 1) Miyano Y *et al.*, Biol Trace Elem Res. 201: 5585-5600, 2023.

## **Candidalysin Enhances the Production of Calprotectin via ERK and JNK Pathway in THP-1-differentiated Macrophages**

○ Resi Manua Yassa<sup>1</sup>, Yasufumi Nishikawa<sup>2</sup>, Yuta Uemura<sup>1</sup>, Hiromichi Yumoto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>) Department of Periodontology and Endodontology, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences

<sup>2</sup>) Oral Implant Center, Tokushima University Hospital

### **【Background and Objective】**

*Candida albicans* has been reported to be detected in the oral cavity (buccal mucosa, tongue, and gingival sulcus, etc.) of patients with compromised immune function due to aging or systemic diseases, such as diabetes. This fungus has been shown to produce a toxin (Candidalysin; Cly) that causes cytotoxicity. Macrophages are known to be important cells in the phagocytosis of microorganisms in the infected sites. However, the effect of Cly on macrophages remains unclear. In this study, we aim to further investigate the effects of Cly on macrophages, especially the production of Reactive Oxygen Species (ROS).

### **【Materials and Methods】**

THP-1 cell ( $5 \times 10^5$  cells/mL) were stimulated by 80 ng/mL of Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 24 hours until it differentiated become macrophages. THP-1-differentiated macrophages were stimulated with commercially available Cly (PEPTIDE Institute. Inc.). LDH assay was conducted to determine the cytotoxicity of Cly in THP-1-differentiated macrophages. Calprotectin production level induced by Cly stimulation was measured using an ELISA kit. To elucidate the possible pathway mechanism of the calprotectin production, UO126 (ERK inhibitor) and SP600125 (JNK inhibitor) were used. Furthermore, to confirm the phosphorylation pathway, Western blot was performed. The production of Cly-induced Reactive Oxygen Species (ROS) was observed by fluorescence microscopy. N-acetyl-L-cysteine/NAC was used as ROS inhibitor.

### **【Results】**

The maximum concentration of Cly was set at 0.5  $\mu$ M by cytotoxicity testing. Cly significantly enhanced the production of calprotectin in THP-1-differentiated macrophages in a time and concentration dependent manner. Western blot results showed that Cly activated ERK and JNK pathways. Furthermore, the production of calprotectin was significantly reduced by the treatment with UO126 and SP600125. Moreover, fluorescence microscopic observation confirmed that Cly induced ROS production in THP-1-differentiated macrophages. Calprotectin production was also significantly reduced by the treatment with NAC.

### **【Conclusions】**

These findings indicate that stimulation with Cly induces ROS production, which in turn activates the ERK and JNK signaling pathways, and this activation leads to the subsequent secretion of calprotectin in macrophages. This study may contribute to the development of therapeutic strategies targeting inflammation induced by fungal infections.

## BMP-2 配合ゼラチンハイドロゲルを成体ラットに用いた場合の骨形成に及ぼす低出力超音波パルスの影響

<sup>1)</sup>岡山大学学術研究院医歯薬学域 歯科保存学分野, <sup>2)</sup>岡山大学病院 医療支援歯科治療部  
○山路公造<sup>1)</sup>, 横山章人<sup>1)</sup>, 高橋 圭<sup>1)</sup>, 松崎久美子<sup>2)</sup>, 神農泰生<sup>1)</sup>, 大原直子<sup>1)</sup>, 鈴木茂樹<sup>1)</sup>

### Effects of Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Bone Formation with Gelatin Hydrogel Containing BMP-2 in Adult Rats

<sup>1)</sup>Department of Operative Dentistry, Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

<sup>2)</sup> Division of Hospital Dentistry, Central Clinical Department, Okayama University Hospital

○YAMAJI Kozo<sup>1)</sup>, YOKOYAMA Akihito<sup>1)</sup>, TAKAHASHI Kei<sup>1)</sup>, MATSUZAKI Kumiko<sup>2)</sup>,  
SHINNO Yasuo<sup>1)</sup>, OHARA Naoko<sup>1)</sup>, SUZUKI Shigeki<sup>1)</sup>

#### 【目的】

低出力超音波パルス (LIPUS) は, 骨芽細胞の増殖や分化, 血管新生を促進し, 骨形成や骨折治癒を促進させることから骨折治療等において非侵襲的な治療法として臨床応用されている。骨形成タンパク質 (BMP) は硬組織誘導能を持つサイトカインと考えられており, 特に BMP-2 は骨形成を強力に誘導することが知られている。ゼラチンハイドロゲルは医療分野で広く利用されている生体適合性の高いバイオマテリアルであり, 成長因子の担体 (足場材) や薬剤の送達システムとして有用性が高いことが報告されている。また歯周病などで失われた歯槽骨などに骨再生療法を応用する場合, 対象の多くは成人であることから成体期の動物で検討する必要がある。そこで本研究は, BMP-2 配合ゼラチンハイドロゲルを用いた骨形成に LIPUS が及ぼす影響について, 成体ラットを用いて評価した。

