

学位研究紹介

Er:YAGレーザーを用いた窩洞形成後の 歯髄反応に関する免疫組織化学的研究 Immunohistochemical study on pulpal response in rat molars after cavity preparation by Er:YAG laser

新潟大学歯学部歯科保存学第一講座

田辺啓太

Department of Operative Dentistry and
Endodontics, Faculty of Dentistry,
Niigata University, Niigata, Japan
Keita Tanabe

目 的

窩洞形成の為に器具として主に電気エンジン、エアタービン等が用いられているが、近年では回転切削器具特有の不快感や振動の少ないレーザーの応用が注目されている。レーザーを用いた齶蝕治療の歴史は古く1960年代まで遡るが、実際に天然歯において窩洞形成、特にエナメル質蒸散を可能にしたレーザーはEr:YAGレーザーが登場してからである。Er:YAGレーザーはその波長(2.94 μm)から特に水分への吸収が強く特に生体中の硬組織蒸散性の高いレーザーである。そのことから窩洞形成に対して有効であり臨床試用も行われている。しかし、レーザー光の生体作用は、エネルギーの大小だけではなくエネルギー密度やレーザー光の波長密度も強く影響するので、レーザー光の歯髄に対する作用はきわめて複雑であると考えられる。

これまで、Er:YAGレーザーにて窩洞形成を行い歯髄反応を観察した報告は多数存在するが、それらの報告は病理組織学的検索に留まっているのが現状であり、免疫組織化学的に詳細に検索を行った報告は現在のところ認められない。そこで本研究では、従来のバーを用いた歯の切削とEr:YAGレーザーを用いた歯質の蒸散による歯髄反応を比較検討する目的で、アルカリ性ホスファターゼの局在の変化について経時的に観察を行った。また細胞の損傷に伴うDNA断片化をTUNEL法を用いて検索し、さらにMHC Class II抗原提示細胞ならびに神経線維の動態についても免疫組織化学的に観察を行った。

材料と方法

実験動物には8週齢Wistar系雄ラットを使用し、レーザー照射群と電気エンジン群の2群に分けた。上顎第一臼歯近心面に照射エネルギー70mJ, 5ppsにてEr:YAGレーザー装置(Erwin; HOYA, MORITA共同開発)ならびに電気エンジンに装着した#1/2タングステンカーバイドラウンドバーを用いそれぞれ注水下にて深さ約0.4mmの皿状窩洞を形成し、形成直後、6時間、12時間、1日、3日、および7日経過後に4%パラホルムアルデヒド混合固定液にて灌流固定を行った。その後5%EDTAにて2週間脱灰を行い試料をそれぞれ2つに分け、1つは通法によりパラフィン包埋を行い厚さ5 μmのパラフィン切片を作成し、残りは厚さ25 μmの凍結切片を作成した。パラフィン切片は酵素抗体法により組織非特異的アルカリ性ホスファターゼ(TNAP)の局在の観察、ならびにTUNEL法によるDNA断片化の検出を行った。凍結切片はクラスII抗原提示細胞ならびに神経線維の局在を観察するため、それぞれOX6モノクローナル抗体、抗PGP9.5ポリクローナル抗体を用いて蛍光抗体法にて二重染色をほどこし蛍光顕微鏡にて観察を行った。

結果と考察

組織学的検索では、全実験期間を通してレーザー、バー両群共にほぼ同様の所見を示した。すなわち、窩洞形成直後にはレーザー、電気エンジン群共に傷害された象牙芽細胞層の剥離が認められその配列は不規則となっており、6時間後でもレーザー、電気エンジン群共に象牙芽細胞層は窩洞形成直後とほぼ同様の所見が観察された。また窩洞形成後3日目よりレーザー、電気エンジン群共に2次象牙質の形成が観察された。

TNAP染色ではレーザー、バー群共に窩洞形成直後から窩洞形成相当部位の象牙芽細胞下層に陽性反応が出現し、さらにレーザー群では象牙芽細胞層周囲の歯髄組織にも強い陽性反応が観察された。この陽性反応の差は6時間後にはさらに広がり顕著な差となって観察された。(写真1)その後バー群においても陽性反応は徐々に拡大し、7日後にはレーザー、バー両群共に窩洞形成相当部位を中心とした広範囲な反応として観察された。

DNA断片化はレーザー、バー群共に窩洞形成直後には観察されなかったが、12時間後からレーザー、バー群共に窩洞形成相当部の象牙芽細胞層周辺に観察されるようになった。しかしバー群の場合7日後でもTUNEL陽

性細胞が認められたのに対して、レーザー群の場合では3日目以降、陽性細胞は観察されなかった。

一方、OX6陽性細胞は、レーザー、バー群共に12時間後に細胞突起の象牙細管への侵入が認められた。さらに3日後より象牙芽細胞層を中心として多数のOX6陽性細胞が観察された。PGP9.5による染色では、レーザー、バー群共に3日目からPGP9.5陽性神経線維の集束が窩洞形成相当部に現れ始め、7日目には、数珠状を呈する神経線維の明らかな集束像が観察された。また、一部の神経線維は窩洞形成相当部位の象牙芽細胞層にも観察された。

