

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890226

研究課題名（和文） レーザー照射による歯髄の石灰化機構における Nitric Oxide の役割と解明

研究課題名（英文） Role and Analysis of Nitric Oxide by Laser Irradiation on Mineralization Ability in Dental Pulp

研究代表者

松井 智（MATSUI SATOSHI）

日本大学・松戸歯学部・助手（専任扱）

研究者番号：10453903

研究成果の概要：本申請では、半導体レーザーを使用した歯髄覆髄法および歯髄象牙質再生療法の確立を目的とし、レーザー照射後の歯髄硬組織形成促進機序の解明の一助として、レーザー照射後に発生するフリーラジカルがシグナル伝達となり象牙質形成に関与する硬組織形成タンパク質の増加させることを報告した。また、レーザー照射以外の生成系から発生したフリーラジカルにおいても硬組織形成タンパク質の発現量が増加することが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

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：歯髄，半導体レーザー，硬組織形成能，Nitric Oxide，マイクロCT，直接覆髄，光線力学的治療法，オステオポンチン

## 1. 研究開始当初の背景

申請者は、レーザーを用いた歯髄保存療法の確立を目指している。これまでに、レーザー照射による歯髄細胞の石灰化促進機構の作用機序を検索する目的で、レーザー照射時に発生するフリーラジカルに着目し、レーザー照射により hydroxyl Radical ( $\cdot\text{OH}$ ) が発生することを明らかとし、 $\cdot\text{OH}$  がヒト歯髄培養細胞における石灰化物形成を促進させることを報告してきた。本申請では、レーザー照射によって発生するその他のフリーラジカルが石灰化物形成を促進させる因子に

なりえるかを検索していく予定である。

## 2. 研究の目的

う蝕や外傷などにより傷害を受け、露髄を生じた歯にとって、歯髄保存の有無は、その歯の寿命に大きく影響する。口腔内に露出された歯髄は、細菌や温度変化などの刺激にさらされるため、露髄面を被覆することは、必須であると思われる。

また、歯髄は、自らが作り出す硬組織である象牙質で覆われることが望ましく、現在臨床において、様々な薬剤や薬液を併用した歯髄覆髄法が広く用いられているが、成功率が高く、安全な治療法の確立には至っていない。よって、薬剤や薬液を用いずに歯髄が保存できる療法が期待されている。また、歯髄における硬組織形成には、炎症の消炎が必須であるが歯髄を保存するためには、炎症を消炎させ、硬組織形成がスムーズに起こる療法の確立が重要であるといえる。申請者は、これまでに歯髄組織の硬組織形成能促進について、半導体レーザーをヒト歯髄培養細胞に照射することで硬組織形成能が有意に促進することを報告した。また、半導体レーザー照射後のヒト歯髄培養細胞における石灰化メカニズムの解明として、レーザー照射時に発生する・OHに着目した。フリーラジカルは、多量に発生すると各種疾患の原因になるとされているが、発生量によっては、殺菌作用、細胞活性および細胞内シグナル伝達分子の機能が見出され近年注目されている。レーザー照射により発生した微量な・OHが硬組織形成能促進のシグナル伝達分子として、熱ショックタンパク質 (HSP) の mRNA 発現を一時的に誘導し、骨誘導タンパク (BMPs) の産生およびアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性が促進されることを報告した。レーザーによる物理的なエネルギーが細胞に伝達される過程でフリーラジカルが発生し、細胞内のタンパク質発現に変動を及ぼすことは、興味深いことである。半導体レーザーは、水に吸収されない組織透過型レーザーであるため、低出力で照射を行うことで、露髄面はもとより、希薄化した象牙質を通過し、歯髄における未分化な細胞を硬組織形成能を有する細胞に分化させることで硬組織形成が促進され、歯髄の保存が可能になると考えられる。よって、申請者は、傷害を受けた歯髄組織を保存・再生させるため、半導体レーザーを用いた歯髄保存療法の確立を目指し、申請者がこれまでに明らかにしてきたレーザー照射による・OHの発生が  $O_2\cdot$  や細胞内で NO 合成酵素 (nitric oxide synthase : NOS) の発現を誘導し、細胞間伝達物質として様々な生理活性を示すことが知られている Nitric Oxide (NO) の発生を検索することで、フリーラジカルと石灰化促進機構との密接な関わりが明らかになるものと考えている。よって、本申請では、フリーラジカルによる歯髄硬組織形成機構の関わりを解明するとともに、ラットの露髄面にレーザー照射を行い、硬組織形成の促進を観察する予定である。

