

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862012

研究課題名(和文) GCFおよびPMICFを用いた矯正力に対する生体反応の検出

研究課題名(英文) Comparison of levels of inflammatory mediators and bone metabolic markers in GCF and PMICF during orthodontic treatment

研究代表者

三原 聖美 (Mihara, Kiyomi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00551920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：動揺を認める矯正用アンカースクリュー(実験群)から採取したPMICFをコントロールと比較した結果、IL-6, IL-8, MMP8, MMP9で顕著な上昇を認めた。TIMP2についても有意な値の上昇を認めた。一方、IL-1, TIMP1については顕著な差を認めなかった。IL-2, PICP, ICTP, NTxについてはサンプル数が少なく、実験群、コントロール群ともに値の検出ができなかった。今回の研究では収集できたサンプルが少なかったが、サンプル数を増やし、さらには経時的にPMICFを採取し、炎症と骨代謝マーカーの変遷について検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：For each subject, anchor screw for orthodontic treatment wick loosened, and contralateral and antagonistic anchor screw without movement served as controls.

Significant differences showed between experimental and control groups for IL-6, IL-8, MMP8, MMP9. TIMP2 had difference between experimental and control groups. No differences demonstrated between experimental and control groups for IL-1, TIMP1.

IL-2, PICP, ICTP, NTx could't detect because of little number of the sample.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：PMICF

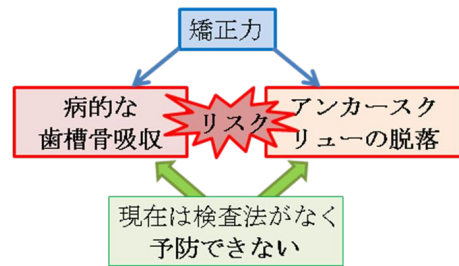
1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療の主たる目的の1つに歯を移動することが挙げられる。移動中の歯の周囲組織では初期反応として炎症反応が起こり、引き続き骨吸収、骨添加(骨代謝)が起こる。しかし、現在これらの動態を分子生物学的に把握し、予後を判定するような検査方法は確立されていない。

歯および歯周組織(骨、歯根膜、歯肉)に施行した歯科治療の予後を判定する項目として、日常的におこなわれているのは、臨床症状の有無、患者の自覚症状の確認である。しかし、これらの一般的診査項目のみでは、組織内で起こっている治癒機転や改造現象を組織学的、生化学的、ならびに分子生物学的に評価しているとは言い難い。これらを定量的に評価するためには、組織片を採取する生検、各エックス線検査、血液検査などがあげられるが、いずれも患者に何らかの損傷を与えることになる。歯周病学の分野では、歯周疾患における炎症性反応のメディエーターの動態を把握するために、ペーパーストリップスを用いて、ヒト歯肉溝滲出液(gingival crevicular fluid 以下 GCF)を採取し、一定時間内の滲出液量や GCF 内の特定のメディエーターの発現解析から、炎症症状の段階的評価を行う手法が用いられている。この方法は、患者の歯周組織を傷つけることなく検体を採取でき、短時間で簡便に行なうことができるので患者の不快感が少ない。矯正移動歯周囲の組織における各メディエーターの動態から炎症反応および骨代謝を関連づけて治療経過を評価することができる。いままでに矯正歯科治療中の歯および歯周組織の炎症性メディエーターに着目した研究は多数存在する(Ren Y. et al, 2008)が、骨代謝マーカーまで着目し、前駆反応としての炎症反応と骨代謝を関連づけて検討した研究はほとんど認められず、本研究では骨代謝マーカーを調べて新たな生体反応の検出を試みることにした。また動揺に、歯科矯正用アンカースクリュー周囲の炎症性メディエーター、骨代謝マーカーの発現まで検出する研究は当研究が初めてである。さらに、歯と矯正用アンカースクリュー周囲の炎症

反応、骨代謝の発現を比較検討することで、歯根膜の介在の有無、矯正力の作用する歯と固定源での炎症反応、骨代謝の発現の相違を確認することは本研究の独創的な点であると言える。

