原 著

マウス歯胚石灰化に対する低出力レーザー局所照射の影響

●第2報 He-Ne レーザーの効果について●

坪 井 孝 博* 奥 村 佳 世 子** 荒 川 精 一*
 戸 莉 彰 史* 松 本 昌 世* 豊 田 理 恵**
 磯 部 誠** 吉 田 憲 司** 深 谷 昌 彦**

*愛知学院大学歯学部薬理学講座

(主任：松本昌世教授)

**愛知学院大学歯学部口腔外科学第一講座

(主任：深谷昌彦教授)

(受理：平成8年2月13日)

The Influence of Low Power Laser Local Irradiation
 on the Mineralization of Tooth Germ in Mice

●Second Report: Effects of He-Ne Laser Irradiation●

Takahiro TSUBOI*, Kayoko OKUMURA**, Seiichi ARAKAWA*,
 Akifumi TOGARI*, Shosei MATSUMOTO*, Rie TOYODA**,
 Makoto ISOBE**, Kenji YOSHIDA** and Masahiko FUKAYA**

*Department of Pharmacology, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University

(Chief: Prof. Shosei MATSUMOTO)

**The First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of
Dentistry, Aichi-Gakuin University

(Chief: Prof. Masahiko FUKAYA)

(Accepted for Publication: February 13, 1996)

Abstract: Previously, we demonstrated the suppressive effect of low power laser (He-Ne laser) irradiation on mineralization in molar tooth germ using the organ culture system. In the present study, we examined the in vivo effect of the laser on the development of mandibular first and second molars in neonatal mouse. The laser was irradiated at developmentally different stages and the chemical and histological changes in these molars were examined. At an early developmental stage of tooth germ showing cell proliferation and differentiation, the laser irradiation caused decreases of alkaline phosphatase activity, of calcium content and the formation of dentin and enamel in tooth germ. However, at a late developmental stage of tooth germ showing additional mineralization, these decreases were

* 〒464 名古屋市千種区楠元町 1-100 愛知学院大学歯学部薬理学講座 TEL 052-751-2561 (内線339)
 FAX 052-752-5988

* 1-100, Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464, Japan. TEL 052-751-2561 (Ext. 339)
 FAX 052-752-5988

not observed at the time of the laser irradiation. From the in vivo experiment, we confirmed that He-Ne laser irradiation suppressed tooth formation and mineralization at an early developmental stage.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 7: 30~36, 1996 Reprint requests to Dr. Tsuboi)

Key words=low power He-Ne laser: tooth germ in mice: irradiation time

キーワード=低出力 He-Ne レーザー: マウス歯胚: 照射時期

緒 言

低出力レーザーは、象牙質知覚過敏症、顎関節症に対する鎮痛作用や知覚麻痺に対する神経賦活作用など、歯科領域における臨床的有用性が示されている。また、骨折部や骨移植部へのルビー、He-Ne、アルゴンダイ、半導体等の低出力レーザー照射による治癒の促進が認められており、基礎的研究においても硬組織の形成促進効果が確認されている¹⁻¹⁴⁾。しかし、これらレーザー照射の効果は、同一生体組織に対しても照射時期により左右されることがあり、本村ら^{1,2)}はアルゴンダイレーザーの骨折治癒効果が特にその初期段階に発揮されていることを報告している。また、我々のマウス培養歯胚を用いた歯牙発育におよぼす低出力レーザーの検討においても、半導体レーザーの促進効果に対し^{13,14)}、He-Ne レーザーの効果は歯胚発育段階に依存して抑制的に働く可能性を示している^{15,16)}。これらの知見は、低出力レーザーの組織に対する効果と組織の発育や治癒過程との関連を検討する必要性を示している。本実験では、第一報と同様に出生直後のマウスを使用した in vivo 法を用い、培養実験において認められた He-Ne レーザー照射による歯胚組織の著しい石灰化抑制^{15,16)}が、in vivo での歯胚組織に対する局所照射においても認められるか否か、さらに in vivo での歯胚組織の発育過程において低出力 He-Ne レーザーに高い感受性を示す時期が存在するか否かを検討した。

