

第73回日本大学歯学会総会・学術大会

動画配信期間 令和3年5月16日(日)～令和3年5月30日(日)

youtubeによる限定公開

《一般講演》

《特別講演》

骨および歯による年齢推定の実際と最近の動向

網干博文 日本大学歯学部法医学講座

歯科的個人識別作業における身元不明死体の検査では、後日入手されるかもしれない生前の歯科資料を念頭に、いかに個人の特定につながる情報を収集できるかが鍵となる。該当者絞り込みのための高い精度の情報提供は、その後の警察捜査の方向性をも左右し、事件の解決にも寄与する。

骨及び歯の成長変化は20歳代前半まで継続することから、若年層に属する遺体では歯の成長発育や萌出状態をもとに比較的正確な年齢推定が可能となる。しかし、成人以降の年齢層においては退行性の加齢変化を指標とするしかなく、また、生活様式、健康・栄養状態でその変化の様相が大きく変動することから、年齢の推定精度は低下する。試料(骨や歯)が完全であれば、肉眼的及びエックス線学的な非破壊検査が行われるが、断片化した試料については破壊的な組織学的検査法も選択される。

歯髓腔の生理学的な退縮は、環境による影響が少なく年齢と相関のある安定した指標として知られる。講演者の講座でも1974年から歯髓腔の狭窄化を簡便かつ非破壊的に捉える年齢推定法の開発に着手し、エックス線フィルム上で設定した歯髓腔の幅、高さおよび面積値の比、また1990年代にはデジタルエックス線撮影画像上で設定した歯根部歯髓腔幅の部位別計測値、さらに2000年代に入り新たに開発された歯科用エックス線CT撮影装置による根部歯髓腔の横断面面積比、そして μ CT撮影装置による3次元計測値から根部歯髓腔の体積比をそれぞれ変数とした年齢推定法を相次いで発表し、良好な結果(実年齢と推定年齢との重相関係数:0.70～0.85)を得ている。

一方、1975年 Helfmanらは、象牙質中のアスパラギン酸のラセミ化反応に注目し、加齢に伴いD-アスパラギン酸が蓄積していくことを見出し、この変化を年齢推定に利用した。日本でも1984年以降、萩野ら、大谷らがガスクロマトグラフィーを用いて年齢推定を行い、その法医学的有用性を報告している。また最近、HorvathらによりDNAのメチル化(エピジェネティックな変化)の程度と暦年齢の相関が示され、これを指標とした年齢推定法が発表され始めており、我々も歯由来のDNAを試料に、新たにリアルタイムメチル化特異的PCRを応用した年齢推定法に着手している。

今回はこのような遺体検査時の年齢推定にスポットを当て、その基本的な考え方や各種推定法の特徴を最近の動向も含め紹介する。

1. EDARADD を標的遺伝子とした歯由来 DNA のメチル化率による年齢推定法の検討

○小方彩乃^{1,2}、近藤真啓^{2,3}、堤 貴通^{1,2}、網干博文^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野¹

日本大学歯学部法医学講座²

日本大学大学院総合歯学研究所 社会歯学研究部門³

目的

身元不明死体における年齢の推定は、個人を識別するうえで重要な事項のひとつである。近年、DNAのメチル化率と暦年齢との相関が注目され、法医学の分野でも年齢推定への応用に期待が寄せられている。しかし損傷の激しい遺体からでもDNAの採取が可能な歯を用いた研究は少ない。最近、我々は歯由来のDNAを試料とし、ELOVL2を標的遺伝子とすることで、比較的实施が簡便なリアルタイムメチル化特異的PCR(以下、リアルタイムMSP)法を用いた年齢推定について検討し、一定の精度を得た。今回、更なる精度の向上を目指すべく、新たに標的遺伝子としてEDARADDを選択した。

材料及び方法

20～60歳の抜去歯(計12例)から通法に従いgenomic DNAを抽出後、バイサルファイト処理を行った。次にEDARADDの上流に存在する異なる3組のCpG配列を標的としたメチル化認識プライマー、及びヒトAlu配列に対するプライマーを作製し、リアルタイムMSPを行い、Percent Methylated Reference(以下、PMR)を算出した。さらにPMRを説明変数とする年齢推定のための回帰式を算出し、その精度を検討した。

成績及び考察

3組のメチル化認識プライマーのうち、1組が増幅に成功し、解離曲線においてもシングルピークが得られたことから、このプライマーの反応特異性が示された。また、各試料のDNA量とPMRとの相関は非常に弱く($R^2=0.16$)、各試料のPMRは実年齢と比較的強い負の相関を示した($R^2=0.53$)。さらに、回帰式より算出した推定値と実年齢との差の絶対値の平均値は10.54歳であった。

本解析により、試料数が少ないものの、EDARADDはELOVL2に続く新たな年齢推定のための標的遺伝子となり得ることが示唆された。今後は試料数を増やし回帰式を改良して行く予定である。

