

## 抗菌性モノマー配合ボンディング材のフィッシャーシーラントへの応用

蓮見 秀樹

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

Application to the Fissure sealant of antibacterial monomer combined bonding materials

HIDEKI HASUMI

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

蓮見秀樹 (2009) 松本歯学 35 : 261-9.

### 【目的】

フィッシャーシーラントは、小窩裂溝の齲蝕予防や初期齲蝕進行抑制手段として临床上極めて有用である。しかし、予後不良例も認められ、その原因としてブラシと酸処理による小窩裂溝内有機性残遺物の清掃が困難、シーラント材の破折による微細漏洩などがあげられ、二次齲蝕の原因となりうる。また、最近ではレジン系シーラントの前処理に用いるリン酸エッチングが、未成熟エナメル質へダメージを与えることが指摘されている。一方、広い抗菌スペクトルを有する第四アンモニウム塩の一種であるアルキルピリジニウム (12-Methacryloyloxydodecylpyridinium bromide : 以下, MDPB) をプライマーに配合したボンディング材が開発されたのに着眼した。この MDPB 配合ボンディング材は、プライミングと同時に殺菌作用が発揮され、硬化後は接着界面からの抗菌成分の溶出が生じず、経時的な接着界面の劣化が起こらないとされている。したがって、この MDPB 配合ボンディング材をシーラント材として用いることにより、予後向上に寄与できる可能性がある。

本研究では、MDPB 配合ボンディング材のプライミング時の殺菌作用だけでなく、硬化後にも抗菌力を持続させるために、光触媒作用により抗

菌性が期待できる酸化チタンを添加して、プライミング時とシーラント後の二段階の抗菌性を付与させた試作シーラント材を作製した。この試作シーラント材を用いた場合、酸化チタンが白色顔料にもなるため、シーラント後に発生する辺縁破折等の異常が容易に確認できると考えられる。

そこで本研究では、二段階の抗菌性と白色着色による識別性を付与させた試作シーラント材について、材料学的検討および細菌学的検討をおこなった。

### 【材料と方法】

#### 1. 試作シーラント材の作製

MDPB 配合ボンディング材である CLERFIL® MEGA BOND® FA (クラレメディカル) のボンディング液に、重量比0.001%の酸化チタンアナターゼ型を添加して、光照射で重合させたものとした (以下0.001% WPB)。

#### 2. 試験片の作製方法

実験群は0.001% WPBとした。対照群は MDPB 配合ボンディング材 (以下 PB), 市販シーラント材の THEETH MATE® F-1 2.0 (クラレメディカル) (以下 FS) を用いた。各材料は縦5mm×横5mm×厚さ1mmの規格とした。

### 3. 材料学的検討

#### 1) 肉眼所見

2. の各試験片に、MDPB 配合ボンディング材のボンディング液に重量比0.01%の酸化チタンアナターゼ型を添加したものと、市販シーラント材 Concise (3M ESPE) の2種類を試験片に追加して、実体顕微鏡で表面の観察をおこなった。

#### 2) 色特性と色差の検討

色彩情報分析システムカラーセンサーを用いて  $L^*a^*b^*$  表色系を測定し、 $L^*$  値による明度、 $a^*$  値および  $b^*$  値による色相の検討と色差値  $dE$  を評価した。

#### 3) EPMA による表面の面分析

各試験片にカーボン蒸着をおこない、エックス線マイクロアナライザー (以下 EPMA) による面分析で Ti および O の元素マッピングをおこなった。

#### 4) 微小硬度の測定

各試験片は 4℃ 水中と 60℃ 温水中に交互に 1 分間の浸漬負荷をおこなったものを 1 サイクルとして、4000 回のサーマルサイクリング負荷後、ビッカース硬さの測定をおこない、サーマルサイクル前後を比較検討した。

#### 5) 接着界面の填塞状態と微細漏洩の観察

便宜抜歯されたヒト小白歯を用いて、裂溝形態を可及的に均質化した裂溝モデルを作製し、PB、0.001% WPB および FS を填塞した。試料は、4000 回のサーマルサイクリング負荷をおこなった後、実体顕微鏡にて填塞状態と接着界面からの微細漏洩の有無の観察をおこなった。

### 4. 細菌学的検討

#### 1) 酸化チタンの光触媒作用による抗菌性の評価

抗菌性の評価対象菌は、*Streptococcus mutans* ingbritt 株を用いた。接種菌液は、1000CFU/ml に調整した後、試験片に滴下し、350nm の紫外線を10分間照射した。試験片上の残存菌は段階希釈し、37℃で48時間の培養後にコロニー数を計測した。

#### 【結果および考察】

1. MDPB 配合ボンディング材を酸化チタンにより白色着色した場合、重量比0.001%配合が適切であった。

2. 0.001% WPB の白色は、市販シーラント材2種の白色に比較して明るい白緑黄色であった

3. 0.001% WPB は、EPMA による面分析をした結果、酸化チタンの粒子がほぼ均一に分布するのが観察された。

4. 0.001% WPB は、サーマルサイクリング負荷後の填塞状態や微細漏洩は PB と同等で、シーラント材 FS に比較して良好であった。

5. 0.001% WPB のサーマルサイクリング負荷後の微小硬度は、PB よりも若干低値を示したが、FS よりも高値であった。

6. 酸化チタンの光触媒作用による *Streptococcus mutans* に対する抗菌性を評価した結果、10分間の350nm 紫外線照射により生菌数の減少が認められた。

以上より、本研究で試作したシーラント材 0.001% WPB は、歯面処理時と填塞後の二段階の抗菌性を有したシーラント材として臨床応用が可能であり、耐蝕性の向上と白色着色による良好な識別性により、フィッシャーシーラントの予後向上に寄与することが判明した。

## 骨芽細胞に対するポリリン酸の作用

薄井 陽平

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

### Effect of polyphosphate on osteoblasts

YOHEI USUI

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

Usui Y, Uematsu T, Uchihashi T, Takahashi M, Takahashi M, Ishizuka M, Doto R, Tanaka H, Komazaki Y, Ohsawa M, Yamada K, Yamaoka M and Furusawa K (2010) Inorganic polyphosphate induces osteoblastic differentiation. *J Dent Res* **89** : 504-9.

#### 【目的】

ポリリン酸〔Poly(P)〕は、リン酸が直鎖状に重合したリン酸ポリマーである。Poly(P)はCa<sup>+</sup>と効率よく結合すること、骨芽細胞や歯肉線維芽細胞などに高い濃度で存在していることが報告されているものの、生体における生理的役割や歯周組織構成細胞に対する作用については明らかにされていない。本研究ではマウス骨芽細胞前駆細胞ならびにビーグル犬歯槽骨欠損モデルを用いてPoly(P)の骨芽細胞への作用について検討した。

#### 【対象と方法】

本研究では、平均鎖長60のPoly(P)を用いた。培養細胞はマウス骨芽細胞前駆細胞であるMC3T3-E1細胞を用いた。成熟骨芽細胞への分化過程におけるアルカリホスファターゼ(ALP)活性は細胞抽出液と基質溶液(p-nitrophenyl phosphate substrate, pH10.5)を反応させ、水酸化ナトリウム溶液で反応を停止させた後、吸光度を測定した。細胞のアポトーシスは、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識 annexin V と propidium iodide (PI) を用いて flow cytometry (FCM) で検討した。骨関連遺伝子の発現は、total RNA を抽出して reverse transcriptase

-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で検討し、石灰化はアリザリンレッド染色で同定した。Poly(P)分解酵素活性は、polyethyleneimine thin layer chromatography (PEI-TLC) plate で展開して同定した。成犬を用いた歯槽骨欠損モデル実験は、株式会社イナリサーチ(伊那市)の動物実験倫理委員会の承認を得て実施した。

#### 【結果および考察】

1. MC3T3-E1細胞の培養上清中にPoly(P)またはPiを添加して培養する条件は、細胞増殖能を指標とすると1mmol/Lの濃度が至適濃度であることが明らかとなった。
2. MC3T3-E1細胞に1mmol/LのPoly(P)を添加して培養すると、培養20日からALP活性が上昇した。
3. MC3T3-E1細胞に1mmol/LのPoly(P)を72時間作用させてFCMを行ったところ、Poly(P)を添加して培養した細胞では、PI陰性、annexinV陽性の早期アポトーシスを示す割合が増加した。
4. Poly(P)を添加してMC3T3-E1を培養すると、培養10日から骨芽細胞前駆細胞から骨芽細胞の形質を示す骨関連遺伝子が発現し、培養

20日には OCN を発現する成熟骨芽細胞様細胞に分化することが明らかとなった。

5. 増殖培地に  $\beta$ -グリセロリン酸または Poly(P) を添加して MC 3 T 3-E 1 細胞を培養し、細胞抽出液中の Poly(P) 分解活性を PEI-TLC プレートを用いて検討したところ、Poly(P) を添加して培養した細胞は、Poly(P) を分解する活性が亢進して Pi, PPI, Pi 3, Pi 4 を生成することが明らかとなった。
6. 25日間培養した MC3T3-E 1 細胞をアリザリンレッドで染色したところ、 $\beta$ -グリセロリン酸または Poly(P) を添加して培養した細胞

で石灰化ノジュールの形成がみられた。

7. ビーグル犬の前臼歯分枝部に骨欠損を作製して骨形成を評価したところ、Poly(P) と EmdogainR を充填した骨欠損部では、組織学的およびエックス線学的にコントロールに比べ有意 ( $p < 0.05$ ) に骨形成が亢進していた。
- 以上の結果から、Poly(P) によって骨芽細胞前駆細胞が成熟骨芽細胞の形質を獲得すること、さらに、骨芽細胞に分化することによって Poly(P) 分解酵素活性が上昇することが明らかとなった。

## レボブピバカインのラット歯髄神経への局所麻酔効果 -歯髄電気刺激に伴う体性感覚誘発電位による評価-

織田 秀樹

松本歯科大学 歯科麻酔学講座

Anesthetic efficacy of levobupivacaine on the tooth pulp of rats  
-Evaluation with somatosensory evoked potential following tooth pulp electrical stimulation-

HIDEKI ODA

Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry,  
Matsumoto Dental University

織田秀樹 (2009) 松本歯学 35 : 270-83.

