

学位論文

実験的歯の移動に対するレーザー照射の
組織学的および分子生物学的効果

学位申請者 柄 優至

広島大学大学院医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻
顎口腔頸部医科学講座 歯科矯正学分野

主指導: 谷本 幸太郎教授

2014 年

目次

緒言-----	1
試料と方法-----	5
I. Er:YAG レーザーおよびNd:YAG レーザー照射のラットにおける実験的歯の移動に対する影響について-----	5
1. ラットにおける実験的歯の移動モデルの作製-----	5
・ 実験動物-----	6
・ 歯の移動装置-----	6
2. レーザー照射による歯の移動距離変化の検討-----	6
・ タイムコース-----	6
・ レーザー照射条件-----	6
・ 歯の移動距離の計測-----	8
3. レーザー照射が実験的歯の移動に及ぼす組織学的変化-----	9
4. レーザー照射による内部組織の温度変化-----	12
II. ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) における Er:YAG レーザー照射の影響-----	14
1. Er:YAG レーザー照射後の細胞生存率について-----	14
・ ヒト歯肉線維芽細胞の採取および細胞培養-----	14
・ タイムコース-----	15
・ Er:YAG レーザー照射条件-----	16
2. Er:YAG レーザー照射後の定量 RT-PCR による炎症性メディエーター関連遺伝子の発現検討-----	17
3. Er:YAG レーザー照射および遠心力負荷併用時の炎症性メディエーター関連遺伝子発現の検討-----	18
III. ヒト骨芽細胞様細胞 (Saos2) における Nd:YAG レーザー照射の影響-----	19
1. Nd:YAG レーザー照射後の細胞生存率-----	19
・ ヒト骨芽細胞様細胞および培養条件-----	19
・ タイムコース-----	19
・ Nd:YAG レーザー照射条件-----	20
2. Nd:YAG レーザー照射後の骨代謝関連因子の遺伝子発現解析-----	21
・ Nd:YAG レーザー照射条件-----	21
・ Nd:YAG レーザー照射後の定量 RT-PCR による骨代謝関連因子の解析-----	22
3. Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷後の骨代謝関連遺伝子の発現検討-----	22
結果-----	23
I. Er:YAG レーザーおよびNd:YAG レーザー照射のラットにおける実験的歯の移動に対する影響について-----	23

1. ラットにおける実験的歯の移動モデルの作製-----	23
2. レーザー照射による体重および歯の移動距離への影響-----	25
3. レーザー照射が実験的歯の移動に及ぼす組織学的変化-----	27
・装置装着 4 週間後の組織学的変化 (H-E 染色)-----	27
・装置装着 4 週間後の組織学的変化 (TRAP 染色)-----	29
・装置装着 4 週間後免疫組織化学的变化 (ALP 染色)-----	31
・装置装着 4 週間後の免疫組織化学的变化 (RANKL 染色)-----	32
・装置装着 4 週間後の免疫組織化学的变化 (OPG 染色)-----	33
4. レーザー照射によるラット組織表面の状態と内部組織の温度変化-----	34
II. ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) における Er:YAG レーザー照射の影響-----	36
1. Er:YAG レーザー照射後の細胞生存率について-----	36
・Er:YAG レーザー照射直後の細胞の状態-----	36
・Er:YAG レーザー照射後の細胞生存率および増殖について-----	36
2. Er:YAG レーザー照射後の定量 RT-PCR による炎症性メディエーター関連遺伝子発現の検討-----	38
3. Er:YAG レーザー照射および遠心力負荷併用時の炎症性メディエーター関連遺伝子発現の検討-----	40
III. ヒト骨芽細胞様細胞 (Saos2) における Nd:YAG レーザー照射の影響-----	42
1. Nd:YAG レーザー照射後の細胞生存率-----	42
2. Nd:YAG レーザー照射後の骨代謝関連因子の遺伝子発現解析-----	44
・Nd:YAG レーザー照射 1 時間後の遺伝子発現-----	44
・Nd:YAG レーザー照射 24 時間後の遺伝子発現について-----	45
・Nd:YAG レーザー照射 48 時間後の遺伝子発現について-----	46
3. Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷後の骨代謝関連遺伝子発現の検討-----	47
・Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 1 時間後の遺伝子発現-----	47
・Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 24 時間後の遺伝子発現-----	48
・Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 48 時間後の遺伝子発現について-----	49
考察-----	50
I. Er:YAG レーザーおよび Nd:YAG レーザー照射のラットにおける実験的歯の移動に対する影響について-----	50
1. ラットにおける実験的歯の移動モデルの作製-----	50
・実験動物について-----	50
・実験期間中におけるラットの体重変化および歯の移動距離と実験モデルの有用性について-----	51
2. レーザー照射の歯の移動距離への影響-----	52
3. レーザー照射が実験的歯の移動に及ぼす組織学的変化-----	54

• 装置装着 4 週間後の H-E 染色による組織学的変化の観察-----	54
• 装置装着 4 週間後の TRAP 染色による組織学的変化の観察-----	54
• 装置装着 4 週間後の RANKL 免疫組織化学的变化の観察-----	55
• 装置装着 4 週間後の OPG 免疫組織化学的变化の観察-----	55
• 装置装着 4 週間後の ALP 免疫組織化学的变化の観察-----	56
4. レーザー照射によるラット組織表面の状態と内部組織の温度変化-----	57
II. ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)における Er:YAG レーザー照射の影響-----	59
1. Er:YAG レーザー照射後の細胞生存率について-----	59
2. Er:YAG レーザー照射後の定量 RT-PCR による炎症性メディエーター関連遺伝子の発現検討-----	59
3. Er:YAG レーザー照射および遠心力負荷併用時の炎症性メディエーター関連遺伝子発現の検討-----	60
III. ヒト骨芽細胞様細胞(Saos2)における Nd:YAG レーザー照射の影響-----	61
1. Nd:YAG レーザー照射後の細胞生存率-----	61
2. Nd:YAG レーザー照射後の骨代謝関連因子の遺伝子発現解析-----	61
3. Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷後の骨代謝関連遺伝子発現の検討と <i>In Vivo</i> の結果との関連について-----	62
総括-----	63
参考文献-----	65
謝辞-----	75

緒言

矯正歯科治療が長期に及ぶことや歯の移動に痛みを伴うことは、治療を受ける患者にとって大きな問題である。歯の移動を加速することは、治療期間の短縮に繋がることから、矯正歯科分野では、歯の移動に関する様々な研究がこれまでに行われてきた。

Köle (1959)は、矯正歯科治療中の患者に対して corticotomy すなわち歯肉および歯槽骨の切開を行い、また Tuncay ら(1986)および Young ら(2013)は、ラットを用いた実験的歯の移動において、fiberotomy すなわち歯根膜線維切除を行うことで、歯の移動が加速したことを報告した。薬物投与としては、2006年神崎らがラットの歯周組織に Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) を局所投与して歯の移動の加速が認められたことを報告した。一方で、多血小板血漿 (PRP) や少血小板血漿 (PPP)、一酸化窒素 (NO)、Prostaglandin E2 (PGE2) などの多くの物質が歯の移動を加速するために検討されてきたが、これらについてはその副作用が問題となっており、臨床応用については現在のところ困難であると考えられている。また、Chen Q ら(1991)はモルモットにおいて、実験的歯の移動中に歯周組織に電磁波を与えると、歯周組織に有害な損傷を与えることなく細胞が活性化し、歯の移動が加速したと報告している。また、大前ら(2001)はビーグル犬において実験的歯の移動中に超音波を照射することで、西村ら(2006)はラットにおいて実験的歯の移動中に振動を与えることで歯の移動が加速したと報告している。

以上のように、歯の移動を加速するために様々な方法が検討されてきたが、

corticotomy 以外の方法は臨床応用されていないのが現状である。しかし、外科的処置を併用した矯正歯科治療は患者の負担が大きく、感染や組織壊死のリスクもあり、より安全性の高い治療が望まれている。

近年、Diode レーザー照射により歯の移動が加速されたという報告 (Marines Vieira *et al.*, 2011; Genc *et al.*, 2012; Doshi-Mehta *et al.*, 2012) があり、歯の移動に対するレーザー照射の効果が注目されている。

レーザーは 1917 年に Albert Einstein が輻射の誘導放出による光増幅の物理原理を確立することにより発見され、その後 1950 年ころから研究が行われ、1958 年 Bell 研究所の Schawlow と Townes らがレーザーに関する基本特許を取得した。その後 1960 年に Maiman によって開発されたルビーレーザーが最初のレーザー装置で、ついで 1961 年に He:Ne レーザー、1962 年に半導体レーザー、1964 年に Ar ガスレーザー、Nd:YAG レーザーおよび CO₂ レーザー、1974 年に Er:YAG レーザーが開発された。

歯科におけるレーザーの使用は、1965 年に Leon Goldman が実の兄弟で歯科医である Bernard Goldman の歯にルビーレーザーを使用したのが最初と考えられている。その後様々な改良がなされ、1989 年 Terry Myers が開発した 1064 nm の Nd:YAG レーザーが初めて実用化された歯科用レーザーである (Parker, 2007)。

レーザーは、Light amplification by stimulated emission of radiation (輻射の誘導放出による光増幅) の略称で、単一の波長を持つように作られた人工的な光である。レーザー装置は、この光スペクトルを放射させて高密度エネルギー光線を発生させる装置で、媒体により様々なレーザーがあり、歯科で主に使用されているものとしては、CO₂ レーザー、He:Ne レーザー、Diode レーザー、Er:YAG レーザー、Nd:YAG レーザー、Ar ガスレーザーなどがある。

組織透過性で分類すると、CO₂ レーザーと Er:YAG レーザーは主に組織表面で

エネルギーが吸収されるため表面吸収型に、He:Ne レーザー、Diode レーザー、Nd:YAG レーザー、Ar ガスレーザーは吸収・散乱を繰り返し組織深部まで到達するため組織透過型に分類され、これらは使用用途に応じて使い分けられている。Er:YAG レーザーは組織表面の切削および蒸散時に組織内部の熱の残存が少ないことから、硬組織切削に使用することができる。一方、CO₂ レーザーは表面吸収型であるが、急激な高熱を発することから組織内部に熱が残存し、硬組織の亀裂や歯髄への悪影響を引き起こすため、硬組織切削には不向きである。他のレーザーは組織透過性があるため、硬組織の切削には適さない。このように適正なレーザーの種類や出力を変えることで、無痛的齶蝕除去、歯石除去、歯周治療、外科的切除、顎関節等の疼痛緩和、治癒促進、根管治療、ホワイトニング等、様々な歯科治療に応用されている。

矯正歯科分野におけるレーザーの利用については、前述した歯の移動の加速の他、疼痛緩和(Fujiyama *et al.*, 2008; Doshi-Mehta *et al.*, 2012)や骨の治癒促進(Kim *et al.*, 2012)などの報告があるが、その機序については発色団の存在により光波長を吸収するということが明らかになっているのみで、ほとんど解明されていない。発色団は波長特有の光線感作物質であり、この存在により光の組織透過性に違いが生じると考えられている。

これまでにDiode レーザーを用いた歯の移動の促進は数多く報告されてきたが、他のレーザーに関する報告はほとんどない。清流ら(2010)は、ヒトにおける歯の移動中にCO₂ レーザーを照射して、歯の移動距離が増加したと報告している。また、Er:YAG レーザーもCO₂ レーザー同様表面吸収型であるため歯の移動に影響を及ぼす可能性が考えられる。Aleksic ら(2010)は、骨芽細胞様細胞にEr:YAG レーザーを照射して細胞増殖が促進したと報告していることから、Er:YAG レーザー照射は骨代謝に影響を及ぼす可能性が示唆される。

一方、Nd:YAG レーザーは Diode レーザー同様組織透過型であり、二宮ら(2003)は、ラット大腿骨に Nd:YAG レーザー照射することにより骨形成が促進したと報告している。よって、Nd:YAG レーザー照射も骨代謝に影響を与える可能性が示唆される。

このような組織活性化の効果を利用して行われる治療は、一般に LLLT(低レベルレーザー治療) や LPLT(低出力レーザー治療) と呼ばれる。LLLT はさらに二種類に分類され、LLLT のみを期待して低出力レーザー照射を行う場合の pure LLLT と高出力レーザー照射に付随して起こる simultaneous LLLT とがある(Ohshiro T, 1991)。

そこで今回の実験では、高出力レーザーである Er:YAG レーザーおよび低出力レーザーである Nd:YAG レーザー照射が実験的歯の移動に及ぼす影響について組織学および分子生物学的に検討することを目的とした。

試料と方法

I. Er:YAG レーザーおよびNd:YAG レーザー照射のラットにおける実験的歯の移動に対する影響について

I-1. ラットにおける実験的歯の移動モデルの作製

・実験動物

生後10週齢のWistar系雄性ラット(チャールスリバー、横浜) 34匹を用いた。なお、本研究で用いたすべてのラットは、広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究部門動物実験部震動物実験施設において飼育され、広島大学動物実験等規則に準じて扱われた。また、飼育には恒温(22~24 °C)、恒湿(50~60 %)ケージを用い、粉末飼料(CE-2、日本クレア、東京)を飲料水とともに自由に摂取させた。

・歯の移動装置

クローズドコイルスプリング(線形 0.15 mm 内径 0.90 mm センタロイ、トミー、東京)を用いてラット上顎第一臼歯の近心移動を行うモデルを作製した(図1)。

クローズドコイルの臼歯側は0.008インチのリガチャーワイヤー(トミー)にて結紮固定を行い、切歯側は切歯とコイルを光重合型フロアブルコンポジットレジン(Unifil flow、GC、東京)により接着した。装置装着後4週間、3~4日毎に体重測定を行った。ラットの体重には個体差があるため、体重を装置装着時体重で割った比で検討を行った。

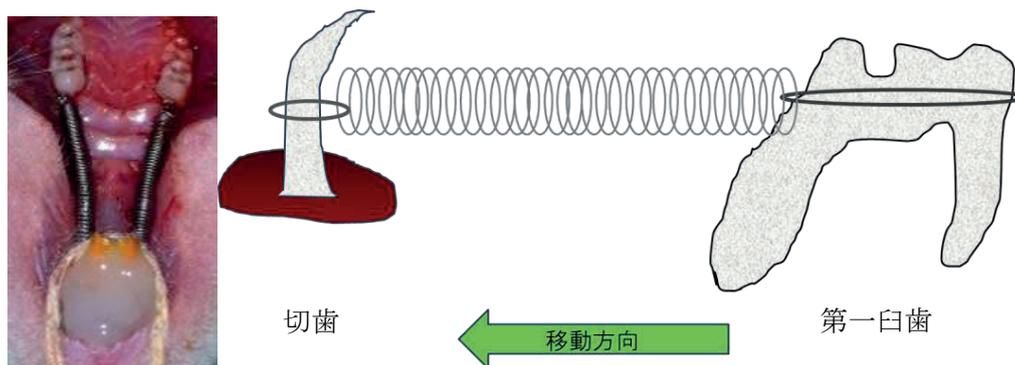


図1 歯の移動装置の写真と模式図

I-2. レーザー照射による歯の移動距離変化の検討

・タイムコース

ラットに実験 I-1 に示した方法で作製した歯の移動装置を装着し、Er:YAG レーザー(アーウィンアドベール、モリタ、東京)(図 2)と Nd:YAG レーザー (Impulse、Incisive、Ca、USA) (図 3)を使用して、装置装着 0、1、2、3、7、10、14、17、21、24 日後の計 10 回各群にそれぞれレーザー照射を行い (図 4)、4 週間後に屠殺した。また装置装着後 1 週間毎に小動物用高分解能マイクロ X 線 CT (Sky Scan 1176、Bruker microCT、Kontich、Belgium)を用いて撮影した(図 5)。

・レーザー照射条件

川崎ら(2000)の方法を参考に、Er:YAG レーザーはレーザーチップ(C800F、モリタ)を用いて、頬側、近心側、口蓋側に各 5 pps 30 mj 120 秒で合計 54 J になるように設定して照射し(図 6)、Nd:YAG レーザーは 320 ミクロンチップ (Impulse、Incisive、Ca、USA)を用いて、頬側、近心側、口蓋側に各 10 pps 20 mj 90 秒で合計 54 J になるように設定して照射した。



図2 Er:YAG レーザー



図3 Nd:YAG レーザー

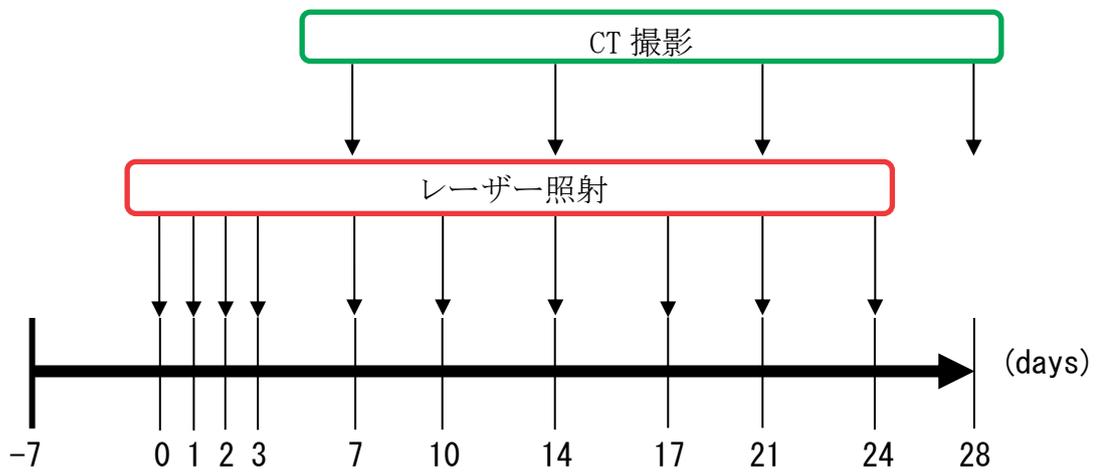


図4 レーザー照射およびCT撮影のタイムコース

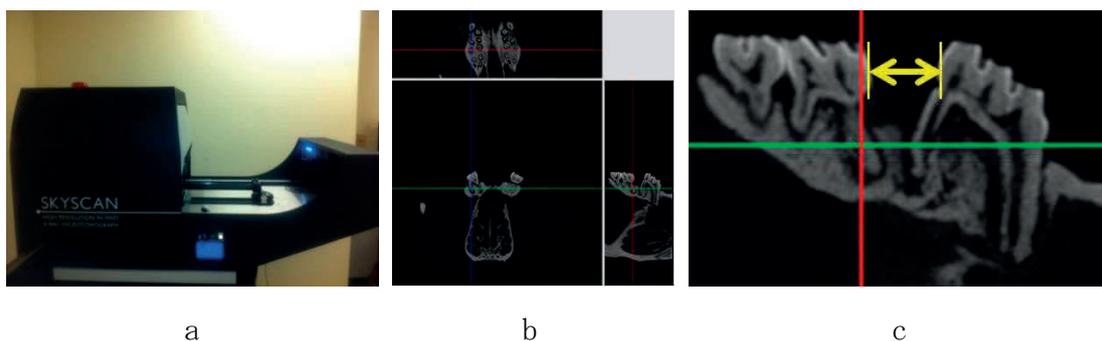


図5 CT撮影および測定方法
 a:Sky Scan 1176 b:Data viewerによる解析 c:歯の移動距離の測定部位



図6 レーザー照射部位

・歯の移動距離の計測

歯の移動距離を計測するために、ラットを全身麻酔下にて空間分解能 35 μm でCT撮影した。全身麻酔は、ジエチルエーテル(ナカライテスク、京都)による吸入麻酔を行った後、ペントバルビタール(ソムノペンチル 5 mg/100 g、共立製薬、東京)を腹腔内注射することにより行った。

歯の移動距離は、解析ソフト Data viewer (Bruker microCT)を用いて、CT画像の上顎第一臼歯遠心面と第二臼歯近心面との間の距離を測定した(図5)。