2. 短鎖脂肪酸誘導細胞死にはヒストンのアセチル化亢進が必要である

- 上道一輝^{1,3}, 津田啓方^{2,4}, 篠塚啓二^{3,5}, 鈴木直人^{2,4}, 外木守雄^{3,5}
日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野¹
日本大学歯学部生化学講座²
日本大学歯学部口腔外科学第I講座³
日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態部門⁴
日本大学歯学部総合歯学研究所 生体防御部門⁵

背景及び目的

歯周病原細菌が産生する酪酸などの短鎖脂肪酸の作用がヒト歯肉上皮細胞の非アポトーシス細胞死を引き起こす。本研究では、この短鎖脂肪酸誘導細胞死のメカニズムの一端を解明することを目的とする。

材料及び方法

死細胞の破綻した細胞膜のみを透過し、二本鎖DNAに結合する事で緑色蛍光を発するSYTOX-Green色素を用いて死細胞量を測定した。細胞内ヒストンH3のアセチル化をウエスタンブロットで評価した。ヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)阻害剤としてC646を用いた。

成績及び考察

歯周病原細菌の培養上清をヒト歯肉上皮Ca9-22細胞に作用させたところ、*Porphyromonas gingivalis*および*Fusobacterium nucleatum*の培養上清のみが細胞死を引き起こした。短鎖脂肪酸である酪酸が細胞死を引き起こすことから、細菌培養上清中の短鎖脂肪酸濃度を調べたところ、これらの培養上清中には酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸が多く含まれていた。これらの短鎖脂肪酸をそれぞれ単独でCa9-22細胞に作用させたところ、濃度依存的に細胞死を促進した。酪酸は有名なヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤で、その作用によりヒストンアセチル化は亢進されるため、短鎖脂肪酸誘導細胞死にヒストンアセチル化が関与している可能性を考えた。細胞死を誘導した酪酸、プロピオン酸、イソ酪酸、イソ吉草酸は濃度依存的にヒストンH3のアセチル化を亢進したことから、C646によるHAT活性阻害でヒストンアセチル化の抑制したところ、短鎖脂肪酸誘導の細胞死は有意に抑制された。さらに、酪酸と同様にHDAC阻害作用をもつSAHAおよびバルプロ酸の作用によっても細胞死が引き起こされ、C646の作用により抑制された。

これらの結果から、短鎖脂肪酸誘導細胞死にはヒストンアセチル化が必要であることが示唆された。

3. 嗅脳溝と中大脳動脈を基点とした体部位局在地図

- 桐原祐喜^{1,2}, 小林真之³, 外木守雄², 藤田智史⁴, 坐間 学⁵
日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野¹
日本大学歯学部口腔外科学講座²
日本大学歯学部薬理学講座³
日本大学歯学部基礎自然科学分野⁴
獨協医科大学医学部口腔外科学講座⁵

目的

感覚情報は脳皮質で処理され、末梢の部位によって、脳皮質の異なる領域で情報処理が行われる、いわゆる体部位局在が存在することが知られている。以前の研究から、嗅脳溝と中大脳動脈を基点として口腔領域のマッピングが可能なが示唆されているが、この2つを基点とした包括的なマップは明らかとなっていない。本研究では、眉、角膜、耳介、髭部、鼻尖、鼻腔粘膜、下唇、舌、上下顎の門歯と臼歯の体部位局在地図を作成することを目的とした。

材料および方法

実験には雄性Wistarラットを用いた。ウレタン麻酔下にて、左側大脳皮質の体性感覚野、島皮質を含む部位に開窓を行った。大脳皮質表層に膜電位感受性色素RH1691を負荷し、電気刺激空気圧刺激を行いその時の大脳皮質の神経活動を光学計測法にて記録した。眉、髭部、下唇、舌尖、舌背、上下顎の門歯と臼歯の歯髄、上下顎の門歯の歯根膜に対しては電気刺激を、また、眉、耳介、角膜、髭部、鼻尖、鼻腔粘膜、下唇に空気刺激を与え、大脳皮質の応答を記録した。

結果および考察

眉、髭部、下唇の空気刺激に反応する領域は、電気刺激に反応する領域にほぼ対応しており、体表を刺激する方法による応答部位の差異は無いことが示唆された。鼻の周辺領域に刺激をした時の応答部位は、眼の周辺領域および耳の刺激に反応する領域に対して、吻側に位置していた。口腔領域の刺激に対する初期応答は吻側に位置する一次体性感覚野(S1)と尾側に位置する二次皮質と島皮質の境界(S2/IOR)の2つの領域それぞれに存在し、そこから同心円状に興奮が広がった。口腔領域の感覚情報処理を行うS1とS2/IORの体部位局在は体表で認められるようなミラー像を示さなかった。このことから、口腔領域からの感覚情報はS1とS2/IORで並行して処理され、皮質領域の反応は一般的な体部位局在地図とは異なる場合があることが示唆される。

4. 軟骨移植による骨造成、骨再建の臨床応用にむけた実験

- 髭内美穂^{1,2}, 生木俊輔², 古川明彦², 米原啓之²
日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野¹
日本大学歯学部口腔外科第II講座²

目的

再生医療技術の進歩により各種移植材料が開発されているが、いまだ構造体としての骨組織は完成していない。一方、軟骨組織は培養軟骨が開発され、臨床応用が開始されている。軟骨は条件

