

ONLINE ISSN 2188-0808

日本歯科保存学雑誌

*THE JAPANESE JOURNAL OF
CONSERVATIVE DENTISTRY*

日歯保存誌 Jpn J Conserv Dent



特定非営利活動法人

日本歯科保存学会

<http://www.hozon.or.jp>

2021

June Vol. 64 No. 3



J-STAGE <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/shikahozon/-char/ja>

NEW



ペースト + パウダー = Bioceramic Evolution



マルチな性状

パウダーを混ぜる量により
性状を変えられます。



マルチな適応

根充から覆髄まで使用できます。



歯科用覆髄材料・歯科用根管充填シーラ

ニシカキャナルシーラ-BGmulti

管理医療機器 一般の名称：歯科用覆髄材料・歯科用根管充填シーラ 医療機器認証番号：302ADBZX00055000

【包装】ペースト(ダブルシリンジ)1本 [A材 4.5g(2.5mL)、B材 4.5g(2.5mL)]、パウダー 1個 [2g]

【標準価格】 19,000 円

室温保管 (1~30℃) ※凍結を避けること

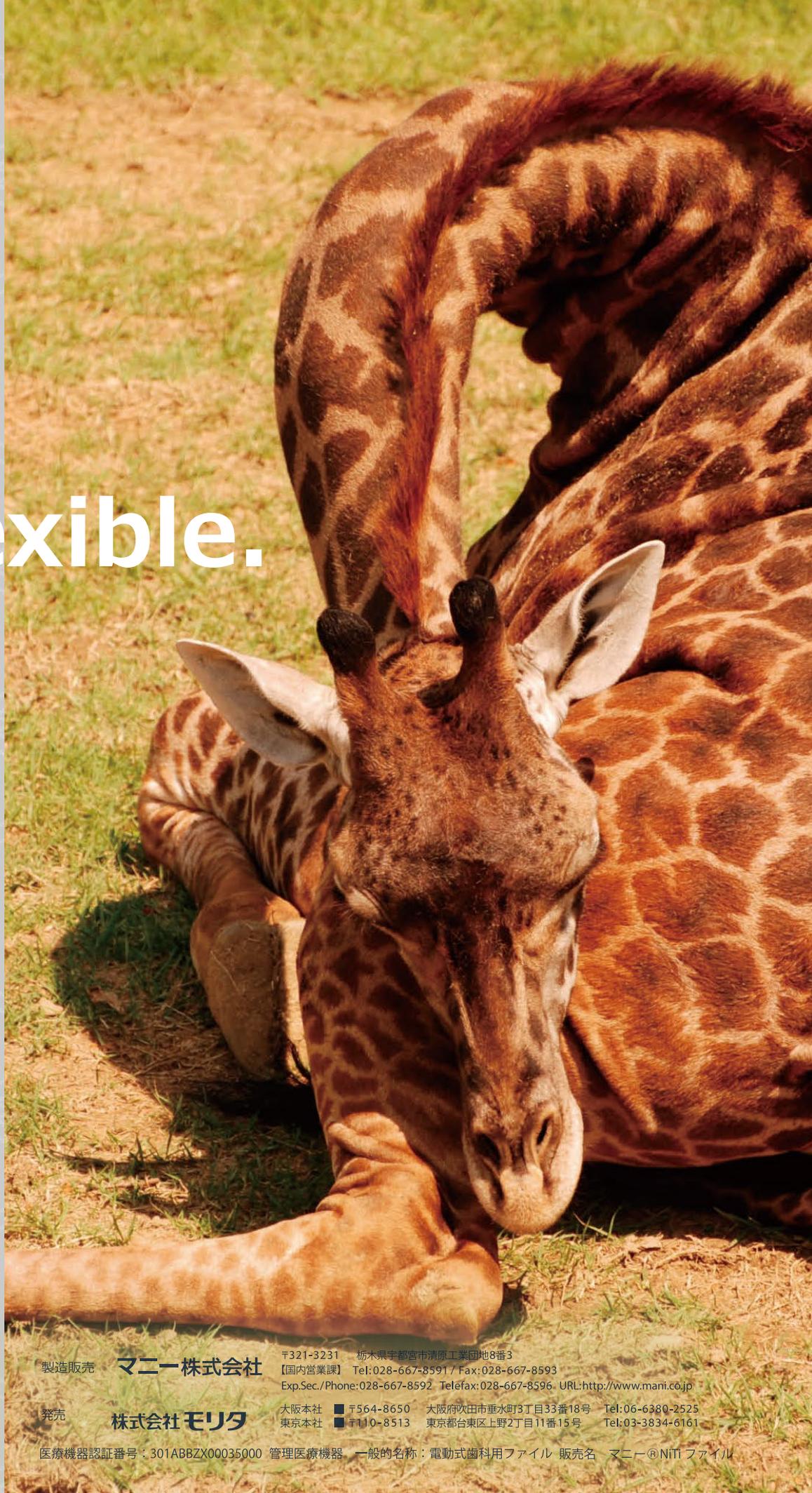
*単品販売もごさいます。

詳しい製品情報をご覧ください



jizai
—自在—

Be
Flexible.



MANI®

製造販売 **マニー株式会社**

〒321-3231 栃木県宇都宮市清原工業団地8番3
【国内営業課】 Tel:028-667-8591 / Fax:028-667-8593
Exp.Sec./Phone:028-667-8592 Telefax:028-667-8596 URL:<http://www.mani.co.jp>

発売 **株式会社モリタ**

大阪本社 ■ 〒564-8650 大阪府吹田市垂水町3丁目33番18号 Tel:06-6380-2525
東京本社 ■ 〒110-8513 東京都台東区上野2丁目11番15号 Tel:03-3834-6161

医療機器認証番号：301ABBZX00035000 管理医療機器 一般の名称：電動式歯科用ファイル 販売名 マニー®NiTi ファイル

1色で天然歯色に親和する フロアブルCR 誕生

クリアフィル® マジェスティ® ES フロー **Low**

Universal



「クリアフィル® マジェスティ® ES フロー」〈LOW〉Universalの
Uシェードを異なるシェードに充填すると...*

After

A1



A4



充填したのは
でしょうか？



※人工歯を用いたシミュレーションであり、天然歯の色調とは異なります

答えは、**こちら**



充填部位のBefore/Afterを
比較できます。

クリアフィル® マジェスティ® ES フロー 〈LOW〉 Universal
管理医療機器 歯科充填用コンポジットレジン 医療機器認証番号：224ABBZK00170000

【単品】 ※本品は、袋包装です。

- レジン充填材〈Low〉(U、UD、UOP、UW) 各2.7g (1.5mL)
 - 付属品 ニードルチップ (N)(5個) ニードルチップキャップ (5個)
- メーカー希望小売価格 各**4,300円**(税抜) 202440600~202440603



クラレノリタケ デンタル株式会社

〒100-0004 東京都千代田区大手町1-1-3 (大手センタービル)

お問い合わせ | ☎ 0120-330-922 月曜～金曜 10:00～17:00

ホームページ | www.kuraraynoritake.jp

●掲載商品のメーカー希望小売価格は2021年4月現在のものです。メーカー希望小売価格には消費税等は含まれておりません。

●仕様及び外観は、製品改良のため予告無く変更することがありますので、予めご了承ください。

●印刷のため実際の色調と異なる場合があります。 ●ご使用に際しましては添付文書を必ずお読みください。

【製造販売元】クラレノリタケデンタル株式会社
〒959-2653 新潟県胎内市倉敷町2-28

【販売元】株式会社モリタ
〒564-8650 大阪府吹田市垂水町3-33-18
お客様相談センター：0800-222-8020 (医療従事者様向窓口)

・「クリアフィル」及び「マジェスティ」は株式会社クラレの登録商標です。

Vitapex[®]

黄色は強さ! Dr.イエロー!



イメージです。実際の製品は黄色のペーストです。

ビタペックス[®]

水酸化カルシウム・ヨードホルムパスタ

高度管理医療機器 医療機器承認番号 16300BZZ00918000

■ **ビタペックス チップセット**
<リフィルとチップが入ったセット>
標準価格 3,700円

■ **ビタペックス リフィル**
<補充用シリンジのみの単品>
標準価格 3,000円

■ **ネオブルーチップ(S)**
<チップのみの単品>
一般医療機器
医療機器届出番号13B1X00154000016
標準価格 2,000円

■ **ミニシリンジ**
<ミニシリンジのみの単品>
一般医療機器
医療機器届出番号13B1X00154000003
標準価格 5,200円

W **ダブルで働くDr.イエロー**



黄色いヨードホルムが治療をバックアップ。

30.3% 水酸化カルシウム含有のビタペックスは、根端(尖)部歯周組織の治癒に好影響を与えるだけでなく、造影剤として配合されているヨードホルムが浸出液などの組織液に接するとヨウ素を遊離し、持続的な殺菌力を発揮します。バランスのとれた成分が多層的に効力を示す、頼れる製材です。

 **ネオ製薬工業株式会社**
東京都渋谷区広尾3丁目1番3号

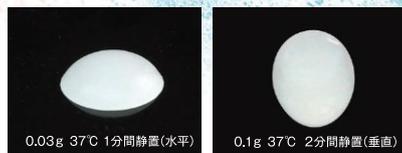
ホームページ <http://www.neo-dental.com/>
お問い合わせ ☎ 0120-07-3768

4月21日
新発売! オムニクロマに
フロアブルが登場!!

シェードのない世界へようこそ
1本でVITA16色に同化!
オムニクロマフロー



omniCHROMA Flow



33%増量
通常3g→キャンペーン品3g+1g

新発売キャンペーン中!!

2021年4月21日~7月20日

オムニクロマは
シェード合わせが
不要です。



構造色を応用したコンポジットレジン

オムニクロマフロー

標準医院価格 ¥4,800/1本 3g(1.8mL)

歯科充填用コンポジットレジン(光硬化型) 管理医療機器(認証番号) 302AFBZX00087000

株式会社 トクヤマデンタル

本社 〒110-0016 東京都台東区台東1-38-9

お問い合わせ・資料請求
インフォメーションサービス

0120-54-1182

受付時間

9:00~12:00/13:00~17:00(土日祝日は除く)

Webにもいろいろ情報載っています!!

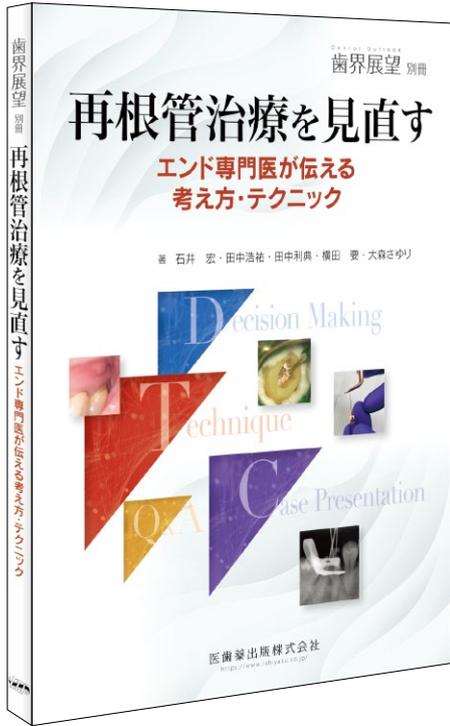
トクヤマデンタル

検索

再根管治療を見直す

エンド専門医が伝える考え方・テクニック

著 石井 宏・田中浩祐・田中利典・横田 要・大森さゆり



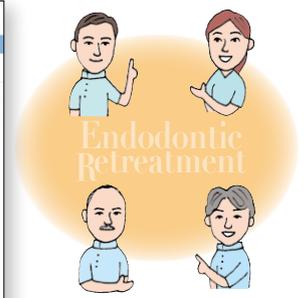
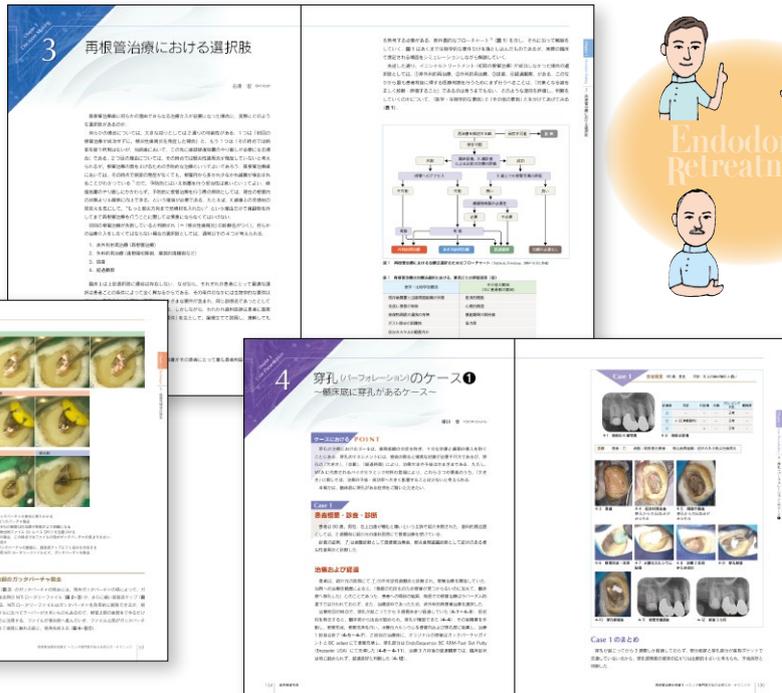
“やり直しの根管治療”を 成功に導くための 考え方とテクニックがここに！

- わが国の根管治療に関する保険請求では、「抜髄処置（初回根管治療）」に比べ「感染根管治療（再根管治療）」が多く、“やり直しの根管治療”が非常に多い実態があります。
- 歯内療法の臨床を専門に行う執筆陣による、「再根管治療」に特化した一冊。
- 診査・診断、手技（テクニック）、現在有効とされる器材等について、豊富な臨床例とともに、ビジュアルにわかりやすく詳説しています！



■A4判変 / 176頁 / カラー
 ■定価 6,930円 (本体 6,300円+税10%)
 注文コード：351180

真に患者さんの
利益につながる
歯内療法実践のために！



日本歯科保存学会 2021 年度秋季学術大会（第 155 回）
《事前登録のご案内》

日本歯科保存学会 2021 年度秋季学術大会（第 155 回）は、2021 年 10 月 28 日（木）～11 月 10 日（水）、オンライン（担当校：新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野，大会長：野村由一郎教授）において、下記のとおり開催することとなりました。事前参加登録についてご案内いたしますので、下記の要領により登録手続きをお願いいたします。多数の会員の皆様方のご参加をお願い申し上げます。

2021 年 6 月

特定非営利活動法人 日本歯科保存学会
理事長 石井 信之

1. 会 期 2021 年 10 月 28 日（木）～11 月 10 日（水）

2. 会 場 オンライン開催

3. 参加登録

大会参加費は以下のとおりです。

事前登録（2021 年 6 月 1 日（火）正午～2021 年 9 月 30 日（木）14：00 までの登録）

10,000 円（歯科医師），5,000 円（歯科衛生士）

当日登録 12,000 円（歯科医師），6,000 円（歯科衛生士）

※本学術大会における事前登録は、すべて大会ホームページ上での手続きとなります。

<http://www.kokuhoken.jp/jscd155> にアクセスして、ご登録下さい。

4. 第 155 回学術大会に関するお問い合わせ先

日本歯科保存学会 2021 年度秋季学術大会（第 155 回）大会事務局

〒170-0003 東京都豊島区駒込 1-43-9

（一財）口腔保健協会コンベンション事業部内

TEL：03-3947-8761 FAX：03-3947-8873 E-mail：jscd155@kokuhoken.jp

詳細につきましては下記アドレスより、大会ホームページにアクセスして下さい。

<http://www.kokuhoken.jp/jscd155>

日本歯科保存学会 優秀発表賞

本賞は、本学会とカボデンタルシステムズジャパン株式会社・株式会社松風・株式会社ジーシーの3社との協定により設けられました。特定非営利活動法人日本歯科保存学会定款第5条第1項第8号に基づき、日本歯科保存学雑誌に掲載された優秀な論文を年間優秀論文賞、学術大会で発表された優秀な演題を優秀ポスター賞として、本会が表彰いたします。

日本歯科保存学雑誌63巻における優秀論文賞および2020年度春季学術大会（第152回）・秋季学術大会（第153回）における優秀ポスター賞の受賞論文・演題は、下記のとおりです。2020年度の学術大会は、新型コロナウイルス感染症の感染状況を鑑み春季は誌上開催、秋季はWeb開催となりましたが、優秀ポスター賞対象演題の審査についてはZoomシステムを利用して行いました。

今回受賞された皆様方には心からお慶び申し上げますとともに、今後ますますの研究成果を期待いたします。

表彰委員会

優秀論文賞 受賞論文

保存修復学分野（カボデンタル優秀論文賞）

「A Preliminary Study on Remaining Enamel Thickness Measurement using Time-domain Optical Coherence Tomography」（63巻4号掲載）

著者：黒川弘康，高見澤俊樹，飯野正義，新井友依子，高宮 寛，若松賢吾，横山宗典，飯島達也，
宮崎真至

筆頭著者所属：日本大学歯学部保存学教室修復学講座

歯内療法学分野（松風優秀論文賞）

「難治性根尖性歯周炎における抗菌ナノパーティクル含有ナノバブル水による根管内除菌効果の検討」（63巻1号掲載）

著者：庵原耕一郎，中島美砂子

筆頭著者所属：国立長寿医療研究センター幹細胞再生医療研究部

歯周病学分野（ジーシー優秀論文賞）

「高齢双生児の歯周病病態と遺伝・環境要因の影響度」（63巻3号掲載）

著者：池上久仁子，山下元三，三木康史，久留島悠子，高阪貴之，鈴木美麻，榎木香織，松田謙一，
北村正博，池邊一典，大阪ツインリサーチグループ，村上伸也

筆頭著者所属：大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科

優秀ポスター賞 受賞演題

152回

保存修復学分野（カボデンタル優秀ポスター賞）

「歯石に含まれるフッ素性アパタイトの¹⁹F-MASおよび¹H-³¹P CP/MAS 固体 NMR による解析」（P2）

演者：小川友子，林 文晶，平石典子，田上順次

筆頭演者所属：東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科う蝕制御学分野

歯内療法学分野（松風優秀ポスター賞）

「*in vitro*・*in vivo*における各種バイオセラミック系シーラーのアパタイト析出能に関する研究」（P3）

演者：イブンベラル ラジサイフラー，枝並直樹，白柏麻里，吉羽邦彦，大倉直人，吉羽永子，遠間愛子，
竹内亮祐，野村由一郎

筆頭演者所属：新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座う蝕学分野

歯周病学分野（ジーシー優秀ポスター賞）

「メタトランスクリプトーム解析を用いた歯周疾患ステージにおける細菌種間のネットワーク構造と機能組成の比較」(P7)

演者：根本 昂，芝 多佳彦，渡辺孝康，小柳達郎，駒津匡二，片桐さやか，竹内康雄，岩田隆紀
筆頭演者所属：東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科歯周病学分野

153回

保存修復学分野（ジーシー優秀ポスター賞）

「う蝕深さとコンジットレジン修復後2年間における歯内治療発生率の関係性」(P1)

演者：佐藤隆明，田上順次

筆頭演者所属：東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科う蝕制御学分野

歯内療法学分野（カボデンタル優秀ポスター賞）

「ニッケルチタン製ロータリーファイル形成時の根尖方向荷重の違いが根管追従性，根管形成中の応力，形成時間に与える影響」(P6)

演者：牧 圭一郎，海老原 新，春日柚香，大森智史，雲野 颯，中務太郎，木村俊介，興地隆史

筆頭演者所属：東京医科歯科大学（TMDU）大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学講座歯髓生物学分野

歯周病学分野（松風優秀ポスター賞）

「歯肉幹細胞由来エクソソームはmiR-1260bによるRANKL阻害により歯槽骨吸収を抑制する」(P7)

演者：中尾雄紀，福田隆男，渡邊ゆかり，林 千華子，川上賢太郎，豊田真顕，四本かれん，大和寛明，
新城尊徳，田中 麗，讃井彰一，西村英紀

筆頭演者所属：九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野

日本歯科保存学雑誌

第 64 巻第 3 号

令和 3 年 6 月

目 次

総 説

歯内療法における技術革新と最近のトレンド・トピックス……………湯本 浩通 (185)

誌上シンポジウム「生体の中の保存治療学」

シンポジウム概要……………横瀬 敏志 (193)

人は口から老い，口で逝く—咬合機能回復の真の意味論—……………落合 邦康 (194)

人生 100 歳時代における硬組織研究の挑戦……………町谷亜位子，片桐 岳信 (201)

歯髄再生治療：実用化に向けた取り組み……………中島美砂子，庵原耕一郎 (206)

原 著

太陽電池付光触媒内蔵音波振動歯ブラシのプラーク除去効果について
……………吉峰 正彌，鴨井 久博，久保田裕子 (212)

術者の臨床経験および接着システムの違いが象牙質接着強さと
接着信頼性に及ぼす影響について……………高橋 礼奈，榎本愛久美，織田祐太郎
内山 沙紀，盧山 晨，金森ゆうな
明橋 冴，田上 温子，高橋 彬文
則武加奈子，佐藤 隆明，田上 順次 (220)

リン酸系モノマー含有歯面処理剤がレジンセメントの接着性に及ぼす影響
……………石井 亮，笠原 悠太，廣兼 榮造
高見澤俊樹，辻本 暁正，吉中 雄太
宮崎 真至，北原 信也 (227)

カテキンによる SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 受容体との
結合抑制効果に対する基礎的検証……………山田 嘉重，木村 裕一，高橋 昌宏
車田 文雄，菊井 徹哉，橋本 昌典
大木 英俊 (237)

臨時評議員会・臨時総会議事録…………… (248)

役員名簿…………… (249)

投稿規程…………… (255)

発 行

特定非営利活動法人 日本歯科保存学会
〒170-0003 東京都豊島区駒込 1-43-9 (一財)口腔保健協会内

THE JAPANESE JOURNAL OF CONSERVATIVE DENTISTRY

Vol. 64, No. 3

JUNE 2021

CONTENTS

Review

Technological Innovations and Recent Trends/Topics in Endodontics.....YUMOTO Hiromichi (185)

Symposium in the Journal

Overview of Symposium.....YOKOSE Satoshi (193)

People Age by the Mouth and Die by the Mouth.....OCHIAI Kuniyasu (194)

The Challenges for Research of Hard Tissue with a 100-Year Life
.....MACHIYA Aiko and KATAGIRI Takenobu (201)

Stem Cell Therapy for Pulp Regeneration : Future Application
for Treatment of Periapical Disease in the Aged.....NAKASHIMA Misako and IOHARA Koichiro (206)

Original Articles

The Effect of Dental Plaque Removal by a Sonic Toothbrush with Solar Panels
and Built-in Photocatalyst.....YOSHIMINE Masaya, KAMOI Hisahiro and KUBOTA Hiroko (212)

Effects of Clinical Experience and Adhesive Systems on Dentin Bonding Strength
and Dentin Bonding Reliability.....TAKAHASHI Rena, ENOMOTO Megumi, ODA Yutaro,
UCHIYAMA Saki, ROZAN Shin, KANAMORI Yuna,
AKEHASHI Sae, TAGAMI Atsuko, TAKAHASHI Akifumi,
NORITAKE Kanako, SATO Takaaki and TAGAMI Junji (220)

Influence of a Tooth Conditioner Containing Phosphoric Acid Ester Monomer on
the Bond Performance of a Resin-based Luting Cement
.....ISHII Ryo, KASAHARA Yuta, HIROKANE Eizo,
TAKAMIZAWA Toshiki, TSUJIMOTO Akimasa, YOSHINAKA Yuta,
MIYAZAKI Masashi and KITAHARA Nobuya (227)

A Basic Analysis on the Inhibitory Effects of Catechins on the Binding of
SARS-CoV-2 Spike Protein to ACE2
.....YAMADA Yoshishige, KIMURA Yuichi, TAKAHASHI Masahiro,
KURUMADA Fumio, KIKUI Tetsuya, HASHIMOTO Masanori
and OHKI Hidetoshi (237)

Published
by
THE JAPANESE SOCIETY OF CONSERVATIVE DENTISTRY (JSCD)
c/o Oral Health Association of Japan (Kōkūhoken kyōkai)
1-43-9, Komagome, Toshima-ku, Tokyo 170-0003
Japan

歯内療法における技術革新と最近のトレンド・トピックス

湯本 浩通

徳島大学大学院医歯薬学研究部 歯周歯内治療学分野

Technological Innovations and Recent Trends/Topics in Endodontics

YUMOTO Hiromichi

Department of Periodontology and Endodontology, Tokushima University Graduate School of Biomedical Sciences

キーワード：歯内療法, 技術革新, Microscope, Cone-Beam CT, Ni-Ti file

はじめに

日本歯科保存学会が主領域としている歯内療法学・保存修復学・歯周病学の3分野では、これまでに直面した数々の課題に対してさまざまな歯科材料の開発とそれに伴う治療技術の革新が行われており、現在もなお、そのスピードは加速している。

歯内療法は抜髄と感染根管治療に大別され、さらに感染根管治療は初回治療と再治療に分けられる。一般的に、再治療が初回治療より治癒・成功率が低いことが、多くの統計学的解析により示されている。その要因として、根尖性歯周炎に対する感染根管治療が、病変の原因である病原細菌や感染歯質の除去を主目的としているにもかかわらず、根管の全貌を肉眼で直視することができず、さらに根管系の形態が非常に複雑であることから、原因物質などを完全に除去することが困難であり、ときには通常の歯内治療には反応しない難治症例にも遭遇し、最終的には抜歯を余儀なくされる症例も少なくないことなどが挙げられる。これらの課題への対応として、近年では、Microscope, Cone-Beam Computed Tomography (CBCT) や Nickel Titanium (Ni-Ti) file などが開発され、広く普及しつつある。さらに充填材料としては、新たに MTA (Mineral Trioxide Aggregate) セメントや数種の根管充填用シーラーが開発・市場化され、良

好な治療成績を示している。

また、根管治療が奏功しない場合の次なる手段として、歯根尖切除術・逆根管充填法や意図的再植などの外科的歯内療法が選択されるが、超高齢社会を迎えた現在、外科的手術を行うことは高齢患者への負担が大きい。特に、高血圧や糖尿病などの全身疾患を有する患者にはリスクも大きく、BP (Bisphosphonate) 製剤を投与されている患者には抜歯も含めてその対応が困難となる。これらの観点からも、多くの患者に適応可能となる低侵襲な新規の非外科的治療法の開発が望まれている。現在、医療の分野では iPS 細胞に代表される再生医療が脚光を浴び、世界中で臨床応用を目指した研究が活発に行われている。歯科の分野では、歯周病学の領域において、GTR (Guided Tissue Regeneration), エナメルマトリックスタンパク質 (エムドゲイン) や FGF (Fibroblast Growth Factor)-2 (リグロス) など数々の手技ならびに材料が応用されているが、残念ながら歯内療法の分野では、再生療法の開発が遅れていることは否めない。しかし、歯内療法分野においては、さまざまな器材の開発とその実用化がなされ、さらに再生療法に関する研究もあらゆる角度から遂行されている。

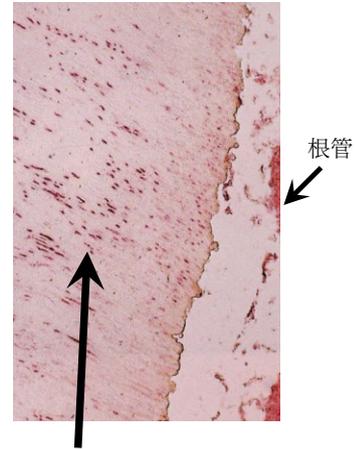
本総説では、現代の歯内療法における概念を確認したうえで、近年の歯内療法における進歩とまだまだ残されている問題点を整理するとともに、次世代へ向けた歯内療法の実現の可能性について考察する。

現代の歯内療法における概念

細菌が根管系に侵入することにより感染が成立し、さらに菌体や細菌由来の病原性物質が根尖孔外歯周組織に漏出することにより、根尖歯周組織に炎症が生じる¹⁾。このことは、根管系に細菌感染が生じなければ根尖性歯周炎が生じないという、無菌ラットを用いた実験結果により示されている²⁾。この根尖歯周組織の炎症は、身体の他の部分の炎症と基本的には変わらず、生体のもつ防御機構が十分に働ける環境にあるため、原因となっている病原性物質を清掃・除去することにより治癒すると考えられる。すなわち、根尖性歯周炎は細菌感染症による炎症であることから、感染根管治療の主目的は、根管内に生息している細菌、Biofilm、細菌由来物質、感染象牙質、壊死歯髓組織や腐敗物質などの感染源を除去することであり、これらの感染源の除去に際しては、file などによる機械的根管拡大と NaOCl や EDTA などによる化学的根管清掃の併用が行われている。しかし、根管系に生息しているさまざまな細菌は、根管象牙質壁の象牙細管から歯根表面近くまで深く侵入していることも示されており³⁾、このように深部にまで侵入した細菌すべてを完全に除去することは不可能である(図1)。そこで、現代の歯内療法概念として、除去不可能な細管深部に生息している細菌を微小な部位に封じ込めて埋葬し、さらに栄養源を枯渇させて化石化させる対応策⁴⁾が現実的に実施されている。

また感染根管治療の成否は、根管系に細菌などの感染物質がどの程度残存し、それが生体にどの程度影響を及ぼすかによって決まるが、現在の歯内療法では宿主側の治癒能力などを調節できないことから、「根管系を生体内外に分ける根管狭窄部を決定して感染源を除去し、緊密に充填する」ために、根管治療における最重要 Step として「作業長の決定」「機械的拡大・清掃・消毒」と「根管充填」が挙げられる⁵⁾。

しかし歯内療法は、他の歯科治療における条件とは異なり、根管口から根尖孔までの根管系を直視できない場合が多く、この特殊な条件が根管治療を最も困難にさせている要因の一つである。さらに、根管系の形態が多様かつきわめて複雑であることから^{6,7)}、機械的手法により完全に細菌を除去することができない。そこで、補助的な化学的洗浄や根管貼薬剤が応用されているが、残存細菌の減少や増殖抑制にはある程度の効果が認められるものの、歯周組織に対する為害性・副作用・耐性菌出現の危惧や象牙細管内深部まで侵入した細菌に対する薬剤の効果・持続時間・浸透性・拡散性など多くの課題が残されている。このような数々の課題に直面し、歯内療法の



根管象牙細管に侵入した細菌

図1 根管象牙細管に侵入した細菌

分野でも以下に記すようなさまざまな歯科材料の開発とそれに伴う治療技術の革新が行われている。

歯内療法の技術革新

根管治療における課題に対して、近年、歯科用 Microscope, CBCT や Ni-Ti file が開発され、根管系を3次的に捉え、狭小な領域を観察・確認でき、さらに本来の根管形態を維持できることで、より正確かつ精密な診査・診断・治療が行えるようになった。このことは、過度な拡大・形成を避けて残存歯質を可及的に保存する「必要最小限の侵襲処置 (MI: Minimal Intervention)」の概念にも合致している。

特に、前述したように根管治療は目で見えない部分を処置するので、治療前の診査・診断はきわめて重要であるが、これまでの Dental X 線画像は重積像であることから、立体的に歯や根管とその周囲の構造に加えて、根尖病変の大きさや位置を把握することが困難な場合も多く、より正確に診査するには、3次的に有意義な情報が得られる CBCT がきわめて有効である。図2に示す症例は、1の歯肉腫脹と排膿状態が改善しないために近医から紹介を受けた患者で、すでに100番まで太く根管が拡大されており、Dental X 線画像からは Point 先端に根管と思われるスペースが確認された。そこで CBCT 撮影を行った結果、根尖部は口蓋側へ湾曲しており、唇側方向に穿孔を起していることがわかった。このように、一般的な Dental X 線撮影による平面的な画像では、骨の吸収状況が唇側・頬側か舌側・口蓋側にあるのか、また根尖病変の原因が側枝などによるものか観察・診査できない。CBCT 撮影は、その他にも過剰根管や槌状根、副根歯の場合の原因根の同定、歯根尖切除・逆根管充填術の術前診査、file や歯根破折の確認、フェネストレー

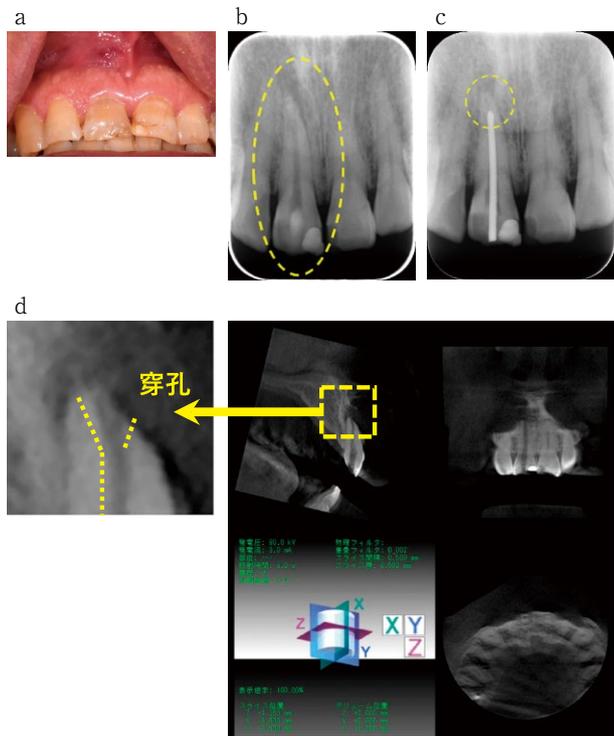


図 2 CBCT の応用により根尖部の湾曲と穿孔が判明した症例

ション（開窓）や外部・内部吸収の確認などに有効であり、その適応は広い。

さらに、歯科用 Microscope と併用することにより、正確に根管や根尖の位置を確認して治療を行うことが可能となる。狭小な領域に対して処置を行う歯内療法では、歯科用 Microscope が有効な適応場面が最も多く、たとえば、髄室形態の確認には5~10倍、根管口から根管内上部における見落とした根管口の発見やイスマス・フィンの処置などには10~15倍で、根管壁の汚染・清掃状態や根管内亀裂・破折線の確認、さらには Endodontic MicroSurgery 時の歯根尖切除・切断断面の確認には15~20倍での使用が目安とされている。しかしながら、歯科用 Microscope により狭小な領域において精密な処置が可能となるが、微細な部分での器具の操作には少し熟練が必要であることから、今後、卒前の学部学生や若い歯科医師・研修医への歯科用 Microscope の適切かつ有効な使用と器具操作に関する指導や教育が重要となる。

根管拡大・形成についても、根管系を3次的に捉え、本来の根管形態と相似形に形成する概念に基づいて、可能なかぎり病原因子を除去し、適切な Flare 形成とし、過度の拡大・形成を避けて最小の侵襲とすること、さらに、根尖孔の変位を生じないように根管の中心軸を維持し、根尖孔を破壊しないことが重要となる。特に、湾曲根管ではジップやレッジを生じやすく Transportation

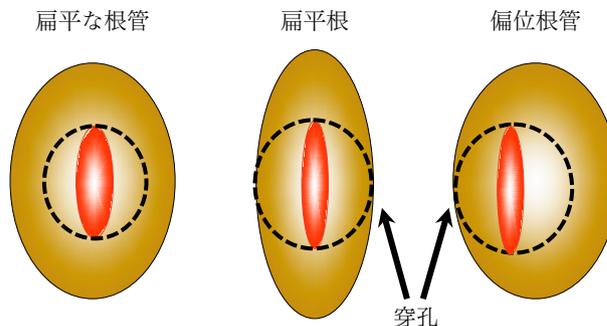
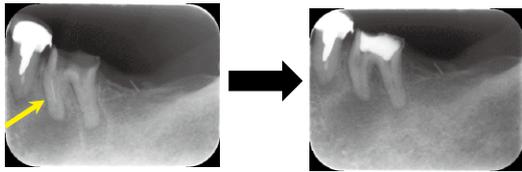


図 3 扁平根や偏位根管に対する根管拡大・形成時の危険性

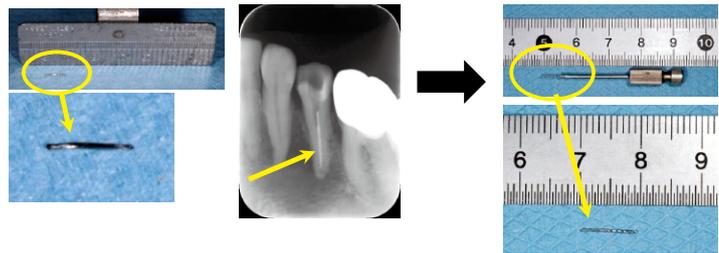
を招く可能性があることから、そのような症例においては超弾性の特性を有する Ni-Ti file が有効になる。しかし、Ni-Ti rotary file は予兆なく突然に破折を生じる可能性があるため、以降の偶発的事故を防止するために、あらかじめ15番以下の手用またはグライドパス用の Ni-Ti rotary file で予備拡大を行うことが重要である。また、細長い扁平根管に対して K-file などの円形器具を用いて拡大・形成した場合の問題点として、イスマスやフィンの形態部分の清掃不足が挙げられるので、フィンに有する場合の全周ファイリングには、根断面から根管形態をイメージして、25番程度のフィンに入り込む細い file を使用して全周に沿って file を操作する必要がある。根管や根尖孔は正円形とは限らず、多くの場合は楕円形であるとの報告があり、円形の長径と短径を意識した形成が必要となる。すなわち、扁平根や根管が偏位している場合には、根管・根尖の形態に合わせて拡大・形成しなければ、穿孔を生じる危険性が高くなる（図3）。このような症例に対しては、根管の形状に合わせて file の形状が変化する Self-Adjusting File (SAF) も開発されている。この file の特長は、薄壁で先の尖った弾性と圧縮性のある独特な格子状かつヤスリ状の Ni-Ti 製の空洞 file の形状であるため、根管の形状に沿って file が柔軟に変形・圧縮され、最小侵襲での根管形成 (Minimally Invasive Endodontics) が可能となることである。さらに、根管の形状に合わせて file の形状が変化することに加えて、根管の形成と洗浄を同時に行える機能も有している。その他にも、キャビテーション効果を有する超音波を利用した根管洗浄や、殺菌効果などを目的とした根管へのレーザー照射（半導体・Er:YAG・Nd:YAG・炭酸ガスレーザーなど）も応用されている。

さらに、緊密な根管充填、すなわち根尖孔および側枝領域に残存した細菌の封じ込めには、シーラーも大きな役割を果たす。これまで長期にわたり使用されてきたキャナルスなどの単に塞ぐという密着性シーラーや、スーパーボンド根充シーラー・メタシール soft などの樹

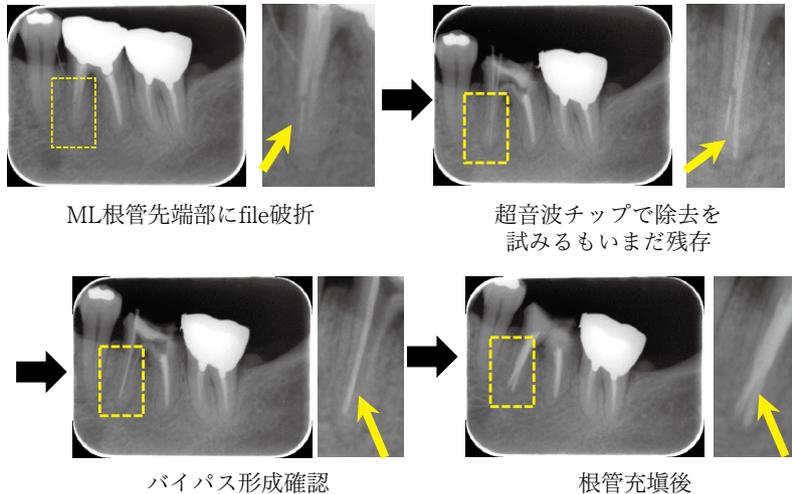
a : Microscope 下で超音波チップを利用



b : Microscope 下でマセランキットを利用



c : Microscope 下でバイパス形成



ML根管先端部にfile破折

超音波チップで除去を試みるもいまだ残存

バイパス形成確認

根管充填後

図 4 File などの器具の根管内破折に対する対応

脂含浸層と長いレジクタグを形成する接着性シーラーに加えて、近年、この緊密な封鎖と細菌の埋葬・化石化という概念に基づいて、MTAを配合したシーラーも市場化されている⁴⁾。近年、Bioactive Glassを配合した「結合性シーラー」も開発された。これは、根管壁象牙質表面の水分子と接触するとシーラー表面にハイドロキシアパタイトの微小結晶が析出して伸長し、象牙細管内にハイドロキシアパタイトのタグ様構造が形成されるという新しい概念に基づいたものである⁹⁾。これらの開発により、根管系を経由した細菌の封鎖（漏出の防止）の観点から根管治療の予後を高めることが期待される。また、主に根管系における抗バイオフィルムの有効性に関して、抗生剤または光増感剤で機能化された抗菌性nanoparticleを洗浄液やシーラーへの添加剤として適用する研究も継続されている¹⁰⁾。

