

非熱的大気圧プラズマがヒト乳歯歯髓由来線維芽細胞に与える影響について

大阪歯科大学・歯学部・小児歯科学講座
青木 翔、原 直仁、奥野真江、原田京子、有田憲司

【目的】

近年、非熱的大気圧プラズマ(Non-Thermal Atmospheric Pressure Plasma: NTAPP)を医療へと応用する「プラズマ医療」が注目されており、がん治療、創傷治癒および遺伝子導入等に有効であると報告されている。歯科領域においてもプラズマ医療の臨床応用が期待されるが、口腔周囲組織への直接的なプラズマ応用に関する報告は少なく、ヒト乳歯歯髓由来線維芽細胞(human deciduous dental pulp fibroblast-like cells: hDDPF)が感知できる活性種の種類やその機構に関しては、未だ不明な点が多い。

本研究では、hDDPFに対するNTAPPの影響について解析を進めることを目的として、まずはhDDPFに対する有効なNTAPP発生条件を検討し、NTAPP照射による細胞増殖能および未分化能の変動について解析を行った。

【方法】

1) 培養細胞

hDDPFは、歯根が2/3以上残存している齲蝕のない乳歯から採取し、実験には3~8継代した細胞を用いた。

2) NTAPP照射

NTAPPは、大気圧マルチガスプラズマ発生装置ピエゾブラシュ2(TDK corp.) (図a)を用い、ヘリウム(2.5L/min)、照射距離20mmで行った。(図b)

図a

図b



3) 細胞増殖能検討

24 well プレートにhDDPF (2×10^4 個/ml)を播種し、37°C 5%CO₂下で5日間培養を行った後、NTAPP照射を行った。照射時間を、10, 20, 30, 40, 50, 60 秒間、また、それぞれの照射時間について照射回数を1, 2, 3回(1回/1時間)とした。照射後、37°C 5%CO₂下で3日間培養し、MTS試薬(Promega Corp. Madison, WI)を添加後、マイクロプレートリーダーM50Siにて490nmの吸光度を測定した。(図1)

また、プラズマによって生成された活性種が培養液に取り込まれ、その培養液が細胞に影響を与える可能性が報告されていることから、hDDPF増殖活性がみられたNTAPP照射が、細胞培養液に与える影響について検討を行った。(図2)

4) 遺伝子発現解析

24 well プレートにhDDPF (2×10^4 個/ml)を播種し、37°C 5%CO₂下で5日間培養後、NTAPP照射を行った。照射後、37°C 5%CO₂下で3日間培養の後にcDNAを抽出し、Applied Biosystem Step One Plus (Thermo Fisher Scientific K.K.)を用いてReal Time PCRを行った。プライマーはOct3/4, Sox2, Nanog (Thermo Fisher Scientific)を用い、指標としてGAPDHを使用した。(図3)なお、本研究は「本学医倫理委員会」の承認を得て行った。(大歯医倫理AP0000529248)

【結果】

- 1) NTAPP照射時間30秒、照射回数1回の群において細胞増殖能の活性化が認められた。(n=4)

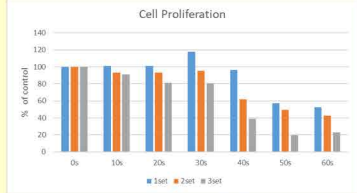


図1: NTAPPによる細胞増殖能の活性化

- 2) 細胞および培養液の両方に照射(30秒1回)を行った群において、最も細胞増殖能の活性化が認められた。(n=4)

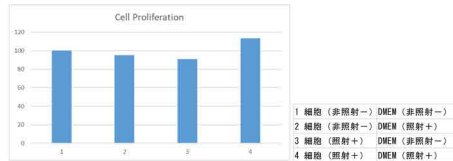


図2: NTAPP照射による培養液への影響

- 3) 照射群(30秒1回)において、代表的な幹細胞マーカー(Oct3/4, Sox2, Nanog)の発現増加が認められた。



図3: PCRによる遺伝子発現の変化

【考察】

NTAPPを30秒間1回照射することにより、hDDPFの細胞増殖能の活性化が促進され、それ以上の過度な照射は細胞が不活化されることが明らかとなった。また、NTAPP照射は、細胞だけでなく培養液にも照射を行うことが有効であり、細胞増加とともに幹細胞マーカーの上昇も確認された。

以上の結果より、低出力によるNTAPP照射がhDDPFに有効であり、幹細胞療法に必要な細胞数を確保するなど、再生医療のための効果的な方法となる可能性が示唆された。

【COI開示】 演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業などはない。