

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月23日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659959

研究課題名（和文） LIPUS照射およびRAP誘導を併用した歯槽骨代謝活性の制御

研究課題名（英文） Control of alveolar bone metabolism activity with RAP induction and LIPUS irradiation

研究代表者

飯田 順一郎 (IIDA JUNICHIRO)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：90151232

研究成果の概要（和文）：（1）RAP誘導方法の検討：ラット臼歯上顎片側第一臼歯を用いて歯槽骨の局所に破骨細胞の活性を上昇させる処置方法(RAP)を検討した。その結果、唇側・口蓋側に、歯髄に到達する深さのosteotomyを、計6か所を施すのが効果的なことが確認された。（2）LIPUS照射条件の検討：骨形成活性の上昇を期待して、超音波(LIPUS)照射装置の照射方法を検討したが、歯槽骨の形成能の変化に対する有意な結果を得るには至っていない。

研究成果の概要（英文）：(1) RAP induction method: We investigated the treatment method for increasing the activity of osteoclasts (RAP) in local alveolar bone by using a rat maxillary first molars. As a result, we confirmed that it is effective to induce RAP induction when performing osteotomy with the depth reaching bone marrow in both labial and palatal sides at for the total of six portion. (2) LIPUS irradiation conditions: We investigated the irradiation method using ultrasound (LIPUS) irradiation, expecting an increase in osteogenic activity. But we did not yet obtain significant results of changes in formation ability of alveolar bone .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：歯科矯正学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯学

細胞組織

医療・福祉

生理活性

歯科矯正学

1. 研究開始当初の背景

近年、顎骨の緻密骨表面に外科的な侵襲を加えると海面骨を含めた局所の骨吸収活性が劇的に亢進することが明らかにされてきた（RAP誘導）。一方、低出力で矩形波の超音波（LIPUS）を組織に照射すると骨芽細胞

の骨形成能を有意に上昇させることが明らかとなり、近年整形外科領域において骨折の治療促進に積極的に応用されている。矯正学的な歯の移動は、歯槽骨における骨吸収と骨添加という骨代謝活性の変化が基本的なそのメカニズムであることから、このRAP誘導と

L I P U S 照射の併用が歯槽骨の選択的な局所の骨代謝活性を亢進できれば、歯の移動の顕著な効率化が得られるものと期待される。

1990年にPillaらがウサギの骨折モデルにL I P U S (Low-Intensity Pulsed Ultrasound) を照射して骨折治癒が促進したことを報告して以来、L I P U S 照射の骨折治癒促進に関する報告が数多くなされている。加えて基礎的な検討からL I P U S 照射が骨芽細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞の増殖および細胞活性を上昇させることが明らかにされている (Sebaoun et al. 2008)。一方、Fergusonらは従来からあるcorticotomy の手法を改変し、歯槽骨表面の緻密骨に浅い窪みをつける外科的な侵襲を加える処置 (osteotomy) をしたところ、歯の移動速度が増すことを経験し発表した。その後、動物実験から、海面骨に及ぶ骨の内部においても局所的に破骨細胞の活性が大きく上昇していることを明らかにしregional acceleratory phenomenon (R A P) と呼んだ

(Ferguson, 2003)。申請者らはこれまでに機械的刺激に対する微小血管の形態的、機能的変化について研究を進めており、毛細血管を含めた微小血管は機械的刺激を受けるとそれに鋭敏に反応し、破骨細胞の誘導など骨吸収に促進的に作用する現象を示すことを明らかにしている。

2. 研究の目的

矯正治療の時間短縮は患者の強く希望することである。これまでに効率的な歯の移動を模索して矯正力の種類、また薬物投与の可能性などが検討されているが、臨床的に顕著な効果を期待できるまでに至っていない。本研究はこれまでに発見された顕著に骨吸収活性を上昇させるR A P誘導の手法と、骨形成活性を上昇させるL I P U S照射を組み合わせることによって歯槽骨の骨代謝活性を局所的

に限局して上昇させ、歯の移動の効率化をはかる方法を検討するものである。本研究では、R A P誘導の手法とL I P U S照射の両者を併用することにより矯正歯科治療における歯の移動の効率化が可能か否かを明らかにすることを目的として、動物実験で基礎的な検討を行うものである。開始当初、期間内に明らかにする予定の計画は以下の通りであった。

