

文部科学省

平成 13 年度私立大学学術研究高度化推進事業

学術フロンティア推進事業
研究成果中間報告会抄録集

歯科先端材料・先進技法による
口腔機能の再構築

日時：平成 16 年 2 月 28 日（土）

場所：日本大学松戸歯学部 400 教室

目 次

研究組織・発表課題	ページ	口頭発表者	ポスター発表者
1. 口腔組織再生医学研究班（座長：前田隆秀）			
1-1 口腔組織の分化・誘導に関する研究	1	安孫子宜光	
1-1-1 口腔組織の再生に関する遺伝子の探索と組織再生への応用	19	13：10～13：30	安孫子宜光
1-1-2 間葉系骨髄細胞，未分化細胞の細胞操作による組織再生	19		柴田 恭子
1-1-3 神経細胞の再生に関する分化・誘導の探索	20		下坂 典立
1-2 骨タンパク質に関する研究	2	小方 頼昌	
1-2-4 骨形成性病変における骨形成機序および骨蛋白の局在についての病理組織学的とその応用	20	13：30～13：50	岡田 裕之
1-2-5 歯周組織再生過程での骨芽細胞内転写因子の発現変化	21		佐本 博
1-2-6 歯周組織（特に骨組織）再生過程における骨シアロタンパク質発現調節機構	21		加藤 直子
1-3 歯の形態形成に関する研究	3	鈴木久仁博	
1-3-7 歯と歯周組織の形態発現に関わる制御機構	22	13：50～14：10	鈴木久仁博
1-3-8 歯の形態形成に関する幹細胞の基礎的研究	22		横田 ルミ
2. 新規代替埋入材料の開発と応用研究班（座長：安孫子宜光）			
2-1 細胞・組織応用系代替埋入材料の開発と応用研究	4	寒河江登志朗	
2-1-9 多能性幹細胞由来アパタイト産生細胞による硬組織結晶の物理化学的性質の制御	23	14：10～14：30	寒河江登志朗
2-1-10 代替材料を用いた歯牙再植の研究	23		松根 健介
2-2 機能タンパク応用系代替埋入材料の開発と応用研究	5	早川 徹	
2-2-11 歯根再建医療用人工細胞外マトリックス代替材の開発	24	14：30～14：50	安孫子宜光
2-2-12 傾斜機能生体材料の開発	24		早川 徹
2-2-13 歯周組織再生を促進する因子に関する研究	25		齊藤綾一朗
2-3 生体親和性物質応用系代替埋入材の開発と応用研究	6～7	西山 典宏	
2-3-14 組織再生効果を有する骨補填材の開発	25	14：50～15：10	西山 典宏
2-3-15 リン酸カルシウムセメントの歯科臨床応用への試み	26		平山 聡司
2-3-16 硬組織形成誘導能を有する根管封鎖材料の開発	26		辻本 恭久
2-3-17 歯牙保存に対する代替生体材料の研究	27		前田 隆秀
3. 歯科先進材料・技術の開発と応用研究班（座長：根本君也）			
3-1 歯科先端材料開発研究	8～9	會田 雅啓	
3-1-18 清掃容易な義歯床用レジンの開発	27	15：20～15：40	妻鹿 純一
3-1-19 傾斜機能を付与したハイブリッド義歯の開発	28		谷本 安浩
3-1-20 歯科用セラミック基複合材料の開発	28		谷本 安浩
3-1-21 CAD/CAMによる補綴物の臨床的評価および長期的評価	29		渡辺 官
3-1-22 セラミックラミネートの開発	29		若見 昌信
3-1-23 快削チタン材の開発	30		根本 君也
3-1-24 生体適合性に優れた新チタン合金の開発	30		中田 浩史

※ ポスター発表は、会場 400 教室前において 11：00 から 18：00 まで展示し、11:00 から 12:00 までの間に質疑応答を行います。

目次

研究組織・発表課題	ページ	口頭発表者	ポスター発表者
3-2 歯科先進技術開発と応用研究	10	池見 宅司	
3-2-25 口腔組織の炎症抑制および口腔組織再生へのレーザー応用	31	15:40~16:00	多田 充裕
3-2-26 新規小窩裂溝充填システムの開発	31		早川 徹
3-2-27 新規矯正用接着システムの開発	32		早川 徹
3-2-28 新規歯質接着システムの開発	32		西山 典宏
3-2-29 レーザーの歯科医療への応用	33		池見 宅司
3-2-30 う蝕除去と歯面清掃システムおよび審美修復	33		木村 大
3-2-31 口腔疼痛性疾患に対する直線偏光近赤外線照射の応用に関する研究	34		渋谷 鋤
4. 先進診断技術の開発と応用研究班 (座長: 笹原廣重)			
4-1 歯科疾患の遺伝子診断の開発と応用研究	11	前田 隆秀	
4-1-32 カスタムメイド DNA チップを応用した歯科診断	34	16:00~16:20	平塚 浩一
4-1-33 齲蝕感受性決定遺伝子の構造解析	35		成山明具美
4-1-34 口腔奇形・異常に関する遺伝子の特定	35		韓 娟
4-2 生体機能からみた顎口腔機能の診断と応用研究	12~13	伊藤 孝訓	
4-2-35 小児顎運動の診断技法の開発	36	16:20~16:40	三好 克実
4-2-36 生体振動を利用した顎口腔機能の診断	36		吉野 祥一
4-2-37 咀嚼と脳の認知機能の解明	37		青木伸一郎
4-2-38 上顎洞サイナスリフトの解剖学的基礎に関する研究	37		静島 昭夫
4-2-39 体幹四肢の筋力発揮時における下顎動態と咀嚼筋活動様相	38		川良美佐雄
4-2-40 歯科遠隔医療システムの開発	38		齊藤 孝親
4-3 初期う蝕検出装置による診断法の開発研究	14		小林 清吾
4-3-41 非破壊的方法による前臨床う蝕の診断法の確立	39	16:40~17:00	後藤田宏也
4-3-42 光を利用した初期う蝕診断法の開発	39		三好 克実
5. 全身機能を基盤とする口腔環境の再構築研究班 (座長: 小林清吾)			
5-1 咀嚼・嚥下・唾液腺機能回復に関する介護予防の研究	15	成田 紀之	
5-1-43 口腔内環境と嚥下性肺炎の病体変化機構の解明	40	17:00~17:20	久山 佳代
5-1-44 唾液および唾液腺機能の再構築	40		吉垣 純子
5-1-45 ヒト顎口腔機能の感覚と運動に関する中枢制御	41		成田 紀之
5-1-46 デジタル画像による口腔領域再構築の評価	41		金田 隆
5-2 遺伝子導入法による口腔機能の促進の研究	16	城座 映明	
5-2-47 グラム陽性細菌による有用物質生産系を応用した口腔機能の促進	42	17:20~17:40	城座 映明
5-2-48 口腔組織の病態解明と遺伝子導入による口腔環境の改善	42		齊藤 重野
5-3 免疫応用とフッ化物応用による宿主強化法の研究	17~18	山本 正文	
5-3-49 Bioavailability を考慮したフッ化物測定法の開発	43	17:40~18:00	小林 清吾
5-3-50 粘膜免疫を応用したう蝕と歯周病のワクチン開発	43		前場 智美
5-3-51 口腔感染症に対する安全性の高い免疫療法の開発	44		柴田 恭子

口頭発表
抄 録

1-1 口腔組織の分化・誘導に関する研究

○安孫子宜光, 柴田恭子, 渋谷 鈺

口腔組織の分化・誘導に関する機序を機能ゲノム科学的手法を応用して分子生物学的に解明することを試みる。組織再生医療を考えたとき、組織再生のプロセスにおける細胞の増殖、機能発現に関与する遺伝子の発現をモニターすることは、具体的な組織再生の手段を模索するにあたって多くの示唆を与える。本研究では、DNA chip, DNA マイクロアレイあるいは遺伝子差分化法を応用して歯周組織再生に関与する発現遺伝子を探索した。歯髄、歯根膜細胞への Emdogain 作用によって発現変化する遺伝子を同定した。歯肉組織では上皮細胞、線維芽細胞に発現している遺伝子の比較を行った。また、歯根膜組織の再生にはセメント芽細胞の細胞生物学的研究が必要であることからセメント芽細胞の硬組織形成時の発現遺伝子を遺伝子差分化法を応用して探索した。さらに、口腔組織の神経再生研究のモデルとして神経細胞様に分化するラット PC12 細胞を用いて神経突起伸長を促進する条件を探索した。

歯髄細胞に Emdogain を作用させ、3,12,24,72 時間後に mRNA を回収した。コントロール群の mRNA を逆転写酵素を用いて cDNA を合成するとともに蛍光色素 cy3 で標識し、実験群の mRNA には cy5 標識 cDNA を合成した。両者を混合して約 1100 のヒト遺伝子カスタムメイドマイクロアレイにハイブリダイズさせ、スキャナーで蛍光密度を測定した。一方、ヒト歯根膜細胞に Emdogain を作用させた実験系では 10000 遺伝子の CodeLink マイクロアレイを用いた。ヒト歯肉上皮細胞およびヒト歯肉線維芽細胞の初代培養細胞をコンフルエントまで培養し、それぞれ蛍光色素 cy3,cy5 標識 cDNA を合成し約 8000 遺伝子のマイクロアレイで発現遺伝子を解析した。各測定データは Gene Spring 遺伝子解析システムを用いて解析した。ヒトセメント質芽細胞の増殖期の mRNA と骨誘導培地で培養した硬組織形成期の mRNA を遺伝子差分化して得られた遺伝子クローンの塩基配列を解読し、DNA データベースで BLAST 検索した。PC12 細胞に NGF, NGF を作用させて神経突起量の定量を神経突起伸長測定キットを用いて行った。

Emdogain による歯髄細胞の遺伝子発現変動の解析結果から、serum inducible kinase,cyclin dependent kinase 2, IGF-1,を含む種々の遺伝子発現の上昇が認められた。これらのトランスクリプトーム情報は歯髄の再生あるいは石灰化促進に役立つと考えられる。歯根膜細胞も同様に Emdogain を作用させたマイクロアレイ解析では、thrombomodulin,VCAM1,claudin 1 などの遺伝子発現の増大が見られた。歯髄細胞、歯根膜細胞への Emdogain 作用による遺伝子発現変化の比較による組織特異性あるいは組織再生に関与する共通の必須遺伝子の同定に興味もたれる。ヒト歯肉上皮細胞およびヒト歯肉線維芽細胞の発現遺伝子の比較では、前者で keratin 5, desmocolin などが後者では vimentin と gp130 などがそれぞれ高く発現している結果が RT-PCR 法でも確認され、マイクロアレイ解析の有用性が示唆された。セメント質芽細胞が硬組織形成期に発現している遺伝子として FGF-7, fibronectin, decorin 等が同定できたことから積極的なセメント質の再生に有用な情報がえられると示唆された。NGF, bFGF は PC12 細胞の神経突起伸長に対して、それぞれ促進効果があり、また、同時に作用させることによって相加効果があることが示唆された。

1-2 骨タンパク質に関する研究

○小方頼昌，岡田裕之

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する非コラーゲン性タンパク質であり，アパタイト結晶形成能を有すること，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。我々は，エナメルマトリックスタンパク質（エムドゲイン；EMD）およびメカニカルストレス（静磁場；SMF）が BSP の転写に与える影響およびその機序に関して解析を行った。さらに，顎骨に発生するセメント質形成性病変の病理組織学的特徴および細胞増殖能に関する比較検討を行うことを目的に研究を行った。

1) ラット骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 と UMR106 細胞を用い，BSPmRNA 量の変化をノーザンブロットまたは Real-time PCR 法にて検索した。2) BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを両細胞に導入し，BSP の転写活性に対する EMD および SMF の影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。3) BSP 遺伝子の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。4) セメント質形成性病変の病理組織学的検討を行うとともに，PCNA 免疫染色および Ag-NORs 染色にて陽性細胞数および核内顆粒数を算定した。

1) EMD (50 $\mu\text{g/ml}$) は BSPmRNA 量を 12 時間後に約 2.8 倍上昇させ，SMF (800 ガウス) は 24 時間後に約 2.7 倍上昇させた。2) BSP の転写活性に対する EMD (50 $\mu\text{g/ml}$) の影響をルシフェラーゼアッセイで検索した結果，転写開始点より -424 塩基対上流まで (pLUC4; -424~+60) および -801 塩基対上流まで (pLUC5; -801~+60) を含むコンストラクトで転写活性が上昇した。一方，SMF (800 ガウス) は pLUC3 (-116~+60) およびそれよりも長いプロモーター配列を含むコンストラクトの転写活性を上昇させた。3) ゲルシフトアッセイにて，プロモーター配列と骨芽細胞様細胞核内タンパク質との結合を検索した結果，50 $\mu\text{g/ml}$ EMD 刺激により，ホメオボックス配列 (Hox; -199~-192) と TGF β 応答配列 (-499~-485) への核内タンパク質の結合が上昇した。SMF (800 ガウス) 刺激後，FGF2 応答配列 (FRE; -92~-85) への核内タンパク質の結合が上昇し，下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1; -111~-105) への結合は減少した。以上のことから，EMD および SMF による BSP の転写の調節は，単独の転写因子でなく，複数の転写因子により制御されていると考えられた。4) 良性セメント芽細胞腫のセメント芽細胞は PCNA 陽性率，平均 Ag-NORs 顆粒数ともに，高い細胞増殖能を示し，根尖性セメント質異形成症では，対照とほぼ同等の細胞増殖能を示した。セメント質肥大では細胞増殖能が低かった。

1-3 歯の形態形成に関する研究

○鈴木久仁博

歯と歯周組織の形態形成を制御する機構を明らかにするために、歯胚分化過程の各構成細胞の形態的解析および機能的解析を行ってきた。ヒトの歯の発生様式の特徴を理解するために、下等脊椎動物から哺乳類各種の歯胚を用い、形態学的ならびに免疫組織化学的な手法を用いて比較検討をおこなってきた。これらの各種動物の歯胚群の連続切片を作成し、立体復構をおこない、発生様式を三次元的に検討してきた。系統発生的な分析のために化石試料の形態学的解析をすすめ発生様式の考察をおこなってきた。本発表ではこれらの成果を紹介し、歯の発生機構とエナメル質の組織形成機構とについて検討をおこなう。

材料としては、現生種としてマウス、ラット、イヌ、スンクス、オポッサム、メガネカイマン、イグアナ、オオトカゲの歯および歯胚であり、化石種として *Desmostylus* (第三紀・哺乳類) の臼歯を用いた。これらの動物について、立体構築のためには発生の各ステージから顎を摘出し、組織形態の研究にはエナメル質のシュレーゲル条を精査し、形成機構の解明のためには発生過程にある歯胚とエナメル芽細胞の形態を観察した。これらの観察には光学顕微鏡(実体顕微鏡, 蛍光顕微鏡を含む)と電子顕微鏡(SEM, TEM)を用い、立体構築には WindowsPC とレンダリングソフト(OZ)を用いた。

エナメル質については、主にイヌの歯胚を用いた研究によって、エナメル芽細胞の集団化とその動きからシュレーゲル条形成との関連性が強く示唆され、その過程におけるエナメル芽細胞内あるいは細胞間での細胞骨格やタンパク質の動態が検索され、物質レベルでの関連性まで明らかになってきた。また、ゲッ歯類の臼歯の形態形成機構に関しては歯胚の器官培養から上皮・間葉の相互作用の実体が明らかにされつつあり、切歯の発生に関する研究からは常生歯の維持機構が解明され、幹細胞の存在とその分化機構が明らかになってきている。また、歯の発生様式の研究では立体構築像から歯胚の世代関係が明らかになり、オポッサム、スンクスの交換様式が明らかになってきており、ヒトの歯式の成立過程解明の展望が開けつつある。爬虫類の研究では哺乳類のエナメル質の基本構造であるエナメル小柱の起源が明らかにされてきた。化石試料の組織構造の検索から発生過程を推定する試みでは、これまでの歯式の変更を示唆する結果が出されてきた。

2-1 細胞・組織応用系代替埋入材料の開発と応用研究

○寒河江登志朗, 前田隆秀

石灰化能を有する細胞の活性・特性を評価するためには細胞が産生した石灰化物の詳細を解析する必要があることは明らかである。石灰化物の判定には従来 von Kossa 染色法が用いられてきたが、演者らは前回の報告会において細胞培養実験で得たノジュールの von Kossa 反応が一様ではなく強弱があることを示し、X 線回折実験(XRD)および顕微フーリエ変換赤外吸収分光法(micro-FTIR)の結果から、その原因を石灰化物の性質にあると推論した。最近 Bonewald et al.(2003)は培養細胞の石灰化物を電子顕微鏡観察(EM)ならびに FTIR で研究した結果、von Kossa 染色法のみでは石灰化の評価に誤りをきたすことがあるとし、石灰化物の判定には EM, XRD, FTIR などを併用すべきであるとした。そこで、今回彼女らの研究手法でまだ残されている XRD を主たる研究手法に用いて、前回と同様の実験をさらに詳細に解析した。一方、臨床応用として、歯牙再植の成功を決定する事項には、歯根膜の活性化、歯根の成長等が挙げられる。再植後に歯根膜の再生・活性が認められなければ、歯根が骨に置換され、いずれ再植歯牙は脱落してしまう。また、根未完成歯の再植においては、歯根が成長の方向か吸収の方向かで再植の成否が分かれると考えられる。本研究は、乳歯または永久歯の歯根膜細胞が再生し、正常にセメント質と付着し根周囲の歯槽骨との正常な関係を維持するための条件を検討すると同時に、歯根未完成歯の歯冠・歯根形態を観察し、歯根の成長様式を検討することを目的としている。

細胞培養実験は rat calvaria 由来の細胞を用い、数種の石灰化促進因子を組み合わせる石灰化物質の沈着量の変化を追及した。沈着量の変化は通法にしたがって von Kossa 反応を顕微鏡下で判定した。比較のために動物を用いた骨形成実験による石灰化物と無細胞系の実験による石灰沈着物を材料に用いた。石灰化物の有機質成分および無機質成分について、定性的ならびに定量的分析を以下の各分析法を用いて行った。X 線回折法：結晶性・結晶学的性質の解析，EDS（エネルギー分散型元素分析法）：元素組成分析，熱分析法（TG-DTA および DSC）：石灰化物の有機質量の測定，顕微フーリエ変換赤外分光分析法（Micro-FTIR）：有機質及び無機質中の分子・イオンの種類と状態。XRD 実験は特に強力ローターX線源を用いた微小部 X 線回折装置による研究を行った。一方、臨床応用にあたって歯根未完成歯の歯冠形態、歯根形態の特徴を調べるために、保護者より研究に同意を得られた唇顎口蓋裂を持つ患児における上顎の前歯部に認められた奇形歯の形態を 3DX にて検討した。

von Kossa 染色で染色態度に違いの現れたノジュールについて、micro-XRD と micro-FTIR による分析を行ったところ、von Kossa 反応による置換生成物の結晶性に明らかな違いが認められた。このことは、von Kossa 反応を起こす前の石灰化物の化学反応性に違いが存在したという証拠となる。したがって、von Kossa 染色で染色性に違いが出ていることは石灰化について間接的ではあるが石灰化物そのものの性質を反映していると考えられる。これは石灰化物質判定法として von Kossa 染色のもつ優れた面を示していると考えられる。現在、無細胞系実験および動物実験の結果と合わせて、von Kossa 染色を施さない試料について micro-XRD と micro-FTIR の結果を解析中である。

最近臨床応用されてきている 3DX にて奇形歯の歯根および歯冠形態の検討を加えたところ、歯冠部エナメル質の一部が陥入している像を認め、2 根管を有するような像が観察された。また、根管長は短く 2 度の動揺を認めた。しかしながら、根尖部付近の歯根膜腔の拡大は認められなかった。現在、根管治療を行っているが、今後、歯がどのような経過をとるかを経時的に観察する予定である。歯牙再植のもう一つの問題点である、歯根膜の再生については、介在物質および再植時における歯根に対してのエッチング効果について加えていく予定である。

2-2 機能タンパク応用系代替埋入材料の開発と応用研究

○早川 徹, 安孫子宜光, 小方頼昌

歯科用インプラントに代表される生体材料の生体適合性を向上させるために今まで様々な試みが検討されてきたが、機能タンパク質を応用した報告は数少ない。本研究グループでは、機能タンパク質を応用した新たな代替埋入材料の開発を行っている。さらに骨形成や骨再生に関与しているタンパク質の発現に対する成長因子の効果についても検討している。

チタンインプラント材に Glow Discharge 法, プラズマ重合法, トレシルクロリド法などを用いて細胞接着タンパク質を固定化させる手法について検討した。Glow Discharge 法ではチタンプレートをアルゴンガスで洗浄後, アルキルアミンガスに置換し, Glow Discharge することで NH-基をチタンプレート表面に固定した。ついで Bis suberate またはグルタルアルデヒドで NH-基固定したチタンプレートに I 型コラーゲンをクロスリンクさせた。コラーゲンコーティングの証明は, SEM-EDS 法および走査電顕で確認した。次いでヒト骨芽細胞をコラーゲンコーティングチタンプレート上で培養し, 定時的に走査電顕観察を行った。プラズマ重合法ではヘキサメチルジシロキサンをモノマーとして用い, チタン表面に約 0.2mm の有機薄膜を形成させた。トレシルクロリド法ではチタン表面の塩基性水酸基にトレシルクロリド ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$) を反応させトレシル化チタン表面を作製した。このトレシル化チタン表面にタンパク質をカップリング反応で固定化した。さらに骨芽細胞様細胞を用い, 骨形成, 骨再生に重要な役割を果たすと考えられている骨シアロタンパク質(BSP)の発現に対する効果を調べた。

Glow Discharge 法ではチタン表面に NH_2 基を導入することによってタンパク質を固定化することができた。プラズマ重合法ではチタン表面上にシロキサンの架橋ポリマー薄膜を形成することによってチタン表面を疎水性化することができ, その結果フィブロネクチンの吸着量が向上することが判明した。プラズマ重合を利用したチタン表面の改質は今までにほとんど報告がなく, 新規な表面改質法として期待ができる。また, 化学的固定化法であるトレシルクロリド法では, フィブロネクチンを効率よく簡便に固定化できることが判明した。骨シアロタンパク質はフィブロネクチンと同じ細胞接着配列およびカルシウム結合配列を有することから, BSP のインプラント表面への応用の可能性も考えられる。

2-3 生体親和性物質応用系代替埋入材の開発と応用研究

○西山典宏, 平山聡司, 前田隆秀, 松島 潔

硬組織再生には, 増殖因子と細胞支持体が重要である。本研究では, 病的に欠損した部位の組織再生特に歯槽骨や象牙質の組織再生を目的として, 細胞支持体(代替埋入材)として生体親和性が高いとされている自己硬化型リン酸カルシウムセメント(CPC), α -TCP, ハイドロキシアパタイトブロック(HA), 及び mineral trioxide aggregate (MTA) に注目し, それぞれの材料の生体親和性および効果的な再生を期待するために増殖因子や薬剤の添加による影響とその有用性やその応用の手技について検討した。

プレミックスタイプ CPC ペーストは, CPC 粉末として $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ と CaHPO_4 から成る CPC-1 と α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ と CaCO_3 から成る CPC-2 を使用した。練和液はグリセリン溶液に硬化促進剤として 30wt% Na_2HPO_4 をさらに, 抗溶出性を付与するために 0.55wt% hydroxypropyl methylcellulose を混入させたものを用いた。ペーストの粉液比は CPC-1 と CPC-2 で, それぞれ 3.5 および 1.5 とした。ビーグル成犬(♀, 1.5~2.0 歳)の下顎前臼歯を抜歯し, 1 ヶ月後に歯牙に近接する下顎骨に 2 壁性の歯槽骨欠損をカーバイドバーを用いて付与した。この欠損部位に各プレミックスタイプ CPC ペーストを充填後, 術前の位置に歯肉弁を戻して縫合した。術後 1, 3 および 6 ヶ月後に薬物屠殺して, CPC ペースト埋入部を含む周囲組織を取り出し, 10%中性ホルマリンで固定した後パラフィン埋入し切片標本を作製し, HE 染色を行い観察に供した。

Nd-YAG レーザーに二酸化チタン分散液を用いると歯質切削能力が向上することが報告されていることにより, 歯の切削において, よりエナメル質, 象牙質に対し侵襲の少ない条件を走査型電子顕微鏡(SEM)を用い検討し, さらに歯髄に対しても侵襲の少ない条件を確立する。有効な条件が確立した後, 歯髄組織表面に α -TCP および CPC を用い経時的变化を検討する。骨伝導性を有し, 蓮根状に気孔の空いたハイドロキシアパタイトブロック(HA)を用い, その気孔径が新生骨形成におよぼす影響を調べるとともに, 組織再生誘導能を有するエムドゲインゲル(EMD)を HA の気孔に保持して, EDM が新生骨形成におよぼす影響について検討するため, 高齢ウサギ(生後約 2.0 年)の大腿骨上顎に歯科用エンジンで骨欠損を作製し, 気孔径の異なる 3 種類(20, 150, 375 μm)の担体 HA(高さ 3.5mm, 直径 3mm)を骨欠損部に埋植した。また, Alg および EMD/Alg 複合体を担体 HA(高さ 1.5mm, 直径 3mm, 気孔径 375 μm)に保持して, 骨欠損部に埋植した。対照群は骨欠損だけの sham 群とした。なお, 実験動物は 1 群 5 羽とした。両実験共に埋植後, 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施して病理組織学的に観察し, HA に接触している新生骨の接触率および骨欠損部に形成されている新生骨の幅を計測した。

活性酸素の中でも最も活性の強いヒドロキシラジカルの消去剤であり, 高い抗酸化能を持つといわれている EPC-K 1 を MTA 使用時に生体で同時使用し, 炎症を抑え, より良い硬組織形成を行えるかどうかを検討するために, 1M 過酸化水素水(H_2O_2)に可視光(キセノンランプ)を種々設定時間照射し, 発生するヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)量を electron spin resonance (ESR) spin-trapping 法を用いて測定した。次に発生している $\cdot\text{OH}$ がフリーの $\cdot\text{OH}$ であるかどうかの確認をするために, $\cdot\text{OH}$ の消去剤であるジメチルスルフォキシド(DMSO)あるいはエタノール(EtOH)を最終濃度 25%添加した。同様に, キレート剤の EDTA を添加した際の $\cdot\text{OH}$ 発生の変化について検討を行い, EPC-K 1 についても検討を行った。

