

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 13 日現在

機関番号：32622  
 研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23792183  
 研究課題名（和文） オフィスブリーチ剤の歯肉為害性について  
 研究課題名（英文） Cytotoxic Effects of Hydrogen Peroxide on human gingival fibroblasts in vitro  
 研究代表者  
 古川 匡恵 (FURUKAWA MASAE)  
 昭和大学・歯学部・兼任講師  
 研究者番号：90439456

研究成果の概要（和文）：オフィスブリーチは現在審美歯科において人気のある漂白法である。しかしながら、オフィスブリーチ法は熟練した術者においても術中に歯肉や口腔粘膜に漂白剤が付着してしまうことがある。その場合、歯肉に一過性の疼痛および白色化が起こるが、数時間後には症状は緩和し、白色化も消失してしまう。この漂白剤の歯肉に対する影響については文献などでは知られていないため本研究では、漂白剤の歯肉に対する為害性を *in vitro* で検討した。

研究成果の概要（英文）：

Office bleach is a popular treatment in modern aesthetic dentistry. However, bleaching agents are sometimes accidentally adhered to gingiva and peripheral tissues even by well-trained operators, which leads to transient pain and whitish change of gingiva. Although these symptoms disappear within several hours, the effects of bleaching agents on gingiva have not been well described in the literature. The current study was aimed to elucidate the cytotoxic effects of a bleaching agent on cultured human gingival fibroblasts (HGFs).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：保存修復学

#### 1. 研究開始当初の背景

オフィスブリーチは現在審美歯科において人気のある漂白法である。しかしながら、オフィスブリーチ法は熟練した術者においても施術中に歯肉や口腔粘膜に漂白剤が付着してしまうことがある。その場合、歯肉に一過性の疼痛および白色化が起こるが、数時間後には症状は軽減し、白色化も消失してしまう。この漂白剤の歯肉に対する影響については文献などでは知られていないことが多い。

#### 2. 研究の目的

本研究では、歯肉に対してオフィスブリーチ剤がどのような影響を与えているのかを目的に、培養ヒト歯肉線維芽細胞におけるオフィスブリーチ剤の歯肉為害性を(1)alamar blue 染色法で細胞生存性を検討した。また、臨床においては歯肉にブリーチ材が付着した際、ビタミンE配合のクリームを塗布すると症状は緩和するという通説があるが、それ

は有効であるかは明らかになっていない。そこで本研究では過酸化水素で歯肉が受けた刺激に(2)ビタミンEが有効かを同様に alamar blue 染色法で細胞生存性を調べた。またこれらの条件における細胞動態を(3)ファロイジン染色で検討した。最後に、歯肉に対する為害性、ならびにビタミンEの効果を(4)DNA マイクロアレイ法で検討した。この、歯肉に対する影響を以上4点について in vitro で検討した。

### 3. 研究の方法

#### (1)細胞生存率の検討

ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF、ScienCell) は非働化したウシ胎児血清 (FCS、ScienCell) を5%の割合に含む歯肉線維芽細胞培地 (FM、ScienCell) を用い、Poly-L-Lysine コートされた10cm ディッシュ

(Poly-L-Lysine-Coated 100mm Dish、IWAKI) で5%炭酸ガス存在下、37°Cで細胞が単層を形成するまで行った。なお、本研究では4~6回継代した線維芽細胞を実験に用いた。

$1 \times 10^5$ 個に調整した細胞は96穴マルチプレート (Poly-L-Lysine-Coated MICRO PLATE 96 Well、IWAKI) に播種し24時間培養した。

PBSで濃度調整した15、1.5、 $1.5 \times 10^{-1}$ 、 $1.5 \times 10^{-2}$ 、 $1.5 \times 10^{-3}$ 、 $1.5 \times 10^{-4}$ 、 $1.5 \times 10^{-5}$ 、 $1.5 \times 10^{-6}$ %各濃度の過酸化水素 (Wako) を90秒、5、10、30、60分間作用させ、再びPBSで洗浄した。細胞生存率をAlamar Blue

(invitrogen) を添加した血清除去培地に置き換え24時間後、可波長吸光マイクロプレートリーダー (VERSA max、Molecular devices) にて540nmの吸光度で測定した。

#### (2)過酸化水素下におけるビタミンEの影響について

細胞生存率の検討で得られた過酸化水素濃度に(±)-Tocopherol  $\alpha$  (Wako) (以下ビタミンE) をそれぞれ500、375、250、125、100、

$50 \mu\text{M}$  添加し90秒間反応させ Alamar blue を用いて細胞生存率を検討した。

#### (3)細胞動態の検討

ヒト歯肉線維芽細胞を6well dishに播種し、コントロール群、15%過酸化水素添加群、15%過酸化水素添加+ $250 \mu\text{M}$  ビタミンE添加群とし、添加群はそれぞれ90秒反応させた。培養終了後10%ホルマリンで固定し、細胞をファロイジン染色した。

#### (4)DNA マイクロアレイによる各遺伝子の動態

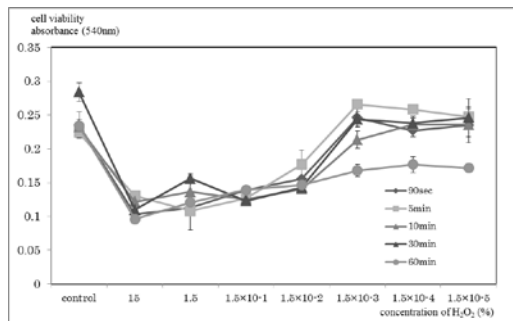
高濃度の過酸化水素濃度 (15%) を培養ヒト歯肉線維芽細胞に培養し、同時にビタミンE ( $250 \mu\text{M}$ ) 添加群とともに90秒で採取しコントロール群と比較検討した。過酸化水素刺激で誘導され、ビタミンE添加で抑制される遺伝子をマイクロアレイ (タカラバイオ株式会社ドラゴンジェノミクスセンター) にて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1)細胞生存率