#### 【材料と方法】

本研究は岡山大学の動物実験ガイドラインに基づき, 12 週齢の成体オス Wistar/ST ラット 24 匹を使用した (承認番号 OKU-2020481, OKU-2023414)。移植材はゼラチンハイドロゲル (Gel) と, これに BMP-2 を配合したもの (0.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  および 1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) を使用した。LIPUS はオステオトロン (伊藤超短波株式会社) を使用し, 出力条件 (1.5 MHz, 30  $\text{mW}/\text{cm}^2$ , 10 分間) にて 3 日毎に照射した。全身麻酔下にてラット口蓋部の粘膜骨膜弁を剥離し移植材を骨膜下に移植した。ラットは条件により以下の 4 群に分類した。

1. LI-BMP 群: BMP-2 配合 (1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) Gel を移植し, LIPUS を照射
2. BMP 群: BMP-2 配合 (1.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) Gel を移植
3. LI-Gel 群: BMP-2 無配合 (0.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) Gel を移植し, LIPUS を照射
4. Gel 群: BMP-2 無配合 (0.0  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) Gel を移植

観察期間は 3 週間とした。移植部位を含む上顎を採取し組織標本を作製した。組織学的観察および定量解析により新生骨を評価し, 各群の新生骨の厚さを測定し骨新生量 (TNB) とした。統計解析には一元配置分散分析および Bonferroni 補正 を用い有意水準 5% で統計処理を行った。

#### 【結果および考察】

組織学的観察では, 移植材は吸収され感染の所見は認められなかった。すべての群で新生骨形成を認め既存骨と概ね連続して形成されていた。特に LI-BMP 群では既存骨と新生骨がほぼ一体化されていた。定量解析では, TNB は LI-BMP 群および BMP 群のいずれも, LI-Gel 群および Gel 群に比べ有意に高い値を示した。また LI-Gel 群は Gel 群に比べて有意に高い値を示した。一方で LI-BMP 群と BMP 群の間では有意差は認められなかった。以上の結果から, ゼラチンハイドロゲルは BMP-2 の担体として有用な材料であることが考えられる。また LIPUS を併用することで既存骨と新生骨がほぼ一体化されていたことから, LIPUS の刺激により骨形成や骨成熟が促進される可能性が示唆された。LI-BMP 群と BMP 群の間で有意差を認めなかったのは, いずれの群も BMP-2 による骨形成促進効果が強く認められており, その結果差が検出されにくかったためと考えられる。

#### 【結論】

本研究の条件下で BMP-2 配合ゼラチンハイドロゲルを成体ラットに用いた場合, LIPUS 併用は骨形成に有用である可能性が示唆された。

## 咽頭喉頭部粘膜上皮傷害ラットにおける TRPV1 及び TRPA1 依存性嚥下反射

<sup>1)</sup>九州歯科大学歯学部口腔機能学講座口腔保存治療学分野, <sup>2)</sup>九州歯科大学歯学部生理学分野  
○御手洗 直幸<sup>1,2)</sup>, 折本 愛<sup>1)</sup>, 北村 知昭<sup>1)</sup>

### TRPV1- and TRPA1-dependent swallowing reflex in rats with mucosal epithelial injury of the pharyngolaryngeal region

<sup>1)</sup>Division of Endodontics and Restorative Dentistry, Department of Oral Functions, Kyushu Dental University,

<sup>2)</sup>Division of Physiology, Kyushu Dental University

○MITARAI Naoyuki<sup>1,2)</sup>, ORIMOTO Ai<sup>1)</sup>, KITAMURA Chiaki<sup>1)</sup>

【目的】嚥下反射は、咽頭喉頭部上皮への水および化学刺激により引き起こされる。咽頭喉頭部には TRPV1, TRPA1 が発現しており、それぞれのアゴニストを作用させると嚥下反射を誘発することが報告されている。しかしながら、TRPV1, TRPA1 を介した化学刺激の受容に、粘膜上皮がどのように関わっているかまだわかっていない。我々はこれまでの研究にて、咽頭喉頭部粘膜上皮に傷害を受けたラットでは水嚥下反射が低下することを報告している。本研究では、咽頭喉頭部の粘膜上皮に傷害を誘発させたラットにおける TRPV1, TRPA1 依存性嚥下反射について検討した。