しかし残念ながら、感染根管治療、特に再治療の成功率に関しては、以前の不適切な根管拡大・形成の修正が技術的に非常に困難であることや、file破折・穿孔などの偶発事故、さらには長期間にわたる根管系や根尖病変内に侵入した細菌の除去・殺菌が困難などの理由から「難治性病変」となった症例も少なくない。Fileなどの器具の根管内破折に対しては、Microscope下で超音波

チップなどを利用して除去できる場合もあり、また除去が困難な場合は、Microscope下でバイパスの形成を試みることができる（図4）。穿孔に対する対処として、穿孔が歯槽骨縁下に位置する場合は、MTAを用いて封鎖することで良好な結果が得られるという多くの報告もある。しかし、このMTAの使用は日本では適用外使用にあたるため、特定機能病院などでは適用外使用を申請し承認を受け、患者の同意を得ることが必要となる。

特に根尖部領域で過度な根管拡大や過度な側方加圧を行った場合には、根尖部の歯根に破折を生じる（図5）。このことから、過度の拡大・形成を避けて、残存歯質を可及的に保存するMIの概念に基づく処置が重要になる。

根尖性歯周炎は通常の根管治療により高い確率で治癒するが、根尖病変の有無やその大きさに関して再感染根管治療の成功率を調べたMeta-Analysisでは、5mm以上の大きな病変は有意に成績が悪く、予後不良であると報告されている¹¹⁾。すなわち、根管の著しい湾曲・狭窄・穿孔や除去不可能な器具破折片などにより根管治療が不十分となりやすい難症例とは異なり、通法どおりに適切かつ十分な清掃・拡大・消毒を施したにもかかわらず、根尖病変が縮小しないなどの症状が継続する「難治

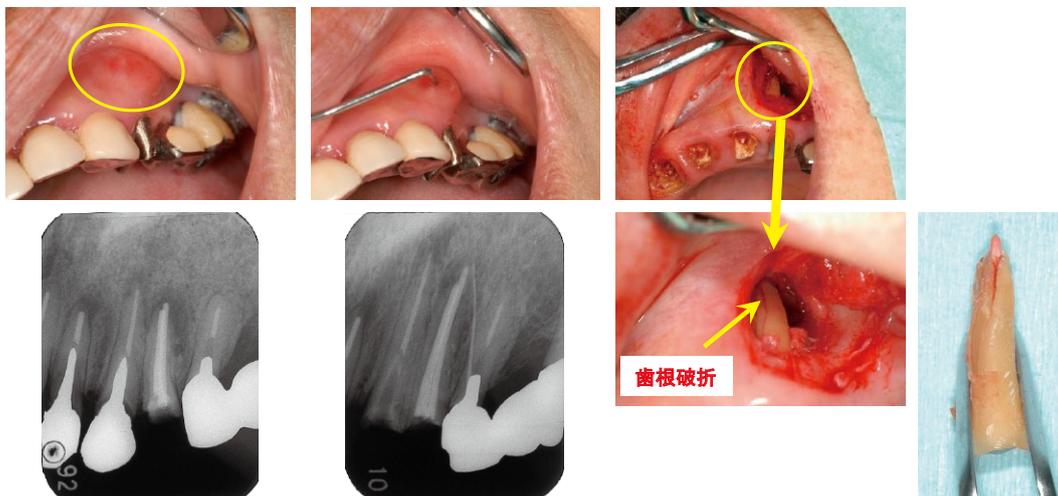


図5 根尖部領域で歯根破折を認めた症例

性」の根尖性歯周炎に遭遇する。難治性根尖性歯周炎の原因としては、通法の根管治療で処置できない副根管(分岐根管)、根部象牙質、根尖付近の生理学的根尖孔外や根尖部セメント質などに細菌が残存していることが考えられる。また、細菌は根尖孔外にも Biofilm を形成して宿主の攻撃を回避するとともに、Quorum Sensing 機構などにより薬剤耐性を獲得して、難治化に関与することも示唆されている¹²⁻¹⁷⁾。そこで、難治性根尖性歯周炎の原因と病態を考慮すると、次の対応として歯根尖切除療法や逆根管充填などの外科的歯内療法が選択される。近年、CBCT 撮影による診査と Microscope 下での処置において、骨補填材や Membrane Barrier (GTR) も併用されている^{18,19)}。以前は、骨削除量も多く、さらに歯根切断面を直視できるよう斜めに切断していたが、Modern Technique (Endodontic Microsurgery) と呼ばれる最近の手法では、幅 4 mm 程度のマイクロミラーが入る骨窩洞を形成し、マイクロミラーと超音波レトロチップを用いた根尖切除面への窩洞形成と MTA による逆根管充填を行うという、MI の概念に基づいたより精度の高い術式となっている。

高周波電流を応用した非外科的歯内療法

超高齢社会を迎えた現在、患者への負担やリスクを考慮して、高齢者や全身疾患を有する多くの患者 (BP 製剤使用患者も含む) に適応可能となる、低侵襲な新規非外科的治療法の開発が望まれている。これまでに、病原細菌の殺菌や感染歯質などの除去に関しては、レーザーや光を応用した Photodynamic Therapy の応用が試みられてきたが、狭小または湾曲領域への到達性など、多くの課題も残されている。また、骨再生促進効果を有する

低出力超音波の間接的照射も試みられているが、厚い顎骨や歯槽骨に囲まれている歯根や根尖病変に対する治療促進効果は明らかではない。近年、医療の分野では iPS 細胞に代表される再生医療が脚光を浴び、細胞・成長因子・足場を用いた組織工学による研究が主流となり、世界中で臨床応用を目指した研究が活発に行われている。歯内療法の分野においても、歯髄幹細胞を移植する歯髄・象牙質再生治療法の臨床研究、成長因子などを用いた歯髄・根尖部歯周組織再生、歯髄血管再生療法 (Pulp Revascularization) や上述した歯根尖切除術への骨補填材・Membrane Barrier の併用など、さまざまな研究が継続的に行われている。その一方で、組織再生を促すために、熱・圧力・超音波や電磁波などの物理的刺激による理学療法も活発に研究されている。なかでも電流刺激による治療促進や再生効果に関しては、電流の流し方、周波数、電流の大きさ、刺激時間や期間などのさまざまな条件が検討され、*in vitro* において間葉系幹細胞・骨芽細胞・筋細胞や心筋細胞などからの成長因子の産生、分化の促進、機能変化や細胞増殖について研究され、*in vivo* 動物実験では、骨折の治療促進や脊髄損傷後の神経の再生効果について報告されている。そこで、歯内療法としての非外科的療法を想定した場合、高周波電流を根管や根尖病変部に通電することにより、直接的に根管および根尖歯周組織に存在する細菌に対する殺菌効果と間接的な抗炎症効果、根尖病変の治療促進や骨再生効果が得られる手法を考案した。

まず初めに、500 kHz の高周波電流通電により、口腔内病原細菌に対する顕著な殺菌効果や病原性の抑制を認め、根管内や根尖孔外の病変に生息する病原細菌の殺菌に有効である可能性が示された²⁰⁾。次に、骨芽細胞様細胞に対する影響を調べたところ、500 kHz にて 1 秒間 5

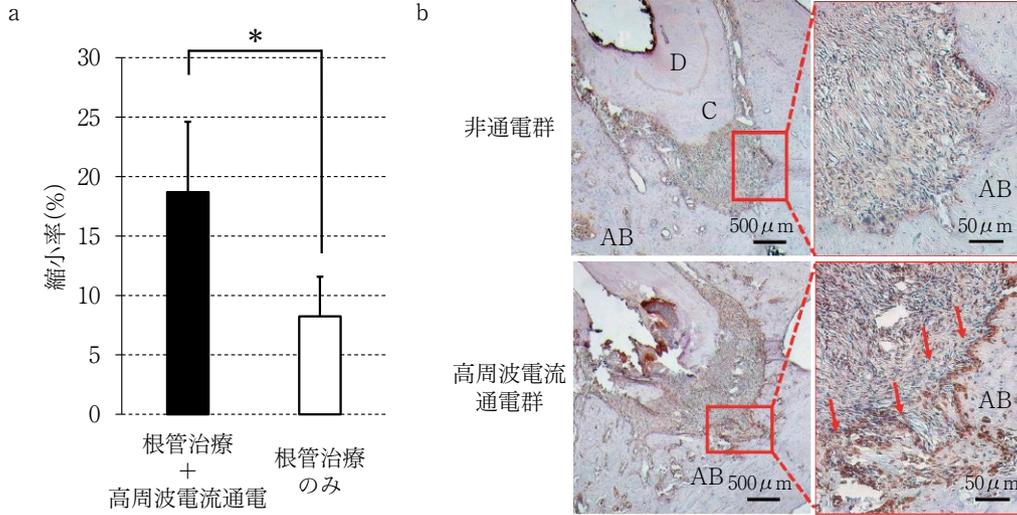


図 6 ラット根管治療モデルへの高周波電流通電

a : 根管治療 (根管充填) 終了後 3 週目の根尖病変体積の縮小率 (* : p<0.05)

b : 免疫組織化学染色による TGF-β1 産生陽性細胞

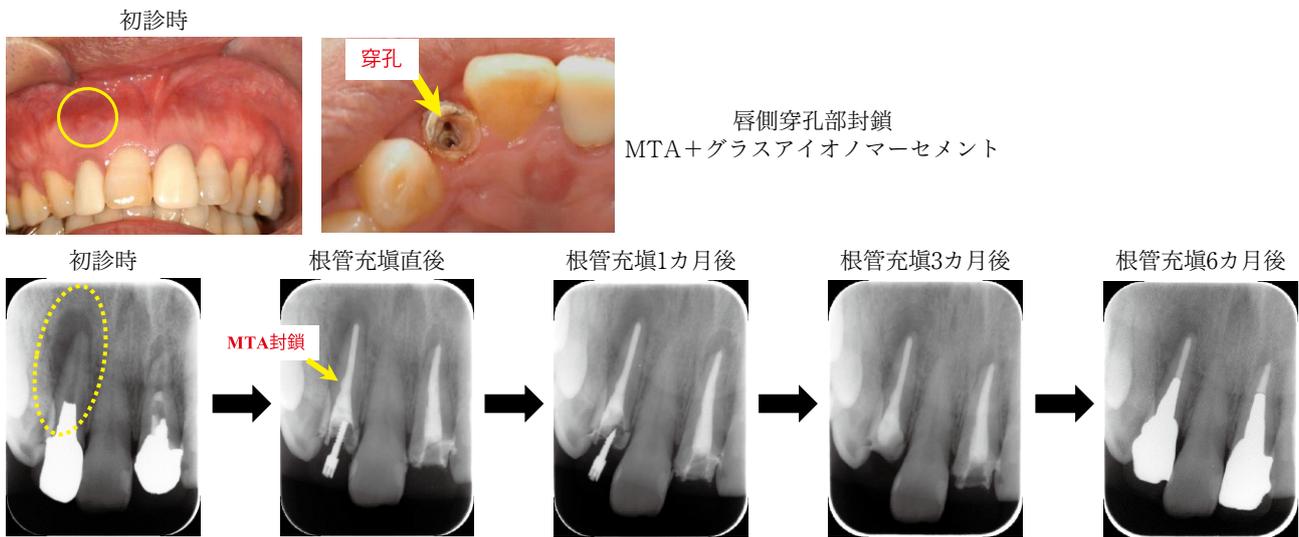


図 7 高周波電流通電を応用した臨床症例

回の高周波電流通電の結果、細胞増殖を促進して活性化し、さまざまな成長因子の発現・産生を誘導することが示され、新規の非外科的歯内療法に応用できる可能性が示唆された²¹⁾。

Sato らの *in vivo* 動物実験において、ラット頭蓋骨の左右 1 カ所にトレフィンバーで骨欠損を形成し、片側の骨欠損部に電極を穿孔して高周波電流 (520 kHz, 1.4 W, 15~30 mA) を通電した結果、8 週間後の μ CT 撮影にてラット頭蓋骨骨欠損部に骨再生が確認され、骨欠損部がほぼ埋まっているものも認められた。さらに 8 週間後の組織標本においても、高周波電流刺激により新生骨の形成が観察され、骨欠損部が完全に新生骨で満たされた標

本も認められた²²⁾。

また、大阪大学・歯科保存学教室の林教授と新潟大学・う蝕学分野の野村教授のグループが新規に開発したラット根管治療モデルを用いて、高周波電流通電し、12 週目まで μ CT 撮影を行って根尖病変の治癒状態を観察した結果、根管治療に加えて高周波電流通電した群では、根管治療のみを行った群と比較して、根管治療 (根管充填) 終了後 3 週目では根尖病変の縮小率が有意に大きく、病変の治癒スピードが速くなっていることが示された (図 6-a)。さらに免疫組織化学染色の結果、通電群においては根尖病変と歯槽骨との境界に TGF-β1 産生陽性細胞が多く認められた (図 6-b)²³⁾。

そこで、難治性根尖性歯周炎への臨床応用を目指して、根管および根尖病変内に高周波電流を直接通電する方法を考案し、徳島大学病院医学系研究倫理審査委員会の承認を得て2010年1月より臨床試験を行った。術式としては、まず通法どおり根管長の計測、根管拡大・形成を行った後、浸潤麻酔下にて10番のK-fileを用いて回転・加圧せずに根尖を穿通し、骨様の抵抗感を得る根尖周囲病変の骨吸収最先端部までの距離を計測し、その後、冷却した生理食塩水で根管を満たして、根管と根尖病変内に高周波電流を直接通電し、ただちに根管を乾燥後、根管充填を行った。通電する位置は、根尖周囲の骨吸収最先端から1mm離れた部位を通電開始点として2mm間隔で、根尖病変および根管内に高周波電流を500kHz (20 W)、1回1秒間/通電点で直接通電し、通電ごとに能動電極の先端に付着した凝固物などは拭き取り、通電による過蓄熱を防止するために2~3秒以上の通電間隔を確保した。能動電極は、先端3mm以外を絶縁体(シリコン)でコーティングした10番のK-fileを使用した。

臨床研究のなかから、難治性と判断された病変に高周波電流通電を応用した症例を示す(図7)。症例は、57歳の男性で2]の歯肉腫脹と瘻孔からの排膿を主訴に来院した患者で、10~20年前に治療して以降、ときどき腫脹と瘻孔からの排膿を認めていた。Dental X線画像では、根尖から遠心根側にかけて連続した大きな透過像を認め、根管充填剤は認めなかった。メタルコアを除去すると、Originalな根管の唇側に穿孔を認めたため、MTAとグラスアイオノマーセメントにて封鎖し、本来の根管については通法に従い根管治療を行った後、高周波電流を通電し、即時に根管充填を行った。根管充填6カ月後のDental X線画像では、透過像はほぼ消失していた。

以上より、高周波電流通電の効果として、顕著な殺菌効果や病原性の抑制を認め、病変部位に生息する病原細菌の殺菌に有効であることや骨芽細胞に対して細胞増殖を促進して活性化させることが示され、非外科的歯内療法に適用できる可能性が示唆された。今後、より効果的な治療法の確立を目指して、電極やその配置、通電部位・方法や通電時間・回数などについてさらなる検討が必要であると考えられる。

おわりに

近年、歯根破折の防止や金属アレルギーの問題、さらには歯科用金属の価格高騰も重なって、補綴領域分野を中心にメタルフリーの治療が増えてきており、根管処置が終了するとファイバーあるいはレジンコアで築造される症例が増加している。しかし、ファイバーあるいはレ

ジンコアにより築造された歯の再根管治療を行う際には、接着性セメントで強固に装着されたファイバーあるいはレジンコアを除去する必要がある。除去する際には、メタルコアと比べて肉眼では歯質との境界が不明瞭であることから、穿孔などの偶発事故の防止やMIの観点からもMicroscopeの使用が必須となり、場合によっては、術前のCBCT撮影が推奨される。歯科保存治療認定医・専門医として、先入観にとらわれることなく、診査・診断を行うことの重要性も再認識し、状況に応じた適切な治療方針や術式を検討しなければならない。

謝 辞

稿を終えるにあたり、高周波電流を応用した非外科的歯内療法に関する共同研究に関して、ご協力を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 林 美加子教授、新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座 舩学分野 野村由一郎教授と北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学分野歯周歯内療法学教室 菅谷 勉教授に深く感謝の意を表します。

本論文の内容に関連し、開示すべき利益相反関係にある企業などはありません。

文 献

- 1) Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 281-293.
- 2) Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 340-349.
- 3) Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *J Endod* 2003; 29: 194-200.
- 4) Yoo JS, Chang SW, Oh SR, Perinpanayagam H, Lim S-M, Yoo Y-J, Oh Y-R, Woo S-B, Han S-H, Zhu Q, Kum K-Y. Bacterial entombment by intratubular mineralization following orthograde mineral trioxide aggregate obturation: a scanning electron microscopy study. *Int J Oral Sci* 2014; 6: 227-232.
- 5) Berman LH, Hargreaves KM. *Cohen's Pathways of the Pulp*, 12th ed. Elsevier: Amsterdam; 2020.
- 6) Baratto FF, Zaitter S, Haragushiku GA, de Campos EA, Abuabara A, Correr GM. Analysis of the internal anatomy of maxillary first molars by using different methods. *J Endod* 2009; 35: 337-342.
- 7) Weng XL, Yu SB, Zhao SL, Wang H-G, Mu T, Tang R-Y,

- Zhou X-D. Root canal morphology of permanent maxillary teeth in the Han nationality in Chinese Guanzhong area: a new modified root canal staining technique. *J Endod* 2009; 35: 651-656.
- 8) Metzger Z. The self-adjusting file (SAF) system: An evidence-based update. *J Conserv Dent* 2014; 17: 401-419.
 - 9) Washio A, Morotomi T, Yoshii S, Kitamura C. Bioactive glass-based endodontic sealer as a promising root canal filling material without semisolid core materials. *Materials* 2019; 12: e3967.
 - 10) Shrestha A, Kishen A. Antibacterial nanoparticles in endodontics: A Review. *J Endod* 2016; 42: 1417-1426.
 - 11) Ng YL, Mann V, Gulabivala K. Outcome of secondary root canal treatment: a systematic review of the literature. *Int Endod J* 2008; 41: 1026-1046.
 - 12) Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 73-77
 - 13) Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28: 304-310.
 - 14) Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002; 28: 679-683.
 - 15) Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8738-8743.
 - 16) Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Teles RP, Leda Quercia Vieira LQ, Teles FR, Sobrinho APR. Microbial ecosystem analysis in root canal infections refractory to endodontic treatment. *J Endod* 2016; 42: 1239-1245.
 - 17) He Z, Liang J, Zhou W, Xie, Q, Tang Z, Ma R, Huang Z. Effect of the quorum-sensing *luxS* gene on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 2016; 124: 234-240.
 - 18) Tsesis I, Rosen E, Tamse A, Taschieri S, Del Fabbro M. Effect of guided tissue regeneration on the outcome of surgical endodontic treatment: a systematic review and meta-analysis. *J Endod* 2011; 37: 1039-1045.
 - 19) Sánchez-Torres A, Sánchez-Garcés MÁ, Gay-Escoda C. Materials and prognostic factors of bone regeneration in periapical surgery: a systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2014; 19: e419-425.
 - 20) Yumoto H, Tominaga T, Hirao K, Kimura T, Takahashi K, Sumitomo T, Bando N, Matsuo T. Bactericidal activity and oral pathogen inactivation by electromagnetic wave irradiation. *J Appl Microbiol* 2012; 113: 181-191.
 - 21) Yumoto H, Hirao K, Tominaga T, Bando N, Takahashi K, Matsuo T. Electromagnetic wave irradiation promotes osteoblastic cell proliferation and up-regulates growth factors via activation of the ERK1/2 and p38 MAPK pathways. *Cell Physiol Biochem* 2015; 35: 601-615.
 - 22) Sato T, Sugaya T, Kudo M, Nakatani M, Maeda N, Kawanami M, Tominaga T. Effects of high-frequency electromagnetic wave stimulation on bone repair in rat calvaria defects. *J Oral Tissue Engin* 2016; 14: 59-64.
 - 23) Matsui S, Yoneda N, Maezono H, Kuremoto K, Ishimoto T, Nakano T, Yumoto H, Ebisu S, Noiri Y, Hayashi M. Assessment of the functional efficacy of root canal treatment with high-frequency waves in rats. *PLoS One* 2020; 15: e0239660.

生体の中の保存治療学
シンポジウム概要

横瀬 敏志

明海大学歯学部機能保存回復学講座保存治療学分野

Overview of Symposium

YOKOSE Satoshi

Division of Endodontics and Operative Dentistry, Department of Restorative Dentistry and Biomaterial Sciences,
Meikai University School of Dentistry

キーワード：次世代型保存治療，人生100歳時代，口腔と全身疾患，硬組織研究，歯髄再生治療

わが国では平均寿命の延長と医療の革新で、平均寿命が100歳を超える時代を迎えようとしている。口腔機能を健康に維持することは健康寿命の延長には必須であり、そのためには歯をう蝕や歯周病から守ることが「人生100歳時代」の基本的概念といっても過言ではないだろう。歯を健康に保存することが使命である歯科保存学では、まさしく今その重要性に再度目を向け、今後の方向性を確認する時がきたといえる。

第153回日本歯科保存学会学術大会のテーマは「人生100歳時代を迎え、次世代型の歯科保存治療学を求めよう」とし、シンポジウムでは「次世代型の保存治療学」を踏まえ、全身と歯科疾患との関連性から保存治療学を考えるために、「生体の中の保存治療学」というテーマにした。これまでの保存治療学からさらに全身疾患との関連性を考えた次世代型の保存治療学とは何かを、みなさんと考えてみたい。

今回はこのようなテーマの下、3名のシンポジストを選出した。落合邦康先生には、細菌学やウイルス学の専

門的立場から、歯周病細菌と全身疾患の関係や口腔機能を回復させることが全身疾患にいかにか大切なことかを、エビデンスとともに概説していただく。片桐岳信先生（共同研究者：町谷亜位子先生）には、保存治療にとって重要な組織であるエナメル質の形態形成のメカニズム、特にBMPシグナルとの関係を説明していただき、MIとの関係を考えたい。そして中島美砂子先生には、これまで長きにわたり先生が追求してきた歯髄組織の再生療法の研究の取り組みとその成果を発表していただき、歯髄再生療法の実現に向けた最新情報をお教えいただくようお願いしている。

3名のシンポジストが示す研究内容とその概念はすべて、健康寿命を延ばすために保存治療がいかにか重要な位置を占めるかを適切に示してくれていると確信している。「人生100歳時代を迎え、次世代型の保存治療を求めよう」という学術大会のテーマに対して、なんらかのヒントと新たな道標になることを切に期待したい。

生体の中の保存治療学
人は口から老い，口で逝く

—咬合機能回復の真の意味論—

落合 邦 康

日本大学

People Age by the Mouth and Die by the Mouth

OCHIAI Kuniyasu

Nihon University

キーワード：口腔常在菌，歯周病，難治性全身疾患

はじめに

歯周病が糖尿病，脳・血管障害や早産，肥満そして認知症などさまざまな全身疾患のリスクファクターとなることが明らかとなってきた¹⁻³⁾。

日本は世界に例をみない速さで高齢化が進み，急増する高齢者の医療費問題は喫緊の課題となっている。この問題を解決するために重要なことは，いかに高齢者の健康を維持し平均寿命と健康寿命の差を縮め，要介護者を減らすかという点に絞られる。医療未発達の国々の主な死亡原因は，肺炎，下痢，マラリア，麻疹，AIDSなど感染症で，5歳未満の乳幼児は約2秒に一人命を落としていることが報告されている（WHO統計，2004年）。医療先進国の本邦における死亡原因の上位は悪性新生物，心疾患，老衰，脳血管障害，肺炎となっている（厚生労働省人口動態調査，2018年）。それ以前の統計調査においては肺炎が第3番目であったが，在宅医療の促進政策により医療機関による継続的な患者ケアと観察が困難となった結果，死亡原因の多くが老衰と診断される傾向が強まったと考えられる。老衰患者の多くは，反復性の誤嚥性肺炎罹患率が高いことが報告されており，脳血管障

害による長期療養者においても同様である（厚生労働省人生の最終段階における医療の決定プロセスに関するガイドライン：平成19年発表，27年改訂，<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10800000-Iseikyoku/0000078981.pdf>）。がん細胞による臓器不全およびがん治療による免疫力の低下は，直接的に感染症に対する抵抗力が低下する。感染症研究者は，死亡原因を直接的死因と間接的死因に分けて考えるが，悪性新生物患者およびその他の死亡原因の上位疾患においても，直接の死亡原因の大部分は肺炎や敗血症などの感染症である。主な死亡原因を総合すると，本邦においても医療未発達の国々と同様，感染症といえる。

現在，世界中を混乱の渦に巻き込んでいる新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の死亡率は平均0.66%（2020年12月現在）で季節性インフルエンザの0.1%前後の死亡率に比べ高い。先に述べたように，高齢者の死亡原因における肺炎の大部分は誤嚥性肺炎で，70~80歳での約70%，90歳以上の約95%が誤嚥性肺炎で亡くなっている。COVID-19による高齢者（65~84歳）の死亡率は約15.1%と高いものの，誤嚥性肺炎のそれとは比較にはならない。外因性感染症と内因性感染症を単純に比較することは困難なものの，医療従事者は専門分野の

いかにかわらず、本邦の最大の死亡原因が口腔や咽頭の常在細菌による誤嚥性肺炎であることを強く認識する必要がある。したがって、「寿命とは常在菌と共存できる期間」といい換えることができる。

口腔内細菌叢と腸内細菌叢^{4,5)}

われわれの粘膜および体表のすべてが常在菌で覆われていることは、広く知られている。しかし、数多くの講演をさせていただいてきた経験からいえることは、常在菌に関する一般的な興味や知識は腸内細菌に関するものが多く、口腔常在菌に関する関心や知識はきわめて乏しい。また、歯科医療従事者においても、口腔細菌に対する認識は十分ではないとの印象をもっている。

デンタルプラーク（以下、プラーク）には、未同定の菌種を含め約700種類、総計約5000億の細菌が生息している（図1）。一方腸管には、約1000種類、総計1000兆個程度の細菌が生息している。口腔の総面積は200 cm²、しかし腸管は8~8.5 mの長さがあり、総面積は32 m²程度とされる。単位面積当たりの細菌密度は、腸管より口腔が高い事実はほとんど知られていない。

また、腸管粘膜は厚いムチン層に覆われており、糞便は直接腸管粘膜に接触することはない。一方、口腔細菌は、舌、歯肉や口腔粘膜に直接接触し、常に組織内に侵入している。感染は細菌の組織付着から始まることを考えると、いかに口腔は感染のリスクの高い器官か理解できる。

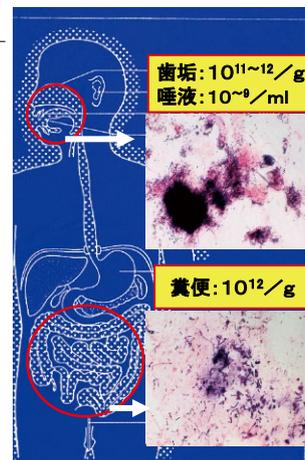
ご存じのように、口腔細菌は1日のなかでも起床時、食後、ブラッシング後に唾液中の総細菌数が変動する。また、ブラッシングを停止すると1週間程度で好気性菌、通性嫌気性菌、偏性嫌気性菌の比率が変化し、遷移が誘導される。レンサ球菌やグラム陽性桿菌が中心となり形成されるプラークの早期定着細菌叢は、健康な口腔環境を維持するという重要な役割をしている。しかし、異菌種間で起こる共凝集によりプラーク細菌の蓄積量が一気に増えると歯周病原細菌などが増加し、プラークは病原性の後期定着菌叢へと遷移が起こる。腸内細菌叢においては、短期間にこのような現象が誘導されることはない。つまり、短時間に起こる正常細菌叢から病原性細菌叢への遷移は、近接する細菌間の増殖促進と抑制によって繰り返される生存競争で、凝集と共凝集というプラーク形成細菌特有の性状によるものといえる。

フレイルと咬合機能回復

近年、サルコペニア（加齢性筋肉減少症）とフレイル（虚弱）という概念が各方面で話題となっている（図2）。

細菌種と総細菌数/総面積

1. 口腔
 - 1) 総面積：200 cm²
(ティッシュペーパー：1/2~3/4枚)
 - 2) 総細菌種：約700種類
 - 3) 総細菌数：約5000億
2. 腸管
 - 1) 総面積32 m²
(畳：約20畳)
 - 2) 総細菌種：約1000種類
 - 3) 総細菌数：約1000兆



単位面積当たりの細菌密度
口腔 ≧ 腸管

デンタルプラークと糞便の染色像 (Gram 染色法)

図1 口腔と腸内環境の相違

腸内細菌と異なり口腔内の細菌種は、付着能および凝集能が強く、典型的な細菌の凝集塊バイオフィームである歯垢（デンタルプラーク）を形成する。総細菌数は腸内細菌叢が多いものの、単位面積当たりの細菌密度はデンタルプラークが高い。なお、細菌数は測定法により異なる。

要介護につながるフレイルの第一段階は、社会的・心理的フレイルといわれ、高齢者の孤食やうつ病など社会との交流意欲が減少して起こる。それに伴い健康意識や運動量も低下し、食欲減退による栄養面のフレイルが起こる。これが第二段階のフレイルで、この状態が続くと第三段階の身体的フレイルから要介護状態となる。栄養摂取や運動などにより第二段階から第一段階へ、第一段階からプレフレイルへと改善することは可能である。しかし、第三段階からの復帰は困難とされている。一連のフレイルの進行を防ぐ最も効果的な手段は、社会的参加意欲を維持し精神的に健康でいること。そして何よりも、口からものを食べ、栄養をつけることが重要とされる。この第一・第二段階の時点でフレイルの進行を防止することが、要介護患者数の抑制につながるとされる。その最も効果的な方法は、口腔ケアによるう蝕および歯周病予防と咬合機能回復で、歯科医療の介在が必須と考えられている。保存・補綴治療による咬合機能回復の背景には、「咬合機能回復＝要介護の防止」という大きな役割を果たしていることを認識する必要がある。高齢者医療従事者や関連医療学会関係者から、歯科医療の重要性が報告されていることはきわめて興味深い。要介護防止の視点からも、一層の医科歯科連携が求められる。

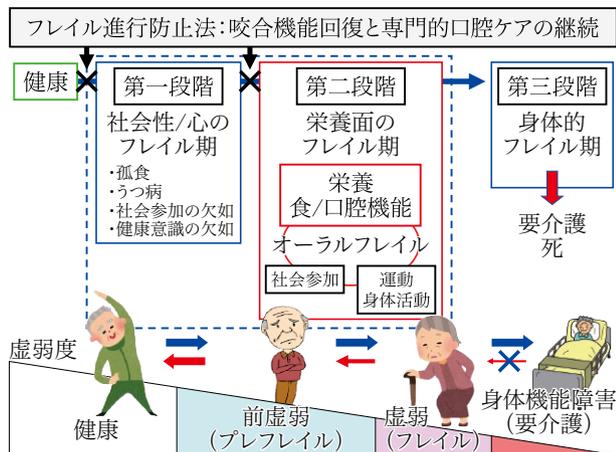


図2 フレイルと歯科医療

健康な高齢者が要介護にいたるまでにはさまざまなフレイル状態が存在する。咬合機能回復と専門的口腔ケアは、すべての段階において、フレイルが進行することを防止することができる。また、さまざまな臨床研究から第一・第二段階においては歯科医療の介入によりその前段階へのフレイル回復が見込めることが報告されている。歯科医療は、高齢者医療においてきわめて重要な位置を占める。

「口からものを食べる」こととは

周術期医療チームや終末期の患者の健康管理に、歯科医師や衛生士が加わる機会が増えた。この背景には、歯科医療の介入により術後の回復が促進され、在院日数が減少し、医療機関および患者の負担軽減につながるなどの経験がある。以前に比べ、明らかに医療従事者の口腔に対する認識の変化がある。しかしながら、医科歯科連携が遅々として進まない。背景にはさまざまな問題があることは認識しているが、基礎研究者の視点でいえることは、両者の食物の経口摂取に対する科学的根拠と根本的な認識に差があると考えている。食物の経口摂取の重要性を認識するには、非経口的栄養補給法における人体の変化を認識すればさほど困難なことではない。

代表的な非経口的栄養補給法として末梢静脈栄養(PPT)と中心静脈法(TPN)があり、ある程度の延命は期待できるものの生体内にはさまざまな変化が起こる。血管内に直接ブドウ糖やアミノ酸製剤を入れるため、もはや腸管、特に小腸を維持するための栄養補給は重要でなくなる。その結果、小腸粘膜の絨毛は短期間に萎縮し、脆弱化する。さらに、粘膜免疫研究により腸管粘膜には、全身のリンパ球の約70~80%が存在することが解明されている。非経口摂取による腸管粘膜の菲薄化により、組織内の免疫担当細胞数は激減する。その結果、

生命維持の根幹である免疫力は低下し感染防御力も著しく低下する。つまり、非経口摂取により、栄養学的にも免疫学的にも生命維持が困難な状態が誘導される。残念ながらこの事実はあまり知られていない。細菌学、免疫学、栄養学、フレイルや高齢者医療などさまざまな知識から得られた「口からものを食べることの真の意味」を医科・歯科を問わず、すべての医療従事者や介護関係者は理解する必要がある。したがって、「歯科医療は日本を救う」といっても過言ではないといえる。

歯科界には長い間、「臨床技術や歯科材料の開発が歯科医療発達そのものである」との考えが根強く、細菌学や生理学などのいわゆる基礎科学に対する知識はないがしるにされてきた。約半世紀にわたる歯科大学教育と研究に携わり、このことを肌で実感してきた。確かに良い義歯が作れることは良い歯科医師の条件であることは間違いない。しかし、高齢者の著しい増加や歯周病と全身疾患の関係がより鮮明となった現状において「咬合機能回復は消化吸収を促進する」や「脳を活性化する」程度の歯科界からの説明では、医学界が納得し医科歯科連携を積極的に推進するとは考えにくい。また、医療行政関係者から「医科に比べ、歯科からは歯科医療の重要性を納得させる根拠が十分ではない」と説明を受けたことがある。これらの視点から、われわれは主に「口腔感染症と全身疾患」に焦点を当てた研究活動を行ってきた。口腔領域の研究者は、基礎・臨床を問わず、口腔と全身との関連性を科学的に解明する姿勢が求められる。臨床に携わる歯科医師は、総合内科医的な知識をもち診療を行う姿勢が必要となるだろう。その結果、医科歯科連携が促進され歯科医療従事者の活動範囲は飛躍的に広がると確信している。

口腔感染症と全身疾患の考え方

歯周病を中心に、口腔感染症と全身疾患について触れたいと思う。歯周病がリスク因子となる全身疾患は慢性疾患で、発症までに「長時間を要する」ものが多い。数多くの因子が関与するため、発症機序はきわめて複雑である。したがって「歯周病が原因の疾患」と断言することはやや問題がある。通常、生体内では生理的な恒常性維持が働くため、容易に全身疾患が発症することはない。特に、免疫システムには多くの細胞や因子がかかわり感染防御にあたる。このシステムは急性炎症や急性疾患にはうまく対応するが、大量の微生物感染や長期に及ぶ炎症に対しては弱点がある。この場合、この防御システムそのものが組織破壊に働くことがある。COVID-19でみられるサイトカインストームが良い例で、炎症が過剰な場合や慢性炎症のような場合も類似の減少が起こ

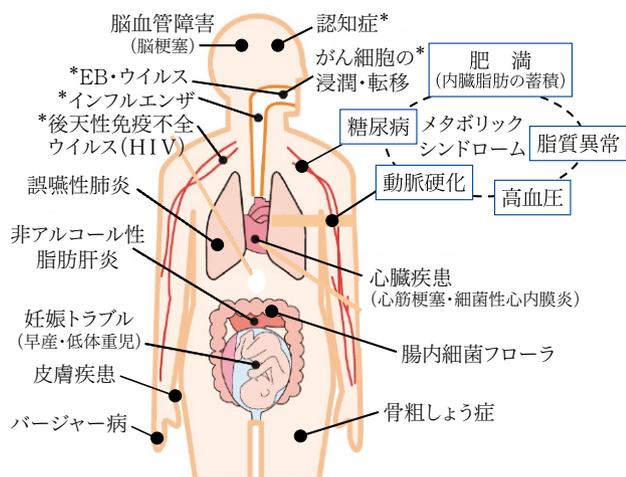


図3 歯周病がリスクとなる全身疾患

歯周病がリスク因子として発症する全身疾患はきわめて多い。歯周病は、感染による軽度慢性炎症性疾患として生体にさまざまな影響を及ぼし、多くの全身疾患の誘因および原因となる。なお、図中の全身疾患には、現在基礎研究段階で今後臨床研究や疫学調査が必要とされる全身疾患も含む。*：落ちらが論文報告した全身疾患

る。さらに、歯周病が関与する全身疾患の多くは、背景に加齢とともに生じる免疫システム上のアンバランスがあると考えてよい。

歯周病と全身疾患との関係は大きく2つに分類して考えることができる(図3)。1つは、細菌や内毒素を中心とした菌体成分、そして代謝産物などが直接の原因となる疾患。もう1つは、感染の結果起こる組織炎症から供給される炎症物質や炎症性サイトカインによって発症する疾患である。しかし、発症までに長期間要する場合などは両者を明確に区別することが困難な疾患もある。

1. 細菌や代謝産物などが原因となる主な疾患

1) 細菌性肺炎(誤嚥性肺炎)^{6,7)}

すでに死亡原因で述べたが、代表的疾患として誤嚥性肺炎が挙げられる。健康者の肺炎(市中肺炎)は、肺炎球菌など特定の細菌が原因となるが、誤嚥性肺炎の場合は病巣部位から歯周病関連菌を含む口腔や咽頭の細菌が多数検出されるため特定の細菌を原因菌とすることは困難である。多くの臨床研究によって口腔清掃により発症率が著しく低下することが報告されており、専門的な口腔ケアは肺炎防止にきわめて有効である。

2) 心臓および循環器疾患(アテローム型動脈硬化症)⁸⁻¹⁰⁾

歯周病原細菌遺伝子が心臓弁や大動脈瘤から検出され、歯周病が動脈硬化や冠動脈疾患に直接的、または間接的にかかわっていることが指摘されている。*Porphyromonas gingivaris*などの歯周病原細菌は、血液細胞内

に侵入し食菌作用を回避することができる。歯周病は、高血圧・喫煙・糖尿病や肥満からは独立したリスク因子と考えてよい。歯周病変部からの持続的な炎症物質の供給も、アテローム性動脈硬化の誘因となっている可能性も高いと考えられている。

3) 非アルコール性肝炎(NASH)¹¹⁻¹³⁾

歯周病原細菌(*P. gingivalis*)や腸内細菌のLPSが持続的に血管内に侵入することにより、糖尿病、動脈硬化、慢性腎疾患などの生活習慣病の発症・増悪にかかわっていることがわかっている。NASHもその一つで、飲酒習慣のない人が脂肪肝から慢性肝炎、肝臓がんにいたる可能性が指摘されており、医科領域においても歯周病とNASHの関係が注目されている。

4) 腸内細菌叢変化の誘導^{14,15)}

唾液中の口腔細菌を大量に飲み込むことにより、腸内細菌叢にさまざまな影響を与えている可能性が指摘されている。*P. gingivalis*を動物の口腔内に投与することにより腸内細菌叢のバランスが崩れ、腸管粘膜上皮細胞の結合部位が変化し血中内の内毒素の濃度が上昇することが報告されている。その結果、NASH、心臓、腎臓、膵臓、血管などにさまざまな影響を与えていると考えられる。さらに詳細な研究が必要であるが、きわめて興味ある結果といえる。

5) ウイルス疾患

歯周病とウイルス疾患との関係は未解明な分野で、疫学調査を含め今後より詳細な研究が必要といえるが、相互関係を強く示唆する報告がある¹⁶⁾。

(1) インフルエンザ

インフルエンザウイルスは感染・増殖後、ノイラミニダーゼ(NA)酵素により感染細胞から遊離し、近傍の細胞に感染が拡大する。口腔レンサ球菌の産生するNAがウイルスの遊離を促進すること、そして、この作用はリレンザなどの抗インフルエンザ薬によって抑制されないことが判明した。また、*P. gingivalis*の産生するタンパク分解酵素(gingipain)がウイルスのHANAタンパクを解離しシアル酸との結合を強め、ウイルスの細胞附着と細胞内への侵入を促進する。その結果、大量のウイルスが増殖し感染を重症化すると報告がある。これらの結果は、不十分な口腔ケアや歯周病がインフルエンザ感染を促進するばかりでなく、重症化する可能性を強く示唆している^{16,17)}。特に、高齢者はインフルエンザが重症化ししばしば死亡原因ともなるため、口腔ケアは誤嚥性肺炎ばかりでなくインフルエンザ対策としても考える必要がある。

(2) ヒト免疫不全ウイルス(HIV)およびEpstein-Barrウイルス(EBV)

感染したHIVは、細胞の染色体に結合したヒストン脱

アセチル化酵素 (HDAC) の作用によってウイルス遺伝子の増殖が抑制され長期間の潜伏状態となる。歯周病原細菌の代謝産物・酪酸により HDAC の働きが阻止されるとウイルス粒子の複製が開始される。また、歯周病によって血中濃度が上昇した炎症性サイトカイン (TNF- α) も HDAC の働きを抑制する。したがって、血液中 TNF- α と歯周局所において歯周病原細菌により産生される酪酸との相乗作用により HIV 再活性化の可能性が考えられる。これらの結果から、HIV 感染者が重症の歯周病に罹患した場合、複製された HIV により CD4 リンパ球数が減少し、免疫不全に陥り AIDS を発症する可能性が強く示唆される。AIDS による免疫力の低下から重症の歯周病を発症するという従来の考えとは、全く逆の仮説が成り立つことになる。臨床 HIV 感染者の AIDS 発症機序が解明されていなかったため、われわれの研究により AIDS 発症に歯周病が深くかかわっている可能性が示唆されたことは、世界中に驚きをもって受け入れられた¹⁵⁾。

成人の大部分が感染し、唾液腺などに潜伏している EBV も酪酸により再活性化することが報告されている。重度の歯周病患者のポケット内から EBV が高頻度に検出されオッズ比は *P. gingivalis* より高いことから、EBV は各種がんやリウマチのみならず、歯周病の発症とも関係する可能性がある。

6) がん細胞の浸潤転移¹⁸⁻²⁰⁾

大規模疫学調査から口腔レンサ球菌の産生するアセトアルデヒドが、口腔や上咽頭がんの誘因となる可能性が報告されている。また、酪酸が炎症部位やがん細胞の浸潤部位に多くみられる糖タンパクの遺伝子の発現を促進することから、がん細胞の転移を誘導する可能性が示唆されている。

7) 認知症 (アルツハイマー型)²¹⁻²⁴⁾

本邦の認知症患者はおおよそ 462 万人おり、5 年以内に半数が認知症となる確率の高い経度認知障害者は 400 万人とされ、2025 年には患者数が 700 万人を超えると予想されている (日本における認知症の高齢者人口の将来推計に関する研究、内閣府「平成 29 年度版高齢社会白書」)。認知症は大きく 4 つに分類されるが、アルツハイマー型認知症 (AD) の患者数が最も多く全体の約 70% を占める。AD 患者が加齢性の記憶力低下と最も異なる点は、自覚がないことと、症状が進行し日常生活において大きな障害やトラブルが起こることである。

認知症の患者の脳は全体に委縮しているが、近い過去の記憶を司る海馬の顕著な萎縮がみられる。海馬の神経線維に神経細胞の代謝産物のアミロイド β が凝集し老人斑が形成され、神経細胞が変性してしまう。アミロイド β の沈着や老人斑の形成が AD 発症の 20~30 年前から

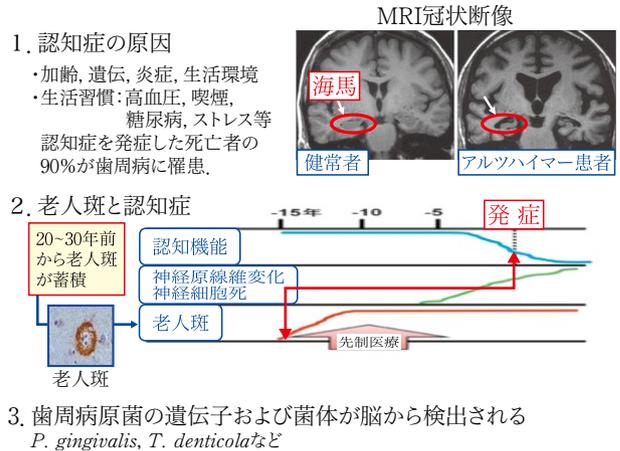


図 4 歯周病とアルツハイマー型認知症

認知症の原因は不明であるが歯周病の発症背景ときわめて類似している。アルツハイマー型認知症 (AD) の患者の脳は全体的に萎縮が進んでいるが、特に海馬の萎縮が顕著である。神経の代謝産物アミロイド β が神経組織に蓄積し老人斑が形成される。その結果神経組織の変性が起こる。アミロイド β の沈着は AD 発症の 20 年以上前から始まっているとの可能性が指摘されている。

すでに起こっているとの報告もあり、30 歳代後半からすでに AD 予備軍となっている可能性がある (図 4)。

老人斑の形成機序は解明されていないため、効果的な予防法や治療法はない。関係が深いとされる因子として加齢、高血圧と動脈硬化、糖尿病、難聴、喫煙などの生活習慣、その他、降圧剤、抗うつ剤や抗コリン剤などの薬物がある。驚くことに、これらはすべて歯周病発症の背景となる因子ときわめて類似している。

歯周病の関与を裏付ける研究報告は多いが、研究結果の内容は大きく 2 つに分けることができる。1 つは、*P. gingivalis* や口腔スピロヘータ歯周病原細菌の遺伝子が脳内から検出されるなどの報告から、菌が直接脳に影響を及ぼしているという考え方。また、AD 患者の脳内から遺伝子だけではなく *P. gingivalis* 菌体も高頻度で検出されている。動物実験からも *P. gingivalis* は脳内に移行するなんらかの手段をもっている可能性が示唆される。特に、内毒素やジンジパイン酵素が強く影響しているとの研究報告がある。われわれの研究でも、歯肉内の酪酸がアミロイド β の前駆体の産生を促進しているという結果も得られている。

ほかの 1 つは、歯周病の炎症物質が脳に作用している、あるいは、歯周病変部位で活性化されたマクロファージが影響しているというもの。認知症における腸内細菌の影響も指摘されているが、消化器官よりもはるかに脳に近い歯周組織の炎症が脳に多く影響を及ぼしている可能

性は無視できない。

現在までの研究結果から歯周病は、ADの発症を早め重症化する可能性がきわめて高いといえる。歯周病とADとの関係は日本をはじめ、世界各国で精力的に研究されており、近い将来より明確になるものと思われる。

2. 炎症が誘因となる主な疾患

1) 糖尿病と肥満 (メタボリックシンドローム)²⁵⁻²⁷⁾

歯周病は糖尿病の合併症であるばかりでなく、糖尿病発症のリスク因子であるといえる。歯周病変部位から持続的に供給される炎症性サイトカイン (TNF- α など) がインスリン抵抗性に影響を与え、糖尿病発症に関与すると考えられている。糖尿病対策において口腔ケアの重要性が認められ、医師会と歯科医師会が連携を深め糖尿病対策を行っている地域が広がっている。

内臓脂肪には TNF- α などの炎症性サイトカインが多数発現しており、炎症反応を促進することから歯周病や糖尿病を悪化させることが報告されている。また、過度の肥満により炎症を抑制するアデポネクチンの産生が低下し、炎症や炎症性サイトカインの産生がより促進され、歯周組織の再生能力も低下することが知られている。歯周病によって肥満が促進されるか否かはより詳細な研究が必要と思われるが、歯周病、肥満、そして糖尿病は相互に深く関係しているものと思われる。

2) 早産・低体重児出産^{28,29)}

子宮収縮を促すプロスタグランジンや炎症性サイトカインが歯周病の進行とともに妊婦の血中に増加し、胎児の成長に悪影響を与える。そのほかの数多くの疫学や臨床研究から、歯周病が早産や低体重児出産のリスクとなることが報告されている。

おわりに

歯周病と全身疾患が各方面で話題となるにつれ、歯科医療に対する注目度は高まっている。そのような背景からかさざまな方面で講演をする機会があり、幅広い年齢層の歯科医師と接してきた。一部の歯科医の方から、「義歯もうまく作れないのに、何が全身疾患だ……」という意見をいただいたこともある。もちろん、良い歯科治療ができ良い義歯を作ることが良い歯科医師であることは間違いない。う蝕全盛の時代と異なり、現在においてそれは“歯科医の最低条件”ではないだろうか。口腔感染症、特に歯周病が全身疾患に深くかかわっていることが判明しても、歯科医師には全身疾患を診断・治療はできない。したがって、国民の健康と長寿を考えると必然的に医科との協力が必須となる。そのために歯科医療従事者は関連分野の医科との共通言語を理解し、さらに、歯科サイドから医療従事者へ提案やアドバイスを行える

資質を備えなければならない。口腔だけを視野に入れた歯科治療に特化しては、みずから活躍の場を狭めてしまう。今はまさに、新たな視点で歯科医療を広い視野でとらえ、新たな方向性を考える時期が来たものと考えられる。

口腔は腸管とは大きく異なり、口腔清掃を怠ると常在細菌叢に遷移が起こり、歯周病などの口腔疾患の原因となる。早急に命にかかわる感染症ではないと放置されるため、しばしば重症化し難治性疾患の原因となる。歯科医療従事者は、咬合機能回復の真の重要性を理解するとともに、歯科医療は高齢化社会において今まで以上に重要な役割を果たしていることを認識する必要がある。

日本細菌学会の祖・北里柴三郎博士は「医療の究極の目的は予防にあり」という言葉を残された。歯科医療従事者は、国民の健康管理に深くかかわることで感染症予防や医療の最前線に立ち、「歯科医療が日本を救う」という自負と自覚が必要なのではないだろうか。

謝 辞

今回の発表に関し、多大なるご尽力を頂いた明海大学機能保存回復学講座の横瀬敏志教授に心から感謝申し上げます。

本論文に関し、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 日本歯周病学会. 歯周病と全身の健康. 1版. 医歯薬出版:東京;2016.
- 2) 落合邦康. 人は口から古い口で逝く. 1版. 日本プランニングセンター:千葉;2021.
- 3) 落合邦康. 口腔細菌と疾患. 落合邦康. 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. シーエムシー出版:東京;2015. 91-213.
- 4) 泉福英信. 口腔常在菌の構成一形成過程. 加齢に伴う推移, その他の影響因子など. 落合邦康. ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. 1版. シーエムシー出版:東京;2020, 10-15.
- 5) 平山和宏. 腸内常在菌叢の構成一形成過程, 年齢に伴う推移, その他の影響因子など. 落合邦康. ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. 1版. シーエムシー出版:東京;2020, 3-8.
- 6) Awano S, Ansai T, Takata Y, Soh I, Akifusa S, Hamasaki T, Yoshida A, Sonoki K, Fujisawa K, Takehara T. Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. J Dent Res 2008; 87: 334-339.
- 7) 山下喜久, 竹下 徹. 高齢者の肺炎と口腔細菌. 落合邦康. 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. 1版. シーエムシー出版:東京;2015, 109-116.
- 8) Kudo C, Shin WS, Minabe M, Harai K, Kato K, Seino H,

- Goke E, Sasaki N, Fujino T, Kuribayashi N, Pearce YO, Taira M, Maeda H, Takashiba S. Analysis of the relationship between periodontal disease and atherosclerosis within a local clinical system: a cross-sectional observational pilot study. *Odontology* 2015; 103: 314-321.
- 9) 落合智子. 歯周病で誘導される動脈硬化と酸化ストレス. 落合邦康. 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2015, 168-173.
- 10) 落合智子. 口腔感染症と動脈硬化. 落合邦康. ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2020, 182-187.
- 11) 和田孝一朗. 非アルコール性脂肪肝炎発症のリスクファクターとしての口腔内細菌. *臨床薬理* 2001; 42: 67-68.
- 12) Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S, Tohnai I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, Amano A, Okanoue T, Ooshima T, Nakajima A. Involvement of a periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2012; 12: 16-20.
- 13) 和田孝一朗, 結束貴臣, 小川祐二, 今城健人, 米田正人, 中島 淳. 落合邦康. 歯周病と非アルコール性脂肪肝炎, ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2020, 236-243.
- 14) 山崎和久, 山崎恭子. 口腔細菌の腸内細菌叢への影響. 落合邦康. ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2020, 30-39.
- 15) 今井健一, 落合邦康. 歯周病原菌とウイルス感染症—ウイルス微生物間相互作用による潜伏感染ウイルスの再活性化機構. 落合邦康. 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2015, 144-152.
- 16) Kamio N, Imai K, Shimizu K, Cueno ME, Tamura M, Saito Y, Ochiai K. Neuramidase-producing oral mitis group streptococci potentially contribute to influenza viral infection and reduction in antiviral efficacy of zanamivir. *Cell Mol Life Sci* 2014; DOI 10.1007/s00018-014-1669-1.
- 17) 神尾宜昌, 落合邦康. インフルエンザ. 落合邦康. 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2015, 127-133.
- 18) 宮崎裕司, 菊地建太郎, 草間 薫. 口腔微生物とがん. 落合邦康. 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2015, 135-141.
- 19) 草間 薫. 口腔微生物と口腔がん. 落合邦康. ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2020, 211-218.
- 20) 日暮琢磨, 吉原 努, 松浦哲也, 中島 淳. 口腔内細菌と大腸癌. 落合邦康. ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2020, 221-227.
- 21) Poole S, Singhrao SK, Kesavalu I, Curtis MA, Crean S. Determining the presence of periodontopathic virulence factors in short-term postmortem Alzheimer's disease brain tissue. *J Alzheimers Dis* 2013; 36: 665-677.
- 22) Poole S, Singhrao SK, Chukkapalli S, Rivera M, Velsko I, Kesavalu L, Crean S. Active invasion of *Porphyromonas gingivalis* and infection-induced complement activation in ApoE^{-/-} mice brain. *J Alzheimers Dis* 2015; 43: 67-80.
- 23) 松下健二. 認知症. 落合邦康. 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2015, 176-181.
- 24) 武 洲. 認知症. 落合邦康. ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2020, 257-264.
- 25) Demmer RT, Squillaro AS, Papapanou NP, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs Jr DR, Desvarieux M. Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Diabetes Care* 2012; 35: 2235-2242.
- 26) 西村英紀. 歯周炎症が糖尿病の病態に及ぼす影響の想定メカニズム. 日本歯周病学会. 歯周病と全身の健康. 1版. 医歯薬出版: 東京; 2016, 89-91.
- 27) 新城尊徳, 西村英紀. 糖尿病. 落合邦康. ヒト常在菌叢と生理機能・全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2020, 199-209.
- 28) Blencowe H, Cousens S, Oestergaard MZ, Chou D, Moller AB, Narwal R, Adler A, Vera Garcia C, Rohde S, Say I, Lawn JE. National, regional, and worldwide estimates of preterm birth rates in the year 2010 with time trends since 1990 for selected countries: a systematic analysis and implications. *Lancet* 2012; 379: 2162-2172.
- 29) 相沢 (小峰) 志保子, 廣畑直子, 早川 智. 口腔細菌と妊娠合併症. 落合邦康. 腸内細菌・口腔細菌と全身疾患. 1版. シーエムシー出版: 東京; 2015, 191-193.

生体の中の保存治療学

人生100歳時代における硬組織研究の挑戦

町谷 亜位子^{1,2,3} 片桐 岳 信¹¹埼玉医科大学医学研究センター埼玉医科大学医学部ゲノム基礎医学²明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野³明海大学歯学部機能保存回復学講座オーラル・リハビリテーション学分野

The Challenges for Research of Hard Tissue with a 100-Year Life

MACHIYA Aiko^{1,2,3} and KATAGIRI Takenobu¹¹Division of Biomedical Sciences, Research Center for Genomic Medicine, Saitama Medical University²Division of Orthodontics, Department of Human Development and Fostering, Meikai University School of Dentistry³Division of Oral Rehabilitation of Sciences, Department of Restorative and Biomaterials Sciences,
Meikai University School of Dentistryキーワード：TGF- β ファミリー，Smad4，歯の発生，上皮系細胞，齧歯類切歯

はじめに

全世界的な高齢化が進むなか、わが国は「人生100歳時代」を迎えつつある。2019年の日本人の平均寿命は男性81.41歳、女性87.45歳であり、世界でもトップレベルの長寿国である¹⁾。高齢化の進展に伴い、一生のなかで健康で自立した生活を営める期間を指す「健康寿命」をいかに伸ばすかが、重要な課題となっている。健康寿命を妨げる要因には、認知症、脳血管障害、高齢による衰弱、関節疾患、転倒・骨折などが挙げられる。これらは、いずれも口腔や運動器の機能に強く関与しており、歯や骨などの硬組織の健康が、健康寿命の延長に重要な役割を果たすことがわかる。本稿では、われわれの最近の研究成果を基に、歯の上皮細胞の分化制御機構を考察する。

齧歯類の切歯を用いたエナメル質の形成機構の解析

1本の歯は、性状が異なるエナメル質と象牙質から構成される。エナメル質は上皮系細胞のエナメル芽細胞などにより形成され、象牙質は間葉系細胞の象牙芽細胞などによって形成される。一連の歯の形成過程において、上皮系細胞と間葉系細胞は、さまざまな液性因子や細胞接着因子などを介して相互に影響し合いながら歯を形成する²⁾。

ヒトの歯は、胎生期から小児期にかけて一過性に形成される。一方、マウスなどの齧歯類の切歯は、出生後も持続的に形成される。これは、齧歯類の切歯に出生後も歯の幹細胞が存在し、持続的な細胞増殖と細胞分化が維持されていることによる。したがって、齧歯類の切歯は、出生後の成体において歯の形成過程やその調節機構を解析できる優れた実験モデルである。

齧歯類切歯の最も根元に位置するサービカルループ

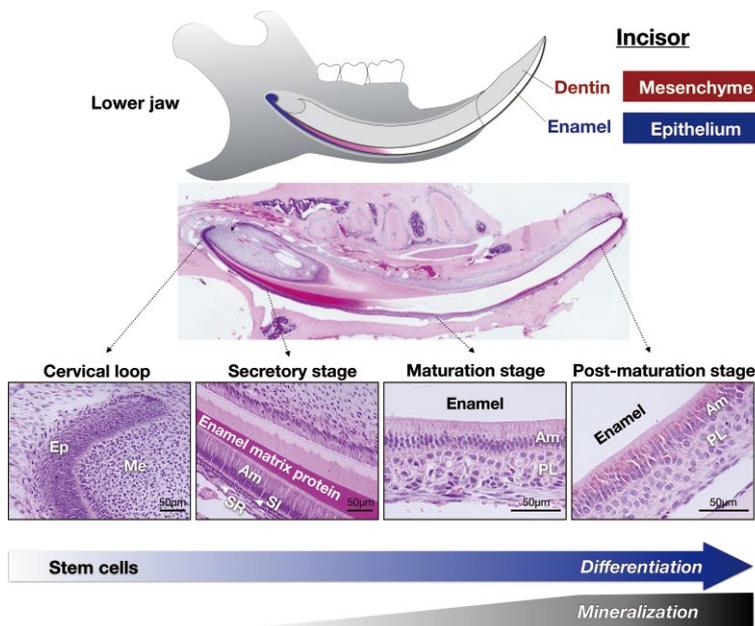


Fig. 1 Dental epithelial cells in mouse incisor

Ep : epithelial cells, Me : mesenchymal cells, Am : ameloblasts, SI : stratum intermedium, SR : stellate reticulum, PL : papillary layer

(Cervical loop) 領域は、歯の上皮系および間葉系の成体幹細胞を維持するニッチ (niche) となっている²⁾ (Fig. 1)。歯の上皮系幹細胞は、エナメル芽細胞 (Ameloblast) やその外層である中間層 (stratum intermedium : SI) 細胞、星状網 (stellate reticulum : SR) 細胞へ分化し、サービカルループ領域から切端側へ移行しながら、高度に石灰化したエナメル質を形成する。エナメル質に沿って存在するエナメル芽細胞は、一連のエナメル質の形成過程で形態を変化させる。まず、幹細胞から分化したエナメル芽細胞は、単層に配列してアメロジェニン、アメロプラスチン、エナメルリンなどのエナメル質に特有の細胞外基質タンパク質を盛んに分泌する。この分泌期 (Secretory stage) のエナメル芽細胞は、背の高い円柱状で極性を示し、核は細胞外基質成分の分泌方向と反対側に整列する。その後、エナメル芽細胞の高さは減少し、MMP-20やKLK4などのプロテアーゼや、石灰化に重要な組織非特異型アルカリホスファターゼ (ALP) などの酵素を発現する。分泌された酵素群により、エナメル基質タンパク質の分解と石灰化が進行し、エナメル質に特有の二次石灰化が起きてエナメル質の成熟が進む (Maturation stage)^{3,4)}。成熟期に認められる乳頭層は、分泌期の中間層細胞、星状網細胞から形成され、毛細血管網を有する乳頭状構造を呈し、エナメル芽細胞と協調してエナメル質の石灰化を制御する。成熟期後期 (Post-maturation stage) には、エナメル芽細胞は立方形となり、分泌機能を失う^{3,4)} (Fig. 1)。このようなエナメル芽細胞に

よるエナメル質の形成過程は、さまざまな情報伝達機構により複雑に制御されている。

Transforming growth factor- β (TGF- β) ファミリーの細胞内シグナル伝達

Transforming growth factor- β (TGF- β) ファミリーは、運動器や硬組織の形成細胞の増殖、分化、死の制御に重要な成長因子群である⁵⁻⁷⁾。主に胎生期の歯胚形成の解析から、TGF- β ファミリーの成長因子は、歯の形成にも重要な因子であることが明らかとなりつつある。TGF- β ファミリーのリガンドとして、Bone morphogenetic protein (BMP), Growth and differentiation factor (GDF), TGF- β や Activin など、30種類以上のメンバーが分類されている。

これら TGF- β ファミリーの成長因子の活性は、標的細胞が細胞膜上に発現する I 型および II 型の膜貫通型セリン・スレオニンキナーゼ受容体によって細胞内へ伝達される (Fig. 2)。リガンドが細胞膜上で受容体と結合すると、受容体が細胞内領域にもつキナーゼが細胞質で Smad と呼ばれる転写因子 (R-Smad) をリン酸化する。リン酸化された R-Smad は、細胞質で転写共役因子として機能する Smad4 と会合し、核内へ移行して標的遺伝子の発現を制御する。

TGF- β ファミリーは、骨誘導活性をもつ BMP や GDF と、骨誘導活性をもたない TGF- β や Activin の 2

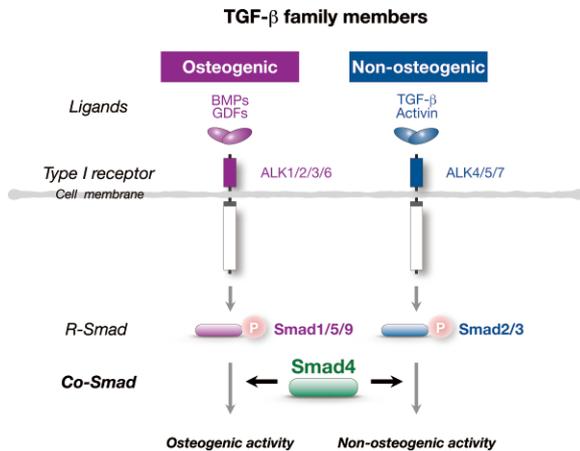


Fig. 2 Smad4, a central co-activator of the TGF- β family

Modified from Katagiri T et al, *Int J Mol Sci* 2018 ; 19 : E3586.⁷⁾

つの群に大別される⁵⁻⁷⁾。両群の差は、受容体により細胞内でリン酸化されるR-Smadの違いによる。骨誘導活性を有するリガンドは、I型受容体としてALK1, ALK2, BMPR-IA (ALK3), BMPR-IB (ALK6)に結合してSmad1/5/9のリン酸化を誘導する。一方、骨誘導活性をもたないリガンドは、I型受容体のALK4, ALK5 (T β R-I), ALK7に結合してSmad2/3のリン酸化を惹起する⁵⁻⁷⁾。

転写共役因子 Smad4 とノックアウトマウス

I型受容体によってリン酸化されるR-Smadとは異なり、Smad4はリガンド依存的な翻訳後修飾を受けないSmadと考えられている。Smad4の重要な機能は、リン酸化されたR-Smadと会合することで、TGF- β ファミリーの転写共役因子として働くことである (Fig. 2)。Smad4の機能を失った細胞では、BMPやTGF- β の刺激によりR-Smadのリン酸化と核内移行が起こるにもかかわらず、初期応答遺伝子の誘導が認められない。Smad4は、R-Smadと複合体を形成することにより、初期応答遺伝子の転写制御領域への結合能を高めると考えられている⁵⁻⁷⁾。

Smad4を全身の細胞で欠失させたノックアウトマウスは、歯の形成以前の胎生期初期 (E6~E7)の段階で致死となる⁸⁾。そのため、歯の形成におけるTGF- β ファミリーの役割を解析するために、歯の細胞特異的なSmad4ノックアウトマウスを樹立し、臼歯歯胚を用いて研究が進められている。

間葉系細胞特異的にSmad4を欠失させると、象牙芽細胞の形態や機能に異常が起こり、象牙質や歯根の形成不

全を呈する⁹⁻¹¹⁾。上皮系細胞特異的にSmad4を欠失させると、エナメル質形成が阻害される^{12,13)}。しかし、上皮特異的なSmad4のノックアウトマウスでも出産直後に致死となる^{12,13)}ため、成体の歯におけるSmad4依存的なTGF- β ファミリーの役割は依然として不明な点が多い。

われわれは、タモキシフェン投与誘導性に全身のSmad4を欠失できる新しいSmad4コンディショナルノックアウトマウス (cKO)を樹立した¹⁴⁾。われわれの作出したSmad4 cKOマウスを用いると、タモキシフェンを投与してSmad4を欠失させることが可能となり、成長過程の任意の時期にSmad4の役割を解析できる。さらに、伸長し続ける切歯を解析することで、Smad4を欠失してすべてのTGF- β ファミリーのシグナルが遮断された状態での歯の形成過程の変化を、連続的に観察することも可能となった。

成体マウスの切歯形成における転写共役因子 Smad4 の役割

われわれが新たに樹立したマウスを10週齢まで飼育した後に、タモキシフェンを腹腔内投与してSmad4の欠失を誘導した。タモキシフェンの初回投与から約3週間飼育を継続した後、下顎骨を摘出して切歯の形成における影響を詳細に解析した。Smad4 cKOマウスの切歯を組織学的に解析すると、特に成熟期以降のエナメル芽細胞を含む上皮細胞層の扁平や低形成が認められた (Fig. 3)。そこで、免疫組織学的にSmad4およびSmad4と複合体を形成するリン酸化Smad1/5/9、リン酸化Smad2/3の局在を検討した。コントロールマウスの切歯では、サービカルループ領域から成熟期後期の上皮系細胞と間葉系細胞に、Smad4、リン酸化Smad1/5/9、リン酸化Smad2/3が広く認められた。この結果は、TGF- β ファミリーのシグナルが切歯の生理的な形成過程に広く関与していることを示唆する。

Smad4 cKOマウスでは、予想どおり抗Smad4抗体による染色性が低下しており、Smad4タンパク質の欠失が確認された。さらに、Smad4 cKOマウスでもリン酸化Smad1/5/9とリン酸化Smad2/3の量や局在に顕著な変化は認められなかった。これらの結果から、Smad4 cKOマウスの切歯における低形成や上皮系細胞の形態変化は、TGF- β ファミリーの細胞内シグナル伝達におけるSmad4を介した標的遺伝子の転写制御の変化に起因すると考えられた¹⁴⁾。この仮説は、野生型マウスを用いてTGF- β ファミリーリガンドの発現量と受容体の低分子キナーゼ阻害剤の影響を調べたわれわれの実験からも支持された¹⁵⁾。

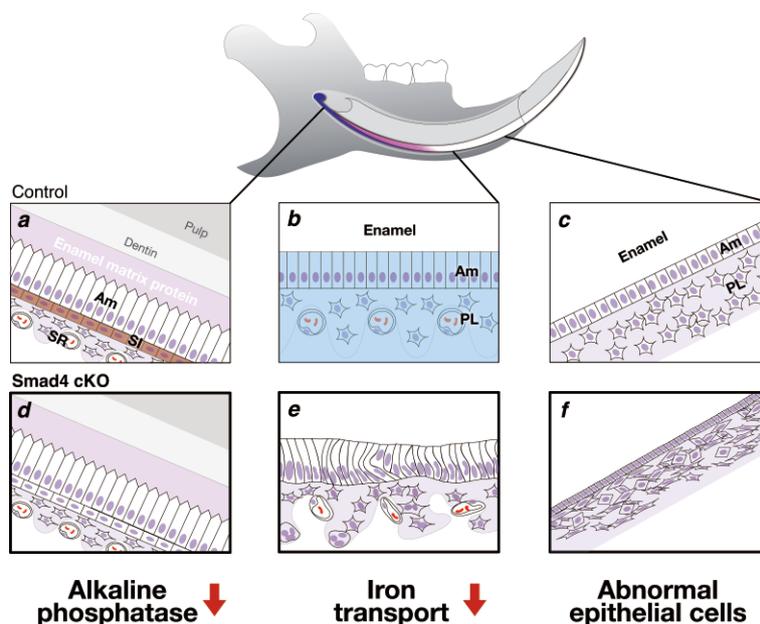


Fig. 3 Smad4-dependent regulation of differentiation and function in dental epithelial cells

A schema of our report¹⁴⁾. (a and d) In the immunohistochemical analysis revealed that the ALP protein level was almost undetectable in dental epithelial cells in Smad4 cKO mice (Brown color area). (b and e) In Berlin blue staining, iron pigmentation in dental epithelial cells was almost undetectable in Smad4 cKO mice (Blue color area). (c and f) Histological analysis showed that cKO of the Smad4 gene led to hypoplasia of dental epithelial cells. Am : ameloblasts, SI : stratum intermedium, SR : stellate reticulum, PL : papillary layer

切歯の石灰化における Smad4 依存的細胞内シグナルの役割

ALP は、歯や骨の石灰化に必須な酵素の一つである。組織非特異的 ALP をコードする *ALPL* 遺伝子変異を認める骨系統疾患の低ホスファターゼ症 (HPP) では、骨の低石灰化とともに歯の石灰化不全が認められる⁴⁾。抗 ALP 抗体を用いて切歯における局在を解析したところ、中間層、成熟期エナメル芽細胞、乳頭層のような上皮系細胞に発現していた。しかし、Smad4 を欠失させたマウスの切歯では、これらの上皮系細胞に ALP は検出されなかった¹⁴⁾ (Fig. 3)。これは、Smad4 依存的な TGF- β ファミリーの細胞内シグナルが、切歯の上皮系細胞の分化を介して石灰化を制御する可能性を示す。

齧歯類の切歯では、エナメル芽細胞が鉄結合性タンパク質であるフェリチンを産生する。このため、齧歯類ではエナメル質石灰化の過程で鉄が沈着することで、肉眼的にオレンジ色を呈する¹⁶⁾。切歯に鉄が沈着することで、物理的な耐性が向上すると考えられている¹⁷⁾。

マウスの切歯切片を、鉄を検出するベルリンブルーで

染色した。コントロールマウスの切歯における鉄の沈着は、成熟期、成熟期後期のエナメル芽細胞や、乳頭層における毛細血管構造に検出された。一方、Smad4 cKO マウスでは鉄の沈着が大幅に減少しており、上皮系細胞における鉄輸送能が低下したと考えられた¹⁴⁾ (Fig. 3)。

以上のように、ALP の発現低下や鉄輸送能の低下から、Smad4 cKO マウスの切歯では、エナメル質の石灰化が低下していると予想された。しかし、マイクロ CT で切歯の石灰化度を解析しても、コントロールマウスの切歯と石灰化に差は認められなかった¹⁴⁾。この理由として、われわれの Smad4 cKO マウスが貧血を呈して 1 カ月程度で死亡するために、十分な差が認められない可能性が考えられる。より長期間飼育できる条件下で、詳細に切歯を解析する必要がある。

おわりに

われわれが樹立した新しい Smad4 cKO マウスを解析した結果から、TGF- β ファミリーが切歯の上皮系細胞の分化と機能を制御する重要なシグナルであることが示唆された¹⁴⁾。単一の細胞で形成される皮膚や、骨、心筋、

角膜などは、組織再生の研究が進展しつつある。一方、歯や毛、乳腺、肺、腎臓など上皮間葉相互作用など複数の細胞の相互作用を要する臓器や器官の再生研究は難しい。TGF- β ファミリーによる上皮間葉相互作用の制御機構の解明は、臓器や器官形成と再生の鍵になる可能性がある。また、誌面の都合上割愛したSmad4 cKOマウスの骨や軟骨などの解析結果も、生理的な硬組織の形成制御機構の解明に糸口を与えるものと期待される。こうした歯や骨などの硬組織研究が進歩することにより、人生100歳時代において、人々が健康で充実した人生を過ごすことができることを願う。

謝 辞

今回の発表に関する研究を遂行するにあたり、多大なる尽力を頂いた埼玉医科大学医学部ゲノム基礎医学の塚本 翔博士、倉谷麻衣博士、研究室メンバー各位、北里大学薬学部の大木 聡博士、明海大学歯学部形態機能成育学講座歯科矯正学分野の須田直人教授、九州大学大学院歯学研究院歯学部部門の自見英治郎教授に深謝する。Smad4 floxed マウスは、Xi Deng 博士より提供された。

本研究は、科研費（課題番号17H04317, 17K11026, 19K22725, 20H03808, 20K18009）、明海大学宮田研究奨励金の助成を受けて行われた。片桐は、第一三共株式会社より研究費の助成を受けている。他の著者は、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) 内閣府. 令和2年版高齢社会白書. <https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/index-w.html> (2021年1月20日アクセス)
- 2) Jussila M, Thesleff I. Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4: a008425.
- 3) Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem* 2012; 389: 695-700.
- 4) Yadav MC, Oliveira RC, Foster BL, Fong H, Cory E, Narisawa S, Sah RL, Somerman M, Whyte MP, Millán JL. Enzyme replacement prevents enamel defects in hypophosphatasia mice. *J Bone Miner Res* 2012; 27: 1722-1734.
- 5) Katagiri T, Watabe T. Bone morphogenetic proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016; 8: a021899.
- 6) Katagiri T, Tsukamoto S, Kuratani M. Heterotopic bone induction via BMP signaling: Potential therapeutic targets for fibrodysplasia ossificans progressive. *Bone* 2018; 109: 241-250.
- 7) Katagiri T, Tsukamoto S, Nakachi Y, Kuratani M. Discovery of heterotopic bone inducing activity in hard tissues and the TGF- β superfamily. *Int J Mol Sci* 2018; 19: E3586.
- 8) Yang X, Li C, Herrera PL, Deng CX. Generation of Smad4/Dpc4 conditional knockout mice. *Genesis* 2002; 32: 80-81.
- 9) Li J, Huang X, Xu X, Mayo J, Bringas Jr P, Jiang R, Wang S, Chai Y. SMAD4-mediated WNT signaling controls the fate of cranial neural crest cells during tooth morphogenesis. *Development* 2011; 138: 1977-1989.
- 10) Kim TH, Bae CH, Lee JY, Lee JC, Ko SO, Chai Y, Cho ES. Temporo-spatial requirement of Smad4 in dentin formation. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 459: 706-712.
- 11) Yun CY, Choi H, You YJ, Yang JY, Baek JA, Cho ES. Requirement of Smad4-mediated signaling in odontoblast differentiation and dentin matrix formation. *Anat Cell Biol* 2016; 49: 199-205.
- 12) Xu X, Han J, Ito Y, Bringas Jr P, Deng C, Chai Y. Ectodermal Smad4 and p38 MAPK are functionally redundant in mediating TGF- β /BMP signaling during tooth and palate development. *Dev Cell* 2008; 15: 322-329.
- 13) Li J, Feng J, Liu Y, Ho TV, Grimes W, Ho HA, Park S, Wang S, Chai Y. BMP-SHH signaling network controls epithelial stem cell fate via regulation of its niche in the developing tooth. *Dev Cell* 2015; 33: 125-135.
- 14) Machiya A, Tsukamoto S, Ohte S, Kuratani M, Suda N, Katagiri T. Smad4-dependent transforming growth factor- β family signaling regulates the differentiation of dental epithelial cells in adult mouse incisors. *Bone* 2020; 137: 115456.
- 15) 町谷亜位子, 自見英治郎, 須田直人, 片桐岳信. 成体マウスの切歯形成における BMP シグナルの役割. 平成 29 年度学術大会 (第 59 回) *J Oral Biosci (Supple)* 2017; 315 : 1-48.
- 16) Yanagawa T, Itoh K, Uwayama J, Shibata Y, Yamaguchi A, Sano T, Ishii T, Yoshida H, Yamamoto M. Nrf2 deficiency causes tooth decolorization due to iron transport disorder in enamel organ. *Genes Cells* 2004; 9: 641-651.
- 17) Pugach MK, Gibson CW. Analysis of enamel development using murine model systems: approaches and limitations. *Front Physiol* 2014; 5: 313.