矯正学分野で、GCF を採取し炎症性メディエーターの動態を確認した報告はあるが、骨代謝マーカーと関連付けた報告は少なく、歯科矯正用アンカースクリューについて骨代謝マーカーの変動を確認している報告はほとんどなく、現在矯正歯科治療前に歯槽骨や歯科矯正用アンカースクリューの予後を把握することは出来ない状況であった。



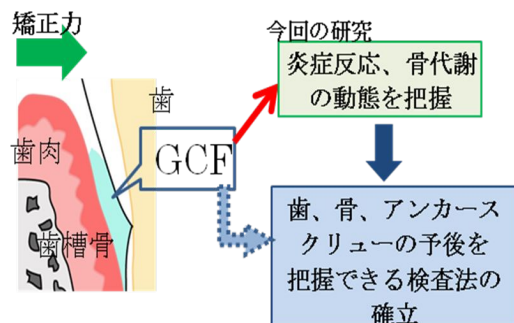
もし、被験者への侵襲が少ない方法で、矯正用アンカースクリューの予後を把握する方法を確立することができれば、矯正治療において治療時間のロスや、患者への負担を減らすことができると考えられる。

2. 研究の目的

矯正力を加えた歯および歯周組織は、最初に炎症反応を起こし、その後に骨代謝が起こることが知られている(Greive WG. et al, 1994)。また、炎症反応の際に発現する炎症性メディエーターが GCF を用いて検出できることが以前から報告されている(Samuels RH. et al, 1993)。矯正治療中の歯の GCF 中もしくはデンタルインプラント周囲の歯周組織で増減が認められる炎症性メディエーターとしては、IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, PGE, TNF-, EGF, FGF, TGF- など複数報告されている。

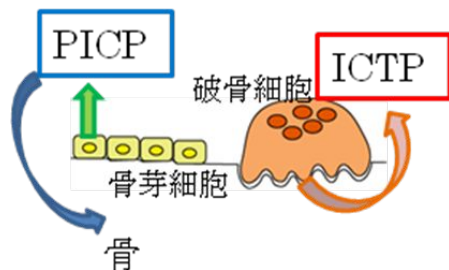
一般的な歯の移動については、炎症反応だけでなくさらに骨代謝反応を関連づけることで周囲組織の反応を特徴づけることが出来ると考え、本研究では炎症メディエーターに加え骨代謝マーカーに着目して、その発現を確認することとした。本研究では、歯科矯正用アンカースクリューの Peri-miniscrew implant crevicular fluid (以下 PMICF) を検体とした新たな病態検査法を確立することを目的とし、患者への侵襲が少ないペーパーストリップスを用いて、動揺のある歯科矯正用アンカースクリューおよびコントロールを用いて炎症性メディエーターならびに骨代謝マーカーの変化を確認することを目的として実験を行うこととした。

PMICF を用いた研究で今までほとんど着目されていない骨代謝マーカーではあるが、



PMICF 中で確認が可能と考えられ、炎症性メディエーターと同様の手法で検出可能なコラーゲン前駆体の断片で、骨形成マーカーである 型プロコラーゲン C-プロペプチド (procollagen of type carboxyterminal propeptide 以下 PICP (Talorpokia JT. et al, 1993))ならびにペプチド結合架橋体である骨吸収マーカーである 型コラーゲン C-テロペプチド (carboxyterminal telopeptide cross-link fragment of type collagen 以下 ICTP) (Oringer AA. et al, 2002)、I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTx) に着目した。 型コラーゲンは骨基質の主成分である。 型プロコラーゲンは、 型コラーゲンの前駆物質であり、骨芽細胞によるコラーゲン産生過程で生じることから、PMICF 中で変動することが予想される。また、ICTP は 型コラーゲンの分解産物であり、PICP と同様に PMICF 中で変動することが予想される。