【方法】実験には雄性 Wistar ラットを用い(九州歯科大学動物実験委員会、承認番号 24-010)、三種混合麻酔下にて、咽頭喉頭部に 10% 酢酸を局所塗布し粘膜傷害を誘発した。刺激溶液として、蒸留水、TRPV1 作動薬カプサイシン (10  $\mu$ M、溶媒:0.1%エタノール生理食塩水)および TRPA1 作動薬 Allyl isothiocyanate (AITC) (30 mM、溶媒:0.1%DMSO 生理食塩水) を使用し、コントロールにはそれぞれの溶媒を使用した。嚥下反射は、三種混合麻酔下にて小動物用内視鏡を用いて観察した。シリンジポンプにて咽頭喉頭部に刺激溶液を一定速度で投与し、喉頭蓋挙上による内視鏡画像のホワイトアウトを嚥下反射として評価した。各溶液の投与は 3 回行い、投与毎に生理食塩水で洗浄した。嚥下測定は酢酸処理 1 週間前と酢酸処理後翌日に行い、測定項目は、潜時、嚥下間隔、嚥下回数とした。粘膜傷害による TRPV1, TRPA1 の発現の変化を調べる為に組織蛍光免疫染色を行った。酢酸処理 1 日後において、三種混合麻酔下で脱血、4% パラホルムアルデヒドで灌流固定後、咽頭喉頭部を摘出し、厚さ 10  $\mu$ m の凍結切片を作成した。コントロール群として、酢酸の代わりに蒸留水を咽頭喉頭部に塗布したラットを用いた。免疫染色には、一次抗体はヒツジ抗 TRPA1 抗体 (1:500)、ウサギ抗 TRPV1 抗体 (1:1000) を使用し、二次抗体はロバ抗ヒツジ IgG 抗体 (1:400)、ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (1:400) を使用した。

【結果】健常ラットと比較し、粘膜傷害後では水嚥下反射の潜時と嚥下間隔が有意に延長し、嚥下回数が有意に減少しており、これまでの我々の研究結果と一致して、粘膜傷害による水嚥下反射の抑制が認められた。健常ラットにおけるカプサイシン誘発嚥下反射は、3 回の投与順に応じて潜時及び嚥下間隔の延長と嚥下回数の低下を示し、著しい脱感作を示した。粘膜傷害後では 3 回目の投与における嚥下間隔が有意に短縮し、嚥下回数が有意に増加した。これは、粘膜に生じた炎症の影響で TRPV1 が活性化し、脱感作が抑制された可能性を示唆している。AITC 誘発嚥下反射については、健常ラットにおいて連続投与により緩やかな脱感作を示した。粘膜傷害後は、有意な潜時の延長が観察されたが、嚥下間隔と嚥下回数に変化はなかった。免疫染色において、コントロール群では、咽頭後壁上皮層において線維状の TRPA1 陽性像を認めたが、TRPV1 陽性像はほとんど観察できなかった。一方、アリテノイド上皮層においては、TRPV1, TRPA1 陽性像を豊富に認めた。粘膜傷害群では、咽頭後壁の上皮層が剥がれ、TRPV1, TRPA1 陽性像は確認できなかったが、アリテノイド上皮は残存しており、TRPV1, TRPA1 陽性像を認めた。

【考察】咽頭喉頭部の粘膜上皮傷害により TRPA1 依存性嚥下反射は抑制され、TRPV1 依存性嚥下反射は活性化する可能性が示唆された。咽頭喉頭部上皮粘膜での TRPV1 及び TRPA1 の分布が異なることから、これらの嚥下反射の变化は、各受容体の局在や分布密度の違いが関与している可能性が示唆された。

【結論】咽頭喉頭部の粘膜傷害は、TRPV1, TRPA1 依存性嚥下反射に影響を与える。

【謝辞】本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました九州歯科大学生理学分野の小野堅太郎教授、中富千尋助教、徐嘉鍵助教に謝意を表します。

## 当院における感染性心内膜炎リスク群患者への周術期口腔機能管理の現状と課題

岩手医科大学歯学部 歯科保存学講座 歯治療学分野  
飛嶋彩恵子, ○千田弥栄子, 大塚泰寛, 清水峻介, 浅野明子, 菅徹也,  
北條友宣, 東兼司, 相上雄亮, 鈴木大平, 野田守

### Current status and problems of perioperative oral function management for patients at risk of infective endocarditis in our hospital

Division of Operative Dentistry and Endodontics, Department of Conservative Dentistry,  
School of Dentistry, Iwate Medical University  
Saeko Tobishima, ○Yaeko Chida, Yasuhiro Otsuka, Shunsuke Shimizu, Akiko Asano, Tetsuya Kan,  
Tomohisa Hojo, Kenji Higashi, Yusuke Aigami, Taihei Suzuki, Mamoru Noda

