

学位論文題名

Tannin-fluoride preparation attenuated prostaglandin  
E<sub>2</sub> production in dental pulp cells

(タンニン・フッ化物合材の歯髄細胞に対する  
プロスタグランジン E<sub>2</sub>産生抑制作用について)

学位論文内容の要旨

【目 的】

歯髄はう蝕、咬耗、歯冠修復など様々な要因により刺激を受け、修復象牙質の形成や、変性を生ずる。窩洞形成により象牙細管が露出し、その刺激により象牙芽細胞の変位や破壊が引き起こされ、急性炎症が生じることがある。また、象牙質に充填された修復材料の成分の溶出による化学的刺激により歯髄炎を生ずることが示されている。

グラスアイオノマーセメント (GIC) は歯髄への刺激性が比較的少ないとされているが、歯髄細胞に直接接触すると細胞毒性を示し、歯髄炎が誘発されるという報告もある。

GIC にタンニン・フッ化物合材 (HY 材) が配合された製品がある。HY 材の添加により、フッ素の放出量が増加し、象牙細管の閉鎖の促進が引き起こされ、歯髄保護に作用すると考えられている。

さらにタンニン酸は一酸化窒素の産生抑制作用や、それに伴う抗酸化作用さらには収斂作用により抗炎症作用を示すことが知られている。

一方で、歯髄細胞の炎症反応に対する HY 材ならびにタンニン酸の作用は明らかになっていない。本研究は GIC 浸出液による歯髄細胞のプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生に対する HY 材の作用について明らかにすることを目的として行った。

【材料と方法】

本研究では、ラット歯髄由来 RPC-C2A (RPC) 細胞を用いた。HY 材含有 GIC (HY(+))、HY 材非含有 GIC (HY(-)) あるいはタンニン酸を主成分とする Y 材含有 GIC (Y) のディスクを DMEM 培地に浸漬し、セメント浸出液を作製した。それらを用いて RPC 細胞を培養して細胞内 ATP 量、培養上清中の PGE<sub>2</sub> 量および細胞に発現した mRNA ならびにタンパク質の分析を行った。

## 【結果と考察】

### 1. セメント浸出液による細胞内 ATP 量の変化

GIC 浸出液による細胞障害の有無について検討するために細胞内 ATP 量の測定を行った。RPC 細胞に対してセメント浸出液を作用させると、培養 24 時間では HY(+)群ならびに HY(-)群で対照群と比較して有意な細胞増殖促進が認められたが、48 時間では有意差は認められなかった。Y 群では 24 時間、48 時間ともに対照群との ATP 量の有意差は認められなかった。以上のことからセメント浸出液の細胞毒性はほとんどないと推測された。

### 2. セメント浸出液による COX-2 mRNA 発現誘導

セメント浸出液を RPC 細胞に作用させることにより COX-2 mRNA の発現が誘導され、HY(-)において刺激後 3 時間で対照群と比較して約 1.6 倍に上昇した。HY(+)では 3 時間後に対照群の約 1.3 倍に上昇したが、全ての時間で HY(-)と比較して発現の低下が認められた。Y でも 3 時間後に COX-2 mRNA 発現は対照群の約 1.3 倍に上昇したが、いずれの時間においてもその発現は HY(-)よりも低い値を示した。ヒト歯髄細胞にボンディング材を作用させたり、レジンモノマーをマウスマクロファージ様 RAW 264.7 細胞に作用させると COX-2 mRNA の発現が増強されるとの報告がある。本研究により GIC 浸出液を作用させた場合も同様に COX-2 mRNA の発現が誘導されることが明らかになった。一方、セメント浸出液 (HY(-)) の作用により誘導される COX-2 mRNA の発現は、HY 材あるいは Y 材によって低下した。さらに、HY(-)のセメント浸出液に HY(+)のセメント浸出液を混合し、HY(+)の割合を増加させると濃度依存的に COX-2 mRNA 発現の低下が認められた。また、タンニン酸を HY(-)のセメント浸出液に添加することにより、濃度依存的に COX-2 mRNA 発現が低下し、HY 材による COX-2 mRNA 発現の低下にはタンニン酸が関与していることが示唆された。

### 3. セメント浸出液による PGE<sub>2</sub> 産生量の変化

GIC 浸出液を歯髄細胞に作用させて PGE<sub>2</sub> 産生量に与える影響を検討した。HY(-)群で対照群と比較して培養液中の PGE<sub>2</sub> 量の増加が認められた。レジンモノマーである BisGMA の刺激により PGE<sub>2</sub> 産生量が増加するという報告があるが、GIC 浸出液の作用によっても同様に PGE<sub>2</sub> の産生量が増加することが明らかとなった。刺激後 12 時間において培養液中の PGE<sub>2</sub> 量を比較すると HY(-)群で対照群の約 3 倍となり、HY(+)群で HY(-)群の約 50%程度、Y 群では約 70%程度に減少した。HY(+)群では HY(-)群より産生量は減少し、刺激後 12 時間、24 時間では有意差が認められた。以上の結果から、GIC 浸出液により増加した PGE<sub>2</sub> 産生量が HY 材および Y 材の作用により減少すること

