原 著

低出力レーザー照射が実験的歯の移動に伴う 歯槽骨骨形成に与える影響

川崎宏一郎, 清水 典佳*

日本大学松戸歯学部歯科矯正学教室

〒271-8587 松戸市栄町西2-870-1

TEL 047-360-9412 FAX 047-364-6295

現住所: *日本大学歯学部矯正学教室

〒101-8310 千代田区神田駿河台1-8-13

Effect of low-energy laser irradiation on bone
formation during experimental tooth movement in rats.

Koichiro KAWASAKI and Noriyoshi SHIMIZU*

Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

2-870-1 Sakaecho-nishi Matsudo 271-8587 JAPAN

Present address: *Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry

1-8-13 Kanda Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-8310 JAPAN

要 旨

本研究の目的は矯正学的歯の移動時に移動歯周囲への低出力レーザー照射が牽引側歯槽骨の骨形成に与える影響を検討することである。実験的にラット上顎切歯を10 g 荷重で離開させ、移動歯周囲に低出力レーザー (Ga-Al-As半導体レーザー, 出力100mW) を毎日1回移動歯周囲に9分間、12日間に渡って照射した。離開直後 (0日) および4, 8, 12日目にカルセインによる骨標識を行い非脱灰研磨標本を作製し、bone histomorphometry法を用いて牽引側歯槽骨骨形成量を定量的に検索した。その結果、12日間の切歯移動中レーザー照射群の新生骨面積量は非照射群に対して、1.3倍有意に増大していた。また移動期間0~4日においてはレーザー照射群の新生骨面積量は非照射群に対して有意に増大していたが、4~8日、8~12日では両群に差がなかった。これらの結果から移動歯への低出力レーザー照射は牽引側歯槽骨の骨形成を促進させ、その効果は移動初期により強く認められた。

以上より歯科矯正治療時の低出力レーザー照射は、移動歯牽引側歯槽骨の骨形成を促進させることにより治療期間の短縮や後戻りの防止に有効である可能性が示唆された。

キーワード: 低出力レーザー, 歯牙移動, Histomorphometry法, 骨形成, 歯槽骨

(平成11年6月5日受理, 平成11年8月21日掲載決定)

(Received June 5th 1999, Accepted August 21th 1999)

Abstract

The purpose of the present study was to investigate the effects of low-energy laser irradiation on bone formation during experimental orthodontic tooth movement in rats. In order to establish a distal movement of the maxillary incisors, 10 grams of orthodontic force was applied for 12 days. A gallium-aluminum-arsenide (Ga-Al-As) diode laser (100mW) was used for 9 minutes, once a day for 12 days, to irradiate the gingiva located at the maxillary incisor roots. Calcein was injected on days 0, 4, 8 and 12 to label the alveolar bone and make specimens for histomorphometrical measurement. Bone formation on the tension side of experimentally moved teeth was significantly accelerated 1.3-fold compared with the non-irradiation controls. Only the early period of irradiation after tooth movement (day 0~4) was effective in increasing the area of bone formation, while irradiation during the latter periods (day 4~8 and 8~12) had no effect. These findings suggest that low-energy laser irradiation can accelerate bone formation on the tension side during tooth movement, and, since this effect was found only in the early period, the timing is very important for acceleration of bone formation. We suggest that laser therapy may be of therapeutic benefit to shorten the treatment period and inhibit relapse through acceleration of bone formation on the tension side during orthodontic treatment.

Key words : Low-energy laser, Tooth movement, Histomorphometry, Bone formation, Alveolar bone

緒 言

歯科矯正治療時の歯の移動速度は、矯正力による歯周組織、特に歯槽骨のリモデリング速度により大きく左右される。現在矯正治療を完了するには数年もの期間が必要であり、長い治療期間は患者にとっても大きな負担となっている。そこで矯正治療に伴う歯槽骨リモデリングを促進できれば歯の移動は早くなり治療期間を短縮することができる。このような考えで近年、矯正移動歯周囲にプロスタグランジンE₂¹⁾、活性型ビタミンD₃²⁾、パラサイロイドホルモン³⁾を局所投与することにより歯の移動を促進できることが報告され、治療期間を短縮できる可能性が述べられた。しかしながらプロスタグランジンE₂投与では局所の疼痛や強い歯根吸収が発現し⁴⁾、また活性型ビタミンD₃やパラサイロイドホルモン投与では全身への悪影響や高コストの問題で現在のところ臨床応用は困難である。