各2群間の距離の有意差検定は t 検定を用いて行った。有意水準は $p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$ とした。

I-3. レーザー照射が実験的歯の移動に及ぼす組織学的変化

装置装着 4 週間後に、実験 I-2 と同様の方法で全身麻酔を行い、4 %中性緩衝パラホルムアルデヒドにより灌流固定した。その後上顎骨を摘出し、pH 7.4 の 14 %エチレンジアミン 4 酢酸 4 ナトリウム(EDTA)で 6 週間脱灰を行った後、流水下で 8 時間洗浄、エタノール脱水を経てパラフィン包埋を行った。ロータリーマイクロトーム(Microm325、Carl Zeiss、Oberkochen、Germany)により、厚さ 5 μm の矢状断連続切片を作製した。

染色は Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色、Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色および Alkaline phosphatase (ALP)、RANKL、Osteoprotegerin (OPG) の免疫組織化学的染色を行った。H-E 染色は通法通りに行い、TRAP 染色は TRAP/ALP 染色キット(和光、東京)を用いて、ヘマトキシリンにより対比染色を行った。免疫染色は、各切片を Dako Protein Block (serum-free) (Dako、Carpinteria、Ca、USA) と 20 分間反応させて非特異的な抗体の吸着を阻止した後、抗 RANKL ウサギポリクローナル抗体 (RANKL Antibody (N-19): sc-7628、Heidelberg、Germany)、抗 OPG ウサギポリクローナル抗体 (OPG Antibody (H-249): sc-11383、Santa Cruz Biotechnology、Heidelberg、Germany) および抗 ALP ウサギモノクローナル (Anti-Alkaline Phosphatase、Tissue Non-Specific [EPR4477] antibody (ab108337)、東京) を用いて一次染色を行った。一次抗体との反応後、切片を PBS で洗浄し、ヤギ抗ウサギ IgG (ヒストファインシンプルステインラット MAX-PO (R)、ニチレイ、東京) を用いて二次染色を行った。以上の反応過程は、すべて湿潤箱内で行われた。免疫組織像を確認するために、ヒストファイン SAB-PO kit (ニチレイ) を用いて、3,3'-diaminobenzidine (DAB) による発色を行った。免疫染色後、ヘマトキシリンによる対比染色を行い、画像解析ソフト (BZ アナライザーソフト BZ-H1A、キ

ーエンス、大阪)により観察した。

本研究モデルでは、図7に示すように第一臼歯は近心傾斜移動することから、近心根には近心側歯冠側部と遠心側根尖部の2か所に圧迫側が形成される。よって本実験では、これら近心根の近心圧迫側と遠心圧迫側について観察を行った。

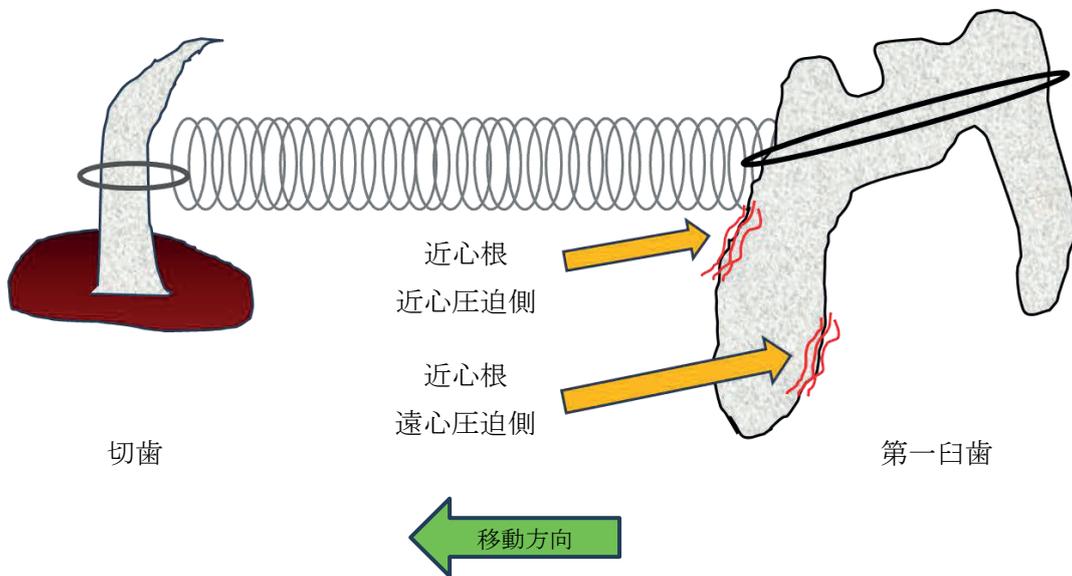


図7 歯の移動様式

TRAP 陽性細胞核数は Kwarizadeh ら (2004) の方法を参考にして歯根尖歯髄が確認できる組織切片をランダムに 8 枚選択して測定した (図 8)。測定部位は、近心根の近心圧迫側と遠心圧迫側の $1175 \mu\text{m} \times 815 \mu\text{m}$ の範囲とした。

各 2 群間の細胞数の有意差検定は t 検定を用いて行った。有意水準は $p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$ とした。

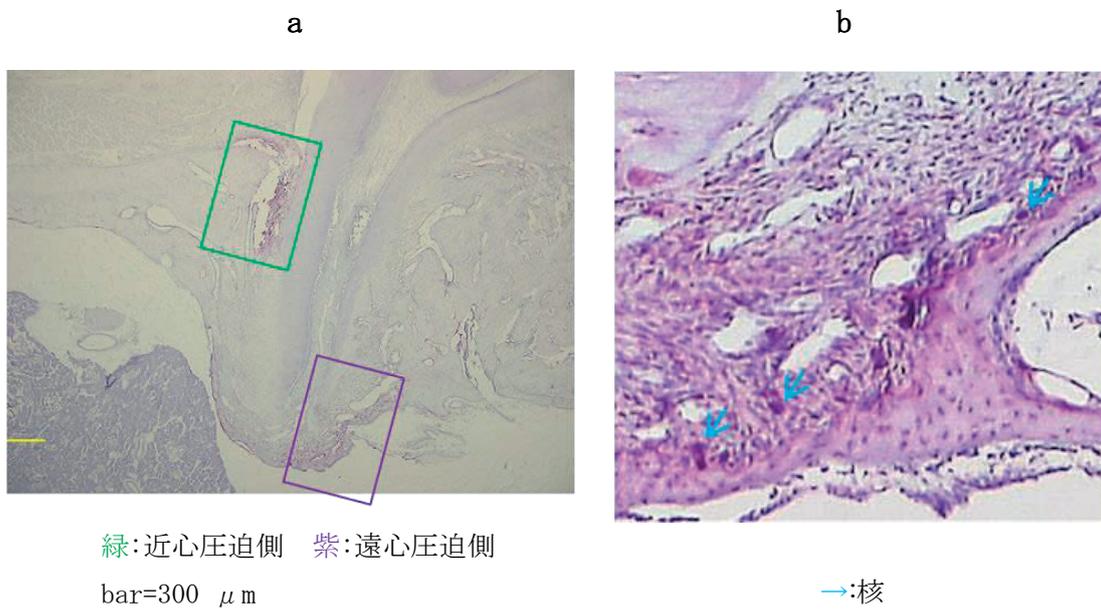


図 8 TRAP 陽性細胞核数の計測
a: 測定範囲 b:TRAP 染色された核

I-4. レーザー照射による内部組織の温度変化

清流ら(2010)の方法を参考にして、レーザー照射時の歯槽骨部、歯根中央部、歯根先端部の温度をシーース熱電対(NCF600 25 G、チーノ、東京)(図 9)とデジタルハンディ温度計(MC3000-000、チーノ)(図 10)を用いて、自動計測プログラムにより 5 秒間に 1 回記録した。

歯槽骨部は、図 11 の①に示すように歯肉を剥離し、歯槽骨との間に温度計先端を挿入して計測した。歯根中央部および歯根先端は、図 11 の②、③に示すようにラットの第一臼歯の抜歯を行い、抜歯窩にシーース熱電対を挿入して計測した。

レーザー照射条件の設定は実験 I-2 と同様にして行った。

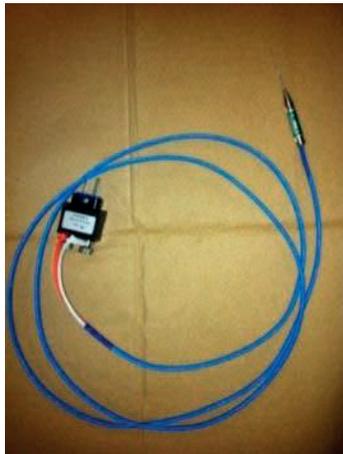


図 9 シーース熱電対



図 10 デジタルハンディ温度計

- ① 歯槽骨
- ② 歯根先端
- ③ 歯根中央

- : シース先端
- : 歯根膜、歯肉
- : 歯槽骨
- : レーザー

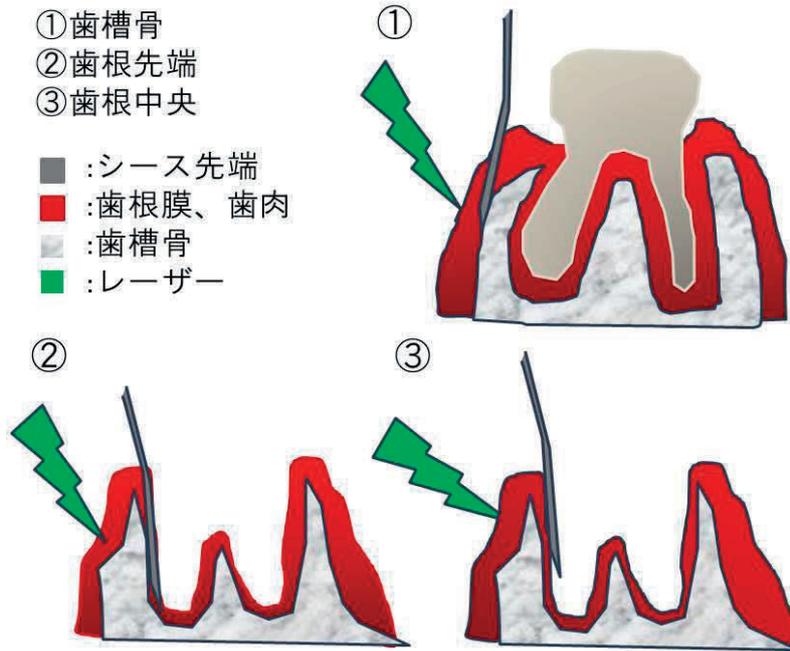


図 11 レーザー照射による温度変化測定部位

II. ヒト歯肉線維芽細胞における Er:YAG レーザー照射の影響

II-1. Er:YAG レーザー照射後の細胞生存率について

・ヒト歯肉線維芽細胞の採取および細胞培養

ヒト歯肉線維芽細胞は、広島大学病院矯正歯科を受診した患者に対して十分な説明を行い、文書による同意を得た上で大熊ら(2009)の方法を参考にして、採取された。患者は8歳、19歳、28歳の3名で上顎小白歯部口蓋より歯肉組織を可及的無菌的に採取した。メスにて組織片を細切した後、35 mm polystyrene dish(Corning, NY, USA)上に敷かれた0.2 % type-I コラーゲンゲル(高研、東京)上に静置し、outgrowth 法にて線維芽細胞を増殖させた。

培養は、10 % ウシ胎児血清(第一化学、東京)および 100 μ g/ml カナマイシン(明治製薬、東京)、0.7 % グルタミン(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)および 10 % NaHCO₃を含む Dulbecco' s Modified Eagle Medium(DMEM、日本製薬、東京)中にて、37 °C、5 % CO₂存在下にて行った。培養開始から2日後ごとに培地交換を行い、80 %コンフルエントに達した時点で歯肉組織片を除去し、0.2 % trypsin(ナカライテスク)および 0.1 % EDTA(和光)を含む phosphate buffered saline (PBS、三菱化学メディエンス、東京)により 15 分間酵素処理を行って剥離した後、機械的にピペッティングを行って単離させた細胞を 100 mm polystyrene dish(Corning)に播種し継代培養を行った。実験には継代 3~4 代目の細胞を用いた。

・タイムコース

採取したヒト歯肉線維芽細胞を、6 well plate にそれぞれ 5×10^4 個となるように播種し、72 時間後に Er:YAG レーザー照射を行った。照射直後の細胞の状態を光学顕微鏡 (BH2-RFCA、オリンパス) で観察した。Pourzarandian ら (2005) の方法を参考にして、レーザー照射 1 時間後および 24 時間後に 0.2 % trypsin と 0.1 % EDTA を含む PBS を用いて細胞を回収した (図 12)。0.4 w/v% トリパンプルー溶液 (和光) で染色を行い、血球算定版 (サンリード硝子、埼玉) を用いて生細胞数を測定した。

各 2 群間の細胞数の有意差検定は t 検定を用いて行った。有意水準は $p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$ とした。

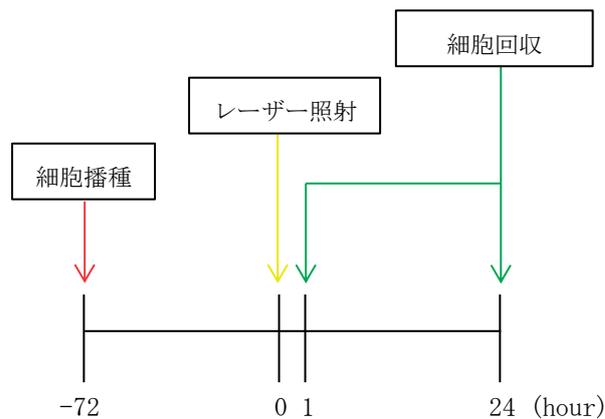


図 12 実験 II-1 のタイムコース

・Er:YAG レーザー照射条件

Er:YAG レーザーはチップを装着せず、照射野が 6 well plate (Corning) の面積 9.6 cm^2 と同等になるように、固定式スタンドを用いてレーザーハンドピースの位置を固定して照射した。培養皿底部からレーザーハンドピースの先端までの距離は 15 cm とした(図 13)。

レーザーを照射する際には一旦メディウムを除去し、レーザーを 30 秒間照射した後、再度メディウムを添加した。出力は、0.6 w(20 pps、30 mj)、1.2 w(20 pps、60 mj)および 3.0 w(20 pps、150 mj)に設定し、レーザー照射を行わないものをコントロールとした。

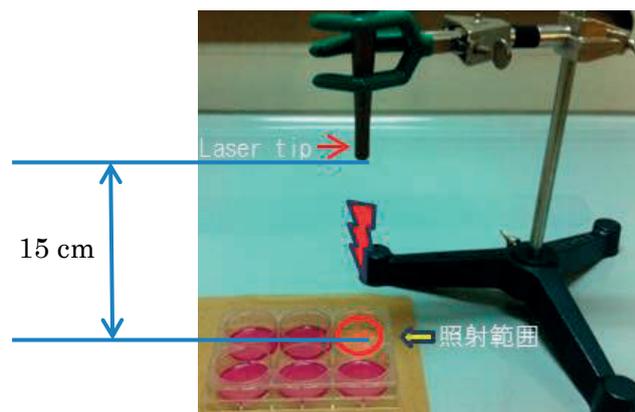


図 13 *In Vitro*における Er:YAG レーザー照射方法

II-2. Er:YAG レーザー照射後の定量 RT-PCR による炎症性メディエーター 関連遺伝子の発現検討

レーザー照射 24 時間後に 0.2 % trypsin と 0.1 % EDTA を含む PBS を用いて細胞を回収し、シリンジと 20 G ニードル (ともにテルモ、東京) を使用してホモジナイズし、RNeasy Mini Kit (Qiagen、東京) を用いたカラム法にて RNA を抽出した。また、分光光度計 (Gene Spec I、日立、東京) を用いて、波長 260 nm の吸光度を測定することにより RNA 定量を行った。1 μ g の total RNA から Rever Tra Ace- α (東洋紡、大阪) および Random Primer (東洋紡) を用いて逆転写し cDNA を合成、SYBR Green Real-time PCR Master Mix (東洋紡) を用いて、Light Cycler システム (Roche Diagnostics、東京) により、炎症性メディエーター関連因子である Tumor necrosis factor- α (TNF- α)、Interleukin-1 (IL-1 β)、Cyclooxygenase-2 (COX-2)、Bone morphogenetic protein (BMP)-2 および-4 の遺伝子発現量を定量 RT-PCR 法を用いて解析した (表 1)。遺伝子発現量はコントロールの GAPDH に対する比で算出し、比較検討した。

各 2 群間の遺伝子発現の有意差検定は t 検定を用いて行った。有意水準は $p < 0.05$ あるいは $p < 0.01$ とした。

II-3. Er:YAG レーザー照射および遠心力負荷併用時の炎症性メディエーター関連遺伝子発現の検討

6 well plate にそれぞれ 2.0×10^5 個のヒト歯肉線維芽細胞を播種し、24 時間培養を行った。Redlich ら (2004) の方法を参考に、RPM LC06-SP (トミー精巧、東京) を使用して、500 rpm で 20 分間遠心力を負荷することにより細胞に 10 g/cm^2 の荷重を付与した。遠心力負荷直後に Er:YAG レーザー照射を行い、24 時間後に細胞を回収して、以下実験 II-2 と同様に実験を行った。

表 1 TNF- α 、IL-1 β 、COX-2、BMP-2、BMP-4 および GAPDH の PCR プライマー塩基配列

Gene	Sequence
GAPDH	Forward 5' -TGGTATCGTGAAGGACTCA-3'
	Reverse 5' -GCCATCACGCCACAGTT-3'
TNF- α	Forward 5' -TGCCTGCTGCACTTTGGA-3'
	Reverse 5' -GCTTGAGGGTTTGTACAACAT-3'
IL-1 β	Forward 5' -TGCACCTGTACGATCACTGAAC-3'
	Reverse 5' -GGCCACAGGTATTTTGTTCATTA-3'
COX-2	Forward 5' -TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3'
	Reverse 5' -AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTTT-3'
BMP-2	Forward 5' -TATCGCAGGCACTCAGGTCA-3'
	Reverse 5' -GGTTGTTTTCCCACTCGTTTCTG-3'
BMP-4	Forward 5' -GCACTGGTCTTGAGTATCCTGA-3'
	Reverse 5' -CTGGTCCCTGGGATGTTCT-3'

III. ヒト骨芽細胞様細胞における Nd:YAG レーザー照射の影響

III-1. Nd:YAG レーザー照射後の細胞生存率

- ・ヒト骨芽細胞様細胞および培養条件

実験には骨芽細胞様細胞としてヒト骨肉腫細胞のクローン化細胞株 Saos-2 (理化学研究所、筑波) を用いた。10 % ウシ胎児血清と 50 mg/ml カナマイシンを含む DMEM 中で 37 °C、5 % CO₂ 存在下にて、培養液を 3 日毎に交換して培養を行った。継代は 80 % コンフルエントに達した時点で行った。

- ・タイムコース

24 well plate にそれぞれ 5.0×10^5 個の細胞を播種し、24 時間後に Nd:YAG レーザー照射を行った。照射直後の細胞の状態を光学顕微鏡で観察した。レーザー照射 1 時間後、24 時間後および 48 時間後に 0.2 % trypsin と 0.1 % EDTA を含む PBS を用いて細胞を回収し、実験 II-1 と同様に生細胞数を測定した (図 14)。