CPC-1 では、術後 1 ヶ月でペーストの一部が骨に置換しており、6 ヶ月では全てが骨に転化していた。一方で CPC-2 の欠損部は、1 ヶ月で完全に新生骨で覆われていた。さらに、1 ヶ月で一部分が海綿骨に置換しており、6 ヶ月では完全に骨に置換していた。1 および 3 ヶ月の試料から、CPC-2 は骨に置換する速度が CPC-1 に比較してより速いことが示唆された。したがって本実験で用いたプレミックスタイプ CPC ペーストは、高い骨伝導性を有し、歯槽骨欠損の補填材として臨床での応用が可能であることがわかった。Nd-YAG レーザーに二酸化チタン分散液濃度を変化させ、健全象牙質に対し影響が少なく感染象牙質の削除が可能な条件を検討したところ、3%チタン分散液を 300mJ で照射したとき SEM 像において歯質に侵襲が少なく歯質削除が可能であることが解った。今後、歯髄に対してよりダメージの少ない条件を検討し、歯髄組織に対して侵襲が少ない条件が確立された後、歯髄組織表面に α -TCP および CPC を用い経時的変化を検討する。HA を用いた実験において、組織学的には術後 2 週において全ての群で新生骨の形成が認められた。新生骨は未石灰化の類骨であった。新生骨は気孔径 20 μ m の細い気孔内にも形成された。術後 8 週において全ての群で新生骨は幅径の増加と石灰化の亢進が認められた。気孔径 20 μ m の細い気孔内の新生骨の石灰化は太い気孔径のものより劣る傾向が認められた。蓮根状 HA の気孔は骨保持形態として有効であった。また Alg および EM/Alg 複合体において局所と全身への為害作用は少ないことが示唆された。HA に接触している新生骨の接触率は 2 週で約 30%、8 週で約 50% であり、各群に有意差は認められなかった。術後 8 週において全ての群で新生骨の幅径の増加と石灰化の亢進が認められた。EM/Alg 群は他の群と比較して、HA 周囲に密に線維性結合組織が形成され、創傷治癒する傾向を認めた。1M H₂O₂ にキセノンランプで 3s, 6s, 9s 照射した結果、照射前では検出されなかった \cdot OH のが検出され照射時間の延長で検出量も増加した。また、時間経過で 20 分までプラトーな値を示した。この系に、 \cdot OH 消去剤の DMSO, EtOH を添加した結果、 \cdot OH 消去後に検出される \cdot C が検出された。このことで、H₂O₂ にキセノン照射をした場合、発生するのは \cdot OH であることが証明された。EDTA を添加した場合において \cdot OH の検出量は 10% ほど減少した。しかし、EPC-K1 においては \cdot OH の検出量の変化は認められなかった。次に、DMPO-OH の消去をすることで見かけ上の \cdot OH 消去能を示す危険性があることから、キセノン照射で生じた DMPO-OH に各種試薬を添加しその変化を検討した。その結果、EPC-K1, EDTA, DMSO, EtOH とも DMPO-OH の量を変化させることはなかった。すなわち、EPC-K1 は \cdot OH 発生系において直接 \cdot OH を消去する能力はなく、さらに、DMPO-OH に対しても消去能はないことがわかった。このことから、EPC-K1 は MTA と併用しても効果が期待できないことが推測された。それぞれの生体親和性物質応用系代替埋入材の臨床応用が期待される。

3-1 歯科先端材料開発研究

○會田雅啓，妻鹿純一，谷本安浩，根本君也，小林喜平

咀嚼機能や審美性の回復を目的として、従来から、全部鑄造金冠、硬質レジン前装冠、金属焼き付け陶材冠、ジャケット冠などが多用されてきた。しかし、これらの補綴物は製法が煩雑であり、技術的な差により、機能や審美性の回復に影響してしまう。また、歯科金属によるアレルギーの報告も多い。金属アレルギー患者に対する治療法の1つとして、硬質レジンやセラミックス単体による補綴処置が行われてきたが、製法が煩雑であり、単冠としての修復に留まっていることから、物理的性質の向上と簡便な製法の確立が急務である。一方、従来から使用されてきた金属にかわる材料として、チタンの研究が行われ、生体安全性が高く、組織埋入材料にも使用されるようになり、金属アレルギーに対する代替え金属としても、有効であることが明らかにされてきたが、機械的性質や鑄造性・研磨性・加工性などの難点から、CAD/CAMでの製作が行われているものの、快削性を備えたチタンの開発が望まれる。そこで、チタン合金およびメタルフリーの修復材料の開発を行うとともに、これらを用いたCAD/CAMによる製法について検討し、臨床的評価を行う。

一方、高齢者社会を迎え、要介護者の増加が予測されている。これら要介護者の口腔ケアをより容易にすることを目的として、新しい義歯床用材料の開発に着手した。

歯冠用硬質レジンにおけるフィラーの粒径が摩擦・摩耗に及ぼす影響を検討するため、UDMAとTEGDMAを60:40で混合したマトリックスレジンに、粒径が0.5, 3.3, 4.3, 7.9, 15.5 μ mのフィラーをそれぞれ70%混入した硬質レジンを試作し、それらの摩擦磨耗試験後の磨耗深さをレーザー表面形状測定顕微鏡で測定した。また、織物繊維を強化材とした繊維強化セラミックスのグリーンシートを作製し、それを積層、焼成することで、織物繊維強化セラミックスを作製した。さらにこの焼成収縮率を測定し、一方向繊維強化セラミックスおよび繊維強化されていないセラミックスの場合と比較した。チタンに関しては、現在多用されているチタンに快削性を与えるため、チタンにAgまたはアルミニウム・銅を添加し、放電プラズマ焼結を行い、それぞれ合金を作製した。これらの合金を厚さ2mm、長さ4mmに成形し、物理的・機械的性質、理論密度、摩擦磨耗、曲げ試験、硬さおよび切削性を測定した。また、組織埋入を考慮し、細胞毒性のないZr, Nb, Taをチタンに添加し、生物学的安定性・耐食性が高く、高密度、高延性のTi-15Zr-4Nb-4Ta合金を開発し、これをウサギ大腿骨に埋入し、2, 4, 8, 16, 24週後に大腿骨を摘出し、Ti-6Al-4V合金を対象として引き抜き試験および組織学的検索を行った。上記の材料をCAD/CAM GN-1によって製作するにあたり、適合性を高くするため、CAD/CAMの性能や設定条件を、18-8ステンレスで大白歯支台歯金型原型を用いて検討した。支台歯金型から通法にてCAD/CAM用石膏模型を作製し、セメントスペースを50, 70, 90 μ mとしてコーピングの設計を行った後、コンジットレジンブロックの切削加工を行い、200倍のデジタル顕微鏡にて14ヶ所の適合性を測定した。併せて、エポキシ模型の上顎中切歯に、歯冠周囲の切削料を多くしたもの、唇側面全体を平坦にしたものの2種類の異なった支台歯形成を行い、CAD/CAMによって製作したベニアと従来法によって製作したベニアを装着し、矢状断面における適合性をマイクロデジタル顕微鏡にて計測した。義歯の清掃を容易にする床用材料の開発では、Methyl methacrylateにPerfluorohexylethyl acrylateを液重量比25%添加

し、創製した球状ビーズをもとに、加熱重合にて試料を作製し、接触角、フッ素分布、ガラス転移温度、ヌープ硬さ、引っ張り強さ、*C. albicans*, *S. mutans* の付着について検討した。

硬質レジンに混入したシリカフィラーの粒径が大きくなるに従い、摩擦係数は大きくなり、摩耗深さも $0.5\mu\text{m}$ の粒径で $5.25\mu\text{m}$, $15.5\mu\text{m}$ では $34.93\mu\text{m}$ とフィラーの粒径が大きくなるとともにその値は増加した。さらに、摩擦係数と摩耗深さには高い相関性 ($r=0.97$) が認められた。また、織物および一方向繊維を用いた繊維強化セラミックスの収縮率は、強化されていない場合に比べて小さかった。これは繊維によって収縮が抑制されたためと考えられる。しかし、二次元構造である一方向繊維と比べ、三次元構造である織物繊維は、繊維/マトリックス界面の制御方法やグリーンシートの薄膜化が困難なため、更に検討が必要とされる。チタンに Ag またはアルミニウム・銅を添加した合金は直径 15mm、厚さ 4mm の円盤状で得られ、密度は 97% であった。曲げ試験の応力たわみ曲線では焼結によるたわみの低下は少なく、応力は増した。曲げ強さは Al5% 添加が最も大きく、5%Cu, 20%Ag 添加によって低下した。弾性率は純チタンが小さく、他は類似していた。硬さはチタン成形板が 450, チタン 100%Ti の SPS 焼結が 465, チタン 20%SPS 焼結で 578Hv であり、銀の添加で上昇した。摩擦摩耗はチタン成形板が 0.3 と摩耗係数が大きく、焼結チタンは 0.25 まで低下したが、銀の添加で増加した。Al, Cu の添加は銀の添加とほぼ同様であった。また 100%Ti の SPS 焼結体は成形板より切削率が良く、銀の添加でさらに向上し、20% 添加では 35% に達した。また、細胞毒性のない Zr, Nb, Ta を添加して開発したチタン Ti-15Zr-4Nb-4Ta 合金は引き抜き試験において、Ti-6Al-4V 合金よりわずかに高い値であった。組織学的検索では、Ti-15Zr-4Nb-4Ta 合金でインプラント体周囲に線維性結合組織の介在が認められず、新生骨が観察された。その結果、Ti-15Zr-4Nb-4Ta 合金は短期経過では Ti-6Al-4V 合金とほぼ同等の安全性を示す可能性が示唆された。CAD/CAM の性能や設定条件に関し、コンポジットレジンプロックの場合はセメントスペースの設定条件では、軸部での $70\mu\text{m}$ が最も良好であり、大臼歯部の設計には最も適している条件であることが判明した。また、ラミネートベニアにおける適合精度については、歯冠周囲の切削料を多くした支台歯形態では CAD/CAM で製作したベニアに比べ、従来法が良好な適合性を示したが、唇側面全体を平坦にした形態では、従来法より、適合性が良好であり、CAD/CAM でのベニアの製作には支台歯形成に影響されることがわった。Perfluorohexylethyl acrylate 添加により開発した義歯床用レジンの表面硬さおよび引っ張り強度は若干低下したが、水に対する接触角は顕著に増加した。また、*C. albicans* および *S. mutans* の試料に対する付着性はコントロールと比較して明らかに減少し、細菌付着の抑制効果を示した。

3-2 歯科先進技術開発と応用研究

○池見宅司, 安孫子宜光, 早川 徹, 根本君也, 渋谷 鉦

歯科臨床に新規な技術的変革をもたらす基礎研究と、その技術の臨床応用について研究することを目的としたグループである。今回の報告内容は 1. 口腔組織の炎症抑制および口腔組織再生へのレーザー応用, 2. 新規小窩裂溝填塞システムの開発, 3. 新規矯正用接着システムの開発, 4. 新規歯質接着システムの開発, 5. エナメル質の脱灰深さの測定法, 6. 歯の漂白に応用するためのフリーラジカルの基礎的研究, そして 7. 口腔疼痛性疾患に対する直線偏光近赤外線照射の応用に関する研究である。

1. レーザー照射によって発現が変化する遺伝子を遺伝子差分化法および cDNA マイクロアレイを応用して同定することを試みた。2. セルフエッチングプライマーを試作し、歯科用レジンとエナメル質との接着性に与える影響について検討した。3. 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した。4. NM ω A のカルボキシル基と歯質との相互作用について検討した。5. アルゴンイオンエッチングを施した SEM 写真と薄切研磨切片に染色剤を応用して光学顕微鏡で得られた脱灰エナメル質と健全エナメル質の境界を比較した。6. 3.5%過酸化水素水と市販の歯質漂白剤を応用して各種照射器による活性酸素発生量を調べた。7. SUPER LIZER HA-2200 (東京医研社製) を用いて PIRISG が自律神経におよぼす影響について、心拍数 RR 間隔周波数解析から検討した。

1. 低出力レーザー照射が種々の遺伝子発現を変動させることが明らかとなり、それらの遺伝子産物が骨芽細胞の骨形成メカニズムに関与する可能性が考えられた。2. 酸性モノマーの代わりに新規なモノマーである MTY をセルフエッチングプライマーの成分として用いたところ、4-META/MMA-TBB レジンとエナメル質との接着に有効であることが判明した。3. セルフエッチングプライマー処理した場合には、エナメル質表面が唾液で汚染されても接着強さの低下はほとんど起こらなかった。4. NM ω A は歯質へのレジンの接着強さを大きく向上させること、その効果はエナメル質より象牙質の方が高いことがわかった。5. アルゴンイオンエッチング後の SEM 写真における脱灰部と健全エナメル質の境界相当部は、光学顕微鏡写真で得られた染色試料の明るい層の下縁に存在する破線状に繋がった線と符合していた。6. 3.5% H₂O₂ に松風 Hi-Lite の粉末を混和した試料にキセノン照射した時に、 \cdot OH の発生が最も多かった。H₂O に二酸化チタンを混和した試料では、キセノン照射により \cdot OH の発生が認められた。7. PIRISG は心拍 RR 間隔周波数解析に対して影響をおよぼしていないものと思われ、非侵襲的な PIRISG は口腔顔面領域の疼痛性疾患に効果を示す可能性が考えられた。

4-1 歯科疾患の遺伝子診断の開発と応用研究

○前田隆秀, 平塚浩一

歯科疾患の主たるものは、う蝕症、歯周疾患、不正咬合である。それらすべての疾患においての感受性の違いを遺伝子で診断する方法は、未だ確立されていない。それらが確立されたならば予防方法、管理方法が個々の患者によって異なり、オーダーメイドの管理が可能となる。そこでそれらの疾患のうち、う蝕感受性と不正咬合に關与する顎骨と歯の大きさを決定する遺伝子を解明することを目標として、まずそれらの遺伝子のマッピングを行い候補遺伝子を挙げることを一つの目的とした。一方、個々の成人の歯周炎の悪性度を診断することは治療ならびに予後判定に重要である。そこで成人性歯周炎の主要病原細菌である *P. gingivalis* 病原性因子発現解析用カスタムアレイを作成し検討することをもう一つの目的とした。

う蝕感受性の異なる2系統マウスを用いて、遺伝的交配によって得られた N2 back cross mice を用い、多型を確認した Mit マーカーを用いて QTL 解析を行った。顎骨と歯の大きさの異なる A 系マウスと SM マウスから作成された SMXA 遺伝子組み換えマウスを用いて、多型を確認した遺伝子マーカーをもとに QTL 解析を行った。

Genebank および TIGR database から主な *P. gingivalis* 病原性遺伝子を選択し、DNA スポッターにてカスタムメイド *P. gingivalis* マイクロアレイを作成した。外部環境に対応する本菌体の病原性遺伝子の発現を検討するために、1) 細菌の各増殖期、2) ヘミン制限、3) 酸化ストレスの各条件下で、作成したマイクロアレイによって *P. gingivalis* 病原性遺伝子を解析した。

う蝕感受性決定遺伝子について

1. う蝕感受性を決定する遺伝子はマウス染色体 1, 2, 7, 8 に存在し、候補としては、歯の形態形成に關与する遺伝子、唾液分泌に關与する遺伝子、免疫能に關与する遺伝子が挙げられた。

顎骨、歯の大きさ決定遺伝子について

2. 上下顎骨の大きさを決定する遺伝子は、マウス染色体 2 に存在し、候補としては第一、第二鰓弓の形成に關与する遺伝子が挙げられた。
3. 上顎骨と下顎骨の大きさは相関していた。
4. 上顎の歯の大きさと下顎の歯の大きさは相関していた。
5. 顎骨の大きさと歯の大きさは相関がみられず、異なった遺伝子によって制御されていることが示唆された。

P. gingivalis 病原性遺伝子の発現

6. *P. gingivalis* は様々な環境に対応して各病原性関連遺伝子のトランスクリプト?ムレベルを機敏に調節しているものと考えられた。

4-2 生体機能からみた顎口腔機能の診断と応用研究

○伊藤孝訓, 前田隆秀, 吉野祥一, 金澤英作, 川良美佐雄, 斎藤孝親, 笹原廣重

顎・口腔系は生理的にも多機能器官であり, 消化器官, 呼吸器官, 発声器官, 感覚器官および運動器官として全身の生体機能と密接な関係を持っている。顎口腔機能は中枢を刺激してヒトの高次機能である精神的なQOLにも影響を与えている可能性が示唆されている。そこで, 咀嚼と脳の認知機能の解明として生理的変化である加齢を表す「年齢」, 認知機能を表す「ERP」, 咀嚼機能を表す指標の一つである「咬合圧」との関連を検討した。またヒトの能動的な身体運動時においても下顎の動態と顎位の維持に咀嚼筋活動が関わりその運動機能を支持している。今回はスポーツ パフォーマンス発揮時(ゴルフ)の咀嚼筋活動様相の検討を行った。近年, 顎関節症状を伴う小児期の顎機能障害の増加傾向が認められる。顎口腔機能の診断技法の開発として, 日常臨床で簡便に使用可能な6自由度顎運動計測装置を開発し, 小児の顎運動の機能的診断としてファントムならびに被験者(小児)を用いて顎運動の検討をした。また, 生体振動を利用した顎口腔機能の診断として, タッピング時の歯の接触により派生する生体振動(咬合音)の解析より, 歯周炎の臨床症状と動的咬合状態の関連より歯周組織の機能的診断を試みた。欠損補綴の領域においてもインプラントへの期待がたかまつており, そのための生体材料として安全で十分に機能するインプラントの開発と同時に, 植立される顎骨, 特に上顎洞の3次元な解剖学的形態と上顎洞サイナリフトの適応に対する検査方法の確立が求められ, そのための基礎的検討を行った。このような先進診断技術の開発にとともに, 地域医療の機能分化とEBM評価機能による病診連携支援のITネットワークの構築がもためられている。そこで, 病診連携も含め歯科遠隔診断システムの情報交換に重要な画像・文字情報の伝達の標準化についての検討を行った。

咀嚼と脳の認知機能の解明については, 被験者 31 名(23~69 歳)を対象に咬合圧をプレスケールオクルーザーにて, 事象関連電位の測定は oddball 課題に準じ 300 回呈示し, 開始期, 継続期及び刺激期に分け P300 の潜時と振幅, 反応時間(RT)を測定した。目的変数を年齢とし, 説明変数を Fz 潜時, Cz 潜時, Pz 潜時, Fz 振幅, Cz 振幅, Pz 振幅, RT, RT の SD, 咬合圧を用いて重回帰モデルを求めた。その結果, 各ステージにおいて重回帰モデルによる年齢と認知機能および咀嚼機能との関連性における決定係数(R²)は, 開始期 0.900, 継続期 0.919, 刺激期 0.381 であり, 開始期および継続期における年齢モデルに比べて刺激期では, 決定係数が低いことから異なった他の要因の関与が示唆された。

スポーツにおける咀嚼筋活動様相は, 被験者男性 8 名, 咀嚼筋筋活動測定にはマルチテレメータシステムを用い, 被験筋は両側側頭筋前腹, 咬筋浅部, および顎二腹筋前腹を選択し, 5 打の一連の動作を記録した。実験に先立ち, 随意的最大噛みしめ, 最大開口抵抗及びピーナッツ咀嚼時の筋活動量を測定した。得られたデータより実効値(RMS 値)を算出し比較対象として相対比率を求めた。その結果, 側頭筋, 咬筋筋活動量は随意的最大噛みしめに対し, 側頭筋で 24.7 %, 咬筋で 31.7 %, 顎二腹筋筋活動量は最大開口抵抗時の筋活動量に対し 101.4 %であった。ピーナッツ咀嚼時の側頭筋, 咬筋筋活動量は随意的最大噛みしめに対し側頭筋で 31.8 %, 咬筋で 23.7 %を示した。顎二腹筋筋活動量は最大開口抵抗時の筋活動量に対し 21.2 %であった。インパクト中の咀嚼筋の協調による下顎の固定に際しては, 側頭筋前腹および咬筋よりも顎二腹筋の筋活動が優勢に作用することが明らかとなり下顎の後退を示唆している。

小児の顎運動の機能的診断は, 開発したアルゴリズム(特開 2002-336282)ならびに顎運動解析装置を

使用し、計測対象としてファントムの最大開閉口運動を計測し開発したアルゴリズムの検討を行い、顎関節症状を有する被検者と顎関節症状の無い被検者の顎運動を計測した。その結果、開発したアルゴリズムの特徴である運動の中心軸を算出したところ、ファントムを用いた計測結果からは、クリック様の衝撃は最大開閉口運動の移動量からは変動は確認できなかった。しかし、中心軸から顎運動ではスムーズな開閉口運動時は安定した波形を示し、クリック様衝撃部では著明な波形の乱れとなって現れ明確にクリック様衝撃が表現できた。このことから、中心軸から顎運動より詳細な顎運動が計測できることが示唆された。また、スプリント療法などの症例で経時的に計測した被験者に関しては、顎運動の変移の変動は認められるが中心軸から顎運動を評価すると、中心軸は経時的に安定しており臨床症状に一致した。顎運動を顎の変位でなく、中心軸から顎の安定性の評価をすることが可能であった。これらの結果から開発したアルゴリズムならびに顎運動計測器の有用性が示唆された。

生体振動を利用した顎口腔機能の診断は、歯周炎と診断された患者 12 名を被検者とし、初期治療前と初期治療終了 2 週間後に歯周組織の臨床症状の評価および咬合音の測定を行った。咬合音の測定 (2Hz~20KHz) は、タッピングにより発生した咬合音を採取し、解析は LOVAS-12 を用いて咬合音の持続時間、多峰性の出現頻度、周波数帯域について解析した。その結果、歯周組織の臨床症状は初期治療後では減少を示し、PD, GI, PII では有意な改善が認め、治療前後の咬合音の持続時間は、2.40msec, 1.98msec と有意 ($P < 0.01$) に小さく、波形の多峰性の出現頻度は、治療前後の比較では有意に低い値が認められた。周波数帯域は、治療前後では 300~600Hz の有意な減少、600~900Hz 帯域と 900~1200Hz 帯域の有意な増加を認めた。このことは生体振動を利用した顎口腔機能の診断法として、歯周炎を機能的側面から評価できることが示唆された。

上顎洞サイナリフトの適応に対する検査方法の基礎的検討は、縄文時代から近代に至る古人骨の乾燥頭蓋骨を資料とし CT 撮影を行った。得られた CT 画像はパーソナルコンピュータで取り込んだのちに、上顎洞部を画像編集ソフトでトレースし、CT Rugle (Medic Engineering, Inc) で立体的に構築した後、トレース部分の体積計測を行い、併せてマルチンの計測法に従った頭蓋骨の計測を行った。その結果、縄文時代人、古墳時代人、室町時代人について頭蓋の一般計測 (頭蓋最大長、頭蓋最大幅、頬骨弓幅の三項目)、CT 撮影、上顎洞の計測を行った。野木の分類に従い、中切歯から第二大臼歯までについて、無歯顎グループ、欠損グループ、全部の歯があるものを完全グループとした。一般計測値は時代を追うごとに増加の傾向を示し、上顎洞の体積もほぼそれに準じた増加傾向を示し、上顎洞の体積と骨格の特定の部位のサイズとの対応関係が考えられる可能性が示唆された。

画像・文字情報の伝達の標準化の検討は、ネットワーク環境について ADSL を対象として回線速度など運用上の問題点と、画像等の視覚的情報を伝送とともに文字情報の添付は必須であることから、標準病名マスターのコードとして用いられている ICD/ICD-DA の分類項目名と日常臨床で頻用されている歯科臨床病名との関係について比較検討を行った。その結果、最大 8/12Mbps の下り回線速度が可能な ADSL であっても回線速度が 4Mbps を確保できない場合がみられた。このことは画像などの大容量ファイル送受信時の障害となるため、病診連携や遠隔歯科医療実施に先立ち回線速度の実測が重要と考えられた。ICD/ICD-DA では埋伏歯を embedded, impacted で分類し、歯性上顎洞炎、智歯周囲炎などは分類項目名として明記されていないなど、ICD/ICD-DA の分類項目名と日常の歯科臨床病名とはやや差異がみられた。今後は、画像伝達時の標準化として画像撮影時の色票写し込みによる補正などについて検討を加える予定である。

4-3 初期う蝕検出装置による診断法の開発研究

○小林清吾, 前田隆秀, 根本君也

幼若永久歯のう蝕予防管理において、再石灰化を期待し予防処置を継続する段階の前臨床う蝕、CO、と進行抑制のため充填処置を必要とする臨床う蝕、Cとの鑑別は重要である。今日行われているう蝕診断法は視診・触診法が主流である。しかし、触診法では、シャープな歯科用探針を用いて加圧を強く行なうと、COレベルの病変に対して歯質破壊を生じさせてしまうことが指摘されている。一方、臼歯小窩裂溝部について、視診法では臨床う蝕を見逃す例も少なくない。また、前臨床う蝕の段階ではX-ray診断でも困難である。また、視診・触診法は診査者の主観に基づく方法であるため診断の再現性が劣っている。近年開発されたレーザーう蝕診断器、DIAGNOdent（ドイツ、KAVO社製）は非破壊的診査法であり、再現性のあるデジタル情報が得られる利点が謳われている。そこで本研究において、1) 前臨床う蝕の診断にDIAGNOdentを適切に活用する条件の検索と診断精度評価を行い、また2) DIAGNOdent診断と細菌及び唾液情報によるう蝕活動性との関連性を検討することとした。