以上よりEr:YAGレーザーにて窩洞形成後の歯髄反応はTNAP染色において、Er:YAGレーザー群で窩洞形成直後から強く広範囲な反応が観察された。この反応はパルス波レーザー特有の硬組織蒸散時に発生する圧力波の影響を受けている可能性が考えられる。また、TUNEL法では、レーザー、バー両群共に歯髄組織に陽性細胞が観察され、Er:YAGレーザーで窩洞形成を行った場合に

においても、歯髄組織に細胞損傷が起こっている事が示唆された。さらに、OX6, PGP9.5を用いた免疫組織化学的検索では、窩洞形成後の免疫担当細胞の局在ならびに神経線維の修復過程においてレーザー、バー共に同様の反応が観察される事が明らかとなった。

結 論

本研究の結果から、Er:YAGレーザーを用いた窩洞形成後の歯髄反応は、組織学的には従来のバーを用いた場合と同様の所見を示すが免疫組織化学的には、特に窩洞形成後初期において若干異なる反応を示す事が明らかになった。しかし、両者の反応は経時的に近似して観察される様になる事から、回転切削器具特有の不快な振動、騒音を発生しないEr:YAGレーザーによる窩洞形成の有用性が示唆された。

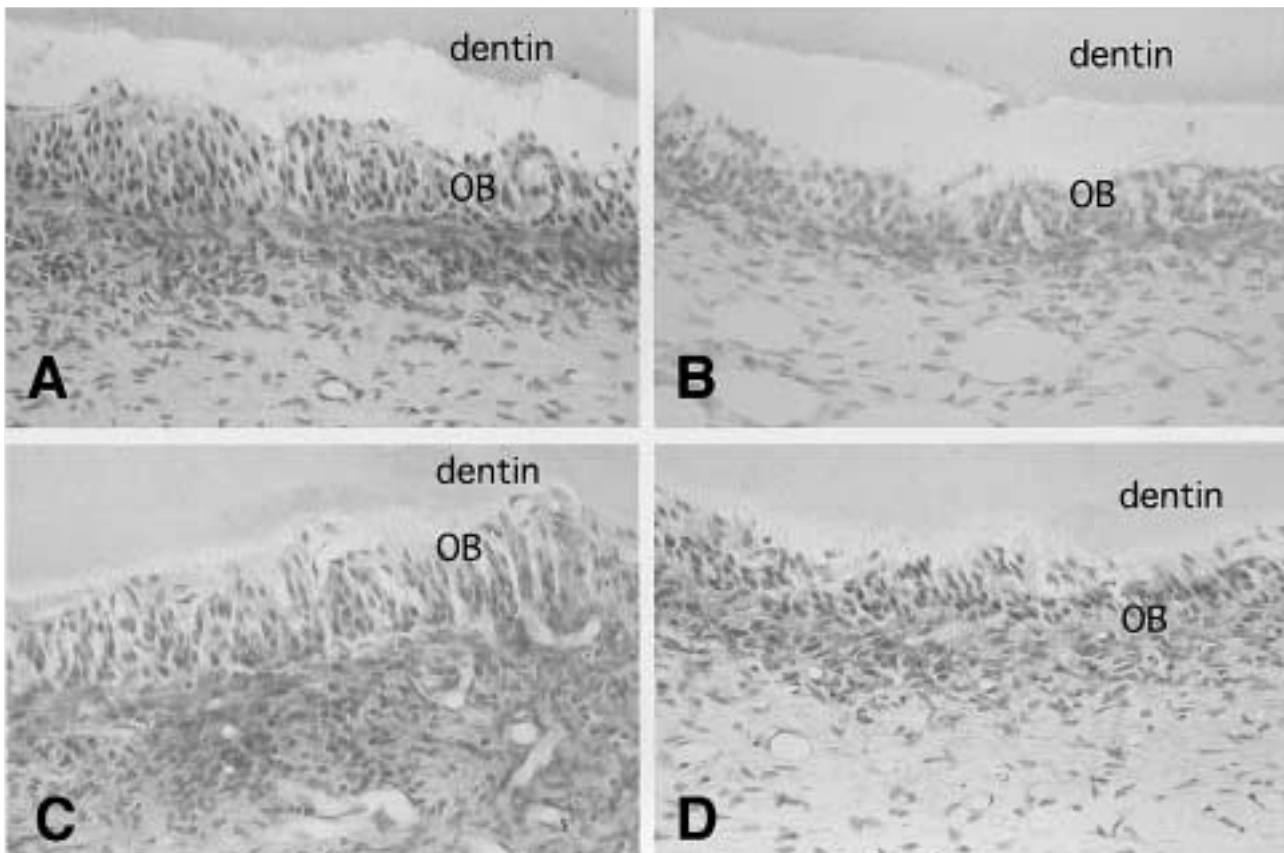


写真1 窩洞形成後のTNAP局在。A: Er:YAGレーザー群窩洞形成直後 B: 電気エンジン群窩洞形成直後 C: Er:YAGレーザー群窩洞形成6時間後 D: 電気エンジン群窩洞形成6時間後 OB, 象牙芽細胞層