実験方法

1. 使用動物

本実験では、妊娠12日目の ddY 系マウスを日本エスエルシー株式会社より購入し、室温23℃、12時間の明暗サイクル環境下で7日間飼育し、妊娠19日目のマウスより出生した直後の新生マウスを使用した。

2. レーザー装置および照射条件

レーザー装置は波長632nm のHe-Ne レーザー、BELBEAM[®] (タカラベルモント社)を用い、ハンドピース先端をマウス下顎臼歯歯胚付近に固定しファイバー先端出力6mW、エネルギー密度11.7J/mm²で局所照

射を行った。照射時期は出生直後から生後3日までのマウス歯胚発育状態を逐日的に調査した先の実験結果より設定した。第一臼歯歯胚と第二臼歯歯胚の発育状態には時間的ズレが認められるため、第一臼歯歯胚が石灰化初期段階で第二臼歯歯胚が増殖・分化段階である期間にレーザーを照射した群をA照射群、第一臼歯歯胚が添加的な石灰化段階で第二臼歯歯胚が石灰化初期段階である期間に照射した群をB照射群とし、マウス臼歯歯胚相当部に1日あたり5分間で2日間照射を行い、その約24時間後に歯胚を摘出した(図1)。

すなわち、A照射群は出生直後(胎生19日目)から2日間の照射後、さらに24時間経過した生後2日で歯胚を摘出し、一方B照射群では生後1日から2日間の照射後、さらに24時間経過した生後3日で歯胚を摘出した。

レーザー照射時には第一報と同様に新生マウスを-20℃で急冷することで無動状態にし、寒冷暴露下での頭部固定を行った。

3. アルカリホスファターゼ活性およびカルシウム量の測定

歯胚発育の指標として、歯胚中のアルカリホスファターゼ活性およびカルシウム量を第一報に準じて定量した。アルカリホスファターゼ活性の測定にはp-ニトロフェニルリン酸法を用い、カルシウムの定量はZ-8200シリーズ偏光ゼーマン原子吸光分光光度計(日立)を用いて測定した。

4. 組織標本の作製

第一報と同様にホルマリン固定後、通法に従って、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、光学顕微鏡下で組織学的観察を行った。

5. 統計的処理

得られた実験データは、すべて平均値と標準誤差で示し統計的な有意差の検定にはStudentのt-testを用いた。p<0.05の場合に有意差ありと判定した。

結 果

1. 低出力 He-Ne レーザーの第一および第二臼歯歯胚のアルカリホスファターゼ活性およびカルシウム量に対する効果

図 1 実験スケジュールおよび照射時期

図 2 低出力 He-Ne レーザー照射後の第一および第二臼歯歯胚中のアルカリホスファターゼ活性 * $p<0.05$

図 3 低出力 He-Ne レーザー照射後の第一および第二臼歯歯胚中のカルシウム量 * $p<0.05$ ** $p<0.01$

図 4 低出力 He-Ne レーザーの A 照射群および B 照射群における第一臼歯歯胚の組織像 (H-E 染色, $\times 400$)
a: A 対照群 (生後 2 日) b: A 照射群 c: B 対照群 (生後 3 日) d: B 照射群

図 5 低出力 He-Ne レーザーの A 照射群および B 照射群における第二臼歯歯胚の組織像 (H-E 染色, $\times 400$)
a : A 対照群 (生後 2 日) b : A 照射群 c : B 対照群 (生後 3 日) d : B 照射群

A 照射群の実験では生後 2 日のマウス歯胚が生化学的測定に用いられたのに対し、B 照射群においては生後 3 日のマウス歯胚を用いているため、B 照射群は A 照射群に比し、高いアルカリホスファターゼ活性およびカルシウム量値を示していた (図 2, 3)。

