

Effects of Laser Irradiation and Mechanical Stress on Odontogenic Cells and Tooth Regeneration

中村, 直寿
Faculty of Dental Science, Kyushu University

<https://doi.org/10.15017/19955>

出版情報 : 九州大学, 2010, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

レーザー照射および機械的刺激の歯胚細胞 と歯の組織形成への影響

Effects of Laser Irradiation and Mechanical
Stress on Odontogenic Cells and Tooth
Regeneration

2011 年

中村 直寿

九州大学大学院歯学研究院

口腔機能修復学講座

クラウンブリッジ補綴学分野

(指導教員：寺田 善博 教授)

本研究の一部は以下の学術雑誌に投稿中である。

Biological Effects of a Carbon Oxide Laser on Odontogenic Cells

Naokazu Nakamura, DDS, Yoshinori Shinohara, DDS, PhD, Hatsumi Nagadome, DDS,

PhD, Takatsuna Nakamura, DDS, PhD and Yoshihiro Terada, DDS, PhD

Journal of Prosthodontic Research (2010)

本書の内容の一部は、下記学会において発表した。

平成 22 年度 第 119 回日本補綴歯科学会 2010 年 6 月 (東京)

「炭酸ガスレーザー照射による培養歯胚細胞の増殖・分化能

および硬組織形成能への影響」

Effect of CO2 Laser Irradiation on Growth, Differentiation and Hard Tissue Formation
of Tooth Bud Cells

中村 直寿, 篠原 義憲, 永留 初實, 寺田 善博

目次

緒言	6
第1章 機械的刺激の歯胚細胞および歯の組織形成への影響	7
1-1 序論	8
1-2 目的	14
1-3 材料と方法	15
1-4 結果	19
1-5 考察	23
1-6 小括	25
第2章 炭酸ガスレーザーの歯の再生への応用	26
2-1 序論	27
2-2 目的	37
2-3 材料と方法	38
2-4 結果	46
2-5 考察	54

2-6 小括	59
総括	60
謝辞	62
参考文献	63

緒言

歯の欠損に対する根本的治療は喪失してしまった歯を再生することである。しかし、歯の器官としての再生を医療に応用するためには、萌出機序の解明、大きさ・形態の制御、再生期間の短縮などの課題が残されており、完全に達成されていない。従って、現時点では欠損補綴治療として天然歯を支台としたブリッジや天然歯に維持を求めるパーシャルデンチャー、さらにはインプラント補綴が行われている。一方、外傷や先天的・後天的な歯の実質欠損は、金属、陶材、レジンといった人工材料でできた修復物により修復・置換されている。しかし、これらの人工材料には、天然歯の組織に比較し、生体親和性・審美性・機能性といった点において様々な課題が残されているのも事実である。

本研究において、再生医療を歯科補綴臨床へ応用する一歩として、細胞組織工学的手法を用いた歯の構成組織、特にエナメル質の再生と歯科補綴装置への応用を目的として研究を行った。

第1章 機械的刺激の歯胚細胞および 歯の組織形成への影響

1-1 序論

1) 歯の発生と再生

歯は上皮 間葉相互作用によって器官形成され、上皮細胞からエナメル芽細胞、間葉細胞から象牙芽細胞が分化する（文献 1-4）。これらの分化した細胞はエナメル質基質あるいは象牙質基質を産生する。

エナメル質の発生は、以下の3つの過程によって起こる（文献 5-7）。

前分泌期

分泌期：エナメル芽細胞の細胞分化

成熟期：エナメル質基質の形成と成熟・基質石灰化

また象牙質の発生は、エナメル芽細胞の分化とほぼ同時期に上皮 間葉界面に局在する間葉由来の歯乳頭細胞が象牙芽細胞へと徐々に分化を始める（文献 8-11）。近年、*in vitro* および *in vivo* の研究において歯髓細胞が象牙芽細胞への分化能や石灰化基質の産生能を有するという報告がある（文献 8）。

2) 機械的刺激の歯の再生への応用

歯をう蝕や歯周病で喪失した後の治療法は、人工材料で作製された架工義歯、床義歯やインプラントといった補綴装置で欠損部を置換する方法が一般的であ

る。近年、組織から採取した細胞から天然歯を再生させる生物学的手法による試みがなされている。これは即ち、歯の欠損治療の最終的な目標が、「歯の再生」であるということであると思われる（文献 9、10）。

1980 年代後期、ハーバード大学の Vacanti らは生体吸収性材料で作製された担体に生体細胞を播種することで、移植に用いる組織を作るという組織工学（ティッシュエンジニアリング）の概念を提唱した（文献 11、12）。生体組織の三次元的空間は、細胞間の相互作用を維持しながら構成している。これらの細胞は自己の位置とその機能を保ちながら、組織の機能と維持を担っている。そこで Vacanti らは組織から単離した細胞を生体内の細胞と同じ、三次元的環境が得られる足場を生体材料から作製し、細胞から組織を再生させることに成功した。

一方、Young や Honda らは組織工学的手法を用いた歯の再生研究について報告している（文献 13、14）。この実験は、ブタ下顎骨に埋伏している第三大臼歯歯胚を、小片に細切し酵素処理にて、歯胚上皮細胞群と歯胚間葉細胞群を単離する。この歯胚の発生段階は歯冠形成期の前期である。次に、これらの細胞群を生体分解性吸収性ポリマーでできたメッシュ状の担体に播種して、免疫不全ラットの腹部大網に移植する。大網は腸を取り巻く血管に富んだ脂肪性組織であり、組織の再生に必須である酸素や栄養を十分に供給することが可能である。担体は移植初期には細胞の足場として働き、最終的に細胞から分泌された細胞

外マトリックス（基質）により担体は吸収され置換される。

移植後 20～30 週において体中に再生した組織の中に小さな歯牙様組織を認めた。この歯牙様組織はエナメル質、象牙質、歯髄などの天然歯を構成する組織から構成されていた。さらに歯根発生初期に観察されるヘルトビッチ上皮鞘も一部に観察された。

また人工的な担体を用いず、細胞と組織を組み合わせて歯を再生したという報告がある。（文献 15、16）これは歯胚由来間葉細胞や他の間葉系幹細胞を歯胚由来上皮組織と組み合わせることで歯を再生させる技術である。さらに Hu らは帽状期の歯胚組織から単離した細胞を歯胚由来間葉組織と組み合わせることで *in vitro* において歯の組織再生を観察したと報告した（文献 17）。

しかしながら、これらの組織化技術では、再生した歯の組織の大きさが約 2 mm と小さい。さらに象牙質では 20 週以上、エナメル質では 25 週以上の再生期間を要することが分かっている（文献 13、14）。

歯を再生させ、その臨床応用を考えたときに再生した組織のサイズや再生期間を制御するために、歯胚由来の上皮細胞および間葉細胞の相互作用を促進するのに必要な因子を探ることは必須であると考えられる。

機械的刺激が細胞の増殖や分化に様々な影響を及ぼすということがよく知られている（文献 18、19）。例えば、この機械的刺激が骨芽細胞や軟骨細胞の分化

を促進するという報告がある（文献 19、20）。

特に流体による剪断応力刺激は骨基質蛋白質の分泌を促進する（文献 20、21）。流体による剪断刺激を受けた骨芽細胞は c-fos やシクロオキシゲナーゼ-2（COX-2）などの遺伝子発現を増強する（文献 22）。そこで我々は歯の再生過程において、適切な剪断刺激が歯原性細胞の分化を促進するのに必要であろうと考えた。

エナメル質形成の過程はエナメル蛋白質を含む細胞外基質中で起こる（文献 23）。エナメル基質の主な構成成分は、アメロジェニン、アメロプラスチン（アメリン、シースリンとも呼称される）およびエナメルリンである（文献 24）。

アメロジェニンはエナメル基質中で約 90 %含まれる最も豊富なエナメル蛋白質であり、cDNA クローニングやアミノ酸配列解析で最初に特定された（文献 25、26）。この蛋白質はエナメル芽細胞により産生される（文献 5、27）。

一方、象牙芽細胞や歯髓細胞は特有の象牙質細胞外基質を産生するために、数種類のコラーゲン性蛋白質やオステオカルシン（OCN）、オステオポンチン（OPN）、骨シアロ蛋白質（BSP）といった非コラーゲン性蛋白質（NCPs）を合成・分泌する。I型コラーゲンは象牙質に存在する主な蛋白で、約 90 %が有機質から成る。

シアロ酸を豊富に含む蛋白質は、石灰化過程に関係している。オステオカル

シンは骨、象牙質、セメント質に局在することが知られている。またこれらの硬組織を形成する細胞に特有で他の組織や細胞に認められない(文献 28、29)。オステオポンチンは上述の部位にだけでなく(文献 29、30)腎臓やマクロファージや活性化T細胞というような一般的な組織や細胞に広く局在する(文献 31-33)。骨シアロ蛋白質は骨、象牙質、セメント質および軟骨を含むいくつかの組織に認められる(文献 34、35)。

OCN、OPN、BSP は、象牙質に類似した骨にも同様な局在を示すので、理想的な間葉のマーカーとして用いられる。また象牙質シアロ蛋白(DSP)は象牙質、象牙芽細胞、そして一時的ではあるが前エナメル芽細胞にも発現している(文献 36-38)。主な非コラーゲン蛋白である DSP や象牙質リン酸蛋白(DPP)は、それぞれ象牙質シアロリン酸蛋白(DSPP)のN末端およびC末端の蛋白分解酵素によりできた産物である(文献 39)。

ショウジョウバエの runt ファミリーに属する転写因子である(文献 40)Runx2 は、骨芽細胞の分化、骨形成、歯の発生に必須であると言われている(文献 41、42)。Runx2 欠損マウスでは骨格筋が欠損し、発生中の歯胚は帽状期初期で発生を停止する(文献 43)。さらに Runx2 は象牙芽細胞の分化においてマウス DSPP のプロモーターを制御する役割を持ち(文献 44)、アメロブラスチン遺伝子の転写に関わっている(文献 45)。

アルカリフォスファターゼ（ALP）遺伝子は齧歯類において 4 種類がコードされている（文献 46）。胎盤や胚、小腸のアイソザイムが多くの組織に発現している（文献 47、48）。これらの中で、組織非特異的アルカリフォスファターゼ（TNAP）は硬組織形成に関与している。TNAP 転写物は、主に歯胚上皮の前分泌型エナメル芽細胞や中間層細胞、歯乳頭の前象牙芽細胞に局在していることが観察されている（文献 49、50）。さらに高濃度の ALP が歯髓細胞に認められている（文献 51）。

1-2 目的

第 1 章における研究の目的は、歯原性細胞の分化や歯原性組織の組織形成に対する機械的刺激の影響を検証することである。まず、流体による応力が培養した歯胚細胞に与える影響について、細胞増殖やアルカリホスファターゼ(ALP) 活性を測定することにより、機械的刺激が歯原性細胞の細胞増殖や分化を促進するかどうかを調べた。さらに組織工学による歯の再生を促進するかどうかを検証した。

