

低出力レーザー治療の骨再生に及ぼす影響
ーマイクロ CT および組織学的評価ー

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

加藤 岳詩

(指導：小木曾 文内 教授, 勝呂 尚 助教)

緒 言

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¹⁾。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（以後、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ている^{2,3)}。すなわち、創傷部における疼痛や腫脹を減少させ、急速な組織温度上昇を伴うことなく炎症を鎮める効果がある⁴⁾。また、近年は、LLLTによって骨折の治癒が促進するとされ、*in vitro*の研究ではLLLTが骨芽細胞の増殖と分化を誘導して骨形成を促進するという報告がある^{5,6)}。さらに、骨形成で重要な血管新生をLLLTが促進させる可能性も示唆されている⁷⁾。

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^{8,9)}。これは、実験に使用される照射条件や動物モデルのバリエーションにも起因している可能性がある¹⁰⁾。事実、これまで用いられた骨再生モデルには、大腿骨¹¹⁾、頭蓋骨^{12,13)}、脛骨^{14,15)}などが多く、これらの骨質や骨密度は一様でない。加えて、LLLTの効果に関して顎骨を用いた骨再生研究の報告は皆無である。

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。再生にともなう変化の評価は、1) 実験動物用 3D マイクロ CT(以後、マイクロ CT) による再生骨の観察、骨体積と骨密度の経日的な定量評価、2) ヘマトキシリン・エオシン (以後、HE) 染色標本による組織学的な観察、および、3) von Willebrand 因子 (以後、vWF) の免疫染色による血管増生の観察によって行った。

材料および方法

1. 供試動物

Wistar 系雄性ラット（8 週齢，体重 180-200 g）36 頭を使用し，飼育は動物飼育施設内（室温；22°C，湿度；55%，12/12-h 明暗サイクル）のケージで行った。

なお，実験は日本大学歯学部動物実験委員会の承認（AP12D007）のもと，同委員会のガイドラインに沿って行った。

ペントバルビタール（ソムノベンチル；共立製薬）の腹腔内投与（0.5 ml/kg 体重）によって全身麻酔を施した後，手術部位を剃毛し，70%エタノールで清拭した。右側口角部から下顎角に至る皮膚切開を行い，咬筋を切断，翻転させ，右側下顎骨骨面を露出させた。ラットにおいては臼歯根尖の近傍に位置する切歯を避けるようにして，右側下顎の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（第 1 図 a, b）。その後，同部を滅菌生理食塩水で充分洗浄し，口腔粘膜および皮膚を復位して 5-0 号絹糸で縫合した。手術日を 0 日目とし，28 日目まで飼育した。

2. レーザー照射

半導体レーザー照射装置（OSL-S；オサダ）を使用した。同装置は，近赤外線波長 810 nm の連続波照射でスポットサイズは 0.156 cm²である。レーザー照射の条件は，照射出力 0.1 W，照射時間 40 sec，照射距離 13 mm とした。本条件

下では、照射熱量 3.6 J, パワー密度 0.59 W/cm², エネルギー密度 23.5 J/cm² である。この照射は Khadra ら¹²⁾に準じて、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。

3. マイクロCT解析

マイクロ CT (R_mCT; 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 (0 日目) 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、定性的な評価をした。また、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、骨再生にともなう骨体積, 骨密度の変化に注目した定量的な評価も行った。

骨体積 (mm³) 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定量し、関心領域内の平均骨密度 (mg/cm³) を算出した。実際の定量操作では、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て計測した。

4. 組織学的観察

レーザー照射群 (n = 8), 非照射群 (n = 8) のラットを 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た後, 右側下顎骨を摘出し, 10%中性緩衝ホルマリンで 2 日間固定した。その後, K-CX (10% ethylenediamine tetraacetic acid-5%塩酸; ファルマ) に室温で 1 週間浸漬して脱灰し, パラフィン包埋を行った。頬側骨面と平行に作製した厚さ 6 μm の連続切片に 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, 治癒組織内での血管新生を観察するために, 抗 vWF ポリクローナル抗体 (Dako) を用いた免疫染色を施した。すなわち, 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法に従って, 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った後, 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, 発色には 3, 3'-diaminobenzidine (シグマ) を用い, 発色後にはヘマトキシリン溶液による核染色を施した。

5. 統計学的検定

骨体積および骨密度についてのレーザー照射群－非照射群間の統計学的検定には、Mann-Whitney U test (SPSS 16.0 for Windows) を用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

1. 骨再生の経日的変化

マイクロCT像の差分解析によって、骨欠損部における骨添加と吸収の状態が7日目毎に可視化された（第2図）。7日目において既に、レーザー照射群では画像上で検出可能なレベルでの骨の添加と吸収が認められた。14日目以降では、照射群・非照射群のいずれにおいても、骨の吸収に比べて明らかに有意な骨の添加・増生による欠損部再生像が観察された。