生体の中の保存治療学

歯髄再生治療：実用化に向けた取り組み

中島 美砂子^{1,2} 庵原 耕一郎²¹RD 歯科クリニック²国立長寿医療研究センター 再生歯科医療研究室Stem Cell Therapy for Pulp Regeneration : Future Application
for Treatment of Periapical Disease in the AgedNAKASHIMA Misako^{1,2} and IOHARA Koichiro²¹RD Dental Clinic²Laboratory of Dental Regenerative Medicine, National Center for Geriatrics and Gerontology

キーワード：歯髄幹細胞，歯髄再生治療，抜髄，感染根管，ナノバブル水

はじめに

歯髄再生治療は、歯髄炎および根尖性歯周炎に罹患した歯において歯髄・象牙質複合体を再生させることにより歯髄の本来の生体防御機能を維持し、歯の喪失およびそれに伴う骨吸収の時期をできるだけ遅らせ、人生100年時代においていつまでも自分の歯で噛めることによる健康長寿に貢献することを目的としている。私たちはすでに「不可逆性歯髄炎における自己歯髄幹細胞移植による歯髄再生治療法」の臨床研究を行い安全性および有効性が確認された¹⁾ことから、さらに特定認定再生医療等委員会での再生医療等提供計画の審査および厚生労働省への届出を経て、昨年より同歯髄再生治療を実施している。一方、抜髄歯ばかりでなく感染根管歯にも歯髄再生治療を適応拡大できるよう、ナノバブル水と抗菌剤を併用した根管内除菌法の開発を進めてきた。さらに、加齢に伴い減退する生体の治癒・再生能力を回復させ、中高齢者にも歯髄再生治療を可能にするため、歯髄再生促進法の研究開発を行ってきた。また、自家の不用歯がない

場合の同種移植の技術開発、および乳歯由来歯髄幹細胞を含めた歯髄幹細胞バンクの細胞源の開発も進めてきた。本稿では、歯髄・象牙質再生治療の実用化とさらなる普及を目指して行っているこれらの研究について紹介する。

感染根管におけるナノバブル水による
根管内除菌後の歯髄再生

従来の感染根管治療法ではなかなか治りにくい場合があるのは、根管形態が複雑で、細管や側枝等に深く侵入した細菌に対して、機械的拡大が困難で薬剤もなかなか浸透せず完全には除去できないことが主原因と考えられる。また、一般に使われている水酸化カルシウムが効かない *Enterococcus faecalis* などの細菌が残って、バイオフィルムを形成してしまうためともいわれている²⁾。

それで私たちは、ナノバブル薬剤導入法による根管内除菌法を開発してきた。ナノバブル水は濃度 2.0×10^7 個/ml 以上、粒径百数十 nm の泡で、根管壁のスミヤ層を除去できる (Fig. 1A) と同時に、バイオフィルム除去に

も効果がある (Fig. 1B)^{3,4)}。さらにナノバブルを抗菌薬等と併用することにより、象牙細管や側枝・副根管などの深部1 mm以上に薬剤を浸透させることが可能となり (Fig. 1C)、複雑な歯構造体の奥深くに潜む細菌を除去することができる^{4,5)}。これにより、従来法のように細菌を除去するために過剰に根管壁を削って歯折するのを防ぐことができると考えられる。

まず、臨床に適応しやすい抗菌薬として、米国でFDAに認可された3Mix/TAP (Triple antibiotic paste)あるいはレボフロキサシン(クラビット)を選択した。まず、初期感染根管から検出される *Fusobacterium*、難治性感染根管から検出される *E. faecalis* およびイヌ難治性の根管より釣菌した混合細菌に対する細菌感受性試験を行い、3Mix/TAP およびレボフロキサシンの最適有効濃度を決定した。次にそれらの薬剤を混合してもナノバブルは消泡せず、象牙細管内に薬剤を浸透できることを確認した (Fig. 1C~G)。次に実際にイヌの感染根管モデルを作製し (Fig. 1H, I)、プラス帯電性ナノバブル水 (Nano Bubble Water, アエラスパイオ) とレボフロキサシンを併用して根管の洗浄・貼薬を1週間ごとに繰り返し、嫌気性培養による管内細菌検査を行った。その結果、それぞれ単独に比べて有意に数回で根管内部の細菌は検出限界以下になった。なお、ナノバブル水と併用することにより根管の除菌が促進できることは、3Mix/TAPにおいても確認できた。根管内無菌化を確認後、通法どおり細胞移植を行い、CBCTにおいて根尖病変の大きさの変化を解析すると、根管治療1カ月目 (細胞移植時, Fig. 1J) と2カ月後 (Fig. 1K) を比較して有意な減少がみられた (Fig. 1L)。細胞移植2カ月後の組織標本では、血管と神経に富む歯髄組織が再生され、根管壁には象牙質様硬組織の添加がみられた。また、根尖歯周組織には炎症所見はなく、骨添加がみられた (Fig. 1M)。根管内の歯髄再生量は約70%に達し、グラム染色にて根管壁・象牙細管内・歯根表面セメント質および根尖歯周組織 (Fig. 1N~Q) にバイオフィームは確認されなかった。

したがって、感染根管歯においても、根管内の除菌ができれば、抜髄歯と同様に歯髄が再生されることが示され、歯髄再生治療が感染根管にも適応拡大できる可能性が示唆された。

中高齢者の歯髄再生促進

次に、中高齢者に対して歯髄再生を促進する根管前処置法を開発した。これまで歯髄再生メカニズムとして、根管内に歯髄幹細胞をG-CSFとともに移植すると、移植細胞はG-CSFの作用により生着でき、根管外へ溢出せずに根管内にとどまることが知られている。そして

移植細胞からさまざまな血管新生・神経栄養因子 (trophic 因子) が放出され、G-CSFとの相加効果により、歯の周辺組織 (歯根膜、骨髄等) から在来幹細胞が根管内に遊走し増殖して、血管新生および神経再疎通が生じると同時に歯髄が再生されると考えている⁶⁾。

一般に、年齢とともに生体組織の再生能力は徐々に低下することはよく知られているが、歯においても、歯髄幹細胞を自家移植すると高齢は若齢と比べて歯髄再生は遅れる⁷⁾。一方、分取した中高齢者由来の歯髄幹細胞は若齢者由来のものと比較して、増殖能はやや劣るものの、遊走能や抗アポトーシス能・血管新生能などの特性は変わらないことが示されている⁸⁾。実際、歯髄幹細胞を他組織再生に適応した治験において、69歳の高齢者でも歯周組織が有効に再生された報告がある⁹⁾。しかしながら、高齢歯由来の歯根膜幹細胞の遊走能・増殖能および抗アポトーシス能を *in vitro* において調べると、若齢に比べて低いことが示されている⁷⁾。よって高齢が若齢と比べて歯髄再生が遅い理由としては、移植する幹細胞自身の問題ではなく、遊走してくる歯根膜などの周辺組織の幹細胞の問題あるいは周囲の微小環境の変化であると考えられた。また高齢歯では、セメント質が厚く、歯根膜は狭窄・線維化している。さらに根尖歯周組織に慢性炎症が生じているため、在来細胞が老化している可能性がある¹⁰⁾。よって、歯根膜などからの在来幹細胞の遊走が妨げられ、歯髄再生が遅延する可能性が示唆された。

したがって、高齢歯の歯髄再生を促進する物質として高齢歯の線維化した歯根膜を溶解し、幹細胞が根管内に遊走しやすくすることを目的として、細胞移植前にトリプシンを根管内に作用 (トリプシン前処置) させてみた。トリプシンは40年以上にわたって臨床で安全に使用されてきたタンパク質分解酵素で、炎症症状を迅速に緩解し、急性組織損傷の治療を促進することにより慢性炎症を防止することが知られていた¹¹⁾。イヌ高齢歯ではトリプシン前処置により、前処置なしのコントロールと比べて移植後14日での歯髄再生量が約4倍有意に増加した (Fig. 2)。また、根尖歯周組織での血管新生も約20倍有意に増加がみられた¹²⁾。しかしながら、若齢歯ではトリプシン前処置しても歯髄再生の促進効果はみられなかった。トリプシン前処置した高齢歯では、移植36週後、根管側壁に大量の象牙質様硬組織が形成され根管が閉塞し、正常な高齢歯と組織学的類似がみられた。歯科用X線解析では、根尖部透過像はみられず、病理標本でも歯根膜・根尖歯周組織に異常はみられなかった。また、血液生化学検査・尿検査によっても、トリプシン前処理の安全性が確認された¹²⁾。したがって、中高齢者においてトリプシン前処置により歯髄再生治療を促進させることが可能であることが示唆された。

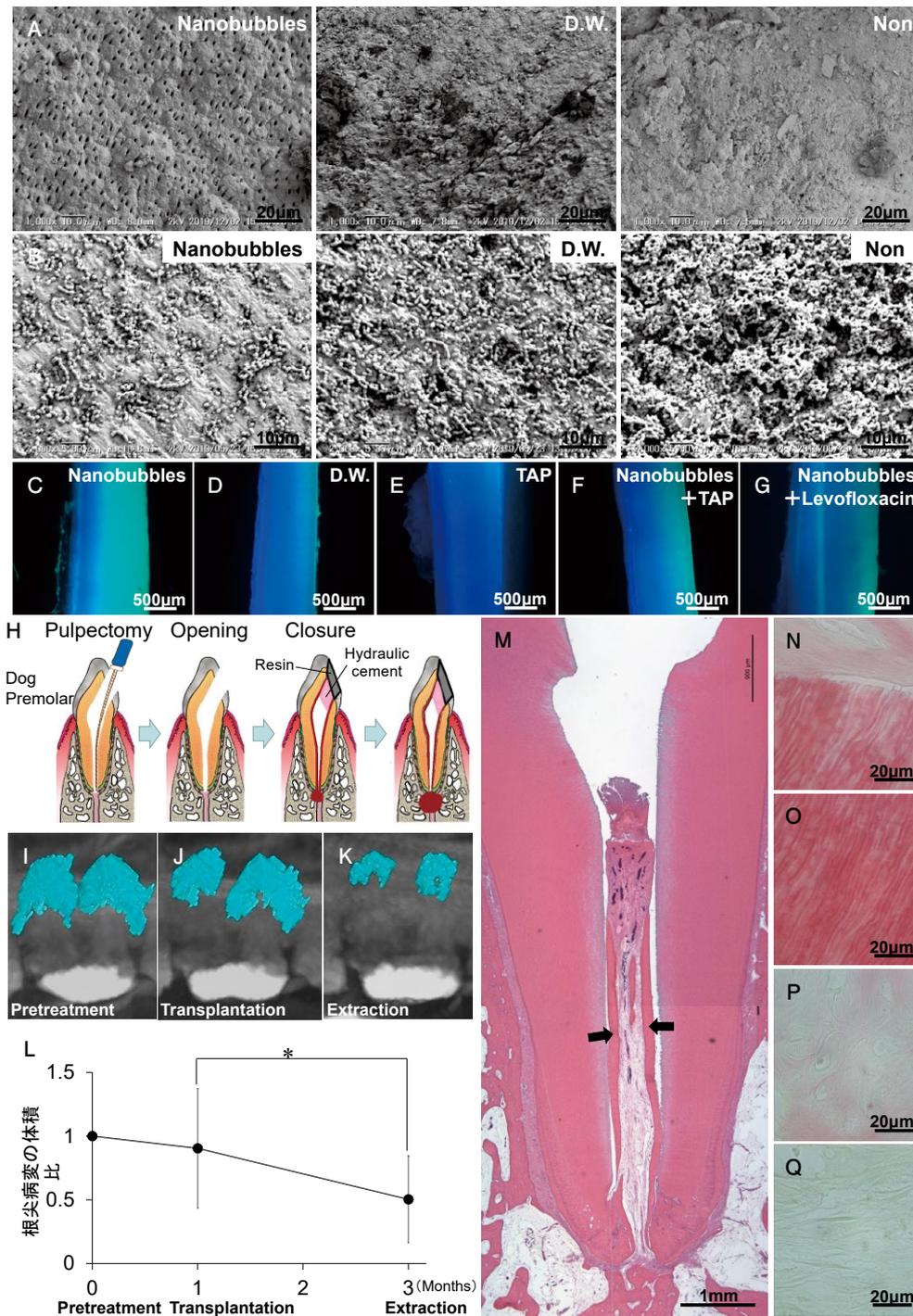


Fig. 1 Complete disinfection with nanobubbles and antibacterial agents and pulp regeneration

A : The ability of the smear layer removal of nanobubbles in a porcine root canal model by scanning electron microscopic (SEM) analysis. B : The removal of *Streptococcus mutans* biofilms formed on hydroxyapatite discs by nanobubbles by SEM analysis. C-G. Enhanced delivery of tetracycline (5 mg/ml) into dentinal tubules with/without nanobubbles. C : nanobubbles. D : Distilled water. E : TAP (Triple antibiotic paste). F : Nanobubbles with TAP. G : Nanobubbles with Levofloxacin. H : A schematic diagram demonstrating intractable periapical disease model in canine premolar. I-K : Complete disinfection by nanobubbles with Levofloxacin and the transplantation of dental pulp stem cells (DPSCs) in the intractable periapical disease model. I-K : A cone beam computed tomography (CBCT) study at the time of pretreatment (I), at 1 month after the root canal treatment (transplantation) (J) and another 2 months after cell transplantation (extraction) (K) using OsiriX program. L : The relative volume of periapical lesions compared with pretreatment. There is a significant difference in the relative volume between 1 month (transplantation) and another 2 months (extraction). Data are expressed as mean \pm SD (n=4) (* ; $p < 0.01$). M : Pulp regeneration at 2 months after cell transplantation. Dentin-like mineralized tissue formed along the dentinal wall (arrows). Hematoxylin-eosin staining. N-Q : Gram staining showing complete removal of microbial biofilm in the dentinal wall (N), dentinal tubules (O), lacunae in the cementum (P), and periapical tissue (Q).

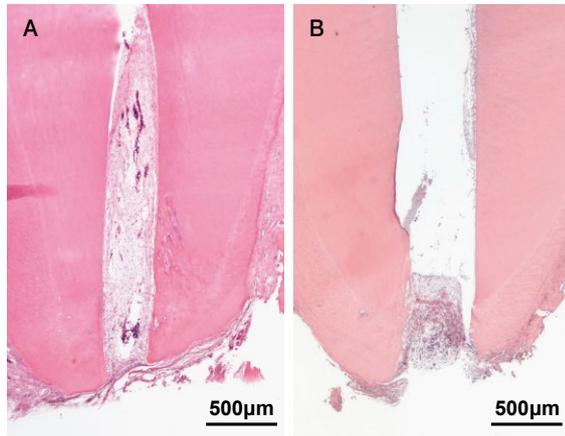


Fig. 2 Enhanced pulp regeneration by trypsin pretreatment in the pulpectomized teeth before transplantation of dental pulp stem cells (DPSCs) in the aged dogs on day 14. Pretreatment with trypsin (A) and with saline as a control (B). Hematoxylin-eosin staining¹⁷⁾.

次に、トリプシンによる高齢歯の歯髄再生促進作用のメカニズムを検討した。根管内に遊走してくる在来細胞として歯根膜幹細胞を高齢歯より分離し若齢歯由来のもの比べてみると、トリプシンにより活性化されるといわれている Protease-activated receptor 2 (PAR2) が高発現していた。高齢の歯根膜細胞にトリプシンを添加した *in vitro* 実験結果より、在来幹細胞へトリプシンが直接働いて老化やアポトーシスが抑制され、再生に関与する種々の組織修復関連因子や抗炎症因子の分泌が促進されることにより、慢性炎症状態の根尖歯周組織に対して再生への機転が働くことが示唆された¹²⁾。また間接作用として、トリプシンによりセメント質や象牙質から放出される Fibronectin 等が在来幹細胞の遊走促進、抗炎症・免疫調整、血管新生・神経再疎通促進に働き、また象牙質から放出される物質により歯髄誘導および象牙芽細胞分化促進が生じることが明らかとなった¹²⁾。

現在、トリプシンを中高齢者の歯髄再生促進治療の臨床に適応できるよう、さらなる研究開発を進めている。

同種移植による歯髄再生

中高齢者の場合、自家移植の問題点は、まず、自分自身の不用歯がない場合が多いということが挙げられる。また中高齢者の歯では根管内の線維化や石灰化、根管壁への象牙質添加などにより歯髄組織量が少なくなり、歯髄幹細胞数が減少し、その増幅に時間がかかること、および糖尿病や関節リウマチなどの慢性疾患により幹細胞形質が変化していることなどが問題となる。よって、同

種の歯髄幹細胞を用いることにより、品質の安定した細胞が治療必要時に必要数すぐに供給可能となる利点がある。現在、間葉系幹細胞を用いた同種移植の実現可能性 proof-of-concept や安全性は示されており、国内外で骨髄、脂肪、滑膜、臍帯等由来の間葉系幹細胞を用いた急性期脳梗塞、虚血性心疾患、肝硬変、軟骨損傷、脊髄損傷等の種々の疾患に対する治験が行われている。日本では、急性移植片対宿主病（急性 GVHD）に対するテムセル HS 注（JCR ファーマ）がすでに再生医療等製品として承認されている。また同種歯髄幹細胞を用いて、オステオインテグレーションや急性期脳梗塞、慢性歯周疾患などに対する治験や臨床研究が行われている¹³⁾。さらに近年、チリにおいて同種臍帯由来間葉系幹細胞を用いて感染根管歯の歯髄再生治療の治験を行い、安全性と有効性が示されている¹⁴⁾。間葉系幹細胞が免疫抑制剤を使用せず同種移植が可能である理由は、間葉系幹細胞の免疫原性が低く、免疫抑制作用が高いためと考えられている。すなわち、MHC class II はほとんど発現しておらず、T cell への共刺激機能をもつ CD40, CD80, CD86 もほとんど発現がみられない。また、免疫抑制作用をもつパラクリン因子やエクソゾームを分泌し、ヘルパー T 細胞や細胞傷害性 T 細胞の増殖を抑制し、炎症誘発因子 (IFN- γ , TNF- α , IL2) の産生を抑制する。さらにナチュラルキラー (NK) 細胞の活性や B 細胞の成熟を抑制し、樹状細胞の成熟を阻止し、結果として T 細胞の活性化に必要な抗原や共刺激分子の発現を低下させ、免疫が抑制されると考えられている¹⁵⁾。

私たちは、同種移植による歯髄再生治療のイヌ非臨床研究において、ヒト HLA に類似したイヌの DLA 遺伝子型の解析を行い、不一致で歯髄幹細胞を 2 回続けて根管内に移植した。その結果、1, 2 回目とも異常はみられなかった。また、12 週での歯髄再生量は、DLA 遺伝子型が一致・不一致とも 1, 2 回目でも変わらず、血管新生量や神経突起伸長量に関しても変化はみられなかった¹⁶⁾。よって、同種移植の歯髄再生治療の安全性・有効性が示唆されている。

歯髄幹細胞バンク

歯髄幹細胞は細胞源として有利な特性を有している。すなわち、抜け落ちる乳歯や抜去する智歯・矯正便宜抜去歯などの不用歯から、体への負担やリスクが少なく手軽に採取することができる。また、遺伝子が傷つきにくく、形質の一定した幹細胞が得られやすいこと、細胞の増殖能、免疫調整能、抗炎症作用、遊走能に優れ、血管新生や神経誘導能が高いことなどが挙げられる。なお、乳歯由来歯髄幹細胞は永久歯由来歯髄幹細胞と比較し

て、遊走能や遊走促進作用および抗炎症・免疫調整作用が高く、同等以上の有利な品質特性を有する。しかしながら、イヌ同一個体において、自家の乳歯由来および永久歯由来の歯髄幹細胞を根管内に移植すると、歯髄再生量・血管新生量および神経突起伸長量に有意差はみられなかった(中島未発表データ)。したがって、歯髄再生治療の細胞源として、永久歯の不用歯ばかりでなく乳歯から採取した歯髄幹細胞をバンクに保管しておくことの有用性が示唆される。エアラスバイオ株式会社ではすでに歯髄幹細胞バンクを開始しており、バンクに保管した歯髄幹細胞は本人の治療に対してばかりでなく、必要時に本人の同意を得ることにより二親等以内に供給できるようなシステムを構築している。また、すでに国内外の治療で報告されているように、将来的には歯髄再生ばかりでなく、顎骨、歯周組織、脳梗塞等の再生治療に用いることができるような時代が来ると考えられ、品質の良い自家の歯髄幹細胞を若いうちに備えておくことも有用かもしれない。

おわりに

本稿において、歯髄再生治療は、根管を消毒できれば感染根管治療にも適応できる可能性があることを示した。また年齢とともに歯髄再生は遅れるが、移植前に根管をトリプシンで前処置することにより再生を促進できる可能性を示した。さらに不用歯がない場合でも、同種移植が適応できる可能性を示した。このような結果を得て、近く、歯髄再生治療の年齢を7歳から69歳までに適応拡大し、症例を感染根管にまで拡大する予定である。また、同種移植の歯髄再生治療の臨床研究も準備を進めている。しかしながら、今後さらに、治療を繰り返してきたあるいは長年経過した感染根管歯においても歯髄再生が確実に成功できるよう、根管壁の処置法、移植細胞の前処理法、最適な移植細胞数や添加因子およびscaffoldなどの技術改良を重ねていく必要がある。また現在、再生された歯髄組織面上に大量に早期に被蓋象牙質が形成され、残存象牙質と隙間なく癒合することにより微小漏洩や再感染を防止でき、十分な機械的強度も得られる象牙質再生法の開発を進めている。

開示すべき利益相反として、筆頭著者中島美砂子は、国立長寿医療研究センターとエア・ウォーター株式会社との共同研究開発として、エア・ウォーター株式会社から一部の研究費を得て、本研究は行われた。

(https://www.awi.co.jp/business/medical/med_guideline/med_guideline_info.html, <https://www.ncgg.go.jp/research/annualreport/documents/2019nenpo1.pdf>.)

文 献

- 1) Nakashima M, Iohara K, Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Arijji Y, Matsushita K. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8: 61.
- 2) 興地隆史. 歯内療法への争点—難治性根尖性歯周炎の病因と臨床. *新潟歯学会誌* 2006; 36: 1-15.
- 3) 庵原耕一郎, 中島美砂子. ナノバブル水を用いた新規根管洗浄液のスミヤー層除去効果の検討. *日歯保存誌* 2019; 62: 159-164.
- 4) 藤田将典, 庵原耕一郎, 堀場直樹, 立花克郎, 中村 洋, 中島美砂子. 感染根管歯におけるナノバブルと超音波を用いた根管無菌化と歯髄再生. *日歯保存誌* 2014; 57: 170-179.
- 5) 庵原耕一郎, 中島美砂子. 難治性根尖性歯周炎における抗菌ナノパーティクル含有ナノバブル水による根管内除菌効果の検討. *日歯保存誌* 2020; 63: 73-82.
- 6) Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, Ishizaka R, Utunomiya S, Nakamura H, Matsushita K, Nakashima M. A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. *Stem Cells Transl Med* 2013; 2: 521-533.
- 7) Iohara K, Murakami M, Nakata K, Nakashima M. Age-dependent decline in dental pulp regeneration after pulpectomy in dogs. *Exp Gerontol* 2014; 52: 39-45.
- 8) Horibe H, Murakami M, Iohara K, Hayashi Y, Takeuchi N, Takei Y, Kurita K, Nakashima M. Isolation of a stable subpopulation of mobilized dental pulp stem cells (MDPSCs) with high proliferation, migration, and regeneration potential is independent of age. *PLoS One* 2014; 9: e98553-e98553. Correction *PLoS One* 2016; 11: e0151741.
- 9) Ferrarotti F, Romano F, Gamba MN, Quirico A, Giraudi M, Audagna M, Aimetti M. Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol* 2018; 45: 841-850.
- 10) Huttner EA, Machado DC, de Oliveira RB, Antunes AG, Hebling E. Effects of human aging on periodontal tissues. *Spec Care Dentist* 2009; 29: 149-155.
- 11) Shah D, Mital K. The role of trypsin: chymotrypsin in tissue repair. *Adv Ther* 2018; 35: 31-42.
- 12) Iohara K, Zayed M, Takei Y, Watanabe H, Nakashima M. Treatment of pulpectomized teeth with trypsin prior to transplantation of mobilized dental pulp stem cells enhances pulp regeneration in aged dogs. *Front Bioeng Biotechnol* 2020; 8: 983.
- 13) Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Kusano K, Baba S. Clinical potential and current progress of dental pulp

- stem cells for various systemic diseases in regenerative medicine: a concise review. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 1132.
- 14) Brizuela C, Meza G, Urrejola D, Quezada MA, Concha G, Ramírez V, Angelopoulos I, Cadiz MI, Tapia-Limonchi R, Khoury M. Cell-based regenerative endodontics for treatment of periapical lesions: a randomized, controlled phase I / II clinical trial. *J Dent Res* 2020; 99: 523-529.
 - 15) Karantalis V, Schulman IH, Balkan W, Hare JM. Allogeneic cell therapy: a new paradigm in therapeutics. *Circ Res* 2015; 116: 12-15.
 - 16) Iohara K, Utsunomiya S, Kohara S, Nakashima M. Allogeneic transplantation of mobilized dental pulp stem cells with the mismatched dog leukocyte antigen type is safe and efficacious for total pulp regeneration. *Stem Cell Res Ther* 2018; 9: 116.
 - 17) Nakashima M, Iohara K, Zayed M. Pulp regeneration: current approaches, challenges, and novel rejuvenating strategies for an aging population. *J Endod* 2020; 46: S135-142.

太陽電池付光触媒内蔵音波振動歯ブラシのプラーク除去効果について

吉 峰 正 彌 鴨 井 久 博 久 保 田 裕 子*

日本医科大学千葉北総病院歯科
久保田歯科医院*

抄録

目的：歯周病予防・治療においてプラークコントロールは非常に重要な役割を果たしており，近年では手用歯ブラシのみならず音波振動歯ブラシも数多く開発されている．本研究では酸化チタン（以下， TiO_2 ）の光触媒作用をさらに増強するために，太陽電池（以下，ソーラーパネル）を増加させた音波振動歯ブラシのプラーク除去効果と安全性について検討を行った．

材料と方法：被験者は日本医科大学千葉北総病院歯科の医局員で，口腔清掃方法の知識・能力・健康な歯肉を有する男女年齢不問の8名とした．被験歯はRamfjördの代表歯6歯とし，プラーク付着に影響を及ぼす修復物がない歯とした．使用した歯ブラシは，ソーラーパネル3枚を内蔵した音波振動歯ブラシ SOLADEY RHYSHM 2（シケン）とした． TiO_2 を有しない同一形状の音波振動歯ブラシ（CONTROL 群），および大型太陽電池付酸化チタン電極内蔵の手用歯ブラシ SOLADEY N4（シケン，MANUAL 群）を対照群とした．付着プラークの評価には，Rustogi Modification Navy Plaque Index (RMNPI) を用いてプラーク除去率を算出した．一元配置分散分析を用い，歯ブラシ前後と3群間のプラーク除去率の比較を行った．

結果と考察：SOLADEY RHYSHM 2を使用したプラーク除去効果は，歯面部位・歯種にかかわらずおおむねプラーク除去率が高い傾向が認められた．また，毛先の届きづらい歯頸部においてもプラーク除去率が高いことが示され，ソーラーパネルを3枚にし内蔵した結果，音波振動機能に加えて TiO_2 の光触媒作用が増強された可能性が考えられた．

結論： TiO_2 とソーラーパネルを内蔵した音波振動歯ブラシは，プラーク除去効果が高く，プラークコントロールに有用である可能性が示唆された．

キーワード：酸化チタン，太陽電池，音波振動歯ブラシ

責任著者連絡先：吉峰正彌

〒270-1694 千葉県印西市鎌苅1715 日本医科大学千葉北総病院歯科

TEL：0476-99-1111，FAX：0476-99-1919，E-mail：yoshimine9110@nms.ac.jp

受付：2021年1月14日/受理：2021年4月14日

DOI：10.11471/shikahozon.64.212

緒言

酸化チタン（以下、 TiO_2 ）は、その光触媒作用により *Streptococcus mutans* や *Porphyromonas gingivalis* などの口腔内細菌に対して抗菌作用を有していることが知られている¹⁻⁴。また TiO_2 の光触媒作用は、太陽電池（以下、ソーラーパネル）を付与することにより増強することが報告されており、*S. mutans* の酸産生および付着の抑制が働いたとの報告がある^{5,6}。このような背景から、 TiO_2 とソーラーパネルを内蔵した手用歯ブラシおよび音波振動歯ブラシが市販され、それらのプラークコントロールに対する有用性について種々の報告がされている⁷⁻¹⁰。特に音波振動歯ブラシは、術後合併症の防止に寄与する可能性があるとの報告もある⁸。またソーラーパネルに関しては、手用歯ブラシにおいてその内蔵枚数と面積を増加させることで、より多くの電子を発生させ、結果としてより大きなプラーク除去率につながったとの報告もある^{9,10}。しかしながら、音波振動歯ブラシにおいてソーラーパネルを増加させて応用した報告はいまだ認められない。本研究では、 TiO_2 の光触媒作用をさらに増強するために、ソーラーパネルを3枚にし内蔵した音波振動歯ブラシのプラーク除去効果と安全性について検討を行った。

材料および方法

被験者は歯周病に対して知識を有する日本医科大学千葉北総病院歯科の医局員で、口腔清掃方法の知識・能力・健康な歯肉を有する男女年齢不問の8名とした。

被験歯は Ramfjörd の代表歯、すなわち右上第一大臼歯、左上第一中切歯、左上第一小白歯、左下第一大臼歯、右下第一中切歯、右下第一小白歯とし（以下、16歯、21歯、24歯、36歯、41歯、44歯）すべて天然歯とした。また被験歯が処置歯の場合は、測定部位が補綴処置あるいは充填処置されていなければ、対象歯とした。被験歯が補綴物により被覆されている場合または欠損の場合は、その隣在歯を被験歯とした。さらに、隣在歯で対応できない場合は対象歯の同顎かつ反対側に位置する歯を、代替被験歯とした。

歯ブラシのプラーク除去効果については、歯ブラシの毛先およびヘッド部の大きさ、毛束の数や状態、把持部の大きさ、長さおよび太さが影響することは知られているが、本研究においては、ソーラーパネルおよび TiO_2 に着目した。

使用した歯ブラシは SOLADEY RHYSHM 2 (シケン)

であり、ソーラーパネルを3枚内蔵し、 TiO_2 電極を有する (TEST 群, Fig. 1)。電子発生が LED ランプの点滅により可視化されるのが特長となっている。また音波振動は 9,000 回転/分、1,100 回転/分の 2 段階となっており、今回は標準モードの 9,000 回転/分を使用した。歯ブラシの毛先はポイント毛形状となっており、ハニカム形状であった。毛の硬さは JIS 規格でふつう、毛の直径は 0.16 mm であった。先端ポイント毛形状を有しており、先端ポイント部の毛の長さが 10.5 mm、フラットな部分の毛の長さは 9.5 mm であった。毛束配列部は横 6.7 mm、縦 17.8 mm であり、植毛穴は、先端が 2 個、その他は 3 個の部分であった。

今回は、酸化チタンを有しない同一形状の音波振動歯ブラシ (CONTROL 群)、および大型太陽電池付酸化チタン電極内蔵の手用歯ブラシ SOLADEY N4 (シケン, MANUAL 群, Fig. 2) を対照群とした。歯ブラシの毛先はポイント毛形状となっており、先端ポイント毛形状であった。毛の硬さは JIS 規格でふつう、毛の直径は 0.177 mm であった。先端ポイント毛形状を有しており、先端ポイント部の毛の長さが 10.5 mm、フラットな部分の毛の長さは 9.5 mm であった。毛束配列部は横 6.7 mm、縦 17.8 mm であり、植毛穴は、先端が 2 個、その他は 3 個の部分であった。TEST 群と同じサイズおよび配置となっていた。CONTROL 群は、 TiO_2 を有しないため、TEST 群と同一形状であるのみで、ソーラーパネルの効力も全く発揮されないものとした。

被験者には、研究開始前 24 時間は歯ブラシによるブラッシングを中止させ、その後、歯磨剤を使用せずに 5 分間毛先磨きによるブラッシングを実施してもらった。なお 3 種の歯ブラシすべてにおいて、ブラッシング時にソーラーパネルを手で隠さないようにすること、ブラシを十分に水で濡らしてからブラッシングを開始することに留意させた。この過程を、日を改めて 3 回繰り返し実施した。歯ブラシ前後におけるプラーク付着状態と、歯ブラシの使用による歯肉創傷の有無の記録は口腔内撮影用ビデオカメラを用いて行った。

デンタルプラークの染め出しには、デントプラークテスター AR (ライオン歯科材) を用いた。付着プラークの評価には、Rustogi Modification Navy Plaque Index (RMNPI) を用いた。歯面を平滑面・隣接面・歯頸部に 9 分割して a, b, c, e を平滑面, d, f を隣接面, g, h, i を歯頸部とした (Fig. 3)。頬側・舌側ともに評価を行い、歯ブラシの使用によるプラーク除去率を算出した。なお、表示するプラーク除去率は平均値である。

なお、本研究はヘルシンキ宣言、医学系研究に関する倫理指針に準拠しており、当院の倫理審査委員会の承認を得て行われた (承認番号 571, 638)。



Fig. 1 SOLADEY RHYSHM 2 (Shiken)

Solar panels reinforce the effect of titanium dioxide electrode.



Fig. 2 SOLADEY N4 (Shiken)

Solar panels reinforce the effect of titanium dioxide electrode as is the case with SOLADEY RHYSHM 2.

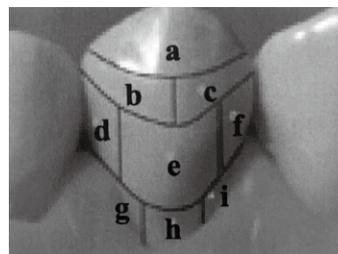


Fig. 3 Rustogi Modification Navy Plaque Index (RMNPI)

Dental plaque adhesion at interproximal surface and cervical surface can be investigated in detail.

a, b, c, e : smooth surface, d, f : interproximal surface, g, h, i : cervical surface

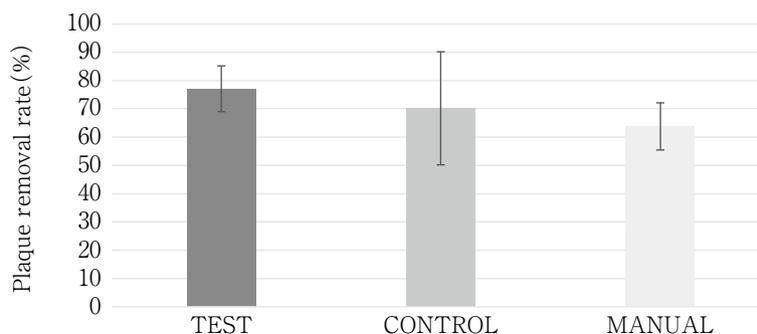


Fig. 4 Plaque removal rate (Whole mouth)

Plaque removal rate was highest in the test group.

統計学的解析には、一元配置分散分析にて歯ブラシ前後と3群間のプラーク除去率の比較を行った。統計学的有意水準はすべて5%とした。

結 果

TEST群・CONTROL群ともに歯ブラシ使用後に、歯肉における創傷は認められなかった。

プラーク除去率は、すべての項目において有意差は認められなかった。口腔内全体のプラーク除去率は、TEST群77.1%、CONTROL群70.2%、MANUAL群63.8%であった (Fig. 4)。TEST群は、CONTROL群およびMANUAL群よりも高いプラーク除去率を示した。

次に、部位別のプラーク除去率は、頬側 (TEST群76.0%・CONTROL群66.8%・MANUAL群68.4%)、舌側 (TEST群68.8%・CONTROL群70.9%・MANUAL群61.3%)、頬側平滑面 (TEST群78.5%・CONTROL群

61.5%・MANUAL群77.3%)、舌側平滑面 (TEST群66.2%・CONTROL群48.3%・MANUAL群80.5%) (Fig. 5)、隣接面 (TEST群67.2%・CONTROL群62.4%・MANUAL群68.0%)、頬側歯頸部 (TEST群75.2%・CONTROL群68.3%・MANUAL群66.9%)、舌側歯頸部 (TEST群69.6%・CONTROL群63.4%・MANUAL群57.0%) (Fig. 6) であり、おおむねTEST群は高いプラーク除去率を示した。ただし、隣接面、舌側平滑面においてはMANUAL群がTEST群よりも高いプラーク除去率を示した。

また、歯種別のプラーク除去率も16 (TEST群75.1%・CONTROL群61.7%・MANUAL群54.1%)、21 (TEST群89.2%・CONTROL群82.9%・MANUAL群66.8%)、24 (TEST群57.6%・CONTROL群56.6%・MANUAL群61.2%)、36 (TEST群68.0%・CONTROL群60.6%・MANUAL群65.8%)、41 (TEST群86.1%・CONTROL群82.5%・MANUAL群73.0%)、44 (TEST群76.1%・

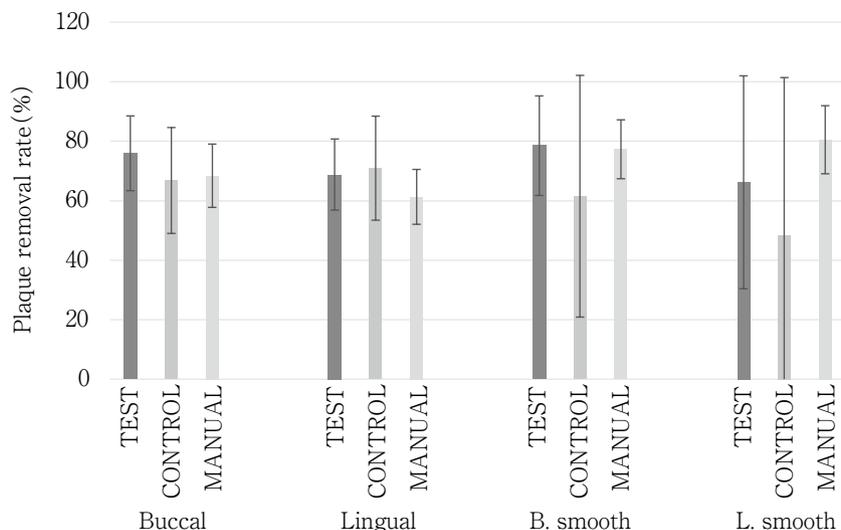


Fig. 5 Plaque removal rate (buccal, lingual, buccal smooth, and lingual smooth surface)

Plaque removal rate of the test group tended to be highest at all four surfaces.

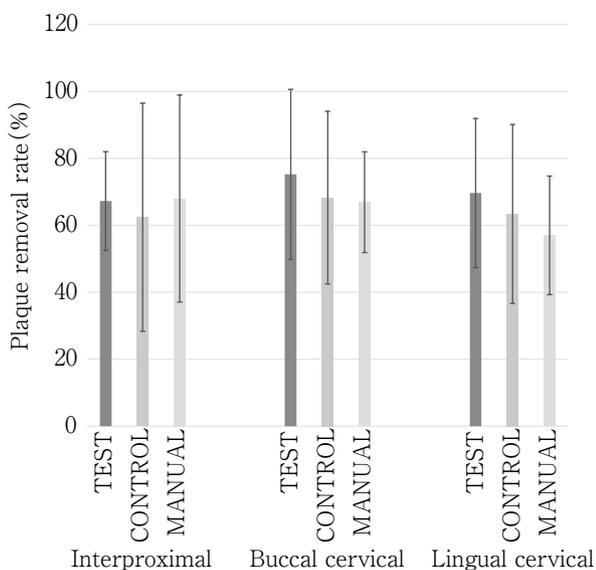


Fig. 6 Plaque removal rate (interproximal surface and cervical surface)

Plaque removal rate at the interproximal surface was highest in the manual group.

CONTROL 群 61.9%・MANUAL 群 62.0%) (Fig. 7) であり、24 以外のすべての歯において、TEST 群が高いプラーク除去率を示した。

考 察

歯ブラシのプラーク除去効果の検討に際して、被験者の選択はそれに影響を与える因子と考えられる。患者を

被験者として選択した場合、患者のブラッシング技能における個人差が大きいとの報告がなされている¹¹⁾。また、患者の代わりに歯学部学生を被験者として選択して行った音波振動歯ブラシの研究でも、手用歯ブラシと比較して有意なプラーク除去率・PCR 減少率が示されたとの報告がある¹²⁾。これらの報告から、本研究では被験者は歯周疾患に対して十分な知識を有する日本医科大学千葉北総病院歯科の医局員としており、被験者の選択は妥当であり、ブラッシング時のプラーク除去効果に影響は与えなかったと考えられる。一方で被験者の歯ブラシに対する習熟度も、プラーク除去効果に影響を及ぼすと考えられる。実験期間については音波振動歯ブラシにおいて5カ月に設定している報告などもあるが、本研究においては被験者が音波振動歯ブラシに関する知識を有し、またその使用方法の習熟になら支障がなく研究が遂行されたものと推察される。次に、本研究においてブラッシング時間は5分としている。これは反転式電動歯ブラシを使用した研究においてブラッシング時間を4分間として、手用歯ブラシと同等以上の臨床的な改善が報告されていることなどから¹³⁾、本研究のブラッシング時間は妥当であったと考えられた。

また、TEST 群および CONTROL 群使用後に、歯肉に創傷は認められなかったためこの歯ブラシを使用することに関して安全性に問題はなかったものと考えられる。

統計学的解析より部位別のプラーク除去率は、舌側では2群間で有意差は認められなかったものの、舌側以外のすべての部位で TEST 群は CONTROL 群と比較して大きなプラーク除去率を有した。これら2群の比較結果

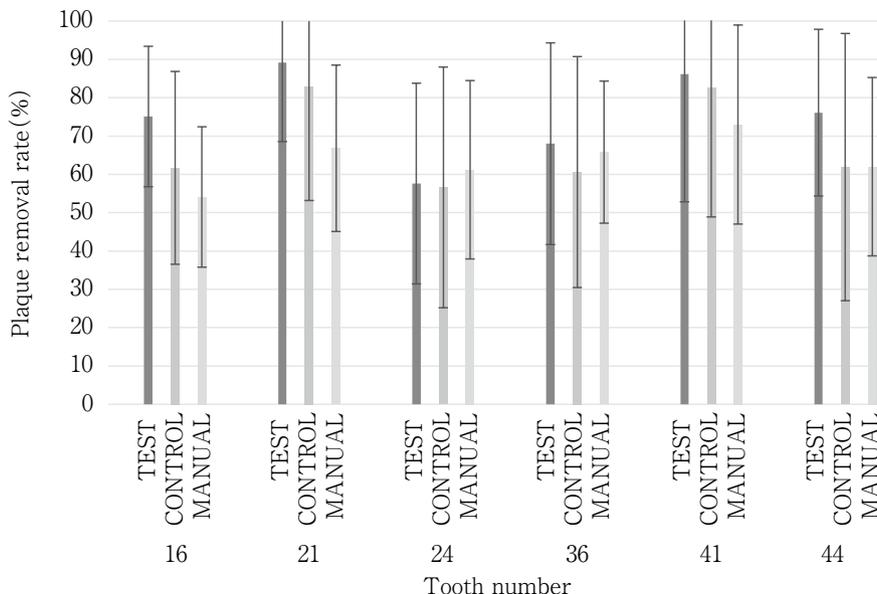


Fig. 7 Plaque removal rate of each tooth

Plaque removal rate of the test group was highest in all teeth except for 24.

