

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791407
 研究課題名（和文） 接着性レジン成分刺激による歯髄細胞への細胞死誘導と刺激後の細胞増殖能回復の検討
 研究課題名（英文） Inducing of apoptotic cell death and cell recovery of dental pulp cells by resin adhesive components stimulation.
 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：接着性レジン成分のうち、Bis-GMA 刺激による歯髄細胞の細胞動態への影響を検討した。直接歯髄細胞へ Bis-GMA が添加された場合、濃度依存的に細胞増殖能の低下やアポトーシス誘導の可能性などが確認された。一方、Bis-GMA 刺激を除去することで生き残った歯髄細胞は通常の状態へ回復する能力を有することが示された。また、象牙質が存在することで Bis-GMA の影響は大きく減弱することが示され、歯髄保護のための象牙質保存の意義が確認された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総 計	2,600,000	390,000	2,990,000

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：歯髄細胞，細胞増殖能，接着性レジン成分，アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

近年、コンポジットレジン等の接着性材料の性能改善に伴う治療術式の向上により、歯質を可及的に保存する治療法が広く普及しつつある。以前は抜髄を余儀なくされていた症例においても歯髄保存が可能となり、患者の QOL 改善にも貢献している。

一方、数年前に Bis-GMA の関連物質であるビスフェノール A の内分泌攪乱物質としての危険性と、ビスフェノール A を原材料とするレジン系材料の使用に対する危険性が指摘された。その後、口腔内ではビスフェノール A が溶出する状態ではないことや、細胞

の形態変化を見たいくつかの組織学的研究でレジン成分の歯髄への安全性が示されており、直接的なレジン成分の安全性については一応の決着を見ている。ただし、今後ますますレジンを用いた歯髄保存的アプローチは増加していくことが予想される。これまで私達の in vivo 実験系の結果から、レジン成分による刺激を受けた歯髄は短期間で正常な組織に戻るものの、その後健全な歯髄とは異なる反応をすることが示されており、形態変化だけでなく分子生物学的研究の必要性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、接着性レジンの歯髄への影響を明らかにし、その結果をもとに接着性レジンによる歯髄保護を確立することにある。本研究では、*in vitro* 実験系におけるコンポジットレジン構成成分の歯髄細胞増殖・分化能および細胞死への影響とレジン成分の影響を受けた歯髄細胞の回復能を検討することを目的としている。

3. 研究の方法

コンポジットレジンの接着システムに含まれる成分である Bis-GMA がヒト歯髄由来細胞株（LSC2 細胞）へ与える影響を検討する。

（1）細胞増殖能および細胞周期の検討

歯髄細胞に Bis-GMA が与える直接的な影響を検討するため、細胞培地に Bis-GMA を各種条件で添加して、細胞増殖能がどのような影響を受けるのかを細胞増殖に伴う BrdU の DNA への取込みを測定することによる細胞増殖能の分析により検討した。あわせて、フローサイトメーターを用いて細胞周期の検討をおこなった。

（2）象牙質ディスクを用いた Bis-GMA 浸透状態の検討

窩洞形成を行い、窩底部に象牙質が存在する状況を想定して、Bis-GMA が象牙質を介して間接的に歯髄へ影響を及ぼすのかを検討するため、ヒト抜去歯より厚さ 1 ミリの象牙質ディスクを作成し、Bis-GMA の象牙質通過浸透を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて計測を行った。