【緒言】弁膜疾患、ペースメーカー装着患者は年々増加している。これらが感染性心内膜炎（以下 IE）のリスク群であることは周知の事実である。当分野では心臓血管外科、循環器内科から術前の口腔内感染源の除去依頼を受け、周術期口腔機能管理を行っている。本来であれば、術前に感染根管処置や残根・動揺歯の抜去を行い、顎骨内の感染源の除去に努める必要がある。しかし、在院日数や手術待機期間の短縮に伴い、実施できる歯科処置は限定されてしまい、術前の感染源除去は困難な現状である。そのため、感染源除去は退院後に当院歯科医療センターまたはかかりつけ歯科医へ依頼している。今回、循環器疾患の中でも口腔内細菌由来の感染が感染性心内膜炎のリスクとなる弁膜疾患、ペースメーカー装着患者を対象とし、周術期の歯科紹介から手術までの期間と退院後の患者の歯科受診の動向、周術期術前口腔ケア介入時の TBI 前後のブランクコントロールレコード（以下 PCR）の変化を調査した。なお本研究は岩手医科大学倫理審査委員会の承認を受けている。（審査番号 MH2024-066）

【対象と方法】令和 4 年 1 月 1 日から令和 5 年 12 月 31 日までに周術期口腔管理目的で心臓血管外科、循環器内科より依頼のあった弁膜疾患、ペースメーカー装着患者 238 名（男性 150 名、女性 88 名、平均年齢 68.8±12.1 歳）を対象とした。当院の電子診療録から、対象患者の原疾患、原疾患への術式および手術日、入院日、退院日、歯科紹介日を抽出した。歯科的項目として、口腔内感染巣となる根尖性歯周炎、要抜歯部位の有無、PCR、口腔内細菌数、退院後の歯科治療紹介先を調査した。根尖性歯周炎、要抜歯歯については、当分野の周術期カンファレンスで決定した歯科治療方針を元に判断した。また、術前の口腔内細菌数と PCR の相関を検討した。さらに、65 歳以上の患者には記憶付加型時計描画テスト（以下 Me-CDT）による認知機能のスクリーニングを行い、Me-CDT スコアと PCR の相関について検討した。

【結果と考察】心臓血管外科、循環器内科からの歯科紹介患者の総数は 725 人で、そのうち IE リスク群患者は 238 人であった。平均入院日数は 19.0 日で、歯科への紹介から手術までの平均日数は 7.0±19 日であった。64.2%の患者には口腔内に感染源となる歯が存在していることが判明した。IE リスク患者のうち、術前後の PCR データを有する患者は 109 人で TBI 後 78 人は PCR が低下し 31 人が上昇した。術前の口腔内細菌数と PCR データを有する患者は 109 人で、相関係数は-0.03 であった。また、Me-CDT スコアと術前 PCR データを有する患者は 68 人で、Me-CDT スコアと PCR の相関係数は-0.13 であった。上述のように、術前の口腔内感染源除去は極めて困難であり、術後、紹介先の歯科で当科からの紹介状をもとに治療を行ってもらうケースが大半で、紹介先の多くは地域の歯科診療施設である。そのため、紹介先となるかかりつけ歯科が周術期口腔管理で担う役割は非常に大きいと考えられる。すべての歯科医師が IE 予防に対する知識を携え適切な時期に感染源の除去を行うことが必要である。今回は相関を認めなかったが、口腔内細菌数の増加による、血行性の IE 発症が懸念されている。また、認知機能低下により、セルフケアの質の低下や、口腔内の不具合を認識して歯科を受療することができない、などによる口腔内環境の悪化が予想される。認知機能低下が疑われる場合、患者だけでなく患者家族へも、口腔内清掃方法や歯科の受診に関しての説明や指導が必須であると考えられる。

## 歯科用ユニット給水管路中のバイオフィーム形成菌同定と化学的洗浄効果の検証

<sup>1)</sup> 岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 歯周病態学分野, <sup>2)</sup> 岡山大学 学術研究院 医歯薬学域 歯周病態学分野,  
<sup>3)</sup> 岡山大学 歯学部 歯学科, <sup>4)</sup> 厚生労働省 保険局 医療課, <sup>5)</sup> 岡山大学病院 歯科・歯周科部門,  
<sup>6)</sup> 岡山大学病院 歯科・総合歯科部門

○中村 綾<sup>1)</sup>, 伊東 有希<sup>2)</sup>, 平田 滉季<sup>3)</sup>, 前田 直哉<sup>3)</sup>, 松浦 佑介<sup>3)</sup>, 伊東 孝<sup>4)</sup>, 大久保 圭祐<sup>5)</sup>,  
 伊東 昌洋<sup>2)</sup>, 武田 宏明<sup>6)</sup>, 大森 一弘<sup>2)</sup>, 山本 直史<sup>6)</sup>, 高柴 正悟<sup>2)</sup>

