

## **Internal adaptation of resin composites: Influence of polymerization shrinkage and stress**

○Seung Hoon Han<sup>1</sup>, Sung Ho Park<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Conservative Dentistry, St. Vincent Hospital, Catholic University of Seoul, Korea*

<sup>2</sup>*Conservative Dentistry, College of Dentistry, Yonsei University, Seoul, Korea*

### **I. Object:**

The first purpose of this study was to compare internal adaptations of different composites in two cavities of different C-factors. The second one was to find out the relationships between internal adaptation and polymerization shrinkage strain and stress.

### **II. Materials & Methods:**

One hundred human 3<sup>rd</sup> molars were divided into high and low C-factor groups. High and Low C-factor groups were divided into 5 subgroups depending on the material used: Filtek supreme (3M), Charisma Diamond (Heraeus Kulzer), Amelogen Plus (Ultradent), Tetric Evoceram Bulk fill (Ivoclar Vivadent), Venus Bulk fill (Heraeus Kulzer). After application of dentin adhesive, composite resin was filled or built up to be the identical dimension. After thermo-mechanical load cyclings, SS-OCT images were taken and the percentage of imperfect margin (%IM) was calculated. Internal adaptations were compared in two ways: among the different materials and between the two cavity configurations. Linear polymerization shrinkage % was measured using a custom-made Linometer. The polymerization shrinkage stresses of 5 composite materials were measured in two ways: under a zero-compliance condition and under a compliance-allowed condition. The relationship between internal adaptation and polymerization stress was investigated.

### **III. Results:**

Highly significant difference was found between internal adaptations in high and low C-factor groups. %IM turned out to be group 2, group 1 ≤ group 4 < group 3, group 5 in High C-factor group. It was shown as group 2, group 4 ≤ group 1, group 3 < group 5 in Low C-factor group. In Low C-factor cavity, the relationship between %IM and polymerization stress under the zero-compliance condition was found to be lower ( $R^2=.498$ , regression analysis).

### **IV. Conclusion:**

Inferior internal adaptation was found in the cavity of high C-factor. Internal adaptation, polymerization shrinkage and stress were different depending on resin composites. At low C-factor cavity, the polymerization shrinkage stress measured under the zero-compliance condition showed lower correlation to internal adaptation.

**Seung Hoon Han**

**Department of Conservative Dentistry, St. Vincent Hospital,**

**Catholic University of Seoul, Seoul, Korea**

Han7537@hotmail.com

## Evaluation of Two Types of Endodontic Sealers in Dentin Penetration and Retrievalability

○Hyunsuk Kim, Euisong Kim, Seung-jong Lee, Su-jung Shin

*Department of Conservative Dentistry, Gangnam Severance Hospital,  
Yonsei University, Korea*

### **I. Object:**

This study was aimed to evaluate the removing efficacy and the amount of residual sealer in a single canal filled with either Endosequence BC (Brasseler, Savannah, GA, USA) or AH plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany).

### **II. Materials & Methods:**

Canal obturation with gutta percha and sealer using continuous wave technique was performed in twenty-eight human teeth. Group 1 (n=13) used AH Plus sealer, and Group 2 (n=15) EndoSequence BC sealer. After 7 days, the root fillings were removed using Gates Glidden drills and the NiTi rotary system. Retreatment time was measured in seconds. Canal cleanliness was examined by scanning electron microscopy (SEM). The remaining debris in the canal space and penetration into dentinal tubules were evaluated by confocal microscopy. Retreatment time was compared by Student's t-test and the difference in sealer penetration and remaining debris between the groups were analyzed by the Mann-Whitney test ( $P<0.05$ ).

### **III. Results:**

There was no significant difference between the two groups in the amount of dentin penetration, amount of debris, or retreatment time. With respect to penetration depth, the AH Plus group showed a slightly higher percentage than the BC group, with a significant difference only in the portion 6mm from the apex ( $P<0.05$ ). SEM images showed significant debris remaining on the canal walls in both groups, while canal patency in retreatment was achieved in every specimen.

### **IV. Conclusion:**

The present study shows that the EndoSequence BC sealer and the AH Plus sealer have similar efficacy in dentin penetration and retrievalability.

**Hyunsuk Kim**

**Department of Conservative Dentistry,**

**Gangnam Severance Hospital,**

**Yonsei University, Seoul, Korea**

GUMDORY@yuhs.ac

## **Cytotoxic Effects of New Calcium Silicate-based Sealers on an Osteoblastic Cell Line**

○Alamuddin Bakhit, Nobuyuki Kawashima, Kentaro Hashimoto,  
Sonoko Noda, Keisuke Nara, Takashi Okiji

*Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of  
Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Tokyo, Japan*

### **I. Object:**

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) is a calcium silicate-based material that shows high biocompatibility and used widely for various endodontic applications. In these days, various MTA-derived calcium silicate-based sealers are developed and used in clinics. The aim of this study was to evaluate the cytotoxicity of two new calcium silicate-based sealers to an osteoblastic cell line (MC3T3-E1).

### **II. Materials & Methods:**

Two calcium silicate-based sealers, Well-Root® ST (WR: Vericom, Korea), and Endoseal® MTA (ES: Maruchi, Korea) were used in this study. AH Plus® (AH: Dentsply, DeTray, Germany) and MTA Fillapex® (FP: Angelus, Brazil) were used for control. Freshly mixed sealers were inserted in cylinders (8 mm in inner diameter and 5 mm long) and were divided into fresh and set groups. In the fresh group, the specimens were immediately incubated in 3 ml of cell culture medium (alpha MEM) for 24 h at room temperature. In the set group, the specimens were stored at 37°C, 100% humidity for 14 days before the incubation in the culture medium. Then, MC3T3-E1 cells (mouse calvaria-derived clonal osteoblastic cells; Riken, Japan) were treated with the sealer extracts (1/4- or 1/16-diluted) for 72 h and relative cell numbers were measured with a WST-8 assay (Cell Counting Kit-8, Dojindo, Japan). Statistical analysis was performed by Tukey-Kramer's methods.

### **III. Results:**

In the fresh group, most of the samples except 1/16-diluted WR suppressed the cell growth ( $p < 0.05$ ). In particular, 1/4-diluted AH, FA, and ES showed severe suppression. In the set group, however, most samples except 1/4-diluted FA, WR, and ES did not induce the suppression of the cell growth.

### **IV. Conclusion:**

Newly developed calcium silicate-based sealers, Well-Root® ST and Endoseal® MTA, showed similar or weaker cytotoxicity to MC3T3-E1 cells compared to AH Plus® and MTA Fillapex®.

