

第2研究班 新規代替埋入材料の開発と応用研究班

咬唇粘膜に潰瘍を引き起こした奇形歯に3DXを利用し
歯内療法を行った一例

- 岡本春憲、宇治川玲子、荒井清司、松根健介、
今村隆一*、前田隆秀
(日大・松戸歯・小児歯, *日大・松戸歯・矯正)

【緒言】

近年、複雑な歯根形態の歯内療法に対し、3DX multi image micro CT (以下3DX、ミタ製作所)の画像が有用であることが報告されている¹⁾。3DXとは日本初の歯科医療に最適化した三次元画像診断装置である。口内法X線写真と同等の解像力があり、被曝線量は従来法のパノラマとほぼ同等ときわめて低被曝である。画像は特に埋伏歯、根尖病巣、根分岐部病変、顎関節症およびインプラントの診断に有効である²⁾。今回われわれが遭遇した症例は、唇顎口蓋裂の既往がある患児の、顎裂に近接して存在する上顎左側中切歯の突起部分が、上口唇内側粘膜へ持続的に刺激を与えたことにより潰瘍を生じ、疼痛のため日常生活に支障をきたした一例である。原因歯の口内法X線写真と3DX写真を用いて歯髄腔の位置や形態を把握し、形態修正および歯内療法を行ったのでここに報告する。

【症例】

患者：9歳8ヶ月の男児(平成5年10月31日生)

主訴：上顎左側中切歯唇側面の突起部分の接触による上口唇内側粘膜の疼痛

現病歴：7歳11ヶ月頃より、奇形歯である上顎左側中切歯の萌出が開始。8歳9ヶ月時、定期検診にて一部萌出している奇形歯にC₂程度の齲蝕を認め、コンボジットレジン修復を行った。その後、当該歯は本大学病院の矯正科にて牽引による萌出誘導を行ったが、それにより露出してきた突起部分の接触により、上口唇内側粘膜に潰瘍を生じた。既往歴：医科的既往歴；ハウスダストに対するアレルギー。滲出性中耳炎。歯科的既往歴；左側唇顎口蓋裂のため、生後4ヶ月時に口唇形成術、1歳2ヶ月時に口蓋形成術、7歳9ヶ月時に口蓋裂部に腸骨移植術を受けた。抜歯等の歯科治療経験あり。

家族歴：家族、親戚に唇顎口蓋裂、奇形歯を有する者はいない。

現症：口腔内所見；上顎左側中切歯・側切歯間に顎裂の

癒痕が認められ、裂部分へは上口唇の内側粘膜が入り込んでおり、この周囲の口腔前庭は浅い。上顎左側中切歯は唇側面に突起部をもつ奇形歯であり、これにより生じた潰瘍が上口唇内側粘膜に認められた。口内法X線写真及び3DX写真所見；奇形歯の歯軸は唇側に傾斜しており、歯根は唇側、且つ近心方向に軽度の彎曲を有する。歯根形成は完了しているが、歯根長は反対側中切歯と比較すると非常に短い。唇側面に歯髄腔を共有する突起様のものが見られる。

【処置および経過】

浸潤麻酔下にて上顎左側中切歯唇側面の突起部分の削除および形態修正を行った。唇側面の露髄は避けることが不可能であったため抜髄を行い、テンボラーグラウを作成し仮着した。1週間後、ガッタバッチポイント+キヤルにて根管充填を行った。その後経過は良好であり、上口唇内側粘膜の潰瘍も消失した。

【考察】

歯の形態や歯数の異常の発生率が唇顎口蓋裂患者で高いことはよく知られており³⁾、本症例も上顎左側中切歯の形態に異常が認められた。今回3DXを用いた理由として、①歯髄腔の位置や形態が複雑であると予想され、口内法X線写真のみではこの把握が不十分。②形態修正時に露髄が避けられるかの判断。③露髄が避けられないときに根管を三次元的に確認し正確な根管治療を行う。④被曝線量が比較的低い。⑤鮮明な画像を得ることが出来る。

奇形歯によって生じた上口唇内側粘膜潰瘍の疼痛のため、日常生活に支障をきたした一例であったが、3DXを根管治療に用いたことにより、不必要な抜歯を行うことなく、良好な結果を得ることが出来た。

【参考文献】

- 1) 菅野亜里早ら：根尖性歯周炎を惹起した嵌入歯に3DX*を利用し、歯内療法を行った1例。小児歯科学雑誌, 40(1): 171-176, 2002.
- 2) 新井嘉則ら：歯科用小型X線CT(Ortho-CT)の臨床例1,000例の統計的分析。日本歯科医学雑誌, 19:54-63, 2000.
- 3) 宮崎正：口蓋裂 その基礎と臨床. 241-242, 医歯薬出版, 東京, 1982.

本研究の一部は学術フロンティア推進事業の補助を受けて行った。

多孔質アパタイトにおける骨再生の検討

○荒井清司, 岡本春憲, 松根健介, 木場秀夫*, 根本君也*
*, 前田隆秀
(日大・松戸歯・小児歯, *日大・松戸歯・病理, **日大・松戸歯・歯科理工)

【目的】

近年, 生体補填材料を用いた再生医療により組織再建および生体機能の回復が行われている。その中でも新生骨の再生に際して, 足場 (scaffold) としてアパタイトが注目されている。Friedenstein らは微細な気孔を有したリン酸三カルシウムが骨置換を起こすことを報告した。また同時に微細な気孔を有する多孔質アパタイトでは, 骨への置換に非常に時間がかかることも合わせて報告している。今回, 演者らは多孔質アパタイトに吸収性のセラミック材料として β -TCP や炭酸カルシウムを含有した多孔質アパタイトを作製し, 作製した多孔質アパタイトの生体内での挙動を動物実験によって観察した。

【試料および方法】

生後3週齢の Wistar-ST 系ラット (雄, 約 40g) を研究に用いた。ラットにネブプタール麻酔による全身麻酔を行い, 試験体埋入場所である左右脚部にリドカインによる局部麻酔を行った。左右側の脛骨内側の膝関節より 10mm 末梢側を剃毛, 消毒後メスにて切開し骨面まで露出, 骨膜まで剥離した。埋入窩は, マイクロモーター (滅菌生理食塩水注水下) を用いて歯科用ラウンドバー #3 (直径 1.0mm), #8 (直径 2.0mm) を順に行い, 皮質骨の長軸に対し垂直に直径 2.0mm 深さ 2.0mm の孔を形成した。滅菌生理食塩水で洗浄の後, 形成した孔に対してそれぞれ作製した試験体を埋入し縫合した (図 1)。埋入後2週間, 1ヶ月, 3ヶ月, 6ヶ月においてラットを CO₂ 下にて安楽死させ, 膝関節を中性ホルマリンにて固定した。固定した試料は非脱灰にて HE 染色およびピラヌエバ骨染色を行い, 骨再生の検討を行った。

試験体は, 以下に示す3種類を用いた。

1. 多孔質ハイドロキシアパタイト
2. 多孔質ハイドロキシアパタイト+炭酸カルシウム
3. 多孔質ハイドロキシアパタイト+ β -TCP

【結果】

1. 多孔質ハイドロキシアパタイトを埋入したものは, 異物反応は認めないが, 埋入窩と試験体の境界に骨添加は認められなかった。
2. 多孔質ハイドロキシアパタイト+炭酸カルシウムを埋入したものは, 試験体辺縁に近接した皮質骨からの骨添加ならびに, 骨置換と思われる (矢印部) 像が認められた。(図 2)
3. 多孔質ハイドロキシアパタイト+ β -TCP を埋入したものは, 結果 2 と同様に骨添加ならびに骨置換と思われる像が認められ, 6 か月経過時の骨新生の割合を結果 2 と比較するとより多かった。矢印は, 新生骨がアパタイト内へ侵入している様子を示す。(図 3)

【考察】

埋入した3種類の試験体は, いずれも異物排除の組織像が認められず, 骨芽細胞の足場となりえる材料であることが考えられた。多孔質アパタイトに吸収性のセラミック材料として β -TCP や炭酸カルシウムを含有させると骨への置換, 特に置換時間の変化に違いがあることが確認できた。今回の結果から多孔質ハイドロキシアパタイト+ β -TCP を混ぜたものにおいて骨への置換がより早く促進されていることが示唆された。これは, β -TCP の方が, 炭酸カルシウムと比較して生体内において吸収が早いためであり微細な気孔から進入した骨芽細胞によって骨改造が行われたものと考えられる。

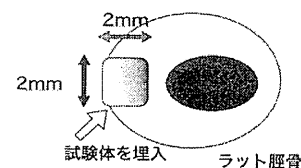


図 1 埋入方法

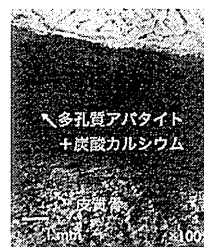


図 2 HE 染色 3ヶ月

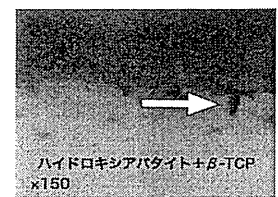


図 3 BN 染色 3ヶ月

本研究の一部は, 平成 15 年度日本大学松戸歯学部鈴木研究費の援助により行われた。

骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1における bone nodule の結晶性へのH₂O₂の影響

○佐藤 俊紀¹⁾・田中 陽子²⁾・安孫子 宜光³⁾
・妻鹿 純一²⁾

¹⁾日本大学大学院松戸歯学研究科 障害者歯科学専攻, ²⁾日本大学松戸歯学部 障害者歯科学講座・口腔科学研究所, ³⁾日本大学松戸歯学部 生化学・分子生物学講座・口腔科学研究所

摘 言

骨組織では、胎児期から老年期まで生涯を通じて骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収が常に行われている。正常な生体では骨形成と骨吸収のバランスが保たれているが、加齢とともに骨量が減退し、その骨量の減退に影響を与える因子として活性酸素による酸化ストレスが重要な役割をしていると考えられている。活性酸素は老化を促進させると考えられており¹⁾、早期老化症の一つとして知られているダウン症候群において、活性酸素種の産生が促進されていることが示唆されている。近年、Akkus²⁾らはラットにおいて加齢により骨の結晶性が変化することから骨の評価法として結晶性の必要性を報告している。しかしながら、老化による骨の結晶性の変化についてはまだ不明な点が多い。

前回の本学会において我々は、生体内で常時産生される活性酸素の一つである過酸化水素(H₂O₂)で骨芽細胞様細胞株であるMC3T3-E1細胞を処理し、培養後の細胞層をvon Kossa法で染色した結果、H₂O₂作用群のbone nodule数、総面積がコントロール群に比べ低下することを報告した。今回はさらに、Micro X-ray diffraction (Micro-XRD)を用い、細胞層に形成されるbone noduleの結晶性に及ぼす影響について検討したので報告する。

対象ならびに方法

MC3T3-E1細胞に、400 μMのH₂O₂を3時間作用させ、10%FBS、アスコルビン酸、β-グリセロリン酸を含むα-MEM培地を用いて37度、air 95%、CO₂5%条件下にて30日間培養した。その後、上清を取り除きPBS(-)にて細胞を洗浄した後、10%中性ホルマリンにて固定し、細胞層における

Bone nodule形成について、Micro-XRDを用いて検討した。なお、Micro-XRDは、RINT-2500湾曲PSPC型微小部X線回折装置(Rigaku, Japan)を用い、以下に述べる2種の方法にて測定及び回折実験を行った。

第1の方法では、bone noduleを慎重に培養プレートから剥がしとり、スライドグラス上に載せたものを用い解析した。第2の方法では、bone noduleを、銀メンブレンフィルター(Milipore, U.S.A)上に載せたものを用いた。

結 果

本実験におけるH₂O₂作用群とコントロール群のbone noduleのX線回折パターンにみられるピークは、すべての方法でも生体骨のX線回折パターンと一致していた。しかし、H₂O₂作用群とコントロール群には、出現したアパタイトの回折ピークに強度及び明瞭性の違いが認められた。

考 察

Micro-XRDにおけるアパタイトの回折ピークの強度の違いから、bone nodule内に存在するハイドロキシアパタイト結晶の大きさにH₂O₂が影響する可能性が示唆された。また、回折ピークにおける明瞭性の違いから、ハイドロキシアパタイト結晶の成熟性にH₂O₂が影響する可能性が示された。

従って、酸化ストレスは骨芽細胞において骨形成能に障害を及ぼし、加齢における骨量減退の原因となりうる可能性が示された。

Micro-XRD回折実験においてご指導をいただいた日本大学松戸歯学部 寒河江 登志朗先生に厚く感謝致します。

本研究費の一部は文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業及び平成17年度大学院高度化推進事業(学生分)によった。

文 献

- 1) Sohal RS, Allen RG. : Oxidative stress as a causal factor in differentiation and aging: a unifying hypothesis. *Exp Gerontol.* 25: 499-522, 1990.
- 2) Akkus O, Adar F, Schaffler MB. : Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone.* 34 (3): 443-53, 2004.

エナメル質形成不全症における過剰歯の組織構造

○鈴木 久仁博¹、松根 健介²、前田 隆秀²、
小澤 幸重¹ (¹日大 松戸歯 解剖²、²日大
松戸歯 小児歯科)

エナメル質形成不全症の正中過剰埋伏歯を観察する機会を得て、組織構造を検討したので報告する。試料の表面観察は無処理、断面観察は1/20N塩酸による腐食処理でおこなった。エナメル質表面は形成不全や吸収窩による凹凸が著しく、明瞭な周波条が観察された。走査電顕ではエナメル質の層状の剥離や球状、茸状の隆起、大小の陥凹が認められて石灰化が不規則に進行したことを示していた。トームス突起の陥凹が観察される部位と陥凹の認められない平滑な面をもつ部位が混在していた。隆起の頂部をトームス突起の陥凹をもつエナメル質の破片が覆う部位もあった。縦断面の観察では不定形の膜状構造や小柱が融合したような像によりエナメル質に有機成分が多いことが推定された。エナメル質には明瞭で幅の広い成長線が認められ、その部位のエナメル小柱は大きく屈曲していたが、対応する象牙質にはこのような像は観察されなかった。エナメル質のほぼ中層には複雑な形態の空洞が配列し、エナメル質形成中においてもエナメル芽細胞の退縮と形成不全のあることを示していた。シュレーゲル条は認められず、小柱の形態や大きさは様々であり、走向は複雑で捻転する部位もみられた。これらの結果から、エナメル質形成不全症の発生過程におけるエナメル芽細胞はシュレーゲル条を構成する運動をとることができず、小柱の形態の多様性からエナメル芽細胞の形態と機能の著しい変化が推定される。

エナメル質形成不全症に認められた過剰歯の形態学的・組織学的検討

○松根健介, 鈴木久仁博*, 小澤幸重*, 前田隆秀
(日大松戸歯・歯・小児歯, *解剖Ⅱ)

【目的】

過剰歯およびエナメル質形成不全症における歯の形態学的・組織学的な報告は数多く報告されている。しかしながら、正中過剰埋伏歯を有するエナメル質形成不全症を伴う患児の報告は認めない。今回、演者らはエナメル質形成不全症の8歳男児に認められた正中過剰埋伏歯の摘出術を行い、当該歯の形態学的、組織学的検討を行ったので報告する。

【症例】

症例：8歳5か月 男児

初診：平成8年6月

主訴：健診にてエナメル質形成不全を指摘され、その精査加療を希望し来院

家族歴：問診においてエナメル質形成不全および過剰歯を有する者は認めなかった。

既往歴：妊娠6か月時にかぜのため薬物3日間服用、7か月時に膀胱炎にて薬剤3日間服用、8か月時に貧血の薬物を出生時まで服用、薬剤名および種類は不明である。吸引分娩にて出生した。その他、特記事項は認めなかった。

全身所見：皮膚、頭髪、爪等の外胚葉系器官に異常は認めなかった。

歯科的既往歴：1歳6か月健診にて、エナメル質形成不全を指摘された。3才児健診にて再度指摘され平成8年に当歯科病院来院、口腔内所見、パノラマエックス線写真像から、乳歯と永久歯全てにエナメル質の低形成が認められ、特発性のエナメル質形成不全症と診断した。なお、その際、2本の正中過剰歯を認めた。しかし、後継永久歯胚との位置関係より経過観察とし、8歳時に摘出を行った。

【試料及び方法】

摘出された試料である正中過剰埋伏歯2本(試料1, 試料2)は生理食塩水にて洗浄後、中性ホルマリンにて保存した。コントロールとして健常児の上顎乳中切歯ならびに正常過剰歯を用いた。

以下の項目について検討を加えた。

1. 患児の乳歯と永久歯とのエナメル質表面の肉眼所見
2. 渡辺の分類¹⁾により歯冠形状、歯根形態の分類を行った。
3. 実体顕微鏡(PHOTOMAKROSKOP M400, Wild 社製)にてエナメル質表面性状を観察した。
4. エレメントアナライザー(JSX-3220, Jeol 社製)を使用しエナメル質表面のCa, P濃度を測定した。
5. エナメル質表面を乾燥し、オートファインコート(FC-1600, Jeol 社製)にて金・パラジウム(Au-Pd)蒸着を行い、走査型電子顕微鏡(SEM:S-2150, 日立社製)を用いて、加速電圧20kvで観察を行った。

【結果及び考察】

1. 患児残存歯との比較

患児の乳歯と永久歯の歯冠全体のエナメル質表面は、凹凸しており、黄褐色であり、水平方向に槓を認める。一方、試料1, 2におけるエナメル質表面は、凹凸感はあるものの乳歯と永久歯に比較しその凹凸感は少なく、白色であった。

2. 歯冠形状、歯根形態

試料1の歯冠形態は、犬歯型であり歯根彎曲を認め、根未完成であった。試料2の歯冠形態は、単錐型であり歯根彎曲は認めず、根未完成であった。

3. エナメル質表面性状

コントロール群に対しその表面は粗造であった。

4. エナメル質表面Ca, P濃度

本試料1, 2のCa濃度はコントロール過剰歯とほぼ同値を示し、P濃度はコントロールに比較して高値を示した。また、Ca/P比はコントロールと比較し低値を示した。

5. エナメル質表面におけるSEM像

エナメル質表面は凹凸の激しい構造を呈していた。

【まとめ】

本研究に用いられた試料は健常児に認められる上顎乳中切歯および過剰歯の構造とは明らかに違いを認めた。今後、患児に残存する乳歯のエナメル質との比較、ならびに、エナメル質形成に関与する遺伝子の構造解析を行う予定である。

【文献】

1)渡辺英雄：小児の上顎前歯部過剰歯に関する研究，愛院大歯誌，24(1)：98-121，1986。

Re-estimation of Human Tooth Enamel Crystallite Size by XRD.
T. SAKAE* (Nihon Univ. School of Dent. at Matsudo, Chiba,
Japan)

Crystallite size of enamel apatite has been shown as the largest among the hard tissue apatites in body. The reported data for human enamel, however, showed a wide variety in crystallite size from several hundred Å to over ten thousand Å. The purpose of this study was to re-estimate the crystallite sizes of human tooth enamel together with the lattice distortion, both of which characterize the chemical-physical properties of tooth enamel apatite against caries attack. Enamel powder was collected from ten human third molars, which were extracted for orthodontic reasons. Crystallite size analysis was carried out by the integral width method. X-ray diffraction (XRD) pattern of the enamel powder was collected using a Rigaku XRD instrument under the laboratory conditions. The XRD pattern was refined for noise, peak-overlap, instrumental broadening and baseline. Using the integral width method, the crystallite size and lattice distortion were ca. 210 Å and ca. 0.4 % along the a-axis and ca. 550 Å and ca. 0.7 % along the c-axis. These results provide an evidence to work out enamel crystal formation hypothesis as well as to realize a character for caries attack. Supported by JSPS and MESSC, Japan. sakae@mascat.nihon-u.ac.jp

Osteoclastic resorption of aragonite as bone substitute material
HOSHINO K*^{1,2}, SAKAE T¹, TANAKA J^{1,2} and KOZAWA Y¹
Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan¹
Clinical Implant Society of Japan, Tokyo, Japan²

Objective: This study aimed to clarify the mechanism of crystalline calcium carbonate (CaCO₃) in the form of aragonite as an osseous transplant material.

Materials and Methods: The histological and chemical changes in newly formed bone after implantation of coral granules in the bone marrow of the rat tibiae were examined.

Results: The coral granules were absorbed by TRAPase positive osteoclasts. The osteoclasts absorbed the coral fragments using a ruffled border, and packaged them into lysosomal vacuoles. The newly formed bone around the coral granules arose through direct attachment to the coral, because matrix vesicles were observed among collagen fibers, which were secreted by the osteoclasts around the coral. The further transmittance infrared absorption bands of CO₃²⁻ groups' intensity the newly formed bones were stronger than those of the control. The absorption bands of HPO₄²⁻ and PO₄³⁻ groups showed a different pattern between the newly formed bone around the coral and the control. Bone lamination and bone cavities were observed in the new bone around the coral at four weeks after implantation indicating that the newly formed bone was mature osseous tissue.

Conclusion: It was assumed that CO₃²⁻ and Ca²⁺ released from the coral was advantageous for calcification of new bone.

STRUCTURAL AND CHEMICAL ANALYSIS OF OSTEOPETROTIC (OP/OP) MOUSE BONE

T Sakae, Y Sato, H Okada, H Yamamoto, Y Kozawa. Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

Osteopetrotic (op/op) mouse comes out by abnormal autosomal condition and shows a small dome skull with non-erupted teeth. Many studies concerning with op/op mouse have been treated the littermate as normal control model. However, our previous histo-pathological observations revealed that the littermate mouse bone structure was not considered as normal (Sato et al., 1995). This study aimed to investigate the structural and compositional differences among op/op, littermate and normal mice bone. Four week-old B6C3-op/op, littermate and normal mice were used in this study. The maxilla and femur were analyzed using backscatter imaging (BSI, Jeol T-200), and micro-Fourier transform infrared spectroscopy (micro FT-IR, Horiba FT-530) using polished sections, and differential thermal analysis (DTA, Rigaku TAS-100 TG-DTA) using powder samples. BSI showed that the molars of op/op were in dental ankylosis with the maxilla bone, and that calcification pattern around bone lacunae of op/op and littermate mice was differed from that of normal. In micro-FT-IR study, crystallinity of apatite in the op/op bone was differed from that in the littermate and normal. DTA showed that the organic combustion pattern of the op/op was differed from the littermate and normal. These results indicated that properties, formation and architecture of apatite crystal and organic matrix vary among op/op, littermate and normal mouse bone. [This study was expensed by the Grant from MECSST, Japan]

齶蝕象牙質の熱重量・示差熱分析的研究

寒河江 登志朗¹⁾, 佐藤 由紀江²⁾, 山本 浩嗣²⁾, 小澤 幸重¹⁾

日本大学松戸歯学部第2解剖学教室¹⁾, 口腔病理学教室²⁾

齶蝕部象牙質の状態を調べる目的で、微量熱分析の手法を用いた。齶蝕部象牙質は脱灰された状態にあると考えられている。従来はその状態を調べるために c MR, SEM-EDX などの方法が用いられてきた。ここでは、示差熱分析-熱重量分析を組み合わせた熱分析的方法により、脱灰の程度、コラーゲンの状態まで知ることが出来た。この方法を用いることで、齶蝕病巣内の変化も追究できることを示す。

Thermal analysis of human carious dentin

Toshiro Sakae¹⁾, Yukie Sato²⁾, Hirotsugu Yamamoto²⁾, and Yukishige Kozawa¹⁾

Departments of Anatomy¹⁾, and Oral Pathology²⁾, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

Carious dentin varies the content of inorganic components from part to part. Applying micro-differential thermal and thermo-gravimetric analyzer (DTA-TG), the degree of mineralization of the carious dentin could be easily obtained. The DTA-TG analysis also revealed the structural change of the collagen in the carious dentin. It is noted that using this technique the degree of mineralization within the carious region was easily obtained. [This study was supported by the Grant-in-Aid for Scientific Research (C) JSPS, and the Grant from the MECSST to promote multidisciplinary research project]

アパタイトに含まれる元素の破骨細胞活性への影響

○寒河江 登志朗¹、藤森 優子²、星野 和正¹、小澤 幸重¹、
LeGeros Racquel³ ¹ 日本大学 松戸歯学部 第2 解剖学教室
² 日本大学 松戸歯学部 口腔外科学教室、³ ニューヨーク大学
歯学部 リン酸カルシウム研究室

【目的】硬組織代替材料として合成 apatite を用いることが多いが、その成績は報告により一定しない。これは、apatite になんらかの差異があるためと推測できる。今回生体 apatite に近い結晶学的性質をもつ合成アパタイトの組成と破骨細胞活性との関連を調べた。【方法】apatite は LeGeros の方法によって、炭酸イオンと F イオン量を変化させた。合成 apatite は、原子吸光法、FT-IR 法、EDS 法、X 線回折法、SEM を用いて分析した。炭酸を多量に含むもの、炭酸と F を含むもの、そして炭酸を微量に含むものの 3 種を実験に用いた。合成アパタイトは粉末化した後、固めてペレットを形成した。細胞培養は藤森ら(1998)にしたがって、ウサギヒ骨から骨髓細胞を採取し3日間培養した。破骨細胞の活性は TRAP 反応と SEM 観察によった。【結果と考察】細胞活性に影響を与える因子である結晶性は、今回の合成 apatite は生体 apatite と同程度であり、試験材料の表面状態もペレットを作ることで同じにした。その結果、細胞の反応には組成の影響がもっとも強く現れ、炭酸イオンは活性を上昇させ、F イオンは低下させるという明瞭な結果を得た。F イオンの影響は破骨細胞のみでなく、その他の細胞へも強く現れた。【謝辞】研究経費の一部は松戸歯学部学術フロンティア推進事業および科研費補助金(No.11671817)によった。

On the calcified stomach tooth of *Procambarus clarkii*

-Analysis, Histology, Histochemistry -

H. Chisaka, T. Sakae and Y. Kozawa

Department of anatomy, Nihon University, School of Dentistry at Matsudo, Chiba,
Japan

To elucidate a calcification in the stomach tooth of the crayfish *Procambarus clarkii*, we investigated the calcification by polarizing microscope, electron diffraction, EDX analysis, FT-IR, histochemical methods and others. The cuticle of the stomach tooth was composed of epicuticle, exocuticle, endocuticle, and membranous layer. The cuticle was lined with an epithelium. For histochemical studies and polarizing microscope, the crystals were observed in the endocuticle. High amount of calcium and phosphorus were detected from the crystal with EDX analysis. The crystal was determined the hydroxyapatite by the electron diffraction and FT-IR. These studies demonstrated the hydroxyapatite crystal was deposited in the exocuticle of the stomach tooth. However, a result of X-ray diffraction with powder of the stomach tooth showed a peak like a calcite without the hydroxyapatite peak.

動脈硬化症に見られた複屈折性結晶について

松村恵美子¹, 寒河江登志朗², 岡田裕之¹, 宇都宮忠彦¹, 山本浩嗣¹, RZレゲロス³

¹ 日本大学松戸歯学部口腔病理学講座, ² 日本大学松戸歯学部口腔組織学講座, ³ New York Univ. 歯学部

動脈硬化症の血管内膜に強い複屈折性を示す結晶が見られた。これらの結晶が見られる部分の血管はフォンコッサ陽性であり、コレステロール結晶の逸脱した痕跡が認められた。これらの結晶はHE染色にもフォンコッサ反応にも陰性であった。偏光顕微鏡下で結晶はさらに放射状結晶集合体と単純結晶に2分された。FT-IRとX線回折実験の結果はこれらの結晶がアパタイト系のものであることを示した。これらの結晶の形成機構について結晶の出現状況から推察する。

Birefringence crystals found in some arteriosclerosis.

E Matsumura¹, T Sakae², H Okada¹, T Utsunomiya¹, H Yamamoto¹, RZ LeGeros³

¹ Dept. of Oral Pathology, NUSDM, ² Dept. of Oral Histology, NUSDM, ³ College of Dentistry, New York University.

