

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20644

研究課題名(和文) 歯周組織の代謝活性作用を有するレーザーを応用した先進的矯正治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of advanced orthodontic treatment using laser having metabolic activity of periodontal tissue

研究代表者

柄 優至 (Tsuka, Yuji)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：50737682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本実験により、半導体レーザー照射を矯正的な歯の移動時に使用することで、歯の移動が促進することが細胞レベルおよび動物実験レベルで実証された。また、細胞レベルおよび動物実験レベルではあるが、最適または適正照射量の解明ができ、レーザー照射により組織代謝の亢進が起こっていることがわかった。このことがより発展していけば、矯正歯科治療中に歯周組織の破壊を予防または抑制しながら、より安全な歯科矯正治療を行うことができる。

研究成果の概要(英文)： This experiment demonstrated that the use of semiconductor laser irradiation during orthodontic treatment promotes tooth movement at the cellular level and animal experimental level. Although it is at the cell level and at the animal experimental level, it was found that the optimal or proper dose can be elucidated, and the tissue irradiation is enhanced by laser irradiation. If this develops further, it is possible to carry out safer orthodontic treatment while preventing or suppressing the destruction of the periodontal tissue during orthodontic treatment.

研究分野：orthodontic

キーワード：laser tooth movement Bone metabolism

1. 研究開始当初の背景

近年、不正咬合や顎変形症などの改善を目的として、成人における矯正歯科治療のニーズが高まり、成人患者の割合は増加傾向にある。しかしながら、若年者に比較して、成人では歯周疾患の罹患率が高いことに加えて、通学や勤務のため長期の治療が困難であるなどの多くの社会的制約が存在する。成人症例においては、歯周疾患や加齢により歯槽骨レベルが減少していることに加えて、健康な歯周組織であっても歯の移動に伴う歯槽骨の十分な支持が得られず、鼓形空隙の増加(ブラケットライアングル)が生じる場合がある。また、若年者に比較して成人では歯周組織の代謝が、減少しているため、歯の移動が遅い。さらに、勤務等のため長期の治療が困難である場合もある。以上の背景から、矯正歯科治療において、健全な歯周組織の維持するとともに、歯の移動を亢進し、治療の効率化を図ることは、矯正歯科分野における重要な課題である。

以前より、歯の移動促進の対応策の一つとして、外科手術を併用した矯正歯科治療(コルチコトミー)の有効性が示唆されてきた。コルチコトミーは、歯槽骨表層の皮質骨に切開を加える術式であり、歯の移動効率を亢進し、矯正歯科治療期間を約 30-50%短縮させることが報告されている。しかしながら、外科的侵襲を伴うため、痛みや治癒不全および感染等の危険性も否めない。そして、コルチコトミーには歯槽骨量を増加させる効果は認められない。

一方、レーザーは励起状態にある物質の誘導放射により発生された特定の電磁波であり、その波長により様々な特徴を有するため近年、医療分野に広く応用されておりその有効性が報告されてきた。現在、歯科医療分野においては主に半導体、Nd-YAG、Er-YAG、CO₂ レーザーが使用されており、疼痛緩和、根管治療および歯周治療などの歯科治療に応用されている。しかしながら、波長や出力量により、組織に及ぼす影響が異なる。また、実際に生体内でどのような機序で代謝が促進されているのかは立証されておらず、科学的根拠に基づいた治療(Evidence-Based-Medicine; EBM)には至っていない。近年、整形外科分野において、非侵襲性であり透過性の高い波長 750 - 900 nm 付近のレーザーを応用した骨折の治癒促進効果が報告された。さらに、臨床研究において、半導体レーザー照射による歯移動の加速が報告された (Doshi-Mehta G et al., Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2012)。しかしながら、歯周組織の代謝や歯の移動に対するレーザー照射の影響について詳細な検証やレーザーの最適出力、波長および照射の条件について検討された報告は少ない。

申請者は、組織透過性の高いレーザーに着目し、歯周組織構成細胞に対する細胞増殖・分化に対する影響について検証を重ねてき

た。これまでの検討により Nd-YAG レーザーの低出力照射は骨芽細胞の細胞増殖能を亢進させることを明らかにした。また、ラットを用いた動物実験では、実験的歯の移動時に Nd:YAG レーザー照射をすることで、圧迫側歯根膜における receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) および アルカリフォスファターゼ (ALP) 発現が亢進することが明らかとなった。そして、Nd-YAG レーザー照射はラットの実験的歯の移動を促進させることを解明した (Tsuka Y et al., Laser Med Sci, 2015)。しかしながら、Nd-YAG レーザーは副作用として多量の熱が産生されるため、組織表面が熱により損傷を招くため、実際に臨床応用するのは困難であった。近年、パルス幅を短い間隔に設定することで、表面組織に熱損傷を生じることなく、組織深部にエネルギーを供給させる半導体レーザーの開発が進み、レーザーの効果を高めることが可能となった。我々は、この半導体レーザーに着目し、予備的な検証を行ってきた。これまでの検討により、半導体レーザー照射は歯髓細胞の細胞増殖や骨分化能を増加させることを解明し、これらの研究結果は、優秀発表論文として誌上に掲載された (國松, 柄ら, 日レ歯誌, 2015)。

