

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010 ~ 2011

課題番号：22791848

研究課題名(和文) 歯科用可視光線照射器の歯髄に対する影響の是非をめぐるエビデンスの探究

研究課題名(英文) Search of evidence on the effect with dental resin curing light irradiation against dental pulp

研究代表者 吉野文彦

(YOSHINO FUMIHIKO)

神奈川歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：20308307

研究成果の概要(和文):

歯科用レジン青色光は歯のレジン充填や漂白処置による歯の処置に用いられるようになってきている。しかし、歯髄や口腔粘膜に対する効果についてはこれまでほとんど考慮されてきていない。したがって、我々は、歯科用レジン重合用青色光が歯髄、とくに血管に対し影響を与えるかどうか検討を行った。我々は、青色光照射が、摘出ラット大動脈に脂質過酸化のレベルを増加させることを見出した。さらに、それは時間依存的に細胞活性を減少させ、ヒト血管平滑筋細胞のアポトーシスを誘導した。これらは、青色光照射により活性酸素種である、過酸化水素やヒドロキシルラジカルが細胞内に発生し、酸化ストレスを伴う脂質過酸化やアポトーシスなど細胞傷害性を増大させることを示唆した。加えて、代表的な抗酸化剤である *N*-acetyl-L-cysteine がこれら細胞傷害性から細胞を防御した。

研究成果の概要(英文):

Dental resin curing light has been used to restore of tooth with resin-based composite fillings and to treat of tooth bleaching. However, it has not been less considered the effect on the oral tissues such as dental pulp or oral mucosa. The aim of this study was to investigate whether dental resin curing light irradiation is affected on the dental pulp. We found that irradiation of resin curing blue light was increased the level of lipid peroxidation on isolated rat aorta blood vessels to use the measurement of malondialdehyde. Furthermore, it was decreased the cell proliferation activity in time-dependent manner and was induced the apoptosis of human aorta vascular smooth muscle cells (VSMC). Therefore, these results indicated that reactive oxygen species such as hydrogen peroxide and hydroxyl radical were generated in VSMC by blue light irradiation, and they were induced the cytotoxicity associated with oxidative stress which was increased the lipid peroxidation and apoptosis. In addition, *N*-acetyl-L-cysteine which is typical intracellular antioxidants prevented VSMC from cytotoxicity associated with oxidative stress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：歯科保存学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：光照射器・活性酸素・青色光・酸化ストレス・アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

多くの研究は紫外線照射の役割について、それ自身の高いエネルギーや光反応性、生物学的色素団の幅、特異的細胞反応性、皮膚メラノーマや白内障の様な病因との関連例に集約している。可視光の光受容細胞に対する障害性については1966年にNoellらによって初めて報告されている。しかしながら、可視光は細胞障害や、細胞死を引く起こすことが *in vitro* や *in vivo* の研究で証明されているにもかかわらず、可視光の役割はこれまであまり広く調査されていない。また、400 nm 以下の紫外線の有害な生物学的効果はよく知られているにもかかわらず、青色光の使用は主に網膜以外の組織のいくつかの効果を持つものとして歯科で受け入れられてきた。

大きな修復または深い場合、複数回の光照射が修復処置のために推奨されている。加えて、可視スペクトルの青色光はそれが比較的高いエネルギーを持ち、組織を貫通することができる可能性があるため特に重要であり、そして動物モデルにおける悪性黒色腫の発生に関連付けられている。したがって、光照射による歯科材料への効果だけでなくエナメル質や象牙質、また歯髄に対する影響の検討が重要になってきている。

2. 研究の目的

これまで、歯の温度は、照射時間が増えることで増加することが報告されている。さらに、青色光を含む可視光は DNA に対する活性酸素種 (ROS) に作用により細胞傷害性を与え、これは加齢に伴い病態や腫瘍形成に寄与することが報告されている。眼科領域ではまた、青色光による生成した ROS による酸化ストレスは、加齢黄斑変性症、未熟児網膜症、網膜光の損傷など、多くの眼疾患に関与している。そのため、歯科においてもレジン光照射を行った場合は術者の眼はスクリーンで保護している。歯髄は、神経線維に富み、また血管も豊富に存在する組織である。とくに周囲を硬組織で囲まれた閉鎖系の歯髄での血管拡張は歯髄内圧の変化をもたらす、感覚神経を刺激する結果、激しい痛みを引き起こ

