

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792045

研究課題名(和文)青色光が誘導する口腔領域の酸化ストレス解析と加齢制御

研究課題名(英文) Antiaging control and oxidative stress analysis induced by blue light in the oral area

研究代表者

吉田 彩佳 (Yoshida, Ayaka)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00609414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：歯牙漂白やレジン修復に用いられる青色光の波長は高エネルギー波長として眼科領域ではすでに防御メガネ等の物理的防御策やサプリメント治療の対策が打ち出されている。歯科の青色光研究は立ち遅れている。そこで術野外でありながら青色光が照射される歯肉線維芽細胞と組織について検討を行った。青色光は細胞に5分間の照射でミトコンドリアが最初のターゲットとし活性酸素種が誘導されることが示唆され、その結果として細胞増殖活性が抑制されることが認められた。また、組織においてもラット口蓋歯肉において酸化ストレスの影響が15分の照射で現れることが認められ、この影響はNアセチルシステインにて抑制されることが見出された。

研究成果の概要(英文)：In Ophthalmology, the protective goggles or antioxidants supplementation have already been applied to harmful effects of high-energy wavelength of blue light which is using in the tooth office bleaching and composite resin treatments. Blue light study of dentistry has lagged behind. Therefore, I examined the effect of blue light irradiation to the gingival fibroblasts and tissue which are the outside of treatments. It was suggested that the reactive oxygen species induced by the 5 min blue light irradiation and the first target of the irradiation was mitochondria. As a result, the cell proliferation was suppressed by the irradiation. Further, it was suggested that oxidative stress was induced by 15 min irradiation to the rat gingival tissue. N-acetyl-cysteine decreased the effect of blue light irradiation.

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：青色光 歯肉線維芽細胞 活性酸素種 酸化ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

歯科臨床現場で使用されている光照射は化学重合レジンの操作性を改善するために開発され、現在は光増感剤であるカンファークシノンの励起波長である 470 nm 付近の光を用いたレジン重合開始に必須である (*J Am Dent Assoc* 92: 775-776, 1976)。開発当初使用された波長の紫外線は、生体障害性が著しく高く、併せてレジンに対する透過度が浅いため、紫外線より生体安全性の高い長波長の青色光 (400 ~ 510 nm) が用いられるようになった (*Dent Mater J* 16: 60-73, 1997)。しかしながら、青色光の生体へ影響の詳細なメカニズムはほとんど解明されていない。最近では、青色光照射はレジン修復に使用されるのみでなく、着色歯の漂白の際、漂白剤の有効成分である過酸化水素 ( $H_2O_2$ ) の光活性化を行い、活性酸素種 (ROS) を発生させるためにも用いられてきている (*J Esthe Dent* 4: 90-95, 1992)。光照射器の使用方法は、時代背景により徐々に推移し、従来は単歯のみをターゲットとし照射を行っていたが、対象歯のみに光照射を行うことは非常に困難であり、加えて現在では多数歯に対し同時漂白処置を行う機会が多くなってきており、周辺組織である口腔軟組織へも青色光照射は拡散されるようになったため、その影響は無視できない。

## 2. 研究の目的

歯科に用いられる青色光の波長は 400-500 nm であるが、眼科領域においてこの青色光波長が ROS を誘導し黄斑加齢変性のような網膜への光加齢の悪影響を引き起こすことが知られてきている。したがってオレンジ色のメガネを使用することにより我々も歯科治療 (レジン修復や漂白) における青色光から網膜を防御している。しかしながら、照射野である口腔領域組織に対する青色光の影響についての研究はほとんど存在しない。近年の歯科のオフィスブリーチングにみられる青色光利用において、術野外であるにもかかわらず光照射をされる代表的な組織の一つとして口腔歯肉粘膜がある。このオフィスブリーチング時にワセリンやレジンなどによって歯肉粘膜を保護しているが、この防御は青色光に対するものではなく、オフィスブリーチング剤の  $H_2O_2$  による傷害の防御を目的としており、青色光からの防御は考慮されていない。そこで口腔軟組織細胞および組織におけるブルーライトの酸化ストレスの影響について検討を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 光源の設定