低出力 He-Ne レーザー照射後の第一臼歯歯胚において、アルカリホスファターゼ活性は、A 照射群、B 照射群ともに対照群との間に有意な差を示さなかったが (図 2)、カルシウム量は A、B 照射群ともに有意な低下を示した (図 3)。He-Ne レーザー照射後の第二臼歯歯胚において、アルカリホスファターゼ活性は増殖・分化期に照射を試みた A 照射群で有意に低下していたが、細胞分化の後期あるいは石灰化の開始期に照射を試みた B 照射群では対照群との間に有意な差を示さなかった。一方、カルシウム量では A 照射群、B 照射群ともに有意な低下が認められた。

2. 低出力 He-Ne レーザーの A 照射および B 照射後の第一および第二臼歯歯胚の組織学的所見

低出力 He-Ne レーザー照射後の第一臼歯歯胚において組織学的観察によると対照群、A 照射群、B 照射群のいずれにおいてもエナメル質、象牙質がかなり形成されており、ほとんど変化が認められなかった (図 4)。第二臼歯歯胚の組織学的観察によると、A 照射群に対応する対照群では、間葉系細胞および内エナメル上皮細胞の分化が認められ石灰化が開始されていたにもかかわらず、A 照射群では明らかに分化が遅延しておりエナメル質、象牙質の形成が認められなかった (図 5)。一方、B 照射群ではすでに象牙質、エナメル質が形成されており、B 対照群と比較してほとんど組織学的差異が認められなかった。

考 察

新生マウスにおける第一および第二臼歯歯胚は細胞の増殖・分化、次いで生じる象牙質ならびにエナメル質基質の形成・石灰化といった歯胚の発育過程に 2 日程の時間的ズレが認められたが、本実験ではこのズレを利用してレーザーに高い感受性を有する歯胚組織の発育時期を短期間に評価した。これは、同一個体内で発育段階の異なる二つの歯胚組織に対するレーザー照射の効果を同時に比較検討することにより、低出力レーザーの作用と歯胚組織における発育段階との関連を探る有効かつ簡便な方法であった。

歯の発生過程において、歯牙の構造決定には相互の基質や基底膜を介した上皮と間葉系の相互作用が重要である。この相互誘導作用は胎生 17 日目のマウス歯胚を用いた培養系において、培養開始後 2 日の間に認められている¹⁷⁻²¹⁾。先に我々は歯胚発育に対する He-Ne レーザー

の効果を調査するため胎生 17 日目のマウス歯胚を 7 日間培養し、1 日あたり 5 分間の条件で 3 つの群に分けて照射した¹⁶⁾。胎生 17 日目の歯胚では間葉系細胞、内エナメル上皮細胞が未分化であるが、7 日間の培養により象牙質、エナメル質が形成されるため、培養前半の照射群と培養後半の照射群さらに 7 日間連続照射群に分けた。7 日間連続照射群では、歯胚中のアルカリホスファターゼ活性およびカルシウム量の低下を、組織学的にも石灰化の低下を認めた。しかし、間葉系細胞、内エナメル上皮細胞の分化は認められていた。さらに、この石灰化抑制作用は、間葉系細胞の分化が終了した後に He-Ne レーザーを照射した群には認められなかった。この結果は、He-Ne レーザーの作用が歯牙形成に関わる細胞の増殖・分化の段階と密接な関係にあることを示している。