以上の背景より、レーザーを併用することで、矯正歯科治療における歯の移動をより促進させる可能性があるものと考えられる。さらに、レーザーの歯周組織への適用により、歯槽骨に加えてセメント質も含めた歯周組織全体の誘導効果が期待されることから、レーザーを併用した新たな治療法の確立を目指す本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、医療用機器として用いられている組織透過性の高い半導体レーザーに着目し、歯の移動時の歯周組織代謝に対するレーザーの効果を検証し、レーザーを併用することにより矯正歯科治療の効率化が達成されるか否かを明らかにすることを目的とする。さらに、歯周疾患を有する矯正治療患者に対して半導体レーザーを応用することで、歯周組織全体の誘導効果があるか否かを検証する。これにより先進的でより安全な矯正歯科治療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

実験 1 レーザ照射が歯周組織構成細胞の代謝に及ぼす影響についての検討

本研究では、2種類の半導体レーザー Lumix 2, USA Laser Biotech Inc (波長 910 nm) およびユニタック製半導体レーザー (波長 650 - 2000 nm まで依頼し作製可能) を使用する。細胞にはヒト骨芽細胞株 (Saos2)、ヒトセメント芽細胞株 (HCEM)、ヒト歯根膜細胞株 (HPL)、マウス由来破骨細胞株 (RAW 264.9)、ヒト肉肉上皮細胞株 (HOK) を用いて以下の検討を行う。なお、レーザー照射については、

Holderら (J Dent Res, 2012, 91; 961-66) の方法に準拠することとする。

歯周組織培養細胞における細胞増殖能の検討

各培養細胞を播種し、0.1 W~2.0 Wの条件でレーザー照射を行う。レーザー照射後の培養細胞の細胞増殖への影響について、MTS assay (Promega)、ELISA BrdU assay (Roche Diagnostics) および WST-8 assay (同仁化学) を用いて解析する。さらに、生細胞イメージングシステム IncucyteTMZOOM (ESSEN bioscience) を用いて、レーザー照射による各細胞増殖時の動態的变化を検討するとともに、細胞遊走能を解析する。

細胞の基質代謝能に対するレーザー照射の影響についての検討

各細胞の基質代謝能の検討では、0.1 W~2.0 Wのレーザー照射後の骨代謝マーカーとして ALP、Bone sialo protein (BSP)、骨吸収マーカーとして RANKL、Osteoprotegerin (OPG) 成長促進因子として TGF- β (Transforming Growth Factor)、IGF (Insulin-like Growth Factor) の発現レベルについて現有の定量 PCR (Light cycler 350S) を用いた遺伝子解析を行う。また現有の Odyssey® (LI-COR Bioscience) と今回申請の Western blot プロセッシング装置 (BenchPro® 4100, Invitrogen) および Western blot ゲル転写装置 (iBlot® 2Gel Transfer Device) を用いた定量 Western blot 解析を行う。さらに、ALP 活性および培養液中の Ca レベルを定量評価し、アリザリンレッド染色法およびバンコッサ染色法を用いて石灰化能の検討を行う。

実験 2 歯周組織構成細胞におけるシグナル伝達機構の解明

近年、半導体レーザーなどの 600-1200 nm の波長は、細胞内のミトコンドリアのシトクロム酸化酵素に反応し、エネルギーが伝達されることで ATP、NO および NADH の産生が亢進すること (J Dent Res, 2012, 91; 961-66) が報告されている。また、炭酸ガスレーザーが細胞内のリン酸化を促進することや、Er:YAG レーザーが MAPK/ERK 経路の活性化をすること (Lasers Med Sci, 2010, 25: 559-69) などが報告されている。本研究では、各培養細胞を用いて、レーザー照射後のシグナル伝達機構を特定する。半導体レーザー照射が細胞内伝達物質に及ぼす変化について検討を行う。各培養細胞に半導体レーザー照射を行い、ATP determination Kit (Invitrogen) を用いて ATP 産生の変化を検討する。また、NO の生成を Nitric Oxide Assay Kit (abcam) を用いて検証するとともに NADH の産生について NAD/NADH assay (abcam) を用いて検討する。そして、MAPK/MEK シグナル伝達経路の中間経路として知られる MAPK/ERK 1/2、p38 MAPK および SAPK/JNK のリン酸化について現有の Odyssey® (LI-COR Bioscience) と今回申請の BenchPro® 4100 (Invitrogen) および iBlot® 2Gel Transfer Device (Invitrogen)