### 【目的】

レボブピバカインは、長時間作用性局所麻酔薬のブピバカインに含有されている鏡像異性体の R (+)体と S (-)体のうち、S (-)体のみで構成されたアミド型局所麻酔薬である。医科領域においては硬膜外麻酔などに使用されているが、歯科領域における局所麻酔効果については報告<sup>1,2)</sup>が少なく、詳細は明らかではない。本研究ではラットの口腔粘膜に浸潤麻酔を行い、歯髄電気刺激に伴う体性感覚誘発電位 (SEP) の変化を指標にレボブピバカインの局所麻酔効果について検討し、現在歯科臨床で使用されている 1/80,000 アドレナリン添加 2% リドカイン (2% リドカイン A)、3% メピバカインと比較した。またレボブピバカインによる組織血流量の変化をレーザードップラー血流計を用いて測定した。

### 【方法】

実験 1 : 各濃度のレボブピバカインの浸潤麻酔効果

ラットの口蓋粘膜へ浸潤麻酔を行い、上顎切歯歯髄電気刺激に伴う SEP 初期成分の振幅 ( $|P_1-N_1|$ ) の変化を測定した。局所麻酔薬は 2% リドカイン A、3% メピバカインおよび 0.5%、

0.75%、1.0%、1.5% のレボブピバカインを使用した。

実験 2 : アドレナリン添加レボブピバカインの浸潤麻酔効果

実験 1 と同じ方法で 0.75% レボブピバカインに 1/500,000 と 1/200,000 のアドレナリンを添加したものを使用した。

実験 3 : レボブピバカイン投与後の組織血流量の変化

ラットの皮膚に局所麻酔薬を投与し、レーザードップラー血流計を使用して血流量の変化を観察した。局所麻酔薬は 0.125%、0.25%、0.5%、0.75%、1.0% のレボブピバカインを使用した。またレボブピバカインと比較するため 2% リドカイン、2% リドカイン A による血流量の変化も測定した。

### 【結果および考察】

実験 1 : 局所麻酔薬の注射により  $|P_1-N_1|$  は減少した。2% リドカイン A は注射 2.5 分後から 120 分後まで、3% メピバカインは注射 2.5 分後から 25 分後まで  $|P_1-N_1|$  は有意に減少した。0.5% レボブピバカインは注射 2.5 分後から 20 分後および 30 分後、50 分後、70 分後、80 分後で  $|P_1-N_1|$

は有意に減少し、0.75%レボブピバカインは注射2.5分後から100分後まで、1.0%レボブピバカインは注射直後から180分後まで、1.5%レボブピバカインは注射2.5分後から180分後まで $|P_1-N_1|$ は有意に減少した。レボブピバカインが高濃度になるほど $|P_1-N_1|$ の抑制は増強され長時間持続した。このうち2%リドカインAと同等の局所麻酔効果を示したのは0.75%レボブピバカインであった。

実験2：1/500,000および1/200,000のアドレナリン添加により0.75%レボブピバカインの $|P_1-N_1|$ の有意な減少が注射180分後まで延長した。特に1/200,000アドレナリンを添加した場合は180分経過しても $|P_1-N_1|$ の回復傾向はみられなかった。

実験3：0.125%、0.25%、0.5%レボブピバカインでは有意に皮膚の組織血流量が減少し、血管収縮作用を示した。その作用は低濃度になるほど強くなり、2%リドカインAとの比較で有意差がみられなかったのは0.125%レボブピバカインであった。これに対して0.75%、1.0%レボブピバカインでは血管拡張傾向を示したが有意な変化

ではなく、2%リドカインの血管拡張作用ほど著明ではなかった。

以上の結果から、レボブピバカインを口腔粘膜の浸潤麻酔に使用する場合、0.75%の濃度で2%リドカインAと同等の麻酔効果を得られるものと思われる。また0.75%レボブピバカインは血管を拡張させる傾向がみられるが、その作用は弱く、アドレナリンを添加する場合、1/200,000以下の低濃度で十分と思われる。

#### 【文献】

- 1) Rood JP, Coulthard P, Snowdon AT and Genery BA (2002) Safety and efficacy of levobupivacaine for postoperative pain relief after the surgical removal of impacted third molars : a comparison with lignocaine and adrenaline. *Br J Oral Maxillofac Surg* **40** : 491-6.
- 2) Branco FP, Ranali J, Ambrosano GM and Volpato MC (2006) A double-blind comparison of 0.5% bupivacaine with 1 : 200,000 epinephrine and 0.5% levobupivacaine with 1 : 200,000 epinephrine for the inferior alveolar nerve block. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Endod* **101** : 442-7.

## ニフェジピンによる歯肉増殖症に対する 柴苓湯およびサイコの抑制効果の検討

松永 省三

松本歯科大学 歯科薬理学講座

The inhibitory effect of Saireito and Saiko on nifedipine-induced gingival overgrowth

SHOZO MATSUNAGA

Department of Pharmacology, School of Dentistry, Matsumoto Dental University

### 【目的】

歯肉増殖症はカルシウム拮抗薬（ニフェジピンなど）、抗てんかん薬（フェニトインなど）、免疫抑制剤（シクロスポリン A）などの薬物の副作用として生じることが知られている。高血圧症、てんかん、臓器移植の患者のうち高血圧症患者が多いこともあり、薬物性歯肉増殖症の中でもカルシウム拮抗薬による歯肉増殖症の患者数が最も多い。これらの薬物による歯肉増殖のメカニズムとしてこれまでに歯肉線維芽細胞の増殖能亢進、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度の上昇、I 型コラーゲンおよび塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）の産生亢進、歯肉線維芽細胞によるコラーゲンの貪食能低下などいくつかのメカニズムが報告されている。しかし、その治療法は確立されておらず、歯肉切除およびプラークコントロールを行うのが一般的である。

漢方薬の一つである柴苓湯は吐き気、食欲不振、のどのかわき、排尿が少ないとき、水瀉性下痢、急性胃腸炎、むくみなどの症状やリウマチ性関節炎、全身性エリテマトーデス、糸球体腎炎、腎炎症候群などの炎症性疾患に対して用いられる漢方薬である。また、柴苓湯はラットメザンギウム細胞の増殖を抑制、あるいは特発性後腹膜線維症における線維芽細胞の増殖を抑制することが報告されている。

本研究ではこの細胞増殖抑制能に着目し、ニフェジピンによるヒト歯肉線維芽細胞の増殖、bFGF および I 型コラーゲン産生に対する柴苓湯の作用を *in vitro* の実験系にて検討した。また、柴苓湯に最も多く含まれる生薬であるサイコも同様に検討した。

### 【対象および方法】

柴苓湯およびサイコは株式会社ツムラより供与された原末を使用した。細胞は正常ヒト歯肉線維芽細胞（Gin-1）を使用した。

細胞増殖能は水溶性テトラゾリウム-1（WST-1）を使用して生細胞数を測定することによって行った。Gin-1 細胞を96穴プレートに  $1 \times 10^4$  個/ウェルずつ播き、 $10 \mu\text{M}$  のニフェジピンあるいはコントロール群として同量の DMSO、およびそれぞれに 0.05%、0.1%、0.2% 柴苓湯を添加した培地で培養した。また、サイコを添加する場合には、Gin-1 細胞を  $1 \times 10^3$  個/ウェルずつ播き、同様の実験を行った。

bFGF および I 型コラーゲンの定量は ELISA により行った。Gin-1 細胞を 35mm デイッシュュに  $1 \times 10^5$  個ずつ播き、ニフェジピンおよび柴苓湯あるいはサイコを含む培地で 5 日間培養し、培養上清およびデイッシュュ底面に付着しているコラーゲンをキットの説明書に従って回収した。培養上清中の bFGF およびデイッシュュ底面から回

収したI型コラーゲンを定量した。

統計学的処理はStudentの*t*検定により行い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

#### 【結果】

コントロール群と比較して、 $10\mu\text{M}$ のニフェジピンを添加した群では培養9日目を以降で有意に細胞数が増加した。ニフェジピンのみを添加した群とニフェジピンと柴苓湯を添加した群とを比較した場合には、 $0.05\%$  w/vの柴苓湯では細胞数に有意な差は見られなかったが、 $0.1$ および $0.2\%$  w/vの柴苓湯では有意に細胞数が減少した。

コントロール群と比較して、 $10\mu\text{M}$ のニフェジピンを添加した群ではbFGF産生量が有意に増加した。ニフェジピンのみを添加した群とニフェジピンと柴苓湯を添加した群とを比較した場合には、 $0.05\%$  w/vの柴苓湯ではbFGF産生量に有意な差は見られなかったが、 $0.1$ および $0.2\%$  w/vの柴苓湯では有意にbFGF産生量が減少した。

コントロール群と比較して、 $10\mu\text{M}$ のニフェジピンを添加した群ではI型コラーゲン産生量が有意に増加した。ニフェジピンのみを添加した群とニフェジピンと柴苓湯を添加した群とを比較した

場合には、 $0.05\%$  w/vの柴苓湯ではI型コラーゲン産生量に有意な差は見られなかったが、 $0.1$ および $0.2\%$  w/vの柴苓湯では有意にI型コラーゲン産生量が減少した。

サイコを使用した場合にも同様の傾向が見られた。

#### 【考察】

柴苓湯が*in vitro*の実験系において歯肉増殖症に関与する因子を抑制したことから、ニフェジピンによる増殖症の予防および治療に対して有効である可能性が示唆された。柴苓湯の主成分であるサイコ(約18%)でも同様の結果が得られたことから、サイコが主となって歯肉増殖症を抑制することが示唆された。

ニフェジピンが細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させることにより、bFGF遊離を促進させ、autocrine/paracrine的にFGFRに作用し、細胞増殖能およびI型コラーゲン産生量を亢進させると考えられる。柴苓湯およびサイコは少なくともその成分であるサイコサポニンによってbFGFの遊離を抑制し、細胞増殖能およびI型コラーゲン産生量を抑制すると考えられる。

## 抗真菌薬ミコナゾールの基材としてのコラーゲンの有用性の検討

吉田 敬子

富山大学 大学院医学薬学研究部 歯科口腔外科学講座

The investigation of feasibility of using collagen as the base of  
the antifungal drug, miconazole

KEIKO YOSHIDA

Department of Oral Surgery, Graduate School of Medicine and Pharmaceutical Sciences  
for Research, University of Toyama

### 【目的】

義歯性口内炎は義歯を装着している人で頻度が高く、かつ再発しやすいものであり、外傷、真菌感染、全身的素因がその発生に関与している。真菌感染による義歯性口内炎の原因菌として主に *Candida albicans* (*C. albicans*) が関与することが広く知られている。カンジダによる義歯性口内炎の発症メカニズムとしては、義歯と粘膜の隙間に *C. albicans* が集積し、そこで免疫反応が起こることによって発生すると考えられている。現在、口腔カンジダ症に対して主にミコナゾールが使用される。市販されているミコナゾール製剤はゲル状のものであるが、ミコナゾールの使用量が多いため口腔内疼痛、味覚異常、口腔内異常感、口唇腫脹などの副作用を生じること、ミコナゾールが薬物相互作用の原因となり他の薬物の作用を増強させること、などの欠点がある。一般的に、義歯装着により口腔カンジダ性を発症する患者は高齢者が多く、薬物の代謝・排泄能が低下していること、全身疾患を有しているために薬物を服用していることが十分に考えられる。このような患者にミコナゾールを投薬する場合、上に述べたような副作用が出やすいために慎重投与する必要があり、できる限りミコナゾールの使用量を減少させる方法の開発が望まれる。