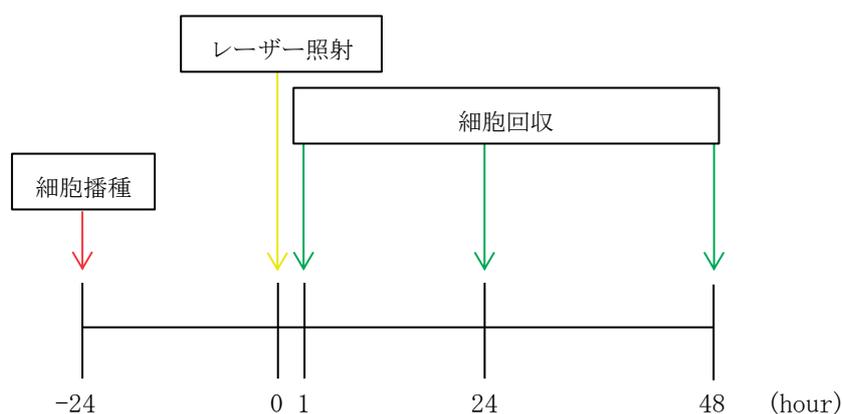


図 14 実験 III-1 のタイムコース

・Nd:YAG レーザー照射条件

320 ミクロンチップを装着したレーザーハンドピースを、照射野が 24 well plate (Corning) の面積 2.0 cm^2 と同等になるように、固定式スタンドを用いて位置を固定した。培養皿底部からレーザーハンドピースの先端までの距離は 2.5 cm とした (図 15 a)。レーザーを照射する際には、出力はメディウムを一旦除去し、レーザーを各条件で 15 秒間照射した後、再度メディウムを添加した。

出力は 0.3 w (10 pps、30 mj)、 0.6 w (20 pps、30 mj)、 2.0 w (20 pps、100 mj)、 4.0 w (20 pps、200 mj) および 6.0 w (30 pps、200 mj) に設定し、レーザー照射を行わないものをコントロールとした。

III-2. Nd:YAG レーザー照射後の骨代謝関連因子の遺伝子発現解析

・Nd:YAG レーザー照射条件

320 ミクロンチップを装着したレーザーハンドピースを用いて照射野が 24 well plate の面積 2.00 cm^2 と同等になるようにし、便宜上 12 well plate (Corning) を 4 分割してそれぞれに各 15 秒間、各 well 合計 1 分間、固定式スタンドを用いて照射した。培養皿底部からレーザーハンドピースの先端までの距離は 2.5 cm とした(図 15 b)。レーザー照射をしないものをコントロールとした。レーザー照射群は各条件を 0.6 w (20 pps、30 mj)、 2.0 w (20 pps、100 mj) とした。

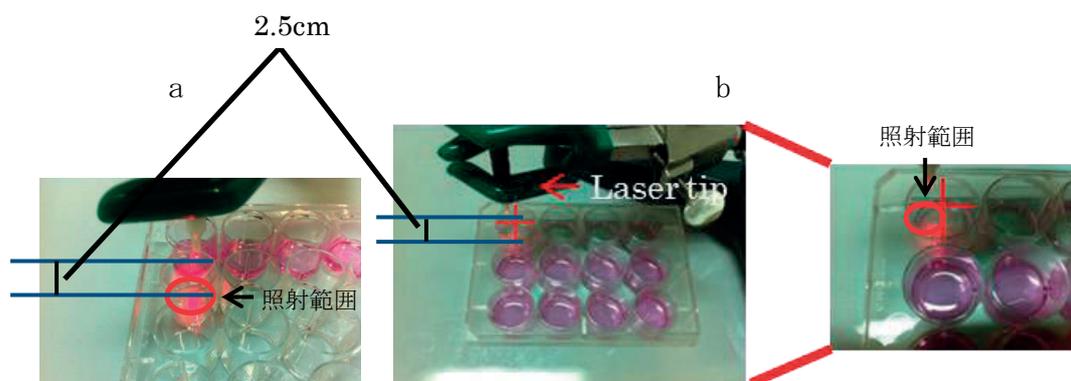


図 15 *In Vitro*におけるNd:YAG レーザー照射方法

a: 実験III-1での照射範囲 b: 実験III-2での照射範囲

・Nd:YAG レーザー照射後の定量 RT-PCR による骨代謝関連因子の解析

12 well plate にそれぞれ 2.0×10^5 個の細胞を播種して、24 時間後に Nd:YAG レーザー照射を行い、1 時間後、24 時間後および 48 時間後に細胞を回収した。実験 II-2 と同様に細胞回収後、骨代謝関連因子として ALP、RANKL および OPG 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR 法を用いて解析した(表 2)。遺伝子発現量はコントロールの GAPDH に対する比で算出し、比較検討した。

表 2 ALP、RANKL、OPG の PCR プライマー塩基配列

Gene	Sequence
GAPDH	Forward 5' -TGGTATCGTGAAGGACTCA-3'
	Reverse 5' -GCCATCACGCCACAGTT-3'
ALP	Forward 5' -TACAAGGTGGGCGGTGA-3'
	Reverse 5' -ACAGCAGACTGCGCCTGGTAGTT-3'
RANKL	Forward 5' -ATATCGTTGGATCACAGCAC-3'
	Reverse 5' -CAAGAGGACAGACTCACTTTATG-3'
OPG	Forward 5' -CTGCTGAAGTTATGGAAACAT-3'
	Reverse 5' - AGGTTAGCATGTCCAATGTG-3'

III-3. Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷後の骨代謝関連遺伝子の発現検討

12 well plate にそれぞれ 2.0×10^5 個のヒト骨芽細胞様細胞を播種し、24 時間後に Redlich ら (2004) の方法を参考に、RPM LC06-SP (トミー精工) を使用して 489 rpm で 20 分間遠心力を負荷した。遠心力負荷直後にレーザーを照射し、1 時間後、24 時間後および 48 時間後に細胞を回収して、以下実験 II-2 と同様に実験を行った。

結 果

I. Er:YAG レーザーおよびNd:YAG レーザー照射のラットにおける 実験的歯の移動に対する影響について

I-1. ラットにおける実験的歯の移動モデルの作製

実験期間中におけるラットの体重は、対照群、装置群、Nd:YAG レーザー群、Er:YAG レーザー群の順に高かったものの、有意差はなく体重は継続して増加を示した(図 16)。また歯の移動距離も、実験期間を通して増加を認めた(図 17)。

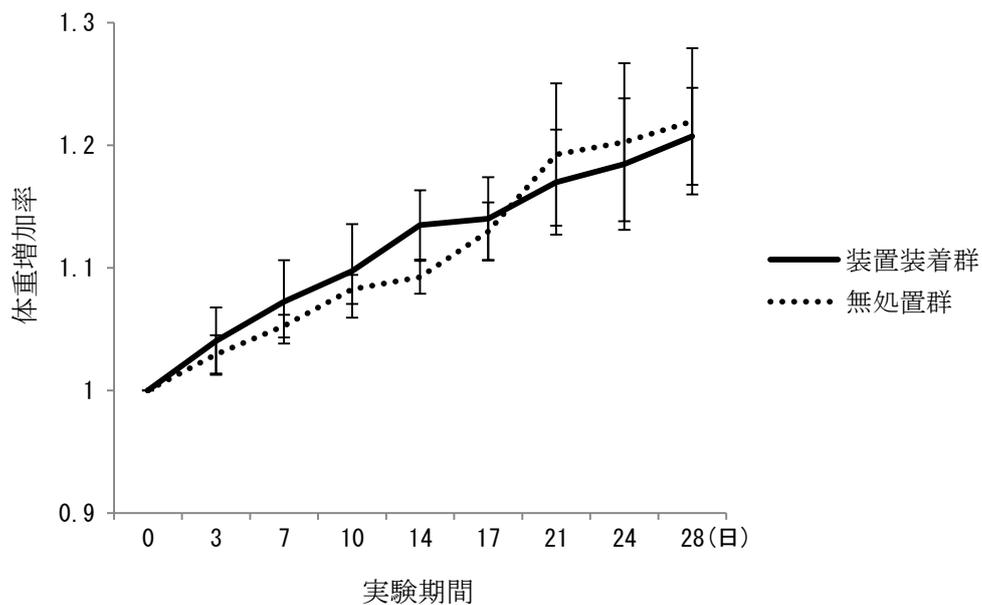


図 16 実験期間中におけるラットの体重変化

装置装着群: n=9

無処置群: n=4

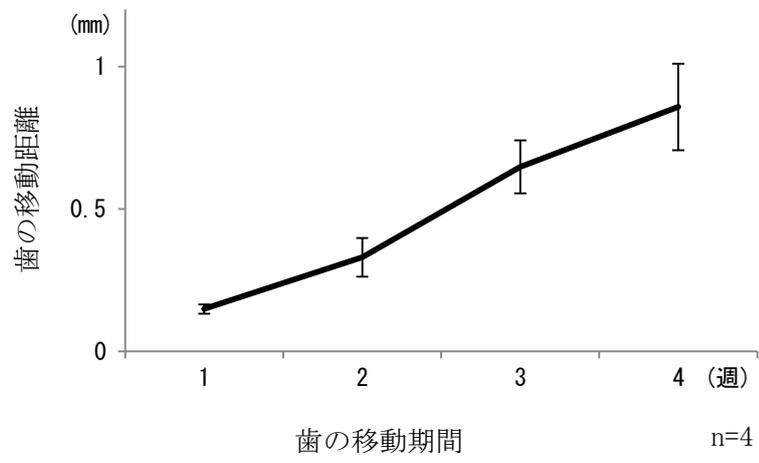


図 17 歯の移動距離変化

I-2. レーザー照射による体重および歯の移動距離への影響

両レーザー照射群は、コントロール群や無処置群と比較して、体重が少ない傾向が認められたものの、有意差はなく継続して増加を示したことから、レーザー照射や実験的歯の移動は全身成長に影響しなかったことが示された(図 18)。

Er:YAG レーザー照射側では、コントロール側と比較して装置装着 3 週間後および 4 週間後に有意に大きな歯の移動が認められ、実験期間を通して移動距離が大きかった(図 19)。

一方、Nd:YAG レーザー照射側では、コントロール側と比較して装置装着 1 週間後に有意に大きな歯の移動が認められ、実験期間を通して移動距離が大きい傾向を示した(図 20)。

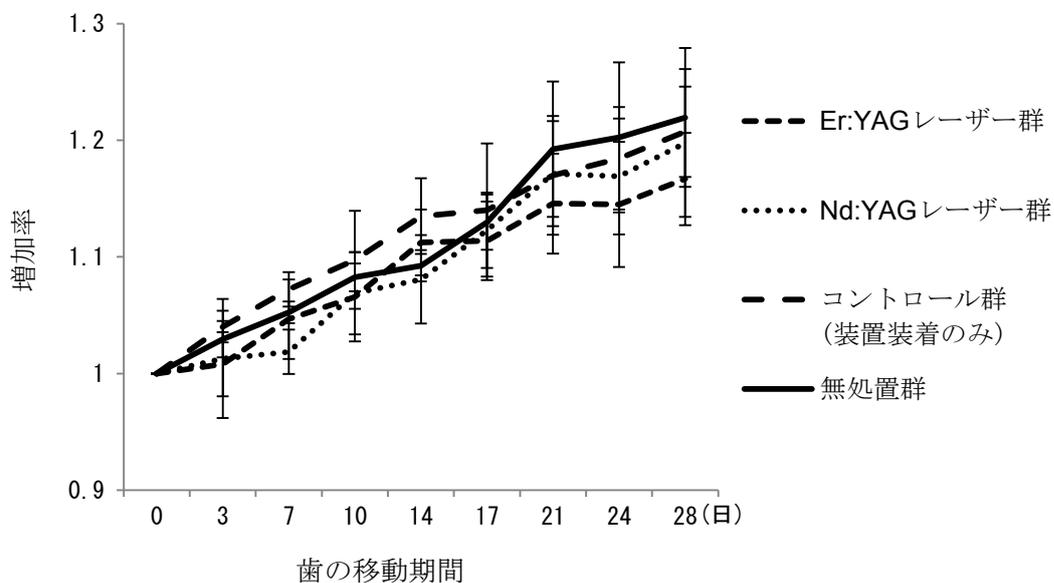


図 18 実験期間中におけるラットの体重変化

Er:YAG レーザー群(装置装着およびEr:YAG レーザー照射): n=9

Nd:YAG レーザー群(装置装着およびNd:YAG レーザー照射): n=12

コントロール群(装置装着): n=9

無処置群(処置なし): n=4

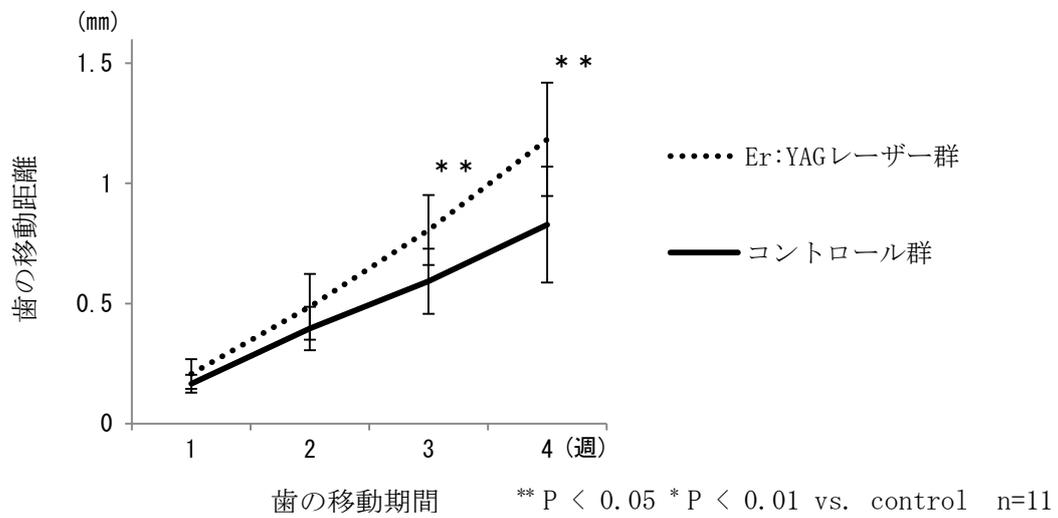


図 19 Er:YAG レーザー照射した歯の移動距離変化

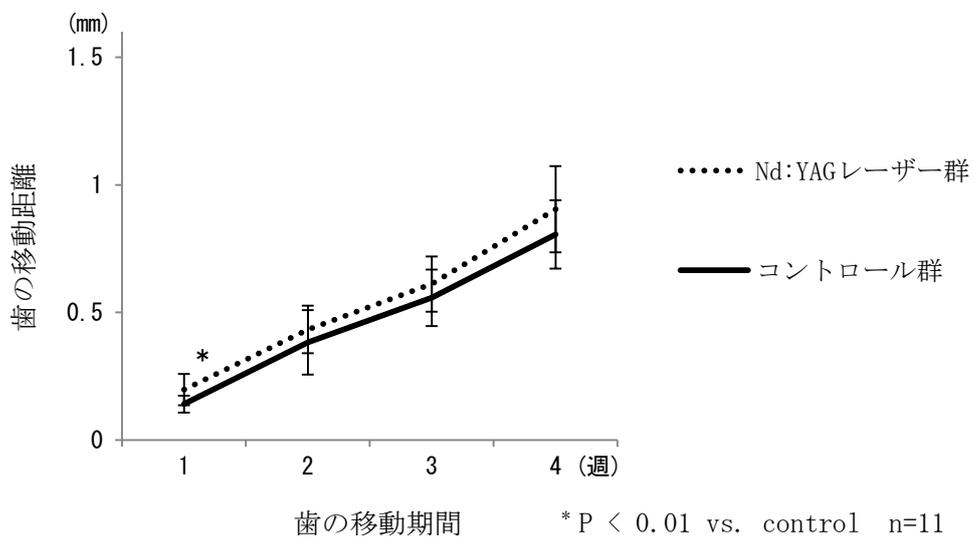


図 20 Nd:YAG レーザー照射した歯の移動距離変化

I-3. レーザー照射が実験的歯の移動に及ぼす組織学的変化

- ・装置装着 4 週間後の組織学的変化 (H-E 染色)

レーザー照射および装置装着 4 週間後の組織切片について、H-E 染色を行い組織像の観察を行った。全群の組織切片に共通して歯は傾斜移動し、近心圧迫側および遠心圧迫側で歯槽骨の吸収および不規則な歯根膜線維が認められたが、歯の移動に伴う病的な吸収・壊死は認められなかった。また新生骨の形成や硝子様変性が一部認められた (図 21)。

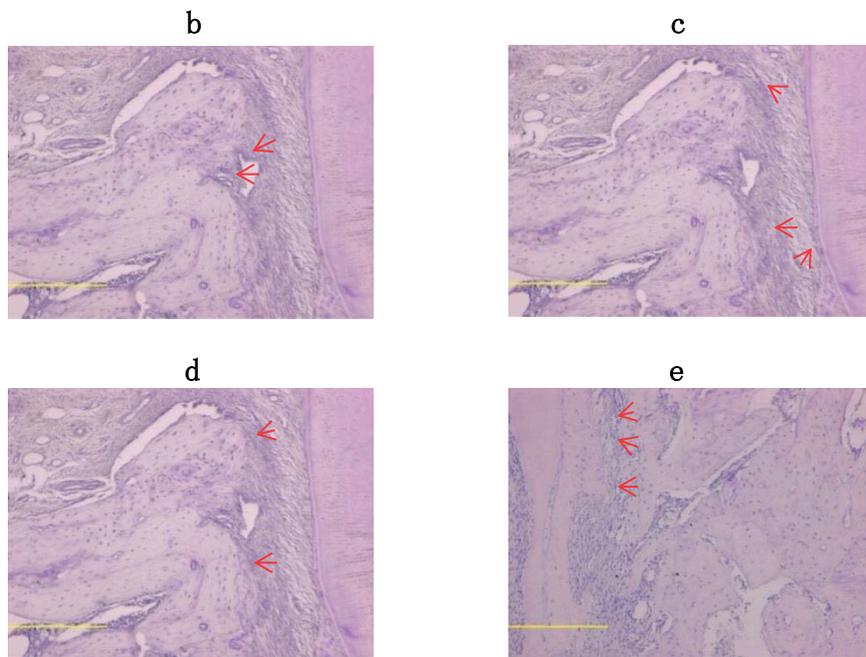
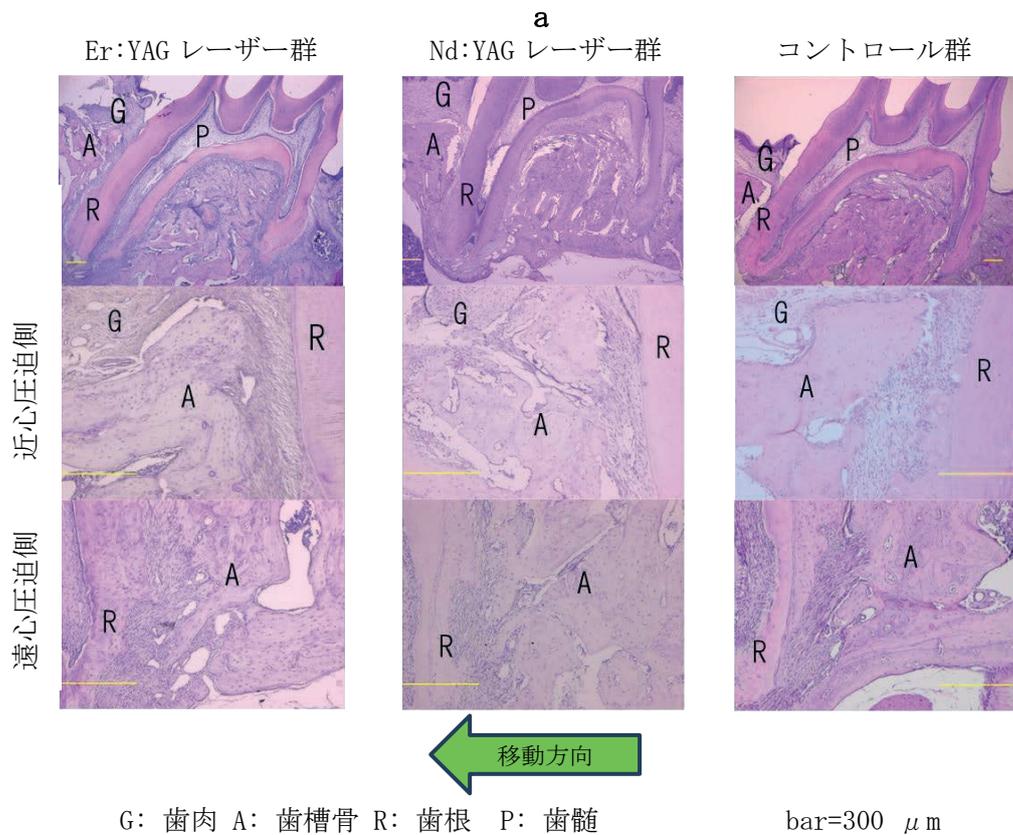