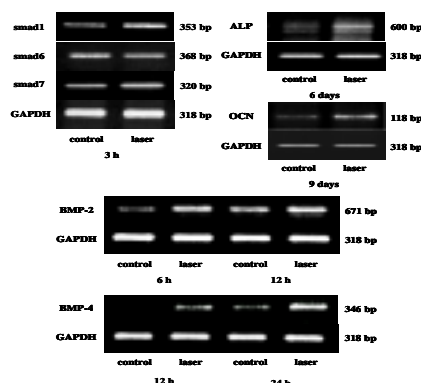
### 3. 研究の方法

平成 19 年度 : 半導体レーザー照射後のヒト歯髄培養細胞における硬組織形成能促進の伝達メカニズムを解明するために、今まで自身の研究から得られた最適な照射条件 (1.0 W-500 秒) を用いて、硬組織形成タンパク質である BMPs や smads の変動を確認する。また、レーザー照射以外の生成系から発生したフリーラジカルにおける歯髄石灰化促進機構を解明する。

平成 20 年度 : 細胞実験でのデータに基づいて、ラットの大白歯を露髄させたところで露髄面に半導体レーザー照射を行い、硬組織形成の観察を病理組織標本を作製し、評価を行う。また、経時的な変化として、歯髄の象牙質様硬組織の形成過程をマイクロ CT を用いて観察を行う。

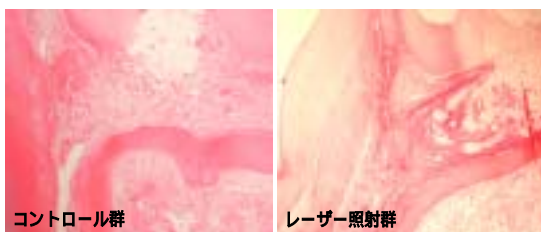
### 4. 研究成果

半導体レーザー照射における歯髄の硬組織形成能促進のメカニズムを解明する目的で、ヒト歯髄培養細胞にレーザー照射を行い、BMP を誘導することが報告されている smads の mRNA が発現し、BMP-2,4 のタンパク質発現が上昇することを明らかにした (図 . 1)。長期培養を行うことで、リン酸カルシウムの形成に深く関与しているオステオポンチンおよびオステオカルシンの mRNA 量およびタンパク質発現量が非照射のコントロール群と比較し、有意に上昇することを明らかにした (図 . 1)。また、von Kossa 染色およびアリザリンレット S 染色を行い、石灰化結節 (リンとカルシウム) の形成が有意に上昇することを報告した。



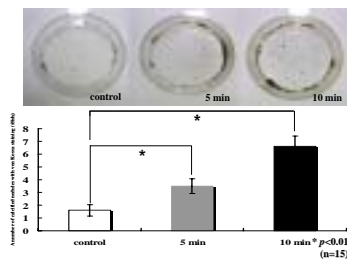
(図 . 1)

また、生体内の歯髄組織に及ぼす半導体レーザーの影響についてラットの歯髄を人工的に露髄させ半導体レーザー照射を行い、象牙質様硬組織形成の促進過程を、ヘマトキシリンエオジン染色にて経時的に観察を行い、動物撮影用マイクロ CT を用いて、同一固体における象牙質様硬組織形成過程を観察した。その結果、レーザー照射を行っていないコントロール群と比較し、照射 1 週間後の病理組織像にて炎症性細胞数の減少が認められ、2 週間には、象牙質様硬組織の形成が開始し、4 週目にはその面積の増大が認められた(図 . 2)。また、CT 所見においても経時的に歯髄腔内に象牙質様硬組織による X 線不透過像の亢進が認められた。