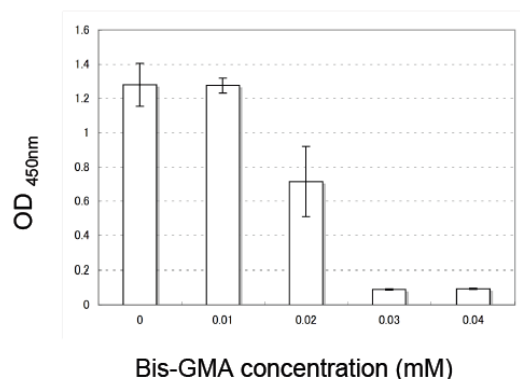
（3）ヘキスト染色によるアポトーシス誘導の検討

Bis-GMA の影響を受けた歯髄細胞がアポトーシスを誘導している可能性を検討するため、位相差顕微鏡及びヘキスト染色を行って形態学的変化を観察した。

4. 研究成果

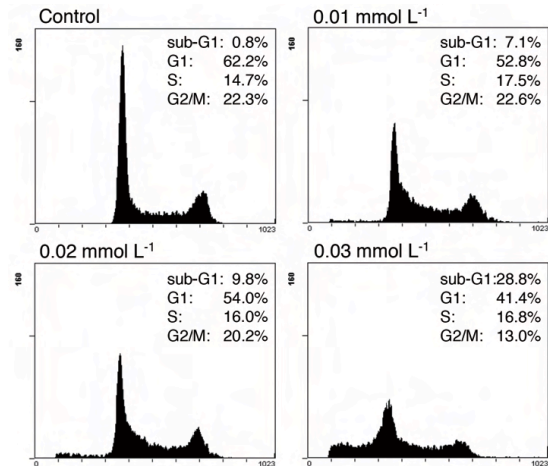
（1）細胞増殖能の検討

培地に各種濃度の Bis-GMA を添加し、48 時間作用させた直後のヒト歯髄細胞の増殖能を分析した結果を以下に示す。（グラフ縦軸は BrdU 取り込み量から求めた細胞増殖能、横軸は Bis-GMA 作用濃度）



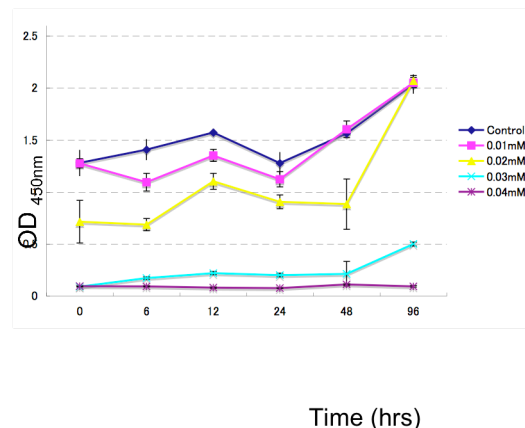
コントロール群と比較して 0.02mM 以上の濃度で有意な細胞増殖能の減少を示し、添加した Bis-GMA の濃度依存的に細胞増殖能が減少することが示された。0.01mM の Bis-GMA 添加群ではコントロールと比較して増殖能に有意な低下は認められなかった。

また、この時点でのフローサイトメーターによる細胞周期の分析結果を以下に示す。Sub-G1 期の細胞割合が Bis-GMA の濃度依存的に増加し、アポトーシスが誘導されている生可能性が示された。



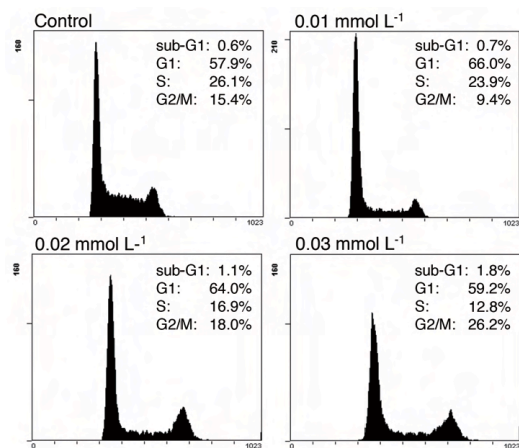
次に、48 時間培地中に Bis-GMA を添加した後に培地を交換して Bis-GMA 刺激を除去し、一定の回復期間を置いた場合のヒト歯髄細胞の増殖能を分析した結果を示す。

回復期間が長くなるにしたがい、細胞増殖能も大きくなる傾向が認められた。特に、96 時間経過後では、Bis-GMA 濃度 0.02mM で刺激した群もほぼコントロールと同等の増殖能を示した。また、0.03mM 群においても、わずかに細胞増殖能の増加が見られた。



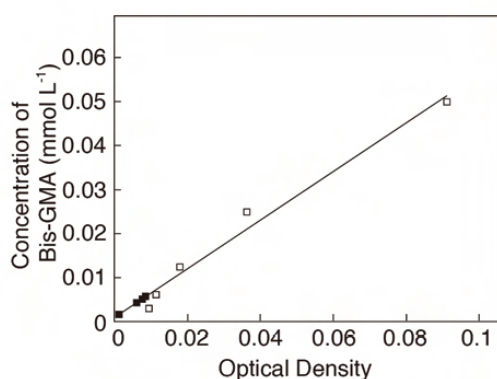
また、96 時間後のフローサイトメーターによる細胞周期の分析結果を以下に示す。刺激直後に多く見られたアポトーシス誘導によると考えられる sub-G1 期の細胞周期の細胞割合が小さくなり、コントロール群と類似し

