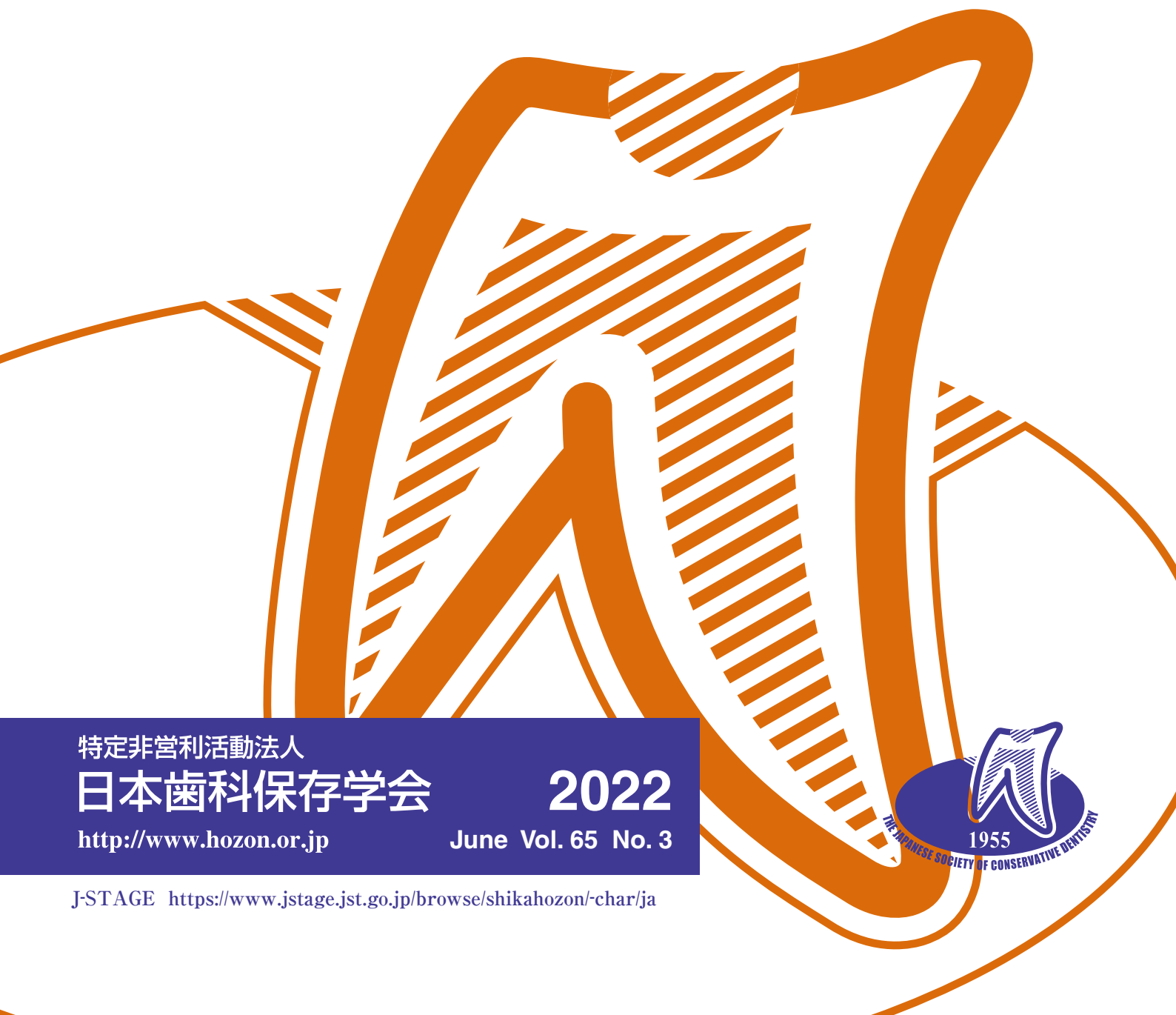


ONLINE ISSN 2188-0808

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>

2022

June Vol. 65 No. 3



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

Super Low

NEW

1色^{*}で天然歯色に親和するフロアブルCR

※白歯部の場合

Low

High

NEW

クリアフィル[®] マジェスティ[®] ES フロー

Super Low Low High

Universal

なぜ色が親和するのか？物性は？操作性は？詳しい特長は特設サイトへ！ →



単品 クリアフィル[®] マジェスティ[®] ES フロー

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：224ABBZX00170000

○本品は、袋包装です。

Super Low

- レジン充填材 (Super Low) (U、UD) 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) 202440620~202440621



Low

- 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



High

- レジン充填材 (High) (U、UD、UOP) 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) 202440610~202440612



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2丁目6-4 常盤橋タワー

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2022年3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。

●メーカー希望小売価格の後の9ケタの数字は株式会社モリタの商品コードです。

●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 【販売元】株式会社モリタ

〒959-2653 新潟県胎内市倉敷町2-28

〒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。

Concept



急な引き込まれを大幅軽減



本来の根管から逸脱しづらい
刃部構造と柔軟性



I・II・IIIの3本で終了
簡単な手順、使用方法を採用



ホームページより
動画をご覧ください

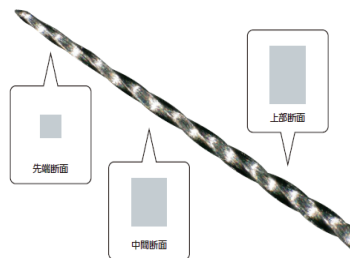


D ファインダー



- 過剰な切削・食い込みを軽減できる。
- 刃部強度を高め、穿通力を UP。
- 石灰化、狭窄した根管にも折れにくく有効。

グライドファインダー



穿通性 + 切削性

- 先端部テーパを強化し力が伝わりやすい。
- 断面形状の変化による優れた切削性と柔軟性。
- 穿通のみならずグライドパス形成も可能。

医療機器届出番号 09B1X00006011050 一般医療機器 一般的名称：歯科用ファイル 販売名 マニー®D ファインダー
医療機器届出番号 09B1X00006011010 一般医療機器 一般的名称：歯科用ファイル 販売名 マニー®K ファイル



オムニクロマに フロアブルが登場!!

◀詳しくはこちらのサイトへ
<https://www.tokuyama-dental.co.jp/omnichroma/>

シェードのない世界へようこそ オムニクロマフロー



1本でVITA16色に同化!

構造色を応用した (オムニクロマ:2020年、オムニクロマフロー:2021年発売)

オムニクロマ/オムニクロマフロー

オムニクロマが1本でカバーする範囲

B1 A1 B2 D2 A2 C1 C2 D3 A3 D4 B3 A3.5 B4 C3 A4 C4

(色付けはイメージ)

色調適合技術
がさらに進化

光拡散性を応用した (2016年発売)

エステライトユニバーサルフロー

A2がカバーする範囲

B1 A1 B2 D2 A2 C1 A3 D3

(色付けはイメージ)



使いこなしのコツ

〈オムニクロマ ブロッカー〉〈オムニクロマフロー ブロッカー〉

ブロッカーは周辺に歯質の無い大きなⅢ級、Ⅳ級修復や変色歯質の遮蔽をしたい場合にご使用ください。

臨床モニターにおいて大きなⅢ級、Ⅳ級修復症例は、

- オムニクロマ 12.8%(311症例中)
- オムニクロマフロー 4.4%(223症例中)



使用方法は

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



NEO DENTAL CHEMICAL
PRODUCTS CO., LTD.

Vitapex[®] Solvent



New!

ビタペックス[®] ソルベント

根管充填材用軟化材

管理医療機器
医療機器認証番号：303ADBZX00115000

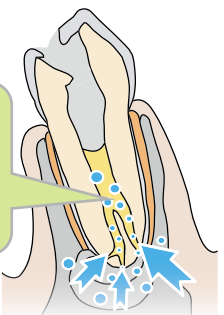
包装 100 mL
標準価格 3,200円 (税抜)

ビタペックスの除去に 専用ソルベント新発売!

根管充填後一定期間経過したビタペックスの組成を考慮し、適切な油脂溶解作用を付与したソルベントです。根管からの機械的な除去操作時に併用し、除去の効率を高めます。

また歯質に対してもその後の治療に影響を与えない処方となっています。ビタペックス応用時の作業性を高める専用軟化材です。

根管充填期間に生じる
ビタペックス水分含量
の増加にも対応する
溶解性を有します。



製造販売元



ネオ製薬工業株式会社

〒150-0012 東京都渋谷区広尾3丁目1番3号
Tel. 03-3400-3768(代) Fax. 03-3499-0613
お問い合わせ ☎0120-07-3768

エマージェンスプロファイル

三角構造の理論

スリープレーンコンセプト

骨格技法

スカイラー、P. K.トーマスら
モダンデンティストリーのジャイアンツとの臨床からクワタが到達し
世界中に伝え続けてきた歯冠修復治療のBasicsは
これからも生き続ける

アナトミカルシェーディングテクニック

FDO (Functionally Discluded Occlusion)

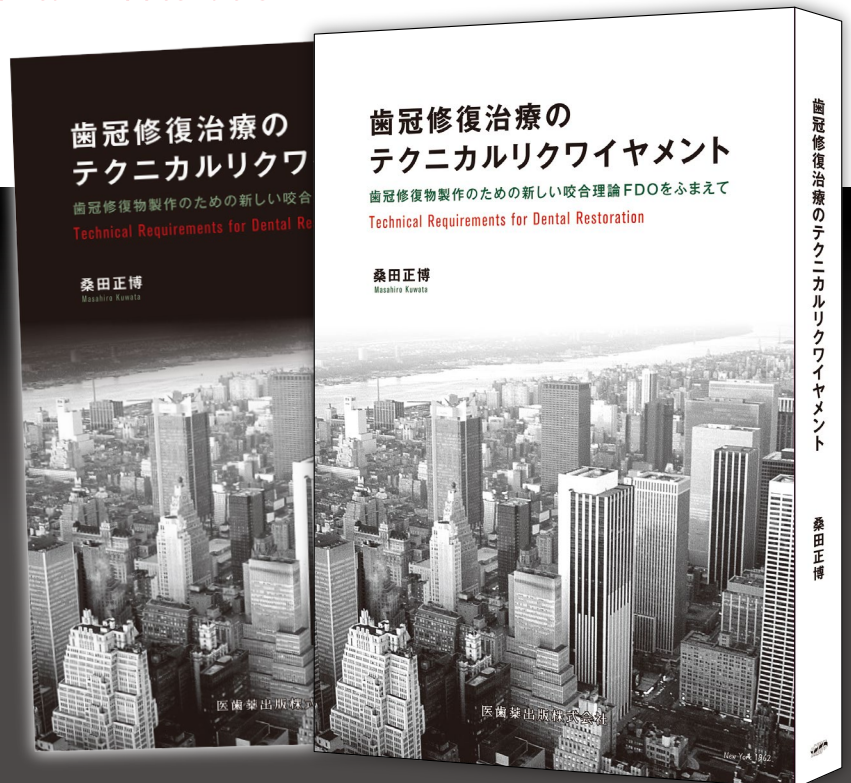
歯冠修復治療の テクニカルリクワイヤメント

歯冠修復物製作のための新しい咬合理論FDOをふまえて
Technical Requirements for Dental Restoration

桑田正博 著

歯冠修復物の外形基準，マージン部の形成と修復材料の構成，ワックスアップやセラミック築盛のテクニック，オリジナルの咬合理論など，著者がこれまで提唱してきた歯冠修復治療の「理論」と「実際」の集大成

■ A4判 / 256頁 / カラー
■ 定価24,200円
(本体22,000円+税10%)
ISBN978-4-263-44658-4
注文コード:446580



医歯薬出版株式会社

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64巻およびODEP1巻1号における優秀論文賞および2021年度春季学術大会(第154回)・秋季学術大会(第155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。2021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。また優秀ポスター賞は、本年から分野別ではなく、研究領域別での審査を実施しました。

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(松風優秀論文賞)

「Influence of Surface Moisture on the Bond Strength of a Universal Adhesive in the Etch-and-rinse Mode」
(ODEP1巻1号掲載)

筆頭著者：杉村留奈, 辻本暁正, 岩瀬 慶, 嘉月 駿, Ahmad ALKHAZALEH, Olajide OBE, 高見澤俊樹,
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(ジーシー優秀論文賞)

「Development of Multilayered Dental Pulp Cell Sheets and Consideration for Calcification Ability」
(ODEP1巻1号掲載)

著者：小柳圭史, 前田宗宏, 関谷美貴, 西田太郎, 五十嵐 勝

筆頭著者所属：日本歯科大学生命歯学部歯科保存学講座

歯周病学分野(カボデンタル優秀論文賞)

「循環器疾患患者におけるプロービング時の出血の有無と全身的因子の関連の検討」(64巻2号掲載)

著者：青山典生, 呉 圭哲, 藤井利哉, 喜田さゆり, 高瀬雅大, 杉原俊太郎, 門田大地, 三辺正人

筆頭著者所属：神奈川歯科大学大学院歯学研究科口腔統合医療学講座歯周病学分野

優秀ポスター賞 受賞演題

154回

研究領域A(松風優秀ポスター賞)

「In vivoにおける多孔性ナノゲル架橋ハイブリッドゲルによる配向性を有する骨組織の再生」(P1)

演者：足立哲也, 宮本奈生, 足立圭司, 山本俊郎, 金村成智

筆頭演者所属：京都府立医科大学大学院医学研究科歯科口腔科学

研究領域B(ジーシー優秀ポスター賞)

「高脂肪食誘発型糖尿病マウスにおける歯肉創傷治療に対するメトホルミン投与の効果」(P6)

演者：小湊広美, 水谷幸嗣, 武田浩平, 城戸大輔, 三上理沙子, 齋藤夏実, 竹村 修, 中川佳太,
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

研究領域 C (カボデンタル優秀ポスター賞)

「トモシンセシス法を用いたパノラマ X 線画像における歯周組織所見の主観的および物理学的画質評価」
(P7)

演者：杉原俊太郎，両角俊哉，三辺正人

筆頭演者所属：神奈川歯科大学歯科保存学講座歯周病学分野

155 回

研究領域 A (カボデンタル優秀ポスター賞)

「歯肉幹細胞由来エクソソーム内包 miR-1260b による小胞体ストレス応答制御を介した歯槽骨吸収抑制作用」(P2)

演者：林 千華子，福田隆男，渡邊ゆかり，川上賢太郎，豊田真顕，中尾雄紀，四本かれん，大和寛明，
新城尊徳，讚井彰一，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歯周病学分野

研究領域 B (松風優秀ポスター賞)

「I κ B ζ による H3K4 のトリメチル化を介した反応性象牙質形成制御機構の解析」(P5)

演者：鈴木茂樹，袁 航，平田-土屋志津，根本英二，齋藤正寛，柴 秀樹，山田 聡

筆頭演者所属：東北大学大学院歯学研究科エコロジ-歯学講座歯内歯周治療学分野

研究領域 C (ジーシー優秀ポスター賞)

「超音波スケーラーから発生するエアロゾルに対する吸引装置の飛散防止効果—流体力学のおよび模擬臨床的検討—」(P7)

演者：高橋直紀，山縣貴幸，峯尾修平，加藤光太，多部田康一

筆頭演者所属：新潟大学大学院医歯学総合研究科歯周診断・再建学分野

※著者・演者の所属は発表当時のものである。

日本歯科保存学雑誌

第 65 卷第 3 号

令和 4 年 6 月

目 次

総 説

頸動脈アテローム性硬化と歯周病との臨床疫学的関連

.....古市 保志, 寺田 裕, 長澤 敏行
森 真理, 川上 智史 (189)

原 著

歯根肉芽腫中でのカルシウム結合タンパク S100A8 と S100A9 の発現

.....田村 隆仁, 宮田 泰伎, 氷見 一馬
羽鳥 啓介, 中村 健志, 清水 康平
鈴木 裕介, 蓮池 聡, 井上 聖也
岡田 将司, 藪原佑季子, 勝呂 尚
正覚 泰佑, 安川 拓也, 林 誠
武市 収 (198)

ヒト歯髄培養細胞における lipopolysaccharide による

kallikrein-related peptidase 8 産生と炎症反応.....神尾 直人, 葉山 朋美, 渡邊 昂洋
深井 譲滋, 鈴木 誠, 五明 夏子
倉持 光成, 岡部 達, 松島 潔 (205)

活動性根面齲蝕様病巣に対するジェルタイプ象牙質知覚過敏治療材の

進行停止効果.....中野 貴文, 川村 和章, 椎谷 亨
山本 龍生, 向井 義晴 (215)

投稿規程..... (221)

編集後記..... (223)

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. 65, No. 3

JUNE 2022

CONTENTS

Review

Clinicoepidemiological Association between Carotid Atherosclerosis and Periodontal Disease

.....FURUICHI Yasushi, TERADA Yutaka, NAGASAWA Toshiyuki,
MORI Mari and KAWAKAMI Tomofumi (189)

Original Articles

Expression of S100A8/A9 in Human Periapical Granulomas

.....TAMURA Takahito, MIYATA Taiki, HIMI Kazuma, HATORI Keisuke,
NAKAMURA Takeshi, SHIMIZU Kouhei, SUZUKI Yusuke, HASUIKE Akira,
INOUE Seiya, OKADA Masashi, YABUHARA Yukiko, SUGURO Hisashi,
SHOUKAKU Taisuke, YASUKAWA Takuya, HAYASHI Makoto and TAKEICHI Osamu (198)

Lipopolysaccharide-induced Kallikrein-related Peptidase 8 Production
and Inflammatory Response in Human Dental Pulp Cells

.....KAMIO Naoto, HAYAMA Tomomi, WATANABE Takahiro,
FUKAI Joji, SUZUKI Makoto, GOMYO Natsuko,
KURAMOCHI Kosei, OKABE Tatsu and MATSUSHIMA Kiyoshi (205)

Effect of Gel-type Desensitizer Containing Copolymer and Sodium Fluoride
on Active Root Caries-like Lesions *in Vitro*.....

NAKANO Takafumi, KAWAMURA Kazuaki, SHIYA Toru,
YAMAMOTO Tatsuo and MUKAI Yoshiharu (215)

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

頸動脈アテローム性硬化と歯周病との臨床疫学的関連

古市保志^{1,2} 寺田裕² 長澤敏行^{2,3}
森真理^{2,4} 川上智史^{2,4}

¹北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系歯周歯内治療学分野

²北海道医療大学病院総合歯科診療科

³北海道医療大学歯学部総合教育学系臨床教育管理運営分野

⁴北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系高度先進保存学分野

Clinicoepidemiological Association between Carotid Atherosclerosis and Periodontal Disease

FURUICHI Yasushi^{1,2}, TERADA Yutaka², NAGASAWA Toshiyuki^{2,3},
MORI Mari^{2,4} and KAWAKAMI Tomofumi^{2,4}

¹Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

²Division of General Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido Hospital

³Division of Advanced Clinical Education, Department of Integrated Dental Education, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

⁴Division of General Dental Sciences, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

キーワード：歯周病，頸動脈硬化，頸動脈内中膜厚，疫学

はじめに

歯および歯周病といった口腔の健康が、全身の健康状態にも関連していることが解明されてきている。この歴史については、1891年にMiller¹⁾が、口腔内の感染は口腔内に限局せず、全身部位に広がる感染源であると提唱した。よって当初根尖病変が、次に遠隔部の全身感染の原因として歯周病原細菌に着目した病巣感染説 (focal infection theory) が誕生した¹⁾。ただ当時これに対する主な治療は抜歯で、多数歯の抜歯後に病態が悪化する報告²⁾がみられたことなどから、1940年代以降この説¹⁾は放棄されていた。その後1989年に、口腔内が不良である

と心筋梗塞³⁾および脳梗塞⁴⁾との関連がみられる報告が発表されて以降、再度注目されるようになり現在にいたっている。

本稿では、心筋梗塞や脳梗塞の発症に関連している動脈硬化の診断に使用される形態学的検査法⁵⁾のなかで、一般的に頸動脈エコーといわれている頸動脈超音波検査⁶⁾による頸動脈硬化の進展程度と、歯周病との関連研究について関連する論文を通覧し、著者らが実施した臨床疫学的研究と合わせて、現在までに得られている知見について述べる。

動脈硬化の臨床診断法

動脈硬化は、動脈壁にコレステロールが沈着し、組織変性と弾力性低下によって血管が硬化した状態で、その部位に炎症性細胞が集積することで、粥状の塊（アテローム性プラーク）が生じる^{7,8)}。

動脈硬化性疾患の一次予防における動脈硬化の評価法は非侵襲的なものが使用されており、大別すると形態学的検査法と、血管機能検査法がある^{5,9)}。形態学的検査法には、粥状硬化をみる超音波検査、石灰化病変をみるエックス線検査およびCTなどがある^{5,9)}。実際の臨床では、これらの検査に問診および身体所見も加えて診断を行っている⁵⁾。