1-3 材料と方法

細胞の採取と細胞 担体複合体試料の作製

埋伏した第三大臼歯歯胚を生後 6 ヶ月の新鮮なブタ下顎骨から取り出した。歯胚の発達時期は歯冠形成期初期である。歯胚上皮由来のエナメル芽細胞と歯乳頭由来の象牙芽細胞はすでに分化しており、石灰化基質を産生している。少量の石灰化した組織を除去した後、歯胚上皮、歯乳頭および歯小嚢を含む歯の組織を 2-3 mm³ の小片に細切し、ディスパーゼ (Roche 社製、ドイツ) およびコラゲナーゼ (和光純薬社製) により酵素的に分解した。一本のブタの歯から、平均的に約 1.0×10^7 個の細胞が採取できた。単離した異種の細胞群を、I 型コラーゲン溶液 (1.0 mg/mL I 型コラーゲン (10 mM HCL 溶液)) (Bioscience 社製、USA) にてコートしたポリグリコール酸 (PGA) 線維で作製されたメッシュ (Albany International Research 社製、USA) に播種した。この球形の担体は、直径 8.0 mm の大きさを持つ。細胞播種前の担体の乾燥重量は平均 0.18 g であった。全ての動物実験は九州大学動物実験規則に則って行った。

機械的刺激

これまでに、3 種類の機械的刺激が細胞分化に与える影響について検証した

研究報告がある。一方向性の伸展刺激、超音波刺激および二方向性の流体による剪断刺激を与え、歯髄細胞の分化マーカーである ALP 活性を検証している(文献 57、58)。これらの機械的刺激の中で、剪断刺激のみが歯髄細胞の ALP 活性を上昇させたという結果が得られている。この研究結果から、剪断刺激が細胞の ALP 活性に最も明らかに影響を与えたと考えられた。

担体に 5.0×10^5 個の細胞を播種した後、インキュベーター内(37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 、湿度 100%)で細胞 担体複合体を 2 時間静置した。さらに、この複合体を 10% 牛血清 (FBS) 含有 Dulbecco 改変イーグル培地 (DMEM) (GIBCO 社製、USA) とともに 15 mL の遠心管に入れた。この試料に Bioshaker (TAITEC 社製) を用いて、遠心管内で振動刺激 120 rpm を 37°C にて、12 時間与えた後、ALP 活性を測定した。試料に与えた機械的負荷は $1.6 \times 10^{-4} \text{ N}$ に相当する。

細胞増殖測定

細胞増殖に対する剪断刺激の影響を WST-8 細胞増殖測定キット (和光純薬社製) のプロトコールに従って調べた。細胞 PGA 担体複合体試料を 10% FBS 含有 DMEM 培地とともに、48 穴のマイクロプレートに入れた。さらに担体に接着しなかった細胞を除去し、試料を 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ にて 2 時間静置した。 15 mL の遠心管に試料を移し 12 時間の振動刺激を与えた。その後 48 穴のマイクロブ

レートに再度戻し、10 % FBS含有DMEM培地を添加し、37 °C、5 % CO₂ にて7日間培養した。培養1、5、7日後に吸光度450 nmにてマイクロプレートリーダー (SmartSpeck™ 3000、Bio-Rad社製) を用いて細胞増殖測定を行った (N=5)。振動刺激を与えず12時間静置した試料をコントロール群とした。

アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性測定

細胞分化に対する剪断刺激の影響を評価するためにALP活性を測定した。上述のように細胞担体複合体に12時間の振動刺激を与えた後、細胞増殖測定と同様に37 °C、5 % CO₂ にて7日間培養した。培養1、5、7日後に、プロトコールに従って、FAST p-Nitrophenyl Phosphate タブレットセット(シグマ社製、USA) を用いた発色反応によりALP活性を測定した (N=5)。吸光度415 nmにてマイクロプレートリーダー (SmartSpeck™ 3000、Bio-Rad社製) を用いて測定した。

細胞担体複合体の移植

4から5週齢の雄の免疫不全ラット (F344/N Jcl-rnu、日本クレア社) を移植実験に供した。ラットはペントバルビタールナトリウムを15 mg/kgで腹腔内に注入し、機械的刺激を与えた細胞担体複合体試料を腹部大網に移植した(図1)。



図1 細胞 担体複合体試料を腹部大網に移植

形態学的解析

移植 15 週後、ラット腹部より再生した組織を採り出し、4 % パラホルムアル
デヒド-リン酸緩衝液にて 4 にて一晩固定した。実験群およびコントロール群
の固定した組織および細胞播種前の担体の大きさを比較計測した。

統計学的解析

本研究のすべての実験において、 $p < 0.05$ にて Student's t 検定により解析した。

1-4 結果

細胞増殖および ALP 活性に対する機械的刺激の影響

機械的刺激を与えた実験群と与えていないコントロール群の細胞増殖を比較した(図 2 - A)。両群とも培養 1 から 7 日目にかけて総細胞数は増加した。培養 7 日目において、コントロール群の細胞増殖は実験群に比較して高い値を示した ($p<0.05$)。

ALP 活性は、7 日目では実験群がコントロール群に比べ有意に高かった。また実験群はコントロール群の約 3 倍高かった(図 2 - B)。

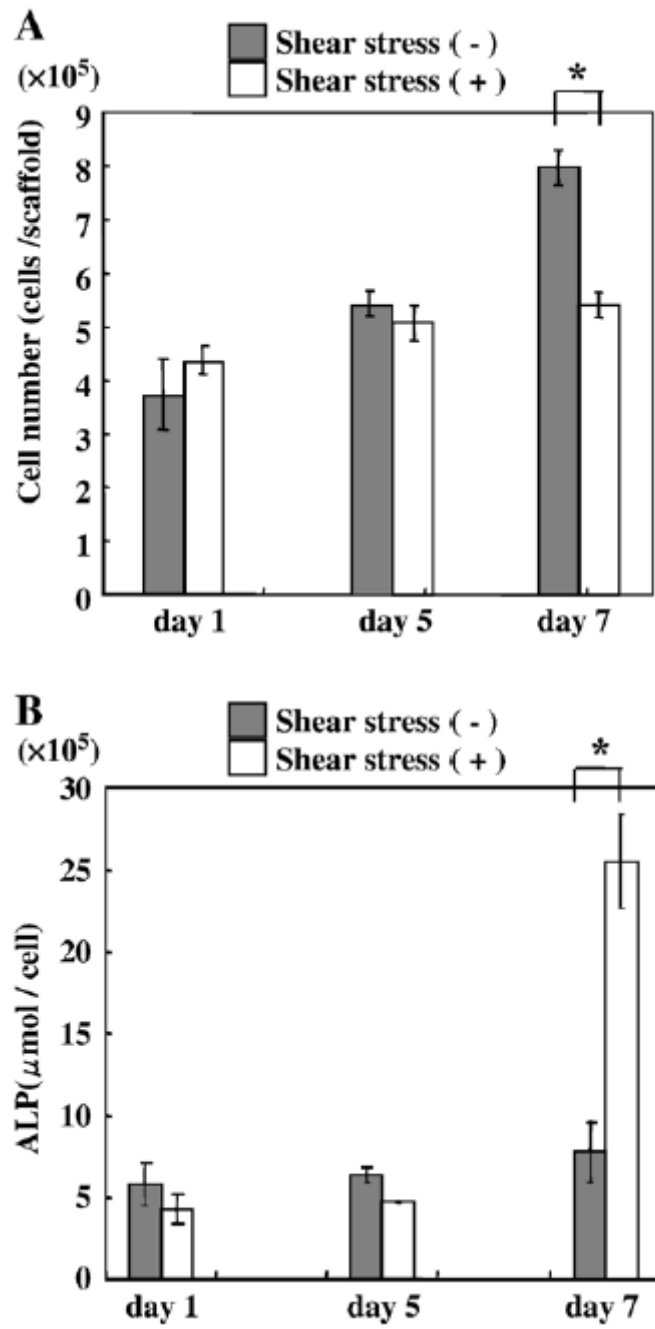


図2 機械的刺激を与えた培養歯胚細胞の細胞増殖 (A) と ALP 活性 (B)

機械的刺激の *in vivo* における再生した組織に対する影響

移植 15 週後、実験群とコントロール群の両群ともに硬組織の形成を認めた。

実験群の再生組織では、移植前の PGA 担体とほぼ同じ大きさを維持していたが、コントロール群では減少していた（図 3）。また実験群の再生組織の直径は、コントロール群に比較して有意に大きかった ($p < 0.05$) (図 4)。

これらの結果より、機械的刺激を与えた細胞により組織再生の速度は促進されたということが示唆された。

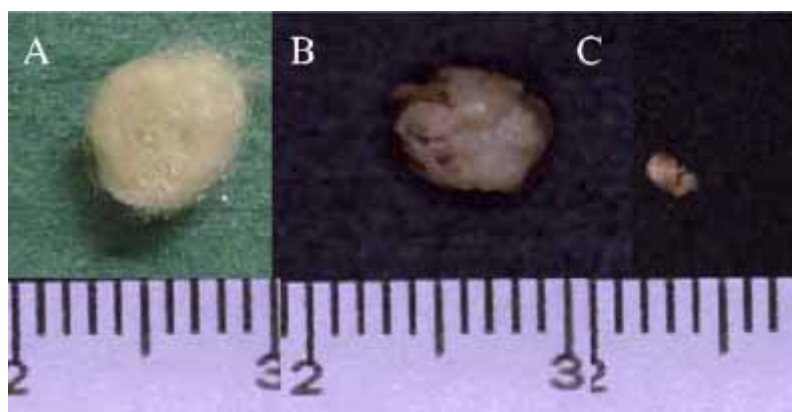


図 3 機械的刺激による歯の組織形成の肉眼所見

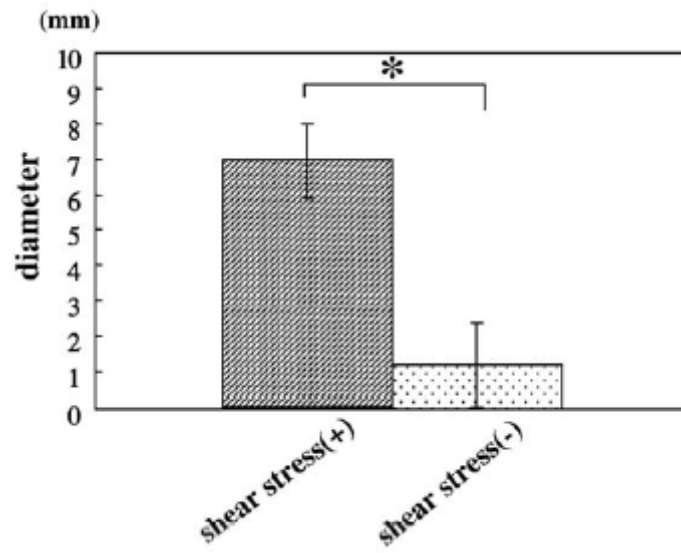


図 4 機械的刺激による歯の組織形成の形態学的解析

1-5 考察

細胞 担体複合体から再生させた歯は、まだ完全な歯の形態を有していない。象牙質やエナメル質の発達期間は象牙質では少なくとも 20 週間、エナメル質では 25 週を要する（文献 13、14）。歯の再生には長期間かかるため、その期間を短縮させる新たな技術が必須であると考えられる。骨代謝に対する機械的刺激の効果はよく知られている（文献 52）。特に流体によって引き起こされる機械的刺激は、骨芽細胞の構造および機能に影響を与える（文献 20 - 22）。故に、本研究では歯の組織再生に対する機械的刺激の影響を検証した。実験群の再生組織では、移植前の PGA 担体とほぼ同じ大きさを維持していたが、コントロール群では減少していた。これらの結果から、機械的刺激が *in vivo* における歯の再生を早めたことが示唆された。