一方、近年低出力レーザーの生体組織に対する

光刺激作用が注目され、創傷治癒促進作用⁵⁾や、骨形成促進作用⁶⁻¹²⁾が報告され医学領域での応用が進んでいる。そこで低出力レーザー照射により矯正移動歯周囲の歯槽骨リモデリングを促進することができれば治療期間の短縮や治療後の後戻りの防止に大変有効である。

著者らは、ラット正中口蓋縫合部を実験的に拡大し同部位に低出力半導体レーザー照射を行い骨形成量を定量したところ、縫合部辺縁部の骨形成を1.4倍有意に増大したことを報告した¹³⁾。また、in vitroの研究ではラット胎仔カルバリアから採取した骨芽細胞様細胞に低出力レーザー照射を行うと、bone nodule形成が照射量に比例して増大し¹⁴⁾、さらに培養早期のレーザー照射がより強い骨形成促進効果を有しており骨芽細胞が低出力レーザーのtarget cellであることと、未分化なprecursor cellやosteoprogenitor cellがよりレーザー照射の応答性に優れていることを示した¹⁵⁾。しかしながら歯の移動は骨吸収と骨添加

Fig. 1 Tooth movement and laser irradiation points. Irradiation was performed by placing the optical fiber in direct contact with the tissue to prevent reflection of the laser beam by the tissue surface. ● : Laser irradiation point, VLS : vertical loop spring made by .012inch Ni-Ti wire, ← → : incisor tooth movement direction.

という相反した変化を伴うため低出力レーザー照射が移動歯周囲の歯槽骨リモデリングに対しどのように影響しているかについては不明である。

そこで本研究では、ラット上顎切歯を実験的に側方移動し、移動歯周囲に低出力半導体レーザー照射を行い牽引側の歯槽骨形成を bone histomorphometry 法により定量的に検索した。

材料および方法

1. 実験動物

実験には5週齢のWistar系雄性ラット（三協ラボサービス、東京）を、購入後1週間予備飼育したものを20匹用い、レーザー照射群と対照群を各10匹に分けた。ラットは予備飼育、実験期間を通じ日本大学松戸歯学部動物実験センターにて温度23℃、1日12時間の人工照明のもと固形飼料と水道水を自由摂取させ飼育した。また実験による健康状態への影響を検討するため、実験期間中毎日体重測定を行った。

2. 切歯側方移動

ペントバルビタールナトリウム50mg/体重kg（ダイナボット社、大阪）による腹腔内麻酔下で左右切歯唇面エナメル質表面の沈着色素をカーボランダムポイントで研磨し0.08mmセルロイドストリップスをマトリックスとして左右切歯間に挿入した。通法に従い37%正リン酸にて30秒間エッチング後、水洗、乾燥し、歯科用接着レジン（Super

Bond, サンメディカル社、東京）を少量左右切歯唇面中央に載せ、あらかじめ10g荷重を発現するように作製したアームの長さ7.0mm、太さ0.012インチのニッケルチタンバーティカルループワイヤースプリング（ロッキーマウンテンモリタ社、東京）の中央を絹糸で結紮固定し、先端をレジン内に埋入し硬化させた。この際ループが上下、左右に偏位しないように、また唇側歯肉に密着するように十分注意を払った。レジン硬化後マトリックスを除去し、結紮した絹糸を切断することにより切歯に荷重を加えた（Fig. 1）。

3. 低出力レーザー照射

低出力レーザー照射は、Ga-Al-As半導体レーザー治療器（パナラス1000、波長830nm、出力100mW、松下産業機器）を用いた。ペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下でラットを開口させ、本体と接続した直径0.6mmの光ファイバーでレーザー光を誘導し上顎左右切歯間歯頸部および左右切歯遠心歯頸部を照射部位として、ファイバー先端を可及的に無圧で直接接触させレーザー照射を行った（Fig. 1）。照射時間は各々3分とし、計9分間毎日1回13回レーザー照射を行った。

4. Bone histomorphometry法による骨の定量的検索

タイムテーブル（Fig. 2）に示すように、離開直後（0日）および4、8、12日目にカルセイン

Fig. 2 Experiment time-schedule for each group.

Fig. 3 Diagram of the datum plane of a maxillary horizontal section. The specimens were embedded in methyl methacrylate resin parallel to the upper molar occlusal plane. Each plastic embedded bone specimen was cut in a parallel plane 4mm below the upper molar occlusal plane.