さらに矯正臨床でも多用されるようになった歯科矯正用アンカースクリュー周囲には歯根膜を介さない骨組織の形成が起こることから骨形成マーカーの動態が変化すると考えられる。このことから、今回は骨代謝マーカーとして、PMICF, ICTP, NTx を選択し、PMICF 中の変動を確認することとした。

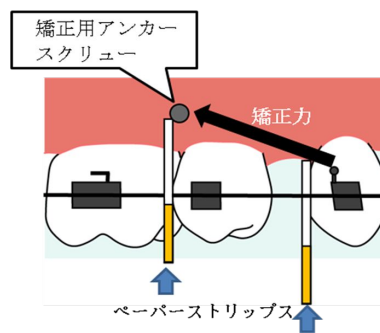


3. 研究の方法

被験者より検体の採取を行った。

インフォームドコンセントが得られた矯正歯科治療中の患者のうち、歯科矯正用アンカースクリュータイプのインプラントを植立した症例で、血液疾患ならびに骨系統疾患に罹患していない症例を被験者とした。

ペーパーストリップスを用いて動揺を認めた歯科矯正用アンカースクリュー周囲組織から PMICF を採取し、同顎反対側のアンカースクリューを対照群とした。それぞれ採取する部位は、周囲のプラークを出血させないようにして取り除き、ロールワッテを置いて防湿した。採取はペーパーストリップスを用い、歯肉溝に約 1mm 程度 30 秒差し込んで行う。その後、60 秒間をあけて、さらに新しいペーパーストリップスをもう一度 30 秒差し込んで 2 回 PMICF を採取し、検体はただちに -30 で保存した。



PMICF の抽出を行った。

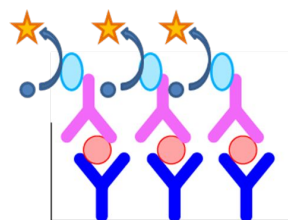
検体採取したペーパーストリップスを入れたそれぞれの滅菌チューブに 100 μ L の buffer (50mM リン酸緩衝液, pH 7.2) を加え、15000g、5 分遠心分離を行い、さらに同じ buffer を 100 μ L 加え再度同じ遠心分離操作を行った。

PMICF 中の各メディエーターの検出を行う

ELISA kit (R & D 社) を用いて IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, MMP8, MMP9, TIMP1, TIMP の検出を行った。

同様に PICP, ICTP, NTx についても検出可能かどうかを確認した。

ELISA により検出されたデータの統計分析は Student's t test を用いて行った。



<ELISA法>

4. 研究成果

今回は協力を得られる被験者が少なく、さらに経時的な変化を確認することが困難であった。このことから、動揺を認める矯正用アンカースクリュー群とコントロール群をサンプルとして回収することとし、n=6 として ELISA にて実験群とコントロール群に差が出るか検討した。

動揺を認める矯正用アンカースクリュー (実験群) から採取した PMICF をコントロールと比較した結果、IL-6, IL-8, MMP8, MMP9 で顕著な値の上昇を認めた。TIMP2 についても動揺を認める矯正用アンカースクリューから採取した PMICF において有意な値の上昇を認めた。一方、IL-1, TIMP1 については顕著な差を認めなかった。IL-2, PICP, ICTP, NTx についてはサンプル数が少なく、実験群、コントロール群ともに値の検出ができなかった。IL-2 については長期的な炎症がある場合に検出されるが、そのような場合は矯正用アン

カースクリューが先に脱落する可能性が高いため、今回スクリーンの動揺を認める状態では検出できなかったと考えられる。PICP, ICTP, NTx についてはサンプル数を増やして検出を試みる必要がある。今回の研究では収集できたサンプルが少なかったが、サンプル数を増やし、さらには経時的に PMICF を採取し、炎症と骨代謝マーカーの変遷について検討する必要がある。

()

研究者番号：

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 0 件)

〔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

三原 聖美 (Kiyomi Mihara)

研究機関：大阪大学

所属部局：歯学研究科

職名：助教

研究者番号：0055192

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者