(1) 有効にR A Pを誘導する手法の検討

歯科用バー等によるosteotomyによる、ラット臼歯部歯槽骨におけるR A P誘導効果を組織学的に検討する。歯科用バー等によるosteotomy処置後、歯周組織を組織学的に観察、非処置の組織 (control) と比較検討することで、R A P誘導の効果を判定する。この検討から、ラット第一臼歯において有効にR A Pを誘導できる手法を確立する。

(2) 有効に骨形成活性を亢進するL I P U S照射条件の検討

ラット上顎にL I P U S照射装置 (BR ソニック-Pro 伊藤超短波社製) による照射手法を検討し、まず、歯周組織に骨芽細胞の活性化による骨組織の変化が生じるか否かを確認する。その後、(1)の検討により得られた、有効に海面骨、皮質骨の吸収を亢進できる刺激方法を用いて、R A Pを誘導した後、L I P U Sを、条件を変化させて照射する。照射後、骨の生体染色のを施した後に、屠殺、上顎骨を摘出し、第一臼歯近傍の水平断の非脱灰切片を作成して骨量の経時的変化を計測し、照射条件間で比較する。以上の結果から、最も有効に骨形成活性を上昇させるL I P U S照射の条件を評価、判定する予定であった。

(3) R A P誘導とL I P U S照射の併用の条件の検討

(1)(2)から得られたR A P誘導、L I P U S照射の条件および効果の出現する

時間を参考に作用時期を考えた上で、両者を同時に、また時間を変えてラット臼歯部に作用させ、上顎第一臼歯に加えた矯正力による歯の移動速度に対する効果を評価し、有効な処置条件を明らかにすることを計画した。

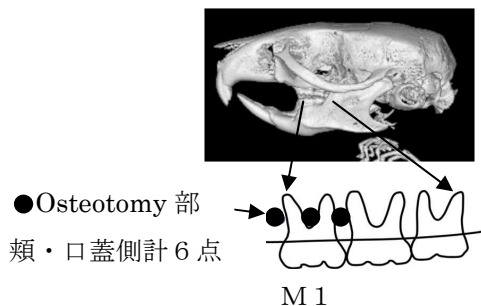
3. 研究の方法

(1) 有効にRAPを誘導する手法の検討

歯科用バーによるosteotomyにより、ラット臼歯部歯槽骨におけるRAP誘導効果及び歯肉に対する侵襲の程度を組織学的に比較検討する。

〔方法〕チアミラールソディウム腹腔内投与による麻酔下で、ラットを用いて上顎左側第一臼歯(M1)頬側および口蓋側に歯科用エンジンに装着したラウンドバー(先端径0.2mm)を用いて、歯肉を貫通させて歯槽骨表面に創傷を形成する刺激(osteotomy)を加える。osteotomyは、頬側中央部、近遠心、および口蓋側中央部及び近遠心の計6点とする

(下図)



〔評価〕osteotomy 処置後3、10日後に屠殺し上顎骨を摘出する。脱灰後、通方に従いパラフィン包埋した上で、第一臼歯近傍の水平断の脱灰切片を作成する。すなわち、第一臼歯歯根膜における歯根分岐部から、根尖方向に350 μ mから750 μ mまで連続切片を作成する。その後、HE染色を施した上で、歯槽骨吸収の状態を組織学的に観察、すなわちosteotomyを施さない右側の対象側と比較検討することで、RAP誘導の効果を判定す

る。この検討から、有効にRAPを誘導できる手法を確立する。

(2) 有効に骨形成活性を亢進するLIPUS照射条件の検討

① LIPUS照射装置(オステオトロンⅢ伊藤超短波社製)を用いてラット頭部から、あるいは上顎のみに対する照射法を試み、歯槽骨周囲に対する適切な照射法をまず検討した。

〔方法〕ラットを用い、LIPUS照射装置(オステオトロンⅢ)の照射器先端が最小の形状を選択し、頭頂部からの照射、および照射器先端を口腔内へ挿入する2つの方法を施術し、上顎骨における骨芽細胞の出現状況を組織学的に観察する。

② ①の結果から、ラット上顎骨に対して有効に骨芽細胞を誘導できるLIPUSの照射手技が会得できた後に、LIPUS照射の出力について適切な条件を求める実験に移行する。

〔方法〕(1)の検討において得られた、最も有効に海面骨、皮質骨の吸収を亢進できるosteotomyの方法を用いてRAPを誘導した後、LIPUS照射装置(オステオトロンⅢ)でLIPUSを出力10mW/cm²と30mW/cm²の2種類で同一の照射部位から上顎骨に照射する。照射時期は以下の条件で検討する予定とした。

① 対照群(sham群としてRAP誘導後、照射操作のみで照射はしない)