1) DIAGNOdent診断精度を検討するため、沖縄県の一地区学童、39名（男子：18名、女子：21名、9.3±1.98歳）の75歯、195小窩裂溝部位を対象として、視診・触診によるう蝕診査と、DIAGNOdentを用いた診査を行った。まず視診にてう窩の有無、色調（着色、白濁）について診査を行い、続いてシャープな歯科用探針にてスティッキー感の有無を判定し、最後に歯面の乾燥前、乾燥後、清掃・乾燥後のDIAGNOdent測定を行った。また、CO～C2程度の抜去歯牙をマイクロCT用いて観察・分析を行った。

2) DIAGNOdent診断とう蝕活動性との対応を検討するため、幼若第一大臼歯と第二大臼歯を有する37名（男子：19名、女子：18名）を対象に、視診、触診によって検討すべき条件にある37歯を選定した。その結果、健全歯と診断された幼若永久歯8歯、COと診断された17歯、Cと診断された12歯が選ばれた。これらの咬合面小窩裂溝部から採取した歯垢中の総連鎖球菌に対するmutans streptococciの割合、パラフィンワックス5分間咀嚼時の唾液量、Dentobuff Strip値、Dentocult SM値ならびにDIAGNOdent値を測定した。

1) DIAGNOdent診断精度の検討課題において、診断値の乾燥前／乾燥後において有意な差が認められた。DIAGNOdent値のcut-off point：20におけるスティッキー感の有無との対応を検討したところ、kappa値=0.49で中等度の一致率であった。陽性反応適中率(p.p.v)：60%、陰性反応適中率(n.p.v)：87%でn.p.vが高く、レーザーう蝕診断はスティッキー感の無い歯の検出に有効であることが示唆された。また、マイクロCTは歯の構造を観察する上で、歯を切片化することなく容易に非破壊的にう蝕を検知でき、有用な方法であると考えられた。現在、マイクロCTとDIAGNOdentによる診断結果を比較分析し、初期う蝕の診断の有用性を検討中である。

2) DIAGNOdent診断とう蝕活動性との対応を検討する課題において、以下の結果が得られた。(1) 幼若永久歯の咬合面小窩裂溝齲蝕部の健全歯、CO、Cの診断は、明視下での視診と小窩裂溝部の軽い擦過による触診でほぼ満足できることが明らかになった。(2) 齲蝕診断と事後措置を含めたその対応には視診・触診だけではなく光学的診断器であるDIAGNO dentTMと齲蝕活動性を評価できる細菌学的診断が有用であることがわかった。(3) 細菌学的診断には咬合面小窩裂溝部歯垢の総レンサ球菌に対するmutans streptococciの比率を測定することが適当と思われたが、簡便なDentocult SM値でも齲蝕活動性を評価できると思われた。(4) 咬合面小窩裂溝部歯垢の総レンサ球菌に対するmutans streptococciの比率とDIAGNO dent値との間には、正の相関が認められた。(5) Dentocult SM値0.1.2におけるDIAGNO dent値間には有意差が認められた。

5-1 咀嚼・嚥下・唾液腺機能回復に関する介護予防の研究

○成田紀之, 杉谷博士, 金田 隆, 山本浩嗣

全身機能を基盤とする口腔環境の再構築のために、本グループは臨床、基礎の研究者より構成される4つの研究ユニットが関連した各々のテーマで咀嚼・嚥下・唾液腺機能回復に関する基礎的及び臨床的裏付けとなる研究データを作製することを目的とした。

口腔内環境と嚥下性肺炎の病体変化機構の解明では、病理解剖症例を用い、臨床・病理組織学的及び免疫組織化学的に検索を行った。

唾液および唾液腺機能の解明では、ラット耳下腺組織から腺房細胞を単離培養し、pEGFP-C1ベクターを遺伝子導入した。ヒト口腔機能の感覚と運動に関する中枢制御の解明では、光トポグラフィーにより顎口腔運動時の脳血流計測を行い、主成分分析し、脳血流計測データからの咀嚼筋血流の分離を試みた。デジタル画像による口腔領域再構築の評価では、CT, MRI, 単純X線像写真のデジタル画像を用い、種々の顎口腔領域疾患への再構築の評価を行った。

嚥下性肺炎が口腔内常在菌による率が高く、呼吸上皮及び期間周囲の平滑筋のアポトーシスが肺炎を増長させる一因子である可能性ことを指摘した。唾液および唾液腺機能の解明に先がけ、単離腺房細胞の培養に成功し、外来遺伝子の導入に成功した。顎運動時の中枢制御には主成分分析を用い、脳血流計測データから咀嚼筋の血流を分離し、それら皮質領域野の活動性局在を推察した。

デジタル画像による口腔領域再構築の評価では、コンピュータラディオグラフのマルチ処理によるパノラマやセファログラムの評価は硬組織では高周波が優れ、軟組織では中周波が優れており、またMRIのSTIR法が炎症の波及に有効なシークエンスであるという結果を得た。

以上の研究結果は咀嚼・嚥下・唾液腺機能回復に関する介護予防に対して基礎医歯学及び臨床医歯学の有意義な成果であり、更なる研究継続とともに、臨床、基礎医歯学の有機的な統合と発展が期待される。

5-2 遺伝子導入法による口腔機能の促進の研究

○城座映明, 斉藤重野

口腔機能を正しく保つことは生活の質 (QOL) を保つ上で欠かせない要素の一つである。しかしながら、老化に伴う口腔機能の低下は避けられない。当研究ユニットでは、組み換え DNA 技術を用いてこれらの問題の解決を試みている。日常生活において口腔機能が損なわれる最大の因子は、う蝕・歯周病に代表させる口腔疾患に起因している。いずれも口腔内細菌の感染によりもたらされると考えられており、その予防法の確立が望まれている。口腔疾患においては、ワクチンなどの投与による能動免疫により微生物の感染を排除することは、予期せぬ副作用の観点から望ましいとは言いきれず、これに代わる受動免疫での予防に着目した。一方、老化に伴う口腔機能の低下は、唾液中のタンパク質をコードする遺伝子の機能劣化が主な要因であると考え、当該遺伝子の細胞内導入により対処する事とした。

受動免疫法を確立するには、標的となる病原因子の性質を明らかにする必要がある。*P. gingivalis* の歯周病への関与は、口腔内常在菌との共凝集、上皮細胞への付着などのステップで進行し、各段階に関与するタンパク質が病原因子と考えられる。*P. gingivalis* の表層タンパク質の1つである HBP35 はヘミンとの結合、および *S. gordonii* との共凝集に関与することが実験的に示されているが、その塩基配列の解析から更に多彩な機能を有することが示唆されている。ここでは、HBP35 の thioredoxin (TR) としての役割を明らかにするため、部位特異的変異により Cys から Ser へのアミノ酸置換を導入した変異 HBP35 を調製し、得られたプラスミドをタンパク質の S-S 結合能を欠損した大腸菌変異株 (*dsb*) に導入し、アルカリ性ホスファターゼ (AP) 活性、および軟寒天上での運動能 (MT) の検討を行った。

また、唾液腺での老化による発現低下する遺伝子を探索することは、遺伝子導入による機能回復に有意義であると考えられる。すでに GeneChip 解析法により老齢マウスで、発現が低下する 6,500 遺伝子を探索し、遺伝子導入に有用な標的を探索してきた。一方、UniGEM V アレイに含まれ顎下腺中で発現している 12 種類の成長因子の加齢による遺伝子発現変化では、インスリン様成長因子 1 (IGF-I) 遺伝子で約 2 倍の低下がみられた。ついで IGF の 11 関連遺伝子についてデータ解析した結果、変動しているのは IGF-I のみであった。そこで本研究では、mRNA レベルの変動を Real-time PCR 法で定量するとともに IGF-I 量を ELISA 法にて測定した。さらに GeneChip マウス 12,000 遺伝子を用いてマウス顎下腺の老化で発現変化する遺伝子をモニターした。

大腸菌 AP は分子内に S-S 結合を有するので、*dsb* 株では AP 活性は弱く、また MT も低い。本変異株に HBP35 をコードするプラスミドを導入したところ、AP 活性の回復が認められた。また、TR の活性中心に存在する Cys を Ser に変えた変異タンパク質をコードするプラスミドを導入した場合には AP 活性の回復が低下した。以上より、HBP35 は TR としての機能を有することが明らかとなり、本活性を阻害する抗体を得ることにより、歯周病に対する新たな受動免疫の経路が開かれるものと期待される。

UniGEM V アレイに含まれ、顎下腺内で遺伝子発現が確認された IGF-I に関してさらなる検証を進めたところ、Real-time PCR 法では 1 ヶ月齢に比べて IGF-I mRNA レベルは 5 ヶ月、9 ヶ月齢ではそれぞれ約 68%、45% 低下していた。また、ELISA 法にて IGF-I 活性を調べたところ、1 ヶ月齢に比べて 5 ヶ月、9 ヶ月齢ではそれぞれ約 53%、42% と低下が認められた。老化によって顎下腺の IGF-I は遺伝子発現レベルで低下し、唾液腺への遺伝子導入による生理機能の回復あるいは改善を IGF-I 遺伝子で試みることは意義あるものと考えられる。

5-3 免疫応用とフッ化物応用による宿主強化法の研究

○山本正文, 大竹繁雄, 安孫子宜光, 小林清吾

本研究グループは宿主強化を主目的として、以下3つの具体的課題に取り組んだ。1) 食品含有フッ素のうち生体吸収・代謝の主役と考えられる無機フッ化物(以下, F-)を対象に、この生体利用能 (bioavailability) を *in vivo* で評価する方法確立のため、今回は独自に開発した装置の有用性を検討することを目的とした。2) 歯周病ワクチンの開発を目的とし、今回は、注射によるワクチン投与の欠点を改善でき、さらに貼剤を用いるだけで手軽に行える経皮免疫により、抗原特異的な抗体を唾液や歯肉溝浸出液に誘導するワクチンの開発を試みた。3) 口腔内感染症に対する安全性の高い受動免疫確立のため、*Porphyromonas gingivalis* の定着に関与する遺伝子クローニングを行い、その病原因子のエピトープ部位、機能部位を特定することを目指し、またこれら病原因子活性を中和できる安全な受動免疫抗体として組換え単鎖 Fv 抗体の開発を行ってきた。今回はさらに、ヒト B 細胞を不死化できる Epstein-Barr Virus(EBV)感染法やヒト抗体遺伝子をもつトランスジェニックマウスを応用して病原因子の機能を中和できる安全な受動免疫療法用抗体として、ヒト型抗体の作成を試みた。

1) 換気式陰圧微量拡散法による自動 F-分離装置の開発し、本装置の測定精度評価を行なった。拡散液には HMDS 飽和 5.0M HClO₄ 40ml, 捕集液には 0.01M NaOH2ml を用いた。試料として 0.1ppmF-標準液, 牛乳(明治)40ml を用いた。拡散終了後, F-複合電極にて測定した。2) BALB/c マウスの背中の毛を剃りエタノールで消毒した後, *P. gingivalis* の 40-kDa 表層タンパク抗原 (40-k-OMP)を, アジュバントのコレラ毒素(CT)と共にガーゼにしみこませ, 24 時間塗布した。抗原投与は, 週 1 回, 計 3 回行った。免疫後, 40-k-OMP を経皮免疫したマウスの唾液における抗原特異的 IgG 抗体価, また, 血清における抗原特異的 IgA および IgG 抗体価を ELISA 法を用いて測定した。また, 経皮免疫したマウスの脾臓および頸部リンパ節よりリンパ球を分離し, 40-k-OMP で再刺激後, [3H]チミジンの取り込みによる細胞増殖活性を測定した。さらに, Kolenbrander, P.E. らの方法に準じて *P.gingivalis* 381 のベシクルと *S.gordonii* challish との協凝集活性試験を行った。3) 組換え 130-kDa 赤血球凝集因子を用いて血清抗体価の高いドナーからリンパ球をパンニングし, Epstein-Barr ウイルスを感染してヒト型抗体産生 B 細胞を選択した。ヒト抗体遺伝子をもつトランスジェニックマウス, Xenomouse, Transchromo-mouse, にそれぞれ 130-kDa 赤血球凝集因子, 40-kDa 外膜タンパク質遺伝子を免疫し, ハイブリドーマを作出し, 病原因子活性を阻害するヒト抗体を作成した。組換え 40-kDa 外膜タンパク質を精製し, クロスリンク剤でポリマーを作成し赤血球凝集活性を調べた。モノクローナル抗体を用いた phage display epitope mapping 法を用いてエピトープ部位を特定した。さらに合成ペプチドを化学合成し, 病原因子活性に対する影響を調べた。40-kDa 外膜タンパク質遺伝子, 200-kDa 膜関連タンパク質遺伝子の塩基配列を解読し DNA データベースを用いてホモロジー検索を行なった。さらに 200-kDa 膜関連タンパク質遺伝子のサブクローニングを行い組換えタンパク質の量産を試みた。

1) 換気式陰圧微量拡散法による自動 F-分離装置の開発し、本装置の測定精度評価を行なった。拡散液には HMDS 飽和 5.0M HClO₄ 40ml, 捕集液には 0.01M NaOH2ml を用いた。試料として 0.1ppmF-標準液, 牛乳(明治)40ml を用いた。拡散終了後, F-複合電極にて測定した。2) BALB/c マウスの背中の毛を剃りエタノールで消毒した後, *P. gingivalis* の 40-kDa 表層タンパク抗原 (40-k-OMP)を, アジュバントのコレラ毒素(CT)と共にガーゼにしみこませ, 24 時間塗布した。抗

原投与は、週1回、計3回行った。免疫後、40-k-OMP を経皮免疫したマウスの唾液における抗原特異的 IgG 抗体価、また、血清における抗原特異的 IgA および IgG 抗体価を ELISA 法を用いて測定した。また、経皮免疫したマウスの脾臓および頸部リンパ節よりリンパ球を分離し、40-k-OMP で再刺激後、[3H]チミジンの取り込みによる細胞増殖活性を測定した。さらに、Kolenbrander, P.E. らの方法に準じて *P.gingivalis* 381 のベシクルと *S.gordonii* challish との協凝集活性試験を行った。

3) 組換え 130-kDa 赤血球凝集因子を用いて血清抗体価の高いドナーからリンパ球をパンニングし、Epstein-Barr ウイルスを感染してヒト型抗体産生 B 細胞を選択した。ヒト抗体遺伝子をもつトランスジェニックマウス, Xeno mouse, Transchromo-mouse, にそれぞれ 130-kDa 赤血球凝集因子, 40-kDa 外膜タンパク質遺伝子を免疫し、ハイブリドーマを作出し、病原因子活性を阻害するヒト抗体を作成した。組換え 40-kDa 外膜タンパク質を精製し、クロスリンク剤でポリマーを作成し赤血球凝集活性を調べた。モノクローナル抗体を用いた phage display epitope mapping 法を用いてエピトープ部位を特定した。さらに合成ペプチドを化学合成し、病原因子活性に対する影響を調べた。40-kDa 外膜タンパク質遺伝子, 200-kDa 膜関連タンパク質遺伝子の塩基配列を解読し DNA データベースを用いてホモロジー検索を行なった。さらに 200-kDa 膜関連タンパク質遺伝子のサブクローニングを行い組換えタンパク質の量産を試みた。

ポスター発表
抄録

○安孫子宜光^{1,5}, 松島 潔^{2,5}, 岸川道子^{1,5}, 村上伸也³, 鷗澤一弘⁴, 丹澤秀樹⁴

日本大学松戸歯学部生化学¹, 歯内療法学², 大阪大学大学院歯学研究科口腔治療学³,
千葉大学医学部口腔外科学⁴, 口腔科学研究所⁵

【目的】 組織再生医療を考えたとき、組織再生のプロセスにおける細胞の増殖、機能発現に関与する遺伝子の発現をモニターすることは、具体的な組織再生の手段を模索するにあたって多くの示唆を与える。本研究では、DNA chip, DNA マイクロアレイを応用して歯髄歯周組織再生に関与する発現遺伝子を探索する。歯肉組織では上皮細胞と線維芽細胞が相互作用をもってホメオスタシスを維持したり、炎症、再生時にも互いに相互作用をもつと考えられている。したがって両細胞で基本的に発現している遺伝子の比較は再生医学上重要である。そこで両組織の初代培養細胞を調製し、マイクロアレイを応用して歯周組織再生に関与する発現遺伝子の探索を試みた。また、歯根膜組織の再生にはセメント芽細胞の細胞生物学的研究が必要である。本研究では、ヒトセメント質からセメント芽細胞を初代培養し、硬組織形成時の発現遺伝子を遺伝子差分化法を応用して探索した。

【方法】 歯髄細胞に Emdogain を作用させ、3,12,24,72 時間後に mRNA を回収した。コントロール群の mRNA を逆転写酵素を用いて cDNA を合成するとともに蛍光色素 cy3 で標識し、実験群の mRNA には cy5 標識 cDNA を合成した。両者を混合して約 1100 のヒト遺伝子カスタムメイドマイクロアレイにハイブリダイズさせ、スキャナーで蛍光密度を測定した。一方、ヒト歯根膜細胞に Emdogain を作用させた実験系では 10000 遺伝子の CodeLink マイクロアレイを用いた。ヒト歯肉上皮細胞およびヒト歯肉線維芽細胞の初代培養細胞をコンフルエントまで培養し、それぞれ蛍光色素 cy3, cy5 標識 cDNA を合成し約 8000 遺伝子のマイクロアレイで発現遺伝子を解析した。各測定データは Gene Spring 遺伝子解析システムを用いて解析した。ヒトセメント質芽細胞の増殖期の mRNA と骨誘導培地で培養した硬組織形成期の mRNA を遺伝子差分化して得られた遺伝子クローンの塩基配列を翻訳し、DNA データベースで BLAST 検索した。

【結果・考察】 Emdogain による歯髄細胞の遺伝子発現変動の解析結果から、serum inducible kinase, cyclin dependent kinase 2, IGF-1, を含む種々の遺伝子発現の上昇が認められた。これらのトランスクリプトーム情報は歯髄の再生あるいは石灰化促進に役立つと考えられる。歯根膜細胞も同様に Emdogain を作用させたマイクロアレイ解析では、thrombomodulin, VCAM1, claudin 1 などの遺伝子発現の増大が見られた。歯髄細胞、歯根膜細胞への Emdogain 作用による遺伝子発現変化の比較による組織特異性あるいは組織再生に関与する共通の必須遺伝子の同定に興味もたれる。ヒト歯肉上皮細胞およびヒト歯肉線維芽細胞の発現遺伝子の比較では、前者で keratin5, desmocollin が後者では vimentin と gp130 がそれぞれ高く発現している結果が RT-PCR 法でも確認され、マイクロアレイ解析の有用性が示唆された。セメント質芽細胞が硬組織形成期に発現している遺伝子として FGF-7, fibronectin, decorin 等が同定できたことから積極的なセメント質の再生に有用な情報が得られると考えられる。

1-1-2

間葉系骨髄細胞、未分化細胞の細胞操作による組織再生

○柴田恭子^{1,5}, 平塚浩一^{1,5}, 早川光央^{2,5}, 小倉直美^{3,5}, Tetsuo Nakamoto⁴, 安孫子宜光^{1,5}

日本大学松戸歯学部生化学¹, 化学², 口腔外科学³, ルイジアナ州立大学歯学部生理学⁴, 口腔科学研究所⁵

【目的】 体性幹細胞は多能性幹細胞として種々の組織細胞を誘導させることが報告され、未分化な間葉系幹細胞を患者から採取し、分化誘導因子の存在下で骨芽細胞に分化させてから骨欠損部に移植する方法が期待されている。骨組織の再生の実現には、間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させる因子の同定が不可欠である。本研究では体性多能性幹細胞として正常ヒト骨髄間葉系幹細胞を選び、細胞培養系で骨芽細胞に分化誘導させる遺伝子発現をモニターすることを試みた。

【方法】 正常ヒト骨髄間葉系幹細胞は、mesenchymal stem cell basal medium で細胞培養を行った。種々の細胞への分化が始まることを防ぐため、80% コンフルエント以上にならないように培養を行った。骨芽細胞への誘導は、 3.1×10^3 cells/cm²にて蒔き、24 時間後骨誘導培地 (osteogenesis induce medium; デキサメタゾン, アスコルビン酸, β -グリセリン酸添加) に変換し 3 週間培養した。石灰化能は Ca Assay, von Kossa, alizarin red 染色にて調べた。さらに骨芽細胞分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性を測定するとともに、BMP4, Cbfa1 遺伝子発現について検索した。

【結果・考察】 正常ヒト骨髄間葉系幹細胞を骨芽細胞誘導培地で培養すると、約 48 時間後に紡錘形から敷石状に形態変化が認められ、約 10 日間の培養で alizarin red で染色に陽性を示すようになった。また、16 日前後から von Kossa 染色陽性となった。Basal medium で培養した細胞は形態変化が認められず、alizarin red, von Kossa 染色に陰性であった。また、骨芽細胞誘導培地で培養するとアルカリホスファターゼ活性は 4 日後から上昇し、7 日目までピークを示した。Basal medium で培養した細胞はアルカリホスファターゼ活性の上昇は認められなかった。BMP4, Cbfa1 遺伝子発現は、それぞれ培養 12 日後に上昇した。次に、遺伝子組換え BMP 2,4,7 を添加して培養を行い Ca Assay を行ったところ、各 BMP 25 ng/ml 単独添加で、骨芽細胞誘導培地のみで培養した系に比べて Ca 量は軽度の上昇が認められた。BMP2, 4, 7 を添加した系では、さらに Ca 量は上昇していた。一方、デキサメタゾンを添加していない培養系では、BMP2, 4, 7 を添加しても紡錘形の細胞形態のまま、Ca の沈着は認められなかった。正常ヒト骨髄間葉系幹細胞から骨芽細胞誘導の細胞培養系が確立できた。これは GeneChip 解析等により骨芽細胞への分化に関与する遺伝子の探索に有用と考えられる。

神経細胞の再生に関与する分化・誘導の探索
 -PC12 細胞の神経突起伸長に対する NGF, bFGF の影響-

○下坂典立^{1,2}, 渋谷 敏^{1,2}

日本大学松戸歯学部麻酔学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 顎・顔面領域の神経再生学的研究を先進的にかつ総合的に推進するには、神経関連細胞の分化・増殖に関する条件、因子の同定が必要と考える。そこで、神経細胞様に分化するラット副腎褐色細胞腫細胞である PC12 細胞を用いて神経突起伸長を促進する条件を探索した。PC12 細胞は、血清存在下で培養すると増殖し、血清非存在下で Nerve Growth Factor (NGF) が存在する環境では突起を伸長して神経細胞様に分化する。また、Russell E. Rydel らの報告によると Basic Fibroblast Growth Factors (bFGF) の存在する環境においても突起を伸長するといわれている。そこで今回、NGF および bFGF を同時に作用させ、神経突起の伸長に対する影響を確認することを目的とした。

【方法】 PC12 細胞を 24 穴 の培養皿に 1×10^5 個/穴になるよう調製した。培地は RPMI1640 を用い、以下の成長因子添加群に分類し、神経突起伸長の比較をした。また、細胞の定着を促すため、培養皿へコラーゲンコートを行った。

①コントロール (血清等無添加) 群

②NGF 50ng/ml 添加群

③bFGF 5.0ng/ml 添加群

④NGF50ng/ml+bFGF 5.0ng/ml 添加群

神経突起量の定量は、ケミコン社製神経突起伸長定量化測定キットを用い神経突起溶解後、分光光度計を用いて 562nm の波長にて行った。

【結果・考察】 ②及び④群では 1 日後より神経突起伸長が認められ、④群では伸長の程度が強い傾向が認められた。神経突起量の定量では、②群では 1, 2 日後、③群では 2 日後においてコントロールと比較して有意に高い傾向が認められた。また、④群においては 1, 2 日後他群と比較して有意に高い傾向が認められ、NGF 及び bFGF の相加効果が示唆された。以上の結果より、NGF, bFGF は神経再生学上有意義な因子と考えられ、今後、ゲノムサイエンス先端技術を用いて、神経再生に関与する遺伝子の探索を行いたい。

骨形成性病変における骨形成機序および骨蛋白の局在についての病理組織学的とその応用
 -セメント質形成性病変の病理組織学的および免疫組織化学的研究-

○岡田裕之^{1,4}, 神野良一^{2,4}, 北村英二², J.E. Davies³, 山本浩嗣^{1,4}

日本大学松戸歯学部病理学¹, 口腔外科学², トロント大学歯学部³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 顎骨に発生する病変には骨やセメント質など硬組織形成を主体とするものがあり、現在までそれらに関する病理組織学的検討が報告されてきている。しかし、セメント質増生病変の細胞増殖能に関する研究報告は少なく、その詳細について不明な点が多い。本研究はセメント質形成性病変の病理組織学的特徴および細胞増殖能に関する比較検討を行い、若干の知見を得たので報告する。

【方法】 インフォームド・コンセントを行い、病理組織学的に診断された良性セメント芽細胞腫 3 例、根尖性セメント質異形成症 4 例、セメント質肥大 4 例、および対照として歯のセメント質 3 例を用いた。通法に従い 10% 中性ホルマリン液にて固定し、10% 硝酸ホルマリン液にて脱灰後パラフィン包埋切片を作製した。ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 重染色を行い病理組織学的検討を行うとともに、PCNA 免疫染色および Ag-NORs 染色にて陽性細胞数および核内顆粒数を算定し、細胞増殖能を比較検討した。

【結果・考察】 セメント芽細胞における PCNA 陽性率、平均 Ag-NORs 顆粒数ともに、良性セメント芽細胞腫 (38.6%, 1.95) は他に比べ、明らかに高い細胞増殖能を有し、根尖性セメント質異形成症 (20.2%, 1.64) は対照 (18.9%, 1.55) とほぼ同様の細胞増殖能を示した。この増殖能の差異は良性セメント芽細胞腫が腫瘍、根尖性セメント質異形成症が非腫瘍性病変との各々の疾病本態を裏付ける証左と考えられた。セメント質肥大のセメント芽細胞の PCNA 陽性率は 0% と対照よりも低値を示したが、一方平均 Ag-NORs 顆粒数は 1.58 であった。これは Ag-NORs が、PCNA の発現時期である G1 後期から S 期早期に加えて G0 期 (休止期) および G2 期 (細胞分裂準備期) に反応することによるものと推察した。この結果は、セメント質肥大が腫瘍とは異なり、ある程度の大きさまでしか増殖しない進行性病変の性格を表現しているものと考えられた。封入細胞では良性セメント芽細胞腫 (17.2%, 1.36)、根尖性セメント質異形成症 (9.3%, 1.23) のみに PCNA 陽性率、平均 Ag-NORs 顆粒数が認められ、これらの細胞に増殖能がなお残存していることが示唆された。セメント芽細胞と封入細胞の比較では、良性セメント芽細胞腫、根尖性セメント質異形成症のセメント芽細胞が封入細胞より高い細胞増殖能を示し、石灰化最前線に位置する細胞増殖活性がより高いことが明示された。