頸動脈超音波検査の概要

頸動脈を含む血管超音波検査は、断層画像が表示できるので血管壁内、血管表面および血管内腔の状態が視認でき、動脈硬化を視覚的にとらえ診断できる⁶⁾。また頸動脈病変は、評価が容易なこと、動脈硬化性疾患のうち脳血管障害と直接的に関係する、冠動脈疾患と関係が深いなどから欧米を中心として動脈硬化性疾患の診断に汎用されている⁶⁾。頸動脈における動脈硬化度の評価項目としては、頸動脈の内中膜厚 (intima-media thickness: IMT)、動脈硬化性プラーク (1.1 mm 以上の限局性隆起性病変) などが日本超音波医学会と日本脳神経超音波学会から標準の評価法として推奨されている⁹⁻¹¹⁾。この理由として、頸動脈の超音波像は層構造を示すが、内膜と中膜、および外膜と周囲組織との分離は超音波検査では困難なことがある¹¹⁾。ただし、内膜と中膜を合わせた厚みは病理組織像と一致すると報告されている^{11,12)}。そのため頸動脈の壁厚を評価する際は、内膜と中膜の複合体の厚みが用いられ、IMT と称している¹¹⁾。一般に IMT は加齢に伴い、健常成人では 0.009 mm/年程度増加する^{11,13)}、この増加分を含めても正常値は 0.5 mm から 1.0 mm 程度とされている^{6,10)}。このため、IMT が 1.1 mm 以上を異常肥厚と診断する^{6,10,14)}。IMT は全身の動脈硬化の程度の反映、ないしは動脈硬化性疾患の合併および発症リスク予想の代替評価因子としても用いられている^{9,15-18)}。特に、頸動脈の最も肥厚している部位を測定する最大 IMT (maximum IMT: max-IMT) の数値の増加は、早期の動脈硬化、虚血性心疾患および脳卒中の予後を反映しているとされ¹⁰⁾、本邦における大規模前向き追跡研究では、max-IMT は脳卒中の発症と関連していることが示されている^{11,19)}。なお動脈硬化は一般的には急速に進行しないので、異常がなければ 1年から 2年に

1 回程度の検査が妥当な頻度とされている⁵⁾。

頸動脈硬化と歯周病に関する論文検索

アテローム性頸動脈硬化と歯周病に関する論文を調べるために、電子検索データベースとして PubMed と医中誌を利用した。キーワードは PubMed で「carotid intima-media thickness」「carotid atherosclerosis」を、歯周病に関しては「periodontal disease」「periodontitis」に設定して検索した。医中誌では「頸動脈内中膜厚」「頸動脈硬化」「歯周病」「歯周炎」で検索した。動物実験などの人間以外を対象とした研究は除外した。抽出された論文の抄録を通覧し、アウトカムについては IMT または頸動脈アテローム硬化に設定した。曝露因子については歯科診療での使用頻度が多い、プロービングポケットデプス (PPD) などの歯周組織検査項目を適用している論文とした。

1. 頸動脈硬化と歯周病の関連についての系統的レビューとメタ解析

IMT あるいは頸動脈アテローム硬化と歯周組織検査の関連についての系統的レビューとメタ解析に関する文献報告は、3 編²⁰⁻²²⁾みられる (Table 1, 最終検索年月日: 2022 年 4 月 9 日)。

Orlandi ら²⁰⁾は 2014 年 1 月 31 日までに発表された報告から、9 編の横断研究^{23,31,36,37,39,40,43,45,46)}、7 編の症例対照研究^{29,30,33,34,41,42,44)}および 1 編の介入研究³⁵⁾を抽出した。続いて横断研究と症例対照研究については、メタ解析を実施した。その結果歯周病群は対照群と比較して、IMT が平均 0.08 mm {95% confidence interval: (CI)=0.07~0.09, p<0.0001} 有意に増加していた。また、横断研究と症例対照研究別のサブグループ解析でも同様の結果であった。さらに、研究ごとの患者背景や検査の違いから生じる異質性 (I^2) もみられなかった (p=0.922, $I^2=0.0\%$)。なおイタリアの大学病院で実施された、軽度から中等度歯周炎患者への介入研究³⁵⁾では、4 週以内の抗菌療法を併用した歯周基本治療後 6 カ月および 12 カ月において、IMT がベースライン時と比較して有意に改善したと報告されている。しかしながら、この研究³⁵⁾は対照群のない 35 名の前後比較試験であることから、より大規模な対照群を含めた研究が必要との結論にいたっている²⁰⁾。

Zeng ら²¹⁾は 2015 年 2 月 20 日までに発表された報告から、15 編の横断および症例対照研究^{23-27,30,32,38,41,45-50)}を抽出して解析した。その結果、歯周病であると頸動脈アテローム硬化の発症リスクが有意に増加していた {オッズ比 (odds ratio: OR)=1.27, 95%CI=1.14~1.41, p<0.001}。研究間の異質性は、有意に存在していた (p<

Table 1 Systematic reviews and meta-analyses of the association between carotid intima-media thickness or atherosclerosis and periodontal disease

Authors	Publication year	Study design	Date of last search for literature	Endpoint	Result	95% confidence interval	Reference	Primary references
Orlandi et al.	2014	Meta-analysis of 9 cross-sectional and 7 case-control studies and systematic review of 1 intervention study	Jan. 31, 2014	The mean difference in carotid intima-media thickness values in individuals with periodontitis compared to controls	0.08 (mm)	0.07 to 0.09 (mm)	20	23, 29-31, 33-37, 39-46
Zeng et al.	2016	Meta-analysis of 15 cross-sectional and case-control studies	Feb. 20, 2015	The risk for developing carotid atherosclerosis of periodontal disease	Odds ratio=1.27	1.14 to 1.41	21	23-27, 30, 32, 38, 41, 45-50
Wang et al.	2019	Meta-analysis of 17 cross-sectional and case-control studies	Jan. 30, 2019	The risk for developing carotid atherosclerosis of periodontitis	Odds ratio=1.39	1.24 to 1.56	22	23-25, 27-30, 32, 38, 41, 45-51

0.01, $I^2=78.9\%$). また喫煙と糖尿病を共変量として調整した6編^{26,30,32,45,49,50}のサブグループ解析では、有意水準境界線上であったことを報告している (OR=1.08, 95%CI=1.00~1.18, $p=0.051$).

Wangら²²⁾は、2019年1月30日までに末梢動脈疾患と歯周炎との関連を調査した文献から、25編の横断および症例対照研究に対してメタ解析を実施した。さらに、末梢動脈疾患は主に下肢動脈あるいは頸動脈である末梢動脈のアテローム性動脈硬化症と定義している報告^{52,53}を基に、頸動脈を対象とした17編^{23-25,27-30,32,38,41,45-51}のサブグループ解析を行った。その結果、歯周炎であると頸動脈アテローム硬化の発症リスクが有意に増加していた (OR=1.39, 95%CI=1.24~1.56, $p<0.001$)。研究間の異質性は有意に存在していた ($p<0.001$, $I^2=79.4\%$)。

2. 日本国内における頸動脈硬化と歯周病の横断研究

日本国内においても、IMTと歯周病の関連について実施された横断研究は5編^{46,54-57}みられる (Table 2, 最終検索年月日: 2022年4月9日)。これらの研究ではすべて、IMTの進展と歯周病において有意な関連がみられていた。

著者ら⁵⁵⁾は、2003年から2014年に北海道医療大学病院内科に通院中の脂質異常症患者のなかで、同歯科も受診し、頸動脈超音波検査を2回以上実施済みの52名を対象に横断研究を実施した。その結果、二項ロジスティック回帰分析では、max-IMT ≥ 1.1 mm群でPPD ≥ 6 mm歯数割合が中央値の4.16%を超えている、つまり上位50%群が有意に関連していた (OR=8.275, 95%CI=1.462~46.844, $p=0.017$)。また重回帰分析では、max-IMTの肥厚に対して現在歯数の減少が有意に関連していた {偏回帰係数=-0.014, 95%CI=-0.024~-0.003, $p=0.014$ }。

3. 頸動脈硬化と歯周病のコホート研究

頸動脈硬化と歯周病のコホート研究は、8編⁵⁸⁻⁶⁵みられる (Table 3, 最終検索年月日: 2022年4月9日)。結果は1編⁵⁸を除いて頸動脈硬化と歯周病は有意な関連がみられていた。日本で実施された研究は2編^{61,65}であった。

Kudoら⁶¹⁾は歯周外科を含む歯周治療を受けた患者について、サポートィブペリオドンタルセラピー (SPT) 開始時、SPT開始1年後および同3年後にIMTを測定したところ、全段階においてベースライン時より有意に改善していたことを報告している。69歳から71歳の日本の地域住民を対象にしたSONIC研究⁶⁵⁾では、ベースライン時のPPD ≥ 4 mm以上の存在は、3年後にアテローム性動脈硬化に相当するmax-IMT ≥ 1.1 mm以上と有意な関連がみられたことを報告している。

Table 2 Cross-sectional studies in Japan of the relationship between carotid intima-media thickness and periodontal disease

Authors (Study name)	Publica- tion year	Subjects	Age, mean± SD	Assesment method for periodontitis	Main results	Refer- ence
Hayashida et al. (The Nagasaki Islands study)	2013	1,053 subjects with 10 teeth or more in Goto City, Nagasaki Pre- fecture (394 men and 659 women)	Over 40, 63.5 ±10.0	PPD and CAL (both 2 sites per tooth)	Mean PPD was associated with a risk of max-IMT >1 mm (OR =1.430, 95% CI=1.067 to 1.918, p=0.017). Mean CAL was asso- ciated with a risk of max-IMT >1 mm (OR=1.251, 95% CI= 1.032 to 1.516, p=0.022).	46
Tada et al.(The SONIC study)	2017	468 participants in Itami City and Asago City, Hyogo Prefec- ture (male : 217, female : 251)	69 to 71	PPD(1 site per tooth)	Individuals with severe peri- odontal disease were signifi- cantly higher risk of max-IMT 1.1 mm or more than those with healthy periodontal tissues (OR=2.01, 95% CI=1.06 to 3.79, p=0.032).	54
Terada et al.	2018	52 dyslipidemia patients attending a university hospital(21 men and 31 women)	66.9±8.9	PPD and BOP (both 6 sites per tooth)	There was a significant associa- tion between max-IMT 1.1 mm or more and % of teeth with PPD 6 mm or more (more than 50 versus less than 50%) (OR =8.275, 95% CI=1.462 to 46.844, p=0.017).	55
Shimizu et al.	2019	907 people in Goto City, Nagasaki Pre- fecture (353 men and 554 women)	60 to 99,(72.1 ±7.0 : men, 71.3±6.8 : women)	PPD (2 sites per tooth)	The OR and 95% CI of PPD 6 mm or more were OR 2.01 and 95% CI 1.06 to 3.81 for partici- pants with max-IMT 1.1 mm or more.	56
Yamada et al. (The Ohasama study)	2022	602 community dwellers residing in Ohasama Town, Iwate Prefecture (male : 37.7%)	Over 55, 66.0 ±7.3	PPD, CAL (both 6 sites per tooth) and radiographic alveolar bone loss	In the multivariate model, regarding CDC/AAP classifica- tion, compared to those with no or mild periodontitis, OR (95% CI) for those with severe peri- odontitis were 4.26 (1.01 to 17.5).	57

Abbreviations : SD, standard deviation ; PPD, probing pocket depth ; CAL, clinical attachment level ; max-IMT, maximum-intima media thickness ; OR, odds ratio ; CI, confidence interval ; SONIC, Septuagenarian, Octogenarian, Nonagenarian Intervention with Centenarian ; BOP, bleeding on probing ; CDC/AAP, Centers for Disease Control/American Academy of Periodontology.

4. 頸動脈硬化に対する歯周治療の介入研究

頸動脈硬化に対する歯周治療の介入研究は、海外から3編^{35,66,67)}の報告がみられる (Table 4, 最終検索年月日 : 2022年4月9日)。

無作為比較試験である PerioCardio study⁶⁶⁾では、歯周炎のアボリジナルオーストラリアンズの参加者を、1回で全顎スケーリング・ルートプレーニング (SRP) を行う歯周治療群 138名と、口腔清掃指導のみの対照群 135

名に分けて12カ月追跡した。その結果、歯周治療群ではベースライン時と比較して、12カ月後のIMTが有意に改善していた。ブラジルの大学病院で実施された非無作為比較試験⁶⁷⁾では、23名の歯肉健全者群に口腔清掃指導を、21名の中等度から重度の歯周炎患者群に口腔清掃指導とSRPを実施した結果、両群ともに術後6カ月でIMTが術前よりも有意に改善していたことを報告している。

Table 3 Cohort studies of the relationship between carotid intima-media thickness and periodontal disease

Authors (Study name)	Publication year	Country	Study design	Subjects	Age, mean \pm SD or median	Assessment method for periodontitis	Follow-up period	Main results	Reference
Vernon et al.	2011	USA	Prospective	43 HIV-infected adults with 20 teeth or more (male : 77%)	Over 18, 38 \pm 8	PPD, REC, CAL and BOP (both 6 sites per tooth)	Median 24 months	Both PPD, REC, CAL or BOP were not significantly associated with IMT.	58
Desvarieux et al. (INVEST)	2013	USA	Prospective	420 residents in Manhattan, New York City. (male : 37%)	Over 55, 68 \pm 8	PPD and CAL (both 6 sites per tooth)	Median 3.1 years	Mean IMT increased during follow-up by 0.139 \pm 0.008 mm. Longitudinal IMT progression attenuated with improvement in clinical periodontal status.	59
Napora et al.	2016	Poland	Prospective	119 patients diagnosed with type 2 diabetes (67 men and 52 women)	Median 62	PPD, CAL, BOP (both 6 sites per tooth) and PCR	1 year	A multivariate analysis demonstrated a significant correlation between mean CAL and IMT change after one year ($\beta = 0.25$, $p = 0.011$).	60
Kudo et al. (Japanese prospective multicentre observational study)	2018	Japan	Prospective	104 medical or periodontal patients (male : 54, female : 50)	57.4 \pm 13.7	PPD, BOP (both 6 sites per tooth) and mobile teeth	Start of SPT, at 1 year and 3 years under SPT	During all stages of SPT, corresponding to improvements in % of positive BOP and average of PPD were decreased with periodontal treatment, max-IMT decreased significantly.	61
Pussinen et al. (the Cardiovascular Risk in Young Finns Study)	2019	Finland	Prospective	755 participants (male : 49.1%) in 1980 at age 6, 9, or 12 years and follow-up in adulthood in 2001 at age 27, 30, or 33 years and/or in 2007 at age 33, 36, or 39 years	8.07 \pm 2.00 (at baseline in 1980)	PPD and BOP {both 2 sites of 6 index teeth (16, 21, 24, 36, 41, and 44)}	21 and 27 years	In boys, periodontal disease (RR=1.69, 95% CI=1.21 to 2.36) were statistically significantly associated with the IMT 27 years later.	62
Tong et al.	2019	Taiwan	Retrospective double	726,300 periodontitis patients (male : 47.3%) and 726,300 controls (male : 47.0%) from the Taiwanese National Health Insurance Research Database	44.02 \pm 14.63 : periodontitis patients, 44.15 \pm 14.41 : controls	The ICD-9-CM code 523.4 was used to identify the patients with periodontitis	8.65 \pm 3.06 years : periodontitis patients, 8.59 \pm 3.08 years : controls	Multivariate Cox regression analysis indicated that the male group had significantly higher incidence risk of carotid atherosclerosis (log rank $p = 0.046$).	63
Wulandari et al.	2020	Indonesia	Prospective	32 HIV-infected adults (male : 59%) and 32 age-matched healthy controls (male : 56%)	Median 36	OHI-S and CPI	5 years	Multiple linear regression analysis showed that periodontitis and CMV antibody levels optimally predicted poor right and left IMT (adjusted $R^2 = 0.36$, $p = 0.0013$; adjusted $R^2 = 0.40$, $p = 0.001$, respectively).	64
Kitamura et al. (the SONIC study)	2021	Japan	Prospective	182 community-dwellers of Itami City and Asago City in Hyogo Prefecture (male : 70, female : 112)	69 to 71	PPD (6 sites per tooth)	3 years	It was revealed that the proportion of teeth with PPD 4 mm or more was independently associated with max-IMT 1.1 mm or more without any relationship to the other traditional risk factors for max-IMT 1.1 mm or more (OR=1.029, 95% CI=1.00 to 1.06, $p = 0.022$).	65

Abbreviations : SD, standard deviation ; HIV, human immunodeficiency virus ; PPD, probing pocket depth ; REC, gingival recession level ; CAL, clinical attachment level ; BOP, bleeding on probing ; IMT, intima-media thickness ; INVEST, the oral Infections and Vascular disease Epidemiology Study ; PCR, plaque control record ; β , partial regression coefficient ; SPT, supportive periodontal therapy ; max-IMT, maximum IMT ; RR, risk ratio ; CI, confidence interval ; ICD-9-CM, International Classification of Disease, Ninth Revision, Clinical Modification ; OHI-S, oral hygiene index-simplified ; CPI, community periodontal index ; CMV, cytomegalovirus ; R^2 , coefficient of determination ; SONIC, Septuagenarian, Octogenarian, Nonagenarian Intervention with Centenarian ; OR, odds ratio.

Table 4 Periodontal intervention studies for the development of carotid intima-media thickness

Authors (Study name)	Publication year	Country	Study design	Subjects	Age, mean±SD	Methods of periodontal intervention	Follow-up period	Main results	Reference
Piconi et al.	2009	Italy	One-group pretest-posttest	35 subjects (15 men and 20 women) affected by mild to moderate periodontitis	Mean 46.21	The anti-infective periodontal therapy included surgical debridement and was completed within 4 weeks.	6 and 12 months	The diminution in carotid IMT was observed as early as 6 months after treatment, persisted throughout the study period, and could be detected in multiple sites along the carotid axis.	35
Kapellas et al.(The Perio-Cardio study)	2014	Australia	Randomized controlled trial	273 Aboriginal Australians with periodontitis (treatments : 138, men 55.8%, controls : 135, men 60.0%)	Over 18, (treatment : 40.2±10.9, control : 40.3±9.6)	Intervention participants received full-mouth periodontal scaling during a single visit, whereas controls received no treatment.	3 and 12 months	IMT decreased significantly after 12 months in the intervention group {mean reduction = -0.023, 95% CI = -0.038 to -0.008 (mm)} but not in the control group {mean increase = 0.002, 95% CI = -0.017 to 0.022(mm)}. The difference in IMT change between treatment groups was statistically significant [-0.026, 95% CI = -0.048 to -0.003 (mm), p=0.03].	66
Toregeani et al.	2016	Brazil	Non-randomized controlled trial	23 healthy patients (group 1, men : 30.4%) and 21 patients with moderate to severe periodontitis (group 2, men : 22.7%)	Mean 39.81±7.98 (39/47 years in group 1 and 40.77 years in group 2)	All patients received oral hygiene instruction ; patients in group 2 also underwent supragingival and subgingival scaling and root planing.	6 and 12 months	A statistically significant improvement in clinical periodontal parameters occurred in both groups (p<0.05). Improvements were more evident between the first and second evaluations and were greater in group 2. Both groups experienced a statistically significant decrease in IMT in the first 6 months (p<0.05). Treatments oral hygiene instruction in group 1 and instruction plus mechanical periodontal instrumentation in group 2 were effective in improving clinical periodontal parameters of both groups and promoting reduction in IMT at 6 months.	67

Abbreviations : SD, standard deviation ; IMT, intima-media thickness ; CI, confidence interval.

おわりに

頸動脈硬化に対して行う頸動脈超音波検査と歯周病との関連報告は、以上の結果であった。メタ解析より、頸動脈硬化と歯周病の関連性はあるといえる。しかしながら、観察研究では因果関係を調べることは困難である。因果関係を調べるための介入研究では、歯周治療でIMT値が改善する傾向がみられるが、報告数が少なく、対象者の選択バイアスなども考慮して解釈する必要がある。近年では、24歳時の歯周炎が30歳時のIMT値へ関連しているかを、周辺構造モデル (marginal structural model) で統計解析した結果、30歳時の高感度CRP値の強い影響が原因で、有意な関連はみられなかった報告⁶⁸⁾もある。

今後はこの分野のエビデンスを明確にするためにも、さらにより質の高い、観察および介入研究が必要である。

文 献

- 1) Miller WD. The human mouth as a focus of infection. *Lancet* 1891; 138: 340-342.
- 2) Vaizey JM, Clark-Kennedy AE. Dental sepsis: Anaemia, dyspepsia, and rheumatism. *Br Med J* 1939; 1: 1269-1273.
- 3) Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen VV, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjäälä SL, Jungell PS, Isoluoma M, Hiitaniemi K, Jokinen MJ. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ* 1989; 298: 779-781.
- 4) Syrjänen J, Peltola J, Valtonen V, Iivanainen M, Kaste M, Huttunen JK. Dental infections in association with cerebral infarction in young and middle-aged men. *J Intern Med* 1989; 225: 179-184.
- 5) 日本動脈硬化学会. 動脈硬化性疾患予防のための脂質異常症診療ガイド 2018年版. 1版. 日本動脈硬化学会: 東京; 2018. 11-14, 148.
- 6) 半田伸夫. 頸動脈エコーによる動脈硬化性病変評価のガイドライン (案). *Neurosonology : 神経超音波医学* 2002; 15 : 20-33.
- 7) 山崎和久, 高橋直紀, 五味一博. 第1部 臨床研究からのエビデンス 1) 歯周病と血管障害 概説. 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. 10-11.
- 8) Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.
- 9) 日本動脈硬化学会. 動脈硬化性疾患予防ガイドライン 2017年版. 1版. 日本動脈硬化学会: 東京; 2017. 19-22.
- 10) 日本脳神経超音波学会・栓子検出と治療学会合同ガイドライン作成委員会. 頸部血管超音波検査ガイドライン.