から、これまでの報告と同じく、 TiO_2 とソーラーパネルを内蔵することは、高いプラーク除去率になる傾向があると考えられる。これらの効果は、特にプラーク除去しづらい歯頸部においてより効力が発揮された可能性がある⁹⁾。すなわち、 TiO_2 に太陽光および蛍光灯などの光源に含まれる紫外光が当たることにより、 TiO_2 およびソーラーパネルから発生した電子が唾液の成分を介して口腔内に移動したと推察される。次に、この過程で発生したヒドロキシラジカル ($\cdot\text{OH}$) あるいはスーパーオキシドアニオン ($\cdot\text{O}_2^-$) がプラーク内の水素イオン (H^+) を除去し粘着力が不安定な状態になり、結果としてよりプラークが除去されやすい状態に変化したと考えられる⁷⁾。またこの結果に加えて、本研究においては電子の発生がLEDランプの点滅により可視化されたことは、ソーラーパネルが手で被覆されてしまうことにより電子が適切に発生しない事象、あるいは TiO_2 が水で十分に濡れていないことによる不具合などを回避できたと考えられ、 TiO_2 およびソーラーパネルの効力をより十分に発揮できた可能性が示唆された。

TEST群とMANUAL群を比較すると、舌側平滑面 (Fig. 5) と隣接面 (Fig. 6) 以外の部位でTEST群において高いプラーク除去率を示した。これらの部位においては音波振動効果によるプラーク除去が適当に発揮された可能性があり、種々の音波振動歯ブラシを用いいずれの音波振動歯ブラシにおいても縁上プラークの減少が認められたとの報告¹⁴⁾と同様の結果となった。

音波振動歯ブラシの効果に関してはさまざまな報告があるが、ブラシ先端に接触したプラークを直接除去する

効果に加えて、直接毛先が接触していない部分においても、音波振動が唾液中を移動することでキャピテーションバブルを発生させて液体流動力によってプラーク除去が可能である¹⁵⁾。本研究においても、音波振動のこれらの効果がプラーク除去に寄与した可能性があるが、詳細なプラーク除去のメカニズムについてはより細かな検討が必要であると考えられる。特にプラーク除去しづらい歯頸部においては、 TiO_2 の光触媒作用とソーラーパネルの効果がブラッシングによるプラーク除去への助力となった可能性が考えられる。

一方で、隣接面 (Fig. 6) はプラーク除去しづらい部位として挙げられるが、3群のうちMANUAL群において最も高い除去率 (68.0%) を示した。また、舌側平滑面 (Fig. 5) においても同様に、MANUAL群において最も高い除去率 (80.5%) を示した。MANUAL群で使用したSOLADEY N4は、 TiO_2 およびソーラーパネルを内蔵し、特にプラークの除去しづらい歯頸部・隣接面において高いプラーク除去率を示す報告^{9,10)}と一致した結果を示した。ただし、2群において歯ブラシのハンドル形状は同一ではないため単純に比較することはできない。しかしながら、音波振動機能を有するTEST群よりもMANUAL群は隣接面 (Fig. 6)、舌側平滑面 (Fig. 5) において高いプラーク除去率を示したことから、 TiO_2 の光触媒作用とソーラーパネルの効果を有することは、音波振動機能を有さない手用歯ブラシにおいてもその機能を補完できる可能性があると考えられる。この傾向は、頬側 (Fig. 5)、隣接面 (Fig. 6)、頬側平滑面 (Fig. 5)、舌側平滑面 (Fig. 5) の4カ所においては、MANUAL群に

において CONTROL 群と比較して高いプラーク除去率を示した。この結果からも、音波振動機能をもたない MANUAL 群は TiO_2 の光触媒作用とソーラーパネルの効果によりプラーク除去に寄与した可能性がある。また、音波振動歯ブラシと手用歯ブラシを比較した際に、プラーク除去効果には差がないとの報告もある^{16,17)}。したがって、 TiO_2 およびソーラーパネルを内蔵した歯ブラシに関しては、使用者の歯ブラシの種類に対する好みなどを状況に応じて手用歯ブラシと音波振動歯ブラシそれぞれを使い分けることができる可能性があり、使用者が口腔内の状況に応じて歯ブラシを選択できるようになると示唆される。ただし、TEST 群および MANUAL 群において、歯ブラシの毛先の形状が前者はハニカム形状であり後者は円形となっていた点、さらに毛の直径がそれぞれ 0.16, 0.177 mm と異なっており、これらの差がプラークコントロールに影響を及ぼした可能性も否定できない。一方でこれら 2 群間においてそれら以外の因子である、毛の硬さはともにふつうで同等、歯ブラシ先端部のポイント形状・毛の長さ・毛束配列も同じであることから、全く異なった形状のものを比較しているわけではないため、ソーラーパネル・ TiO_2 に主に着目した本研究においてはこれら 2 群を比較検討することに問題はないと考えた。

歯種別のプラーク除去率に関しては、24 (Fig. 7) 以外では TEST 群が最も高いプラーク除去率を示し、TEST 群においては、口腔内における歯の位置にかかわらずおおむね良好にプラーク除去ができることが示された。前歯部から臼歯部にいくに従い、プラーク除去が困難になることが報告されているが¹⁸⁾、音波振動機能に加えて、 TiO_2 の光触媒作用とソーラーパネルからの電子発生効果により口腔内においてプラーク除去効果が向上し、歯種にかかわらずほぼ一様にプラーク除去が可能になったものと推察される。一方で、24 (Fig. 7) においては MANUAL 群が最も高いプラーク除去率を示し、かつ 36・44 (Fig. 7) では MANUAL 群において CONTROL 群と比較すると高いプラーク除去率を示した。これらの結果は上述したように、 TiO_2 およびソーラーパネルを内蔵した手用歯ブラシが、一般的な音波振動歯ブラシを代替できる可能性を示唆するものである。

結 論

TiO_2 とソーラーパネルを内蔵した音波振動歯ブラシは音波振動機能に加えて、 TiO_2 の光触媒作用とソーラーパネル (3 枚) の電子が働くことにより、歯面部位や歯種にかかわらずプラーク除去効果がおおむね高いことが確認された。これにより、太陽電池付光触媒内蔵音波振動

歯ブラシがう蝕や歯周病に対するプラークコントロールに有用である可能性が示唆された。

株式会社シケンより研究に使用した歯ブラシの提供を受けたが、本研究に関連して特に開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 齊藤俊行, 堀江純司, 奈良美夫, 小野田金児, 森岡俊夫. 半導体 TiO_2 微粒子の光触媒による *Streptococcus mutans* に対する殺菌効果. 口腔衛生会誌 1987; 37: 520-521.
- 2) 三浦宏子, 磯貝恵美子, 磯貝 浩, 脇坂仁美, 上田五男, 井藤信義. 半導体 TiO_2 微粒子配合歯磨剤の臨床応用—齲蝕原性細菌との関連性—. 口腔衛生会誌 1989; 39: 711-715.
- 3) 磯貝恵美子, 三浦宏子, 磯貝 浩, 脇坂仁美, 上田五男, 井藤信義. 半導体 TiO_2 微粒子の光触媒反応による黒色集落性 *Bacteroides* に対する反応. 口腔衛生会誌 1988; 38: 588.
- 4) 八島章博, 五味一博, 佐藤淳一, 前田伸子, 新井 高. 酸化チタン光触媒が口腔内細菌に及ぼす影響. 日歯周誌 2006; 48: 297-306.
- 5) 石井敏美, 松村誠士, 西村美智子, Omar Rodis, 平川貴之, 保富貞宏, 下野 勉, 和田精久. 太陽電池を付与した棒状半導体 TiO_2 の *S. mutans* に対する光触媒効果—第 1 報: 酸産生抑制および抗菌効果について—. 小児歯誌 2006; 44: 567-572.
- 6) 石井敏美, 松村誠士, 西村美智子, Omar Rodis, 平川貴之, 保富貞宏, 下野 勉, 和田精久. 太陽電池を付与した棒状半導体 TiO_2 の *S. mutans* に対する光触媒効果—第 2 報: 付着抑制効果について—. 小児歯誌 2006; 44: 709-712.
- 7) 吉峰正彌, 小倉喜一郎, 大木亜悠子, 村田侑加, 藤川瑞穂, 鴨井久博, 和崎佳子. 光触媒を内蔵した太陽電池付音波振動歯ブラシの臨床効果. ライフケアジャーナル 2013; 4: 7-15.
- 8) 吉峰正彌, 大木亜悠子, 藤川瑞穂, 村田侑加, 鴨井久博, 久保田裕子. 周術期患者に対する SOLADEY RHYTHM® の効果. 日本口腔ケア学会誌 2017; 12: 25-31.
- 9) 田辺瑞穂, 本間友千佳, 河野亮子, 山崎廉平, 後藤祐香, 岡崎加奈, 小木曾令実, 村田侑加, 吉峰正彌, 鴨井久博, 松村彰子. 大型太陽電池付チタン電極内蔵歯ブラシのプラーク除去効果. ライフケアジャーナル 2018; 9: 1-6.
- 10) 吉峰正彌, 山崎廉平, 岡崎加奈, 小木曾令実, 鴨井久博, 浅木英理. 太陽電池付酸化チタン内蔵歯ブラシの口腔清掃効果. 日歯周誌 2020; 62: 58-73.
- 11) 泉澤勝憲, 立花智子, 宮川みほ, 小林 誠, 福田光男, 野口俊英, 木下四郎. ブラッシング時の個人差が歯垢除去効果に及ぼす影響について. 日歯周誌 1993; 35: 674-680.

- 12) 鈴木崇夫, 望月 悟, 山本祥子, 宮下 元, 山本松男. 音波ブラシのプラーク除去効果. 日歯周誌 2007; 49: 120-129.
- 13) 渡辺孝章, 鈴木丈一郎, 荒瀬 誠, 岩林明子, 新井 高, 中村治郎. 反転式電動歯ブラシと手用歯ブラシの臨床的評価. 日歯周誌 1995; 37: 353-361.
- 14) 八島章博, 鈴木丈一郎, 田村紗恵子, 松島友二, 五味一博, 新井 高. 音波歯ブラシの臨床的および細菌学的パイロット研究. 日歯周誌 2015; 57: 159-167.
- 15) MacNeill S, Walters DM, Dey A, Glaros AG, Cobb CM. Sonic and mechanical toothbrushes. An in vitro study showing altered microbial surface structures but lack of effect on viability. J Clin Periodontol 1998; 25: 988-993.
- 16) 白川 哲, 氏家優子, 横山拓哉, 中山佑平, 早田優樹, 丹羽堯彦, 船津太一郎, 荒井千明, 長野孝俊, 五味一博. 音波歯ブラシ (Sonicare[®] FlexCare Platinum) のプラーク除去, 臨床パラメーターならびに歯周ポケット内細菌に与える効果. 日歯周誌 2016; 58: 107-116.
- 17) 松島友二, 鈴木琢磨, 八島章博, 白川 哲, 鈴木丈一郎, 五味一博. 極細毛音波歯ブラシの歯肉傷害と臨床効果ならびにポケット内細菌への影響. 日歯保存誌 2015; 58: 306-313.
- 18) 苗代 明, 鴨井久博, 齊藤洋一, 大崎忠夫, 島田栄一, 田中正直, 松村彰子, 中島 茂, 西澤和利, 佐藤 聡, 鴨井久一. 規格モデルによるプラークコントロール—各種歯ブラシの形態によるプラーク除去の効果について—. 日歯周誌 1994; 36: 693-706.

The Effect of Dental Plaque Removal by a Sonic Toothbrush with Solar Panels and Built-in Photocatalyst

YOSHIMINE Masaya, KAMOI Hisahiro and KUBOTA Hiroko*

Dental Clinic, Nippon Medical School Chiba Hokusoh Hospital

*Kubota Dental Clinic

Abstract

Objective: Effective control of dental plaque by daily brushing is critical for the prevention and treatment of periodontal disease. Recently, not only manual toothbrushes but also many types of sonic powered toothbrush have been developed.

Materials and Method: The aim of this study was to investigate the dental plaque removal effect and safety of SOLADEY RHYTHM 2 (Shiken Co., Ltd.), which has more solar panels than the conventional types already developed by Shiken Co., Ltd., to reinforce the effect of the titanium dioxide electrode.

Results: SOLADEY RHYTHM 2 has a high oral hygiene effect regardless of the kind of tooth and surface, and a high rate of dental plaque removal at interproximal or cervical surfaces in particular was observed.

Conclusion: It is suggested that the sonic powered toothbrush with titanium dioxide electrode and solar panels has high dental plaque removal efficacy, and is effective for plaque control for preventing dental caries and periodontal disease.

Key words: titanium dioxide electrode, solar panel, sonic powered toothbrush

術者の臨床経験および接着システムの違いが象牙質接着強さと 接着信頼性に及ぼす影響について

高橋 礼奈 榎本 愛久美¹ 織田 祐太郎
 内山 沙紀 盧山 晨 金森 ゆうな²
 明橋 冴³ 田上 温子 高橋 彬文⁴
 則武 加奈子² 佐藤 隆明 田上 順次

東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院歯医学総合研究科 歯医学系専攻 口腔機能再構築学講座 う蝕制御学分野

¹東京医科歯科大学 (TMDU) 歯学部

²東京医科歯科大学 (TMDU) 歯学部附属病院歯科総合診療部

³東京歯科大学保存修復学講座

⁴日本歯科大学附属病院総合診療科 1

抄録

目的：近年、コンポジットレジン修復において、さまざまな被接着体に対して同一のボンディング材が使用できるユニバーサルタイプの接着システムが開発され、臨床でも多用されるようになってきている。本研究では、術者の臨床経験と接着システムが象牙質接着性能に及ぼす影響について評価した。

材料と方法：2ステップボンディングシステムであるクリアフィルメガボンド2 (MB2) および1ボトルユニバーサルタイプのボンディングシステムであるクリアフィルユニバーサルボンドクイック (UBQ) の、2種類の接着システムを使用した。ウシ抜去下顎永久切歯の唇面象牙質平坦面を流水下にて露出させ、#600の耐水研磨紙で研削した。基礎実習中の歯学部学生 (undergraduates) 5名と臨床経験5年以上 (平均7.4年) の歯科医師 (professionals) 5名が、MB2またはUBQを業者指示どおりに象牙質表面に接着操作を行った後、コンポジットレジン2mm築盛し、光照射を20秒行った。試料を24時間37°Cの水中に保管した後、クロスヘッドスピード1mm/分にて微小引張試験を行った。得られた値は、二元配置分散分析とt検定により統計処理を行った ($p=0.05$)。さらに、Weibull分析により解析した。

結果：MB2-undergraduates, MB2-professionals, UBQ-undergraduates, UBQ-professionalsの平均値±標準偏差 (MPa) は、 33.7 ± 10.1 , 36.7 ± 10.1 , 26.0 ± 10.7 , 28.1 ± 11.1 、Weibull係数は3.6, 4.2, 2.0, 2.6であった。二元配置分散分析により、“臨床経験”は微小引張接着強さに影響せず ($p>0.05$)、“接着システム”は微小引張接着強さに影響した ($p<0.05$)。Weibull係数は、大きい値からMB2-professionals, MB2-undergraduates, UBQ-professionals, UBQ-undergraduatesの順であった。傾きの差の検定では、すべての群のmの間に有意差を認めた ($p<0.05$)。

結論：MB2はUBQより高い象牙質接着強さを示し、信頼性も高い接着システムであった。臨床経験の違いは象牙質接着強さに影響を及ぼさなかったが、信頼性に関してはMB2, UBQともに臨床経験5年以上の歯科医師のほうが歯学部学生に比べて高かった。

キーワード：術者の臨床経験, 象牙質接着性能, Weibull分析

責任著者連絡先：高橋礼奈

〒113-8549 東京都文京区湯島1-5-45 東京医科歯科大学 (TMDU) 大学院歯医学総合研究科歯医学系専攻口腔機能再構築学講座う蝕制御学分野

TEL : 03-5803-5483, FAX : 03-5803-0195, E-mail : rtakahashi.ope@tmd.ac.jp

受付：2021年3月15日/受理：2021年4月20日

DOI : 10.11471/shikahozon.64.220

緒言

これまで、コンポジットレジン修復において、セルフエッチングプライマーとボンドを1ボトルにした、1ステップボンディングシステムが多数開発されてきた。1ステップボンディングシステムでは、酸性モノマーがプロトン電離しボンディング材にエッチング機能をもたせるために水を含有している¹⁾。さらに、触媒などを溶解し、ボンドが歯質に浸透するのに適当な粘性を与える有機溶媒(アセトンやアルコール)やさまざまなモノマー成分を含有している²⁾。2ステップボンディングシステムに比べて、1ステップボンディングシステムでは歯面処理時間の短縮、操作手順のエラーの減少など有利な点も挙げられる。その反面、ボンディング材の水や有機溶媒は、ボンディング材の重合を阻害する因子でもあり、さらに硬化後のボンディング層の機械的性質の低下の原因となるため、接着修復の劣化をまねく危険性もある。

さらに近年、さまざまな被接着体に対して同一のボンディング材が使用できるユニバーサルタイプの接着システムや、塗布後に待ち時間が必要ない接着システムが開発され、臨床でも多用されるようになってきている。各接着システムの操作方法は製品により異なり、術者の経験により接着強さに影響を及ぼすことが報告されている³⁻⁵⁾。しかしながら、術者の臨床経験が異なる接着システムに及ぼす影響やその接着信頼性について検討した報告は少ない。そこで本研究では、術者の臨床経験および接着システムの違いが象牙質接着強さと接着信頼性に及ぼす影響について検討を行った。

材料および方法

本実験に用いた材料を Table 1 に示す。接着システムとして、2ステップボンディングシステムのクリアフィルムメガボンド 2 (MB2, クラレノリタケデンタル) と 1 ボトルユニバーサルタイプボンディングシステムのクリアフィルムユニバーサルボンドクイック (UBQ, クラレノリタケデンタル) を使用した。

被着体材料として、冷凍保存されたウシ抜去下顎永久切歯 40 歯を用いた。歯を解凍し、流水下にて唇面象牙質平坦面をモデルトリマー (Y-230, ヨシダ) にて露出させ、#600 の耐水研磨紙で研削した。術者は、東京医科歯科大学歯学部歯学科 4 年生で基礎実習中の学生 (undergraduates) 5 名と、臨床経験 5 年以上 (平均 7.4 年) の歯科医師 (professionals) 5 名とした。各術者が、業者指示に従い MB2 または UBQ を用いて牛歯象牙質に接着操作を行い、光重合型コンポジットレジン (クリアフィル

AP-X, クラレノリタケデンタル) 2 mm の築盛を行った。光照射器は、LED 光照射器である VALO キュアリングライト (VALO, ウルトラデント, USA) のスタンダードモード (1,000 mW/cm²) を用いた。試料を 24 時間 37°C 水中に保管後、接着界面が約 1 mm² となるように、精密切断加工機 (アイソメット, ビューラー, USA) を用いて接着界面に垂直に薄切し、ビーム状試片を作製した。小型卓上試験機 (EZ-SX, 島津) を用いてクロスヘッドスピード 1 mm/分にて微小引張試験を行った (n = 30)。得られた値は、Shapiro-Wilk test にて正規性と Levene test にて等分散性を確認した後、二元配置分散分析と *t* 検定を用いて統計処理を行った。さらに、得られた微小引張接着強さの値に対して以下に示す式を用いて Weibull 分析に必要な数値を算出した。

$$P_f = 1 - \exp[-(\sigma/\sigma_0)^m]$$

P_f : 破断確率, σ : 応力 (MPa), m : Weibull 係数, σ_0 : 尺度パラメーターである。

各条件間の Weibull 係数の差については、回帰直線の傾きの差の検定を行った。統計処理は、IBM SPSS Statistics 23 (IBM, USA) を用いて有意水準 5% にて行った。

さらに微小引張試験後の試料は金蒸着を施して走査電子顕微鏡 (SEM, JSM-5310LV, Jeol) にて破断面観察を行い、界面破壊または凝集破壊に分類した。

結果

微小引張試験の結果を Table 2 に、Weibull プロットを Fig. 1 に示す。MB2-undergraduates, MB2-professionals, UBQ-undergraduates, UBQ-professionals の接着強さの平均値 ± 標準偏差 (MPa) は、33.7 ± 10.1, 36.7 ± 10.1, 26.0 ± 10.7, 28.1 ± 11.1, Weibull 係数は 3.6, 4.2, 2.0, 2.6 であった。二元配置分散分析により、“臨床経験”は微小引張接着強さに影響せず ($p > 0.05$)、“接着システム”は微小引張接着強さに影響した ($p < 0.05$)。また、2 要因の交互作用は認められなかった ($p > 0.05$)。 m は、大きい値から MB2-professionals, MB2-undergraduates, UBQ-professionals, UBQ-undergraduates の順であった。傾きの差の検定では、すべての群の m の間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。

また、微小引張試験後の破断面形態観察では、すべての群において、90% 以上の凝集破壊が認められた (Fig. 2)。

考察

本研究で用いた微小引張試験は、レジン系材料と象牙質の接着試験に広く用いられている試験方法である。ま

Table 1 Materials used in this study

Material	Code	Compositions	Procedure	Batch No.
Clearfil Mega Bond 2	MB2	Primer: 10-MDP, HEMA, hydrophilic dimethacrylate, water, photo initiator (pH<2.5)	Apply and leave primer for 20 s, and then gently air-dry.	3F0032
		Bond: 10-MDP, HEMA, Bis-GMA, hydrophobic dimethacrylate, silanated colloidal silica, CQ, new initiators, accelerators	Apply bond, gently air-dry, and then light cure for 10 s.	3M0047
Clearfil Universal Bond Quick	UBQ	10-MDP, Bis-GMA, HEMA, hydrophilic amide monomer, filler, NaF, ethanol, water, photo initiators, chemical polymerization, accelerator, others (pH 2.3)	Apply and air-dry immediately for 5 s. Light cure for 10 s.	5Q0035
Clearfil AP-X Shade: A2		Bis-GMA, TEGDMA, silane barium glass filler, silane silica filler, silanated colloidal silica, CQ, pigments, others	Light cure for 20 s.	B90078

Manufacturer: Kuraray Noritake Dental, Tokyo, Japan; Abbreviations: 10-MDP: 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate; HEMA: 2-hydroxyethylmethacrylate; Bis-GMA: bisphenol-A-diglycidylmethacrylate; TEGDMA: triethylene glycol dimethacrylate; CQ: dl-camphorquinone

Table 2 Results of microtensile bond strength test and failure mode analysis

Adhesive system	Operator	Mean±SD	<i>m</i>	σ_0	<i>P10</i>	Failure mode % (Ad/Co)
MB2	undergraduates	33.7±10.1 ^a	3.6 ^A	37.4	20.1	5/95
	professionals	36.7±10.1 ^a	4.2 ^B	40.4	23.5	6/94
UBQ	undergraduates	26.0±10.7 ^b	2.0 ^C	30.3	9.7	7/93
	professionals	28.1±11.1 ^b	2.6 ^D	31.7	13.5	5/95

Weibull modulus (*m*), characteristic strength (σ_0) in MPa, and 10% probability of failure (*P10*) in MPa.

The values with the same superscript letters are not statistically different (p>0.05).

Ad: adhesive failure, Co: cohesive failure within substrates

た、Weibull分析は信頼性の評価に用いる分析方法であり、Burrowらは、Weibull分析はレジ系材料と象牙質接着強さにおける分析において有用であると報告している⁶⁾。Weibullプロットの回帰直線の傾きとして得られるWeibull係数(*m*)は、値が大きいほど接着強さのばらつきが少なくなり、信頼性が高いといえる。

本研究で用いたMB2とUBQは、どちらも代表的なリン酸エステル系モノマーである10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (10-MDP)が含まれている。MB2は、2ステップセルフエッチボンディングシステムのゴールドスタンダードと考えられてきたクリアフィルムメガボンド(クラレノリタケデンタル)⁷⁾よりも、ボンドに新規重合触媒を含有することにより重合性が高まり、初期接着強さおよび長期接着耐久性が向上したとの報告がある⁸⁾。

1液性の接着システムでは、親水性モノマーとして、水を取り込み水化ゲルを形成するHEMAが含有

されている製品が多い⁹⁾。HEMA-richの接着システムでは象牙質と接触したときの親水性の増加が認められ^{10,11)}、HEMA-freeの接着システムでは、相分離により接着強さが低下することが報告されている⁹⁾。本研究で使用したUBQは、HEMAの一部をHEMAより高い親水性をもつ多官能アミド系モノマーに置換してある。Kunoらは、上記の置換を行うことにより象牙質への浸透性が向上し、かつ重合後のボンドの機械的強度が向上し、接着性能が向上したと報告している¹²⁾。本研究において、UBQが業者指示である塗布後待ち時間なしにもかかわらず25MPa以上の平均微小引張接着強さを示し、凝集破壊が多くみられた。しかしながら、MB2はUBQよりも有意に高い接着強さを示した。

UBQは有機溶媒としてエタノールを含有しているが、アセトンと比較した場合、エタノールの蒸気圧は低く、共沸効果としての水の除去効果は高くないと考えられる^{1,10)}。これら溶媒がボンド層や樹脂含浸層に残存する

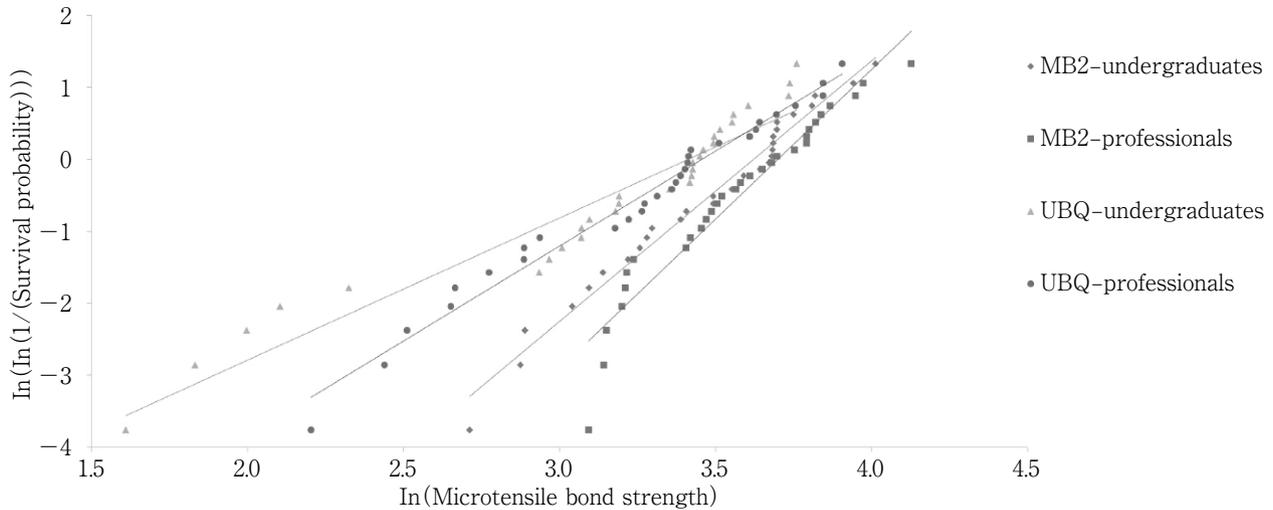
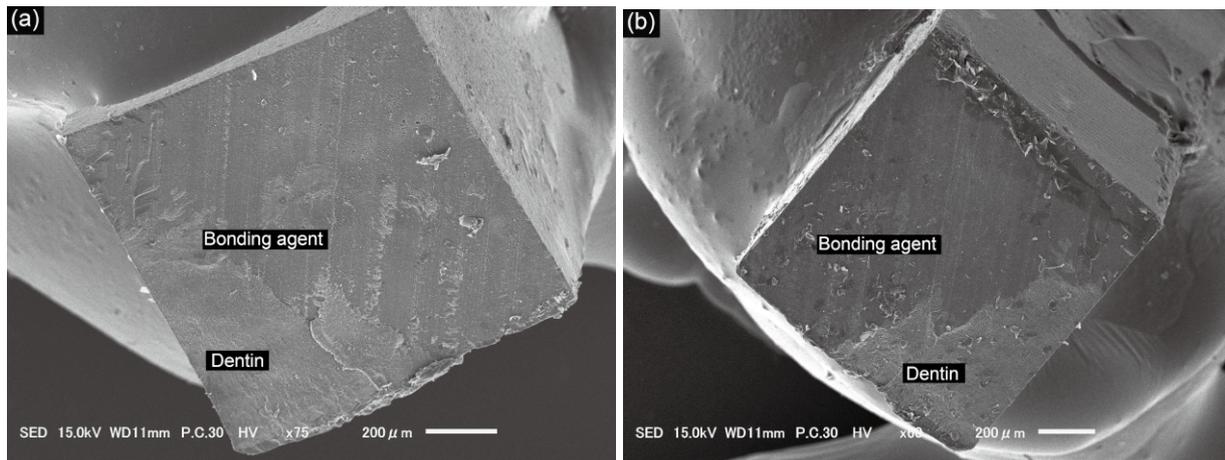


Fig. 1 Weibull plots of microtensile bond strength



a : dentin side

b : composite resin side

Fig. 2 Representative SEM images of the fractured specimens
Cohesive failures within bonding agent and dentin were observed.

ことにより、ボンドの重合不全を起こし接着強さを低下させる¹³⁾。エタノールと水は光照射前に徹底的に除去することが必要であるが、溶媒が揮発するにつれてボンドの粘性が上昇するため、溶媒の完全除去は困難である^{14,15)}。さらに、UBQには親水性モノマーとして、アミド系モノマーに加えてHEMAが含まれており、溶媒除去効果に影響を与えている可能性がある¹⁶⁾。以上のUBQの性質から、Weibull係数がMB2よりも小さくなったと考えられる。

Seitokuら¹⁷⁾は、MB2とUBQを用いて象牙質に対する微小引張試験と走査電子顕微鏡による接着界面観察を行っている。MB2は、UBQより有意に高い接着強さを示し、MB2では多数のレジントグが象牙質細管内に観察されたが、UBQではほとんどレジントグがみられなかつ

たと報告している。これは、UBQはマイルドなセルフエッチングシステムにもかかわらず、塗布後の待ち時間がないことにより、スミヤー層の除去がほとんどできなかったためと結論づけている。

これまでの2ステップボンディングシステムと1ステップボンディングシステムを使用した研究では、2ステップボンディングシステムのほうが高い接着強さが得られ、値のばらつきが小さく信頼性が高い材料であったとの報告がある¹⁸⁾。このことは、本研究結果と一致する。

本研究では、同一システムを用いた場合、術者の臨床経験の差による微小引張強さに有意差が認められなかったが、Weibull係数では有意差が認められた。2ステップボンディングシステムは、プライマー成分中の水分の揮発やボンドの厚みにより接着強さが変わるとの報告があ

る。1ステップボンディングシステムでは、塗布方法・塗布回数・塗布後のエアブローの強さにより、接着性能が左右されるとの報告がある¹⁰⁾。Sanoらは、術者の臨床経験は接着試験の結果に影響を及ぼすが、臨床経験よりも使用する接着システムのほうが接着試験の接着強さおよび値のばらつきに影響を及ぼすと報告している³⁾。そして、2ステップボンディングシステムを用いた際に、歯学部学生と歯科医師で接着強さに有意差がなかったが、歯科医師のほうが値のばらつきが少なかったと報告しており、本研究結果と一致する³⁾。また、同一の術者が経験を重ねると接着強さが向上し、ばらつきが小さくなったとの報告がある¹⁹⁾。本研究においても、臨床経験5年以上の歯科医師は製品の使用に慣れており、塗布方法・エアブローの強さなどの手技が安定しており、Weibull係数が大きくなったと考えられる。

本研究では、初期接着性能について検討したが、長期接着性能についてもさらなる検討が必要である。

結 論

本研究の結果から、MB2はUBQより高い象牙質接着強さを示し、信頼性も高い接着システムであることが明らかになった。臨床経験の違いは象牙質接着強さに影響を及ぼさなかったが、信頼性に関してはMB2、UBQともに臨床経験5年以上の歯科医師のほうが歯学部学生に比べて高かった。

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Peumans M, Yoshida Y, Poitevin A, Coutinho E, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Systematic review of the chemical composition of contemporary dental adhesives. *Biomaterials* 2007; 28: 3757-3785.
- 2) Wang Y, Spencer P, Yao X, Brenda B. Effect of solvent content on resin hybridization in wet dentin bonding. *J Biomed Mater Res A* 2007; 82: 975-983.
- 3) Sano H, Kanemura N, Burrow MF, Inai N, Yamada T, Tagami J. Effect of operator variability on dentin adhesion: students vs. dentists. *Dent Mater J* 1998; 17: 51-58.
- 4) Miyazaki M, Onose H, Moore BK. Effect of operator variability on dentin bond strength of two-step bonding systems. *Am J Dent* 2000; 13: 101-104.
- 5) Ueda M, Mine A, De Munck J, Hakogi T, Van Meerbeek B, Kuboki T. The effect of clinical experience on dentine bonding effectiveness: students versus trained dentists. *J Oral Rehabil* 2010; 37: 653-657.
- 6) Burrow MF, Thomas D, Swain MV, Tyas MJ. Analysis of tensile bond strengths using Weibull statistics. *Biomaterials* 2004; 25: 5031-5035.
- 7) De Munck J, Mine A, Poitevin A, Van Ende A, Cardoso MV, Van Landuyt KL, Peumans M, Van Meerbeek B. Meta-analytical review of parameters involved in dentin bonding. *J Dent Res* 2012; 91: 351-357.
- 8) Sato K, Hosaka K, Takahashi M, Ikeda M, Tian F, Komada W, Nakajima M, Foxton R, Nishitani Y, Pashley DH, Tagami J. Dentin bonding durability of two-step self-etch adhesives with improved of degree of conversion of adhesive resins. *J Adhes Dent* 2017; 19: 31-37.
- 9) Ikeda T, De Munck J, Shirai K, Hikita K, Inoue S, Sano H, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Effect of air-drying and solvent evaporation on the strength of HEMA-rich versus HEMA-free one-step adhesives. *Dent Mater* 2008; 24: 1316-1323.
- 10) Van Landuyt KL, De Munck J, Snauwaert J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, Inoue S, Peumans M, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Monomer-solvent phase separation in one-step self-etch adhesives. *J Dent Res* 2005; 84: 183-188.
- 11) Van Landuyt KL, Snauwaert J, De Munck J, Coutinho E, Poitevin A, Yoshida Y, Suzuki K, Lambrechts P, Van Meerbeek B. Origin of interfacial droplets with one-step adhesives. *J Dent Res* 2007; 86: 739-744.
- 12) Kuno Y, Hosaka K, Nakajima M, Ikeda M, Klein Junior CA, Foxton RM, Tagami J. Incorporation of a hydrophilic amide monomer into a one-step self-etch adhesive to increase dentin bond strength: Effect of application time. *Dent Mater J* 2019; 38: 892-899.
- 13) Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH. Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *J Dent* 1999; 27: 209-214.
- 14) Bail M, Malacarne-Zanon J, Silva SM, Anauate-Netto A, Nascimento FD, Amore R, Lewgoy H, Pashley DH, Carrilho MR. Effect of air-drying on the solvent evaporation, degree of conversion and water sorption/solubility of dental adhesive models. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23: 629-638.
- 15) Yiu CK, Pashley EL, Hiraishi N, King NM, Goracci C, Ferrari M, Carvalho RM, Pashley DH, Tay FR. Solvent and water retention in dental adhesive blends after evaporation. *Biomaterials* 2005; 26: 6863-6872.
- 16) 保坂啓一, 米倉和秀, 田口啓太, アントニーン ティヒー, 久野裕介, 永野大樹, 荒岡大輔, 畑山貴志, 佐藤健人, 高橋真広, 西谷佳浩, 池田正臣, 中島正俊, 田上順次. タッチキュアがセルフエッチシステムの深部根管壁象牙質接着性能に及ぼす効果. *日歯保存誌* 2019; 62: 39-46.

- 17) Seitoku E, Hoshika S, Ikeda T, Abe S, Tanaka T, Sano H. Bonding performance of a hydrophilic amide monomer containing adhesive to occlusal and cervical dentin. *Materials (Basel)* 2020; 13: 4727.
- 18) Takahashi R, Nikaido T, Tagami J, Hickel R, Kunzelmann KH. Contemporary adhesives: marginal adaptation and microtensile bond strength of class II composite restorations. *Am J Dent* 2012; 25: 181-188.
- 19) Adebayo OA, Burrow MF, Tyas MJ. Bond strength test: role of operator skill. *Aust Dent J* 2008; 53: 145-150.

Effects of Clinical Experience and Adhesive Systems on Dentin Bonding Strength and Dentin Bonding Reliability

TAKAHASHI Rena, ENOMOTO Megumi¹, ODA Yutaro,
UCHIYAMA Saki, ROZAN Shin, KANAMORI Yuna²,
AKEHASHI Sae³, TAGAMI Atsuko, TAKAHASHI Akifumi⁴,
NORITAKE Kanako², SATO Takaaki and TAGAMI Junji

Department of Cariology and Operative Dentistry, Division of Oral Health Sciences, Medical and Dental Sciences,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

¹Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

²Oral Diagnosis and General Dentistry, Dental Hospital, Tokyo Medical and Dental University (TMDU)

³Department of Operative Dentistry, Cariology and Pulp Biology, Tokyo Dental College

⁴The Nippon Dental University Hospital, General Dentistry 1

Abstract

Purpose: In composite resin restoration, universal adhesives have become popular due to their broad applicability in various clinical situations. The clinical success of adhesive systems depends not only on material-related but also on operator-related factors. The purpose of this study was to evaluate the dentin bond strength of two adhesive systems performed by operators with or without clinical experience.

Methods: Two types of adhesive system, a two-step self-etch adhesive, Clearfil Mega Bond 2 (MB2), and a 1-bottle universal adhesive, Clearfil Universal Bond Quick (UBQ), were used in this study. The operators were five undergraduate dental students with no clinical experience at all (undergraduates) and five dentists with extensive experience in adhesive dentistry (mean experience of 7.4 years) (professionals). Forty bovine dentin surfaces were prepared with #600-grit SiC paper under running water. MB2 or UBQ was applied to the dentin surfaces and light-cured according to the manufacturer's instructions, followed by 2-mm composite buildups by each operator. The specimens were sectioned and subjected to a microtensile bond strength (μ TBS) test after being stored in water for 24 h. The data were statistically analyzed by two-way ANOVA and *t*-test ($p=0.05$). Weibull analysis was also performed on the μ TBS data.

Results: The mean μ TBSs in MPa/Weibull modulus value were MB2-undergraduate: 33.7/3.6, MB2-professionals: 36.7/4.2, UBQ-undergraduate: 26.0/2.0, and UBQ-professionals: 28.1/2.6. Two-way ANOVA revealed that "adhesive system" influenced μ TBS ($p<0.05$), while "operator" did not ($p>0.05$). The Weibull modulus of each group was significantly different ($p<0.05$).

Conclusion: MB2 is superior to UBQ in terms of dentin bond strength and bonding reliability. The practitioner's clinical experience does not affect the dentin bond strengths of both MB2 and UBQ. Professionals attained superior bonding reliability of both MB2 and UBQ compared with undergraduates.

Key words: clinical experience, dentin bond strength, Weibull analysis

Corresponding author: Dr. TAKAHASHI Rena, Department of Cariology and Operative Dentistry, Division of Oral Health Sciences, Medical and Dental Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), 5-45, Yushima 1-chome, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8549, Japan.

TEL: +81-3-5803-5483, FAX: +81-3-5803-0195, E-mail: rtakahashi.ope@tmd.ac.jp

Received for Publication: March 15, 2021/Accepted for Publication: April 20, 2021

リン酸系モノマー含有歯面処理剤がレジンセメントの接着性に及ぼす影響

石井 亮^{1,2} 笠原 悠太¹ 廣兼 榮造¹
高見澤 俊樹^{1,2} 辻本 暁正^{1,2} 吉中 雄太¹
宮崎 真至^{1,2} 北原 信也^{1,3}

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

³TEAM 東京 ノプレストラティブデンタルオフィス

抄録

目的：唾液汚染が生じた歯質表面に対し、各種汚染除去法がレジンセメントの接着性に及ぼす影響について、剪断接着強さおよび歯質表面の表面自由エネルギーを求めるとともにSEM観察を行うことによって検討した。

材料と方法：レジンセメントとしてパナビア V5（クラレノリタケデンタル）を、唾液汚染面の表面処理剤としてカタナクリーナー（KC、クラレノリタケデンタル）、Multi Etchant（ME、ヤマキン）および Ultra-Etch（UE、Ultradent Products）を使用した。接着試験用試片の製作に際して、ウシ下顎前歯歯冠部を常温重合レジジンに包埋し、エナメル質あるいは象牙質平坦面を耐水性 SiC ペーパー #320 を用いて研削して被着歯面とした。これらの被着歯面に対し、ヒト唾液を 10 μ l 滴下してこれを汚染面とした。汚染面に表面処理を施すことなく測定を行ったものを SC 群、汚染のない被着面を Control 群とした。汚染面の表面処理法は、KC 群、ME 群および UE 群の合計 3 条件とした。これらの被着面に対して内径 2.4 mm、高さ 2 mm の円柱状ステンレス型を静置し、これにセメントペーストを填塞して接着試験用試片とした。これらの試片を 37°C 精製水中に 24 時間保管後、あるいは 24 時間保管後に 5~55°C を 1 サイクルとしたサーマルサイクル (TC) を 10,000 回負荷後、万能試験機 (Type 5500R, Instron) を用いてクロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件で剪断接着強さを測定した。表面自由エネルギーの算出に際しては、剪断接着強さ測定用試片と同様に調製した試片に対して、表面自由エネルギーが既知である 3 種類の液体を用いて接触角を測定することによって求めた。また、各被着歯面における、各処理後の SEM 観察を行った。

成績：歯質に対するレジンセメントの 24 時間後の接着強さは、Control 群に比較して SC 群で有意に低下したが、表面処理を行うことによって回復した。TC 後におけるレジンセメントの接着強さは、エナメル質では UE 群が有意に高い値を示し、象牙質においては KC 群が有意に高い値を示した。歯質表面における表面自由エネルギーは SC 群で低下したが、各表面処理の影響は歯質とともに各処理剤によって異なるものであった。

結論：本実験の結果から、唾液汚染されたエナメル質および象牙質に対する表面処理は、汚染面を改質することで接着強さを向上させた。また、処理面の表面自由エネルギーは各処理剤によって異なる傾向を示した。

キーワード：唾液汚染、レジンセメント、表面自由エネルギー、接着強さ

責任著者連絡先：石井 亮

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13 日本大学歯学部保存学教室修復学講座

TEL : 03-3219-8141, FAX : 03-3219-8347, E-mail : ishii.ryou@nihon-u.ac.jp

受付：2021年2月22日/受理：2021年4月23日

DOI : 10.11471/shikahozon.64.227

緒 言

近年, CAD/CAM システムが普及したことによって, セラミックスやコンポジットレジンブロックを用いた間接法による修復治療を選択する機会が増加している¹⁾. これら修復材料は, 優れた審美性を有するとともに, 機械的強度も高く耐摩耗性にも優れている^{2,3)}. 一方, 製作された歯冠修復物は, 口腔内で長期間機能させるためには装着材として接着性レジンセメントを使用することが推奨されている⁴⁾.

間接修復法においては, 製作された歯冠修復物を口腔内で試適し, 調整する必要がある. その際, 歯冠修復物内面あるいは被着歯面に唾液汚染が生じることとなる. この唾液汚染はレジンセメントの接着阻害因子となり, 接着性を低下させることが指摘されている^{5,6)}. このうち, 化学的除去法としてリン酸系モノマーを用いて, 界面活性作用を効果的に発揮するという製品が開発された⁷⁻⁹⁾. しかし, これらの製品における汚染除去効果とともに歯質接着性に及ぼす影響については, 開発から間もないこともあり, 不明な点が多いのが現状である.

そこで著者らは, レジンセメントの接着性に関する研究の一環として, 被着歯面の唾液汚染に対する表面処理材の応用効果について検討した. すなわち, 唾液汚染が生じた被着歯面および汚染を除去した後の接着強さを測定するとともに, 処理面の表面自由エネルギーの変化から, レジンセメントの歯質に対する接着性について検討するとともに, 被着歯面の走査電子顕微鏡 (SEM) 観察を行った.