義歯性口内炎の治療薬として使用されるミコナ

ゾールを低濃度で一定時間、義歯粘膜面に保持する基材として接着性タンパク質であるコラーゲンに着目し、その有効性を検討した。

### 【対象および方法】

被試験菌として *C. albicans* JCM 1542, 抗真菌薬として硝酸ミコナゾール (和光純薬) およびフロリドゲル経口用® (持田製薬), 接着性タンパク質として魚の鱗から抽出したコラーゲンパウダー (以下コラーゲン) (メルシーコラーゲン, リアルフーズ株式会社) を使用した。

#### (実験1)

NCCLS の方法に準じた抗真菌剤感受性試験によりミコナゾールの80%最小発育阻止濃度 (MIC<sub>80</sub>) を測定した。ミコナゾールは RPMI 1640 培地あるいは33%コラーゲン溶液に溶解した。

#### (実験2)

0, 0.01, 0.1, 1 µg/ml ミコナゾールを含む33%コラーゲン溶液20 µl をレジンプレート (加熱重合型アクリルレジン, GC 株式会社, 10mmφ × 1 mm) に塗布して乾燥させた。レジンプレートを生理食塩水中で30分間振盪 (20 stroke/分) した後10<sup>3</sup> CFU/ml の *C. albicans* 菌液20 µl を滴下し、さらに24時間培養した。レジンプレートを SCDLP 培地で洗浄し、その培地中に含まれる *C. albicans* 数を測定した。

**(実験3)**

コラーゲンと従来製品の効果を比較するために、フロリドゲル経口用®をグリセリン-デンブロン溶液で1 µg/mlに希釈して実験2と同様の実験を行った。生理食塩水中での振盪時間は15, 30, 60分間、ミコナゾールの作用時間は48時間とした。

**【結果】**

(実験1) ミコナゾールのMIC<sub>50</sub>は0.06-0.26 µg/ml (RPMI 1640中) および0.06-0.5 µg/ml (コラーゲン溶液中) であり、コラーゲンはMIC<sub>50</sub>に影響を及ぼさなかった。

(実験2) ミコナゾールの *C. albicans* 致死率は0.01, 0.1 µg/ml で85%, 1 µg/ml では100%だった。

た。

(実験3) いずれの観察時間においても、グリセロールを基材とした場合には60-80%の致死率であったが、コラーゲンを基材とした場合にはほぼ100%の致死率であった。

**【考察】**

コラーゲンをミコナゾールの基材とすることにより、従来の方法と比較してミコナゾールを低用量で使用することが可能になると考えられる。この方法によりミコナゾールによる副作用および薬物相互作用の危険性を軽減することが予想される。したがって、この方法が義歯性口内炎を治療する新たな方法として有効であることが示唆された。

## 齲蝕関連遺伝子の母子伝播について-齲蝕発症要因と *gtf* との関係-

吾妻 昭夫

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

The spread of mothers and children for dental caries related genes  
-Relationship with dental caries detection and glucosyltransferase-

AKIO AZUMA

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University

吾妻昭夫 (2010) 松本歯学 36 : 220-9.

### 【緒言】

従来から口腔内細菌と齲蝕との関係は「齲蝕の有無」, 「原因菌数」, 「原因菌の種類」との相関および「母から子への伝播に関する疫学研究」などの分析が行なわれ, ミュータンスレンサ球菌が齲蝕の主要な原因菌として密接な関連が明らかとなり, 分子生物学的により詳細な分析が行われている。また, 母子伝播 (感染) についてもミュータンスレンサ球菌が乳歯萌出前に検出されており, 血清型, バクテリオシンパターン, DNA パターンが母親と一致することが過去により示され, 子どもの口腔から検出されるミュータンスレンサ球菌は主に母親の唾液を介して伝播し, 定着したものと考えられ, 生後間もない時期から母子伝播を生じることが示されてきている。

ミュータンスレンサ球菌は7菌種に分類されているが, 口腔疾患に関わる *Streptococcus cricetus*, *Streptococcus rattus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* の4菌種が主に基礎研究や疫学的調査の対象となっている。4菌種の内, *Streptococcus mutans* (以下, *S. mutans*) と *Streptococcus sobrinus* (以下, *S. sobrinus*) はヒトの口腔内に棲息し齲蝕発症に関係する。

本研究では母子の齲蝕関連細菌の *gtf* 遺伝子と

環境要因との関連を示す報告が少ないことに着目し, 母子感染経路と重症齲蝕の発症に関する遺伝子レベルでの細菌学的関連について菌種特異的なDNA配列に基づくミュータンスレンサ球菌をReal-time PCR法を用いてプラーク中の *S. mutans* と *S. sobrinus* から遺伝子分析を行った。

### 【対象と方法】

#### 1. 対象ならびに診査方法

対象は松本歯科大学病院小児歯科に通院する3歳から6歳までの乳歯列期小児と養育者 (保護者) である母親とした。

#### 2. ミュータンスレンサ球菌の遺伝子分析

ミュータンスレンサ球菌の中から齲蝕の原因菌である *S. mutans* と *S. sobrinus* の glucosyltransferase (以下, 酵素: GTF, 遺伝子: *gtf*) に着目した。 *S. mutans* は染色体上に非水溶性グルカン合成酵素 GTF B と水溶性グルカン合成酵素 GTF C, GTF D の3種の *gtf* を持つ。また, *S. sobrinus* は染色体上に非水溶性グルカン合成酵素 GTF I と水溶性グルカン合成酵素 GTF U, GTF T および GTF S の4種の *gtf* を持つ。本研究では齲蝕の発症と重症度に関連する遺伝子として *S. mutans* では glucosyltransferase B (以下, *gtf* B), glucosyltransferase C (以下, *gtf* C),

glucosyltransferase D (以下, *gtf* D) の3種, *S. sobrinus* では glucosyltransferase I (以下, *gtf* I) の1種について遺伝子発現を分析し齲蝕との関連ならびに母子伝播について検討を行った。

遺伝子分析には定量分析を可能にした方法である Real-time PCR 法 (MJ Japan, kk : Optico ; SYBR Green 法) を用いて行った。

### 3. 実験方法

採取したブラッシング菌垢から RNA Isolation Kit (Gentra 社, USA) を用いて RNA 抽出を行った。RNA 抽出後 Cloned DNase I (RNase-free) (TaKaRa 社, Japan) にて DNase 処理を施し, その後 PCR (Polimerase chain reaction) を行い電気泳動から抽出物に DNA の混入がないことを確認した。これらの RNA サンプルと RT Mix を調製し, cDNA 合成を行った。Real-time PCR に用いる cDNA の定量はバイオフォトメーター (Eppendorf 社, Germany) を用いて 260 nm の吸光度から測定し定量を行った後, テンプレート量を 10 ng に統一するよう希釈して付属マニュアルに従い Real-time PCR 法を行った。

Real time PCR の条件は 95°C/10分→95°C/10秒→57°C・60°C/20秒→72°C/*S. mutans* : 12秒, *S. sobrinus* : 16秒の3手順を45サイクル行った。Real-time PCR では発現量を正確に測定するため標準株の cDNA を段階希釈し検量線求めた。また, 目的とする産物が増幅されていることを確認するために, 内部標準である *S. mutans* における組換え修復遺伝子 recombination A (*recA*), *S. sobrinus* における 16S rRNA に基づくプライマー配列を作成した。なお, 発現量は手技上の誤差を考慮し, 1 サンプルにつき同時に3回行い, 平均値から算出した。発現量は内部標準と各サンプルの *gtf* 発現量を計算式  $[2^{-\Delta CT(\text{target}/\text{内部標準})}]$  に当てはめ, 比率で表した。

### 【結果】

#### 1. *gtf* の発現

##### 1) *gtf* B

無齲蝕群では *gtf* B は母親のみ 4 例 (50.0%) に発現し, 重症齲蝕群では *gtf* B は重症齲蝕児 3 例 (42.9%), 母親 6 例 (85.7%) で 3 組の母子に発現が認められた。

##### 2) *gtf* C

無齲蝕群では *gtf* C は母親のみ 1 例 (12.5%) に発現し, 重症齲蝕群では認められなかった。

##### 3) *gtf* D

無齲蝕群では無齲蝕児 6 例 (75.0%), 母親 8 例 (100.0%) に発現し, 重症齲蝕群では重症齲蝕児とその母親 7 組 (100.0%) に発現が認められた。

##### 4) *gtf* I

無齲蝕群では母子共に認められなかった。一方, 重症齲蝕群では母親のみ 2 例 (28.6%) に発現が認められた。

#### 2. *gtf* の発現量 (比率)

##### 1) *gtf* B

*gtf* B の発現量は重症齲蝕群と比較して無齲蝕群の母親の方が高い発現比率を示した。また, 重症齲蝕児の発現比率は低率であった。

さらに, 重症齲蝕群の母子ともに発現が認められても, その子どもの発現比率が認められたのは 2 サンプルのみであった。

##### 2) *gtf* C

*gtf* C は 1 サンプルに発現が認められたが, 発現比率は 0 であった。

##### 3) *gtf* D

*gtf* D の発現量は無齲蝕群に比較して, 母子ともに重症齲蝕群の方が高い比率を示した。また, 母親の発現比率が高いサンプルでは, その子どもの発現比率も高い傾向を示した。

##### 4) *gtf* I

*gtf* I は 2 サンプルに発現が認められたが, 発現比率は 0 であった。

### 【考察】

本研究では *S. mutans* や *S. sobrinus* の遺伝子解析を中心に分析を行い同時に母子の環境因子についても検討を行った。

#### 1. *gtf* 発現状況と齲蝕発症との関連

遺伝子分析からは齲蝕の発症や重症度には *S. mutans* の *gtf* B と D の発現や発現量が主に関与し, 小児期の口腔内では *gtf* B や D の発現量の多寡は口腔環境を反映すると考えられるが, *S. sobrinus* が検出されたとしても *S. mutans* に比べその発現菌数は少なく, *gtf* I 発現による口腔環境への影響は明確にはならなかった。

## Ozony Tron<sup>®</sup>の歯内療法処置への応用 -O<sub>3</sub>の感染根管治療に対する殺菌効果について-

山田 博仁

松本歯科大学 歯科保存学第2講座

### Application of Ozony Tron<sup>®</sup> to endodontic therapy -Antimicrobial effects of O<sub>3</sub> gas on infected root canal treatment-

HIROHITO YAMADA

*Department of Endodontics and Operative Dentistry, School of Dentistry,  
Matsumoto Dental University*

山田博仁, 内山真紀子, 細矢明宏, 中村浩彰, 山本昭夫, 笠原悦男 (2007) 日歯保存誌 50 : 657-63.