Fig. 4 Photographs of labeled alveolar bone taken under a fluorescent microscope. White box : measurement area of formation.
 ⇔ : new bone formation bone area on tension side labeled by calcein. I : incisors

8 mg/体重kg (Wako社, 東京) の皮下注射による骨四重標識を行い, 13日目には屠殺した。ラット上顎骨を摘出, 軟組織を除去し10%ホルマリン

Fig. 5 Changes of body weight during the experimental period.

で固定後, 右側第一および第三臼歯, 左側第二臼歯の近心頬側咬頭以外のすべての咬頭を削除し, 臼歯咬合平面を決定した上で, Villanueva bone stain溶液に72時間浸漬し, ブロック染色を施した。本染色法は類骨と石灰化骨を染め分けられ, 骨標識の蛍光も観察できる利点がある^{16, 17)}。その後咬合平面が水平になるよう通法に従ってメチルメタクリレート樹脂に包埋し, 上顎骨水平断の,

Fig. 6 Comparison of new bone formation area with or without application of laser irradiation. Bone formation rate ($\Rightarrow\Leftarrow$) was higher in the laser irradiation group than the non-irradiation group.

非脱灰研磨標本を作製した。標本は臼歯部咬合平面と平行になるように切片切断面を設定し、切歯離開量が大きく骨面積量の定量に適していると考えられる臼歯咬合平面より深さ4.0mm部位（切歯歯槽骨縁より1.0mmの深さ）において、厚さ100 μ mの切片をISOMET (BUEHLER社, USA)にて作製し、砥石を用い30 μ mに研磨した (Fig. 3)。標本を蛍光顕微鏡 (OlympusBHS, Olympus社, 東京) により250倍で観察、写真撮影したものをHistomorphometryの測定に供した。骨形成量の計測は、両切歯歯槽窩の唇側最前縁と舌側最後縁を結んだ四角形内のカルセインによる骨標識線によって囲まれた新生石灰化骨 (0日～12日, 0日～4日, 4日～8日, 8日～12日) (Fig. 4) をトレースした。その後、画像スキャナー (EPSON GT-8000, EPSON社, 東京) を用いてパーソナルコンピュータ (Power MacintoshG3, Apple computer社, USA) に入力、画像処理ソフト (Ultimage Ver. 2.0, Graftek社, France) により牽引側の骨形成量を測定した。骨形成量は測定面積 (mm^2) を標識されている骨辺縁長 (mm) で割ることにより標準化し単位長さ当りの面積として算出した。また統計処理はstudent t-testを用いた。

結 果

1. 実験期間中の動物体重の推移

実験期間中の全身状態の指標として毎日体重測定を行った結果、装置装着後0日～1日において一過性の体重減少があったが、その後実験終了までレーザー照射群および非照射群共に体重増加が認められた。また、レーザー照射群と非照射群間には日毎における有意差は実験期間を通して認められなかった (Fig. 5)。

2. Bone histomorphometry法による検索

カルセインにて骨標識した標本を蛍光顕微鏡にて観察すると、骨標識線0日～12日間の距離すなわち骨形成量は、牽引側舌側面で最も大きかった。またレーザー照射群が非照射群に比べ顕著に増大していた (Fig. 6)。移動期間は12日間におけるレーザー照射群の新生骨面積量は $0.46 \pm 0.056 \text{ mm}^2/\text{mm}$ 、非照射群の新生骨面積量は $0.36 \pm 0.023 \text{ mm}^2/\text{mm}$ でありレーザー照射群は、非照射群に対し1.3倍有意差をもって ($p < 0.01$) 骨形成の促進が認められた (Fig. 7)。

一方、移動期間0日～4日におけるレーザー照射群の新生骨面積量は $0.23 \pm 0.051 \text{ mm}^2/\text{mm}$ 、非照射群の新生骨面積量は $0.17 \pm 0.041 \text{ mm}^2/\text{mm}$ でありレーザー照射群は非照射群に対し1.4倍有意差をもって ($p < 0.01$) 骨形成の促進が認められた。

Fig. 7 Effect of laser irradiation on newly formed mineralized bone area during distal movement of the incisors. *Significant difference from nonirradiation control ($p < 0.01$). Values are mean $\pm$ S. D. for 5 rats.