図 21 装置装着 4 週間後の H-E 染色像

a: 各レーザー照射、近心圧迫側および遠心圧迫側での比較 b: 歯槽骨の吸収(←)

c: 不規則な歯根膜線維(←) d: 新生骨の形成(←) e: 硝子様変性(←)

bar=300 μm

・装置装着 4 週間後の組織学的変化 (TRAP 染色)

全群において装置装着 4 週間後に歯槽骨表面および歯根膜に TRAP 陽性細胞が認められた。また、Er:YAG レーザー照射群の近心圧迫側において、コントロール群と比較して、TRAP 陽性細胞が多く観察された (図 22)。

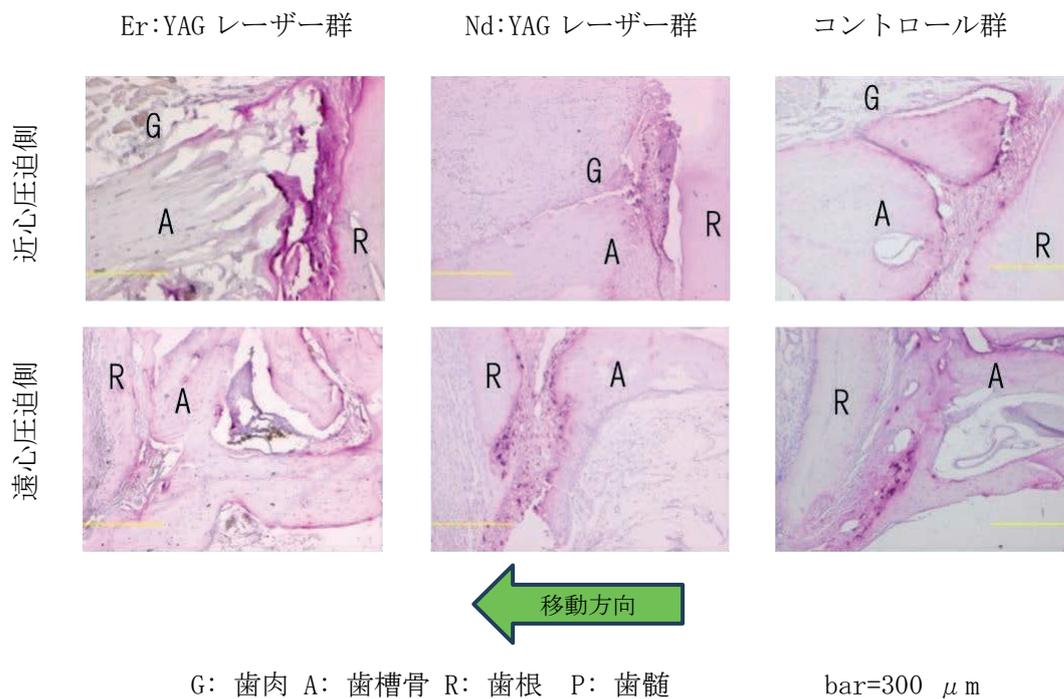


図 22 装置装着 4 週間後の TRAP 染色像

Er:YAG レーザー照射群は、近心圧迫側でコントロール群と比較して有意に TRAP 陽性細胞核数が多く認められた(図 23)。また、Nd:YAG レーザー照射群の近心圧迫側ではコントロール群と比較して、TRAP 陽性細胞核数が有意な差は認められなかったものの、より多い傾向を示した(図 24)。

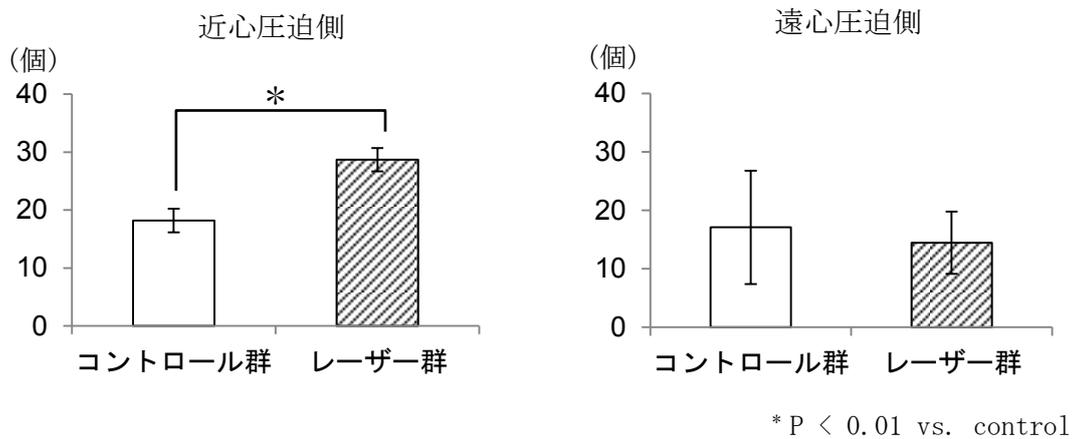


図 23 Er:YAG レーザー照射後の TRAP 陽性細胞核数

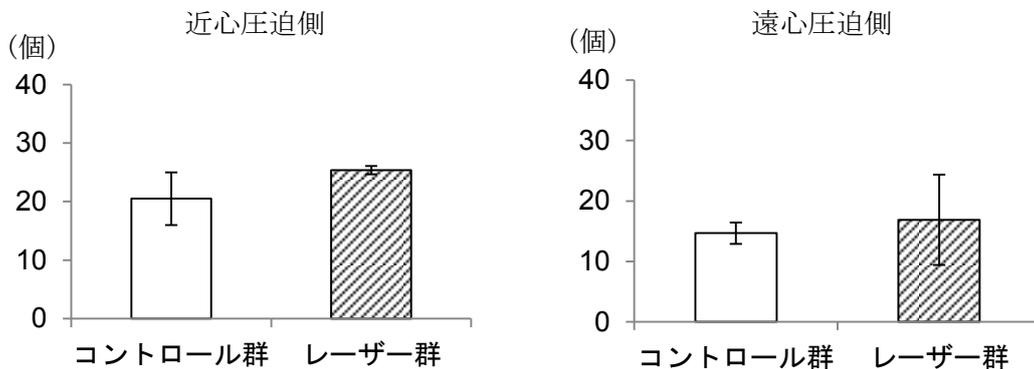


図 24 Nd:YAG レーザー照射後の TRAP 陽性細胞核数

・装置装着 4 週間後免疫組織化学的变化 (ALP 染色)

装置装着 4 週間後、全群において近心圧迫側および遠心圧迫側の歯槽骨、歯根膜、歯根および歯肉に ALP の発現が認められた。また、Er:YAG レーザーおよび Nd:YAG レーザー照射群ともに、近心圧迫側および遠心圧迫側でコントロール群と比較して ALP の発現が多く認められた(図 25)。

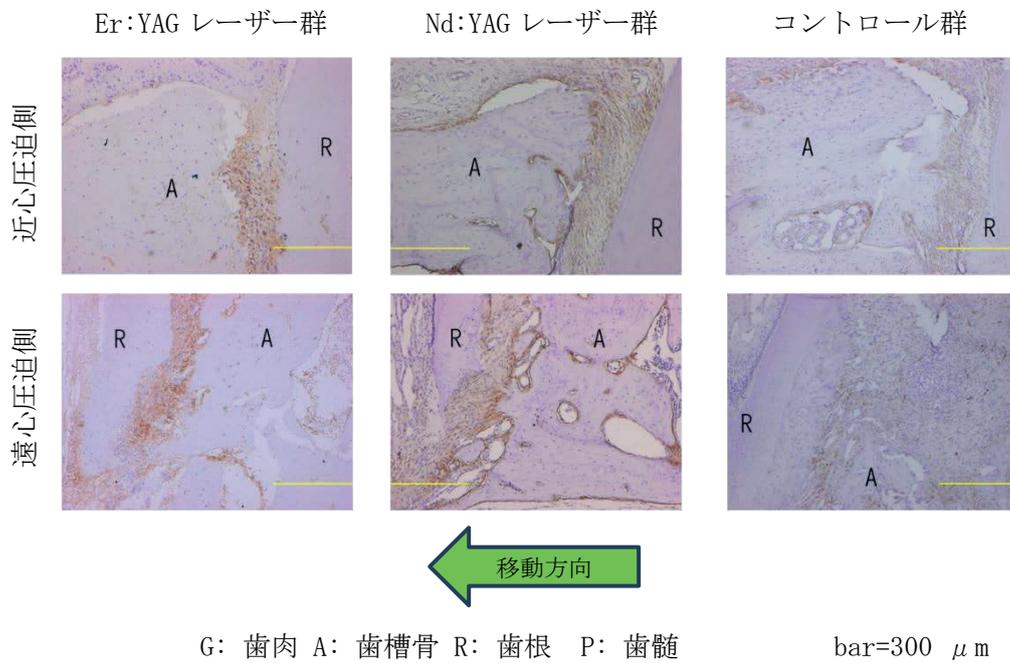


図 25 装置装着 4 週間後の ALP 免疫組織化学染色像

・装置装着 4 週間後の免疫組織化学的变化 (RANKL 染色)

装置装着 4 週間後、全群において近心圧迫側および遠心圧迫側の歯槽骨、歯根膜、歯根および歯肉に RANKL の発現が認められた。また、Er:YAG レーザー照射群および Nd:YAG レーザー照射群において、近心圧迫側でコントロール群と比較して RANKL の発現が多く認められた (図 26)。

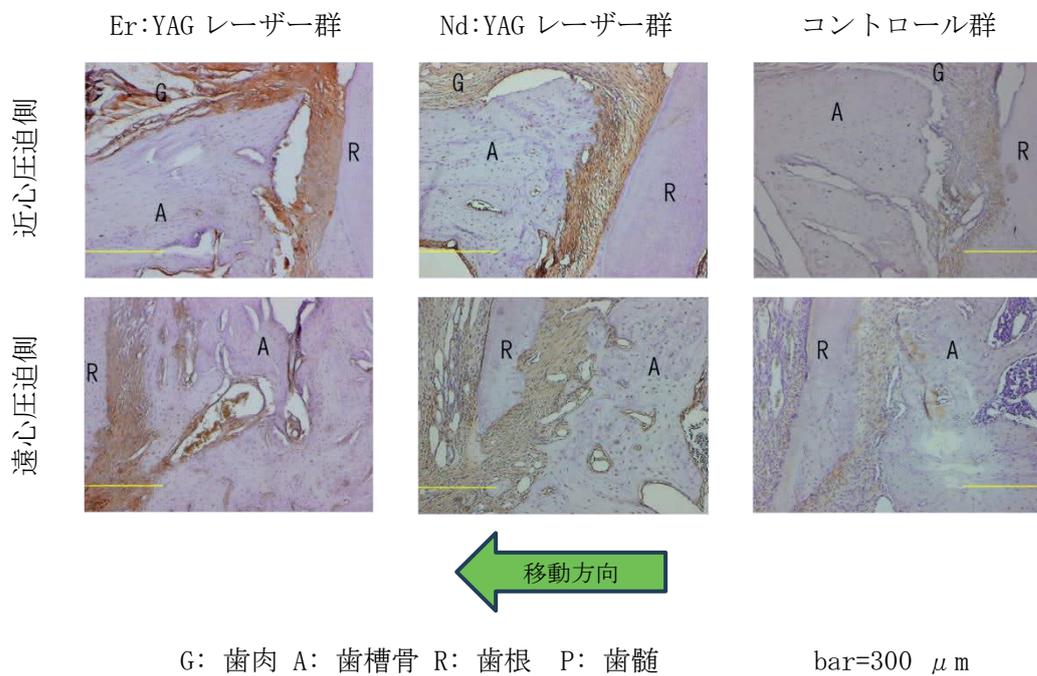
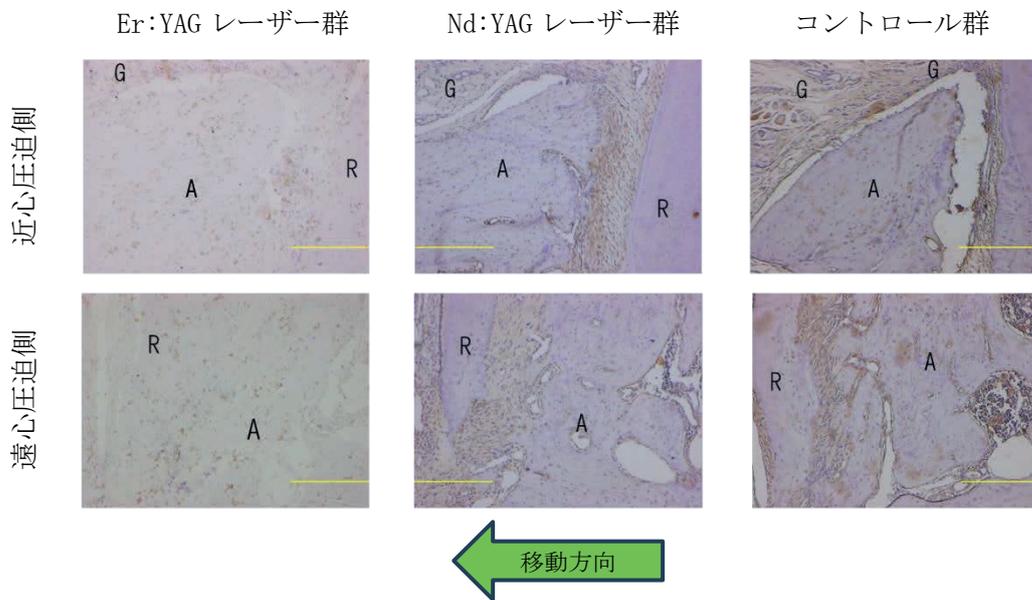


図 26 装置装着 4 週間後の RANKL 免疫組織化学染色像

・装置装着 4 週間後の免疫組織化学的变化 (OPG 染色)

装置装着 4 週間後、全群において近心圧迫側および遠心圧迫側の歯槽骨、歯根膜、歯根および歯肉に OPG の発現が認められた。また、Er:YAG レーザー照射群の近心圧迫側では、コントロール群と比較して OPG の発現が低い傾向を示した(図 27)。



G: 歯肉 A: 歯槽骨 R: 歯根 P: 歯髄 bar=300 μ m

図 27 装置装着 4 週間後の OPG 免疫組織化学染色像

I-4. レーザー照射によるラット組織表面の状態と内部組織の温度変化

Er:YAG レーザーおよび Nd:YAG レーザー照射時の組織表面の写真を図 28 に示す。Er:YAG レーザー照射直後の歯肉表面はアブレーションや出血が認められた。一方、Nd:YAG レーザー照射後の歯肉表面には大きな変化は認められなかった。

レーザー照射によるラット組織の部位別温度上昇の平均は、歯槽骨表面において Er:YAG レーザーで 2.72 °C、Nd:YAG レーザーで 5.10 °C であった。歯根中央においては Er:YAG レーザーで 2.12 °C、Nd:YAG レーザーで 4.13 °C であった。歯根先端部においては、Er:YAG レーザーで 1.41 °C、Nd:YAG レーザーで 2.37 °C であった(図 29、表 3)。

Er:YAG レーザー照射



Nd:YAG レーザー照射



図 28 レーザー照射後の組織表面の状態

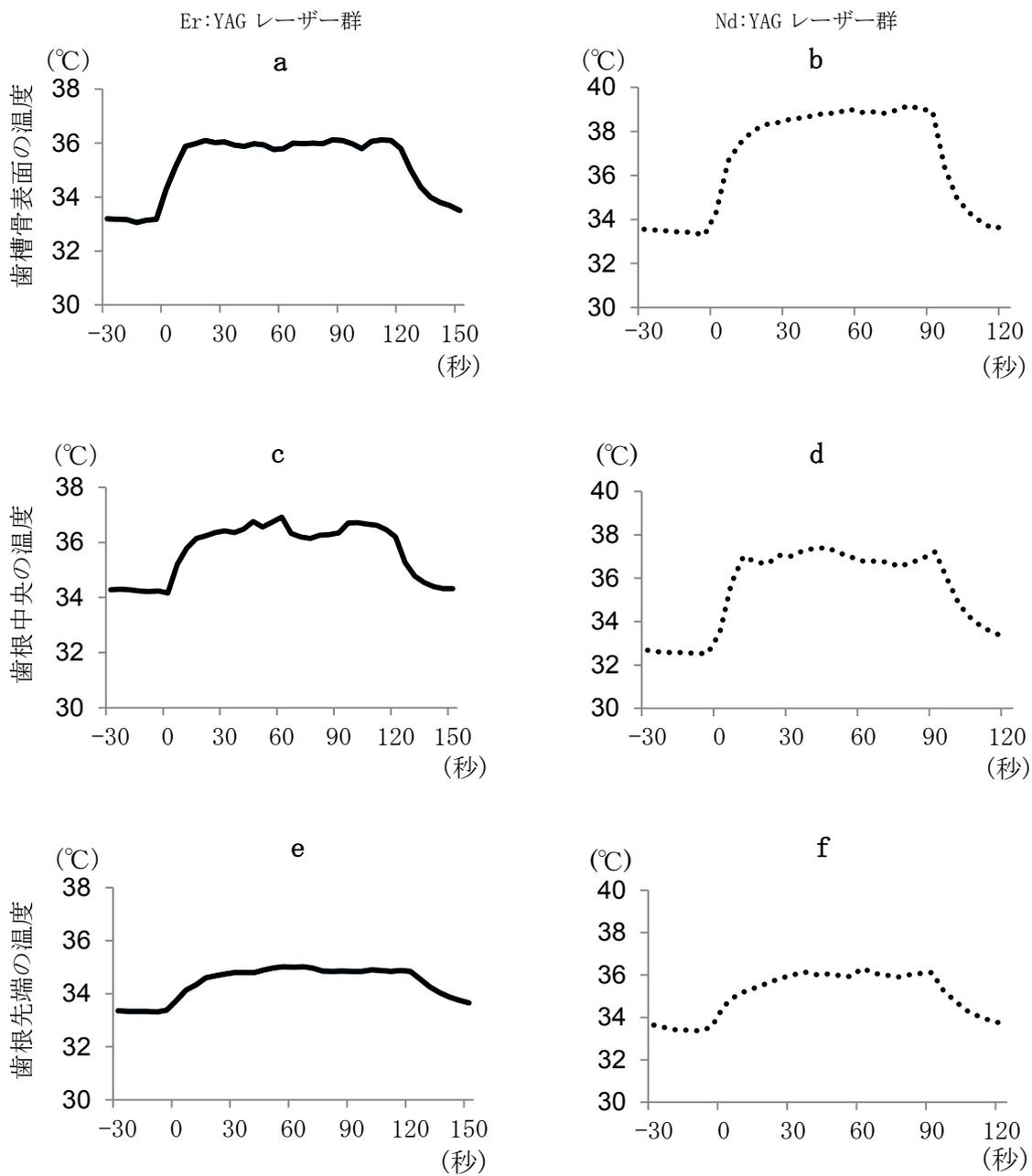


図 29 レーザー照射によるラット内部組織の温度変化

a 歯槽骨表面、c 歯根中央、e 歯根先端：Er:YAG レーザー照射時温度変化

b 歯槽骨表面、d 歯根中央、f 歯根先端：Nd:YAG レーザー照射時温度変化

n=5

表 3 レーザー照射による内部組織平均温度変化(°C)と歯肉表面の状態

平均上昇温度(°C)	歯槽骨表面	歯根中央	歯根先端	歯肉表面
Er:YAG laser	+2.72	+2.12	+1.41	アブレーション、出血
Nd:YAG laser	+5.1	+4.13	+2.37	(-)

