

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791857

研究課題名(和文) 低出力半導体レーザー照射が歯髄細胞のレジン成分に対する反応に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) Influence of resin components to the response of low-power semiconductor laser irradiation on dental pulp cells

研究代表者

矢野 淳也 (YANO JUNYA)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00347676

研究成果の概要(和文)：in vitro 実験系における半導体レーザー照射後の歯髄細胞および象牙芽細胞に対するレジン成分の影響の検討を行った。検討対象のレジン成分は、ベースレジンとして多くの修復用コンポジットレジンに使用されている Bis-GMA を用い、半導体レーザーとしては出力調整が段階的に変換可能なパナソニック P-Laser を使用した。

ヒト由来培養歯髄細胞株および私達が確立したラット由来象牙芽細胞様細胞株が細胞死に到らないレーザー出力の上限を検討した。レーザー出力の設定については、私達の研究チームがこれまでにこなして来て得られた知見や、論文等で報告されている内容も参考に、実際の臨床での適応を念頭に条件づけを行なった。その結果、エネルギー密度 $12\text{J}/\text{cm}^2$ の出力が最適であることが示された。細胞にエネルギー密度 $12\text{J}/\text{cm}^2$ 前後の半導体レーザー照射を行った場合には、当初想定していた特徴的な細胞増殖能の増加は検出されなかった。レーザーの作用を効果的に反映させる照射条件を再検討する必要がある。レーザー照射の条件設定を行った後には、当初予定していた以下の実験を実施する予定である。

- 1) 細胞培養液中に数種類の濃度に調整した Bis-GMA を一定時間添加した後、レーザー出力の程度による細胞周期の違いをフローサイトメトリーで確認
- 2) 細胞増殖能の違いを BrdU の DNA への取込み測定で確認
- 3) 石灰化能の違いをアルカリフォスファターゼ活性測定および von Kossa 染色により検討
- 4) ヘキスト染色による核の形態変化、および電子顕微鏡による細胞の形態変化の観察

研究成果の概要(英文)：I investigated the influence of resin composite to the response of low-power semiconductor laser irradiation on dental pulp cells. I examined the in vitro effects of resin components on dental pulp cells and odontoblasts in cell after the semiconductor laser irradiation. Resin component under consideration has been used as a base resin in a number of resin composites using a Bis-GMA. Panasonic P-Laser was used as a power adjustable semiconductor laser.

The maximum laser output were limited to not causing cell death rat odontoblast-like cell lines we established cell lines and cultured human dental pulp. Setting of the laser output is done and the findings so far come to our research team, in reference to what has been reported in other papers, the conditioned mind to adapt clinical practice in performed. As a result, the energy density was shown to be optimal $12\text{J}/\text{cm}^2$ output. If the energy density $12\text{J}/\text{cm}^2$ irradiated cells before and after the semiconductor laser is a characteristic increase in cell proliferation was not detected initially expected. Need to be reviewed to reflect the exposure conditions effective laser action. After setting the laser irradiation conditions, will conduct the following experiment was originally planned.

- 1) Adjusted to several levels in the cell culture period of time after the addition of Bis-GMA, and confirmed by flow cytometry cell cycle differences in the degree of laser output.
- 2) Differences in cell proliferation measured by BrdU incorporation into DNA of confirmed.
- 3) Performance measurement and the difference between calcification and alkaline phosphatase activity evaluated by von Kossa staining.

4) Changes in nuclear morphology of Hoechst staining, cell morphology changes were observed by electron microscopy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：歯内療法学、半導体レーザー、歯髄保護療法

1. 研究開始当初の背景

以下に私達のグループにおける研究成果を示す.

＜歯髄創傷治癒・再生におけるアポトーシス誘導と細胞増殖・分化に関する研究＞

歯髄創傷治癒初期において象牙芽細胞および歯髄細胞にアポトーシスが誘導されること (Kitamura et al., J Dent Res, 2001), 歯髄アポトーシス誘導および象牙芽細胞様細胞の分化・誘導に JNK 経路が関与していること, およびアポトーシス誘導を受けていない細胞にヒートショックタンパク質発現が認められること (Kitamura et al., J Dent Res, 2003) を明らかにした. また歯髄細胞は熱耐性を有しているが (Kitamura et al., J Cell Biochem, 2005), 細菌由来リポ多糖に暴露された歯髄細胞の熱刺激に対する反応は変化すること (Kitamura et al., J Cell Biochem, 2006), さらに, 低酸素環境下では歯髄細胞に細胞周期停止とアポトーシスが誘導されること (Ueno et al., J Dent Res, 2006) を明らかにした.