2. 再生骨の体積および密度

再生骨の体積変化は第3図のとおりであった。7日目では、レーザー照射群（ 0.06 mm^3 ）と非照射群（ 0.03 mm^3 ）の再生骨の体積はわずかで、有意な差も認められなかったが、14, 21, 28日目での骨体積は、非照射群ではそれぞれ 0.53 , 0.93 , 1.25 mm^3 であったのに対して、レーザー照射群では 1.37 , 1.77 , 1.94 mm^3 と有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。

再生骨の密度変化は第4図のとおりであった。7日目では、照射群（ 53.3 mg/cm^3 ）と非照射群（ 48.8 mg/cm^3 ）との間に有意な差は認められなかった。その後の骨密度は、レーザー照射群、非照射群ともに骨体積と同様なパターンでの増加傾向を示した。非照射群の骨密度は、14日目で 193.9 mg/cm^3 、21日目で 264.1 mg/cm^3 、28日目で 303.4 mg/cm^3 であり、レーザー照射群の骨密度は、14日目で

273.6 mg/cm³, 21日目で367.6 mg/cm³, 28日目で411.2 mg/cm³であった。

3. 組織学的観察

骨欠損形成後7日目（第5図a-d）においては，レーザー照射群，非照射群のいずれにおいても，欠損部内に出血を伴った肉芽組織の増生や毛細血管の拡張と充血が観察された。レーザー照射群では，一部に幼弱な骨の形成が認められたが，非照射群ではそうした像は観察されなかった。骨欠損形成後14日目（第5図e-h）においては，形成された当初の骨欠損の外形痕跡内に，レーザー照射群，非照射群のいずれの場合においても，既存骨から連続した明らかな骨の再生像を認め，骨梁構造とその間を埋める結合組織が明瞭に観察された。骨欠損の形成後21および28日目（図示せず）における骨再生像は，レーザー照射群，非照射群とも，14日目の像と組織学的に顕著な差はみられなかった。

抗vWF抗体による免疫染色標本では，血管内皮細胞が陽性反応を示し，欠損部内の組織における新生結果の分布状況が示された。骨欠損形成後7日目（第6図a-d）においては，レーザー照射群，非照射群のいずれにおいても，内皮がvWF陽性を示す血管が多数観察されたが，レーザー照射群における新生血管数が非照射群よりも優位であった。しかし，骨欠損形成後14日目（第6図e-h）では，レーザー照射群における新生血管数は7日目に比べて減少する傾向を示し，非照射群における新生血管数は7日目よりも増加する傾向が認められた。

考 察

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^{8,9)}。一方、小動物を用いた組織形態学的研究では、マイクロCTによる定量的評価が注目されており¹⁶⁾、CT画像データを活用した骨体積および骨密度の定量的評価の有用性はEjimaらによっても報告されている¹⁷⁾。

そこで、本研究では、ラット顎骨に実験的に施術した骨欠損の治癒過程をモデルとし、LLLTが骨の再生、治癒に及ぼす効果について、マイクロCTによる定性的・定量的評価、HE染色標本による組織学的検討、抗vWF免疫染色による血管増生状態の観察を行った。照射条件の重要性を指摘する報告^{18,19)}は多いが、理想的な照射条件については結論が得られていないため、頭蓋骨欠損部へのレーザー照射後の骨再生過程を報告しているKhadraら¹²⁾が用いた照射条件に準じた。

骨欠損部における骨再生は、欠損部周囲の既存骨から開始し、7～14日目間で顕著に増加し、14日目で円筒形の欠損のほぼ全周に骨が形成され、21、28日目には骨体積および骨密度が増加していく傾向が観察された。14、21、28日目のレーザー照射群での骨体積および骨密度は、非照射群に比べて有意に高い値を示した。こうした骨体積および骨密度の増加は、Ozawaら²⁰⁾、Ninomiyaら²¹⁾

が報告している創傷治癒初期段階での未分化間葉系細胞や骨芽細胞の増殖や分化の促進、形成骨の増大、破骨細胞数の減少などといった現象が、レーザー照射の効果によって促進されたものと推測できる。

組織学的には、術後7日目にレーザー照射群で幼弱な骨梁が認められるようになり、14、21、28日目へと経日的に、欠損部組織内で骨が占める割合が増加する傾向がみられた。加えて、そうした傾向は、レーザー非照射群よりも照射群において顕著であった。本研究では細胞活性についての検索は行っていないが、レーザー照射後にアルカリホスファターゼ活性が有意に上昇するとの報告^{22,23)}もあることから、本研究で観察された組織学的所見は、レーザーの照射効果が細胞レベルでの賦活化を促進していることを反映した結果だと考えることが可能である。