A number of high birefringence crystals were found in the tunica intima of arteriosclerosis lesions. These lesions were positive in von Kossa reaction but the crystals remained clear. Polarized light microscopy showed these crystals were grouped into at least two types, i) radial aggregation and ii) uniform structure. FT-IR and X-ray diffraction analysis showed that these crystals were not composed of apatite. The mechanism of the crystal formation is discussed from the mode of occurrence.

エナメル質カリエスの微小領域X線回折分析

寒河江登志朗¹・兒野 喜穂²・永井 教之³

¹ 日本大学松戸歯学部第2解剖学講座、² 帝京大学医学部歯科口腔外科学教室、³ 岡山大学歯学部口腔病理病態学講座

エナメル質カリエス（齲蝕）の進行機序はかなりの部分が解明され、最近ではその予防法に力が向けられている。予防あるいは修復のためには（将来の）齲蝕部の状態を正確に知る必要がある。従来、エナメル質カリエスの結晶の研究は電子顕微鏡的に行われてきている。ここでは微小部X線回折法を用いて結晶の状態を解明しようとした。齲蝕歯（C1からC3）の縦断研磨標本を作製し、偏光顕微鏡で観察後、RIGAKU RINT IPシステムを用いて100 μ m径X線ビームによる微小部X線回折パターンを得た。エナメル質カリエス部位の結晶は周囲の健全部エナメル質とは種々の点で異なっていた。例えば、白斑病巣の結晶は周囲の健全部よりも配向特性が強くなり結晶性の上昇も見られた。しかし、それらの変化は個別のであり、一般化はまだ出来ない。今後例数を増やして一般化できる傾向を見出したい。

Micro X-ray Diffraction Study of Carious Tooth Enamel

Toshiro Sakae¹, Yoshiho Chigono², Noriyuki Nagai³

¹Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

²Department of Dental Oral Surgery, School of Medicine, Teikyo University

³Department of Oral Pathology and Medicine, dental School, Okayama University

Mechanism of caries process in tooth enamel has been clarified so well, and recently attentions are focused on its preventive methodology. It is needed to be clarified the state of carious lesions, including predicted, to prevent or to reconstruct the lesions. Usually ultra-microscopic study on carious lesion has been carried out using an electron microscope. In this study, an attempt of using micro-focus X-ray diffraction method for analysis of carious crystals was carried out. Carious teeth, ranked from C1 to C3, were sectioned and polished. After observation by polarized light microscope, micro X-ray diffraction analysis was carried out using a RIGAKU RINT IP system with an X-ray beam of 100 μ m in diameter. The results showed that crystals in carious lesions differed from those in the surrounding normal enamel; i. e. the higher degree of crystal orientation and crystallinity found in the white lesions. However, the results was not uniform and varied from to specimens. There needs accumulation of data to assume a general tendency.

Orientation of apatite crystal in dentin from human and some animal teeth.

MISHIMA Hiroyuki, SAKAE Toshiro, KOZAWA Yukishige

Department of Anatomy, Nihon University School of dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan

Dentins of human, bovine, deer, rat, rabbit and alligator teeth were studied to investigate the crystal organization of dentin, and the relationship between crystal orientation and the mechanism of tooth formation, using a curve IP X-ray Laue system (RINT RAPID, Rigaku). The crystal orientation was very poorly orientated in the enamel-covered crown dentin of human, bovine and deer teeth. The results were similar to the enamel-covered labial dentin of rat and rabbit incisors. In the enamel-covered dentin, the calcospherites were present. With the presence of calcospherites, the crystal orientation was arranged radially. The crystals were orientated indistinctly in the cementum-covered root dentin of human, bovine, and deer teeth. No calcospherites were observed in the cementum-covered root and lingual dentin. In the cementum-covered dentin, the axis of crystal orientation was almost parallel to the tooth axis and almost to the direction of the collagen fibers. In the cementum-covered dentin of rat and rabbit incisors, the distribution of Debye ring of apatite (002) was narrower. The degree of orientation of continuously growing teeth was better than that of diphyodont teeth. In the enamel-covered crown dentin from alligator's polyphyodont teeth, the crystal orientation was recognized as similar to the cementum-covered root dentin. The incremental lines were clearly observed in the crown dentin in alligator. It is assumed that collagen-orientated crystals run nearly parallel to the orientation of incremental lines. It is suggested that the relationship was observed between the mechanism of the tooth formation and the orientation characteristic of dentine crystal. A part of this work was supported by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to Promotion Multidisciplinary Research Projects 1998-2003 and 2001-2005, and Grant-in-Aid for Scientific Research (C. 13671914 and C. 12671787) from Japan Society for the Promotion of Science.

病理的な石灰化物—もうひとつの生体鉱物

寒河江登志郎 (日本大学松戸歯学部・口腔科学研究所)

Pathological Calcifications – Another Form of Biomineralization

Toshiro Sakae (Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

In this paper, it was attempted to bring the pathologically formed minerals into focus. The wider variation of mineral species in the pathological calcifications expresses the more complicated mechanism of mineralization than in the normal. Several examples of the pathological calcifications were presented and pathogenic minerals were reviewed briefly.

近年、生物・微生物の関与した鉱物形成が地質時代を通じて地球環境に多大の影響を与えてきたことが明らかになってきた。生体鉱物形成作用は Biologically Induced Mineralization (Lowenstam, 1981) と Biologically Controlled Mineralization (Mann, 1983) に分類され、これはさらに exo-cellular, inter-cellular, そして intra-cellular mineralization に分けられる。これは病理的な原因で形成される生体鉱物にも適用される。病理的な生体鉱物の特徴の一つは、正常な状態では形成されないシュウ酸塩鉱物が頻出することにある。これは病理的な鉱物形成が細胞破壊を伴っているときに起きる。このように鉱物種の同定から形成機構を推定することが出来る。

ここでは鉱物学の古くて新しい応用分野としての病理的な生体鉱物形成のかかえる問題を明らかにする目的で、経験したいくつかの病理的な石灰化物(参考文献)を示し、他の報告とともに出現する鉱物種、特に生体アパタイト以外、を簡単に総括する。

参考文献

- Akimoto Y et al.: A long submandibular sialolith lying in the Wharton's duct, *Oral and Maxillofacial Radiology Today*, 2000.
- 呉屋ほか：歯内歯様構造をもった複雑性歯牙腫, *J Jpn Stomatolo Soc*, 1980.
- Gunge M et al.: Venous hemangioma with phleboliths, *J Nihon Univ Sch Dent*, 1987.
- 松村ほか：動脈硬化症にみられた興味ある結晶構造物に関する一知見, *日大口腔科学*, 2001.
- 中山ほか：Dens invaginatus の 3 例, *口腔外科学会雑誌*, 1980.

寒河江ほか：微小部 X 線回折装置によるエナメル質・象牙質・セメント質・骨・唾石中のアパタイトの回折図形, *日大口腔科学*, 207, 1979.

寒河江ほか：唾石にみられた weddellite の結晶形態, *日大口腔科学*, 1984.

Sakae T et al.: Mode of occurrence of Brushite and whitlockite in a sialolith, *J Dent Res*, 1981.

Sakae T et al.: Crystals and calcification patterns in two lymph node calcification, *J Oral Pathol*, 1987.

Sakae T et al.: SEM of dental calculi, *JNUSD*, 1985.

Tanaka et al.: Calcium phosphate in aspergillosis of the maxillary sinus, *Scan Micro*, 1993.

内堀ほか：小唾液腺に生じた唾石症の 1 例, *口腔科学会雑誌*, 1979.

Yamamoto H et al.: Weddellite in submandibular gland calculus, *J Dent Res*, 1983.

Yamamoto H et al.: SEM and X-ray microdiffractometric studies on sialolith-crystals in human submandibular glands, *Acta Pathol Jpn*, 1984.

山本ほか：胆石の走査型電子顕微鏡観察, *日大口腔科学*, 1985.

Yamamoto H et al.: Analysis of vaterite microspherulith deposits on pure cholesterol gallstone by XRD, X-ray microanalysis and IR, *Virchow Arch*, 1985.

Yamamoto H et al.: Phlebolithiasis associated with intramuscular hemangioma. *Path Res Pract*, 1986.

Yamamoto H & Sakae T: Brushite in fibrous dysplasia of the jaw bone, *Acta Pathol Jpn*, 1987.

謝辞

研究を進めるにあたり多くの研究試料を提供していただいた日本大学松戸歯学部口腔病理学講座山本浩嗣教授に深く感謝いたします。研究経費の一部は日本大学松戸歯学部学術フロンティア推進時事業(H10,H13)、日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設学術フロンティア推進事業(H12)を使用した。

Keywords: abnormal calcification, phosphates, carbonates, oxalates, citrates, organic matter

歯のエナメル質アパタイトと低温合成アパタイトの熱的性質の違い

(日大・松戸歯)○寒河江登志朗

sakae@mascat.nihon-u.ac.jp

【はじめに】 歯のエナメル質の 95wt%以上はいわゆる“生体アパタイト”で構成されている。生物が造りだした生体アパタイトが鉱物あるいは合成アパタイトと異なる点は比重、化学組成、化学量論、結晶性などに表れている。一条らは骨、歯などの硬組織結晶の TEM・ED を精力的に行い、生体アパタイト結晶に格子の乱れが多いことを示した。生体アパタイトの中でも、エナメル質のアパタイトは結晶粒子が大きく、結晶性も良いため、古くから研究が進められてきている。生体アパタイトの特徴の一つに、アパタイト結晶構造中に炭酸イオン置換が多いことがある。この炭酸イオンは結晶構造に乱れを起こす原因となっており、加熱によって結晶構造内を A-site から B-site へ移動し最終的に結晶構造から逸脱していくといわれる(Holcomb & Young, 1980)。一方、LeGeros et al (1969)は生体アパタイト中の炭酸イオンは B-site にあるとしている。この議論は決着をみてない。また、エナメル質のアパタイト結晶はアパタイトの構造水以外に揮発性成分が含まれている(LeGeros et al., 1978; Sakae et al., 1984, 1988)。これらの特徴を有するエナメル質アパタイトと、生体アパタイトに近い性質をもつと考えられる低温合成アパタイトについて、それらの熱的性質を比較し検討した。

【材料と方法】 歯のエナメル質試料は、教室の保存試料である歯から肉眼的に健全なヒト大臼歯を選び、Buhler Isomet low speed diamond saw により薄片を作成し、エナメル質部分を dental engine を用いてブロック状に切り出し、偏光顕微鏡で象牙質の混入がないことを確かめ、めう乳鉢で粉末とした。低温合成アパタイトは 100 度以下の温度条件で合成されたものを使用した(Apatite-A と呼ぶ)。試料の結晶学的解析は粉末型 X 線回折装置を用いて、炭酸イオン分析は FT-IR を用いて行った。熱分析は Rigaku TG8120(TG-DTA)と DSC8230(DSC)を用いて行った。

【結果】 歯のエナメル質の TG-DTA 曲線では吸着水の脱水による吸熱・減量反応が 200°C までにみられる。300°C 付近にエナメル質固有の有機質の燃焼による発熱反応が出現した。200°C 以降今回の設定温度の 900°C に至るまで連続的な重量減少(100°C 毎に約 0.5wt%)が認められた。これらの熱反応は安定しており、試料ごとの差は有機質量に認められる程度であった。Apatite-A の熱分析曲線にも減量が認められたが、重量変化は少なく、600°C 以上ではほとんど減量はみられなくなった。

【考察】 今回の実験では 900°C に至るまでに有機質の燃焼反応以外の連続的な減量が認められた。この減量は別な熱分析実験から 1000°C まで引き続くことが分かっている。この結果は 800°C でエナメル質のアパタイト結晶中の CO₃ がなくなるとした Holcom & Young (1980)とは異なる。加熱減量は Apatite-A にも見ることができた。しかし、Apatite-A にみられる重量減少は少なく、これは含有した炭酸イオンの量と配置を反映したものと考えられる。

【謝辞】 この研究経費の一部は日本大学学術フロンティア推進事業による。

THREE-DIMENSIONAL ANALYSIS OF PRISM DECUSSATION IN TOOTH ENAMEL FROM HUMAN AND SEVERAL ANIMALS USING A MICRO-FOCUS X-RAY DIFFRACTION

T. Sakae¹⁾, K. Suzuki¹⁾, Y. Kozawa¹⁾, H. Mishima²⁾

¹⁾Dept. Anat., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, ²⁾Dept. Anat. Kochi Gakuen College

[sakae@mascat.nihon-u.ac.jp]

Enamel prism arrangement is a significant factor reflecting the mechanical and chemical properties of enamel, and has been known in variation among animals and tooth types. Crystal orientation in tooth enamel is related to the orientation of enamel prism, in which apatite crystals were arranged in highly ordered manner, generally shown as the Meckel's model. This study used micro-focus X-ray diffraction to show the deviation in crystal orientation of tooth enamel from mouse, rat, rabbit, pig, bovine and human. The transmitted diffraction was recorded on an imaging plate, Fuji Film Co. Ltd., with an incident X-ray beam of 100 μm in diameter, widely enough to cover the area of several bands of Hunter-Schreger. A particular micro-diffractogram was shown from the inner layer of bovine incisor enamel, in which the crystal orientation consisted of two axes crossing almost at a right angle, the largest value in this study. The two fiber axes correlated to the diazone and parazone of Hunter-Schreger bands. At the middle layer of bovine incisor enamel the crystal orientation still consisted two fiber axes but decreasing the intensity due to the diazone, and at the outer layer the crystal orientation was uni-axial and almost parallel to the enamel prism axis and nearly normal to the enamel surface. The results verified that micro-XRD verified the histological structure of running of enamel prisms in bovine incisor enamel at crystallographic level and proved the exact information on the crossing angle. It was noted that the crystal arrangement, or enamel prism arrangement, of tooth enamel varied upon location, tooth types and animal kind.

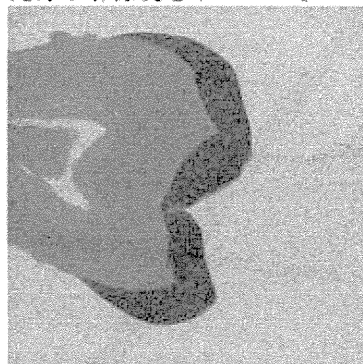
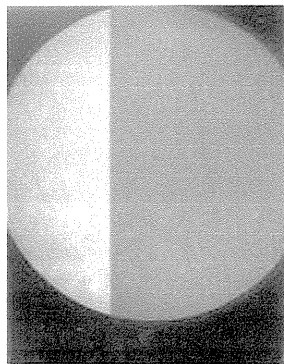
LEBRA-PXRによる生体材料のラジオグラフィとXAFS実験

寒河江登志朗^{1,2}, 佐藤 勇², 早川 建², 田中俊成², 早川恭史² (1日大松戸歯学部, 2日大量科研LEBRA)

Radiography and XAFS Study on Biomaterials Using Parametric X-Ray at LEBRA

*Sakae T^{1,2}, Sato Y², Hayakawa K², Tanaka T², Hayakawa Y² (1Nihon Univ. Sch. Dentistry at Matsudo, 2Nihon Univ. Inst. Quantum Sci. LEBRA)

日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設 (LEBRA) は125MeVの電子線形加速器 (LINAC) で生み出される電子線を利用した自由電子レーザー (FEL) とパラメトリックX線 (PXR) の開発応用研究の拠点として学術フロンティア推進事業に選定され、整備されてきた。PXRはその性質上、横軸方向にわずかな波長分散が生じるが、実際にPXRを使った実験はほとんど行われてこなかった。このほどLEBRA-LINACでPXRの照射に成功したことを受けて、実際にいくつかの材料で試した結果、波長分散によると考えられるXAFSを探えることができた。LEBRA-PXRを利用したXAFSの利点は、フィルムまたは2次元型のX線検出器を用いることで直接にX線吸収像を撮影可能であるという、装置構成の単純な点にある。装置の概要：電子線形加速器：加速周波数2856MHz、最大電子エネルギー：125MeV、マクロパルス：20 μ s、ビーム電流：200mA、繰り返し：12.5Hz、ビームパンチ幅：3.5~10ps、規格化エミッタンス：20n \times 10⁻⁶mrad、エネルギー分散：1%、パラメトリックX線発生装置：平行2結晶 (Si)、X線エネルギー：3~30KeV。結果：左図：BrのXAFS：13.5KeVで30分間照射(ポロロイド撮影)。LEBRA-PXRは水平方向に波長分散が出現する構造となっている。この理由でここに現れたX線吸収の変化はBrのK線の吸収端に相当するものと考えられ、XAFSのピーク解析に十分な解像度を示している。



右図：ヒトの臼歯研磨薄片(厚さ約100 μ m)のX線透過像：13.5KeVで7分間照射(X線CCDカメラ)。この場合はリン酸カルシウムであるアパタイトが主体であるのでXAFS効果よりも通常のX線吸収像が現れているが、背景の濃淡は試料を包んでいたラップの重なりが映っており、感度が極めて良い事を示している。現在種々の生体材料を用いて実験を進めている。考察：LEBRA-PXRはmicro-radiographyとして有効で

あり、XAFSに応用可能であり、迅速な測定が行える能力を有することが判明した。謝辞：この研究経費は学術フロンティア事業による。

Key words: Radiography, XAFS, Parametric X-ray, Biomaterials, LINAC.

*Corresponding author e-mail: sakae@mascat.nihon-u.ac.jp

歯のエナメル質と象牙質に対する自由電子レーザー照射とEr:YAGレーザー照射の比較

○寒河江登志朗¹、佐藤山紀江¹、山本浩嗣¹、早川 建²、
田中俊成²、早川恭史²、佐藤 勇²

¹日本大学松戸歯学部第二解剖学講座

²日本大学量子科学研究所

近年、歯科領域でレーザーが幅広く臨床に用いられている。レーザーは波長、パルス、ピーク強度などによって、物質との相互作用に違いがあることが知られている。臨床的にはエナメル質、象牙質に与える効果、影響が異なっているといわれているが、歯質の変化と変化の過程についての基礎的研究は数少なく、詳細は明らかでない。今回、日本大学日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設LEBRAの125MeV-LINIAC自由電子レーザー(FEL)で実際に臨床で使用されているEr:YAGレーザーと同波長を用いた実験から、従来のEr:YAGレーザー照射実験とは異なった結果を得た。

【材料と方法】 Buchler Isomet low speed sawによりヒト1歯の縦断薄片を作成し、2.94 μm に調整したLEBRA-FEL、2Hz、5mJ/pulseをエナメル質、象牙質の試料面にレーザーを焦点照射した。FEL装置を使用し、レーザーを発振させ、市販機と同じ、を出し、ヒト歯牙における切削を比較した。比較のため市販機のEr:YAGレーザー照射装置で同様の実験を行った。歯質の変化は光学顕微鏡、偏光顕微鏡、深度測定顕微鏡、顕微FTIR、マイクロX線回折を用いて追求した。

【結果】 LEBRA-FELレーザーの1回の照射でエナメル質は径約100 μm 深さ約10 μm のクレーター状のピットが形成された。照射回数に比例してピットの深さが増したが、径はほぼ一定であった。顕微鏡的にエナメル質の変性は少なく、X線回折法でアハタイト以外は検出されなかった。市販機を照射したものはクレーター状に切削し、一部茶褐色を呈して焦げていた。自由電子レーザーを照射したものはクレーター状に切削し、焦げ付きは見られなかった。

【考察】 従来のEr:YAGレーザーが照射ポイントのエナメル質に白濁物の形成など変性がおきることが知られている。今回のLEBRA-FELレーザー照射はそれらとは異なった態度を示した。レーザーの波長、強度以外の因子がエナメル質への態度に大きく関与していることが示された。

【謝辞】 研究経費の一部は学術フロンティア事業によった。FELレーザー発振に際してLEBRAのスタッフに多大のご協力をいただいた。

Genome Science–Based Gene Expression Monitoring in Osteoblasts Altered by Low-Level Laser Irradiation

Y. Abiko¹, K. Hiratsuka¹, M. Ohta², K. Ide² and H. Sasahara².

Department of ¹Biochemistry and ²Oral Diagnostics, Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

Although the acceleration of bone regeneration by low-level laser irradiation (LLLI) has been reported, the molecular based mechanisms are not well elucidated. Advances in the technology for assaying transcription levels, in a highly parallel fashion coupled with the completion of genome projects, make possible a complete description of gene regulatory systems.

We have focused on the characterization of genes altered in osteoblast cells by LLLI and attempted to elucidate the mechanism of biostimulatory effects on bone regeneration using the subtractive gene cloning and cDNA microarray system. Subtractive cDNA library of MC3T3-E1, a clonal osteoblastic cell line, was constructed. Nucleotide sequencing of gene clone was carried out and assessed by homology search in DNA databases. To find transcriptional profiling, we also examined mRNA levels of 3,800 genes using the gene expression cDNA microarray (Atlas™ Glass Mouse 3.8. Clontech). Total RNAs were isolated and synthesized to cDNAs, and then labeled with fluorescence dye. The hybridization signals were followed by computer analysis to derive relative changes in expression level of the genes.

Many genes altered their expression levels by LLLI were identified including ATP synthesis, DNA replication, transcription and translation, growth factor, and other unknown function genes including ESTs. These findings suggest that LLLI may demonstrate biostimulatory effects on osteoblasts through expression of many gene, and cDNA subtraction and DNA microarray technology will provide unprecedented access to elucidate the mechanism of bone regeneration stimulated by LLLI.

Supported in part by A Grant of the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan to promote 2001-Multidisciplinary Research Projects.

Chemical Modification of Titanium Surface by Glow Discharge. M.-S. CHEN*¹, W.-J. CHANG¹, C.-T. LIN¹, S.-Y. LEE¹, and Y. ABIKO², ¹ Taipei Medical University, Taiwan, ² Nihon University, Matsudo, Japan

The surface of implantable biomaterials is in direct contact with the host tissue and plays a critical role in determining biocompatibility. In order to improve the integration of implants, it is desirable to control interfacial reactions such that nonspecific adsorption of proteins is minimized and tissue-healing phenomena can be controlled. Objective: In this regard, our goal is to develop a glow-discharge method to functionalize titanium surfaces by the covalent immobilization of bioactive organic molecules. Methods: Titanium plate first was cleaned by glow Discharge using argon plasma to eliminate surface contaminants and to produce a consistent and reproducible titanium oxide surface layer. Then an intermediary allylamine deposition was covalently linked to the oxide layer by glow discharge, followed by the covalent binding of albumin to the free terminal NH₂ groups using glutaraldehyde or BS3 as a coupling agent. Surface analyses were performed by scanning electron microscopy (SEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), scanning electron microscopy energy dispersive spectroscopy (SEM-EDS), atomic force microscopy (AFM), and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). Result: SEM showed the surface morphology was changed after glow discharge modification. SEM-EDS, FTIR and XPS demonstrated surface component changed after treatment. Conclusion: The result implied that the surface characteristics was successful modified on the titanium plates by glow discharge technology and this method could offer the possibility of covalently linking selected molecules in order to guide and promote the tissue healing that occurs during implant integration in bone and soft tissue.

演題名：

ハイドロキシアパタイトの気孔径が骨再生に及ぼす影響

演者：

久保山 昇¹、木場秀夫²、西山典宏³、早川光央⁴、石崎 勉⁵、藤井 彰¹、
山本浩嗣²、根本君也³、安孫子 宜光⁶

所属機関名：

¹日大松戸歯学部・薬理学、²病理学、³理工学、⁴化学、⁵(株)サンギ、
⁶生化学

【目的】ハイドロキシアパタイト（以下 HA）は生体親和性と骨伝導性を有するため、骨組織構築の細胞の足場として有用である。今回、高齢ウサギ（生後 2 歳以上）の大腿骨上顆に、気孔径の異なる蓮根状 HA を埋植し、HA の気孔径が新生骨の形成に及ぼす影響を検討した。【方法】HA（直径 3mm）は、気孔径の異なる 3 種（20、150、375 μm ）を 1,200°C で焼結して作製した。ウサギの大腿骨上顆に直径 3.2mm の骨欠損を作製し、HA を埋植した。動物は 1 群 5 匹とし第 1 群は骨欠損のみの sham 群、第 2、3、4 群はそれぞれ気孔径 20、150、375 μm の HA を埋植した。埋植後 2、8 週に大腿骨を摘出し、脱灰とパラフィン包埋後、H-E 染色とアザン染色を施し病理組織学的に観察した。また、画像解析装置で、HA 気孔内の新生骨との接触率および面積を測定した。【結果】埋植 2 週間では、全群に HA 周囲、気孔の内面および既存の骨の断端に密着して新生骨の骨梁が観察された。新生骨骨梁はアザン染色で均一に青染した未石灰化の類骨組織であった。埋植 8 週間では、埋植 2 週間と比較し HA 周囲と気孔の内面に形成された新生骨は、一部石灰化が進行していた。また、気孔径 20 μm は 150、375 μm の HA と比較し、新生骨の HA との接触率および石灰化面積ともに低下する傾向が認められた。HA の気孔内に形成された新生骨の石灰化は、気孔径の太さに依存して増加した。

演題名：

高齢ウサギの実験的骨欠損に対するエムドゲイン複合体の骨再生効果

演者：

木場 秀夫 1、久保山 昇 2、西山 典宏 3、早川 光央 4、石崎 勉 5、
安孫子 宜光 6、根本 君也 3

所属機関名：

日本大学松戸歯学部病理学講座 1、薬理学講座 2、理工学講座 3、化学講座 4、
(株)サンギ 5、生化学講座 6

【目的】硬組織再生には、増殖因子と細胞支持体が重要で、現在この2つを満足させる条件で組織特性に合致した骨再生療法が行われている。今回、我々は高齢者の骨再生にエムドゲイン(EMD)を応用する事を想定して、高齢ウサギ大腿骨の実験的骨欠損に EMD/アルジネート(Alg)複合体を連根状ヒドロキシアパタイト(HA)に保持し、埋植して骨再生促進効果を検討した。【方法】高齢ウサギ(生後約 2.0 年)の大腿骨上顆に骨欠損を作製し、HA(直径 3mm, 孔径 250 μ m)を欠損部に埋植した。実験動物は 1 群 5 匹とし第 1 群は無処置、第 2 群は穴のみ、第 3 群は HA のみ、第 4 群は HA+Alg、第 5 群は HA+EMD/Alg とした。埋植後、2 と 8 週目に大腿骨を摘出し、切片を H-E 染色とアザン染色を行い、病理組織学的所見を得た。【結果】各群の体重は平均 4.7 \pm 0.4 kg で、第 2~5 群は手術後体重の減少が認められたが、2 週目でほぼ手術前に回復した。また、群間の体重差は認められず EMD/Alg 複合体の局所と全身への為害性は少ない事が示唆された。組織学的所見は、埋植 2 週：骨欠損部の骨再生は、HA 周囲と孔の内表面に新生骨の骨梁が観察されたが、実験群の間では有意差は認められなかった。埋植 8 週：埋植 2 週と比較すると HA 周囲と孔の内表面に形成された新生骨骨梁は太く石灰化が進行していた。また、EMD/Alg 複合体では、HA 周辺に線維性結合組織が密に形成され創傷治癒する傾向が認められた。

分子プレカーサー法を用いたチタン基板上へのアパタイト薄膜形成 その1 -焼成温度による影響-

○高橋健一¹, 早川 徹¹, 原 広樹², 吉成正雄³, 佐藤光史³, 根本君也¹

¹日大・松戸歯・理工・口科研, ²工学院大学・工, ³東歯大・理工

Hydroxyapatite Thin Film Formation on a Ti Substrate by Molecular Precursor Method. Part 1. -Effect of Firing Temperature-

K.TAKAHASHI¹, T.HAYAKAWA¹, H.HARA², M.YOSHINARI³, M.SATO², K.NEMOTO¹

¹Nihon University at Matsudo, ²Kogakuin University, ³Tokyo Dental College

[緒言]