が明らかとなった。

#### 4. セメント浸出液による COX-2 タンパク質発現と細胞内情報伝達系への作用

RPC 細胞に GIC 浸出液を作用させ、COX-2 タンパク質の発現やその上流の細胞内情報伝達系に与える影響について検討した。GIC 浸出液により COX-2 タンパク質の発現は刺激後 120 分で HY(-)、HY(+)ともに上昇した。240 分において HY(-)では依然発現の上昇が認められたが、HY(+)では発現が著しく低下していた。GIC 浸出液の刺激により COX-2 mRNA のみならず、タンパク質の発現の上昇が認められた。また、HY 材がセメント浸出液による COX-2 発現をタンパク質レベルでも抑制することが示唆された。COX-2 発現に関わる細胞内情報伝達系は複雑で多数存在し、NF- $\kappa$ B や ERK、p38 の関与が示されている。I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化は HY(-)では刺激後 120 分で HY(+)の 1.8 倍に上昇していた。刺激後 240 分で HY(-)では刺激前の約 3 倍であったが、HY(+)では刺激前と同程度まで低下した。本研究では歯髄細胞に対するセメント浸出液の作用により I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化が認められたが、HY 材を添加することによりその発現が低下した。タンニン酸は I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化を阻害することにより NF- $\kappa$ B の活性化を抑制するという報告があることから、本研究における HY 材の添加による I $\kappa$ B $\alpha$  のリン酸化の減少には、HY 材中のタンニン酸が関与していることが示唆された。また、ERK は HY(-)においてわずかなリン酸化が認められたが、I $\kappa$ B $\alpha$  の場合と同様に、HY(+)ではリン酸化は減少した。さらに、HY(-)では p38 のリン酸化の経時的な増加が認められ、240 分では刺激前の約 5.1 倍に達した。一方、HY(+)では今回調べた全ての時間においてリン酸化の誘導はほとんど見られなかった。以上の結果から GIC 浸出液の刺激には歯髄細胞の ERK ならびに p38 MAP キナーゼを介する伝達経路も存在し、HY 材がこれらを抑制することが明らかになった。

本研究において HY 材非添加の GIC 浸出液を歯髄細胞に作用させることにより、PGE<sub>2</sub> の産生量ならびにその産生に関与する COX-2 タンパク質および mRNA の発現の上昇、さらにはその上流に存在する細胞内情報伝達系の活性化が認められた。また、HY 材はこれらを抑制することを確認した。一方で、HY 材の作用点の詳細に関してはまだ不明な点も多く、さらに詳細に検討する必要がある。HY 材は充填材のみでなく、合着材および覆髄材と幅広く用いられているが、その歯髄細胞に対する作用や機序はほとんど明らかとなっていない。本研究では HY 材の歯髄細胞に対する抗炎症作用についてその一端を明らかにした。今後、歯髄細胞に対する HY 材の作用の研究を進めていくことは、さらなる臨床応用への可能性を開拓するものと考えられる。

#### 【結 論】

GIC 浸出液の刺激による歯髄細胞の PGE<sub>2</sub> 産生は HY 材の添加によって抑制されることが明らかになった。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝  
副 査 教 授 鈴 木 邦 明  
副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

## Tannin-fluoride preparation attenuated prostaglandin E<sub>2</sub> production in dental pulp cells

(タンニン・フッ化物合材の歯髄細胞に対する  
プロスタグランジン E<sub>2</sub>産生抑制作用について)

歯髄は齲蝕、咬耗、歯冠修復など様々な要因により刺激を受け、修復象牙質の形成や、変性を生ずる。窩洞形成により象牙細管が露出し、その刺激により象牙芽細胞の変位や破壊が引き起こされ、急性炎症が生じることがある。グラスアイオノマーセメント (GIC) は歯髄への刺激性が比較的少ないとされているが、歯髄細胞に直接接触すると細胞毒性を示し、歯髄炎が誘発されるという報告もある。GIC にはタンニン・フッ化物合材 (HY 材) が配合された製品があるが、HY 材の添加により、フッ素の放出量が増加し、象牙細管の閉鎖の促進が引き起こされ、歯髄保護に作用すると考えられている。さらに Y 材の主成分であるタンニン酸は、一酸化窒素の産生抑制作用や、それに伴う抗酸化作用さらには収斂作用により抗炎症作用を示すことが知られている。一方で、歯髄細胞の炎症反応に対する HY 材ならびにタンニン酸の作用は明らかになっていない。本研究は、GIC 浸出液による歯髄細胞のプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生に対する HY 材の作用について明らかにすることを目的とした。