また、LLLTは血管新生や線維芽細胞によるコラーゲン合成亢進に影響を及ぼすことで骨形成を促進するという報告もある^{24,25)}。本研究では、HE染色等の通常の組織切片標本では全体像が把握しにくい新生血管あるいは創傷部への血管侵入を、抗vWF抗体による免疫染色によって可視化した。その結果、7日目の抗vWF免疫染色では、レーザー照射群、非照射群のいずれにおいても、vWF陽性の血管内皮からなる細血管あるいは毛細血管を認め、それらは、レーザー非照射群に比べて照射群においてより豊富である傾向が示された。こうした所見を、

HE染色標本での観察結果と併せて考察すると、LLLTは血管新生を加速させ、おそらくはコラーゲンの合成や線維芽細胞の活性化なども促すことによって、創傷治癒ならびに骨再生を積極的に促進されると考えられた。

ラットの下顎臼歯部根尖付近に骨欠損を作成した後に1週間の低出力レーザー照射を行った本研究の結果は、創傷治癒の初期段階でのLLLTが、照射組織における血管新生、線維性結合組織の形成を促し、その後の骨再生に対して促進的な影響を及ぼす可能性を実験的に支持するものだといえる。

結 論

ラット顎骨に実験的に施術した骨欠損部に1週間のみ低出力レーザーを照射してその治癒過程を調べた結果、以下の結論を得た。

1. 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。
2. 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、新生血管も増加も、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、LLLT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。

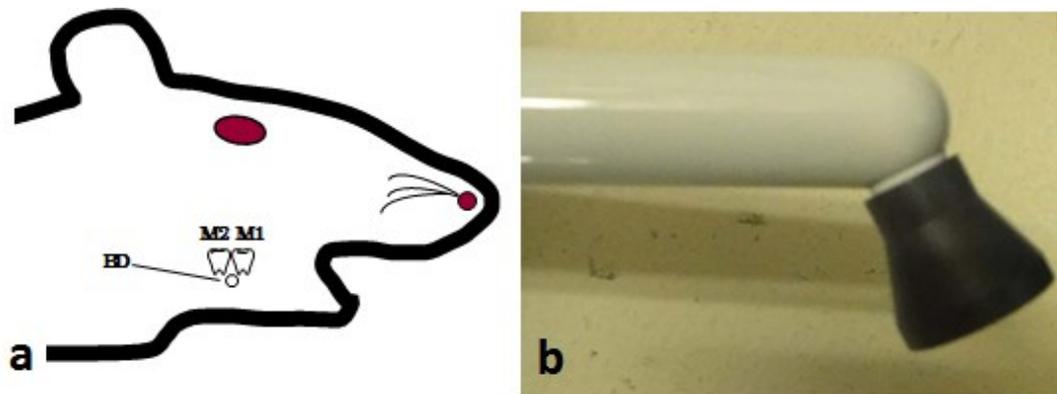
文 献

- 1) Peterson J, Gutmann JL (2001) The outcome of endodontic resurgery: A systematic review. *Int Endod J* 34, 169-175.
- 2) Kemmotsu O, Sato K, Furomido H, Harada K, Takigawa C, Kaseno S (1991) Efficacy of low reactive-level laser therapy for pain attenuation of postherpetic neuralgia. *Laser Ther* 3, 71-75.
- 3) Lizarelli RFZ, Lamano-Carvalho TL, Brentegani LG (1999) Histometrical evaluation of the healing of the dental alveolus in rats after irradiation with a low-powered GaAlAs laser. *SPIE* 3593, 49-55.
- 4) Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD (2004) The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control, a meta-analysis study. *Photomed Laser Surg* 22, 323-329.
- 5) Fujihara NA, Hiraki KRN, Marques MM (2006) Irradiation at 780 nm increases proliferation rate of osteoblasts independently of dexamethasone presence. *Lasers Surg Med* 38, 332-336.
- 6) Khadra M, Lyngstadaasb SP, Haanas HR, Mustafa K (2005) Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials* 26, 3503-3509.
- 7) Garavello IF, Baranauskas V, Cruz-Höfling MA (2004) The effects of low laser irradiation on angiogenesis in injured rat tibiae. *Histol Histopathol* 19, 43-48.
- 8) Garcia-Morales JM, Tortamano-Neto P, Todescan FF, Andrade-Jr JCS, Marotti J, Zezell DM (2011) Stability of dental implants after irradiation with an 830 nm low-level laser: a double-blind randomized clinical study. *Lasers Med Sci* 27, 703-711.
- 9) Jakse N, Payer M, Tangl S, Berghold A, Kirmeier R, Lorenzoni M (2007) Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation: An

experimental study on sheep. Clin Oral Implan Res 18, 517-524.