今回の *in vivo* 実験においても、A 照射群の第二臼歯歯胚、すなわち間葉系細胞および内エナメル上皮細胞の増殖・分化期に He-Ne レーザー照射を行った群ではアルカリホスファターゼ活性、カルシウム量および組織学的観察において発育の遅延が認められていた。しかし、B 照射群の第二臼歯歯胚ではアルカリホスファターゼ活性および組織学的観察での変化はほとんど認められず、カルシウム量の低下を示したに過ぎなかった。出生直後の第二臼歯歯胚は間葉系細胞、内エナメル上皮細胞ともに未分化であるが、生後 1 日の第二臼歯歯胚では間葉系細胞の分化が認められており、分化期からマトリックス分泌への移行期と考えられる。以上の結果により He-Ne レーザーが間葉系細胞、内エナメル上皮細胞の分化段階、特に象牙芽細胞への分化に対し抑制的影響をおよぼしている可能性が高い。また、骨および歯牙の石灰化は、それぞれの硬組織形成細胞から有機質性のマトリックスが分泌された後、一定の時間的、空間的な間隔においてマトリックス上にミネラルが沈着することに特徴を有している。すなわち歯牙においては、エナメル芽細胞および象牙芽細胞がそれぞれの基質産物であるエナメル蛋白および象牙質基質を分泌する第一相とマトリックスの質的な変化に伴いミネラルを沈着する第二相とに分けることができる²⁵⁾。

本実験においては第一臼歯歯胚を A 照射群 (石灰化初期)、B 照射群 (添加的石灰化) に分けて照射を試みたが、A および B 照射群に組織学的変化は認められなかった。しかしカルシウム量の低下のみが確認されており、咬頭頂やサービカルループといった歯胚中の各部位により発育段階に差異があることに基づいている可能性がある。また、*in vivo* における低出力レーザーの効果はあらゆる組織において、様々な効果を示しているが、その効果は照射部位における器質的变化ではなく、可逆的な変化をおよぼすといわれている²²⁾。本実験で使用し

たサンプルは照射約24時間後に摘出した歯胚を用いたが、その可逆的変動を調べるため照射後の歯胚の変化を経時的に調査する必要がある。

本実験ではアルカリホスファターゼ活性、カルシウム量および組織学的観察を歯胚組織におけるレーザー効果を判定する指標として用いてきたが、He-Ne レーザー照射により影響を受けることが報告されているコラーゲン分解酵素系やプロスタグランジン E₂ の分泌等^{23,24)}より詳細な生化学的パラメーターおよびアプローチを用いたさらなる検討が望まれている。

結 論

低出力 He-Ne レーザーは先に報告した培養実験のみならず、in vivo 実験においても歯胚組織における発育段階と関連した抑制効果を示した。このレーザー効果は、間葉系細胞、内エナメル上皮細胞の増殖段階、分化初期段階に抑制的影響がおよんだためと考えられた。