**Alamuddin Bakhit**

**Department of Pulp Biology and Endodontics, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and  
Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Tokyo, Japan**

alam@bakhit.com

## **Pulp infection induced osteonecrosis of the jaw in the BPs administration mice**

○Noriko Mutoh, Nobuyuki Tani-Ishii

*Department of Pulp Biology and Endodontics, Kanagawa Dental University*

### **I. Object:**

A bisphosphonates (BPs) administration is chiefly worked for the treatment of osteoporosis or metastasis of malignant tumors. The bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BRONJ) induced the exposure of jaw bone to the oral cavity, indicated that the special attentions must be paid for the application of BPs in the periodontal disease patients. To date, there is no available data on the cause and effect of BRONJ, although clinical cases have been gradually increased in number since the first report in 2002. The present study aims to clarify the relationship between oral administration of BPs and osteonecrosis of the jaw using the murine experimental model.

### **II. Materials & Methods:**

ICR mice were divided into three groups: sham, ovariectomized (OVX) and OVX + Alendronate (ALN) Fosamax<sup>®</sup>. Experimental BRONJ was induced by ALN treatment and pulpal exposure. Both ALN and placebo were administered to the oral cavity of animals 2 days per week for 2-8 weeks. Materials were collected from animals scanned by Micro-CT, and prepared for conventional histological procedure using paraffin sections and hematoxyline and eosin staining.

### **III. Results:**

Calculation of body weights of each of the groups revealed an increase of sham + ALN and ALN, decrease of sham + ALN, OVX, OVX + ALN compared with the starting weight. ALN increased cortical bone thickness and experimental group of using OVX + ALN was regenerated. Histological analysis were induced the periodontal tissue destruction, rescued bone density, inflammatory cell infiltration, and the fibrosis of bone marrow spaces. In the severe cases of the periodontal tissue destruction, the exposure of bone to the oral cavity also occurred following the degeneration of osteocyte and bone marrow.

### **IV. Conclusion:**

The administration of ALN induced the pathological features similar to BRONJ: the severe periodontal tissue destruction is followed by the exposure of bone. The BRONJ-like lesion occurring in our experimental model may be induced by the disorder of bone metabolism and blood circulation.

**Noriko Mutoh**

**Department of Pulp Biology and Endodontics,  
Kanagawa Dental University, Yokosuka, Japan  
mutoh@kdu.ac.jp**

## **Clinical performance vs. Ultrastructural biomineralization of Pozzolan-based MTA root canal sealer**

○WooCheol Lee

*Department of Conservative Dentistry, Seoul National University, School of Dentistry*

### **I. Objectives:**

Recent application of the Mineral trioxide aggregates (MTA) in the field of Endodontics has brought a change of treatment modalities. MTA has been used as perforation repair, root-end filling, pulp-capping and root canal filling material. MTA root canal fillings should not be considered as a routine procedure but used only this type of filling is needed. In order to make a successful root canal obturation with this material, several application methods have been introduced. However, root canal filling with using MTA is still difficult and challenging process. Recently, root canal sealers made of MTA have been developed. Among them, Pozzolan-based MTA sealer has gaining a concern. Pozzolan-based MTA material is reported to have acceptable clinical and biological properties according to a few recent researches. Therefore, a clinical and biological performance of newly developed Pozzolan-based MTA sealer can be discussed in this lecture.

### **II. M&M:**

The root canals were obturated with gutta-percha (GP) and pozzolan-based MTA sealer by using continuous wave of condensation technique. The biomineralization ability under different obturation conditions was evaluated.

### **III. Results:**

Scanning electron microscopy analysis at dentin-MTA interfaces verified the extension of ultrastructural biomineralization. Handling of pozzolan-based MTA sealer during the obturation procedure will be presented. Clinical radiographs of root canal treated tooth using pozzolan-based MTA sealer will also be discussed.

### **IV. Conclusion:**

The use of pozzolan-based MTA sealer during the root canal obturation procedure would provide the intratubular tight sealing.

This study and presentation is supported by Ministry for Health, Welfare & Family Affairs through the Korea Healthcare Technology R&D Project (Grant no. A120815).

**WooCheol Lee, DDS, PhD, Professor**

**Department of Conservative Dentistry,**

**Seoul National University School of Dentistry, Seoul, Korea**

jimin525@snu.ac.kr

## Pressure Generated Outside the Apex During Root Canal Irrigation Activated by Diode Laser and Er:YAG Laser

○Satoshi Watanabe<sup>1</sup>, Kanako Yao<sup>1</sup>, Kazuhisa Satake<sup>1</sup>, Tomoyuki Hongo<sup>1</sup>,  
Arata Ebihara<sup>1</sup>, Chihiro Kobayashi<sup>2</sup>, and Takashi Okiji<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences,*

<sup>2</sup>*Oral Diagnosis and General Dentistry, Dental Hospital,*

*Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Tokyo, Japan*

### I. Objective:

To investigate pressure generated outside the apex during laser-activated irrigation (LAI) with a new diode laser system and an Er:YAG laser compared to the passive ultrasonic irrigation (PUI) and the conventional irrigation (CI).

### II. Materials & Methods:

Plastic root canal models instrumented with a working length of 20 mm to an apical size #40 were used. They were assigned to one of the following groups (n = 10, each):

- 1) LAI with diode laser group: distilled water in the model canal was activated by a pulsed diode laser (Alta MLS, Dental Photonics, USA) at a power setting of 6 (120 mJ, 16 pps) with a computer-controlled heat tip (DS1-200, Dental Photonics,  $\phi = 200 \mu\text{m}$ ) positioned 10 mm short of the working length.
- 2) LAI with Er:YAG laser group: distilled water was activated by an Er:YAG laser (Erwin AdvErL, Morita, Japan; 30 mJ, 10 pps) with a cone-shaped tip (R200T, Morita;  $\phi = 200 \mu\text{m}$ ) positioned 10 mm short of the working length.
- 3) PUI group: PUI was performed with an ultrasonic file (#20 U-file; SHOFU, Japan) driven by an ultrasonic device (Piezon Master 400, EMS, Switzerland; highest power setting) positioned 2 mm short of the working length.
- 4) CI group: a conventional syringe with a 27 gauge flat needle (Nipro needle and syringe, Nipro, Japan) was placed 2 mm short of the working length and 1 ml of distilled water was delivered into the canal.

Each irrigation was done 10 times for 20 seconds each. The mean maximum pressure caused by the irrigation was measured with a pressure sensor (AP-12S, Keyence, Japan) connected via a plastic tube to the model. Data were analyzed by using one-way ANOVA and Tukey-Kramer test at a significance level of 0.05.

### III. Results:

The LAI groups and the PUI group showed significantly lower mean maximum pressure compared to the CI group ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences among the LAI groups and the PUI group ( $p > 0.05$ ).

### IV. Conclusion:

Under the conditions of this preliminary study, the pressure generated outside the apex during the LAI was smaller than that generated by the conventional irrigation method. Nevertheless, the possibility of irrigant extrusion through the apical foramen should be taken into consideration during the LAI.