材料および方法

1. 供試材料および可視光線照射器

供試したレジンセメントおよび唾液汚染に対する表面処理材を, Table 1, 2 に示した. すなわち, レジンセメントとしてパナビア V5 (クラレノリタケデンタル) を, 表面処理剤としてカタナクリーナー (KC, クラレノリタケデンタル), Multi Etchant (ME, ヤマキン) および Ultra-Etch (UE, Ultradent Products, USA) を用いた. また, 可視光線照射器 (Optilux 501, Kerr, USA) は, その光強度が 600 mW/cm^2 以上であることを確認して実験に使用した.

2. 接着強さ

接着試験測定用試片の製作に際して, ウシ (2~3 歳齢) 下顎前歯歯冠部 (大阪食肉臓器) のみを常温重合レジン (トレレジン II, 松風) に包埋し, 直径 6~8 mm 程度のエナメル質あるいは象牙質平坦面が得られるように,

唇側中央部をモデルトリマーを用いて研削した. 次に, この面を耐水性 SiC ペーパーの #320 で研削し, 被着歯面とした (Control 群).

これらの被着歯面に対し, ヒト唾液を $10 \mu\text{l}$ 滴下し 60 秒後に水洗し 10 秒間乾燥させたものを唾液汚染面 (SC 群) とした. 汚染面の表面処理法は, KC 処理 (KC 群), ME 処理 (ME 群) および UE 処理 (UE 群) の 3 条件とした. 各被着歯面に対し歯面処理を行った後, 内径 2.4 mm, 高さ 2 mm のステンレス (SUS 304) 製リング状モールドにセメント泥を填塞し, 填塞面を透明ストリップで圧接して 30 秒間光照射を行ったものを接着試験用試片とした.

これらの試片を, 37°C 精製水中に 24 時間保管, あるいは 24 時間保管後にサーマルサイクル試験機 (サーマルショックテスター TTS-1, トーマス科学) を用いて $5\sim 55^\circ\text{C}$ を 1 サイクルとし, 各温度における係留時間を 30 秒間に設定したサーマルサイクル (TC) を 10,000 回負荷した. その後, 万能試験機 (Type 5500R, Instron, USA) を用いてクロスヘッドスピード 1.0 mm/min の条件で剪断接着強さを測定した. 各条件における試片の数は 15 個とし, 接着試験終了後の試片については, 実体顕微鏡 (SZH-131, オリンパス) を用いて被着歯面およびレジンセメント破断面を観察し, 界面破壊, 歯質あるいはレジンセメントの凝集破壊および混合破壊として分類した.

なおヒト唾液は, 本研究の趣旨を理解し協力を得られた, 全身健康状態および口腔内環境が良好な 30 代男性 1 名から採取した唾液を試料とした. 唾液採取に際しては, 研究協力者に唾液採取前 2 時間以内の飲食およびブラッシングを控えるようあらかじめ指示した. その後, パラフィンペレットを 5 分間噛むことによって刺激唾液を採取, これを試料とした. なお, 唾液採取に関しては実験ごとに行った.

また, 本研究の実施にあたっては日本大学歯学部倫理審査委員会の承認を得ている (倫許 2019-12).

3. 表面自由エネルギー

表面自由エネルギーの算出に際して, 接着試験用試片と同様に処理したウシ下顎前歯の歯冠部に対して各表面処理を行った. 表面自由エネルギーが既知の液体として, 1-ブロモナフタレン, ジョードメタンおよび蒸留水を使用した (Table 3). 接触角の測定は, 全自動接触角計 (Drop Master DM 500, 協和界面科学) を用い, セシルドロップ法でそれぞれの液滴を $1 \mu\text{l}$ 滴下し, 装置に付属するソフトウェア (FAMAS, 協和界面科学) を用いて $\theta/2$ 法で測定を行った (Fig. 1). なお, 接触角の測定は液滴滴下直後とし, 各条件における試片数は 10 個とした.

表面自由エネルギーと接触角の関係は, 接着仕事量を

Table 1 Resin cement used in this study

Resin cement	Main component	Manufacturer	Lot No.
Panavia V5	Past A: Bis-GMA, TEGDMA, hydrophobic aromatic dimethacrylate, hydrophilic aliphatic dimethacrylate, silanated barium glass filler, fluoroaluminosilicate glass filler, colloidal silica, accelerator, initiator Past B: Bis-GMA, hydrophobic aromatic dimethacrylate, hydrophilic aliphatic dimethacrylate, silanated barium glass filler, silanated aluminum oxide filler, accelerator, dl-camphorquinone, pigments	Kuraray Noritake Dental	5M0104
Panavia V5 Tooth primer	10-MDP, hydrophilic aliphatic dimethacrylate accelerators, HEMA, water, stabilizer	Kuraray Noritake Dental	AB0071

Bis-GMA: 2,2-bis [4-(2-hydroxy-3-methacryloyloxypropoxy) phenyl] propane, TEGDMA: triethyleneglycol dimethacrylate, 10-MDP: 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate, HEMA: 2-hydroxyethyl methacrylate.

Table 2 Pretreatment materials used in this study

Pretreatment (Code)	Main component	pH	Manufacturer	Lot No.
Katana Cleaner (KC)	10-MDP, water, triethanolamine, polyethyleneglycol, stabilizer, accelerator, dyes	4.51	Kuraray Noritake Dental	AH001
Multi Etchant (ME)	M-TEG-P, water, thicluig agenrt, dyes	0.6	Yamakin	02022026
Ultra-Etch (UE)	35%phosphoric acid, water, silicon dioxide, dyes	<1	Ultradent Products (USA)	01071704

10-MDP : 10-methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate, M-TEG-P : methacryloyloxy tetraethylene glycol dihydrogen phosphate.

Table 3 Surface-free energy and their components values of three test liquids ($\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$)

Liquids	Lot No.	Manufacturer	γ^{d}	γ^{p}	γ^{h}	γ_{L}
1-Bromonaphthalene	ALH4513	Wako Pure Chemical Industries	44.4	0.2	0.0	44.6
Diiodomethane	ALL2310	Wako Pure Chemical Industries	46.8	4.0	0.0	50.8
Distilled water	—	—	29.1	1.3	42.4	72.8

γ^{d} : dispersion force, γ^{p} : polar force, γ^{h} : hydrogen-bonding force, γ_{L} : total free-energy of liquid.

WSL, 液体の表面自由エネルギーを γ_{L} , 固体の表面自由エネルギーを γ_{S} および接触角を θ としたとき, 以下に示す拡張Fowkesの理論式で定義される¹⁰⁾.

$$\text{WSL} = \gamma_{\text{L}} + \gamma_{\text{S}} - \gamma_{\text{SL}} = \gamma_{\text{L}} (1 + \cos\theta)$$

この拡張Fowkesの理論式を用いて, 各条件における表面自由エネルギー(γ_{S})を分散($\gamma_{\text{S}}^{\text{d}}$), 双極子($\gamma_{\text{S}}^{\text{p}}$)および水素結合($\gamma_{\text{S}}^{\text{h}}$)の各成分を, 次に示す理論式から算出した.

$$\gamma_{\text{SL}} = \gamma_{\text{S}} + \gamma_{\text{L}} - 2(\gamma_{\text{S}}^{\text{d}} \cdot \gamma_{\text{L}}^{\text{d}})^{1/2} - 2(\gamma_{\text{S}}^{\text{p}} \cdot \gamma_{\text{L}}^{\text{p}})^{1/2} - 2(\gamma_{\text{S}}^{\text{h}} \cdot \gamma_{\text{L}}^{\text{h}})^{1/2}$$

$$\gamma_{\text{L}} = \gamma_{\text{L}}^{\text{d}} + \gamma_{\text{L}}^{\text{p}} + \gamma_{\text{L}}^{\text{h}}$$

$$\gamma_{\text{S}} = \gamma_{\text{S}}^{\text{d}} + \gamma_{\text{S}}^{\text{p}} + \gamma_{\text{S}}^{\text{h}}$$

4. SEM 観察

唾液汚染後とともに各表面処理後の歯質表面を観察するために, 各試片を接着試験および表面自由エネルギー測定用試片と同様に処理した. 次いで, 試片をtert-ブタノール濃度上昇系列を用いて脱水するとともに, フリーズドライヤー (Model ID-3, エリオニクス) を用いて乾燥処理を行った. この面にイオンスパッタ装置 (Quick Coater Type SC-201, サンユー電子) を用いて金蒸着

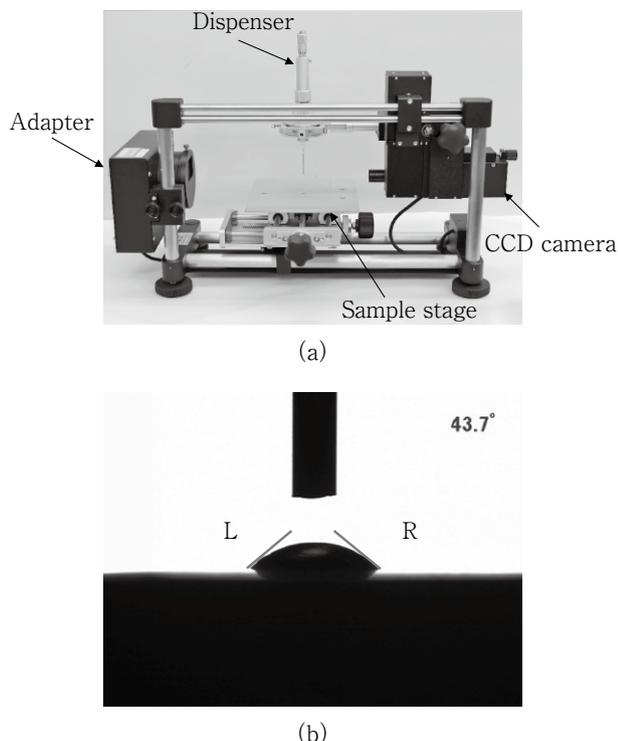


Fig. 1 Contact angle meter used in this study (Drop Master DM500; Kyowa Interface Science)
(a) Using this device, automatic measurements of the contact angles can be done (b).

し、フィールドエミッション型SEM (ERA-8800 FE, エリオニクス) を用いて加速電圧 10 kV の条件で観察した。

5. 統計処理

接着強さについては、等分散性を確認した後、二元配置分散分析、表面自由エネルギーについては一元配置分散分析を行い、その後 Tukey Honestly Significant Difference test を用いて有意水準 5% の条件で統計処理を行った。

成 績

1. 接着強さ

唾液汚染歯面の表面処理剤の違いがレジンセメントの接着性に及ぼす影響および試験後の破壊形式を Table 4, 5 に示した。二元配置分散分析の結果から、歯面処理法および TC 条件の組合せは、接着強さへの有意な影響因子であり ($p < 0.001$)、それぞれの因子の交互作用についても有意差が認められた ($p < 0.001$)。

エナメル質の 24 h における接着強さは、SC 群 (5.2 MPa) は Control 群 (23.3 MPa) と比較して有意に低い値を示した。唾液汚染面に表面処理を行うと、接着強さ

Table 4 Influence of surface treatment of saliva contaminated enamel on bond strength of resin cement

	Treatment	24 h	TC
Enamel	Control	23.3 (1.8) ^b [6/3/0/1]	16.8 (1.6) ^c [9/1/0/0]
	SC	5.2 (1.0) ^c [10/0/0/0]	3.7 (0.7) ^d [10/0/0/0]
	KC	22.1 (2.6) ^b [7/3/0/0]	23.4 (2.0) ^b [8/2/0/0]
	ME	19.5 (1.9) ^b [8/2/0/0]	20.2 (1.1) ^b [8/2/0/0]
	UE	26.9 (2.5) ^a [6/4/0/0]	27.3 (1.6) ^a [8/2/0/0]

n=15, unit: MPa, values in parenthesis indicate standard deviations. Fracture mode [adhesive failure/cohesive failure in resin cement/cohesive failure in enamel/mixed failure]. Same small case letter columns indicates no difference at 5% significance level.

TC: thermal cycles

Table 5 Influence of surface treatment of saliva contaminated dentin on bond strength of resin cement

	Treatment	24 h	TC
Dentin	Control	19.8 (2.1) ^a [7/2/0/1]	16.2 (1.2) ^b [9/1/0/0]
	SC	4.8 (0.7) ^d [10/0/0/0]	2.6 (0.9) ^e [10/0/0/0]
	KC	19.1 (1.8) ^a [9/1/0/0]	20.8 (1.2) ^a [9/1/0/0]
	ME	18.1 (1.1) ^a [9/1/0/0]	15.1 (1.1) ^b [10/0/0/0]
	UE	20.4 (1.4) ^a [9/1/0/0]	12.7 (1.9) ^c [10/0/0/0]

n=15, unit: MPa, values in parenthesis indicate standard deviations. Fracture mode [adhesive failure/cohesive failure in resin cement/cohesive failure in dentin/mixed failure]. Same small case letter columns indicates no difference at 5% significance level.

TC: thermal cycles

はいずれの条件においても SC 群と比較して有意に高い値を示し、Control 群と比較して KC 群 (22.1 MPa) および ME 群 (19.5 MPa) は有意差が認められなかったものの、UE 群 (26.9 MPa) は有意に高い値を示した。TC 負荷後のエナメル質接着強さは、24 h の接着強さと比較して Control 群 (16.8 MPa) および SC 群 (3.7 MPa) において有意に低下した。一方、KC 群 (23.4 MPa)、ME 群

Table 6 Influence of surface treatment of saliva contaminated tooth on surface free energy

	Treatment	γ_s^d	γ_s^p	γ_s^h	γ_s
Enamel	Control	43.9 (1.3)	3.4 (1.4)	14.6 (2.7)	61.9 (1.7)
	SC	42.9 (1.2)	0.0 (0.0)	6.8 (0.4)	49.7 (1.4)
	KC	43.2 (1.2)	2.4 (1.4)	13.4 (0.9)	59.0 (1.9)
	ME	43.4 (1.5)	1.3 (1.2)	25.1 (1.1)	69.8 (1.7)
	UE	42.2 (1.2)	8.6 (1.2)	27.4 (1.2)	78.2 (1.2)
Dentin	Control	42.3 (1.3)	2.8 (1.3)	25.4 (1.6)	70.5 (1.3)
	SC	38.4 (1.2)	0.0 (0.0)	8.2 (1.5)	46.6 (1.8)
	KC	35.8 (1.2)	1.6 (1.4)	18.3 (2.0)	55.7 (1.6)
	ME	40.6 (1.5)	0.9 (0.2)	10.2 (2.0)	51.7 (1.1)
	UE	36.8 (1.4)	1.4 (1.5)	2.8 (1.5)	41.0 (1.1)

N=10, unit: $\text{mN} \cdot \text{m}^{-1}$, values in parenthesis indicate standard deviations.

Values connected by vertical lines indicate no significant difference ($p > 0.05$).

γ_s^d : dispersion force, γ_s^p : polar force, γ_s^h : hydrogen-bonding force, γ_s : surface free energy.

(20.2 MPa) および UE 群 (27.3 MPa) においては、TC 後における接着強さに差は認められなかった。接着試験後の破壊形式は、いずれの保管条件においても SC 群で界面破壊が大勢を占めたのに対し、唾液汚染後の表面処理によってレジンセメント内の凝集破壊が増加する傾向を示した。

象牙質の 24 h における接着強さは、エナメル質接着強さと同様に、Control 群 (19.8 MPa) と比較して SC 群 (4.8 MPa) において有意に低い値を示し、唾液汚染後の各種表面処理により接着強さは向上した。TC 負荷後の象牙質接着強さは、24 h と比較して KC 群を除いて有意に低下した。また、TC 負荷条件内で比較すると、KC 群 (20.8 MPa) および ME 群 (15.1 MPa) では Control 群 (16.2 MPa) と同等あるいは有意に高い値を示したのに対して、UE 群 (12.7 MPa) は有意に低い値を示した。接着試験後の破壊形式では、いずれの条件においても界面破壊がその大勢を占めた。

2. 表面自由エネルギー

唾液汚染および各表面処理後の歯質表面における表面自由エネルギー (γ_s) およびその各成分を Table 6 に示した。唾液汚染されたエナメル質の γ_s は、Control 群 ($61.9 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) と比較して有意に低い値 ($49.7 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) を示したものの、SC 群に対する表面処理後の γ_s は、SC 群と比較して有意に高い値 ($59.0 \sim 78.2 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) を示した。表面自由エネルギーの各構成成分で比較すると、分散成分 (γ_s^d) はいずれの条件においても支配的であるととも有意差は認められなかった ($42.2 \sim 43.9 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$)。一方、双極子成分 (γ_s^p) は、SC 群では 0 であったものが、各表面処理によって有意に高い値

($1.3 \sim 8.6 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) を示し、UE 群 ($8.6 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) で KC 群 ($2.4 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) および ME 群 ($1.3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) と比較して有意に高い値を示した。また、水素結合成分 (γ_s^h) は、SC 群で有意に低い値 ($6.8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) を示し、各表面処理によって上昇した ($13.4 \sim 27.4 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$)。

唾液汚染された象牙質における γ_s では、Control 群 ($70.5 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) と比較していずれの群においても有意に低い値 ($41.0 \sim 55.7 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) を示した。また、SC 群 ($46.6 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) に対し KC 群 ($55.7 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) および ME 群 ($51.7 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) は有意に高い値を示し、逆に UE 群 ($41.0 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) は有意に低い値を示した。表面自由エネルギーの各構成成分で比較すると、 γ_s^d はいずれの条件においても支配的であり、 γ_s^p はエナメル質同様、SC 群では 0 であったものが、唾液汚染面に対する表面処理によって有意に高い値 ($0.9 \sim 1.6 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) を示した。また γ_s^h は、SC 群 ($8.2 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) と比較して KC 群 ($18.3 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) で有意に高い値を示したものの、UE 群 ($2.8 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$) では有意に低下した。

3. SEM 観察

唾液汚染および各表面処理後の歯面における代表的な SEM 像を Fig. 2 に示した。また、参考として唾液汚染されていない歯面に対する各表面処理後の代表的な SEM 像を Fig. 3 に示した。Control 群では、エナメル質および象牙質のいずれにおいても SiC ペーパーによる削状痕を認めるとともに、その表面は厚いスマイヤ層に覆われていた。SC 群においては、その表面に唾液成分と考えられる残留物が認められたものの、UE 群では汚染物質とともにスマイヤ層もすべて除去され、エナメル質ではエッチングパターンが、象牙質では象牙細管が明瞭に観察さ

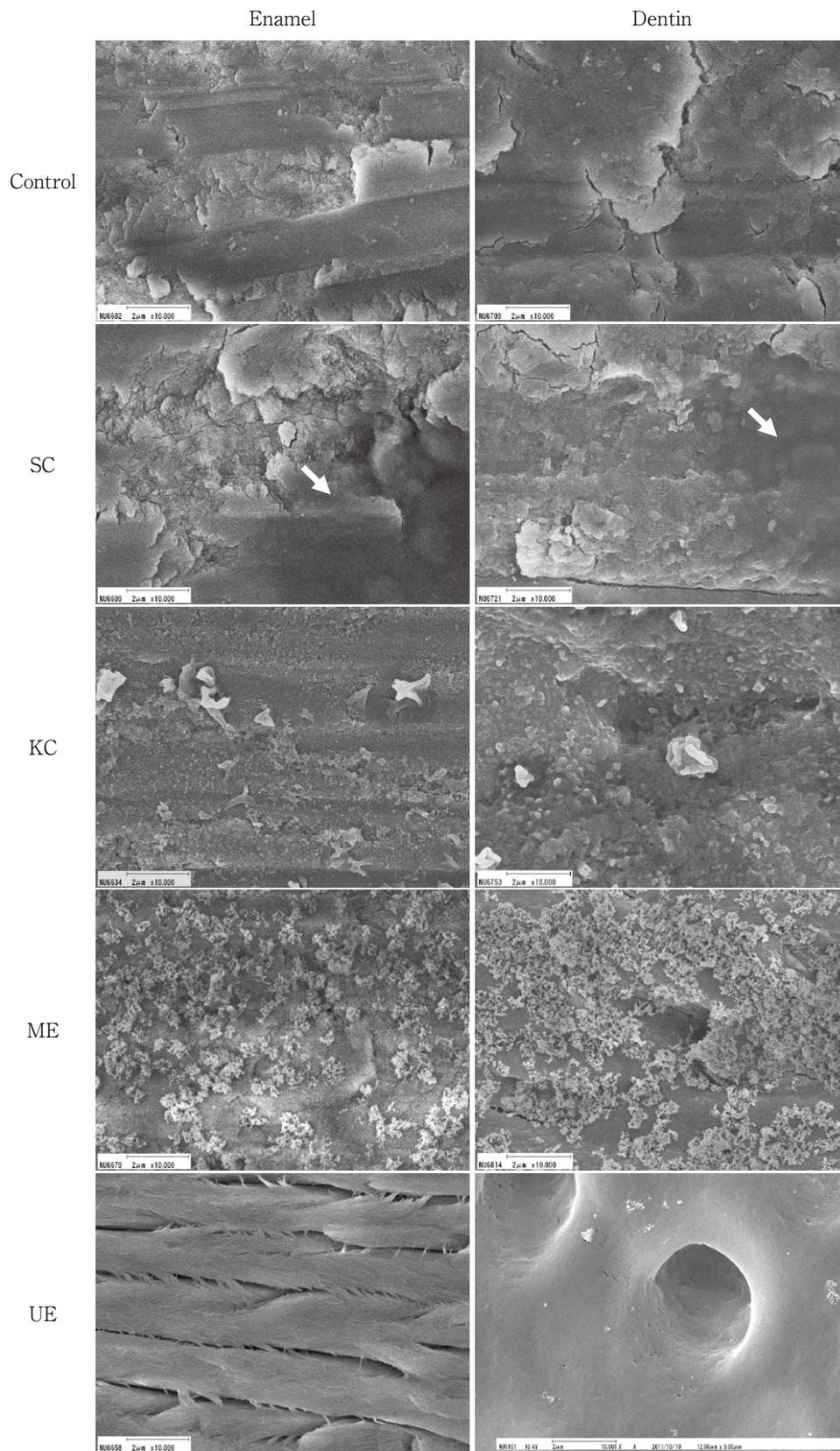


Fig. 2 SEM observation of saliva contaminated and surface treated tooth
Arrows indicate the saliva contamination.

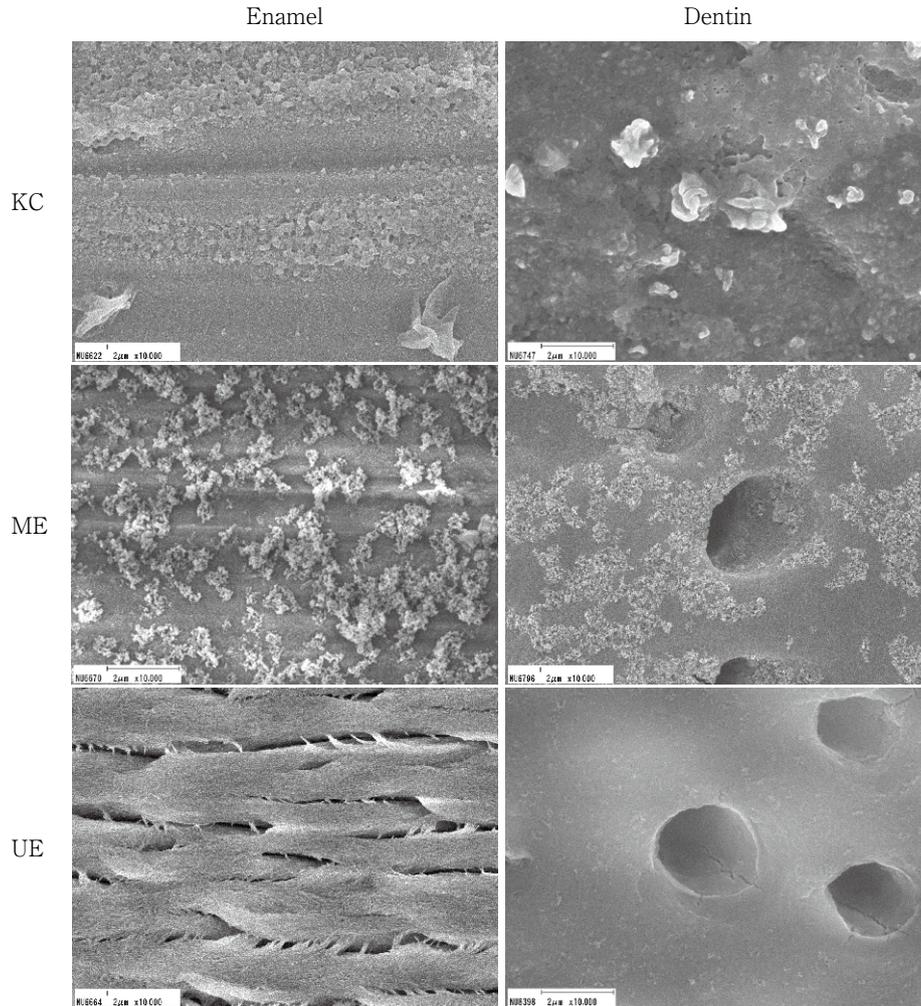


Fig. 3 SEM observation for surface treated tooth without saliva contamination

れた。KC群およびME群においては、SC群で観察された残留物は認められず、スマー層は除去されているものの、一部に微細な粒子の残留が認められた。

考 察

セラミックスやハイブリッドレジンをを用いた間接修復法は、デジタルデンティストリーの普及に伴って一般臨床に急速に広がっている^{11,12)}。一方、これら歯冠修復物の装着には、その良好な予後を獲得するためにレジンセメントを用いることが推奨されている¹³⁾。レジンセメントは、高い接着性を示すものの歯冠修復物の試適時に生じる唾液汚染が接着性を低下させることが指摘されている^{9,14)}。そこで、歯冠修復物内面に対する汚染物質の除去法として、機械的および化学的方法が検討されている。一方、被着体である歯質表面に対する汚染物質除去法については化学的清掃法としては、リン酸エッチング処理が用いられてきたものの、象牙質に対するリン酸処理に

については議題が残っている¹⁵⁾。そこで、口腔内に使用可能な唾液汚染の効果的除去法としてリン酸系モノマーを用い、その界面活性剤としての効果によって被着面のヌレ性を向上させることが提案され、臨床使用がされている⁷⁻⁹⁾。しかし、これらの処理剤は開発されて間もないところから、その詳細については不明な点が多い。そこで、これら歯面処理剤がレジンセメントの接着性に及ぼす影響について、リン酸エッチング材と比較検討した。

その結果、レジンセメントのエナメル質接着強さは、唾液汚染によって24 hおよびTC後のいずれも有意に低下した。歯質表面における唾液汚染は、唾液タンパク質成分が歯質表面に吸着するため、水洗のみによる除去は不可能とされている^{9,14)}。歯質に残留した唾液成分が、レジンセメントに付属しているトゥースプライマーと被着歯面との化学的相互作用を阻害することによって、接着強さが低下したものと考えられた。これに対して、唾液汚染面に各表面処理を行うことで汚染物質が除去され、接着強さが有意に向上したものと考えられた。特にエナ

メル質接着強さに関しては、UEで24hおよびTC条件でほかの群に比較して有意に高い値を示したが、これはエッチングパターンの形成による粗糙面形成ならびに被着面積の増加によるものと考えられた¹⁵⁾。

エナメル質表面における表面自由エネルギー(γ_s)は、表面処理を行うことによってSC群に比較して有意に向上した。固体表面における表面自由エネルギーは、その界面における清浄度とともに界面における活性の指標とされている^{16,17)}。このことから、エナメル質においては唾液汚染後の各表面処理によって唾液汚染物質が除去されたことで、表面自由エネルギーが上昇したのと考えられた^{18,19)}。一方、 γ_s^p および γ_s^h は各表面処理によって高い値を示した。歯質表面に唾液汚染が生じた際、歯質表面の極性側鎖に対し、唾液タンパクをはじめとする汚染物質の極性側鎖が吸着することで歯質表面に非極性側鎖が配向するため、 γ_s は有意に低下したのと考えられた。一方、各表面処理によって汚染物質が除去されて歯質表面が改質されたことで、 γ_s^p および γ_s^h が上昇したのと考えられ²⁰⁾、エナメル質に対するTC後の高い接着強さにつながった可能性が示された。

象牙質においても、エナメル質と同様に唾液汚染物質を除去することで24hの接着強さは有意に向上した。これは、SEM観察の結果からも各表面処理によって汚染物質が除去されていたことから明らかと考えられる。一方、表面自由エネルギーにおける γ_s^p および γ_s^h は、唾液汚染面と比較してKC処理およびME処理によって向上したものの、UE処理で有意に低下した。

KCに含有されているMDPは、親水基と疎水基をもつ両親媒性の機能性モノマーである²¹⁾。MDPは歯質表面に吸着した汚染物質を取り囲むように疎水基が結合し、親水基を外側に配向したミセルを形成する⁷⁾。その結果、汚染物質に対する界面活性作用による洗浄効果が発揮され、象牙質の構造を変化させることなく汚染物質の除去が可能と考えられている。また、MEにおいては、KC同様に機能性モノマーによる界面活性効果による清掃性を獲得している。しかし、使用されている機能性モノマーの性質は異なるもので、MEに含有されているM-TEG-Pは界面活性剤に用いられるポリエチレングリコールと類似した構造を連結基にもつリン酸系モノマーである²²⁻²⁴⁾。MEは、M-TEG-Pの作用によって歯質表面へのマイルドなエッチング効果とともに、汚染物質に対する界面活性効果を発揮することで清掃効果を発揮するとされている。このことから、KC群およびME群においては汚染物質の除去により、歯質表面の改質がされたものの、残留する機能性モノマーの違いによって γ_s^p および γ_s^h が異なる傾向を示したのと考えられた。

象牙質表面に対するリン酸エッチングは、過脱灰とな

るためコラーゲン線維の露出量が増加する。その結果、プライマー成分が十分に浸透せず、樹脂含浸層の形成が不十分な層が生じるために象牙質への接着性が低下する²⁵⁾。エナメル質に対してのリン酸エッチングは、レジメンセメントの接着強さ向上には大きな効果を発揮するものの、象牙質に対する接着耐久性向上効果は期待できない可能性が示唆された。これに対してリン酸系モノマーを用いて象牙質表面の唾液汚染を除去する方法は、残留する機能性モノマーの違いによって異なる傾向を示すものの、接着耐久性の維持という観点からも優れた前処理法であると考えられた。臨床においては、全部冠の場合、接着対象が象牙質となることから、リン酸系処理剤の使用は接着耐久性の維持という観点からも望ましいと考えられる。一方、インレーまたはアンレー窩洞のようにエナメル質が混在する場合、エナメル質にセレクトティブエッチングを行い、象牙質に対してはリン酸系処理剤を併用することが望ましいと考えられる。

以上のように、本実験の結果からリン酸系モノマーを用いた表面処理剤であるKCおよびMEは、唾液汚染されたエナメル質および象牙質に対するレジメンセメントの接着性を向上させることが明らかとなった。

結 論

リン酸系モノマー含有歯面処理剤がレジメンセメントの接着性に及ぼす影響について検討した結果、以下の結論を得た。

1. リン酸系モノマー含有歯面処理剤であるKCおよびMEは、機能性モノマーによる界面活性効果により清掃効果を発揮し、レジメンセメントの歯質接着性を向上させた。
2. 唾液汚染されたエナメル質の表面自由エネルギーは、唾液汚染によって低下するものの、UE処理で有意に向上した。
3. 唾液汚染された象牙質の表面自由エネルギーは、唾液汚染によって低下した。また、KC処理およびME処理で向上するものの、UE処理で有意に低下した。
4. SEM観察の結果から、唾液汚染後の各表面処理により汚染物質は除去され、清掃効果を得た。しかし、KC群およびME群においては残留モノマーと思われる粒子が観察された。

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) Spitznagel FA, Boldt J, Gierthmuehlen PC. CAD/CAM

- ceramic restorative materials for natural teeth. *J Dent Res* 2018; 97: 1082-1091.
- 2) Wang F, Yu T, Chen J. Biaxial flexural strength and translucent characteristics of dental lithium disilicate glass ceramics with different translucencies. *J Prosthodont Res* 2020; 64: 71-77.
 - 3) Romanini-Junior JC, Hirata R, Bonfante EA, Bordin D, Kumagai RY, Fardin VP, Coelho PG, Reis AF. Monolithic CAD/CAM laminate veneers: Reliability and failure modes. *Dent Mater* 2020; 36: 724-732.
 - 4) Blatz MB, Vonderheide M, Conejo J. The effect of resin bonding on long-term success of high-strength ceramics. *J Dent Res* 2018; 97: 132-139.
 - 5) Yoshida K. Influence of cleaning methods on resin bonding to saliva-contaminated zirconia. *J Esthet Restor Dent* 2018; 30: 259-264.
 - 6) Kawaguchi-Uemura A, Mine A, Matsumoto M, Tajiri Y, Higashi M, Kabetani T, Hagino R, Imai D, Minamino T, Miura J, Yatani H. Adhesion procedure for CAD/CAM resin crown bonding: Reduction of bond strengths due to artificial saliva contamination. *J Prosthodont Res* 2018; 62: 177-183.
 - 7) Takahashi A, Takagaki T, Wada T, Uo M, Nikaido T, Tagami J. The effect of different cleaning agents on saliva contamination for bonding performance of zirconia ceramics. *Dent Mater J* 2018; 37: 734-739.
 - 8) Sato T, Takagaki T, Baba Y, Vicheva M, Matsui N, Hiraiishi N, Ikeda M, Nikaido T, Tagami J. Effects of different tooth conditioners on the bonding of universal self-etching adhesive to dentin. *J Adhes Dent* 2019; 21: 77-85.
 - 9) Tajiri-Yamada Y, Mine A, Nakatani H, Kawaguchi-Uemura A, Matsumoto M, Hagino R, Yumitate M, Ban S, Yamanaka A, Miura J, Meerbeek BV, Yatani H. MDP is effective for removing residual polycarboxylate temporary cement as an adhesion inhibitor. *Dent Mater J* 2020; 39: 1087-1095.
 - 10) Hata T, Kitazaki Y, Saito T. Estimation of the surface energy of polymer solids. *J Adhes* 1987; 21: 177-194.
 - 11) Blatz MB, Conejo J. The current state of chairside digital dentistry and materials. *Dent Clin North Am* 2019; 63: 175-197.
 - 12) Suese K. Progress in digital dentistry: The practical use of intraoral scanners. *Dent Mater J* 2020; 39: 52-56.
 - 13) Murillo-Gómez F, Rueggeberg FA, De Goes MF. Short- and long-term bond strength between resin cement and glass-ceramic using a silane-containing universal adhesive. *Oper Dent* 2017; 42: 514-525.
 - 14) Kawaguchi A, Matsumoto M, Higashi M, Miura J, Minamino T, Kabetani T, Takeshige F, Mine A, Yatani H. Bonding effectiveness of self-adhesive and conventional-type adhesive resin cements to CAD/CAM resin blocks. Part 2: Effect of ultrasonic and acid cleaning. *Dent Mater J* 2016; 35: 29-36.
 - 15) Nagura Y, Tsujimoto A, Barkmeier WW, Watanabe H, Johnson WW, Takamizawa T, Latta MA, Miyazaki M. Relationship between enamel bond fatigue durability and surface free-energy characteristics with universal adhesives. *Eur J Oral Sci* 2018; 126: 135-145.
 - 16) Tsujimoto A, Iwasa M, Shimamura Y, Murayama R, Takamizawa T, Miyazaki M. Enamel bonding of single-step self-etch adhesives: Influence of surface energy characteristics. *J Dent* 2010; 38: 123-130.
 - 17) Marshall SJ, Bayne SC, Baier R, Tomsia AP, Marshall GW. A review of adhesion science. *Dent Mater* 2010; 26: e11-16.
 - 18) Ishii R, Tsujimoto A, Takamizawa T, Tsubota K, Suzuki T, Shimamura Y, Miyazaki M. Influence of surface treatment of contaminated zirconia on surface free energy and resin cement bonding. *Dent Mater J* 2015; 34: 91-97.
 - 19) Yoshida F, Tsujimoto A, Ishii R, Nojiri K, Takamizawa T, Miyazaki M, Latta MA. Influence of surface treatment of contaminated lithium disilicate and leucite glass ceramics on surface free energy and bond strength of universal adhesives. *Dent Mater J* 2015; 34: 855-862.
 - 20) Tsujimoto A, Barkmeier WW, Takamizawa T, Watanabe H, Johnson WW, Latta MA, Miyazaki M. Influence of duration of phosphoric acid pre-etching on bond durability of universal adhesives and surface free-energy characteristics of enamel. *Eur J Oral Sci* 2016; 124: 377-386.
 - 21) Moszner N, Salz U, Zimmermann J. Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater* 2005; 21: 895-910.
 - 22) Feitosa VP, Ogliaeri FA, Van Meerbeek B, Watson TF, Yoshihara K, Ogliaeri AO, Sinhoreti MA, Correr AB, Cama G, Sauro S. Can the hydrophilicity of functional monomers affect chemical interaction? *J Dent Res* 2014; 93: 201-206.
 - 23) Feitosa VP, Sauro S, Ogliaeri FA, Stansbury JW, Carpenter GH, Watson TF, Sinhoreti MA, Correr AB. The role of spacer carbon chain in acidic functional monomers on the physicochemical properties of self-etch dental adhesives. *J Dent* 2014; 42: 565-574.
 - 24) Feitosa VP, Sauro S, Ogliaeri FA, Ogliaeri AO, Yoshihara K, Zanchi CH, Correr-Sobrinho L, Sinhoreti MA, Correr AB, Watson TF, Van Meerbeek B. Impact of hydrophilicity and length of spacer chains on the bonding of functional monomers. *Dent Mater* 2014; 30: e317-323.
 - 25) De-Paula DM, Lomonaco D, Ponte AMP, Cordeiro KE, Moreira MM, Mazzetto SE, Feitosa VP. Influence of collagen cross-linkers addition in phosphoric acid on dentin biomodification and bonding of an etch-and-rinse adhesive. *Dent Mater* 2020; 36: e1-2.

Influence of a Tooth Conditioner Containing Phosphoric Acid Ester Monomer on the Bond Performance of a Resin-based Luting Cement

ISHII Ryo^{1,2}, KASAHARA Yuta¹, HIROKANE Eizo¹,
TAKAMIZAWA Toshiaki^{1,2}, TSUJIMOTO Akimasa^{1,2}, YOSHINAKA Yuta¹,
MIYAZAKI Masashi^{1,2} and KITAHARA Nobuya^{1,3}

¹Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry

²Division of Biomaterials Science, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

³Nobu Restorative Dental Office, Team Tokyo

Abstract

Purpose: The purpose of this study was to determine the influence of a tooth conditioner containing phosphoric acid ester monomer on the bond performance of a resin-based luting cement to saliva contaminated surfaces based on shear bond strength (SBS) tests and surface free energy (SFE) measurements.

Materials and Methods: Three conditioners for saliva contaminated tooth surfaces were used: Katana Cleaner (KC, Kuraray Noritake Dental), Ultra-Etch (UE, Ultradent Products), and Multi Etchant (ME, Yamakin). Panavia V5 (Kuraray Noritake Dental) was used as a resin-based luting agent. Bovine enamel and dentin surfaces were ground with SiC papers, ending at #320 grit. For saliva contaminated tooth surfaces, 10 μ l of human saliva was applied to the ground surface. Uncontaminated tooth surfaces were set as a control group. The saliva contaminated specimens were divided into four groups, treated with the different conditioners described above (KC, UE, and ME group) or without any treatment (SC group). A stainless-steel metal ring was placed over the bonding area, and the luting agent was condensed into the ring and light irradiated. The assembled specimens were stored in 37°C water for 24 h. Half of the specimens in each group were subjected to thermal cycling (TC) 10,000 times between 5 and 55°C, with a dwell time of 30 s. The other half of the specimens in each group formed a baseline group. SBS tests were conducted after each storage condition. For SFE determinations, specimens were prepared as for the SBS tests. The contact angles of three test liquids that have known SFE parameters were measured using a contact angle meter. In addition, SEM observations were performed of surfaces treated with the three different conditioners after saliva contamination.

Results: In the baseline groups, although the SC groups showed a significantly lower SBS value than the control groups in both enamel and dentin, the conditioner treated groups showed higher SBS values than the SC groups. In the TC groups, UE showed a significantly higher enamel SBS than the other groups, but KC showed a significantly higher dentin SBS than the other groups. Although the SC groups showed significantly lower SFEs than the control groups in both enamel and dentin, the SFEs after conditioner treatment were material dependent.

Conclusion: After salivary contamination of tooth surfaces, the conditioners tested might be useful in enhancing the bond performance of the resin-based luting cement due to modification of the contaminated tooth surfaces. The SFEs of treated surfaces differed with different conditioners depending on their conditioning mechanisms.

