

機関番号： 32650
研究種目： 若手研究 B
研究期間： 平成 21 年度 ～ 平成 22 年度
課題番号： 21791952
研究課題名 (和文) 歯科用レーザーによる口腔領域の間葉系細胞活性化療法の確立
研究課題名 (英文) Establishment of treatment that activates oral mesenchymal cells using dental LASER.
研究代表者
村上 聡 (SATOSHI MURAKAMI)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号： 70385219

研究成果の概要 (和文)：本研究の目的は口腔領域の間葉系細胞および SP 細胞に対する炭酸ガス (CO₂) レーザーおよび半導体レーザーによる LLLT (Low reactive Level Laser Therapy) を想定し、必要な細胞を活性化させ、サイトカインネットワークを調整し、創傷治癒の促進、疼痛の緩和により病態をより早く常態に戻すメカニズムを検索することである。歯科臨床においては従来より生活歯髄切断法として高い硬組織形成能を有する歯髄細胞の創傷治癒は知られている。また、近年では象牙質知覚過敏症に歯科用レーザーを用いた LLLT による疼痛緩和などを目的とした治療が行われている。しかしながら、象牙質歯髄複合体細胞への歯科用レーザーの影響をサイトカインネットワークの観点から検索した報告は少ない。そこで今回は、ラット上顎臼歯に炭酸ガス (CO₂) レーザーを照射したときの歯髄組織における炎症性サイトカインをはじめとするサイトカインの発現について遺伝子学的ならびに免疫組織化学的に検索した。炭酸ガス (CO₂) レーザーは波長 10.6 μm で、連続波で 8.8 秒照射した。エネルギー密度は 203.84 J/cm² と算出された。熱電対温度計による歯髄腔側での温度は 47.5°C であった。RT-PCR 法による検索では、IL-1, TNF-α の各 mRNA は照射後 6 時間には発現し、照射後 24 時間をピークとして減少し、照射後 48 時間ではコントロールと差が認められなかった。また、抗 HSP-70 抗体、抗 Nestine 抗体を用いた免疫組織化学的検索では、照射後 1 日では象牙芽細胞に抗 Nestine 抗体に陽性の反応が見られたものの、照射後 5 日では明らかな Nestine の反応は見られなかった。一方で、照射後 5 日、7 日では抗 HSP-70 抗体の陽性反応が観察された。これらの結果より炭酸ガスレーザーの照射により病理組織像としては強い変性像がみられなくても歯髄組織に炎症性サイトカインの発現に始まるサイトカインネットワークが働き、タンパク質の発現に関与することが示唆された。本研究の成果は「pulp responses after CO₂ laser irradiation of rat dentin」として Journal of Oral Laser Applications へ投稿中である。

研究成果の概要 (英文)：

Aim: The purpose of this study was to investigate pulp responses after CO₂ laser irradiation of the cusp of molar teeth using RT-PCR and immunohistochemical methods.

Methods: Adult male Sprague-Dawley rats, weighing about 200 g each, were used in this study. A CO₂ laser was used to irradiate the cusp region of the upper first molar with a total energy of 4 J (Density; 203.84 J/cm²). The temperature change in the pulp was measured using a super fine sheath thermocouple.

Results: The temperature at the pulp side after the CO₂ laser irradiation increased 22.5 °C. The expression of both TNFα and IL-1 mRNAs was significantly higher at 6, 12 and 24 hr (but not at 48 hr) after the laser irradiation compared to the control group (p<0.05). Histologically, a slight degeneration of the pulp tissue was observed immediately after the laser irradiation, and HSP-70 positive cells were observed in the pulp horn immediately after the CO₂ laser irradiation. Cells positive for VEGF were seen in the sub-odontoblast layer immediately and 5 days after the laser irradiation. At 5 days after the laser irradiation, the expression of Nestin was recognized in the deeper pulp cells. NFP-positive nerve fibers had disappeared in the pulp horn by 5

days after the laser irradiation.