ブルーライト光源にハロゲン (QTH, Techno Light KTS-150) と発光ダイオード (LED, Techno Light KTL-100) を用い、青色光フィルター (225S-SPF500, Kenko Tokina) にて波長を統一し、460 nm にて細胞実験は 250

mW/cm<sup>2</sup>、動物実験には 400 mW/cm<sup>2</sup> とするよう設定した。

### 3-2. 細胞培養および光照射による細胞増殖活性

細胞はヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs, 神奈川県立小松知子提供, *Redox Report*, 11(2),71-77, 2006) を用い通法に則り培養を行った。細胞増殖活性は 96 well プレートに  $1.6 \times 10^4$  にて播種一晚培養後、青色光照射を行った。この青色光照射と非照射細胞の細胞増殖活性を Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell proliferation Assay kit® (Promega) を用い検討した。

### 3-3. 透過型電子顕微鏡による形態学的検討

HGFs は 35 mm ディッシュへ  $4.0 \times 10^5$  で播種を行い通法に則り一晚培養後、青色光照射を行った。この青色光照射と非照射細胞の形態学的検討を透過型電子顕微鏡にて行うため、通法に従い細胞の染色を行い観察した。

### 3-4. 活性酸素種の検討

3-2. 同様 HGFs を通法に則り培養を行った。細胞増殖活性は 96 well プレートに  $1.6 \times 10^4$  にて播種一晚培養後、5 分間の青色光照射を行った。この青色光照射と非照射細胞の ROS の影響を CellROX® (Promega) のプロトコルの指示に従い測定、検討を行った。

### 3-5. ラット歯肉口蓋組織における酸化ストレスの検討

6 週齢雄性ウィスターラット (日本 SLC) 歯肉口蓋組織に 4 日間 15 分の LED 照射し、麻酔下にて脱血還流後、サンプル回収を行い、TBARS assay kit (Cayman) にてマロンジアルデヒド (MDA) を 540 nm の波長にて検出した。なおこの研究の手続は USNIH のガイドに基づき、プロトコルは本研究機関の動物実験委員会にて承認されている。

### 3-6. I 型コラゲナーゼ測定

3-5 同様のプロトコルにて照射・サンプル回収を行い、I 型コラゲナーゼアッセイキット (Primary Cell) を用い I 型コラゲナーゼ測定を行った。なおこの研究の手続は USNIH のガイドに基づき、プロトコルは本研究機関の動物実験委員会にて承認されている。

## 4. 研究成果

歯肉線維芽細胞に対する細胞毒性の検討 HGFs に対する青色光照射は照射時間依存的に細胞増殖活性を低下させた。この低下は 3 分以上において有意となり、また特に 5 分においては QTH と比較しても LED において有意な抑制が認められた ( $p < 0.05$ )。また、形態学的検討において、ミトコンドリアの空胞化やクリステの消失など障害性が 5 分間の照射において認められた。さらに、この障害性に ROS の関与が認められた。以上の結

果より、細胞レベルにて細胞内ミトコンドリアにて青色光照射により ROS が誘導され、この ROS の最初のターゲットはミトコンドリアであることが示唆された。

ラット歯肉口蓋に対する青色光の影響の検討

4 日間 15 分間の歯肉口蓋組織に対する青色光の照射により I 型コラゲナーゼには変化が認められなかったが、TBARS assay にて歯肉口蓋組織に脂質過酸化の亢進が認められた。このことは口蓋歯肉組織コラーゲンに今回の照射条件では影響を与えていないが、口蓋歯肉組織に酸化ストレスをすでに引き起こしていることが示唆される。