**Satoshi Watanabe**

**Pulp Biology and Endodontics, Department of Oral Health Sciences,  
Graduate School of Medical and Dental Sciences.**

**Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan**

s.watanabe.endo@tmd.ac.jp

## **Isthmuses in Mesial Root of Myanmar Mandibular First Molar with Vertucci's Type IV Canal Configuration: a Micro Computer-based Tomographic Study**

○Maung Maung Kyaw Moe\*, Jung-Hong Ha, Myoung Uk Jin, Young Kyung Kim, Sung Kyo Kim

*Department of Conservative Dentistry, Kyungpook National University, Daegu, Korea*

**I. Introduction:** Isthmus, one of the intrinsic complexities of root canal system, is the potential space for microbes and accumulation of debris from mechanical debridement procedure. Accumulation of debris is the undesirable consequence of root canal shaping and therefore, isthmus is clinically significant in non-surgical as well as surgical endodontics, especially in apical region. Vertucci's type IV is the most common root canal type in mesial root of mandibular first permanent molars. Therefore, the aim of this study was to investigate the profile of isthmus in mesial root of Myanmar mandibular first molar.

**II. Materials and Methods:** Seventy five extracted mandibular first permanent molars with Vertucci's types IV canal configuration from Myanmar people were selected and scanned using a Micro CT machine (SkyScan 1272, Bruker, Belgium) at 10  $\mu\text{m}$  isotropic voxel size, 125  $\mu\text{A}$ , 80 kV, 1 mm aluminum filter, and 180° rotation. To explore isthmus in the apical region, the apical 6 mm of mesial root and canal system were extracted and constructed three dimensional (3D) model by CTAn software and visualized by CTvol software. Types of isthmus were studied and categorized three dimensionally from 3D models of root and canal system. From two dimensional slides, the incidence of isthmus was also evaluated as partial or complete isthmus by counting the number of slides showing either partial or complete isthmus from apex to 1, 1 to 2, 2 to 3, 3 to 4, 4 to 5 and 5 to 6 mm levels. Fifty sections for each level and 300 sections for apical 6 mm region of each specimen were evaluated. Total 22500 sections were examined for apical 6 mm region of 75 specimens by CTvol software.

**III. Results:** For 3D types of isthmus, five 3D types of isthmus were observed in this study as sheet complete type (31%), sheet incomplete type (7%), tubular incomplete type (4%), mixed complete type (38%) and mixed incomplete type (20%) in apical 6 mm region. In two dimensional sections, the incidence of isthmus is (5.76%) at apex to 1 mm, (44.21%) at 1 to 2 mm, (73.41%) at 2 to 3 mm, (77.12%) at 3 to 4 mm, (74.72%) at 4 to 5 mm and (70.88%) at 5 to 6 mm levels, respectively. Partial isthmus was more common than complete isthmus at all levels.

**IV. Conclusion:** Mesial root of Myanmar mandibular first permanent molar with Vertucci's type IV canal configuration reveals the high incidence of isthmus in apical 6 mm region. The findings in this study show that isthmus is a complex structure and difficult to shape, clean and fill by conventional techniques. The majority of the specimens were composed of sheet and tubular or cannula structure and they were also difficult to classify in 2D and 3D views.

**Maung Maung Kyaw Moe,**

**Postgraduate student,**

**Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry,**

**Kyungpook National University, Daegu, Korea**

mmkm10472@gmail.com

## **Biocompatibility of Novel Type I Collagen Purified from Tilapia Fish Scale: An In Vitro Comparative Study**

○Jia Tang, Takashi Saito

*Division of Clinical Cariology and Endodontology,  
Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido, Japan*

### **I. Objective:**

The purpose was to compare the effect of tilapia scale collagen and porcine skin collagen on MDPC-23 cell *in vitro*.

### **II. Materials & Methods:**

MDPC-23, a rat odontoblast-like cell line, was used. Type I collagen from tilapia scale (T-COL) (Taki chemical, Japan) and porcine skin (P-COL) (Nitta gelatin, Japan) were used. Cells were inoculated on those collagen-coated 35mm tissue culture polystyrene dish. Non-coated plates were taken to be the control. Morphology of cell was observed under phase contrast microscopy (19 hours, 44 hours, 3d). Cell number was counted manually by a hemocytometer (2d, 3d, 4d). Cell differentiation was evaluated in terms of alkaline phosphatase activity (ALP activity) (6d, 8d, 10d) and real time RT-PCR (7d, 10d). Cell mineralization was observed by alizarin red staining (10d) and quantified by Cetylpyridinium Chloride (CPC) extraction. Tukey's multiple comparison test was used for statistical analysis.

### **III. Results:**

T-COL promoted the cell proliferation on 2d and 3d ( $p<0.05$ ), while P-COL only promoted the cell proliferation on 2d ( $p<0.05$ ). ALP activity was up-regulated on T-COL and P-COL for the three time points ( $p<0.05$ ). *BSP* mRNA expression was enhanced by T-COL (1.21-fold) and P-COL (1.25-fold) at 7d ( $p<0.05$ ). T-COL and P-COL accelerated the mineralization by two-fold to that of control ( $p<0.05$ ). No significant differences were detected between the two types of collagen in each experiment. Matsumoto (Matsumoto R et al., 2011) reported a five-fold higher ALP activity promoted by T-COL in comparison to P-COL on human mesenchymal stem cells. The potential reason for different result obtained in this work might due to different type of cells used and experimental design.

### **IV. Conclusion:**

T-COL displayed comparable capacity to P-COL in promoting cell proliferation, differentiation and accelerating cell mineralization. It hence holds sound potential to be used as an alternative choice to mammalian collagens for tissue regeneration study in dental field.

**Jia Tang**

**Division of Clinical Cariology and Endodontology,  
Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido, Tobetsu, Japan  
tangjia@hoku-iryo-u.ac.jp**

## カキタンニンのポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する酸産生抑制効果

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 う蝕制御修復学講座<sup>1</sup>, 微生物感染学講座<sup>2</sup>, 神経組織発生学講座<sup>3</sup>,  
東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野<sup>4</sup>,

Department of Preventive Dentistry, Academic Center for Dentistry Amsterdam (ACTA)<sup>5</sup>

○富山 潔<sup>1</sup>, 長谷川晴彦<sup>1</sup>, 椎谷 亨<sup>1</sup>, 渡辺清子<sup>2</sup>, 河田 亮<sup>3</sup>, 東 一善<sup>3</sup>, 齋藤正寛<sup>4</sup>, 高橋 理<sup>3</sup>, 浜田信城<sup>2</sup>,  
Exterkate R.A.M<sup>5</sup>, 向井義晴<sup>1</sup>

### Inhibitory effect of condensed tannin extracted from astringent persimmon on acidogenic capacity of polymicrobial biofilms

<sup>1</sup> Dept. of Cariology and Restorative Dent, <sup>2</sup> Dept. of Microbiology, <sup>3</sup> Dept. of Histology, Embryology and Neuroanatomy,  
Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University,

<sup>4</sup> Dept. of Restorative Dentistry, Div. of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry,