いずれの時間においてもコントロールと比較して低濃度の過酸化水素処理群で細胞生存性が高く、 $1.5 \times 10^{-2}$ %以上の高濃度処理群では細胞生存性が低かった。60分間線維芽細胞を刺激した場合、細胞生存度はどの濃度でも低かった。15%過酸化水素で細胞生存性がコントロールの半分程度の値になった。その一方で $1.5 \times 10^{-3}$ %の濃度を境目に細胞障害性がなくなりコントロールと同様の細胞生存性を示した。(図1)

図 1：過酸化水素刺激後の歯肉線維芽細胞の生存率

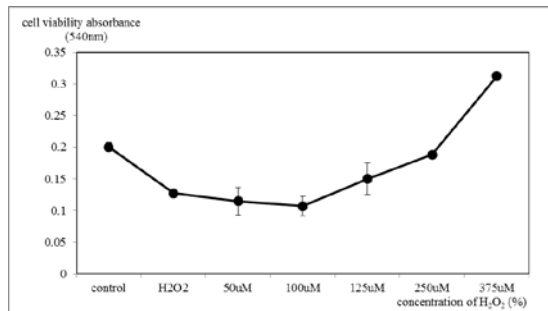


縦軸は細胞生存率、横軸は過酸化水素濃度を示す。過酸化水素濃度が  $1.5 \times 10^{-3}\%$  以上で細胞生存率が低くなっていることがわかる。

### (2) ビタミン E 添加の検討

(1) で細胞為害性が最も強く出た 15%過酸化水素濃度を用い、90 秒で反応を検討したところ、過酸化水素刺激で半分になった細胞生存率が 250uM ビタミン E 添加でコントロールと同程度まで回復した。(図 2)

図 2：ビタミン E 添加の検討



### (3) 細胞動態

歯肉線維芽細胞における細胞動態は過酸化水素刺激で強く障害を受けた。(図 3~5) ビタミン E 不添加のものと比較すると細胞生存率は高く、細胞の形態も正常に保たれていた。また、ビタミン E 添加により障害を受けた細胞形態が正常に戻りつつあることも確認できる。

図 3：正常なヒト歯肉線維芽細胞

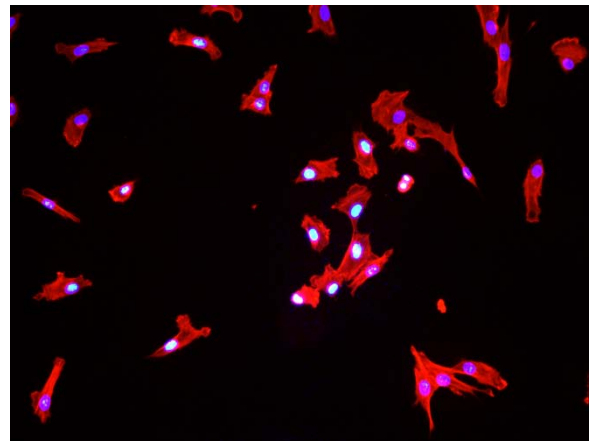


図 4：過酸化水素刺激後のヒト歯肉線維芽細胞

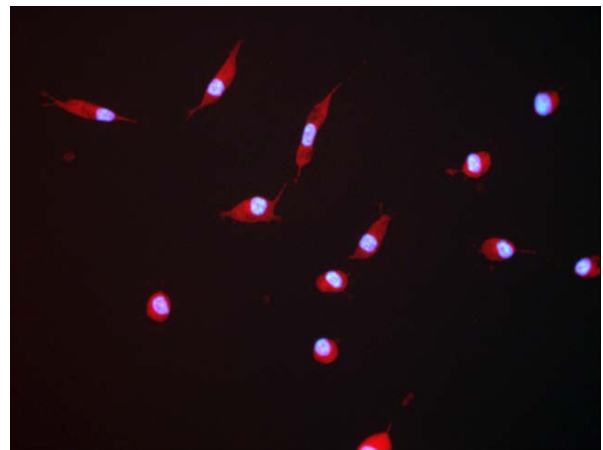


図 5：ビタミン E 添加後のヒト歯肉線維芽細胞



### (4) マイクロアレイによる検討

高濃度過酸化水素刺激で IL 6 や炎症性サイトカイン誘導されていた。また、ビタミン E

添加で DNA 修復系遺伝子が誘導されていた。  
このことにより、ビタミン E 添加によって細胞障害性が緩和することが明らかになった。

#### 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) 古川匡恵, 東光照夫, 久光久  
白い歯を求める患者の心理について, 歯科の色彩, 査読有, Vol. 18, No. 1, 2012, 10-14

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) Masae Furukawa, Hisashi Hisamitsu and Atsufumi Manabe  
Cytotoxic Effects of Hydrogen Peroxide on human gingival fibroblasts in vitro,  
12<sup>th</sup> Biennial Meeting of Asian Academy of Aesthetic Dentistry, 2012

〔図書〕(計 1 件)

(1) 東光照夫, 古川匡恵, 久光久  
ホワイトニングに強くなる本、クインテッセンス出版、2011

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

**古川 匡恵 (FURUKAWA MASAE)**  
昭和大学・歯学部・兼任講師  
研究者番号：90439456