② RAP誘導後にLIPUSを1回20分間照射する。

③ RAP誘導後にLIPUSを1日1回20分間照射する。(骨折治癒促進のための適応時間である)

④ RAP誘導後にLIPUSを1日2回20分間ずつ照射する。

〔評価〕照射後1日目から3日ごとに、骨の生体染色のためにtetracyclin、ruthenium

redを静脈内注射する。各群を照射後3日、10日、30日に屠殺、上顎骨を摘出し、第一臼歯近傍の水平断の非脱灰切片を作成し、von Kossa染色を施し骨量の経時的变化を定量的に計測するとともに、蛍光像から骨形成の量を定量的に計測し照射条件間で比較する。以上の結果から、最も有効に骨形成活性を上昇させるL I P U S照射の条件を評価、判定する。

(3) R A P誘導とL I P U S照射の併用の条件の検討

〔方法〕(1)(2)から得られたR A P誘導、L I P U S照射の条件および効果の出現する時間を参考に作用時期を考えた上で、両者を同時に、また時間を変えてラット臼歯部に作用させ、上顎第一臼歯に加えた矯正力による歯の移動速度に対する効果を評価し、有効な処置条件を明らかにする。

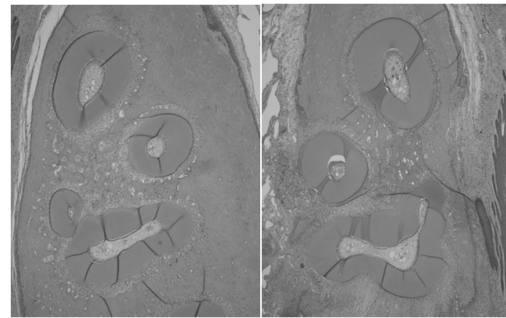
4. 研究成果

(1) 有効にR A Pを誘導するosteotomy付与方法の検討

ラット臼歯を用いて歯槽骨の局所に破骨細胞の活性を上昇させるregional acceleratory phenomenon(R A P)を誘導する処置方法を検討した。北海道大学動物実験委員会による実験計画の承認を得た後、ラット上顎片側第一臼歯頰側、口蓋側計6か所にスチールラウンドバーによる歯槽骨皮質骨あるいは歯槽骨骨髓に達するosteotomyの処置を行い、第一臼歯の横断方向の脱灰切片を作成、H E染色により観察する手法を用いた。ラウンドバーによるosteotomyの位置、箇所数、深さについて異なる条件でR A P誘導の程度を判定した。

その結果、最も有効なR A P誘導の処置法としては唇側・口蓋側に歯髓に到達する深さのosteotomy計6か所を施すのが、最も効果的に歯槽骨の吸収を誘導することが確認された。

(下図参照)



【対象群】

【osteotomy 3日】

(2) 有効に骨形成活性を亢進するL I P U S照射条件の検討

超音波L I P U S (Low-Intensity Pulsed Ultrasound)照射装置〔B RソニックP r o, 伊藤超短波社製〕を購入する際に、ラット臼歯に適切な照射ができるように照射器先端の形状を選択した。ラット上顎臼歯への照射において、口腔内照射、口腔外(頭頂部)からの照射、いずれが適切かについて、照射方法について検討したが、いずれにおいてもL I P U Sによる歯槽骨の形成能の変化に対する有意な結果を現状では得るには至っていない。L I P U S照射方法における照射器先端の形状、サイズから再検討する必要があるものとする。更に異なる条件による検討が必要と考えられる。

(3) R A P誘導とL I P U S照射の併用の条件の検討

L I P U Sによる有効な骨形成の誘導法が確立できなかったことから、R A P誘導とL I P U S照射の併用による歯の移動速度に対する効果の検討まで進めることができなかった。L I P U S照射による骨形成促進効果に関して、ラットにおける有効性、あるいは照射条件の両面から再検討し、有効なL I P U S照射条件を確立させることが歯の移動に応用する上で乗り越えなければならない検討課題で

ある。その成果が得られた後に論文発表する
予定である。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 順一郎 (IIDA JUNICHIRO)
北海道大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：90151232

(2) 連携研究者

佐藤 嘉晃 (SATO YOSHIAKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：00250465

(3) 連携研究者

梶井 貴史 (KAJII TAKASHI)
福岡歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：60322822

(4) 研究協力者

日下部 豊寿 (KUSAKABE TOYOHISA)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号：80322824

(5) 研究協力者

彦根 敦 (HIKONE ATSUSHI)
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生