#### 【目的】

オゾンは酸化作用による殺菌作用に加えて、オゾンに付帯するとされる組織賦活作用などから、歯科医療においても、殺菌、消炎、止血への効果が着目され、オゾン水を用いた義歯の洗浄・消毒や歯周ポケット、根管治療時の洗浄液としての可能性などが検討されている。

近年、空気中の酸素からオゾンを発生するオゾン発生器、Ozony Tron<sup>®</sup>が開発された。この装置は、オゾンを発生させるための酸素ボンベなどを必要とせず、小型軽量の簡便性に加えて、発生したオゾンガスも空気中で酸素に分解されるため安全であることから、訪問診療の携行にも有用と思われる。

今回、感染根管を対象として、臨床応用を行ったところ、若干の知見が得られたので報告する。

#### 【材料と方法】

根管拡大に先がけての根管培養で陽性培養が得られた失活歯155歯、250根管のうち、著者らが日常の臨床で行っている根管の拡大基準（安田の基準）にしたがって拡大・形成後の根管培養でも陽性が確認された130根管を本実験の被検歯とし

た。被検歯を無作為選択で88根管にオゾンガスを応用し、残りの42根管には、ネオクリーナーと3%オキシドールによる交互洗浄を行って実験対照とした。それぞれ応用直後に根管培養試験を行い、さらに次回来院時にも処置に先がけて二度目の培養試験を行って成績を判定した。また、術前のエックス線写真から根尖病巣の有無による陰性培養獲得率との関係についても調査を行った。

#### 【結果】

1. 250根管中、根管拡大のみで陰性培養が得られたのは120根管（48%）であった。
2. オゾンガス応用例は88根管中42根管、47.7%に無菌を示し、そのうち10根管、全例中の11.4%が次回培養まで陰性が持続した。
3. 交互洗浄例は、42根管中36根管、85.7%が無菌を示し、そのうち21根管、全例中の50%が次回培養まで陰性が持続した。
4. 根尖部エックス線透過像と陰性培養獲得率の関係は、オゾンガス応用例は根尖病巣の有無に関わらず、いずれも約50%の陰性培養率であった。交互洗浄例は、根尖病巣（-）が100%、（±）が91%、そして（+）が64%の陰性培養

率であった。

#### 【考察】

オゾン水による超音波洗浄と2.5%次亜塩素酸ナトリウムとの比較を試みた過去の文献からは、オゾン水による超音波洗浄は次亜塩素酸ナトリウムと同等の殺菌効果が得られたとの報告がなされており、感染根管治療などに応用できる可能性を示唆している。

本実験は、あらかじめ感染の確認された根管であっても、機械的な清掃拡大のみで陰性培養が得られた対象を除外したことで、より実験効果を明確にすることができたと考えられる。このような実験環境のなかで、交互洗浄に劣るとはいえ、培養1で約半数に陰性培養が得られたことは、評価すべきと考えられる。オゾンガスは、液体を用いての洗浄に比べて細部への導入、浸透性に優れると考えられるが、Ozony Tron<sup>®</sup>はPA電極により根管口部でオゾンが発生させるだけで、ガスを根管内

へ送気する構造になっていない、そのためにもともと分解が早く持続性がないとされるオゾンガスが、根管内ことに根尖部に充満されていたとは考えられない。このような状況下を考慮すると、装置の改良などで根管内にて高濃度のガスを発生でき、根尖部へ送気が達成できれば、望ましい効果を得ることができるかもしれない。

今回の実験では、被検歯の菌種・根管別の調査ならびにエックス線透過像の有無との関係についても集計を行った。菌種・根管種の集計はそれぞれが少数例となるため確定的なことは不明であり、エックス線透過像を有するものは感染度も高いとの傾向は示されたが、上顎臼歯と下顎大臼歯とで傾向の違いも示されるなど、不鮮明な部分も残された。これらについては、デンタルエックス線写真上での判読性の問題もあるため、今後はエックス線CT画像による調査を行ってみたいとも考えている。

## 破骨細胞の骨吸収活性における Wnt5a-Ror2 シグナルの役割

石原 章弘

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

The role of Wnt5a-Ror2 signaling in bone resorption

AKIHIRO ISHIHARA

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University

### 【目的】

歯周病菌は、TNF $\alpha$  や IL-1 などの炎症性サイトカインの産生を誘導し、組織破壊と破骨細胞による歯槽骨吸収を引き起こす。破骨細胞の分化および機能発現は、骨芽細胞の M-CSF と RANKL 発現によって厳密に調節されている<sup>1)</sup>。一方、サイトカインの一つである Wnt5a が破骨細胞の分化を調節する可能性が示唆されている。本研究では、破骨細胞の骨吸収活性における Wnt5a の役割を解析した。

### 【材料と方法】

- ① 破骨細胞、破骨前駆細胞における Ror2 発現と、骨芽細胞、破骨細胞および破骨前駆細胞における Wnt5a 発現を RT-PCR 法で解析した。
- ② コラーゲンゲル上でマウス骨髄細胞と骨芽細胞を共存培養し、活性型ビタミン D<sub>3</sub> の添加により破骨細胞を形成した。次に、破骨細胞を象牙切片上で培養し、骨吸収活性を観察した。この培養系に作製した Wnt5a のデコイ受容体である GST-soluble Ror2 (GST-sRor2) または対象として GST を添加した。
- ③ Ror2 欠損マウスおよび Wnt5a 欠損マウスの胎生15.5日齢の肝臓を用い、肝マクロファージ (Mf) を調整し、象牙切片上に播種した。M-CSF と RANKL の添加により破骨細胞に分化させ、骨吸収活性を検討した。骨吸収活性の

評価は、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色 (TRAP 染色) による破骨細胞数の定量、ロダミン結合ファロイジンによるアクチンリングの観察、HE 染色による骨吸収窩数の定量を行った。

### 【結果】

- ① Ror2 の発現は、破骨細胞、破骨前駆細胞で認められ、Wnt5a 発現は骨芽細胞と破骨細胞で高発現していた。
- ② 骨芽細胞と破骨細胞の共存培養を象牙切片上で行い、吸収窩を形成させた。ここに、GST-sRor2 を添加すると、吸収窩形成は濃度依存的に抑制された。GST 添加では、吸収窩形成は抑制されなかった。この結果から、Wnt5a は破骨細胞による骨吸収を増強することが示唆された。
- ③ Ror2 欠損マウス由来 Mf および Wnt5a 欠損マウス由来 Mf は、M-CSF と RANKL の添加により野生型マウス由来 Mf と同様に破骨細胞に分化した。しかし、Wnt5a 欠損由来および Ror2 欠損由来破骨細胞によるアクチンリング形成および吸収窩形成は、野生型由来破骨細胞に比べ著明に低下した。また Wnt5a 欠損マウス由来破骨細胞に Wnt5a を添加すると骨吸収活性が回復した。

### 【考察】

Wnt5a-Ror2 シグナルは破骨細胞の骨吸収活

性をポジティブに調節することが明らかになった。Wnt5a が Ror2 を介して破骨細胞の明帯の形成を調節し、骨吸収活性を制御する可能性が示唆された。また GST-sRor2 は破骨細胞の分化のみならず、骨吸収機能を阻害することから、GST-sRor2 は骨吸収性疾患の治療に応用できる可能性が示唆された。

**【文献】**

- 1) Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ and Suda T (1990) Origin of osteoclasts : mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. Proc Natl Acad Sci U S A **87** : 7260-4.

## ヒト歯肉線維芽細胞から産生される IL-8 量に対する マクロライド系抗菌薬アジスロマイシンの影響

亀本 晃

松本歯科大学大学院 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

The effect of azithromycin on IL-8 production by human gingival fibroblasts

AKIRA KAMEMOTO

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University

### 【目的】

マクロライド系抗菌薬は細菌のリボソームを阻害し、タンパク質合成を阻害することによって作用を示す抗菌薬である。これまでに、マクロライド系抗菌薬の一つであるアジスロマイシンが侵襲性歯周炎の歯周基本治療期間を短縮すること、また、口腔内細菌からなる *in vitro* バイオフィルムモデルの形成抑制能・破壊能を有することが報告されている。近年、アジスロマイシンがマクロファージあるいは気管支上皮細胞から産生されるインターロイキン (IL)-8 量を増加させること、一方、嚢胞性線維症の気管支上皮細胞から産生される IL-8 および TNF- $\alpha$  量を抑制するなど、炎症性サイトカインの産生量を制御することが報告されている。とくに後者の炎症性サイトカイン産生量減少は、アジスロマイシンが直接的な抗炎症作用をもつことを示している。

近年、難治性の歯周炎に対してアジスロマイシンが使用されていることから、アジスロマイシンが歯周組織の炎症反応に影響を与えている可能性が考えられる。そこで今回、歯周炎に対するマクロライド系抗菌薬の影響についてヒト歯肉線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験系にて検討した。また、組織破壊に重要な役割を果たすマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の産生量に対する

マクロライド形抗菌薬の作用についても検討した。

### 【対象および方法】

マクロライド系抗菌薬としてエリスロマイシン (14員環系)、アジスロマイシン (15員環系)、ジョサマイシン (16員環系) を使用した。培養ヒト歯肉線維芽細胞を *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) 由来 LPS (10 ng/ml) で24時間刺激し、培養上清中に産生された IL-6, IL-8, PGE<sub>2</sub> 量を ELISA にて測定した。これらの実験系にマクロライド系抗菌薬 (0, 0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml) を同時に添加して IL-6, IL-8, PGE<sub>2</sub> 量の変化を検討した。さらに、細胞内情報伝達系の阻害剤を用いることによりそのメカニズムについて検討した。また、培地中に産生された MMP 量をゼラチンザイモグラフィで検討した。

### 【結果】

アジスロマイシンは LPS 刺激による IL-8 産生量を濃度依存的に増加させた。一方、エリスロマイシンおよびジョサマイシンは LPS 刺激による IL-8 産生量に影響を与えなかった。いずれの抗菌薬も LPS 刺激による IL-6, PGE<sub>2</sub> 産生量、および MMP-2, MMP-9 の産生量に影響を与えなかった。

細胞内シグナル伝達系の阻害薬を用いてアジス

ロマイシンがLPS刺激によるIL-8産生量を増加させるメカニズムを検討したが、ERK, JNK, p38MAPK, PKA, PI3K, PLC $\gamma$ 系の関与は認められなかった。また、NF- $\kappa$ B阻害薬によりIL-8産生量がすべて検出限界以下となったため、NF- $\kappa$ B系の関与については不明だった。

#### 【考察】

歯周炎においては歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8 など) およびPGE<sub>2</sub>の産生が重要であると考えられている。

歯肉線維芽細胞も使用した場合にはマクロライド系抗菌薬はLPS刺激によるIL-6, IL-8およびPGE<sub>2</sub>の産生量を低下させず、むしろアジスロマイシンはIL-8産生量を増加させた。さらに、

マクロライド系抗菌薬はMMP産生量にも影響を与えなかった。したがって、マクロライド系抗菌薬が歯周炎に対して直接的な抗炎症作用を示すとは考えにくい。しかし、これらの抗菌薬は*P. gingivalis*に対して抗菌作用を示すことから、歯周炎の原因となる細菌数を減少させることによって炎症を軽減させるという二次的な抗炎症作用を示す可能性が考えられる。

さらに、IL-8産生量の増加により好中球が歯周組織に遊走することにより、一時的に炎症症状が亢進すると考えられる。しかし、好中球の貪食作用により歯周病の原因となる細菌数を減少させることで結果的に炎症症状が早期に終焉する可能性が考えられる。