<sup>5</sup> Department of Preventive Dentistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam (ACTA), The Netherlands

○ TOMIYAMA Kiyoshi<sup>1</sup>, HASEGAWA Haruhiko<sup>1</sup>, SHIYA Toru<sup>1</sup>, WATANABE Kiyoko<sup>2</sup>, KAWATA Akira<sup>3</sup>, HIGASHI Kazuyoshi<sup>3</sup>,  
SAITO Masahiro<sup>4</sup>, TAKAHASHI Osamu<sup>3</sup>, HAMADA Nobushiro<sup>2</sup>, Exterkate R.A.M<sup>5</sup>, MUKAI Yoshiharu<sup>1</sup>

【研究目的】口腔バイオフィルムは、糖の摂取に関わらず様々な酸を産生するが、齶蝕発生時、乳酸が重要な役割を果たすことが知られている。口腔バイオフィルムは多種菌とともに齶蝕原生菌を含んでおり、スクロース摂取頻度の増加により酸産生能および酸耐性能に優れたこれらの割合の増加とともに、乳酸産生量の増加、pHの低下が生じ、歯質の脱灰を引き起こす。このような口腔バイオフィルム中の齶蝕原生菌の乳酸産生を生体に害を及ぼさず、しかも持続的に抑制できる抗菌薬を開発することは重要である。縮合型タンニンは *S. mutans* に吸着し易いことから、その発育阻止や歯質および修復物への付着抑制能の高いことが指摘されている。我々は第138、139、140および142回本学会において、渋柿由来の縮合型タンニンを含有させた食品・化粧品等の原料 (Pancil PS-M: リリース科学工業株式会社) が短期および長期培養ポリマイクロバイアルバイオフィルム中の細菌細胞を破壊する可能性があること、さらには緑茶タンニンや0.2%グルコン酸クロルヘキシジンよりも持続的にポリマイクロバイアルバイオフィルムの増殖を抑制できることを報告した。今回、Pancil PS-M のポリマイクロバイアルバイオフィルムの乳酸産生に対する抑制効果を分析する目的で、Pancil PS-M 処理前後の乳酸産生量の分析を行った。

【材料および方法】ポリマイクロバイアルバイオフィルム形成用材料には直径12 mm厚さ150 μmのカバーガラス (Menzel, Braunschweig, Germany) を用いた。処理剤には、4 wt% Pancil PS-M, Corsodyl (0.2 wt% グルコン酸クロルヘキシジン, GlaxoSmithKline) を用いた。実験群は、(1) 非処理群 (Cont), (2) 4.0 wt% Pancil PS-M 群 (P), (3) 0.2 wt% グルコン酸クロルヘキシジン群 (C) の3群とした (n=6)。ポリマイクロバイアルバイオフィルムの培養には一被験者から採取した刺激唾液を用いた。培養液には unbuffered McBain 2005 (0.2%スクロース含有) 培養液を用い、50倍希釈となるように刺激唾液を混入した。培養液の交換は10時間、14時間のサイクルで行ない、使用済み培養液のpH測定を行った。培養24時間の時点で各処理剤 (P, C) あるいは滅菌脱イオン水 (Cont) に5分間浸漬後、嫌気条件下 (CO<sub>2</sub>: 10.0%, H<sub>2</sub>: 10.0%, N<sub>2</sub>: 80.0%, 37°C) で48時間、培養した。乳酸産生量の測定は、バイオフィルムが付着した円盤状ガラス試片を Bacto Peptone Water (BPW) に浸漬した後、乳酸測定キット (日本バイオコン株式会社) を用いて、薬液処理後および培養終了時点で行なった。乳酸産生量および pH 測定値は、One-way ANOVA および Tukey の検定により有意水準5%にて統計学的分析を行ない、各処理剤がポリマイクロバイアルバイオフィルムの酸産生に与える影響を比較検討した。

【結果】24時間培養したポリマイクロバイアルバイオフィルムに薬液処理を行い、その後、バイオフィルム培養を継続した結果、処理直後 (乳酸産生減少率: P = 40.9%, C = 40.3%) および、その後の培養停止時点での乳酸産生量は、P群、C群が Cont 群に比較して有意に抑制された、さらには、培養停止時点では、C群の乳酸産生量が増加するのに対し、P群では顕著に抑制されていた (P = 51.2%, C = 23.3%)。また、PおよびC群の処理直後における使用済み培養液のpHは、Contに比較して有意に上昇し (Cont = 4.2, P = 6.8, C = 6.7)、その後48時間培養を継続すると、C群ではpHが下降するもののP群のpH下降は有意に抑制された (Cont = 4.1, P = 6.0, C = 4.8) (p<0.05)。

【考察】P群がC群よりも持続的な乳酸産生抑制効果を示したことから、Pancil PS-M中の縮合型タンニンは、細菌細胞に対し長時間にわたってダメージを与え続けていると考えられた。また、本研究では、ポリマイクロバイアルバイオフィルムモデルが、抗菌剤の生菌抑制効果だけでなく乳酸産生量の抑制効果およびその後の持続性についても評価できるモデルであることが示された。

【結論】Pancil PS-Mは口腔バイオフィルムの乳酸産生を処理直後に抑制するだけでなく、その後少なくとも48時間の乳酸産生を抑制できる可能性が示された。

## S-PRG フィラー含有コンポジットレジンの *Streptococcus mutans*

### の糖代謝活性に対する抑制効果

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子制御学講座(歯科保存学教室)<sup>1</sup>、顎口腔機能再建学講座(歯科理工学教室)<sup>2</sup>、  
東北大学大学院歯学研究科 歯学イノベーションリゾンセンター<sup>3</sup>、口腔生物学講座(口腔生化学分野)<sup>4</sup>

○三木彩希<sup>1</sup>、真柳 弦<sup>3</sup>、安彦友希<sup>3</sup>、騎馬和歌子<sup>2</sup>、北川晴朗<sup>2</sup>、北川蘭奈<sup>1</sup>、林 美加子<sup>1</sup>、高橋信博<sup>4</sup>、今里 聡<sup>2</sup>

**Inhibitory effects of resin composites containing S-PRG filler on glucose metabolism of *Streptococcus mutans***  
Department of Restorative Dentistry and Endodontology<sup>1</sup>, Department of Biomaterials Science<sup>2</sup>, Osaka University Graduate School of Dentistry  
Liaison Center for Innovative Dentistry<sup>3</sup>, Division of Oral Ecology and Biochemistry<sup>4</sup>, Tohoku University Graduate School of Dentistry  
○Saeki Miki<sup>1</sup>, Gen Mayanagi<sup>3</sup>, Yuki Abiko<sup>3</sup>, Wakako Kiba<sup>2</sup>, Haruaki Kitagawa<sup>2</sup>, Ranna Kitagawa<sup>1</sup>, Mikako Hayashi<sup>1</sup>, Nobuhiro Takahashi<sup>1</sup>, Satoshi Imazato<sup>2</sup>