- Neurosonology : 神経超音波医学 2006 ; 19 : 49-69.
- 11) 日本超音波医学会用語・診断基準委員会, 頸動脈超音波診断ガイドライン小委員会. 超音波による頸動脈病変の標準的評価法 2017 (2018年1月29日公示). https://www.jsum.or.jp/committee/diagnostic/pdf/jsum0515_guideline.pdf (2022年3月26日アクセス)
 - 12) Pignoli P, Tremoli E, Poli A, Oreste P, Paoletti R. Intimal plus medial thickness of the arterial wall: a direct measurement with ultrasound imaging. *Circulation* 1986; 74: 1399-1406.
 - 13) Homma S, Hirose N, Ishida H, Ishii T, Araki G. Carotid plaque and intima-media thickness assessed by b-mode ultrasonography in subjects ranging from young adults to centenarians. *Stroke* 2001; 32: 830-835.
 - 14) Barnett HJ, Taylor DW, Eliasziw M, Fox AJ, Ferguson GG, Haynes RB, Rankin RN, Clagett GP, Hachinski VC, Sackett DL, Thorpe KE, Meldrum HE, Spence JD. Benefit of carotid endarterectomy in patients with symptomatic moderate or severe stenosis. North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators. *N Engl J Med* 1998; 339: 1415-1425.
 - 15) Nezu T, Hosomi N, Aoki S, Matsumoto M. Carotid intima-media thickness for atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb* 2016; 23: 18-31.
 - 16) O'Leary DH, Polak JF, Kronmal RA, Manolio TA, Burke GL, Wolfson SK Jr. Carotid-artery intima and media thickness as a risk factor for myocardial infarction and stroke in older adults. Cardiovascular Health Study Collaborative Research Group. *N Engl J Med* 1999; 340: 14-22.
 - 17) del Sol AI, Moons KG, Hollander M, Hofman A, Koudstaal PJ, Grobbee DE, Breteler MM, Witteman JC, Bots ML. Is carotid intima-media thickness useful in cardiovascular disease risk assessment? The Rotterdam Study. *Stroke* 2001; 32: 1532-1538.
 - 18) Lorenz MW, Markus HS, Bots ML, Rosvall M, Sitzer M. Prediction of clinical cardiovascular events with carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Circulation* 2007; 115: 459-467.
 - 19) Kitamura A, Iso H, Imano H, Ohira T, Okada T, Sato S, Kiyama M, Tanigawa T, Yamagishi K, Shimamoto T. Carotid intima-media thickness and plaque characteristics as a risk factor for stroke in Japanese elderly men. *Stroke* 2004; 35: 2788-2794.
 - 20) Orlandi M, Suvan J, Petrie A, Donos N, Masi S, Hingorani A, Deanfield J, D'Aiuto F. Association between periodontal disease and its treatment, flow-mediated dilatation and carotid intima-media thickness: a systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* 2014; 236: 39-46.
 - 21) Zeng XT, Leng WD, Lam YY, Yan BP, Wei XM, Weng H, Kwong JS. Periodontal disease and carotid atherosclerosis: A meta-analysis of 17,330 participants. *Int J Cardiol* 2016; 203: 1044-1051.
 - 22) Wang J, Geng X, Sun J, Zhang S, Yu W, Zhang X, Liu H. The risk of periodontitis for peripheral vascular disease: a systematic review. *Rev Cardiovasc Med* 2019; 20: 81-89.
 - 23) Beck JD, Elter JR, Heiss G, Couper D, Mauriello SM, Offenbacher S. Relationship of periodontal disease to carotid artery intima-media wall thickness: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 1816-1822.
 - 24) Persson RE, Hollender LG, Powell VL, MacEntee M, Wyatt CC, Kiyak HA, Persson GR. Assessment of periodontal conditions and systemic disease in older subjects. II. Focus on cardiovascular diseases. *J Clin Periodontol* 2002; 29: 803-810.
 - 25) Ravon NA, Hollender LG, McDonald V, Persson GR. Signs of carotid calcification from dental panoramic radiographs are in agreement with Doppler sonography results. *J Clin Periodontol* 2003; 30: 1084-1090.
 - 26) Desvarieux M, Schwahn C, Völzke H, Demmer RT, Lüdemann J, Kessler C, Jacobs DR Jr, John U, Kocher T. Gender differences in the relationship between periodontal disease, tooth loss, and atherosclerosis. *Stroke* 2004; 35: 2029-2035.
 - 27) Engebretson SP, Lamster IB, Elkind MS, Rundek T, Serman NJ, Demmer RT, Sacco RL, Papapanou PN, Desvarieux M. Radiographic measures of chronic periodontitis and carotid artery plaque. *Stroke* 2005; 36: 561-566.
 - 28) Desvarieux M, Demmer RT, Rundek T, Boden-Albala B, Jacobs DR Jr, Sacco RL, Papapanou PN. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Circulation* 2005; 111: 576-582.
 - 29) Leivadaros E, van der Velden U, Bizzarro S, ten Heggeler JM, Gerdes VE, Hoek FJ, Nagy TO, Scholma J, Bakker SJ, Gans RO, ten Cate H, Loos BG. A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. *J Periodontol* 2005; 76: 121-128.
 - 30) Söder PO, Söder B, Nowak J, Jogestrand T. Early carotid atherosclerosis in subjects with periodontal diseases. *Stroke* 2005; 36: 1195-1200.
 - 31) Franek E, Blaschkyk R, Kolonko A, Mazur-Psonka L, Łanowska-Adamczyk H, Kokot F, Wiecek A. Chronic periodontitis in hemodialysis patients with chronic kidney disease is associated with elevated serum C-reactive protein concentration and greater intima-media thickness of the carotid artery. *J Nephrol* 2006; 19: 346-351.
 - 32) Schillinger T, Kluger W, Exner M, Mlekusch W, Sabeti S, Amighi J, Wagner O, Minar E, Schillinger M. Dental and periodontal status and risk for progression of carotid atherosclerosis: the inflammation and carotid

- artery risk for atherosclerosis study dental substudy. *Stroke* 2006; 37: 2271-2276.
- 33) Söder B, Yakob M, Nowak J, Jogestrand T. Risk for the development of atherosclerosis in women with a high amount [corrected] of dental plaque and severe gingival inflammation. *Int J Dent Hyg* 2007; 5: 133-138. Erratum in: *Int J Dent Hyg* 2009; 7: 79. Nowak J [added]; Jogestrand T [added].
 - 34) Cairo F, Castellani S, Gori AM, Nieri M, Baldelli G, Abbate R, Pini-Prato GP. Severe periodontitis in young adults is associated with sub-clinical atherosclerosis. *J Clin Periodontol* 2008; 35: 465-472.
 - 35) Piconi S, Trabattoni D, Luraghi C, Perilli E, Borelli M, Pacei M, Rizzardini G, Lattuada A, Bray DH, Catalano M, Sparaco A, Clerici M. Treatment of periodontal disease results in improvements in endothelial dysfunction and reduction of the carotid intima-media thickness. *FASEB J* 2009; 23: 1196-1204.
 - 36) Li X, Tse HF, Yiu KH, Jia N, Chen H, Li LS, Jin L. Increased levels of circulating endothelial progenitor cells in subjects with moderate to severe chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2009; 36: 933-939.
 - 37) Ylöstalo P, Anttila S, Rajala U, Päivänsalo M, Keinänen-Kiukaanniemi S, Sakki T, Knuutila M. Periodontal infection and subclinical atherosclerosis: the role of high-density lipoprotein as a modifying factor. *J Clin Periodontol* 2010; 37: 617-624.
 - 38) Carallo C, Fortunato L, de Franceschi MS, Irace C, Tripolino C, Cristofaro MG, Giudice M, Gnasso A. Periodontal disease and carotid atherosclerosis: are hemodynamic forces a link?. *Atherosclerosis* 2010; 213: 263-267.
 - 39) Vieira CL, Cury PR, Miname MH, Martinez LR, Bortolotto LA, Giuliano IB, Santos RD, Caramelli B. Severe periodontitis is associated with diastolic blood pressure elevation in individuals with heterozygous familial hypercholesterolemia: a pilot study. *J Periodontol* 2011; 82: 683-688.
 - 40) Li P, Zhang DK, Zhang JR, Chen L. Detection of the parameters for early atherosclerosis in patients with metabolic syndrome and periodontitis. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban/J Peking Univ Health Sci* 2011; 43: 34-39. (in Chinese)
 - 41) Lopez-Jornet P, Berna-Mestre JD, Berna-Serna JD, Camacho-Alonso F, Fernandez-Millan S, Reus-Pintado M. Measurement of atherosclerosis markers in patients with periodontitis: a case-control study. *J Periodontol* 2012; 83: 690-698.
 - 42) Zahnd G, Vray D, Serusclat A, Alibay D, Bartold M, Brown A, Durand M, Jamieson LM, Kapellas K, Maple-Brown LJ, O'Dea K, Moulin P, Celermajer DS, Skilton MR. Longitudinal displacement of the carotid wall and cardiovascular risk factors: associations with aging, adiposity, blood pressure and periodontal disease independent of cross-sectional distensibility and intima-media thickness. *Ultrasound Med Biol* 2012; 38: 1705-1715.
 - 43) Franek E, Januszkiewicz-Caulier J, Błach A, Napora M, Jedynasty K, Budlewski T, Gozdowski D, Górska R. Intima-media thickness and other markers of atherosclerosis in patients with type 2 diabetes and periodontal disease. *Kardiol Pol* 2012; 70: 7-13.
 - 44) Puhar I, Lovrencic-Huzjan A, Sodec-Simicevic D, Strineka M, Bozic D, Plancak D. Carotid intima-media thickness in patients with chronic and aggressive periodontitis. *Debljina intime-medije karotidnih arterija kod pacijenata s kronicnim i agresivnim parodontitisom*. *Acta Stomatol Croat* 2012; 46: 255-262. (in Croatian, English)
 - 45) Pinho MM, Faria-Almeida R, Azevedo E, Manso MC, Martins L. Periodontitis and atherosclerosis: an observational study. *J Periodontol Res* 2013; 48: 452-457.
 - 46) Hayashida H, Saito T, Kawasaki K, Kitamura M, Furu-gen R, Iwasaki T, Hayashida Y, Nakazato M, Sekita T, Takamura N, Maeda T. Association of periodontitis with carotid artery intima-media thickness and arterial stiffness in community-dwelling people in Japan: the Nagasaki Islands study. *Atherosclerosis* 2013; 229: 186-191.
 - 47) Wożakowska-Kapłon B, Włosowicz M, Gorczyca-Michta I, Górska R. Oral health status and the occurrence and clinical course of myocardial infarction in hospital phase: a case-control study. *Cardiol J* 2013; 20: 370-377.
 - 48) Ramesh A, Soroushian S, Ganguly R. Coincidence of calcified carotid atheromatous plaque, osteoporosis, and periodontal bone loss in dental panoramic radiographs. *Imaging Sci Dent* 2013; 43: 235-243.
 - 49) Jung YS, Shin MH, Kim IS, Kweon SS, Lee YH, Kim OJ, Kim YJ, Chung HJ, Kim OS. Relationship between periodontal disease and subclinical atherosclerosis: the Dong-gu study. *J Clin Periodontol* 2014; 41: 262-268.
 - 50) Yu H, Qi LT, Liu LS, Wang XY, Zhang Y, Huo Y, Luan QX. Association of carotid intima-media thickness and atherosclerotic plaque with periodontal status. *J Dent Res* 2014; 93: 744-751.
 - 51) Ahn YB, Shin MS, Han DH, Sukhbaatar M, Kim MS, Shin HS, Kim HD. Periodontitis is associated with the risk of subclinical atherosclerosis and peripheral arterial disease in Korean adults. *Atherosclerosis* 2016; 251: 311-318.
 - 52) Criqui MH, Aboyans V. Epidemiology of peripheral artery disease. *Circ Res* 2015; 24: 116: 1509-1526. Erratum in: *Circ Res* 2015; 19: 117: e12.
 - 53) Gerhard-Herman MD, Gornik HL, Barrett C, Barshes NR, Corriere MA, Drachman DE, Fleisher LA, Fowkes FGR, Hamburg NM, Kinlay S, Lookstein R, Misra S,

- Mureebe L, Olin JW, Patel RAG, Regensteiner JG, Schanzer A, Shishehbor MH, Stewart KJ, Treat-Jacobson D, Walsh E. 2016 AHA/ACC guideline on the management of patients with lower extremity peripheral artery disease: a report of the American college of cardiology/American heart association task force on clinical practice guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2017; 69: e71-e126. doi : 10.1016/j.jace.2016.11.007. Erratum in: *J Am Coll Cardiol* 2017; 69: 1521.
- 54) Tada S, Ikebe K, Kamide K, Gondo Y, Inomata C, Takeshita H, Matsuda KI, Kitamura M, Murakami S, Kabayama M, Oguro R, Nakama C, Kawai T, Yamamoto K, Sugimoto K, Shintani A, Ishihara T, Arai Y, Masui Y, Takahashi R, Rakugi H, Maeda Y. Relationship between atherosclerosis and occlusal support of natural teeth with mediating effect of atheroprotective nutrients: From the SONIC study. *PLoS One* 2017; 12: e0182563. doi : 10.1371/journal.pone.0182563
- 55) 寺田 裕, 長澤敏行, 小西ゆみ子, 尾立達治, 森 真理, 舞田健夫, 森谷 満, 井出 肇, 辻 昌宏, 川上智史, 古市保志. 脂質異常症患者における残存歯数および重度歯周炎と頸動脈内中膜厚との関連性. *日歯保存誌* 2018; 61 : 132-144.
- 56) Shimizu Y, Yamanashi H, Kitamura M, Furugen R, Iwasaki T, Fukuda H, Hayashida H, Kawasaki K, Kiyoura K, Kawashiri SY, Saito T, Kawakami A, Maeda T. Association between human T cell leukemia virus type-1 (HTLV-1) infection and advanced periodontitis in relation to atherosclerosis among elderly Japanese: a cross-sectional study. *Environ Health Prev Med* 2019; 24: 81. doi : 10.1186/s12199-019-0836-2
- 57) Yamada S, Komiyama T, Ohi T, Murakami T, Miyoshi Y, Endo K, Hiratsuka T, Hara A, Satoh M, Tatsumi Y, Inoue R, Asayama K, Kikuya M, Hozawa A, Metoki H, Imai Y, Ohkubo T, Hattori Y. Regular dental visits, periodontitis, tooth loss, and atherosclerosis: The Ohasama study. *J Periodontal Res* 2022; 57: 615-622.
- 58) Vernon LT, Babineau DC, Demko CA, Lederman MM, Wang X, Toossi Z, Weinberg A, Rodriguez B. A prospective cohort study of periodontal disease measures and cardiovascular disease markers in HIV-infected adults. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2011; 27: 1157-1166.
- 59) Desvarieux M, Demmer RT, Jacobs DR, Papapanou PN, Sacco RL, Rundek T. Changes in clinical and microbiological periodontal profiles relate to progression of carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology study. *J Am Heart Assoc* 2013; 2: e000254. doi : 10.1161/JAHA.113.000254
- 60) Napora M, Grabowska E, Górska R. Prospective analysis of the relationship between the state of periodontal tissues and changes in selected cardiovascular parameters in patients with type 2 diabetes. *Adv Clin Exp Med* 2016; 25: 879-886.
- 61) Kudo C, Shin WS, Sasaki N, Harai K, Kato K, Seino H, Goke E, Fujino T, Kuribayashi N, Pearce YO, Taira M, Matsushima R, Minabe M, Takashiba S; Periodontitis and Atherosclerosis Project-Tokyo and Chiba Consortiums. Effects of periodontal treatment on carotid intima-media thickness in patients with lifestyle-related diseases: Japanese prospective multicentre observational study. *Odontology* 2018; 106: 316-327. Erratum in: *Odontology* 2018; 106: 349.
- 62) Pussinen PJ, Paju S, Koponen J, Viikari JSA, Taittonen L, Laitinen T, Burgner DP, Kähönen M, Hutri-Kähönen N, Raitakari OT, Juonala M. Association of childhood oral infections with cardiovascular risk factors and subclinical atherosclerosis in adulthood. *JAMA Netw Open* 2019; 2: e192523. doi : 10.1001/jamanetworkopen.2019.2523
- 63) Tong C, Wang YH, Chang YC. Increased risk of carotid atherosclerosis in male patients with chronic periodontitis: A nationwide population-based retrospective cohort study. *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16: 2635. doi : 10.3390/ijerph16152635
- 64) Wulandari EAT, Wijaya IP, Karim B, Ariyanto I, Tanudjaja SA, Lee S, Price P. Periodontitis and cytomegalovirus associate with atherosclerosis among HIV patients after 5 years on ART. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2020; 85: 195-200.
- 65) Kitamura M, Ikebe K, Kamide K, Gondo Y, Yamashita M, Takedachi M, Nozaki T, Fujihara C, Yamada S, Kashiwagi Y, Miki K, Iwayama T, Hatta K, Mihara Y, Kurushima Y, Takeshita H, Kabayama M, Oguro R, Kawai T, Akasaka H, Takeya Y, Yamamoto K, Sugimoto K, Ishizaki T, Arai Y, Masui Y, Takahashi R, Rakugi H, Maeda Y, Murakami S. Association of periodontal disease with atherosclerosis in 70-year-old Japanese older adults. *Odontology* 2021; 109: 506-513.
- 66) Kapellas K, Maple-Brown LJ, Jamieson LM, Do LG, O'Dea K, Brown A, Cai TY, Anstey NM, Sullivan DR, Wang H, Celermajer DS, Slade GD, Skilton MR. Effect of periodontal therapy on arterial structure and function among Aboriginal Australians: a randomized, controlled trial. *Hypertension* 2014; 64: 702-708.
- 67) Toregeani JF, Nassar CA, Nassar PO, Toregeani KM, Gonzatto GK, Vendrame R, Castilhos JS, Rotta LS, Reinheimer AC, Longoni A, Barcella MW. Evaluation of periodontitis treatment effects on carotid intima-media thickness and expression of laboratory markers related to atherosclerosis. *Gen Dent* 2016; 64: 55-62.
- 68) Leite FRM, Nascimento GG, Peres KG, Demarco FF, Horta BL, Peres MA. Collider bias in the association of periodontitis and carotid intima-media thickness. *Community Dent Oral Epidemiol* 2020; 48: 264-270.

歯根肉芽腫中でのカルシウム結合タンパク S100A8 と S100A9 の発現

田村 隆 仁¹ 宮田 泰 伎¹ 氷見 一 馬¹ 羽鳥 啓 介^{1,2}
中村 健 志¹ 清水 康 平^{1,2} 鈴木 裕 介^{1,2} 蓮池 聡^{2,3}
井上 聖 也¹ 岡田 將 司¹ 藪原 佑季子¹ 勝呂 尚^{1,2}
正覺 泰 佑¹ 安川 拓 也^{1,2} 林 誠^{1,2} 武市 収^{1,2}

¹日本大学歯学部歯科保存学教室歯内療法学講座

²日本大学歯学部総合歯学研究所高度先端医療研究部門

³日本大学歯学部歯科保存学教室歯周病学講座

抄録

目的：根尖性歯周炎は、感染根管に起因した二次的病変として発症するリンパ球活性の増進、炎症性細胞の遊走や浸潤および破骨細胞の活性化を伴う根尖周囲の炎症性疾患で、疼痛や根尖部歯肉の腫脹など、さまざまな臨床症状を引き起こす。これまでに、根尖性歯周炎の病態を解明することを目的として、サイトカインや成長因子のようなさまざまな炎症性メディエーターの関与について研究が行われてきているが、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では歯根肉芽腫の病態を解明することを目的として、慢性炎症性疾患の病態に関与することが報告されているカルシウム結合タンパク S100A8 と S100A9 に着目し、両タンパクの歯根肉芽腫と健常歯肉におけるタンパクおよび遺伝子発現の検索を行った。

材料と方法：日本大学歯学部付属歯科病院歯内療法科に来院し、根尖性歯周炎と診断され歯根尖切除法が適応とされた患者から根尖病変組織を採取した。採取した試料はただちに二分割し、一方を10%ホルマリンで固定およびパラフィン切片の作製後、病理組織学的検索を行った。加えて、病理組織学的検索の結果、歯根肉芽腫と診断した試料を用いて、免疫組織化学的検索を行った。他方は、OCT コンパウンドに包埋し、ドライアイス-アセトンで凍結した後、real-time polymerase chain reaction (PCR) 法による遺伝子発現の検索を行った。また、健常歯肉組織は埋伏智歯抜歯時に採取し、根尖性歯周炎と同様に検索を行った。なお、被験者に対して試料を本実験に使用することを説明し、文書にて同意を得た後に試料採取を行った (EP18D014)。

成績：病理組織学的検索の結果、採取した44例の根尖病変組織のうち、32例は歯根肉芽腫、12例は歯根嚢胞であった。次に歯根肉芽腫組織と健常歯肉組織に対して、蛍光標識した抗体を用いて免疫組織化学的検索を行った結果、健常歯肉中ではS100A8 と S100A9 タンパクの発現を認めなかったが、歯根肉芽腫では両タンパクの発現を認めた。また、real-time PCR 法を用いて検索した結果、健常歯肉と比較して歯根肉芽腫では有意に高いS100A8 と S100A9 遺伝子の発現を認めた。

結論：慢性炎症性疾患である歯根肉芽腫中でS100A8 およびS100A9 が発現し、S100A8 およびS100A9 は慢性炎症性疾患においてその病態に関与していることから、口腔内の慢性炎症性疾患である歯根肉芽腫においても病態の調節に関与している可能性が示唆された。