ユーカリ葉抽出物による日和見感染,  
歯周疾患, う蝕予防についての検討  
重症心身障害児・者への口腔ケアのために

河瀬 聡一郎

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

Examination of opportunistic infection prevention, prevention of periodontal diseases,  
and decayed tooth prevention with eucalyptus leaf extract  
For the oral health care to person or children with severe motor and intellectual disabilities

SOUICHIROU KAWASE

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University

【目的】

摂食・嚥下障害を有する重症心身障害児・者では、唾液中の細菌数が多く、さらに介助磨き後では唾液中細菌数が増加することが報告されている<sup>1)</sup>。増加した細菌は全身状態の安定しない摂食・嚥下障害を伴う重症心身障害児・者で誤嚥性肺炎の危険性を高める。

また、重症心身障害児・者では、開口困難、体動などにより介助磨きが困難なことがあり、重度のう蝕、歯周疾患に罹患する事が多い。

近年、人体への安全性が高いとされている天然成分を利用した制菌、殺菌作用の研究が進められている。なかでも、ユーカリグロブレスの成分である1.8-cineolは気道粘液改善の他、真菌に対する制菌作用<sup>2)</sup>を示すとされている。

そこで、真菌に対する制菌作用だけでなく、日和見感染菌、歯周病原性菌、う蝕原性菌に対し制菌作用があるとするれば重症心身障害児・者へ介助磨き後に用いることによりう蝕、歯周病、誤嚥性肺炎の予防に有用である可能性がある。これらの原因菌に対する制菌作用と口腔内常在菌に対する影響について検討をおこなった。

【方法】

ユーカリ・グロブレスの葉を水蒸気蒸留により抽出し1.8-cineolを0.2 mg/ml含むハーブウォーターを用いて、日和見感染菌：*Candida albicans* JCM 1842, *Klebsiella pneumoniae* JCM 1662, 歯周病原性菌：*Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Prevotella nigrescens* ATCC 33563株, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* JCM 8577, *Porphyromonas gingivalis* ATCC 49417, う蝕原性菌：*Streptococcus mutans* Ingbritt, *Streptococcus sobrinus* 6715に対し培地を作製した。その培地を好気培養あるいは、嫌気培養し、比濁法により制菌効果を検討した。また、口腔内常在菌に及ぼす影響も明らかにするために*Streptococcus salivarius* JCM 5707についても検討をおこなった。

【結果】

日和見感染菌、歯周病原性菌、重症う蝕原性菌に対して1.8-cineolを含むハーブウォーターは制菌効果を認めた。また、1.8-cineolを含むハーブウォーターは口腔内常在菌である*Streptococcus salivarius* に対しては制菌効果を認めなかつ

た。

**【考察】**

今回の検討より、1,8-cineolを含むハーブウォーターは口腔内常在菌の細菌叢を壊す事無く、全身状態の安定しない摂食・嚥下障害を伴う重症心身障害児・者に対し日和見感染、歯周疾患予防につながる可能性が示唆された。

また、介助磨きが難しいとされる重症心身障害児・者に対し歯周疾患、重症う蝕予防にも応用で

きる可能性が示唆された。

**【参考文献】**

- 1) 河瀬聡一郎, 平井 要, 山田朱美, 小島広臣, 河瀬瑞穂, 岡田尚則, 小笠原 正, 宮沢裕夫 (2007) 摂食・嚥下障害を有する重症心身障害者における介助歯磨き前後の唾液中細菌数の推移: 日障誌 28: 583-8.
- 2) ケモタイプ製油事典 (2007) NARD JAPAN 6, 468. 東京.

## チタン材に接着した歯科用セメントの接着強さと熱膨張量の関係

河瀬 雄治

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

### Relationship between bonding strength to bonded titanium and thermal expansion of dental cements

YUJI KAWASE

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

近年、インプラントは歯科治療における補綴処置の1つとして広く普及している。インプラントのアバットメントと上部構造物との固定は、スクリーやセメントで行われているが、歯科用セメントには多くの種類があり、最適なセメントを使い分けるのは困難である。また口腔内は、飲食による熱履歴が生じ、セメントの機械的性質に影響を及ぼすとされている。しかしながら、口腔内環境に近い条件におけるセメントの熱膨張や接着に関するデータは乏しい。そこで、本研究は口腔内の温度変化を想定し、サーマルサイクル試験を行い、引張せん断強さと熱膨張量、剥離強さを測定し、各種セメントの接着強さについて検討した。

材料は従来型セメント4種類、ガラスイオノマー系レジンセメント2種類、接着性レジンセメント4種類の計10種類を使用した。試験片は、温度23℃、湿度50%の恒温恒湿室にて作製した。引張せん断試験片はチタン板（JIS2種）を2枚使用し、皮膜厚さ50 $\mu$ m、接着面積25mm<sup>2</sup>になるように製作した。その後、万能試験機を用いてクロスヘッド速度0.5mm/minにて、引張せん断強さと伸びを測定した。加熱膨張試験片は4 $\phi$ ×8mmの樹脂型を使用して製作し、蒸留水中にて1℃/minの加熱速度で膨張率を測定した。また、サーマルサイクル試験（4℃1分、60℃1分、10000回）を行った試験片についても、引張せん断試

験、および加熱膨張試験を行った。剥離試験はチタン板上に皮膜厚さ50 $\mu$ mにて接着したセメントに対し、剥離試験機を用いて刃幅0.5mm、水平速度3 $\mu$ m/sec、垂直速度0.3 $\mu$ m/secの条件にて剥離強さとみなしせん断強さを測定した。その結果、以下の結論を得た。

1. アルミナサンドブラストを行う事によりいずれのセメントのせん断強さは向上した。従って、アルミナサンドブラストはセメント合着時に必須であると考えられた。
2. ブラスト後のせん断強さおよび伸びは、従来型セメントよりレジン系セメントの方が大きい値を示した。
3. セメントの膨張率は温度上昇と共に増加し、熱履歴が加わる事により膨張率は小さくなった。
4. みなしせん断強さは、レジン系セメントが大きな値を示し、剥離強さはレジン系セメントのSBで最も大きい値を示した。
5. レジン系セメントは従来型セメントよりもサーマルサイクルの影響が大きく、接着強さが著しく低下した材料が認められた。しかしながら、サーマルサイクル後においても、レジン系セメントの接着強さは従来型セメントよりも有意に大きい値を示した。したがって、大きな咬合力の加わるインプラント治療にはレジン系セメントが有用であると考えられた。

## レボブピバカインのラット眼窩下孔への伝達麻酔効果

鹿内 恒樹

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Efficacy of Levobupivacaine Conduction Anesthesia to the Infraorbital Foramen in Rats

KOKI SHIKANAI

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

鹿内恒樹 (2010) 松本歯学 36 : 23-30.

### 【目的】

レボブピバカインは、長時間作用性局所麻酔薬のブピバカインに含有されている鏡像異性体の R (+)体と S (-)体のうち、S (-)体のみで構成されたものである。レボブピバカインは、ブピバカインと比べ中枢神経系や心臓循環器系に対する毒性は低い。

本研究ではレボブピバカインの口腔顔面領域における伝達麻酔への応用について検討するため、ラットの眼窩下孔に伝達麻酔を行い、上唇電気刺激に伴う体性感覚誘発電位 (SEP) の変化を指標として、レボブピバカインの局所麻酔効果を、リドカイン、ブピバカイン、ロピバカインと比較した。

### 【方法】

週齢7~12週、体重170~250gのウィスター系雄性ラットを用い、ペントバルビタール腹腔内投与による浅麻酔自発呼吸下で実験を行った。

ラットの上口唇電気刺激により得られた SEP の第1次反応成分の最初の陽性波 (P<sub>1</sub>) と、それに続く陰性波 (N<sub>1</sub>) の頂点間振幅 (|P<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>|) を測定した。ラットの眼窩下孔に局所麻酔薬50μℓを注入後、|P<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>| の変化を調べた。局所麻酔薬は、0.5%、0.75%レボブピバカイン、1/80,000アドレナリン添加2%リドカイン、0.5%

ブピバカイン、0.5%、0.75%ロピバカインを用い、対照には乳酸リンゲル液を用いた。

### 【結果および考察】

局所麻酔効果発現時間は、0.5%レボブピバカインと0.75%ロピバカインが注射直後と最も早く、0.5%ロピバカインは注射10分後と最も遅かった。持続時間は0.5%レボブピバカインと0.75%ロピバカインが注射直後から180分以上持続し、0.5%ロピバカインは注射10分後から110分後までの100分間で最も短かった。|P<sub>1</sub>-N<sub>1</sub>| が消失するまで、または最大に抑制されるまでの時間が早かったのは、0.5%と0.75%のレボブピバカイン、0.75%ロピバカインでいずれも注射10分後で、遅かったのは0.5%ブピバカインで注射25分後であった。SEP 振幅が消失していた時間が最も長かったのは、0.75%レボブピバカインと0.75%ロピバカインであった。レボブピバカインは今回使用した薬剤の中で局所麻酔効果が最も強かった。ラットを用いた実験においてレボブピバカインは0.5%の濃度で十分な局所麻酔効果が得られた。

以上の結果から、レボブピバカインを臨床の場で眼窩下孔への伝達麻酔で使用する場合、0.5%の濃度で十分な局所麻酔効果が得られると思われる。

## 発達と特性からみた自閉症児者の歯科適応

隅田 佐知

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

Adjustment in dentistry for autistic persons from the viewpoint of development  
and special characteristics

SACHI SUMIDA

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

### 【緒言】

歯科治療への適応性には発達年齢が関与している。自閉症児者でも発達に関与していると報告されている<sup>1)</sup>が、適応群の中央値から判定しているため、明らかになっていない。

今回、発達年齢、自閉症的特性が歯科治療時の適応性にどのように影響するか調査した。さらに発達レベルの高い者における発達と特性の影響についても検討した。

### 【対象ならびに方法】

#### 1. 調査対象者

当科に1年以上通院し、浸潤麻酔を必要とする歯科治療を受けた者78名(男性62名,女性16名)とした。平均年齢は、 $17.6 \pm 9.6$ 歳であった。

#### 2. 調査方法

保護者から発達年齢(遠城寺式乳幼児分析的発達検査)、自閉症的特性(強度行動障害判定基準,常同行動・奇声・の有無)について聞き取り調査した。

診療記録から暦年齢,他院の受診経験の有無,管理期間,来院回数,治療回数を調査した。

受診時の歯科治療の適応性は外来で観察調査した。拒否行動なく基本的行動調整(通法,笑気吸入鎮静法)で治療可能であった者を適応とし,拒否行動のため特殊な行動調整(抑制法,静脈内鎮

静法(深鎮静),全身麻酔)を用いた者を不適応と評価した。

分析Ⅰ. 発達と特性からみた自閉症児者の適応性

歯科治療の適応性の予測に最も影響を与える要因を検索するため,各調査項目(自閉症的特性15項目遠城寺式乳幼児分析的発達検査6項目,その他6項目:全27項目を説明変数とし,歯科治療の適応・不適応を目的変数として,赤池情報量規準と単回帰分析で解析した。