一方、歯の再生における三次元的な組織形成や石灰化の促進は基質中の高分子により制御されていると考えられている。いかに早期に組織工学的手法で歯を再生させるかを検証した。*in vitro* における研究結果から、機械的刺激を与えると ALP 活性が増強し、細胞増殖には影響しないということが分かった。ALP 活性は歯髄細胞の分化マーカーであるが、歯胚上皮のマーカーではないことがよく知られている（文献 53、54）。即ち、機械的刺激は歯乳頭細胞の分化を促進

することが示唆された。しかしながら、ALP 活性の増強の正確なメカニズムは不明である。なぜなら、象牙質やエナメル質の石灰化における詳細な役割は未だ議論が続いているからである。

1-6 小括

機械的刺激を与えると、*in vitro* において、ALP 活性が増強し、細胞増殖には影響しないということが分かった。ALP 活性は間葉由来の歯髓細胞の分化マーカーである。即ち、機械的刺激は歯胚間葉である歯乳頭細胞の分化を促進することが示唆された。

また、*in vivo* における研究結果から、機械的刺激を与えた細胞から再生した組織が生体内において 15 週間で形成され、その組織はコントロール群に比較して大きかった。機械的刺激が培養歯胚細胞の分化を促進し、*in vivo* において歯の組織再生速度を早めることが示唆された。

第 2 章 炭酸ガスレーザーの歯の 再生への応用

2-1 序論

1) レーザーについて

LASER(レーザー)とは、Light Amplification by Stimulated Emission of Radiationの頭字語(アクロニム)であり、訳すると“放射の誘導放出による光の増幅”という意味になる。つまり、光を電気信号のように増幅して強化したものであるが、強化すると共に、非常に良質の光として増幅したものである。

1960年代初頭に歯科用レーザーの研究がはじまり、そして、炭酸ガスレーザーやNd:YAGレーザーは1960年代末に開発され、1970年代および1980年代に研究の対象とされるようになった(文献55)。

波長と周波数

全ての歯科用レーザーは非電離領域である波長380~10,600nm(図5)の可視または不可視の赤外線領域に属している。それ以下の紫外線などの電離領域に属するレーザーは、波長が短く周波数が大きいので細胞の深部に到達する特性を持つ。さまざまなレーザーの最も大きな違いはこの波長である(文献56)。

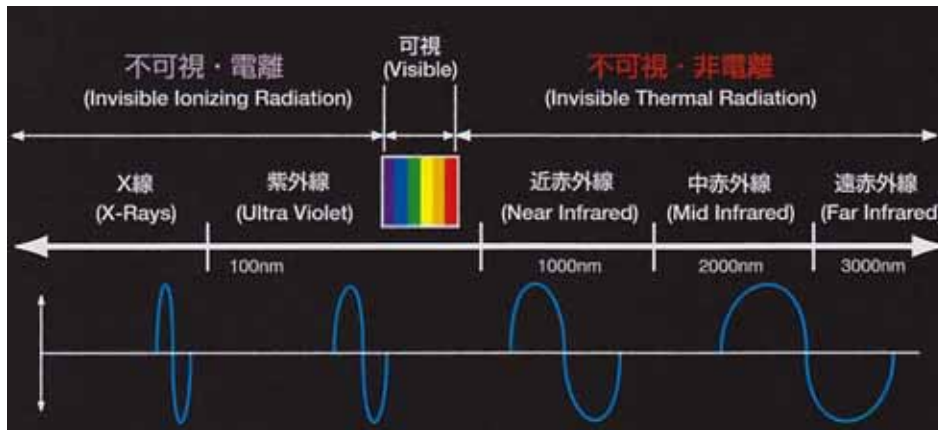


図5 歯科用レーザーの波長分布 歯科用レーザー徹底ガイド：梅本寛著

より引用

レーザーの性質

レーザーの性質として、単色性 (Monochromaticity)、指向性 (Collimation)、干渉性 (Coherence)、効率性 (Efficiency) の4つがあげられる。単色性とは、純粋な一つの色 (波長・周波数) のことであり、歯科では可視、不可視光のどち

らも使用される。指向性とは、光の進行が直線的で広がらずに進む性質により、発振器から一定のサイズと形状のレーザー光が発振されることである。干渉性とは、活性化媒体で発生した波長は同じであり、つまり、同一波形であるということである。効率性とは、標的となる組織にのみ選択的に熱エネルギーを反応させることができる性質である。

レーザー機器の仕組み

レーザー発振を起こさせるためにエネルギーを増幅させる活性化媒体は光共振器の中央にあり、一般にレーザーの名称は活性化媒体の材料（気体、液体、固体）にちなんで命名される。

固体レーザーである Nd:YAG レーザーは、イットリウムとアルミニウムの複合酸化物からなるガーネット構造のガラス結晶に、発振波長に關与するネオジウムを微量に添加させた活性化媒体を使用している。炭酸ガスレーザーやアルゴンガスレーザーなどの気体レーザーでは、通常ガラスや金属で作られた放電管の中にガス状の活性化媒体を真空封入したものをいう。その他としては、半導体（ガリウム、アルミニウム、インジウム、砒素などの複合層の金属で構成されたレーザーがある。

外部エネルギー源（主にフラッシュランプ）から注入された光の粒子は活性

化媒体に衝突し誘導放出される。誘導放出されたエネルギー源は両端の鏡に反射、衝突を繰り返し増幅、その一部が部分反射鏡の穴を通してレーザーとして発振される（図6）。

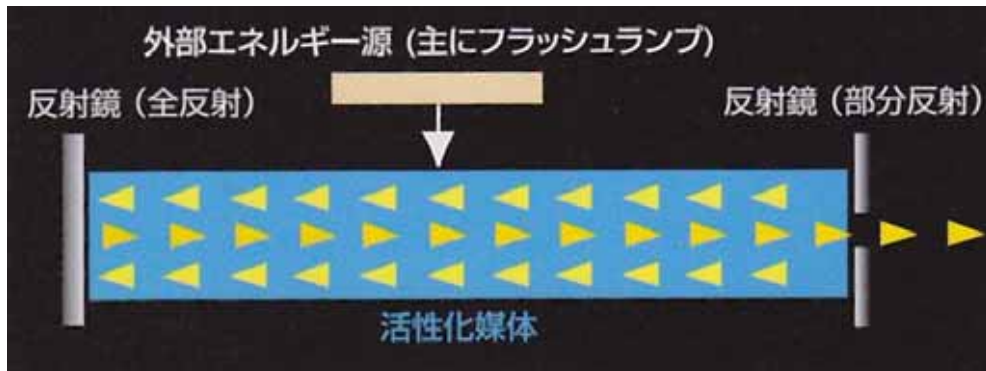


図6 レーザー機器の仕組み：歯科用レーザー徹底ガイド 梅本寛著
より引用

レーザーの発振方式

1) 連続波 (Continuous Wave)

1 つの出力レベルのみでレーザー光が発振される。ダイオードレーザーや炭酸ガスレーザーの基本発振方式で、つねに一定した出力のため最高出力と平均出力は同一である。

2) 断続波 (Gated Pulse/Chopped pulse)

連続波の一種で、レーザー光が点滅灯のように定期的に交替する。波形は基本的に矩形波である。これは、連続波を発振するレーザーの経路にあるシャツ

ターを機械的に開閉したり、活性化媒体への励起を電氣的に制御することにより、コントロールされる。連続波・断続波発振のどちらで使用しても出力パワーと最高出力はおなじである。断続波を使用することで、熱緩和時間（組織表面にレーザーが照射していない時間）を得ることができ、照射組織を冷却することができる。

温度による組織への影響

レーザーは出力が上がるにつれ、組織の変性や壊死につながる（表1）。

そのため、治療目的に応じた出力設定が必要となる。

温度	組織への影響
37~50℃	組織を温める、分子間結合の破壊、生体膜の変化
50~60℃	酸素活性の変化
60~70℃	たんぱく質の変質、凝固、組織の収縮、止血
70~100℃	組織の癒合
100~150℃	組織の蒸散、切除
200℃	組織の炭化、燃焼
300℃	組織の融解（歯の硬組織など）
1000℃	電離

表1 温度による組織への影響：歯科用レーザー徹底ガイド 梅本寛著
より引用変改

レーザーの組織透過性

種々のレーザーにおける組織透過深度の違いを示す(図7)。エルビウム系ヤグレーザーや炭酸ガスレーザーは、吸収深度が浅いため主として表面で作用する。



図7 各種レーザーの組織透過深度 歯科用レーザー徹底ガイド 梅本寛著より引用

2) 歯科臨床における炭酸ガスレーザーの応用

炭酸ガスレーザーの日本での普及状況

現在さまざまなメーカーから歯科用レーザーがでていますが、日本において歯科用レーザーの導入率は28.6%である(文献57)。そして、炭酸ガスレーザーが一番多く臨床応用されており、約61.3%の割合である(図8)。

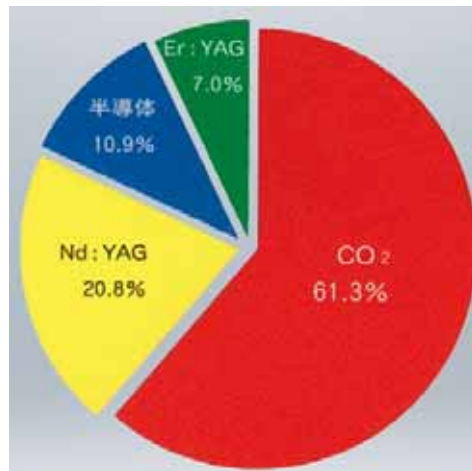


図 8 炭酸ガスレーザーの日本での普及率: やさしいレーザー治療 皆川仁著
より引用

レーザーの臨床的効果

臨床的にレーザーが組織に与える影響として、光熱効果 (Photothermal Effects)、光化学効果 (Photochemical Effects)、光物理効果 (Photomechanical Effects)、光電気効果 (Photoelectrical Effects) の 4 つがあげられる。