新規薄膜形成法である分子プレカーサー法¹⁾は, 基板にコート溶液を塗布し焼成を行うという簡便な工程で, 均一かつ高純度の金属酸化物薄膜を形成する手法である。本研究では, EDTA-カルシウム錯体からなる分子プレカーサー溶液を用いてチタン基板上にハイドロキシアパタイト (HA) 薄膜を形成し, 焼成温度が薄膜形成に与える影響について検討するとともに薄膜のキャラクタリゼーションを行った。

[材料および方法]

1) プレカーサー溶液の調製

EDTA 懸濁溶液と酢酸カルシウムとの反応により, EDTA-カルシウム錯体を合成し, 次にこの EDTA-カルシウム錯体とジブチルアミンをエタノール中で加熱反応させた後に, 反応溶液にリン酸/エタノール溶液を加えて, Ca/P=1.7 として調製した。

2) HA 薄膜コーティング

調製したプレカーサー溶液をチタン基板 (99.9%, 直径 12mm, 厚さ 1mm) に塗布した。卓上型高速昇温電気炉 (MSFT-1520-P 型, ニッカト) にて, まず, 60°C で 20 分間プレヒートを行い, その後, 300, 400, 500, 600, 700°C の各焼成温度で 2 時間焼成した。

3) HA 薄膜コーティングの解析

X線回折装置 (XRD, MXP18AHF22, マックサイエンス) を用いて, Cu-K α 線源, 管電圧 45kV, 管電流 300mA, 入射角度 0.3° の条件にて薄膜 X線回折パターンを測定した。また, フーリエ変換赤外分光高感度反射法 (FT-IR-RAS, FT-IR-210, ホリバ) を用いて, FT-IR スペクトルを測定した。電界放射走査電子顕微鏡 (FE-SEM, JSM-6340F, 日本電子) により表面形状の観察を行い, さらに電子線マイクロアナライザー (EPMA, X-8010, 日立) を用いて加速電圧 25kV の条件で HA 膜厚, および Ca/P 比を求めた。

[結果および考察]

調製したプレカーサー溶液は無色透明で, チタン基板上への塗付が容易であった。その溶液を塗付し, 焼成後, 生成した薄膜はチタンにかなり強固に密着しており, クラックや剥離などは観察されなかった。

薄膜の XRD 測定の結果を Fig.1 に示す。焼成温度 300°C, 400°C では, HA に由来するピークは観察できなかった。これは, 500°C 以下では, 有機物が十分に焼成されないためと考えられる。焼成温度 500°C では, $2\theta=25^\circ\sim 34^\circ$ 付近にアモルファス HA に由来すると思われるブロードなピークが観察された。焼成温度 600°C, 700°C では, $2\theta=31.8^\circ(211)$, $33.0^\circ(300)$, $46.8^\circ(222)$,

$49.5^\circ(213)$ 付近に HA のピークが観察された。以上より, 薄膜の主成分は HA であることが判明した。

FT-IR-RAS 測定の結果を Fig.2 に示す。全ての焼成温度において, $550\sim 600\text{cm}^{-1}$ 付近と $900\sim 1200\text{cm}^{-1}$ 付近に P-O 結合に由来するピークが観察された。XRD 測定の結果から, 焼成温度 300°C, 400°C での P-O 結合のピークはプレカーサー溶液中のリン酸に由来するものであり, 焼成温度 600°C, 700°C での P-O 結合のピークは HA のリン酸基に由来するものと思われる。焼成温度 300°C, 400°C では, 1700cm^{-1} 付近に EDTA の C=O 結合に由来するピークが観察され, 500°C 以上では, $1300\sim 1600\text{cm}^{-1}$ 付近に CO₃ 基に由来するピークが観察され, 炭酸アパタイトが含有されていることが分かった。

EPMA 測定の結果から, 薄膜の主成分はカルシウムとリンであることが分かった。また, 膜厚は $0.44\pm 0.01\mu\text{m}$ とかなり薄く, また Ca/P=1.56 \pm 0.04 と HA に近似していることが分かった。

以上の結果から, EDTA-カルシウム錯体からなる分子プレカーサー溶液を用いることにより, チタン基板上に HA 薄膜を簡便にコーティングできた。また, 加熱焼成温度は 600°C が最も妥当であると思われた。

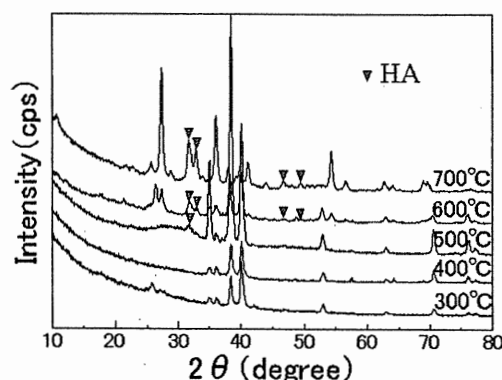


Fig.1 XRD patterns of the specimens with different firing temperature

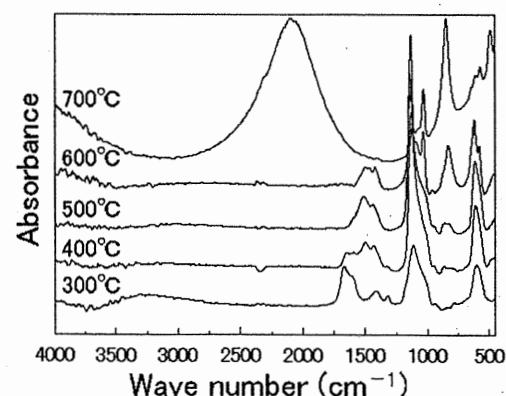


Fig.2 FT-IR spectra of the specimens with different firing temperature

[参考文献]

- 1) 佐藤光史:分子プレカーサー法の新展開-欠陥のない金属酸化物薄膜を作る- 未来材料,2,12-17(2002)

本研究の一部は, 日本学術振興会平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤 C2:15592073) および文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行った。

分子プレカーサー法を用いたチタン基板上へのアパタイト薄膜形成 その2 - 薄膜の密着性 -

○高橋健一¹, 早川 徹¹, 原 広樹², 吉成正雄³, 佐藤光史², 根本君也¹

¹日大・松戸歯・理工・口科研, ²工学院大学・工,
³東歯大・理工

Hydroxyapatite Thin Film Formation on a Ti Substrate by Molecular Precursor Method. Part 2. -Adhesiveness of coated thin film-

K.TAKAHASHI¹, T.HAYAKAWA¹, H.HARA², M.YOSHINARI³, M.SATO², K.NEMOTO¹

¹Nihon University at Matsudo, ²Kogakuin University,

³Tokyo Dental College

[緒言]

演者らは、新規な薄膜形成法として分子プレカーサー法に着目し、その適応について検討してきた。その結果、EDTA-Ca 錯体からなるプレカーサー溶液を Ti 基板上に塗布して 600°C で 2 時間加熱焼成するという簡便な工程で、Ti 基板上へ均一に炭酸含有アパタイト (HA-CO₃) 薄膜が形成できることを明らかにした¹⁾。

本研究では、この分子プレカーサー法を用いた薄膜形成法を歯科用インプラント材料に応用するために基礎実験として、薄膜の密着性の評価ならびに疑似体液中での薄膜の挙動について検討した。

[材料および方法]

1) HA-CO₃ 薄膜コーティング

プレカーサー溶液は、EDTA-Ca 錯体にメタリン酸ジブチルアンモニウム塩を Ca/P 比が 1.7 となるように加えて調製した。調製したプレカーサー溶液を Ti 基板 (99.9%, 直径 12mm, 厚さ 1mm) に塗布した。卓上型高速昇温電気炉 (MSFT-1520-P 型, ニッカト) にて、まず、60°C で 20 分間プレヒートを行い、その後、600°C で 2 時間焼成を行った。

2) 薄膜の密着性試験

加熱硬化型エポキシ接着剤 (ボンド E39, コニシ) を用いて HA-CO₃ コーティング Ti 基板とステンレス棒とを接着させた。150°C で 30 分加熱してエポキシ接着剤を硬化させた後、引張圧縮試験機 (TG-5kN, Techno Graph, ミネベア) を用いてクロスヘッドスピード 1mm/min の条件で引張接着試験を行った。コーティング試料はリン酸緩衝溶液 (PBS, pH=7.4) 浸漬前試料および PBS 1 ヶ月浸漬試料を用い、コントロールとしてコーティング処理を施していない Ti 基板を用いた。

薄膜の密着性のもう一つの評価としてスクラッチ試験を行った。スクラッチテスター (CSR-101, レスカ) を用いてダイヤモンド圧子により HA-CO₃ コーティング表面をスクラッチし、薄膜の剥離荷重を測定した。スクラッチ荷重は 0.26mm/s で 10N までとし、ステージ移動スピードは 0.40mm/s とした。コーティング試料は PBS 浸漬前試料および PBS 1 ヶ月浸漬試料を用いた。

3) 疑似体液浸漬実験

疑似体液には pH=7.4 に調製したハンクス溶液を用いた。調製したハンクス溶液 30ml 中に HA-CO₃ コーティング Ti 基板を浸漬した。浸漬 1 週間および 2 週間後に試料を取り出し、X線回折装置 (XRD, MXP18AHF22,

マックスサイエンス) およびフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR, FT-IR-210, ホリバ) を用いて表面に析出した結晶の解析を行った。また、析出物の形態を電界放射走査電子顕微鏡 (FE-SEM, JSM-6340F, 日本電子) を用いて観察した。

[結果および考察]

プレカーサー溶液を Ti 基板に塗布し、600°C で 2 時間焼成した試料を XRD および FT-IR にて測定した結果、HA-CO₃ 薄膜が形成されていることが確認できた。

このサンプルの PBS 浸漬前と PBS 浸漬 1 ヶ月後での引張接着試験の結果を Table 1 に示す。分子プレカーサー法で形成した HA-CO₃ 薄膜は Ti 基板に約 40MPa の接着強さで密着していた。コントロールとして用いた Ti 基板とほぼ同程度の接着強さを示しており、また、PBS 浸漬前と浸漬後での引張接着強さに有意差は認められなかった。

Table 1 にスクラッチ試験の結果も示す。スクラッチ試験においても PBS 浸漬前と浸漬後での Lc 値 (critical load at the first crack of coating) に有意差は認められず、HA-CO₃ 薄膜は Ti 基板に強固に密着しており、PBS 浸漬後でも密着性は低下しないことが分かった。

疑似体液浸漬実験では、XRD, FT-IR の結果から浸漬 1 週間で HA-CO₃ コーティング Ti 基板表面に炭酸含有アパタイトが析出していることが分かった。析出した結晶の SEM 像 (Fig. 1) から、コーティング表面に球状の炭酸含有アパタイトが生成している様子が観察できた。

以上の結果から、分子プレカーサー法を用いて形成した HA-CO₃ 薄膜は Ti 基板に強固に密着しており、また、疑似体液浸漬実験の結果から HA-CO₃ 薄膜の良好な骨適合性が期待でき、臨床応用が十分可能であると考えられた。

Table1 Tensile bond strength of coated film to titanium and Lc values obtained by scratch test

	引張強さ (MPa)	Lc 値 (kgf)
Ti 基板のみ	42.1±9.4	-
PBS 浸漬前	40.2±5.6	2.6±0.4
PBS 浸漬後	38.6±6.3	2.9±1.0

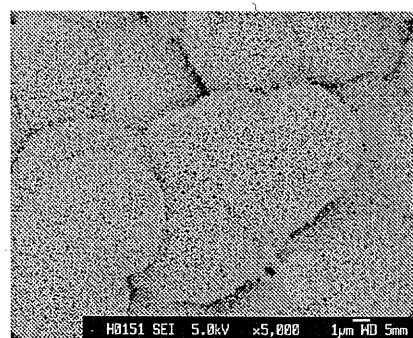


Fig.1 SEM of precipitated HA-CO₃ after SBF immersion

[参考文献]

1) 高橋健一 他: 歯材器 23 (2), 124, 2004

本研究の一部は、日本学術振興会平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤 C2:15592073) および文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行った。

骨シアロタンパク質の石灰化組織特異的発現機構の検索

日本大学松戸歯学部保存学Ⅲ講座（歯内療法学），矯正学*，保存学Ⅱ講座（歯周病学）**

○齋藤綾一朗，清水映美，佐本博*，葛西一貴*，山崎宗与，小方頼昌**

Analysis of the mechanism of bone sialoprotein (BSP) gene expression in mineralized tissue

○ Ryoichiro Saito, Emi Shimizu, Hiroshi Samoto, Kazutaka Kasai, Muneyoshi Yamazaki and Yorimasa Ogata*,

Department of Endodontics, Orthodontics* and Periodontology**,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

【目的】

骨シアロタンパク質 (BSP) は石灰化初期に硬組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質であり，ハイドロキシアパタイト結晶形成能を有する事から初期の石灰化において重要な役割を果たすと考えられている。我々は，ラット骨芽細胞様細胞 ROS17/2.8 および UMR106 細胞を用い，種々の長さのラット BSP 遺伝子プロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。その結果，転写開始点から-116~+60 塩基対上流を含むルシフェラーゼコンストラクトで最も高い転写活性が認められることを報告した。今回我々は，BSP が硬組織特異的に発現する機構を解明することを目的として，種々の細胞を用いその転写調節機構の検討を行った。

【材料および方法】

ノーザンブロット解析：骨芽細胞様細胞（ROS17/2.8, UMR106 細胞）以外の細胞として，ラット骨格筋細胞(L6), ラット肝臓上皮細胞(RL34), ラット未分化間葉細胞(C3H10T1/2), ヒト唾液腺腺房細胞(HSY), ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)を用い，それらの細胞における BSP の mRNA 発現に関してノーザンブロット法により解析を行った。

ルシフェラーゼアッセイ：ラット BSP プロモーター配列 (-116~+60) を挿入したルシフェラーゼプラスミドを用いて，転写活性の検索をルシフェラーゼアッセイにより行った。

ゲルシフトアッセイ：各種細胞より核内タンパク質を抽出し，BSP プロモーター中の配列をアイソトープで標識し，核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索を行った。

【成績および考察】

ノーザンブロットの結果，ROS17/2.8 細胞および UMR106 細胞で BSP mRNA の発現が認められたが，その他の細胞においては BSP mRNA の発現は検出されなかった。ルシフェラーゼアッセイの結果，骨芽細胞様細胞において BSP 遺伝子プロモーターは高い転写活性を示し，両者を比較すると ROS17/2.8 細胞の方が高い活性を示した。その他の細胞では，BSP の転写活性は非常に低くその細胞間に差は認められなかった。現在，どの配列が BSP の石灰化組織特異的発現に関与するかを，ゲルシフトアッセイにて検索中である。

【結論】

ノーザンブロットとルシフェラーゼアッセイの結果より，骨芽細胞様細胞において BSP mRNA の発現が認められ，転写活性が高かった。一方，その他の細胞では転写活性が低かったことから BSP 遺伝子プロモーター (-116~+60) 中に石灰化組織特異的発現を支配する配列が存在し，転写を調節しているものと考えられた。

Parathyroid Hormone Regulation of Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription in UMR106 cells. Y.Ogata*, E.Shimizu-Sasaki, Y.Matsuda, M.Yamazaki, S.Furuyama, H.Sugiya and J.Sodek Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo, Chiba, Japan, CIHR Group in Periodontal Physiology, Faculty of Dentistry, Univ. Toronto, Ont. Canada.

Bone sialoprotein (BSP), an early marker of osteoblast differentiation, has been implicated in the nucleation of hydroxyapatite during *de novo* bone formation. Our previous studies using the osteoblastic cell line ROS 17/2.8, have revealed that BSP gene expression was increased by human 1-34 parathyroid hormone (PTH), which is a major regulator of calcium and bone cell metabolism. Since the regulation of BSP by PTH may be cell-type dependent, we analyzed the transcriptional regulation of the BSP gene in UMR 106 rat osteosarcoma cells. PTH (10^{-8} M) initially suppressed BSP mRNA expression at 3h, then increased mRNA at 6 h, after which the BSP mRNA slowly returned to basal levels. The effects of PTH, which were abrogated by cycloheximide, did not alter the stability of the BSP mRNA. From transient transfection analyses using various sized BSP promoter sequences ligated to a luciferase reporter construct, a region encompassing nts -116 to -43 (pLUC3) was identified as a target of transcriptional activation by PTH. 2bp mutations were made in an inverted CCAAT box (ATTGG; between nts -50 and -46), a putative cAMP response element (CRE; between nts -75 and -68) and a pituitary-specific transcription factor-1 motif (Pit-1; between nts -111 and -105) within the pLUC3 construct. Transcriptional stimulation by PTH was almost completely abrogated in the construct including the 2bp mutations of Pit-1. These results indicate that PTH regulates BSP transcription through a Pit-1 element in the proximal promoter of the rat BSP gene.

スタチンによる骨シアロタンパク質の転写の調節

日本大学松戸歯学部歯内療法学¹, 歯周病学², 矯正学講座³

○斉藤綾一郎¹, 清水映美², 佐本博³, 葛西一貴³, 小方頼昌²

Regulation of bone sialoprotein (BSP) transcription by statins.

Dept. ¹Endo. ²Perio., and ³Ortho., Nihon Univ. School of Dent. at Matsudo

○Ryoichiro Saito¹, Emi Shimizu², Hiroshi Samoto³, Kazutaka Kasai³ and

Yorimasa Ogata²

キーワード：骨シアロタンパク質，スタチン，転写調節

【目的】

骨シアロタンパク質（BSP）は石灰化組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質であり、アパタイト結晶の形成能を有することから、石灰化における役割が注目されている。スタチンは、3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A の働きを阻害することにより、血中コレステロール値を低下させる薬であるが、最近、骨形成促進効果があることが報告された。そこで今回我々は、骨芽細胞様細胞（ROS17/2.8 細胞）を用い、スタチンによる BSP の転写調節機構を解析することを目的に検索を行った。

【材料および方法】

ROS17/2.8 細胞を種々の濃度の Simvastatin により 12 時間刺激を行った。また 5 μ M の Simvastatin により刺激後、経時的に全 RNA を抽出し、BSPmRNA 量の変化をノーザンブロット法により解析した。次に、Simvastatin 刺激後の BSPmRNA の半減期を検索した。BSP 遺伝子プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイの結果から、Simvastatin に応答すると考えられるプロモーター配列を合成し、Simvastatin 刺激後の核内タンパク質との結合状態をゲルシフトアッセイにて検索を行った。

【結果】

Simvastatin 刺激により、BSPmRNA 量は経時的に増加したが、ルシフェラーゼアッセイの結果、Simvastatin は BSP の転写活性を変化させなかった。転写阻害剤作用後にノーザンブロットにて BSPmRNA の半減期の検索した結果、Simvastatin は BSPmRNA の半減期を延長することが判明した。

【考察および結論】

骨芽細胞様細胞において、Simvastatin は BMP-2 の転写を促進し、その作用を介して骨形成を促進することが報告されているが、BSP の転写は促進しなかった。Simvastatin 刺激による BSPmRNA 量の増加は、BSPmRNA の半減期が延長したことによると考えられた。

ブタエナメルタンパク分画面分が未分化間葉系細胞の分化に与える影響

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室¹⁾、日本大学松戸歯学部歯周病学講座²⁾

○長野 孝俊¹⁾、鈴木 進一¹⁾、金指 幹元¹⁾、五味 一博¹⁾、小方 頼昌²⁾、新井 高¹⁾

Effect of Fractionated Porcine Enamel Proteins on Mesenchymal cells Differentiation

Department of Periodontics and Endodontics¹⁾, School of Dental Medicine, Tsurumi University

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo²⁾

○Takatoshi Nagano¹⁾, Shinichi Suzuki¹⁾, Mikimoto Kanazashi¹⁾, Kazuhiro Gomi¹⁾, Yorimasa Ogata²⁾, Takashi Arai¹⁾

[目的]

ブタエナメルタンパク質中に BMP 様ならびに TGF- β 様活性物質が含まれていることが最近の報告により明らかにされているが、他にも複数の物質が混在していると考えられるため、どのようなメカニズムで歯周組織の再生が起こっているか不明な点が未だ残されている。そこで本研究では、ブタエナメルタンパク抽出物を可能な限り細かく分画し、未分化間葉系細胞を含む細胞として広く用いられているヒト歯根膜(HPDL)細胞、マウス骨髄間葉系細胞(ST2)、マウス頭蓋冠由来細胞(MC3T3-E1)への影響について、アルカリホスファターゼ(ALP)活性、Luciferase 活性を指標として活性物質の検索を行った。

[材料と方法]

エナメルタンパクの抽出と分画：生後6ヶ月のブタ下顎から臼歯歯胚を摘出し、チーズ様固さの幼若エナメル質を調製、炭酸緩衝液(pH10.8)でタンパクを抽出した後、G-100カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、fr.1~fr.25の25画分に分画した。また、分画したエナメルタンパクのSDS-PAGEを行い、バンドを確認した。

細胞培養：3種類の未分化間葉系細胞を各々96wellプレートに播種し、播種24時間後からエナメルタンパク分画面分を作用させた。

Bio Assay：分画面分添加4日後に、基質として0.1Mパラニトロフェニルリン酸を用いてALP活性を測定した。さらに、HPDL細胞およびST2を用いてDual-Luciferase Reporter assayを行い、BMPならびにTGF- β 様活性物質の存在について検討した。

[結果及び考察]

HPDL細胞では、エナメルタンパク分画面分のfr.5~6の影響によりALP活性は抑制され、fr.9~15によりALP活性は上昇した。一方、ST2、MC3T3-E1においては、fr.5~6の影響によりALP活性は上昇し、fr.9~15によりALP活性は抑制された。また、fr.5~6の刺激によりBMPに反応するId-1プロモーター領域の転写活性が上昇し、fr.9~15によりTGF- β に反応するPAI-1プロモーター領域の転写活性が上昇した。以上の結果より、ブタエナメルタンパク中にはBMPならびにTGF- β 様活性物質が混在しており、HPDL細胞とST2やMC3T3-E1細胞などの前駆骨芽細胞ではそれら成長因子に対する反応性が異なることが確認された。従ってBMPとTGF- β の相互作用により歯周組織の再生がコントロールされている可能性があることが示唆された。

[共同研究者] 深江 允、大井田新一郎、田辺孝子 (鶴見大学歯学部生化学教室)

骨芽細胞様細胞および骨髄細胞に対するエナメルマトリックスタンパク質の効果

日本大学松戸歯学部保存学Ⅱ講座（歯周病学）

○加藤直子，中嶋祐，中山洋平，清水映美，小方頼昌

Effects of Enamel Matrix Derivative on Osteoblast-like Cells and Stromal Bone Marrow Cells.

Department of Periodontology, Nihon Univ. School of Dent. at Matsudo

○Naoko Kato, Yu Nakajima, Youhei Nakayama, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata

【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は、石灰化初期に石灰化組織特異的に発現し、アパタイト結晶形成能を有する非コラーゲン性タンパク質である。また、骨転移を生ずるガン細胞でその発現が認められることから、石灰化およびガンの骨転移との関係が注目されている。今回我々は、骨芽細胞様細胞および骨髄細胞に対するエナメルマトリックスタンパク質の効果を検索した。

【材料および方法】

1) 骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞，骨髄由来細胞である SBMC 細胞および筋芽細胞である C2C12 細胞を，50 $\mu\text{g/ml}$ の EMD にて刺激後，経時的に全 RNA を抽出し BSPmRNA 量の変化をノーザンブロット法および RT-PCR 法により解析した。2) 種々の長さに調節したラット BSP プロモーター領域を挿入したルシフェラーゼプラスミを，ROS17/2.8 細胞，SBMC 細胞および C2C12 細胞に導入し，EMD 刺激後の BSP の転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて検索した。3) EMD 刺激後の ROS17/2.8 細胞，SBMC 細胞および C2C12 細胞から核内タンパク質を抽出し，プロモーター配列との結合をゲルシフトアッセイにて検索を行った。

【結果および考察】

1) ノーザンブロットの結果，ROS17/2.8 細胞において EMD (50 $\mu\text{g/ml}$) は BSPmRNA 量を 12 時間後に増加させた。RT-PCR の結果，EMD (50 $\mu\text{g/ml}$) は SBMC および C2C12 細胞における BSPmRNA 量に変化を与えなかった。2) 転写開始点より-424 塩基対上流 (pLUC4) および -801 塩基対上流 (pLUC5) までのプロモーター配列を挿入したルシフェラーゼプラスミドを ROS17/2.8，SBMC および C2C12 細胞に導入し EMD 刺激を行ったところ，転写活性の増加が認められた。3) ゲルシフトアッセイの結果，ROS17/2.8，SBMC および C2C12 細胞の核内タンパク質と BSP プロモーター配列中のホメオボックス (Hox) および TGF- β 応答配列との結合は，EMD (50 $\mu\text{g/ml}$) 刺激により ROS17/2.8 細胞では結合量が増加し，SBMC および C2C12 細胞ではその結合量は減少した。

【結論】

ROS17/2.8 細胞において，EMD 刺激により BSPmRNA 量の増加および転写活性の上昇が認められ，転写開始点より -424 および -801 塩基対上流までのプロモーター配列の中に EMD に応答する配列が存在すると考えられた。SBMC および C2C12 細胞におけるルシフェラーゼアッセイの結果，EMD 刺激により BSP の転写活性は上昇するが，BSPmRNA 量は EMD 刺激後にほとんど変化しないことから，骨芽細胞様細胞と骨髄および筋芽細胞では，EMD に対する応答性に相違があると考えられた。

Amelogenin Stimulates Bone Sialoprotein (BSP) Expression.

Yorimasa Ogata¹, Yu Nakajima¹, Naoko Kato¹, Youhei Nakayama¹, James Simmer² and Emi Shimizu¹. ¹Dept. Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan, and the ²Dept. Biologic & Materials Sciences, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, MI 48108, USA.

Introduction: Amelogenins are a complex mixture of hydrophobic proteins that are the major organic component of developing enamel. The principal function of the amelogenins and their degradation products have been assigned to structural roles in creating the space and milieu for promoting enamel mineralization. Recently, porcine enamel matrix proteins (enamel matrix derivative; EMD) have been used clinically for periodontal regenerative treatment, and the activities were attributed to amelogenin and growth factors. While EMD is believed to induce regeneration of periodontal tissue, the precise mechanism is not known. Bone sialoprotein (BSP), an early phenotypic marker of osteoblast differentiation, has been implicated in the nucleation of hydroxyapatite during bone formation. **Purpose:** To examine the ability of amelogenin to regulate BSP gene transcription in osteoblast-like cells. **Approaches:** To determine the molecular basis of the transcriptional regulation of BSP gene transcription by amelogenin, we conducted Northern hybridization, transient transfection analyses with chimeric constructs of the rat BSP gene promoter linked to a luciferase reporter gene and gel mobility shift assays using recombinant amelogenin. **Results:** Using the osteoblastic cell line ROS 17/2.8, we revealed that BSP mRNA levels increased ~2.4-fold by amelogenin at 12h. In transient transfection analyses, recombinant amelogenin (1 µg/ml, 12 h) increased luciferase activity of the construct, pLUC3, which encompasses nucleotides -116 to +60, as well as in longer constructs (pLUC4; -425 to +60, pLUC5; -801 to +60) transfected into ROS 17/2.8 cells. Included within the DNA sequence that is unique to this region (pLUC3; between nt -116 and +60) is an inverted CCAAT box (ATTGG; between nt -50 and -46), a cAMP response element (CRE; between nt -75 and -68), a FGF2 response element (FRE; between nt -92 and -85) and a pituitary-specific transcription factor-1 motif (Pit-1; between nt -111 and -105). Gel mobility shift assays with radiolabeled FRE ds-oligonucleotides revealed increased binding of nuclear proteins from amelogenin stimulated ROS 17/2.8 cells. When we used the inverted CCAAT, CRE and Pit-1 elements as probes, DNA-protein complexes did not change after stimulation by amelogenin. **Conclusions:** These studies have, therefore, identified amelogenin response element in the rat BSP gene promoter is FRE that may mediate the effects of amelogenin on BSP gene transcription.

