

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10374

研究課題名(和文) 緑茶カテキンを利用した新規生活歯髄切断材料は作れるか～歯髄作用機構の解析から～

研究課題名(英文) Making pulp capping materials using epigallocatechin-3-gallate

研究代表者

中村 光一 (Nakamura, Koichi)

北海道大学・歯学研究院・助教

研究者番号：50580932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：RAW264.7細胞にLPSならびにHEMA刺激を加え、WST-8 assayを行ったところ、細胞増殖に対してEGCGは影響を与えなかった。また、炎症反応を評価するためにELISA法でプロスタグランジンE2 (PGE2) 産生量を測定した。LPS刺激によりPGE2産生量は24時間後、48時間後で著しく増加した。EGCGによりそれらの増加は抑制された。HEMAの刺激により、48時間後におけるPGE2産生量は増加したが、EGCGによりその増加は抑制された。in vitroにおいてEGCGが抗炎症作用を有することが示唆された。ラット臼歯に対する生切の結果、EGCGには硬組織誘導能があることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、EGCGが抗炎症作用、硬組織誘導作用を示すことがわかった。生活歯髄切断の際には必ず炎症が誘発されるが、抗炎症作用を示すことにより、生活歯髄切断材料として望ましい性質を有することが明らかになった。また、生活歯髄切断後はデンチンブリッジを形成することが良好な予後をもたらすが、硬組織誘導作用を示すことから、デンチンブリッジの形成にも有効であることが明らかになった。これらの性質を利用した生活歯髄切断材料が開発されれば、生活歯髄切断後の予後が向上する可能性がある。今後はこの性質を応用した製品の開発につながることを期待する。

研究成果の概要(英文)：After adding LPS and HEMA stimulation to RAW264.7 cell, and performing WST-8 assay, EGCG did not affect it for cell proliferation. EGCG reduced PGE2 production induced by LPS and HEMA. As the result of pulpotomy, EGCG attenuated recalcification.

研究分野：小児歯科

キーワード：生活歯髄切断 エピガロカテキンガラート

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生活歯髄切断(生切)材料はホルモクレゾール(FC)が多く用いられてきたが、FCの発がん性が指摘されて以降、日本では水酸化カルシウムが主に用いられている。一方で水酸化カルシウムはFCと比較して効果が弱く、臨床的な予後は不安定である。また、近年研究が進んでいる Mineral Trioxide Aggregate (MTA)は高価で臨床応用しやすいとはいえない。生切材料に必要な性質として、生体安全性、抗炎症作用、抗菌作用、石灰化誘導能が挙げられる。さらにそれらは持続する必要がある。エピガロカテキンガラート(EGCG)は緑茶カテキンの主成分であり、特にがんに対して医療への応用が進められている。歯科分野においては抗菌作用が注目され、歯磨剤やマウスウォッシュへの応用などが試みられている。EGCGは緑茶由来成分であり生体に対する安全性は高い。さらに、抗菌作用が有することがわかっており、生活歯髄切断材料に必要な要件を備えている。本研究では抗炎症作用や石灰化誘導能について主に検討していく。

### 2. 研究の目的

本研究は緑茶カテキンの主成分であるエピガロカテキンガラート(EGCG)を用いて、抗炎症作用、石灰化誘導作用を有する生切材料を開発することを最終的な目的とする。そのために抗炎症作用ならびに石灰化誘導作用を評価する。

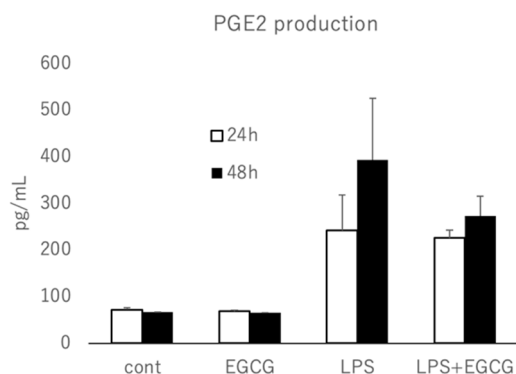
### 3. 研究の方法

*In vitro*の研究では、マウス由来のマクロファージ様細胞である RAW264.7 細胞を使用した。培養液には DMEM (10%FBS 含有)を使用した。細胞を 96well プレートに  $1.0 \times 10^4$  個の細胞密度となるように播種後、37℃、5%CO<sub>2</sub> の環境下で前培養を行い、細胞を刺激した。細胞への刺激誘発物質としてグラム陰性菌の内毒素 (LPS:200ng/mL)ならびに、歯科材料に多く使用されている 2-Hydroxyethyl Methacrylate(HEMA:5mM)を使用し、24、48 時間培養した。培養後、cell counting kit-8 溶液を添加し、1 時間インキュベートした。マイクロプレートリーダーで吸光度を 450nm で測定した。また、抗炎症作用を評価するために ELISA 法でプロスタグランジン E2 (PGE2) 産生量を測定した。

*In vivo*の研究として、生後 6 週齢の SD 系雄性ラットの上顎第一臼歯に全身麻酔下で生切を行った。ラウンドバーで歯髄を切断し、生理食塩水で洗浄した後、覆髓をした。覆髓材料には水酸化カルシウム製剤であるカルピタル、カルピタルに EGCG を添加したものを使用した。覆髓材料を使用せずに CR 充填したものをコントロールとした。1 週間後ならびに 1 か月後に安楽死させ、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液を用いて灌流固定を行い、上顎骨を摘出して浸漬固定を行った。EDTA で試料を脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋し、歯軸に対して垂直に厚さ 5 $\mu$ m の薄切標本を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い組織学的観察を行った。本研究は国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受け、同指針に従って行った。(計画承認番号:19-0096)

### 4. 研究成果

RAW264.7 細胞に LPS ならびに HEMA 刺激を加え、WST-8 assay を行ったところ、以下の結果を得た。LPS ならびに EGCG(10  $\mu$ M)により細胞増殖は増加した。HEMA では細胞増殖は抑制された。HEMA による細胞増殖抑制に対して EGCG は影響を与えなかった。また、炎症反応を評価するために ELISA 法でプロスタグランジン E2(PGE2)産生量を測定した。LPS 刺激により PGE2 産生量は 24 時間後、48 時間後で著しく増加した。EGCG によりそれらの増加は抑制された(右図)。HEMA の刺激により、48 時間後における PGE2 産生量は増加したが、EGCG によりその増加は抑制された。*in vitro*において EGCG が抗炎症作用を有することが示唆された。



ラット上顎臼歯に対する生切の結果、コントロールは 1 週間後には炎症性細胞浸潤が強く認められ、1 か月後には歯髄壊死していた(下図上段)。カルピタルは 1 週間後には炎症性細胞浸潤は認められたものの、軽度であった。1 か月後では一部で歯髄壊死が認められた(下図中段)。カルピタル+EGCG は 1 週間後には炎症性細胞浸潤が軽度に認められた。1 か月後には一部歯髄壊死が認められたものの、二次象牙質の形成が認められた(下図下段)。以上より EGCG には硬組織誘導能があることが示唆された。

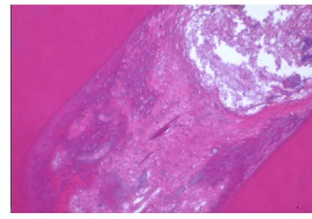
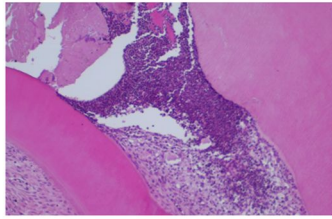
本研究における環境下では EGCG には抗炎症作用ならびに石灰化誘導作用を有することが明らかになった。EGCG は前述の通り緑茶由来成分であり、生体安全性は高い物質だと考えられる。生活歯髄切断材料への応用は有用である可能性が高く、実用化に向けて今後更なる研究ができ

ればと考えている。

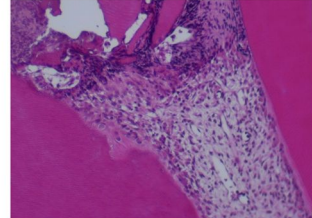
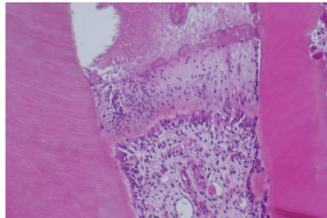
1 週間後

1 か月後

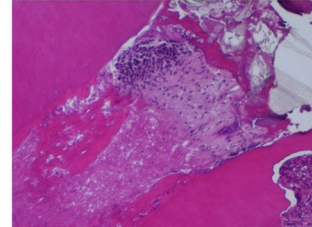
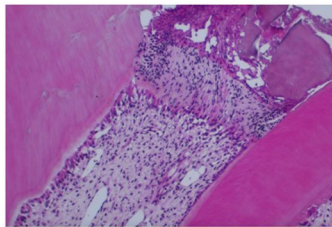
コントロール



カルビタール



カルビタール  
+ EGCG



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 NAKAMURA Koichi、MINAMIKAWA Hajime、TAKAHASHI Shizuka、YOSHIMURA Yoshitaka、YAWAKA Yasutaka	4. 巻 40
2. 論文標題 N-acetylcysteine attenuates PGE2 and ROS production stimulated by 4-META/MMA-based resin in murine osteoblastic cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 808 ~ 812
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2020-275	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishimi Mitsuhiro、Nakamura Koichi、Hisada Akina、Endo Kazuki、Ushimura Shuya、Yoshimura Yoshitaka、Yawaka Yasutaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Effects of N-acetylcysteine on root resorption after tooth replantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 72 ~ 79
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdj.2020.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋静香、中村光一、八若保孝
2. 発表標題 4-META/MMA-TBBレジンに惹起された炎症に対するN-acetyl cysteineの効果
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	阿部 薫明 (Abe Shigeaki) (40374566)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授  (17301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	八若 保孝  (Yawaka Yasutaka)  (60230603)	北海道大学・歯学研究院・教授     (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関