

## 論文の内容の要旨

氏名：深井 譲滋

博士の専攻分野の名称：博士(歯学)

論文題名：ヒト歯髄細胞における異なる波長の半導体レーザーの硬組織形成におよぼす影響

歯髄は自らが作り出した硬組織、すなわち象牙質で覆われることが望ましい。現在では保存治療における歯髄保存のために、露髄した面に水酸化カルシウム製剤やMTAを用いるカルシウムを主体とした直接覆髄法が臨床応用されている。しかし、水酸化カルシウム製剤を用いた直接覆髄法では、その強い塩基性のため歯髄組織に炎症をきたし、壊死層を形成することや不均一な修復象牙質を形成するために成功率は高くない。また、MTAセメントは、成功率は高いがびまん性の石灰化も少なからず存在するとされている。また歯髄において炎症と硬組織形成は密接に関わると考えられており、臨床において覆髄処置が必要となる歯髄、特に露髄面にはすでに炎症が起きていることを考慮しなければならない。このことから臨床において確実性のある覆髄法を確立するためには歯髄の炎症をコントロールすることが必須であると考えられる。

炎症のケミカルメディエーターである prostaglandin E2 (PGE2) は修復象牙質形成に関わると考えられており、ヒト歯髄培養細胞に対し低濃度で刺激することによって硬組織形成を促進し、高濃度で刺激することによって硬組織形成が抑制されるという二面性の働きを持つとされている。さらに Bone morphogenetic protein (BMP)の作用や発現もまた、炎症性サイトカインやケミカルメディエーターにより調整されている。BMPは生理活性物質の中で最も強い骨形成を示す因子の一つと報告され、骨芽細胞の分化、骨の発生、成長、再生に深く関与しており、特に BMP-2 は強力な骨形成促進作用を有するといわれ、歯髄における未分化細胞の象牙芽細胞への分化に関与し硬組織形成を促進するものと考えられている。BMPのシグナル伝達には主に smad が関与しているとされる。BMPはレセプターに結合した際、特異型 Smad である smad 1, 5, 8 が BMPレセプターによりリン酸化され、共有型 Smad である Smad 4 と複合体を形成し、核内へと移行することによりシグナル伝達を行う。抑制型 Smad である Smad 7 は特異型 smad のレセプターによるリン酸化に競合するか、特異型 smad に結合することによって特異型 smad と共有型 smad の複合体形成を阻害することによってその作用を抑制する。過去の報告からヒト歯髄培養細胞 (hDPC)における高濃度 PGE2 による硬組織形成の抑制には smad6 が関与していると考えられる。

一方、近年では出力の低いレーザー光線を生体組織に照射することによって、創傷治癒促進、血流改善、疼痛緩和、神経賦活等の効果を得ることを目的とした低反応レベルレーザー治療 (Low level laser treatment ; LLLT)が注目されている。レーザーは発生物質によって、固体レーザー、気体レーザー、液体レーザーや半導体レーザーなどに分類される。現在、直接覆髄法への応用にレーザーを用いる研究が数多くなされている。半導体レーザーは波長特異性、すなわち水分および血中ヘモグロビンの吸収係数が低いことを利用して、生体内深部組織までエネルギーが到達する組織透過性レーザーとして知られている。歯科においても半導体レーザーはその波長特異性を応用し、LLLTによる歯周組織の消炎作用、骨や歯髄における硬組織形成促進作用の臨床応用が期待されている。過去の報告から、歯内療法分野において 660 nm あるいは 810 nm の半導体レーザーを hDPC に照射することで、硬組織形成能が促進されることがわかる。しかしながら、単波長のレーザーや異なる波長のレーザーによる歯髄の硬組織形成の研究はなされているが、出力条件や照射時間に差があり硬組織形成能の違いが出力によるものなのか、照射時間によるものなのか、各波長で形成にかかわる因子が違うのか判別する研究は行われていない。それゆえに、波長以外の条件を限りなく合わせることで、半導体レーザーの硬組織形成能の機序を解明する上で必要となると考えられる。

以上より本研究では、半導体レーザーの硬組織形成能の機序を解明することを目的として、同出力下における「波長」の相違に焦点を合わせ、hDPC に対する半導体レーザーの硬組織形成能を評価した。さらに、高濃度 PGE2 を刺激させた hDPC に対して、半導体レーザーが与える硬組織形成能の影響について解析し、以下の結果を得た。

- 1) hDPC に対し出力を 300 mW に統一した波長 660 nm および 810 nm の半導体レーザーを照射することによって、無照射の hDPC との硬組織形成能の違いを検討したところ、無照射群に比べ 660 nm 照射群と 810 nm 照射群どちらの群でも ALP 活性の上昇、Osteocalcin の mRNA 発現量が優位な増加、von Kossa 染色の染色性の増大が認められた。しかし、BMP-2 の発現という点で、660 nm 照射群では無照射群に比べ有意に増加しているが 810 nm 照射群では無照射群に対して有意な差が認められなかった。

- 2) hDPCに10 $\mu$ M PGE2を添加したうえで300 mWに統一した波長660 nmおよび810 nmの半導体レーザーを照射することによって、hDPCの硬組織形成能の違いを検討したところ、10 $\mu$ M PGE2を添加することによって硬組織形成が抑制されるが、波長660 nmもしくは波長810 nmの半導体レーザーを照射することによって硬組織形成が抑制されなくなった。10 $\mu$ M PGE2添加によりBMP-2, smad6の発現増加が認められ、660 nmの半導体レーザーを照射することにより smad6の発現減少とBMP-2の発現増加を認めた。しかし810 nmの半導体レーザー照射では smad6の減少は認められずBMP-2の発現増加も認められなかった。

以上の結果から、出力を一定にした2つの波長の半導体レーザーを用いたとき両方の波長で硬組織形成が行われた。2つの波長による最終的な硬組織形成量の比較に明確な差は得られなかったが、2つの波長の間ではBMP-2の発現量には差が生じた。また660 nmの半導体レーザーは smad6を抑制することによって硬組織形成能を亢進させることが示唆された。また、同出力での810 nmの半導体レーザーではBMP-2と smad6を介さない別の硬組織形成機構をとるものと推測された。