### Identification of Biofilm-Forming Bacteria and Evaluation of the Chemical Cleaning Effects on Dental Unit Water Lines (DUWL)

<sup>1)</sup> Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science, <sup>2)</sup> Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Faculty of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Science, Okayama University, <sup>3)</sup> Dental School, Okayama University, <sup>4)</sup> Medical Affairs Division, Health Insurance Bureau, Ministry of Health, Labour and Welfare, <sup>5)</sup> Department of Periodontics and Endodontics, Division of Dentistry, Okayama University Hospital, <sup>6)</sup> Department of Comprehensive Dentistry, Division of Dentistry, Okayama University Hospital

○ NAKAMURA Aya<sup>1)</sup>, SHINODA-ITO Yuki<sup>2)</sup>, HIRATA Koki<sup>3)</sup>, MAEDA Naoya<sup>3)</sup>, MATSUURA Kosuke<sup>3)</sup>, ITO Takashi<sup>4)</sup>,  
 OKUBO Keisuke<sup>5)</sup>, ITO Masahiro<sup>2)</sup>, TAKETA Hiroaki<sup>6)</sup>, OMORI Kazuhiro<sup>2)</sup>, YAMAMOTO Tadashi<sup>6)</sup>, TAKASHIBA Shogo<sup>2)</sup>

キーワード：歯科用ユニット給水管路, バイオフィーム, 従属栄養細菌, 院内感染

【緒言】 歯科治療時に使用する水は、歯科用ユニット給水管路 (Dental Unit Water Lines : DUWL) を通して、一般の水道水を使用している。夜間や休診時には DUWL 内に水道水が停滞して水中の塩素濃度が低下するため、従属栄養細菌由来のバイオフィームが形成される。これは健康者に無害な細菌量・細菌叢であっても、近年増加しているがん治療患者や臓器移植患者などの易感染者にとっては日和見感染の原因となり得る。DUWL の細菌汚染による院内感染リスクを低減するため、これまで中空糸膜フィルターの定期的交換、ハンドピース回路内での逆流防止装置の使用、始業前のフラッシング、そして DUWL 内の化学的洗浄などが推奨されている。しかし、使用期間が長い歯科用ユニットにおいて、これらの持続的効果は明確ではない。

本研究では、歯科診療室の移転を機会に新旧の歯科用ユニットにおける汚染状況の把握とこれらの対策効果の検証を目的に、DUWL の水中やチューブ内に存在する微生物の生菌数測定と同定を行った。

#### 【材料と方法】

- 岡山大学病院の歯科診療室 (歯周科部門と総合歯科部門) に設置されている使用開始後 1 年以内とそれ以上の新旧歯科ユニットのうち、化学的洗浄 (隔週) 実施の歯科ユニットの①化学的洗浄前と②化学的洗浄 1 日使用後、そして③化学的洗浄未実施の歯科ユニットから、DUWL を通過した水を用いた。採水は、術者側のスリーウェイシリンジから、1 分間のフラッシング後にシリンジ先端を 78% 清拭用エタノールで消毒して、遠沈管へ 15 mL 採取した。対照には、診療室の水道水を使用した。さらに、化学的洗浄未実施の歯科用ユニットの整備時に 1 年間使用したフィルターを、また 10 年間使用した歯科ユニットから DUWL チューブを回収した。
- 採水サンプルは、標準寒天培地とサブロー寒天培地 (37°C, 大気下, 2 日間), R2A 寒天培地 (室温, 大気下, 1 週間), そしてブルセラ血液寒天培地 (37°C, 嫌気下, 1 週間) に、100 μL ずつ播種して培養した。コロニー数を計測し、単離培養後にグラム染色して検鏡した。単離コロニーは、遺伝子配列解析後に BLAST 検索を実施して、特定の遺伝子配列との相同性を調べた。
- 回収したフィルターと DUWL チューブの内壁は、走査型電子顕微鏡で表面を観察した。また、DUWL チューブの内壁から得られたバイオフィームは、採水サンプルと同様の培養と遺伝子配列解析を実施した。
- 統計解析には one-way ANOVA を用い、有意水準を P<0.05 とした。