(レーザー照射から 4 週後。図 . 2)

また、レーザー照射以外の発生系から生成された低濃度の活性酸素種を 5 分または 10 分作用させることで歯髄硬組織形成能の促進を確認したところ、オステオポンチンおよびオステオカルシンの mRNA 量およびタンパク質産生量の増加が認められ、von Kossa 染色およびアリザリンレッド S 染色において陽性反応が認められた。



(図 . 3)

以上の結果から、レーザー照射後に発生するフリーラジカルが dentinogenesis を反映している硬組織形成タンパク質の発現を増大させることで歯髄の硬組織形成能が促進されることが示唆できた。

## 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 8 件)

S. Matsui, C. Takahashi, Y. Tsujimoto, et. al.

Stimulatory Effects of Low-concentration Reactive Oxygen Species on Calcification Ability of Human Dental Pulp Cells. *J Endod* 35, 67 - 72, 2009. 査読有

福田麻耶, 山崎文恵, 松井智, 他 10 名  
下顎前歯における楔状欠損と切端象牙質露出の関係. *日大口腔科学誌* 34, 69 - 72, 2008. 査読有

渡辺菜津子, 松井美佳枝, 松井智, 他 10 名

ヒト抜去下顎切歯 X 線写真における根尖孔の開口方向. *日大口腔科学誌* 34, 63 - 68, 2008. 査読有

S. Matsui, M. Kozuka, J. Takayama, et. al.

Stimulatory Effects of CO<sub>2</sub> laser, Er:YAG laser and Ga-Al-As Laser on Dentinal Hypersensitivity. *J Clin Biochem Nutr*, 42, 138 - 143, 2008. 査読有

S. Matsui, H. Takeuchi, Y. Tsujimoto, et. al.

Effects of Smads and BMPs Induced by Ga-Al-As Laser Irradiation on Calcification Ability of Human Dental Pulp Cells. *J Oral Sci* 50, 75 - 81, 2008. 査読有

武内ひとみ, 松井智, 辻本恭久, 他 1 名  
水酸化カルシウムが次亜塩素酸ナトリウムの有機質溶解効果におよぼす影響. *日歯保存誌* 51, 163 - 168, 2008. 査読有

H. Miura, T. Katoh, S. Matsui, et. al.

Analysis of Tooth Access Opening by Students Who Have Completed a Course in Endodontic Practice Part 2. Upper Premolars. *Int J Oral Med Sci* 6, 77 - 80, 2007. 査読有

荒井清司, 松井智, 松根健介, 他 6 名  
炭酸カルシウムがヒト歯髄培養細胞の  
アルカリフォスファターゼ活性におよ  
ぼす影響. 小児歯誌 45, 480 - 484,  
2007. 査読有

[学会発表](計 18 件)

松井智, 木村 大, 松島潔, 他 2 名  
低濃度の hydrogen peroxide がヒト歯髄  
培養細胞の石灰化物形成能促進におよ  
ぼす影響.  
第 28 回日本歯内療法学会学術大会  
2007 年 5 月 26 日・広島

S. Matsui, M. Kimura, Y. Tsujimoto,  
et. al.  
Effects of AOB on Antibiofactor in  
Human Gingival Fibroblast. Study of  
AOB 7th, 2007 年 6 月 1 日・台湾

松井智, 辻本恭久, 松島潔, 他 4 名  
半導体レーザー照射がヒト歯髄培養細胞  
の石灰化物形成におよぼすオステオ  
カルシンおよびオステオポンチンの発  
現.  
第 126 回日本歯科保存学会春季学術大会  
2007 年 6 月 13 日・埼玉