Regulation of Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription by Lipopolysaccharide

Naoko Kato, Youhei Nakayama, Yu Nakajima, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata. Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

Introduction: Bone sialoprotein (BSP) is mineralized tissue specific protein that appears to function in the initial mineralization of bone. Our previous studies have demonstrated that BSPmRNA expression is essentially restricted to fully differentiated cells of mineralized connective tissues and that the expression of BSP is developmentally regulated. Lipopolysaccharide (LPS) is a major constituent of the cell wall of gram-negative bacteria and a mediator of inflammatory responses in periodontitis. LPS decreases the synthesis of bone matrix protein and stimulates bone resorption. **Purpose:** To examine the ability of LPS to regulate BSP gene transcription in osteoblasts. **Approaches:** Rat osteoblast-like ROS 17/2.8 cells were treated with LPS and changes in mRNA analyzed by Northern hybridization. Effects of LPS on transcriptional activity were measured by transient transfection assays using chimeric rat BSP gene promoter constructs linked to a luciferase reporter gene, and nuclear protein binding analyzed by gel mobility shift assays. **Results:** Using ROS 17/2.8 cells, we revealed that BSP mRNA levels decreased by LPS (0.01~1 µg/ml; from *E. coli* 0111: B4, Sigma) in a dose dependent manner with a maximal effect at 1 µg/ml LPS after 12 h stimulation. The results of transient transfection assay indicated a ~0.6-fold decrease in transcription with the construct -108BSPLUC (-108~+60), as well as in longer constructs (-116BSPLUC; -116~+60, -425BSPLUC; -425~+60) after 12 h treatment with LPS (1 µg/ml). Within the DNA sequence that is unique to this region (-108BSPLUC; between nt -108 and +60) are an inverted CCAAT box (ATTGG; between nt -50 and -46), a cAMP response element (CRE; between nt -75 and -68) and a FGF2 response element (FRE; between nt -92 and -85). Transcriptional inhibition by LPS was almost completely abrogated in constructs that included the 2-bp mutation in FRE. Gel mobility shift assays with radiolabeled FRE (nt -98 and -78) and FRE-3' (nt -95 and -73) ds-oligonucleotides revealed different patterns of nuclear protein binding and decreased FRE and FRE-3' DNA-protein complexes after stimulation by LPS for 12 h. When we used the inverted CCAAT and CRE elements as probes, DNA-protein complexes did not change after stimulation by LPS. **Conclusions:** These studies indicate that LPS decreases BSP gene transcription, targeting a sequence between nt -98 and -73 in the BSP promoter, and the major LPS response element might be FRE.

骨シアロタンパク質の転写に対する BMP-2 とエナメルマトリックス タンパク質の効果

日本大学松戸歯学部保存学Ⅱ講座（歯周病学）

○加藤直子, 中嶋祐, 中山洋平, 高井英樹, 金東淳, 新井政人, 齋藤綾一朗, 清水映美,
小方頼昌

Effects of BMP-2 and Enamel Matrix Derivative on Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription.

Departments of Periodontology, Nihon Univ. School of Dent at Matsudo

○ KATO Naoko, NAKAYAMA Youhei, NAKAJIMA Yu, TAKAI Hideki, KIM Tonsun, ARAI Masato,
SAITO Ryoichiro, SHIMIZU Emi and OGATA Yorimasa

【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は、石灰化初期に石灰化組織特異的に発現し、アパタイト結晶形成能を有する非コラーゲン性タンパク質であり、骨転移を生ずるガン細胞で発現が認められることから、石灰化およびガンの骨転移との関係が注目されている。今回我々は、BMP-2 とエナメルマトリックスタンパク質 (EMD) の BSP の転写に対する影響を検索した。

【材料および方法】

- 1). 筋芽細胞である C2C12 細胞を、300 ng/ml BMP-2 と 50 μ g/ml EMD にて刺激後、経時的に全 RNA を抽出し、BSP mRNA 量の変化を RT-PCR 法および Real-Time-PCR 法により解析した。
- 2). 種々の長さに調節したラット BSP プロモーター領域を挿入したルシフェラーゼプラスミドを C2C12 細胞に導入し、BMP-2 および EMD 刺激による BSP の活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて検索した。
- 3). BMP-2 および EMD 刺激後の C2C12 細胞から核内タンパク質を抽出し、プロモーター配列との結合をゲルシフトアッセイにて検索を行った。

【結果および考察】

- 1). C2C12 細胞を BMP-2 および EMD にて刺激後、BSP mRNA 量の変化を RT-PCR 法にて検索した結果、BSP mRNA は検出されなかった。Real-Time-PCR 法にて検索の結果、C2C12 細胞において BMP-2 刺激後 12 時間後より BSP mRNA 量は経時的に増加した。一方、EMD 刺激後には、BSP mRNA は検出されなかった。
- 2). ルシフェラーゼアッセイの結果、C2C12 細胞において転写開始点より -425 塩基対上流 (pLUC4) および -801 塩基対上流 (pLUC5) までのプロモーター配列を含むコンストラクトで BMP-2 および EMD 刺激により転写活性が増加した。
- 3). ゲルシフトアッセイの結果、C2C12 細胞の核内タンパク質と、BSP プロモーターの -190 塩基対上流に存在するホメオボックス応答配列 (HOX) と -490 塩基対上流に存在する TGF- β 応答配列 (TAE) との結合は、BMP-2 および EMD 刺激により減少した。

【結論】

C2C12 細胞において、BMP-2 刺激により BSP mRNA 量の増加と転写活性の上昇が認められ、BMP-2 に応答する配列は転写開始点から -425 および -801 塩基対上流までのプロモーター配列の中に存在すると考えられた。一方、EMD 刺激により転写活性は上昇し、BSP プロモーター中の HOX 配列および TAE 配列と核内タンパク質との結合は減少した。また、EMD 刺激後 C2C12 細胞において BSP mRNA が検出されなかったことから、BMP-2 と EMD は C2C12 細胞の分化に対して異なる作用機序を示すと考えられた。

ヒト骨芽細胞様細胞 Saos-2 に対する TNF- α の影響
-TNF- α による骨シアロタンパク質の転写調節-
日本大学松戸歯学部歯周病学講座

○中山洋平, 加藤直子, 中嶋祐, 清水映美, 小方頼昌

Effect of TNF- α on human osteoblast-like Saos2 cells. -TNF- α regulation
of bone sialoprotein gene expression -

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

○Youhei Nakayama, Naoko Kato, Yu Nakajima, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata

キーワード：骨シアロタンパク質, 腫瘍壊死因子, 転写調節

【目的】

骨シアロタンパク質 (BSP) は石灰化初期に石灰化組織特異的に発現し, アパタイト結晶形成能を有する非コラーゲン性タンパク質である。腫瘍壊死因子(TNF- α) は, アポトーシス誘起能以外に, 細胞障害, エンドトキシンショック, 炎症および骨吸収等, 様々な作用を引き起こすことが知られている。今回我々は, BSP の転写に対する TNF- α の影響を検索し, 炎症, 骨形成に関与する酵素, タンパク質および転写因子の遺伝子発現について検索を行った。

【材料および方法】

1) ヒト骨芽細胞様細胞である Saos2 細胞を用いて, TNF- α 刺激前後の BSP, Cbfa1, Osterix, COX-2, IL-6, Cathepsin B, Cathepsin L, $\alpha 1$ (I) Collagen, TIMP-1 および GAPDH mRNA 量の変化を RT-PCR 法にて検索した。2) ラット BSP 遺伝子プロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドを Saos2 細胞に導入し, BSP の転写活性に対する TNF- α の影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。3) ラット BSP およびヒト COX-2 遺伝子プロモーター配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した。

【結果】

1) RT-PCR の結果, BSP, IL-6 および COX-2 mRNA 量は, TNF- α (10 ng/ml) 刺激後経時的に増加した。Cbfa1 mRNA 量は, TNF- α 刺激 3 時間後から上昇し, 24 時間後に減少した。 $\alpha 1$ (I) Collagen mRNA 発現は, TNF- α 刺激 3~12 時間後まで変化せず, 24 時間後に減少した。Osterix, Cathepsin B, Cathepsin L および TIMP-1 mRNA 量は, TNF- α 刺激前後で変化しなかった。

2) BSP の転写活性に対する TNF- α 影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した結果, 転写活性に変化は認められなかった。3) COX-2 遺伝子プロモーター中の cAMP 応答配列(CRE)および NF κ B 応答配列と, Saos2 細胞の核内タンパク質の結合は, TNF- α 刺激 6 時間後に増加した。BSP 遺伝子プロモーター中の CRE および FGF2 応答配列 (FRE) と核内タンパク質との結合は, TNF- α 刺激 3 時間後に減少し, 6 時間後に再び増加した。

【考察および結論】

TNF- α 刺激により, Saos2 細胞において BSP, IL-6, COX-2 および Cbfa1 mRNA 量が増加し, $\alpha 1$ (I) Collagen mRNA 発現が減少した。さらに COX-2 プロモーター中の CRE および NF κ B 配列への転写因子の結合が上昇することから, TNF- α は COX-2 の発現を誘導し, PGE₂ を介して BSP の転写を調節していると考えられた。

トレシルクロリドを利用したチタン表面への細胞接着タンパク質の固定化

○早川 徹, 吉成正雄¹, 根本君也
日大・松戸歯・理工・口科研, ¹東歯大・理工・口
腔科学研究センター

Immobilization of cell-adhesive protein onto titanium surface using tresyl chloride
T.HAYAKAWA, M. YOSHINARI¹, K. NEMOTO
Nihon University at Matsudo, ¹Tokyo Dental College

[緒言]

チタンインプラントと上皮組織との接合は未だ不十分であり, その結果, 細菌の侵入や上皮のダウングロースなどが起こり, インプラント周囲炎を引き起こす可能性があると考えられている. 演者らは, ラミニン, フィブロネクチンなどの細胞接着タンパク質のチタン表面への固定化により, 上皮接着機構を有するチタンインプラント材の開発が可能と考え, 比較的簡便でかつ確実に固定化できる方法としてトレシルクロリド (CF₃CH₂SO₂Cl) の利用を試みた.

本研究では, トレシルクロリドを利用したフィブロネクチンのチタン表面への固定化について検討した.

[材料および方法]

チタンディスク (直径 6mm, 厚さ 1mm) をコロイダルシリカ溶液 (pH9.8) により鏡面仕上げした. トレシルクロリドを鏡面研磨チタン表面に塗布し, 37°C にて 2 日間反応させた. 水/アセトン混合溶液にて洗浄, 乾燥後, トレシル化チタンを pH7.4 のフィブロネクチン/リン酸緩衝溶液 (0.1mg/ml) に 37°C で 1 日間浸漬した.

トレシル化およびフィブロネクチン固定化の確認は X 線光電子分光 (XPS, ESCA750, 島津) を使用し, F1s, N1s および O1s のスペクトルを測定して行った.

[結果ならびに考察]

Fig.1 にトレシルクロリドとチタン表面の水酸基との反応模式図を, Fig.2 にトレシルクロリド反応後のチタン表面の XPS 測定結果を示す. トレシルクロリド由来と思われる F1s のピークが 688.6eV 付近に観察された. このピークは 10 秒間のアルゴンイオンエッチングで大きく減少し, 20 秒間のエッチングでほとんど消失した. また 530.3eV 付近に TiO₂ の酸素原子由来の O1s ピークが観察され, 532eV 付近にトレシルクロリドの付加によって生成した有機酸素原子に由来すると思われる O1s ピークが観測された. このピークも 20 秒間のエッチングにより消失していた. 以上の結果から, Fig.1 に示した反応式でトレシルクロリドがチタン表面に反応した事が推定できる.

Fig.3 にトレシル化チタンにフィブロネクチンを固定化し, その後, 純水で洗浄した試料の XPS 測定結果を

示す. この試料では F1s のピークは観測されなかった. フィブロネクチンに由来すると思われる N1s のピークが 399.9eV 付近に観察された. このピークは 60 秒間のエッチングによっても消失しなかった. O1s のスペクトルにおいても, エッチング前では 532eV 付近にフィブロネクチンの酸素原子由来と思われる O1s ピークが大きく観察され, TiO₂ 由来のピークの強度は非常に低かった. イオンエッチング時間の増加と共に, TiO₂ 由来のピーク強度は増加したが, 532eV 付近の O1s のピーク強度は減少しており, N1s ピークと同様の挙動を示した.

また, フィブロネクチン固定化後, 60 分間超音波洗浄した試料においても同様にフィブロネクチン由来の N1s および O1s のピークが観察された.

以上の結果から, トレシルクロリドを用いた反応によって, チタン表面に簡便にフィブロネクチンが固定化できる事が判明した.

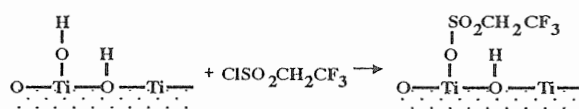


Fig.1 Reaction of tresyl chloride with titanium OH

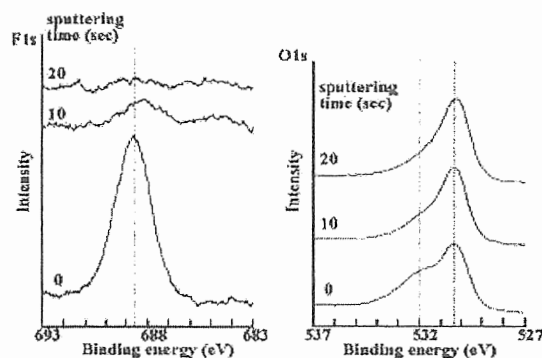


Fig.2 F1s and O1s XPS spectra of tresylated titanium

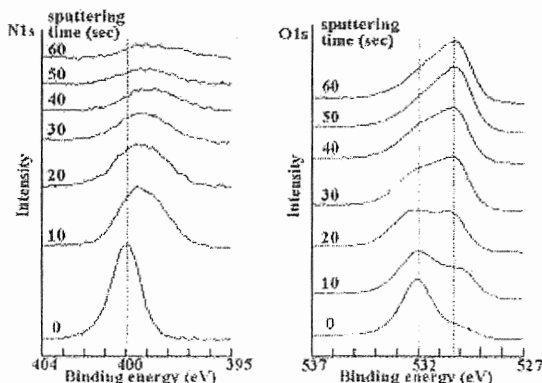


Fig.3 N1s and O1s XPS spectra of fibronectin attached titanium

本研究の一部は, 文部科学省平成 10 年度および平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行った.

プラズマ CVD 法による有機薄膜コーティング

○早川 徹, 吉田浩輝, 長井 恵¹, 吉成正雄², 根本君也

日大・松戸歯・理工・口科研,¹日大・松戸歯・総合歯科,²東歯大・理工・口腔科学研究センター

Organic thin film coating with plasma CVD technique

T.HAYAKAWA, H.YOSHIDA, M. NAGAI¹, M.

YOSHINARI², K. NEMOTO

Nihon University at Matsudo,²Tokyo Dental College

[緒言]

現在, チタンインプラントの組織適合性向上のための表面改質法としてスパッタリング法やイオンプレーティング法などの物理気相蒸着 (PVD) 法が検討されている。一方, ドライプロセスでの表面改質法としては, PVD 法の他にプラズマ化学気相蒸着 (CVD) 法がある。プラズマ CVD 法は PVD 法に比べて, 一般に膜形成速度が早い, 原料に有機物を用いるので様々な特性を有した表面改質が可能であるなどの利点を有している。今までにプラズマ CVD 法を用いたチタンの表面改質についてはほとんど検討がなされていない。

本研究では, 代表的なプラズマ CVD 法であるプラズマ重合法を用いてチタン基板上に有機薄膜をコーティングし, 薄膜の組成および構造について解析を行った。

[材料および方法]

チタンディスク (直径 6mm, 厚さ 1mm) をコロイダルシリカ溶液 (pH9.8) により鏡面仕上げした後, ハイブリッド有機薄膜形成装置 (VEP-1000, アルバック) に装着した。モノマーとしてはヘキサメチルジシロキサン ((CH₃)₃-Si-O-Si-(CH₃)₃, HMDSO) を用いた。モノマー容器を 80°C に加熱した後, チタン基板を約 250°C に加熱し, 高周波電圧 50V, 放電層内圧力約 0.17Pa の条件で 30 分間プラズマ重合を行いチタン基板上に有機薄膜をコーティングした。コーティングされた有機薄膜の厚みの測定は接触式表面形状測定器 (DEKTA, VEECO) で行った。また, 薄膜の解析は X 線光電子分光 (XPS, ESCA750, 島津), フーリエ変換赤外分光高感度反射法 (FT-IR-RAS, FT-IR-430, 日本分光) によって行った。

[結果ならびに考察]

一般的にプラズマ重合では様々なラジカル種が形成されるので, コーティング薄膜は架橋密度が高くかつ複雑な構造を呈している。本実験で形成された有機薄膜もアセトンなどの有機溶媒に不溶であり架橋構造を有していることが推測される。本研究の条件ではコーティング膜厚は約 0.2μm であった。

XPS 測定では, 表面には Si, C, O 原子のみが観測され Ti 原子は認められなかった。Fig.1 に示すように HMDSO 由来の Si2p のピークが 101.3eV 付近に, C1s のピーク (真空ポンプ由来のヒドロカーボン含む) が 284.6eV 付近に, O1s のピークが 532.6eV 付近にそれぞ

れ観測された。アルゴンイオンエッチングを 60 分間行うと HMDSO 由来の Si2p, C1s, O1s ピークの強度は大きく減少し, 90 分後ではほとんど消失していた。また, O1s スペクトルでは 531.4 eV 付近に TiO₂ の酸素原子由来のピークが新たに観測された。さらに 459.8eV 付近および 453.9eV 付近に Ti2p のピークが出現した。

FT-IR-RAS 測定では, Fig.2 に示すように Si-H, Si-C 結合 (800cm⁻¹ 付近), Si-O-Si 結合 (1080cm⁻¹ 付近), C-H 結合 (1500cm⁻¹ 付近), C=O 結合 (1700cm⁻¹ 付近) に起因すると思われるピークがそれぞれ観測され, Ti 表面は有機薄膜でコーティングされている事が確認された。

以上, HMDSO をモノマーとしたプラズマ重合法により, Ti 表面は Si, C, O 原子からなりシロキサン結合を含む有機薄膜でコーティングされる事が判明した。

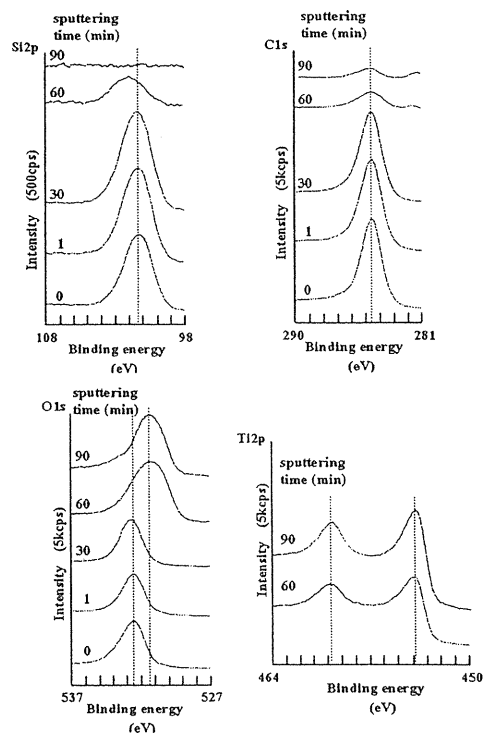


Fig.1 XPS spectra of plasma polymerized HMDSO film

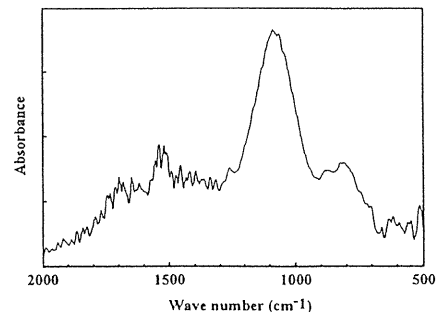


Fig.2 FT-IR-RAS spectrum of plasma polymerized HMDSO film

本研究の一部は, 文部科学省平成 10 年度および平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行った。

Binding of Cell-adhesive Protein on Titanium Surface using Tresyl Chloride. T. HAYAKAWA^{*1}, M. Yoshinari², S. Uchiyama¹ AND K. NEMOTO¹. (¹Nihon University School of Dentistry at Matsudo, ²Tokyo Dental College, Chiba, Japan)

Purpose: The aim of this study is to bind cell-adhesive protein directly to a titanium surface for the development of a strong connection of a dental implant to subepithelial connective tissues and/or peri-implant epithelia.

Materials & Method: Commercially pure wrought titanium disks were ground down to 1200 grit, polished using colloidal silica at pH=9.8, and then ultrasonically cleaned with acetone. Afterwards, the polished disks were left untreated or provided with 0.1M NaOH/H₂O₂ treatment for 10, 30 or 90 min, respectively. The surface of the mirror polished or NaOH/H₂O₂ treated titanium disk was completely covered with 2,2,2-trifluoroethanesulfonyl chloride (tresyl chloride) for the activation of titanium terminal OH, and then stored at 37°C or at 70°C for 2 days. Human plasma fibronectin, which is a well-known cell-adhesive protein, was dissolved into phosphate-buffered saline (PBS) solution with pH=7.4 at a concentration of 0.1mg/ml. The tresylated titanium disk was then immersed into a fibronectin/PBS solution for 24 h at 37°C. Specimens were rinsed with double-distilled water or cleaned ultrasonically with double-distilled water after rinsing.

Results: The activation reaction of the basic OH of titanium with tresyl chloride was confirmed by S2p, F1s and O1s spectra by the measurement of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). The measurement of Fourier transform infrared reflection-adsorption spectroscopy revealed the formation of -O-S-O₂- bonds after the reaction with tresyl chloride. Table 1 shows the intensity of F1s peak at 688.6 eV of tresylated titanium in XPS spectra at various conditions. Higher intensity of F1s peak to mirror polished titanium was obtained at 37°C. This means that the reactivity of tresyl chloride to titanium OH was higher at lower temperature. NaOH/H₂O₂ treatment showed no remarkable increase of the intensity of F1s peak, and the prolongation of NaOH/H₂O₂ treatment time decreased the intensities of F1s peak. Therefore, the binding reaction of cell-adhesive protein was performed to tresylated mirror polished titanium at 37°C.

Table 1 The intensity of F1s peak by XPS measurement

surface condition	mirror polished	mirror polished	NaOH/H ₂ O ₂ 10 min	NaOH/H ₂ O ₂ 30 min	NaOH/H ₂ O ₂ 90 min
tresylated temperature	37°C	70°C	37°C	37°C	37°C
F1s (kcps)	3.0	1.0	3.4	2.4	1.9

The N1s peak at 399.9 eV by XPS measurement derived from attached fibronectin onto the tresylated titanium still remained after 60 s argon-ion etching. In contrast, the N1s peak of the specimen not treated with tresyl chloride has almost disappeared after only 10s argon-ion etching. The fibronectin that was directly attached to the tresylated titanium was not removed after 60 s of ultrasonic cleaning.

Conclusion: It revealed that fibronectin could easily be attached to the mirror polished titanium surface by use of the tresyl chloride activation technique.

This study was supported by a Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to promote 2001-multidisciplinary Research Project (in 2001-2005).

プラズマ重合によるチタンへの有機薄膜形成

日本大学松戸歯学部理工学教室・口腔科学研究所，*総合歯科診療学

**東京歯科大学歯科理工学講座

○早川 徹，長井 恵^{*}，吉成正雄^{**}，根本君也

1. 緒言

現在，歯科用チタンインプラントの表面改質法として，スパッタリング法やイオンプレーティング法などの物理気相蒸着（PVD）法が検討されている．一方，ドライプロセスでの表面改質法としては，PVD法の他にプラズマ化学気相蒸着（CVD）法がある．今までにプラズマCVD法を用いたチタンの表面改質についてはほとんど検討がなされていない．本研究では，代表的なプラズマCVD法であるプラズマ重合法によるチタン基板上への有機薄膜コーティングについて検討した．

2. 実験

チタンディスク（直径 6mm，厚さ 1mm）をコロイダルシリカ溶液（pH9.8）により鏡面仕上げした．モノマーとしてヘキサメチルジシロキサン（HMDSO）を用い，有機薄膜形成装置（VEP-1000，アルバック）でプラズマ重合を行った．モノマー容器を 80℃に，チタン基板を約 250℃に加熱した後，高周波出力 50W，放電層内圧力約 0.17Pa の条件で 10，30，60 分間プラズマ重合を行い，有機薄膜をコーティングした．コーティングされた有機薄膜の厚み（接触式表面形状測定器，DEKTAk，VEECO），純水に対する接触角（顕微鏡式接触角計，CA-D，協和界面科学）の測定を行った．また，X線光電子分光（XPS，ESCA750，島津）による薄膜の解析も行った．

3. 結果と考察

膜厚および接触角との関係を示す．

	コーティング時間 (min)			
	0	10	30	60
膜厚 (μm)	-	0.07	0.18	0.35
接触角 (°)	33.3±3.8	78.4±1.4	82.6±1.9	74.6±0.5

膜の厚みはコーティング時間にほぼ比例して増加していた．一方，純水に対する接触角はシロキサンコーティングにより大幅に増加し，有機薄膜でコーティングされたチタンの表面は疎水性に変化した事が分る，さらに，コーティング時間 30 分の時に 10 分，60 分コーティングと比べて有意に高い接触角を示し，表面構造が異なっている事が示唆される．コーティング表面の XPS 測定では，Si，C，O 原子のみが観測され Ti 原子は認められなかった．

以上，HMDSO をモノマーとしたプラズマ重合法により，Ti 表面は Si，C，O 原子からなる疎水性の有機薄膜でコーティングされる事が判明した．今後，この有機薄膜の特性について検討する．

本研究の一部は，文部科学省平成 10 年度および平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行った．

Organic thin film formation on titanium by plasma polymerization technique. ○Tohru Hayakawa, Megumi Nagai*, Masao Yoshinari**, Kimiya Nemoto. Department of Dental Materials, Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, * Department of Comprehensive Clinical Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, **Department of Dental Materials Science, Tokyo Dental College. E-Mail: hayakawa@mascat.nihon-u.ac.jp

4-META/MMA-TBBレジンのエナメル質への接着におけるセルフエッチングプライマーの効果—唾液汚染の影響—

○早川 徹, Somsak Sirirungrojyng*, 葛西一貴*, 根本君也

(日本大学松戸歯学部理工学教室・口腔科学研究所, *日本大学松戸歯学部矯正学教室)

The Effect of Self-etching Primer Treatment in the Adhesion of 4-META/MMA-TBB Resin to Enamel —Influence of Saliva Contamination—

○Hayakawa Tohru/Somsak Sirirungrojyng*/Kasai Kazutaka*/Nemoto Kimiya

(Department of Dental Materials, Research Institute of Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, *Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

キーワード：4-META/MMA-TBB レジン, セルフエッチングプライマー, 矯正用ブラケット

「研究目的」

4-META/MMA-TBB レジン (スーパーボンド C & B, サンメディカル) は補綴, 矯正領域で幅広く使用されているが, エナメル質への前処理としてはリン酸エッチングが指示されている。我々は, 4-META/MMA-TBB レジンとエナメル質との接着におけるセルフエッチングプライマーの有効性について検討してきた。その結果, リン酸エステル系モノマー含有セルフエッチングプライマーで処理するとエナメル質に対してリン酸エッチングと同等あるいは有意に高い接着強さが得られる事を見出した¹⁻³⁾。しかしながらこれらのデータはいずれも研磨ウシエナメル質を用いたものであり, 表層エナメル質に対する効果やヒトエナメル質に対する効果については明確にされていなかった。

本研究では, 4-META/MMA-TBB レジンを用いてヒトエナメル質に矯正用ブラケットを接着させる際の市販セルフエッチングプライマーの効果を確認するとともに, ヒトエナメル質表面が唾液で汚染された場合の接着強さについても検討したので以下に報告する。