ブルーライト照射は ROS による酸化ストレスの関与が示唆され、この障害は細胞レベルのみでなく組織レベルにおいても認められた。

#### 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 4 件)

Yoshida A., Yoshino F., Makita T., Maehata Y., Higashi K., Miyamoto C., Wada-Takahashi S., Takahashi S-S., Takahashi O., Lee M-C.: Reactive Oxygen Species Production in Mitochondria of Human Gingival Fibroblast Induced by Blue Light Irradiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 129(5): 1-5, 2013. 査読有  
DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2013.09.003

Kobayashi Y., Hayashi M., Yoshino F., Tamura M., Yoshida A., Ibi H., Lee M-C., Ochiai K., Ogiso B: Passive ultrasonic irrigation in the presence of a low concentration of hydrogen peroxide enhances hydroxyl radical generation and bactericidal effect against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Oral Science*, 56(1), 35-39, 2014. 査読有  
DOI: 10.2334/josnusd.56.35

Yoshino F., Yoshida A., Nakajima A., Wada-Takahashi S., Takahashi S-S., Lee M-C.: Alteration of the redox state with reactive oxygen species for 5-fluorouracil-induced oral mucositis in hamsters. *PLoS ONE*, 8(12): 1-6, 2013. 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pone.0082834

Yoshino F., Yoshida A., Okada E., Okada Y., Maehata Y., Miyamoto C., Kishimoto S., Otsuka T., Nishimura T., Lee M-C.: Dental

resin curing blue light induced oxidative stress with reactive oxygen species production. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 114: 73-78, 2012. 査読有

DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2012.05.012

[学会発表](計 8 件)

吉田彩佳, 東 一善, 高橋 理, 吉野文彦: ブルーライト照射が口腔軟組織・細胞に及ぼす影響の検討. 神奈川歯科大学学会 第 143 回例会, 横須賀, 2014.1.9.

Yoshida A., Yoshino F., Maehata Y., Miyamoto C., Takahashi S.-S., Takahashi-Wada S., Lee M-C.: Effects of Blue Light to Mitochondria in Human Gingival Fibroblast. 2013 FDI Annual World Dental Congress, Istanbul, Turkey, 2013. 8. 27-8.31.

吉田彩佳, 吉野文彦, 前畑洋次郎, 宮本千央, 高橋聡子, 高橋俊介, 李 昌一: 歯科治療に用いられる青色光照射が血管平滑筋へおよぼす影響. 第 13 回 AOB 研究会, 台東区, 2013.7.12.

吉田彩佳, 吉野文彦, 東 一善, 高橋 理, 李 昌一: 平成 24 年度研究報告: 青色光が歯肉線維芽細胞へおよぼす影響および口内炎発症メカニズムの検討. 神奈川歯科大学学会 第 140 回例会, 横須賀, 2013.1.10.

Yoshida A., Yoshino F., Lee M-C.: Effects on Vascular Smooth Muscle Caused by the Dental Curing Unit Lights. 2012 FDI Annual World Dental Congress, Hong Kong, 2012. 8. 29-9.01.

吉田彩佳, 吉野 文彦, 李 昌一: 歯科用可視光線照射器の青色光が血管平滑筋へおよぼす影響. 日本歯科保存学会 2012 年度 春季学術大会 (第 136 回), 沖縄, 2012.6.28-29.

吉田彩佳, 吉野文彦, 前畑洋次郎, 高橋俊介, 高橋聡子, 宮本千央, 徳富文彬, 杉山秀太, 李 昌一: 血管平滑筋に対する歯科用レジン照射器の青色光照射がおよぼす影響. 第 12 回日本抗加齢医学会総会, 横浜市, 2012.6.22-24.

吉田彩佳, 吉野 文彦, 前畑洋次郎, 宮本千央, 李 昌一: 歯科用可視光線照射器を用いた青色光照射による血管平滑筋への影響の検討. 第 65 回 酸化ストレス学会学術集会, 徳島, 2012.6.7-8.

[その他]

ホームページ等

<http://www.labs.kdu.ac.jp/pmd/>

6．研究組織

(1)研究代表者

吉田彩佳 (AYAKA YOSHIDA)

神奈川歯科大学大学院歯学研究科・特別研究員

研究者番号：00609414