によって骨化することが知られており、関節などにおいては骨化が弊害となる。一定の条件下において軟骨が骨化することが可能であれば、硬組織の再建材料として使用することが可能となり、臨床応用も期待できるとして実験を計画した。

材料および方法

Wistar ラットの肋軟骨を採取。軟骨膜を除去し碎片状にする。同ラットの脛骨の骨面を露出させ、1 mm × 1 mm × 5 mm の欠損を作成し肋軟骨を移植。骨膜、筋肉、皮膚を旧位に覆し縫合し術終了とした。また欠損のみ作成したラットをコントロール群として用いた。術直後、1, 2, 4, 8, 12 週後に micro-CT 撮影、切片の作成を行い経時的変化の観察および形成された骨の体積の計測を行った。

成績および考察

micro-CT 画像により、術直後、移植群では欠損作成部に石灰化度の低い不透過像を認めた。コントロール群、移植群の両群は移植 1 週間には欠損作成部に新生骨と推測される不透過像を認める。脛骨横断面において、コントロール群は皿状の陥凹を認めたが、移植群は 4 週目には周囲の骨と比較して膨隆した不透過像を認めた。移植した軟骨は時間の経過に伴い石灰化度の上昇を認め、これは軟骨の骨化を示唆している。HE 染色により移植群では時間の経過とともに、軟骨細胞は一塊化する傾向を示し、4 週目には軟骨細胞と骨髄間に骨様組織を認めた。また 8 週目になると、TB 染色においては軟骨細胞の外周よりメタクロマジーを示しにくくなる傾向にあった。欠損作成 4 週間までの形成された骨の体積は両群ともに骨の形成は認められたが有意差は示さなかった。これらのことにより、軟骨の存在が骨再生を妨げることはなかった。しかし欠損部断端における骨再生が認められるため、断端からの骨形成と軟骨が骨化した骨との比較検討が必要であると考えた。

5. 張力負荷に対する骨細胞用細胞株 MLO-Y4 の反応性の検討

○清水なつ生^{1,2}、藤原恭子^{3,4}、高橋富久^{3,4}、本吉 満^{2,5}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野¹

日本大学歯学部歯科矯正学講座²

日本大学歯学部解剖学第 I 講座³

日本大学歯学部総合歯学研究 機能形態部門⁴

日本大学歯学部総合歯学研究 臨床研究部門⁵

目的

矯正治療ではワイヤーの力で歯を移動する際、歯槽骨に骨の添加と吸収が起こる。この時、骨小腔に存在する骨細胞が力学的負荷を感受し、骨芽細胞や破骨細胞の働きを制御すると考えられているが、その詳細な機序については不明な点が多い。本研究では力学的負荷に対し骨細胞が示す反応の分子機序を解明するために、マウス骨細胞様株化細胞 MLO-Y4 に張力負荷を与え、遺伝子発現パターンや抗酸化剤への反応性を検討した。

材料及び方法

Flexcell Tension system を用いて MLO-Y4 細胞に張力負荷 (18%, 6 cycle/min) を与えた。24 時間後に細胞から RNA を抽出し、負荷を与えていない細胞との間で発現レベルに差のある遺伝子をマイクロアレイで、網羅的に解析した。絞り込んだ遺伝子に

ついては、リアルタイム PCR およびウエスタンブロッティングで発現パターンを調べ、細胞の生存率は WST8 アッセイによって計測した。

結果

張力負荷により有意に発現上昇した遺伝子群の中にはグルタチオン代謝関連酵素が多く含まれ、特に 10 倍以上の発現上昇を示した 7 遺伝子のうち 3 つがグルタチオン S 転移酵素 (GST) ファミリー遺伝子であった。経時的な発現解析の結果、GST 遺伝子群は、張力負荷を与え始めてから 20 分後に発現上昇を示した。張力負荷によって細胞の生存率は 6 割程度に低下したが、抗酸化剤 α トコフェロール存在下では細胞生存率は低下しなかった。このことから GST は張力負荷で生じる酸化ストレスの解消に関係していることが示唆されたが、siRNA によって GSTA1, GSTA2, GSTA5 の発現をノックダウンした場合の張力負荷で生じる細胞生存率は、予想とは逆に上昇した。現在、骨細胞の張力負荷の応答性と GST の役割を明らかにするために研究を続けている。

6. 異なるタイプのエッチ & リンスシステムにおける象牙質接着疲労耐久性および接着界面の SEM 観察

○笠原悠太^{1,2}、高見澤俊樹^{2,3}、廣兼榮造^{1,2}、辻本暁正^{2,3}、石井 亮^{2,3}、宮崎真至^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔化学分野¹

日本大学歯学部歯科保存学第 I 講座²

日本大学歯学部総合歯学研究 生体工学研究部門³

目的

エッチ & リンス (ER) 接着システムは、エナメル質接着性の向上および接着阻害因子の除去などの観点から、使用頻度は高い。しかし、異なるタイプの ER 接着システムの接着耐久性について検討した報告は少なく、接着界面の微細構造においても接着システムによって異なる可能性がある。そこで、異なるタイプの ER 接着システムにおける象牙質接着疲労耐久性について、繰り返し荷重負荷が可能な疲労試験を行うことによって、その耐久性について検討した。また、接着界面の微細構造について走査電子顕微鏡 (SEM) 観察した。

材料及び方法

供試した ER 接着システムは、3 ステップの OptiBond FL (OL, Kerr) および Scotchbond Multi-purpose plus (SM, 3 M Oral Care)、2 ステップの Single Bond Plus (SB, 3 M Oral Care)、ユニバーサルタイプの Scotchbond Universal (SU, 3 M Oral Care) を用いた。また、リン酸エッチング材として、Ultra-Etch を使用した。接着試験に際しては、ヒト象牙質を SiC #4000 まで研削し、被着歯面とした。被着歯面に対しリン酸処理後、製造者指示条件に従い歯面処理を行なった。内径 2.36 mm、高さ 2.5 mm のステンレス型に、コンポジットレジン充填、40 秒間照射を行い、接着試験用試片とした。これら試片を 37°C 精製水中に 24 時間保管後に剪断接着強さを測定した。接着疲労強さは、剪断接着強さ試験と同様に試片を製作し、得られた接着強さの約 50 ~ 60% の値の荷重を 20 Hz の正弦波で繰り返し 50,000 回試片に負荷した。また、形態的な検討を行うため、SEM 観察を行った。本研究の実施にあたって、本学倫理審査委員会の承認を得ている (倫許 EP20 D007)。

成績及び考察

3ステップのER接着システムは、他の接着システムに比較して高い象牙質接着疲労強さを示した。また、SEM観察から、SU接着界面においては樹脂含浸層直下に高密度な反応層が観察された。これらのことから、ER接着システムの象牙質接着疲労耐久性および接着界面の微細構造は、用いるシステムによって異なることが明らかとなった。

7. 窩洞の深さが構造色を応用したコンポジットレジンの色調適合性に及ぼす影響

○三枝 真¹, 小森谷康司^{1,2}, 杉村留奈¹, 飯島達也¹, 奥脇岳人¹, 甘利佳之¹, 黒川弘康^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}
日本大学歯学部歯科保存学 第1講座¹
日本大学歯学部総合歯学研究所 生体工学研究部門²

目的

構造色を応用したコンポジットレジンは、窩洞の明度が低い、いわゆるカメレオン効果が得られにくい症例での使用が有効となる可能性が考えられる。そこで、人工歯に深さの異なる窩洞を形成し、構造色を有するコンポジットレジンを填塞した際の、レジ充填部と窩洞周囲の人工歯との色調適合性について検討した。

材料及び方法

構造色を有するコンポジットレジンとしてオムニクロマ(OC, トクヤマデンタル)を、対照としてエステライトΣクイック(EL, トクヤマデンタル)およびフィルテックシュープリームウルトラ(FU, 3M ESPE)を用いた。人工歯として硬質レジン歯(ゼンオパール, AU19, ジーシー)の上顎中切歯(シェードA2およびA4)を用いた。

人工歯の唇側面中央付近に、直径4mm、深さ1.5あるいは3mmの規格円形窩洞を形成した後、窩洞内面をボンドマーライトレス(トクヤマデンタル)を用いて製造者指示条件で処理した。次いで、レジペーストを填塞、30秒間照射した。なお、窩洞に填塞するレジペーストのシェードは、OCではいずれのシェードの人工歯に対してもユニバーサルを、ELおよびFUでは人工歯と同色とした。

これらの試片を37℃精製水中に24時間保管後、シリコーンポイントを用いて研磨し、測色用試片とした。色調適合性の評価にはクリスタルアイ(CE100-DC/JP, オリパス)を用い、レジ充填部と窩洞周囲の人工歯の色調を確認することで ΔE^*ab を算出した。

成績及び考察

OCの色差値は1.4~2.4を示し、人工歯のシェードおよび窩洞の深さにかかわらず、良好な色調適合性を示した。一方、ELおよびFUでは、窩洞が深くなる条件で色差値が大きくなり、その傾向はA4の人工歯で顕著であった。

OCはフィラー粒径および形状などを最適化することで構造色を発現するように設計されており、とくに窩洞が深い条件では入射した光が吸収されることで、構造色としての発色が強くなり、これによって良好な色調適合性を示したものと考えられた。

8. ユニバーサルアドヒーズブ応用型2ステップアドヒーズブの歯質接着性能について

○田村友彦^{1,2}, 高見澤俊樹^{2,3}, 笠原悠太^{1,2}, 石井 亮^{2,3}, 横山宗典^{1,2}, 廣兼榮造^{1,2}, 辻本暁正^{2,3}, 宮崎真至^{2,3}
日本大学大学院歯学部研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹
日本大学歯学部保存学教室修復学講座²
日本大学歯学部総合歯学研究所 生体工学研究部門³

目的

ユニバーサルアドヒーズブは、優れた汎用性から使用頻度が増加しているものの、その接着耐久性については従来の2ステップセルフエッチングアドヒーズブと比較して低いことが懸念されている。本研究では、多機能性を有するユニバーサルアドヒーズブの組成と類似したプライマーを応用した新規2ステップアドヒーズブの初期接着性について剪断接着強さ試験を行うとともに接着疲労耐久性試験から接着耐久性を検討した。