キーワード：歯根肉芽腫, S100A8, S100A9

責任著者連絡先：羽鳥啓介

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13 日本大学歯学部歯科保存学教室歯内療法学講座

TEL : 03-3219-8142, FAX : 03-3219-8348, E-mail : hatori.keisuke@nihon-u.ac.jp

受付：2022年3月4日/受理：2022年4月12日

DOI : 10.11471/shikahozon.65.198

緒言

根尖性歯周炎は、感染根管に起因した病変として発症し、炎症性細胞の遊走および破骨細胞の活性化を伴う根尖周囲の炎症性疾患である¹⁻³⁾。これまでに、根尖性歯周炎の病態解明を目的としてサイトカインや成長因子などの炎症性メディエーターの関与に関するさまざまな研究が行われてきた。著者らの所属する講座においても根尖性歯周炎の病態解明のために同様の研究が行われてきたが、その詳細はいまだに明らかにされていない⁴⁻⁶⁾。

カルシウム結合タンパク S100 (S100 タンパク) はさまざまな細胞から発現され、25 種類のサブクラスが報告されている^{7,8)}。近年の研究で、S100 ファミリーのなかでも S100A4, S100A8 および S100A9 は健常者に比べ、慢性炎症性疾患である関節リウマチ患者の血清中とリウマチ組織中で高く発現し、その病態調節に関与していることが報告されている⁸⁻¹¹⁾。著者ら¹²⁾は、S100 ファミリーの一種である S100A4 が歯根肉芽腫中で発現し、その病態へ関与していることを報告した。一方、S100A8 と S100A9 は全身の炎症組織内において好中球・マクロファージに発現し、その病態に関与していることが報告されている¹³⁾が、歯根肉芽腫での S100A8 と S100A9 の発現は明らかにされていない。

これらのことから、S100A8 と S100A9 が口腔内の慢性炎症性疾患である歯根肉芽腫においてもその病態に関与している可能性があると思われる。しかしながら歯根肉芽腫における S100A8 および S100A9 の発現は報告されていないことから、本研究では免疫組織化学的検索および real-time polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて、S100A8 と S100A9 局在の検索を行うこととした。

材料および方法

1. 試料の採取

日本大学歯学部付属歯科病院歯内療法科を受診し、診査によって根尖性歯周炎と診断され、歯根尖切除術あるいは抜歯が適応とされた患者から根尖病巣を採取した。健常歯肉は、埋伏智歯の抜歯を目的に日本大学歯学部付属歯科病院口腔外科を受診した患者から採取した。試料採取にあたっては、採取方法、術中・術後の不快症状と使用目的を口頭で説明し、書面による同意を得た。根尖病巣を採取した患者は、32 歳から 64 歳までの 44 名 (男性 26 名, 女性 18 名) であった。健常歯肉を採取した患者は、25 歳から 37 歳までの 5 名 (男性 3 名, 女性 2 名) であった。なお本研究は、日本大学歯学部倫理委員会の承認を得ている (EP18D014)。

2. 組織切片の調製

採取した組織はただちに 2 分割し、一方を通法に従って 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、パラフィン包埋し、薄切切片を作製した。他方は、real-time PCR 法に使用するため、OCT コンパウンドに包埋後、ドライアイス-アセトンで凍結し、凍結試料を作製した。

3. 病理組織学的検索

採取したすべての組織の薄切切片に対して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、病理組織学的に歯根肉芽腫と診断したものを本実験に供試した。健常歯肉についても同様に検索を行った。

4. 蛍光二重免疫染色法

歯根肉芽腫および健常歯肉の薄切切片を 10% 正常ウサギ血清 (Vectastain, Vector Laboratories, USA) で 20 分間ブロッキングした後、抗ヒト S100A8 マウスモノクローナル抗体 (Aviva systems biology, USA) と抗ヒト S100A9 ウサギモノクローナル抗体 (Abcam, UK) を用いて 1 時間インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水で洗浄した後、fluorescein isothiocyanate 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Abcam), rhodamine isothiocyanate 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Abcam) および 4',6-diamidino-2-phenylindole, 2 dihydrochloride (Vector Laboratories) を同時に用いてインキュベートした。洗浄後、切片を水溶性マウント溶液 (Vectashield, Vector Laboratories) にて封入し、蛍光顕微鏡 (E-600, ニコン) 下で観察を行った。

5. RNA 抽出および real-time PCR 法

歯根肉芽腫 (n=32) および健常歯肉 (n=5) の凍結切片に 1 ml の Trizol (Invitrogen, USA) を加え、RNA の採取を行った後、cDNA 合成キット (Prime Script RT reagent kit, タカラバイオ) を用いて相補的 DNA を合成した。次いで、PCR プライマー (Table 1) と real-time PCR 用スタンダード試薬 (TB Green Premix Ex Taq, タカラバイオ) を使用し、Smart Cycler (Cepheid, USA) を用いて業者指定の増幅条件で PCR 反応を行った。なお、S100A8 と S100A9 遺伝子の発現量は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) 遺伝子発現量を用いて、標準化を行った。

6. 統計学的分析

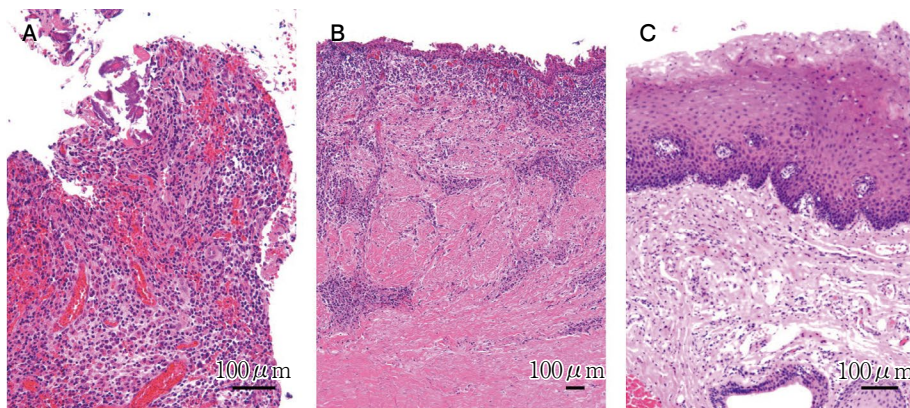
Real-time PCR を用いて得られた歯根肉芽腫と健常歯肉における標的遺伝子発現量に対して、Mann-Whitney U test を用いて有意水準 5% 未満で統計学的分析を行った。

結果

薄切標本を病理組織学的に検討した結果、採取した 44

Table 1 PCR primers used in this study

Gene	Primer sequence	GenBank accession number
S100A8	Forward 5'-GTGTCCACCTTCCACAAATACTCA-3'	NM_002961
	Reverse 5'-ACTTCATTGTCCCTGTTGCTGTC-3'	
S100A9	Forward 5'-TCATGGAGGACCTGGACACAAA-3'	NM_002965
	Reverse 5'-GCAGCTTCTCATGACAGGCAAA-3'	
GAPDH	Forward : 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAA-3'	NR_152150
	Reverse : 5'-ATGGTGTTGAAGACGCCAGT-3'	

**Fig. 1** Histological examination of periapical lesions and healthy gingival tissues stained using hematoxylin and eosin

(A) Periapical granulomas showing rich blood vessels and inflammatory cell infiltration, (B) radicular cysts with epithelial cell lining, and (C) healthy gingival tissues.

例のうち 32 例で著明な炎症性細胞浸潤と肉芽組織を認め、歯根肉芽腫と診断した (Fig. 1A)。他の 12 例は嚢胞腔と裏層上皮を認め、歯根嚢胞と診断し (Fig. 1B)、本研究から除外した。また、採取した健常歯肉 5 例については、炎症性細胞浸潤がほぼないことを確認し、対照群とした (Fig. 1C)。

作製した薄切片を用いて蛍光二重免疫染色法を行った結果、歯根肉芽腫中の炎症性細胞において、S100A8 と S100A9 の共発現を認めた (Fig. 2)。陽性細胞率は S100A8 が 66.4%、S100A9 が 48.7%、共発現率が 29.0% と、約半数が共発現を示す結果となった。一方、健常歯肉中では S100A8 および S100A9 の発現は認められなかった (Fig. 3)。

歯根肉芽腫と健常歯肉中での S100A8 と S100A9 遺伝子の発現量を検索する目的で Real time PCR 法を行った。その結果、すべてのサンプル中で S100A8 と S100A9 遺伝子発現を認め、その発現量は歯根肉芽腫で健常歯肉と比較して有意に高かった (Fig. 4)。また、Pearson の相関係数を算出したところ S100A8 および S100A9 との間に有意な正の相関を認めた (Fig. 5)。

考 察

根尖性歯周炎は、感染根管に起因した口腔常在菌や感染歯髄の分解産物などによって発症し、好中球の浸潤により膿瘍が形成される。活動期から修復期へと移行すると、膿瘍はマクロファージなどの炎症性細胞が浸潤した肉芽組織に置き換わって歯根肉芽腫となる¹⁻³⁾。しかしながら、歯根肉芽腫の成立に関して、さまざまな炎症性メディエーターが関与していることが報告されているが、その詳細は明らかにされていない。そこで、S100A8 と S100A9 に着目し、歯根肉芽腫での発現を検索することを目的として本研究を行った。

蛍光二重免疫染色において、歯根肉芽腫中で S100A8 と S100A9 の発現が認められたが、健常歯肉中では認められなかった。加えて、real-time PCR 法によって、歯根肉芽腫における S100A8 と S100A9 遺伝子の発現が健常歯肉よりも有意に高いことが明らかになった。以前の研究において、IL-1 β と IL-10 は線維芽細胞やマクロファージにおける S100A8 の発現を促進することが報告

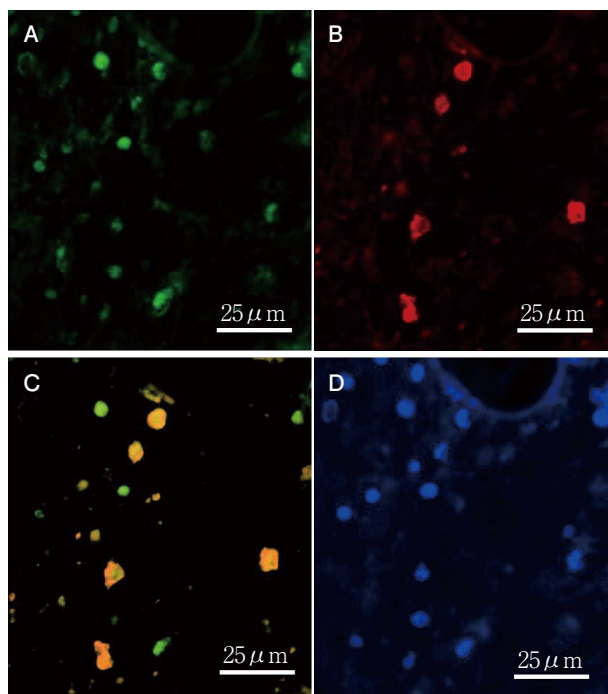


Fig. 2 Two-color immunofluorescence image analysis of periapical granulomas
(A) Staining with anti-human mouse S100A8 monoclonal antibody. (B) Staining with anti-human rabbit S100A9 monoclonal antibody. (C) Merged images. (D) Nuclear counterstaining with 4',6-diamidino-2-phenylindole.

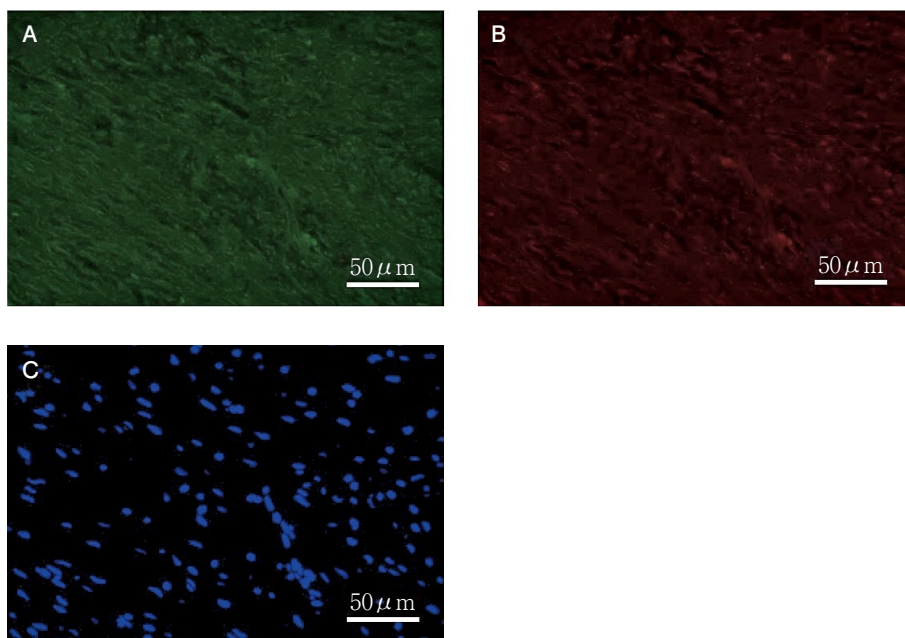


Fig. 3 Two-color immunofluorescence image analysis of healthy gingival tissues
(A) Staining with anti-human mouse S100A8 monoclonal antibody. (B) Staining with anti-human rabbit S100A9 monoclonal antibody. (C) Nuclear counterstaining with 4',6-diamidino-2-phenylindole.

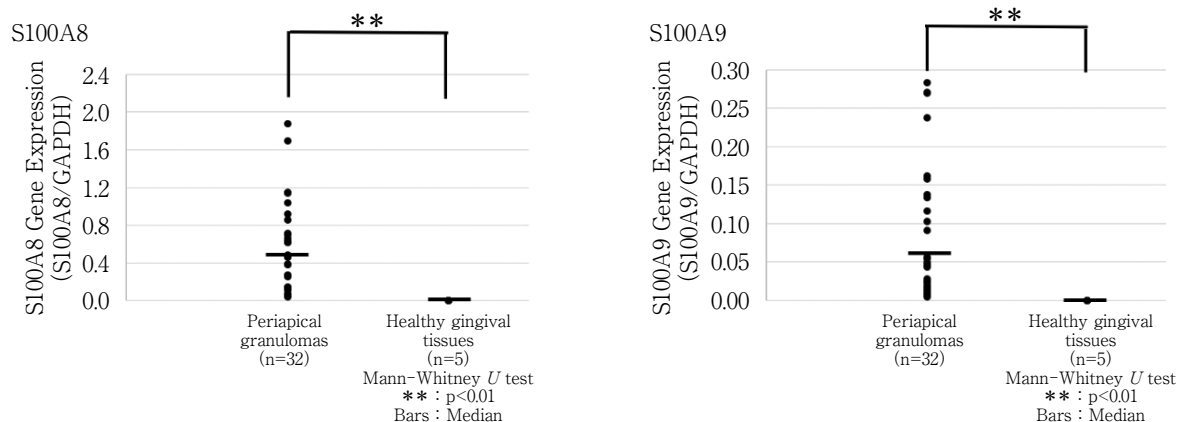


Fig. 4 Real-time polymerase chain reaction analysis for S100A8 and S100A9 mRNA expression in periapical granulomas and healthy gingival tissues

The value for (A) S100A8 and (B) S100A9 mRNA expression was divided by that for GAPDH expression. All mRNA expressions in PGs were significantly higher than those in HGTs. ** : $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test).

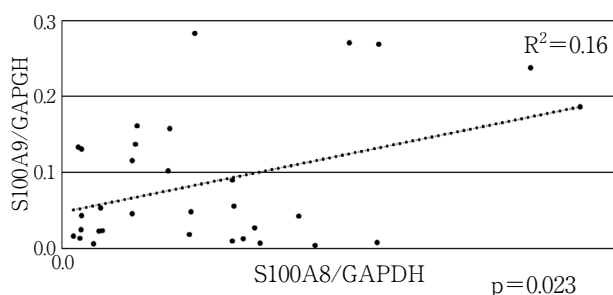


Fig. 5 Real-time PCR and Pearson's correlation coefficient analysis were performed to compare the mRNA expression of S100A8 with S100A9 in human periapical granulomas

A positive correlation between the expression of S100A8 and S100A9 ($p = 0.023$, $R^2 = 0.16$) was noted.

されている^{14,15}。Kangら¹⁵は肺の上皮細胞を S100A8 で刺激することによって、NF- κ B を活性化することを明らかにした。さらに Gebhardt らは、TNF- α と IL-1 によって、S100A8 発現を強く促進することを報告した¹⁶。また、ヒト単球を *Porphyromonas gingivalis* から抽出したりポ多糖、TNF- α および IL-1 β を用いて刺激したところ、S100A8 と S100A9 の発現が促進するとの報告がある¹⁷。また、S100A8 と S100A9 は慢性炎症である関節リウマチ中で発現し、その病態に関与していることが報告されている¹⁸。S100A8 と S100A9 は感染性疾患や自己免疫疾患中で Toll-like receptor 4 との相互作用を介して初期免疫反応に関与していることも知られている¹⁹。このことから歯根肉芽腫中で炎症性メディエーターにより刺激された炎症性細胞から S100A8 と S100A9 が発現さ

れ、炎症の惹起や調節に関与している可能性がある。一方、著者¹²らは歯根肉芽腫中で S100A4 が発現し、IL-1 β と TNF- α 発現に関与している可能性があることを報告している。IL-1 β と TNF- α が炎症を増悪させる働きをもつことは、広く知られている。S100A4 は、S100ファミリーである S100A8 と S100A9 発現を上昇させる調節因子として知られている^{20,21}。このことから、S100A8 と S100A9 は炎症の増悪に関与していることが考えられる。しかしながら、単球の cell line である THP-1 に S100A8 と S100A9 により刺激を行うと、IL-10 の発現が上昇したとの報告がある²²。IL-10 は抗炎症作用をもつ炎症性メディエーターであることから、S100A8 と S100A9 は歯根肉芽腫中で炎症を抑制する働きも併せもっている可能性もある。

以上のことから、歯根肉芽腫において発現した S100A8 および S100A9 は炎症性メディエーターを介して、その病態に関与している可能性が示唆された。

結 論

S100A8 および S100A9 は歯根肉芽腫中で共発現しており、その遺伝子発現も健常歯肉中よりも有意に高かった。このことから、S100A8 と S100A9 は歯根肉芽腫中で発現すること、また慢性炎症性疾患における S100A8 および S100A9 の機能の報告より、その成因に関与している可能性が示唆された。

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006; 39: 249-281.
- 2) Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol* 2000 1997; 13: 121-148.
- 3) Lin L, Huang GTJ. Pathobiology of apical periodontitis. Berman LH, Hargreaves KM, Cohen S, Burns RC. Cohen's pathways of the pulp. 11th ed. Mosby Elsevier: St. Louis; 2016. 630-659.
- 4) Hama S, Takeichi O, Fujisaki K, Tanabe N, Maeno M, Ochiai K. Nitric oxide attenuates vascular endothelial cadherin-mediated vascular integrity in human chronic inflammation. *Clin Exp Immunol* 2008; 154: 384-390.
- 5) Hatori K, Takeichi O, Ogiso B, Maeno M, Komiyama K. Midkine expression in human periapical granulomas. *J Endod* 2011; 37: 781-785.
- 6) Ishii K, Tamura T, Hatori K, Himi K, Nakamura T, Toyama Y, Miyata T, Takeichi O. Elevated Foxo3a and Fas-ligand expression in human periapical granulomas as a potential treatment target. *Oral Dis* 2021; DOI: 10.1111/odi.14052 [Online ahead of print].
- 7) Moore BW. Chemistry and biology of two brain-specific proteins, s-100 and 14-3-2. *Adv Exp Med Biol* 1972; 32: 5-7.
- 8) Pietzsch J. S100 proteins in health and disease. *Amino Acids* 2011; 41: 755-760.
- 9) Salama I, Malone PS, Mihaimeed F, Jones JL. A review of the S100 proteins in cancer. *Eur J Surg Oncol* 2008; 34: 357-364.
- 10) Donato R, Cannon BR, Sorci G, Riuzzi F, Hsu K, Weber DJ, Geczy CL. Functions of S100 proteins. *Curr Mol Med* 2013; 13: 24-57.
- 11) Sinha P, Okoro C, Foell D, Freeze HH, Ostrand-Rosenberg S, Srikrishna G. Proinflammatory S100 proteins regulate the accumulation of myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2008; 181: 4666-4675.
- 12) Tamura T, Miyata T, Hatori K, Himi K, Nakamura T, Toyama Y, Takeichi O. Role of S100A4 in the pathogenesis of human periapical granulomas. *In Vivo* 2021; 35: 2099-2106.
- 13) Carle R, Karen V, Pascal R, Marieve T, Philippe AT. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol* 2003; 170: 3233-3242.
- 14) Rahimi F, Hsu K, Endoh Y, Geczy CL. FGF-2, IL-1 beta and TGF-beta regulate fibroblast expression of S100A8. *FEBS J* 2005; 272: 2811-2827.
- 15) Kang JH, Hwang SM, Chung IY. S100A8, S100A9 and S100A12 activate airway epithelial cells to produce MUC5AC via extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor- κ B pathways. *Immunology* 2015; 144: 79-90.
- 16) Gebhardt C, Németh J, Angel P, Hess J. S100A8 and S100A9 in inflammation and cancer. *Biochem Pharmacol* 2006; 72: 1622-1631.
- 17) Kido J, Hayashi N, Kataoka M, Nagata T. Calprotectin expression in human monocytes: induction by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1 beta. *J Periodontol* 2005; 76: 437-442.
- 18) Wang Q, Chen W, Lin J. The role of calprotectin in rheumatoid arthritis. *J Transl Int Med* 2019; 7: 126-131.
- 19) Ehrchen JM, Sunderkötter C, Foell D, Vogl T, Johannes R. The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 557-566.
- 20) Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 1008-1022.
- 21) Hansen MT, Forst B, Cremers N, Quagliata L, Ambartsumian N, Grum-Schwensen B, Klingelhöfer J, Abdul-Al A, Herrmann P, Osterland M, Stein U, Nielsen GH, Schere PE, Lukanidin E, Sleeman JP, Grigorian M. A link between inflammation and metastasis: serum amyloid A1 and A3 induce metastasis, and are targets of metastasis-inducing S100A4. *Oncogene* 2015; 34: 424-435.
- 22) Yang J, Anholts J, Kolbe U, Stegehuis-Kamp JA, Claa FHJ, Eikmans M. Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9: Investigation of their immune regulatory effect in myeloid cells. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 1833.