た状態となった。



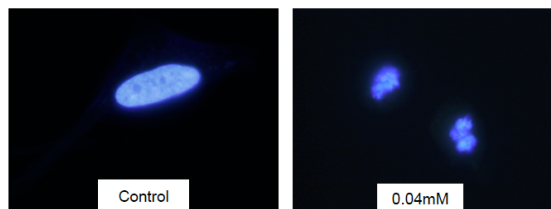
(2) 象牙質ディスクを用いた Bis-GMA 浸透状態の検討

厚さ 1mm の象牙質ディスクを介して Bis-GMA の浸透量を計測した。既知濃度の標準液を参考にして、浸透量を検討した結果、象牙質を通過する Bis-GMA は 0.01mM 以下と極めて微量であることが示された。以下に、標準液から導き出された検量線（グラフ中□点および直線）と 2 週間の浸透期間後に HPLC により計測された Bis-GMA 量（グラフ中■点）の結果を示す。この結果より、1mm 程度の象牙質が存在することで、歯髄側へ浸透する Bis-GMA 量は大きく減弱することが示され、象牙質が Bis-GMA 刺激を遮断する障壁の役割を示していることが示唆された。



(3) ヘキスト染色によるアポトーシス誘導の検討

Bis-GMA 刺激後の歯髄細胞をヘキスト染色し、核の状態を観察した。その結果、以下に示すように歯髄細胞核の凝集、断片化が確認され、アポトーシスが誘導されている可能性が示された。



これらの結果から導き出される結論および考察は、以下の通りである。

ヒト歯髄細胞は Bis-GMA の影響を受け、濃度依存的に細胞増殖能が低下する。また、sub-G1 期の増加といった細胞周期に変化が生じ、組織学的観察からもアポトーシスが誘導されていることが示唆される。

一定濃度以下の Bis-GMA 刺激を受けた細胞も回復期間を経ることで、通常の細胞に近い細胞増殖能や細胞周期を示す状態へと変化する可塑性を有することが示された。

窩底部に十分な残存象牙質厚さが確保されている場合、歯冠部窩洞側からの Bis-GMA 刺激は象牙質で大きく減弱され、歯髄腔内部の歯髄細胞へと抑制的な作用がおよぶ可能性は低いと考えられる。

(現在、上記内容を雑誌投稿中.)

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 2 件)

- ①坂本英治, 諸富孝彦, 北村知昭, 椎葉俊司, 矢野淳也, 永吉雅人, 寺下正道, 仲西修, 風間富栄: 難治性口腔顔面痛への直線偏光近赤外線の効果についての検討. 日本レーザー治療学会雑誌. 6: 22-25 2007. (査読有)
- ②永吉雅人, 北村知昭, 安保直樹, 矢野淳也, 諸富孝彦, 市丸美希, 尾川幸雄, 寺下正道: 臨床をシミュレートした環境下での Ni-Ti ファイルによる根管形成に与える臨床経験の影響 第 1 報 湾曲の少ない根管における根管形成所要時間と根管壁の評価. 日歯内療誌. 29: 113-118, 2008. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

- ①諸富孝彦, 坂本英治, 北村知昭, 椎葉俊司, 矢野淳也, 永吉雅人, 仲西修, 寺下正道: 歯内治療で改善を認めない難治性歯痛患者への口腔顎顔面痛治療の検討. 第 67 回九州歯科学会総会, 北九州 (5 月), 九州歯科学会抄録集: 21, 2007.
- ②有田正博, 陳克恭, 芳賀健輔, 小城辰郎, 松木貴彦, 中村恵子, 波多野圭紀, 矢野淳也, 諸富孝彦, 笠井宏記, 永吉雅人. 統合型卒前臨床実習とポートフォリオ評価の導入. 第 67

回九州歯科学会総会，北九州（5月），九州歯科学会抄録集：34，2007.

③諸富孝彦，坂本英治，北村知昭，椎葉俊司，矢野淳也，永吉雅人，寺下正道：歯内治療で改善しない難治性歯痛患者への口腔顔面痛治療の検討．第28回日本歯内療法学会学術大会，広島（5月），日本歯内療法学会抄録集：89，2007.

④坂本英治，諸富孝彦，北村知昭，椎葉俊司，矢野淳也，永吉雅人，寺下正道，仲西修：難治性口腔顔面痛の鑑別と直線偏光近赤外線の効果についての検討．第19回日本レーザー治療学会シンポジウム2：歯科とLLLT療法，東京（6.30-7.1），2007.

⑤永吉雅人，北村知昭，諸富孝彦，矢野淳也，安保直樹，市丸美希，寺下正道：臨床をシミュレートした環境下で行なった根管形成に与える臨床経験の影響．第29回日本歯内療法学会学術大会，千葉（5月），2008.

⑥永吉雅人，北村知昭，諸富孝彦，矢野淳也，寺下正道：臨床をシミュレートした環境下でのNi-Tiファイルによる根管形成の評価．第68回九州歯科学会総会，北九州（5月），九州歯科学会抄録集：36，2008.

⑦永吉雅人，北村知昭，矢野淳也，諸富孝彦，市丸美希，尾川幸雄，寺下正道：臨床をシミュレートした環境で行なった根管形成への臨床経験の影響．歯工学連携キックオフシンポジウム，北九州（1月），2009.

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