Key words: saliva contamination, resin-based luting agent, surface free energy, bond strength

カテキンによる SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 受容体との 結合抑制効果に対する基礎的検証

山田嘉重 木村裕一¹ 高橋昌宏²
車田文雄³ 菊井徹哉 橋本昌典
大木英俊

奥羽大学歯学部歯科保存学講座保存修復学分野

¹奥羽大学歯学部歯科保存学講座歯内療法学分野

²奥羽大学歯学部歯科補綴学講座口腔インプラント学分野

³奥羽大学歯学部口腔衛生学講座

抄録

目的：SARS-CoV-2 感染予防は、COVID-19 流行を阻止するために非常に重要である。そのため、手指の消毒と个人防护器具（PPE）の装着に加えて新たな予防対策を講じる必要がある。その予防策の候補の一つとして、エピガロカテキンガレート（EGCG）を代表とするカテキンの使用が挙げられる。分子ドッキング法により、選択的に SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と EGCG が結合することで、スパイクタンパク質と ACE2 受容体との結合を抑制する可能性が報告されている。本研究では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質に対して EGCG 単独、4 種混合カテキンおよび緑茶が実際にスパイクタンパク質と ACE2 との結合抑制に効果を有するのかを調べることを目的とした。

材料と方法：本研究では、異なる状態のカテキン（EGCG、4 種混合カテキン、粉末緑茶）を使用した。溶液の濃度は EGCG 溶液（EGCG）と 4 種混合カテキン溶液（4 KC）で 1, 10, 100 mg/ml、2 種類の緑茶溶液 I（PWA）と緑茶溶液 II（PWB）では 1, 10 mg/ml とした。SARS-CoV-2 スパイクタンパク質抑制スクリーニングキットを使用し、TMB 基質で発色後の撮影と ELISA による検討を行った。

結果および考察：各種抑制溶液において 100 mg/ml の濃度が最も SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 との結合抑制効果が強く、濃度の減少に比例して抑制効果が減少するのが観察された。それぞれの結合抑制率の割合は、EGCG では 12~89%、4 KC は 11~88%、PWA では 10~47%、PWB では 11~47% であった。本研究結果において、EGCG だけでなく 4 KC や PWA、PWB でもスパイクタンパク質と ACE2 との結合抑制効果を有することおよび、その結合はカテキンの濃度に依存することが判明した。

結論：本研究により EGCG 単独だけではなく、4 種カテキン混合状態および粉末緑茶溶液においても SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 との結合に対して濃度依存的に抑制効果を有することが確認された。カテキン配合溶液は、SARS-CoV-2 感染に対する新たな予防法の一つとなることが期待される。

キーワード：SARS-CoV-2、スパイクタンパク質、EGCG、4 種混合カテキン、粉末緑茶

責任著者連絡先：山田嘉重

〒963-8611 福島県郡山市富田町字三角堂 31-1 奥羽大学歯学部歯科保存学講座保存修復学分野

TEL：024-932-8931（内線 2538）、FAX：024-938-9192（代表）、E-mail：y-yamada@den.ohu-u.ac.jp

受付：2021年3月15日/受理：2021年5月12日

DOI：10.11471/shikahozon.64.237

緒 言

2019年12月に中国湖北省で発生した新型コロナウイルス（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス2：SARS-CoV-2）は、SARS-CoV（重症急性呼吸器症候群コロナウイルス）と遺伝子では79.5%¹⁾、タンパク質では76%²⁾の同一性があることが報告されている。SARS-CoV-2は現在も日本を含む世界中に深刻な影響を与えており、現在各国でSARS-CoV-2感染予防のためのワクチンやCOVID-19発症時の特效薬の開発が継続して進められている。ウイルス感染の予防としてのワクチンの種類には、これまでは生ワクチン・不活化ワクチンが主であったが、今回SARS-CoV-2感染に対するワクチンとしては従来型のワクチンだけでなく、mRNAワクチン、DNAワクチン、アデノウイルスベクターワクチン、組換えタンパクワクチンなどの新しい手法のワクチン開発がいくつか進められており、実際に海外では開発された数種類のワクチンの投与が開始されている。日本においてもmRNAワクチンの投与が開始されており、今後は国内産を含め感染予防効果の高いワクチンがいくつも開発されるものと考えられる。

一方、実際にCOVID-19が発症した際の効果的な治療薬はいまだ開発されておらず、現在はエボラ出血熱の治療薬レムデシビル（商品名：ベクルリー）、抗インフルエンザ薬のアファピラビル（商品名：アピガン）、ステロイド薬であるデキサメタゾン（商品名：デカドロン）など本来別の疾患に使用している治療薬を代用しているという状況にある。ウイルスは細菌などと異なり自己増殖ができないため、宿主細胞内に侵入し増殖を行う必要がある。そのため治療薬として(1)細胞内へのウイルスの侵入を阻害するもの、(2)細胞内に侵入したウイルスの遺伝子が増殖を行うのを阻害するものに大きく区分されている。現在のところ著しく効果の高い薬剤については開発途上の状態にあると考えられるが、しばらくするとCOVID-19感染症に対する効果的な薬剤が開発され、現在の状況は改善されることが期待される。しかし、SARS-CoV-2感染に対しては現在のところ集団免疫を獲得することは困難であり、天然痘ウイルスのように完全に根絶すること、または2003年に流したSARS-CoVのように感染を抑え込むことは困難であると推察される。また、SARS-CoV-2に対するワクチンは現在のところ、はしかのように一度免疫を獲得すると一生その効果が持続することは難しく、免疫による感染防護の効果は長期的に持続せず再感染を引き起こす可能性があることも報告されており³⁻⁵⁾、将来的には季節性インフルエンザのような対応をせざるをえない状況になる可

性が高いものと考えられる。

SARS-CoV-2を体内の細胞内に取り込む際にはACE2（アンジオテンシン変換酵素2）という受容体が関与していることが報告されている⁶⁾。ACE2は血管拡張による血圧上昇の調節⁷⁻⁹⁾、心臓の保護¹⁰⁾、腎臓の保護¹¹⁾などに関与する受容体であり、HIVウイルス、インフルエンザウイルスなどには結合せず、SARS-CoVなど特定のウイルスにのみ結合する¹²⁾。ACE2は上気道（鼻腔、咽頭、喉頭）、下気道（気管支、肺胞）、脳、心臓、腎臓、十二指腸、小腸、精巣などの数多くの組織の細胞表面に存在しており、気管支や肺胞の細胞表面はACE2が発現しやすい部位とされている^{13,14)}。ウイルスのヒト体内への侵入経路としては、鼻や口腔から上気道に沈着して鼻杯分泌細胞の感染を引き起こした後、肺の中央部および内側に広がっていくことが生理学的研究で判明している^{15,16)}。

重度の喘息などの呼吸器疾患のある人の肺にはACE2が多く存在し、その結果SARS-CoV-2感染およびCOVID-19発症のリスクが増加してしまうことも報告されている¹⁷⁾。したがってウイルスの口腔内への侵入を阻止することができれば、SARS-CoV-2感染およびCOVID-19発症抑制に大いに貢献するものと考えられる。ゆえに、マスクを着用することは、ACE2が存在する気道内にウイルスを侵入させないための重要な感染予防対策の一つとなる。これまでにマスクの着用による鼻と口腔を被覆することで、SARS-CoV-2ウイルス感染に対してかなりの予防効果が期待できることが報告されている¹⁸⁾。

SARS-CoV-2は、ウイルス膜に連なる王冠状を呈する大きな糖タンパク質を有する。この糖タンパク質はスパイクタンパク質と呼ばれ、標的細胞に存在する受容体へ結合するドメイン（RBD）を含むS1タンパク質と、標的細胞膜に貫通し膜融合を誘起するS2タンパク質から構成されている。このスパイクタンパク質が細胞膜上に存在する受容体であるACE2に結合することで、ウイルスが標的細胞内に侵入しウイルス感染を引き起こす主要因となっていることが解明されている¹⁹⁾。SARS-CoV-2の構造として、mRNAを覆うカプシドと呼ばれる殻の周囲をエンベロープと呼ばれるタンパク質の膜で被覆されている。エタノールや逆性石鹼はこのエンベロープ膜を溶解する効果を有しており、これらの薬剤の使用によりウイルスを失活させることに優れていることから、手指のアルコールや石鹼による消毒が推奨される理由となっている²⁰⁻²⁴⁾。

SARS-CoV-2感染に対するワクチンもいくつか臨床使用されはじめていますが、効果的に感染を阻止できるワクチンや特效薬が開発され広く使用されるまでには、かなり時間を要するものと考えられる。そのため、マスク

Table 1 Types of catechins

Natural Catechins	Heat-denatured catechins
Epicatechin (EC)	Catechin (C)
Epigallocatechin (EGC)	Gallocatechin (GC)
Epicatechin gallate (ECG)	Catechin gallate (CG)
Epigallocatechin gallate (EGCG)	Gallocatechin gallate (GCG)

Catechins are classified into four types of natural catechins and four types of heat-denatured catechins.

の着用や手指の消毒の励行以外の予防手段についても検討していく必要があると考えられる。その場合、日常的に継続して予防手段を励行するためには、経済的に高価なものや使用手段が困難なものは予防法としては適さず、現在われわれが日常使用している方法を応用することが最も簡便で継続が容易な方法になるものと考えられる。その予防法の一つとして、緑茶由来のカテキンの応用が期待されている。一般的に呼ばれているカテキンは総称であり、実際は天然カテキンとしてエピガロカテキン (EGC)、エピカテキン (EC)、エピガロカテキンガレート (EGCG)、エピカテキンガレート (ECG) の4種類に分類される。また、市販のペットボトルなど加熱殺菌したものはカテキンの構造が一部熱変性を引き起こし、ガロカテキン (GC)、カテキン (C)、ガロカテキンガレート (GCG)、カテキンガレート (CG) に変化する (Table 1)。EGCG は緑茶中のカテキンのなかで最も量が多く約 60% を占め、天然カテキンのなかで特に多様な作用を有することが知られている。EGCG の SARS-CoV-2 に対する効果としては、ウイルスのスパイクタンパク質の RBD を含むさまざまな領域と高い結合能力を有することが、分子ドッキング法により報告されている²⁵⁾。その結果、SARS-CoV-2 のスパイクタンパク質は ACE2 との結合が阻害され、ウイルス感染が抑制されることになる。また、EGCG はウイルスの複製と成熟に重要な役割を果たすと考えられているメインプロテアーゼ (Mpro) とも特異的に結合し、プロテアーゼ活性を抑制する可能性も分子ドッキング法にて確認されている²⁶⁾。これらの報告では EGCG が SARS-CoV-2 感染予防に対して有効な薬剤になりうるとしているが、多くのカテキンが混合された状態や緑茶飲料の場合において、EGCG 単独の場合と比較して効果に差異が生じるのか、生じる場合にはどの程度抑制効果に影響を与えるのかなどについての評価はこれまでなされていない。

そのため本研究では、EGCG 単独、4 種天然カテキン混合、粉末緑茶とそれぞれ異なった状態のカテキンにおいて、どの程度 SARS-CoV-2 と ACE2 との結合抑制効

果に差異が生じるかを検討した。

材料および方法

1. 各結合抑制溶液の準備

本研究では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 との結合抑制溶液として 4 種類の抑制溶液を作製し、検討した。

抑制溶液 1 (EGCG) : エピガロカテキンガレート (Toronto Research, Canada), 抑制溶液 2 (4 KC) : 4 種類のカテキン混合 (緑茶由来カテキン混合物, 富士フィルム和光純薬), 抑制溶液 3 (PWA) と抑制溶液 4 (PWB) は、市販の粉末緑茶を精製水で溶解した。PWA は粉末緑茶 (カテキンまるごと粉末緑茶, お茶の丸幸), PWB は粉末緑茶 (おーいお茶濃い茶, 伊藤園) を選択して本研究に使用した。EGCG と 4 KC は 37°C の精製水で溶解した。一方、粉末緑茶は常温では溶解が困難なため、PWA と PWB は 70°C に加温した精製水で粉末緑茶が溶解したのを確認して 37°C に冷却後再攪拌を行い、本研究に使用した。EGCG と 4 KC を含有する結合抑制溶液の濃度はそれぞれ①100 mg/ml, ②10 mg/ml, ③1 mg/ml の 3 種類とした。PWA, PWB 溶液における濃度は、①10 mg/ml, ②1 mg/ml の 2 種類とした。

Positive Control (Po-Cont) として、5% DMSO 溶液 (三協化学) を使用した。また、Negative Control (Ne-Cont) として、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の代わりに使用したキット付属の試薬である Immuno Buffer を添加した。

2. 実験手順

本研究では Spike S1-Biotin (SARS-CoV-2) Inhibitor Screening Assay Kit (BPS Bioscience, USA) を使用した。研究手順は本キットの説明書の手順に従い、また、Hoffmann らの方法を参考に施行した¹⁹⁾。まずはプレートの各ウェルに ACE2 (1 µg/ml) をコーティングし室温で 1 時間インキュベートした。その後 3 回洗浄を行い、付属の Blocking Buffer にて室温で 10 分間ブロッキングを行った。

各種結合抑制溶液と SARS-CoV-2 スパイクタンパク質 (1 ng/µl) をそれぞれのウェルに添加し、1 時間室温でインキュベートを行った。Po-Cont には各種結合抑制溶液使用グループと同様に SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を加えたが、結合抑制溶液の代わりに同量の 5% DMSO 溶液をウェルに添加した。Ne-Cont には SARS-CoV-2 スパイクタンパク質を入れずに、ほかのグループで使用したスパイクタンパク質と同量の Immuno Buffer と Po-Cont と同量の 5% DMSO 溶液を混合してウェルに添加した。

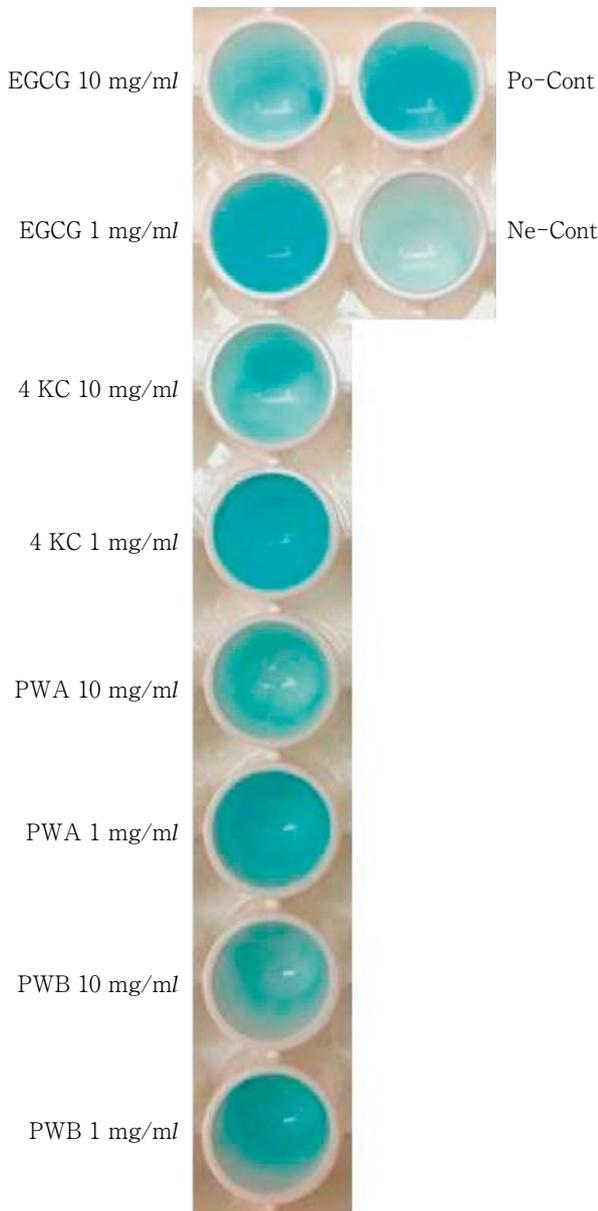


Fig. 1 Results of various inhibitor reactions

The coloration of 1 mg/ml of all inhibitory solutions was similar to that of the positive control. On the other hand, the coloration was reduced at 10 mg/ml concentration.

インキュベート終了後に3回洗浄した後、Blocking Bufferにてブロッキングを行った。次いで、本キットで使用したSARS-CoV-2スパイクタンパク質に融合しているマウスFcに対するHRP標識抗マウスFc抗体を添加した後、1時間室温でインキュベートを施行した。反応はTMB基質（TMB One Component HRP Microwell Substrate, Surmodics IVD, USA）にて可視化し、プレート上に発色が生じた後、発色状態をデジタルカメラ（PSG7X Mark III, キヤノン）にて撮影した。その後、

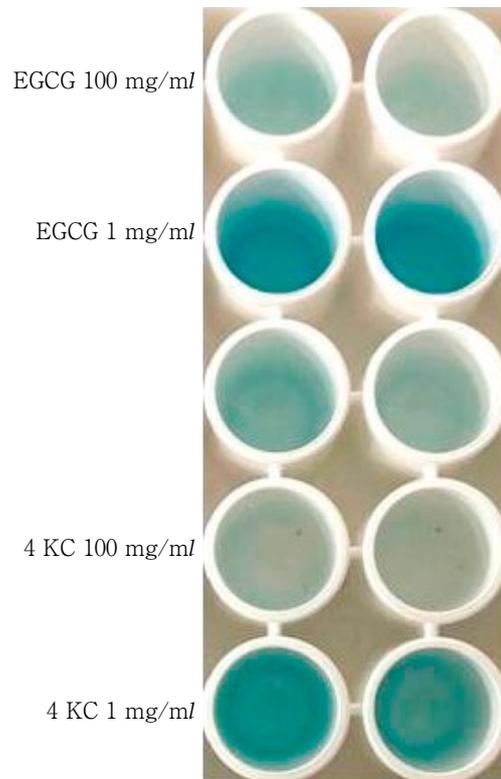


Fig. 2 Comparison of 100 mg/ml and 1 mg/ml concentrations for EGCG and 4 KC, respectively

Reaction to EGCG solution (100 mg/ml and 1 mg/ml) or four catechins mixed solution (100 mg/ml and 1 mg/ml). 100 mg/ml of each solution showed no specific color reaction, while 1 mg/ml of each solution showed a distinct color reaction.

TMB 停止溶液（Sera Care, USA）にて反応を停止させた。450 nmにおける吸光度を、ELISA法マイクロプレートリーダー（マルチスキャン JX, Thermo Fissure Scientific, USA）にて測定した。本研究では各抑制溶液、Po-Cont, Ne-Contそれぞれにおいて3試料ずつ行った。

3. 統計解析

本研究にて得られた結果は、Mann-Whitney *U*-testおよびKruskal Wallis H-testを用いて有意水準5%で解析した。

結 果

EGCG 溶液, 4 KC 溶液, 各種粉末緑茶溶液それぞれにおける結合抑制効果を Fig. 1 と Fig. 2 に示す。EGCG 単独, 4 種混合カテキン, 粉末緑茶のそれぞれを結合抑制溶液として使用したどの場合においても、濃度依存的に結合抑制効果が確認された。結合抑制溶液の濃度による

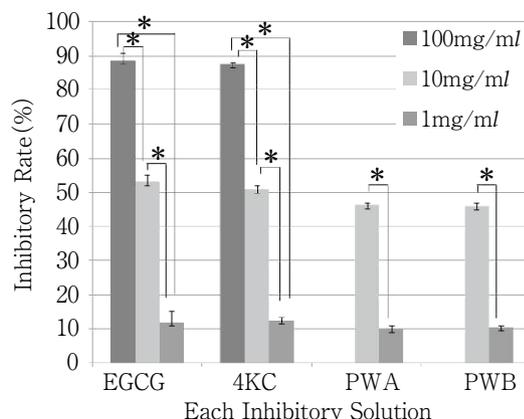


Fig. 3 Inhibition rate of SARS-CoV-2 spike protein-ACE2 receptor binding

In each of the inhibitory solutions, the inhibition rate decreased as the concentration of each inhibitory solution decreased, and significant differences were observed between the concentrations. (* : $p < 0.05$)

検討では、各種抑制溶液において 100 mg/ml の濃度が最も SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 との結合抑制効果が高く、10、1 mg/ml と濃度の減少に比例して結合抑制効果が減少したことが観察された。SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 との結合抑制率の割合は、5% DMSO 溶液を使用した Po-Cont の結合の割合を基準として、どの程度結合が低下するかを評価して算定した。その結果、各抑制溶液使用時における結合抑制率は EGCG では 100、10、1 mg/ml のそれぞれで 89、53、12% であり、4 種混合カテキンを使用した 4 KC は 88、51、11% であった。一方、粉末緑茶を使用した PWA では 10、1 mg/ml それぞれで 47% と 10%、PWB では 47% と 11% であった。EGCG 抑制溶液と 4 KC 抑制溶液それぞれにおいて、100 mg/ml と 1 mg/ml 間において統計学的に有意差を認めた。また、EGCG 抑制溶液と 4 KC 抑制溶液だけではなく、PWA 溶液と PWB 溶液を含むすべての抑制溶液においても 10 mg/ml と 1 mg/ml 間に統計学的な有意差が認められた。得られた結果を Fig. 3 に示す。

考 察

カテキンは茶葉に含まれている成分として知られているが、リンゴ、ブラックベリー、ソラマメ、サクランボ、ブドウ、ナシ、キイチゴ、チョコレートなどにも含まれているポリフェノールの一種である。これまでにカテキンには抗酸化作用²⁷⁾、殺菌作用²⁸⁾、抗ガン作用²⁹⁾、コレステロール減少作用³⁰⁾、血糖上昇抑制作用³¹⁾、齧蝕予

防・口臭予防作用³²⁾、体重減少³³⁾など多種多様の効果が報告されている。これらの効果を発揮するカテキン群のなかで最も強い作用を示すのは、EGCG である。EGCG は緑茶に特異的に認められるカテキンであり、緑茶由来のカテキン中の約 60% と最も多くの割合を占めている。EGCG は SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の S1 領域に特異的に結合することで ACE2 との結合を阻害することが、分子ドッキング法にて報告されている²⁵⁾。分子ドッキング法とは、ターゲットとするタンパク質とリガンドが鍵と鍵穴のように相補的に結合する際の表面の結合状態がどの程度良好に行われているかをコンピューターによるシミュレーションにて予測する方法であり、創薬の設計などに対しても応用されている技術である³⁴⁾。しかし、この方法はタンパク質の構造を検討し計算式で結合状態をシミュレーションする方法であり、実際のタンパク質と受容体との結合状態を検討しているわけではないことから、どの程度の濃度において効果を有するのかについて明確にする必要がある。そのため本研究では、SARS-CoV-2 スパイクタンパク質専用のキットを使用して検討した。また、これまで報告されている研究では EGCG の検討が主であり、4 種類の天然カテキンのすべてが含まれた状態や実際の緑茶飲料における検討はほとんどみられないことから、本研究では EGCG だけではなく、4 種類の天然カテキンの混合状態や緑茶飲料とした場合ではそれぞれの程度スパイクタンパク質との結合効果に促進・減弱などの差異が生じるかなどについても検討するため、さまざまなカテキン溶液を結合抑制溶液として使用した。

結合抑制溶液の一つとして本研究では粉末緑茶を溶解した溶液を使用した。その理由として、煎じて溶出させた場合では茶葉から溶出するカテキンは 30% 前後程度にとどまり、カテキンの多くは茶葉の中に残留することがわかっている。そのため一般的に行われている急須を使用した方法では期待する量のカテキンは溶液中には含まれていない可能性が高いことから、最も確実に多くの茶葉内のカテキンを摂取する方法として、茶葉全体を粉末状にした粉末緑茶の使用を選択した。また、製品の生成法の違いにより結果が異なる可能性を考慮して、2 種類の異なる製品の粉末緑茶を使用した。そして粉末緑茶溶解のための精製水の温度を、本研究では 70°C に設定した。その理由として、EGCG は 82°C 以上の温度で熱変性を生じる可能性が指摘されていることがある。特に 100°C を超えると EGCG 量は減少していくことが報告されており、通常急須から入れる飲料緑茶の場合は 60°C から 80°C の温水にて溶解することが奨励されている。そのため本研究では、粉末緑茶を使用した PWA と PWB は、粉末の溶解性が高く、かつ EGCG の減少に影響が少ない

と思われる70°Cに加熱した精製水を選択した。

本研究結果において、EGCG単独溶液だけでなく4種類カテキン混合溶液や緑茶溶液においてもスパイクタンパク質との結合効果を有することや、その結合はカテキンの濃度に依存することが判明した。今回検討した1 ng/ μ l量のSARS-CoV-2スパイクタンパク質に対しては、1 mg/ml濃度以下のカテキンではどの結合抑制溶液においてもSARS-CoV-2スパイクタンパク質とACE2との結合抑制がかなり低いことが確かめられた。一方、EGCG溶液または4種類カテキン混合溶液においては10 mg/ml濃度では50%以上、100 mg/ml濃度では80%以上の抑制効果が認められたことから、現段階では可能な限りカテキンの濃度を高くすることが、SARS-CoV-2スパイクタンパク質とACE2との結合抑制に大きく寄与するものと考えられる。粉末緑茶を使用した緑茶溶液の場合においてもほぼ同様に、10 mg/ml濃度では50%前後の抑制効果を示した。本研究では100 mg/ml濃度の緑茶飲料を確かめてはいないが、100 mg/mlなどに濃度を増加させることで、EGCG単独溶液や4種混合カテキン溶液と同様な抑制効果を有するものと推測される。統計学的な評価では、各抑制溶液においてそれぞれの濃度の間で有意差が確認された。しかし、今回は基礎的研究のため評価した各試料数は多くなく、今後は同様の試験を繰り返すことでより統計学的に詳細な評価を行う予定である。

また4種混合カテキン溶液や緑茶溶液においてもEGCG溶液とほぼ同様の結果を示したことから、EGCG以外のカテキンや茶葉の中のほかの成分はSARS-CoV-2スパイクタンパク質との結合に顕著に関与していない可能性が推察される。しかし、この結果は本来のSARS-CoV-2ウイルスにて検討したのではなく、ウイルスのスパイクタンパク質を使用した特定の研究キットを使用し検証していることから、今後はさまざまな条件の異なる研究キットにより追加検証を続け、最終的には本来のウイルスそのものを使用して検証する必要がある。また本研究で使用した4種混合カテキンに含まれる各種カテキン量は同一ではなく、通常茶葉に含まれている各種カテキンの配合割合に準じている。緑茶抽出溶液における各種カテキンの割合は分析法の違いにより割合が多少異なるが、総カテキン量に対してECが6~8%、EGCが19~24%、ECGが13~16%、EGCGが50~60%前後とされている。そのため今後は、同一濃度におけるそれぞれのカテキンがSARS-CoV-2スパイクタンパク質とACE2との結合に対してどのような働きをするのかも検討しなければならない。

さらに緑茶飲料としては、急須を使用する場合や粉末緑茶を溶解する場合以外に市販のペットボトル緑茶飲料

も数多く普及している。ペットボトル飲料の場合は加熱殺菌処理により、EGCはGCに、ECはC、EGCGはGCG、ECGはCGへとそれぞれ変性する。分子ドッキング法による検証では、GCGはEGCGに近似する抑制効果が報告されている²⁶⁾。そのため今後は、ペットボトル緑茶飲料においても実際に抑制効果を発揮するのか、また天然カテキンとどの程度抑制効果に差が生じるのかについての検討も必要である。

SARS-CoV-2はほかのウイルスと同様に、前記したように自分自身では複製・増殖することができず、①標的細胞の細胞膜上の受容体と結合、②細胞内に侵入、③脱殻(みずからのRNAの放出)、④細胞内でウイルスRNAの合成、⑤カプシド、スパイクタンパク、エンベロープタンパクなどの合成、⑥ウイルスの構築、⑦細胞外への放出・出芽という過程を経て拡散・増殖していく^{35,36)}。SARS-CoV-2スパイクタンパク質がACE2に結合した後の細胞侵入には2種類の経路が判明しており、一つはACE2に結合後、エンドサイトーシスによりエンドソームを形成して細胞内に侵入³⁷⁾し、その後細胞内でカテプシンB、Lにより分解される機序がある。もう一つの細胞内への侵入経路は、SARS-CoV-2スパイクタンパク質がACE2に結合した後にセリンプロテアーゼであるTMPRSS2によりS1とS2領域に分断され、その後ウイルス側のS2スパイクタンパク質断端が活性化して標的細胞の細胞膜に結合することで膜融合が生じ、その結果SARS-CoV-2のmRNA遺伝子が細胞内に放出されるという機序である^{38,39)}。そのためSARS-CoV-2のスパイクタンパク質を切断する酵素、特にTMPRSS2は細胞内のウイルス感染に重要な役割を果たしていることがいくつも報告されている^{6,19)}。

TMPRSS2に関しては、SARS-CoVにおいても問題であることが指摘され報告されている^{40,41)}。したがって、TMPRSS2の酵素活性を抑制することがSARS-CoV-2感染阻害に大いに寄与するものと考えられており、TMPRSS2発現抑制をターゲットとした薬剤の開発も行われている。Kesicらは、ヒト鼻上皮細胞へのインフルエンザウイルス感染に対する実験系を用いて検討したところEGCGがTMPRSS2分泌を減少させることを報告しており⁴²⁾、カテキンを作用させることにより、SARS-CoV-2が生体細胞への結合と細胞内への侵入を阻止する効果が期待される。

また、奈良県立医科大学の矢野寿一教授らは緑茶飲料にSARS-CoV-2を30分間反応させるとウイルス自身を99%以上不活化させることができると報告している(プレス発表のみ)⁴³⁾。彼らの研究報告内容は、本研究で検討しているカテキンによるSARS-CoV-2感染抑制とは目的の趣旨が異なるが、カテキンによるSARS-CoV-2の

効果としては大変興味深い。ウイルス不活性化に対する詳細な報告が出ていないので現時点では不明な点が多いが、これまで報告されているカテキンによる抗ウイルス効果に準じる可能性が考えられる。特に天然カテキンのなかで EGCG が最も強力なウイルス阻害効果を有することが報告されている^{44,45)}。EGCG は単純ヘルペスウイルス (HSV), B, C 型肝炎ウイルス, インフルエンザウイルス, ヒト免疫不全ウイルス (HIV) など多くのウイルスの感染を抑制する^{45,46)}。本研究で示唆している標的細胞受容体への結合阻害による抗ウイルス作用とは別に, EGCG はウイルス自身にダメージを与えることが知られている。B 型肝炎ウイルスに対する DNA 合成防止^{47,48)} や細胞内の複製中間体の RNA 合成阻害⁴⁹⁾, HIV の逆転写ステップの阻害⁵⁰⁾ などが報告されている。インフルエンザウイルスに対してはゲノム RNA 合成阻害やノイラミニダーゼ活性阻害を誘発し, その効果は EGCG には及ばないが ECG や EGC も有することが知られている⁵¹⁾。そのため EGCG を含むカテキンは, SARS-CoV-2 に対しても RNA 合成系の阻害などの活性抑制効果を有する可能性が推察されるが, 詳しい作用機序の解明については今後の研究が必要である。以上のことから, EGCG を代表とするカテキンには SARS-CoV-2 に対して標的細胞への結合と細胞侵入によるウイルス感染の抑制効果のみではなく, ウイルス自身への殺菌作用などの多面的な抗ウイルス効果を有する天然由来のポリフェノールとしての効果が大変期待される。

また, 緑茶にカテキンが含まれているように紅茶にもテアフラビンというポリフェノールが存在する。紅茶は緑茶と同じ茶樹から精製されるが酸化酵素を含んで精製されるため, 含有ポリフェノールも緑茶とは異なる。テアフラビンは2つの緑茶カテキンが結合された構造を呈しているため, カテキンよりさまざまな作用が強いことが推測されている。これまでに, カテキン同様分子ドッキング法を用いた研究によりテアフラビンと SARS-CoV-2 スパイクタンパク質との結合力はカテキンより高い可能性が示唆されている⁵²⁻⁵⁴⁾。そのため, カテキンとテアフラビンにおいてどの程度結合抑制効果が異なるかなどについての比較検討も予定している。

本研究結果より, 緑茶由来のカテキンが SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 との結合を抑制する可能性が示唆された。Marta らは, EGCG による効果を検証した結果, COVID-19 の症状が悪化し炎症マーカーが上昇した時点で, EGCG を 600~900 mg/日の用量で経口投与することで症状のさらなる悪化を防ぐ可能性があることを報告しているが⁵⁵⁾, 感染予防に効果的な投与量に関しての報告はない。本研究で使用した SARS-CoV-2 スパイクタンパク質の濃度は SARS-CoV-2 感染者の口腔内の

ウイルス量とは比例していないことから, 効果的な緑茶の飲用量や飲用による感染予防効果の程度などはいまだ明確ではないため, 今後は効果的な緑茶飲用量について継続して検討する必要がある。

本研究を含むこれまでの研究報告により, EGCG を含むカテキンは SARS-CoV-2 感染予防に対して有望な選択肢になりうるだけでなく, 今後新たに出現する可能性があるウイルスに対しても対抗できる自然由来のウイルス対抗因子としての優秀な候補であることには間違いのない。今後起こりうる可能性のある新たなウイルス感染の脅威も含め, 効果的なカテキン含有飲料やカテキンドロップなどの摂取形態の構築も必要になるものと考えられる。

今回の結果およびこれまでの報告から, 緑茶飲料は絶対的な SARS-CoV-2 感染防止とはならないとしても, 非常に簡便で安価な SARS-CoV-2 感染防止対策の一つになりうる可能性が強く示唆される。本研究ではある一定条件におけるカテキンの効果の傾向を示したにすぎず, 今後はさらに各種カテキン成分や緑茶についての詳細な検討を計画している。

結 論

EGCG 単独だけではなく, 4 種類カテキンが混合した状態および粉末緑茶から得られた溶液の状態においても, SARS-CoV-2 スパイクタンパク質と ACE2 との結合に対して同程度の抑制効果を有することが確認された。この抑制効果は濃度依存性があり, EGCG 単独および 4 種混合カテキンでは 10 mg/ml の濃度では結合抑制は約 50% 程度であるが, 100 mg/ml の濃度になると 90% 近く抑制できるものと考えられる。粉末緑茶においても, EGCG 単独, 4 種混合カテキンと同程度の抑制効果が確認された。本研究はあくまでも基礎的解析であり, 今後も条件設定や結合抑制溶液の検証をさらに継続していく必要があるが, カテキン配合溶液の使用が SARS-CoV-2 をはじめさまざまなウイルスの感染に対する新たな予防法の一つとなることが期待される。

本論文に関連し, 開示すべき利益相反関係にある企業等はない。

文 献

- 1) Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, Si HR, Zhu Y, Li B, Huang CL, Chen HD, Chen J, Luo Y, Guo H, Jiang RD, Liu MQ, Chen Y, Shen XR, Wang X, Zheng XS, Zhao K, Chen QJ, Deng F, Liu LL, Yan B,

- Zhan FX, Wang YY, Xiao GF, Shi ZL. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579: 270-273.
- 2) Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, Hu Y, Tao ZW, Tian JH, Pei YY, Yuan ML, Zhang YL, Dai FH, Liu Y, Wang QM, Zheng JJ, Xu L, Holmes EC, Zhang YZ. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020; 579: 265-269.
 - 3) Philippe S, Sabrina VI, Jo M, Joachim M, Koen B, Eveline D, Sarah V, Hilde J, Kevin KA. Symptomatic SARS-CoV-2 reinfection of a health care worker in a Belgian nosocomial outbreak despite primary neutralizing antibody response. *Clin Infect Dis* 2020; ciaa1850. doi: 10.1093/cid/ciaa1850.
 - 4) Tillett RL, Sevinsky JR, Hartley PD, Kerwin H, Crawford N, Gorzalski A, Laverdure C, Verma SC, Rossetto CC, Jackson D, Farrell MJ, Van Hooser S, Pandori M. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. *Lancet Infect Dis* 2021; 21: 52-58.
 - 5) Yuezhou C, Adam Z, Stephanie F, Jyotsna M, Caroline A, Meghan T, Felipe JNL, Krista MP, Hannah M, Pei T, Avneesh G, Shaghayegh H, Jillian B, Deborah G, Jared F, Blake MH, Timothy MC, Yongfei C, John SB, Junrui L, James AL, Evan CL, Christy LL, Michael SS, Bing C, Aaron GS, Alejandro BB, Douglas AL, Galit A, Duane RW. Quick COVID-19 healers sustain anti-SARS-CoV-2 antibody production. *Cell* 2020; 183: 1496-1507.
 - 6) Ou X, Liu Y, Lei X, Li P, Mi D, Ren L, Guo L, Guo R, Chen T, Hu J, Xiang Z, Mu Z, Chen X, Chen J, Hu K, Jin Q, Wang J, Qian Z. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. *Nat Commun* 2020; 11: 1620. doi: 10.1038/s41467-020-15562-9.
 - 7) 田野中浩一, 丸ノ内徹郎. アンジオテンシン変換酵素2. *日薬理誌* 2016; 147: 120-121.
 - 8) Xia H, Sriramula S, Chhabra KH, Lazartigues E. Brain angiotensin-converting enzyme type 2 shedding contributes to the development of neurogenic hypertension. *Circ Res* 2013; 113: 1087-1096.
 - 9) Douglas MB, Emily AH, Alexander JI, Lauren LD, Robert WR, David JP, Daniel LP, Colin S. Activation of the neuroprotective angiotensin-converting enzyme 2 in Rat Ischemic Stroke. *Hypertension* 2015; 66: 141-148.
 - 10) Li S, Wang Z, Yang X, Hu B, Huang Y, Fan S. Association between circulating angiotensin-converting enzyme 2 and cardiac remodeling in hypertensive patients. *Pep-tides* 2017; 90: 63-68.
 - 11) Anguiano L, Riera M, Pascuala J, Soler MJ. Circulating ACE2 in cardiovascular and kidney disease. *Curr Med Chem* 2017; 24: 3231-3241.
 - 12) Kuba K, Imai Y, Ohto NT, Penninger JM. Trilogy of ACE2: A peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol Ther* 2010; 128: 119-128.
 - 13) Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N, Donovan M, Woolf B, Robison K, Jeyaseelan R, Breitbart RE, Acton S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; 87: E1-E9.
 - 14) Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 2004; 203: 631-637.
 - 15) Mason RJ. Pathogenesis of COVID-19 from a cell biology perspective. *Eur Respir J* 2020; 55: 2000607. doi: 10.1183/13993003.00607-2020.
 - 16) Schaefer IM, Padera RF, Solomon IH, Kanjilal S, Hammer MM, Hornick JL, Sholl LM. *In situ* detection of SARS-CoV-2 in lungs and airways of patients with COVID-19. *Mod Pathol* 2020; 33: 2104-2114.
 - 17) Pinto BGG, Oliveira AER, Singh Y, Jimenez L, Gonçalves ANA, Ogava RLT, Creighton R, Schatzmann Peron JP, Nakaya HI. ACE2 expression is increased in the lungs of patients with comorbidities associated with severe COVID-19. *J Infect Dis* 2020; 222: 556-563.
 - 18) Jinxiang X, Xiuhua AS, Ramaswamy N. Effects of mask-wearing on the inhalability and deposition of airborne SARS-CoV-2 aerosols in human upper airway. *Phys Fluids (1994)* 2020; 32: 123312. doi: 10.1063/5.0034580.
 - 19) Hoffmann M, Kleine WH, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 2020; 181: 271-280.
 - 20) Andrew PG, Dexter C, Aziz G. Hand sanitizers: a review of ingredients, mechanisms of action, modes of delivery, and efficacy against coronaviruses. *Am J Infect Control* 2020; 48: 1062-1067.
 - 21) Gupta MK, Lipner SR. Hand hygiene in preventing COVID-19 transmission. *Cutis* 2020; 105: 233-234.
 - 22) Reza J, Vahid M, Hossein J, Arezoo A. Synergistic effects of anionic surfactants on coronavirus (SARS-CoV-2) virucidal efficiency of sanitizing fluids to fight COVID-19. *Food Chem Toxicol* 2020; 145: 111702. doi: 10.1016/j.fct.2020.111702.
 - 23) Przekwas A, Chen Z. Washing hands and the face may reduce COVID-19 infection. *Med Hypotheses* 2020; 144: 110261. doi: 10.1016/j.mehy.2020.110261.
 - 24) Coiffard L, Couteau C. Soap and syndets: differences and analogies, sources of great confusion. *Eur Rev Med*

- Pharmacol Sci 2020; 24: 11432-11439.
- 25) Smarajit M, Amrita B. Epigallocatechin gallate and theaflavin gallate interaction in SARS-CoV-2 spike-protein central channel with reference to the hydroxychloroquine interaction: Bioinformatics and molecular docking study. *Drug Dev Res* 2021; 82: 86-96.
 - 26) Rajesh G, Ayon C, Ashis B, Snehasis C. Evaluation of green tea polyphenols as novel corona virus (SARS CoV-2) main protease (Mpro) inhibitors-an in silico docking and molecular dynamics simulation study. *J Biomol Struct Dyn* 2020; 22: 1-13.
 - 27) Bernatoniene J, Kopustinskiene DM. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. *Molecules* 2018; 23: 965 doi: 10.3390/molecules23040965.
 - 28) Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E. Anti-infective properties of epigallocatechins-3-gallate (EGCG), a component of green tea. *Br J Pharmacol* 2013; 168: 1059-1073.
 - 29) Shirakami Y, Shimizu M. Possible mechanisms of green tea and its constituents against cancer. *Molecules* 2018; 23: 2284. doi: 10.3390/molecules23092284.
 - 30) Chen IJ, Liu CY, Chiu JP, Hsu CH. Therapeutic effect of high-dose green tea extract on weight reduction: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin Nutr* 2016; 35: 592-599.
 - 31) Bai L, Li X, He L, Zheng Y, Lu H, Li J, Zhong L, Tong R, Jiang Z, Shi J, Li J. Antidiabetic potential of flavonoids from traditional Chinese medicine: a review. *Am J Chin Med* 2019; 47: 933-957.
 - 32) Narotzki B, Reznick AZ, Aizenbud D, Levy Y. Green tea: a promising natural product in oral health. *Arch Oral Biol* 2012; 57: 429-435.
 - 33) Yang CS, Zhang J, Zhang L, Huang J, Wang Y. Mechanisms of body weight reduction and metabolic syndrome alleviation by tea. *Mol Nutr Food Res* 2016; 60: 160-174.
 - 34) Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol* 1996; 6: 402-406.
 - 35) 田口文広. コロナウイルスの細胞侵入機構：病原性発現との関連. *ウイルス* 2006 ; 56 : 165-172.
 - 36) 田口文広, 松山州徳. コロナウイルス細胞侵入機構. *ウイルス* 2009 ; 59 : 215-222.
 - 37) Simin S, Behzad K, Amir HL, Nasrin S, Misagh FK, Maryam B, Sasan SN, Bahareh G, Amene S, Nima R. Targeted therapy strategies against SARS-CoV-2 cell entry mechanisms: a systematic review of *in vitro* and *in vivo* studies. *J Cell Physiol* 2021; 236: 2364-2392.
 - 38) Dong M, Zhang J, Ma X, Tan J, Chen L, Liu S, Xin Y, Zhauang L. ACE2, TMPRESS2 distribution and extrapulmonary organ injury patients with COVID-19. *Biomed Pharmacother* 2020; 131: 110678. Doi: 10.1016/j.biopha. 2020. 110678.
 - 39) Sheikhzadeh HF, Hosseinzadeh SS, Asl Monadi Sardroud MA. Review of COVID-19 and male genital tract. *Andrologia* 2021; 53: e13914.10.1111/and.13914.
 - 40) 松山州徳. プロテアーゼ依存的なコロナウイルス細胞侵入. *ウイルス* 2011 ; 61 : 109-116.
 - 41) Matsuyama S, Nagata N, Shirato K, Kawase M, Takeda M, Taguchi F. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol* 2010; 84: 12658-12664.
 - 42) Kesic MJ, Meyer M, Bauer R, Jaspers I. Exposure to ozone modulates human airway protease/antiprotease balance contributing to increased influenza A infection. *PLoS One* 2012; 7: 35108. doi: 10.1371/journal.pone.0035108.
 - 43) 奈良県立医科大学. お茶による新型コロナウイルスの不活化効果について—お茶の種類（製品）による相異—. ochahp.pdf (naramed-u.ac.jp) (2021年3月14日アクセス)
 - 44) Kaihatsu K, Yamabe M, Ebara Y. Antiviral mechanism of action of epigallocatechin-3-o-gallate and its fatty acid esters. *Molecules* 2018; 23: 2475. doi: 10.3390/molecules 23102475.
 - 45) Xu J, Xu Z, Zheng W. A review of the antiviral role of green tea catechins. *Molecules* 2017; 22: 1337. doi: 10.3390/molecules22081337.
 - 46) Colpitts CC, Schang LM. A small molecule inhibits virion attachment to heparan sulfate- or sialic acid-containing glycans. *J Virol* 2014; 88: 7806-7817.
 - 47) Karamese M, Aydogdu S, Karamese SA, Altoparlak U, Gundogdu C. Preventive effects of a major component of green tea, epigallocatechin-3-gallate, on hepatitis-B virus DNA replication. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 16: 4199-4202.
 - 48) Pang JY, Zhao KJ, Wang JB, Ma ZJ, Xiao XH. Green tea polyphenol, epigallocatechin-3-gallate, possesses the antiviral activity necessary to fight against the hepatitis B virus replication *in vitro*. *J Zhejiang Univ Sci B* 2014; 15: 533-539.
 - 49) He W, Li LX, Liao QJ, Liu CL, Chen XL. Epigallocatechin gallate inhibits HBV DNA synthesis in a viral replication-inducible cell line. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 1507-1514.
 - 50) Li S, Hattori T, Kodama EN. Epigallocatechin gallate inhibits the HIV reverse transcription step. *Antivir Chem Chemother* 2011; 21: 239-243.
 - 51) Song JM, Lee KH, Seong BL. Antiviral effect of catechins in green tea on influenza virus. *Antivir Res* 2005; 68: 66-74.
 - 52) Susmit M, Shivraj N, Vandana P. A molecular docking study of EGCG and theaflavin digallate with the drugable targets of SARS-CoV-2. *Comput Biol Med* 2021;

- 129: 104137. doi: 10.1016/j.combiomed.2020.104137.
- 53) Susmit M, Tishya S, Shivraj N, Vandana P. Antiviral activity of green tea and black tea polyphenols in prophylaxis and treatment of COVID-19: a review. *Phyto-medicine* 2020; 153286. doi: 10.1016/j.phymed.2020.153286.
- 54) Singh S, Sk MF, Sonawane A, Kar P, Sadhukhan S. Plant-derived natural polyphenols as potential antiviral drugs against SARS-CoV-2 via RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) inhibition: an in-silico analysis. *J Biomol Struct Dyn* 2020; 1-16.
- 55) Marta M, Rachele C, Mariarita B, Rosalia, Rosanna DP, Salvatore C. Protective effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in diseases with uncontrolled immune activation: could such a scenario be helpful to counteract COVID-19? *Int J Mol Sci* 2020; 21: 5171. doi: 10.3390/ijms21145171.