Expression of S100A8/A9 in Human Periapical Granulomas

TAMURA Takahito¹, MIYATA Taiki¹, HIMI Kazuma¹, HATORI Keisuke^{1,2},
NAKAMURA Takeshi¹, SHIMIZU Kouhei^{1,2}, SUZUKI Yusuke^{1,2}, HASUIKE Akira^{2,3},
INOUE Seiya¹, OKADA Masashi¹, YABUHARA Yukiko¹, SUGURO Hisashi^{1,2},
SHOUKAKU Taisuke¹, YASUKAWA Takuya^{1,2}, HAYASHI Makoto^{1,2} and TAKEICHI Osamu^{1,2}

¹Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry

²Division of Advanced Dental Treatment, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

³Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry

Abstract

Purpose: Calcium-binding proteins termed S100 proteins are involved in the pathogenesis of various inflammatory diseases. Among the S100 proteins, S100A8 and S100A9 expression is associated with the pathology of chronic inflammatory diseases. In this study, the expression of two S100 proteins (S100A8 and S100A9) in human periapical granulomas was investigated.

Methods: Periapical lesions were excised from 44 patients during endodontic surgery or tooth extraction. The samples were divided in half immediately after the periapical lesions were excised. One half of the divided tissues was fixed with 10% neutral-buffered formalin and paraffin sections were prepared. The other half of the tissue samples was fixed with 4% paraformaldehyde prepared in phosphate-buffered saline, embedded in OCT compound, and frozen in dry-ice acetone. These samples were then used for RNA preparation. Five healthy gingival tissue samples were also prepared as described above. After 32 samples were diagnosed as periapical granulomas based on histological evaluation, paraffin sections were examined using two-color immunofluorescent staining with anti-human S100A8 and anti-human S100A9 antibodies to search for the expression of S100A8 and S100A9 in human periapical granulomas. In addition, a quantitative analysis of S100A8 and S100A9 mRNA expression was performed using real-time PCR, using total RNA extracted from frozen samples of periapical granulomas and gingival tissues. The assays were performed using Smart Cycler, and gene expression levels were normalized by dividing the calculated values for the mRNA samples by those of GAPDH mRNA. Healthy gingival tissues were used as a negative control. Real-time PCR data were statistically analyzed using the Mann-Whitney *U* test. Significance was considered at $p < 0.05$.

Results: S100A8 positive inflammatory cells in periapical granulomas were stained with S100A9 Abs. S100A8 and S100A9 mRNA were expressed in human periapical granulomas, and their expression levels in periapical granulomas were significantly higher than in the negative control.

Conclusion: The results indicate the possibility that S100A8 and S100A9 expression could be associated with pathogenesis and growth of human periapical granulomas.

Key words : periapical granulomas, S100A8, S100A9

ヒト歯髄培養細胞における lipopolysaccharide による kallikrein-related peptidase 8 産生と炎症反応

神尾直人^{1,2} 葉山朋美^{1,2} 渡邊昂洋^{1,2}
深井讓滋^{1,2} 鈴木誠^{1,2} 五明夏子¹
倉持光成¹ 岡部達^{1,2} 松島潔^{1,2}

¹日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

²日本大学松戸歯学部口腔科学研究所

抄録

目的: Kallikrein-kinin カスケードは炎症時における血管透過性亢進や発痛に関与するが、組織カリクレインとも呼ばれる kallikrein-related peptidase (KLK) は、そのカスケードを担うだけでなく、生体内でさまざまな機能を示す。また、グラム陰性菌の外膜成分である lipopolysaccharide (LPS) は起炎物質の一つとして知られており、歯髄でもまた炎症の誘発・進展に作用する。著者らは、歯髄で LPS が KLK8 の発現を促進し、さらに KLK8 が炎症促進的に作用するという仮定の下、ヒト歯髄培養細胞を用いて基礎的研究を行った。

材料と方法: 抜去歯よりアウトグロースした細胞をヒト歯髄培養細胞とし、10% FCS 添加 α -MEM にて培養した。培養上清中に LPS を添加後の KLK8 発現量の変化、もしくは KLK8 添加後の COX-2 発現について、RT-PCR 法、Western blot 法にて検索した。細胞内の遊離カルシウムイオン濃度の測定は、蛍光カルシウムプローブ Fura-2 を用いた蛍光連続測定にて行い、また培養上清中に放出された PGE₂ 量を enzyme immunoassay kit にて検討した。

成績: ヒト歯髄培養細胞において、LPS は時間依存的、濃度依存的に KLK8 mRNA とタンパク質の発現を促進した。LPS による KLK8 タンパク質発現は ERK1/2, P38 MAPK 阻害剤で抑制された。また、KLK8 は PAR-1 受容体非依存的に COX-2 タンパク質発現および培養上清中 PGE₂ 産生を促進し、その効果は tyrosine kinase 阻害剤で抑制された。

結論: LPS は KLK8 の産生に関与し、kallikrein-kinin カスケードに影響を及ぼすことで歯髄炎の進行に関与することが示唆された。また KLK8 は歯髄で kininogen 活性化だけでなく PAR-1 非依存的、tyrosine kinase 依存的に COX-2 の産生、PGE₂ の分泌を促進する可能性が示唆された。

キーワード: lipopolysaccharide (LPS), kallikrein-related peptidase (KLK), COX-2, 歯髄培養細胞

責任著者連絡先: 神尾直人

〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1 日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

TEL: 047-360-9369, FAX: 047-360-9370, E-mail: kamio.naoto@nihon-u.ac.jp

受付: 2022年2月2日/受理: 2022年4月22日

DOI: 10.11471/shikahozon.65.205

緒言

感染症では、微生物による宿主組織への侵入が多様な炎症反応や免疫病理学的反応を引き起こす。歯髄においても、齲蝕や外傷による生物学的・物理学的な侵襲により歯髄炎が惹起される。感染した根管象牙質や壊死歯髄からはグラム陰性菌が頻りに検出され¹⁾、歯髄炎や根尖性歯周炎の進行に深く関与していると考えられている。なかでもグラム陰性菌の細胞壁成分である lipopolysaccharide (LPS) は、宿主組織の破壊につながる生物学的活性を誘発する起炎物質の一つである。LPS の刺激は、歯髄培養細胞において Toll-like receptor (TLR) 4 を介して mitogen-activated protein kinase (MAPK) 系を活性化し、IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインを誘導すること^{2,3)}や、血管内皮増殖因子 (VEGF) を誘導して血管透過性の亢進や炎症性細胞の集積を修飾すること⁴⁾、または転写因子 nuclear factor- κ B の活性化による炎症性シグナルの誘発を促進する⁵⁾。このような免疫応答バランスの破綻は、結果的に組織破壊へつながる。

歯髄組織は周囲を硬組織に囲まれた閉鎖的な空間に存在するため、炎症の進行は強い臨床症状とともに組織圧の亢進、脈管系の圧迫による循環障害を引き起こし、最終的に壊死にいたることもある。生活歯に比べ失活歯の生存率は確実に短いことが統計学的にも示され、また機能歯数の減少が寿命にまで影響を与えること⁶⁾が明らかになっており、積極的な歯髄保存が試みられている。

Kallikrein-related peptidase (KLK) は、アミノ酸配列の相同性からヒトでは現在 15 種のサブタイプが報告されているトリプシン・キモトリプシン様セリンプロテアーゼファミリーで、kallikrein-kinin システム以外にも種々の組織で生理学的・病理学的機能を担うことが近年報告されてきた⁷⁾。KLK8/neuropsin はマウス脳の海馬で神経可塑性や記憶形成に関与するプロテアーゼとして同定⁸⁾されたが、ヒトでは逆に脳での発現は画一的ではなく⁹⁾、ケラチノサイトでの細胞外基質の分解を担い、皮膚における炎症性疾患とその創傷治癒に関与することが報告されている¹⁰⁾。詳細な機能や疾患との関連性について、口腔領域での報告はない。歯髄炎や壊死歯髄において、エラスターゼやコラゲナーゼ活性の上昇がみられ¹¹⁾、他組織同様にプロテアーゼが炎症時の細胞外基質代謝に重要な役割を担っていることが考えられる。著者らはこれまでに、セリンプロテアーゼである plasmin¹²⁾ や plasma kallikrein¹³⁾ がそのタンパク質分解酵素としての機能のみならず、protease activated receptor (PAR)s を介して細胞内シグナル伝達を誘発し、cyclooxygenase (COX)-2 の発現や prostaglandin (PG) E₂ 産生に寄与

る可能性を報告した。PGE₂ は炎症のケミカルメディエーターとして発痛や血管透過性亢進に関わることは知られているが、歯髄においては特に硬組織形成能のコントロールに関わる¹⁴⁾点で重要であり、その産生調節は歯髄の予後に大きく影響すると考えられる。

そこで本研究では、ヒト歯髄におけるグラム陰性菌の LPS が KLK8 発現に与える影響と、KLK8 と歯髄炎の関係について、特に PGE₂ の産生に与える影響に注目し、培養細胞を用いて基礎的な検討を行った。

材料および方法

1. 材料

本実験では、牛胎児血清 (fetal calf serum : FCS), alpha minimum essential medium (α -MEM), trypsin は Invitrogen (USA), penicillin G は Meiji seika ファルマ, LPS (*Escherichia coli* O111 : B4), Cellytic M Cell lysis reagent, U0126, SB239063, JNK inhibitor 2, genistein は Sigma-Aldrich (USA), KLK8 は富士フィルム和光純薬, plasma kallikrein は R & D Systems (USA), Fura-2/AM は同仁化学研究所, PAR-1 活性化剤は Tocris Bioscience (USA), 抗 COX-2 抗体は Santa Cruz Biotech (USA), 抗 KLK8 抗体は abcam (UK), 抗 β -actin 抗体, HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体は Cell Signaling Technology (USA), RNeasy Mini Kit, One step RT-PCR kit は QIAGEN (Germany), SDS sample buffer は New England Biolabs (UK), Prostaglandin E₂ enzyme immunoassay (EIA) kit は Cayman Chemical (USA) より購入したものを使用した。

2. 歯髄細胞の培養

日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認 (承認番号 : EC20-19-19-003-2 号) を受け、日本大学松戸歯学部付属病院に来院し、矯正治療により抜去された 10 歳代~20 歳代の男女の患者の健康な第三大臼歯から歯髄を無菌的に取り出した。取り出した歯髄は Somerman らの方法¹⁵⁾に基づき、PBS で十分に洗浄した後、約 2 mm 角に細切し、組織片を 35 mm culture dish に静置後、10% FCS, 100 μ g/ml penicillin G を添加した α -MEM を用いて 37°C, 5% CO₂, 95% 気相下にて out growth させた。細胞がコンフルエントに達した時点で 0.05% trypsin を用いて回収し、5~9 代継代培養したものを研究に用いた。

3. 半定量的 RT-PCR 法

1) RNA の抽出

上記の培養条件にてヒト歯髄培養細胞を 10 cm culture dish で 1×10^6 個/dish で播種し、LPS 作用 24 時間前に 1% FCS 含有 α -MEM に交換した。作用後の歯髄細胞の total RNA を RNeasy Mini Kit を用いて抽出し、得ら

れた全RNAの純度は260 nmと280 nmの比で測定した。

2) 半定量的RT-PCR法

得られたtotal RNA, DNAプライマー (KLK8およびglyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase: GAPDH), One step RT-PCR kitを使用してRT-PCRを行った。すなわちtotal RNA (250 ng), 5 pmolプライマー, および5×Reaction Mix (0.4 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂含有), を混和した後, 総量を25 μlとし, TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice (タカラバイオ)にてcDNA合成および増幅反応を行った。用いたDNAプライマーの塩基配列は, KLK8¹⁵⁾ forward 5'-ACA GAC CAT GCC ATC TGT GA-3', reverse 5'-ATG AGT GCC AAC CCC ATT C-3', GAPDH¹²⁾ forward 5'-ATC ACC ATC TTC CAG GAG-3', reverse 5'-ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'とした。RT-PCRの反応条件は, 50°C 30分, 95°C 15分を1 cycle行ってcDNAを合成し, 次いでDNA変性を94°C 30秒, アニーリングを55°C 30秒, 伸長反応を72°C 30秒行い, これを1 cycleとして28 cycle行った後, 最終伸長反応を72°C 10分間行った。PCR合成産物は2%アガロースゲルで電気泳動を行った後, エチジウムブロマイド染色を行い紫外線照射下にて遺伝子増幅を確認した。得られたバンドパターンの一部は, 濃度および面積を画像編集ソフトAdobe Photoshop Elements 10にて数値化し, GAPDHとの対比から有意差の検定を行い, グラフに示した。

4. Western blot法

LPS, KLK8作用後の歯髄培養細胞を100 μM Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 0.2 mM EGTA, 2 mM EDTAを含有するCellytic M Cell lysis reagentにて溶解した。Bradford法¹⁶⁾にて, タンパク質量の調整を施した後SDS sample bufferを加え5分間煮沸し, 15,000 rpmで1分間遠心分離した後の上清をサンプルとした。7.5%のSDS polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)用ゲル (Mini-PROTEAN TGX Gels, Bio-Rad, USA)にて電気泳動後, 転写装置 (日本エイドー) を使用してニトロセルロース膜 (Bio-Rad) へ転写した。その後skim milk (Becton Dickinson, USA)にて室温で30分ブロッキングを行い, 一次抗体を室温で2時間振盪反応させ, 二次抗体を室温で90分同様に反応させた。一次抗体として抗KLK8抗体 (1/1,000), 抗COX-2抗体 (1/1,000), 抗β-actin抗体 (1/3,000) を供した。二次抗体として, HRP標識抗マウスIgG抗体またはHRP標識抗ウサギIgG抗体を供した。ECL prime Western Blotting detection system (Cytiva, Switzerland) を用いて化学発光を行い, X線フィルム (Hyperfilm ECL, Cytiva) 上に感光させて発現量を確認した。得られたバンドパターンの一部は, 濃度および面積を画像編集ソフトAdobe Photo-

shop Elements 10にて数値化し, GAPDHとの対比から有意差の検定を行い, グラフに示した。

5. 細胞内カルシウムイオン濃度 ([Ca²⁺]_i) の測定

上記の培養条件にてヒト歯髄培養細胞を10 cm culture dishで1×10⁶個/dishで播種し, 2 μM Fura-2/AMにてα-MEM中で37°C, 30分間インキュベートした後, 0.25% trypsin, 0.02% EDTAにて細胞をdishから剥離し, Krebs-Ringer-Hepes溶液 (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 0.96 mM NaH₂PO₄, 0.2% glucose, 0.1% BSA, 1 mM CaCl₂, 20 mM HEPES buffer: pH7.4) に浮遊させた後, KLK8, plasma kallikrein, PAR-1活性化剤を作用させた。Fura-2にてラベルした細胞内の蛍光測定は, 日本分光CAF-110型スペクトロフルオロメーターにて340 nmと380 nmの二波長励起, 500 nmの蛍光測定にて行った。[Ca²⁺]_iの測定はGrynkiewiczらの方法¹⁷⁾により行った。

6. PGE₂量の検索

前述の培養条件にて, 24穴細胞培養プレートに5×10⁴個/dishで播種した。サンプルはKLK8作用後の培養上清とし, PGE₂の分泌量をProstaglandin E₂ EIA kitを用いて波長450 nmにおける吸光度を測定した。

7. 統計処理

得られた測定値は, 平均値±標準誤差 (SEM) で示した。有意差の検定には, Tukey testを用い, 有意水準5%で検定した。

結 果

1. ヒト歯髄培養細胞におけるLPSによるKLK8 mRNA発現

ヒト歯髄培養細胞に各種濃度のLPSを3時間作用させると, KLK8 mRNA発現量はLPSの用量依存的に増加し, 1 μg/mlで最大値に達し, それ以上の濃度では減少した (Fig. 1A)。また, 1 μg/ml LPSを作用させると, KLK8 mRNA発現量は時間依存的に増加し, 作用3時間で最大値に達し, 以後減少した (Fig. 1B)。

2. ヒト歯髄培養細胞におけるLPSによるKLK8タンパク質発現

ヒト歯髄培養細胞に各種濃度のLPSを6時間作用させると, KLK8タンパク質発現量は用量依存的に増加し, 1 μg/mlで最大値に達し, それ以上では減少した (Fig. 1C)。また, 1 μg/ml LPSを作用させると, KLK8タンパク質発現量は時間依存的に増加し, 作用6時間で最大値に達し, 12時間においてもタンパク質量は維持された (Fig. 1D)。

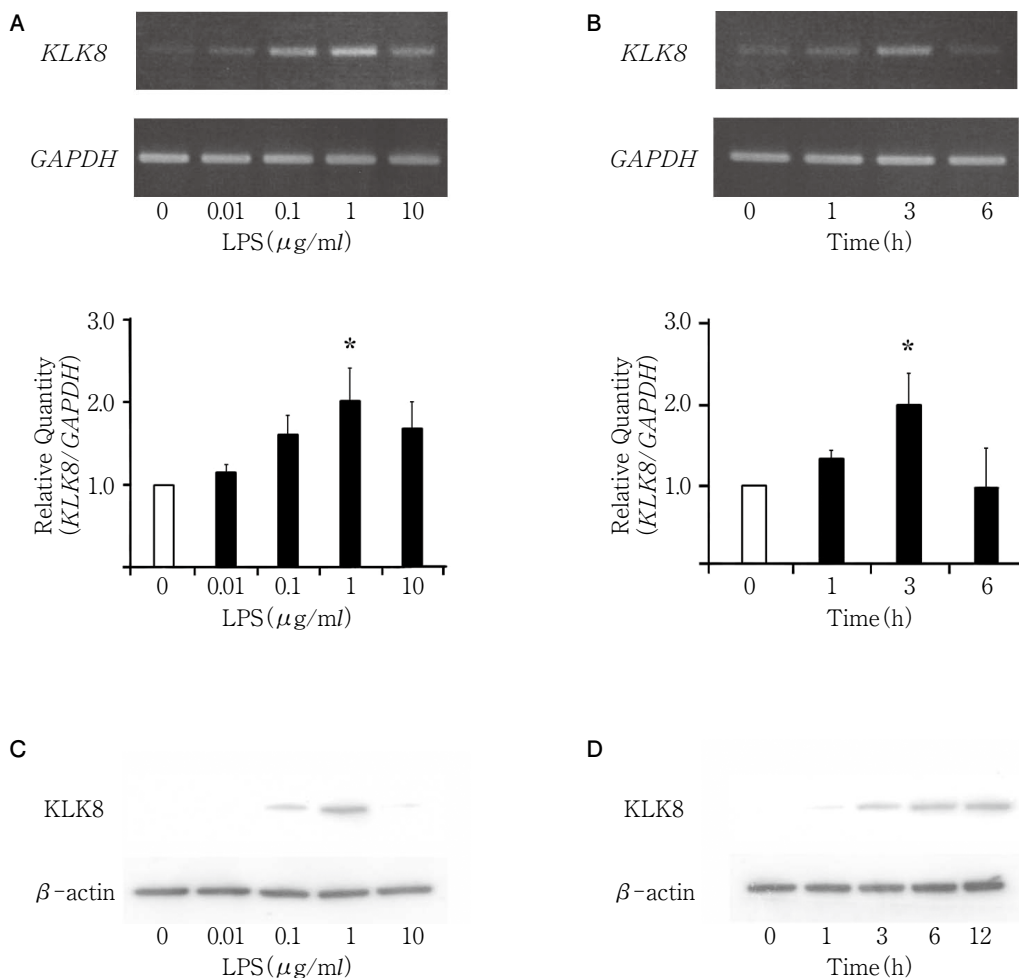


Fig. 1 Lipopolysaccharide-dependent expression of kallikrein-related peptidase 8 mRNA and kallikrein-related peptidase 8 protein

(A) The cells were treated with LPS (0–10 $\mu\text{g/ml}$) for 3 h. (B) The cells were stimulated with or without 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for the indicated times. (A, B: Lower parts) Data are calculated as the quantity of KLK8 mRNA relative to that of GAPDH and normalized against the control (*: $p < 0.05$ versus unstimulated cells). (C) Cells were treated with LPS (0–10 $\mu\text{g/ml}$) for 6 h. (D) Cells were stimulated with or without 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS for the indicated times. KLK8 in the cell lysate was detected by Western blotting using anti-KLK8 antibody.