また、移動期間4日～8日、及び8日～12日における新生骨面積量は共にレーザー照射群と非照射群の間に有意な差は認められなかった。一方、両群とも移動期間0日～4日の新生骨面積量と比較し4日～8日及び8日～12日の新生骨面積量は有意差をもって($p < 0.01$)減少していた (Fig. 8)。

考 察

矯正治療時の骨のリモデリングを促進できれば歯は速く移動し治療期間を短縮することができる。このような考えでラット切歯を実験的に移動させ移動歯周囲に低出力半導体レーザー照射を行い移動歯牽引側の単位時間内の歯槽骨形成量をhistomorphometry法を用いて定量的に検討した。12日間切歯を移動した時の歯槽骨形成量は、レーザー照射群においては非照射群の1.3倍促進されており、矯正移動歯周囲へのレーザー照射により牽引側歯槽骨骨形成は顕著に促進されることが確認された。しかしレーザー照射による骨形成促進作用は歯の移動4日目までしか認められず、以後8日目、12日目での検討では新生骨面積量は対照群、レーザー群間に有意な差は認められなかった。

Fig. 8 Effect of laser irradiation on newly formed mineralized bone area during incisor distal movement in experimental rats. *Significant difference from non-irradiation controls ($p < 0.01$). **Significant difference from laser irradiation for days 0-4 in labeled bone area ($p < 0.01$). †Significant difference from nonirradiation controls for days 0-4 in labeled bone area ($p < 0.01$). Values are mean $\pm$ S. D. for 5 rats.

このことはレーザー照射が歯の移動直後に有効であることを意味している。著者らはこれまでに低出力レーザーの縫合部骨形成に与える影響を検討するため、ラット正中口蓋縫合の急速拡大時に低出力レーザー照射を行うと縫合辺縁部の骨形成が1.4倍促進すること¹³⁾、さらに口蓋拡大前期(0-2日)のレーザー照射は有効であるが後期(2-4日)の照射は無効であることを報告した。このことは縫合部骨形成に対するレーザー効果と本研究における歯の移動時のレーザー効果が非常に類似していることを示唆している。実験的歯の移動における組織学的検討で、牽引側歯根膜中の細胞増殖能とコラーゲン産生能は歯の移動開始後1日以内に、また新生骨の形成は5日以内に現れることが報告されていることより (Azuma¹⁸⁾, 古賀¹⁹⁾, 市之川ら²⁰⁾), 歯の移動中のレーザー照射は歯根膜や歯槽骨の細胞増殖や、基質合成に促進的に作用している可能性が強いと考えられる。著者らは、ラットカルバリアから採取した骨芽細胞を用いレーザー照射を行うとbone nodule形成が顕著に増大するが、レーザー照射が培養早期の

未分化間葉系細胞の増殖と骨芽細胞への分化を促進することにより引き起こされていることも報告した^{1,5)}。本研究においても実験開始後0～4日目のレーザー照射群は非照射群に対し新生骨の形成が有意に促進していることから、レーザー照射が移動初期の牽引側骨芽細胞における骨形成に対し促進的に働いている可能性が強いことが示唆された。しかしカルセインでラベルされた石灰化骨の形成促進作用は、骨芽細胞の分化、増殖、マトリックス形成、石灰化のいずれにも影響されることが考えられるため、レーザー照射がこれらのどのような機能に影響を与えるのか今後検討する必要があると考える。

一方、本実験においては実験期間を通じて動物の体重はレーザー照射群と非照射群間に日毎における有意差は認められず、照射部位の肉眼的観察ではレーザー照射群に炎症、熱傷等の所見を認めなかった。またSaito and Shimizu^{1,3)}も同様な半導体レーザー照射器を用い100mW、10分のレーザー照射により局所および全身への影響がないことを報告しており、レーザー照射の局部及び全身への影響は無視できるものと考えられた。レーザー光は組織表面における反射、組織内における吸収あるいは拡散により組織を透過した際のエネルギーは減衰されることが知られている。山岸ら^{2,1)}は、波長790nm、出力60mWの連続波の半導体レーザーを厚さ1.0mmのヒト新鮮皮質骨に照射すると、レーザー光は50%透過することを報告している。本実験で使用したGa-Al-As半導体レーザーはヘモグロビンや水分に対して吸収されにくく生体への透過性が大変良いことが知られており^{2,2)}、本研究の照射条件でレーザー光は移動歯周囲の歯周組織に到達しているものと考えられる。今後、最適な照射条件を決定するうえでもレーザーの光量を変えた時の骨形成促進作用について検討する必要があると思われる。一方歯の移動は骨形成のみならず骨吸収にも顕著に影響されることが考えられるため、レーザー照射の破骨細胞に対する影響についても今後十分検討を加え、骨形成、骨吸収両面からレーザーの効果を詳細に検討