歯周組織再生過程での骨芽細胞内転写因子の発現変化
 -PGE2 による骨シアロタンパク質の転写の調節-

○佐本 博^{1,4}, 清水映美^{1,4}, 本城祐子¹, 齋藤綾一朗³, 中尾寿美^{2,2}, 山崎宗与^{3,4}, 小方頼昌^{1,4}

日本大学松戸歯学部歯周病学¹, 薬理学², 歯内療法学³, 口腔科学研究所⁴

【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、試験管内でハイドロキシアパタイト結晶の形成能を有し、骨の石灰化初期に発現が上昇するため初期の石灰化における役割が注目されている。今回我々は骨のリモデリングに密接に関与すると考えられるプロスタグランジン E2 (PGE2) による BSP の転写調節機構の検索を行った。

【方法】 ラット骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞を用いて、BSP mRNA の発現を RT-PCR 法およびリアルタイム PCR にて検索を行った。また、PGE2 刺激による BSP の転写活性に対する影響および細胞内情報伝達系をルシフェラーゼアッセイにて検索した。さらにラット BSP プロモーター中に核内タンパク質との結合が PGE2 刺激により変化する部位が存在するか否かをゲルシフトアッセイにて検索した。

【結果・考察】 RT-PCR 法およびリアルタイム PCR の結果、UMR106 細胞において 3 μM および 30 nM PGE2 により BSP mRNA の発現の上昇が刺激 12 時間後に認められた。ルシフェラーゼアッセイの結果、転写開始点より -116 塩基対上流を含む配列(pLUC3)およびそれよりも長い配列にて転写活性の上昇が認められた。pLUC3 の配列を一部変化させたプラスミドを用いて PGE2 刺激による影響を検索した結果、cAMP 応答配列 (CRE) および FGF 応答配列 (FRE) が PGE2 による BSP の遺伝子発現を調節していることが明らかとなった。ゲルシフトアッセイの結果、CRE および FRE に結合する核内タンパク質が PGE2 の作用により結合が上昇することが明らかとなった。さらに、CRE に結合する核内タンパク質は CREB 抗体を加えることにより結合が減少したことから CRE 結合蛋白質 (CREB) であることが判明した。しかし、FRE に結合する転写因子は未同定であるため今後検索を続ける必要があると考えられる。

歯周組織 (特に骨組織) 再生過程における骨シアロタンパク質発現調節機構
 -リポポリサッカライド(LPS)による骨シアロタンパク質の転写の調節-

○加藤直子¹, 中山洋平¹, 中嶋 祐¹, 清水映美^{1,2}, 小方頼昌^{1,2}

日本大学松戸歯学部歯周病学¹, 口腔科学研究所²

【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。内毒素性リポ多糖(LPS) はグラム陰性菌外膜の構成成分であり、ヒト単球において PGE2 および IL-1β 産生を誘導すること、ヒト歯肉線維芽細胞において IL-6 産生、プラスミンおよびプラスミノゲンアクチベーター活性を上昇させることから、歯槽骨の破壊に関与すると考えられる。今回我々は、LPS による BSP の転写調節機構の検索を行った。

【方法】 1) 骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞を、1 μg/ml の LPS 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。

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 ROS17/2.8 に導入し、LPS 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) LPS 刺激後の ROS17/2.8 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・考察】 ノーザンブロットの結果、ROS17/2.8 細胞において BSP mRNA の発現は、1 μg/ml の LPS で 12 時間後に抑制された。ルシフェラーゼアッセイの結果、転写開始点から -108 塩基対上流までを含むコントラストおよびそれよりも長いプロモーター配列を含むコントラストにおいて LPS により転写活性が抑制され、それよりも短いプロモーターを含むコントラスト -43BSPLUC、-60BSPLUC および -84 BSPLUC (それぞれ -43, -60, -84→+60 塩基対を含む) で転写活性に変化がなかったことから、ラット BSP プロモーターの -108 から -84 塩基対上流までの配列中に LPS に応答する塩基配列が存在すると考えられた。この配列中の転写因子結合配列としては、FGF2 応答配列 (FRE; -90 塩基対上流) が存在する。次に、オリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイを行った。逆方向の CCAAT 配列への核内タンパク質の結合は LPS 刺激後に変化しなかったが、FRE 配列への結合は、LPS 刺激後に抑制された。以上の結果より、FRE 配列への核内転写因子の結合の減少が LPS による BSP の転写の抑制に関与していると考えられた。

歯と歯周組織の形態発現に関わる制御機構
—特殊化した歯冠とその歯根の関係—*Desmostylus* の歯根について—

○鈴木久仁博^{1,2}, 横田ルミ^{1,2}

日本大学松戸歯学部第II解剖学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 歯冠と歯根の関係は歯の形態形成機構の上でも重要な問題である。この問題を解明するために化石試料を用いて、咬頭と歯根の対応関係を明らかにした。*Desmostylus* (デスモステルス) は、第三紀中新世の日本列島やアメリカ西海岸に生息した化石哺乳類であり、特徴的な円柱状の多咬頭大型臼歯をもつ。

大臼歯は咬頭の形が明瞭な点で、歯根との位置関係の観察に適している。大臼歯の交換、萌出が水平方向に傾くため、歯根形成時における環境からの影響を観察し、ヒトの歯冠・歯根の相互関係を理解する上で重要な試料である。

【方法】 歯根の保存された *Desmostylus* 標本

1. アメリカ・カリフォルニア州の第三紀層から産出した臼歯標本: 上下顎臼歯- 4標本

2. 日本・福島県いわき市の第三紀層から産出した下顎標本- 1標本

の咬合面の咬耗の状態と歯根の形成部位を観察する。

【結果・考察】 *Desmostylus* は基本的に上顎の臼歯に3本、下顎に2本の歯根を持つ。上顎臼歯には8~9個の咬頭があり、歯根は近心頬側咬頭(2咬頭)に対応する部位と近心舌側(2咬頭)、遠心頬側(3咬頭)の各咬頭に対応する部位に存在していた。近心頬側の歯根は独立した太い茎状であり、他の2根は根尖近くまで癒合していた。下顎臼歯は6~7咬頭であり、歯根は近心2咬頭のほぼ中央にある近心根と、遠心部の頬側から舌側にかけて板状となった遠心根が認められる。遠心根の位置は近心から第2列目の咬頭にあるものと第3列目の咬頭にあるものがあつた。

咬合面の形状は基本的には上顎では近心舌側から遠心頬側にかけて蛇行する帯状の咬耗があり、下顎ではほぼ中央を近遠心方向に走る帯状の咬耗があつた。個々の臼歯における歯根の部位の変異は、それぞれの咬耗状態と関連していると考えられる。すなわち、歯根形態の形成は、まず咬頭との対応関係で基本的な部位が決まり、顎骨の発生と咬合圧による微小環境によって決まるものと推定される。歯根の位置をみると、歯根の形成が遺伝的に決定される場合にもかなりの変異を含むものと考えられる。また、歯根形成の出発点が未萌出の時期に決定されるとすると、咬合圧との関係が成立する時期が問題となり、今後の課題としたい。

歯の形態形成に関する幹細胞の基礎的研究
—イヌのエナメル芽細胞の免疫組織学的研究—

○横田ルミ^{1,3}, 三島弘幸², 鈴木久仁博^{1,3}

日本大学松戸歯学部第II解剖学¹, 高知学園短期大学保健科², 口腔科学研究所³

【目的】 ハンター・シュレーゲルの条紋を形成するエナメル芽細胞の動き—Grouping と Dancing—の組織細胞学的背景を解明するために、イヌの歯胚を用いて、基質形成期のエナメル器に細胞の集団化に関与する細胞接着、細胞の動き、分泌、形態維持の因子として知られる抗体にて免疫組織化学的に検索し、エナメル質構造の形成を推定した。

【方法】 基質形成期のイヌ臼歯歯胚を4%Paraformaldehyde固定し、凍結切片を作製して、Actin, Keratin 14, Tubulin, Desmoplakin, Tropomyosinの免疫反応を観察した。

【結果・考察】 Actinの反応は、外エナメル上皮からエナメル芽細胞まで局在が認められたが、矢状断面では、一定の間隔のエナメル芽細胞で反応が弱いか、またはほとんど認められないものがあつた。その間のエナメル芽細胞群は中間層から外エナメル上皮まで強く反応が認められた。エナメル芽細胞層の横断では、シュレーゲル条の帯と類似したActinの局在による細胞集団の配列が観察された。トームスの突起はTWと細胞膜に強く反応するが、反応が現れない集団が島状に認められた。

Keratin 14の分布は、エナメル器全体に反応が認められたが、外エナメル上皮の局在がActinと異なっていた。トームスの突起は細胞質全体に反応し、Actinの局在とは異なっていた。

TubulinはTWとトームスの突起の滑走面を除くエナメル芽細胞のほぼ全体に局在していた。

Desmoplakinは中間層とエナメル芽細胞のデスモゾームに関連して局在が認められた。

これらの細胞内のタンパクの局在はエナメル芽細胞が周期的に変化し、エナメル芽細胞の集団的動き、および個々の細胞独自の動きを示しており、それがエナメル質の構造を形成すると推定される。

多能性幹細胞由来アパタイト産生細胞による硬組織結晶の物理化学的性質の制御
 –Micro-XRDF と Micro-FTIR による石灰化物の評価–

○寒河江登志朗^{1,3}, 早川 徹^{2,3}

日本大学松戸歯学部第II解剖学¹, 歯科理工学², 口腔科学研究所³

【目的】 石灰化能を有する細胞の活性・特性を評価するためには細胞が産生した石灰化物の詳細を解析する必要があることは明らかである。石灰化物の判定には従来 von Kossa 染色法が用いられてきたが、演者らは前回の報告会で細胞培養実験で得たノジュールの von Kossa 反応が一樣ではなく強弱があることを示し、X 線回折実験(XRD)および顕微フーリエ変換赤外吸収分光法(micro-FTIR)の結果から、その原因を石灰化物の性質にあると推論した。最近 Bonewald et al.(2003)は培養細胞の石灰化物を電子顕微鏡観察(EM)ならびに FTIR で研究した結果、von Kossa 染色法のみでは石灰化の評価に誤りをきたすことがあるとし、石灰化物の判定には EM, XRD, FTIRなどを併用すべきであるとした。そこで、今回彼女らの研究手法でまだ残されている XRD を主たる研究手法に用いて、前回と同様の実験をさらに詳細に解析した。

【方法】 細胞培養実験は rat calvaria 由来の細胞を用い、数種の石灰化促進因子を組み合わせる石灰化物質の沈着量の変化を追及した。沈着量の変化は通法にしたがって von Kossa 反応を顕微鏡下で判定した。比較のために動物を用いた骨形成実験による石灰化物と無細胞系の実験による石灰沈着物を材料に用いた。石灰化物の有機質成分および無機質成分について、定性的ならびに定量的分析を以下の各分析法を用いて行った。X 線回折法：結晶性・結晶学的性質の解析、EDS (エネルギー分散型元素分析法)：元素組成分析、熱分析法 (TG-DTA および DSC)：石灰化物の有機質量の測定、顕微フーリエ変換赤外分光分析法 (Micro-FTIR)：有機質及び無機質中の分子・イオンの種類と状態。XRD 実験は特に強力ローターX 線源を用いた微小部 X 線回折装置による研究を行った。

【結果・考察】 von Kossa 染色で染色態度に違いの現れたノジュールについて、micro-XRD と micro-FTIR による分析を行ったところ、von Kossa 反応による置換生成物の結晶性に明らかな違いが認められた。このことは、von Kossa 反応を起こす前の石灰化物の化学反応性に違いが存在したという証拠となる。したがって、von Kossa 染色で染色性に違いが出ていることは石灰化について間接的ではあるが石灰化物そのものの性質を反映していると考えられる。これは石灰化物質判定法として von Kossa 染色のもつ優れた面を示していると考えられる。

現在、無細胞系実験および動物実験の結果と合わせて、von Kossa 染色を施さない試料について micro-XRD と micro-FTIR の結果を解析中である。

代替材料を用いた歯牙再植の研究

○松根健介^{1,2}, 鈴木康弘^{1,2}, 前田隆秀^{1,2}

日本大学松戸歯学部小児歯科学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 歯牙再植の成功を決定する事項には、歯根膜の活性化、歯根の成長等が挙げられる。再植後に歯根膜の再生・活性が認められなければ、歯根が骨に置換され、いずれは再植歯牙は脱落してしまう。また、根未完成歯の再植においては、歯根が成長の方向か吸収の方向かで再植の成否が分かると考えられる。本研究は、乳歯または永久歯の歯根膜細胞が再生し、正常にセメント質と付着し根周囲の歯槽骨との正常な関係を維持するための条件を検討すると同時に、歯根未完成歯の歯冠・歯根形態を観察し、歯根の成長様式を検討することを目的としている。

【方法】 歯根未完成歯の歯冠形態、歯根形態の特徴を調べるために、保護者より研究に同意を得られた唇顎口蓋裂を持つ患児における上顎の前歯部に認められた奇形歯の形態を 3DX にて検討した。

【結果・考察】 最近臨床応用されてきている 3DX にて奇形歯の歯根および歯冠形態の検討を加えたところ、歯冠部エナメル質の一部が陥入している像を認め、2 根管を有するような像が観察された。また、根管長は短く 2 度の動揺を認めた。しかしながら、根尖部付近の歯根膜腔の拡大は認められなかった。現在、根管治療を行っているが、今後、歯がどのような経過をとるかを経時的に観察する予定である。歯牙再植のもう一つの問題点である、歯根膜の再生については、介在物質および再植時における歯根に対してのエッチング効果について加えていく予定である。

歯根再建医療用人工細胞外マトリックス代替材の開発

○安孫子宜光^{1,4}, 平塚浩一^{1,4}, 小倉直美^{2,4}, 張 維仁^{1,3}, 李 勝揚³日本大学松戸歯学部生化学^{1,3}, 口腔外科学^{2,3}, 台北医学大学口腔医学院³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 歯根再建医療については、人工代替材の顎骨への埋入後の代替材の顎骨への初期固定期間の治癒成績が予後に大きく影響する。骨内インプラント埋入後の骨の修復過程において積極的に骨形成促進処置を行い、骨内インプラントの初期固定期間を短縮させ、いかに周囲組織細胞を短時間に定着させられるかが重要である。本研究では、いかに早期に骨形成能を有する骨芽細胞の未分化細胞を代替埋入材料、すなわちインプラント体に定着させる人工細胞外マトリックス付加代替材の開発を目的とした。一般に血球系細胞を除く細胞の多くは、細胞マトリックスに接着、定着し、自ら細胞マトリックスを合成分泌して始めて、特有の細胞機能を発揮する。そこで骨髄間葉系幹細胞(human mesenchymal stem cell)の定着に有用な細胞マトリックス成分として骨芽細胞の機能誘導に有用なフィブロネクチンに注目して正常ヒト骨髄間葉系幹細胞をフィブロネクチン コーティングした培養プレートに対する初期付着能を調べた。また、コラーゲンも骨芽細胞の定着、機能発現を促進する重要な細胞マトリックス成分であることから、チタンプレートに Glow Discharge 法でコラーゲンをコーティングし、骨芽細胞の付着、細胞マトリックス成分の合成への影響について調べた。

【方法】 正常ヒト骨髄間葉系幹細胞をフィブロネクチンまたはアルブミンをコーティングした培養プレート上で培養し、定時的に定着細胞数を測定した。チタンプレートをアルゴンバガスで洗浄後、アルキルアミンガスに置換し、Glow Discharge することで NH-基をチタンプレート表面に固定した。ついで Bis suberate またはグルタルアルデヒドでコラーゲンを NH-基固定したチタンプレートに I 型コラーゲンをクロスリンクさせた。コラーゲン コーティングの証明は、Scanning electron microscopy-energy dispersive spectroscopy(SEM-EDS) 法および走査電顕で確認した。また、ヒト骨芽細胞株 MG63 をコラーゲン コーティング チタンプレート上で培養し、定時的に走査電顕観察を行った。

【結果・考察】 ヒト骨髄間葉系幹細胞の定着実験では、血清存在下で、フィブロネクチンは有意に細胞定着を促進しないが、血清無添加の条件下ではコントロール群のアルブミンコーティング群に比べて短時間で、有意の細胞定着を促進した。これらの結果から、フィブロネクチンは、ヒト骨髄間葉系幹細胞の定着にも有用な人工細胞外マトリックス成分になることが示唆された。一方、コラーゲン コーティング チタンプレート実験では、SEM-EDS 分析によって、チタンプレート上に C, S, O, N 元素の確認ができた。走査電顕観察でもコラーゲンと思われる付着物が観察された。コラーゲンコーティングしていないコントロール チタンプレート上には、いっさいこれらの現象は認められなかった。また、MG63 細胞の定着実験では、培養 4 時間後の観察で、グルタルアルデヒド クロスリンク チタンプレートでは、すでに MG63 細胞は定着し、細胞周辺には自ら合成、分泌したと思われるコラーゲン線維が観察された。

Bis suberate クロスリンク チタンプレートでは、コラーゲン線維は明確でなく、不定形の細胞外マトリックス様物質が細胞表層を覆っているように見えた。これらの結果から、Glow Discharge 法による、I 型コラーゲン、フィブロネクチン クロスリンク チタンプレート は、骨内インプラント埋入後の骨芽細胞の定着を促進し、積極的に骨形成促進が期待できると考えられる。

2-2-12

傾斜機能生体材料の開発

○早川 徹^{1,4}, 安孫子宜光^{2,4}, 會田雅啓^{3,4}, 根本君也^{1,4}日本大学松戸歯学部歯科理工学¹, 生化学², 第II補綴学³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 現在、チタンまたはチタン合金は歯科用インプラント材料として多用されているが、骨形成速度や骨との固着力に未だに問題を有している。チタンインプラントの生体適合性を向上させる新たな方法として、細胞接着タンパク質をチタンに固定化させる手法に着目した。固定化方法について種々検討した結果、トレシルクロリド ($\text{CF}_3\text{CH}_2\text{SO}_2\text{Cl}$) で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フィブロネクチンが簡単に固定化できる事を見出した。本研究では、トレシルクロリドにより処理された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子マイクロバランス(Quartz crystal microbalance-dissipation, QCM-D) 法を用いて解析を行った。

【方法】 QCM-D 法では水晶発振子(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。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 5 MHz AT カット水晶を使用した。チタンセンサーにトレシ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。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、トレシ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・考察】 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。トレシルクロリド処理した場合、無処理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。Sauerbrey の公式を用いてフィブロネクチンの吸着量を計算すると、トレシル化処理チタンで約 1000ng/cm², トレシル化処理を施さないチタンでは約 700ng/cm²と、トレシル化処理によってフィブロネクチンの吸着量が有意に向上することが判明した。また、フィロネクチンはチタン表面の水酸基と強固なイオン結合を形成して吸着していることも分かった。以上の結果からタンパク質固定に関するチタン表面のトレシル化クロリド処理の有効性が確認された。

歯周組織再生を促進する因子に関する研究
 ー副甲状腺ホルモンによる骨シアロタンパク質の転写の調節ー

○齋藤綾一朗¹, 清水映美^{2,3}, 山崎宗与^{1,3}, 小方頼昌^{2,3}

日本大学松戸歯学部歯内療法学¹, 歯周病学², 口腔科学研究所³

【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こと、乳癌、肺癌、前立腺癌等の癌病巣でその発現が認められることから、石灰化および癌の骨転移との関係が注目されている非コラーゲン性タンパク質である。今回我々は、骨代謝に重要なホルモンである副甲状腺ホルモン (PTH) による BSP の転写調節機構の検索を行った。

【方法】 1) 骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞を 10 nM の PTH (human 1-34 PTH) 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プロット法により解析した。2) ラット BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを UMR106 細胞に導入し、PTH 刺激による 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) PTH 刺激後の UMR106 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状態をゲルシフトアッセイにて検索した。

【結果・考察】 1) PTH (10 nM) 刺激により BSP mRNA 量はコントロールに比べ 3 時間後に減少し、6 時間後から再び増加した。2) ルシフェラーゼアッセイの結果、転写開始点より -116 塩基対上流までのプロモーター配列およびそれよりも長い配列を含むコンストラクトで PTH 刺激後に転写活性の上昇が認められた。3) ハービマイシン A (チロシンキナーゼ阻害剤) および H89 (A キナーゼ阻害剤) により、PTH 刺激による転写活性の上昇が抑制された。4) 転写開始点より -116 塩基対上流までのプロモーター配列を一部変化させたプラスミドを用いて PTH の効果を検索した結果、下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1) が PTH の作用に関与すると考えられた。5) Pit-1 配列に結合する核内タンパク質が、PTH 刺激によりどのように変化するかは現在検索中である。

組織再生効果を有する骨補填材の開発

○西山典宏^{1,7}, 木場秀夫^{2,7}, 久保山 昇^{3,7}, 早川光央^{4,7}, 石崎 勉⁵, 安孫子宜光^{6,7}, 根本君也^{1,7}

日本大学松戸歯学部歯科理工学¹, 病理学², 薬理学³, 化学⁴, サンギ中央研究所⁵, 生化学⁶, 口腔科学研究所⁷

【目的】 硬組織再生には、増殖因子と細胞支持体が重要である。これまで、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考案され、骨形成能が検討されている。本報告では、骨伝導性を有し、蓮根状に気孔の空いたハイドロキシアパタイトブロック (HA) を用い、その気孔径が新生骨形成におよぼす影響を調べるとともに、組織再生誘導能を有するエムドゲインゲル (EMD) を HA の気孔に保持して、EMD が新生骨形成におよぼす影響について検討した。

【方法】 高齢ウサギ (生後約 2.0 年) の大腿骨上顆に歯科用エンジンで骨欠損を形成し、実験①では気孔径の異なる 3 種類 (20, 150, 375 μm) の担体 HA (直径 3mm, 長さ 3.5mm) を骨欠損部に埋植した。実験②では Alg および EMD/Alg 複合体を担体 HA (直径 3mm, 長さ 1.5mm, 気孔径 375 μm) に保持して、骨欠損部に埋植した。対照群は骨欠損だけの sham 群とした。なお、実験動物は 1 群 5 羽とした。実験①, 実験②ともに埋植後、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施して病理組織学的に観察し、HA 周囲に接触している新生骨の接触率および骨梁の幅を計測した。

【結果・考察】 実験①: 各群の体重に差は認められなかった。組織学的には埋植後 2 週において全ての群で新生骨の形成が認められた。新生骨は未石灰化の類骨であった。新生骨は気孔径 20 μm の細い気孔内にも形成された。埋植後 8 週において全ての群で新生骨は幅径の増加と石灰化の亢進が認められた。気孔径 20 μm の細い気孔内の新生骨の石灰化は太い気孔径のものより劣る傾向が認められた。蓮根状 HA の気孔は骨保持形態として有効であった。実験②: 各群の体重に差は認められなかった。Alg および EMD/Alg 複合体の局所と全身への為害作用は少ないことが示唆された。HA に接触している新生骨の接触率は 2 週で約 30%, 8 週で約 50% であり、各群に有意差は認められなかった。埋植後 8 週において全ての群で新生骨の幅径の増加と石灰化の亢進が認められた。EMD/Alg 複合体群は他の群と比較して、HA 周囲に密に線維性の結合組織が形成され、創傷治癒する傾向を認めた。

リン酸カルシウムセメントの歯科臨床応用への試み
 —歯槽骨欠損に対するプレミックスタイプリン酸カルシウムセメントの病理組織学的検討—

○平山聡司^{1,4}, 菅原明喜², 藤川謙次¹, 並木泰次¹, 高木章三³, Laurence C. Chow³, 池見宅司^{1,4}

日本大学松戸歯学部保存修復学¹, 歯科理工学², American Dental Association Foundation, Paffenbarger Research Center³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ と CaHPO_4 から成る自己硬化型リン酸カルシウムセメント (CPC) は、極めて良好な生体親和性を有し、最終生成物としてアパタイト様なリン酸カルシウムを形成することから、骨欠損の修復補填材として有用である事が報告されている。さらに近年、高木らにより CPC 粉末に練和液としてグリセリンとリン酸を用いたプレミックスタイプの CPC ペーストが開発された。このプレミックスタイプ CPC ペーストは、従来の CPC と比較して硬化時間が長く、機械的強さが劣る反面、良好な操作性や賦形性を有することに加えて、抗溶出性を持ち、水を含む環境下において硬化し始めるなど、従来の CPC には無い多くの特性を有している。そこで本研究は、イヌの下顎歯槽骨欠損をプレミックスタイプ CPC ペーストで補填した場合の病理組織学的特性について検討を行った。

【方法】 プレミックスタイプ CPC ペーストは、CPC 粉末として $\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$ と CaHPO_4 から成る CPC-1 と $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ と CaCO_3 から成る CPC-2 を使用した。練和液はグリセリン溶液に硬化促進剤として 30wt% Na_2HPO_4 をさらに、抗溶出性を付与するために 0.55wt% hydroxypropyl methylcellulose を混入させたものを用いた。ペーストの粉液比は CPC-1 と CPC-2 で、それぞれ 3.5 および 1.5 とした。ビーグル成犬 (♀, 1.5~2.0 歳) の下顎前臼歯を抜歯し、1ヶ月後に歯牙に近接する下顎骨に2壁性の歯槽骨欠損をカーバイドバーを用いて付与した。この欠損部位に各プレミックスタイプ CPC ペーストを充填後、術前の位置に歯肉弁を戻して縫合した。術後1, 3および6ヶ月後に薬物屠殺して、CPC ペースト埋入部を含む周囲組織を取り出し、10%中性ホルマリンで固定した後パラフィン埋入し切片標本を作製し、HE染色を行い観察に供した。