#### 【結果】

- 標準寒天培地と R2A 寒天培地でコロニーが形成した。化学的洗浄の有無に関わらず、新旧いずれの歯科ユニットでも生菌数に差はなかった。また、全ての条件で疾病対策予防センター (Centers for Disease Control and Prevention : CDC) の基準値 (500 CFU/mL) を上回るユニットが複数台あった。各条件の総数に対して、基準を超えるユニット台数が占める割合は③が多く、①より約 3 倍、②より約 1.5 倍であった。
- 培養の結果、白、黄、桃、橙色のコロニーが形成され、グラム染色で桿菌、球菌、芽胞形成桿菌を確認した。BLAST 検索の結果、従属栄養細菌である *Bradyrhizobium* 属 (*B. roseum*)、*Afipia* 属 (*A. broomeae*)、*Sphingomonas* 属 (*S. ursincola*, *S. echinoides*, *S. rhizogenes*, *S. ginsenosidimitans*, *S. carotinifaciens*)、*Mycobacterium* 属、*Rhodoferrax ferrireducens* (鉄還元細菌) を、従属栄養細菌的な代謝を併せ持つ細菌である *Methylobacterium* 属 (*M. nodulans*, *M. isbiliense*; メタノール利用細菌) を、さらに従属栄養性の真菌である *Cadophora malorum* を同定した。
- 1 年間使用したフィルター表面には、水中に含まれる無機質成分の析出と少量のバイオフィームを検出した。
- 10 年間使用した DUWL チューブ内壁のバイオフィームからは、従属栄養細菌である *Kocuria* 属 (*K. rhizophila*) や *Cutibacterium* 属 (*C. acnes*) を同定した。

【考察】 本研究の結果から、日々のフラッシングや化学的洗浄による DUWL 除染効果は完全ではないことが示された。中空糸膜フィルターには一定の除染効果はあるものの、水道中の微生物はフィルターを通過し、歯科治療時に使用する水に含まれるだけでなく、経年的に DUWL 内にバイオフィームを形成することがわかった。DUWL はその構造上、バイオフィームが形成されるとその除去は困難なため、バイオフィームを形成しにくい予防的対応が重要である。また、DUWL を通過後の水中生菌数は歯科ユニットの稼働率や使用状況により左右された。これらの知見は、DUWL の衛生管理方法の改善および院内感染のリスク低減に寄与する重要なデータとなる。

## 肝炎ウイルスや標準的予防策に対する教育および患者への配慮に関する啓発活動

徳島大学大学院 医歯薬学研究部 歯周歯内治療学分野  
○湯本浩通

**Education on hepatitis viruses and standard precautions, and awareness-raising activities on patient care**  
Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences, Department of Periodontology and Endodontology  
○Hiromichi Yumoto

### 【目的】

2019 新型コロナウイルス(2019-nCoV, SARS-CoV-2) が、中国湖北省武漢市付近で発生が初めて確認され、その後、COVID-19 の世界的流行(pandemic)を引き起こし、世界中で社会活動や経済活動に多大な影響を及ぼしたことは記憶に新しい。歯科診療において、歯科医療従事者は、患者の唾液や血液等の体液に曝露されることが多く、SARS-CoV-2 のみならず肝炎ウイルス等からの感染予防として標準予防策の徹底は肝要であるが、肝炎ウイルスに関する知識や標準予防策が十分でない場合、肝炎患者の診療に影響をもたらす。そこで、歯科医療従事者向け動画を作成する等、肝炎ウイルスや標準予防策に対する教育および肝炎患者への配慮に関する啓発に関する我々の研究活動について報告する。

### 【これまでの啓蒙活動とその結果】

「肝炎ウイルスや標準予防策に対する教育および肝炎患者への配慮に関する啓発」を目的として「歯科医療従事者に知ってほしい B 型肝炎, C 型肝炎のこと」という約 20 分の動画を作成し、動画視聴およびアンケート調査について、「肝炎ウイルスに関する歯科医療従事者向けの e ラーニング作成のためのアンケート調査」として、徳島大学病院生命科学・医学系研究倫理審査委員会(申請番号: 4381)および北海道医療大学予防医療科学センター倫理審査委員会(申請番号: 2023\_006)での承認を得て実施した。本研究に同意が得られた徳島大学、北海道医療大学および徳島県歯科医師会の 343 名の歯科医師に視聴していただいた結果、動画の構成については概ね良好な意見が多かった「B 型肝炎ワクチンの定期接種」「B 型肝炎ウイルスの体外の感染可能持続期間」「肝炎検査の助成」「HCV 抗体が中和抗体でないこと」を知っていた歯科医師は半数以下で、若い歯科医師では「C 型肝炎が近年治療できる」ことを知らない割合が多かった。体液が環境面に付着した際の消毒薬は、次亜塩素酸ナトリウム、アルコール、クロロヘキシジンの順に回答していたが、若い歯科医師でアルコールを消毒薬として使用する割合が多かった。また、約 45%の開業医では針刺し等の刺傷時に対応できる内科への連携ができておらず、その理由として、「連携方法が分からない」や「近くに連携先がない」が大半であった。肝炎医療コーディネーターについては、約 7 割の歯科医師(コメディカルも含む)が資格取得を検討していたが、取得の必要性を感じない年配の歯科医師の割合も多かった。