#### 【研究目的】

フルオロボロアルミノシリケートガラスの表層にグラスアイオノマー相を有する S-PRG フィラー (松風) は、 $\text{BO}_3^{3-}$ , F,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{SiO}_3^{2-}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  といった多種のイオンを放出する特性を備えている。われわれはこれまで、S-PRG フィラーを含有するコンポジットレジン (CR) の硬化体表面では *Streptococcus mutans* の増殖が抑制されることを明らかにし、さらに、その作用が主に  $\text{BO}_3^{3-}$  と F の溶出に起因するものであることを報告してきた (第 136 回日本歯科保存学会学術大会, 第 62 回日本歯科理工学会学術講演会)。

ところで、抗菌性を示す成分は、増殖阻害には至らない低濃度でも細菌に対して何らかの抑制作用を発揮する可能性があることが知られている。そこで今回は、S-PRG フィラーを含有する CR の *S. mutans* の糖代謝活性に対する抑制効果を、低濃度レベルの  $\text{BO}_3^{3-}$  と F の作用と合わせて検討した。

#### 【材料および方法】

1. CR 硬化体表面での pH 低下抑制効果の検討: Bis-GMA 70%/TEGDMA 30% のモノマー組成で、S-PRG フィラーを 55.9 (vol)% 含有する試作 CR を調製した。ディスク状の CR 硬化体表面に、試料端から中心に至る深さ 1 mm の溝を形成し、微小 pH 電極を固定した後、その上に  $1 \times 10^8$  CFU/g に濃縮した *S. mutans* NCTC10449 菌塊を接触させた。菌塊に PPB 100  $\mu\text{L}$  を滴下して 37°C にて 60 分間静置した後、0.5% グルコース 500  $\mu\text{L}$  を滴下し、37°C 下での pH 変動を 120 分後まで記録した。コントロールには S-PRG フィラーの代わりにシリカフィラーを含む CR を使用し、試料数は各群につき 3 とした。

2.  $\text{BO}_3^{3-}$ , F 存在下での代謝活性の測定:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  または NaF を蒸留水に溶解させて  $\text{BO}_3^{3-}$  と F の標準溶液を作製した。各標準液を、S-PRG フィラーからの溶出濃度の 25%, 12.5%, 6.25% となるように希釈後、*S. mutans* 菌液を加えて ( $1 \times 10^5$  または  $1 \times 10^6$  CFU/mL) 嫌気培養を行った。18 時間培養後、吸光度測定により増殖を判定すると同時に、XTT assay にて細菌の活性を評価した。

3.  $\text{BO}_3^{3-}$ , F 存在下での酸産生能の測定: S-PRG フィラーからの溶出濃度の 12.5% に希釈した  $\text{BO}_3^{3-}$  または F 標準液に *S. mutans* 菌液を加え (約  $1 \times 10^8$  CFU/mL), 37°C 下で 4 分間静置した。その後、0.5% グルコース 100  $\mu\text{L}$  を滴下し、pH スタットを用いて経時的な酸産生量を測定した。得られた酸産生量曲線の傾きから、酸の産生速度を算出した。

#### 【結果】

コントロール CR ではグルコース添加 15 分後から pH が低下し始め、120 分後には約 4.2 に達したのに対し、S-PRG フィラー含有 CR では、35 分後から pH 低下が始まり、120 分経過後も約 4.8 にとどまった。また、増殖に影響がみられない濃度の  $\text{BO}_3^{3-}$  または F の存在下でも、XTT assay での有意な活性抑制が認められた。さらに、低濃度のこれらのイオンの存在によって、グルコース添加 10~30 分後の酸産生速度の有意な低下が確認された。

#### 【考察および結論】

S-PRG フィラーを含有する CR 表面では、*S. mutans* の糖代謝による pH 低下の抑制がみられた。S-PRG フィラーには酸の中和作用があることも知られているが、今回の結果からすれば、溶出した  $\text{BO}_3^{3-}$  または F によって *S. mutans* の代謝活性が抑制されたこともその一因となっているものと考えられる。 $\text{BO}_3^{3-}$  と F は、*S. mutans* に対して、増殖抑制には至らない低い濃度レベルであっても糖代謝抑制効果を示すことより、S-PRG フィラー含有 CR 表面では、持続的な pH 低下抑制効果が発現される可能性が期待される。

### 人工唾液中での小窩裂溝封鎖材のフッ素溶出と脱灰抑制効果について

<sup>1</sup> 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔機能再構築学系専攻摂食機能保存学講座う蝕制御学分野

○テウエ ジン イ<sup>1</sup>、ロメロ マリア ハシント ロザリオ<sup>1</sup>、中嶋省志<sup>1</sup>、島田康史<sup>1</sup>、田上順次<sup>1</sup>

#### Monitoring the Fluoride Release and Demineralization Inhibition Potential of Fissure Sealants in Simulated Salivary Solutions

<sup>1</sup>Cariology and Operative Dentistry Department, Division of Oral Health Sciences, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

OTHWE Zin Ei<sup>1</sup>, ROMERO Maria Jacinta Rosario H.<sup>1</sup>, NAKASHIMA Syozi<sup>1</sup>, SHIMADA Yasushi<sup>1</sup>, TAGAMI Junji<sup>1</sup>

**Background and Purpose:** Fluoride incorporation into fissure sealants (FS) is a viable way for caries prevention through its potential to inhibit demineralization with the release of fluoride into enamel. Numerous in vitro studies have been carried out on the fluoride measurement of dental materials but without the involvement of salivary proteins. Salivary phosphoproteins are key in tooth mineral regulation processes and preventing mineral precipitation on tooth surfaces. It has recently been reported that casein can potentially mimic the mineral regulatory function of salivary phosphoproteins in vitro (Romero et al., 2015). The aim of this study was to monitor the fluoride release (FR) of FS in artificial saliva (AS) solutions containing the salivary phosphoprotein homologue casein and assess the potential for protection against demineralization to the adjacent enamel surfaces that is exposed to the AS and not in direct contact with the PFS.

**Materials and Methods.** 2 x 2 x 0.5 mm Class I cavities were prepared in bovine enamel blocks (n=10) and were filled with either: control – non-fluoride containing adhesive and flowable composite resin (C), Estelite Flow Quick (Tokuyama Dental); test groups - fluoride containing FS: light cured resin sealant Teethmate F-1 (TF) (Kuraray Noritake Dental) and glass ionomer cement Fuji VII (FVII) (GC Corporation). Specimens were then incubated in AS (1mM CaCl<sub>2</sub>, 3mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100mM NaCl, 100mM Na acetate, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 100 µg/ml casein), pH 6.3 at 37°C. AS were refreshed every 2 days for 14 days and FR were measured accordingly. Data were analyzed using Two way ANOVA with Bonferroni adjustment. Morphological assessment of adjacent enamel surfaces was performed in additional specimens (n=3) by using scanning electron microscopy. After the incubation of the enamel blocks in AS, the specimens were subsequently demineralized for 5 days at pH 4.8. Protection of the adjacent enamel surfaces from demineralization were assessed using released calcium ion measurements and swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) imaging done before and after demineralization. Total FR was measured similarly from sealant discs (n=5) incubated in deionized water (DW) for 14 days.