主な組織への影響としては、光熱効果は、組織を凝固、蒸散、光化学効果は化学反応の促進及び、光線力学的療法として、光物理効果は、分子間結合の切断、光電気効果は、プラズマ形成することが知られている。そして、この中でも、レーザーエネルギーの主要効果は光熱効果であり、光エネルギーを熱エネルギーに変換することである (文献 58)。

レーザー光の波長の違いによる組織の吸収特性

波長の比較的短いアルゴン、ダイオード、Nd:YAG などのレーザーはメラニン

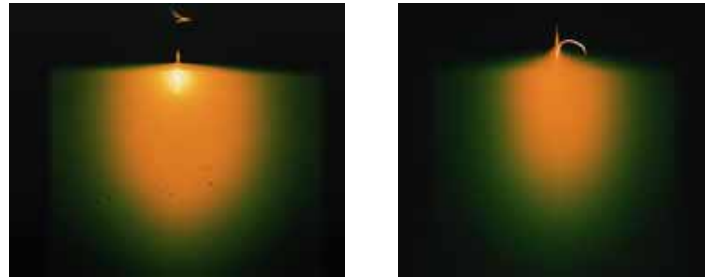
やヘモグロビンなどに吸収されやすく、水、ハイドロキシアパタイトなどには吸収されない。逆に、波長の長いEr:YAG、Er、Cr:YSGG、炭酸ガスレーザーなどは、メラニン、ヘモグロビンに吸収されにくく、水、ハイドロキシアパタイトに吸収されやすいという特性がある（表2）。

	短い波長を持つレーザー (アルゴン、ダイオード、Nd:YAGなど)	長い波長を持つレーザー (Er,Cr:YSGG, Er:YAG,CO2 など)
メラニン	吸収されやすい	吸収されにくい
ヘモグロビン	吸収されやすい	吸収されにくい
水	吸収されにくい	吸収されやすい
ハイドロキシアパタイト	吸収されにくい	吸収されやすい

表 2 レーザーの組織への吸収特性：ADVANCED PROFICIENCY TUTORIAL SYLLABUS. Academy of Laser Dentistry. 2001 より引用変改

レーザー照射モード

レーザー照射には、大きくディフォーカス照射とフォーカス照射の2つのモードがある。ディフォーカス照射は、広い照射面積のため、エネルギー密度が低く、一般的に弱い凝固や乾燥、組織活性効果を期待して応用される。一方、フォーカス照射は、照射面積が最も小さくなっており、エネルギー密度が高く、組織の切開や切除に用いられる（文献 59）（図 9）。



デフォーカス照射

フォーカス照射

図9 2つのレーザー照射モード

レーザー照射方法

すべてのハードレーザー照射後の組織には、範囲は異なるものの、いくつかの層が出現する（図10）。これらの中で、細胞が不可逆的な変化を示す層を治療に応用するのがHLLT（High reactive Level Laser Therapy）であり、蒸散や切開にあたる。逆に人為的にレーザーのエネルギー密度を低くし、細胞が活性化する層を治療に応用するのがLLL（Low reactive Level Laser Therapy）である（文献60）。

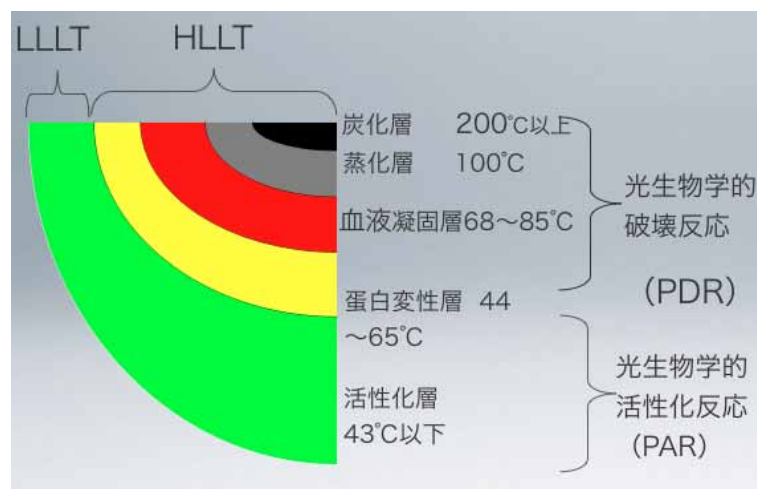


図10 レーザーの持つ2つの作用

3) 炭酸ガスレーザーの基礎研究報告について

炭酸ガスレーザーによる遠赤外線は、皮下に照射した場合、40-50 mm まで浸透し、人間の細胞を共振させて内部から加温するといわれているが、微小血管の拡張、血液循環の活性化、新陳代謝の強化、組織再生力の増加、成長促進に極めて効果的に働くことがわかっており、細胞分子レベルでも研究がすすんでいる（文献 61、62）。

2-2 目的

近年、培養歯胚細胞を用いたエナメル質の再生が報告されているが、組織再生までの期間が長期に亘ることや再生した組織が幼弱で小さいものであることが分かっている（文献 63）。また、これまでに低出力でのレーザー照射が培養ヒト歯髓細胞やマウス象牙芽細胞様細胞株の細胞増殖や分化を促進させることが報告されている。そこで第 2 章では、炭酸ガスレーザー照射が培養ブタ歯胚細胞の増殖能や分化能、歯の組織再生能への影響について調べ、臨床応用可能な量的質的な細胞培養および組織再生技術の改善を目的として研究を行った。

2-3 材料と方法

細胞の採取と培養方法

第 1 章と同様に、埋伏した第三大臼歯歯胚を生後 6 ヶ月の新鮮なブタ下顎骨から取り出した。さらに歯胚上皮、歯乳頭および歯小嚢を含む歯の組織を 2-3 mm³ の小片に細切し、ディスパーゼ (Roche 社製、ドイツ) およびコラゲナーゼ (和光純薬社製) により酵素的に分解した。一本のブタの歯から、平均的に約 1.0×10^7 個の細胞が採取できた。歯胚細胞は 48 穴マイクロプレートに播種 (1.0×10^4 cells/well) し、10% FBS含有DMEM培地 (GIBCO 社製、USA) に抗生物質 (ペニシリン-ストレプトマイシン混合液) を 1 % 添加したものをうい、通法に従いインキュベーター (37 °C、5% CO₂) 中で 24 時間培養した。レーザー照射直前に培地を除去し、照射後新たに 500 μLの培地を加えた。

レーザーの照射条件

レーザー装置はオペレーター Lite (吉田製作所製) (図 11-A) を使用した。レーザー光の種類は炭酸ガスレーザーであり、条件は波長 10,6 μm、出力 0.5 W、発信モードは連続波で使用した。レーザー照射条件は塩崎らを参考に骨組織に対する誘導能が高いとされるタイムコース (図 11-B) で行った (文献 64)。照射チップ先端から単層の細胞層までの距離は 10.0 mm に設定した (図 11-C)。

製品名：オペレーターLite

製造元：株式会社ヨシダ

波長：10.6 μm

最大出力：0.5-5 W

発振方式：連続波、スーパーパルス
(シングルパルス、リピートパルス)

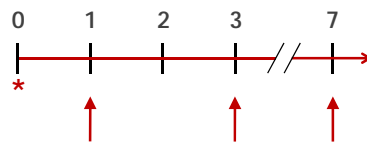
パルス幅：0.001-0.9 秒

デリバリーシステム：ホローウェーブガイド

重量：19.0 kg

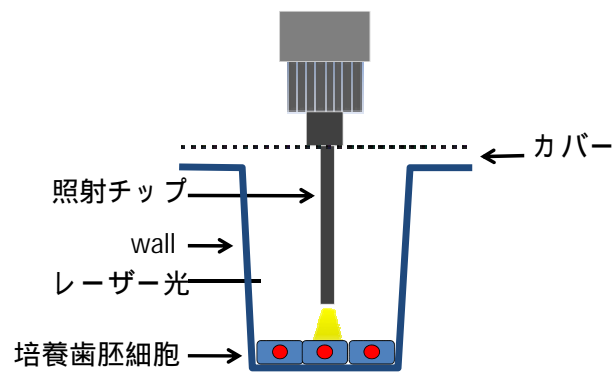
A) 使用した炭酸ガスレーザーの仕様

培養日数(day)



* : Cell seeding / ↑: Laser irradiation

B) レーザー照射のタイムコース



C) レーザー照射環境

図 11 レーザー照射条件

細胞増殖測定

レーザー照射の細胞増殖に対する影響について、血球計算板を用いた細胞数の

計測およびCell counting kit-8（同人化学社製）により調べた。細胞を 10 % FBS 含有DMEM培地 500 μ Lとともに、48 穴マイクロプレートに播種し、37 °C、5 % CO₂ にて 7 日間培養した。培養 1、3、7 日後に吸光度 450 nmにてマイクロプレートリーダー（SmartSpeck™ 3000、Bio-Rad社製）を用いて細胞増殖測定を行った（N=5）。レーザー照射を行なわなかったものをコントロール群とした。

アルカリフォスファターゼ（ALP）活性測定

細胞分化に対するレーザー照射の影響を評価するためにALP活性を測定した。前述のようにレーザー照射した後、細胞増殖測定と同様に 37 °C、5 % CO₂ にて 7 日間培養した。培養 1、3、7 日後に、プロトコールに従って、FAST p-Nitrophenyl Phosphate タブレットセット（シグマ社製、USA）を用いた発色反応によりALP活性を測定した（N=5）。吸光度 415 nmにてマイクロプレートリーダー（SmartSpeck™ 3000、Bio-Rad社製）を用いて測定した。

蛋白質抽出および SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

レーザー照射した細胞における歯に関連した蛋白質発現を調べるために、ウェスタンブロット法を行った。蛋白質は細胞外に分泌されるので、歯胚細胞をインスリンートランスフェリン-セレンウム（ITS）サプリメント（GIBCO 社

製)を添加した無血清 DMEM 培地を用いて培養した。レーザー照射し 7 日間培養した後、培地を Ultrafree-4 遠心管 (Millipore 社製、USA) に移し、4 °C、10 分間、7500 G 条件下にて不純物を遠心除去した後回収した。回収した上清を凍結乾燥した。凍結乾燥した蛋白質の試料は、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) サンプルバッファーに溶解し、5 分間煮沸した。さらに 4-20 % ポリアクリルアミドグラディエントゲル(BioRad 社製)を用いて SDS-PAGE を行った。

ウェスタンブロット法による蛋白質発現解析

SDS-PAGE により分離した蛋白質試料を、電気プロッター (Mini Trans-Blot Cell、BioRad 社製) を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレンに転写した。転写後、メンブレンをブロッキング溶液 (Block Ace、大日本製薬社製) に一晩浸漬した。さらにメンブレンを抗アメロジェニン抗体 (1000 倍希釈)(米国テキサス大、Simmer 博士から供与) 抗 BSP 抗体 (500 倍希釈)(カナダトロント大、Sodek 博士から供与) および抗ビメンチン抗体 (1000 倍希釈) (NeoMarkers 社製、USA) と 25 °C、2 時間反応させた。反応後、それぞれの抗体に対し、アルカリフォスファターゼ標識した二次抗体を 25 °C、1 時間反応させた。メンブレンを蒸留水で洗浄し、BCIP/NBT 発色基質キット (Promega 社