文 献

- 1) 本村喜代二：各種レーザーの整形外科領域における応用と今後の展開。医学のあゆみ，124(5)：577-581, 1983.
- 2) 本村喜代二，中島正治，井原章夫，渥美和彦：アルゴンダイレーザーの骨折治癒におよぼす影響。日本レーザー医学学会誌，6(3)：171-174, 1986.
- 3) 各務和宏，吉田憲司，深谷昌彦：Nd:YAG レーザーの口腔領域への応用 (2)―低出力レーザー―。歯界展望，73(5)：1107-1117, 1989.
- 4) 那須優則，松岡嘉生，代居 敬，古本啓一：舌の創傷治癒過程に及ぼす低出力レーザーの影響についての実験的研究。日本レーザー歯学会誌，1：23-24, 1990.
- 5) 富永礼司，黒田敬之：ラット口蓋粘膜切除創に対する He-Ne レーザー照射の効果。日本レーザー歯学会誌，3：138-139, 1992.
- 6) 紺 健一：低出力レーザー照射による骨組織形成促進作用に関する実験的研究―とくに照射期間および照射時間による影響について―。日本レーザー歯学会誌，3：35-44, 1992.
- 7) Pourreay-Schneider, N., Ahmed, A., Soudry, M., Jacquemier, J., Kopp, F., Franquin, J. C. and Martin, P. M.: Helium-Neon laser treatment transforms fibroblasts into myofibroblast. Am. J. Pathol., 137: 171-178, 1990.
- 8) Pourreay-Schneider, N., Soudry, M., Remusat, M., Franquin, J. C. and Martin, P. M.: Modification of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. Quintessence Int., 20: 887-893, 1989.
- 9) 小野寺篤，高原克彦，松本光吉：培養骨細胞に対する He-Ne レーザーの影響について。昭歯誌，10：14-17, 1990.
- 10) 宮島邦彰，吉田光志，神谷一有，堅田尚生，千田 彰，原学郎：He-Ne レーザーの培養細胞に対する照射効果に関する研究 (第1報) 骨芽細胞様細胞に対する効果。日歯保誌，35(3)：911-915, 1992.
- 11) 山田邦雄，松井宣夫，蟹江良一，太田弘敏，大塚隆信，服部正広，脇田 郷，加藤泰治，杉本吉彌：低出力レーザー照射の骨形成促進作用―培養骨芽細胞へのレーザー照射実験を中心に―。第11回日本レーザー医学会大会大会論文集：61-64, 1990.
- 12) Kunio YAMADA: Biological Effects of Low Power Laser Irradiation on Clonal Osteoblastic Cells (MC3T3-E1). J. Jpn. Orthop. Assoc., 65: 787-799, 1991.
- 13) 荒川精一，磯部 誠，戸刈彰史，松本昌世，松下秀典，吉田憲司，深谷昌彦：マウス培養歯胚の石灰化に対する低出力レーザー照射の効果―第1報 半導体レーザー照射時間の検討―。日本レーザー歯学会誌，4：27-31, 1993.
- 14) 磯部 誠，荒川精一，松下秀典，吉田憲司，深谷昌彦，戸刈彰史，松本昌世：マウス培養歯胚の石灰化に対する低出力レーザーの効果―第2報 半導体レーザー照射日数の検討―。日本レーザー歯学会誌，4：39-43, 1993.
- 15) 荒川精一，磯部 誠，戸刈彰史，松本昌世，松下秀典，吉田憲司，深谷昌彦：低出力レーザーのマウス培養歯胚に対する影響―その3. He-Ne レーザー照射による効果―。日本レーザー歯学会誌，5：事後抄録集 115, 1994.
- 16) 坪井孝博，奥村佳世子，荒川精一，磯部 誠，吉田憲司，深谷昌彦，戸刈彰史，松本昌世：マウス培養歯胚の石灰化に対する低出力レーザーの効果―第3報 He-Ne レーザー照射時期の検討―。日本レーザー歯学会誌，6：1-7, 1995.
- 17) 佐藤温重，小沢和子：歯科領域における組織培養の現状と展望。組織培養，4：345-351, 1978.
- 18) 佐藤温重：口腔組織の培養―歯学への応用―。中井準之助ら編。組織培養，東京，1976。朝倉書店：553-559.
- 19) 名和橙黄雄：歯胚細胞の培養。遠藤浩良編。実験医学のための動物培養細胞利用集成，東京，1985，R & D プランニング：380-386.
- 20) 近藤 真：マウス培養歯胚の石灰化に対する Chlorpromazine の効果：Retinoic acid および HEBP との比較。日薬理誌，97：85-95, 1991.
- 21) 荒川精一：カルシトニンのマウス培養歯胚の石灰化に対する促進効果：副甲状腺ホルモンおよび活性形ビタミン D₃ との比較。愛院大歯誌，31(4)：833-848, 1993.
- 22) 近藤昌彦他：“Soft Laser 632” によるレーザー照射がラットの口腔粘膜，皮膚，膝関節，顎関節およびヒトの歯髄に及ぼす影響に関する病理組織学的研究。愛院大歯誌，26：795-804, 1988.
- 23) Katada, H. et al.: A study on the effects of He-Ne laser irradiation on cultures cells Part 2. The effects on gingival fibroblast. Aichi-Gakuin Dent. Sci., 5: 85-90, 1992.
- 24) Miyajima, K. et al.: Effects of He-Ne laser irradiation on gingival fibroblasts. Aichi-Gakuin Dent. Sci., 7: 1-5, 1994.
- 25) Schenk, R.K., Hunziker, E. & Herrmann, W., 1982. In “Biological Mineralization and Demineralization” (G.H. Nancollas, ed.), pp.143-160, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.