**Results.** FVII showed significantly higher (p<0.05) cumulative FR at all times than TF and control whereas TF (p>0.05) with control (Fig.1). Total FR of TF was higher (p<0.05) in DW than in AS. TF and FVII exhibited similar Ca measurements (p>0.05) which are lower than the control (p<0.05). Observation with SS-OCT showed that 50% of TF specimens had some protection against demineralization at the adjacent enamel (Fig.2-A) while other groups showed no apparent protection (Fig. 2-B,C)

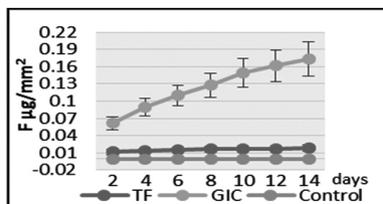
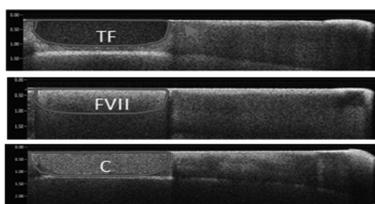


Fig.1- Cumulative fluoride release in AS containing casein



A. TF shows apparent protective area in adjacent enamel surface  
B. FVII without apparent protective area in adjacent enamel surface  
C. Control specimen

Fig. 2. SS-OCT imaging

**Conclusion.** Fluoride release of TF in casein-containing AS was considerably lower than FVII. Nevertheless, TF exhibited comparable or even better anti-demineralization potential. Both TF and FVII may provide protection to the adjacent enamel surface. Further studies are needed to compare and explain the mechanisms of fluoride release and utilization in different types of solutions.

**BMP-1 によるヒト歯髄細胞膜糖鎖の変化**

神奈川県立歯科大学大学院歯学研究科 歯髄生物学講座  
○室町 幸一郎, 石井 信之

**BMP-1 alters membrane glycosylation in human dental pulp cells**

Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University  
○MUROMACHI Koichiro, TANI-ISHII Nobuyuki

**【目的】**

メタロプロテアーゼである BMP-1 は dentin sialophosphoprotein (DSPP) や dentin matrix protein-1 (DMP-1) などを分解することで象牙質の基質形成に関与すると考えられている。また、ヒト象牙質・歯髄複合体において齶蝕により修復象牙質が形成される際に BMP-1 の発現が亢進すること、BMP-1 が dynamin 依存性のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれ、骨形成に関わる分泌タンパク質である CCN2/CTGF の発現を亢進することを報告してきた(第 141 回 日本歯科保存学会 秋季学術大会)。

細胞膜には種々のタンパク質や脂質が存在するが、それらには糖鎖が結合しており、糖タンパク質や糖脂質として細胞間の情報伝達や分泌タンパク質のリザーバーなど多彩な機能を有している。また、細胞の分化に伴い糖鎖の修飾に変化が現れることが知られており細胞の表現型を反映するマーカーとしても有用であると考えられている。この糖鎖はタンパク質との結合様式によって 2 つに大別され、タンパク質中のアスパラギン残基と結合する N 型糖鎖と、セリンやスレオニンと結合する O 型糖鎖が知られている。これまでの研究から BMP-1 がプロテアーゼ活性非依存的に分泌タンパク質生成を調節することが明らかになりつつあるが、それらと接する細胞膜糖鎖の発現に及ぼす影響については不明である。そこで本研究では、BMP-1 がヒト歯髄培養細胞の細胞膜糖タンパク質修飾に及ぼす影響を明らかにすることを目的に、Lectin microarray を用いて糖鎖の変化を検索した。

**【材料および方法】**

治療目的で抜歯予定の患者に研究のインフォームドコンセントを行い、同意を得た後に抜去された健全歯から歯髄を抽出し研究に用いた。なお本研究は神奈川県立歯科大学倫理委員会の承認を得て行った。(承認番号: 277)

- 1) 細胞培養: ヒト健全歯から歯髄を抽出したのち、3 代継代培養した細胞をヒト歯髄培養細胞として実験に用いた。
- 2) 細胞膜画分の抽出: recombinant human BMP-1 (100 ng/ml) で刺激したのちに、Mem-PER Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit を用いて細胞膜画分を抽出した。
- 3) Lectin microarray: 細胞膜画分のサンプルを LecChip(GlycoTechnica)にて解析し、細胞膜上の糖鎖プロファイリングの変化を検索した。

**【結果】**

- 1) control 群と比較し BMP-1 において N 型糖鎖の修飾に有意な減少を認めた。
- 2) control 群と比較し BMP-1 において O 型糖鎖の修飾に有意な増加を認めた。

**【考察】**

今回の結果から、BMP-1 による刺激によりヒト歯髄の細胞膜糖鎖に変化が現れることが明らかとなった。しかしながらこれらの糖鎖修飾の変化が BMP-1 のプロテアーゼとしての働きによるものか、あるいは糖転移酵素の発現を調節するなど細胞に直接働きかけるものであるかは今後の検討課題である。

本研究は、平成 27 年度科学研究費補助金(若手研究(B) No. 26861609)により行った。

## 象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進する象牙質基質分解産物の同定

大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)

○小道俊吾, 高橋雄介, 岡本基岐, 林 美加子

### Identification of degraded dentin matrix components promoted wound healing process of dentin-pulp complex

Osaka University Graduate School of Dentistry, Department of Restorative Dentistry and Endodontology

○KOMICHI Shungo, TAKAHASHI Yusuke, OKAMOTO Motoki, HAYASHI Mikako

#### 【研究目的】

全身の組織において細胞外基質 (Extracellular Matrix: ECM) は酸や酵素によって分解され、分解された ECM はその組織において生理学的活性を持ち創傷治癒を促進させるという報告がある。う蝕環境下においても、歯髄にとつての ECM である象牙質基質タンパク (Dentin Matrix Components: DMCs) が酸や酵素によって分解されると考えられ、Matrix metalloproteinase (MMP) 分子により分解された DMCs が象牙質-歯髄複合体の創傷治癒を促進することをわれわれは第 139 回、第 142 回日本歯科保存学会で報告してきた。

そこで本研究では、象牙質-歯髄複合体の創傷治癒促進作用を持つ DMCs 分解産物中に存在する創傷治癒を促進する特定の分子の同定を目的とし、DMCs 分解産物中に含まれるタンパクの詳細な解析ならびに DMCs 分解産物中の細胞増殖を促進する分画の検索をおこなった。

#### 【方法】

本研究に用いたヒト象牙質試料は英国 Birmingham 大学 School of Dentistry Tooth Bank Ethics Committee の承認を受け研究を実施した (承認番号 90/H0405/33)。