材料および方法

ヒト抜去大臼歯(倫許EP20 D007)を用いた。供試アドヒーズブとして、ユニバーサルアドヒーズブ応用型2ステップアドヒーズブG2-BOND Universal(GU, GC)および従来の2ステップセルフエッチングアドヒーズブClearfil Mega Bond 2(CM, Kuraray Noritake Dental)を用いた。

実験1: プライマーへの光照射がGUの初期接着性能に与える影響について。

GUプライマー塗布後、光照射を10秒間行った群とこれを行わない群に対して、ボンディング材を塗布した後、光照射を10秒間行った。内径2.38mm、高さ2.5mmのステンレス型を設置し、コンポジットレジンを填塞、光照射を行い、接着試験用試片とした。これらの試片は、24時間37℃の精製水に保管した後、剪断接着強さ試験を行った。

実験2: 接着疲労耐久性について

製造者指示条件に従って歯面処理を行った試片に対して、実験1と同様な方法で接着試験用試片を製作した。これらの試片に対して、周波数20Hzの正弦波を5万回負荷した接着疲労耐久性試験を行った。

成績および考察

実験1の結果から、いずれの歯質においても光照射を行った群はこれを行わなかった群と比較して、有意に低い値を示した。実験2の結果からは、いずれの接着システムにおいてもその接着疲労耐久性強さに有意差は認められなかった。

考察

プライマーにユニバーサルアドヒーズブの技術を応用しているGUは、従来の2ステップセルフエッチングアドヒーズブと比較して同等以上の接着性能を有するため、更なる臨床応用範囲の拡大が期待できる。

9. ユニバーサルアドヒーシブの2度塗りが初期エナメル質接着強さに及ぼす影響

○廣兼榮造¹, 高見澤俊樹^{1,2}, 笠原悠太¹, 石井 亮^{1,2},
横山宗典¹, 田村友彦¹, 辻本暁正^{1,2}, 宮崎真至^{1,2}

(¹日大・歯・保存修復, ²日大・歯・総歯研・生体工学)

目的

充填直後のコンポジットレジン修復物には、重合時に発生する内部応力あるいは形態修正・研磨などによって外力が負荷されるため、使用する接着システムの初期接着性能の把握は重要である。そこで演者らは、最近使用頻度が増加しているユニバーサルアドヒーシブの初期エナメル質接着性ととも、アドヒーシブの2度塗りがその初期接着性に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

供試ユニバーサルアドヒーシブ4製品および対照として、2ステップセルフエッチング接着システムを用いた。アドヒーシブ塗布に先立って、リン酸エッチングを15秒間行うエッチ&リンスモードあるいはこれを行わないセルフエッチモード条件を設定した。また、各エッチングモードに対してアドヒーシブを1度塗布、あるいはアドヒーシブ塗布して光照射を行った後、アドヒーシブを再度塗布する群についても条件に加えた。レジンペーストを填塞、照射を行い、接着試験用試片とした。接着試験に際しては、これらの試片を5分、1、6、12あるいは24時間、37℃の精製水に保管した後、剪断接着強さを測定した。また、使用したコンポジットレジンの機械的性質の経時的変化も接着強さへの影響因子となるところから、曲げ特性について接着試験の保管条件と同一条件で測定した。

成績及び考察

いずれのエッチングモードにおいても同一の保管条件では、ユニバーサルアドヒーシブの2度塗りは1度塗りに比較して高いエナメル質接着強さを示した。一方、使用したコンポジットレジンの曲げ特性においても、保管時間の延長に伴ってその機械的性質は向上する傾向を示した。本実験の結果から、リン酸エッチングを併用するエッチ&リンスモードおよびアドヒーシブの2度塗りは、エナメル質の初期接着強さの向上に寄与することが明らかとなった。その理由としては、接着界面を構成するボンドおよびコンポジットの機械的強度の向上が影響していることが示唆された。

10. 歯内療法への応用を考えたBiphasic calcium phosphate cementの基礎的研究 —逆根管充填材として応用した際の辺縁封鎖性について—

○中村健志^{1,2}, 林 誠^{2,5}, 鈴木裕介^{2,5}, 安川拓也^{2,5},
遠山由理香^{1,2}, 菅原明喜⁸, 掛谷昌宏^{3,6}, 伊藤智加^{4,7},
武市 収^{2,5}

日本大学歯学部大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹
日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座²,
歯科理工学講座³, 歯科補綴学第Ⅰ講座⁴
日本大学歯学部総合歯学研究所 高度先端医療研究部門⁵,
生体工学研究部門⁶, 顎口腔機能研究部門⁷, 菅原歯科⁸