製、USA)にて発色反応を行った。

RT-PCR 法による遺伝子発現解析

レーザー照射し7日間培養した細胞から、総 RNA を TRIZOL 溶液 (Invitrogen 社製、USA)により抽出した。DNase I (Promega 社製)で処理することでゲノム DNA の分解を行った。抽出した RNA は Superscript™ First-Strand Synthesis キット (Invitrogen 社製、USA)を用いて cDNA の合成を行った。合成した cDNA を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)を行い、歯に関連した遺伝子の発現解析を行った。PCR に使用したプライマーの配列は表 3 に示す。プライマー配列の設計に関しては National Center for Biotechnology Information (NCBI) の遺伝子データベースの各遺伝子配列データを参考にした。コントロール遺伝子として β -actin を用いた。1 サイクル当たりの PCR 反応は 95 °C、30 秒間にて変性、58-62 °C、1 分間アニーリング反応させ、72 °C、1 分間伸長反応させた。これらの反応を 35 サイクル行った後、PCR 産物を 2 % アガロースゲルにて電気泳動を行った。

Primer sequences for the reverse transcription/polymerase chain reaction		
Transcript name	Primer set (5'-3')	Products
β-actin	S-GAC CGA CTA CCT CAT GAA G	392
	A-CCG TGA TCT CCT TCT GCA T	
Amelogenin	S-CCT GCC TTT TGG GAG CA	207
	A-TGG TGG TGT TGG GTT GGA	
Ameloblastin	S-ATT CCC AAC CTG GCA AGA GG	380
	A-AGC GCT TTT AAT GCC TTT GC	
Enamelin	S-TGA GGA GAT GAT GCG CTA TG	315
	A-TGA GGT GTC TGG GTT TCC TC	
Enamelysin	S-ATA CGT GCA GCG AAT AGA TGC	289
	A-CTA TTT AGC AAC CAA TCC ACG	
Runx2	S-GAC CCT GGA AGG AAA CAC AA	303
	A-CGC TGG TCC ATG CTT AGA GT	
Col-1	S-GAT CCT GCT GAC GTG GCC AT	212
	A-ACT CGT GCA GCC GTC GTA GA	
BSP	S-ACT GAA GCC CAA GGA ACC AC	480
	A-GTC CAG AAG ACC ACG TTG GA	
OPN	S-GCA ATG AGC ATT CCA ATG TG	383
	A-GAC CGT CGA CTA AAC CCT GA	
OCN	S-TCA ACC CCG ACT GCG ACG AG	204
	A-TTG GAG CAG CTG GGA TGA TGG	
DSPP	S-CAG CCG CTG ATT AAT ATT CCT AAA	338
	A-TAA CAT GGG ACG TGC AGA AGA ACT	

S: sense, A: antisense, DSPP: dentin sialophosphoprotein, BSP: bone sialoprotein, OPN: osteopontin, OCN: osteocalcin, Col-1: collagen type I.

表 3 歯に関連する遺伝子発現解析に用いた PCR プライマーの遺伝子配列

細胞 担体複合体の移植

レーザー照射した細胞をウェルプレートからコラゲナーゼ（和光純薬社製）により酵素的に剥離し、I型コラーゲンスポンジ（名古屋大学医学部口腔外科 本田雅規先生から供与）に 1.0×10^6 cells 播種した（以下、細胞 担体複合体試料とする）。この円柱型の担体は、直径 16.0 mm × 5.0 mm の大きさを持つ。

細胞播種前の担体の乾燥重量は平均 0.18 g であった。5 週齢の雄の免疫不全ラット（F344/N Jcl-rnu、日本クレア社）を移植実験に供した。ラットはペントバルビタールナトリウムを 15 mg/kg で腹腔内に注入し、セボフルレン吸入麻酔下

にて、細胞 担体複合体試料を腹部大網に移植した (N=5)。全ての動物実験は九州大学動物実験規則に則って行った。

組織学および免疫組織学的解析

移植 8 週後、ラット腹部より再生した組織を採り出し、4 % パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液にて一晩、4 °C にて固定した。固定した組織を 5 % EDTA 溶液にて 1 週間脱灰した。脱灰した組織をパラフィン包埋し、組織切片を作製した。免疫組織化学的解析は Vectastain ABC キット (Vector Laboratories 社製、USA) を用いて行った (文献 65、66)。抗体は抗アメロジェニンポリクローナル抗体 (2000 倍希釈) および抗 BSP ポリクローナル抗体 (500 倍希釈) を用いた。

統計学的解析

本研究のすべての実験において、 $p < 0.05$ にて Student's t 検定により解析した。

2-4 結果

レーザー照射による細胞増殖および ALP 活性への影響

細胞数を血球計算板および Cell counting kit-8 の両測定方法において、培養 3 日目及び 7 日目ではレーザー照射群はコントロール群に比べ、細胞増殖は有意に増加した (図 12)。

また、歯胚の分化の指標としたアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性は、培養 3 および 7 日目において、レーザー照射群はコントロール群に比べ ALP 活性は有意に増加した (図 13)。

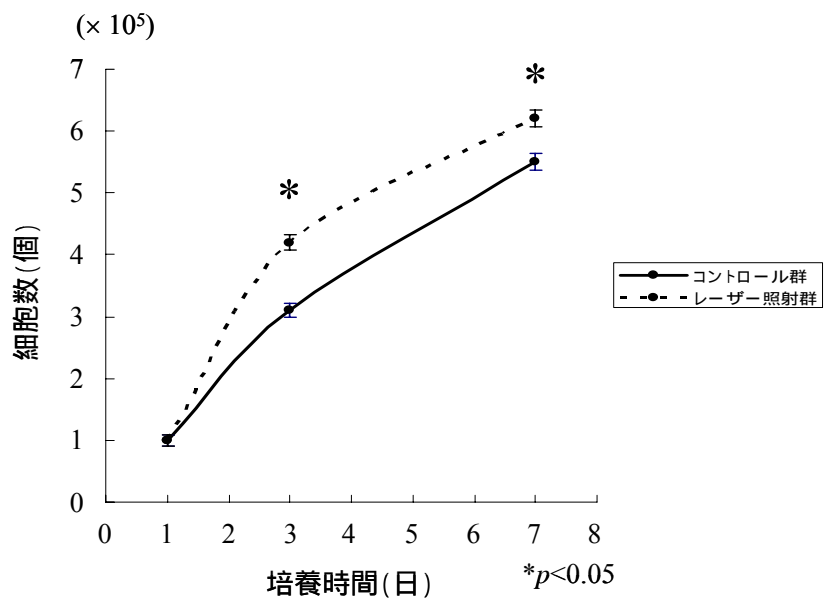
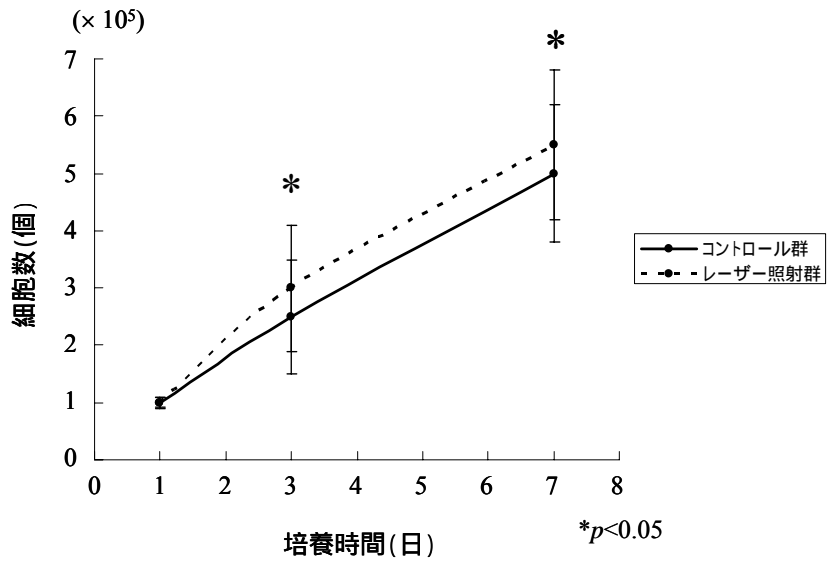


図 12 レーザー照射による細胞増殖への影響

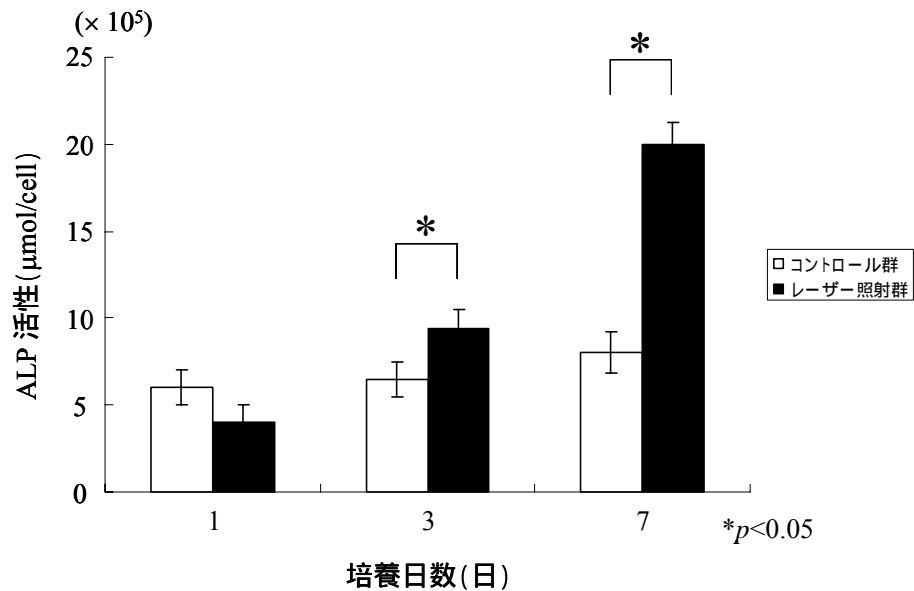


図 13 レーザー照射による ALP 活性に対する影響

ウェスタンブロット法による蛋白質発現解析

歯胚上皮のマーカーにおいて、アメロジェニン発現のウェスタンブロット解析の結果から、実験群はコントロール群に比較して高いことがわかった(図 14)。さらに、歯胚間葉のマーカーにおいて、BSP やビメンチンの蛋白質発現は、コントロール群に比較して実験群は高かった(図 14)。