【結果・考察】 CPC-1 では、術後1ヶ月でペーストの一部が骨に置換しており、6ヶ月では全てが骨に転化していた。一方で CPC-2 の欠損部は、1ヶ月で完全に新生骨で覆われていた。さらに、1ヶ月で一部分が海綿骨に置換しており、6ヶ月では完全に骨に置換していた。1および3ヶ月の試料から、CPC-2 は骨に置換する速度が CPC-1 に比較してより速いことが示唆された。したがって本実験で用いたプレミックスタイプ CPC ペーストは、高い骨伝導性を有し、歯槽骨欠損の補填材として臨床での応用が可能であることがわかった。

硬組織形成誘導能を有する根管封鎖材料の開発
 —ヒドロキシラジカル消去剤の EPC-K 1 の検証—

○辻本恭久^{1,2}, 小塚昌宏^{1,2}, 三浦 浩^{1,2}, 川島 正^{1,2}, 松島 潔^{1,2}, 山崎宗与^{1,2}

日本大学松戸歯学部歯内療法学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 硬組織形成能を有する根管封鎖材料の開発を目的に mineral trioxide aggregate (MTA) を使用した研究を進めているが、生体において炎症を回避し、治癒促進を行うためには、生体で発生する活性酸素の発生を抑制したり、消去することが有効である。本実験では、活性酸素の中でも最も活性の強いヒドロキシラジカルの消去剤であり、高い抗酸化能を持つといわれている、vitamin C と vitamin E をリン酸ジエステル結合させることによって水溶性薬剤として開発された EPC-K 1 を MTA 使用時に生体で同時使用し、炎症を抑え、より良い硬組織形成を行えるかどうかを検討するために、EPC-K 1 のヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)消去能の検証を行った。

【方法】 1M 過酸化水素水(H_2O_2)に可視光(キセノンランプ)を種々設定時間を照射し、発生するヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)量を electron spin resonance (ESR) spin-trapping 法を用いて測定した。次に発生している $\cdot\text{OH}$ がフリーの $\cdot\text{OH}$ であるかどうかの確認をするために、 $\cdot\text{OH}$ の消去剤であるジメチルスルフォキシド(DMSO)あるいはエタノール (EtOH)を最終濃度 25%添加した。同様に、キレート剤の EDTA を添加した際の $\cdot\text{OH}$ 発生の変化について検討を行い、EPC-K 1 についても検討を行った。

【結果・考察】 1M H_2O_2 にキセノンランプで 3s, 6s, 9s 照射した結果、照射前では検出されなかった $\cdot\text{OH}$ のが検出され照射時間の延長で検出量も増加した。また、時間経過で 20 分までプラトーな値を示した。この系に、 $\cdot\text{OH}$ 消去剤の DMSO, EtOH を添加した結果、 $\cdot\text{OH}$ 消去後に検出される $\cdot\text{C}$ が検出された。このことで、 H_2O_2 にキセノン照射をした場合、発生するのは $\cdot\text{OH}$ であることが証明された。EDTA を添加した場合において $\cdot\text{OH}$ の検出量は 10%ほど減少した。しかし、EPC-K1 においては $\cdot\text{OH}$ の検出量の変化は認められなかった。次に、DMPO-OH の消去をすることで見かけ上の $\cdot\text{OH}$ 消去能を示す危険性があることから、キセノン照射で生じた DMPO-OH に各種試薬を添加しその変化を検討した。その結果、EPC-K1, EDTA, DMSO, EtOH とも DMPO-OH の量を変化させることはなかった。すなわち、EPC-K1 は $\cdot\text{OH}$ 発生系において直接 $\cdot\text{OH}$ を消去する能力はなく、さらに、DMPO-OH に対しても消去能はないことがわかった。このことから、EPC-K1 は MTA と併用しても効果が期待できないことが推測された。

歯牙保存に対する代替生体材料の研究

○前田隆秀^{1,5}, 松根健介^{1,5}, 石崎 勉³, 明石俊和⁴, 鶴町 保⁴, 根本君也^{2,5}日本大学松戸歯学部小児歯科学¹, 歯科理工学², サンギ中央研究所³, 日本大学歯学部⁴, 口腔科学研究所⁵

【目的】 本研究の目的は、 α -TCP および CPC (Calcium phosphate cement) を直接覆髄および生活歯髄切断、未完成永久歯のアペキソゲネーシス、アペキシフィケーションへ応用する時に、レーザーを用いることによる歯髄組織の変化を調べその有用性を検討することである。

【方法】 Nd-YAG レーザーに二酸化チタン分散液を用いると歯質切削能力が向上することが報告されていることにより、歯の切削において、よりエナメル質、象牙質に対し侵襲の少ない条件を走査型電子顕微鏡 (SEM) を用い検討し、さらに歯髄に対しても侵襲の少ない条件を確立する。有効な条件が確立した後、歯髄組織表面に α -TCP および CPC を用い経時的変化を検討する。

【結果・考察】 Nd-YAG レーザーに二酸化チタン分散液濃度を変化させ、健全象牙質に対し影響が少なく感染象牙質の削除が可能な条件を検討したところ、3%チタン分散液を 300mJ で照射したとき SEM 像において歯質に侵襲が少なく歯質削除が可能であることが解った。今後、歯髄に対してよりダメージの少ない条件を検討し、歯髄組織に対して侵襲が少ない条件が確立された後、歯髄組織表面に α -TCP および CPC を用い経時的変化を検討する。

清掃容易な義歯床用レジンの開発
—Perfluorohexylethyl acrylate を用いた試作レジン—

○妻鹿純一^{1,3}, 小林雅人¹, 久保田俊夫²日本大学松戸歯学部障害者歯科学¹, 茨城大学工学部物質工学科², 口腔科学研究所³

【目的】 有床義歯を装着する要介護者の口腔ケアを改善する一環として床用レジンに改質し、より清掃容易な義歯床用材料を開発することを目的として本研究に着手した。口腔細菌と床用材料との親和性を低下させるための方法として、床用レジン表面の表面エネルギーを低下させることが挙げられる。有床義歯の表面エネルギーを低下させるためには、床用材料としてフッ素化合物を応用することが考えられるが、以前、我々が行った研究では、床用加熱重合レジン液部にフッ素系モノマーを添加するだけでは、当初期待した表面性状の改質を達成することはできなかった。しかし、フッ素系モノマー含有ポリマービーズを創製することにより、試作レジン表面性状を疎水性に改質することができ、細菌、特に不潔な義歯床や義歯性口内炎に特異的に検出されると報告されている *Candida albicans* の付着性が有意に低下したことを報告した。本報告では、より生体に安全といわれているフッ素系モノマーを用いてポリマービーズを創製し、同ビーズを用いて作製した試料の物性および細菌の付着性について検討したので報告する。

【方法】 Methyl methacrylate (MMA) に Perfluorohexylethyl acrylate (C6F) を液重量比 25% で添加し、懸濁重合によって球形ビーズを創製した。重合時には、液部にも液重量比 25% で C6F を添加し、通法に従って加熱重合を行い、試料を作製した。表面性状を含めた物性については、接触角、試料内部におけるフッ素の分布、ガラス転移温度、ヌーブ硬さ、および引っ張り強さについて検討した。さらに、口腔細菌の付着実験においては *Candida albicans* (*C. albicans*) および *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) を用い、試料表面に対する付着菌数の測定を行った。

【結果・考察】 コントロール (MMA) と比較して C6F 添加試料は表面硬さおよび引っ張り強度において若干低下したが、水に対する接触角は顕著に増加した。以前の研究では、Perfluorooctylethyl acrylate (C8F) 添加ポリマービーズを用いることによって試作レジン表面を疎水性に改質させることができたが、今回の実験ではより生物学的に安全といわれている C6F においても同様の結果を得ることができた。さらに、今回新たな知見として、デンチャープラークの形成初期に関与していると報告されている *S. mutans* の試料表面への付着性を検討したが、その付着量はコントロール (MMA) と比較して、有意な減少を示した。以上のことから C6F のポリマービーズへの導入によって床用レジン表面への細菌付着を抑制できることが示唆された。

傾斜機能を付与したハイブリッド義歯の開発
— フィラー粒径が硬質レジンとの摩擦・摩耗に及ぼす影響 —

○谷本安浩^{1,3}, 邊 吾一², 根本君也^{1,3}

日本大学松戸歯学部歯科理工学¹, 日本大学生産工学部機械工学科², 口腔科学研究所³

【目的】 歯冠用硬質レジンとは、臼歯部のクラウン・ブリッジ用材料として用いられているが、対合する天然歯や材料の摩耗の問題が臨床報告で指摘されている。そのため近年においては、十分な機械的性質を備えたハイブリッド型硬質レジンが開発されている。本研究において傾斜機能を付与したハイブリッド義歯を最適設計するにあたって、硬質レジンとの摩擦・摩耗メカニズムの詳細を解明する必要がある。そこで今回は、歯冠用硬質レジンにおけるシリカフィラーの粒径が硬質レジンとの摩擦・摩耗に及ぼす影響について検討した。

【方法】 硬質レジンマトリックスレジンには、ウレタンジメタクリレート（根上）とトリエチレングリコールジメタクリレート（新中村化学）を60:40mol%の割合で混合し、重合開始剤としてカンファーキノン（アルドリッチ）およびメタクリル酸2-ジメチルアミノエチル（和光純薬）をそれぞれ0.5wt%および1.0wt%添加して調製した。マトリックスレジンに混入するシリカフィラーは2wt%g-メタクリロキシプロピルトリメトキシシラン（信越化学）で処理した。フィラー粒径が摩擦・摩耗に及ぼす影響を検討するため、フィラーの平均粒径が0.5, 3.3, 4.3, 7.9, 15.5 μm の計5種類のシリカフィラーを使用した。シリカフィラーをマトリックスレジンにそれぞれ70wt%混入後、減圧下で脱泡して硬質レジンペーストとした。硬質レジンペーストはゴム枠（直径6mm, 厚さ1mm）に充填し、上下をスライドガラスで圧接した後、照射器（クラレ）により表裏90秒ずつ照射して試験体とした。摩擦摩耗試験には、回転式摩擦摩耗試験機（FPR-2000, レスカ）を用いた。また摩擦摩耗後の摩耗深さは、レーザー表面形状測定顕微鏡（キーエンス）を用いて測定した。

【結果・考察】 硬質レジンにおけるシリカフィラーの粒径が大きくなるにしたがい、摩擦摩耗試験により得られた摩擦係数の値は大きくなった。また摩耗深さは粒径0.5 μm の硬質レジンで5.25 μm であり、フィラー粒径が大きくなるにつれてその値は大きくなり、フィラー粒径が15.5 μm の硬質レジンでは摩耗深さは34.93 μm であった。さらには本研究で得られた摩擦係数と摩耗深さとの間に高い相関性（ $r=0.97$ ）が見られたことから、硬質レジンとの摩耗量の検討に、摩擦係数を用いることが有効であると考えられた。

歯科用セラミック基複合材料の開発

○谷本安浩^{1,3}, 會田雅啓^{2,3}, 根本君也^{1,3}

日本大学松戸歯学部歯科理工学¹, 第II補綴学², 口腔科学研究所³

【目的】 歯科用セラミックスには、金属焼き付けポーセレン、キャストブルセラミックスなどがあり、臨床に多く用いられている。本研究では、新しい歯科用セラミックスを開発することを目的として、セラミックスを一方向繊維で強化した繊維強化セラミックス（Fiber reinforced ceramics: FRC）を作製し、その機械的性質などについて検討してきた。今回は、織物繊維を強化材としたグリーンシート（未焼成シート）を試作するとともに、グリーンシートを積層、焼成することによって成形されたFRCの焼成収縮率を測定し、FRCの評価を行った。

【方法】 本研究で作製したFRCの強化材には、平織タイプの炭化ケイ素系繊維（宇部興産）、マトリックスにはアルミナ（昭和電工）を用いた。作製方法としては、まずアルミナ、ホウケイ酸ガラス、エタノール等を、遊星型ボールミルにて18時間混合分散した。次に一次分散したスラリーにバインダおよび可塑剤を加えて2時間混合した後、攪拌脱泡を行った。攪拌脱泡したスラリーをドクターブレード法を用いることでグリーンシートを作製した。グリーンシートは三枚積層し、卓上型高速昇温電気炉を用いて、1000°Cで焼成することでFRCを作製した。比較対象として、一方向繊維で強化されたFRCおよび繊維強化されていないマトリックス単体の試供体も同様に作製した。また得られた焼結体の焼成収縮率を測定した。その際、グリーンシート作製時の送り方向をX方向、幅方向をY方向、厚さ方向をZ方向として、それぞれ収縮率を求めた。なお一方向繊維強化材の繊維軸方向はX方向である。

【結果・考察】 一方向繊維強化材の場合と同様、強化材に織物繊維を用いた場合についてもドクターブレード法によりグリーンシートを成形することができた。織物および一方向繊維を用いた場合のFRCの収縮率は、マトリックス単体に比べて小さかった。これはマトリックスの収縮が繊維によって抑制されたためと考えられる。また一方向繊維を強化材とした場合は、X（繊維）方向とY, Z方向の収縮率に強い異方性が見られたが、織物繊維はすべての方向に対して収縮率を抑制することができた。以上の結果から、織物繊維を複合化したグリーンシートを得ることができた。さらにはそのFRC成形体は、焼成収縮率を効率良く抑えることが判明した。しかし二次元構造である一方向繊維と比べ、今回使用した織物繊維は三次元構造をとるため、繊維/マトリックス界面の制御方法やグリーンシートの薄膜化など更なる検討が必要である。

○渡辺 官^{1,4}, 池見宅司^{2,4}, 根本君也^{3,4}, 後藤治彦^{1,4}, 桜田俊彦^{1,4}, 増田美樹子^{1,4}, 會田雅啓^{1,4}

日本大学松戸歯学部第II補綴学¹, 保存修復学², 歯科理工学³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 歯科金属アレルギーの予防から、セラミックやチタンが有効であることが近年明らかにされた。これらの材料での補綴物の製作には、焼成収縮や強度、鑄造特性などから CAD/CAM を利用したブロックからの削り出しが適している。しかし、口腔内での長期的な観察は行われていない。また、これらの材料は硬いため、20個のブロックの切削で専用の切削用のバーの切削効率が低下してしまい、経済的な負担が大きい。そこで、現在使用されているセラミックおよびチタンブロックを用いて歯冠補綴物を製作し、口腔内に装着し、5年間における長期的観察による評価を行うとともに、当学部理工学教室で開発中の快削セラミックや快削チタン材料の物性や生体親和性など、種々な方向から評価を行う。

【方法】 大臼歯のオールセラミッククラウンを想定した支台歯の金型原型模型（辺縁形態：シャンファー，曲率半径2mm）を、18-8ステンレス鋼（SUS-303）にて作製し、シリコン印象材にて印象採得後、CAD/CAM用超硬石膏で石膏模型を作製した。計測機を用い5軸計測（計測ピッチ0.1mm）により計測し、設計デザインソフト（GN-Iソフトウェア，GC）を用いてコーピングの設計を行った。設定条件は外形モデルType I，オフセット値1.0mm，セメントスペース開始点高さ1mm，制御点を歯冠側隅角部，セメントスペースを50 μ m（以下，S50），70 μ m（以下，S70）および90 μ m（以下，S90）とした。コンジットブロックの切削加工を行った。コーピングは石膏模型へ手指にて適合させ、シアノアクリレートで固定した。即時重合レジンにて包埋を行った後、正中方向から縦断し、デジタル顕微鏡を用いて倍率200倍にて辺縁から0.5mm間隔で6mmまでの14点（測定点A~N）の測定を行った。これらの測定値の平均値を算出し、一元配置分散分析にて平均値の差を検定後、FisherのPLSD検定を行い危険率5%で有意差を判定した。

【結果・考察】 本実験では、測定点AからCまではセメントスペースは無く、Dからセメントスペースが発生し制御点でセメントスペース設定の間隙となるように設定している。また測定点AからCまでは辺縁形態における曲線部位でありそれ以降は軸面に相当する。軸面におけるセメントスペースの再現性はS70において良好な結果を示した。辺縁部における空隙量の測定結果を図に示す。測定点AではS90が有意に小さかったが、BおよびCではS70が有意に小さい値を示した。またすべての設定条件で辺縁の加工は曲率半径が大きく加工あるいは直線的に加工されていたと考えられる。GN Iにおける計測制度は約 $\pm 20\mu\text{m}^2$ ）であり、加工誤差も考慮すると約50 μm の誤差範囲があることが影響しているものと考えられる。結果として、本実験における設定条件ではセメントスペース70 μm が適切であると示唆された。

○若見昌信^{1,3}, 田中孝明^{1,3}, 大村祐史^{1,3}, 渡辺 官^{1,3}, 谷本安浩^{2,3}, 後藤治彦^{1,3}, 桜田俊彦¹, 増田美樹子¹, 會田雅啓^{1,3}

日本大学松戸歯学部第II補綴学¹, 歯科理工学², 口腔科学研究所³

【目的】 切削をエナメル質にとどめるため、歯質や歯髄に対する侵襲が少なく、審美性や形態異常の治療に効果的なセラミックラミネートベニアが臨床で用いられている。現在の製作法では陶材の焼成に伴う収縮による適合性や技工操作などに問題がある。そこで、鑄造や焼成などに費やされる操作時間の短縮、補綴物の変形、技工操作の熟練差による形態や適合性の違いなどをなくすために、ラミネートの作製をCAD/CAMシステムを応用し、また、その適合性が向上するために適した支台歯の形成法を行う。

【方法】 エポキシ模型を用いて右側中切歯に対し、二つの方法によるラミネートベニアの支台歯形成を行った。審美性の回復を十分に行うため、エナメル質の厚い部分、すなわち、切端部および両隣接部では切削量を多くしたのと、唇側全体を平坦的に形成したものである。それぞれの支台歯を印象採得し、作業模型を作製したのち、ワックスアップを行った。そして、CAD/CAMシステムGN-1によりラミネートベニアを作製し、試料とした。また、従来法により作製したラミネートベニアと、適合性の比較検討を行った。試料数はそれぞれ5とした。ベニアをエポキシ上にシアノアクリレートにて固定後包埋し、正中部から矢状断を行いマイクロデジタル顕微鏡にて、切端部、中央部、歯頸部の3点で観察を行った。

【結果・考察】 GN-1により作製したラミネートベニアにおいて切端部および両隣接部では切削量を多くしたものは、従来法と比較して適合性について大きく劣っていた。それは、切削量が多いところは陥凹した形態のため計測の際、レーザー光の乱反射が生じたことで正確な測定ができず、その結果適合が悪くなったのではないかと考えられる。そこで、唇側全体を均一的に支台歯形成し、GN-1により作製したラミネートベニアにおいては、適合性が向上した。よって、CAD/CAMシステムGN-1によりラミネートベニアを作製するには、唇側全体を平坦的に支台歯形成を行う必要があることが示唆された。

快削チタン材の開発

○根本君也^{1,4}, 出井 裕³, 會田雅啓^{2,4}日本大学松戸歯学部学歯科理工学¹, 第Ⅲ補綴学², 日本大学理工学部³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 チタンは生体安全性が高く、組織埋入材料や金属アレルギー患者の修復用金属として用いられているが、機械的性質や铸造性・研磨性・加工性などに難点がある。

義歯用材料として用いる場合も合金化されるが、Al,Cu,Va,Taなどの元素を添加すると溶出による危険性が危惧される。そこで冠橋義歯材料として、CAD/CAMで作製する快削性材料の開発を行っている。

【方法】 アレルギーの出現が少ないと云われているAgおよび対照としてアルミニウム・銅をチタンに添加し、快削性を得るためと融点の大きく異なる金属を合金化するために放電プラズマ焼結装置（SPS）を用いて合金を作製した。すなわち、各種球状粒子を任意の割合で混合し、カーボン製ダイス（内径15mm）に充填した後、放電プラズマ焼結装置に設置して真空下5.4kNの加圧下で通電し、焼結をおこなった。実験中の温度・変位（試験体の厚さ）・圧力・電流・真空度の電圧をPCに取込み、経時的に監視した。

試験体は厚さ2mm、幅4mm、長さ15mmに成形し、物理的・機械的性質、理論密度、摩擦摩耗、曲げ試験および硬さの測定を行なった。摩擦摩耗試験はフリクションプレーヤ（レスカ）を37°C・1kgの条件で用い、切削試験は試作機を用い、120gの荷重で3分間歯科技工用カーバイトバーで切削した重量を測定した。

【結果・考察】 ○合金は直径15mm厚さ4mmの円盤状で得られ、密度はおおよそ97%であった。

○曲げ試験の応力-たわみ曲線では純チタンとチタン100%の焼結合金のたわみが3.2~3.8mmと大きく、焼結による低下が少なく、応力は増したことがわかった。

○曲げ強さはAl5%の添加が最も大きく、5%Cu, 20%Agの添加によって低下した。○弾性率は純チタン板が小さく、他は類似の大きさであった。

○硬さはチタン成形板が450、チタン100%TiのSPS焼結体が465、チタン20%SPS焼結体が578Hvとなり、銀の添加によって上昇した。

○摩擦摩耗はフリクションプレーヤを用い、1kgの荷重下で摩擦試験を行ない10~30分間の係数を求めた結果、チタン成形板が0.3と摩擦係数が大きく、焼結チタンは0.25まで低下したが、銀の添加によって増加した。Al,Cuの添加は銀の添加とほぼ同じ値であった。

○試作研削試験機を用いて銀の添加量と研削量を成形板に対する比で表した結果、100%TiのSPS焼結体は成形板より切削率が良くなり、銀を添加するとさらに向上し、20%の添加では35%に達した。

生体適合性に優れた新チタン合金の開発

○中田浩史^{1,2,4}, 岡崎義光³, 小林喜平^{1,2,4}日本大学松戸歯学部第Ⅰ補綴学¹, インプラント診療科², 産業技術総合研究所 つくば東事務所
機械システム研究部門 循環型機械材料研究グループ³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 インプラント治療を成功させるためには生物学的な配慮に基づいた安全性の高いインプラント材料を確立させることが必須である。材料中に少しでも有害な元素が含まれる場合、長期使用中に極微量ではあるがそれらが溶出し、生体組織に対してアレルギー反応や炎症反応などを引き起こすことが懸念される。そのため、チタン合金においてもできるだけ生体に影響を及ぼさない元素で構成されることが望ましい。著者のグループでは、細胞毒性が指摘されていない合金元素（Zr, Nb, Ta）をチタンに添加し、生物学的安定性および耐食性が高く、しかも高強度、高延性を有するTi-15Zr-4Nb-4Ta合金の開発を行なっている。本研究では、Ti-15Zr-4Nb-4Ta合金およびTi-6Al-4V合金のインプラント体をウサギ大腿骨に2~24週埋入し、引き抜き試験および組織学的検索を行なうことにより、Ti-15Zr-4Nb-4Ta合金およびTi-6Al-4V合金における生体反応の比較検討を行った。

【方法】 実験プロトコルは、日本大学松戸歯学部実験動物倫理委員会の承認を受けて作成されたものである（承認番号第ECA-03-0003号）。実験動物は、1週間以上予備飼育した16週齢のNew Zealand White Rabbit（体重約3.0kg）を使用した。全身麻酔を行い、手術野は、左右大腿骨中枢側外面を剃毛し、アルコール綿およびヨードチンキにて消毒後、浸潤麻酔を施した。その後、メスにて大転子部直上に約3cmの切開を加え、殿筋群を鈍的に分け大転子を露出した。大転子を切離後、インプラント用エンジン（IMPLANTER-S®）を用い、低速回転（180rpm）で滅菌した生理食塩水を注水しながら直径3.1mmの埋入窩を形成し、インプラントを埋入した。深さは25mm、髓空内を通り反対側の皮質骨に接触する部分までとした。切り離した大転子は殿筋を再固定し、切開した皮膚は、サージカルシルク針付き縫合針を用いてマットレス縫合し閉鎖した。術後3日間はヨードチンキにて消毒を行い、また1週間毎に体重の変化を記録した。埋入後2,4,8,16,24週にて大腿骨を摘出し、引き抜き試験および組織学的検索を行なった。

【結果・考察】 引き抜き試験では、Ti-15Zr-4Nb-4Ta合金はTi-6Al-4V合金に比べわずかに高い値を示した。組織学的検索では、Ti-15Zr-4Nb-4Ta合金はインプラント体周囲に線維性結合組織の介在は認められず新生骨が観察された。以上の結果より、Ti-15Zr-4Nb-4Ta合金は、短期経過ではTi-6Al-4V合金とほぼ同等の安全性を示す可能性が示唆された。

○多田充裕^{1,5}, 平塚浩一^{2,5}, 岸川道子^{2,5}, 笹原廣重^{1,5}, 松井 大³, 金田 明⁴, 安孫子宜光^{2,5}

日本大学松戸歯学部口腔診断学¹, 生化学², 東京医研株式会社³, 松下産業機器株式会社⁴, 口腔科学研究所⁵

【目的】 低出力レーザー治療の歯科医学領域への積極的な応用が期待されているなかで、レーザー医療をさらに推進させるためには、歯科疾患への有用性、生物学的効果を実証科学的に解明していく必要がある。ゲノム科学研究の進展に伴ってゲノムデータベースを利用した遺伝子発現の網羅的解析技術が可能になりつつある。本研究では、炎症抑制作用のモデルとして膝関節リュウマチ滑膜細胞を、骨形成促進作用モデルとしてマウス骨芽細胞様株 MC3T3-E1 細胞を用いて、レーザー照射によって発現が変化する遺伝子を遺伝子差分法および cDNA マイクロアレイを応用して同定することを試みた。