「材料と方法」

矯正治療のために抜歯されたヒト小臼歯をアクリル樹脂に包埋後, 頬側面を通常に従いポリッシングクリームで清掃した。その後, 以下に示す手順で矯正用メタルブラケットを接着させた。

1) リン酸エッチング群：ヒトエナメル質をメーカー指示に従い, 4-META/MMA-TBB レジン付属のリン酸エッチング剤で30秒間エッチングした。水洗, 乾燥後に, 4-META/MMA-TBB レジンを筆積み

法で用いてメタルブラケットを接着させた。

2) リン酸エッチング+唾液汚染群：ヒトエナメル質をリン酸エッチング剤で30秒間エッチングした。水洗, 乾燥後に, エッチング面にヒト唾液を塗布した。30秒後に圧縮空気で余剰唾液を除去した後に, 4-META/MMA-TBB レジンを筆積み法で用いてメタルブラケットを接着させた。

3) 再リン酸エッチング群：前記2)と同様にしてエナメル質をリン酸エッチングし, 唾液で汚染させた。その後, リン酸で汚染エナメル質に再エッチングを施して, 4-META/MMA-TBB レジンを筆積み法で用いてメタルブラケットを接着させた。

4) セルフエッチングプライマー群：ヒトエナメル質を市販セルフエッチングプライマー (メガボンドプライマー, クラレ) にて30秒間処理した。圧縮空気にて乾燥後, 4-META/MMA-TBB レジンを筆積み法で用いてメタルブラケットを接着させた。

5) セルフエッチングプライマー+唾液汚染群：ヒトエナメル質をメガボンドセルフエッチングプライマーで30秒間処理した。乾燥後に, セルフエッチングプライマー処理面にヒト唾液を塗布した。30秒後に圧縮空気で余剰唾液を除去した後に, 4-META/MMA-TBB レジンを筆積み法で用いてメタルブラケットを接着させた。

6) 再セルフエッチングプライマー群：前記5)と同様にしてエナメル質を, メガボンドセルフエッチングプライマーで処理し, 唾液で汚染させた。その後, セルフエッチングプライマーで再度汚染エナメル質を処理して, 乾燥後に 4-META/MMA-TBB レジンを筆積み法で用いてメタルブラケットを接着させた。

上記のいずれかの方法で矯正用メタルブラケットをヒトエナメル質に接着させた後、37℃の水中に1日浸漬した。その後、オートグラフを用いて引張速度 2mm/min で圧縮せん断接着強さを測定した。測定はそれぞれの条件につき、10-12本の試験体を作製して行い、Fisher分散分析を用いて、危険率5%にて統計処理を行った。

「結果ならびに考察」

図1に圧縮せん断接着強さの測定結果を示す。リン酸エッチング処理の場合、唾液汚染なしで約20MPaの接着強さが得られたが、唾液中で汚染されると約15MPaと有意に接着強さは低下した。唾液汚染後に再エッチングすると約17MPaと接着強さは向上したが、唾液汚染なしの場合と比べるとやはり有意に低い値であった。

セルフエッチングプライマー処理の場合、唾液汚染なしで約18MPaとリン酸エッチング処理と有意差のない接着強さが得られた。唾液汚染後でも約17MPaと接着強さの低下はほとんど見られず、再セルフエッチングプライマー処理により約19MPaの接着強さが得られた。

この様にセルフエッチングプライマー処理の場合には、唾液汚染なし、唾液汚染有り、唾液汚染後再セルフエッチングプライマー処理の3条件で接着強さに統計学的な有意差が確認されず、セルフエッチングプライマー処理はリン酸エッチング処理と同等の接着強さが得られることが判明したのみならず、唾液汚染されたエナメル質に対しても接着強さの低下が起らず有効であることが分かった。リン酸エッチング後およびメガボンドセルフエッチングプライマー処理後のヒトエナメル質表面のSEM観察では、リン酸エッチングではヒトエナメル質表面が脱灰によって粗造になっていたが、セルフエッチングプライマー処理では、ヒトエナメル質表面の脱灰は穏やかであるのが確認された。この表面状態の違いが唾液中の残存量に影響し、その結果接着強さに対する影響が異なったものと考えられるが、詳細については未だ不明である。

接着強さ測定後の破断面の様相を観察すると、リン酸エッチング処理の場合ではいずれの場合にも

エナメル質破壊が多く見られたが、セルフエッチングプライマー処理の場合、唾液汚染なしではエナメル質破壊が確認されたものの、唾液汚染有り、唾液汚染後再セルフエッチングプライマー処理の場合にはエナメル質破壊は見られなかった。

以上、本研究では4-META/MMA-TBBレジンを用いてヒトエナメル質と矯正用ブラケットとを接着させた場合の、市販メガボンドセルフエッチングプライマーの有効性を調べたところ、リン酸エッチングと同等の接着強さが得られたのみならず、唾液汚染により接着強さが低下しないことが判明した。

参考文献

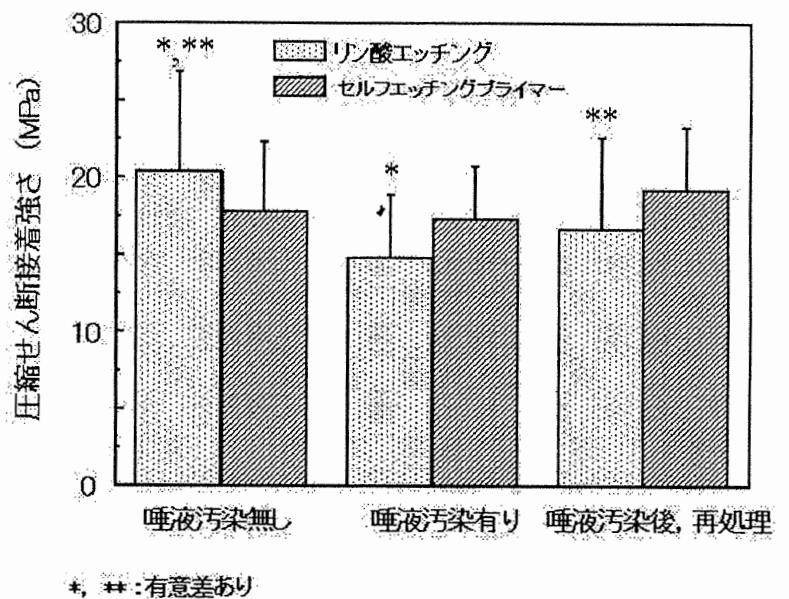


図1 ヒトエナメル質に対する4-META/MMA-TBBレジンの圧縮せん断接着強さ

- 1) 早川 徹 他: 接着歯学, 19(3):181-187, 2001.
- 2) Tohru Hayakawa et al: Journal of Adhesive Dentistry, 4(2), 105-113, 2002,
- 3) Tohru Hayakawa et al: Journal of Adhesive Dentistry, 5(2), 113-120, 2003,

本研究の一部は、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業の援助を受けた。

プラズマ重合により形成された有機薄膜へのタンパク質吸着

○早川 徹, 吉成正雄¹, 根本君也
日大・松戸歯・理工・口科研, ¹東歯大・理工・口腔科学研究センター

Protein adsorption on to organic thin film produced by plasma polymerization

T. HAYAKAWA, M. YOSHINARI¹, K. NEMOTO

Nihon University at Matsudo, ¹Tokyo Dental College

[緒言]

チタンインプラントの組織適合性向上のための表面改質法としてスパッタリング法やイオンプレーティング法などの物理気相蒸着 (PVD) 法が主に検討されている。一方、ドライプロセスでの表面改質法としては、PVD 法の他にプラズマ化学気相蒸着 (CVD) 法がある。演者らは新しい表面改質法として代表的なプラズマ CVD 法であるプラズマ重合に着目した。ヘキサメチルジシロキサン ((CH₃)₂-Si-O-Si-(CH₃)₂, HMDSO) を用いたチタン基板上への薄膜形成について検討したところ、シロキサン結合を含む有機薄膜でチタン表面が均一にコーティングされることを見出した。

本研究では、プラズマ重合によりチタン基板上に形成された HMDSO 薄膜の特性について調べる目的で、この有機薄膜に対するタンパク質の吸着挙動について検討した。

[材料および方法]

チタンディスク (直径 6mm, 厚さ 1mm) をコロイダルシリカ溶液 (pH9.8) により鏡面仕上げした後、ハイブリッド有機薄膜形成装置 (VEP-1000, アルバック) に装着した。HMDSO モノマーを 80°C に加熱した後、チタン基板を約 250°C に加熱し、高周波電圧 50W, 放電層内圧力約 0.17Pa の条件下で、プラズマ重合を行った。重合時間を 10 分, 30 分および 60 分と変化させてチタン基板上に有機薄膜をコーティングし、有機薄膜の厚み (接触式表面形状測定器: DEKTAK, VEECO) および純水に対する接触角 (協和接触角計, CA-D) を測定した。

次に、鏡面研磨チタンおよび有機薄膜コーティングチタン (30 分間プラズマ重合) を pH7.4 のフィブロネクチン/リン酸緩衝溶液 (0.1mg/ml) に 37°C で 1 日間浸漬した。浸漬後、純水洗浄および純水洗浄後に超音波洗浄 (60 分) を行った。フィブロネクチンの吸着状態は、X 線光電子分光 (XPS, ESCA750, 島津) の N1s のスペクトルの測定により確認した。

[結果ならびに考察]

Table 1 にコーティング時間を変化させた時の膜厚および純水に対する接触角を示す。膜厚はコーティング時間と共に増大し、60 分間コーティングで約 0.35μm であった。

HMDSO コーティングチタンの接触角は、鏡面研磨チタ

ンに比べると、いずれのコーティング時間でも有意に増大し、約 75~80° となった。これより、HMDSO コーティングチタンの表面は疎水性になっていることが判明した。また、コーティング時間によって疎水性が異なることも判明した。本研究の条件下では 30 分コーティングチタンが最も高い接触角を示した。

次に HMDSO コーティングチタン (30 分間コーティング) に対するタンパク質の吸着状態について検討した。Fig. 1 に XPS 測定による N1s スペクトルを示す。鏡面研磨チタンおよび HMDSO コーティングチタンともに、399.9eV 付近に吸着したフィブロネクチン由来の N1s のピークが観測された。鏡面研磨チタンでは、このピークは 30 秒間のアルゴンイオンスパッタリングによりほとんど消失したが、HMDSO コーティングチタンでは 60 秒間スパッタリングでも消失しないことが確認された。また、純水洗浄後に超音波洗浄を行った場合でも同様に N1s のピークが観察された。これより、HMDSO コーティングチタンにはフィブロネクチンが良好に吸着することが判明した。これは、HMDSO コーティングによりチタン表面が疎水性になったことが一因と推察される。

以上、HMDSO をモノマーとしたプラズマ重合により、Ti 表面を疎水性に改質することができ、さらにこの表面にフィブロネクチンが良好に吸着することが判明した。

Table 1 Film thickness and contact angles of plasma-polymerized HMDSO film

Coating time (min)	Thickness (μm)	Contact angle (°)
0	-	33.3 (3.8)
10	0.07 (0.01)	78.3 (1.4)
30	0.18 (0.01)	82.6 (1.9)
60	0.35 (0.02)	74.9 (0.5)

() : 標準偏差

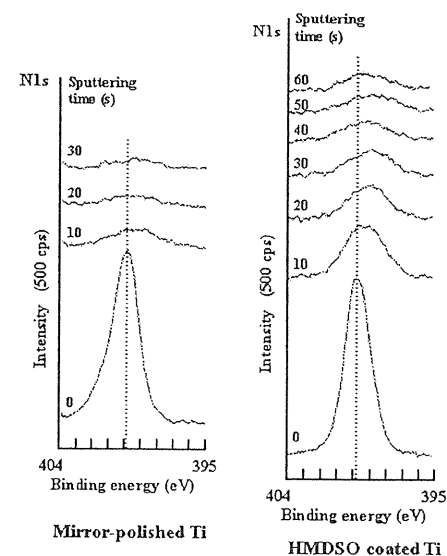


Fig.1 XPS spectra of fibronectin-attached mirror polished and HMDSO coated titanium

本研究の一部は、文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行った。

トレスル化チタンへの細胞接着タンパク質の固定化
—水晶発振装置マイクロバランス法による解析—

○早川 徹, 吉成正雄¹, 根本君也

日大・松戸歯・理工・口科研, ¹東歯大・理工・口腔科学研究センター

Immobilization of cell-adhesive protein onto tresylated titanium
—Analysis using quartz crystal microbalance-dissipation
technique—

T.HAYAKAWA, M. YOSHINARI¹, K. NEMOTO
Nihon University at Matsudo, ¹Tokyo Dental College

【緒言】

チタンインプラントと上皮組織との接合は未だ不十分であり, 細菌の侵入や上皮のダウングロースなどが起こり, その結果インプラント周囲炎を引き起こす可能性があるとしてされている。演者らは, フィブロネクチン, ラミニニンなどの細胞接着タンパク質をチタン表面に固定化する事により, 上皮付着機構を有するチタンインプラント材の開発が可能になると考えた。比較的簡便でかつ確実に固定化できる方法としてトレスルクロリド ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$) に着目し, 検討した結果, チタン表面の塩基性水酸基をトレスル化することによってチタン表面にフィブロネクチンが簡便に固定化できる事を見出し, 報告した¹⁾。

本研究では, トレスルクロリドにより処理されチタン表面へのフィブロネクチンの吸着挙動について水晶発振装置マイクロバランス (Quartz crystal microbalance-dissipation, QCM-D) 法を用いて解析を行った。

【材料および方法】

水晶発振装置として, 生体分子間相互作用定量測定装置 (QCM-D300, Q-Sense AB, Sweden) を用いた。この装置では, 水晶発振子 (センサー) の共鳴発振周波数の変化によりセンサーに吸着したタンパクの質量変化が測定できるのみではなく, 消散 (デシペーション) する周波数の測定から吸着したタンパク質の粘弾性に関する知見が得られる。

センサーとして, チタンをスパッタコーティングした共振周波数 5MHz AT カット水晶を使用した。チタンセンサーにトレスルクロリドを塗布し, 37°C で 2 日間チタン表面に反応させた。その後, 水/アセトン混合溶液にて洗浄し, 乾燥後, 装置に装着した。本装置では溶液を一度 T ループに蓄えてからセンサーセルに流す様式になっている。センサーセルを 37°C に設定し, フィブロネクチン/PBS 溶液 (20ppm) をセンサーセルに流し込むと同時に測定を開始した。

比較として, トレスル化処理を施さないチタンセンサーについても同様に測定した。

【結果ならびに考察】

Fig.1 にフロー時間に対する振動数の減少変化を, Fig.2 にデシペーション変化を測定した結果を示す。

Fig.1 から, フィブロネクチン/PBS 溶液をセンサーセルに流し込むと同時に振動数の減少が見られ, センサーにタンパク質が吸着したことが分かる。トレスルクロリドにてチタンセンサーを処理した場合, 無処理のチタンセンサーに比べて吸着初期での吸着速度が速く, また, 吸着開始から 100 分後での吸着量も多いことが分かった。

また, デシペーション値の変化の比較から, トレスル化処理した場合, 吸着したフィブロネクチンはトレスル化チタン上で比較的柔らかい膜を形成していることが推定される。

以上, 水晶発振装置マイクロバランス法にてフィブロネクチンのチタンへの吸着状態を測定したところ, フィブロネクチン固定化のためのトレスルクロリド処理の有効性が確認され, かつフィブロネクチンの吸着状態がトレスル化処理によって影響を受けることが判明した。

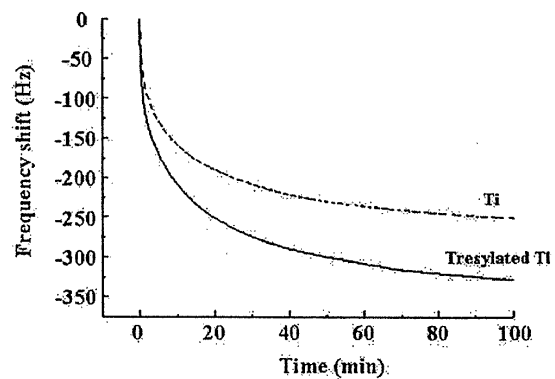


Fig.1 Frequency shift of a titanium or tresylated titanium QCM-sensor in fibronectin/PBS solution.

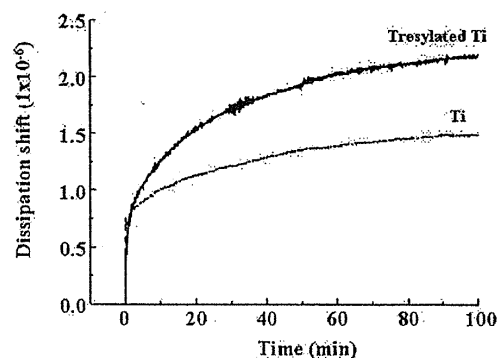


Fig.2. Dissipation shift of a titanium or tresylated titanium QCM-sensor in fibronectin/PBS solution.

1) T.Hayakawa et al. J. Biomed. Mater. Res 2003, in press

本研究の一部は, 文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業および日本学術振興会平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤 C2:15592073), および東京歯科大学 HRC5A10 によって行った。

Thin Film Coating Onto Titanium Using PVD And CVD Technique

Hayakawa T¹, Yoshinari M,² John A. Jansen³

¹ Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

² Tokyo Dental College, Chiba, Japan

³ University Medical Center, Nijmegen, The Netherlands

Several techniques for preparing thin Ca-P coating on the titanium are evaluated in order to overcome the shortcoming of plasma spray methods. Physical vapour deposition (PVD) technique, such as radio frequency magnetron sputtering and ion beam dynamic mixing (IBDM) method, can produce thin, adherent and uniform Ca-P coatings for oral implants^{1,2}. Besides surface chemistry, many studies have demonstrated that implant surface. On the other hand, we found Ca-P sputter-coated implants evoked an enhanced beneficial bone response compared to only surface roughened implants³. In this paper, we report the influence of thin Ca-P coating and surface roughness on the trabecular bone response of titanium implants produced by IBDM method. Moreover, we refer to the potential ability of plasma of plasma polymerisation, which is one of the chemical vapour deposition (CVD) technique, for the surface modification of titanium implants.

IBDM method

Four types of titanium implants, i.e. blasted with titanium powder (Ti-blast), sintered with titanium beads (Ti-beads), blasted and provided with an additional IBDM Ca-P coating (Ti-CaP/blast), and titanium beads with Ca-P coating (Ti-CaP/beads), were prepared. SEM appearance of blasted and sintered beads implant was shown in Fig.1. The Ca-P coating was deposited by IBDM method. The Ca-P coating was rapid heat-treated with infrared radiation at 700°C. The infrared radiation did not cause any detachment nor crack formation of the deposited films. The thickness of Ca-P coating was approximately 0.5 µm, and the XRD measurement showed the main component of heat-treated thin Ca-P coating was crystalline hydroxyapatite. The implants were inserted into the trabecular bone of left and right femoral condyles of rabbits. Histological evaluation revealed that new bone formation around different implant materials after already 3 weeks. After 12 weeks, mature trabecular bone surrounded all implants. At 3 and 4 weeks of implantation, no difference existed in bone contact to the various implant materials as shown in Table 1. On the other hand, after 12 weeks of implantation the highest percentage of bone contact was found around the Ca-P coated beads implants. We concluded that the combination of surface geometry and Ca-P coating benefits the implant-bone response during the healing phase.

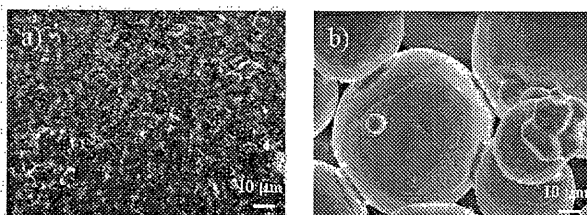


Fig.1 Scanning electron micrograph of blasted (a) and sintered beads (b) implants

Table 1 Percentage of bone contact

Periods (weeks)	Ti-blast	Ti-beads	Ti-CaP/blast	Ti-CaP/beads
3 W	40.9 (7.6) ^a	37.1 (3.2) ^a	43.0 (10.8) ^a	41.7 (15.9) ^a
4 W	47.2 (5.2) ^b	49.0 (16.5) ^b	42.5 (3.7) ^b	31.5 (1.9) ^b
12 W	69.7 (4.2) ^c	72.8 (5.2) ^c	75.8 (5.4) ^c	84.5 (3.1) ^d

(): standard deviation

Same superscript indicates the no significant difference among the means within the same implantation period group ($p > 0.05$).

Plasma polymerization

Little attention has been given to the use of CVD techniques other than PVD for modifying the surfaces of titanium substrates. Hexamethyldisiloxane (HMDSO) was deposited onto titanium using plasma polymerization technique. The thickness of the deposited HMDSO film was about 0.35 µm after 60 min deposition. The contact angle with respect to double distilled water significantly increased after HMDSO coating. Quartz crystal microbalance-dissipation (QCM-D) measurement demonstrated that the deposition of HMDSO thin films on titanium has a benefit for fibronectin adsorption. HMDSO-coated titanium has potential application as a dental implant material.

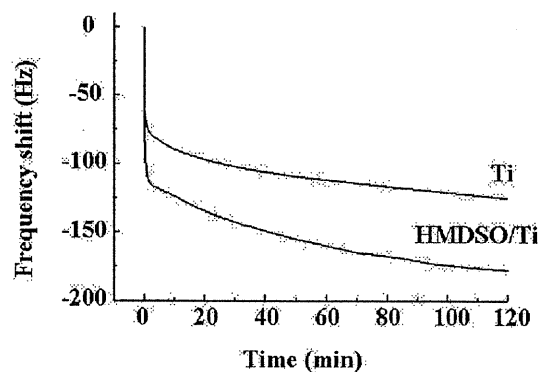


Fig.2 QCM response after the adsorption of fibronectin to titanium

References

- 1) Jansen JA, et al., Clin Oral Impl Res 1993;4:28-34.
- 2) Yoshinari M, et al., Biomaterials 1994;15:529-535.
- 3) Hayakawa T, et al., Clin Oral Impl Res 2000;11:296-304.

Acknowledgements

This study was supported by a Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to promote 2001-Multidisciplinary Research Projects (in 2001-2005), by a Grant-in Aid for Scientific Research (C2,15592073) from Japan Society for the Promotion of Science.

トレシルクロリド法を用いて細胞接着タンパク質を固定化したチタン上での細胞附着

○早川 徹¹, 高橋健一¹, 長井 恵², 牧村正治², 吉成正雄³, 根本君也¹

¹日大・松戸歯・理工・口科研, ²日大・松戸歯・総合歯科, ³東歯大・理工

Cell attachment on cell-adhesive protein immobilized titanium using tresyl chloride technique.

T.HAYAKAWA¹, K.TAKAHASHI¹, M.NAGAI², M.MAKIMURA², M.YOSHINARI³, K.NEMOTO¹

^{1,2}Nihon University at Matsudo, ³Tokyo Dental College

【緒言】

チタンインプラントと上皮組織との接合は未だ不十分であるために、細菌の侵入や上皮のダウングロースなどが起こり、その結果インプラント周囲炎などが引き起こされる危険性が指摘されている。演者らは、細胞接着タンパク質をチタンインプラントに固定化することによって上皮附着機構を有するインプラントが開発できると考えた。新規なタンパク質固定化法としてトレシルクロリド (CF₃CH₂SO₂Cl) に着目し検討した結果、チタン表面の塩基性水酸基をトレシル化することによって細胞接着タンパク質をチタン表面に簡便に固定化できることを見出した^{1,2)}。

本研究では、固定化された細胞接着タンパク質の効果を調べるために、細胞培養実験を行った。すなわち、トレシルクロリド法を用いて細胞接着タンパク質を固定化したチタン上でのヒト歯肉由来線維芽細胞の初期附着について検討を行った。細胞接着タンパク質としては、コラーゲンおよびフィブロネクチンを用いた。

【材料および方法】

1) 細胞接着タンパク質の固定化

まず、スライドガラス (直径 15mm) にマグネトロンスパッタリング法 (有機ハイブリッド薄膜形成装置, ULVAC) を用いてチタンをコーティングした試料を作製した。

次に、チタンコーティングスライドガラスの表面にトレシルクロリドを 37°C で 2 日間反応させた。トレシル化された試料をコラーゲン (セルマトリックス タイプ I-C, 新田ゼラチン) またはフィブロネクチン (ヒト細胞性由来, Upstate) のリン酸緩衝溶液 (100ppm/PBS, pH=7.4) に 37°C で 1 日間浸漬して、細胞接着タンパク質を固定化し、コラーゲン固定化ディスク (Collagen/Ti) およびフィブロネクチン固定化ディスク (Fn/Ti) を作製した。

2) 細胞培養

ヒト歯肉由来線維芽細胞 (日本大学松戸歯学部倫理委員会承認番号 EC02-001 号) を 1x10⁴ 個ずつ、Collagen/Ti および Fn/Ti 試料に播種した。培養液には 10%FBS 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium を用いた。37°C, 5%CO₂ 雰囲気下 90 分間培養した後に、トリプシン/EDTA 溶液で処理して細胞を回収し、附着細胞数を計測した。計測はカルチャーカウンターによって行った。対照として、タンパク質を固定化していないチタンコーティングスライドガラス (Ti) および細胞培養用 well (TCPS) に附着した細胞数を計測した。

【結果および考察】

Fig.1 に細胞接着タンパク質を固定化した試料の FT-IR-RAS スペクトルを示す。Collagen/Ti, Fn/Ti どちらも 1450-1550cm⁻¹, 1600-1700cm⁻¹ 付近にタンパク質のアミド結合に由来するピークが確認され、タンパク質が固定化されていることが分かる。

Fig.2 に初期附着細胞数の測定結果を示す。コントロールとして用いた Ti 試料に附着した細胞数は TCPS と同程度であった。コラーゲンを固定化した Collagen/Ti 試料では附着細胞数は Ti 試料の 3 倍以上と有意に増加しており、コラーゲン固定化の効果が確認された。

一方、フィブロネクチンを固定化した Fn/Ti 試料では附着細胞数は有意に低下し、フィブロネクチン固定化の効果は見られなかった。フィブロネクチンの活性部位が有効に働かなかつたため、あるいは本研究で使用したフィブロネクチンがヒト歯肉由来線維芽細胞の初期附着に有効でなかつたためかと推察されるが、詳細な機構は不明である。

以上の結果から、トレシルクロリドを用いてチタン上に細胞接着タンパク質を固定化した場合、コラーゲン固定では初期の細胞附着数が有意に向上したが、フィブロネクチン固定化ではその効果が見られないことが判明した。

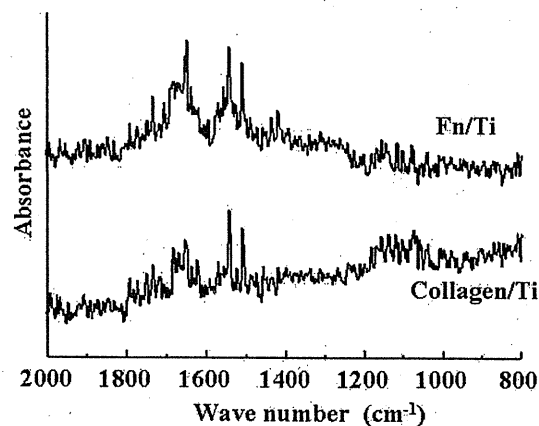


Fig.1 FT-IR-RAS after cell-adhesive protein immobilization.

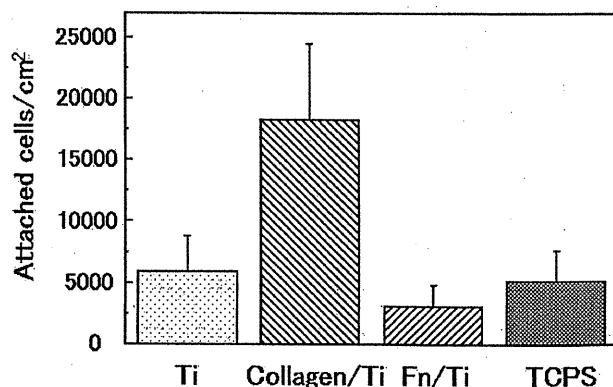


Fig. 2 Number of attached fibroblast on the different substrate

1) Hayakawa T. et al. JBMR Part A, 67A,684-688,2003.