する必要がある。

以上のように、低出力レーザーの骨代謝に与える影響をin vivo, in vitro両方の系で検討することにより低出力レーザーの矯正臨床応用が可能になり、治療期間の短縮や後戻りの防止等に貢献できるものと考ええる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に於けるレーザー装置の開発に御協力を賜りました松下産業機器株式会社、金田明様に深謝致します。

参考文献

1. Yamasaki K, Shibata Y, Fukuhara T : The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (*Macaca fuscata*). *J Dent Res*, 61 : 1444-1446, 1982.
2. Yamamoto T, Kawakami M, Kobayashi Y, et al. : The effect of local application of 1, 25-dihydroxy cholecalciferol on osteoclast numbers in orthodontically treated rats. *J Dent Res*, 71 : 53-59, 1992.
3. 相馬俊一, 山下和夫, 松本進ほか : PTHの継続的投与が実験的歯の移動に及ぼす促進的効果について。日矯歯誌 (抄) 31 : 1997.
4. Pongsri Brudvik, Per Rygh : Root resorption after local injection of prostaglandinE₂ during experimental tooth movement. *Eur J Orthod*, 13 : 255-263, 1991.
5. Mester E, Spiry T, Szende B, Tota JG : Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg*, 122 : 532-537, 1971.
6. Abe T. Diode laser LLLT-enhanced bone fusion of femoral shaft fracture complicated by chronic osteomyelitis : a case report. *Laser Therapy*, 2 : 175-178, 1990.
7. Trelles MA, Mayayo E : Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers in Surg Med*, 7 : 36-45, 1987.
8. Tang XM, Chai BP : Effect of CO₂ laser irradiation on experimental fracture healing : A transmission electron microscopic study. *Lasers in Surg Med*, 6 : 346-352, 1986.
9. Nagasawa A, Kato K, Negishi A : Bone regeneration effect of low level lasers including argon laser. *Laser therapy*, 3 : 59-62, 1991.
10. 紺健一 : 低出力レーザー照射による骨形成促進作用

に関する実験的研究—特に照射期間及び照射時間による研究について. 日本レーザー歯学会誌, 3 : 35-44, 1992.

11. Takeda Y : Irradiation effect of low-energy laser on alveolar bone after tooth extraction experimental study in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 388-391, 1988.
12. 長澤明範, 加藤一, 高岡邦夫 : 骨形成因子から見たレーザーの骨修復促進効果の実験的検討. 日本レーザー歯学会誌, 9 : 165-168, 1988.
13. Saito S, Shimizu N : Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in mid-palatal suture during expansion in rat. *Am J Orthod Dentfac Orthop*, 111 : 525-532, 1997.
14. Ozawa Y, Shimizu N, Mishima H, et al. : SPIE 1984, Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone formation in vitro. 281-288, 1995.
15. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, et al. : Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*, 22 : 347-354, 1998.
16. Villanueva AR : A bone stain for osteoid seems in fresh, unembedded mineralized bone. *Stain Technology*, 49 : 1-8, 1974.
17. Eriksen EF, Axelrod DW, Melson F : Bone histology and histomorphometry. In, *Bone histomorphometry*. New York, 33-48, Raven Press, 1994.
18. Azuma M. Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experiment tooth movement, *Bull.* 17 : 149-178, Tokyo Med. Dent. Univ., 1970.
19. 古賀正忠 : 人為的歯牙移動時の組織変化に対する研究, 光学顕微鏡及び電子顕微鏡による観察. 歯科学報, 74 : 498-557, 1974.
20. 市之川正孝 : 人為的歯牙移動時の組織変化に対する研究, 酢酸鉛時刻描記法による光顕及び電顕的観察. 歯科学報, 75 : 1435-1472, 1975.
21. 山岸久也, 篠原親, 齊藤茂ほか : 半導体レーザーの組織透過性に関する基礎的研究. 日本レーザー歯学会誌, 5 : 13-22, 1994.
22. 渥美和彦 : レーザー光の生体への影響. レーザー歯学, 39-52, 医歯薬出版, 東京, 1986.