### 【今後の啓蒙活動】

今回作成した動画のアンケート調査結果から、肝炎ウイルスや標準予防策に関する継続的な学習の必要性が確認されたので、今後は、患者のプライバシーを尊重しながら全身疾患を把握できるような問診表を作成すると共に、肝炎患者に対する安全な歯科治療と配慮を担えるような問診のあり方等について改善した動画を完成させる予定である。さらに、日本歯科医師会ならびに厚生労働省から内容等の確認と承認をいただき、都道府県歯科医師会や大学および関連病院等へ対象を拡大して、動画の有用性についてアンケート調査を行う予定である。

本研究は、厚生労働科学研究(肝炎等克服政策研究事業)「オーダーメイドな肝炎ウイルス感染防止・重症化予防ストラテジーの確立に資する研究(研究責任者: 四柳宏, 研究分担者: 河野豊)」の一環として行われた。

研究協力者: 東京大学医科学研究所付属先端医療研究センター感染症分野 四柳宏

徳島大学大学院医歯薬学研究部 実践地域診療・医科学 河野豊

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系高度先進補綴学分野 舞田健夫

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系保健衛生学分野 植原治

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野 安彦善裕

徳島大学大学院医歯薬学研究部口腔内科学分野 青田桂子

徳島大学大学院医歯薬学研究部消化器内科学分野 高山哲治

**CAMBRA を用いたジュニアアスリートのカリエス評価について  
～第2報 CAMBRA123 への移行型とその経過～**

ハイパフォーマンススポーツセンター 国立スポーツ科学センター  
○豊島由佳子/岩崎圭祐/三ツ山晃弘/高垣智博

**Caries Risk Assessment of Junior Athletes Using CAMBRA**

**～Second Report - Shift to CAMBRA123 and Subsequent Development～**

Japan High Performance Sport Center / Japan Institute of Sport Sciences

○Yukako Toyoshima / Keisuke Iwasaki / Akihiro Mitsuyama / Tomohiro Takagaki

【緒言】我々は昨年の本学会 (161 回) において、ジュニアアスリートの予防プログラム開始時の検診およびリスク評価結果について報告した。トップアスリートを目指す選手は、日々の練習、遠征、試合に加え、学業や身の回りの支度等に追われ、就寝前のブラッシングが疎かになっている事象も見られた。また、スポーツフードや補食を摂取する選手も存在していた。これらの結果を踏まえ、リスクに応じたリコールを実施し、予防処置およびう蝕リスクコントロールを実施した。今回は第 2 報として、その後の取り組みについて報告する。なお今回から CAMBRA (Caries Management by Risk Assessment) 123 に移行したため、その基準を用いて行った。

【対象・方法】被験者は、国立スポーツ科学センタークリニック (以下: JISS) において、2023 および 2024 年度の検診を受けたジュニアアスリート 20 名 (13-17 歳)、男子 5 名 (平均 15.8 歳)、女子 15 名 (平均 15.5 歳) ならびに 2024 年度初診の 2 名 (女子 2 名 14.5 歳) である。対象者に対し、検診を実施した。その内容は、問診、パノラマ X 線撮影、歯科医師による口腔内診査 (歯式、歯周組織検査 (CPITN)、咬合診査、顎関節症状の有無) およびカリエスリスク評価である。カリエスリスク評価は、「CAMBRA123」へ移行したため、唾液検査 (カリスクリーン) は実施しなかった。検診後のリスク評価結果を参考に、リスク判定に応じたリコール (3 および 6 か月毎) を実施した。その際には、セルフケア方法の確認と予防処置 (PMTC、フッ化物塗布) を行った。また診査の上で治療が必要と判断した場合には治療を行った。(倫理委員会承認番号 令和元年 12 月 23 日-049)