ヒト DMCs と組換え MMP 分子 (MMP-1, MMP-20) を 37°C で 24 時間反応させて、これまでにわれわれが象牙質-歯髄複合体創傷治癒の顕著な促進効果を報告した DMCs 分解産物を作成し、非分解の DMCs をコントロールとして以下の実験をおこなった。

#### 1) 分解 DMCs 中タンパクの差異解析

MMP-1, MMP-20 により生成された DMCs 分解産物について、LC-ESI-MS/MS により質量分析を行い得られたマススペクトルに対し Mascot software を用いてデータベースとの照合をおこないタンパクの同定および差異解析をおこなった。

#### 2) 細胞増殖を促進する分画の検索

DMCs 分解産物を液体クロマトグラフィーにて親水性に基づく分離を行い、得られたピークを各リテンションタイムに基づき 14 の分画に分類し、回収をおこなった。ヒト歯髄由来幹細胞 (DPSCs, LONZA) を 5,000 cells / well の濃度で播種し、各分画の存在下で 5 日間培養し、細胞増殖能を WST-1 法にて評価した。統計学的有意差検定は、One-way ANOVA および Tukey-Kramer 検定にておこなった (危険率 5%)。

#### 【結果および考察】

1) 非分解 DMCs, DMCs 分解産物中のタンパクのうち大部分は共通であったが、MMP-1 および MMP-20 による DMCs 分解産物中に特有なタンパクがそれぞれ 58 種類, 30 種類、両試料に共通のタンパクが 17 種類同定された。

2) MMP-1 および MMP-20 による DMCs 分解産物中に、非分解 DMCs と比較し、有意に細胞増殖を促進する分画が認められた ( $p < 0.05$ )。

以上の結果より MMP-1 および MMP-20 により生成された DMCs 分解産物にはおのおの固有のタンパクが溶出しており、これらのタンパクもしくはタンパクを含む分子群の中に細胞増殖を促進する分画の存在が示唆された。今後、細胞増殖促進作用が認められた分画におけるタンパクの詳細な解析をおこない、創傷治癒を促進する分子の同定ならびに構造解析をおこなっていく予定である。

(本研究は JSPS 科研費 25462958 の助成を受けたものです。)

## SAA は血管内皮細胞における接着分子の発現を上昇させる

愛知学院大学歯学部歯周病学講座

○西田 英作、相野 誠、岩村 侑樹、佐々木 康行、林 潤一郎、三谷 章雄

### Upregulation of adhesion molecules in human aortic endothelial cells by serum amyloid A.

Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, Nagoya, Japan

○NISHIDA Eisaku, AINO Makoto, IWAMURA Yuki,

SASAKI Yasuyuki, HAYASHI Jun-ichiro, MITANI Akio

#### 【緒言】

近年、ペリオドンタルメディシンの研究の中で、歯周病と動脈硬化症の関連性が示唆されているが、それらは主に疫学的研究によるものである。一方、モデルマウスを用いた報告では、動脈硬化症易発症マウス (ApoE ノックアウトマウス) に歯周炎を惹起させると、急性炎症マーカーである血清アミロイド A (SAA) が上昇し、コントロールマウスと比較して、大動脈の内膜におけるプラーク形成が大きくなったとの報告もある。しかしながら、モデルマウスを用いた報告においても、多くは現象を確認しているのみで、歯周病が動脈硬化性疾患を誘発する詳細なメカニズムに関しては不明な点が多い。そこで今回我々は、そのメカニズムを解明する基礎的研究として、SAA に着目し、ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) を用いて、SAA が血管内皮細胞にどのような影響をおよぼすかを *in vitro* で解析した。

#### 【材料および方法】

HAEC は 6 穴プレートに  $1 \times 10^5$  cells/well にて播種、培養した。実験に供した細胞の継代数は 6~7 継代とし、コンフルエントに達するまで培養した。その細胞に対し、リコンビナントヒト SAA (rhSAA) にて刺激後、RNA を抽出した。cDNA に変換後、Atherosclerosis PCR Array を用いて rhSAA 刺激前・刺激後の経時的な遺伝子発現の変化を解析した。次に SAA 刺激時に重要な役割を担う receptor をスクリーニングするために、rhSAA 刺激前・刺激後の HAEC において qPCR 法にて、過去に報告のある SAA receptor の中から候補を検索した。さらに、PCR array の結果とスクリーニングされた SAA receptor からそのカスケードの仮説を立て、qPCR 法にて rhSAA 刺激前・刺激後における各遺伝子の経時的な発現変化を調べた。

#### 【結果】

PCR array の結果、HAEC において rhSAA 刺激前後を比較したところ、接着分子である ICAM1、VCAM1、SELE が顕著に上昇し、中でも SELE の発現が最も上昇した。また、rhSAA 刺激後、遺伝子レベルにおいて最も発現が上昇する receptor は TLR2 であることが分かった。そこで rhSAA 刺激後、TLR2 signaling 下流の遺伝子 NFkB1、TNF の発現を検討したところ、それらは顕著に上昇しており、同時に SELE の発現も上昇することが分かった。

#### 【考察】

HAEC に rhSAA を添加、刺激することにより顕著に上昇した ICAM1、VCAM1、SELE は、動脈硬化症初期のプラーク形成過程の初期段階にて、血中の単球が、血管内皮細胞と接着 (テダリング)、その後血管内皮細胞上で回転現象 (ローリング) を起こすのに重要な接着分子である。その中で最も発現が上昇した SELE は、炎症性因子によってその発現が誘導され、血管内皮細胞表面への接着において重要な分子である。つまり、本研究では、血管内皮細胞は SAA 刺激によって炎症状態となった結果、単球を内皮表面に引き寄せているという状況を *in vitro* で再現することができた。また、HAEC において、rhSAA 刺激で最も発現の上昇した TLR2 は、そのシグナル伝達系が活性化されると、炎症性サイトカインの発現を増強することが知られているが、本研究では、TLR2 signaling 下流の NFkB1、TNF の炎症性因子の発現が上昇していることが分かった。

#### 【結論】

今回の結果より、SAA は血管内皮細胞の TLR2 を介して炎症性因子の産生を誘導し、その後血管内皮表面の接着分子発現を誘導することで単球/マクロファージを集積させる可能性が示唆された。

ベルベリンはヒト歯根膜細胞アルカリフォスファターゼを抑制し細胞増殖を誘導する

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野  
○池野 修功、金谷 聡介、根本 英二、須藤 瑞樹、向阪 幸彦、島内 英俊

**Berberine induces cell proliferation of hPDL cells with decreasing ALP expression.**

Department of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry  
○IKENO Shuko, KANAYA Sousuke, NEMOTO Eiji, SUTO Mizuki, SAKISAKA Yukihiko, SHIMAUCHI Hidetoshi