研究目的

リン酸カルシウムセメントは数種のカルシウム化合物の粉末からなり、ヒドロキシアパタイト(HA)を生成する骨補填材である。しかしながら、正確な粉末配合比の調製が困難であり材料学的特性に影響を及ぼすことが指摘されている。そこで、粒子内に α -tricalcium phosphate(α -TCP)とtetracalcium phosphate(TTCP)が分子レベルで均一に分散し、単峰性粒度分布を示すbiphasic calcium phosphate cement(BCP)を試作した。本研究では本材の歯内療法用セメントとしての可能性を検討するため、BCPの粒径が逆根管充填材に応用した際の辺縁封鎖性に及ぼす影響について解析した。

材料及び方法

BCP粉末の調製時平均粒径は $9.96\mu\text{m}$ であるため、粒径 $4.02\mu\text{m}$ および $1.85\mu\text{m}$ に粉碎した新たな被験材料を試作した。液は酸性リン酸カルシウム溶液を使用し、粉液比は操作性を考慮して粒径 $9.96\mu\text{m}$ は3.5、 $4.02\mu\text{m}$ は3.0および $1.85\mu\text{m}$ は1.8と規定した。辺縁封鎖性試験はsplit chamber法にて実施し、代表的な歯内療法セメントであり、封鎖性に優れているMineral Trioxide Aggregate(MTA)を対照材料とした。

ヒト単根抜去歯(倫理EP17 D013-5)を用いたsplit chamber法は根管拡大形成後、根尖部切断と逆根管充填窩洞形成を行いプラグにて被験材料を充填し、chamber上部に固定した。chamber下部には生体内を模倣した擬似体液(Hanks' 平衡塩溶液)を入れ根尖部を浸漬し、メチレンブルーを根管内に注入した。漏洩の判定は37℃、湿度100%で擬似体液の色の変化を4週間観察し、生存分析とlog-rank検定にて解析した。

成績及び考察

辺縁封鎖性をMTAと比較すると、粒径 $9.96\mu\text{m}$ と $1.85\mu\text{m}$ では有意に封鎖性が低かったが、粒径 $4.02\mu\text{m}$ では有意差は認められなかった。以上の結果から、BCPを根尖切除術の逆根管充填材として応用する際の適切な粒径は $4.02\mu\text{m}$ 程度であり、BCPの粒径は辺縁封鎖性に影響を及ぼすことが推察された。

粒径は硬化後の空孔率やHAの生成にも関与することから、BCPの粒径を適切に調整することでMTAの欠点である長い硬化時間を改善した新たな歯内療法用セメントとしての可能性が示された。

11. 加齢が神経障害性疼痛の異所性疼痛発現機構に与える影響

○藤原慎太郎^{1,2}, 浦田健太郎^{2,3}, 篠田雅路^{4,5}, 飯沼利光^{2,3}
日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹
日本大学歯学部歯科補綴学第I講座²
日本大学歯学部総合歯学研究所 顎口腔機能研究部門³
日本大学歯学部生理学講座⁴
日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態部門⁵

目的

高齢者への歯科診療時に遭遇する異常疼痛の一つに神経障害性疼痛がある。近年、下歯槽神経損傷により、損傷部とは異なる部位に機械痛覚過敏が発症する、いわゆる異所性疼痛の発症が報告されている。しかし、下歯槽神経における加齢変化がこの病態に及ぼす影響については不明である。そこで本研究では、顎顔面領域の疼痛調節に関与するマクロファージ性免疫応答に着目し、老化促進モデルマウス SAMP8(以下 P8)の下歯槽神経損傷後における三叉神経節(TG)中での活性化マクロファージである CD11c、及び M1 から放出される炎症性ケモカインである CCL2 の各発現変化を解析し、顎顔面領域の神経障害性疼痛の発現機構の加齢による影響を検討した。

材料及び方法

深麻酔下にて P8 及び正常老化マウス(SAMR1, 以下 R1)の左側下歯槽神経を 1 mm 切除し、それぞれ P8 切除群と R1 切除群とした。行動観察実験では、浅麻酔下にてデジタルフォンフライを用い、三叉神経第 2 枝支配領域の口髭部へ機械刺激を加え、逃避閾値(MHWT)を経日的に計測した。免疫組織学的解析では、まず神経逆行性トレーサーである Fluro Gold を口髭部に注入し、続いて下歯槽神経切除を行い、切除後 5 日目及び 9 日目に、4% パラフォルムアルデヒドによる灌流固定後、TG を摘出し、FG でラベルされた TG 第 2 枝領域における Iba1/CD11c 共陽性細胞と CD11c/CCL2 共陽性細胞の発現変化を解析した。

結果及び考察

行動観察実験の結果、下歯槽神経切除により、P8 と R1 の口髭部の MHWT は各非切除群と比較し有意な低下を認め、また P8 切除群の MHWT は R1 切除群と比較して有意に低下した。免疫組織学的解析の結果、P8 切除群は R1 切除群と比較して、切除 5 日目において Iba1/CD11c 共陽性細胞は有意に増加し、さらに切除後 9 日目では CD11c/CCL2 は有意に増加した。以上より、下歯槽神経損傷後に口髭部に発現する機会痛覚過敏は加齢により増強及び持続する事が明らかとなり、TG 中の M1 発現増加及び CCL2 発現増加が関与する可能性が示された。