3. LPSによるKLK8タンパク質発現に対するMAPK阻害剤の効果

歯髄培養細胞におけるLPSによるKLK8の産生作用が明らかになったことから、次にKLK8産生シグナルにおけるMAPKの関与について阻害剤を用いて検索した。その結果、1 $\mu\text{g/ml}$ LPSを6時間作用させて認められたKLK8タンパク質発現の増強は、Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) 1/2 MAPK阻害剤であるU0126 (10 μM) およびp38 MAPK阻害剤であるSB239063 (10 μM) の存在下では有意に抑制された (Fig. 2)。一方、c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1/2/3 MAPK阻害剤であるJNK inhibitor 2 (10 μM) の存在下では、LPSによ

るKLK8タンパク質発現は抑制されなかった (Fig. 2)。

4. ヒト歯髄培養細胞におけるKLK8によるCOX-2タンパク質発現

次にCOX-2タンパク質発現に与えるKLK8の影響を確認した。ヒト歯髄培養細胞に各種濃度のKLK8を3時間作用させると、COX-2タンパク質発現量は用量依存的に増加し、10 nMで最大値に達し、それ以上では減少した。また、10 nM KLK8を作用させると、COX-2タンパク質発現量は時間依存的に増加し、作用3時間で最大値に達し、以後減少した (Fig. 3)。

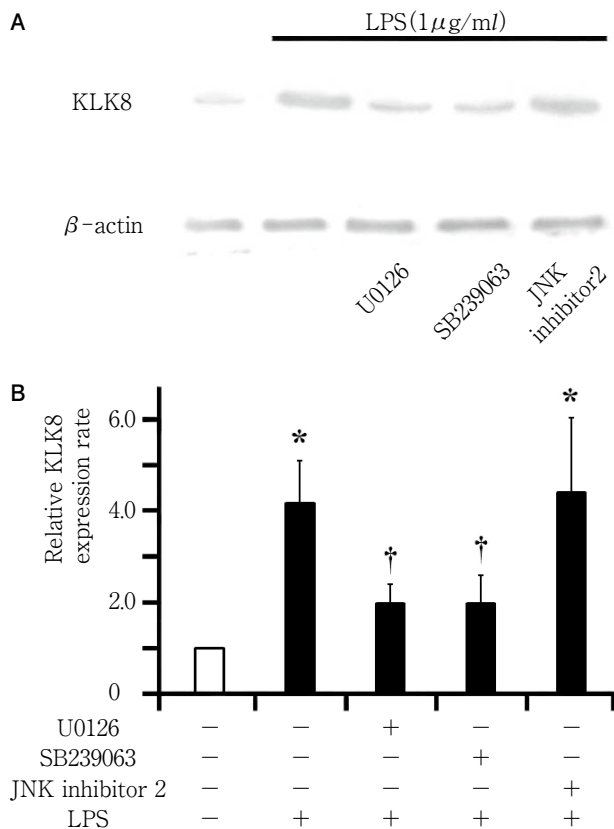


Fig. 2 Involvement of mitogen-activated protein kinases in lipopolysaccharide-induced kallikrein-related peptidase 8 expression in human dental pulp cells

(A) Cells were pretreated with U0126 (10 μ M), SB239063 (10 μ M), or JNK inhibitor 2 (10 μ M) for 1 h, followed by LPS stimulation for 6 h. KLK8 in the cell lysate was determined by Western blot analysis using anti-KLK8 antibody. (B) Quantitation of the Western blotting data of the KLK8 was normalized against the absence of LPS and MAPK inhibitors. (* : $p < 0.05$ versus unstimulated cells ; † : $p < 0.05$ versus cells stimulated with LPS in the absence of MAPK inhibitors)

5. $[Ca^{2+}]_i$ に与えるKLK8, plasma kallikreinの効果

KallikreinファミリーであるKLK8が, plasma kallikrein¹³⁾やKLK5, 6¹⁸⁾と同様にPAR-1受容体を介して $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を引き起こす可能性について検索した. Fura-2を負荷したヒト歯髄培養細胞に100 μ M PAR-1活性化剤, 1 μ g/ml plasma kallikreinを作用させると, 30秒後から $[Ca^{2+}]_i$ は上昇し, 120秒後にピークに達し, その後緩やかに減少した. 一方, 10 nM KLK8の作用では $[Ca^{2+}]_i$ に変化はみられなかった (Fig. 4).

6. KLK8によるCOX-2タンパク質発現およびPGE₂分泌に対するtyrosine kinase阻害剤の効果

KLK8がtyrosine kinase型受容体を介してシグナル伝達を担う報告がある^{19,20)}. そこで, tyrosine kinase阻害剤であるgenisteinを用いてKLK8によるCOX-2タンパク質発現に対する効果を確認した. その結果, ヒト歯髄培養細胞における10 nM KLK8 (3時間) によるCOX-2タンパク質発現量の増加は, genisteinの用量依存的に抑制された (Fig. 5). また, KLK8の6時間の添加により培養上清中のPGE₂量は有意に増加し, genistein存在下ではPGE₂分泌量の増加は抑制された (Table 1).

考 察

歯髄は局在的な特徴から, 炎症が惹起されたときのその症状は激烈なものとなるのに加え, 不可逆的な病態変化に進行しやすい組織である. したがって, 痛みの除去やさらなる炎症の波及を防止する目的で歯髄除去療法を選択することが多い. 炎症は免疫担当細胞の浸潤やサイトカインの発現を介して各種侵襲に対して発された生体の防御反応であり, 炎症の適切なコントロールは組織の創傷治癒を促す. 実際に, 血管透過性亢進や発痛に関与するPGE₂は低濃度では歯髄の硬組織形成能を促進す

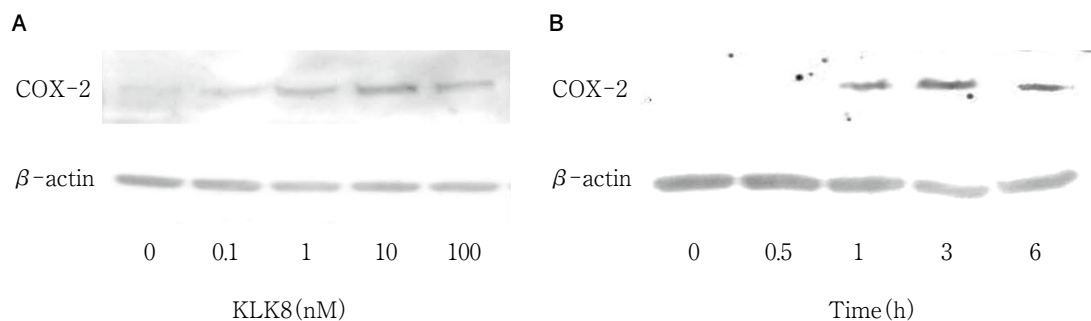


Fig. 3 Kallikrein-related peptidase 8-induced cyclooxygenase-2 protein expression in human dental pulp cells
COX-2 in the lysate was detected using Western blotting. (A) Cells were treated with KLK8 (0-100 nM) for 3 h. (B) Cells were stimulated with or without 10 nM KLK8 for the indicated times.

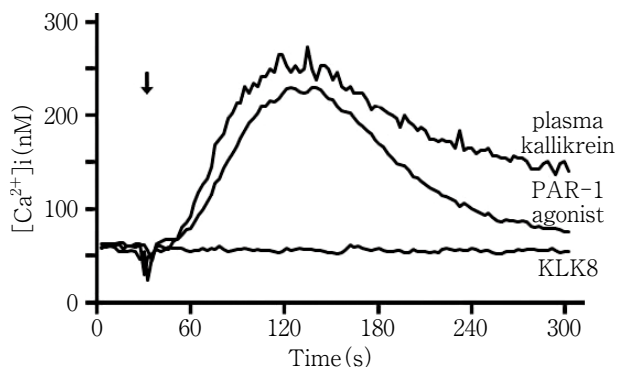


Fig. 4 Effect of protease-activated receptor-1 agonist, plasma kallikrein, or kallikrein-related peptidase 8 on intracellular Ca^{2+} concentration in human dental pulp cells

Ca^{2+} mobilization in human dental pulp cells was loaded with Fura-2 and stimulated with $100 \mu M$ of PAR-1 agonist, $1 \mu g/ml$ of plasma kallikrein, or $10 nM$ KLK8 at the time point marked with an arrow.

Table 1 Kallikrein-related peptidase 8-induced prostaglandin E_2 secretion in the absence or presence of tyrosine kinase antagonist

	genistein	
	(-)	(+)
	<i>Prostaglandin E₂ (pg/10⁵ cells)</i>	
Control	193.0 ± 35.0	290.8 ± 85.7
KLK8	$1,264.9 \pm 326.2^*$	$571.4 \pm 114.6^\dagger$

After treatment with or without the tyrosine kinase antagonist genistein ($50 \mu M$) for 30 min, the human dental pulp cells were stimulated with $10 nM$ KLK8 for 6 h. PGE_2 secreted into the conditioned medium was determined using an enzyme immunoassay kit. These results are representative of four independent experiments.

(* : $p < 0.05$ versus unstimulated cells ;

† : $p < 0.05$ versus cells stimulated with KLK8 in the absence of genistein)

る¹⁴)ことや、メタロプロテアーゼである MMP-3 による細胞遊走の促進²¹)や血管新生、修復象牙質の形成促進作用²²)など、プロテアーゼやプロスタノイドが歯髄を治癒に導くと考察された報告も散見される。本研究では、細菌学的侵襲の一つである LPS により、セリンプロテアーゼの KLK8 がヒト歯髄培養細胞で発現を促進し、 PGE_2 産生調節に関与する可能性を示した。

比較的近年報告されたヒト KLK8 は、アルツハイマーとの関わりや種々の癌細胞での発現促進に関する研究が

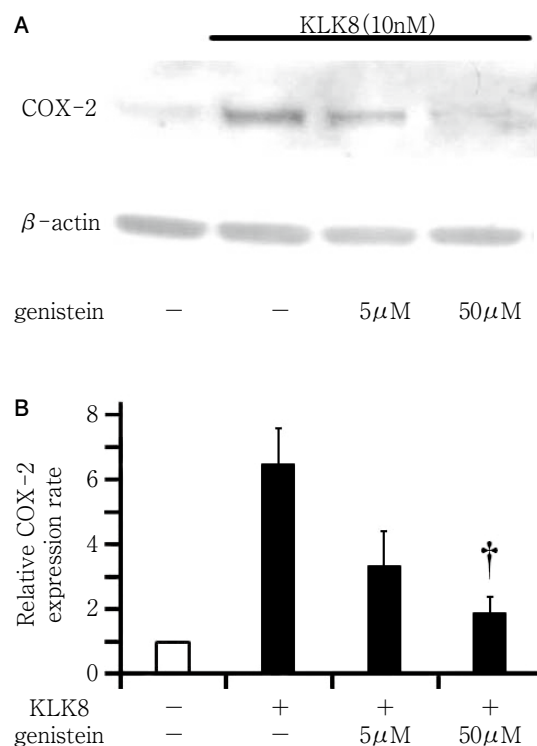


Fig. 5 Kallikrein-related peptidase 8-induced signaling in human dental pulp cells mediated by phosphorylation of tyrosine

(A) Inhibition of genistein ($5 \mu M$ and $50 \mu M$) downregulated the COX-2 expression, as analyzed by Western blotting. (B) Quantitation of the Western blotting data of COX-2 was normalized against the absence of KLK8 and genistein. († : $p < 0.05$ versus cells stimulated with KLK8 in the absence of genistein)

進み、膵臓²³)や卵巣、子宮²⁴)では癌の侵襲性との相関性から有用な癌細胞マーカーとして期待されている。炎症との関連については皮膚での研究が進んでおり、アトピー性皮膚炎患者のケラチノサイトでは、アレルギーと関連深い IL-4 や IL-13 が KLK7, 8 の分泌量を促進²⁵)し、細胞外フィブロネクチンの分解に関与することが報告されている²⁶)。また、KLK8 が細胞増殖を促進させると同時に細胞間接着を減弱させることが乾癬性皮膚疾患につながると考察された報告もある²⁷)。LPS は歯髄培養細胞において TLR 4 を介して MAPK 系を活性化²)し、炎症性サイトカインの誘導³)、血管内皮増殖因子 (VEGF) を誘導して血管透過性の亢進や炎症性細胞の集積を修飾すること⁴)、ラット歯髄でアラキドン酸代謝の増加を誘引することで PGE_2 , PGI_2 の産生を増強させ

る²⁸⁾ことなど、起炎物質としての報告も多い。本研究で示した、ヒト歯髄培養細胞におけるLPSによる濃度依存的・時間依存的なKLK8のmRNA発現量・タンパク質発現量の促進もまた、ERK 1/2 MAPKおよびp38 MAPKによる調節を介することが示唆された。Jurkat T細胞では5 μg/ml LPSの作用によるKLKファミリーのmRNA発現の増強と、dexamethasoneをはじめとしたステロイドホルモンによる発現調節が示されている²⁹⁾。また、p38 MAPKのリン酸化がケラチノサイトにおけるKLK5、7のタンパク質発現調節に関与し、デスモソーム代謝に影響を与えているとの報告³⁰⁾はあるが、KLK8の報告はない。歯髄培養細胞において、LPSがそのシグナル伝達過程でMAPK系を介する報告のうち、標的タンパクの違いからJNKを介する報告³¹⁾と介さない報告²⁾がある。本研究では前者同様にJNK阻害剤ではLPS誘導性KLK8タンパク質発現は抑制されなかったが、ERK 1/2 MAPKおよびp38 MAPKを介して炎症性のシグナルを惹起する点では共通であった。今後、それぞれのMAPKのリン酸化をWestern blot法などで検討することで、詳細解明に近づくものと考えられる。

KLK8受容体についての報告も、組織によって見解が分かれる。トリプシン・キモトリプシン様セリンプロテアーゼファミリーであるため、トリプシン受容体であるPAR-1、2を介する報告は心筋細胞²⁰⁾でみられる。一方で、腎上皮KRNK細胞ではKLK5、14でPAR-2が活性化されるもののKLK8では活性化されることが本研究と同手法の $[Ca^{2+}]_i$ の研究で示されている³²⁾。歯髄におけるPARsの発現について、われわれは恒常的にPAR-1が多く発現していることを示し¹²⁾、plasma kallikreinによるシグナル伝達を介することも過去に示した¹³⁾。本研究においてもまた、ヒト歯髄培養細胞でPAR-1活性化剤とplasma kallikreinにより $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は認められたが、KLK8では認められなかったことから、歯髄において細胞内カルシウムイオンの関わるシグナル伝達を誘発しないことが推察される。他の報告では、扁桃体ではEphrin B2受容体¹⁹⁾、心筋細胞ではepidermal growth factor受容体²⁰⁾の関与が示されている。本研究では上記の受容体がtyrosine kinase受容体ファミリーであることから、tyrosine kinase阻害剤による影響を検討し、genisteinによりKLK8によるCOX-2タンパク質発現およびPGE₂の産生は抑制されることを明らかにした。そして少なくとも歯髄ではKLK8はPARsの活性化に関与しないこと、COX-2・PGE₂の産生にtyrosineのリン酸化が関与することが示唆された。それぞれの受容体の特異的阻害剤やRNA干渉を用いた解析により、詳細が明らかになると考えられる。

低濃度PGE₂やLPSシグナルが及ぼす象牙芽細胞への

分化促進に関する報告³¹⁾があり、炎症の進展と治癒としての石灰化機構の間には複雑な制御システムが関与していると考えられる。本研究では、グラム陰性菌の侵害刺激により歯髄でKLK8産生が促進され、さらにKLK8がオートクリン/パラクリン様に細胞に作用し、COX-2の発現やPGE₂の産生が増強される可能性を示した。LPSはそれ単独でもMAPK³³⁾やtyrosine kinase³⁴⁾を介してCOX-2発現に直接的に寄与することも報告されており、本研究で示したKLK8を介した作用はさらなる炎症の促進因子だけでなく二次的な調節機構である可能性も推察される。複雑で多彩な調節機構の結果としてPGE₂量はコントロールされ、炎症進展や石灰化へ寄与しているものと理解すべきであろう。このように歯髄における炎症時のメカニズムを解明することが、歯髄炎の予防・治療・再生医療に向けた創薬に貢献すると考えられる。

結 論

ヒト歯髄培養組織において、LPSはKLK8のmRNA発現、タンパク質発現を促進すること、またそのKLK8はヒト歯髄培養細胞でtyrosineのリン酸化を介してCOX-2、PGE₂産生に関与する可能性が示唆された。

本研究において開示すべき利益相反はない。

本研究の一部は2015～2017年度文部科学省研究補助金若手研究(B)研究課題番号(15K11131)、2020～2022年度文部科学省研究補助金基盤研究(C)研究課題番号(20K09979)の補助により行われた。

文 献

- 1) Pekovic DD, Fillery ED. Identification of bacteria in immunopathologic mechanisms of human dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 57: 652-661.
- 2) He W, Qu T, Yu Q, Wang Z, Lv H, Zhang J, Zhao X, Wang P. LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells. *Int Endod J* 2013; 46: 128-136.
- 3) Hosoya S, Matsushima K. Stimulation of interleukin-1 beta production of human dental pulp cells by *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *J Endod* 1997; 23: 39-42.
- 4) Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Nagaoka S, Matsuyama T, Abeyama K, Maruyama H, Takada H, Torii M. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in

- culture. *Infect Immun* 1999; 67: 1633-1639.
- 5) Chang J, Zhang C, Tani-Ishii N, Shi S, Wang CY. NF-kap-paB activation in human dental pulp stem cells by TNF and LPS. *J Dent Res* 2005; 84: 994-998.
 - 6) Fukai K, Takiguchi T, Ando Y, Aoyama H, Miyakawa Y, Ito G, Inoue M, Sasaki H. Functional tooth number and 15-year mortality in a cohort of community-residing older people. *Geriatr Gerontol Int* 2007; 7: 341-347.
 - 7) Avgeris M, Scorilas A. Kallikrein-related peptidases (KLKs) as emerging therapeutic targets: focus on prostate cancer and skin pathologies. *Expert Opin Ther Targets* 2016; 20: 801-818.
 - 8) Suzuki J, Yoshida S, Chen ZL, Momota Y, Kato K, Hirata A, Shiosaka S. Ontogeny of neuropsin mRNA expression in the mouse brain. *Neurosci Res* 1995; 23: 345-351.
 - 9) Kishi T, Grass L, Soosaipillai A, Shimizu-Okabe C, Diamandis EP. Human kallikrein 8: immunoassay development and identification in tissue extracts and biological fluids. *Clin Chem* 2003; 49: 87-96.
 - 10) Shingaki K, Matsuzaki S, Taniguchi M, Kubo T, Fujiwara T, Kanazawa S, Yamamoto A, Tamura H, Maeda T, Ooi K, Matsumoto K, Shiosaka S, Tohyama M. Molecular mechanism of kallikrein-related peptidase 8/neuropsin-induced hyperkeratosis in inflamed skin. *Br J Dermatol* 2010; 163: 466-475.
 - 11) Morand MA, Schilder H, Blondin J, Stone PJ, Franzblau C. Collagenolytic and elastinolytic activities from diseased human dental pulps. *J Endod* 1981; 7: 156-160.
 - 12) Kamio N, Hashizume H, Nakao S, Matsushima K, Sugiya H. Plasmin is involved in inflammation via protease-activated receptor-1 activation in human dental pulp. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 1974-1980.
 - 13) Hayama T, Kamio N, Okabe T, Muromachi K, Matsushima K. Kallikrein promotes inflammation in human dental pulp cells via protease-activated receptor-1. *J Cell Biochem* 2016; 117: 1522-1528.
 - 14) 坂本真樹, 塩沢 督, 松島 潔, 山崎宗与. ヒト歯髄細胞における Prostaglandin E₂の硬組織形成促進作用. *日歯保存誌* 2003; 46: 445-450.
 - 15) Somerman MJ, Archer SY, Imm GR, Foster RA. A comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts in vitro. *J Dent Res* 1988; 67: 66-70.
 - 16) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
 - 17) Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260: 3440-3450.
 - 18) Oikonomopoulou K, Hansen KK, Saifeddine M, Vergnolle N, Tea I, Blaber M, Blaber SI, Scarisbrick I, Diamandis EP, Hollenberg MD. Kallikrein-mediated cell signalling: targeting proteinase-activated receptors (PARs). *Biol Chem* 2006; 387: 817-824.
 - 19) Attwood BK, Bourgoignon JM, Patel S, Mucha M, Schiavon E, Skrzypiec AE, Young KW, Shiosaka S, Korostynski M, Piechota M, Przewlocki R, Pawlak R. Neuropsin cleaves EphB2 in the amygdala to control anxiety. *Nature* 2011; 473: 372-375.
 - 20) Cao B, Yu Q, Zhao W, Tang Z, Cong B, Du J, Lu J, Zhu X, Ni X. Kallikrein-related peptidase 8 is expressed in myocardium and induces cardiac hypertrophy. *Sci Rep* 2016; 7: 20024.
 - 21) Muromachi K, Kamio N, Narita T, Annen-Kamio M, Sugiya H, Matsushima K. MMP-3 provokes CTGF/CCN2 production independently of protease activity and dependently on dynamin-related endocytosis, which contributes to human dental pulp cell migration. *J Cell Biochem* 2012; 113: 1348-1358.
 - 22) Zheng L, Amano K, Iohara K, Ito M, Imabayashi K, Into T, Matsushita K, Nakamura H, Nakashima M. Matrix metalloproteinase-3 accelerates wound healing following dental pulp injury. *Am J Pathol* 2009; 175: 1905-1914.
 - 23) Hua Q, Li T, Liu Y, Shen X, Zhu X, Xu P. Upregulation of KLK8 predicts poor prognosis in pancreatic cancer. *Front Oncol* 2021; 11: 624837.
 - 24) Borgoño CA, Kishi T, Scorilas A, Harbeck N, Dorn J, Schmalfeldt B, Schmitt M, Diamandis EP. Human kallikrein 8 protein is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 1487-1493.
 - 25) Morizane S, Yamasaki K, Kajita A, Ikeda K, Zhan M, Aoyama Y, Gallo RL, Iwatsuki K. TH2 cytokines increase kallikrein 7 expression and function in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 259-261.
 - 26) Tani N, Matsumoto K, Ota I, Yoshida S, Takada Y, Shiosaka S, Matsuura N. Effects of fibronectin cleaved by neuropsin on cell adhesion and migration. *Neurosci Res* 2001; 39: 247-251.
 - 27) Kishibe M, Bando Y, Terayama R, Namikawa K, Takahashi H, Hashimoto Y, Ishida-Yamamoto A, Jiang YP, Mitrovic B, Perez D, Iizuka H, Yoshida S. Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins. *J Biol Chem* 2007; 282: 5834-5841.
 - 28) Okiji T, Morita I, Sunada I, Murota S. Involvement of arachidonic acid metabolites in increases in vascular permeability in experimental dental pulpal inflammation in the rat. *Arch Oral Biol* 1989; 34: 523-528.
 - 29) Scarisbrick IA, Blaber SI, Tingling JT, Rodriguez M, Blaber M, Christophi GP. Potential scope of action of tissue kallikreins in CNS immune-mediated disease. *J Neuroimmunol* 2006; 178: 167-176.
 - 30) Choi H, Yang SH, Bae IH, Park JY, Kim HJ, Noh M, Lee TR, Shin DW. Fructose 1, 6-diphosphate regulates des-