II. ヒト歯肉線維芽細胞における Er:YAG レーザー照射の影響

II-1. Er:YAG レーザー照射後の細胞生存率について

- Er:YAG レーザー照射直後の細胞の状態

Er:YAG レーザー照射直後のヒト歯肉線維芽細胞を光学顕微鏡で観察したところ、コントロール群と比較して 1.2 w 群では大きな変化が認められなかった。一方 3.0 w 群では、細胞が剥離し、細胞間に空隙が多く観察された。1.2 w 群ではコントロール群と同様の像が観察された(図 30)。

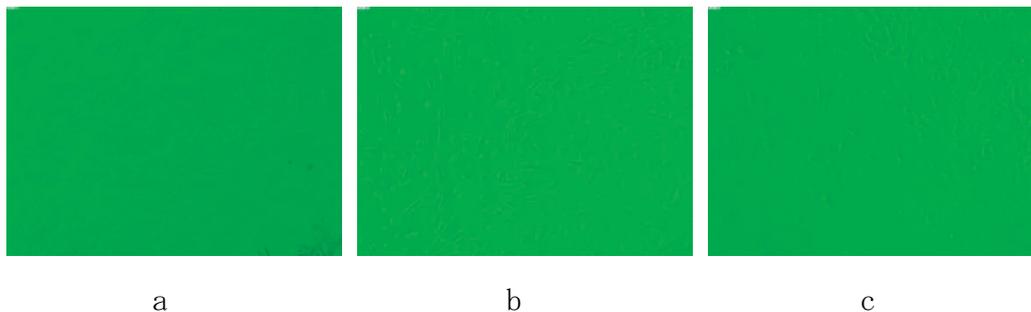


図 30 Er:YAG レーザー照射直後のヒト歯肉線維芽細胞の写真
a: コントロール、b: 1.2 w (20 pps 60 mj)、c: 3.0 w (20 pps 150 mj)

- Er:YAG レーザー照射後の細胞生存率および増殖について

Er:YAG レーザー照射 24 時間後の細胞生存率は、コントロール群と比較して 1.2 w 群(20 pps 60 mj)以下では細胞数に有意差は認められなかった。3.0 w 群では細胞数はコントロール群と比較して、約 7 割程度まで有意に減少した(図 31)。また 0.6 w および 1.2 w での細胞数の経時的変化については、各群間での有意差はなくコントロール群と同様に増殖が認められた(図 32)。

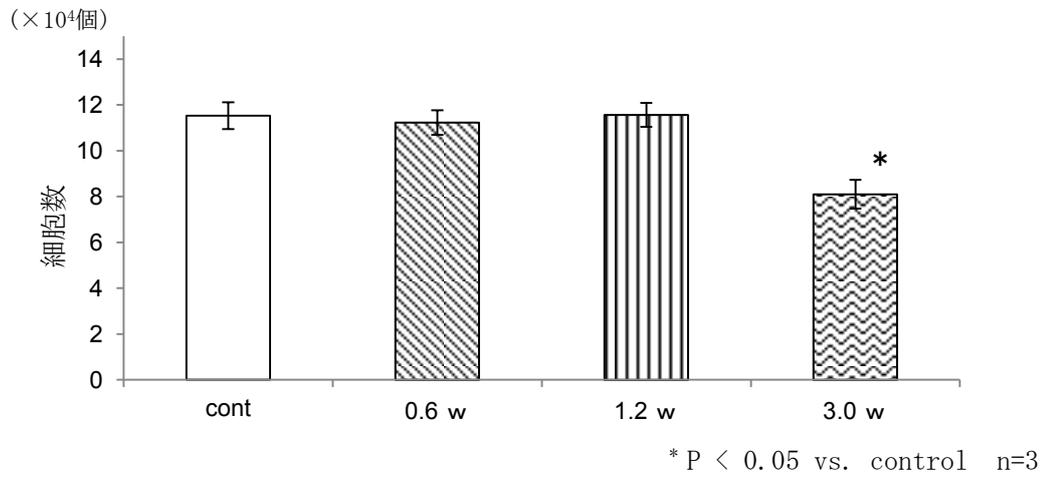


図 31 Er:YAG レーザー照射 24 時間後の細胞数

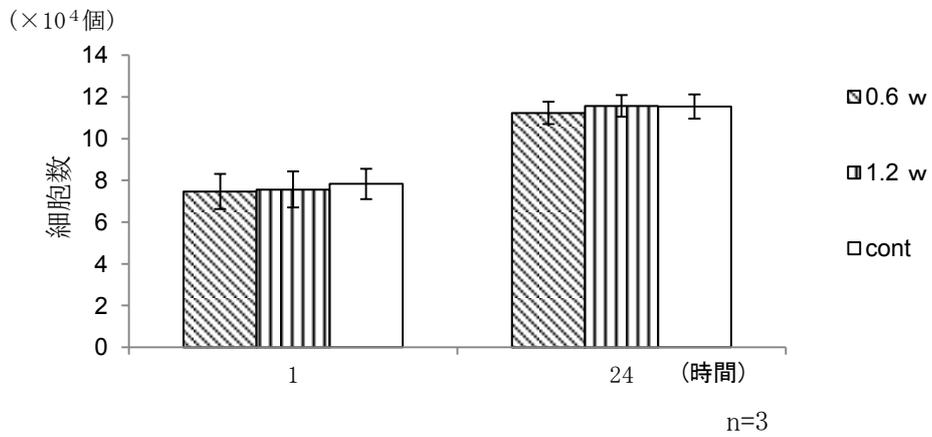


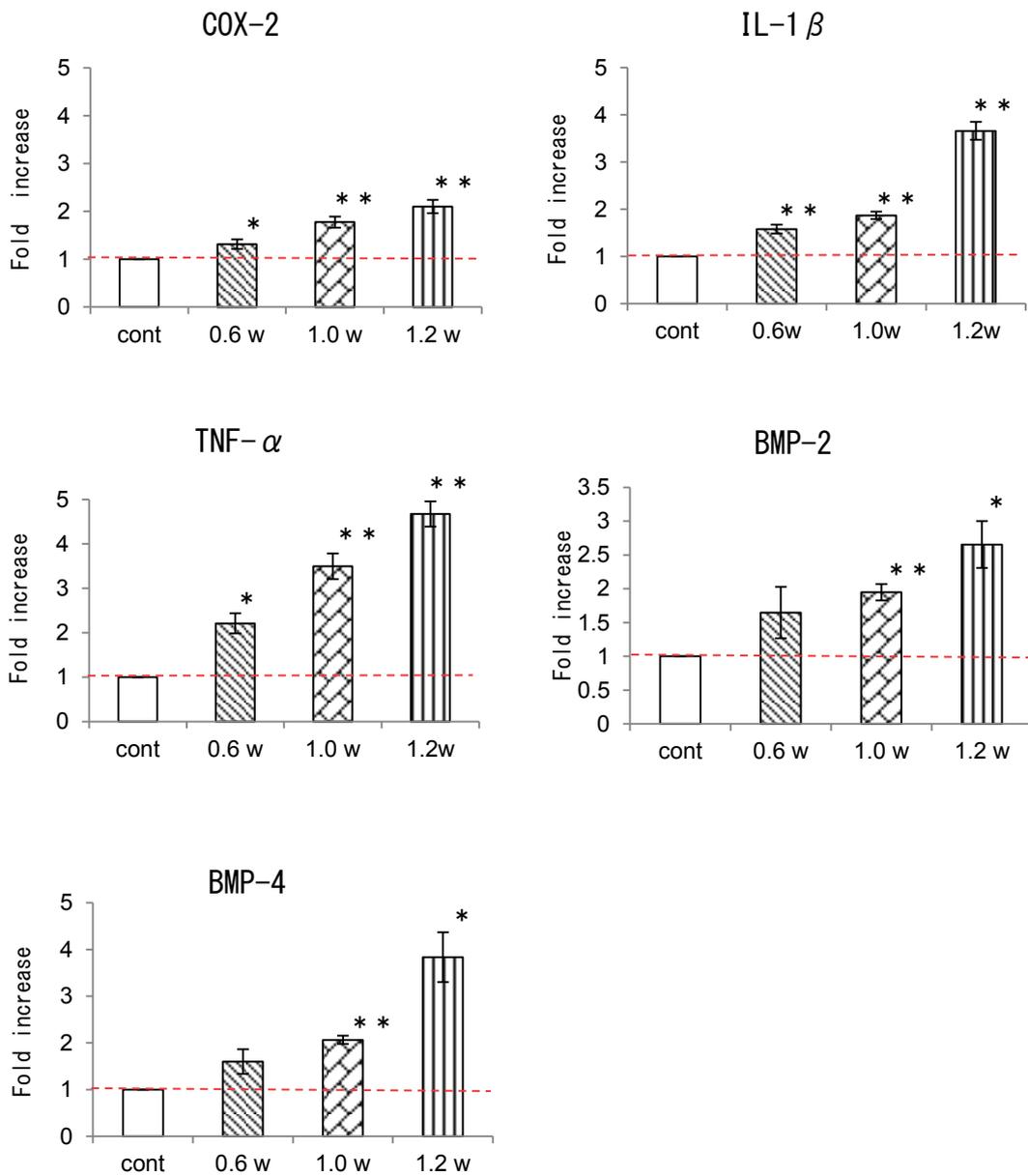
図 32 Er:YAG レーザー照射後の細胞数の経時的変化

II-2. Er:YAG レーザー照射後の定量 RT-PCR による炎症性メディエータ

ー関連遺伝子発現の検討

炎症性メディエーターであり破骨細胞関連因子でもある COX-2、IL-1 β 、TNF- α および炎症性メディエーター関連因子であり骨形成因子でもある BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現を検討した。

レーザー照射直後の細胞を回収し、定量 RT-PCR にて遺伝子の発現検討を行ったところ、COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現は、それぞれ照射エネルギー量に依存して増加し、1.2 w で最も大きな値を示した(図 33)。



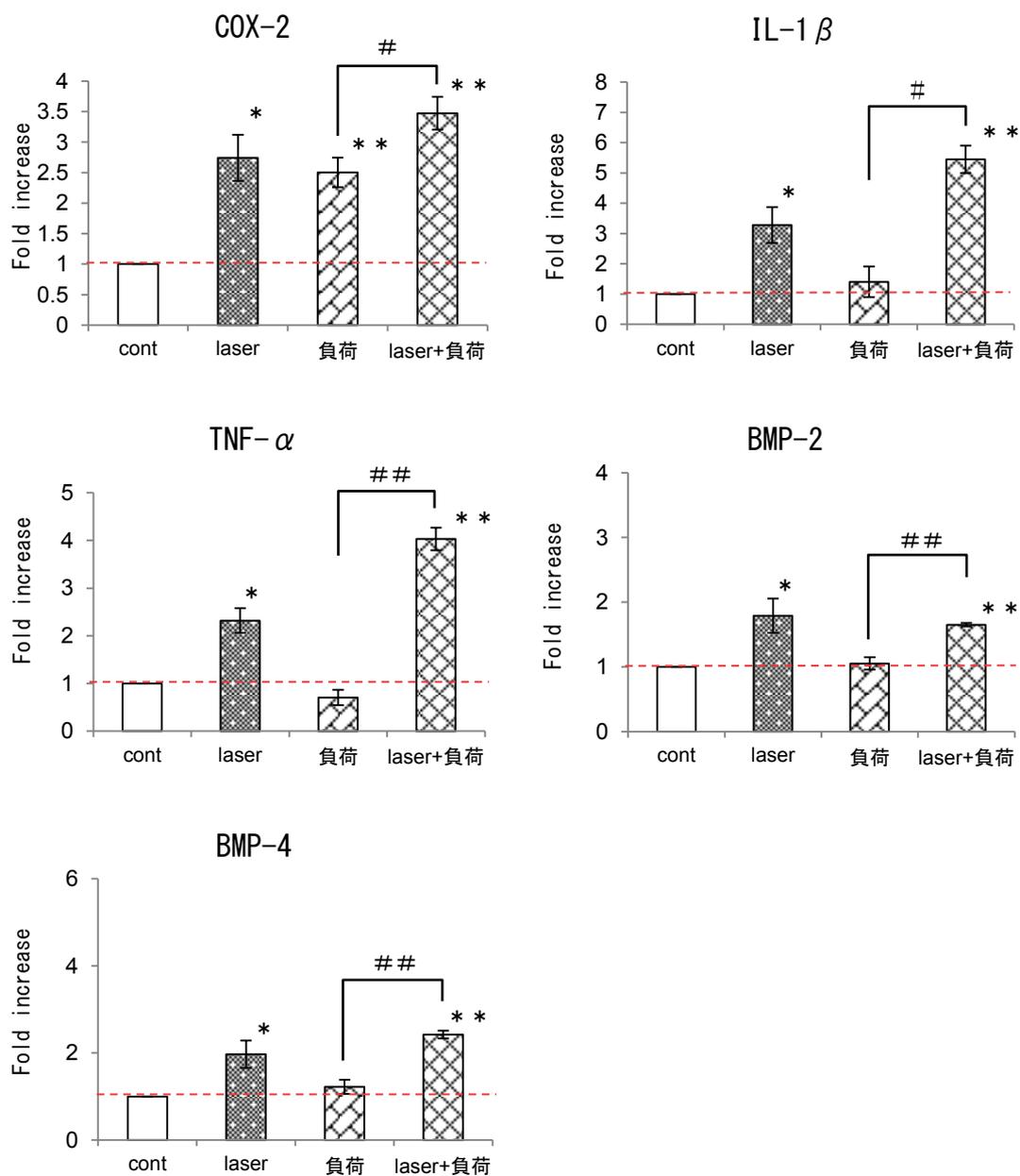
** P < 0.01 * P < 0.05 vs. control n=3

----- control level

図 33 Er:YAG レーザー照射後の COX-2、IL-1β、TNF-α、BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現

II-3. Er:YAG レーザー照射および遠心力負荷併用時の炎症性メディエーター関連遺伝子発現の検討

負荷群はコントロール群と比較して、COX-2 の遺伝子発現が有意に高い値を示した。IL-1 β 、TNF- α 、BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現は、負荷群では有意な差を認めなかった。レーザー負荷群では、負荷群と比較して COX-2、IL-1 β 、TNF- α 、BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現が有意に高い値を示した(図 34)。



** P < 0.01, * P < 0.05 vs. control, ## P < 0.01, # P < 0.05 n=3

----- control level

図 34 Er:YAG レーザー照射および遠心力負荷併用時の COX-2、IL-1β、TNF-α、BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現

cont: コントロール

laser: レーザー照射のみ

負荷: 遠心力負荷のみ

Laser+負荷: レーザー照射および遠心力負荷

III. ヒト骨芽細胞様細胞における Nd:YAG レーザー照射の影響

III-1. Nd:YAG レーザー照射後の細胞生存率

Nd:YAG レーザー照射直後のヒト骨芽細胞様細胞を光学顕微鏡で観察したところ、コントロール群と比較して 2.0 w 群では大きな変化は認められなかった。一方、4.0 w 群以上では細胞が剥離し、細胞間に空隙が多く観察された。2.0 w 群ではコントロール群と同様の像が観察された(図 35)。

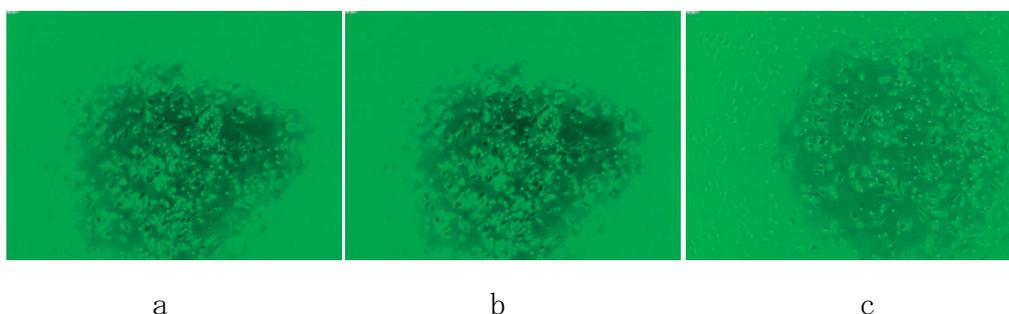


図 35 Nd:YAG レーザー照射直後の Saos2 の細胞状態

a: コントロール、b: 2.0 w (20 pps 100 mj) 、c: 4.0 w (20 pps 200 mj)

Nd:YAG レーザー照射 24 時間後の細胞生存率は、コントロール群と比較して 2.0 w 群(20 pps 100 mj)以下では細胞数に有意な差は認められなかった。4.0 w 群および 6.0 w では、コントロール群と比較して細胞数は約 7~8 割程度まで有意に減少した(図 36)。また、2.0 w 以下での細胞数の経時的変化については、各群間での有意差はなく、コントロール群と同様の増殖が認められた(図 37)。