を用いた定量 Western blot 解析を行う。また、下流の経路として細胞核内の ELK のリン酸化についても検討する。さらに、MAPK/ERK 1/2 阻害剤である U0126、SAPK/JNK 阻害剤である SP600125、p38 MAPK 阻害剤である SB203580 を用いて、詳細なシグナル伝達機構の経路を検証する。

実験 3 動物実験による検討

人為的な歯の移動 ラットの上下顎門歯と第一臼歯間にクロズドコイルを装着し、門歯を固定源として第一臼歯を近心に移動させる。なお、半導体レーザーは非常に透過性が強いので、レーザー照射群と非照射群は別個体を使用する。

歯槽骨レベル低下モデルの作製 腹腔内麻酔下でラットの第一臼歯周囲の歯肉を切開および剥離し、ダイヤモンドポイントを使用し、第一臼歯周囲の骨を約 1 mm 切削しその後、縫合しこれを歯槽骨レベル低下モデルとする。歯の移動のみ行った群、歯の移動とレーザー照射を行った群、歯槽骨レベル低下モデルに歯の移動を行った群および歯槽骨レベル低下モデルに歯の移動とレーザー照射を行った群を設定し検討を行う。

4. 研究成果

我々の実験の結果、実験 1 および 2 の部分に関しては、マウスの頭蓋骨骨芽細胞 (MC3T3-E1) に 2.85J / cm² の線量でのスーパーパルスレーザー照射は、細胞遊走能が亢進し、MAPK / ERK1 / 2 のリン酸化が誘導され、15 分後に 30 分後に MAPK / ERK1 / 2 のリン酸化が誘導されたことを確認した。つまり MAPK / ERK シグナル伝達を介して MT3T3-E1 細胞の細胞分裂および移動を増加させたことがわかった。これは 2017 年に Lasers Med Sci (Kunimatsu R, Gunji H, Tsuka Y, et.al) に受理された。実験 3 の部分に関しては、ラットの人為的歯の移動に、スーパーパルスレーザー (半導体) 照射を行い検討したところ、歯の移動が促進され、組織学的にも圧迫側で TRAP 陽性細胞が増加し、牽引側でも ALP および PCNA の増加が確認された。このことは歯の移動時に半導体レーザー照射が影響し、骨代謝を促進している可能性が示唆された。この内容は 2018 年に Laser Sur Med (Gunji H, Kunimatsu R, Tsuka Y, et.al) に受理された。また、歯槽骨レベル低下モデルについては、簡易作成が困難であったため、半導体レーザーではなく、組織表面吸収型レーザーである Er:YAG レーザーを使用し、切開とレーザー照射を兼ねて歯の移動に対する検討を行った。その結果、歯の移動は亢進され、組織学的にも圧迫側で TRAP 陽性が増加し、牽引側で ALP の増加が認められ、骨代謝が亢進されたことが確認された。この内容は 2018 年に J Oral Sci (Tsuka Y, Kunimatsu R, Gunji H) に受理された。今後も、さらなる実験が必要と考えられる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Gunji H, Kunimatsu R, Tsuka Y, Yoshimi Y, Sumi K, Awada T, Nakajima K, Kimura A, Hiraki T, Hirose N, Yanoshita M, Tanimoto K (2018) Effect of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on periodontal tissues during experimental tooth movement in rats. *Laser Sur Med*. 2018 Feb 5. doi: 10.1002/lsm.22797. 査読有
2. Kunimatsu R, Gunji H, Tsuka Y, Yoshimi Y, Awada T, Sumi K, Nakajima K, Kimura A, Hiraki T, Abe T, Naoto H, Yanoshita M, Tanimoto K (2018) Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on the proliferation and migration of mouse calvarial osteoblasts. *Lasers Med Sci*. 2018 Jan 4. doi: 10.1007/s10103-017-2426-0. 査読有
3. Tsuka Y, Kunimatsu R, Gunji H, Nakajima K, Hiraki T, Nakatani A, Tanimoto K: Molecular biological and histological effects of Er:YAG laser irradiation on tooth movement. *J Oral Sci*, 2018, in press. 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柄 優至 (Tsuka Yuji)
広島大学・病院・歯科診療医

研究者番号：50737682

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()