12. 小臼歯部ハイブリッドアバットメントクラウンの破壊強度

○高野了己^{1,2}, 本田順一^{2,3}, 小林達朗^{1,2}, 小峰 太^{2,3}, 松村英雄^{2,3}
日本大学大学院歯学研究科歯科専攻 応用口腔科学分野¹
日本大学歯学部歯科補綴学第III講座²
日本大学歯学部総合歯科研究所 高度先端医療研究部門³

目的

補綴装置とアバットメントを一体化したスクリュー固定式インプラント上部構造であるハイブリッドアバットメントクラウン(HAC)が臨床応用されている。本研究では、異なる種類の CAD/CAM 用歯冠修復材料を用いて製作した HAC の破壊強度を比較、検討した。

材料および方法

下顎第一小臼歯欠損症例に対するインプラント治療を想定し、インプラント体を常温重合レジンに埋入した。チタンアバットメントに接着する補綴装置には、陶材前装ジルコニア補綴装置(LZ)、モノリシック高透光性ジルコニア補綴装置(MZ)、モノリシックニケイ酸リチウム含有ガラスセラミック補綴装置(LD)およびモノリシック CAD/CAM 冠用コンポジットレジン補綴装置(CM)を用いた。LZ のフレームワークは、アバットメント周囲に均一な厚みとなるよう設計し、CAD/CAM を用いて製作した後、統一した形態になるよう陶材を前装した。MZ、LD および CM は LZ と統一した形態になるよう CAD/CAM を用いて製作した。

LZ、MZ および CM の内面とアバットメント表面はアルミナブラスト処理およびプライマー処理を行った。LD 内面はフッ化水素酸処理およびプライマー処理を行った。すべての補綴装置はレジン系装着材料を用いてアバットメントに接着した。製作した HAC をインプラント体に装着した後、アクセスホールは直接修復用コンポジットレジンを用いて充填した。全ての試料は 37℃ 精製水中にて 24 時間保管後、万能試験機を用いて破壊強度を測定した。

成績および考察

MZ および LD は、LZ および CM と比較して有意に高い破壊強度を示した。これは、MZ および LD は CM と比較して材料自体が高い曲げ強さを有しており、圧縮荷重に対して破壊抵抗を示したためと推察される。また、MZ および LD はモノリシック構造であるため、LZ に存在するフレームワークと前装陶材の界面がないことから高い破壊強度を示したと考えられる。

13. 新生児期外傷性ストレスによる顎顔面異常疼痛に対する性差の検討

○尾辻 盛^{1,2}, 林 良憲^{3,4}, 人見涼露^{3,4}, 篠田雅路^{3,4}, 白川哲夫^{2,5}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野¹

日本大学歯学部小児歯科学講座²

日本大学歯学部生理学講座³

日本大学歯学部総合歯学研究 機能形態部門⁴

日本大学歯学部総合歯学研究 顎口腔機能研究部門⁵

目的

新生児期に被る外傷の経験が成人期における外傷後の痛覚受容に影響し、これにはミクログリアの関与が示唆されている。慢性疼痛におけるミクログリアの関与は広く認知されているが、これは雄のみで認められる現象であり、雌ではT細胞が選択的に寄与していることが報告されている。本研究では新生児期の外傷性ストレスにより成体期に顎顔面領域で生じる異常疼痛に寄与する細胞で性差があるのかどうかを検討した。

方法

雄性および雌性のSprague-Dawleyラットを用い、生後4日目(新生児期)に口髭部皮膚に2.5mmの切開を加え、生後7週目(成体期)に同部位へ1cmの切開を加えた。成体期再切開後2日目から口髭部にフォンフライフィラメントにより機械刺激を与え、逃避反射閾値を隔日的に10日目まで測定した。その後、三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)におけるミクログリアおよびT細胞の数を免疫組織化学的に解析した。また、成体期再切開前から浸透圧ポンプを用いてミクログリア活性化阻害薬(ミノサイクリン)およびT細胞活性化阻害薬(ピオグリタゾン)を大槽内へ持続投与し、口髭部皮膚への機械刺激に対する逃避反射閾値を測定した。その後、VcにおけるミクログリアおよびT細胞の発現を免疫組織化学的に解析した。

結果

成体期再切開後の口髭部皮膚への機械刺激に対する逃避反射閾値およびVcにおけるミクログリア活性化に性差は認められなかった。一方で、ミノサイクリンによる逃避反射閾値低下およびVcにおけるミクログリア数増加の抑制は雄でのみ認められ、雌では認められなかった。成体期再切開後10日目のVcにおけるT細胞の浸潤は雌雄で同程度に認められたが、ピオグリタゾンによる逃避反射閾値低下の抑制効果は雌で顕著に認められた。

