

## 論文の内容の要旨

氏名：加藤 岳 詩

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：低出力レーザー治療の骨再生に及ぼす影響

—マイクロ CT および組織学的評価—

歯内療法では、良好な治癒が困難な症例に対する根管治療と併用して、歯の保存を目的に根尖切除術が行われている。根尖切除後、歯肉粘膜創は 2 週間程度で安定するが、骨欠損部の治癒については、病巣が大きければ数ヶ月を要するといわれる。一方、低出力レーザー治療（LLLT）は、消炎、鎮痛に加えて、創傷治癒促進効果があると報告され、近年においては、LLLT によって骨折の治癒をも促進するとされる。しかし、LLLT に関しては臨床治験報告が先行しており、その効果について、基礎的検討に裏付けられた解釈は必ずしも十分ではない。

そこで、本研究では、ラット下顎臼歯部の根尖付近に実験的に施術した骨欠損の治癒過程をモデルとし、同部の骨再生における LLLT の効果について検討を行った。再生過程の評価は、実験動物用 3D マイクロ CT（マイクロ CT）による再生骨の定性的評価、骨体積と骨密度についての定量的評価、ヘマトキシリン・エオシン（HE）染色標本による組織学的な観察、そして、von Willebrand 因子（vWF）染色標本での血管増生の観察によって行った。

実験動物は、8 週齢、体重 180-200 g の Wistar 系ラット 36 頭を使用した。ペントバルビタール麻酔下にて右側口角部から下顎角にいたる皮膚切開を行い、咬筋を切断、翻転させ、右側下顎骨骨面を露出させた。次いで、臼歯根尖の近傍に位置する切歯を避けるようにして、右側下顎第一および第二臼歯間の根尖付近に直径 1.8 mm のラウンドバーで円筒形の骨欠損を形成した。レーザー照射条件は、照射出力 0.1 W、照射時間 40 sec、照射距離 13 mm とし、Khadra ら準じて、術直後（0 日目）に開始し、1 日 1 回、6 日目までの計 7 回行った。マイクロ CT（R<sub>m</sub>CT; リガク）の撮影条件は、撮影倍率 6.7 倍（voxel サイズ: 30 × 30 × 30 μm）、管電圧 90 kV、管電流 120 μA、撮影時間は 17 sec とした。レーザー照射群（n = 10）、非照射群（n = 10）のラットから得られた術直後から 28 日目に至るまでの 7 日毎の撮像データは、i-View-R（リガク）によって観察し、定性的な評価を行うとともに、骨欠損部に設定した円筒形の関心領域（直径 1.5 mm × 高さ 1.5 mm）について、再生骨の体積および密度変化の定量的評価を行った。骨体積（mm<sup>3</sup>）は、周囲組織および明らかな硬組織（既存骨）それぞれの放射線吸収のピーク値を断層像から求め、その中間値が再生骨による放射線吸収度の下限であるとして定量した。骨密度は、骨密度既知の骨塩ファントムの撮影で得た Volume データ値と骨塩量の検量線をもとに関心領域内の平均骨密度（mg/cm<sup>3</sup>）を求めて定量評価した。定量操作は、骨体積測定ソフトウェア（北千住ラジスト歯科 I-View Image Center）を用いて、7、14、21 および 28 日目それぞれの撮像データ画像と 0 日目の撮像データ画像とを重ね合わせることで得られる差分（voxel 数）を骨体積あるいは骨密度の変化量とした。

組織学的観察は、レーザー照射群および非照射群のラット（各群 n = 8）を 7、14、21 および 28 日目にペントバルビタールの過剰投与にて安楽死させて右側下顎骨を摘出後、10%中性緩衝ホルマリンで 2 日間固定し、K-CX（10% ethylenediamine tetraacetic acid-5%塩酸; ファルマ）に室温で 1 週間浸漬脱灰してパラフィン包埋を行った。組織標本は頰側骨面と平行に厚さ 6 μm の連続切片に作製し、HE 染色を施して光学顕微鏡（Leica DM 6000B; Leica）で観察した。一部の切片については、抗 vWF ポリクローナル抗体（Dako）を用いた免疫染色を施し、治癒組織内での血管新生を観察した。免疫染色標本は、脱パラフィン後、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に浸漬した切片を通常に従って、PBS で調製した 1%ウシ血清アルブミン（BSA）に浸漬することで非特異的反応部位のブロッキングを行い、1% BSA-PBS で 100 倍希釈した抗 vWF 抗体と HRP 標識 2 次抗体（One-Step Polymer-HRP 抗体, BioGenex）とに順次反応させた。発色には 3, 3'-diaminobenzidine（シグマ）を用い、発色後にヘマトキシリン溶液による核染色を施し、光学顕微鏡下にて観察した。

その結果、マイクロ CT を用いた観察では、術後 14 日目でレーザー照射群、非照射群ともに明らかな骨再生が認められた。骨体積および骨密度は、7～14 日目で急速に増加し、その後の 21、28 日目においても増加傾向を示した。14 日目以降の骨体積および骨密度は、レーザー照射群で有意に高かった。組織学的には、骨欠損部における再生骨の出現が、レーザー照射群においては 7 日目に観察され、非照射群よりも早い時期に骨形成が生じることが示唆された。また、新生血管の増加もレーザー照射群では非照射群よりも早いタイミングで生じると考えられた。

以上のことから、LLLТ は、受傷後の初期段階における細胞レベルでの賦活化を介して、骨欠損部における骨再生過程を促進させる可能性があるとし唆された。