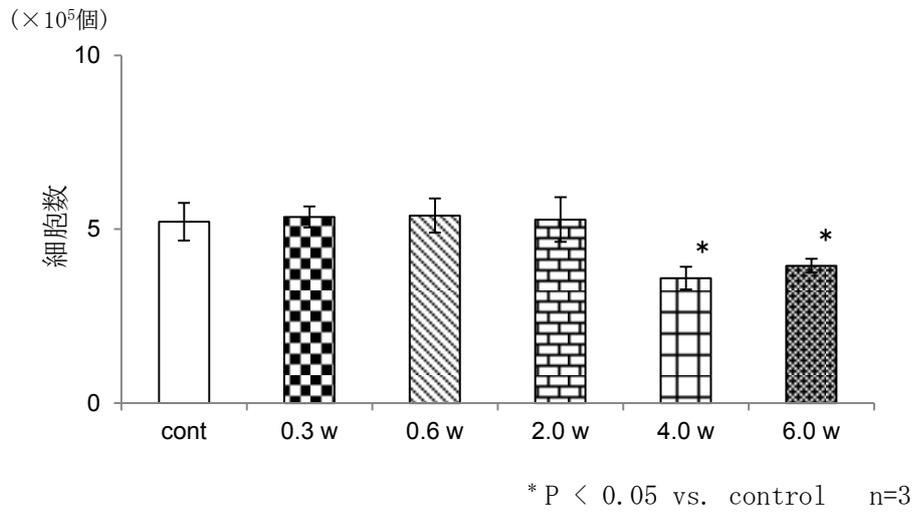


図 36 Nd:YAG レーザー照射 24 時間後の細胞数

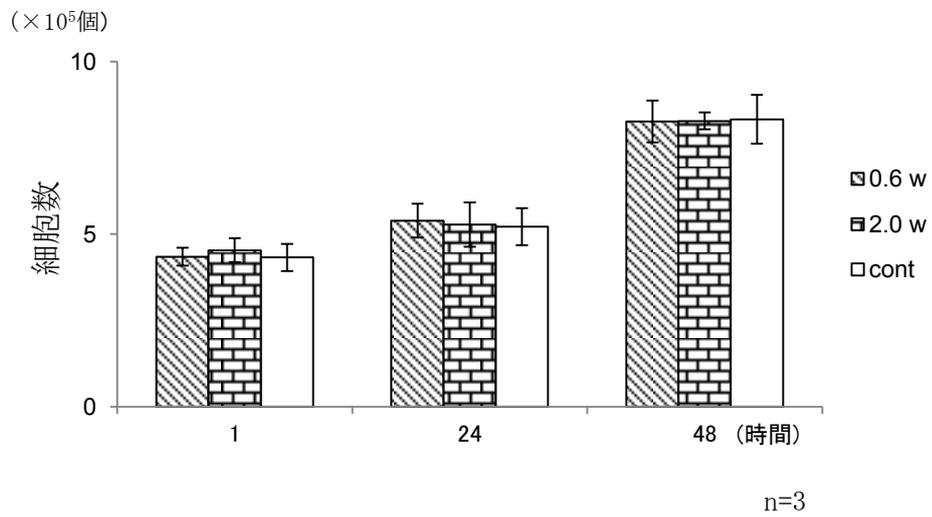


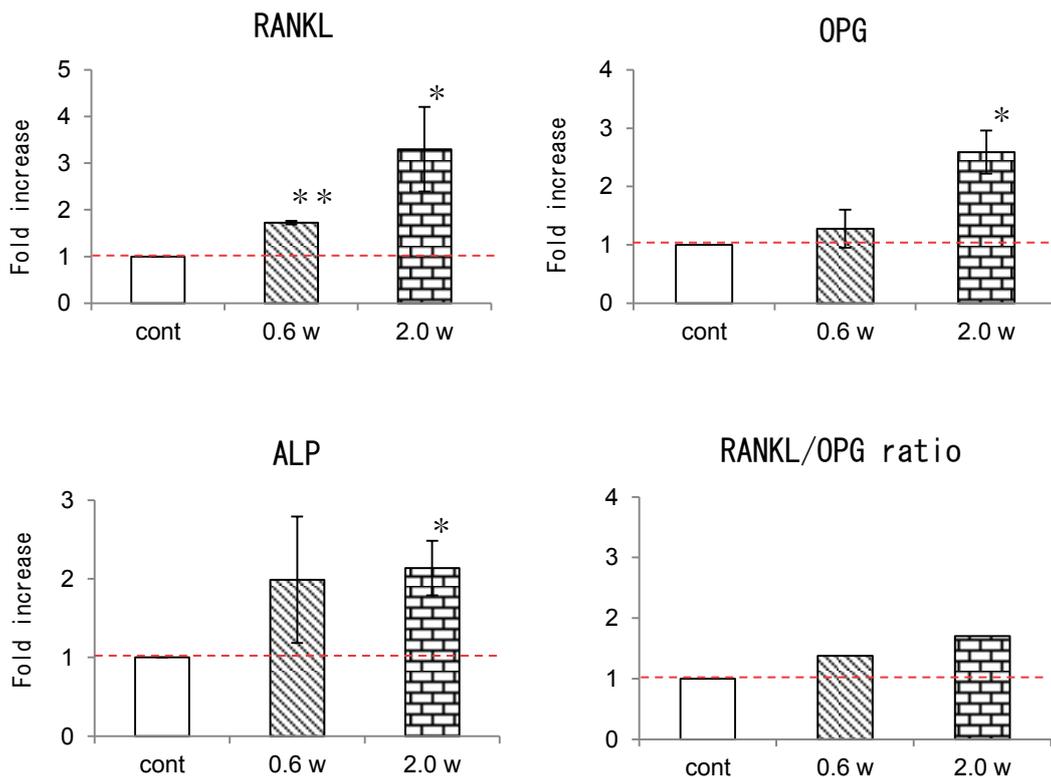
図 37 Nd:YAG レーザー照射後の細胞数の経時的変化

III-2. Nd:YAG レーザー照射後の骨代謝関連因子の遺伝子発現解析

骨芽細胞分化関連遺伝子として ALP、破骨細胞分化関連遺伝子として RANKL および OPG の遺伝子発現について定量 RT-PCR 法を用いて解析した。

・Nd:YAG レーザー照射 1 時間後の遺伝子発現

レーザー照射 1 時間後の細胞を回収し、骨代謝関連遺伝子の発現を検討をしたところ、2.0 w 群ではコントロール群と比較して RANKL、OPG および ALP の遺伝子発現が有意に高い値を示した。また RANKL/OPG 比は 0.6 w 群および 2.0 w 群において、コントロール群と比較して高い値を示した(図 38)。



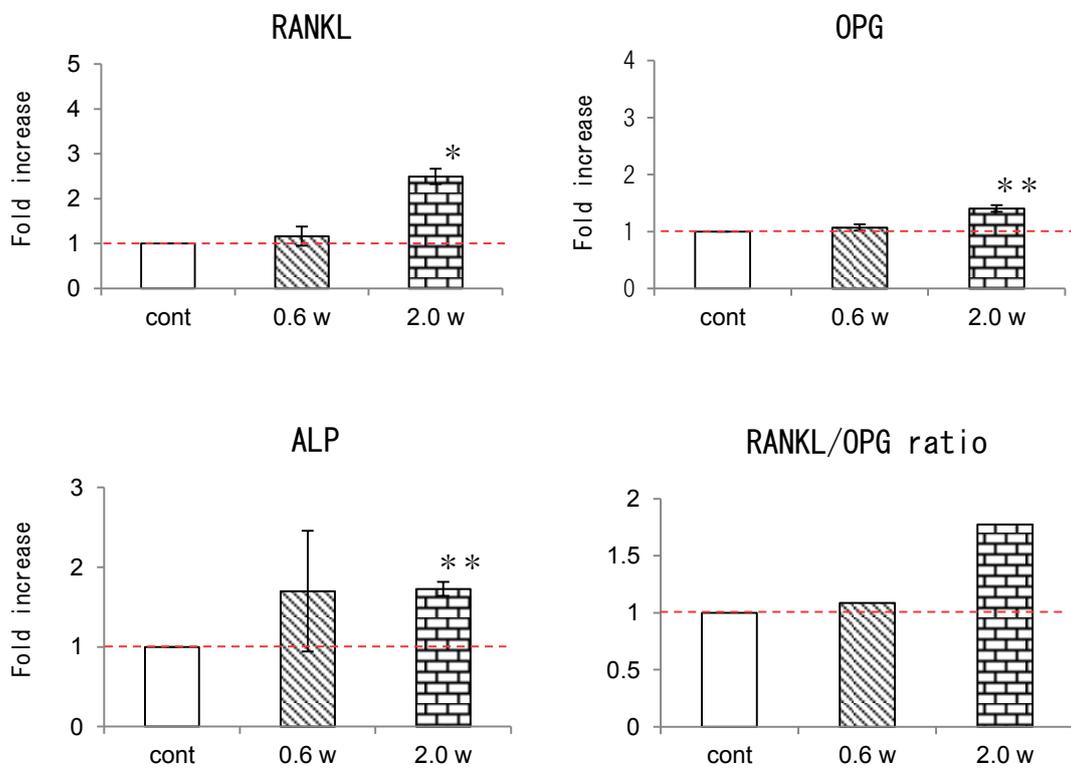
** P < 0.01 * P < 0.05 vs. control n=3

----- control level

図 38 Nd:YAG レーザー照射 1 時間後の RANKL、OPG および ALP の遺伝子発現

・Nd:YAG レーザー照射 24 時間後の遺伝子発現について

レーザー照射 1 時間後と同様にして、24 時間後の遺伝子発現について検討した結果、2.0 w 群ではコントロール群と比較して RANKL、OPG および ALP の遺伝子発現が有意に高い値を示した。また、RANKL/OPG 比は 2.0 w 群において他の群と比較して高い値を示した(図 39)。



** P < 0.01 * P < 0.05 vs. control n=3
 ---- control level

図 39 Nd:YAG レーザー照射 24 時間後の RANKL、OPG および ALP の遺伝子発現

・Nd:YAG レーザー照射 48 時間後の遺伝子発現について

レーザー照射 1 時間後と同様にして、48 時間後の遺伝子発現について検討した結果、Nd:YAG レーザー照射群は、コントロール群と比較して有意な差は認められなかった。また、0.6 w 群および 2.0 w 群の RANKL/OPG 比は、コントロール群と比較してほぼ同等の値を示した (図 40)。

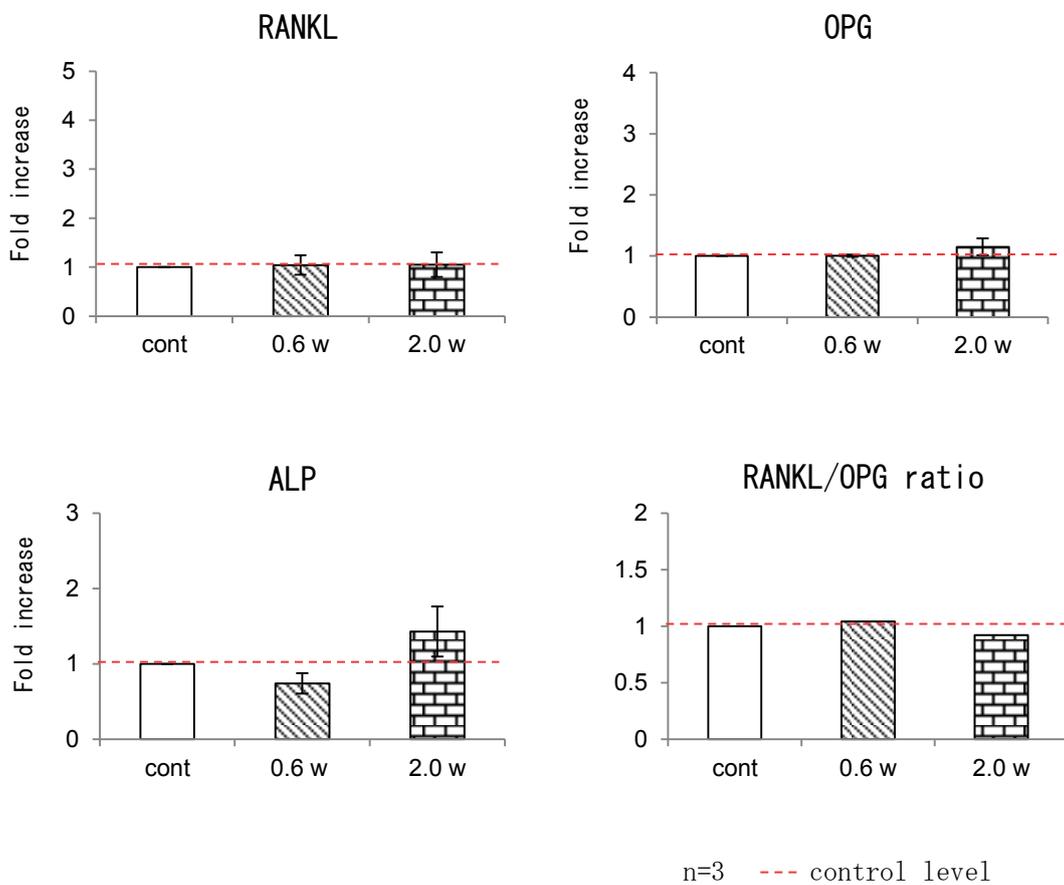


図 40 Nd:YAG レーザー照射 48 時間後の RANKL、OPG および ALP の遺伝子発現

III-3. Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷後の骨代謝関連遺伝子発現の検討

・Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 1 時間後の遺伝子発現

Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 1 時間後の細胞を回収し、定量 RT-PCR にて骨代謝関連遺伝子の発現を検討した。その結果、レーザー群および負荷群の OPG、RANKL および ALP の遺伝子発現は、コントロール群と比較して有意に高い値を示した。またレーザー負荷群は、負荷群と比較して RANKL および ALP の遺伝子発現が有意に高く、OPG は有意に低い値を示した。レーザー負荷群では、他の群と比較して、RANKL/OPG 比が高い値を示した(図 41)。

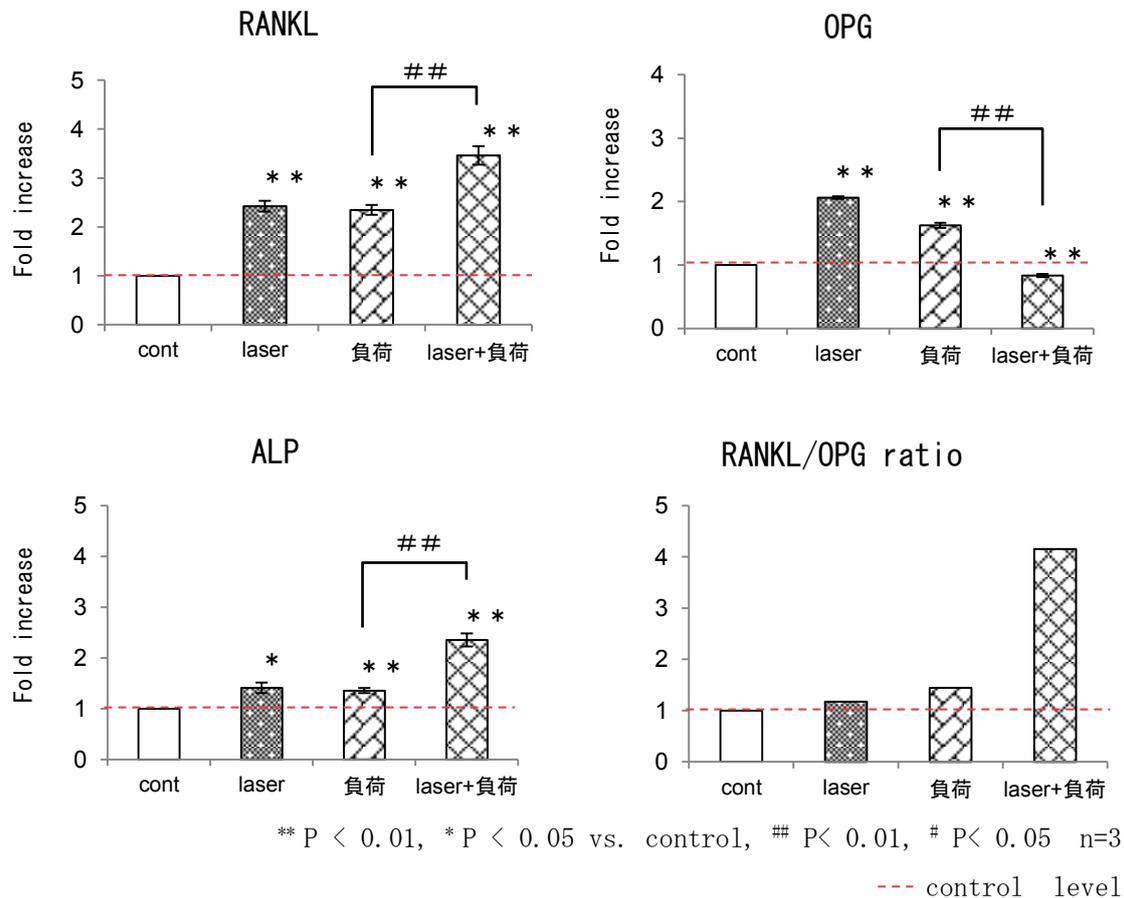
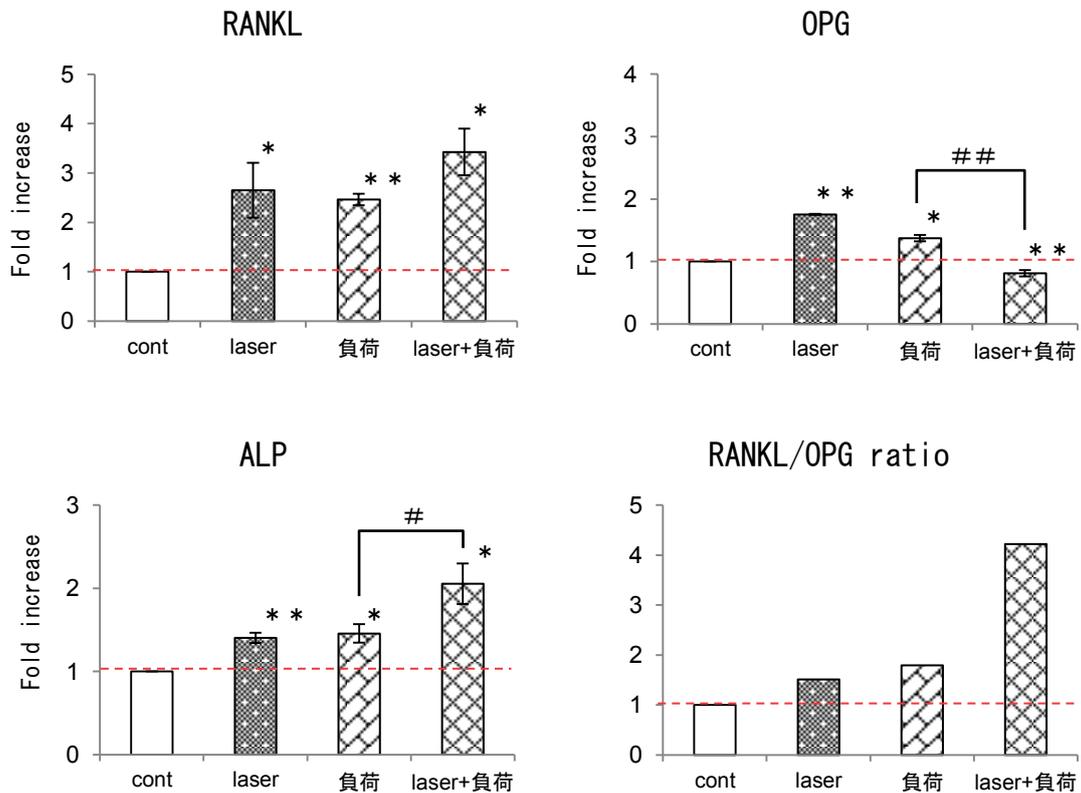


図 41 Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 1 時間後の RANKL、OPG および ALP の遺伝子発現

• Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 24 時間後の遺伝子発現

Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 1 時間後と同様にして、24 時間後の遺伝子発現について検討した結果、レーザー群および負荷群の OPG、RANKL および ALP の遺伝子発現は、コントロール群と比較して有意に高い値を示した。またレーザー負荷群は負荷群と比較して、ALP の遺伝子発現が有意に高く、OPG の遺伝子発現は有意に低い値を示した。また、他の群と比較して RANKL/OPG 比が高い値を示した(図 42)。



** P < 0.01, * P < 0.05 vs. control, ## P < 0.01, # P < 0.05 n=3

--- control level

図 42 Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 24 時間後の RANKL、OPG および ALP の遺伝子発現

・Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 48 時間後の遺伝子発現について

Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 1 時間後と同様にして、48 時間後の遺伝子発現について検討を行った結果、負荷群の ALP 遺伝子発現はコントロール群と比較して有意に高い値を示したが、それ以外に有意な差は認められなかった(図 43)。