武内ひとみ, 松井智, 松島潔, 他 3 名  
半導体レーザー照射時の熱上昇がヒト  
歯髄培養細胞の ALP 活性に及ぼす影響.  
第 7 回日大口腔科学会学術大会  
2007 年 9 月 4 日・千葉

松井智, 荒井清司, 松島潔, 他 4 名  
半導体レーザー照射がラット歯髄の硬  
組織形成能促進におよぼす影響.  
第 127 回日本歯科保存学会秋季学術大会  
2007 年 11 月 8 日・岡山

松井智, 荒井清司, 辻本恭久, 他 4 名  
半導体レーザー照射がラット歯髄の硬  
組織形成能促進におよぼす影響.  
第 6 回比較歯科研究会  
2008 年 3 月 25 日・千葉

松井智, 神尾直人, 三浦浩, 他 3 名  
MTA がヒト歯髄培養細胞の石灰化物形成  
能促進におよぼす影響.  
第 29 回日本歯内療法学会学術大会  
2008 年 5 月 24 日・千葉

松井智, 大林 英美, 松島潔, 他 5 名  
LED 照射がヒト歯髄培養細胞の石灰化物  
形成能促進におよぼす影響.  
第 129 回日本歯科保存学会春季学術大会  
2008 年 6 月 5 日・新潟

松井智, 高橋知多香, 木村大, 他 3 名  
AOB が骨芽細胞様細胞における酸化スト  
レスの抑制効果.  
第 8 回 AOB 研究会  
2008 年 6 月 8 日・東京

松井智, 高橋知多香, 小澤俊彦, 他 2 名  
二酸化チタン含有低濃度過酸化水素に  
405 nm LED を用いた新規ブリーチング法  
の検討.  
第 61 回酸化ストレス学会学術大会  
2008 年 6 月 13 日・京都

Y. Tsujimoto, T. Katoh, S. Matsui, et.  
al.  
Development of Substitute Tooth for  
Endodontic Exercise - Upper Premolar  
and Molar. IFEA, Vancouver, Canada,  
Aug 22.2007

S. Matsui, K. Arai, K. Matoba, et. al.  
Effects of LED-Irradiation on  
Calcified Nodules Formed in HDP Cells.  
IADR, Tront, Canada. July 2.2008.

Y. Tsujimoto, Matsui and K. Matsushima.  
Generation of Hydroxyl Radical from  
Hydrogen Peroxide by LED Irradiation.  
IADR, Tront, Canada. July 2.2008.

K. Matsushima, Matsui and Y. Tsujimoto.  
Effects of Smads by Laser Irradiation  
on Calcification Ability of HDP Cells.  
IADR, Tront, Canada. July 2.2008.

K. Arai, S. Matsui, K. Matsune, et. al.  
Effect of CaCO<sub>3</sub> on Calcification  
ability of rat dental pulp. IADR,  
Tront, Canada. July 2.2008.

松井智, 伊藤 耕, 辻本恭久, 他 2 名  
オトガイ孔に近接した根尖性歯周炎か  
ら誘発された下顎知覚鈍麻の一例.  
第 8 回日大口腔科学会学術大会  
2008 年 9 月 6 日・千葉

松井智, 高橋知多香, 辻本恭久, 他 1 名  
ヒト歯髄培養細胞における酸化スト  
レスからのアポトーシス誘導.  
第 130 回日本歯科保存学会秋季学術大会  
2008 年 11 月 6 日・富山

松井智, 高橋知多香, 和田陽子, 他 4 名  
ヒト歯根膜細胞の分化誘導に対する酸  
化ストレスの役割.  
第 23 回酸化ストレス学会関東部会  
2008 年 12 月 1 日・神奈川

〔図書〕(計 1 件)

松井智, 木村 大, 辻本恭久, 小澤俊彦. AOB の hydroxyl radical 消去能について. 2006 年度第 6 回 AOB 研究会プロシ  
ーディング. 2008.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松井 智 (MATSUI SATOSHI)  
日本大学・松戸歯学部・助手 (専任扱)  
研究者番号 : 1 0 4 5 3 9 0 3