【結果】初診 2 名を加えた 22 名の DMFT は、3.3 本 (D0.4/M0.0/F2.9) であり、カリエスリスク分類では、ハイリスク:10 名、ミドルリスク:6 名、ローリスク:6 名であった。継続者 20 名の DMFT は 3.4 本 (D0.2/M0.0/F3.2) であり、う蝕罹患患者は 3 名 (15%) であった。2024 年の検診において、う蝕罹患患者 3 名のうち、1 名は矯正治療中の隣接面う蝕により、治療を行っている。次の 1 名は JISS 以外の歯科医院で治療を受けており、根管治療中だったため、う蝕歯と判断した。残り 1 名はう蝕リスクが高く、リコール頻度を増やしているが、本人の意識づけが難しく、新規う蝕を発生するに至った。また、問診において、歯磨剤の選択基準についての質問では、「虫歯予防効果」と回答した選手は、19 名 (86.4%) であったが、現状使用している歯磨剤を確認したところ、すべての選手でフッ化物配合歯磨剤を使用していることが確認できた。さらに、フッ化物高配合歯磨剤 (1450ppm) を使用している選手は、15 名 (68.2%) であった。また、エナジードリンクを摂取している選手は 3 名 (13.6%)、サプリメント摂取者は 6 名 (27.3%) であり、週 1 回以上の間食の摂取者 (糖分を含む菓子・清涼飲料水) は 21 名 (95.5%) であった。

【考察】虫歯予防への意識は高まりつつある中、問診結果から歯磨きペーストの選択基準において「虫歯予防」を選択しなかった選手は 3 名確認したが、結果的に全員がフッ化物配合歯磨剤を使用していた。しかしながら、30%の選手は未だフッ化物高配合歯磨剤を使用してはいなかった。今後、本人だけでなく、保護者や養育者を含めた包括的な啓発が必要であると考えられる。具体的には、推奨する歯磨剤の種類、適切な使用方法、使用頻度等について、より詳細な情報提供と指導が必要と思われる。また、スポーツフードや間食の摂取が一定数の選手に見られることから、これらの摂取タイミングや頻度、口腔ケアとの関連についても指導を強化する必要がある。特に、練習や試合後の栄養補給と口腔衛生管理の両立について、具体的な指針を提示することが重要であると考えられる。アスリートの口腔健康管理は、単にう蝕や歯周病の予防にとどまらず、全身の健康維持やパフォーマンス向上にも寄与する可能性がある。したがって、歯科医療従事者だけでなく、栄養士、コーチなど、多職種が連携してアスリートの口腔衛生管理に取り組む体制の構築が必要と示唆された。

**The effects of low-dose 2-hydroxyethyl methacrylate  
and 10-Methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate  
on cell viability in human embryonic palatal mesenchyme cell**

○Yu-Hsiang Cheng, Wan-Yu Tseng, Tsung-Ching Wu

*Graduate Institute of Clinical Dentistry, National Taiwan University, Taipei, Taiwan*

*Department of Dentistry, National Taiwan University Hospital, Taipei, Taiwan*

I. Object

The purpose of this study was to explore the growth of cells in different concentrations of following functional monomers used in dental adhesives: 10-Methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (10-MDP) and 2-hydroxyethyl.

II. Materials and Methods

The cell line used for cell viability is human embryonic palatal mesenchyme (HEPM). The functional monomers, 10-MDP and HEMA, were diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) at concentrations ranging from 25 to 400  $\mu\text{M}$ . Cells not exposed to the compounds served as controls. The HEPM were seeded into 96-well plates and incubated for 24h. Subsequently, the cells were exposed to 10-MDP and HEMA for 1 day, 4 days, 7 days, 14 days and 28 days. The cell viability was measured with AlamarBlue assay. The data were analyzed using one-way ANOVA and Tukey's test.

III. Results

Regardless of the concentration and type of functional monomers, there were no significant differences ( $p>0.05$ ) among the groups during the early stages of the experiment (Days 1, 4, and 7). However, on Day 14, the cell viability in the control group was significantly higher than other experimental groups ( $p<0.05$ ). Among the other experimental groups, the group of 200  $\mu\text{M}$  HEMA + 25  $\mu\text{M}$  10-MDP was significantly higher than the others. On Day 28, the groups of 400  $\mu\text{M}$  HEMA+100  $\mu\text{M}$  10-MDP and 400  $\mu\text{M}$  HEMA+200  $\mu\text{M}$  10-MDP showed significant reduction of cell viability.

IV. Conclusions

This study investigated the effects of 10-MDP and HEMA on cell viability in human embryonic palatal mesenchyme (HEPM) cells to determine their toxic concentrations. No significant differences in cell viability were observed during the early stages (Days 1, 4, and 7). However, on Day 14, the control group showed significantly higher cell viability than all experimental groups. On Day 28, higher concentrations of HEMA (400  $\mu\text{M}$ ) and 10-MDP (above 200  $\mu\text{M}$ ) significantly reduced cell viability, with the combination of 200  $\mu\text{M}$  HEMA and 25  $\mu\text{M}$  10-MDP showing notable differences. These findings highlight the cytotoxicity of these functional monomers at higher concentrations

**Contact information of the authors**

Yu-Hsiang Cheng: MS student, Graduate Institute of Clinical Dentistry, National Taiwan University. E-mail address: stan0230069@gmail.com