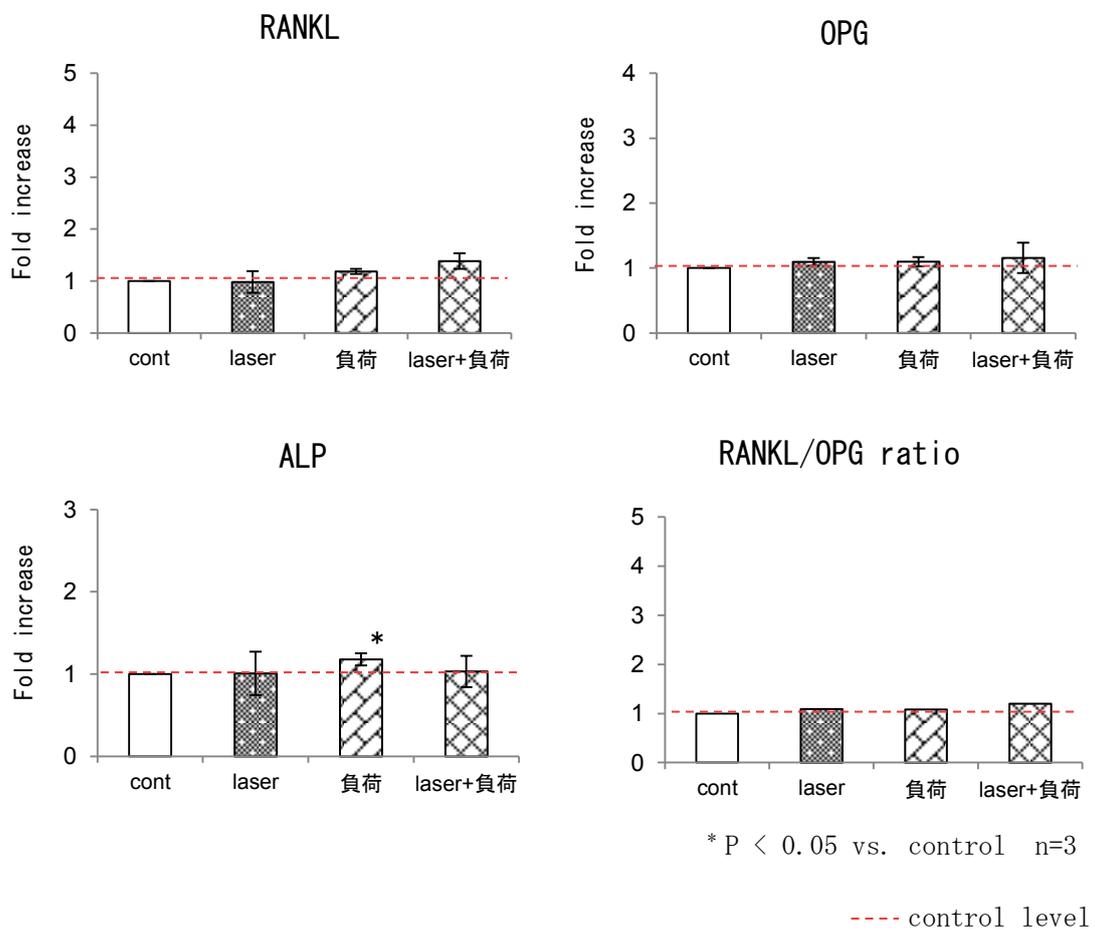


図 43 Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷 48 時間後の RANKL、OPG および ALP の遺伝子発現

考察

I. Er:YAG レーザーおよび Nd:YAG レーザー照射のラットにおける実験的歯の移動に対する影響について

I-1. ラットにおける実験的歯の移動モデルの作製

・実験動物について

これまでに、実験的歯の移動を目的とした多くの動物実験が行われ、マウス (Yoshimatsu *et al.*, 2006)、ラット (Kawasaki *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2009)、ネコ (Celebi AA *et al.*, 2013)、イヌ (Kim *et al.*, 2010)、ラビット (Sun *et al.*, 2001)、ブタ (Tarek *et al.*, 2011) 等が用いられてきた。またヒトを対象とした臨床研究もいくつか報告されている (Cruz *et al.*, 2004; Genc *et al.*, 2013)。

動物実験を行う上において、小型動物は繁殖率が高く、世代交代が早いため成長の経過を追いやすいという利点がある。一方で、大型動物は形態がヒトに近いという利点がある (Saito, 1986)。ラットはマウスより体長が大きいため、装置等の装着が容易であり、また大型動物を使用するよりも組織切片の作製が簡便かつ低コストであるなどの利点があり、本研究ではラットを用いた。

ラットは出生から生後 3 週頃までが哺乳期であり、生後 10 週前後までが幼若期、次いで生後 10 週頃よりヒトにおける思春期に相当する第二次成長期となり、生後およそ 14 週で成長が終了する (Saito, 1986)。したがって、本研究で設定したラットの生後 10~14 週という実験期間は、ヒトの 15 歳頃から成長が完全に終了する 20 歳頃の青年期初期に相当することになる。これは、矯正歯科臨床においてマルチブラケット装置を用いて行う治療期間を包含していることから、

歯の移動について調べる上では妥当な週齢であると考えられる。

- ・実験期間中におけるラットの体重変化および歯の移動距離と実験モデルの有用性について

Gonzales ら(2008)はラットにおける歯の移動を牽引力 10、25、50、100 g の条件で行い、歯の移動距離を測定した。その結果、100 g 群では移動開始 2 週間後に他の群と比較して有意に移動距離が小さい値を示した。しかし、4 週間後には 25 g および 50 g 群と比較して有意差を認めず、さらに 10 g 群では移動開始 4 週間後に他の群と比較して有意に大きな移動距離を示した。また歯根吸収は 10 g 群で最も少ないと報告している。

ヒト上顎第一大臼歯の至適矯正力を 270 g 以下(Jarabak, 1972)とすると、至適矯正力が歯根表面の大きさに依存し、ヒト上顎第一大臼歯歯根表面積がラット上顎第一臼歯歯根表面積の約 20 倍ということから、ラット上顎第一臼歯の至適矯正力は 13.5 g 以下であると推察できる。そのため本研究では、牽引力を 10 g と設定した。

本研究では、ラットの第一臼歯とクローズドコイルスプリングをリガチャーワイヤーで結紮し、他方は切歯とクローズドコイルスプリングをリガチャーワイヤーならびにレジンで固定して、歯の移動を行った。このラットにおける歯の移動モデルは、川崎ら(2000)をはじめ多くの研究で使用されている。本研究では、装置装着 4 週間後のコントロール群の平均移動距離は約 0.8 mm であり、10 g の牽引力で 4 週間牽引した Gonzales ら(2008)の結果とほぼ同様の値を示した。

装置装着 4 週間後の体重変化は、無処置群、コントロール群、Er:YAG レーザー群、Nd:YAG レーザー群のいずれの群間においても有意差が認められなかった。このことから、装置装着やレーザー照射は全身成長に大きな影響を及ぼさなか

ったと考えられ、実験モデルとして適当であることが示された。

I-2. レーザー照射の歯の移動距離への影響

レーザー照射の歯の移動距離への影響についてはこれまでに様々な報告がある。ラットにおいては、実験的歯の移動中に Diode レーザー照射をすることにより移動距離を有意に促進したという報告(Kawasaki *et al.*, 2000; Yamaguchi *et al.*, 2010)がある一方で、移動距離に有意差はなかったという報告(Gama *et al.*, 2010; Marquezan *et al.*, 2010)も認められる。これらの報告の詳細を検討してみると、歯の移動を促進したという報告における第一臼歯の牽引力は 10 g であり、促進しなかったという報告では牽引力が 20 g 以上の強いものであった。このことから、10 g という至適矯正力に近い牽引力と低出力 Diode レーザー照射の併用が、歯の移動を促進した可能性が推察される。

一方で、ヒトを対象にした同様の実験において、Cruz ら(2004)、Limpanichkul ら(2006)、Youssef ら(2008)がいずれも犬歯を同じ 150 g で牽引したにもかかわらず、異なった結果を報告している。これは、牽引力以外にもレーザー照射の総エネルギー量やエネルギー密度が歯の移動に関与している可能性を示唆している。

これに関して、Limpanichkul ら(2006)はレーザー照射のエネルギー密度を 75 J/cm²に設定し、歯の移動に影響がなかったことを報告した。Limpanichkul らは、考察として矯正的歯の移動に対する促進効果または阻害効果が現れるにはエネルギー密度の設定が低すぎたのではないかと論じている。一方で、Youssef ら(2008)は 67 J/cm²の出力で、Cruz ら(2004)は 50 J/cm²の出力で歯の移動量が促進したことを報告している。このように Youssef らおよび Cruz らの Limpanichkul らよりも小さいエネルギー密度で歯の移動を促進したという結果

から考えると、Limpanichkul らの用いたエネルギー密度の設定は彼らの考察とは逆に高すぎたのであり、より低いエネルギー密度が歯の移動には適しているのではないかと考えられる。

レーザーの透過性はそのレーザー特有の光波長と、照射体に存在する発色団の分布、またレーザーの出力で異なる。発色団には水分、ヘモグロビン、核酸、タンパク質などがある。Er:YAG レーザーは主な発色団が水であり、生体組織の 70 %が水で構成されていることから表面で吸収されます。一方、Nd:YAG レーザーは水が高効率の発色団ではないため組織透過性を示し、歯や骨など硬組織においてもわずかな水分などによって軟組織と同じような傾向を示す（加藤ら 2003）。Marshall ら(1987)は、550 nm よりも 750 nm の波長のほうが組織透過性が高いと報告しており、特に 800 nm 付近の波長は非常に透過性が良いと考えられている。つまり、Nd:YAG レーザーの波長は 1064 nm であり Diode レーザーよりも透過性が低く、同等の効果を得るためには川崎らの用いた Diode レーザーよりも高い出力に設定する必要があると考えられる。そこで、本研究では Nd:YAG レーザーのエネルギー密度を 249 J/cm^2 に設定した。しかしながら、本研究では Nd:YAG レーザー照射群はコントロール群と比較して歯の移動量が大きい傾向を示したものの、最終的に有意な差は認められなかった。したがって、Limpanichkul らと同様、設定したエネルギー密度が高すぎた可能性が考えられる。一方、Er:YAG レーザーのエネルギー密度は 30 J/cm^2 であった。これは、Er:YAG レーザーはほぼ透過性がなく組織透過型と同様の効果は望めないこと、またエネルギーを高くすると組織が破壊されることから妥当な設定だったと考える。

さらに、出力一定条件下ではエネルギーを増加させるよりもパルス条件を増加させる方が細胞活性が下がらない(Hacer *et al.*, 2006)という報告もあり、同出力下ではエネルギーとパルス条件の違いによる影響も考慮する必要がある。

しかし過去の報告は全て Diode レーザーを使用したものであり、Nd:YAG レーザーおよび表面吸収型である Er:YAG レーザーの歯の移動の加速におけるエネルギー設定に関する報告はない。そのため、エネルギー密度、出力、パルス波、総エネルギー量および照射回数に関して今後より詳細な条件検討が必要であると考えられる。

I-3. レーザー照射が実験的歯の移動に及ぼす組織学的変化

・装置装着 4 週間後の H-E 染色による組織学的変化の観察

ラットにおける実験的歯の移動により、装置装着 4 週間後に不規則な歯根膜線維、わずかな硝子様変性、破骨細胞および破歯細胞が観察されたと報告されている(松阪, 2006)。本研究においても、装置装着 4 週間後に近心圧迫側および遠心圧迫側では破骨細胞の出現による歯槽骨の吸収、不規則な歯根膜線維が観察され、新生骨の形成や硝子様変性を一部認めた。一方で過度な歯根膜腔の狭窄等は認められなかったため、矯正歯科治療における通常の歯の移動と組織学的に類似していた。このことから今回の歯の移動およびレーザー照射を併用した歯の移動は適正なものだったと考えられる。

・装置装着 4 週間後の TRAP 染色による組織学的変化の観察

本研究では歯の移動の際に 10 g の牽引力が持続的に加わっているため、成熟破骨細胞および破骨前駆細胞の分化・活性促進が常に生じていると考えられる。TRAP 陽性細胞核数は破骨前駆細胞であることから(高橋, 1998)、本研究では Pourzarandian (2005) らの TRAP 陽性細胞核数を計測する方法を参考にして、TRAP 陽性細胞核数を計測することにより破骨細胞活性を検討した。

TRAP 染色の結果、Er:YAG レーザー照射群の近心圧迫側において、コントロー

ル群と比較して TRAP 陽性細胞核数が多く出現し、遠心圧迫側においては少ない傾向が認められた。本研究では、ラットの上顎第一臼歯は近心傾斜移動しており、遠心圧迫側の一部は歯の移動に伴って牽引側に変化し、観察部位では圧迫側と牽引側が混在した状態になる。このため移動量の多かった Er:YAG レーザー照射群では、遠心圧迫側でコントロール群と比較して圧迫による負荷が小さくなり、TRAP 陽性細胞核数が減少する傾向にあったと推察できる。一方、Nd:YAG レーザー照射群の近心圧迫側および遠心圧迫側では、コントロール群と比較して TRAP 陽性細胞核数が多い傾向はあったものの有意な差は認められなかった。これは、Nd:YAG レーザー照射群では Er:YAG レーザー照射群ほど移動距離が大きくなかったため、遠心圧迫側にかかる負荷が減少しなかったためと推察される。山口ら(2007)はラットにおける実験的歯の移動中に Diode レーザーを照射したところ、1週間後に歯の移動距離および TRAP、RANKL、M-CSF 陽性細胞および破骨細胞数が有意に増加し、歯の移動距離と TRAP 陽性細胞数の増加が認められたことを報告している。本研究もまた、Er:YAG レーザーおよび Nd:YAG レーザー照射により TRAP 陽性細胞核数の増加とともに歯の移動距離も増加した傾向を示し、山口らの報告と同様の結果が得られた。

・装置装着 4 週間後の RANKL 免疫組織化学的変化の観察

本研究では、Er:YAG レーザー照射群および Nd:YAG レーザー照射群の近心圧迫側において、コントロール群と比較して RANKL の発現が多く認められた。これらの結果は TRAP 染色と同様に、歯の移動距離の増加に伴い RANKL 遺伝子発現も増加することを示した。

- ・装置装着 4 週間後の OPG 免疫組織化学的变化の観察

本研究では、Er:YAG レーザー照射群の近心圧迫側において、コントロール群と比較して OPG の発現はほとんど認められなかった。OPG は破骨細胞抑制因子であるため、Er:YAG レーザー照射群の近心圧迫側において破骨細胞の発現が誘導される一因となっていると推察される。

- ・装置装着 4 週間後の ALP 免疫組織化学的变化の観察

二宮ら(2003)は、ラット大腿骨に Nd:YAG レーザー照射することにより、骨幹端の骨形成を促進したと報告している。また Verica ら(2010)は骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞に Er:YAG レーザー照射することにより、MAPK/ERK の活性化を介して骨芽細胞の増殖を促進したと報告している。本研究においても、近心圧迫側および遠心圧迫側において、Er:YAG レーザーおよび Nd:YAG レーザー照射群の両群ともに、コントロール群と比較して ALP の発現が多く認められた。これらのことから Er:YAG レーザーおよび Nd:YAG レーザー照射が骨形成を促進している可能性が示唆された。

I-4. レーザー照射によるラット組織表面の状態と内部組織の温度変化

本研究では、Er:YAG レーザーと Nd:YAG レーザーの両方で照射に伴う骨内部組織での温度上昇が確認された。両レーザーともに表面に近いほど高い温度上昇を認め、Nd:YAG レーザー照射は Er:YAG レーザー照射と比較して 1~2 度高い温度上昇を示した。Nd:YAG レーザーは組織透過型であるため、吸収と散乱を繰り返しながら組織深部まで到達することから、また Er:YAG レーザーは表面吸収型であるが、熱が深部へ伝導することにより温度が上昇したと考えられる。

高出力レーザーを組織に照射すると、レーザー光は一般に吸収、反射、透過、

散乱の 4 種類の変化を示す。標的組織に吸収されたレーザー光は熱エネルギーに変換され、組織の温度上昇を引き起こす。組織は温度上昇の程度によって、炭化、蒸化、血液凝固、タンパク変性を生じる(大城, 1988)(図 45)。

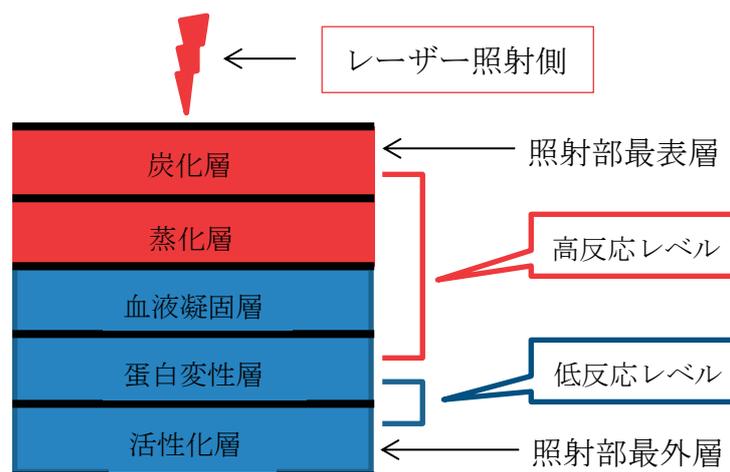


図 45 高出力レーザー照射時の組織表面の変化

照射エネルギーは、照射部の深部や周囲組織に向かうにつれ減弱するため、照射部最外層には組織の不可逆変化を生じないレベルのエネルギーが浸透し組織活性を引き起こす。これは活性化層と呼ばれ、この活性化層はさらに光熱作用による活性化層とその外層の非光熱作用による活性化層に分けられる(大城, 1991)。このようにして、高出力レーザー照射の際の LLLT が生じ、常に照射部の最外層に活性化層が存在すると考えられる。Er:YAG レーザー照射による LLLT の作用機序に関しては、ヒト歯肉線維芽細胞の増殖の促進(Pourzarandian A, 2005)、マウス骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1 cell)の増殖促進が MARK/ERK 経路の活性化を介して生じる(Aleksic V, 2010)などの報告がある。

本研究での Er:YAG レーザー照射による温度上昇は 1~3 °C で、最高温度は歯槽骨表面で 36.92 °C であった。栗津ら(1991)は、42 °C 以下では組織に病的変化

が起こらないことを報告しており、本研究で測定した部位は、温度上昇の範囲から考えて、すべて活性化層の範囲にあると推察される。

低出力レーザーを組織に照射すると、レーザー光は吸収・散乱を繰り返しながら、歯や骨などの硬組織においても軟組織同様組織深部まで到達する。光エネルギーは、細胞内の発色団によって吸収され(Friedmann *et al.*, 1991)、さらにこの発色団によって細胞のミトコンドリア内に吸収され、同時に細胞膜で吸収される。これらのレーザー光子は、ミトコンドリア内でシトクロム c 酸化酵素にエネルギーを与え、ATP 合成酵素と ATP の生成を活性化させる。この時生じた全エネルギーの 90 % 以上がミトコンドリア内での酸化還元反応に使用される。600~1200 nm の光波長は組織透過性が強く LLLT に使用され、これらの生体刺激効果が細胞活性を起こす原因であると考えられている(Karu, 2007)。

また、低出力レーザーである Nd:YAG レーザー照射による温度上昇は 2~5 °C で、最高温度は歯槽骨表面で 39.16 °C であった。上記同様に病的変化は起こらない範囲であり LLLT の効果が予想される。

II. ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) における Er:YAG レーザー照射の影響

II-1. Er:YAG レーザー照射後の細胞生存率について

Er:YAG レーザー照射 3.0 w 群では、コントロール群と比較して細胞数は有意に減少した。これは、ヒト線維芽細胞への過度の刺激が細胞死を引き起こした可能性が考えられる。条件検討の結果、1.2 w 以下ではコントロール群と同様の増殖が認められたため、本研究では 1.2 w 以下の出力で遺伝子発現の検討を行うこととした。

II-2. Er:YAG レーザー照射後の定量 RT-PCR による炎症性メディエーター関連遺伝子の発現検討

吉松ら (2006) は、マウスにおける実験的歯の移動モデルの圧迫側では TNF- α が関与しており、直接マクロファージに働きかけ、RANK/RANKL の発現を増加させること、また RANK/RANKL を介さず破骨前駆細胞を破骨細胞へ分化させることを報告した。さらには、IL-1 β が骨芽細胞に作用して RANKL の発現を増加させる (北浦、2011) ことや、COX-2 の増加により骨芽細胞から PGE2 の産生が促進され、破骨細胞の形成・分化が誘導される (藤田、2001) という報告も認められる。このように、歯の移動には歯周組織の炎症性反応が関与していると考えられる。また、Urist ら (1965) は、ラットの皮下組織に BMP を局所投与すると異所性の骨形成が促進したことから、BMP には骨形成能があると報告している。そこで本研究では、Er:YAG レーザー照射後の IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現を検討した。その結果、いずれも出力依存的に遺伝子発現量は多くなり、1.2 w で最も大きな値を示した。Pourzarandian ら (2005) は、ヒト線維芽細胞に Er:YAG レーザー照射することにより、COX-2 の遺伝子発現および PGE2 の濃度が出力依存的に増加したという報告をしており、本研究でも同様の結果