すことが報告されている。さらに、さまざまな波長の光は循環調節において血管平滑筋に対し拡張作用や収縮作用をもたらすことも報告されている。いくつかの研究は、可視光の哺乳類に対する照射は最初に ROS を介して引き起こされることを示している。スーパーオキシドやヒドロキシルラジカル、一重項酸素は細胞内光励起剤を励起する際に生じることが可能である。多くの病的過程における ROS の最初の標的は、血管調節システムである。ROS は様々なモデルにおいて血管反応に対し重要な役割を演じることが知られている。加えて、哺乳類の細胞に対する青色光照射は過酸化水素産生を誘導し DNA 障害を与えることを示している。しかしながら、青色光、とくにハロゲンを用いた歯科用レジン照射器による血管平滑筋に対する ROS に関連した影響はについて報告したものはないため、今回この影響について検討を行った。

3. 研究の方法

3-1. 血管標本摘出

7 週令の雄ウイスターラット (日本 SLC) は 12 時間サイクルで光がコントロールされている室温で飼育され、餌と水は自由に摂取させた。動脈は、ペントバルビタール麻酔下にて摘出し、全てのラットは動脈摘出後頸椎脱臼させた。外科処置により摘出した動脈は、付着結合組織を除去し、ヘリカルストリップスを作成した。ストリップスは実験の間クレプクリンガー溶液に湿潤で保存した。なお、この研究の手続きは USNIH のガイドに基づき行われ、プロトコールはアニマルケアにより承認されている。

3-2. 血管に対する脂質化酸化の検討

作成した血管標本をシャーレ上に固定し、5 mm の距離にてレジン青色光を 5 分間照射した。照射後、TBARS assay kit (Caymen) にてマロンジアルデヒド (MDA) を 540 nm の波長にて検出した。

3-3. 細胞培養および、光照射による細胞活性、アポトーシスの検討

細胞はヒト血管平滑筋細胞 (ACBR1716) を使用し、通法に則り培養を行った。細胞活性は、 1.6×10^4 で 96 well plate に播種 24 時間培養後、青色光照射を行い、非照射群、照射群による光照射の影響を Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell proliferation Assay kit (Promega) を用いて測定した。また、細胞のアポトーシスを観察する目的で、カスパーゼ 3/7 活性を指標とし、Apo-ONE homogenous Caspase-3/7 Assay (Promega) を用いて測定した。

3-4. 3-3 で確認された細胞毒性に対する防御法の検討

上記と同条件下にて、活性酸素種消去剤である *N*-acetyl-L-cysteine (NAC) を全処置することによるカスパーゼ活性への影響を検討した。

4. 研究成果

血管平滑筋に対する脂質酸化の検討

ラット摘出大動脈血管平滑筋に対するレジン青色光の照射は、非照射群と比較し有意に血管平滑筋細胞膜の脂質酸化を増加させた ($p < 0.05$)。これらは、レジン光照射は血管平滑筋に酸化ストレスを生じさせ、このレベルは細胞内抗酸化物の濃度以上に ROS を生成したことを示唆している。

レジン光照射器による細胞毒性の検討

ACBR1716 に対する光照射は、照射時間依存的に細胞活性を低下させた。また、照射 3 分以上において、その低下は優位なものとなった ($p < 0.05$)。しかしながら、光照射における、培養液の温度変化は認められなかった。さらに、この光照射時間に対するカスパーゼ 3/7 活性を評価した結果、細胞活性低下に依存し、カスパーゼ 3/7 活性の増大が確認された ($p < 0.05$)。カスパーゼ 3/7 活性はアポトーシスの重要なイニシエーターであり、細胞のアポトーシスの信頼されているインジケータとして広く認められている。さらに、青色光照射によりアポトーシスを示すカスパーゼ 3/7 活性も増加した。ヒドロキシルラジカルは反応性の高い酸化物である。Godley らは青色光はミトコンドリアの DNA に対して