考察

新生児期の外傷性ストレスによる顎顔面領域における外傷性疼痛強度の増強には、雄ではミクログリア、雌ではT細胞が優位に関与している可能性が示唆された。

14. 光遺伝学的手法による島皮質興奮性ニューロンの腕傍核外側部ニューロンに対する投射様式

○廣瀬健佑^{1,2,3}, 中谷有香³, 松村幸恵^{2,3}, 白川哲夫², 小林真之³

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野¹

日本大学歯学部小児歯科学講座²

日本大学歯学部薬理学講座³

目的

口腔顔面領域における侵害情報は一次求心性神経を介して主に三叉神経脊髄路核尾側亜核に投射し、一次体性感覚野、島皮質(IC)を含む辺縁系の大脳皮質へ伝達される。この経路の中継核である腕傍核には、特に外側(LPBN)に侵害情報が入力する。ICは痛みの情動的側面を担い、LPBNへの下行性投射が報告されているが、その機能については不明である。そこで我々は、ICニューロンからのLPBNに存在する興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、コリン作動性ニューロンに対するシナプス投射様式を光遺伝学的手法およびホールセル・パッチクランプ法を用いて検索した。

方法

それぞれのニューロンを同定するためにGABA作動性ニューロンに緑色蛍光タンパク質(Venus)を発現し、コリン作動性ニューロンに赤色蛍光タンパク質(tdTomato)を発現させた遺伝子改変動物であるVenus×ChAT-tTomatoラットを用いた。さらに、青色光刺激によって活性化する非選択的陽イオンチャネルであるチャンネルロドプシン2(ChR2)をアデノ随伴ウイルスベクターによってラットのICニューロンに導入した。4.5週間後にLPBNを含む急性脳スライスを作製し、ChR2を発現したIC→LPBN下行性投射線維を光刺激にて選択的に興奮させて興奮性ニューロン、抑制性ニューロン、コリン作動性ニューロンの各々から興奮性シナプス後電流(pEPSC)を記録した。

結果・結論

コリン作動性ニューロンの振幅は抑制性ニューロンに比較して有意に大きかった。また、興奮性ニューロン、抑制性ニューロン及びコリン作動性ニューロンの各々においてpEPSCの振幅は、非選択的アセチルコリン受容体作用薬であるカルバコールの灌流投与により有意に減弱し、ムスカリンM₁受容体選択的拮抗薬であるピレンゼピンの灌流投与により振幅の減弱は阻害された。したがって、LPBNにおけるニューロンにはM₁受容体が発現し、ICから投射を受けるコリン作動性ニューロンからのアセチルコリンの放出でLPBN内で侵害情報を抑制している可能性が示唆された。

15. *MECP2* 遺伝子変異を有するヒト歯髄幹細胞の特性解析

○星まなみ^{1,2}, 石山未紗^{2,5}, 伊藤寿典², 浅野正岳^{3,4},
白川哲夫^{2,5}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野¹

日本大学歯学部小児歯科学講座²

日本大学歯学部病理学講座³

日本大学歯学部総合歯学研究所 生体防御部門⁴

日本大学歯学部総合歯学研究所 顎口腔機能研究部門⁵

目的

MECP2 は X 染色体長腕 (Xq28) 上の遺伝子で, *MECP2* の変異は Rett 症候群や重度神経発達障害を引き起こす。Rett 症候群は主に女性に発症し, 一对の X 染色体のうち片方の *MECP2* に変異を認める。今回, *MECP2* の 1 塩基変異により発症した Rett 症候群女児から得た歯髄から幹細胞を分離し, 特性の解析を試みたので報告する。なお, 本研究は日本大学歯学部倫理委員会の承認を得て実施した(倫許 EP18 D011)。

材料及び方法

10 代 Rett 症候群女児及び健常女児の抜去歯から歯髄組織を採取し, 20%FBS 添加 MEM α 培地により, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO $_2$ インキュベーター内で培養した。アウトグロースした細胞について Cellartis MSC Xeno-Free Basal Medium(タカラバイオ)にて培養継続し実験に供した。Rett 女児の *MECP2* 変異部位については, 担当医からの情報に基づき変異部位を切断する酵素 Nla III にて処理し確認した。MeCP2 タンパクの発現と局在, ならびに幹細胞としての性質を調べる目的で, スライド上で歯髄細胞を 24 時間培養後, 4% パラホルムアルデヒドで固定し, MeCP2 ならびに幹細胞マーカーである Ki-67, STRO-1, SSEA3 に対する抗体にて免疫蛍光二重染色を行った。また, これらタンパクの核内局在について DAPI にて検討した。

結果及び考察

免疫蛍光染色にて, 健常女児の細胞では全細胞で MeCP2 が主に核に局在していたのに対し, Rett 女児の細胞では細胞質と核がほぼ同レベルで染色された細胞も認められた。この結果は, Rett 女児の一部の細胞において MeCP2 タンパクの核内移行あるいは核内での DNA 結合能の低下があることを示しており, それらは *MECP2* の変異アレルが活性化した細胞と考えられた。Ki-67 発現は核内に限局し, DAPI 染色の核の濃淡と類似していた。また STRO-1 は主に細胞質に, SSEA3 は細胞質と核の両方に免疫陽性反応が確認されたが, Rett 女児と健常女児の細胞で差異はみられなかった。以上の結果より, Rett 女児と健常女児の歯髄細胞が幹細胞としての性質を有すること, また Rett 女児の歯髄細胞では *MECP2* の変異アレルと正常アレルのいずれかが活性化している細胞が混在することが示唆された。