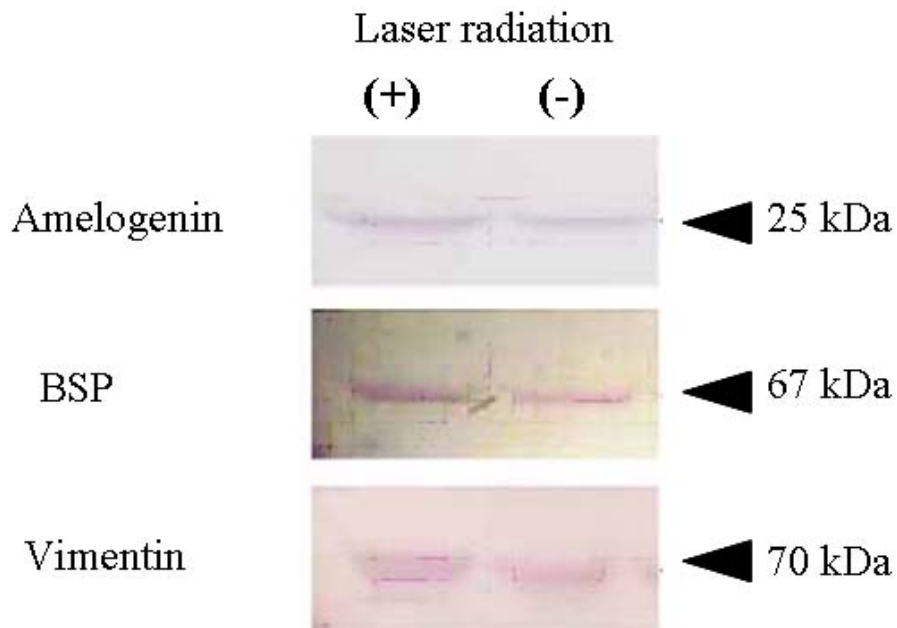


図 14 レーザー照射による歯に関連する蛋白質発現に対する影響

レーザー照射の mRNA 発現に対する影響

歯胚細胞にレーザー照射したとき、歯に関連する mRNA 発現に対する影響を調べた。レーザー照射 7 日後では、コントロール群に対する相対値に対して実験群ではアメロジェニンおよびアメロブラスチンの mRNA 発現は高かった（図 15）。一方、エナメルリンおよびエナメライシン（MMP-20）mRNA の発現は、レーザー照射による影響を認めなかった。レーザー照射 7 日後の Runx2、I 型コラーゲン、OPN、OCN および DSPP mRNA 発現は、コントロール群に比較して実験群では高かった（図 15）。

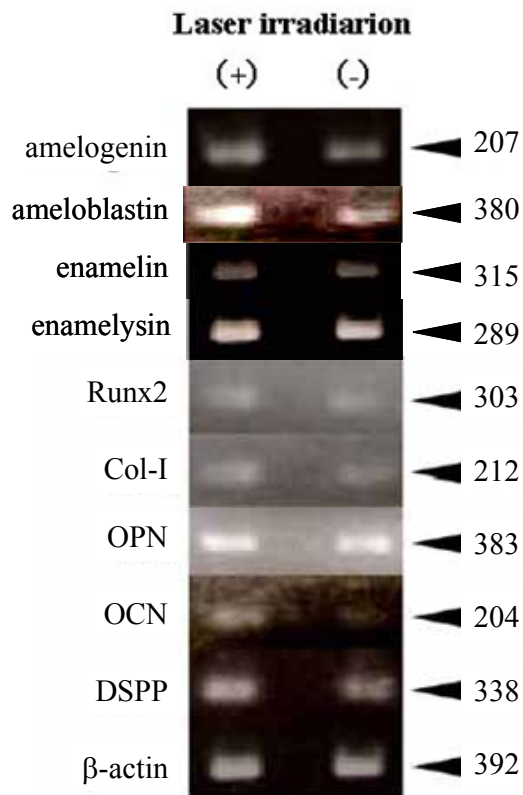


図 15 レーザー照射の mRNA 発現に対する影響

in vivo におけるレーザー照射の再生歯に対する影響

移植 8 週後、実験群とコントロール群の両群ともに硬組織の形成を認めた。

実験群の再生組織では、移植前の担体とほぼ同じ大きさを維持していたが、コントロール群では減少していた。また実験群の再生組織の直径は、コントロール群に比較して大きかった。

移植 8 週後において、実験群では再生した歯の構造体にはエナメル-象牙質複

合体を認めた(図 16-A)。極性を持つ細胞核を有する多数の円柱形の細胞だけでなく、象牙細管、セメント様組織やエナメル質も観察された(図 16-A, B, D)。さらに、実験群では抗体免疫染色にて、エナメル質やエナメル芽細胞にアメロジェニ(図 16-C)、前象牙質やセメント様組織に BSP が検出された(図 16-E)。この結果から、歯胚間葉由来の象牙質や歯胚上皮由来のエナメル質の存在が示唆された。しかしながら、移植 8 週間後において、コントロール群の再生した組織は、まだ歯冠形成期初期の様相を呈していた。即ちエナメル質、象牙質あるいはセメント質が認められなかった(図 16-F)。これらの結果より、歯胚細胞へのレーザー照射により組織再生の速度は促進されたということが示唆された。

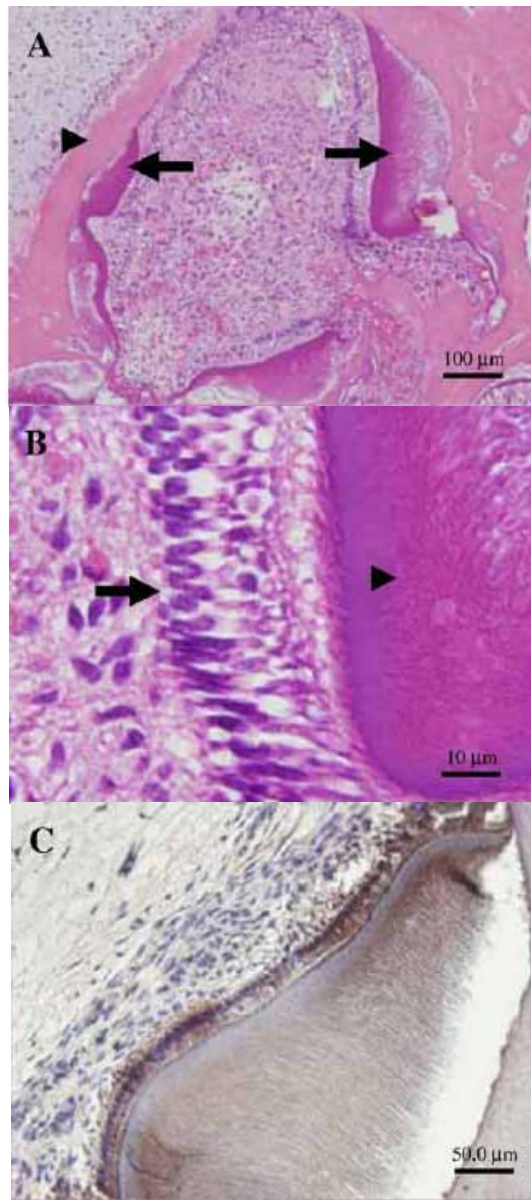


図 16-A, B, C *in vivo* におけるレーザー照射の組織形成に対する影響

図 A : 再生組織の H-E 染色 (矢印 : 成熟したエナメル質、矢頭 : 成熟した象牙質)

図 B : 再生組織の H-E 染色 (矢印 : エナメル芽細胞、矢頭 : エナメル質)

図 C : 再生組織の免疫組織染色

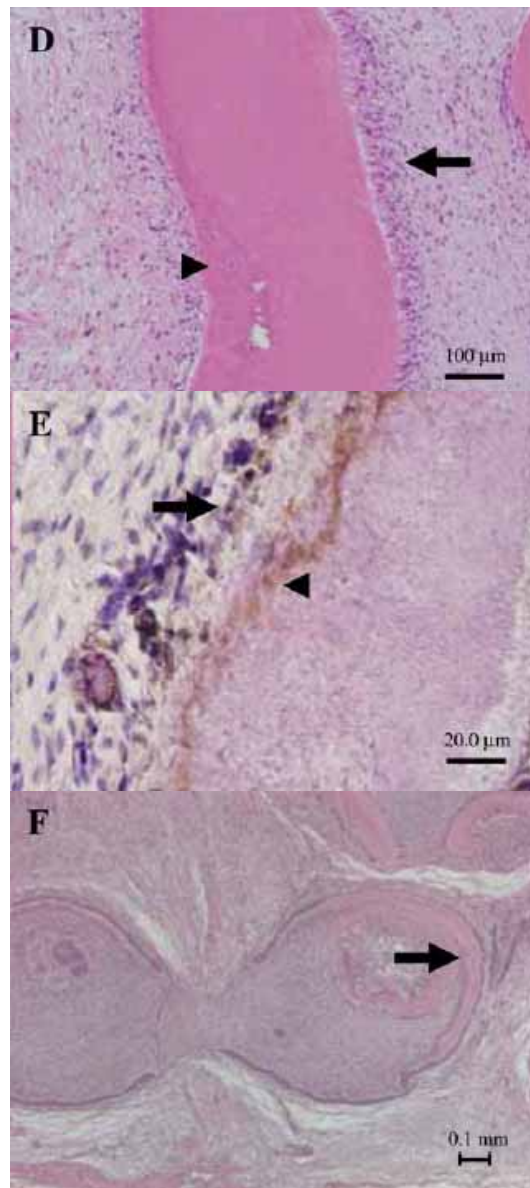


図 16-D, E, F *in vivo* におけるレーザー照射の組織形成に対する影響

図 D : 再生組織の H-E 染色 (矢印 : 象牙質と象牙芽細胞、矢頭 : セメント質様組織)

図 E : 再生組織の免疫組織染色 (矢印 : セメント芽細胞による BSP 発現、
矢頭 : セメント-象牙境)

図 F : コントロール群における再生組織の H-E 染色 (矢印 : 硬組織形成)

2-5 考察

結果より、レーザー照射によりアメロジェニン、BSP やビメンチン蛋白質の発現量は、コントロール群より増強されることが分かった。ビメンチンは、ヒト歯髄細胞、筋線維芽細胞および周囲細胞を含むすべての線維芽細胞に観察される中間フィラメント蛋白質である（文献 67-69）。レーザー照射は歯に関連する基質産生を増強することができるが、上皮あるいは間葉のどちらの細胞が細胞分化に影響しているかは不明である。なぜならエナメルおよび象牙質の蛋白質は、この重要な期間において上皮と間葉細胞に共通するシグナル伝達系により、共同的に制御されていると考えられているからである。つまり、基質を産生する期間はエナメル質および象牙質基質で共有され、形成された石灰化物もまだはっきりと区別されていないのである。歯の形成は、様々な種類の細胞の分化、細胞外基質の沈着および石灰化に関連する複雑な現象である。