- mosomal proteins and collagen fibres in human skin equivalents. *Exp Dermatol* 2013; 22: 847-849.
- 31) He W, Wang Z, Luo Z, Yu Q, Jiang Y, Zhang Y, Zhou Z, Smith AJ, Cooper PR. LPS promote the odontoblastic differentiation of human dental pulp stem cells via MAPK signaling pathway. *J Cell Physiol* 2015; 230: 554-561.
- 32) Stefansson K, Brattsand M, Roosterman D, Kempkes C, Bocheva G, Steinhoff M, Egelrud T. Activation of proteinase-activated receptor-2 by human kallikrein-related peptidases. *J Invest Dermatol* 2008; 128: 18-25.
- 33) Hou GQ, Guo C, Song GH, Fang N, Fan WJ, Chen XD, Yuan L, Wang ZQ. Lipopolysaccharide (LPS) promotes osteoclast differentiation and activation by enhancing the MAPK pathway and COX-2 expression in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 2013; 32: 503-510.
- 34) McElroy SJ, Hobbs S, Kallen M, Tejera N, Rosen MJ, Grishin A, Matta P, Schneider C, Upperman J, Ford H, Polk DB, Weitkamp JH. Transactivation of EGFR by LPS induces COX-2 expression in enterocytes. *PLoS One* 2012; 7: e38373. doi: 10.1371/journal.pone.0038373

Lipopolysaccharide-induced Kallikrein-related Peptidase 8 Production and Inflammatory Response in Human Dental Pulp Cells

KAMIO Naoto^{1,2}, HAYAMA Tomomi^{1,2}, WATANABE Takahiro^{1,2},
FUKAI Joji^{1,2}, SUZUKI Makoto^{1,2}, GOMYO Natsuko¹,
KURAMOCHI Kosei¹, OKABE Tatsu^{1,2} and MATSUSHIMA Kiyoshi^{1,2}

¹Departments of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

²Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Abstract

Purpose: The kallikrein-kinin cascade is involved in vascular permeability and pain during inflammation. Kallikrein-related peptidase (KLK), called tissue kallikrein, not only plays a role in the cascade, but also performs various functions within the tissue. Additionally, lipopolysaccharide (LPS), an adventitial component of gram-negative bacteria, is one of the pro-inflammatory substances, and it affects the induction and progression of inflammation in the dental pulp. This study was conducted using cultured human pulp cells, assuming that LPS enhances the expression of KLK8 and promotes pulpitis.

Methods: Human dental pulp cells were cultured in 10% fetal calf serum (FCS)-supplemented alpha-minimal essential medium (α -MEM). When the cells were confluent, they were incubated in α -MEM containing 1% FCS for 24 h, and then stimulated with LPS or KLK8. The expression of KLK8 mRNA was determined by reverse transcription-polymerase chain reaction. KLK8 or cyclooxygenase (COX)-2 protein expression was detected by Western blotting, and the prostaglandin (PG) E₂ concentration in the culture medium was measured using an enzyme immunoassay kit. The intracellular Ca²⁺ concentration was determined by fluorescence measurement using the fluorescent calcium probe Fura-2.

Results: In the human dental pulp cells, LPS promoted KLK8 mRNA expression and protein expression in a time- and concentration-dependent manner. KLK8 protein expression by LPS was suppressed by extracellular signal-regulated kinase 1/2 and P38 mitogen-activated protein kinase inhibitors. Furthermore, KLK8 promoted COX-2 protein expression and PGE₂ secretion in a protease-activated receptor (PAR)-1-independent manner, but its effect was suppressed by a tyrosine kinase inhibitor.

Conclusion: This study suggests that LPS is involved in the production of KLK8 and in the kallikrein-kinin cascade, thereby affecting the progression of pulpitis. Furthermore, KLK8 may promote the production of COX-2 and the secretion of PGE₂ in the dental pulp in a PAR-1-independent and tyrosine kinase-dependent manner.

Key words: lipopolysaccharide (LPS), kallikrein-related peptidase (KLK), COX-2, dental pulp cells

活動性根面齲蝕様病巣に対するジェルタイプ象牙質知覚過敏治療材の 進行停止効果

中野 貴文 川村 和章¹ 椎谷 亨²
山本 龍生³ 向井 義晴²

神奈川歯科大学大学院 社会歯科学分野

¹神奈川歯科大学健康科学講座口腔保健学分野

²神奈川歯科大学歯科保存学講座保存修復学分野

³神奈川歯科大学健康科学講座社会歯科学分野

抄録

目的：活動性根面齲蝕に類似した象牙質病巣を作製し、ジェルタイプのフッ化物含有知覚過敏治療材の塗布時間の違いによる病巣変化と進行停止効果について、TMR (Transverse microradiography) を用いて検討を行った。

材料と方法：フッ化物含有象牙質知覚過敏治療材として、MSコートHysブロックジェルを使用した。ウシ歯根面象牙質に耐酸性バーニッシュを塗布し、2×3 mmの被験面を作製した。実験群はBaseline lesion群、Control群、30 s-Tr群、5 min-Tr群の4群とした。4群とも脱灰溶液 (1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 50 mM 酢酸, 0.2 ppm F, pH 5.0) を注いで24時間37°Cで基準病巣を作製した後、Baseline lesion群はこの直後にTMR分析を行った。他の3群は各処理を行った後に96時間脱灰を行い、TMR分析を行った。被験面処理方法は、Control群では脱イオン水を30秒間、30 s-Tr群ではHysブロックジェルを30秒間、5 min-Tr群ではHysブロックジェルを5分間塗布した。すべての群の試料から薄切片を切り出した後、TMR撮影してミネラルプロファイルから脱灰深度とミネラル喪失量を測定した。統計分析はKruskal-Wallis検定ならびにSteel-Dwassの多重比較検定により、有意水準5%で実施した。

結果：5 min-Tr群のミネラルプロファイルはControl群に比較し顕著に高いミネラルvol%を示し、特に表層部は約45 vol%であった。各群の病巣深度は、Baseline lesion群で71.5 μm、Control群で165.8 μm、30 s-Tr群で155.7 μm、5 min-Tr群で100.1 μmであり、ミネラル喪失量は、Baseline lesion群で2,020.0 vol%×μm、Control群で4,727.5 vol%×μm、30 s-Tr群で3,592.5 vol%×μm、5 min-Tr群で2,102.5 vol%×μmであった。病巣深度およびミネラル喪失量とも、5 min-Tr群はControl群および30 s-Tr群に比較し有意に小さな値を示した。

結論：表層の再石灰化が乏しい根面脱灰病巣に対し、MSコートHysブロックジェルを規定の塗布時間を超えて5分間処理することにより、効果的な病巣進行停止効果が認められた。

キーワード：根面齲蝕、象牙質知覚過敏、フッ化物、TMR

責任著者連絡先：川村和章

〒238-8580 神奈川県横須賀市稲岡町82 神奈川歯科大学健康科学講座口腔保健学分野

TEL & FAX : 046-822-8862, E-mail : kawamura@kdu.ac.jp

受付：2022年3月14日/受理：2022年4月26日

DOI : 10.11471/shikahozon.65.215

緒 言

わが国では、急速に高齢化が進んでいることから疾病構造が変化している。高齢者は身体機能が低下するために、身体的フレイルやオーラルフレイルを自覚する割合が加齢に伴い段階的に増加し、ADL (Activities of Daily Living: 日常生活動作) は低下する^{1,2)}。さらに、高齢者は唾液流出量減少などの生理的機能の低下ならびに手指の運動機能や感覚機能の低下によりプラークコントロールも困難になることから、根面齲蝕の発症や歯周疾患を重篤化させやすい状況にある。自力で日常生活を行うことが困難となり、なんらかの介護を要する状態とされる要介護または要支援の認定を受けた人の推移は平成19年度末では約437.8万人、平成28年度末では約618.7万人と約180.9万人増加している³⁾。また、介護施設を利用する高齢者の9割以上が根面齲蝕を経験しており、歯磨剤の非使用や歯周病の罹患との関連も明らかになっている⁴⁾。

エナメル質と比較して象牙質やセメント質は、ハイドロキシapatiteの割合が少なく耐酸性が低いため脱灰が進行しやすい⁵⁾ことや、歯冠部齲蝕と比較して根面齲蝕は視診により確認することが困難であることから発見が遅れやすい。また、高齢者の根面齲蝕と歯冠部齲蝕の関連についての研究⁶⁾では、歯冠部齲蝕歯数は根面齲蝕の有無に関連があることが示されており、根面齲蝕の発生部位や進行状態によっては歯冠全体の処置が必要となる可能性もある。さらには、高齢期の全身の健康状態が歯の喪失に影響を及ぼしていることも示唆されている⁷⁾。これらに対して、フッ化物含有歯磨剤を使用した日常的なブラッシングやフッ化物洗口により、初期根面齲蝕を非侵襲的に治療することも可能とされている⁸⁾が、口腔清掃を十分に行えない要介護者や高齢者にはより積極的かつ簡便な手法によるアプローチが求められている。

根面齲蝕は、臨床的には病変部の硬さを指標としてsoft lesion (活動性)、leathery lesion (活動性または非活動性) およびhard lesion (非活動性) に分類される⁹⁾。これまでに、象牙質知覚過敏治療材を歯根象牙質面に塗布し、その後脱灰液に浸漬することでTMR (Transverse microradiography) による脱灰抑制効果を検討した論文¹⁰⁾は存在するが、活動性様の根面齲蝕に適用し進行停止効果を検討した報告はない。本研究では、根面齲蝕の分類のなかでも活動性根面齲蝕に類似した表層のミネラル密度が低い病巣を作製し、塗布が容易で擦り込み操作も不要なジェルタイプの象牙質知覚過敏治療材をメーカー指定の塗布時間ならびにそれより長い塗布時間を設定することで、塗布時間の違いによる病巣内の変化と脱

灰進行の停止効果について検討を行った。

材料および方法

1. 実験材料

本実験では、歯科用知覚過敏抑制材料のMSコートHysブロックジェル(サンメディカル, 以下, Hysブロックジェル)を使用した (Table 1)。

2. 試料作製

凍結保存したウシ下顎中切歯24本を歯頸部直下ならびに5mm根尖側の位置を低速切断機(Isomet, Buehler, USA)で切断し、ドーナツ状の試料を作製後、ダイヤモンドワイヤー式精密切断機(Well 3242, Walter Ebner, Germany)で2分割するとともに、平坦な試験面を作製するために歯根表面を1層削除し、48個の試料を作製した。平坦な試験面を2,000番の耐水研磨紙(Fujistar DCCS, 三共理化学)にて研磨し、脱イオン水中で5分間超音波洗浄(US-2R US Cleaner, AS ONE)を行った。その後、耐酸性バーニッシュを塗布して約2×3mmの被験面を作製し、6個ずつの試料を8つの容器にスティッキーワックスにて固定した。

3. 脱灰および処理

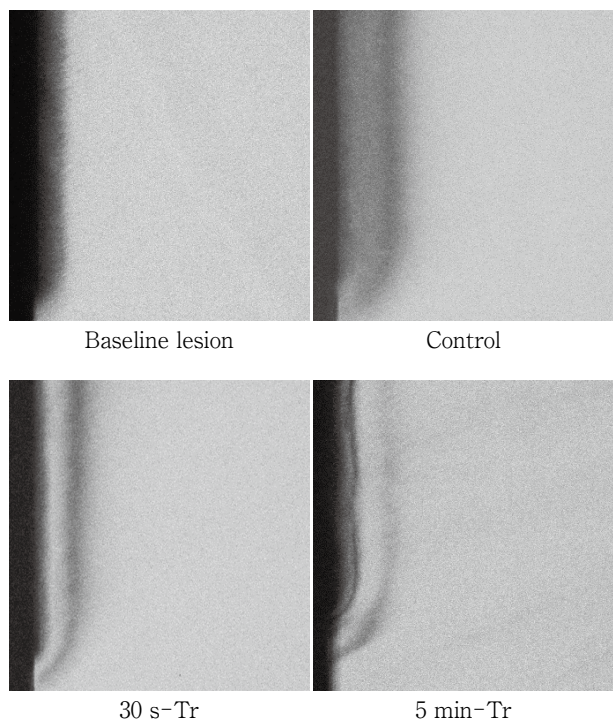
1容器当たり60mlの脱灰溶液(1.5mM CaCl₂, 0.9mM KH₂PO₄, 50mM 酢酸, 0.2ppm F, pH 5.0)^{10,11)}に試料を浸漬させ、37°Cの保温機に静置して、4群の前脱灰を行った。24時間経過後、脱イオン水にて5秒間の洗浄を行い、エアーにて乾燥、基準病巣群とした(Baseline lesion群)。Control群は、前脱灰後、脱イオン水にて5秒間の洗浄を行い、エアーにて乾燥後、被験面に脱イオン水を30秒間塗布、エアー乾燥後、再び60mlの脱灰溶液に浸漬し、37°Cの保温機にて96時間の脱灰を行った。30s-Tr群は、前脱灰後、脱イオン水にて5秒間の洗浄を行い、エアーにて乾燥後、被験面にHysブロックジェルを塗布し、30秒間静置した。その後、脱イオン水で5秒間の洗浄を行い、エアー乾燥後、再び60mlの脱灰溶液に浸漬、37°Cの保温機にて96時間の脱灰を行った。5min-Tr群は、前脱灰後、脱イオン水にて5秒間の洗浄を行い、エアー乾燥後、被験面にHysブロックジェルを塗布し、5分間静置した。その後、30s-Tr群同様に脱イオン水で5秒間の洗浄を行い、エアー乾燥後、再び60mlの脱灰溶液に浸漬、37°Cの保温機にて96時間の脱灰を行った。なお、各群の試料数は12とした。

4. TMR撮影および病巣深度とミネラル喪失量の測定

各群の実験期間終了後、ダイヤモンドワイヤー式精密切断機で厚さ約300μmの薄片を各試料から2枚ずつ、歯軸に対して垂直方向に切り出した。各切片はHigh

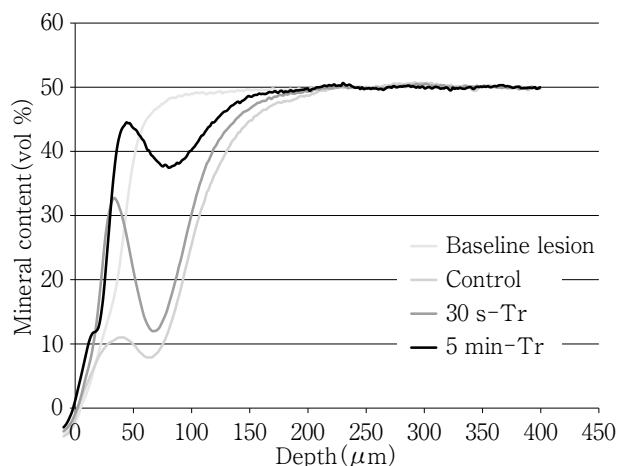
Table 1 Material used

Material	Ingredients	pH	Lot number	Manufacturer
MS Coat Hys Block Gel	methyl methacrylate-co-p-styrene sulfonic acid (MS) polymer 1% oxalic acid sodium fluoride (900 ppmF) acidity regulator (potassium phosphate salt), thickener water, others	2.0	FV012	Sun Medical

**Fig. 1** Representative TMR images

5 min-Tr showed most intense radiopacity as compared with the Control and 30 s-Tr.

resolution X-ray glass plate (コニカミノルタ) を用いて、発生源に Cu およびフィルターに Ni を使用した顕微エックス線装置 (PW3830, Spectris, UK) で、13 段階のステップウェッジとともに TMR 撮影(管電圧 35 kV, 管電流 15 mA, 焦点-試験片間距離 570 mm, 照射時間 15 分)を行った。なお TMR 撮影は、試験片の乾燥を防止するために 13 段階のアルミステップウェッジが組み込まれたホルダーに脱イオン水とともに封入して行った¹²⁾。現像、定着、水洗、乾燥後、セットアップされた microscope-videocamera-microcomputer システム、およびミネラル量分析ソフト (TMR2006・TMR2012, Inspektor Research System, Netherlands) を使用してミネラルプロファイルを作成、ミネラル喪失量 (IML: vol% × μm) を測定した^{10,13,14)}。

**Fig. 2** Average mineral profiles

5 min-Tr showed higher mineral density at both surface layer and lesion body as compared with the Control and 30 s-Tr.

5. 統計分析

統計分析は、Kruskal-Wallis 検定ならびに Steel-Dwass の多重比較検定により有意水準 5% として実施した (EZR version 1.35 software, 自治医科大学附属さいたま医療センター)¹⁵⁾。

結 果

各群の代表的 TMR 像を Fig. 1 に、平均ミネラルプロファイルを Fig. 2 に示す。前脱灰を行ったのみの Baseline lesion 群の TMR 像ならびにミネラルプロファイルは、表層が確認できず活動性の根面齲蝕である soft lesion に類似した状態であった。Control 群の TMR 像は脱灰病巣幅の拡大が認められ、ミネラルプロファイルでは深度約 20 μm から 200 μm の範囲で脱灰が進行し、ミネラル密度が 10 vol% 程度の表層および 8 vol% 程度の病巣体部が確認された。30 s-Tr 群と 5 min-Tr 群のミネラルプロファイルの比較では、前者が表層約 30 vol%, 病巣体部 15 vol% 程にまでミネラル密度が下がっているのに対し、後者では、表層は約 45 vol%, 病巣体部も約 40

Table 2 Lesion depth (LD)

Group	LD (μm)
Baseline lesion	71.5 (63.3-74.4)
Control	165.8 (124.5-182.0)
30 s-Tr	155.7 (138.2-160.2)
5 min-Tr	100.1 (80.8-113.0)

The results are expressed as medians and interquartile ranges.

Brackets represent significant differences within the same column ($p < 0.05$). $n = 12$

vol%で維持されていた。また、Control群に比較し30 s-Tr群のTMR像では不透過層が明瞭となり、5 min-Tr群のTMR像では不透過性がさらに増加した表層の存在が確認された。各群の病巣深度(μm)は、Control群(165.8)と30 s-Tr群(155.7)はBaseline lesion群(71.5)に比較し有意に大きな値を示した(ともに $p = 0.0002$)が、Baseline lesion群と5 min-Tr群(100.1)との間には有意差は認められなかった($p = 0.160$)。また、5 min-Tr群は、Control群と30 s-Tr群に比較して有意に小さな値を示した($p = 0.005, 0.001$) (Table 2)。ミネラル喪失量($\text{vol}\% \times \mu\text{m}$)の比較では、Control群(4,727.5)と30 s-Tr群(3,592.5)はBaseline lesion群(2,020.0)に比較して有意に大きな値を示した(ともに $p = 0.0002$)が、5 min-Tr群(2,102.5)との間に有意差は認められなかった($p = 0.939$)。また、5 min-Tr群はControl群および30 s-Tr群に比較して有意に小さな値を示し(ともに $p = 0.0002$)、30 s-Tr群もControl群に比較して有意に小さな値を示した($p = 0.009$) (Table 3)。

考 察

根面齲蝕は高齢者において罹患率が増加することが報告されており^{16,17)}、発症部位の解剖学的形態が治療を困難にすることからも進行を積極的に防止することが重要である。Nyvadら¹⁸⁾は頬側歯根面の活動性齲蝕を対象にした臨床実験において、フッ化物配合歯磨剤の毎日の使用とともにNaF溶液の塗布を併用することで2カ月から半年後にはすべての齲蝕が非活動性に転じたと報告している。また、う蝕治療ガイドライン第3版根面う蝕の診療ガイドライン¹⁹⁾には、「フッ化物配合歯磨剤(1,100~1,400 ppm F)にフッ化物配合洗口剤(250~900 ppm F)を毎日併用することにより、永久歯の活動性根面う蝕が回復する(硬くなり、非活動性になる)。よって永久歯の活動性根面う蝕の回復(reversals)に、本法を提案する」と記載されている。この指針は臨床家にとって、きわめて有用な情報であると考えられる。その一方で、日常生活に

Table 3 Integrated mineral loss (IML)

Group	IML ($\text{vol}\% \times \mu\text{m}$)
Baseline lesion	2,020.0 (1,841.3-2,100.0)
Control	4,727.5 (3,895.0-5,318.8)
30 s-Tr	3,592.5 (3,348.8-3,882.5)
5 min-Tr	2,102.5 (1,798.8-2,333.8)

The results are expressed as medians and interquartile ranges.