【方法】 ヒト膝関節リュウマチ滑膜細胞には疾患モデルとして IL-1 β を作用させ、一般的な治療薬として dexamethasone を、そしてレーザー照射を行って、それぞれの mRNA を回収した。骨形成能を有する骨芽細胞 MC3T3-E1 には増殖初期にレーザー照射を行なった。低出力半導体レーザーとして Ga-Al-As 半導体レーザー Panalas-1000、(松下産業機器製、波長 830 nm) を細胞表面から 5 cm の距離に照射部を設定し、500 mW で培養ディッシュ 75 cm² に対して 20 分間照射した。この照射条件で、エネルギー密度は 7.6 J/cm² になる。一方、光照射装置として偏光赤外線照射機 (Super Lizer; 東京医研) を同等のエネルギー量が得られる条件で照射した。MC3T3-E1 の cDNA ライブラリーから非照射細胞の mRNA を用いて得られた差分遺伝子ライブラリーから、プラスミド DNA を抽出、精製し制限酵素で切断してアガロースゲル電気泳動を行い、挿入断片を調べた。300bp 以上の挿入断片をもち、かつ制限酵素消化パターンが異なる 88 遺伝子クローンを選び、挿入断片の塩基配列を解読し、NCBI の DNA データベースとホモロジー検索を行った。一方、レーザー非照射、照射の膝関節リュウマチ滑膜細胞、MC3T3-E1 細胞から経時的に mRNA を回収して、それぞれを cy3, cy5 蛍光色素で標識し、約 3,800 遺伝子のマイクロアレイあるいは Affimetrix Gene Chip (19,000 遺伝子) を用いて遺伝子発現プロファイルをモニターした。発現変動した遺伝子については、さらに RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法によって確認を試みた。

【結果・考察】 ヒト膝関節リュウマチ滑膜細胞の偏光赤外線照射によってキモカインである IL-8 の mRNA レベルが著明に低下した。ELISA 法による遺伝子産物の同定実験でも実際に IL-8 量が減少していた。この結果から、偏光赤外線照射は炎症促進因子である IL-8 の遺伝子発現レベルを低下させることで炎症、疼痛を抑制することが示唆される。一方、骨芽細胞 MC3T3-E1 へのレーザー照射による遺伝子差分ライブラリー遺伝子のホモロジー検索の結果、22 クロオンが Known 遺伝子、38 クロオンが EST クロオン、30 クロオンが Unknown 遺伝子であった。遺伝子クローンのなかから、マウスの macrophage inhibitory factor 遺伝子と高いホモロジーをもつものが同定された。また、マイクロアレイ解析結果からは、osteoglycine が新たに同定された。これらの遺伝子発現を real-time PCR 法で確かめたところ、レーザー照射後、mRNA レベルが増大することが確認された。osteoglycine は骨形成に関与する成長、分化誘導因子と結合して機能を維持させるプロテオグリカンであることが知られている。また macrophage inhibitory factor は骨芽細胞で発現しており細胞機能の維持に関与すると報告されている。この結果から低出力レーザー照射が種々の遺伝子発現の促進を介して骨芽細胞の骨形成メカニズムに関与する可能性が考えられる。

○早川 徹^{1,3}, 前田隆秀^{2,3}, 根本君也^{1,3}

日本大学松戸歯学部歯科理工学¹, 小児歯科学², 口腔科学研究所³

【目的】 現在、レジン系シーラントを接着させる際にはリン酸エッチング処理が不可欠である。リン酸エッチング処理に関しては、過剰のリン酸エッチングによる二次齲蝕の発生や、幼若エナメル質の過度の脱灰の危険性などが指摘されており、リン酸エッチングに変わる前処理の開発が急務である。本研究では、アミノ酸残基を有するメタクリレートモノマーを含有したセルフエッチングプライマーを試作し、歯科用レジンとエナメル質との接着性に与える影響について検討した。

【方法】 アミノ酸残基を有するメタクリレートモノマーとしてメタクリロイルオキシチロシン (MTY) を合成した。MTY (5%, 10%, 20%), 塩化第二鉄 (3%), HEMA (35%) の混合水溶液からなるセルフエッチングプライマーを試作した。被着体として冷凍保存したウシ前歯を使用した。注水でエナメル質を砥石 (#800, #1000) で研磨した後に、内径 3mm の穴のあいたテープで接着面積を規定した。その後、試作セルフエッチングプライマーで 30 秒間被着面を処理した。乾燥後、スーパーボンド C&B を用いて、ステンレス棒 (サンドブラスト処理) を接着させ、レジン硬化後、37°C の水中に 1 日浸漬した後に、オートグラフを用いて引張速度 2mm/min で引張接着強さを測定した。比較として、リン酸エッチング処理の場合の接着強さについても同様にして測定した。

【結果・考察】 試作セルフエッチングプライマーを用いた場合、5%MTY 処理で約 5MPa、10%MTY 処理で約 7MPa とリン酸エッチング (約 14MPa) と比べて統計学的に有意に低い接着強さであったが、20%MTY 処理では約 13MPa とリン酸エッチングとほぼ同程度の接着強さが得られた。MTY 濃度が上昇するにつれ、試作セルフエッチングプライマーの pH 値は 1.4, 1.6, 2.1 となり、酸性度が低下する傾向にあった。このことから試作セルフエッチングプライマーの酸性度、すなわちエナメル質の脱灰はレジンの接着強さに関与していないことが示唆された。以上、本研究では酸性モノマーの代わりに新規なモノマーである MTY をセルフエッチングプライマーの成分として用いたところ、4-META/MMA-TBB レジンとエナメル質との接着に有効であることが判明した。

新規矯正用接着システムの開発

○早川 徹^{1,3}, 前田隆秀^{2,3}日本大学松戸歯学部歯科理工学¹, 小児歯科学², 口腔科学研究所³

【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) は矯正用ブラケットの接着に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。リン酸エッチング処理については, 過剰のエッチングによる二次齲蝕発生の危険性やブラケット撤去時のエナメル質破壊などが指摘されている。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。

【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, 頬側面を通法に従いポリッシングクリームで清掃した。その後, 以下に示す手順でエナメル質を処理した。すなわち, 1) 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) 処理, 2) セルフエッチングプライマー処理後, 唾液汚染, 3) リン酸エッチング, 4) リン酸エッチング後, 唾液汚染, の4条件である。各処理後, 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。その後, 37°Cの水中に1日浸漬した後, 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。

【結果・考察】 各条件での圧縮せん断接着強さは条件1) で約18MPa, 条件2) で約17MPa, 条件3) で約20MPa, 条件4) で約15MPaとなった。この様に, セルフエッチングプライマー処理した場合には, エナメル質表面が唾液で汚染されても接着強さの低下はほとんど起こらなかった。一方, メーカー指示されているリン酸エッチングの場合には, 唾液汚染によって統計学的に有意に接着強さが低下することがわかった。各処理後のヒトエナメル質表面の走査電子顕微鏡観察では, リン酸エッチングではヒトエナメル質表面が強く脱灰され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, 詳細については現在検討中である。以上, 本研究の結果から, セルフエッチングプライマー処理は矯正用ブラケットの接着に有効であることが判明した。

新規歯質接着システムの開発

○西山典宏^{1,4}, 池見宅司^{2,4}, 前田隆秀^{3,4}, 根本君也^{1,4}日本大学松戸歯学部歯科理工学¹, 保存修復学², 小児歯科学³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 加水分解安定性の高いセルフエッチングプライマーを開発することを目的として, メチレン鎖長の異なる3種のN-メタクリロイル- ω -アミノ酸 (NM ω A) を合成し, セルフエッチングプライマーの酸性モノマーとしてNM ω Aを歯質に作用させた場合のコンポジットレジンの接着強さおよびNM ω Aのカルボキシル基と歯質との相互作用について検討した。

【方法】 1. NM ω Aの合成: メチレン鎖長の異なる3種の ω -アミノ酸のアミノ基にメタクリル酸クロリドを縮合させ, メチレン鎖が1のN-メタクリロイルグリシン (NM Gly), 2のN-メタクリロイル- β -アラニン (NM β A) および4のN-メタクリロイル吉草酸 (NMVa) を合成した。

2. 歯質に対するコンポジットレジンの引張接着強さの測定: ウシ前歯をシリコンカーバイトペーパーを用いて注水で平滑に研磨し, 新鮮エナメル質を露出させた。このエナメル質研磨面にポリエチレンリングを仮着し, その内面に5mol%のNM ω Aを水に溶解して調整したプライマー水溶液を30秒間作用させ, 10秒間エアードライさせた。その表面にクリアフィルメガボンドを塗布し, 3秒間エアードライした後, 10秒間光照射した。その後ただちに, クリアフィル AP-Xを充填し, 30秒間光照射して試験体を作製した。試験体を室温に5分間放置した後, 37°C水中に浸漬した。24時間後, 接着試験用アタッチメントを備えた万能試験機 (DCS-2000, 島津) を用い, 引張速度 2 mm/min の条件でエナメル質に対するレジンの引張接着強さを測定した。なお, 試験体はそれぞれの条件につき10個作製した。また, 上記方法に準じてNM ω A水溶液で処理した歯冠象牙質に対するレジンの接着強さを測定した。

3. 歯質との相互作用: 5 mol% NM ω A水溶液 600mg をNMR管に精秤し, 歯質成分としてハイドロキシアパタイト (HAP200, 大平化学) または象牙質 60mg を添加して, 5分間振蕩・攪拌した。この歯質成分懸濁液のpHを測定した後, 懸濁液の¹³C NMRスペクトルを測定し, NM ω A分子内カルボキシル基に帰属されるカルボニルカーボンピークの化学シフトを求め, 歯質成分添加によるカルボキシル基カルボニルカーボンピークのシフトを求めた。

【結果・考察】 エナメル質および歯冠象牙質をNM ω A水溶液で処理すると, NM ω A分子内カルボキシル基が歯質を脱灰するため, レジンの接着強さはエナメル質で16MPa, 象牙質では24MPaと大きく向上した。以上の結果から, NM ω Aは歯質へのレジンの接着強さを大きく向上させること, その効果はエナメル質より象牙質の方が高いことがわかった。

レーザーの歯科医療への応用
 エナメル質の脱灰深さの測定法

○池見宅司^{1,4}, 飯田浩雅¹, 山本憲廣^{1,4}, 神谷直孝^{1,4}, 岩井啓寿¹, 木場秀夫^{2,4}, 藤田恵二郎³,
 石崎 勉³, 山本浩嗣^{2,4}

日本大学松戸歯学部保存修復学¹, 病理学², サンギ中央研究所³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 レーザーによる歯質耐酸性獲得を調べるためには、その評価法を定めておく必要があり、脱灰エナメル質の状態と、エナメル質耐酸性獲得評価法としての脱灰深度測定を検討する目的で本実験を行った。脱灰層を有するエナメル質の研磨切片にアルゴンイオンエッチングを施してSEMで観察した。そして、研磨切片の通常のSEM像では認めにくい脱灰部の形状が、アルゴンイオンエッチング後のSEM像によって認識できる状態となることが判明した。さらに、より簡便に脱灰深さを測定するために、薄切研磨切片に染色剤を応用して光学顕微鏡で観察を行った。その際、脱灰エナメル質と健全エナメル質の境界が染色により認識できるか否かについて、同一試料のアルゴンイオンエッチング後のSEM写真と比較し、境界部の構造を調べた。

【方法】 1. 牛前歯唇側エナメル質のエナメルブロック4x3x3mmを作成後、エナメル質表面を平坦にし、1最終研磨を行った。pH4に調整した0.01Mの乳酸に16, 24, 48時間浸漬して人工脱灰エナメル質を作成した。それらを包埋後、厚さ約90μmの薄切切片を作成した。2. アルゴンイオンエッチングはフラットミリング装置(日立, E-3200)を用い、ミリング時間30分の条件で処理後、蒸着を行い、SEM画像をコンピュータに取り込んだ。SEMはFE-SEM(S-4500, 日立)を使用して、倍率は500, 3,000, 10,000, 30,000倍でSEM観察を行った。3. 光学顕微鏡観察では、薄切切片研磨後、無処理の試料を光学顕微鏡(島津)にて倍率400倍の画像をコンピュータ(NEC)に取り込み、無処理試料とした。同一試料のCMR試料作製後、さらに、同一試料を蝕蝕検知液(クラレ)に5分間浸漬して染色試料とし、画像をコンピュータ(NEC)に取り込んだ。

【結果・考察】 1. 脱灰エナメル質最深部の状態を観察するにはアルゴンイオンエッチングが有効であった。2. アルゴンイオンエッチング後のSEM写真から脱灰部と健全エナメル質の境界と考えられる位置を明示することができた。3. 脱灰層を有したエナメル質試料の薄切切片を染色することにより、脱灰深部に明るい層が認められ、その下縁に破線状に繋がった線が観察された。4. アルゴンイオンエッチング後のSEM写真における脱灰部と健全エナメル質の境界相当部は、光学顕微鏡写真で得られた染色試料の明るい層の下縁に存在する破線状に繋がった線と符合していた。

3-2-30

う蝕除去と歯面清掃システムおよび審美修復
 一歯の漂白に応用するためのフリーラジカルの基礎的研究一

○木村 大¹, 杉山道紀¹, 野浪 亨³, 川本幸司², 辻本恭久^{2,4}, 池見宅司^{1,4}

日本大学松戸歯学部保存修復学¹, 歯内療法学², 独立産業法人産業技術研究所中部センター セラミックス研究部門³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 歯の漂白は、着色の原因である高分子の有機性着色物に対して、活性の高いヒドロキシラジカル等のフリーラジカルが、化学的に作用して着色高分子を酸化することで低分子化し漂白すると報告されている。したがって漂白効果を調べるためには、過酸化水素水より発生するフリーラジカルの種類や発生量を求めることが、基本となると考えられる。そこで、低濃度の過酸化水素水から効果的にヒドロキシラジカルを発生させて、生体に対して安全なブリーチング法の開発を目的として実験を行ってきた。本実験では、3.5%の過酸化水素水を基にして、配合したライトアクチベーターならびに、光照射器の種類の違いによって生じるラジカル量を比較することを試みた。

【方法】 3.5% 過酸化水素水 150μl をコントロールとし、3.5% 過酸化水素水 150μl に松風社製ハイライトの粉末0.6mgを混和したものと二酸化チタン 200mgを混和したものを試料とした。スピントラッピング剤はDMPO(同仁化学)を20μl用い、・OHの確認のためDMSO 50μlを用いた。

フリーラジカルの検出には、ESRスピントラッピング法を用い、ESR装置はJEOLFA300(日本電子)を用いて測定した。光照射器のキセノンランプはAPOLLO 95E(Dental Medical Diagnostic Systems), ハロゲンランプはXL-3000(3M), 青色発光ダイオードは, Radius(オサダ)を使用した。各々の試料にDMPOを添加し、光照射せず15秒間放置したものと、キセノン, ハロゲン, ダイオードにて15秒間照射したものについて60秒後にフリーラジカルの発生を測定した。

【結果・考察】 1. 今回、用いた全ての試料において・OHの発生が認められた。2. 3.5% H₂O₂に松風Hi-Liteの粉末を混和した試料にキセノンを照射した時に、・OHの発生が最も多かった。3. 3.5% H₂O₂に二酸化チタンを混和した試料にキセノン, ハロゲンを照射した時に、・OHとO₂・の発生が認められた。4. H₂Oに二酸化チタンを混和した試料に、キセノン照射した時に、・OHの発生が認められたが、O₂・の発生が認められなかった。

○渋谷 敏^{1,2}, 卯田昭夫^{1,2}, 橋本崇文^{1,2}, 山口秀紀^{1,2}, 下坂典立^{1,2}, 石橋 肇^{1,2}日本大学松戸歯学部麻酔学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 顎顔面の疼痛性疾患に対して、直線偏光近赤外線の星状神経節近傍照射(PIRISG)のおよぼす影響について検討を加えた。

【方法】 1. PIRISG の自律神経機能におよぼす影響

SUPER LIZER HA-2200 (東京医研社製)を用いて PIRISG が自律神経におよぼす影響について、心拍数 RR 間隔周波数解析から検討を加えた。健康成人ボランティアを対象に、5 分間の安静 (安静時) 後、PIRISG を T ミックスモード (80% パワー) で左右側 (左側から右側へ) に 2 回づつ行い、その前後について検討を加えた。周波数帯域は 0.04~0.15Hz (LH), 0.15~0.4Hz (HF) とした。

2. 臨床例 1) 顔面神経麻痺患者への応用 2) 下歯槽神経麻痺患者への応用

【結果・考察】 1. PIRISG は心拍 RR 間隔周波数解析に対して影響をおよぼしていないものと思われた。PIRISG 前後の比較において、HR(bpm)は 74.3±11.7(Mean±SD)から 68.7±7.3, LH (msec²)は 498.9±443.6 から 622.9±328.0, HF(msec³) 212.7±178.1 から 304.5±174.9, および LH/HF は 5.3±5.7 から 2.6±1.8 であり、いずれも有意な差は認められなかった。

健康者において PIRISG は心拍 RR 間隔周波数に影響を与えないことが考えられるが、照射方法の違いによる検討も加えられなければならない。

2. 臨床例

1) 顔面神経麻痺患者への応用: 38 歳, 女性。下顎臼歯部の歯科治療後に Bell 症状出現し 2 日後に来院。PIRISG および鍼灸療法を併用し、初診時の顔面神経麻痺点数 8 点であったが、3 週間後 32 点, 4 週間後 40 点と Bell 症状は消失, 5 回の治療にてほぼ完治した。

2) インプラント処置における下歯槽神経麻痺: 47 歳, 女性。1 回目の PIRISG 直後に VAS で 10 から 7 に改善した。PIRISG 後に顔面部の温感を自覚している。

3) 下顎第 3 大臼歯抜歯後の下歯槽神経麻痺: 31 歳, 女性。約 3 年前の抜歯以後, 左口唇および頤部の hypoesthesia (知覚麻痺) および dysesthesia (不快感) を感じる。数ヶ月におよぶ薬物療法, PIRISG および鍼灸治療を行っているが症状はほぼ固定したままで、著明な改善効果は認められていない。PIRISG 後に顔面部の温感を自覚しない。

4-1-32

カスタムメイド DNA チップを応用した歯科診断

—*P. gingivalis* カスタムアレイによる環境応答に対する遺伝子発現変化のトランスクリプトーム解析—

○平塚浩一^{1,2}, 岸川道子^{1,2}, 斉藤重野^{1,2}, 安孫子宜光^{1,2}日本大学松戸歯学部生化学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 ゲノムプロジェクトの進歩に伴い、大量の遺伝子情報を一度に処理、解析する必要性が高まってきた。このようなニーズに答える 1 つの手法として、DNA マイクロアレイが開発され現在に至っている。本ユニットでは成人性歯周炎の主要病原細菌である *P. gingivalis* 病原性因子の発現解析用カスタムメイドアレイを作成し、その有用性を検討すると共に、本菌体が生息する歯周ポケット内のような変化の著しい外部環境に対応する本菌体の病原性遺伝子の発現解析を行うことで、将来、患者歯周ポケット内での本菌体の悪性度を診断するアレイ作製用遺伝子プローブを選出することを目的の 1 つとしている。

【方法】 Genbank および TIGR database から主な *P. gingivalis* 病原性遺伝子をおよそ 120 遺伝子選択し、PCR 法によって特異的領域を増幅した後、DNA スポッターにてカスタムメイド *P. gingivalis* マイクロアレイを作成した。またマイクロアレイ実験の条件を検討後、その実験条件の妥当性を RT-PCR にて確認した。外部環境に対応する本菌体の病原性遺伝子の発現解析を行うため、1) 細菌の各増殖期における RNA 抽出, 2) ヘミン制限下からの RNA 抽出, 3) 酸化ストレス後の RNA 抽出を行い、本マイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行った。

【結果・考察】 1) 細菌の各増殖期における遺伝子発現解析では、EL 期で増加している遺伝子の多くが酸化ストレス応答性であった。ML 期に対して LL 期では全体的に発現比が高まる傾向にあるものの、その大部分が 2 倍以内であった。また、ST 期ではおよそ 80% の遺伝子の発現量が大きく減少していた。2) ヘミン制限下における遺伝子発現解析では、コントロール群に比べてヘミン制限下群で発現量が高くなったのは HGP15, Rgp1, DPS, GroEL, Kgp などであり、また逆に低くなったのは Ferritin, SOD, Ef-g, HmuR, FtsA などであった。3) 酸化ストレスにおける遺伝子発現解析では、酸化ストレス応答性遺伝子群はストレス直後に遺伝子発現レベルが上昇した。他の病原性遺伝子群の発現レベルは全体的に、時間と共に減少した。これらの結果から、本菌体は各環境に応じて生存・増殖・代謝・するために必要なタンパク質の発現量を遺伝子発現レベルで機敏に調節しているものと考えられた。

齶蝕感受性決定遺伝子の構造解析
—量的形質遺伝解析を用いたマウスう蝕感受性に関する染色体の探索—

○成山明具美¹, 清水邦彦^{1,2}, 前田隆秀^{1,2}

日本大学松戸歯学部小児歯科学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 う蝕症は多因子疾患である事が知られているが、宿主の遺伝的要因に関してはこれまでにあまり解析されていない。当教室ではこれまでにう蝕感受性マウスである C57BL/6 系統と、う蝕抵抗性マウスである C3H 系統を用いた交配実験により、宿主のう蝕感受性が単純なメンデル遺伝形式に従わないため、宿主の遺伝的要因が複数存在する事を明らかにしてきた。さらにこれら 2 系統のマウスの交雑交配を行い、う蝕スコアを指標とした Pool DNA 法を用いて解析を行った結果、う蝕感受性に関する遺伝的要因の 1 つがマウス第 2 番染色体に存在する可能性を示してきた。Pool DNA 法では第 2 番染色体の他には、明らかにう蝕感受性に関する染色体領域が検出できなかったため、多遺伝子疾患の解析法の 1 つである量的形質遺伝 (Quantitative Trait locus; QTL) 解析を用いて他の候補染色体領域の検出を行った。

【方法】 C57BL/6 系統マウスと C3H/He 系統マウスを交配し、F1 マウスを得た。そして F1 マウス同士を交配し、85 匹の F2 マウスを得た。すべての F2 マウスを 21 日齢にて離乳すると同時にう蝕誘発飼料である Diet2000 にて飼育し、また *Streptococcus mutans* JC2 (cerotype c) を 7 日間毎日マウスに経口接種した。細菌の口腔内への定着を確認後 49 日齢まで飼育を行い、下顎骨の摘出を行った。それぞれのマウスのう蝕スコアを算定すると同時に脾臓より DNA を抽出した。各染色体上に約 30cM おきに設定した 87 個のマイクロサテライトマーカーを用いすべてのマウスの遺伝型の判定を行った。得られたう蝕スコアを量的形質とし、量的遺伝解析ソフトの MapManager QTXb15 を用いて解析を行った。得られた QTL 解析値(LRS 値)の判定は Permutation test を用いて行った。

【結果・考察】 Permutation test の結果、LRS 値が 9.6 の時に suggestive, 17 の時に significant, 23.5 の時に highly significant と判定する事となった。QTL 解析の結果、マウス第 1, 2, 7 番染色体に suggestive QTL が検出でき、第 2 番染色体に significant QTL, 第 8 番染色体に highly significant QTL が検出できた。

第 1 番染色体の 32.8 cM のマーカー D1Mit21 付近で LRS 値が 9.7, 第 2 番染色体の 56.8cM のマーカー D2Mit255 付近で LRS 値が 13.3, 第 7 番染色体の 43.7 cM のマーカー D1Mit21 付近で LRS 値が 16.2 の suggestive QTL が検出できた。

第 2 番染色体の 27.3~52.3cM の領域に LRS 値 18.5 の significant QTL が検出できた。

第 8 番染色体の 50.3 cM のマーカー D8Mit280 付近で LRS 値が 26.6 の highly significant QTL が検出できた。この他の染色体には有意な QTL は検出できなかった。これらの結果よりマウス第 1, 2, 7, 8 番染色体にう蝕感受性に関する遺伝的要因が存在する可能性が示された。これらの領域には現在までに約 4,000 個の機能が既知および未知遺伝子の存在が報告されており、今回唾液分泌および免疫系に関する遺伝子に焦点を当てた所、Kcnn1, Calr, Cacnala, Nfat3, Necab2, Cacnb4 といったカルシウムイオン輸送に関する遺伝子や Gab1, Il-15, Il-17c, Tccr, Mmps といった免疫応答に関する遺伝子の存在が明らかとなった。C57BL/6 系統と C3H 系統のこれら遺伝子の機能の違いが、う蝕感受性に関与している可能性が示唆された。

口腔奇形・異常に関する遺伝子の特定
—コルチゾン投与により誘導されるマウス唇顎口蓋裂発症に対する遺伝学的検討—

○韓 娟¹, 清水武彦^{1,2}, 前田隆秀^{1,2}

日本大学松戸歯学部小児歯科学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 妊娠中のマウスへのコルチゾン投与により、A/WySn マウスでは唇顎口蓋裂の発症が認められるが、C3H/He マウスでは全く認められない。これまでの研究により、マウス唇顎口蓋裂は常染色体劣性遺伝であることが示唆されたが、その原因遺伝子が存在する染色体領域は不明である。今回の研究の目的は、A/WySn マウスに発症する唇顎口蓋裂の原因遺伝子の存在する染色体領域を特定することである。

【方法】 A/WySn 系統マウスと C3H/He 系統マウスと交配し、F1 インタークロスマウスを得た。そして F1 マウスを A/WySn に戻し交配し、妊娠 11 日目から 14 日目までの 4 日間に酢酸コルチゾン 100mg/kg/day を妊娠マウスに投与し、胎生 18 日の N2 バッククロスマウス胎仔を得た。そのうち、唇顎口蓋裂を有した N2 マウス胎仔の DNA をサンプルとし、A/WySn 系と C3H/He 系の 2 系統マウス間で多型を有する SSLP (simple sequence length polymorphism) マーカーを用いて、インターバルマッピングを行った。全常染色体上に、各 SSLP マーカー間の遺伝的距離が可及的に 40cM を超えないように、65 個のマーカーを選択した。これらの SSLP マーカー座位における唇顎口蓋裂を有した N2 マウスの遺伝子型を、PCR 法および電気泳動法を用いて判定した。