＜歯髄アポトーシス誘導への各種刺激の影響に関する研究＞

歯髄アポトーシスに対する各種ストレスの影響を検討した結果, 窩洞形成に伴うメカニカル・ストレスの程度や覆髄等のケミカル・ストレスが歯髄アポトーシス誘導に影響を与えること (Kitamura et al., Oper Dent, 2003; Kitamura et al., J Endod, 2003) を明らかにした. また, Bis-GMA が歯髄細胞の増殖を抑制しアポトーシスを誘導すること, Bis-GMA 刺激歯髄細胞を通常環境下で培養すると正常状態へ回復することを明らかにした (投稿中).

＜象牙芽細胞様細胞株樹立と FGF-2 徐放による象牙質・歯髄再生療法に関する研究＞

ラット切歯歯髄から象牙芽細胞の所要性質を示す象牙芽細胞様細胞株を樹立した (Nomiyama et al., J Endod, 2007). また, FGF-2 を徐放するゼラチン粒子をカラーゲン・スポンジとともに露髄部に移植すると象牙質・歯髄複合体の再生が誘導される可能性を示した (Kikuchi et al., J Endod, 2007).

[本研究の特色・位置づけ]

本研究の特色は, レジン成分の刺激は避けられないと判断した上で, 半導体レーザーを用いた Low-level Laser Therapy によりレジン成分に暴露される前の象牙芽細胞・歯髄細胞の活性化を検討することで, 半導体レーザーの細胞活性化能を解明し歯髄保存療法に半導体レーザーを応用することを目的としている点である. 臨床応用を考えた場合, 歯面に対して非接触で使用する半導体レーザーはレジン修復処置の臨床ステップを阻害しないというメリットがある. 今回の研究により, コンポジットレジン修復時の歯面処理手順を変

えずに, 半導体レーザー照射により歯髄の活性化を行えることが明らかになれば, 比較的高速やかに臨床応用に適用することが可能であると考えた.

これまでに私達は, 歯髄創傷治癒初期において象牙芽細胞および歯髄細胞にアポトーシスが誘導されること, 過度の窩洞形成やレジン系材料を用いた覆髄により歯髄アポトーシス誘導が増強されること (Kitamura et al., Oper Dent, 2003; Kitamura et al., J Endod, 2003) を明らかにしてきた. また, レジン成分である Bis-GMA は濃度依存的に歯髄細胞増殖能を抑制しアポトーシスを誘導することを明らかにした. Bis-GMA 刺激歯髄細胞を通常環境下に戻すと正常機能を回復することから, 正常歯髄はレジン成分の刺激に適応できると考えているが, 細菌感染や過度の窩洞形成による刺激を既に受けている歯髄では正常状態に回復できない可能性が懸念される.

2. 研究の目的

近年, 歯科治療において各種レーザーが光学的治療法 (photodynamic therapy) として応用されている (Konoplam et al., J Dent Res, 2007). 特に, 低出力レーザーによる細胞活性化療法 (Low-level Laser Therapy) は非侵襲的治療法として注目されており, 歯髄細胞に対して半導体レーザーを照射することで歯髄細胞の持つ石灰化能が増強されることが報告されている. 一方, 歯科臨床においては, 個々の歯科医師が有する経験に基づいてレーザーが使用されているのも現実である. レザーを用いた歯科医療が広がる中, Low-level Laser Therapy に必要な段階的出力調整ができる半導体レーザー照射による歯髄の保存的治療の確立が期待されているとともに, その背景となる基礎的研究が要求されている.

本研究では, 半導体レーザーを照射した象牙芽細胞や歯髄細胞に対するレジン成分の影響を検討することを目的としている. また, 本研究を通して半導体レーザーが有すると言われる細胞活性化能を解析することにより半導体レーザーの歯髄への影響を解明し, 歯髄保存療法に応用することを最終目標としている.

3. 研究の方法

[研究計画 1: *in vitro* 実験系における半導体レーザー照射後の歯髄細胞および象牙芽細胞に対するレジン成分の影響の検討]

半導体レーザー照射が象牙芽細胞や歯髄細胞のレジン成分に対する反応に与える影響を検討する. レジン成分は, ベースレジンとして多くの修復用コンポジットレジンに使用されている Bis-GMA を用い, 半導体レーザーとしては出力調整が段階的に変換可能なパナソニック P-Laser を使用する.