2) Hayakawa T. et al. Biomedical Research, 24:223-230,2003.

本研究の一部は、日本学術振興会平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤 C2:15592073) および文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行った。

分子プレカーサー法によるチタン基板上へのアパタイト薄膜形成

日本大学松戸歯学部理工学教室・口腔科学研究所, *工学院大学工学部

**東京歯科大学歯科理工学講座

○早川 徹, 高橋健一, 原 広樹*, 望月千尋*, 吉成正雄**, 佐藤光史*, 根本君也

1. 緒言

分子プレカーサー法は, 基板にプレカーサー溶液を塗布し焼成を行うという簡便な工程で, 均一かつ高純度の金属酸化物薄膜が形成できる新規な薄膜形成法である. 本研究では, EDTA-カルシウム錯体からなる分子プレカーサー溶液を用いて, チタン基板上へのハイドロキシアパタイト (HA) 薄膜を形成について, 焼成温度の検討および薄膜のキャラクタリゼーション, 密着性の測定などを行った.

2. 実験

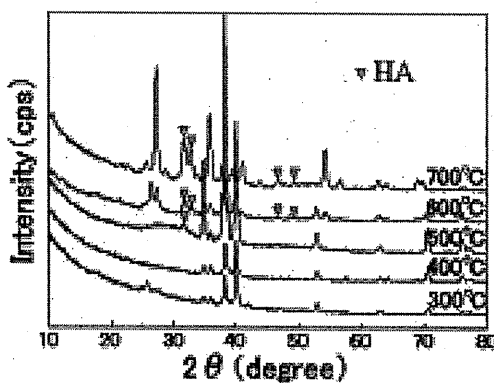
EDTA 懸濁溶液と酢酸カルシウムとの反応により, EDTA-カルシウム錯体を合成し, 次にこの EDTA-カルシウム錯体とジブチルアミンをエタノール中で加熱反応させた後に, 反応溶液にメタリン酸ジブチルアンモニウムを Ca/P=1.7 となるように加えて調製した.

調製したプレカーサー溶液をチタン基板 (99.9%, 直径 12mm, 厚さ 1mm) に塗布した. 卓上型高速昇温電気炉を用いて, まず, 60°C で 20 分間プレヒートを行い, その後, 300, 400, 500, 600, 700°C の各焼成温度で 2 時間焼成した. チタン上に生成した薄膜の組成, 膜厚, 表面状態などについて検討を加えた. また, 引張試験により薄膜の密着性を測定した.

3. 結果と考察

各焼成温度における薄膜 XRD 測定の結果を図に示す. 400°C 以下ではアパタイトが生成しなかった. 焼成温度 600°C, 700°C でアパタイトの生成が確認された. また, FT-IR-RAS の測定から, このアパタイトは炭酸含有ハイドロキシアパタイト薄膜であることが判明した. EPMA による測定では, 薄膜の厚みは約 0.4 μ m であり, また Ca/P=1.56 とアパタイトに近似していた. 薄膜表面にクラックの発生は見られず, また, 引張試験による密着強度は焼成直後で約 40MPa と高い値であり, チタンに強固に密着していることが分かった. リン酸緩衝溶液 (pH=7.4) に 1 ヶ月浸漬した後も薄膜の密着強度は約 38MPa であり, ほとんど低下しなかった.

以上の結果から, EDTA-カルシウム錯体からなる分子プレカーサー溶液を用いると, 密着性に優れた炭酸含有アパタイト薄膜をチタン基板上に簡便に形成することができた. また, 加熱焼成温度は 600°C が最も妥当であると思われた.



本研究の一部は, 文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業および日本学術振興会科学研究費補助金 (C2:15592073) によって行った.

Apatite thin film formation onto titanium using molecular precursor method. ○Tohru Hayakawa, Kenichi Takahashi, Hiroki Hara*, Chihiro Mochizuki*, Masao Yoshinari**, Mitunobu Sato*, Kimiya Nemoto. Nihon University School of Dentistry at Matsudo, *Kogakuin University, **Tokyo Dental College. E-Mail: hayakawa@mascat.nihon-u.ac.jp

IDENTIFICATION OF FGF2-RESPONSE ELEMENT IN THE RAT BONE

SIALOPROTEIN (BSP) GENE PROMOTER. E. Shimizu-Sasaki, M. Yamazaki, S.

Furuyama, H. Sugiya, J. Sodek and Y. Ogata Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo, Chiba, Japan,
CIHR Group in Periodontal Physiology, Faculty of Dentistry, Univ. Toronto, Ont. Canada.

Bone sialoprotein (BSP), an early marker of osteoblast differentiation, has been implicated in the nucleation of hydroxyapatite during *de novo* bone formation. Basic fibroblast growth factor (FGF2) is recognized as a potent mitogen for a variety of mesenchymal cells. In skeletal tissues FGF2, produced by osteoblasts, accumulates in the bone matrix and acts as an autocrine/paracrine factor for bone cells. To determine the molecular mechanism of FGF2 regulation of osteogenesis, we have analyzed the effects of FGF2 on the expression of BSP in the rat osteosarcoma cell line ROS 17/2.8. FGF2 at 10ng/ml, increased BSP mRNA levels ~4-fold; the stimulation was first evident at 3h, reached maximal levels at 6h. The stability of the BSP mRNA was not significantly affected by FGF2, suggesting that the increased mRNA was due to increased transcription. From transient transfection analyses using various BSP promoter-luciferase constructs, a FGF2 response element (FRE) (nts -92 to -85, "GGTGAGAA") was identified as a target of transcriptional activation by FGF2. Ligation of two copies of the FRE 5' to an SV40 promoter was sufficient to confer FGF responsive transcription. A sequence-specific protein-DNA complex, formed with a double-stranded oligonucleotide encompassing the FRE and nuclear extracts from ROS 17/2.8 cells, but not from fibroblasts, was increased following FGF2 stimulation. Several point mutations within the critical FRE sequence abrogated the formation of this complex and suppressed both basal and FGF2-mediated promoter activity. These studies, therefore, have identified a novel FRE in the proximal promoter of the BSP gene that mediates both constitutive and FGF2-induced BSP transcription.

骨シアロタンパク質の転写に対する腫瘍壊死因子の効果

日本大学松戸歯学部保存学Ⅱ講座 (歯周病学), 矯正学講座*,
保存学Ⅲ講座 (歯内療法学) **

○ 佐本博, 清水映美, 齋藤綾一郎**, 葛西一貴*, 山崎宗与**, 小方頼昌

Effects of Tumor Necrosis Factor- α on Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription

Departments of Periodontology, Orthodontics* and Endodontics**, Nihon University School of Dentistry at
Matsudo

Hiroshi Samoto, Emi Shimizu, Ryoichiro Saito**, Kazutaka Kasai*, Muneyoshi Yamazaki **,
and Yorimasa Ogata*

【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)はリン酸化および硫酸化を受けた糖タンパク質で、石灰化結合組織特異的に発現し、骨、象牙質、セメント質形成初期にその遺伝子発現が上昇することから、初期の石灰化における役割が注目されているタンパク質である。腫瘍壊死因子(TNF- α)は多くの炎症性疾患に関与し、炎症時のサイトカインカスケードにおいて中心的な役割を担っていると考えられる。本研究では、TNF- α のBSPの転写に対する作用を分子生物学的に検索した。

【材料および方法】

骨芽細胞様細胞(ROS17/2.8細胞)を、TNF- α (10 ng/ml)にて刺激後、経時的に全RNAを抽出し、BSP mRNA量の変化をノーザンブロット法により解析した。次に、種々の長さで調節したBSPプロモーター領域を挿入したルシフェラーゼプラスミドを用い、ルシフェラーゼアッセイを行った。以上の結果から、TNF- α に応答すると考えられるDNA配列を合成し、TNF- α 刺激後の核内タンパク質との結合状態をゲルシフトアッセイにて検索を行った。

【結果および考察】

TNF- α (10 ng/ml)刺激24時間後に、BSP mRNA量および転写活性は減少した。その効果はチロシンのリン酸化および活性酸素が関与すると考えられ、転写調節は転写開始点から約70塩基対上流に存在するcAMP応答配列(CRE)を介すると考えられた。ゲルシフトアッセイの結果、CREと無刺激のROS17/2.8細胞から抽出した核内タンパク質との結合バンドが認められ、TNF- α 刺激によりその結合は減少した。CRE配列と核内タンパク質の結合が特異的であるかどうかを検索するため、競合実験を行った結果、その結合はラットIGF-I遺伝子に存在するHS3D配列で競合され減少した。

【結論】

本研究の結果、TNF- α によるBSPの転写の抑制にはCRE配列が重要であり、その効果はチロシンのリン酸化および活性酸素が関与すると考えられた。また、HS3D配列にはC/EBP転写因子が結合することから、CREに結合する転写因子はC/EBPファミリーである可能性が示唆された。

Responses of Osteoblast-like Cells to Collagen-grafted Titanium Surfaces. C.-T. LIN*¹, W.-J. CHANG¹, J.-Y. CHEN¹, S.-Y. LEE¹, and Y. ABIKO², ¹ Taipei Medical University, Taiwan, ² Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan

One of the disadvantages of dental implants is the six-month healing time required. Shortening the healing time of osseointegration is an important issue for dental implant development. Glow discharge is a type of surface treatment which activates surface characters using gas plasma. Objective: to evaluate the cell response of collagen grafted titanium surfaces. Methods: The plates were treated by glow discharge with argon and allylamine. Glow-discharged titanium plates were then grafted with type I collagen using the cross-linking agents, bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS) and glutaraldehyde (GA). MG63 osteoblast-like cells were cultured on the grafted titanium surfaces to examine the effect on cells. Results: Enhanced cell attachment was shown on collagen-grafted titanium surfaces. The results also showed a higher grafting rate in the GA group and that grafting rates increased with GA and BS concentrations. MG63 cells revealed enhancement of cell behaviors in the GA group. Conclusion: The data indicate that collagen was successfully grafted onto the titanium surfaces using the glow discharge technology.

Responses of Osteoblast-like Cells to Collagen-grafted Titanium Surfaces. C.-T. LIN*¹, W.-J. CHANG¹, J.-Y. CHEN¹, S.-Y. LEE¹, and Y. ABIKO², ¹ Taipei Medical University, Taiwan, ² Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan

One of the disadvantages of dental implants is the six-month healing time required. Shortening the healing time of osseointegration is an important issue for dental implant development. Glow discharge is a type of surface treatment which activates surface characters using gas plasma. Objective: to evaluate the cell response of collagen grafted titanium surfaces. Methods: The plates were treated by glow discharge with argon and allylamine. Glow-discharged titanium plates were then grafted with type I collagen using the cross-linking agents, bis(sulfosuccinimidyl) suberate (BS) and glutaraldehyde (GA). MG63 osteoblast-like cells were cultured on the grafted titanium surfaces to examine the effect on cells. Results: Enhanced cell attachment was shown on collagen-grafted titanium surfaces. The results also showed a higher grafting rate in the GA group and that grafting rates increased with GA and BS concentrations. MG63 cells revealed enhancement of cell behaviors in the GA group. Conclusion: The data indicate that collagen was successfully grafted onto the titanium surfaces using the glow discharge technology.

Biological Response of Surface-modified Titanium. W.-J. CHANG*¹, C.-T. LIN¹, K.-H. FAN¹, S.-Y. LEE¹, and Y. ABIKO², ¹ Taipei Medical University, Taiwan, ² Nihon University, Matsudo, Japan

The surface of implantable biomaterials is in direct contact with the host tissue and plays a critical role in determining biocompatibility. In order to improve the integration of implants, it is desirable to control interfacial reactions such that nonspecific adsorption of proteins is minimized and tissue-healing phenomena can be controlled. Objective: Biological behavior of surface modified titanium was evaluated in this study. Methods: Titanium plate first was cleaned by glow Discharge using argon plasma to eliminate surface contaminants and to produce a consistent and reproducible titanium oxide surface layer. Then an intermediary allylamine deposition was covalently linked to the oxide layer by glow discharge, followed by the covalent binding of albumin to the free terminal NH₂ groups using glutaraldehyde. Surface coverage by bound albumin was evaluated by SEM visualization of colloidal gold immunolabeling. Calcium and phosphate change *in vitro* were measured. Result: The surface bonding rate showed significant differences between control and experimental groups The calcium and phosphate change were noted in the osteoblast-like cell culture system. The mineralization nodules formation also showed difference from control groups. Conclusion: The surface modified titanium influenced calcium / phosphate balance activity *in vitro*.

Biological Response of Surface-modified Titanium. W.-J. CHANG*¹, C.-T. LIN¹, K.-H. FAN¹, S.-Y. LEE¹, and Y. ABIKO², ¹ Taipei Medical University, Taiwan, ² Nihon University, Matsudo, Japan

The surface of implantable biomaterials is in direct contact with the host tissue and plays a critical role in determining biocompatibility. In order to improve the integration of implants, it is desirable to control interfacial reactions such that nonspecific adsorption of proteins is minimized and tissue-healing phenomena can be controlled. Objective: Biological behavior of surface modified titanium was evaluated in this study. Methods: Titanium plate first was cleaned by glow Discharge using argon plasma to eliminate surface contaminants and to produce a consistent and reproducible titanium oxide surface layer. Then an intermediary allylamine deposition was covalently linked to the oxide layer by glow discharge, followed by the covalent binding of albumin to the free terminal NH₂ groups using glutaraldehyde. Surface coverage by bound albumin was evaluated by SEM visualization of colloidal gold immunolabeling. Calcium and phosphate change *in vitro* were measured. Result: The surface bonding rate showed significant differences between control and experimental groups. The calcium and phosphate change were noted in the osteoblast-like cell culture system. The mineralization nodules formation also showed difference from control groups. Conclusion: The surface modified titanium influenced calcium / phosphate balance activity *in vitro*.

親水化ポリ乳酸表面へのタンパク質固定化

○長井 恵, 早川 徹¹, 吉成正雄², 牧村正治, 根本君也¹

日大・松戸歯・総合歯科,¹日大・松戸歯・理工,²東歯大・理工・口腔科学研究センター

Protein immobilization on hydrophilic poly-lactic acid

M. NAGAI, T. HAYAKAWA¹, M. YOSHINARI², M. MAKIMURA, K. NEMOTO¹

Nihon university at Matsudo,²Tokyo Dental College

【緒言】

現在、ポリ乳酸に代表される生分解性材料が口腔外科、歯周病治療などの分野で応用されている。今までにポリ乳酸や各種ポリ乳酸共重合体およびこれらとリン酸カルシウムなどの無機材料との複合体などについて検討がなされてきた¹⁾。演者らは、ポリ乳酸に代表される生分解性高分子材料に細胞接着促進などの生理活性が付与できれば、生分解性材料の臨床での応用が広がることを期待できると考えた。

そこで、本研究ではポリ乳酸をアルカリ加水分解することにより表面にカルボキシル基を導入して、その後、脱水縮合剤を用いて細胞接着タンパク質であるフィブロネクチンをポリ乳酸に固定化する手法を試みたので、以下に報告する

【材料および方法】

ポリ-L-乳酸 (PURASORB, PURAC 社, オランダ) をクロロホルムに溶解し、5 wt%の溶液を調整し、この溶液を円形スライドガラス (直径 15mm) 上にキャストした。室温で 24 時間放置した後に、ポリ乳酸フィルムをスライドガラスから剥がして、フィルムを作製した。

フィブロネクチン固定化の方法は Cai らの方法²⁾ に準じて行った。まず、ポリ乳酸フィルムを 0.5N NaOH 水溶液に 0.5, 1, 3 または 5 時間浸漬してアルカリ処理することによってフィルム表面にカルボキシル基を導入した。カルボキシル基の導入は純水に対する接触角の測定 (顕微鏡式接触角計, CA-D, 協和界面科学) によって確認した。

次に、0.1%wt 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド(水溶性脱水縮合剤, Sigma) を含有した MES バッファーにカルボキシル基導入ポリ乳酸を 24 時間浸漬した。その後、この試料を 0.5 wt% フィブロネクチン含有 MES バッファーに 24 時間浸漬して、ポリ乳酸表面にフィブロネクチンを固定化した。フィブロネクチンの固定化の確認は、x 線光電子分光測定(XPS, ESCA750, 島津)によって行った。

【結果ならびに考察】

Fig.1 に NaOH 処理時間を変化させた場合のポリ乳酸

フィルムの純水に対する接触角の測定結果を示す。NaOH 処理前では約 79° の接触角を示した。NaOH 処理を施すと接触角は低下し、NaOH 3 時間処理で約 45° となった。これから、NaOH 処理によって表面にカルボキシル基が導入されたことが分かる。

Fig.2 にフィブロネクチン固定化後のポリ乳酸表面の XPS 測定結果を示す。固定化されたフィブロネクチンの酸素原子に由来すると思われる O1s のピークが 532eV に、また、フィブロネクチンの窒素原子由来と思われる N1s ピークが 399.6eV に観察された。

以上の結果からポリ乳酸フィルムを NaOH 処理し、その後脱水縮合剤を用いることによって細胞接着タンパク質であるフィブロネクチンがポリ乳酸に固定化できることが判明した。

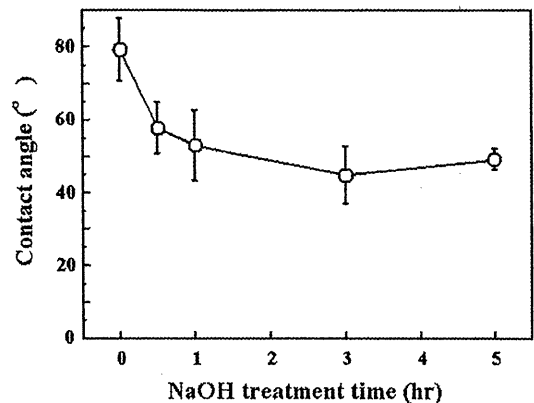


Fig.1 contact angles of poly L-lactic acid films

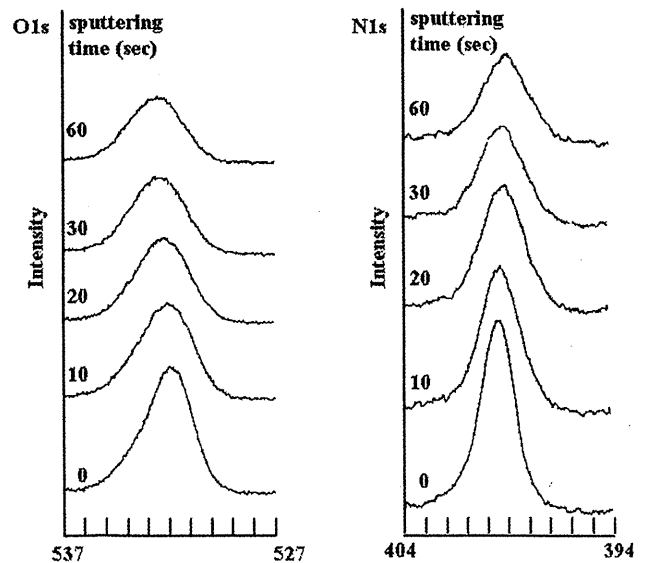


Fig.2 XPS of O1s and N1s of fibronectin immobilized poly-L-lactic acid film.

1) 長井 恵, 歯材器, 19:56-64:2000

2) Cai et al. Biomaterials, 23:1153-1160:2002

本研究の一部は、平成 15 年度日本大学学術助成金 一般研究 (個人)、日本学術振興会平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤 C2:15592073) および文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行った。

乳歯と永久歯のヒト歯髄線維芽細胞における *Lactobacillus casei* による IL-1 β 産生の検索

○鈴木康弘、前田隆秀
(日大松戸歯・小児歯)

【目的】

乳歯歯髄炎は永久歯歯髄炎と比較し臨床的疼痛を訴える頻度が少ない。このことから起炎物質における炎症メディエーターの産生に差があるのではないかと興味をもたれる。

う窩深部ではグラム陽性菌が多く検出され、特に *Lactobacilli* が優勢であると報告されている¹⁾。う窩深部から同定されるグラム陽性菌のうち、*Lactobacillus casei* (*L. casei*) から抽出したペプチドグリカンがヒト永久歯歯髄に最も強い刺激効果を示したと報告されている²⁾。

また、線維芽細胞等から産生され³⁾、歯髄炎等の炎症メディエーターの1つと報告されている⁴⁾ Interleukin-1 β (IL-1 β) に着目した。また、乳歯歯髄への起炎物質刺激における IL-1 β 産生の報告はほとんどない。

以上のことから、乳歯歯髄の特徴的な歯髄反応を解明するために *L. casei* から抽出したペプチドグリカンにより歯髄線維芽細胞を刺激し、IL-1 β 産生量を計測し永久歯歯髄と乳歯歯髄との比較検討を行った。

【方法】

1. 研究資料

日本大学松戸歯学部小児歯科あるいは口腔外科を受診し、永久歯では便宜抜歯・智歯抜歯を行う際に、また乳歯では下顎乳犬歯の便宜歯髄切斷・抜歯を行う際に、保護者(小児の場合)あるいは本人に了解が得られた全身疾患を有さない健常者の歯髄を採取した。

歯髄は、7～9才の乳歯歯髄と20～25才の永久歯歯髄を採取し、継代数は6～9代の細胞を用いた。

2. ヒト歯髄線維芽細胞の培養方法

ヒト歯髄線維芽細胞は、Somerman ら⁴⁾の方法に準じ、37℃、5%CO₂、95%気相下で10%ウシ胎児血清(FCS)を添加した α -MEMを用いて培養し、out growthさせた細胞を使用した。

3. ペプチドグリカン (*L. casei*) の分離と精製

L. casei(ATCC4646株)における細胞壁ペプチドグリカンの分離・精製は、Yanai ら⁵⁾の方法に従い行

った。

4. 測定方法

- (1) 乳歯・永久歯のヒト歯髄線維芽細胞に *L. casei* のペプチドグリカンを各濃度別(0.1、1、10 μ g/ml)で刺激し、上清を採取した。このとき、ペプチドグリカン無添加をcontrolとした。
- (2) 乳歯・永久歯のヒト歯髄線維芽細胞に *L. casei* のペプチドグリカンを各作用時間(4、8、12、24時間)刺激し、上清を採取した。このとき、ペプチドグリカン無添加をcontrolとした。
- (3) IL-1 β 産生量は Endogen Human IL-1 β ELISA kit (Endogen, Inc)を用いて計測した。

【結果】

- (1) 乳歯と永久歯において、*L. casei*のペプチドグリカンにより濃度依存的に IL-1 β 産生量は増加した。
- (2) 乳歯では、IL-1 β 産生量はcontrolと比較し有意差が認められた。
- (3) 永久歯では、IL-1 β 産生量はcontrolと比較し有意差が認められた。
- (4) 永久歯の IL-1 β 産生量は乳歯と比較し有意に増加した。

【考察】

今回の研究では、う窩に多く検出される *L. casei* からのペプチドグリカンを用いて歯髄組織の炎症反応を、炎症メディエーターである IL-1 β の産生量を計測することにより、乳歯と永久歯の比較検討を行った。

その結果、*L. casei*のペプチドグリカンは、永久歯では乳歯に比較して IL-1 β の産生量を増大させ、歯髄炎の反応が強く表れることが示唆された。このことから、乳歯歯髄は、永久歯歯髄に比較し炎症反応が乏しいことが示唆された。

【文献】

- 1) Hahn C.L. et al.: Archs. oral Biol. 36(2) 147-53, 1991.
- 2) Matsushima K. et al.: J. J. Cons. Dent. 38 (5), 1333-8, 1995.
- 3) D'souza R. et al.: Archs. oral Biol. 34(5) 307-313, 1989.
- 4) Somerman M. et al.: J. Dent. Res., 67:66-70, 1978.
- 5) Yanai A. et al.: Agr. Biol. chem., 40:1505-8, 1988.