もダメージを与え、細胞加齢を起こすかもしれないことを報告している。したがって、歯科治療における、3 分を超えるような青色光照射は、細胞内に過酸化水素を発生させ、さらに fenton 反応を介して生成されたヒドロキシルラジカルが細胞膜脂質過酸化のみならず、アポトーシスを誘導し、歯髄の微小循環に対して動脈硬化や細胞加齢などの有害作用を与えるかもしれない。

細胞傷害性に対する細胞保護の検討

これら光照射による細胞毒性は、細胞内活性酸素種の消去剤である NAC の前処置により有意に抑制された ($p < 0.05$)。NAC は酸化物を直接消去することを示し、ミトコンドリア電子伝達系と酸素的燐酸化と共役する間に産生する酸化ストレスに関連した ROS から細胞内器官を保護するために最高に重要な細胞内グルタチオンを上昇させるものがある。さらに、多くの疾患の治療に数十年間用いられている。この現象は、NAC が過酸化水素およびヒドロキシルラジカルのような ROS を *in vivo* において消去するためもっとも一般的な細胞内抗酸化物質であることを示している。今回の研究においてみられた NAC による防御作用は、このような抗酸化剤の処置が血管平滑筋の青色光により誘導される活性酸素が関与する細胞毒性を減弱することができることを示唆している。

したがって、これらの我々の結果は、長時間の光照射を必要とする歯の漂白処置のような歯科治療において、歯髄内で ROS が照査時間依存的に産生し、この現象の蓄積が歯髄の加齢を促進する可能性を示唆した。また、ROS 産生を伴う酸化ストレスから予防するため抗酸化剤使用の必要性を示唆された。

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)

Yoshino F., Yoshida A., Wada-Takahashi S., Sugiyama S., Tokutomi F., Maehata Y., Miyamoto C., Komatsu T., Takahashi SS., Kobayashi K., Lee M-C.: Assessments of

salivary antioxidant activity using electron spin resonance spectroscopy. Archives of Oral Biology, 査読有, *in press*.

Yoshino F., Yoshida A., Umigai N., Kubo K., Lee M-C.: Crocetin reduces the oxidative stress induced reactive oxygen species in the SHRSPs brain. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, 49 (3): 182-187, 2011.

Yoshino F., Yoshida A., Sugiyama S., Tokutomi F., Miyamoto C., Maehata Y., Kobayashi K., Wada-Takahashi S., Maetani T., Okada E., Okada Y., Komatsu T., Takahashi S-S., Wan J., Lee M-C.: Assessment of Anti-Aging Effects of Fish Products Peptide in Middle-Aged Subjects. Anti-Aging Medicine, 査読有, 8(4): 48-52, 2011.

Yoshida A., **Yoshino F.**, Tsubata M., Ikeguchi M., Nakamura T., Lee M-C.: Direct assessment by electron spin resonance spectroscopy of the antioxidant effects of French maritime pine bark extract in the maxillofacial region of hairless mice. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, 49 (2): 79-86, 2011.

〔学会発表〕(計2件)

吉田彩佳, **吉野文彦**, 前畑洋次郎, 高橋俊介, 高橋聡子, 小林 杏, 宮本千央, 徳富文彬, 李 昌一: 歯科用レジン照射器の青色光が血管平滑筋へ及ぼす影響の検討. 神奈川歯科大学学会 第137回例会, 横須賀. 2012年12日

吉野文彦, 吉田彩佳, 西村知子, 石井信之, 李 昌一: 歯科用可視光線照射器による光照射の血管平滑筋に対する影響, 第135回日本歯科保存学会秋季大会, 2011年10月21日, 大阪

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kdcnet.ac.jp/college/medicine/yakuri/yakuri.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉野文彦 (YOSHINO FUMIHIKO)
神奈川歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 16791169