分析Ⅱ. 発達年齢の高い自閉症児者の不適応要因

基本的習慣の発達年齢が3歳10ヵ月以上の37名(男性29名,女性8名)を分析対象とした。平均年齢は, $18.2 \pm 8.8$ 歳であった。

発達年齢の高い自閉症児者における歯科治療の不適応要因を検索するため,各調査項目を説明変数とし,歯科治療の適応・不適応を目的変数として単回帰分析を行い,P値が $\leq 0.20$ 未満の項目を調べた。

さらに関連が認められた項目について Fisher's exact probability test を用いて項目間の独立性を検討した。P値が $\leq 0.05$ 以上で相互の項目間で関連のない項目を説明変数として選択し,ロジスティック回帰分析を行った。

**【結果】**

## 1. 全対象者における適応・不適応の要因

調査項目27項目中15項目が有意な説明変数であった。(発達年齢の全6項目, 自閉症的特性の16項目中6項目, 治療回数, 治療内容, 年齢)

最も関連があったのは, 「対人関係3歳6ヵ月以上/未満」でオッズ比が13.5, 95%信頼区間は3.9-46.68であった。

## 2. 基本的習慣の発達年齢が3歳10ヵ月以上の者の不適応要因

目的変数を歯科治療への適応・不適応とし, 「奇声」, 「粗暴で恐怖感を与え指導困難」, 「手の運動」, 「睡眠の大きな乱れ」の4項目を説明変数としてロジスティック解析を行った。有意な説明変数は, 「奇声:あり/なし」でオッズ比が36.4, 95%信頼区間は3.56-372.33であった。

**【考察】**

自閉症児者の歯科治療は, 発達と特性に配慮することが重要で, 歯科治療場面において不快な経験をさせない, 無理強いしない行動調整法を選択することが必要と考えられた。

**【結論】**

自閉症児者の歯科治療への不適応に関する要因を検討した。

1. 自閉症児者の歯科適応には, 発達と特性ともに関連が認められた。しかし, 特性より発達の関連が強かった。
2. 基本的習慣の発達年齢が3歳10ヵ月以上の自閉症児者では, 奇声の有無が不適応要因であった。

**【文献】**

- 1) 長田 豊, 栗山拓代, 他 (2004) 自閉症患者の歯科に対する適応に関する研究. 障歯誌 25: 527-34.

下歯槽神経切断モデルラットにおける  
三叉神経節非損傷神経の遺伝子発現動態解析  
-感覚異常発生との関連-

時崎 匡史

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Analyses of gene expressions in uninjured trigeminal neurons  
after inferior alveolar nerve transection in rats

TADASHI TOKIZAKI

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

時崎匡史, 奥村雅代, 大木絵美, 岡藤範正, 栗原三郎, 山田一尋,  
宇都野 創, 田所 治, 金銅英二 (2010) 松本歯学 36 : 93-106.

【目的】

三叉神経第3枝の一部である下歯槽神経を切断すると第2枝領域でアロディニアが発現する。このモデル動物を用いて切断3日後の三叉神経節をcDNA マイクロアレイにて解析を行なったところ、非損傷で且つアロディニアを発症する第1・2枝領域の組織で41種類の遺伝子に発現上昇が認められた。このうち、名称及び機能が明らかな遺伝子を22種に絞り込み、これら遺伝子の詳細な発現動態解析を目的とした。

【方法】

1) プライマー及びプローブの設計

データベース (GenBank) から配列を調べ遺伝子解析プログラム (BLAST) を用いて他の遺伝子との相同性が低い領域を選び、プライマー設計プログラム (Primer3) を使用しプライマー、プローブを設計した。

2) 定量 PCR

22遺伝子について、末梢神経組織、中枢神経組織、血液細胞を多く含む組織のそれぞれにおける

発現を確認するため、未処置ラットの三叉神経節、大脳、脾臓のcDNAを作製し、PCRを行なった。

3) in situ ハイブリダイゼーション

未処置ラットの三叉神経節を摘出後、新鮮凍結切片を作製した。

次に22遺伝子に特異的な遺伝子配列の Digoxigenin (DIG) 標識のRNAプローブを作製し、ハイブリダイゼーション反応 (55℃, 20時間) を行った。その後、洗浄、発色反応を行い光学顕微鏡下で観察した。

4) リアルタイム PCR

アロディニア発症後の三叉神経節第1・2枝領域での遺伝子発現レベルの経時的変化の確認を行なうため、未処置、下歯槽神経切断1, 3, 5, 7日目、対照群のそれぞれの三叉神経節第1・2枝領域のcDNAを作製し、TaqManプローブ法を用い解析を行なった。

【結果】

1) PCRにて三叉神経節で強く発現が見られた

のは Myelin basic protein (MBP) のみだった。他の遺伝子は発現が見られなかったか弱いものであった。

2) *in situ* ハイブリダイゼーションにて、神経細胞での発現が見られたのは Adducin 2 (ADD 2) と MBP だった。他の遺伝子は神経細胞での発現が認められなかった。

3) リアルタイム PCR にて経時的な遺伝子動態変動を解析した結果、下歯槽神経切断後に発現上昇が認められたのは MBP であった。また1日後の短期的な発現上昇を認めたのは HEMGN と VEZF1 であった。

#### 【考察】

今回の研究で三叉神経節内の非損傷領域である

第1・2枝領域の神経細胞で発現を認め、その経時的な発現上昇を検出できたのは MBP 遺伝子のみであった。このことは三叉神経節内非損傷神経では大きな遺伝子発現上昇を認めないことを示していると考えられ、同領域で発症する感覚異常（アロディニア）については非損傷領域の神経細胞が直接関与していないことが示唆された。

#### 【結論】

アロディニア発症については、損傷を受けた第3枝の神経細胞により、二次ニューロンの存在する三叉神経脊髄路核や上位中枢において神経伝達に変調を起こしアロディニアを惹起していることが考えられた。

## 歯肉線維芽細胞を用いた *in vitro* 実験系に対する 黄連湯の抗炎症作用の検討

本庄 健一

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

The investigation of anti-inflammatory effect of Orento in *in vitro*  
experimental model using gingival fibroblasts

KEN-ICHI HONJO

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University

### 【目的】

歯周炎は、歯周炎関連細菌の菌体成分の刺激により歯肉線維芽細胞、単球、マクロファージなどの細胞がプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)、炎症性サイトカイン (IL-6, IL-8 など) などを産生することにより発症することが知られている。歯周病の治療は原因となる歯石・プラークの除去が必要であるが、炎症症状が著しい場合には抗炎症薬を投与することがある。実際に、酸性非ステロイド性抗炎症薬が歯肉の炎症および歯槽骨の吸収を抑制することが動物実験および臨床試験で確認されている。しかし、酸性非ステロイド性抗炎症薬は胃腸障害・血小板凝集抑制による出血傾向などの副作用を示すことが知られている。

黄連湯は「傷寒論」に記載された処方で、ハンゲ、オウレン、カンキョウ、カンゾウ、ケイヒ、タイソウ、ニンジン等を有する。黄連湯は抗炎症作用をもち、臨床的に、急性胃炎、口内炎に対して使用される。したがって、黄連湯が歯周炎の炎症症状に対しても抗炎症作用を示すことが考えられた。本研究では、歯周炎に対する黄連湯の抗炎症作用の有無およびその作用機序を解明するために、歯肉線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験系を用いて黄連湯の作用機序を検討した。

### 【対象および方法】

埋伏歯抜去時の遊離歯肉片からヒト歯肉線維芽細胞を培養した (松本歯科大学倫理委員会の承認済: 許可番号 第0063号)。歯肉線維芽細胞を *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS (10ng/ml) で24時間刺激した後に培養上清中に産生された PGE<sub>2</sub>, IL-6, IL-8 量を ELISA にて測定し、刺激終了時の生細胞数で補正した。

ヒト歯肉線維芽細胞を LPS で8時間刺激してホスホリパーゼ A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>)、シクロオキシゲナーゼ (COX)-2 およびアネキシン 1 の発現量をウェスタンブロット法にて検討した。これらの実験系に黄連湯 (0.01-1mg/ml) を同時に添加することにより黄連湯の作用を検討した。

COX 活性の阻害能は Cayman 社の COX Inhibitor Screening Assay Kit を用いて測定した。

cPLA<sub>2</sub> の活性化はウェスタンブロット法でバンドの移動が遅れることを利用して検討した。細胞内シグナル伝達物質 ERK のリン酸化はリン酸化 ERK に対する抗体を使用してウェスタンブロット法で検討した。

### 【結果】

黄連湯は LPS 刺激により歯肉線維芽細胞から産生される PGE<sub>2</sub> 量を濃度依存的に減少させた。一方、黄連湯は LPS 刺激なしの場合に産生され

る PGE<sub>2</sub>量に影響を与えなかった。黄連湯は LPS 刺激による IL-6 および IL-8 産生量に明らかな影響を及ぼさなかった。

黄連湯は COX-1 および COX-2 活性に影響を与えなかった。黄連湯は LPS 刺激による COX-2 の発現量を増加させた。また、黄連湯は cPLA<sub>2</sub> の発現量をわずかに増加させた。黄連湯は アネキシン 1 の発現量に影響を与えなかった。

また、黄連湯は LPS 刺激による cPLA<sub>2</sub> および ERK のリン酸化を抑制した。また、無刺激および黄連湯単独刺激の場合には cPLA<sub>2</sub> のリン酸化は見られなかった。PGE<sub>2</sub>, IL-6, IL-8 産生量に関して、MEK 阻害剤 PD 98059 は黄連湯と同様の傾向を示した。

#### 【考察】

歯肉線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験系にお

いて黄連湯が LPS 刺激による PGE<sub>2</sub> の産生を抑制することから歯周病に対する抗炎症作用をもつことが示唆された。また、黄連湯は LPS 刺激なしの場合の PGE<sub>2</sub> 産生量に影響を及ぼさないことから胃腸障害が少ないことが示唆された。

黄連湯の作用機序として、細胞内シグナル伝達系である ERK 系の活性化を抑制することで ERK による cPLA<sub>2</sub> リン酸化を抑制し、その結果として PGE<sub>2</sub> の産生量を低下させると考えられた。一方、COX の活性抑制および cPLA<sub>2</sub>, COX-2, 炎症性サイトカインの産生抑制は見られなかった。したがって、黄連湯の作用機序は現在使用されている酸性非ステロイド性抗炎症薬およびステロイド性抗炎症薬は異なっており、新たな作用機序をもつ抗炎症薬であると考えられる。

## 生体吸収性高分子材料を応用した乳歯用歯科根管用ポスト成形品 (乳歯用スクリューポスト) への基礎研究

水谷 智宏

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

Basic research on screw post by biomaterials for primary teeth

TOMOHIRO MIZUTANI

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine  
Matsumoto Dental University*