細胞の増殖と分化には相反的あるいは機能的に共役する関係性があるという研究報告が多数あるため、レーザー照射が歯に関連する遺伝子群に与える影響について RT-PCR 法を用いて検証した。歯の発生は、基質巨大分子の制御下で進むと考えられている。即ち象牙質では主に I 型コラーゲンや BSP、リン酸化蛋白質といった非コラーゲン性蛋白質（文献 70）が、エナメル質では様々なリン

酸化した極めて特有のエナメル蛋白であるアメロジェニン(文献5)やアメロブラスチン(文献71-73)やエナメリン(文献74)が関係している。DSPPを含む、いくつかの象牙芽細胞に関連したマーカーの発現はレーザー照射により増強された。DSPPは骨では低レベルで発現しているが(文献75)、この遺伝子は成熟した象牙芽細胞に強く発現していると考えられている(文献8、76)。多種の細胞が混在しているので、多くの細胞がこれらの遺伝子を構成的に発現しているのか、あるいは未同定の一部の細胞群だけがこれらの遺伝子を発現しているのか決定するのは困難である。しかし、レーザー照射が歯乳頭細胞を含む歯胚間葉細胞の少なくともある細胞集団が象牙芽細胞に分化するのを促進したということが推測される。また歯の発生開始時には上皮の歯原性細胞が重要であるので、歯の再生初期のメカニズムには上皮細胞に対する影響と関連性があるかもしれない(文献1-4)。興味深いことに、アメロジェニンやアメロブラスチンの発現は増強しているのに対し、エナメリンやエナメライシン(MMP-20)は増強しなかった。近年、アメロジェニンが石灰化組織の形成時にシグナル分子として作用することが証明されたという研究報告がいくつかある(文献77-80)。例えば、ブタのエナメル蛋白混合物が歯根表面に沿ってセメント質形成を誘導することが示され、この活性因子がアメロジェニンだと同定されている(文献78)。またRT-PCR解析により、アメロジェニンのmRNA発現が、ラットの歯髓

や象牙芽細胞の cDNA ライブラリー（文献 79）やブタ象牙芽細胞で報告されている（文献 80）。このことは象牙芽細胞もまたアメロジェニンを発現していることを示唆している。それ故に、アメロジェニンは組織工学的な歯の再生においてシグナル分子として働いていることが考えられるが、分化促進に寄与する上皮や間葉細胞の活性化に関わる分子メカニズムについては未だ完全には解明されていない。また、アメロブラスチンはエナメル芽細胞の分化初期マーカー、エナメリンおよびエナメライシンは分化後期マーカーとして知られている（文献 80）。つまり、レーザー照射はエナメル芽細胞の分化初期に作用していることが示唆された。このことは、*in vivo* における実験結果とも一致し、移植 8 週後のエナメル質の組織形成は成熟しておらず極めて幼弱であることが分かる（図 16-A）。レーザー照射の実際の効果については、歯の再生時にいくつかの異なる出来事の組み合わせに関与していると思われる。これらの結果から、歯原性細胞の分化はレーザー照射により促進され、これらの細胞は初期の歯の基質産生を引き起こすことが示唆された。炭酸ガスレーザーによる照射は、骨に対する温熱効果が骨基質中の骨芽細胞や骨細胞に伝達する効果があると考えられている（文献 81-83）。これらの特性は、実験的な低リン酸化症で証明されているように、リン酸化酵素障害に対する歯の感受性の違いにおいて重要な要素であると考えられる（文献 84）。

象牙芽細胞は極めて極性化した細胞であり、石灰化する象牙質有機基質を合成する。それらは輸送の際に中心的な役割を果たし、石灰化前線にカルシウムを蓄積させる(文献 85)。特定のカルシウムブロッカーが劇的に象牙質へのカルシウムの取り込みを阻害するため、象牙質形成におけるカルシウム伝達経路は、細胞膜にあるカルシウムチャンネルに關与していると考えられている(文献 86)。カルシウムチャンネルの他に、ナトリウム、カリウムそして近年クロライドチャンネルが *in vitro* にて培養したヒト歯髓細胞や酵素処理によって単離された象牙芽細胞に認められている(文献 87、88)。さらに、*in vitro* において分化させたヒト象牙芽細胞に機械感受性の Kca チャンネルが発現している(文献 89)。これらのチャンネルは石灰化過程に關与している。要するに歯乳頭細胞の機械感受性はレーザー照射による刺激によって細胞分化が促進することに寄与しているであろうと思われる。

結論として、研究データからレーザー照射の ALP 活性レベルへの影響は、RNA レベルや蛋白質レベルの研究や *in vivo* 研究の結果と一致した。レーザー照射をした細胞を含む担体の形態は、移植 15 週後でも維持されていたが、照射をしていない細胞を含む担体は収縮していることが分かった。

本研究では、歯原性細胞の分化の開始は、細胞外基質の初期沈着とそれに続く石灰化であると考えられる。炭酸ガスレーザーの照射は *in vitro* において歯原

性細胞の分化を促進し、歯の初期の再生を誘導することが示唆された。

2-6 小括

レーザー照射を行うと歯原性細胞の細胞増殖、ALP 活性および蛋白質発現が増加するということが分かった。レーザー照射により、歯胚上皮および歯胚間葉由来細胞は歯に関連する特異的遺伝子の発現が増強されることが分かった。

すなわち、*in vitro* においてレーザー照射は歯原性細胞の増殖および分化を促進することが示唆された。

また、*in vivo* における研究結果から、単離した歯原性細胞へのレーザー照射により移植 8 週後に歯牙様組織が再生し、コントロール群に比較してエナメル質および象牙質形成の速度が促進されることがわかった。

総括

機械的刺激により、ALP 活性が増強し、細胞増殖には影響しないということが分かった。また、機械的刺激を与えた細胞から再生した組織が生体内において 15 週間で形成され、その組織はコントロール群に比較して大きかった。

従って、機械的刺激が培養歯胚細胞の分化を促進し、*in vivo* において歯の組織再生速度を早めることが示唆された。

レーザー照射を行うと歯原性細胞の細胞増殖、ALP 活性および蛋白質発現が増加するということが分かった。また、レーザー照射により、歯胚上皮および歯胚間葉由来細胞は歯に関連する特異的遺伝子の発現が増強されることが分かった。すなわち、*in vitro* においてレーザー照射は歯原性細胞の増殖および分化を促進することが示唆された。*in vivo* における研究結果から、レーザー照射により歯原性細胞から再生したエナメル質および象牙質形成速度が促進されることが分かった。

機械的刺激およびレーザー照射が培養した歯胚細胞の増殖・分化を促進し、*in vivo* において歯の組織再生を促進することが示唆された。

本研究において、組織工学的手法を用いた歯の再生を一步前進させることができたと考える。しかし、組織工学的手法を用いた歯の再生を臨床応用するた

めのさらなる研究が必要であると思われる。さらに今後は、最適なレーザー照射条件（出力・時間）及び移植条件（担体の種類・移植期間）を検討する必要があると思われる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜りました

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座 寺田 善博 教授

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座 永留 初實 先生

に深く感謝致します。また実験方法について御助言を賜りました

九州大学病院咬合補綴科 篠原 義憲 先生

はじめ教室員の皆様に心より御礼申し上げます。

参考文献

- [1] Thesleff I. Tooth morphogenesis. *Adv Dent Res* 1995;9:12.
- [2] Maas R, Bei M. The genetic control of early tooth development. *Crit Rev Oral Biol Med* 1997;8:4–39.
- [3] Thesleff I, Sharpe P. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* 1997;67:111–23.
- [4] Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* 2000;92:19–29.
- [5] Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M et al. Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol* 1995;39: 69–92.
- [6] Smith CE, Nanci A. Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol* 1995;39:153–61. M.J. Honda et al. / *Bone* 2006;39:125–133 131.
- [7] Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci* 1998;106(Suppl 1):282–91.

- [8] Couble ML, Farges JC, Bleicher F, Perrat-Mabillon B, Boudeulle M, et al. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. *Calcif Tissue Int* 2000;66:129–38.
- [9] Earthman JC, Sheets CG, Paquette JM, Kaminishi RM, Nordland WP, et al. Tissue engineering in dentistry. *Clin Plast Surg* 2003;30:621–39.
- [10] Chai Y, Slavkin HC. Prospects for tooth regeneration in the 21st century: a perspective. *Microsc Res Tech* 2003;60:469–79.
- [11] Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993;260:920-26.
- [12] Vacanti JP, Morse MA, Saltzman WM, Domb AJ, Perez-Atayde A et al. Selective cell transplantation using bioabsorbable artificial polymers as matrices. *J Pediatr Surg* 1988;23:3-9.
- [13] Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC. Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002;81:695-700.
- [14] Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistochemical studies of tissue engineered odontogenesis. *Arch Histol Cytol* 2005;68:89–101.

- [15] Yamamoto H, Kim EJ, Cho SW, Jung HS. Analysis of tooth formation by reaggregated dental mesenchyme from mouse embryo. *J Electron Microsc* (Tokyo) 2003;52:559–66.
- [16] Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res* 2004;83:518–22.
- [17] Hu B, Nadiri A, Bopp-Kuchler S, Perrin-Schmitt F, Lesot H. Dental epithelial histomorphogenesis in vitro. *J Dent Res* 2005;84:521–5.
- [18] Banes AJ, Link Jr GW, Gilbert JW, Tran Son Tay R, Monbureau O. Culturing cells in a mechanically active environment. *Am Biotechnol Lab* 1990;8:12–22.
- [19] Wang N, Butler JP, Ingber DE. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993;260:1124–7.
- [20] Kapur S, Baylink DJ, William Lau KH. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone* 2003;32:241–51.
- [21] Owan I, Burr DB, Turner CH, Qiu J, Tu Y, et al. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol* 1997;273:C810–5.

[22] Wadhwa S, Godwin SL, Peterson DR, Epstein MA, Raisz LG, et al. Fluid flow induction of cyclo-oxygenase 2 gene expression in osteoblasts is dependent on an extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. *J Bone Miner Res* 2002;17:266–74.

[23] Fukae M, Shimizu M. Studies on the proteins of developing bovine enamel. *Arch Oral Biol* 1974;19:381–6.

[24] Uchida T, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M, Yamada M, et al. Immunochemical and immunohistochemical studies, using antisera against porcine 25 kDa amelogenin, 89 kDa enamelin and the 13–17 kDa nonamelogenins, on immature enamel of the pig and rat. *Histochemistry* 1999;96(2):129–38.

[25] Yamakoshi Y, Tanabe T, Fukae M, Shimizu M. Porcine amelogenins. *Calcif Tissue Int* 1994;54:69–75.

[26] Snead ML, Zeichner-David M, Chandra T, Robson KJ, Woo SL, et al. Construction and identification of mouse amelogenin cDNA clones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:7254–8.

[27] Baba T, Terashima T, Oida S, Sasaki S. Determination of enamel protein synthesized by recombined mouse molar tooth germs in organ culture. *Arch Oral Biol* 1996;41:215–9.