【結果・考察】 母獣として 37 匹の A/WySn と 34 匹の F1 を用い、483 匹の N2 胎仔を得た。そのうち 13 匹に唇顎口蓋裂が認められ、コルチゾン投与による N2 マウス唇顎口蓋裂の発症率は 2.7% であった。13 匹の唇顎口蓋裂を有した N2 マウス胎仔の DNA をサンプルとし、65 個のマーカーを用いて遺伝子型判定を行い、D1Mit48, D2Mit272, D11Mit336, D13Mit78 および D14Mit39 に A/WySn ホモ接合体の高い遺伝子型比が得られた。DNA マーカーと原因遺伝子が連鎖していないと仮定すると、Mendel 遺伝学説にしたがい N2 マウスの遺伝子型比は A/WySn ホモ接合体 : C3H/He ホモ接合体が 1 : 1 になる。従って、この理論値と今回得られた唇顎口蓋裂を有した N2 マウスの遺伝子型比との有意な差から、マウス 1 番, 2 番, 11 番, 13 番および 14 番染色体が唇顎口蓋裂発症の原因遺伝子が存在する候補染色体であることが示唆された。

小児顎運動の診断技法の開発

○三好克実¹, 西村一美¹, 鬼頭衣里¹, 前田隆秀^{1,2}日本大学松戸歯学部小児歯科学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 近年, 小児期においても顎関節症状を伴い来院する患者も増加し, さらに症状が無くとも MRI 所見から顎関節円板転位を発見することがある。顎関節症の発症要因は腫々挙げられているが, 咬合異常は最も考えられ, 強い要因と思われる。咬合異常は顎運動異常を伴うことから, 顎運動異常の早期発見, 早期治療ならびに予防の面からも健常児ならびに咬合異常・顎関節異常の顎運動について詳細な研究が必要である。そのため, 顎運動解析に際して, 小児に負担が少なく, 簡便に日常の咀嚼運動に近い状態で, わずかな顎運動異常を解析できる, 顎運動解析装置の開発をおこなった。この顎運動解析装置を用いて, ファントムならびに被検者を用いて検討をおこなった。

【方法】 開発したアルゴリズム (特開 2002-336282) ならびに顎運動解析装置を使用し, 計測対象としてファントムの最大開閉口運動を計測し開発したアルゴリズムの検討をおこなった。この結果をもとにインフォームド・コンセント (日本大学松戸歯学部倫理委員会承認番号: EC03-009) をおこない, 顎関節症状を有する被検者と顎関節症状の無い被検者の顎運動を計測した。

【結果・考察】 開発したアルゴリズムの特徴である運動の中心軸を算出したところ, ファントムを用いた計測結果からは, クリック様の衝撃は最大開閉口運動の移動量のみからは, はっきりとした変動は確認できなかった。しかし, 中心軸から顎運動をみてみると, その波形の変移は一目瞭然で, スムーズな開閉口運動時では安定した波形を示すが, クリック様衝撃部では著明な波形の乱れとなって現れ, 明確にクリック様衝撃が表現できた。このことから, 中心軸から顎運動をみることで詳細な顎運動が計測できることが示唆された。また, スプリント療法などの症例で経時的に計測した被験者に関しては, 片側に変移していた顎運動の変移が少なくなるとともに, 中心軸の波形の変動が安定してきた。しかし, 計測後再び変移は計測当初の状態に近づき, 後戻りを起こした症例ではあったが, 臨床症状は改善されていた。この結果は移動量のみで計測では後戻りに分類されるが, 中心軸から顎運動を評価すると, 中心軸は経時的に安定しており, 臨床症状に一致する面がうかがわれた。このことから, 顎運動を顎の変位としてとらえるのではなく, 中心軸から, 顎の安定性の多寡という評価をすることが可能であった。これらの結果から開発したアルゴリズムならびに顎運動計測器の有用性が示唆された。

生体振動を利用した顎口腔機能の診断
一歯周疾患患者の初期治療前後の咬合音による機能的評価一

○吉野祥一^{1,3}, 齊藤孝親^{2,3}, 多田充裕^{1,3}, 大沢聖子^{1,3}, 大川将彦¹, 笹原重^{1,3}日本大学松戸歯学部口腔診断学¹, 総合口腔医学², 口腔科学研究所³

【目的】 歯周疾患患者の初期治療前後における炎症の改善に伴う歯と歯周組織の変化を, 生体振動を利用した顎口腔機能の診断法として比較検討を行った。歯周疾患患者の初期治療前後における, 歯周組織の変化は, 歯根膜の粘弾性などに変化が生じる。この変化が, 歯と歯周組織を系とした共振周波数と, 動的咬合における歯の接触状態に変化をもたらすものと考え, そこで咬合音の振動解析により, 歯と歯周組織の評価を機能的側面より客観的に評価できる可能性を, タッピング運動時の咬合音によって検討した。

【方法】 歯周組織検査と X 線画像診断によって成人性歯周炎と診断された患者で, 顎口腔系に歯周病以外, 自覚的, 他覚的に異常が認められない 12 名を被検者とした。被検者には, 初期治療 (プラークコントロール, スケ-リング, ルートプレーニング) 前と, 約 3 ヶ月間程度の初期治療を行い処置終了 2 週間後に歯周組織の臨床症状の評価 (PD, CAL, GI, PII) および咬合音の測定を行った。咬合音の測定 (2Hz~20KHz) は, 患者に咬合音採取用のヘッドギアを装着し, タッピングにより発生した咬合音を頬骨部より採取し, 解析は LOVAS-12 を用いて咬合音の持続時間, 咬合音波形の多峰性の出現頻度, 周波数帯域について解析した。初期治療の期間は, 約 3 ヶ月である。

【結果・考察】 歯周組織の臨床症状は, PD, CAL, GI, PII において初期治療前と比較して初期治療後では減少を示し, PD, GI, PII では有意な改善が認められた。

初診時の咬合音の持続時間は, 2.40msec であったのに対し, 歯周初期治療後は 1.98msec と有意 ($P < 0.01$) に小さな値を示した。咬合音の波形の多峰性の出現頻度については, 初期治療前と初期治療後の比較では初期治療後で有意に低い値が認められた。また, 周波数帯域の検討においても, 初期治療後に 300~600Hz の周波数成分の有意な減少と 600~900Hz 帯域および 900~1200Hz 帯域の周波数成分が初期治療後では有意な増加を認められた。このことから, 歯周組織の変化により, 咬合音の持続時間, 咬合音の波形の多峰性の出現頻度, 周波数帯域に変化が見られることがわかった。

以上のように生体振動を利用した顎口腔機能の診断法として, 初期治療後における歯周組織の改善状態をタッピング運動時の咬合音によって検討したところ, 歯と歯周組織の共振周波数, 高周波成分の持続時間および波形数によって歯周炎の改善状態を機能的に評価できることが示唆された。

咀嚼と脳の認知機能の解明
一年齢、ERP および咬合圧の関連性一

○青木伸一郎^{1,2}, 伊藤孝訓^{1,2}, 井出壺也^{1,2}, 笹原廣重^{1,2}

日本大学松戸歯学部口腔診断学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 近年、咀嚼機能と精神活動との関連について報告されるようになり、咀嚼機能の改善が単に身体的な影響を与えるばかりでなく精神的な QOL にまで影響を与えている可能性が示唆されている。演者らはこれまでに認知機能の一つである意欲について事象関連電位(ERP)をツールとして実験を重ねてきた。今回、生理的变化である加齢を表す「年齢」、認知機能を表す「ERP」、そして咀嚼機能を表す一つの指標である「咬合圧」との関連について検討を行った。

【方法】 被験者は脳に異常がなく咀嚼に支障のない咬合を有する 23~69 歳の健常者(平均年齢 48.7 歳)31 名である。咬合圧はプレススケールオクルーザーにて測定した。課題は円、三角、四角の鑑別であり、本実験では oddball 課題に準じ、ランダムに連続して 300 回呈示した。記録方法はシールドルーム内において椅子に安静な状態で座位をとらせ 1m 前方にあるディスプレイの中央を見るよう説明し、呈示された試料の中で標的刺激が呈示されたときのみボタン押しするよう指示した。300 試行を最初の 100 回(開始期)、中間の 100 回(継続期)および最後の 100 回(刺激期)に分け、刺激期の試行を開始する前に残りの試行回数を口答で伝え意欲を高め、ERP 成分の変化を測定した。各ステージにおいて測定部位における P300 潜時、P300 振幅を求め、反応時間(RT)、反応時間 SD(RTSD)および咬合圧を含めた各測定値において、目的変量を年齢とし説明変量を Fz 潜時、Cz 潜時、Pz 潜時、Fz 振幅、Cz 振幅、Pz 振幅、RT、RTSD、咬合圧を用いて重回帰モデルを求めた。

【結果・考察】 各ステージにおいて重回帰モデルによる年齢と認知機能および咀嚼機能との関連性について表す。

開始期は (年齢)= $0.124 \times (\text{Fz 潜時}) - 0.123 \times (\text{Cz 潜時}) + 0.051 \times (\text{Pz 潜時}) - 0.117 \times (\text{Fz 振幅}) - 0.055 \times (\text{Cz 振幅}) + 0.154 \times (\text{Pz 振幅}) - 0.113 \times (\text{RT}) + 0.368 \times (\text{RTSD}) - 0.006 \times (\text{咬合圧}) + 32.842$ で、決定係数 $R^2=0.900$ であった。

継続期は (年齢)= $-0.023 \times (\text{Fz 潜時}) + 0.056 \times (\text{Cz 潜時}) - 0.010 \times (\text{Pz 潜時}) - 0.333 \times (\text{Fz 振幅}) + 0.192 \times (\text{Cz 振幅}) + 0.351 \times (\text{Pz 振幅}) - 0.112 \times (\text{RT}) + 0.399 \times (\text{RTSD}) - 0.004 \times (\text{咬合圧}) + 36.786$ で、決定係数 $R^2=0.919$ であった。

刺激期は (年齢)= $-0.340 \times (\text{Fz 潜時}) + 0.342 \times (\text{Cz 潜時}) + 0.004 \times (\text{Pz 潜時}) + 0.677 \times (\text{Fz 振幅}) - 0.593 \times (\text{Cz 振幅}) - 0.741 \times (\text{Pz 振幅}) + 0.045 \times (\text{RT}) + 0.05 \times (\text{RTSD}) - 0.009 \times (\text{咬合圧}) + 46.626$ で、決定係数 $R^2=0.381$ であった。

開始期および継続期における年齢モデルに比べて刺激期では、決定係数が低いことから異なった他の要因の関与が示唆された。

上顎洞サイナスリフトの解剖学的基礎に関する研究
一現代人と古人骨における上顎洞形態・体積の差異について一

○静島昭夫¹, 松野昌展^{1,2}, 金澤英作^{1,2}

日本大学松戸歯学部第 I 解剖学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 歯内療法や抜歯の偶発事故に際して形態の把握が必須な解剖学的部位として知られている上顎洞は、インプラント体の上顎骨内埋入を行う場合においても、歯槽頂から上顎洞底までの距離を考える上で重要視されている。Computed Tomography (以下 CT と略す) は対象の任意の断面の撮影が可能な検査機器であり、これを用いた上顎洞部の精査は、歯科インプラントの一方法としてのサイナスリフトを行うかどうか判定する際に信頼性が高い検査方法として利用されている。上顎洞形態は形質人類学的にも興味を持たれており、日本人の歴史の中でどのような形態の変遷をたどったかを知ることは、現代人における形態の基礎を知るために重要である。今回の研究の目的は、野木がおこなった現代日本人男性の上顎洞に関する研究成果を比較対象として用いながら、古人骨の上顎洞形態の解剖学的検証を行い、時代の変遷に対応した上顎洞・上顎骨の形態変化についての知見をさらに一歩おしすすめることに主眼をおいた。

【方法】 国立科学博物館所蔵の縄文時代から近代に至る古人骨の乾燥頭蓋骨を資料として用いた。これらをアクリル製の保定装置で固定したのちに上顎咬合平面から眼窩上縁までの CT 撮影を行った。CT 装置の使用条件は管電圧 120kv, 管電流 50mA, スライス幅 1mm, スライス間隔 1mm で、FH 平面と平行にシングルスキャンを行った。得られた CT 画像はパーソナルコンピューターで取り込んだのちに、上顎洞部を画像編集ソフトウェアでトレースし、CT Rugle (Medic Engineering, Inc) で立体的に構築した後、トレース部分の体積計測を行った。また併せてマルチンの計測法に従った頭蓋骨の計測を、触角計とデジタルノギス (ミットヨ) を用いて行った。

【結果・考察】 今回は縄文時代人、古墳時代人、室町時代人について頭蓋の一般計測 (頭蓋最大長、頭蓋最大幅、頬骨弓幅の三項目)、CT 撮影、上顎洞の計測を行った。野木の分類に従い、中切歯から第二大臼歯までについて、歯が無いものを無歯顎グループ、欠損があるものを欠損グループ、全部の歯があるものを完全グループとして、グループごとの計測を行った。一般計測値は時代を追うごとに増加の傾向を示し、上顎洞の体積もほぼそれに準じた増加傾向を示した。その結果、上顎洞の体積と骨格の特定の部位のサイズとの対応関係が考えられる可能性が示唆された。

体幹四肢の筋力発揮時における下顎動態と咀嚼筋活動様相
—スポーツにおける咀嚼筋活動様相—

○川良美佐雄^{1,2}, 福本雅彦^{1,2}, 村上 洋^{1,2}, 小林 平^{1,2}, 小見山 道^{1,2}, 鈴木浩司^{1,2}, 浅野 隆^{1,2}

日本大学松戸歯学部総合歯科診療学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 スポーツパフォーマンス発揮時における噛みしめの有無,あるいはその時の咀嚼筋活動量などについては系統立てられた見解が望まれている。また,下顎の動態を含めた顎口腔機能と身体運動との関連についてその一端を明示していくことは意義あることと思われる。演者らは,これまで背筋力発揮時の顎頭位変化と咀嚼筋活動様相について基礎的検討を加えてきたが,今回はボールインパクト種目の一つであるゴルフについて咀嚼筋活動様相を検討したのでその結果を報告する。

【方法】 被験者はゴルフ上級者の男性8名(22~40歳,平均年齢27.3歳)とした。咀嚼筋活動測定にはマルチテレメータシステム(WEB-5000,日本光電,東京)を用いた。被験筋は両側側頭筋前腹,咬筋浅部,および顎二腹筋前腹を選択した。計測にあたっては,双極表面電極からのリード線の長さ,固定に配慮し,スイング動作への妨げはないことを確認し,開始の合図から連続5打の一連の動作を記録した。なお,実験に先立ち,随意的最大噛みしめ,最大開口抵抗およびピーナッツ咀嚼時の筋活動量を測定した。得られたデータより実効値(RMS値)を算出し,側頭筋,咬筋については随意的最大噛みしめ時の筋活動量を,顎二腹筋においては最大開口抵抗時の筋活動量を比較対象として相対比率を求めた。筋活動量の関係についてはANOVA およびTukey-Kramer's Methodを用いて検討した。

【結果・考察】 ゴルフインパクト時の側頭筋,咬筋筋活動量は随意的最大噛みしめに対し,側頭筋で24.7%,咬筋で31.7%を示した。顎二腹筋筋活動量は最大開口抵抗時の筋活動量に対し101.4%であった。ピーナッツ咀嚼時の側頭筋,咬筋筋活動量は随意的最大噛みしめに対し側頭筋で31.8%,咬筋で23.7%を示した。顎二腹筋筋活動量は最大開口抵抗時の筋活動量に対し,21.2%であった。ピーナッツ咀嚼時およびゴルフインパクト時の側頭筋前腹と咬筋浅部の筋活動量は随意的最大噛みしめ時と比較して有意に小さかった。顎二腹筋の筋活動量は最大開口抵抗時と同等で有意な差は認められなかった。以上より,ゴルフインパクト時の側頭筋前腹,咬筋筋活動量は随意的最大噛みしめ時と比較して約25~32%で,ピーナッツ咀嚼時とほぼ同様であり,顎二腹筋は最大開口抵抗と同等の強い筋活動を示す結果を得た。すなわち,インパクト中の咀嚼筋の協調による下顎の固定に際しては,側頭筋前腹および咬筋よりも顎二腹筋の筋活動が優勢に作用することが明らかとなった。

歯科遠隔医療システムの開発
—画像情報や文字情報伝達の標準化について—

○齊藤孝親^{1,3}, 内田貴之^{2,3}, 多田充裕^{2,3}, 吉野祥一^{2,3}, 大沢聖子^{2,3}, 大関一弥^{2,3}, 笹原廣重^{2,3}

日本大学松戸歯学部総合口腔医学¹, 口腔診断学², 口腔科学研究所³

【目的】 遠隔医療や電子カルテなどの医療情報システムを支える基盤として情報交換規格の統一,すなわち標準化は重要であり,医科領域では画像規格や情報伝送の規格化,内容伝達のための病名や所見など用語・コードの標準化が進められ,情報交換基盤が構築されつつある。しかし,歯科領域においては標準化が未整備な部分も多く,医科領域で標準的なDICOM規格や国際疾病分類(ICD-10)コードの利用も病院歯科に限られているのが現状である。

そこで,病診連携も含め歯科遠隔診断システムなど歯科医療情報システムでの情報交換に重要な画像情報や文字情報伝達の標準化について検討を行う。

【方法】 通信基盤であるネットワーク環境について,ブロードバンドで最も普及しているADSLを対象として回線速度など運用上の問題点の検討を行った。

画像等の視覚的情報を伝送する場合も病名など文字情報の添付は必須であることから,標準病名マスターのコードとして用いられているICD/ICD-DAの分類項目名と日常臨床で頻用されている歯科臨床病名との関係について比較検討を行った。

【結果・考察】 最大8/12Mbpsの下り回線速度が可能なADSLであっても,交換局からの道のり距離2km未満にもかかわらず回線速度が4Mbpsを確保できない場合がみられた。このことは画像などの大容量ファイル送受信時の障害となるため,病診連携や遠隔歯科医療実施に先立ち回線速度の実測が重要と考えられた。

ICD/ICD-DAでは埋伏歯をembedded, impactedで分類する,歯性上顎洞炎,智歯周囲炎などは分類項目名として明記されていないなど,ICD/ICD-DAの分類項目名と日常の歯科臨床病名とはやや差異がみられた。

画像伝達時の標準化として,画像撮影時の色票写し込みによる補正などについて検討を加える予定である。

非破壊的方法による前臨床う蝕の診断法の確立

○後藤田宏也^{1,3}, 田口千恵子¹, 有川量崇^{1,3}, 水野恭子¹, 金田 隆^{2,3}, 佐久間汐子⁴, 小林清吾^{1,3}

日本大学松戸歯学部衛生学¹, 放射線学², 口腔科学研究所³, 新潟大学医歯学総合病院口腔保健科⁴

【目的】 現在行われているう蝕診断法は視診・触診法が主流である。しかし、触診ではシャープな歯科用探針を用いるため歯質破壊を生じさせてしまうことが指摘されている。臼歯小窩裂溝部では視診が困難であり、前臨床う蝕の段階はX-ray 診断でも困難である。また、視診・触診法は診査者の主観に基づく方法であるため診断の再現性が劣っている。近年開発されたレーザーう蝕診断器(ドイツ, KAVO 社製)は、レーザー蛍光線を利用し非破壊的診査法であり、再現性のあるデジタル情報が得られる方法である。本研究の目的は、非破壊的方法による前臨床う蝕の診断法を確立することである。1) レーザーう蝕診断器の特性の把握と臨床診断における適切な条件の確立、2) 視診・触診法とレーザーう蝕診断法との相関性、3) 視診・触診法とレーザーう蝕診断法のう蝕臨床像との対応、4) それぞれの診断法のう蝕検出精度、について検討する。今回この研究の一環として、学童の永久臼歯を対象に、う蝕の形成がない小窩裂溝部の臨床診断とレーザー診断器(以下: DIAGNOdent) 測定値の関係について、臨床疫学的な比較検討を行った。また、マイクロCTを用いることによる非破壊的なう蝕診断の可能性を検討した。

【方法】 沖縄県の一地区の学童を対象として視診・触診とDIAGNOdentを用いて診査を行った。小窩裂溝部を視診にてう蝕の有無、色調(着色、白濁)について診査を行い、続いてシャープな歯科用探針にてスティッキー感の有無を判定した。続いて歯面の乾燥前、乾燥後、清掃・乾燥後のDIAGNOdentの測定値について比較検討を行った。また、CO~C2程度の抜去歯牙をマイクロCT用いて観察・分析を行った。

【結果・考察】 DIAGNOdent値の乾燥前/乾燥後において有意な差が認められた。DIAGNOdent値のcut-off point: 20におけるスティッキー感の有無との対応を検討したところ、kappa値=0.49で中等度の一致率であった。陽性反応適中率(p.p.v.): 60%, 陰性反応適中率(n.p.v.): 87%でn.p.v.が高く、レーザーう蝕診断はスティッキー感の無い歯の検出に有効であることが示唆された。また、マイクロCTは歯の構造を観察する上で、歯を切片化することなく容易に非破壊的にう蝕を検知でき、有用な方法であると考えられた。現在、マイクロCTとDIAGNOdentによる診断結果を比較分析し、初期う蝕の診断の有用性を検討中である。

光を利用した初期う蝕診断法の開発

○三好克実¹, 山崎 優¹, 清水邦彦^{1,2}, 前田隆秀^{1,2}

日本大学松戸歯学部小児歯科学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 小児歯科の健康診査において幼若永久歯の初期う蝕の診断は重要である。従来から用いられている探針によるう蝕診査は再石灰化の可能性のあるエナメル質に破壊を起こし、う蝕を促進してしまう危険が報告されている。幼若永久歯のエナメル質は石灰化が未熟なためう蝕感受性が高く、う蝕は成立するとその進行が速いという特徴があり、う蝕症の見落としは幼若永久歯にとって致命的となる。しかし一方、カルシウム、リン、フッ素などの無機質がエナメル質表面に沈着し再石灰化し易いという特徴も併せ持つ。従って再石灰化が可能なCOとう蝕Cとの鑑別が重要である。近年、光を利用したう蝕診断器としてDIAGNOdentが開発された。そこで視診、擦過による触診によるう蝕診査とDIAGNOdentさらにはDentocult SM, Dentobuff strip, 5分間咀嚼唾液量を測定して精度の高いう蝕診断法を検討することを目的としている。

【方法】 幼若第一大臼歯と第二大臼歯を有する男子19名、女子18名から視診、触診によって健全歯と診断された幼若永久歯8歯、COと診断された17歯、Cと診断された12歯を対象として、パラフィンワックス5分間咀嚼時の唾液量、Dentobuff Strip値、Dentocult SM値ならびにDIAGNOdent値を測定した。

【結果・考察】 以下の結果を得た。

1. 幼若永久歯の咬合面小窩裂溝齶蝕部の健全歯、CO、Cの診断は、明視下での視診と小窩裂溝部の軽い擦過による触診でほぼ満足できることが明らかになった。
2. 齶蝕診断と事後措置を含めたその対応には視診・触診だけではなく光学的診断器であるDIAGNO dentTMと齶蝕活動性を評価できる細菌学的診断が有用であることがわかった。
3. 簡便なDentocult SM値でも齶蝕活動性を評価できると思われた。
4. Dentocult SM値0.1.2におけるDIAGNO dent値間には有意差が認められた。

○久山佳代^{1,7}, 妻鹿純一^{2,7}, 落合智子^{3,7}, 遠藤弘康^{4,7}, 小林清吾^{5,7}, 後藤田宏也^{5,7}, 有川量崇^{5,7}, 泉福英信⁶, 山本浩嗣^{1,7}

日本大学松戸歯学部病理学¹, 障害者歯科学², 細菌学³, 歯周病学⁴, 衛生学⁵, 国立感染症研究所⁶, 口腔科学研究所⁷

【目的】 肺炎はわが国では、依然 65 歳以上の高齢者における死亡原因の 4 位に挙げられている。高齢者肺炎は micro aspiration における不顕性誤嚥と気道閉塞による顕性誤嚥に分類され、いずれも病理組織学的に細菌性気管支肺炎の像を呈する。特に前者は、口腔および咽頭常在菌の吸引によるため、歯科領域と密接な関係を有するため興味深い。しかし、不顕性誤嚥による肺炎の実態調査は非常に困難である。そこでわれわれは、不顕性誤嚥に着眼し、千葉県内にある 2ヶ所の某総合病院において 1998-2002 年に経験した全剖検例のうち、死因に不顕性誤嚥が大きく関与したと考えられた剖検例 8例について臨床および病理組織学的に詳細に検討を加え、若干の興味深い知見を得たので報告する。

【方法】 ご遺族にインフォームド・コンセントを行い、剖検承諾を得た剖検例 375 例について、死亡に至るまでの臨床情報および病理組織学的所見を検索して、病理組織学的に死亡原因に大きく関与し、さらに臨床的背景に不顕性誤嚥が考えられた 8 例を抽出した。これらについて臨床病理学的検討として死亡に至るまでの経過、治療、臨床データおよび剖検時肉眼所見について解析を加え、さらに病理組織学的検討として免疫組織化学染色を施した。

【結果・考察】 全症例を主死因ごとに分類すると悪性腫瘍 183 例(48.8%)、炎症 73 例(19.5%)、そのうち肺炎 27 例(7.2%)、循環障害 56 例(14.9%)、その他 63 例(16.8%)であった。副死因も含めて、不顕性肺炎を発症していたのが 8 例(男 7, 女 1)であり、その臨床内訳を示す。平均年齢は 75±12 歳、既往歴は陳旧性脳梗塞 2 例、大酒家 2 例、右半回神経麻痺 1 例、四肢麻痺 1 例などであった。喀痰細菌培養検査の結果、口腔内常在菌のみが認められたのが 3 例であった。剖検時はいずれの症例も左右両気管支に膿性ないし粘調性内容物を認め、右肺により炎症が強くみられたのが 6 例であった。病理組織学的に、細菌性細気管支炎の所見と一致し、さらにアポトーシスを検索すると、肺炎症例では対照と比較して細気管支線毛円柱上皮細胞ないし、気管支周囲平滑筋細胞に陽性細胞数が有意に多く認められた。以上の結果からこれらの症例は、誤嚥を惹起する基礎疾患を有する場合が多く、また気管支内容物には口腔常在菌が認められたことから、不顕性誤嚥の繰り返しが存在したものと推察された。組織学的に誤嚥を増長させる要因の一つとして、気管支線毛円柱上皮細胞および周囲平滑筋細胞でみられたアポトーシスの亢進が病因に関与していることが示唆された。