### 【緒言】

近年、幅広い分野での応用が検討されている生体吸収性高分子材料を用いて、乳歯の歯冠修復物の十分な保持とともに、永久歯への交換期に認められる乳歯の生理的歯根吸収にも対応することを目的とした乳歯用歯科根管用ポスト成形品（以下：乳歯用スクリューポスト）の臨床応用に向けた基礎研究を行った。

### 【材料と方法】

材料は、生体吸収性高分子のうち、自然分解型・脂肪族ポリエステルに分類されるBMG社製（京都府 京都市）のポリグリコール酸：Poly glycolic acid（以下PGA）とポリ-L-乳酸：Poly L lactic acid（以下PLLA）の2種類（表1）を用いた。

PGAとPLLAが歯科材料として適しているかを判断するために、①ISO 4049：2000 Dentistry-Polymer-based filling, restorative and luting materialsおよびJIS T 6523：歯科用高分子系支台築造用材料に準拠した曲げ強度試験、②弾性率試験、③ISO 11405：Dental materials-Testing of adhesion to tooth structureに準拠した歯科用セメントとの接着性試験、④ISO 6922：Adhesives-Determination of tensile strength of butt jointsとJIS K 6849：引張接着強さ試験に準拠し

たコンジットレジンとの接着性試験を行った。

これらの結果を踏まえて⑤乳歯用スクリューポストの設計を行い、押出圧縮成形法にて作成した（図1）。続いて作成した乳歯用スクリューポストに対して⑥37℃の条件下でリン酸酸性緩衝溶液に浸漬し、加水分解による変化について計測を行った。

### 【結果および考察】

1. 曲げ強度試験において、PGAおよびPLLAはISOおよびJIS規格の基準値以上の値を示し、また、支台築造用コンジットレジンであるCLEARFIL®PHOTO CORE®（クラレメディカル株式会社：東京）とCLEARFIL®DC CORE（クラレメディカル株式会社：東京）に近似した値を示した。
2. 弾性率試験において、PGAおよびPLLAは乳歯歯根象牙質よりも低い数値を示し、CLEARFIL®PHOTO CORE®（クラレメディカル株式会社：東京）とCLEARFIL®DC CORE（クラレメディカル株式会社：東京）に近似した値を示した。
3. 歯科用セメントとの接着性試験において、PGAとPLLAはBASE CEMENT®（株式会社松風：京都）とFUJI I®（GC：東京）に対して接着を認めた。

4. コンポジットレジンとの接着性試験において、PGA と PLLA はボンディング材として G-BOND<sup>®</sup> (GC:東京) もしくは CLEARFIL<sup>®</sup> MEGA BOND<sup>®</sup> (クラレメディカル株式会社:東京) を用いた場合、コンポジットレジン: CLEARFIL<sup>®</sup> AP-X (クラレメディカル株式会社:東京) に対して接着を認めた。
5. PGA と PLLA は、長さ9.50mm、頸部直径1.62mm にてスクリー型乳歯用スクリーポストの設計を行い、加熱溶融後に押出圧縮成形を行った結果、精密な成形物の作成が可能で

- あった。
6. 押出圧縮成形法により作成した乳歯用スクリーポストを、リン酸酸性緩衝溶液に浸漬し加水分解試験を行った結果、PGA では乳歯歯根吸収速度よりも早く、PLLA では乳歯歯根吸収速度とほぼ同じ早さで加水分解する様相を示した。
- 以上より、生体吸収性高分子材料を用いた乳歯用スクリーポストの臨床応用の可能性が示唆された。

表 1

材料	ロット番号	色調	融点	成分	成分分析	触媒	大きさ	その他
PGA	KED8B067	ベージュ	Tm=192.4℃	>99.5%	IR スペクトルと合致	<10 ppm (Pb)	<32 mesh (0.5 mm <sup>2</sup> )	MFR(240,10)=5.95 MFR(240,20)=6.95 MFR(250,10)=9.90(g/10 min)
PLLA	KAA8D327	白	Tm=226.9℃	>99.5%	IR スペクトルと合致	<10 ppm (Pb)	<32 mesh (0.5 mm <sup>2</sup> )	Mw=250,000 Mw/Mn=1,52

BMG Inc.

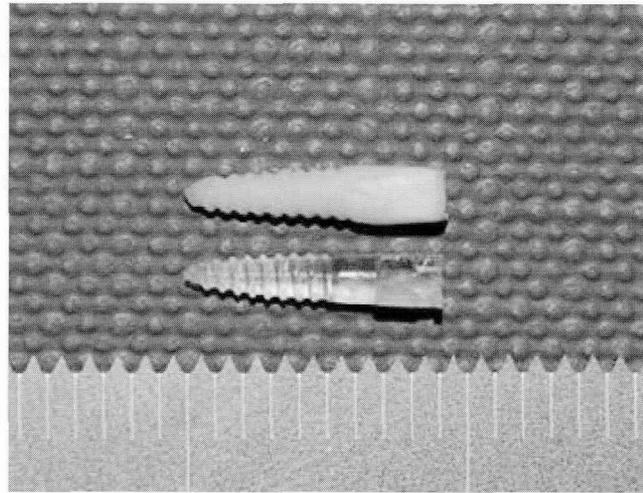


図 1

## 摂食・嚥下障害者のリハビリテーションにおける 体位効果とそのメカニズム

脇本 仁奈

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

Effective head rotation angles in the postural compensation techniques  
for individuals with dysphagia

NINA WAKIMOTO

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University

### 【目的】

頸部回旋法は、頭を麻痺側に回旋して嚥下することで、嚥下後の咽頭残留を軽減させる摂食・嚥下代償法の一つである<sup>1-3)</sup>。しかし、極限まで頸部を回旋した状態で長時間食事をとるという姿勢は、身体へ負担がかかる。そこで、頸部回旋による効果を残したまま、できる限り摂食しやすい姿勢が望まれる。今回われわれは、若年健常者において、ビデオ嚥下造影 (Videofluorography, 以降 VF と略す) を用いて、頸部回旋法の有効な角度を検討した。さらに、嚥下内視鏡検査 (videoscopic evaluation of swallowing, 以降 VE と略す) にて、咀嚼から嚥下前までに頸部回旋が、咽頭形態に与える影響と咽頭部での食塊通過路との関連について検討した。

### 【対象と方法】

研究 I では、健常若年成人30名を対象に VF を行った。頸部回旋角度を正面位と左右各々15度、30度、45度および最大回旋位の計9角度に設定した。被験者が3mlの液体バリウム液を嚥下するところをVF正面像にて撮影、記録した。デジタル化されたVF映像上で下咽頭での回旋側のバリウム液通過の有無を同定した。各頸部回旋角度で、回旋側下咽頭をバリウム液が通過した人の割

合を比較検討した。

研究 II では、健常若年成人22名を対象に VE を行った。頸部回旋角度を正面位と左右各々30度および最大回旋位の計5角度に設定した。各頸部回旋角度における喉頭蓋と咽頭側壁の接触状態およびバリウム液5mlとコンビーフ4gを同時に咀嚼・嚥下させ、咽頭部での食塊通過動態を内視鏡にて撮影しDVDに記録した。デジタル化されたVE映像上で、喉頭蓋と咽頭側壁の接触状態の有無を観察した。さらに、咽頭部を3部位にわけ食塊通過経路を比較検討し、喉頭蓋と咽頭側壁の接触と食塊通過経路との関係を検討した。

### 【結果】

研究 I では、正面位で、全例において両側をバリウム液が通過していたが、頸部回旋角度が増すと、回旋側通過の割合が減少した。30度頸部回旋でのバリウム液の回旋側下咽頭通過を認めた被験者数は、右側回旋7名(7名/30名, 23%)、左側回旋12名(12名/30名, 40%)と有意な減少を認めた ( $p < 0.01$ )。最大まで頸部を回旋すると、右側回旋1名(1名/30名, 3%)、左側回旋4名(4名/30名, 13%)のみに、バリウム液の回旋側の通過を認めた。

研究 II での、各頸部回旋角度における食塊通過

側では、舌後方部、喉頭蓋谷部および喉頭蓋基部の全ての食塊通過経路において、正面と比較して左右30度および左右最大回旋での通過の割合は、統計学的有意差を認めなかった。喉頭蓋と咽頭側壁の接触の有無では、頸部回旋の角度変化により、喉頭蓋と咽頭側壁の接触の割合が有意に増加した。正面位と比較して、左最大回旋位の6名（6名/10名，60%）の者でのみ統計学的有意差を認めた。喉頭蓋と咽頭側壁の接触の有無と喉頭蓋基部における回旋側通過の有無では、左最大回旋時のみ統計学的に有意な変化が認められた。

#### 【考察】

今回の検討より、研究Ⅰでは、頸部回旋30度から、バリウム液は回旋側と反対側を通過していた。さらに、研究Ⅱでは、喉頭蓋基部で回旋側の反対側を食塊通過する傾向を認めた。これは、喉頭蓋と咽頭側壁が接触するという解剖学的要因に

より食塊の貯留を防ぐ一機序を担っている可能性が示唆された。摂食・嚥下障害者への姿勢代償法は、安全性が十分保証された上で、無理のない摂食姿勢が望ましい。臨床において、その点を考慮すると頸部回旋法を適用する際には、30度程度の回旋からその有効性を確認する価値があることが示唆された。

#### 【参考文献】

- 1) Logemann JA (1998) Evaluation and treatment of swallowing disorders. 2nd ed, Pro-Ed, Austin Texas.
- 2) 才藤栄一, 向井美恵 (2007) 摂食・嚥下リハビリテーション. 第2版 ed, 106-7, 医歯薬出版, 東京.
- 3) Logemann JA, Kahrilas PJ, Kobara M and Vakil NB (1989) The benefit of head rotation on pharyngoesophageal dysphagia. Arch Phys Med Rehabil **70**: 767-71.