まず、培養歯髄細胞株および私達が確立した象牙芽細胞様細胞株が細胞死に到らないレーザー出力の上限を検討する。細胞死の測定はMTTアッセイおよび形態的観察により行う。細胞死を誘導しない範囲でレーザー出力を数段階設定し、各出力のレーザーを歯髄細胞株あるいは象牙芽細胞様細胞株に一定時間照射する。その後、細胞培養液中に数種類の濃度に調整したBis-GMAを一定時間添加した後、レーザー出力の程度による細胞増殖能の違いをBrdUのDNAへの取込み測定で検討する。

〔研究計画2：in vivo実験系における窩洞形成後の歯髄に対する半導体レーザーの影響の検討〕

私達は、ラット臼歯に窩洞形成し窩洞に様々な材料を充填後、歯髄反応を組織学的に検討する実験系を確立している。このin vivo実験動物モデルを用いて、半導体レーザー照射の歯髄創傷治癒過程に与える影響について検討する。

〔研究計画3：in vivo実験系における窩洞形成後、半導体レーザー照射を行った窩洞にレジンを充填を行った時の歯髄反応の検討〕

上記〔研究計画2〕で半導体レーザー照射自体の歯髄創傷治癒への影響を検討した後、レーザー照射歯（歯髄）へのレジン成分の影響を検討する。

4. 研究成果

培養歯髄細胞株および私達が確立した象牙芽細胞様細胞株が細胞死に到らないレーザー出力の上限を検討した。その結果、培養に用いる数種類のディッシュを均一にカバー可能で、かつ細胞に対して短時間（標準条件 120 秒）で照射が可能なものとしてエネルギー密度 $12\text{J}/\text{cm}^2$ となる照射距離（標準条件 22.4cm）となる条件設定が最適であった。

この結果をふまえて、まずレジン成分が存在しない、通常の培地中にヒト歯髄細胞株を播種・定着させた後に半導体レーザー照射を行なって影響を調べた。レーザー照射により培地中の温度が可及的に変化しない程度で、レーザー照射時間を3分、5分と条件を変え、MTTアッセイにて細胞増殖状態を比較した結果を【図1】に示す。照射時間が3分のものより5分のほうが細胞増殖能が低下する傾向が示されたが有意差は認められなかった。また、照射条件を種々変えた場合でも有意な差は検出されず、現設定では細胞増殖に対して半導体レーザー照射はそれほど明らかな影響を及ぼしている可能性は低いと考えられた。

【図2】には、ヒト歯髄細胞の培地中に各種濃度のBis-GMAを添加し、それと半導体レーザー照射の条件を組み合わせた場合のBrdU取り込みから見た細胞増殖能を検討したものである。Bis-GMA濃度は

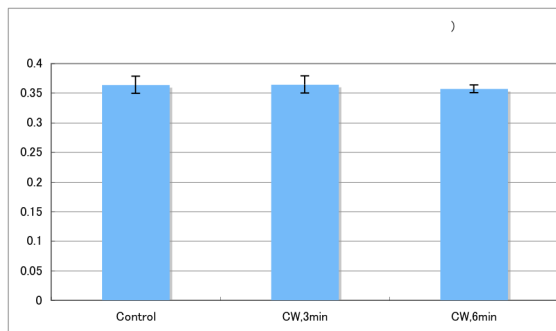
Control, 0.0001, 0.0025, 0.005, 0.01, 0.02mMの5種類とし、レーザー照射はBis-GMAを培地中に添加して刺激を開始する時とその後培地を交換して刺激を除去する2つのタイミングについて、1) Controlとして照射しない2) 添加前のみ照射、3) 添加前及び添加後両方に照射、4) 添加後のみ照射の4つとして、その組み合わせで評価を行った。

その結果、添加前に照射を行なった群においてBis-GMAが0.0025mMと低濃度で十分細胞が生存できる条件でわずかに細胞増殖能が維持されること、添加前後や添加後に照射を行なったものではコントロールと比較して増殖能が低下することが示された。

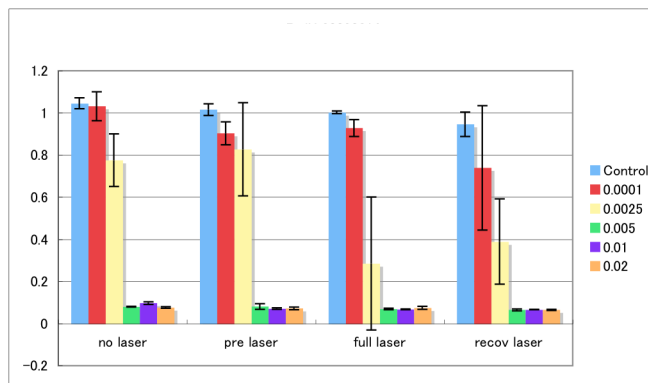
これらの結果は、半導体レーザー照射が単純に細胞の増殖能等の活性を賦活させるというのではなく、複数の因子が関連してその効果を発揮していると考えられる。

今回、上述した内容以外に計画されていた実験については、照射条件の設定・調整に時間が消費されたため、期間内の実施が困難であった。今後継続して検討を行う予定である。

【図1】半導体レーザー照射後のヒト歯髄細胞の増殖能の検討



【図2】各種濃度のBis-GMA存在下で半導体レーザー照射した場合の増殖能の検討



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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計◇件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野淳也 (YANO JUNYA)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：00347676

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし