

平成21年 4月27日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006年～2008年
 課題番号：18791398
 研究課題名（和文） レーザー照射後の象牙質・歯髄複合体の修復再生過程の
 免疫組織化学的研究
 研究課題名（英文） Immunohistochemical study on the healing process of
 dentin-pulp complex after laser irradiation
 研究代表者
 重谷 佳見
 新潟大学・医歯学総合病院・医員
 研究者番号：80397132

研究成果の概要：

歯科用レーザーの普及に向け、その有効性・安全性を実証するためには、レーザー照射後の歯髄反応に対する検索が急務である。本研究により、レーザー照射後のラット臼歯歯髄反応を組織学的および免疫組織化学的検索し、これまで不明確であった同レーザー照射後の象牙質/歯髄複合体の修復・再生機構について知見を得て、レーザーの臨床応用に向けた指針の一つと成り得たと考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000 円	0 円	1,300,000 円
2007年度	1,000,000 円	0 円	1,000,000 円
2008年度	1,000,000 円	300,000 円	1,300,000 円
年度			
年度			
総計	3,300,000 円	1,300,000 円	3,600,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：レーザー, 象牙質・歯髄複合体, 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

歯科用レーザーの普及に向け、その有効性・安全性を実証するためには、レーザー照射後の歯面に対する確実な修復（充填）技法の確立、およびレーザー照射後の歯髄反応に対する検索が急務である。これまで申請者を含む多くの研究者によって、レーザーを用いたう蝕除去と接着性修復処置を併用するこ

との有用性が示唆されてきた。ところが、レーザー照射に対する象牙質/歯髄複合体の反応様式についての知見は未だ十分とはいえ、臨床応用に向けての知見の蓄積が望まれる。

2. 研究の目的

歯科用レーザーの有効性が注目されているが、レーザー照射に対する象牙質/歯髄複

合体の反応様式についての知見は未だ十分といえない。レーザー照射後のラット臼歯歯髄反応を組織学的および免疫組織化学的検索することにより、これまで不明確であった同レーザー照射後の象牙質/歯髄複合体の修復・再生機構の詳細を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

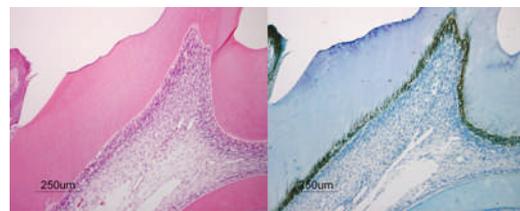
(1) 生後8週齢 Wistar 系雌性ラットの上顎第一臼歯近心に、Er:YAG レーザー（アーウィン アドベール；モリタ社製）を用いて照射出力 80mJ, 10pps にて象牙質の約半分の深さに達する窩洞を形成した。その後、フロアブルレジンにて修復処置を施し、継時的に組織学的・免疫組織化学的検索を行った。すなわち、窩洞形成直後、および6時間、12時間、1日、2日、3日、5日、7日経過後に、4%パラホルムアルデヒド液を用いて灌流固定したのち、10%EDTA にて脱灰後、通法に従ってパラフィン切片を作成した。なお、固定の2時間前に5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)を腹腔内に投与した。次いで、HE染色による組織学的観察を行うとともに、酵素抗体法により、象牙芽細胞分化マーカーとして Heat-shock protein 25(Hsp-25)、中間径フィラメント nestin の発現を観察するとともに、BrdU で標識された細胞の動態解析を行った。

(2) 生後8週齢 Wistar 系雄性ラットの上顎第一臼歯近心に、半導体レーザー装置（オサダライトサージ 3000）を用いて、出力 0.5W もしくは 1.5W、60秒 X 3回照射の条件でレー

ザー照射を行った。レーザー非照射の反対側同名歯を対照とした。照射直後あるいは1, 2, 3日後に4%パラホルムアルデヒド液で灌流固定し、10%EDTA にて脱灰後、通法に従ってパラフィン切片を作成し、HE染色による組織学的観察を行うとともに、象牙芽細胞の分化マーカーである heat-shock protein 25 (Hsp-25)あるいは nestin 発現細胞、および5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU；灌流固定2時間前に投与)で標識された増殖細胞の局在を酵素抗体染色にて解析した。

4. 研究成果

(1) コントロールにおいては、Hsp-25、nestinとも象牙芽細胞層に陽性反応が観察された。また、BrdU陽性細胞は認められなかった。窩洞形成直後および6時間後では、窩洞直下での象牙芽細胞の配列の乱れは認められたが、Hsp-25およびnestin陽性反応の消失には至らなかった。しかしながら、12および24時間後には、窩洞直下でHsp-25およびnestin陽性反応の消失がみられた。その後、2日目以降でHsp-25およびnestin陽性反応が同部の象牙芽細胞様細胞に観察されるようになった。BrdU陽性細胞は、2日および3日後に歯髄中に多く検出された。



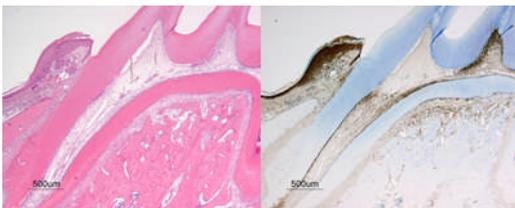
Er:YAG レーザー照射 1 日後
HE 染色、Hsp-25 免疫染色
窩洞形成後に、象牙芽細胞層に変性像を認め、Hsp-25 陽性反応の消失を認めたが、1 日後には象牙芽細胞様細胞に Hsp-25 陽性反応が観察される。

Er:YAG レーザー窩洞形成後のラット臼歯歯髄反応を観察し、以下の結果を得た。

1, 窩洞形成 12 時間および一日後には象牙芽細胞が消失し、2 日後には象牙芽細胞様細胞の配列が生じた。

2, 細胞増殖は、窩洞形成 2 日および 3 日後に多く認められた。

(2) 対照群では、象牙芽細胞が Hsp-25 および nestin に陽性反応を示したが、BrdU 陽性細胞は認められなかった。0.5W 照射群では、照射直後において照射部直下での象牙芽細胞の配列の乱れと Hsp-25 および nestin 陽性反応の消失がみられた。しかしながら、1 日目以降で Hsp-25 陽性反応が、また 2 日目以降では nestin 陽性反応も同部の象牙芽細胞様細胞に観察されるようになった。BrdU 陽性細胞は観察期間を通じて認められなかった。1.5W 照射群では、照射直後より象牙芽細胞を含む歯髄細胞の壊死がレーザー照射部を中心に観察され、時間の経過とともに同心円状に拡大した。Hsp-25 は、壊死層周囲に強陽性反応を示した。一方、nestin 陽性反応は照射直後より照射部近傍で消失しており、時間の経過とともに陰性部が拡大した。BrdU 陽性細胞は 2 日後、3 日後に検出された。



半導体レーザー照射 2 日後
HE 染色、Hsp-25 免疫染色
歯髄壊死は 1 日経過例と比較して更に進行している。照射部近傍では Hsp-25 陽性反応が消失し、壊死層周囲には Hsp-25 強陽性反応が観察される。

半導体レーザー照射後 3 日以内にけるラット臼歯歯髄反応を観察し、以下の結論を得た。

1, 0.5W 照射群では、照射後 2 日後には象牙芽細胞様細胞の再配列が生じた。

2, 1.5W 照射群では、象牙芽細胞が消失する一方、2 日後以降に BrdU 陽性細胞が出現した。

以上 (1), (2) 研究の結果から、これまで Er:YAG レーザー、および半導体レーザー照射後の象牙質・歯髄複合体の修復・再生過程についての不明確な点が生物学的視点から明確となり、Er:YAG レーザー、および半導体レーザーの臨床応用に向けた指針の一つと成り得たと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T: Immunohistochemical Analysis of Nestin, Osteopontin and Proliferating Cells in the Reparative Process of Exposed Dental Pulp Capped with Mineral Trioxide Aggregate; J Endod 34, 970-974, 2008. (査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

1. 鞍立桃子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 他. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) に対するラット臼歯歯髄の反応-硬組織形成過程の免疫組織化学的研究-. 日本歯科保存学会2006年秋季学術大会 (第125回), 2006.11.9, 鹿児島.
2. 吉羽邦彦, 吉羽永子, 重谷佳見, 他. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) に対するヒト歯髄の反応-直接覆髄後の硬組織形成過程の免疫組織化学的研究-.

- 日本歯科保存学会 2007 年春季学術大会
(第 126 回) , 2007. 6. 8, 大宮.
3. 吉羽永子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 他. MTA に対するヒト歯髄反応に関する免疫組織化学的研究-直接覆髄後の細胞外基質の変化と細胞分化-. 日本歯科保存学会 2007 年秋季学術大会 (第 127 回) , 2007. 11. 8, 岡山.
 4. 鞍立桃子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 他. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) に対するラット臼歯歯髄の反応に関する免疫組織化学的研究. 第 28 回日本歯内療法学会学術大会, 2007. 5. 26, 広島.
 5. 鞍立桃子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 他. MTA によるラット臼歯覆髄モデルにおける歯髄反応. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会, 2007. 8. 30, 札幌.
 6. 鞍立桃子, 吉羽邦彦, 重谷佳見, 他. MTA によるラット臼歯覆髄モデルにおける歯髄反応の免疫組織化学的解析. 平成 19 年度新潟歯学会第 2 回例会, 2007. 11. 10, 新潟.
 7. 吉羽邦彦, 吉羽永子, 重谷佳見, 他. Mineral Trioxide Aggregate (MTA) を応用した象牙質再生療法-直接覆髄後の歯髄反応について-. 日本歯科医学会総会. 2008. 11. 15, 横浜.
 8. 重谷佳見, 他. Er:YAGレーザーによる窩洞形成後のラット臼歯歯髄反応に関する免疫組織学的検討. 日本歯科保存学会. 2008. 11. 7, 富山.
 9. 笹なつき, 重谷佳見, 他. 半導体レーザー照射後のラット臼歯歯髄初期反応に関する免疫組織学的検討. 日本歯科保存学会. 2008. 11. 7, 富山.

[図書] (計 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- (2) 研究分担者
- (3) 連携研究者