- [28] Bronckers AL, Gay S, Finkelman RD, Butler WT. Developmental appearance of Gla proteins (osteocalcin) and alkaline phosphatase in tooth germs and bones of the rat. *Bone Miner* 1987;2:361–73.
- [29] Bronckers AL, Farach-Carson MC, Van Waveren E, Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Miner Res* 1994;9:833–41.
- [30] Helder MN, Bronckers AL, Woltgens JH. Dissimilar expression patterns for the extracellular matrix proteins osteopontin (OPN) and collagen type I in dental tissues and alveolar bone of the neonatal rat. *Matrix* 1993;13:415–25.
- [31] Xie Y, Sakatsume M, Nishi S, Narita I, Arakawa M, et al. Expression, roles, receptors, and regulation of osteopontin in the kidney. *Kidney Int* 2001;60:1645–57.
- [32] Miyazaki Y, Setoguchi M, Yoshida S, Higuchi Y, Akizuki S, et al. The mouse osteopontin gene. Expression in monocytic lineages and complete nucleotide sequence. *J Biol Chem* 1990;265:14432–8.
- [33] O'Regan AW, Chupp GL, Lowry JA, Goetschkes M, Mulligan N, et al. Osteopontin is associated with T cells in sarcoid granulomas and has T cell adhesive and cytokine-like properties in vitro. *J Immunol* 1999;162:1024–31.

- [34] Bosshardt DD, Zalzal S, McKee MD, Nanci A. Developmental appearance and distribution of bone sialoprotein and osteopontin in human and rat cementum. *Anat Rec* 1998;250:13–33.
- [35] Macneil RL, Sheng N, Strayhorn C, Fisher LW, Somerman MJ. Bone sialoprotein is localized to the root surface during cementogenesis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1597–606.
- [36] Butler WT, Bhowm M, Brunn JC, D'Souza RN, Farach-Carson MC, et al. Isolation, characterization and immunolocalization of a 53-kDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix* 1992;12:343–51.
- [37] Bronckers AL, D'Souza RN, Butler WT, Lyaruu DM, et al. Dentin sialoprotein: biosynthesis and developmental appearance in rat tooth germs in comparison with amelogenins, osteocalcin and collagen type-I. *Cell Tissue Res* 1993;272:237–47.
- [38] Ritchie HH, Berry JE, Somerman MJ, Hanks CT, Bronckers AL, et al. Dentin sialoprotein (DSP) transcripts: developmentally-sustained expression in odontoblasts and transient expression in pre-ameloblasts. *Eur J Oral Sci* 1997;105:405–13.
- [39] Gu K, Chang S, Ritchie HH, Clarkson BH, Rutherford RB. Molecular cloning of a human dentin sialophosphoprotein gene. *Eur J Oral Sci* 2000;108:35–42.

- [40] Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev* 1999;13:3037–51.
- [41] Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89:747–54.
- [42] Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997;89:755–64.
- [43] Wang XP, Aberg T, James MJ, Levanon D, Groner Y, et al. *Runx2 (Cbfa1)* inhibits *Shh* signaling in the lower but not upper molars of mouse embryos and prevents the budding of putative successional teeth. *J Dent Res* 2005;84:138–43.
- [44] Chen S, Rani S, Wu Y, Unterbrink A, Gu TT, et al. Differential regulation of dentin sialophosphoprotein expression by *Runx2* during odontoblast cytodifferentiation. *J Biol Chem* 2005;280:29717–27.
- [45] Dhamija S, Krebsbach PH. Role of *Cbfa1* in ameloblastin gene transcription. *J Biol Chem* 2001;276:35159–64.
- [46] Henthorn P, Millan P, Leboy P. In: Seibel MJ, Robins SP, Bilezikian JP, editors. *Principles of Bone Biology*. San Diego: Academic; 1999. p. 127–36.
- [47] Terao M, Mintz B. Cloning and characterization of a cDNA coding for mouse

placental alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:7051–5.

[48] Warren RC, McKenzie CF, Rodeck CH, Moscoso G, Brock DJ, et al. First trimester diagnosis of hypophosphatasia with a monoclonal antibody to the liver/bone/kidney isoenzyme of alkaline phosphatase. *Lancet* 1985;2:856–8.

[49] Hoshi K, Amizuka N, Oda K, Ikehara Y, Ozawa H. Immunolocalization of tissue non-specific alkaline phosphatase in mice. *Histochem Cell Biol* 1997;107:183–91.

132 M.J. Honda et al. / *Bone* 39 (2006) 125–133

[50] Hotton D, Mauro N, Lezot F, Forest N, Berdal A. Differential expression and activity of tissue-nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) in rat odontogenic cells in vivo. *J Histochem Cytochem* 1999;47:1541–52.

[51] Spoto G, Fioroni M, Rubini C, Tripodi D, Di Stilio M, et al. Alkaline phosphatase activity in normal and inflamed dental pulps. *J Endod* 2001;27:180–2.

[52] Duncan RL, Turner CH. Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif Tissue Int* 1995;57:344–58.

[53] Pavasant P, Yongchaitrakul T, Pattamapun K, Arksornnukit M. The synergistic effect of TGF-beta and 1,25-dihydroxyvitamin D3 on SPARC synthesis and alkaline phosphatase activity in human pulp fibroblasts. *Arch Oral Biol* 2003;48:717–22.

[54] Alliot-Licht B, Bluteau G, Magne D, Lopez-Cazaux S, Lieubeau B, et al. Dexamethasone stimulates differentiation of odontoblast-like cells in human dental pulp cultures. Cell Tissue Res 2005;321:391-400.

[55] 梅本寛. Laser Dentistry Perfect Guide : 2009; ゼニス出版、東京.

[56] Loh Hong Sai. レーザーの特性および安全性 - 歯科レーザーの臨床. 歯界展望 1994;83:15-18.

[57] 歯科機器・用品年鑑. 2005-2006 年版. 愛知:(株)アール アンド ディ、2005.

[58] ADVANCED PROFICIENCY TUTORIAL SYLLABUS. Academy of Laser Dentistry. 2001.

[59] 加藤純二、守矢佳世子、栗津邦男. レーザー図鑑. 2008 医歯薬出版株式会社、東京.

[60] 横瀬敏志. 歯科における炭酸ガスレーザー治療の基礎と臨床. 日本歯科評論 (通刊第 742 号) The NIPPON Dental Review Vol. 64:No. 8:2004-8.

[61] 下川公一. 再生における CO₂ レーザーの有効性とその概念. 補綴臨床 2006; 39.

[62] 大城俊夫. 眼瞼・結膜疾患. 眼科学大系 5B 中山書店.

[63] Honda MJ, Sumita Y, Kagami H, Ueda M. Histological and immunohistological studies of tissue engineered odontogenesis. Arch Histol Cytol 2005; 68: 89-101.

[64] 塩崎洋堂. ラット骨組織における炭酸ガスレーザー照射の骨誘導作用についての形態学的研究. 日本歯科保存学雑誌 2006;49:375-86.

[65] Hsu SM, Raine L, Fanger HH. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem 1981;29:577-80.

[66] Chen L, Zhang Q, McCulloch CAG, Sodek J. Immunohistochemical localization of bone sialoprotein (BSP) in fetal porcine bone tissues: comparisons with secreted phosphoprotein I (SPPI, osteopontin) and SPARC (osteonectin). Histochem J 1991;23:281-9.

[67] Webb PP, Moxham BJ, Ralphs JR, Benjamin M. Cytoskeleton of the mesenchymal cells of the rat dental papilla and dental pulp. Connect Tissue Res 1995;32:71-6.

- [68] Iwasaki H, Isayama T, Ichiki T, Kikuchi M. Intermediate filaments of myofibroblasts. Immunochemical and immunocytochemical analyses. *Pathol Res Pract* 1987;182:248–54.
- [69] Diaz-Flores L, Gutierrez R, Varela H, Rancel N, Valladares F. Microvascular pericytes: a review of their morphological and functional characteristics. *Histol Histopathol* 1991;6:269–86.
- [70] Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 1995;39:169–79.
- [71] Cerny R, Slaby I, Hammarstrom L, Wurtz T. A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. *J Bone Miner Res* 1996;11:883–91.
- [72] Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM, et al. Fulllength sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. *J Biol Chem* 1996;271:4431–5.
- [73] Nanci A, Zalzal S, Lavoie P, Kunikata M, Chen W, et al. Comparative immunochemical analyses of the developmental expression and distribution of ameloblastin and amelogenin in rat incisors. *J Histochem Cytochem* 1998;46:911–34.

- [74] Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, et al. Cloning and characterization of porcine enamelin mRNAs. *J Dent Res* 1997;76: 1720–9.
- [75] Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigiwa H, et al. The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 2002;81:392–4.
- [76] D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, et al. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 1997;12:2040–9.
- [77] Papagerakis P, MacDougall M, Hotton D, Bailleul-Forestier I, Oboeuf M, et al. Expression of amelogenin in odontoblasts. *Bone* 2003;32: 228–40.
- [78] Hammarstrom L, Heijl L, Gestrelus S. Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997;24:669–77.
- [79] Veis A, Tompkins K, Alvares K, Wei K, Wang L, et al. Specific amelogenin gene splice products have signaling effects on cells in culture and in implants in vivo. *J Biol Chem* 2000;275:41263–72.

- [80] Nagano T, Oida S, Ando H, Gomi K, Arai T, et al. Relative levels of mRNA encoding enamel proteins in enamel organ epithelia and odontoblasts. *J Dent Res* 2003;82:982–6.
- [81] Trellas MA, Mayano E. Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med* 1987;7:36-45.
- [82] Aneroth G, Hall G, Ryden H, Zetterqvist L. The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1988;26 :12-7.
- [83] Braverman B, McCarthy RJ, Ivankovich AD, Forde DE. Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg Med* 1989;9:50-8.
- [84] Whyte MP, Landt M, Ryan LM, Mulivor RA, Henthorn PS, et al. Alkaline phosphatase: placental and tissue-nonspecific isoenzymes hydrolyze phosphoethanolamine, inorganic pyrophosphate, and pyridoxal 5'-phosphate. Substrate accumulation in carriers of hypophosphatasia corrects during pregnancy. *J Clin Invest* 1995;95:1440–5.
- [85] Linde A, Lundgren T. From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Dev Biol* 1995;39:213–22.

[86] Lundgren T, Linde A. Voltage-gated calcium channels and nonvoltagegated calcium uptake pathways in the rat incisor odontoblast plasma membrane. *Calcif Tissue Int* 1997;60:79–85.

[87] Davidson RM. Potassium currents in cells derived from human dental pulp. *Arch Oral Biol* 1993;38:803–11.

[88] Guo L, Davidson RM. Potassium and chloride channels in freshly isolated rat odontoblasts. *J Dent Res* 1998;77:341–50.

[89] Allard B, Couble ML, Magloire H, Bleicher F. Characterization and gene expression of high conductance calcium-activated potassium channels displaying mechanosensitivity in human odontoblasts. *J Biol Chem* 2000;275:25556–61.