Conclusions: These results suggest that a low energy of laser irradiation such as used in the clinic to the pulp tissue through the dentin induces the inflammatory and pathological cytokine pathways to repair the damaged pulp tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
21年度	1,300,000	390,000	1,690,000
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：病理

キーワード：象牙質知覚過敏症、炭酸ガスレーザー、半導体レーザー、歯髄細胞、象牙芽細胞、炎症性サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

レーザーは細胞活性を促すことも知られ、研究はいくつかあるが、その臨床応用はほとんどない。一方、近年の創傷治癒ならびに再生療法に関する研究では、各組織における間葉系細胞や組織(臓器)幹細胞の応用が注目されている。特に組織幹細胞の存在は口腔領域においても報告されはじめており、再生療法や創傷治癒への応用に期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は口腔領域の間葉系細胞および SP 細胞に対する炭酸ガス(CO2)レーザーおよび半導体レーザーによる LLLT(Low reactive Level Laser Therapy)を想定し、必要な細胞を活性化させ、サイトカインネットワークを調整し、創傷治癒の促進、疼痛の緩和により病態をより早く常態に戻すメカニズムを検索することであり、レーザーを用いる口腔領域の間葉系細胞の活性化療法に基づく臨床と基礎研究のリエゾン構築の端緒となる新たな歯科レーザー応用の確立を目的とする。

3. 研究の方法

平成 21 年度：in vitro による検索
本研究に用いるレーザー装置はパナソニックデンタル社製炭酸ガス(CO2)レーザー(Panalas C05Σ)および高出力半導体レーザー(P-Laser)を用いる。

- ・培養した線維芽細胞、骨髄細胞、歯髄細胞、口腔粘膜上皮細胞、象牙芽細胞に対する PAR 効果を期待できる炭酸ガス(CO2)レーザーおよび半導体レーザー照射の至適条件を検索し、増殖能を計測、比較する。

- ・培養した線維芽細胞、骨髄細胞、歯髄細胞、口腔粘膜上皮細胞、象牙芽細胞および SP 細胞に対する細胞の機能発現について種々のサイトカインの mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR を用いて検索する。

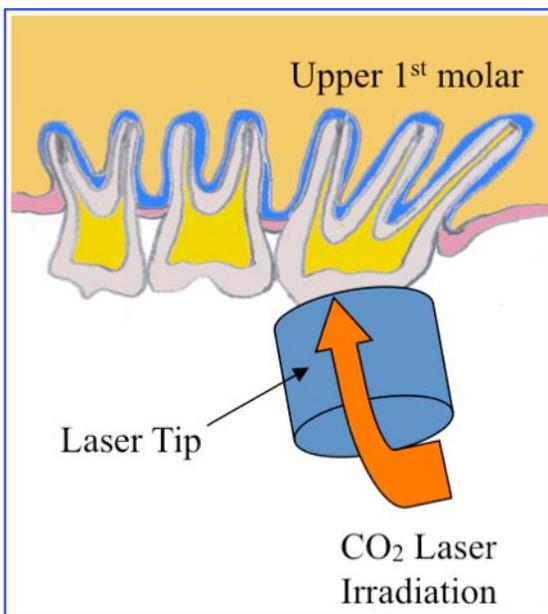
平成 22 年度：in vivo による検索

- ・ラットの口蓋粘膜、歯周組織、唾液腺、歯髄に炭酸ガス(CO2)レーザーおよび半導体レーザー照射を照射し、組織破壊および創傷治癒過程の細胞活性について組織学的に検索し、レーザー照射の至適条件を決定する。

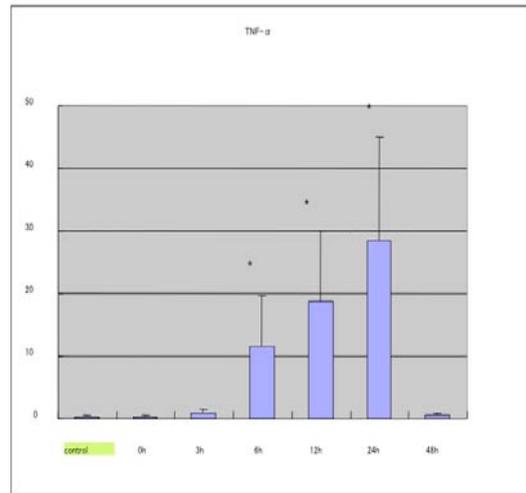
・創傷治癒過程および恒常性維持の発現におけるサイトカインの発現と局在を免疫組織化学的に検索する。・一次抗体には epidermal growth factor(EGF), basic fibroblast growth factor(bFGF), vascular endothelial growth factor(VEGF), heat shock protein(HSP), neuron specific enolase(NSE), osteopontin(OPN), osteocalcin(OCN)などを用いる。