Nd-YAGレーザー照射後のエナメル質に対するシーラント材の接着強さ

○ 生田剛史, 松根健介, 早川 徹*, 根本君也*, 前田隆秀

(日大・松戸歯・小児歯・口科研, *歯科理工・口科研)

【目的】

Nd-YAGレーザーによるエナメル質切削ならびにエナメル質耐酸性付与効果は, 新たな齲蝕治療および齲蝕予防法の可能性を提示している。しかしながら, 現在までに二酸化チタン懸濁液を使用した Nd-YAGレーザー照射後(以下Nd-YAGレーザー)の接着強さにおける報告はみられない。演者らは, Nd-YAGレーザー照射後のシーラント材充填時における引張り強さおよび電界放射走査電子顕微鏡による接着界面の検討を行ったので報告する。

【試料及び方法】

1. 試料: 被験歯は, 10%ホルマリン溶液中にて保存し, 使用直前に水洗した健全なヒトの抜去臼歯を用いた。頬側面を#1,000まで研磨し, 内径2.5mmの規定面を実験エナメル質とした。また, 中心部の穴はダイヤモンドバーにて作製した。レーザー装置は, Nd-YAGレーザー(CONTAC LASER, S.L.T)を用いた。照射条件は, ファイバー径400 μ m(シリカ, 加工なし), 繰り返し速度5pps, 先端出力300mJ, 1%二酸化チタン懸濁液を介在させて接触照射で行った。シーラント材は, レジン系シーラント材(Toothmate-FI, クラレ)を用い, 充填はメーカー指示に従った。

2. 接着試験: 研磨エナメル質面を下に示す各条件で処理した。

- (1)健全エナメル質面 (Normal)
- (2)中心部に直径0.5mm 深さ0.5mmの穴 (Hole: 擬似小窩裂溝)
- (3)中心部の穴をワックスにて閉鎖 (Hole+Wax)
- (4)中心部の穴にレーザー照射 (Hole+Laser)
- (5)規定面をレーザー照射 (Laser)

その後, 各条件のエナメル質面をリン酸エッチングし, 内径2.5mm, 厚さ約0.3mmのマスキングテープを貼り付け, シーラント材をエナメル質に接着させた。レジン硬化後, 37°Cの水中に1日浸漬した後, インストロン型万能試験機(TCM-500CR, シンコー)を使用し引張り速

度1mm/minで引張り接着強さを測定した。得られた測定値について一元配置分散分析およびシェフィーの多重比較による統計処理を行った。

3. SEM観察

各条件にて処理されたエナメル質面に, 内径3.2mm, 厚さ約2mmのシリコンリングを仮着し, リング内にシーラント材を充填し, 硬化後シリコンリングを撤去し, 37°Cの水中に1日浸漬し, 歯を歯軸と平行に切断後, 鏡面研磨, 乾燥し, 小型 ECR イオンシャワー装置(EIS-200ER, エリオニクス)にて, 1KV, 15mAの条件で30秒間のアルゴンイオンエッチング後, 白金蒸着を施しエナメル接着界面の観察をFE-SEMにて行った。

【結果】

1. 接着試験

(1) Normal	11.7 \pm 2.7
(2) Hole	13.6 \pm 5.0
(3) Hole+Wax	7.1 \pm 3.0
(4) Hole+Laser	8.1 \pm 2.4
(5) Laser	4.1 \pm 1.9

— : 有意差なし 単位: MPa

2. 接着界面のSEM像

レーザー照射した接着界面部は, 健全エナメル質における接着界面比較して, シーラント材とエナメル質の結合が弱い像を呈していた。

【まとめ】

エナメル質面に各条件で処理を行った場合, 引張り試験における有意差(5%)は認められなかったものの, 擬似小窩裂溝にレーザー処理を加えた場合(条件4), 引張り強さの平均値は大きく低下した。また, 規定面全体にレーザーを照射した場合(条件5), 接着強さはさらに低下した。次に, 擬似小窩裂溝部に対しての各条件での影響(条件2,3,4の比較)を考えると, 有意差(5%)は認めないものの, 中心部にワックス処理(条件3)を施したときに平均が約半分に低下した。この結果は, 小窩裂溝部にシーラント材が入らず死腔を形成してしまうとその接着能力が低下することが考えられた。一方, 裂溝内部にレーザーを照射したときには, 接着能力に対し影響が少ないことが同時に示唆された。

以上の知見を基に, 接着性を損なうことなく, レザーの耐酸性を生かせる条件を検討中である。

本研究の一部は, 文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業によって行った。

新規ハイドロキシアパタイトおよびリン酸カルシウムセメントの生活歯髄切断法への応用

○ 岡本春憲, 荒井清司, 宇治川玲子, 松永利恵, 松根健介, 木場秀夫*, 根本君也**, 前田隆秀 (日大・松戸歯・小児歯, *日大・松戸歯・病理, **日大・松戸歯・歯科理工)

【目的】

生活歯髄切断法として, FC 法と水酸化カルシウム法が主に用いられている。FC 法は, 臨床成功率は高いが, FC の毒性において問題点が挙げられている。一方, 水酸化カルシウム法は硬組織誘導能に優れており, FC 法と比較すると比較的毒性が弱いと考えられるが, 水酸化カルシウムにも毒性があり, 歯髄に浸透した場合, 強アルカリにより切断面表層部に壊死層をつくり歯髄の破壊が起こることによる内部吸収などが報告されている。そこで演者らは, 生態親和性に優れ, 生活歯髄切断法に適した覆髄剤の開発を目的として, ハイドロキシアパタイトおよびハイドロキシアパタイト+リン酸カルシウムセメントならびにハイドロキシアパタイト+炭酸カルシウムを覆髄剤に応用することを検討すべくラットを用い評価した。

【試料及び方法】

実験動物として生後 5~8 週の WISTER 系ラットの雄を用いた。実験歯は左右上顎の第一臼歯とした。

方法はラットの下肢部にネンプターを用い全身麻酔下にて固定板上に固定し, 患歯をヨードチンキにて消毒後, 生活歯髄切断法を臨床的術式に準じマイクロモーターにて行った。覆髄剤は以下の 5 種類を使用した。

1. 水酸化カルシウム製剤(カルピタール[®])
2. FC(パルパック V[®])
3. 多孔質 HAP(以下 HAP)
4. HAP+炭酸カルシウム
5. HAP+ β -TCP

術後 3, 7, 14, 30 日にて CO₂ による安楽死を行い, マイクロ CT および病理学検討を行った。病理組織学的検討は 5 μ m の連続切片標本作製し, HE 染色を施し光学顕微鏡にて硬組織形成, 壊死層の有無, 歯髄の状態, 根尖病巣の有無についての観察を行った。

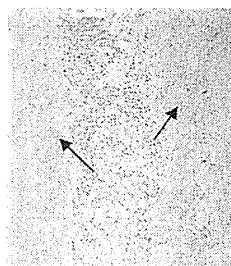
【結果及び考察】

術後 30 日のマイクロ CT 像では水酸化カルシウム製

剤では切断面に, HAP, HAP+炭酸カルシウム, HAP+ β -TCP の 3 製剤では髄腔壁に硬組織様像を認め(図 1), FC では認められなかった。マイクロ CT において, HAP+炭酸カルシウム病理組織学像には覆髄剤直下ではなく髄腔壁に沿って硬組織様像の所見が認められた(図 2)。木村ら¹⁾は, 強アルカリの持続時間が切断面にデンティンブリッジの形成上必要であると考察している。本研究においても同様な結果を示した。HAP, HAP+炭酸カルシウム, HAP+ β -TCP において, 髄腔壁に硬組織様像を認め, 歯髄には炎症像を認めなかったことから覆髄剤としてこれらの製剤を用いた生活歯髄切断法は臨床の場において歯髄刺激も少なく, 切断面への硬組織形成が改良されれば有用である可能性が示唆された。



(図 1)硬組織様像



(図 2)硬組織様像(矢印)

【参考文献】

- 1) 木村奈津子, 有田憲司, 西野瑞穂: 歯髄切断部の硬組織形成に関する外因性因子についての研究, 小児歯科学雑誌, 38 : 138-154, 2000
- 2) 城戸秀美: ラット臼歯の生活歯髄切断後の修復象牙質形成に対する水酸化カルシウム製剤, フォルムクレゾール製剤, 高分子ヒアルロン酸製剤の効果に関する組織学的・微細構造学的研究, 昭和歯学会雑誌, 20 : 294-309, 2000
- 3) 井野場朗子, 五十嵐勝, 川崎孝一: HAP と α -TCP セラミックスを用いる生活歯髄切断法の CO₂ レーザー光による去る歯髄反応の組織学的観察, 日本歯科保存学雑誌, 46 : 118-131, 2003
- 4) 井上友紀, 大西智之, 大嶋隆: Er:YAG レーザーの乳歯生活歯髄切断法への応用, 小児歯科学雑誌, 40 : 739-743, 2000

本研究の一部は, 平成 15 年度日本大学松戸歯学部鈴木研究費の援助により行われた。

電気浸透ポンプ調製用ゲル電気泳動による DNA
および蛋白質の分離・精製

○早川 光央^{1,6}、印東 次郎^{1,6}、上野 正男^{1,6}、西
山 典宏^{2,6}、木場 秀夫^{3,6}、久保山 昇^{4,6}、浜島
進^{5,6}、城座 映明^{5,6}、安孫子 宜光⁵

(¹日大松戸歯 化学、²理工、³病理、⁴薬理、⁵生化、
⁶口科研)

【目的】核酸および蛋白質のバンドを電気泳動的に分離しながら回収する方法として、半透膜をエレクトロオスモティックポンプとして利用する調製用電気泳動システムの確立を目的とした。【方法】直径～10 cm まで種々のゲルサポートカラムを擁する電気泳動装置を作製し、DNA および蛋白質を試料として泳動を行なった。ポリアクリルアミドまたはアガロースのディスクゲルにナイロンチュールと透析膜を張ってエリューションチャンバーとした。溶出液はチャンバーからキャピラリーを通してフラクションコレクターに回収した。DNA サイズマーカーおよび制限酵素処理した細菌の染色体 DNA を電気泳動にかけ、経時的に分画したフラクションを平板ゲル電気泳動で分析した。また、細菌性プロテアーゼは蛍光基質で検出しながら精製を行なった。【結果】核酸用に TAE バッファー、蛋白用に Tris-Glycine バッファーを用いたとき再生セルロース製の透析膜で至適なエリューション速度が得られ、DNA および蛋白質は高い解像力で分離・回収された。DNA はエタノール沈殿後リガーゼや制限酵素等の酵素反応に障害を認めなかった。【結論】本法は透析膜がポンプであるため電気泳動装置の構造を単純化できた。DNA はアクリルアミドとアガロースを用いて分子サイズを広範囲に分画できた。蛋白質精製には native-、SDS-PAGE 双方で有効であった。

歯髄培養細胞の Interleukin-1 β 産生に対する EPC-K₁ の影響

○三浦 浩、辻本 恭久、松島 潔、山崎 宗与

日本大学松戸歯学部 歯内療法学教室

L-ascorbic acid 2-[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-yl-hydrogen phosphate] potassium salt (EPC-K₁) は抗酸化作用を持つヒドロキシラジカル ($\cdot OH$) 消去剤として炎症に対する臨床応用が検討されている薬剤である。我々の教室では歯科において、歯髄切断面、移植歯歯根膜保護、歯肉切除部創面保護等に EPC-K₁ が応用可能かどうかを検討している。特に炎症に対しての効果を詳細に解明することは、薬剤の応用範囲を特定する上で重要である。そこで、本研究では歯髄培養細胞に起炎性の高い LPS を作用させ EPC-K₁ を添加し、炎症性サイトカインの一つである IL-1 β の産生を比較することによって、EPC-K₁ の抗炎症作用を検討した。

材料と方法

歯髄細胞の培養は、研究のインフォームドコンセントを十分行って、同意を得られた患者の、矯正学的理由で抜去された健康な歯から歯髄組織を無菌的に取り出し、10%ウシ胎児血清 (FCS) を含む α -MEM を用いて、CO₂ インキュベータ中 (37 $^{\circ}$ C、5%CO₂) で out growth させ、5~9 代継代し、歯髄培養細胞 (歯髄細胞) として研究に供した。歯髄細胞を 24 穴プレートに 5×10^4 cells / well になるように播種し、コンフルエント後に培地を 2%FCS を含む α -MEM に交換し、その 24 時間後に 2% FCS, 1 μ g/ml LPS (*Porphyromonas endodontalis* より hot phenol 法により抽出) を含む α -MEM に 0, 1, 5, 10, 50 μ M EPC-K₁ (千寿製薬より供与) を添加し、4, 8 時間培養し、培養上清中の IL-1 β 量を human IL-1 β ELISA kit (ENDOGEN 社製) を用いて測定した。10 cm 細胞培養プレートに上記と同様に培養した歯髄細胞から Fast Prep Kit を用いて mRNA を抽出し、GeneAmp RNA kit (Perkin-Elmer 社製) を用いて cDNA を作製した。作製した IL-1 β の primer を用いて GeneAmp RNA kit にて PCR 法を行い、DNA を増幅した。PCR 産物を 1.5% アガロースゲルで泳動し、各々の増幅産物のサイズの確認と IL-1 β の遺伝子発現の観察を行った。

結果および考察

歯髄培養細胞に LPS を作用させることにより、経時的に IL-1 β の産生が増加した。これに EPC-K₁ を添加することにより、経時的に、EPC-K₁ の濃度依存的に IL-1 β の産生を抑制した。さらに RT-PCR 法による遺伝子発現の観察において EPC-K₁ の添加により IL-1 β mRNA の発現が減少した。以上の結果より、EPC-K₁ は歯髄培養細胞の IL-1 β 産生を抑制することが示唆され、抗炎症効果も期待できるものである。

この研究の一部は、文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行った。

カーボネートアパタイトとbioactive glassの混合による 歯根罅またはセメント質剥離への修復応用の可能性

○大久保厚司^{1,2)}, 下御領良二²⁾, 木村知克²⁾, 塚田典功³⁾,
三橋淳也^{2,3)}, 辻本恭久^{2,3)}, 小澤幸重¹⁾

1. 日本大学松戸歯学部第2解剖学教室
2. 厚生労働省認可(社)日本歯科先端技術研究所
3. 日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

The possibility of the root repair to the case of root crack or exfoliated cement using the mixture of carbonated hydroxyapatite and bioactive glass

○Ookubo Atsushi^{1,2)}, Shimogoryo Ryouji²⁾, Kimura Tomokatu²⁾, Tsukada Norikatu³⁾,
Mitsuhashi Junya^{2,3)}, Tsujimoto Yasuhisa^{2,3)}, Kozawa Yukishige¹⁾

1. Dept. of 2nd Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
2. Japan Institute for Advanced Dentistry
3. Dept. of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

1. 緒言

咬合性外傷による歯根罅やセメント質の剥離は、臨床的には根尖周囲組織に歯槽膿瘍としてあらわれる。診断も然ることながら健全歯であれば自然治癒も望めるが、感染根管治療を施した歯は急性歯槽膿瘍として臨床症状が継続してあらわれ、外科的処置を伴うことが多い。そこで、早期の臨床症状回復とより確実性の高いミネラルにより修復する方法を紹介する。

2. 材料および方法

生体材料には自己と非自己の製剤があるが、感染の可能性から人工生体材料を選択し、創傷治癒促進させる安定したpHと早期に骨との置換可能な、ニューヨーク大学のDr. LeGeros RZによって開発中のカーボネートアパタイト(CHA), ならびに長期に組織安定と置換作用をもつbio-active glass (Orthovita社製 Biogran®: BG)を用いた。CHAの実験には雑種成犬2才の下顎歯を抜去後2カ月の下顎歯槽骨に5 x 6 mmの人工窩を形成してCHAを埋入し、灌流固定後、3, 6, 8週の骨造成状態を光顕で観察した。コントロールは同様に形成した窩を自然治癒群とした。また、BGをラット骨に埋入し、3, 6カ月をCHA同様、光顕で観察した。

3. 結果

CHA群はコントロール群と比較して3週、6週の早期に骨造成を認めたが、8週ではコントロール群がより骨造成を認めた。また、BGでは骨置換まで6カ月を要したが、全て吸収置換が行われていた。

4. 考察

感染根管の歯根罅やセメント質の剥離の治癒には歯根膜の再生が第一であるが、長期の治癒過程を要し、感染した場合には急性化し、部分除去や抜歯に至る。そこで、象牙質やセメント質の成長期にはCa, Pに加えて多量のMg, Al, Siが存在し、特にSiの存在は欠かせないものとする。創傷治癒に必要な安定したpHと歯根修復にミネラルを供給させるために早期に骨置換するCHAと長期にわたりミネラル供給可能なBGの混合する方法は臨床的にも有効であるとする。

5. 臨床応用

歯根罅やセメント質の剥離症例に応用し、咀嚼可能な状態で良好な治癒経過像を認める3症例を供覧したい。

この研究の一部は、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業によって行われた。

PRP の臨床的確認と歯根端切徐術への応用

○大久保厚司^{1, 2)}, 下御領良二²⁾, 岸民祐²⁾, 田中悟²⁾,
辻本恭久^{2, 3)}, 小澤幸重¹⁾

1. 日本大学松戸歯学部第2解剖学教室
2. 厚生労働省認可(社)日本歯科先端技術研究所
3. 日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

The clinical target confirmation of Platelet Rich Plasma, and application the apicoectomy method to the origin of endodontic lesion

○Ookubo Atsushi^{1, 2)}, Shimogoryo Ryouji²⁾, Kishi Tamihiro²⁾, Tanaka Satoru²⁾,
Tsujimoto Yasuhisa^{2, 3)}, Kozawa Yukishige¹⁾

1. Dept. of 2nd Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
2. Japan Institute for Advanced Dentistry
3. Dept. Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

1. 緒言

根管治療は勿論のこと歯根端切除や搔爬などの外科処置を施しても根尖病変が消失せず再発する症例がある。原因は管外側枝、亀裂(罅)、セメント質剥離や自己免疫等様々であるが確定診断に至らないまま臨床でも極少に遭遇する。また、外科的処置をおこなうにも治癒するか否かの危惧の可能性もある。そこで、より感染のない安全な方法として自己採血から遠心分離で抽出し、自己骨造成タンパクとしてTGF- β , IGF-1, PDGFが血流より約3倍含まれ、広く行われている多血小板血漿(Platelet Rich Plasma: PRP)を処置部に局所埋入する方法と臨床的にPRP量の確認をおこなう方法を検討する。

2. 材料および方法

あらかじめ抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム0.5ccを注入した10ccの真空採血管にて患者血液を8cc採血し、2,400 rpmで10分間遠心分離をおこない、血球との境界より0.8cc残存させた状態でクエン酸ナトリウムとPPPを取り除き、さらに3,600rpmで5分間遠心分離を行い、血球境界を含むPRPを1cc採取した。実験では雑種成犬2才の下顎歯を抜去後2カ月の下顎歯槽骨に5x6mmの人工窩を形成し、そこにPRP, β -TCP, 吸収性HAを埋入し、3, 5週の骨造成状態を観るために灌流固定を行った。さらに臨床では患者の体調によりPRP採取が不定確な場合があるので採取したPRPより1滴を位相差顕微鏡でカウントして全体像として採らえ、埋入の可否の判定をおこなった。

3. 結果

採取したPRP量の目安として血小板濃縮率について調べた結果、必要量とされる100万/mlが存在した。また、コントロールと比較して3週のHA, β -TCPの一部の周囲に新性骨で被われた部分を認め、5週では骨造成を13%多く認めた。臨床では全体のPRP量を把握するために1滴を位相差顕微鏡でカウントし、PRP必要量に伴う埋入の可否の判定をおこなうことができる。

4. 考察

PRPの効果をMarxらは6カ月で20%の骨量の増加と2倍の早さで骨形成ができると報告しているが、本実験では多血小板から抽出したPRPは約7日でその発現を終わると考え、初期のジャンプスタートとしての役割をもつと考える。以後、5週では約13%の造成率を観たが、それ以上の長期観察はおこなっていない。しかし、初期の感染や免疫応答に関与するT細胞や抗原提示細胞の出現をPRPで制御する可能性があり、創傷治癒の初期段階の働きはおこなえるものとする。

5. 臨床応用

歯根端切除術症例に埋入したPRPならびにPRP clotの経過を報告する。

この研究の一部は、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業によって行われた。

Observation of the surface of MTA and portland cement after application of canal irrigants

○ Hiroshi MIURA, Masahiro KOZUKA, Tomohiro KATOH, Tadashi KAWASHIMA, Yasuhisa TSUJIMOTO, Kiyoshi MATSUSHIMA

【研究目的】

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は、パーフォレーションや内部吸収の処置、逆根管充填、覆髄、漂白における歯根内バリアー等に用いられ、その有効性が近年注目されている。本研究では、パーフォレーション部の閉鎖に優れている MTA を根管洗浄剤に作用させたとき、どのような影響が認められるかを検索する目的で、MTA と MTA の主成分であるポルトランドセメント (PS) を根管洗浄剤中に一定時間作用させ、MTA と PS の表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて観察、比較検討した。

【材料および方法】

試薬の H_2O_2 、 NaClO 、EDTA は和光純薬工業より入手し調整した。MTA は DENTSPLY TULSADENTAL 社製 PRO ROOT_{TM} を用いた。MTA はメーカーの指示通り練和し、2枚のガラス練板の間に圧接し、厚さ約 1 mm に調整し試料とした。試料を 3% H_2O_2 、5% NaClO 、15% EDTA の各溶液 2 ml 中に 1 週間浸漬した。また、超純水 (PW) に 1 週間浸漬したものをコントロールとした。試料の表面の観察は日立社製 S-2150 を用いて行った。

【結果】

MTA : 〈コントロール群〉針状結晶構造体および六角形の結晶構造体を認める。他の部分は不定形の粒子が密に充填されているのが観察された。〈 H_2O_2 群〉針状結晶構造体および六角形の結晶構造体を認める。他の部分不定形の粒子が密に充填されているのが観察された。〈 NaClO 群〉表面に六角形の結晶構造体が多数観察された。〈EDTA 群〉所々に間隙を認め、結晶構造物は観察されなかった。

PS : 〈コントロール群〉MTA よりも針状結晶構造体が多く観察された。〈 H_2O_2 群〉所々に間隙を認め、結晶構造物は観察されなかった。〈 NaClO 群〉表面に三角錐状の構造結晶体が多数観察された。〈EDTA 群〉所々に間隙を認め、結晶構造物は観察されなかった。

【考察】

これまでの報告から、MTA は安定した物質であると言われているが、本実験において、各種洗浄液によって MTA の表面が様々な影響を受けたことがわかった。このことは MTA が種々の無機質によって構成されており、各種洗浄液の作用でこれらの成分が溶出したためか、構造物ができたためであると考えられる。今後は各種洗浄液によって、MTA のどの成分が溶出し、またはどんな反応生成物かを観察、分析し、検討していくつもりである。

この研究の一部は、文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業および平成 17 年度日本大学学術研究助成金(奨 05-045)によって行われた。

骨欠損部におけるハイドロキシアパタイトの効果

○西山 典宏¹、木場 秀夫²、久保山 昇³（日本大学松戸歯学部理工学講座¹、病理学講座²、薬理学講座³）

【目的】ヒトでは種々な形態のハイドロキシアパタイト（以下HA）が早期に骨を再生させる目的で臨床応用されている。我々は多孔性連根状HAを試作し、それらが初期骨形成に与える効果を病理組織学的に検討した。

【埋植材料と方法】埋植したHAは湿式法で合成し、1200℃で焼結した、直径3mmで連根状の孔のあいた3種類である。高齢ウサギの大腿骨上顆の骨欠損部にHAを埋植した。実験動物は1群5匹とし第1群は無処置群、第2群は穴だけのSham群、第3群はHA埋植群とした。埋植後、2と8週目に大腿骨を摘出し、脱灰パラフィン切片を作成しH-E染色とアザン染色を施し、病理組織学的に観察した。

【結果】埋植2週は、HA周囲、孔の内面および既存の骨の断端に新生骨の骨梁が観察された。また、新生骨骨梁はアザン染色で青く染まる類骨組織であった。埋植8週では、HA周囲と孔の内面に形成された新生骨骨梁は埋植2週と比較すると太くなり、新生骨の一部はアザン染色で赤に染まり、埋植2週より石灰化が亢進していた。HA埋植群の孔内にはいずれも新生骨が認められ、孔の形成は保持形態として有効と考えられた。今後、小動物歯科臨床の発展に伴って小動物の骨欠損にHAを埋植する症例も増えると考えられる。

演題名：

絹フィブロインの骨再建材料への応用

演者：

西山 典宏¹、木場 秀夫²、久保山 昇³、早川 光央⁴、山本 浩嗣²、
藤井 彰³、安孫子 宜光⁵、朝倉 哲郎⁶、根本 君也¹

所属機関名：

¹日大松戸歯学部・歯科生体材料学、²口腔病理学、³口腔分子薬理学、⁴化学、
⁵生化学・分子生物学、⁶東京農工大工学部・生命工学

【目的】カイコの繭から得られた絹フィブロイン (SF) は、各種アミノ酸から構成されるタンパク質で、生分解性を有する事から、生体材料への応用が検討されている。今回、SF とハイドロキシアパタイト (サンギ社製、HA) の複合体を、高齢ウサギ大腿骨に埋植して新生骨の再生に及ぼす影響を検討し、SF の担体としての有用性を検討した。

【方法】SF を 9M LiBr 水溶液に約 10%に溶解し、濾過した後透析した。SF 溶液、1 g に HA の懸濁液 (500 mg/ml)、80 μ l を混合し、ポリエチレン製リングに注入し、凍結乾燥してスポンジ状の SF-HA 複合体を得た。この複合体をエタノールで浸漬・固定した後、動物実験に供した。動物は 1 群 5 匹とし、第 1 群は骨欠損のみの sham 群、第 2、3、4 群はそれぞれコラーゲン、SF および SF-HA 複合体とし、高齢ウサギの大腿骨上顆に作製した骨欠損部に埋植した。埋植後 2、8 週に大腿骨を摘出し、脱灰、パラフィン包埋後、H-E 染色あるいはアザン染色を施し病理組織学的に観察した。

【結果】SF-HA 複合体は、埋植直後から少しずつ巨細胞に貪食され、肉芽組織に置換されていった。埋植 8 週では SF-HA 複合体の約 50%が吸収され、肉芽組織の内部やその周囲に新生骨の形成が認められた。

骨欠損に対する再建材料としてのヒドロキシアパタイト周囲の初期組織変化

木場 秀夫 1、久保山 昇 2、石崎 勉 3、西山 典宏 4 (日本大学松戸歯学部病理学講座 1、薬理学講座 2、理工学講座 4、(株) サンギ 3)

【背景】 口腔は多くの機能を担っているため、口腔の骨欠損は出来るだけ早期に骨を再生させて機能回復することが重要である。一方、ヒドロキシアパタイト (以下 HA) は骨組織内に移植すると優れた生体親和性を示すだけでなく骨伝導性を有し、骨再建材料として有用であると報告されている。【目的】 骨再建を目的として骨組織内に埋植する材料として、多孔性連根状 HA を試作した。それら試作材料の初期骨形成促進効果を検討した。【材料と方法】 ウサギの大腿骨上顆に骨欠損を作製し、HA を欠損部に埋植した。埋植した材料は湿式法で合成して 1200°C で焼結した HA である。直径 3mm 大で連根状の多数の孔を形成した。実験動物は 1 群 5 匹とし第 1 群は無処置、第 2 群は穴のみ、第 3 群は HA のみ、第 4 群は HA/アルジネートゲル (Alg) とした。埋植後、2 と 8 週目に大腿骨を摘出し、脱灰パラフィン切片を作成し H-E 染色とアザン染色を施し病理組織学的に観察した。【結果】 埋植 2 週：骨欠損部の骨再生は、HA 周囲、孔の内面および既存の骨の断端に密着して、新生骨の骨梁が観察された。新生骨骨梁はアザン染色で均一に青く染まり未石灰化の類骨組織であった。HA を埋植した第 3 群と第 4 群では既存の骨の断端部より HA 周囲に多くの新生骨が形成される傾向が認められた。埋植 8 週：埋植 2 週と比較すると HA 周囲と孔の内面に形成された新生骨骨梁は太く、一部アザン染色で赤に染まり石灰化が進行していた。また、第 4 群では、HA 周辺に線維性結合組織が密に形成され創傷治癒する傾向が認められた。【結論】 HA は骨再生の足場として重要であり、HA の孔内に新生骨が形成されたことから、HA に蓮根状孔を形成したことが HA の初期安定化に有効であることが示唆された。

木場秀夫 kiba@mascat.nihon-u.ac.jp

Effect of Pore Size in Hydroxyapatite Structure on Bone Regeneration

*N. KUBOYAMA^{*1}, H. KIBA¹, N. NISHIYAMA¹, M. HAYAKAWA¹, T. ISHIZAKI², A. FUJII¹, H. YAMAMOTO¹, K. NEMOTO¹, and Y. ABIKO¹, ¹ Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan, ² Sangi, Tokyo, Japan*

Objectives: This study was undertaken to examine histopathologically the effect of pore sizes on the new bone formation on the surface of pore in HA structure in aged rabbits. **Methods:** The bone defect was prepared at the distal femoral condyles of the rabbit, more than 1.5-year old, weighing 3.5-4.5 kg. The HA structure (3.0 mm Φ and 2.7 mm in height) was implanted in the bone defect. The animals were randomly divided into 4 groups; Only bone defect (Sham), fine pore size (20 $\mu\text{m}\Phi$), middle pore size (150 $\mu\text{m}\Phi$), and large pore size (375 $\mu\text{m}\Phi$). The rabbits were sacrificed at 2 and 8 weeks after implantation, femur bones were extracted, and histopathological observations were made. The contact ratio between newly formed bone and the surface of pore in HA structure was calculated. **Results:** In the fine pore size, the contact ratio significantly increased from 11.6% to 58.7% at 2 and 8 weeks, respectively (Scheffe's test, $p < 0.005$). The contact ratio of middle pore size at 2 weeks was consistently higher (83.4%) than that of large pore size (48.9%). However, no significant difference was found between middle pore size and large pore size in both contact ratio and histomorphometric analysis at 8 weeks. At 8 weeks, the inside surface of pore in middle pore size and large pore size HA structure were almost completely surrounded by newly formed bone. **Conclusion:** The best pore size in HA structure was 150 $\mu\text{m}\Phi$. The importance of physical characteristics of the pore size in HA structure for new bone formation was indicated. Part of this work was supported by a Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology to promote 2001-multidisciplinary research projects (in 2001-2005).

Calcium Phosphate Cement Reinforced with Chopped High Performance Polyethylene Fiber.