【目的】

歯周炎によって喪失した組織の再生には、多くの細胞が協調して包括的に組織を再構築することが必要である。歯根膜細胞は、再生に必要な様々な細胞への分化が可能な未分化間葉系細胞の供給源となることが知られている。

これまで、生薬は全身疾患のみならず口腔内疾患の治療および予防に用いられてきた。イソキノリンアルカロイドの一種で黄蓮の茎から抽出されるベルベリンは、主に止瀉薬として口内炎の治療に用いられてきた。近年、骨芽細胞をベルベリンで刺激すると、Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) p38 の活性化および Cyclooxygenase-2 (COX-2)発現増強を介して、骨分化マーカーであるオステオポンチン(OPN)、オステオカルシン(OCN)および Runt-related transcription factor 2 (Runx2)の発現を増強し石灰化を促進することから、骨再生への有用性が示唆されている。しかし、歯周組織に及ぼす作用についてはまだ報告がない。そこでベルベリンがヒト歯根膜由来細胞の増殖や分化に及ぼす影響について解析を行った。

【材料と方法】

インフォームドコンセントを得た患者の健全抜去歯よりヒト歯根膜細胞 (hPDLC) を採取した。コンフルエントになった hPDLC をベルベリン存在下にて 2% FBS  $\alpha$ -MEM 培地にて所定時間培養したものをを用いた。

- ①細胞増殖は WST-8 を用いた比色法、cyclin D1 の遺伝子発現を定量リアルタイム PCR 法により測定を行った。
- ②ベルベリンが細胞分化におよぼす影響についての解析：Alkaline phosphatase(ALP) 活性は p-Nitrophenyl-phosphate を基質とした比色法を用い、ALP 遺伝子発現は定量リアルタイム PCR 法を用いて測定した。
- ③シグナル伝達における MAPK の関与については各種 MAPK (p38, Erk1/2, JNK) 阻害剤を用いて検討を行った。さらに MAPK のリン酸化は Western blot 法を用いて解析を行った。

【結果と考察】

hPDLC をベルベリン刺激すると 1  $\mu$ g/ml をピークとして細胞増殖が促進された。さらに同濃度のベルベリン刺激により ALP 活性の抑制がみられた。

- ①ベルベリン刺激により Cyclin D1 遺伝子の発現増強および細胞増殖の促進がみられた。
- ②ベルベリン刺激により ALP 遺伝子の発現および ALP 活性は抑制された。
- ③MAPK p38, Erk1/2, JNK のリン酸化が確認された。ALP 遺伝子および ALP 活性の抑制は MAPK 阻害剤 (ERK1/2)の添加においてのみ解除された。一方、Cyclin D1 遺伝子および細胞増殖にはこれらの阻害剤は影響を与えなかった。

【結論】

hPDLC において、ベルベリンは MAPK/ERK 経路を介して ALP を抑制し、細胞増殖に対しては同シグナル非依存的に促進することが示唆された。これらの知見から漢方薬の薬効成分を新たな歯周組織再生療法に応用できる可能性が示唆された。

## Spry2 抑制による M1 マクロファージへの分化抑制メカニズムの解析

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野  
○後村亮、讃井彰一、福田隆男、豊田敬介、山道研介、秋山元、西村英紀

### **Inhibition of Spry2 suppresses differentiation of macrophage into M1 phenotype**

Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University  
○Ryo Atomura, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Kyosuke Toyoda, Kensuke Yamamichi, Hajime Akiyama,  
Fusanori Nishimura

#### 【目的】

Sprouty2 (Spry2) は古典的 MAPK である ERK の抑制因子であり、これまでに演者らは、Spry2 を抑制し、bFGF と EGF で刺激を行うと、骨芽細胞の増殖と分化が亢進し、歯肉上皮細胞の増殖は抑制され、さらに、歯根膜細胞の増殖、遊走が亢進することを報告した (Sanui *et al.* 2015 *J. Cell Biochem.*)。これらのことから、Spry2 は新たな歯周組織再生療法を確立する上で標的分子となる可能性を見出した。また、演者らは前回、Spry2 抑制マクロファージを *Porphyrromonas gingivalis* LPS と IFN- $\gamma$  で刺激を行うと、M1 (炎症性) 型から M2 (抗炎症性) 型へと分化が強制的に転換され、そのメカニズムとして、Spry2 を抑制すると Rac1 が活性化されることによりマクロファージの efferocytosis (アポトーシス細胞の認識と除去) が誘導され、M2 型に分化がシフトする可能性を示した (第 142 回日本歯科保存学会春季学術大会)。しかしながら、Spry2 による M1 型への分化抑制のメカニズムは明らかではない。そこで本研究では、Spry2 の抑制が M1 マクロファージへの分化にどのような影響を与えるのかを検討することとした。

#### 【材料及び方法】

マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 を用い、リポフェクション法により Control siRNA 及び Spry2 siRNA を導入した後、歯周病原細菌である *P. gingivalis* の LPS と IFN- $\gamma$  にて刺激を行い、以下の解析を行った。

1. 通常、マクロファージに Pg LPS で刺激を行うと、Inhibitor of Kappa B (IkB) の分解、Nuclear Factor-Kappa B (NF- $\kappa$ B) の活性化が起こり、M1 型へ分化する。そこで、Spry2 抑制が IkB の分解、NF $\kappa$ B の活性化に及ぼす影響についてウェスタンブロッティング法で検討した。
2. 過去の研究より、成長因子の受容体であるチロシンキナーゼ型受容体 (RTK) の下流にある Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) および Akt は LPS の受容体である Toll-Like Receptor (TLR) の下流にある NF- $\kappa$ B シグナルをクロストークにより抑制することが分かっている。そこで、Spry2 抑制が PI3K、Akt に及ぼす影響についてウェスタンブロッティング法で検討した。

#### 【結果】

1. IFN- $\gamma$ + Pg LPS にて刺激した J774.1 マクロファージにおいて、Spry2 を抑制すると、対照群と比較して、IkB の分解および NF- $\kappa$ B の活性化が抑制された。
2. 対照群と比較して Spry2 抑制マクロファージでは PI3K の活性化、Akt の活性化が亢進した。

#### 【考察】

今回の結果から、Spry2 を抑制すると PI3K/Akt の活性化が亢進することにより、IkB の分解、NF- $\kappa$ B の活性化が抑制され、M1 マクロファージへの分化シグナルが抑制されることが示唆された。これらの結果より、Spry2 の抑制は炎症の収束に関わる可能性があることから、Spry2 は新しい歯周組織再生療法の開発に対して一助を担うことが期待される。現在、Spry2 抑制が IFN- $\gamma$  受容体シグナルの下流に及ぼす影響についても検討を加えている。

#### 【結論】

Spry2 を抑制すると、歯周病原細菌の感染で活性化した M1 マクロファージの表現型が強制的に M2 マクロファージへと転換され、歯周組織再生に不可欠な炎症状態の収束に寄与することが示唆された。