## 歯髄細胞を用いた硬組織再生の試み—マウス培養歯髄細胞の特性解析—

萩原 貴寛

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

### Regeneration of calcified tissue using mouse dental pulp cells

TAKAHIRO HAGIHARA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

#### 【目的】

歯髄細胞は多分化能を有し、さらに脱落乳歯や智歯及び歯科矯正治療における便宜抜去歯などから容易に採取可能であるため、再生医学において有望な材料である。そこで、本研究においては歯髄細胞を用いた再生医療の実現を最終目標とし、マウスを実験材料に選択し、(1)歯髄細胞の培養条件の至適化、(2)培養歯髄細胞の特性の分子生物学的解析、及び(3)歯髄細胞の生体移植による硬組織形成能の検討を行った。

#### 【材料と方法】

- (1) 正常マウス（8週齢）門歯より歯髄を採取し、コラゲナーゼ処理後に10%ウシ胎仔血清 $\alpha$ -MEM培地にて培養を行った。その際、 $6.0 \times 10^2$  cells/well,  $6.0 \times 10^3$  cells/well,  $6.0 \times 10^4$  cells/well, (いずれも96-well plate) の3条件で播種した。対照として骨芽細胞についても同様の条件で培養を行った。培養1週、2週、3週間後にそれぞれアルカリホスファターゼ (ALP) 染色に供し、さらにALP活性の測定も行った。
- (2) 高密度の培養歯髄細胞における骨芽細胞マーカー (オステオカルシン, I型コラーゲン), 象牙芽細胞マーカー [象牙質マトリックスプロテイン1 (DMP-1), 象牙質シアロホスホプロテイン (DSPP)] 遺伝子の発現レベルについて解析した。

- (3) Genechip 解析により培養歯髄細胞, 骨芽細胞, 骨髄間葉細胞の網羅的な mRNA 発現プロファイルを作製した。
- (4) 歯髄細胞の石灰化能について, 骨芽細胞と比較, 検討した。
- (5) 長期間 (1ヵ月) 培養歯髄細胞をゼルフォーム [滅菌吸収性ゼラチンスポンジ; 【株】ファイザー (東京)] に浸漬し, 免疫不全マウス (NOD/SCID, IL2R $\gamma$ KO, NOG マウス) 筋膜下に埋入した。3週間後および2ヵ月後, 組織を回収した。これをソフロン (超軟X線発生装置, 【株】ソフロン (東京)) で撮影した後, 脱灰切片を作製し, ALP および酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い, 硬組織形成能について解析した。

#### 【結果と考察】

- (1) 歯髄細胞の生存およびALP活性は細胞密度に強く依存し, 高密度培養においてのみ, これらが維持された。高密度培養歯髄細胞は骨芽細胞の約60倍のALP活性を示した。一方, 骨芽細胞の増殖およびALP活性は全く細胞密度の影響を受けなかった。
- (2) 高密度培養歯髄細胞は, 骨芽細胞と比較して, DMP-1 及び, ペリオスチンの mRNA の著しく強い発現が認められた。しかし, 培養歯髄細胞は新鮮歯髄組織と異なり, DSPP mRNA の発現が認められなかった。

- (3) 培養歯髓細胞は骨芽細胞に比べ  $\text{Ca}^{2+}$ 、リン酸濃度調節因子群の発現が著しく高く、ヒドロキシアパタイト形成に有利な細胞であることが示唆された。
- (4) 骨芽細胞の石灰化は BMP に依存していたが、歯髓細胞は BMP 非依存的に石灰化が認められた。
- (5) 軟 X 線撮影により 3 週間後の歯髓細胞移植部位に硬組織様の不透過像が認められた。移植片には TRAP 及び ALP 強陽性の細胞が認められ、硬組織が形成されたことが分かった。2 ヶ月後の移植片には造血機能を伴った完全な骨が形成された可能性が示された。マウス歯髓細胞

の生存は細胞密度に強く依存し、高密度培養においてのみ生存が維持された。また、高密度培養条件下において培養した歯髓細胞は培養期間を通して高い ALP 活性を示し、マウス頭蓋骨から採取した骨芽細胞の約 60 倍の ALP 活性を示した。一方、骨芽細胞の増殖および ALP 活性は細胞密度の影響を全く受けなかった。

以上のマウスを用いた *in vitro* および *in vivo* の実験結果より、歯髓細胞は強い石灰化能を有する特徴的な細胞であり、硬組織再生療法に臨床応用できる可能性を秘めた将来有望な細胞群であることが示唆された。

空気曝露による *P. gingivalis* SOD の発現量の変化：  
サンドイッチ型酵素免疫測定法（ELISA 法）の確立とその応用

小町谷 美帆

松本歯科大学 歯科補綴学第1講座

Development and validation of a sandwich ELISA for the quantification of  
SOD from aerated *P. gingivalis*.

MIHO KOMACHIYA

*Department of Removable Prosthodontics, Matsumoto Dental University*

【目的】

スーパーオキシドジスムターゼ（SOD）は、酸化ストレスから生体を保護するために生物の生存にとって不可欠の酵素である。偏性嫌気性菌でも例外ではなく、歯周ポケットのような高度に嫌気的な部位に棲息する歯周病原菌 *Porphyromonas gingivalis* でさえも SOD を獲得している<sup>1-3)</sup>。

細菌の SOD は、その活性依存の金属によって鉄を含む酵素（Fe-SOD）とマンガンを含む酵素（Mn-SOD）に分けられるが、*P. gingivalis* SOD（*P. g.* SOD）は金属酵素としては例外的にいずれの金属でも活性を示す特徴を有する。Amano, A.ら<sup>4)</sup>は、嫌気下で培養した *P. gingivalis* は Fe-SOD を合成しているのに対し、これを通気下で増殖し続けると Mn-SOD に変換していることを見出した。この原因について、筆者は生育環境の酸化還元電位の変化に応じて *P. g.* SOD は利用する金属種を置換すると考えた。この仮説を立証するために、*P. g.* SOD の定量的酵素免疫測定法（ELISA 法）を開発し、空気曝露に対する SOD タンパク質の発現量の変動を経時的に定量した。SOD の酵素活性の変動も併せて測定した。

【方法】

- (1) 抗 SOD ウサギ抗体を作製し、一抗体固層法によるサンドイッチ型 ELISA 法を開発した。
- (2) *P. gingivalis* ATCC 33277 を通法に従って嫌気培養器で対数増殖期まで培養した。培養終了時を曝露 0 分の菌体とし、培地を室内の振とう器で 30, 60, 90, 120, 240, 360 分間空気に曝露させた。菌体の超音波処理後の遠心上澄を試料とした。
- (3) 試料中の SOD タンパク質量を開発した ELISA 法で定量した。併せて SOD 酵素活性の測定を行い比較した。

【結果と考察】

- (1) 1 pmol~0.5 nmol の *P. g.* SOD の測定が可能である ELISA 法を確立した。
- (2) SOD の酵素活性の測定においては「見掛け上の高い活性」が観察され、確立した ELISA 法は菌体の粗抽出液中における SOD 量の測定に優れていることが示唆された。
- (3) SOD の発現量は空気曝露直後から上昇し、空気曝露 60 分で曝露前の量（0 分値）の 5 倍になった。また、空気曝露 60 分における SOD 量は全タンパク質の 2.7% を占めていた。
- (4) 空気曝露 90 分後の SOD 量は、曝露前の量の 60% にまで低下した。その後、SOD 量は漸次

上昇し、空気曝露360分後（6時間後）には曝露前の量の1.5倍に増加した。

#### 【結論】

*P. gingivalis* の抗酸化機構に関する従来の報告は、長時間空気に曝露した結果のみが示されているため、短時間の空気曝露における *P. g.* SOD の動態は不明であった。筆者は、ELISA 法を開発し、短時間の空気曝露に対する SOD 発現量変化を観察した。この結果、*P. gingivalis* は短時間の空気曝露に対して大量の SOD を発現し、また、直後に大幅な減少を示した。これは本報告が初めてとなる。この変動は、*P. gingivalis* の抗酸化機構を解明する上で新たな示唆を与えると考える。

#### 【文献】

- 1) Amano A, Shizukuishi S, Tamagawa H, Iwakura K, Tsunasawa S and Tsunemitsu A (1990) Characterization of superoxide dismutases purified from either anaerobically maintained or aerated *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol* **172** : 1457-63.
- 2) Amano A, Shizukuishi S, Tsunemitsu A, Maekawa K and Tsunasawa S (1990) The primary structure of superoxide dismutase purified from anaerobically maintained *Bacteroides gingivalis*. *FEBS Lett* **272** : 217-20.
- 3) Nakayama K (1990) The superoxide dismutase-encoding gene of the obligately anaerobic bacterium *Bacteroides gingivalis*. *Gene* **96** : 149-50.

## 臼歯部咬合支持が減少した患者における 主機能部位と咀嚼能力に関する研究

中塚 佑介

松本歯科大学 総合歯科医学研究所 顎口腔機能制御学部門

Location of main occluding areas and masticatory ability in patients  
with reduced occlusal support

YUSUKE NAKATSUKA

*Institute for Oral Science, Division of Oral & Maxillofacial Biology,  
Matsumoto Dental University*

### 【目的】

硬い食品の咀嚼時には、歯列上に存在する主機能部位と呼ばれる特定の歯が中心となって粉碎が行われ、この部位は、最も緊密な咬合関係を示し最大咬合力の発揮される第一大臼歯に一致していることが多いとされている。しかし、臼歯部の咬合が崩壊し咬合支持が減少した場合に、欠損部位をたとえ有床義歯を用いて補綴治療を行ったとしても、はたして新たな口腔内環境において主機能部位がもとのように第一大臼歯部に位置するのか、あるいは残存歯に影響を受けることで、別の部位に位置するのかについては、いまだ不明な部分が多く残されている。そこで本研究では、咬合支持の減少を可撤性有床義歯で補綴処置した場合に、主機能部位がどこに位置するのかについて、さらに主機能部位と咀嚼能力との関係について明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

被験者は松本歯科大学補綴科に来院した患者の中から、Eichner 分類 A1 に属し欠損部位がない者、および Eichner 分類 B1~B4, C1~C3 に属する者の中で欠損部位が可撤性有床義歯により補綴されている者の計102名を選択した。

主機能部位の判定は加藤らの方法に準じて行っ

た。長さ4mmのストッピング片を試験試料として被験者の舌上に乗せ、咀嚼時を想定させながら噛みやすい任意の部位で1回の噛みしめを行わせた後、歯列上におけるストッピングの位置をもって主機能部位と判定した。可撤性有床義歯を使用している被験者では義歯を装着した状態で試験を行った。また、主機能部位をもとに被験者を2群に分類した。主機能部位が小臼歯部に位置しているものをPM群、大臼歯部に位置しているものをM群とした。得られた結果より、Eichner 分類のコードと主機能部位との関連性について分析を行った。

また、各被験者に対して主観的評価に基づく咀嚼能力に関するアンケート調査を行い、主機能部位との関連性について分析を行った。このアンケートは、豆腐などの噛みやすいものからりんごの丸かじりなどの噛みにくいものまで20種類の食品について、咀嚼することが可能か否かを質問し、得られた回答を点数化したものである。

### 【結果と考察】

Eichner 分類 A1 では主機能部位の多くが第一大臼歯部に認められたが、Eichner 分類 B群, C群と咬合支持数が減少するのに伴い、主機能部位は前方歯である小臼歯群に位置する傾向が認めら

れた。この傾向は Eichner 分類 C1 で特に顕著であった。Eichner 分類コードと主機能部位との間には統計学的に関連性が認められた (Chi square test;  $p < 0.05$ )。

咀嚼能力評価は Eichner A1 が B1 から C3 に比べて非常に高い値を示し、咀嚼能力評価と Eichner 分類の間には統計学的に関連性が認められた。 (one-factor ANOVA;  $p < 0.01$ )。また、

主機能部位の違いによる咀嚼能力評価を比べると PM 群に位置している場合の方が、M 群の場合よりも低いスコアを示す傾向にあり、両群間に有意差が認められた (Student t-test;  $p < 0.05$ )。

以上より、主機能部位は残存歯の影響を受けることで位置が異なる可能性があること。さらに、主機能部位の位置と咀嚼能力評価のスコアとは密接に関連していることが判明した。