A Basic Analysis on the Inhibitory Effects of Catechins on the Binding of SARS-CoV-2 Spike Protein to ACE2

YAMADA Yoshishige, KIMURA Yuichi¹, TAKAHASHI Masahiro²,
KURUMADA Fumio³, KIKUI Tetsuya, HASHIMOTO Masanori
and OHKI Hidetoshi

Division of Operative Dentistry, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry

¹Division of Endodontics, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry

²Division of Oral Implantology, Department of Prosthetic Dentistry, Ohu University School of Dentistry

³Department of Preventive Dentistry, Ohu University School of Dentistry

Abstract

Purpose: Prevention of SARS-CoV-2 infection is crucial for overcoming the COVID-19 epidemic. Therefore, it is necessary to take new precautionary measures in addition to disinfecting hands and wearing personal protective equipment (PPE). One of the candidates for prevention is the use of catechins, particularly epigallocatechin-3-O-gallate (EGCG). It has been reported that EGCG selectively binds to the spike protein of SARS-CoV-2 by the molecular docking method, which may inhibit the binding of the spike protein to angiotensin converting enzyme-2 (ACE2). The purpose of this study was to investigate whether each of EGCG alone, a mixture of four kinds of catechins, or green tea effectively inhibited the binding of the SARS-CoV-2 spike protein to ACE2.

Materials and Methods: Catechins in different states (EGCG, four types of mixed catechins, powdered green tea) were used in this study. The effects of EGCG solution (EGCG) and four kinds of mixed catechins solution (4 KC) were examined at three different concentrations (1, 10 and 100 mg/ml), and two types of green tea solution, I (PWA) and II (PWB), at two different concentrations (1 and 10 mg/ml) were adopted. A screening kit for SARS-CoV-2 spike protein inhibition was used and the reaction was developed with a tetramethylbenzidine (TMB) substrate. Thereafter, the coloring reaction was photographed and inhibitory level was measured by ELISA.

Results and Discussion: The inhibitory effect of ACE2 binding to SARS-CoV-2 spike protein was the strongest at high concentration in each solution, and the inhibitory effect decreased in proportion to the decrease of concentration. The percentages of inhibitory effect ranged from 12 to 89% for EGCG, from 11 to 88% for 4 KC, from 10 to 47% for PWA, and from 11 to 47% for PWB. In the present study, it was found that four kinds of catechins mixed solution and green tea solution inhibited binding of the spike protein to ACE2 the same as the EGCG solution, and that the inhibitory effect of each solution depended on the concentration.

Conclusion: This study showed that not only EGCG, but also the mixture of four kinds of catechins and the powdered green tea effectively inhibited the binding of SARS-CoV-2 spike protein depending on the concentration. Catechins are expected to serve as a new way to prevent SARS-CoV-2 infection.

Key words: SARS-CoV-2, spike protein, EGCG, mixture of four kinds of catechins, powdered green tea

❖ 会 務 報 告

特定非営利活動法人日本歯科保存学会 2020 年度臨時評議員会・臨時総会議事録

1. 開催日時 2020年11月24日(火) 16:00~16:30

1. 開催場所 一般財団法人口腔保健協会 3階会議室(東京都豊島区駒込1-43-9 駒込TSビル)

1. 正会員(社員)数 4,370名

1. 出席正会員数 1,451名

内訳 本人出席 6名, 表決委任者 1,618名

1. 議事の経過の要領及び議決の結果

上記のとおりのおり出席があったので、定款の規定により議長の選出を行ったところ、田上順次が選ばれて議長となった。

議長が、議事録署名人を選任したい旨及び次の者を指名したい旨を述べたところ、満場一致をもって承認可決されたので、議長は次の者を議事録署名人に指名した。

議事録署名人 五十嵐 勝・前田英史

第1号議案 1号理事承認の件

議長は、上記議案を上程し、概要を説明して議決を求めたところ、原案通り承認可決した。(書面表決にて1名反対)

第2号議案 2号理事承認の件

議長は、上記議案を上程し、概要を説明して議決を求めたところ、原案通り承認可決した。(書面表決にて2名反対)

第3号議案 次期執行部役員の件

議長は、上記議案を上程し、概要を説明して議決を求めたところ、原案通り承認可決した。(書面表決にて1名反対)

第4号議案 入会金及び会費に関する規程の制定の件

議長は、上記議案を上程し、概要を説明して議決を求めたところ、原案通り承認可決した。(書面表決にて4名反対)

議長は、以上をもって本日の議案の審議をすべて終了した旨を述べ、16時30分閉会を宣した。

上記議事の経過の要領及び議決の結果を明確にするためこの議事録を作成し議長及び議事録署名人がこれに記名押印する。

特定非営利活動法人 日本歯科保存学会名誉会員・役員 (2021年度)

名誉会員

細田裕康	向山嘉幸	松尾繁	土谷裕彦	岡本莫	川越昌宜
下河辺宏功	末田武	村井正大	堀内博	齋藤毅	井上清
中村治郎	加藤熙	岡田宏	浅井康宏	上野和之	河野篤
村山洋二	岩久正明	小野瀬英雄	高津寿夫	新谷英章	鴨井久一
石川烈	戸田忠夫	太田紀雄	川崎孝一	天野義和	岡本浩
滝内春雄	平井義人	松本光吉	山本宏治	清水明彦	久保田稔
新井高	加藤喜郎	山田了	角田正健	横田誠	上田雅俊
小松正志	久光久	黒崎紀正	伊藤公一	寺中敏夫	寺下正道
前田勝正	須田英明	出口眞二	笠原悦男	中村洋	野口俊英
林宏行	赤峰昭文	鳥居光男	恵比須繁之	川浪雅光	笹野高嗣
片山直	勝海一郎	吉田隆一	竹重文雄	林善彦	和泉雄一
永田俊彦	原宜興	桃井保子	吉江弘正	千田彰	福田正義
堀田正人	小木曾文内	栗原英見	松尾敬志	荒木孝二	田上順次
廣藤卓雄					

理事長 石井信之 (神奈川歯科大学大学院歯学研究科)
 副理事長 北村知昭 (九州歯科大学)
 副理事長 林美加子 (大阪大学大学院歯学研究科)
 前理事長 田上順次 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科)

常任理事

(総務担当) 山本一世 (大阪歯科大学)
 (財務担当) 向井義晴 (神奈川歯科大学大学院歯学研究科)
 (編集担当) 柴秀樹 (広島大学大学院医系科学研究科)
 (修復担当) 北村知昭 (九州歯科大学)
 (歯内担当) 林美加子 (大阪大学大学院歯学研究科)
 (歯周担当) 小方頼昌 (日本大学松戸歯学部)
 (医療合理化委員長) 二階堂徹 (朝日大学歯学部)
 (教育問題委員長) 奈良陽一郎 (日本歯科大学生命歯学部)
 (学術委員長) 齋藤隆史 (北海道医療大学歯学部)
 (学会のあり方委員長) 前田英史 (九州大学大学院歯学研究院)
 (学術用語委員長) 古澤成博 (東京歯科大学)
 (渉外委員長) 坂上竜資 (福岡歯科大学)
 (国際交流委員長) 宮崎真至 (日本大学歯学部)
 (認定委員長) 五十嵐勝 (日本歯科大学生命歯学部)
 (認定歯科衛生士審査委員長) 野杵由一郎 (新潟大学大学院医歯学総合研究科)
 (定款委員長) 北村知昭 (九州歯科大学)
 (広報委員長) 山本一世 (大阪歯科大学)
 (選挙管理委員長) 佐藤聡 (日本歯科大学新潟生命歯学部)
 (表彰委員長) 北村知昭 (九州歯科大学)
 (倫理/COI委員長) 林美加子 (大阪大学大学院歯学研究科)

監 事 榎 石 武 美 (東京歯科大学名誉教授)
中 村 勝 文 (埼玉県開業)

幹 事

(理事長幹事) 武 藤 徳 子 (神奈川歯科大学大学院歯学研究科)
(総務担当幹事) 吉 川 一 志 (大阪歯科大学)
(財務担当幹事) 富 山 潔 (神奈川歯科大学大学院歯学研究科)
(編集担当幹事) 武 田 克 浩 (広島大学大学院医系科学研究科)
(認定幹事) 前 田 宗 宏 (日本歯科大学生命歯学部)

理 事

北海道医療大学歯学部 〒061-0293 北海道石狩郡当別町字金沢 1757

古 市 保 志 斎 藤 隆 史 川 上 智 史

北海道大学大学院歯学研究科 〒060-8586 札幌市北区北 13 条西 7 丁目

佐 野 英 彦 井 上 哲 菅 谷 勉

岩手医科大学歯学部 〒020-8505 盛岡市中央通 1-3-27

野 田 守 八 重 柏 隆

東北大学大学院歯学研究科 〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 4-1

齋 藤 正 寛 山 田 聡

奥羽大学歯学部 〒963-8611 郡山市富田町字三角堂 31-1

高 橋 慶 壮 木 村 裕 一 山 田 嘉 重

新潟大学大学院医歯学総合研究科 〒951-8514 新潟市中央区学校町通二番町 5274

野 杵 由 一 郎 吉 羽 邦 彦 多 部 田 康 一

日本歯科大学新潟生命歯学部 〒951-8580 新潟市中央区浜浦町 1-8

新 海 航 一 佐 藤 聡

松本歯科大学 〒399-0781 塩尻市広丘郷原 1780

吉 成 伸 夫 音 琴 淳 一 亀 山 敦 史 増 田 宜 子

明海大学歯学部 〒350-0283 坂戸市けやき台 1-1

申 基 喆 横 瀬 敏 志

日本大学松戸歯学部 〒271-8587 松戸市栄町西 2-870-1

小 方 頼 昌 松 島 潔 平 山 聡 司

東京歯科大学 〒101-0061 千代田区神田三崎町 2-9-18

齋 藤 淳 古 澤 成 博 村 松 敬

日本歯科大学生命歯学部 〒102-8159 千代田区富士見 1-9-20

奈 良 陽 一 郎 沼 部 幸 博 五 十 嵐 勝 北 村 和 夫

日本大学歯学部 〒101-8310 千代田区神田駿河台 1-8-13

宮 崎 真 至 佐 藤 秀 一 武 市 収

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 〒113-8549 文京区湯島 1-5-45

興 地 隆 史 岩 田 隆 紀

昭和大学歯学部 〒145-8515 大田区北千束 2-1-1

山 本 松 男 真 鍋 厚 史 長 谷 川 篤 司 鈴 木 規 元

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 〒238-8580 横須賀市稲岡町 82

石 井 信 之 三 辺 正 人 向 井 義 晴

鶴見大学歯学部 〒230-8501 横浜市鶴見区鶴見 2-1-3

細 矢 哲 康 五 味 一 博 山 本 雄 嗣

愛知学院大学歯学部 〒464-8651 名古屋市千種区末盛通 2-11

三 谷 章 雄 富 士 谷 盛 興

朝日大学歯学部 〒501-0296 岐阜県瑞穂市穂積 1851
河野 哲 二階堂 徹 辰巳 順一
大阪大学大学院歯学研究科 〒565-0871 吹田市山田丘 1-8
村上 伸也 林 美加子
大阪歯科大学 〒573-1121 枚方市楠葉花園町 8-1
山本 一世 梅田 誠 前田 博史
広島大学大学院医系科学研究科 〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3
柴 秀樹 水野 智仁
岡山大学学術研究院医歯薬学域 〒700-8525 岡山市北区鹿田町 2-5-1
吉山 昌宏 高柴 正悟 鳥井 康弘
徳島大学大学院医歯薬学研究部 〒770-8504 徳島市蔵本町 3-18-15
湯本 浩通 保坂 啓一
九州歯科大学 〒803-8580 北九州市小倉北区真鶴 2-6-1
北村 知昭 中島 啓介
九州大学大学院歯学研究科 〒812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1
西村 英紀 前田 英史 和田 尚久
福岡歯科大学 〒814-0193 福岡市早良区田村 2-15-1
坂上 竜資 阿南 壽 米田 雅裕
長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 〒852-8588 長崎市坂本 1-7-1
吉村 篤利
鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 〒890-8544 鹿児島市桜ヶ丘 8-35-1
野口 和行 西谷 佳浩

立澤 敦子（日本歯科衛生士会）

訃 報

名誉会員 高橋 一祐先生

日本歯科保存学会各種委員会委員リスト (2021年4月1日～2023年3月31日)

編集委員会

*柴 秀樹 ☆前田 英史 亀山 敦史 北村 和夫 平山 聡司 村松 敬 八重柏 隆
山本 一世 山本 松男 湯本 浩通 吉羽 邦彦 吉村 篤利 米田 雅裕 (武田 克浩)

医療合理化委員会

*二階堂 徹 ☆細矢 哲康 岩田 隆紀 小方 頼昌 菅谷 勉 鈴木 規元 林 美加子
半場 秀典 柵木 寿男 吉川 一志 (高垣 智博)

〔社会保険対策小委員会〕

*細矢 哲康 岩田 有弘 代田あづさ 瀧川 智義 松見 秀之 山田 嘉重 吉川 一志
陸田 明智

〔う蝕治療ガイドライン作成小委員会〕

*林 美加子 小幡 純子 北迫 勇一 久保 至誠 清水 明彦 菅井 健一 高橋 礼奈
中嶋 省志 二階堂 徹 福島 正義 堀江 卓 前蘭 葉月 松崎英津子 武藤 徳子
桃井 保子

教育問題委員会

*奈良陽一郎 ☆小方 頼昌 亀山 敦史 川上 智史 佐藤 聡 柴 秀樹 鳥井 康弘
長谷川篤司 三谷 章雄 山本 雄嗣 吉羽 邦彦 吉村 篤利 (柵木 寿男)

学術委員会

*齋藤 隆史 ☆高柴 正悟 興地 隆史 亀山 敦史 坂上 竜資 申 基喆 二階堂 徹
西谷 佳浩 沼部 幸博 増田 宜子 横瀬 敏志 (松田 康裕)

学会のあり方委員会

*前田 英史 ☆齋藤 隆史 五味 一博 新海 航一 高橋 慶壮 辰巳 順一 松島 潔
向井 義晴 湯本 浩通 (杉井 英樹)

学術用語委員会

*古澤 成博 ☆石原 裕一 田口洋一郎 武市 収 鳥井 康弘 根本 英二 半場 秀典
柵木 寿男 鷲尾 絢子 和田 尚久 (吉田 隆)

渉外委員会

*坂上 竜資 ☆奈良陽一郎 阿南 壽 五十嵐 勝 大槻 昌幸 小方 頼昌 木村 裕一
菅谷 勉 立澤 敦子 村上 伸也

国際交流委員会

*宮崎 真至 ☆吉山 昌宏 阿南 壽 興地 隆史 齋藤 淳 二階堂 徹 西谷 佳浩
山本 雄嗣 山本 松男 吉成 伸夫 (高見澤俊樹)

認定委員会

*五十嵐 勝 ☆野杵由一郎 木村 裕一 黒川 弘康 佐藤 秀一 武市 収 中島 啓介
西谷 佳浩 平山 聡司 富士谷盛興 細矢 哲康 真鍋 厚史 三谷 章雄 両角 祐子
湯本 浩通 (前田 宗宏)

認定歯科衛生士審査委員会

*野杵由一郎 ☆前田 英史 梅田 誠 尾崎 和美 北村 和夫 坂上 竜資 佐藤 治美
立澤 敦子 野田 守 真鍋 厚史 山口由美子

倫理委員会

*林 美加子 ☆山本 一世 五十嵐 勝 北村 知昭 柴 秀樹 前田 英史 山本 松男
○井上 順之 ○永嶋 哲也 (高橋 雄介)

COI委員会

*林 美加子 ☆吉村 篤利 阿南 壽 古市 保志 山田 聡 山田 嘉重 ○井上 順之
 ○永嶋 哲也 (高橋 雄介)

定款委員会

*北村 知昭 ☆木村 裕一 河野 哲 佐野 英彦 沼部 幸博 野口 和行 三辺 正人
 山本 雄嗣 和田 尚久 (鷺尾 絢子)

広報委員会

*山本 一世 ☆細矢 哲康 石幡 浩志 稲本 京子 井上 哲 音琴 淳一 斎藤 隆史
 多部田康一 前田 宗宏 吉成 伸夫 (吉川 一志)

選挙管理委員会

*佐藤 聡 ☆前田 博史 海老原 新 鈴木 茂樹 平山 聡司

表彰委員会

*北村 知昭 ☆古澤 成博 岩田 隆紀 齋藤 正寛 菅谷 勉 西村 英紀 増田 宜子
 向井 義晴 横瀬 敏志 (鷺尾 絢子)

積立金管理運用委員会 【役職指定】

*【理事長】	石井 信之	【副理事長】	北村 知昭	林 美加子
【前理事長】	田上 順次	【次期理事長】	※総会承認後	
【総務担当常任理事】	山本 一世	【財務担当常任理事】	向井 義晴	

*委員長, ☆副委員長, ○外部委員, () 内幹事役, 五十音順

日本歯科保存学会編集連絡委員

大 学	連絡委員	大 学	連絡委員	大 学	連絡委員
北 医 大 歯周歯内 う蝕制御	加藤 幸紀 松田 康裕	東 歯 大 修復 歯内 歯周 総診	春山 亜貴子 佐古 亮 勢島 典子 杉山 利子	阪 大 感染制御(保存) 免疫制御(治療)	伊藤 祥作 島袋 善夫
北 大 修復・歯内 歯周・歯内	星加 修平 下地 伸司	日 歯 大 保存 接着 歯周病 総合診療	前田 宗宏 柵木 寿男 沼部 幸博 石川 明子	大 歯 大 保存 口腔治療 歯周病	谷本 啓彰 至田 宗泰 田口 洋一郎
岩 医 大 う蝕治療 歯周療法	工藤 義之輔 佐々木 大輔	日 大 保存修復 歯内療法 歯周病	黒川 弘康 勝呂 尚之 菅野 直之	広 大 歯髄生物 歯周病態	土屋 志津 藤田 剛
東 北 大 歯内歯周 保存	鈴木 茂樹 半田 慶介	医科歯科大 う蝕制御 歯周病 歯髄生物 総合診療	大槻 昌幸 竹内 康雄 渡辺 聡 新田 浩	岡 大 保存修復 歯周病態	島田 康史 畑中 加珠
奥 羽 大 修復 歯周 歯内	菊井 徹哉 高橋 慶壮夫 佐々木 重夫	昭 大 保存・美容歯科 歯周病	小林 幹宏 小出 容子	徳 大 保存 歯周歯内	中西 正一 木戸 淳一
新 潟 大 う蝕 歯周 総診	吉羽 永子 久保田 健彦	神 歯 大 保存修復 歯周 歯内	富山 潔 両角 俊哉 鈴木 二郎	九 歯 大 保存 歯周病	鷺尾 絢子 白井 通彦
日 歯 大 新 潟 保存I 保存II 歯周病 総合診療	北島 佳代子 鈴木 雅也 両角 祐子 横須賀 孝史	鶴 大 保存修復 歯内療法 歯周病	岡田 彩子 中野 雅子 長野 孝俊	九 大 口腔機能(歯周) 口腔機能(歯科保存)	讚井 彰一 友清 淳
松 歯 大 保存(修復) 保存(歯周) 健康増進	安西 正明 吉成 伸夫 音 琴 淳一	愛 院 大 保存修復 歯内治療 歯周病	友田 篤臣 樋口 直也 福田 光男	福 歯 大 修復・歯内 歯周 総合歯科	泉 利雄 吉永 泰周 米田 雅裕
明 海 大 保存治療 歯周病	門倉 弘志 林 丈一朗	朝 日 大 修復 歯内 歯周病	日下部 修介 瀧谷 佳晃	長 大 歯周歯内	柳 口 嘉治郎
日 大 松 戸 保存修復 歯周治療学 歯内	内山 敏一 小方 頼一 川 島 昌正			鹿 大 修復歯内 歯周病	星加 知行 野口 和行

日本歯科保存学雑誌投稿規程

1. この学術雑誌は、研究成果の論文発表による発信を通して、歯科保存学（保存修復学、歯内療法学、歯周病学）の発展に寄与することを目的としている。そのため、歯科保存学の基礎、臨床、教育ならびに歯科保存学を基盤とした歯科医学全般に関する論文を掲載する。
2. 論文の種類は、原著論文（独創性がある研究の成果に関するもの）、総説（歯科保存学に関する争点を整理して今後の方向性を示唆しようとするもの、あるいは既発表論文の内容をまとめて新たな概念を提唱しようとするもの）、ミニレビュー（歯科保存学に関する最近のトピックを総説形式で簡潔にまとめたもので、各賞の受賞論文を含む）、症例・臨床報告（歯科保存学領域から広く歯科医療の実践と発展に有用となる臨床の記録）などの4種に分類する。なお、総説とミニレビューは、編集委員会からの依頼によるものと投稿によるものとに分ける。
3. 原著論文および症例・臨床報告の内容は、過去に他誌に掲載されたり、現在投稿中あるいは掲載予定でないものに限る。
4. 論文の採否は、査読を経て決定する（編集委員会からの依頼によるものを除く）。
5. 投稿原稿は、日本語または英語で簡潔に記述されたものとする。
6. 原著論文の形式は、原則として和文（英文）抄録、緒言、材料および方法、結果あるいは成績、考察、結論、文献、英文（和文）抄録の順に記載する。原著論文以外の論文も、原則としてこれに準ずる。
7. 本誌の発行は、原則として2月、4月、6月、8月、10月および12月に行う。12月には英文誌“Operative Dentistry, Endodontology and Periodontology”として発行する。また、必要があれば増刊する。
8. 筆頭著者が会員の場合のみ、一定額の掲載料補助を行う。また、筆頭著者が会員であるが共著者に非会員が含まれる場合については、掲載料補助は行われるが非会員の人数に応じて別途負担金を求める。なお、図表・写真などの実費、発送および別刷にかかわる費用、J-STAGE 登載用データ作成代は、著者負担とする。ただし、編集委員会からの依頼によるものは除くものとする。
9. 論文投稿票は、最新のものを用い、投稿原稿に必ず添付する。
10. 受付日は、投稿原稿が学会事務局へ到着した日付とする。また、受理日は、査読担当者から採択可と判定された日付とする。
11. 掲載順序は、受理順とする。なお、採択論文の掲載証明は希望がある場合に発行する。
12. 論文投稿はE-mail 投稿または学会ホームページ等からのWeb 投稿とする。投稿原稿の送付先は、学会事務局とする。
13. 著者による校正は、原則として2校までとする。その際には、字句の著しい変更、追加、削除などは認めない。校正刷は所定の日までに必ず返却する。校正不要の場合には、その旨表紙左側に明記する。
14. 本誌掲載の著作物の著作権は、本学会に帰属するものとする。
15. この規程にない事項は、別に編集委員会で決定する。

附則

1. 本規程は平成6年11月10日から施行する（第38巻第1号より適用）。
2. 本規程は平成7年10月26日から一部改正し施行する。
3. 本規程は平成9年6月5日から一部改正し施行する。
4. 本規程は平成11年11月17日から一部改正し施行する。
5. 本規程は平成16年6月9日から一部改正し施行する。
6. 本規程は平成18年11月9日から一部改正し施行する。
7. 本規程は平成20年6月5日から一部改正し施行する。
8. 本規程は平成21年10月28日から一部改正し施行する。
9. 本規程は平成22年6月3日から一部改正し施行する。
10. 本規程は平成24年6月28日から一部改正し施行する。
11. 本規程は平成25年6月27日から一部改正し施行する。
12. 本規程は令和2年6月25日から一部改正し施行する。
13. 本規程は令和3年6月9日から一部改正し施行する。

投稿にあたっては「投稿規程」のほか、必ず各巻の1号に掲載されている「投稿の手引き」に準拠すること。

複写をご希望の方へ

本学会は、本誌掲載著作物の複写複製に関する権利を学術著作権協会に委託しております。
本誌に掲載された著作物の複写複製をご希望の方は、学術著作権協会 (<https://www.jaacc.org/>) が提供している複製利用許諾システムを通じて申請ください。
複写以外の許諾（著作物の引用、転載、翻訳等）に関しては、直接本学会へお問い合わせください。

Reprographic Reproduction outside Japan

The Japanese Society of Conservative Dentistry authorized Japan Academic Association For Copyright Clearance (JAC) to license our reproduction rights of copyrighted works. If you wish to obtain permissions of these rights in the countries or regions outside Japan, please refer to the homepage of JAC (<http://www.jaacc.org/en/>) and confirm appropriate organizations to request permission.

編集後記

- 本年4月から、日本歯科保存学雑誌の編集委員の任を仰せつかりました、松本歯科大学歯科保存学講座（修復）の亀山と申します。どうぞよろしくお願いたします。
- 現在、私は本学会以外にも3つの学会で編集委員を務めておりますが、学会誌の発行は学術大会の開催とならび、いずれの学会においても主要な事業として位置づけられているうちの1つです。本学会でも、総会や理事会の資料を見ると10項目以上ある事業計画案や事業報告書の1番目に本誌の発行が明記されていることから、最も主要な事業と考えられていることがわかります。そして以前から事業計画案の2番目に記載されてきた英文誌発行が、いよいよ今年から始まります。
- さて、この原稿を書いているのは6月初旬で、いよいよこれから歯と口の健康週間が始まろうという時期です。この事業は日本歯科医師会が昭和3年、「虫歯予防デー」という名前で実施し、その後何度か名前を変えながら現在に至っており、日本歯科医師会をはじめ、都道府県歯科医師会や郡市区歯科医師会で啓発のための各種イベントなどを行っています。
- この間、昭和・平成・令和の90年以上にわたって歯と口の健康、そして歯科疾患の予防に関する啓発・普及がなされたこともあり、国民にブラッシングの習慣が根付く大きなきっかけとなりました。この効果は非常に大きいものであり、今後も長く続けていくべき事業であると考えられます。一方で、今日の歯の健康寿命が延伸したことは、単にブラッシング習慣のみではなしえず、むしろ保存治療技術の向上や発展が大きく関わってきたものと思います。そしてこの技術の発展・向上は、これまで本誌に掲載された論文で紹介された数々の知見や研究成果によるものも多数ございます。
- この原稿を執筆している6月4日、私はわが国における現在の歯の健康寿命の延伸を支えてきた日本歯科保存学会と、学会の根幹をなす日本歯科保存学雑誌に対して長年の歴史を感じるとともに、新たに編集委員会のメンバーに加わったこと責任の重さをより一層感じている次第です。あわせて、学会と本誌をこれまで支えてきてくださった全ての会員の先生方に改めて敬意を表したいと思います。

(亀山敦史 記)

日本歯科保存学雑誌編集委員会

委員長	柴 秀 樹 (広島大学大学院医系科学研究科)
副委員長	前 田 英 史 (九州大学大学院歯学研究院)
	亀 山 敦 史 (松本歯科大学)
	北 村 和 夫 (日本歯科大学)
	平 山 聡 司 (日本大学松戸歯学部)
	村 松 敬 (東京歯科大学)
	八 重 柏 隆 (岩手医科大学歯学部)
	山 本 一 世 (大阪歯科大学)
	山 本 松 男 (昭和大学歯学部)
	湯 本 浩 通 (徳島大学大学院医歯薬学研究部)
	吉 羽 邦 彦 (新潟大学大学院医歯学総合研究科)
	吉 村 篤 利 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)
	米 田 雅 裕 (福岡歯科大学)
幹 事	武 田 克 浩 (広島大学大学院医系科学研究科)

(50音順)

編集・発行予定

号	投稿締切日	発行日
1	前年11月15日	2月末日
2	1月15日	4月末日
3	3月15日	6月末日
4	5月15日	8月末日
5	7月15日	10月末日
6	9月15日	12月末日

令和3年6月25日 印刷

令和3年6月30日 発行

編集兼発行者

制 作 者

印 刷 所

発 行 所

特定非営利活動法人 日本歯科保存学会理事長

石 井 信 之

一般財団法人 口腔保健協会

<http://www.kokuhoken.or.jp/>

三報社印刷株式会社

特定非営利活動法人 日本歯科保存学会
日本歯科保存学雑誌編集委員会

〒170-0003 東京都豊島区駒込1-43-9

(一財)口腔保健協会内

電 話 03 (3947) 8891

F A X 03 (3947) 8341

特定非営利活動法人 日本歯科保存学会賛助会員名簿

賛助会員名	郵便番号	所在地	電話番号
アグサジャパン株式会社	540-0004	大阪市中央区玉造1-2-34	(06)6762-8022
医歯薬出版株式会社	113-8612	東京都文京区本駒込1-7-10	(03)5395-7638
イボクラールピバデント株式会社	113-0033	東京都文京区本郷1-28-24 4F	(03)6801-1303
長田電機工業株式会社	141-8517	東京都品川区西五反田5-17-5	(03)3492-7651
カボデンタルシステムズ株式会社	140-0001	東京都品川区北品川4-7-35 御殿山トラストタワー15F	(03)6866-7480
クラレノリタケデンタル株式会社	100-0004	東京都千代田区大手町1-1-3 大手センタービル	(03)6701-1730
クルツァー ジャパン株式会社	113-0033	東京都文京区本郷4-8-13 TSKビル2F	(03)5803-2151
小林製薬株式会社	567-0057	大阪府茨木市豊川1-30-3	(072)640-0117
コルテンジャパン合同会社	190-0012	東京都立川市曙町2-25-1 2F	(042)595-6945
サンメディカル株式会社	524-0044	滋賀県守山市古高町571-2	(077)582-9981
株式会社ジーシー	113-0033	東京都文京区本郷3-2-14	(03)3815-1511
株式会社松風	605-0983	京都市東山区福福上高松町11	(075)561-1112
昭和薬品化工株式会社	104-0031	東京都中央区京橋2-17-11	(03)3567-9573
スリーエムジャパン株式会社	141-8684	東京都品川区北品川6-7-29	(03)6409-3800
タカラベルモント株式会社	542-0083	大阪市中央区東心斎橋2-1-1	(06)6212-3619
デンツプライシロナ株式会社	106-0041	東京都港区麻布台1-8-10	(03)5114-1005
株式会社東洋化学研究所	173-0004	東京都板橋区板橋4-25-12	(03)3962-8811
株式会社トクヤマデンタル	110-0016	東京都台東区台東1-38-9 イトーピア清洲橋通ビル7F	(03)3835-2261
株式会社ナカニシ	322-8666	栃木県鹿沼市下日向700	(0289)64-3380
株式会社ニッシン	601-8469	京都市南区唐橋平垣町8	(075)681-5346
日本歯科薬品株式会社	750-0015	山口県下関市西入江町2番5号	(0832)22-2221
ネオ製薬工業株式会社	150-0012	東京都渋谷区広尾3-1-3	(03)3400-3768
白水貿易株式会社	532-0033	大阪市淀川区新高1-1-15	(06)6396-4455
ピヤス株式会社	132-0035	東京都江戸川区平井6-73-9	(03)3619-1441
マニー株式会社	321-3231	宇都宮市清原工業団地8-3	(028)667-1811
株式会社茂久田商会	650-0047	神戸市中央区港島南町4-7-5	(078)303-8246
株式会社モリタ	564-8650	大阪府吹田市垂水町3-33-18	(06)6388-8103
株式会社モリムラ	110-0005	東京都台東区上野3-17-10	(03)3836-1871
YAMAKIN株式会社	543-0015	大阪市天王寺区真田山町3-7	(06)6761-4739
株式会社ヨシダ	110-0005	東京都台東区上野7-6-9	(03)3845-2931

(五十音順)

貴稿が日本歯科保存学雑誌の投稿規程に沿ったものであるかを確認し、1～12の項目については、必ず著者チェック欄にチェック（√印）して下さい。さらに、その項目について、所属機関の編集連絡委員のチェックを受けてから投稿して下さい。（編集連絡委員名簿は各巻3・6号に掲載しています）

なお、13～18の項目については該当する場合にチェックして下さい。

チェック 著者 編集連絡委員	チェック 編集委員会
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 1. 保存学会 HP 掲載の最新の投稿票を用いていますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 2. 原稿（図、表を含む）は A4 サイズで作成していますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 3. 原稿は和文（英文）表紙、和文（英文）抄録、本文、文献、英文（和文）表紙、英文（和文）抄録の順になっていますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 4. 和文抄録、英文抄録には、見出しが付いていますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 5. 和文・英文各表紙の末尾に責任著者連絡先が記入してありますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 6. 和文・英文各キーワード（索引用語）を3語程度、和文抄録・英文抄録の末尾に記入してありますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 7. 表紙には、ランニングタイトルが記入してありますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 8. 原稿には通しページ番号（表紙から文献まで）が記載されていますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 9. 文献は所定の書き方で、引用順になっていますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 10. 図表にはそれぞれ番号が記入してありますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 11. 図表とその説明は英語で表記していますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 12. 投稿論文に関わる利益相反（COI）自己申告書を添付していますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 13. トレースの必要な図は、余白にその旨記載してありますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 14. カラー掲載希望の場合にはカラーデータを、モノクロ掲載希望の場合にはモノクロデータを添付していますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 15. 英文論文の場合は、ネイティブスピーカー等による英文校閲証明書を添付していますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 16. ヒトを対象とする研究について、所属機関の長もしくはその長が委託する倫理委員会等の承認を得ていますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 17. ヒトを対象とする研究について、匿名化を行うなど研究対象者個人が特定されることがないように配慮されていますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 18. ヒトを対象とする研究について、得られた資料を使用するにあたり研究対象者の承諾を得ていますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>

編集連絡委員名 _____ (印)

編集委員会からのお願い：所属機関に編集連絡委員がおられない場合には、その旨明記の上、締切日に余裕をもって事務局までお送り下さい。

1本で各種被着体に対応

常温保管OK※

※1～25℃

歯質

コンポジットレジン
/ 硬質レジン

ジルコニア

CAD/CAM
レジンブロック

金属

陶材



BeautiBond Xtreme

幅広い用途

コンポジットレジン充填修復、各種材料のリペア、レジンセメントの前処理、
支台築造の前処理、知覚過敏抑制、象牙質レジンコーティング

プロモーション動画はコチラ

ビューティボンド Xtreme

1セット ¥16,000
【セット内容】
ビューティボンドXtreme5.0mL、
ディスプレイブラシファイブ(ピンク)50、
松風Vティッシュ25

販売名	一般的名称	承認・認証・届出番号
ビューティボンド Xtreme	歯科用象牙質接着材 歯科セラミックス用接着材料 歯科金属用接着材料 歯科用知覚過敏抑制材料 歯科用シーリング・コーティング材	管理医療機器 医療機器認証番号302AKBZX00026000



製品の詳細はこちらまで…

松風 検索 www.shofu.co.jp

掲載の価格は2021年6月現在の標準医院価格(消費税抜き)です。

Thinking ahead. Focused on life.



Spaceline EX

スペースライン EXが iFデザイン賞の金賞を受賞

ドイツのiFデザイン賞は、50年以上の歴史を有し、各国から選ばれた審査員によって厳正に選考される世界的に権威のあるデザイン賞です。世界中から6,400以上のエントリーがあった中、最優秀デザインとして75件に授与される金賞（iF GOLD AWARD）をスペースライン EXが受賞しました。人間工学に基づき緻密に計算されたデザインは、患者さんだけでなく術者にも理想的で洗練されたデザインであると評価されました。



発売

株式会社 **モリタ**

大阪本社 大阪府吹田市垂水町3-33-18
〒564-8650 T 06. 6380 2525

東京本社 東京都台東区上野2-11-15
〒110-8513 T 03. 3834 6161

お問合せ お客様相談センター 歯科医療従事者様専用
T 0800. 222 8020 (フリーコール)

製造販売・製造

株式会社 **モリタ製作所**

本社工場 京都府京都市伏見区東浜南町680
〒612-8533 TEL 075-611-2141

久御山工場 京都府久世郡久御山町市田新珠城190
〒613-0022 TEL 0774-43-7594

販売名: スペースライン
一般的名称: 歯科用ユニット
機器の分類: 管理医療機器(クラスII)
特定保守管理医療機器
医療機器認証番号: 228ACBZX00018000

www.dental-plaza.com



Leading the way
to a new standard

多目的光重合型 2 液性ボンディング材

G2- ボンド ユニバーサル

2ステップセルフエッチング
ボンディングの
新しいスタンダード

ジーシー G2-ボンド ユニバーサル 管理医療機器 302AKBZX00045000



Since 1921
100 years of Quality in Dental