4. 研究成果

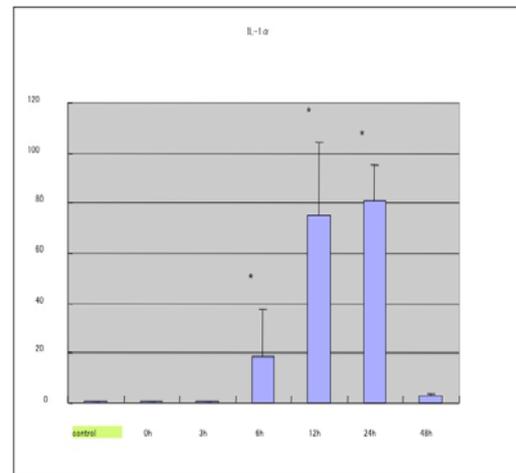
ラット上顎臼歯に炭酸ガス(CO₂)レーザーを照射したときの歯髓組織における炎症性サイトカインをはじめとするサイトカインの発現について遺伝子学的ならびに免疫組織化学的に検索した。炭酸ガス(CO₂)レーザーは波長 10.6 μm で、連続波で 8.8 秒照射した。エネルギー密度は 203.84J/cm² と算出された。炭酸ガスレーザー照射後の



熱電対温度計による歯髓腔側での温度は 47.5°C であった。RT-PCR 法による検索では、IL-1, TNF- α の各 mRNA は照射後 6 時間には発現し、照射後 24 時間をピークとして減少し、照射後 48 時間ではコントロールと差が認められなかった。



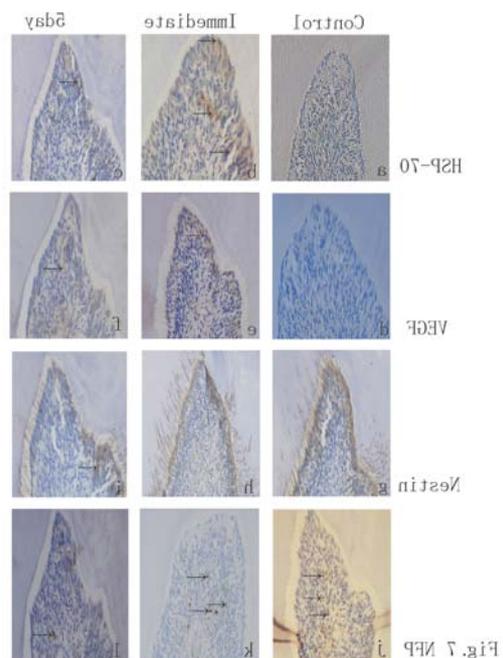
炭酸ガスレーザー照射後の TNF- α mRNA の発現($P<0.05$)



炭酸ガスレーザー照射後の IL-1 mRNA の発現($P<0.05$)

また、抗 HSP-70 抗体、抗 Nestine 抗体を用いた免疫組織化学的検索では、照射後 1 日では象牙芽細胞に抗 Nestine 抗体に陽性の反応が見られたものの、照射後 5 日では明らかな Nestine の反応は見られなかった。一方で、照射後 5 日、7 日では抗 HSP-70 抗体の陽性反応が観察された。これらの結果より炭酸ガスレーザーの照射により病理組織像としては強い変性像がみられなくても歯髓組織に炎症性サイトカインの発現に始まるサイトカインネットワークが働き、

タンパク質の発現に関与することが示唆された。



本研究の成果は「pulp responses after CO2 laser irradiation of rat dentin」として Journal of Oral Laser Applications へ投稿中である。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 聡 (SATOSHI MURAKAMI)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70385219