5-1-44

唾液および唾液腺機能の再構築

—耳下腺腺房細胞の初代培養系への外来遺伝子の導入—

○吉垣純子^{1,2}, 通川広美^{1,2}, 杉谷博士^{1,2}

日本大学松戸歯学部生理学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 唾液は口腔内 pH の維持や抗菌作用など重要な役割を担っている。シェーグレン症候群などの唾液腺の機能低下により唾液分泌量が減少すると、ドライマウスやそれに伴う重度の齶蝕が引き起こされる。唾液腺腺房細胞は原唾液を産生するが、自律神経の支配を受けてその分泌量や組成が変化する。このような唾液腺の機能および調節機構がどのように維持されているかを知ることは口腔機能維持のために重要であり、特にどのような遺伝子が関与しているかを調べるのが求められている。現在までに、唾液分泌能が維持されている培養細胞は確立されていないため遺伝子導入などのシステムが使えず、分子生物学的解析が進んでいない。我々は唾液腺腺房細胞の初代培養系を用い、外来遺伝子を導入する系の確立を試みた。

【方法】 ラット耳下腺組織からコラゲナーゼおよびヒアルロニダーゼ処理により腺房細胞を単離する。コラーゲン I, コラーゲン IV, ラミニン, マトリゲル (Falcon) などの細胞外マトリクスをコートしたディッシュ上で 10 % ラット血清を含む培地を用いて培養した。培養 24 時間後および 48 時間後の細胞の形状を観察し、細胞内のアミラーゼ量、 β アドレナリン受容体刺激であるイソプロテレノール添加によるアミラーゼ分泌能を測定した。また、腺房細胞単離直後に pEGFP-C1 ベクター (CLONTECH) を遺伝子導入試薬 DMRIE-C (Invitrogen) を用いて細胞内に導入し、enhanced green fluorescence protein (EGFP) の発現を、共焦点レーザー顕微鏡 μ Radiance MR/AG-2/S (BIO-RAD) を用いて確認した。

【結果・考察】 単離腺房細胞は細胞外マトリクスをコートしたディッシュ上で培養することにより、基底面への接着およびフィロポディアの形成が見られた。細胞内に含まれるアミラーゼ量は単離直後に比較すると、24 時間で 1/2, 48 時間後には 1/10 に減少していた。24 時間後のアミラーゼ分泌能を測定したところ、イソプロテレノール添加により分泌量の増加が見られ、その反応性は単離直後の腺房細胞と同程度であった。48 時間後でも刺激依存性は低下したものの観察された。したがって、48 時間以内であれば、分泌能の測定が可能である。DMRIE-C による遺伝子導入により、5-10 % の細胞で EGFP の発現が見られ、48 時間後も維持されていた。今後この系を用いて、様々な外来遺伝子を導入しその影響を解析することによって、唾液分泌能の維持に必要な遺伝子を同定していくことが可能であると期待される。

ヒト顎口腔機能の感覚と運動に関する中枢制御
 ー主成分分析を用いた脳血流計測データからの咀嚼筋血流の分離についてー

○成田紀之^{1,3}, 川崎真護², 石井智浩^{1,3}, 松本敏彦^{1,3}

日本大学松戸歯学部第Ⅲ補綴学¹, 日立メディコ応用機器開発室², 口腔科学研究所³

【目的】 これまでに、非侵襲的脳活動計測法としての光トポグラフィーを用いて咀嚼・嚥下時の大脳皮質脳血流の計測を行ってきた。咀嚼時の咀嚼野ならびに一次感覚運動皮質/顔面野領域からの血流計測に際しては咀嚼筋、とくに側頭筋筋血流による血流データへの干渉が認められる。そこで、主成分分析法を用いて咀嚼・嚥下運動時の血流計測データから筋血流成分の分離を試みた。

【方法】 光トポグラフィー (NIRS: near infrared spectroscopy: ETG-100 HITACHI) により、顎口腔機能運動として咀嚼ならびに嚥下運動時の脳血流計測を行った。計測に先立ち、一次感覚運動皮質ならびに咀嚼・嚥下野を含む頭蓋領域にプローブ (照射-検出間 30 mm, 24 CH) を装着した。いずれの運動も安静 40 秒後に 10 秒間行わせ、それを 5 回繰り返した。データの加算処理は運動前、後における安静 20 秒間と運動 10 秒間を対象とした。計測された全被験者の脳血流データを加算平均したのち、主成分分析による波形解析を行った。さらに、この主成分分析の結果をもとに脳血流ならびに筋血流の波形パターンへの評価とともに画像表示システムを介して 3 次元トポグラフィー画像を脳磁気共鳴描画に転写してそれぞれの局在を検討した。

【結果・考察】 1) 咀嚼時の血流データにおいて、第 1 主成分は運動に関連した脳血流変化の典型的なパターンを示した。一方、第 2 主成分は運動直後に血流が低下し、運動後に上昇するといった筋収縮を推察させる血流変化のパターンを示した。さらに、第 1, 2 主成分それぞれの脳磁気共鳴描画上における機能局在は、第 1 主成分の血流変化は咀嚼野および一次感覚運動皮質/顔面野領域に一致した外側皮質領域に示され、さらには内側皮質領域に及ぶ広範な分布パターンを示した。咀嚼時血流データの第 2 主成分は計測領域の外側部に示され、側頭筋筋腹の筋血流と推察された。2) 嚥下時の血流データにおいて、第 1 主成分は一次運動野の血流変化パターンとは明らかに異なり、運動発現に先立って血流を上昇した。さらに、その局在が内側皮質領域に示されたことから、運動の企画にかかわると補足運動野の活動性と考えられた。一方、第 2 主成分は外側皮質領域に示され、さらに明らかな筋血流の干渉を認めないことから、主に嚥下に関連した一次感覚運動皮質ならびに咀嚼・嚥下野の活動性と推察された。

デジタル画像による口腔領域再構築の評価

○金田 隆^{1,5}, 葛西一貴^{2,5}, 妻鹿純一^{3,5}, 宇都宮忠彦^{4,5}, 木場秀夫^{4,5}, 山本浩嗣^{4,5}

日本大学松戸歯学部放射線学¹, 歯科矯正学², 障害者歯科学³, 病理学⁴, 口腔科学研究所⁵

【目的】 近年、エックス線 C T, 磁気共鳴画像 (MRI) のみならず単純エックス線写真までデジタル画像に変換され、日常臨床にてフィルムレスの時代になりつつある。しかしながらデジタル画像による口腔領域再構築の応用はいまだ十分に検討されておらず、臨床応用も十分な検討がなされていない。本研究の目的は C T, MRI ならびに単純エックス線写真のデジタル画像を用いて顎口腔領域の正常デジタル画像の検討、矯正や顎変形等の診断や治療前後のデジタル画像評価、および種々の顎口腔領域疾患への再構築の評価である。

【方法】 デジタル画像評価は Computed Radiography のマルチ周波数処理によるパノラマやセファログラムの画像収集および評価、Computed Radiography や C T による矯正および顎変形治療の画像収集および評価、MRI の各シーケンスによる顎骨の正常および異常像の収集および評価、MRI 各シーケンスのファントム実験とその評価、および顎口腔領域疾患のデジタル画像の収集と評価を行った。

Computed Radiography のマルチ周波数処理によるパノラマやセファログラムの画像評価はマルチ周波数を施したパノラマやセファログラムを用いて観察点を設定し、マルチ周波数を高周波、低周波および中間周波数で処理した画像にて評価した。パノラマエックス線写真は正常像、病変の検出能、性状を検討した。セファログラムは観察点を設定し、マルチ周波数を高周波、低周波および中間周波数で処理した画像にて評価した。MRI の各シーケンスによる顎骨の正常および異常像の評価は、まずファントムを用いて最適な撮影条件を検討した。撮影シーケンスは SE 法、脂肪抑制像として STIR 法を用いてファントム実験を行った。撮像シーケンスは TR, TE, TI を変化させ、大きさおよび形態を変化させたファントムの脂肪や水の検出能の画像評価を行った。顎口腔領域の応用と評価は 162 症例の正常像と代表的炎症性疾患として 21 症例の下顎骨骨髓炎の画像評価をおこなった。検討項目は体軸横断像を用いて下顎骨 (骨髓、皮質骨) および周囲軟組織の信号強度を検討した。なお臨床例については本学倫理委員会の了承を得た (承認番号: EC02-049 号)。

【結果・考察】 Computed Radiography のマルチ周波数処理によるパノラマやセファログラムの画像評価は骨を中心とした硬組織の評価は高周波処理が優れていた。軟組織の評価は中周波数が優れていた。パノラマエックス線写真は正常像、病変の検出能、性状を検討したが、顎骨の評価は高周波処理が優れていたが含気空洞や軟組織の描出の評価は中周波数が優れていた。セファログラムは各測定部位の観察はマルチ周波数を中間周波数で処理した画像が全体的に評価点が高かった。臨床例としての矯正や顎変形等の治療前後のデジタル画像評価は症例のさらなる収集をはかる必要がある。MRI の各シーケンスによる顎骨の正常および異常像の評価は、まずファントムを用いて最適な撮影条件を検討した。脂肪抑制法の STIR 法の最適な条件は TR : 1,500~3000, TE : 30, TI:100 であった。臨床例についての MRI 検討例にて下顎骨骨髓は T1, T2 強調像ともに 162/162 例(100%)が高信号を示し、STIR 法にて 162/162 例(100%)が低信号を示した。下顎骨皮質骨は 162/162 例(100%)が低信号を呈した。周囲軟組織はリンパ節および顎下腺は 162/162 例(100%)が高信号を呈した。

下顎骨骨髓炎の症例にて STIR 法にて下顎骨骨髓および周囲軟組織は高信号を呈し、炎症の波及に有効なシーケンスと考えられた。

今後は今回の基礎的な結果にもとづき症例収集をはかる必要がある。特に、Computed Radiography のマルチ周波数処理によるパノラマやセファログラムの臨床例の画像評価、Computed Radiography や C T による矯正および顎変形治療前後の評価、MRI の各シーケンスによる異常像の評価および顎口腔領域疾患のデジタル画像の収集と評価をはかる必要がある。

グラム陽性細菌による有用物質生産系を応用した口腔機能の促進
—*P. gingivalis* HBP35 の変異導入による機能解析—

○城座映明^{1,2}, 岡野総一郎¹, 柴田恭子^{1,2}, 安孫子宜光^{1,2}

日本大学松戸歯学部生化学¹, 口腔科学研究所²

【目的】 歯周病・う蝕などの口腔疾患の予防法の1つに受動免疫法が挙げられ、その際、標的となる病原因子の性質を明らかにする必要がある。*P. gingivalis* の歯周病への関与は、口腔内常在菌との共凝集、上皮細胞への付着などのステップで進行し、各段階に関与するタンパク質が病原因子と考えられる。*P. gingivalis* の表層タンパク質の1つである HBP35 はヘミンとの結合、および *S. gordonii* との共凝集に関与することが実験的に示されているが、その塩基配列の解析から更に多彩な機能を有することが示唆されている。当研究ユニットでは HBP35 の thioredoxin (TR) としての役割を明らかにするため、部位特異的変異により Cys から Ser へのアミノ酸置換を導入した変異 HBP35 を調製し、その機能解析を試みた。

【方法】 ミスマッチを含む、完全に相補な2本の PCR プライマーを、および、プラスミド上で標的部位とはほぼ反対側にあたる領域に、約 100 bp の間隔でオーバーラップするような2本の PCR プライマーを化学合成した。これらのプライマーを組み合わせて得られる2種の PCR 産物では両末端が共通領域である。この2種の PCR 産物をエキソヌクレアーゼで処理して両末端を部分的に1本鎖とした後、大腸菌に直接導入し、変異の導入されたプラスミドを有する形質転換体を得た。得られたプラスミドをタンパク質の S-S 結合能を欠損した大腸菌変異株 (dsb-) に導入し、アルカリ性ホスファターゼ (AP) 活性、および軟寒天上での運動能 (MT) の検討を行った。

【結果・考察】 大腸菌 AP は分子内に S-S 結合を有するので、dsb- 株では AP 活性は弱く、また MT も低い。本変異株に HBP35 をコードするプラスミドを導入したところ、AP 活性の回復が認められた。また、TR の活性中心に存在する Cys を Ser に変えた変異タンパク質をコードするプラスミドを導入した場合には AP 活性の回復が低下した。一方、本変異株の MT は、本来の HBP35 をコードするプラスミドを導入してもそれほど回復は見られなかった。しかしながら、Cys を Ser に変えた変異タンパク質をコードするプラスミドを導入した場合には大幅に増強され、Cys を Ala に変えることによりバックグラウンドレベルとなった。近年の報告によれば、Cys を Ser に変えた場合でも TR 活性を有することが示されている。以上より、HBP35 は TR としての機能を有することが明らかとなり、本活性を阻害する抗体を得ることにより、歯周病に対する新たな受動免疫の経路が開かれるものと期待される。

口腔組織の病態解明と遺伝子導入による口腔環境の改善

○斉藤重野^{1,4}, 早川光央^{2,4}, 平塚浩一^{1,4}, 神野良一^{3,4}, 安孫子宜光^{1,4}

日本大学松戸歯学部生化学¹, 化学², 口腔外科学³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 唾液には、細胞増殖因子や殺菌作用物質などが含まれ多彩な機能を果たしている。高齢化に伴って、口腔組織の創傷や口腔感染症が増大するといわれていることから、唾液腺での老化により発現低下する遺伝子を探索することは、遺伝子導入による機能回復に有意義であると考えられる。すでに GeneChip 解析法により老齢マウスで、発現が低下する 6,500 遺伝子を探索し、遺伝子導入に有用な標的を探索してきた。一方、UniGEM V アレイに含まれ顎下腺中で発現している 12 成長因子の加齢による遺伝子発現変化では、インスリン様成長因子 1 (IGF-I) 遺伝子で約 2 倍の低下がみられた。ついで IGF の 11 関連遺伝子についてデータ解析した結果、変動しているのは IGF-I のみであった。そこで本研究では、mRNA レベルの変動を Real-time PCR 法で定量するとともに ELISA 法にて遺伝子産物 IGF-I 量を測定した。さらに GeneChip マウス 12,000 遺伝子を用いてマウス顎下腺の老化で発現変化する遺伝子をモニターした。

【方法】 SAM-P1 マウス、1,5,9 ケ月齢の顎下腺を摘出し、細切後、ホモジネートを作成し遠心後、上清画分中の IGF-I 量を ELISA 法で測定した。また、顎下腺組織に Trizol 溶液を添加し、Fast Prep (FP120; BIO101, Vista) システムを用いて組織を破壊して総 RNA 画分を回収、精製後、real-time PCR および Affimetrix mouse 12,000 遺伝子 GeneChip にて遺伝子発現解析を行った。

【結果・考察】 UniGEM V アレイに含まれ顎下腺内で遺伝子発現変化が認められた IGF-I に関して更なる検証を試みた。Real-time PCR 法では 1 ケ月齢に比べて IGF-I mRNA レベルは 5 ケ月齢および 9 ケ月齢ではそれぞれ約 68%, 45% 低下していた。ついで ELISA 法で IGF-I 量を測定したところ、1 ケ月齢に比べて 5 ケ月齢および 9 ケ月齢ではそれぞれ約 53%, 42% 低下していた。これらのことから顎下腺の IGF-I は老化によって遺伝子発現レベルで低下し、唾液腺への遺伝子導入による生理機能の回復あるいは改善を IGF-I 遺伝子で試みることは意義あるものと考えられる。

Bioavailability を考慮したフッ化物測定法の開発
— 独自に開発した換気式微量拡散法によるフッ化物定量法の検討 —

○小林清吾^{1,3}, 田口千恵子¹, 有川量崇^{1,3}, 後藤田宏也^{1,3}, 水野恭子¹, 平田幸夫², 荒川浩久²

日本大学松戸歯学部衛生学¹, 神奈川県歯科大学口腔衛生学², 口腔科学研究所³

【目的】 本研究では、食品含有フッ素のうち生体吸収・代謝の主役と考えられる無機フッ化物(以下、F-)を対象に、この生体利用能 (bioavailability) を in vivo で評価する方法確立を目的とし、新開発装置の有用性を検討した。

【方法】 1) 換気式陰圧微量拡散法による自動 F-分離装置の開発：装置は、拡散液槽、反応槽、捕集槽、換気シリンジで構成し、密閉系である。動力としては、体積可変シリンジのプランジャ保持台が交互に動き、連結された各部分に空気と反応ガスを一定時間を持って自動的に移動させる。弁の開閉動作のタイミングを組み合わせることにより、反応槽内の陰圧度を任意に調節する。2) 測定精度評価：拡散液には HMDS 飽和 5.0M HClO₄ 40ml, 捕集液には 0.01M NaOH 2ml を用いた。試料として 0.1ppm F-標準液, 牛乳(明治)40ml を用いた。拡散終了後、F-複合電極にて測定した。

【結果・考察】 1) 開発装置の特徴：① 装置内部が陰圧で反応ガスが漏れない, ② 反応槽の温度, 拡散液の濃度, 換気速度を管理し反応速度をコントロールできる, ③ 捕集槽が独立でタイムリスポンス測定が可能, ④ 濃度濃縮 (20 倍) により, 電極の限界値上回る濃度で正確に測定可。2) 測定結果：① 0.1ppm F-標準液の回収率は 101%, CV 値 1.4% であった。② 牛乳に F-標準液を添加した回収実験において, 0.1ppm F-標準液の回収率は 92%, 0.5ppm F-標準液では 86%, 1.0ppm F-標準液では 86% であった。③ タイムリスポンス測定で, F-標準液のみの場合と牛乳に混合した場合で比較した。標準液の場合, 20 分で約 80%, 1 時間で 100% の回収率であった。回収曲線の推移より, 実際に 100% 回収率を示すのは約 40 分と見積もられた。一方, 牛乳に標準液を混合した場合は 1 時間で 57%, 4 時間でも 92% の回収率であった。これら回収曲線をもとに, 標準液の 100% 回収率となる拡散時間を 40 分とすると, この時点で, 牛乳に混合した標準液の拡散率は約 40% と算定できた。このような同一時間における拡散率の違いは, 食品毎の生体利用能を相対的に反映しているものと考察された。④ [食品試料] と [食品試料 + F 標準液] の比較から, 拡散反応の途中で拡散率 100% における F-濃度を推定する方法を検討した。3) 今後：人工胃液, 体温の条件で, 種々食品を対象に拡散率を比較し, また生体実験の結果と比較しながら, 食品中 F-の生体利用能評価を試みる予定である。

5-3-50

粘膜免疫を応用したう蝕と歯周病のワクチン開発
— *P.gingivalis* 外膜タンパク抗原の経皮免疫による抗原特異的抗体応答の誘導 —

○前場智実¹, 浪越 順¹, 早川光央^{2,4}, 安孫子宜光^{3,4}, 山本正文^{1,4}, 大竹繁雄^{1,4}

日本大学松戸歯学部総合口腔医学¹, 化学², 生化学³, 口腔科学研究所⁴

【目的】 本実験は、歯周病予防ワクチンの開発を目的としている。現在行われているワクチンの投与方法は注射によるものが主流であるが、この方法には無菌的に作製した高純度の抗原を必要とすることや強い副作用、針刺しによる医療事故、注射によるワクチン接種ではワクチン療法が標的とする病原体の進入経路と異なる等の欠点がある。また注射によるワクチン接種法では、全身系組織に抗原特異的抗体を誘導することは可能であるが、歯周病予防にとって最も重要であると考えられる唾液腺などの粘膜系組織に抗原特異的抗体はほとんど誘導されない。近年、皮膚に貼剤を用いた経皮免疫法により全身系及び粘膜系に抗原特異的抗体応答の誘導が認められることが示唆されている。そこで、注射によるワクチン投与の欠点を改善し、さらに貼剤を用いるだけで手軽に行える経皮免疫により抗原特異的な抗体を唾液や歯肉溝浸出液に誘導するワクチンの開発を試みた。

【方法】 BALB/c マウスの背中の中毛を剃りエタノールで消毒した後、*P.gingivalis* の 40-kDa 表層タンパク抗原(40-k-OMP) を、アジュバントのコレラ毒素(CT)と共にガーゼにしみこませ、24 時間塗布した。抗原投与は、週 1 回、計 3 回行った。免疫後、40-k-OMP を経皮免疫したマウスの唾液における抗原特異的 IgG 抗体価、また、血清における抗原特異的 IgA および IgG 抗体価を ELISA 法を用いて測定した。また、経皮免疫したマウスの脾臓および頸部リンパ節よりリンパ球を分離し、40-k-OMP で再刺激後、[3 H] チミジンの取り込みによる細胞増殖活性を測定した。さらに、Kolenbrander, P.E. らの方法に準じて *P.gingivalis* 381 のベシクルと *S.gordonii* challish との協凝集活性試験を行った。

【結果・考察】 40-k-OMP を経皮免疫した群では、血清中に 40-k-OMP 特異的 IgG 抗体価の顕著な上昇が認められた。IgG サブクラスを測定した結果、40-k-OMP 単独免疫群、40-k-OMP と CT を免疫した群ともに、IgG1 抗体価が最も高かった。唾液中の 40-k-OMP 特異的 IgG 抗体価を経時的に測定したところ、40-k-OMP を CT と共に経皮免疫した群では初回免疫の 1 週間後より顕著な抗体価の上昇が認められた。また、最終測定時の 42 日目まで高い抗体価を維持していた。しかしながら、40-k-OMP 単独免疫群では、40-k-OMP 特異的 IgG 抗体価の誘導は僅かであった。IgG サブクラスを測定した結果、血清 IgG と同様に 40-k-OMP と CT を免疫した群で IgG1 抗体価が最も高かった。40-k-OMP を CT と共に免疫した群ともに脾臓および頸部リンパ節のリンパ球は 40-k-OMP 特異的細胞増殖活性を示した。さらに、40-k-OMP 特異的 IgG 抗体で前処理した *P.gingivalis* のベシクルと *S.gordonii* の混合液では顕著な共凝集の阻害が認められた。以上の結果より、40-k-OMP の経皮免疫は、*P.gingivalis* 感染に対する抗原特異的抗体を誘導するために効果的であると考えられ、歯周病予防ワクチンとして高い有効性を持つことが示された。

○柴田恭子^{1,5}, 早川光央^{2,5}, 久保田 守³, 田原知幸⁴, 安孫子宜光^{1,5}日本大学松戸歯学部生化学¹, 化学², 日本たばこ産業株式会社³, キリンビール医薬探索研⁴, 口腔科学研究所⁵

【目的】 病原因子の機能ドメインや主要エピトープを利用したコンポーネントワクチンは安全性が高いといわれている。また、抗血清や精製抗体を利用して病原因子を中和する受動免疫は安全性が高く、とくに口腔への投与は危険性が極めて低いとされている。これまで歯周病の重要な原因菌である *Porphyromonas gingivalis* の定着に関与する 40-kDa 外膜タンパク質, 130-kDa 赤血球凝集因子, 200-kDa 膜関連タンパク質の遺伝子をクローニングを行い、その病原因子のエピトープ部位, 機能部位を特定することを目指してきた。そして、これら病原因子活性を中和できる安全な受動免疫抗体として組換え単鎖 Fv 抗体の開発を行ってきたが、さらに、ヒト B 細胞を不死化できる Epstein-Barr Virus (EBV) 感染法やヒト抗体遺伝子をもつトランスジェニックマウスを応用して病原因子の機能を中和できる安全な受動免疫療法用抗体として、ヒト型抗体の作成を試みた。

【方法】 組換え 130-kDa 赤血球凝集因子を用いて血清抗体価の高いドナーからリンパ球をパンニングし、Epstein-Barr ウイルスを感染してヒト型抗体産生 B 細胞を選択した。ヒト抗体遺伝子をもつトランスジェニックマウス, Xeno mouse, Transchromo-mouse, にそれぞれ 130-kDa 赤血球凝集因子, 40-kDa 外膜タンパク質遺伝子を免疫し、ハイブリドーマを作出し、病原因子活性を阻害するヒト抗体を作成した。組換え 40-kDa 外膜タンパク質を精製し、クロスリンク剤でポリマーを作成し赤血球凝集活性を調べた。モノクローナル抗体を用いた phage display epitope mapping 法を用いてエピトープ部位を特定した。さらに合成ペプチドを化学合成し、病原因子活性に対する影響を調べた。40-kDa 外膜タンパク質遺伝子, 200-kDa 膜関連タンパク質遺伝子の塩基配列を解読し DNA データベースを用いてホモロジー検索を行なった。さらに 200-kDa 膜関連タンパク質遺伝子のサブクローニングを行い組換えタンパク質の量産を試みた。

【結果・考察】 EBV 法, Xeno mouse ハイブリドーマで得られたヒト型抗体は、濃度依存的に *P. gingivalis* の赤血球凝集活性を阻害した。40-kDa 外膜タンパク質遺伝子の解析の結果、本遺伝子がヘミン結合タンパク質である可能性が示唆され、Transchromo-mouse ハイブリドーマで得られたヒト型抗体は共凝集活性、ヘミン結合活性を阻害し、また、好中球の貪食作用を活性化した。組換え 40-kDa 外膜タンパク質のポリマーは赤血球凝集活性をもち、組換えタンパク質に対する抗体が赤血球凝集活性を阻害した。さらに phage display epitope mapping 法で特定された合成ペプチドを用いた competition assay により、赤血球凝集活性の阻害が証明された。200-kDa 膜関連タンパク質遺伝子塩基配列のデータベース検索によって、*P. gingivalis* の HagA 遺伝子であることが判明した。HagA は赤血球凝集因子の一つであることが報告されていることから、サブクローン遺伝子産物を精製し抗血清を作成したところ赤血球凝集活性を阻害した。これらの結果から、さらに *P. gingivalis* の病原因子の分子標的を明確にした有効な免疫療法の開発が期待できる。

2004年2月28日(土) 研究成果中間報告会