本研究では、ラット歯髄由来RPC-C2A (RPC) 細胞を用いた。HY材含有GIC (HY (+))、HY材非含有GIC (HY (-))あるいはY材含有GIC (Y) のディスクをDMEM培地に浸漬し、セメント浸出液を作製した。それらを用いてRPC細胞を培養して細胞内ATP量、培養上清中のプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 量および細胞に発現したmRNAならびにタンパク質の分析を行った。

GIC浸出液による細胞障害の有無について検討するために細胞内ATP量の測定を行った。RPC細胞に対してセメント浸出液を作用させると、培養24時間ではHY (+)群ならびにHY (-)群で対照群と比較して有意な細胞増殖促進が認められたが、48時間では有意差は認められなかった。Y群では24時間、48時間ともに対照群とのATP量の有意差は認められなかった。セメント浸出液をRPC細胞に作用させることによりCOX-2 mRNAの発現が誘導され、HY (-)群において刺激後3時間で刺激前と比較して約1.6倍に上昇した。HY (+)群では3時間後に約1.3倍に上昇したが、全ての時間でHY (-)群と比較して発現の低下が認められた。Y群でも3時間後にCOX-2 mRNA発現は約1.3倍に上昇したが、いずれの時間においてもその発現はHY (-)群よりも低下した。また、HY (-)群のセメント浸出液にHY (+)群のセメント浸出液を混合し、HY (+)群の割合を増加させると濃

度依存的にCOX-2 mRNA発現の低下が認められた。さらに、タンニン酸をHY(-)群のセメント浸出液に添加することにより、濃度依存的にCOX-2 mRNA発現が減少した。次にGIC浸出液による歯髄細胞のPGE<sub>2</sub>産生量に与える影響を検討した。HY(-)群で対照群と比較して培養液中のPGE<sub>2</sub>量の増加が認められた。HY(+群)ではHY(-)群より産生量は減少し、刺激後12時間、24時間では有意差が認められた。さらに、刺激後12時間において培養液中のPGE<sub>2</sub>量を比較するとHY(-)群で対照群の約3倍となり、HY(+群)でHY(-)群の約50%程度、Y群では約70%程度に減少した。COX-2タンパク質の発現は刺激後120分ではHY(-)群、HY(+群)ともに上昇した。240分においてHY(-)群では依然発現の上昇が認められたが、HY(+群)では発現が著しく低下していた。GIC浸出液の刺激によりCOX-2 mRNAだけでなく、タンパク質の発現の上昇が認められ、さらに、HY材がセメント浸出液によるCOX-2発現をタンパク質レベルでも抑制することが示唆された。I $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化はHY(-)群では刺激後120分でHY(+群)の1.8倍に上昇していたが、HY(+群)では240分後には刺激前と同程度まで低下した。本研究では歯髄細胞に対するセメント浸出液の作用によりI $\kappa$ B $\alpha$ のリン酸化が認められたがHY材を添加することによりその発現が低下した。また、ERKはHY(-)群においてわずかなリン酸化が認められたが、I $\kappa$ B $\alpha$ の場合と同様に、HY(+群)ではリン酸化は減少した。さらに、HY(-)群ではp38のリン酸化の経時的な増加が認められ、240分では刺激前の約5.1倍に達した。一方、HY(+群)では今回調べた全ての時間においてリン酸化の誘導はほとんど見られなかった。以上の結果から、GIC浸出液の刺激は歯髄細胞のERKならびにp38 MAPキナーゼを介する伝達経路も存在し、HY材がこれらを抑制することが明らかになった。

GIC浸出液を作用させることにより、PGE<sub>2</sub>の産生量ならびにPGE<sub>2</sub>産生に関わる重要な酵素であるCOX-2タンパク質およびmRNAの発現の上昇、さらにはその上流に存在する細胞内情報伝達系の活性化が認められた。また、HY材はこれらを抑制することを確認した。一方で、HY材の作用点の詳細に関してはまだ不明な点も多く、さらなる検討の必要性が示唆された。本研究ではHY材の歯髄細胞に対する抗炎症作用についてその一端を明らかにした。

口頭試問では、本論分の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

1. 研究を始めるきっかけについて
  2. グラスアイオノマーFに入っているHY材の濃度、また、材料の組成について
  3. セメントをDMEMに浸漬した期間について
  4. ATP量について (特に24時間で増加していることに関して)
  5. セメント浸出液によるCOX-2誘導について
    - 1) レジンとの違い
    - 2) COX-1について
  6. HY材を含有する覆髄材について
  7. タンニン酸の作用点について
  8. 今後の展望について
- などであった。

以上の質問に対して、申請者から適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答をとおして申請者が本研究ならびに関連分野に対する理解が十分なされており、幅広い知識を有していることから明らかになり、本研究のさらなる発展、今後の研究が期待された。

以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与する十分な学識・資質を有しているものと認めた。