Brackets represent significant differences within the same column ($p < 0.05$). $n = 12$

において要介護や看護状態にある高齢者などは、日常的なセルフケアを含めた口腔ケアが困難となる。また慢性的に進行する根面齲蝕に対しては、発見が遅れ修復処置が困難となる可能性がある。本研究では、歯根面への塗布が容易なジェルタイプの象牙質知覚過敏材を活動性の根面齲蝕を模した歯根面に塗布し、メーカー指定の塗布時間を変更することによる病巣状態の変化をTMRで評価した。

Nyvadらが活動性齲蝕と判断した根面齲蝕のTMR像では、歯根表面の再石灰化が乏しく不透過性の表層がほぼ認められない^{20,21)}。今回の研究においても、基準病巣では表層におけるミネラル密度の高まりが認められない活動性病巣に類似した根面齲蝕病巣が再現できたものと考えられた。その後、脱イオン水で処理して再度脱灰を行ったControl群ならびにメーカー指定の30秒処理群(30 s-Tr)では、基準病巣に比較して有意に大きな病巣深度およびミネラル喪失量を示し、病巣の進行が認められたのに対し、5分処理群(5 min-Tr)ではミネラル喪失量および病巣深度ともに基準病巣と比較して有意な差はなく、効果的な進行抑制効果が示された。今回使用したMSコートHysブロックジェルには、MSコートFと同様にNaFを含有するMS(methacrylate-co-p-styrene sulfonic acid)ポリマーならびにシュウ酸カリウムが含まれている。フッ化物濃度はMSコートの約1/3であるが、歯根面に塗布することでNaFが歯質と反応して CaF_2 が形成され、その後の酸侵襲により CaF_2 より溶け出たフッ化物イオン、カルシウムイオンならびに象牙質から溶出したカルシウムイオン、リン酸イオンが相まって、フルオロアパタイトの形成がもたらされたと考えられる。今回の研究では、塗布時間をメーカー指定の30秒から10倍の5分に延長したことで形成される CaF_2 の量が増加し、その後のフルオロアパタイトの形成量も増加して優れた耐酸性効果が獲得されたと考えられた。本材料はすでに効果的な細管封鎖性ならびに象牙質知覚過敏抑制効果が確認されており^{22,23)}、本ポリマーならびに唾液や歯質のカルシウムと反応して形成されたシュウ酸カル

シウムが象牙細管を物理的に封鎖すると考えられている。今回の結果から、本材を塗布した歯根面は、フッ化ジアンミン銀のように歯質を黒変させることなく、塗布時間を延長することで齲蝕進行抑制ならびに象牙質知覚過敏抑制の両方の効果を兼ね備えた有効な治療法となる可能性が示された。

結 論

表層の再石灰化が乏しい活動性根面齲蝕様病巣に、フッ化物含有ジェルタイプ知覚過敏治療材であるMSコートHysブロックジェルをメーカー指定の塗布時間を超えて5分間処理することにより、効果的な病巣進行停止効果が認められた。

本研究の遂行において開示すべき一切の利益相反はない。

文 献

- 1) 齲蝕. 千田 彰, 宮崎真至, 林 美加子, 向井義晴, 齋藤隆史. 保存修復学. 7版. 医歯薬出版: 東京; 2019. 14-27.
- 10) Kawamura K, Kunimatsu Y, Nakano T, Hasegawa H, Arakawa H, Mukai Y. Anti-demineralization effect of desensitizer containing copolymer and sodium fluoride on root dentin—a transverse microradiographic study. *Acta Biomater Odontol Scand* 2019; 5: 38-43.
- 11) Shiiya T, Tomiyama K, Iizuka J, Hasegawa H, Kuramochi E, Fujino F, Ohashi K, Nihei T, Teranaka T, Mukai Y. Effect of the coating material on root dentin remineralization in vitro. *Am J Dent* 2014; 27: 258-262.
- 12) Van Strijp AJP, Buijs MJ, Ten Cate JM. Contact microradiography of dentine under wet conditions to prevent lesion shrinkage. *Caries Res* 1995; 29: 107-110.
- 13) 長谷川晴彦, 椎谷 亨, 見明康雄, 日高恒輝, 國松雄一, 石澤将人, 二瓶智太郎, 向井義晴. 亜鉛ガラス含有グラスアイオノマーセメントによる歯根象牙質脱灰抑制能. *日歯保存誌* 2018; 61: 361-367.
- 14) Ogihara T, Tomiyama K, Iizuka J, Ishizawa M, Shiiya M, Mukai Y. Effect of desensitizer containing fluoroaluminocalciumsilicate glass nanoparticles on remineralization of root dentin subsurface lesions in vitro. *Dent Mater J* 2021; 40: 1027-1032.
- 15) Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 2013; 48: 452-458.
- 16) Burt BA, Ismail AI, Eklund SA. Root caries in an optimally fluoridated and a high-fluoride community. *J Dent Res* 1986; 65: 1154-1158.
- 17) Imazato S, Ikebe K, Nokubi T, Ebisu S, Walls AWG. Prevalence of root caries in a selected population of older adults in Japan. *J Oral Rehabil* 2006; 33: 137-143.
- 18) Nyvad B, Fejerskov O. Active root surface caries converted into inactive caries as a response to oral hygiene. *Scand J Dent Res* 1986; 94: 281-284.
- 19) 日本歯科保存学会. う蝕治療ガイドライン 第3版. 永末書店: 東京; 2020. 15-23.
- 20) Nyvad B, Ten Cate JM, Fejerskov O. Arrest of root surface caries in situ. *J Dent Res* 1997; 76: 1845-1853.
- 21) Nyvad B, Fejerskov O. Active and inactive root surface caries—structural entities? Thylstrup A, Leach SA, Qvist V. *Dentine and dentine reactions in the oral cavity*. IRL Press: Oxford; 1987. 165-179.
- 22) 鈴木司郎, 山口博康. 「MSコートHysブロック®ジェル」の臨床的検証. *歯界展望* 2016; 128: 776-785.
- 23) Kameyama A, Haruyama A, Nakazawa Y, Furusawa M, Muramatsu T. Micrographic and spectroscopic analyses of the application of methyl methacrylate-p-styrene sulfonic acid copolymer-based desensitizing agents to bovine dentin. *Asian Pac J Dent* 2019, 19: 51-57.
- 1) 檜原 司, 後藤崇晴, 柳沢志津子, 中道敦子, 市川哲雄. 各年齢階層におけるオーラルフレイルと身体的フレイルに関連する兆候—アンケートによる実態調査—. *老年歯学* 2017; 32: 33-47.
- 2) 厚生労働省. 介護・高齢者福祉, 第5期介護保険事業(支援)計画の策定準備及び地域支援事業の見直しに係る会議, 日常生活圏域ニーズ調査モデル事業・結果報告書(全体版). <https://www.mhlw.go.jp/topics/kaigo/dl/tp101027-01c.pdf> (2022年3月1日アクセス)
- 3) 内閣府. 令和元年版高齢社会白書, 高齢期の暮らしの動向, 2 健康・福祉. https://www8.cao.go.jp/kourei/whitepaper/w-2019/zenbun/pdf/1s2s_02_01.pdf (2021年12月28日アクセス)
- 4) 持田悠貴, 山本龍生, 川村和章, 宋 文群, 淵田慎也, 中野貴文, 川田和重, 榎田中外, 佐塚仁一郎, 竹内 智, 荒川浩久. 介護老人保健施設利用高齢者における根面う蝕の有病状況と関連要因. *神奈川歯学* 2019; 12: 85-91.
- 5) 守屋信吾, 安藤雄一, 三浦宏子. 日本人の口腔状態の推移〜「8020」達成度の推移と見直し. *保健医療科学* 2011; 60: 379-386.
- 6) 高野尚子, 葭原明弘, 安藤雄一, 小川祐司, 廣富敏伸, 山賀孝之, 花田信弘, 宮崎秀夫. 高齢者の根面う蝕の有病状況と歯冠う蝕との関連. *口腔衛生会誌* 2003; 53: 592-599.
- 7) 清田義和, 葭原明宏, 安藤雄一, 宮崎秀夫. 70歳高齢者の歯の喪失リスク要因に関する研究. *口腔衛生会誌* 2002; 52: 663-671.
- 8) 向井義晴. 象牙質再石灰化研究と臨床戦略. *日歯保存誌* 2021; 64: 303-307.
- 9) 宮崎真至. 硬組織疾患, 歯の発育異常および関連疾患,

Effect of Gel-type Desensitizer Containing Copolymer and Sodium Fluoride on Active Root Caries-like Lesions *in Vitro*

NAKANO Takafumi, KAWAMURA Kazuaki¹, SHIYA Toru²,
YAMAMOTO Tatsuo³ and MUKAI Yoshiharu²

Division of Dental Sociology, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University

¹Division of Oral Health, Kanagawa Dental University

²Division of Restorative Dentistry, Kanagawa Dental University

³Division of Dental Sociology, Kanagawa Dental University

Abstract

Purpose: This study used transverse microradiography (TMR) to investigate changes in active root caries-like lesions following the application of a gel-type desensitizer containing copolymer and sodium fluoride with different application times.

Materials and Methods: Acid-resistant varnish was applied to the surface of 48 bovine root dentin samples, except over 2×3 mm test areas. These samples were immersed in demineralization solution (1.5 mM CaCl₂, 0.9 mM KH₂PO₄, 50 mM acetic acid, 0.2 ppmF, pH 5.0) at 37°C for 24 h to make baseline lesions. The samples in the Control group were immersed in deionized water for 30 s, and those in the 30 s-Tr and 5 min-Tr groups were treated with a MS Coat Hys Block Gel containing fluoride for 30 s and 5 min, respectively. Then, the samples of these three groups were further immersed in the demineralization solution for 96 h at 37°C. Thin sections from samples in all groups were analyzed by TMR for demineralization depth and mineral loss. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis test and the Steel-Dwass multiple comparison test at a significance level of 5%.

Results: The mineral profile of the 5 min-Tr group showed a remarkably higher mineral density compared to the Control and 30 s-Tr groups, and particularly the surface layer vol% of the 5 min-Tr group was about 45%. The lesion depth (μm) of each group was 71.5 in the Baseline lesion group, 165.8 in the Control group, 155.7 in the 30 s-Tr group, and 100.1 in the 5 min-Tr group, and the depth of the 5 min-Tr group was significantly shallower than that of the Control and 30 s-Tr groups. Mineral loss (vol% × μm) was 2,020.0 in the Baseline lesion group, 4,727.5 in the Control group, 3,592.5 in the 30 s-Tr group, and 2,102.5 in the 5 min-Tr group, and mineral loss of the 5 min-Tr group was significantly smaller than that of the Control and 30 s-Tr groups.

Conclusion: Five-minute treatment, which is longer than the manufacturer's recommendation of 30 s, by MS Coat Hys Block Gel effectively stopped the progression of active root caries-like lesions.

Key words: root caries, dentin hypersensitivity, fluoride, TMR

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

- 例年通りに梅雨が訪れて、湿度の高い中で、鬱陶しい季節が始まりました。一方で、このような世の中で、いつもどおりに季節を体感できることに安心を感じております。会員の皆様におかれましては、益々ご健勝で日々ご活躍のことと存じます。
- コロナウイルスの弱毒化によって、with コロナで社会が動いており、感染者数は漸減の様相ですが、日常が少しずつ戻りつつあるのが感じられるようになってまいりました。Web会議や学会にも慣れて、移動がないことのメリットを享受しつつも、やはり対面で行われることの重要度はとても高いものであると改めて認識されます。
- 早いもので、2022年も半分が過ぎようとしていますが、世界情勢がかくも短期間で大きく変化するものかと実感させられた期間でもありました。このようなことが、21世紀になっても繰り返されるとは思いもしませんでした。平和であることで、人類は進歩し、よりよい未来を築き続けることができるのだと改めて考えさせられました。
- さて、今号は論文数が少ない号となりましたが、次号以降では多数の投稿をいただきますことを、会員の皆様に改めましてお願い申し上げます。また一方で、前編集委員長の中田和彦先生が発刊に向けてご尽力された、本学会のもう1つの機関誌である Operative Dentistry, Endodontology and Periodontology は、昨年度第1号が無事に誕生しました。今年の2号の発行に向けても順調に進んでおり、本学会にしっかりと根を張ってきております。和文誌と並んでさらに発展していくことが期待されます。
- 平和で健康な時間の中で、歯科保存学が益々躍進することを祈念しつつ、秋の学術大会では、久しぶりに先生方と対面でお目にかかれまことを楽しみにしております。
(前田英史 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
英文誌	9月15日	12月末日

令和4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
株式会社ジーシー昭和薬品	113-0033	東京都文京区本郷 1-28-34	(03)5689-1580
株 式 会 社 松 風	605-0983	京都市東山区福稲上高松町 11	(075)561-1112
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
ビヤス株式会社	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
Y A M A K I N 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)

日本歯科保存学雑誌論文投稿票

(第 卷 号掲載希望)

1. 論文の分類 (チェックして下さい) 修復 歯内 歯周 その他
 2. 論文種別 (チェックして下さい) 原著 総説 ミニレビュー 症例・臨床報告
 3. 論文タイトル _____

4. ランニングタイトル (サブタイトルでなく, 論文内容を的確に示す略表題, 40字以内とし, 英文は2文字が和文1文字に相当する)

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

5. 著者名 (全員) _____

6. 筆頭著者の 所属機関名 _____

7. 原稿の構成
 ・本文 (和文・英文表紙, 和文・英文抄録, 本文, 文献, 付図説明を含む) _____ 枚
 ・図 _____ 枚 (うちカラー掲載希望の図番号 _____), 表 _____ 枚

8. 別刷希望部数 _____ 部 (カラー印刷 モノクロ印刷)

9. 連絡先 (投稿・校正責任者)
 ・氏名 _____
 ・住所 〒 _____
 ・電話 _____ 内線 _____ Fax _____
 ・E-mail _____

10. 備考, 連絡事項 _____

日本歯科保存学雑誌著作権帰属承諾書

日本歯科保存学会 殿

_____年 _____月 _____日

下記に署名・捺印した著者は, 下記の表題の投稿原稿が「日本歯科保存学雑誌」に掲載された際には, 同誌の投稿規程により, 著作権を貴学会に帰属することを承諾いたします。

- ・論文タイトル _____
- ・著者 (全員)
- | | | | | |
|--|---|--|---|--|
| | 印 | | 印 | |
| | 印 | | 印 | |
| | 印 | | 印 | |
| | 印 | | 印 | |
| | 印 | | 印 | |

著者全員の署名・捺印が投稿締切までに揃わない場合は, 事務局までご相談ください。
 (裏面にチェックリストがあります)

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1・4号に掲載しています）

なお、13～20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. 再生医療等安全性確保法に定められている再生医療等技術を含む症例発表については、その法に従い患者に提供された技術であることを明記していますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 18. 適応外使用の薬剤・機器あるいは国内未承認の医薬品、医療機器、再生医療等製品を用いた治療法を含む症例発表については、所属機関の長もしくはその長が委託する倫理審査委員会、未承認新規医薬品等審査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"/> 19. 患者資料（臨床写真、エックス線写真など）を症例報告論文に掲載するにあたり、患者（保護者・代諾者）から同意を得ていることを明記していますか。	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 20. 論文発表に際して、研究対象者（患者）個人が特定できないよう、個人情報を保護していますか。	<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。



ROTATE NiTi ファイル

NEW

シンプルな操作ステップで
さまざまな症例に対応

特殊な熱処理による
柔軟性と耐久性の向上

独特のS字型断面による
迅速な形成



詳しくはコチラ



VDW.ROTATE™ NiTi Root Canal File

The remix taking rotary
preparation to the next level

ROTATE NiTi ファイル

〈セット〉3本: ¥5,600 種類: 3種
〈同種類〉4本: ¥7,500 種類: 37種

販売名	一般的名称	承認・認証・届出番号
ROTATE NiTi ファイル	電動式歯科用ファイル 電動式歯科用螺旋状除去器	管理医療機器 医療機器認証番号 303AKBZX001 10000

製品の詳細はこちらまで…

松風 www.shofu.co.jp

価格は2022年5月現在の標準医院価格(消費税抜き)です。



世界の歯科医療に貢献する

株式会社 松風

●本社: 〒605-0983 京都市東山区福福上高松町11 お客様サポート窓口(075)778-5482 受付時間8:30~12:00 12:45~17:00(土日祝除く) www.shofu.co.jp
●支社: 東京(03)3832-4366 ●営業所: 札幌(011)232-1114/仙台(022)713-9301/名古屋(052)709-7688/京都(075)757-6968/大阪(06)6330-4182/福岡(092)472-7595

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

ペースト + パウダー = Bioceramic Evolution



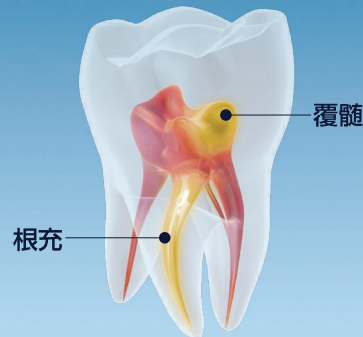
マルチな性状

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ー-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]

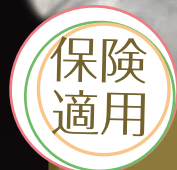
【標準価格】 19,000 円

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





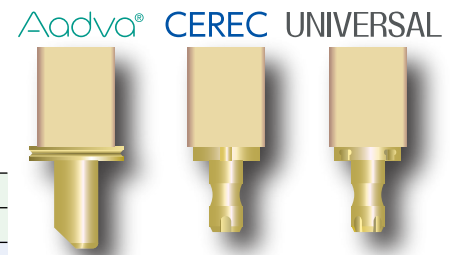
CAD/CAM 冠も、CAD/CAM インレーも やっぱりセラスマート

令和4年4月より CAD/CAM インレー保険収載

セラスマートプライム、300 に
CAD/CAM インレーに最適な
透明性の高いHT 色を追加

セラスマートレイヤー に
歯冠長の短い症例に最適な
サイズ 12 を追加

幅広い加工機に対応



歯科切削加工用レジン材料 管理医療機器	適用範囲	機能区分	色調	サイズ
セラスマート プライム 302AKBZX0007000	小白歯	CAD/CAM冠用材料 (II)	HT:A1HT,A2HT,A3HT,A3.5HT LT:A1LT,A2LT,A3LT,A3.5LT,A4LT	12 12, 14
セラスマート300 228AABZX00116000	大白歯	CAD/CAM冠用材料 (III)	HT:A2HT,A3HT LT:A2LT,A3LT,A3.5LT	12, 14 12, 14, 16
セラスマート レイヤー 231AKBZX00004000	前歯	CAD/CAM冠用材料 (IV)	A1EL,A2EL,A3EL,A3.5EL	12, 14

※CEREC SYSTEM用については、デンツプライ シノナ株式会社に
お問い合わせください。
※UNIVERSAL対応の加工機については、各加工機メーカーに
お問い合わせください。
※UNIVERSAL用はAadva CAD/CAM SYSTEM, PlanMill及び
CEREC SYSTEMには、ご使用できません。

CAD/CAM冠を 強固に接着!

ジーセム ONE neo に
メタルコアや変色歯への CAD/CAM 冠装着に最適な
メタルコアオパーク色を追加

CAD/CAM冠に ワンランク上の表現を!



選べる2タイプ



ハンドミックスタイプ
neo



ジーセム ONE EM

色調●4色=ユニバーサル(A2)、ホワイト(オパーク)、A03、トランスルーセント

歯科接着用レジンセメント 管理医療機器
ジーシー ジーセム ONE EM
301AKZX00021000

ジーセム ONE neo

支台歯・窩洞接着用プライマー
ジーセム ONE 接着強化プライマー

色調●5色=メタルコアオパーク、ホワイト(オパーク)、A03、ユニバーサル(A2)、トランスルーセント

歯科接着用レジンセメント 管理医療機器
ジーシー ジーセム ONE 228AKBZX00104000

セラスマートコート

色調●4色=クリアコート、インテンシブホワイト、インサイザルグレー、サービカルブラウン

高分子系歯冠用着色材料 / 歯科表面滑沢硬化材
管理医療機器 ジーシー セラスマートコート
302AKBZX00048000

発売元 株式会社 ジーシー
東京都文京区本郷3丁目2番14号

製造販売元 株式会社 ジーシーデンタルプロダクツ
愛知県春日井市鳥居松町2丁目285番地

製造販売元 株式会社 ジーシー
東京都板橋区蓮沼町76番1号

カスタマーサービスセンター お客様窓口 ☎0120-416480 受付時間 9:00a.m.~5:00p.m. (土曜日、日曜日、祝日を除く)
※アフターサービスについては、最寄りの営業所へお願いします。 www.gcdental.co.jp/

支 店 ●東京 (03)3813-5751 ●大阪 (06)4790-7333 営業所 ●北海道 (011)729-2130 ●東北 (022)207-3370 ●名古屋 (052)757-5722 ●九州 (092)441-1286
※掲載の内容は2022年4月現在のものです。※色調は印刷のため現品と若干異なることがあります。