S. Hirayama^{1*}, T. Ikemi¹, Y. Tsujimoto¹, M. Yamazaki¹, L.C. Chow², S. Takagi², J. M. Antonucci³.

¹*Nihon University, Chiba, Japan*, ²*American Dental Association Health Foundation, Paffenburger Research Center*,

³*National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, U.S.A.*

A self-setting calcium phosphate cement (CPC), consisting of tetracalcium phosphate (TTCP) and dicalcium phosphate anhydrous (DCPA), reacts with water and hardens fast (30 min) to form hydroxyapatite (HA) under physiological conditions as the final product. Although this CPC is finding increasing use as a biomaterial, it is presently limited to low stress bearing applications because of its relatively low strength and highly brittle nature. Recently the mechanical properties of CPC reinforced with chopped carbon fiber have been reported. **Objective:** To evaluate the effect of adding chopped high performance polyethylene fibers (PEF) to CPC on the physical and mechanical properties of this cement. **Materials and Methods:** CPC mixed with distilled water containing (0, 1.0, and 2.0) wt % dispersed PEF (length 5~10 mm, diameter 35 μ m). Hardening times at 37 $^{\circ}$ C were assessed with a Gilmore needle method and the extent of HA conversion by X-ray diffraction (XRD). Mechanical strength was assessed by Diametral tensile strength (DTS), flexural testing (FS) and toughness of specimens hardened after 24 h at 37 $^{\circ}$ C, 100 % relative humidity. Scanning electron microscopy (SEM) was used to analyze fracture behavior. **Results:** PEF reinforced CPC had similar handling characteristics, hardening times (\approx 30 min), and HA conversion (XRD) as the control CPC. However, significant differences in strength and toughness ($p < 0.05$) were noted for PEF-CPC vs CPC. Flexural strength (mean \pm s.d., $n = 5$) values were (21.2 \pm 5.5) MPa and (16.4 \pm 1.9) MPa, for 1.0 wt % PEF-CPC and CPC, respectively. Unlike the fractured control specimens, the PEF-CPC specimens did not fail catastrophically but exhibited fragment cohesion in spite of multi cracking. SEM indicated that crack propagation was arrested by fiber bridging and resistance to fiber pull out. **Significance:** Incorporation of 1.0 wt% of PEF fibers into the brittle CPC matrix provides a means to enhance both the strength and toughness of this important biomaterial.

異なる Ca/P 比から成るリン酸カルシウムセメント の材料特性について

日本大学松戸歯学部 保存修復学講座¹

American Dental Association Health Foundation,
Paffenbarger Research Center²

日本大学松戸歯学部 口腔科学研究所³

○平山聡司^{1,3}, 池見宅司^{1,3}, 高木章三²
Lawrence C Chow²

【目的】リン酸四カルシウム(TTCP)とリン酸二カルシウム(DCPA)を等モル混合させたリン酸カルシウムセメント(CPC)はChowらによって1987年に報告され,水との練和により硬化し,生体内環境下でハイドロキシアパタイト(HAp)に転化して硬組織と結合する生体親和性材料である。CPCのTTCP/DCPAモル比(T/D比)が1/1の場合,生成されるHApは化学量論HApに転化するが,T/D比が低くなるとCa量の不足したHApが生成される。本研究はCPCのT/D比を変えた場合の材料的特性について検討した。

【方法】CPCをT/D比1/1(CPC-1),1/2(CPC-2)および1/3(CPC-3)に調整したものを本実験に供した。各CPCの硬化時間の測定はギルモア針法により測定し,理工学的強さの測定は間接引張り強さ(DTS)を測定した。DTS試料の作製は,各CPC練和後ステンレス製金型に充填し,37°C湿箱中で2時間保管後,金型より取り出した。この試料(直径6mm×厚さ3mm)を37°C擬似体液(pH=7.4)中に1,5および10日間浸漬後,DTSを測定した。さらに粉末X線回折装置(XRD)を用いてHApの生成量の変化について分析し,試料表面と内面の形態的变化をSEMにて観察した。

【結果】硬化時間は,各CPC間に有意な差は認められなかった。DTS値は,CPC-1において浸漬時間の延長に伴って低下した。CPC-2では5日浸漬試料で有意に増加したが,CPC-3では浸漬時間にかかわらず有意な差は認められなかった。XRDとSEM観察からT/D比の違いによりHApの生成速度と結晶形態に差が認められた。

【結論】CPCはT/D比が1/1~1/3の範囲では,HApが生成されるT/D比1/2および1/3では,結晶生成速度と物性の低下が認められた。

ヒドロキシラジカル消去剤 EPC-K₁ の他の作用について

○辻本恭久, 川本幸司, 小塚昌宏, 一ツ子延大, 石崎勉#, 山崎宗与

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

株式会社サンギ中央研究所#

【実験目的】

千寿製薬で開発された EPC-K₁ は, 優れたヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) 消去剤としてフリーラジカルの実験に使用されている. 歯科臨床では変色した歯の漂白を行う場合, 30-35% の高濃度の H_2O_2 が使用されている. われわれは H_2O_2 を使用した歯の漂白の効果は $\cdot\text{OH}$ によると推測報告しているが, 今回, 歯の漂白を EPC-K₁ によって $\cdot\text{OH}$ を消去することで阻止できるかどうかの検索を行っていた際, 歯が溶解していくことが観察された. そこで, EPC-K₁ の歯に対する作用の詳細を検索するために, 各種濃度の EPC-K₁ を歯に作用させ検討した結果, 興味ある知見を得た.

【材料ならびに方法】

ヒト抜去歯は当教室に保存されていたものを使用した. EPC-K₁ は千寿製薬から提供された. 過酸化水素 (H_2O_2) は和光純薬工業より入手した. スピントラッピング剤は 5, 5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (同人化学) を用いた. Electron spin resonance (ESR) は JEOL JES FA 300 を用いた.

【結果】

3% H_2O_2 から発生する $\cdot\text{OH}$ を各種濃度の EPC-K₁ を添加することで消去を行った. その場合, 25 mM から 2.5 μM までの EPC-K₁ を添加することで $\cdot\text{OH}$ は検出されなかったが, 72 時間経過時では 2.5 μM EPC-K₁ 添加例において, $\cdot\text{OH}$ は検出されるようになった. 25 mM の EPC-K₁ 使用例では, 歯の試料を溶液中に入れた場合, 経時的に Ca 溶出量が増加し, 試料が溶解することが観察された.

【結論】

EPC-K₁ は $\cdot\text{OH}$ 消去能を有しているが, キレート作用もあることが再確認された.

この研究の一部は, 文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業によって行われた.

DENTIN IS DISSOLVED BY EPC-K₁ WITH HYDROGEN PEROXIDE

Yasuhisa TSUJIMOTO, Kohji KAWAMOTO, Masahiro KOZUKA,

Tsutomu ISHIZAKI* and Muneyoshi YAMAZAKI

Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 870-1, Nishi-2, Sakaecho, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan. *Central Research Center, Sangi Co., Ltd., 2745-1, Fudouinno, Kasukabe, Saitama 334-0001, Japan.

In the previous study, we reported that hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) was main factor for tooth whitening. However, the detail mechanism of tooth whitening is not clarified yet. L-ascorbic acid 2-[3,4-dihydro-2,5,7,8-tetramethyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)-2H-1-benzopyran-6-yl-hydrogen phosphate] potassium salt (EPC-K₁) has not only $\cdot\text{OH}$ scavenging effect, but also metal chelating effect. In the process of tooth whitening experiment, we observed that tooth blocks were dissolved when tooth blocks were put into the solution of 3% H₂O₂ with EPC-K₁, or EPC-K₁. The aim of this study is clarify of EPC-K₁ effect to dentin. Electron spin resonance (ESR) spin-trapping method was used for measurement of the $\cdot\text{OH}$. The calcium volume of solutions, and teeth block weights were measured in the time course. In the results, tooth block was dissolved in the solution of EPC-K₁ with 3% H₂O₂, or EPC-K₁. Too much collapsed tooth block was observed in the case of using 25mM EPC-K₁ with 3% H₂O₂. Also, the calcium volume was detected too much in the solution when using 25mM EPC-K₁ with 3% H₂O₂ or 25mM EPC-K₁. Tooth block weight is decreased a little except using 3% H₂O₂ with 25mM EPC-K₁ at 3 weeks. The $\cdot\text{OH}$ did not detect from each concentrations of EPC-K₁ solution, but the $\cdot\text{OH}$ like signal was observed at 3 weeks. Also, the $\cdot\text{OH}$ like signals were observed at 3 weeks in the solution of EPC-K₁ with 3% H₂O₂. It is suggested that EPC-K₁ with/without 3% H₂O₂ generate the $\cdot\text{OH}$ like signals and give damage to dentin. (The present study was supported by a Grant from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote 2001-Multidisciplinary Research Projects (in 2001-2005), and The Tsuchiya Foundation.)

Free Radical Study and Structure Analyses of Carisolv™ System Using ESR and NMR. Y. TSUJIMOTO*, K. KAWAMOTO, M. KOZUKA, H. TAKEUCHI, H. GOMI, N. NISHIYAMA, K. NEMOTO, M. YAMAZAKI. (Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, JAPAN)

Carisolv™ system was developed for removal of carious dentin with chemo-mechanical method by Swedish researcher. Carisolv™ system is composed of 0.5% NaClO and three kinds of amino acid, i.e., leucine, lysine and glutamic acid. After these agents are mixed together, the mixed gel is applied to carious dentin and the softened carious dentin is able to be removed with hand instruments without using burs. The mechanism of softening the dentin is postulated that the degenerated collagen by caries is chlorinated and decomposed. But the details of the mechanism are not clarified yet. The authors performed the present study to clarify the mechanism of the action of the particular agent of Carisolv™ system from viewpoint of free radical and chemical structure.

[Materials and Methods]

Chemicals: Carisolv™ system was obtained from DENICS Co., Japan. Spin-trapping agent, 5,5, dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO), was obtained from Dojin Chemicals, Japan. Glutamic acid, leucine and lysine were obtained from Wako Pure Chemical Co., Japan.

Free radical measurement: The electron spin resonance (ESR) spectra were measured using JES FA300 (JEOL, Japan).

Measurement of ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum: NMR spectra were measured using EX 270 Spectroscopy (JEOL, Japan).

[Results and Discussion]

In the ESR study, a typical DMPO-X was detected from the reaction of 0.5% NaClO and DMPO. A slight amount of hydroxyl radical (\cdot OH) was detected from the gel of Carisolv™ system and DMPO. From the mixed gel, like amino acid radical was detected first, it changed to the \cdot OH later. The detected radical species from amino acids and NaClO reaction mixtures, the \cdot OH was detected from 0.5% glutamic acid and 0.5% NaClO reaction mixture, the \cdot OH and carbon center radical were detected from 0.5% lysine and 0.5% NaClO, and DMPO-X like signal was detected from 0.5% leucine and 0.5% NaClO, respectively.

In the NMR study, after the NaClO had interacted with the leucine in aqueous solution, the six ¹³C NMR peaks assigned to the carbons in the leucine disappeared, and the unknown three ¹³C NMR peaks were detected on the NMR spectrum. This indicated the degradation of the leucine structure completely. Also, 5 peaks of glutamic acid disappeared and the unknown 3 peaks appeared. In the case of lysine, 7 peaks disappeared and the unknown 1 peak appeared.

It is suggested that the structure of every amino acids of Carisolv™ system were changed by 0.5% NaClO and several free radicals generated.

The present study was supported partly by a Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote 2001-Multidisciplinary Research Project (in 2001~2005)

H₂O₂ に可視光照射をして発生する・OH に対する検討

○辻本恭久, 小澤俊彦*

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座, *独立行政法人放射線医学総合研究所

(緒言)・OH はメタリオンと H₂O₂ との反応 (Fenton 反応) や H₂O₂ に紫外線を照射して発生することは良く知られている。これまでに、われわれは歯科治療用可視光照射器を使用して、H₂O₂ に照射することで・OH が発生することを報告してきた。今回は、キセノンランプによる照射で発生する・OH に、・OH scavenger として知られている、ethanol, ジメチルスルフォキシド (DMSO), EPC-K₁ を作用させたところ、興味ある結果を得た。(材料と方法) 2M H₂O₂ 100 μ l, pure water (PW) 80 μ l, 89mM DMPO 20 μ l を混合し、15 秒後に光照射を行い (キセノン照射器, 波長 470nm), 60 秒後に JES FA300 (JEOL) を使用し・OH の発生量を検索した。光照射時間は 3, 6, 9 秒とした。次に 2M H₂O₂ 100 μ l, PW 30 μ l, 各種濃度の・OH scavenger 50 μ l, 89mM DMPO 20 μ l を混合し同様に・OH の発生量を検索した。また、DMPO-OH に対する影響を検討するために、2M H₂O₂ 100 μ l, PW 30 μ l, 89mM DMPO 20 μ l を混合し、15 秒後に光照射を行い、30 秒後に PW あるいは・OH scavenger 50 μ l を添加し、60 秒後に ESR 測定を行った。(結果および考察) キセノン照射器を使用して H₂O₂ に各時間光照射を行ったが、照射時間に依存して・OH の発生量が増加した。・OH scavenger の ethanol, DMSO を添加した場合、・OH の検出は減少し・C が検出された。すなわち、発生しているのは・OH であることが確認された。しかし、EPC-K₁ (最高最終濃度 25mM) を添加しても・OH は減少しなかった。すなわち、EPC-K₁ には、この系で発生する・OH 消去能がないことが示唆された。また、今回使用した、すべての・OH scavenger の DMPO-OH に対する影響はみられなかった。この研究は文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業、平成 16 年度 (株) エイオーエイ・ジャパン研究助成金によって行われた。

MTA の骨芽細胞に対する骨形成関連遺伝子発現誘導作用

○石井信之¹、浜田信城²、渡辺清子²、辻本恭久³、寺中敏夫¹、梅本俊夫²
神奈川歯科大学口腔治療学講座歯科保存学分野¹、感染制御学講座微生物学分野²
日本大学松戸歯学部歯内療法学講座³

Bone Mineralized related gene expression of osteoblast by MTA

○ TANI-ISHII Nobuyuki¹, HAMADA Nobushiro², WATANABE Kiyoko²
TSUJIMOTO Yasuhisa³, TERANAKA Toshio¹, UMEMOTO Toshio²

Department of Operative Dentistry and Endodontics¹, Microbiology², Kanagawa Dental
College, Department of Endodontics³, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

研究目的: Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は、1993 年、M Torabinejad によって歯科領域への応用を目的として開発され、2000 年 ProRoot としてアメリカで商品化された穿孔部封鎖用セメントである。成分は Portland cement (3CaO-SiO₂, BiO₃, 2Ca-SiO₂, 3CaO-Al₂O₃, 4CaO-AlO₃-Fe₂O₃, CaSO₄-2H₂O) が 75%, BiO₂ が 20%、石膏 5% で構成されている。封鎖性、操作性に優れ、組織親和性が良好で、細胞毒性および変異原性が少ないことから歯科臨床では穿孔部封鎖、逆根管充填、歯髄覆髄等に使用され、良好な臨床成績が報告されているが日本国内では認可されていない。本研究は MTA の骨芽細胞に対する石灰化促進作用を調べる目的で骨形成関連遺伝子の発現誘導作用と細胞傷害性を検討した。材料と方法: MTA、Dycal、Amalgam を直径 2mm、高さ 1mm に調製し、骨芽細胞 MC3T3-E1 に対する実験試料とした。細胞培養は、0.45 μm pore size のメンブレンフィルターを内在する 6well plate chamber 内で 10%FCS 含有 αMEM を用い 24、48、96 時間培養後、MC3T3-E1 を回収し、RNA を抽出した。骨形成関連遺伝子の発現誘導作用は、Type I collagen、Osteocalcin、Bone Sialo Protein (BSP) mRNA 発現を RT-PCR 法にて解析した。MTA、Dycal、Amalgam に対する細胞傷害性は、位相差顕微鏡による形態変化の観察と Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promaga 社)による細胞傷害性を解析した。結果および考察: MTA、Dycal、Amalgam の MC3T3-E1 に対する骨形成関連遺伝子発現誘導作用は、24 時間以内に Type I collagen、Osteocalcin、BSP mRNA が発現し、MTA は Type I collagen、Osteocalcin mRNA 発現が 96 時間培養時まで持続された。MTA の MC3T3-E1 に対する細胞傷害性を位相差顕微鏡による形態変化観察を行ったが、いずれも細胞形態に明らかな変化は認められず、96 時間培養時まで標品無添加の対照群と同様の形態を維持した。また、Proliferation Assay の結果においても MTA の細胞傷害性は認められなかった。以上の結果から、MTA は骨芽細胞に対して細胞傷害性を示さず、BSP mRNA 発現と持続的な Type I collagen、Osteocalcin mRNA 発現を誘導し石灰化促進作用を有することが示された。

本研究の一部は文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業補助金により行った。

Observation of the Surface of MTA by Root Canal Irrigants

Kawashima T¹, Kozuka M¹, Miura H¹, Kawamoto K¹, Ishizaki T²,
Tsujimoto Y¹, Yamazaki M¹

¹Nihon University school of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Japan

²Central Research Center Sangi Co. , Kasukabe, Japan

Objective: The purpose of this study is to investigate the effects of root canal irrigants on Mineral Trioxide Aggregate (MTA) which is root canal repair material using scanning electron microscope (SEM) and digital microscope (DM) .

Methods: The mixed MTA was pressed between two glass plates and made about 1mm in depth and about 10mm in diameter. These samples were immersed in 2ml of 3% H₂O₂, 5% NaClO , 15% EDTA and H₂O for the period of 1, 2 and 3 weeks. The surface changes of MTA were observed by SEM (Hitachi S-2150, Japan) and DM (Keyence VH8000, Japan).

Results: The DM examinations showed small particles changing red on the surface of samples and these tended to increase the redness by the time passing. The SEM study showed several kinds of crystal grew up by the time passing. In the H₂O₂, numerous triangular crystals were observed after 1 week and these grew up to cubical crystals. Between the crystals, small amorphous crystals were observed after 3 weeks. In the NaClO, numerous squar type crystals were observed on all samples. In the EDTA, rounded crystals were growing up by the time passing. These changes observed occurred only surface area of the samples by the view of longitudinal section.

Conclusion: MTA powder consists of fine hydrophilic particles. In the H₂O, it is considered that calcium was dissolved and formed calcium compound. In the NaClO, the crystals will be formed with silicate oxide or tricalcium. In the H₂O₂ , bismuth oxide will be changing to another compound. In EDTA, iron oxide will be changed to another compound by chelating action. Based on the results of this study, we are doing further studies on these crystals by SEM-EDS (energy dispersive X-ray microanalysis).

Mineral Trioxide Aggregate に根管洗浄液を作用させた後の表面の観察

Observation of the surface of MTA by canal irrigants

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

○川島 正、小塚 昌宏、三浦 浩、川本 幸司、辻本 恭久、山崎 宗与

○Tadashi KAWASHIMA, Masahiro KOZUKA, Hiroshi MIURA, Kohji KAWAMOTO,
Yasuhisa TSUJIMOTO, Muneyoshi YAMAZAKI

【研究目的】

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は、パーフォレーションや内部吸収の処置、逆根管充填、覆髄等に用いられ、その有効性が近年注目されている。本研究目的は、MTA に臨床で使用されている各種洗浄液を作用させた場合、表面形態にどのような変化が見られるかをデジタルマイクロスコープと走査型電子顕微鏡で観察し、検討を加えることにある。

【材料および方法】

試薬の H_2O_2 、 $NaClO$ 、EDTA は和光純薬工業より入手し調整した。MTA は DENTSPLY TULSADENTAL 社製 PRO ROOT_{TM} を用いた。MTA はメーカーの指示通り練和し、2枚のガラス練板の間に圧接し、厚さ約 1 mm に調整し試料とした。試料を 3% H_2O_2 、5% $NaClO$ 、15% EDTA の各溶液 2 ml 中に 1、2、3 週間浸漬した。試料の表面の観察はキーエンス社製デジタル HF マイクロスコープ VH-8000 と日立社製 S-2150 を用いて行った。

【結果】

〈Control 群〉結晶構造がみられない平坦な部分がみられ、他の部分は約 1 ~ 10 μm の不定形の粒子が密に充填されているのが観察された。

〈 H_2O_2 群〉1 週間後では約 2.5 μm の矢じりに似た三角形の粒子と 1 辺約 15 μm の立方体の構造物が観察された。2、3 週間後では時間経過と共に立方体がいくつも重ね合ったような構造物が増加していく傾向が観察された。

〈 $NaClO$ 群〉1 週間後では表面に一辺約 2.5 μm の立方体の構造物を多数観察された。2、3 週間後では時間経過と共に立方体が消失し、微細な顆粒状構造物が観察された。

〈EDTA 群〉1 週間後では所々に間隙を認め、針状結晶構造物が多数観察された。2、3 週間後では針状結晶構造物は消失し、微細な顆粒状構造物が観察された。

【考察】

これまでの報告から、MTA は安定した物質であると言われているが、本実験において、各種洗浄液によって MTA の表面が様々な影響を受けたことがわかった。このことは MTA が種々の無機質によって構成されており、各種洗浄液の作用でこれらの成分が溶出したためか、構造物ができたためであると考えられる。今後は各種洗浄液によって、MTA のどの成分が溶出し、またはどんな反応生成物かを観察、分析し、検討していくつもりである。

この研究の一部は、文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業および平成 14 年度日本大学松戸歯学部鈴木研究費 (02-2011) によって行われた。

0338 Histopathological Reactions of Pre-mixed Calcium Phosphate Cements for Bone Defects

A. SUGAWARA¹, K. FUJIKAWA¹, S. HIRAYAMA², Y. NAMIKI², T. IKEMI², K. KUSAMA³, S. TAKAGI⁴, and L.C. CHOW⁴, ¹ Nihon University School of Dentistry, Tokyo, Japan, ² Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan, ³ Meikai University School of Dentistry, Saitama, Japan, ⁴ American Dental Association Health Foundation, Gaithersburg, MD, USA

Previous studies showed that water-free, premixed calcium phosphate cements (CPCs) exhibited longer hardening times and lower strengths than conventional CPCs, but they were stable in the package and hardened only after being delivered to a wet environment. Premixed CPCs also showed good washout resistance and excellent biocompatibility when implanted in subcutaneous tissues in rats. **Objective:** The present study evaluated characteristics of premixed CPCs when used for repairing periodontal bone defects in dogs. **Materials:** Premixed CPC pastes were prepared by combining a CPC powder that consisted of $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ and CaHPO_4 (CPC-1) or $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and CaCO_3 (CPC-2) with a glycerol based liquid at a power-to-liquid mass ratio of 3.5 and 1.5, respectively. The glycerol liquid contained Na_2HPO_4 (30 mass %) and hydroxypropyl methylcellulose (0.55 %) to accelerate cement hardening and to improve washout resistance, respectively. **Methods:** The mandibular premolar teeth of mature beagle dogs were extracted. One month later, two-wall periodontal defects were surgically created adjacent to the teeth of the mandibular bone. The defects were filled with the CPC pastes, and the flaps were replaced in the preoperative positions. The dogs were sacrificed, and biopsies were obtained at 1, 3 and 6 months after surgery. **Results:** One month after surgery, the implanted CPC-1 paste was partially replaced by bone and was converted to bone in 6 months. The pockets filled with CPC-2 were completely covered by newly formed bone in 1 month. The CPC-2 was partially replaced by trabecular bone in 1 month and was completely replaced by bone in 6 months. Examination of 1-month and 3-month samples indicated that CPC-2 resorbed and was replaced by bone more rapidly than CPC-1. **Conclusion:** Both premixed CPC pastes were highly osteoconductive. When implanted in periodontal defects, CPC-2 was replaced by bone more rapidly than CPC-1. Supported by NIDCR grant DE11789, ADAHF, and NIST.

[Seq #49 - Implant Surfaces and Scaffolds](#)

11:00 AM-12:15 PM, Thursday, 13 March 2003 Henry B. Gonzalez Convention Center Exhibit Hall C

[Back to the Implantology Research Program](#)

[Back to the 32nd Annual Meeting and Exhibition of the AADR \(March 12-15, 2003\)](#)

[Top Level Search](#)

2068 Histopathological Reactions of Macropore Premixed Calcium Phosphates for Bone Defects

A. SUGAWARA¹, K. FUJIKAWA¹, S. HIRAYAMA², T. MORI², T. IKEMI², S. TAKAGI³, and L.C. CHOW³, ¹ Nihon University, Tokyo, Japan, ² Nihon University at Matsudo, Japan, ³ ADAF, Gaithersburg, MD, USA

Water-free, premixed calcium phosphate cements (CPCs), which are stable in the package and harden only when exposed to a wet environment, have been shown to have excellent osteoconductivity and washout resistance when implanted in bone defects in dogs. For most clinical applications, it would be desirable to have macropores built into the bone graft material to obtain a more rapid implant resorption and concomitant osteointegration.

Objective: This study was to evaluate in-vivo characteristics of macropores-containing premixed CPCs (MPCs) in a dog model. **Materials:** Three kinds of MPC powders (MPC-1: $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ and CaHPO_4 , MPC-2: $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ and CaCO_3 , MPC-3: CaHPO_4 and $\text{Ca}(\text{OH})_2$), each containing 35wt% mannitol granules (mean particle size: 100-125 μm) for forming macropores, and glycerol as the cement liquid were used to prepare the cement pastes. Additionally, Na_2HPO_4 and hydroxypropylmethylcellulose were added to accelerate cement hardening and to improve washout resistance, respectively. **Methods:** After grafting these MPCs in surgically formed defects (5 mm diameter x 4 mm depth) in dog jaws, the flaps were replaced in the preoperative position. The dogs were sacrificed, and the biopsies were obtained at 1, 3 and 6 months after surgery. **Results:** One month after surgery, all of the pockets filled with MPCs pastes were covered by newly formed bone and was partially replaced by trabecular bone. Newly formed woven bone was also observed in the central area of the pocket. Three month after surgery, the pockets were already filled with newly formed bone. Cortical bone with Haversian lamellae was formed in the outer portion of the pocket. After 6 month, all defects were completely converted to natural bone. MPC-2 showed faster bone replacement than did the other 2 MPCs. **Conclusion:** All of the MPCs showed faster bone formation compared to premixed CPCs without macropores. Supported by NIDCR grant DE11789, ADAHF, and NIST.

[Seq #221 - Cell Studies/Tissue Engineering](#)

10:15 AM-11:30 AM, Friday, 12 March 2004 Hawaii Convention Center Exhibit Hall 1-2

[Back to the Implantology Research Program](#)

[Back to the IADR/AADR/CADR 82nd General Session \(March 10-13, 2004\)](#)

[Top Level Search](#)

0851 Premixed Calcium Phosphate Cement for Alveolar Ridge Augmentation

A. SUGAWARA¹, K. FUJIKAWA¹, S. HIRAYAMA², T. IKEMI³, S. TAKAGI⁴, and L. CHOW⁴, ¹Nihon University, Tokyo, Japan, ²Nihon University, Matsudo Chiba, Japan, ³Nihon University, Chiba, Japan, ⁴American Dental Association Foundation, Gaithersburg, MD, USA

A prefabricated calcium phosphate cement (CPC) ridge augmentation block was shown in a dog model to be completely replaced by new alveolar bone within 6 months. Other studies showed that premixed CPCs, which are stable in the package and harden after being delivered to an augmentation site, exhibited good washout resistance, excellent biocompatibility and osteoconductivity. **Objective:** To evaluate the feasibility of using premixed CPC in the reconstruction of defective alveolar ridge in conjunction with tooth implant placement. **Materials:** Premixed CPC was prepared by combining CPC powder consisting of $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3\text{O}$ and CaHPO_4 with a glycerol based liquid at powder to liquid mass ratio of 4 to 1. The glycerol liquid contained Na_2HPO_4 (30 mass%) and hydroxypropyl methylcellulose (0.55 mass%) to accelerate cement hardening and improve washout resistance, respectively.

Methods: Mandibular premolar teeth of mature beagle dogs were extracted. After 2 months of healing, alveolar bone was reduced and the space created was filled with premixed CPC paste and an 8 mm long HA-coated titanium implant. The apical half of the implant was embedded into alveolar bone while the coronal half was in the premixed CPC. The dogs were sacrificed and biopsies were obtained at 1, 3, and 6 months after surgery for evaluation of the integration of premixed CPC and the implant to alveolar bone. **Results:** Histopathological data showed that premixed CPC augmentation area was gradually replaced by natural bone. Six months after surgery, the augmentation area was similar to natural bone, and the coronal half of the implant, previously surrounded by premixed CPC, was firmly fixed in new bone. These results were confirmed by fluorescent analysis. **Conclusions:** The results suggest the feasibility of performing ridge augmentation using premixed CPC and tooth implantation in a single procedure. Supported by NIDCR grant DE11789, ADAF, and NIST.

[Seq #110 - Bone Substitute Materials](#)

2:00 PM-4:00 PM, Thursday, 10 March 2005 Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

[Back to the Implantology Research Program](#)

[Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session \(March 9-12, 2005\)](#)

[Top Level Search](#)