が得られた。

本研究の結果から、Er:YAG レーザー照射が IL-1 β 、TNF- α 、COX-2 の遺伝子発現増加を介して破骨細胞の形成・分化に影響を与えた可能性が考えられる。また、BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現も同様に増加したことから、BMP を介した骨形成への影響も示唆された。

一般に、Lipopolysaccharide (LPS) を血中投与すると、血中 TNF- α の発現は 1~2 時間後にピークに達する。また、IL-1 β の発現は 4~5 時間後にピークに達し、その後減衰する。本研究では、レーザー照射 24 時間後に TNF- α および IL-1 β の遺伝子発現がコントロールと比較して高い値を示した。この結果はレーザーの刺激が LPS による刺激と作用機序が異なることを示唆している。

II-3. Er:YAG レーザー照射および遠心力負荷併用時の炎症性メディエーター関連遺伝子発現の検討

神崎ら(2002)は、ヒト線維芽細胞に機械的刺激を加え、COX-2 の遺伝子発現が増加したと報告した。本研究では、遠心力負荷を与えた場合にコントロールと比較して COX-2 の遺伝子発現が有意に高い値を示した。さらに、ヒト線維芽細胞に Er:YAG レーザーを照射および遠心力負荷を行うと、遠心力負荷だけを行うよりも IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現が有意に高い値を示した。これらの結果から、機械的刺激が Er:YAG レーザーの作用を増幅し、IL-1 β 、TNF- α 、COX-2、BMP-2 および BMP-4 の遺伝子発現の増加を介して破骨細胞活性促進および骨形成促進が生じた可能性が考えられる。

以上のことから、Er:YAG レーザー照射が組織表面でアブレーションや出血を引き起こし、歯の移動時の炎症性メディエーターの分泌をさらに促進した可能性が示唆される。

Ⅲ. ヒト骨芽細胞様細胞 (Saos2) における Nd:YAG レーザー照射の影響

Ⅲ-1. Nd:YAG レーザー照射後の細胞生存率

Nd:YAG レーザー照射 4.0 w 群では、コントロール群と比較して細胞数が有意に減少した。これは、Er:YAG レーザーの場合と同様に Nd:YAG レーザー照射による骨芽細胞様細胞への刺激過多が細胞死を引き起こしたためと考えられる。2.0 w 以下ではコントロール群と同様の増殖が認められたため、本実験では 2.0 w 以下の出力で遺伝子発現の検討を行うこととした。

Ⅲ-2. Nd:YAG レーザー照射後の骨代謝関連因子の遺伝子発現解析

Chellini ら (2010) は、Nd:YAG レーザー照射群において TRPC1 イオンチャネルの活性化を介して骨芽細胞様細胞における細胞内 Ca^{2+} の増加が認められたことから LLLT の効果を報告している。また、二宮ら (2010) は、ラット大腿骨に Nd:YAG laser を照射して骨形成が促進したことを、さらに、Usumez ら (2013) は、ラット歯肉創傷モデルにおいて Nd:YAG laser を照射して TGF- β 、PDGF、bFGF の遺伝子発現が増加したことを報告している。このように、Nd:YAG レーザーにおける LLLT の効果は多数報告されている。

本研究においても、Nd:YAG レーザー照射 1 時間後および 24 時間後に 2.0 w 群で ALP の発現が有意に高い値を示したが、これは骨芽細胞様細胞に LLLT の効果が生じたためであると考えられる。その結果 RANKL/OPG 比が、コントロール群と比較して高い値を示したと考えられる。田中ら (2011) は、RANKL/OPG 比の増加により骨吸収が促進されたと報告しており、本研究でも LLLT の効果が RANKL/OPG 比に作用して骨代謝を活性化した可能性が示唆された。

III-3. Nd:YAG レーザー照射および遠心力負荷後の骨代謝関連遺伝子発現の検討と *In Vivo* の結果との関連について

内藤ら(2009)は、ラット骨髄由来骨芽細胞への遠心力負荷により ALP 遺伝子発現が有意に増加したと報告している。また岡本ら(2009)は、骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞への遠心力負荷により RANKL 遺伝子発現が増加したことを、また成瀬ら(2009)は、培養歯根膜細胞に遠心力負荷により OPG 遺伝子発現が増加したことを報告している。

本研究においても、負荷群において、過去の報告と同様にコントロール群と比較して OPG、RANKL および ALP の遺伝子発現が有意に高い値を示した。さらに Nd:YAG レーザー照射を行うことで1時間後および24時間後のレーザー負荷群は、負荷群と比較して ALP および RANKL の遺伝子発現がより高い値を示した。一方で、OPG の遺伝子発現は有意に低い値を示し、その結果 RANKL/OPG 比が高い値を示した。

以上のことから、ヒト骨芽細胞様細胞に機械的刺激と Nd:YAG レーザー照射を併用することにより、ALP の遺伝子発現および RANKL/OPG 比の増加を介して骨形成および破骨細胞活性を促進したと考えられる。

本研究では前述のように *In Vivo* において Nd:YAG レーザー照射群ではコントロール群と比較して、移動距離が装置装着1週間後に有意に大きい値を示した。これはレーザーを0、1、2、3、7、10、14、17、21、24日後に照射していること、つまり最初の一週間に最もレーザー照射量が多いことが関係していると考えられる。*In Vitro* において、48時間後の RANKL/OPG 比はレーザー群とコントロール群およびレーザー負荷群と負荷群に有意差はなかった。これら *In Vivo* と *In Vitro* の結果から、骨芽細胞において24時間 LLLT の効果が持続した可能性が示唆された。

総括

本研究では、矯正歯科治療時の歯の移動に Er:YAG レーザー照射および Nd:YAG レーザー照射がどのように影響しているのかを解明するために、ラットを用いた実験的歯の移動モデルを作製し、またヒト線維芽細胞ならびにヒト骨芽細胞様細胞に対してレーザー照射が与える影響を検討した。その結果、以下の所見が明らかとなった。

1. ラットの実験的歯の移動に対する Er:YAG レーザー照射により、装置装着 3 および 4 週間後において歯の移動距離は有意に大きい値を示した。
2. ラットの実験的歯の移動に対する Nd:YAG レーザー照射により、装置装着 1 週間後に歯の移動距離が有意に大きく、実験期間を通して移動距離が大きい傾向を示した。
3. Er:YAG レーザーと Nd:YAG レーザーの照射時に骨内部組織での温度変化が確認され、温度上昇による骨代謝活性の促進が示唆された。
4. Er:YAG レーザー照射は、炎症性メディエーターの発現を介して破骨細胞を活性化し、歯の移動を加速した可能性が示唆された。
5. Nd:YAG レーザー照射は、骨芽細胞の活性化による RANKL 発現の増加および OPG 発現の減少を介して、破骨細胞を活性化した可能性が示唆された。

以上のことより、Er:YAG レーザーが炎症性メディエーターの発現を介して骨代謝に影響を与えること、Nd:YAG レーザーも同様に骨代謝関連因子の発現に影響

響を与えることにより歯の移動を促進する可能性が示され、今後エネルギー密度、総エネルギー量、出力、パルス波および照射回数の設定、チップの形状など、詳細な条件を検討することにより、より安全で効果的な歯の移動が行える可能性が示され、レーザーの矯正的歯の移動に対する臨床応用が期待される結果となった。

参考文献

Aleksic V, Aoki A, Iwasaki K, Takasaki AA, Wang CY, Abiko Y, Ishikawa I, Izumi Y: Low-level Er:YAG laser irradiation enhances osteoblast proliferation through activation of MAPK/ERK. *Lasers Med Sci.* 25: 559-69, 2010.

Arisu HD, Türköz E, Bala O: Effects of Nd:Yag laser irradiation on osteoblast cell cultures. *Lasers Med Sci.* 21: 175-80, 2006.

Awazu K, Fukami Y: Medial applications of infrared lasers. *Analytical Chemistry.* 3: 95-104, 2002.

Celebi AA, Demirer S, Catalbas B, Arikan S: Effect of ovarian activity on orthodontic tooth movement and gingival crevicular fluid levels of interleukin-1 β and prostaglandin E(2) in cats. *Angle Orthod.* 83: 70-5, 2013.

Chellini F, Sassoli C, Nosi D, Deledda C, Tonelli P, Zecchi-Orlandini S, Formigli L, Giannelli M: Low pulse energy Nd:YAG laser irradiation exerts a biostimulative effect on different cells of the oral microenvironment: "an In Vitro study". *Lasers Surg Med.* 42: 527-39, 2010.

Chen Q: Effect of pulsed electromagnetic field on orthodontic tooth movement through transmission electromicroscopy. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 26: 7-10, 1991.

Cruz DR, Kohara EK, Ribeiro MS, Wetter NU: Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: a preliminary study. *Lasers Surg Med.* 35: 117-20, 2004.

Doshi-Mehta G, Bhad-Patil WA: Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: a clinical investigation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 141: 289-97, 2012.

Friedmann H, Lubart R, Laulicht I, Rochkind S: A possible explanation of laser-induced stimulation and damage of cell cultures. *J Photochem Photobiol B.* 11: 87-91, 1991.

藤田直也, 鶴尾隆: がん転移研究の新しい展開—分子研究から臨床へ— [II] 転移の生物学と実験動物モデル骨転移形成の分子機構 日本医学会シンポジウム記録集年 119: 44-9, 2001.

Fujiyama K, Deguchi T, Murakami T, Fujii A, Kushima K, Takano-Yamamoto T: Clinical effect of CO(2) laser in reducing pain in orthodontics. *Angle Orthod.* 78: 299-303, 2008.

Gama SK, Habib FA, Monteiro JS, Paraguassú GM, Araújo TM, Cangussú MC, Pinheiro AL: Tooth movement after infrared laser phototherapy: clinical study in rodents. *Photomed Laser Surg.* 2: 79-83, 2010.

Genc G, Kocadereli I, Tasar F, Kilinc K, El S, Sarkarati B: Effect of low-level laser therapy (LLLT) on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci.* 28: 41-7, 2013.

Gonzales C, Hotokezaka H, Yoshimatsu M, Yozgatian JH, Darendeliler MA, Yoshida N: Force magnitude and duration effects on amount of tooth movement and root resorption in the rat molar. *Angle Orthod.* 78: 502-9, 2008.

Goulart CS, Nouer PR, Mouramartins L, Garbin IU, de Fátima Zanirato Lizarelli R: Photoradiation and orthodontic movement: experimental study with canines. *Photomed Laser Surg.* 24: 192-6, 2006.

Ibrahim TM, gheith M, Mona M: The Effect of Soft laser Application on Orthodontic Movement (In Vitro study). *J Am Sci.* 7: 125-5, 2011.

Jarabak, JR., and Fizzell, JA: Technique and Treatment with Light-Wire Edgewise Appliances. C. V. Mosby Co., Saint Louis. 2nd ed: 277-379, 1972.

Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H: Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 17: 210-20, 2002.

Karu T: Ten Lectures on Basic Science of Laser Phototherapy. Prima Books AB, Grngesberg (Sweden).

加藤純二、栗津邦男、篠木毅、守矢佳世子、部谷学、宮崎英隆：一から分かるレーザー歯科治療。医歯薬出版 3-5, 2003

Kawarizadeh A, Bourauel C, Zhang D, Götz W, Jäger A: Correlation of stress and strain profiles and the distribution of osteoclastic cells induced by orthodontic loading in rat. *Eur J Oral Sci.* 112: 140-7, 2004.

Kawasaki K, Shimizu N: Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med.* 26: 282-91, 2000.

Kanzaki H, Chiba M, Arai K, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H: Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Ther.* 13: 678-85, 2006.

Kim SJ, Moon SU, Kang SG, Park YG: Effects of low-level laser therapy after Corticision on tooth movement and paradental remodeling. *Lasers Surg Med.* 41: 524-33, 2009.

Kim SJ, Paek JH, Park KH, Kang SG, Park YG: Laser-aided circumferential supracrestal fiberotomy and low-level laser therapy effects on relapse of rotated teeth in beagles. *Angle Orthod.* 80: 385-90, 2010.

北浦英樹: 骨髄細胞での TNF- α による破骨細胞形成における IL-12 および IL-18 によるアポトーシス誘導. *骨粗鬆症治療.* 10: 8, 2011.

Köle H: Surgical operations of the alveolar ridge to correct occlusal abnormalities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 12: 515-29, 1959.

Limpanichkul W, Godfrey K, Srisuk N, Rattanayatikul C: Effects of low-level laser therapy on the rate of orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 9: 38-43, 2006.

Marquezan M, Bolognese AM, Araújo MT: Effects of two low-intensity laser therapy protocols on experimental tooth movement. *Photomed Laser Surg.* 28: 757-62, 2010.

Marshall J, Haywood JK: The biological nature of the hazard. *The Institute of Physical Sciences in Medicine.* 1-7, 1987.

松坂賢一、下野正基、前田健康、溝口 到：歯の移動の臨床バイオメカニクス
骨と歯根膜のダイナミズム 医歯薬出版 88-93, 2006.

Naito K, Matsuzaka K, Ishigami K, Inoue T: Mechanical force promotes
proliferation and early differentiation of bone marrow derived
osteoblast-like cells In Vitro. Oral Med Pathol 13: 151-7, 2009.

成瀬晋一：Expressions of RANKL and OPG mRNA on Rat Periodontal Ligament
Cells Following Heavy Mechanical Stress. 日本外傷歯学会雑誌 5: 10-7, 2009.

Ninomiya T, Ninomiya T, Miyamoto Y, Ito T, Yamashita A, Wakita M, Nishisaka
T: High-intensity pulsed laser irradiation accelerates bone formation in
metaphyseal trabecular bone in rat femur. J Bone Miner Metab. 21: 67-73,
2003.

Nishimura M, Chiba M, Ohashi T, Sato M, Shimizu Y, Igarashi K, Mitani H.
: Periodontal tissue activation by vibration: intermittent stimulation by
resonance vibration accelerates experimental tooth movement in rats. Am
J Orthod Dentofacial Orthop. 133: 572-83, 2008.

大前正美：Biomechanical acceleration of experimental tooth movement by
ultrasonic vibration In Vivo : Part 1 Homo-directional application of
ultrasonication to orthodontic force. Orthod Waves. 60: 201-12, 2001.

Ohshiro T, Calderhead RG: Development of low reactive-level laser therapy and its present status. *J Clin Laser Med Surg.* 9: 267-75, 1991.

Okamoto A, Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Chiba N, Maeda A, Fukunaga T, Miyawaki S, Matsuguchi T: Reduction of orthodontic tooth movement by experimentally induced periodontal inflammation in mice. *Eur J Oral Sci.* 117: 238-47, 2009.

Parker S: Introduction, history of lasers and laser light production. *Br Dent J.* 202: 21-31, 2007.

Pourzarandian A, Watanabe H, Ruwanpura SM, Aoki A, Noguchi K, Ishikawa I: Er:YAG laser irradiation increases prostaglandin E production via the induction of cyclooxygenase-2 mRNA in human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res.* 40: 182-6, 2005.

Redlich M, Asher Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Mussig D, Baumert U, Golan I, Palmon A: Expression of tropoelastin in human periodontal ligament fibroblasts after simulation of orthodontic force. *Arch Oral Biol.* 49: 119-24, 2004.

佐藤徳光: 動物実験の基本, 西村書店. 38-9, 1986.

Seifi M, Shafeei HA, Daneshdoost S, Mir M: Effects of two types of low-level laser wave lengths (850 and 630 nm) on the orthodontic tooth movements in rabbits. *Lasers Med Sci.* 22: 261-4, 2007.

Seiryu M, Deguchi T, Fujiyama K, Sakai Y, Daimaruya T, Takano-Yamamoto T: Effects of CO2 laser irradiation of the gingiva during tooth movement. *J Dent Res.* 89: 537-42, 2010.

Son J, Kim YB, Ge Z, Choi SH, Kim G: Bone healing effects of diode laser (808 nm) on a rat tibial fracture model. *In Vivo.* 26: 703-9, 2012.

Sousa MV, Scanavini MA, Sannomiya EK, Velasco LG, Angelieri F: Influence of low-level laser on the speed of orthodontic movement. *Photomed Laser Surg.* 29: 191-6, 2011.

Sun X, Zhu X, Xu C, Ye N, Zhu H: Effects of low energy laser on tooth movement and remodeling of alveolar bone in rabbits. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 19: 290-3, 2001.

Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, Roodman GD, Mundy GR, Jones SJ, Boyde A, Suda T: Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology.* 122: 1373-82, 1988.

Tanaka H, Mine T, Ogasa H, Taguchi T, Liang CT: Expression of RANKL/OPG during bone remodeling In Vivo. *Biochem Biophys Res Commun.* 411: 690-4, 2011.

Tanimoto K, Ohkuma S, Tanne Y, Kunimatsu R, Hirose N, Mitsuyoshi T, Yoshimi Y, Su S, Tanne K. Effects of bFGF on the Modulation of Apoptosis in Gingival Fibroblasts with Different Host Ages. *Int J Dent.* in press

Tuncay OC, Killiany DM: The effect of gingival fiberotomy on the rate of tooth movement. *Am J Orthod.* 89: 212-5, 1986.

Urist MR: Bone: formation by autoinduction. *Science.* 150: 893-9, 1965.

Usumez A, Cengiz B, Oztuzcu S, Demir T, Aras MH, Gutknecht N: Effects of laser irradiation at different wavelengths (660, 810, 980, and 1,064 nm) on mucositis in an animal model of wound healing. *Lasers Med Sci.* in press

Yamaguchi M, Fujita S, Yoshida T, Oikawa K, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K: Low-energy laser irradiation stimulates the tooth movement velocity via expression of M-CSF and c-fms. *Orthod Waves.* 66: 39-48, 2007.

Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K: Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and alpha(v) beta(3) integrin in rats. *Eur J Orthod.* 32: 131-9, 2010.

Yoshida T, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Kato M, Arai Y, Kaneda T, Yamamoto H, Kasai K: Low-energy laser irradiation accelerates the velocity of tooth movement via stimulation of the alveolar bone remodeling. *Orthod Craniofac Res.* 12: 289-98, 2009.

Yoshimatsu M, Shibata Y, Kitaura H, Chang X, Moriishi T, Hashimoto F, Yoshida N, Yamaguchi A: Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice. *J Bone Miner Metab.* 24: 20-7, 2006.

Young L, Binderman I, Yaffe A, Beni L, Vardimon AD: Fiberotomy enhances orthodontic tooth movement and diminishes relapse in a rat model. *Orthod Craniofac Res.* in press

Youssef M, Ashkar S, Hamade E, Gutknecht N, Lampert F, Mir M: The effect of low-level laser therapy during orthodontic movement: a preliminary study. *Lasers Med Sci.* 23: 27-33, 2008.

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なる御教示、御支援ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科応用生命科学部門(歯科矯正学) 谷本幸太郎教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本論文作成にあたり、御助言、御校閲を賜りました 丹根一夫前教授、総合研究化学部門小児歯科学 香西克之教授、総合研究化学部門口腔生物工学 二川浩樹教授ならびに基礎生命科学部門(口腔生理学) 杉田 誠教授に深謝申し上げます。

本研究の遂行および本論文の作成を御指導、御助言頂きました広島大学大学院医歯薬学総合研究科応用生命科学部門(歯科矯正学) 藤田 正助教、同研究科 白倉麻耶助教、広島大学大学院医歯薬学総合研究科応用生命科学部門の教室員各位ならびに関係者各位に心より感謝いたします。

また慶熙大学歯学部歯科矯正講座において、Young-Guk Park 教授、同講座 Su-Jung Kim 教授にも貴重な御助言を頂きました。ここに感謝の意を表します。

最後に、これまで私を支えていただいた家族、友人に心から感謝します。