- 10) Bashardoust Tajali S, Macdermid JC, Houghton P, Grewal R (2010) Effects of low power laser irradiation on bone healing in animals: a meta-analysis. J Orthop Surg Res 5, 1-10.
- 11) Barbosa D, de Souza RA, Xavier M, da Silva FF, Arisawa EA, Villaverde AG (2013) Effects of low-level laser therapy (LLLT) on bone repair in rats, optical densitometry analysis. Lasers Med Sci 28, 651-656.
- 12) Khadra M, Kasem N, Haanaes HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP (2004) Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97, 693-700.
- 13) Marques L, Holgado LA, Francischone LA, Ximenez JP, Okamoto R, Kinoshita A (2014) New LLLT protocol to speed up the bone healing process-histometric and immunohistochemical analysis in rat calvarial bone defect. Lasers Med Sci 23, (DOI:10.1007/s10103-014-1580-x)
- 14) Luger EJ, Rochkind S, Wollman Y, Kogan G, Dekel S (1998) Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. Lasers Surg Med 22, 97-102.
- 15) Ribeiro DA, Matsumoto MA (2008) Low-level laser therapy improves bone repair in ratstreated with anti-inflammatory drugs. J Oral Rehabil 35, 925-933.
- 16) Udagawa A, Sato S, Hasuike A, Kishida M, Arai Y, Ito K (2013) Micro-CT observation of angiogenesis in bone regeneration. Clin Oral Implan Res 24, 787-792.
- 17) Ejima K, Omasa S, Motoyoshi M, Arai Y, Kai Y, Amemiya T, Yamada H, Honda K, Shimizu N (2012) Influence of metal artifacts on *in vivo* micro-CT for orthodontic mini-implants. J Oral Sci 54, 55-59.
- 18) Schindl A, Schindl M, Pernerstorfer-Schön H, Schindl L (2000) Low-intensity laser therapy: a review. J Investig Med 48, 312-326.

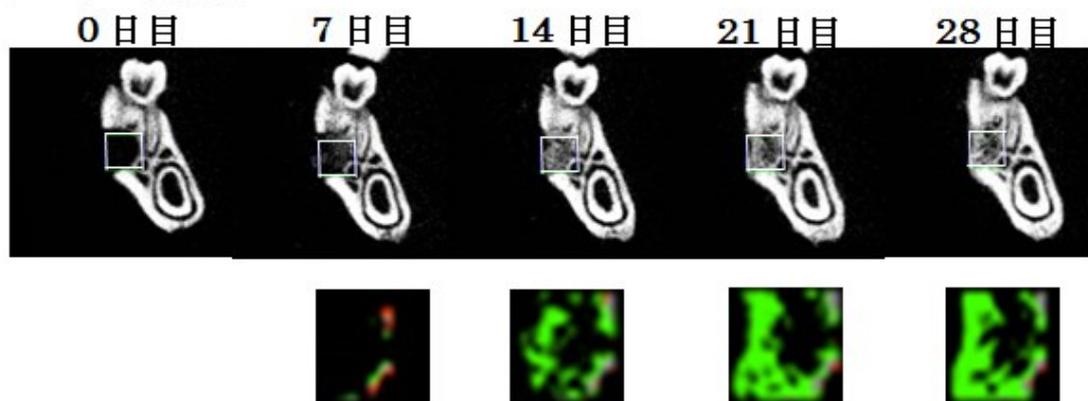
- 19) Al-Watban FA, Zhang WY (2001) The acceleration of wound healing is not attributed to laser skin transmission. *Laser Ther* 11, 6-11.
- 20) Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y (1998) Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stage of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* 22, 347-354.
- 21) Ninomiya T, Hosoya A, Nakamura H, Sano K, Nishisaka T, Ozawa H (2007) Increase of bone volume by a nanosecond pulsed laser irradiation is caused by a decreased osteoclast number and an activated osteoblasts. *Bone* 40, 140-148.
- 22) Ueda Y, Shimizu N (2001) Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation. *J Oral Sci* 43, 55-60.
- 23) Barushka O, Yaakobi T, Oron U (1995) Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia. *Bone* 16, 47-55.
- 24) Shimizu N, Mayahara K, Kiyosaki T, Yamaguchi A, Ozawa Y, Abiko Y (2007) Low-intensity laser irradiation stimulates bone nodule formation via insulin-like growth factor-I expression in rat calvarial cells. *Lasers Surg Med* 39, 551-559.
- 25) Kiyosaki T, Mitsui N, Suzuki N, Shimizu N (2009) Low-level laser therapy stimulates mineralization via increased Runx2 expression and ERK phosphorylation in osteoblasts. *Photomed Laser Surg* 28, 167-172.



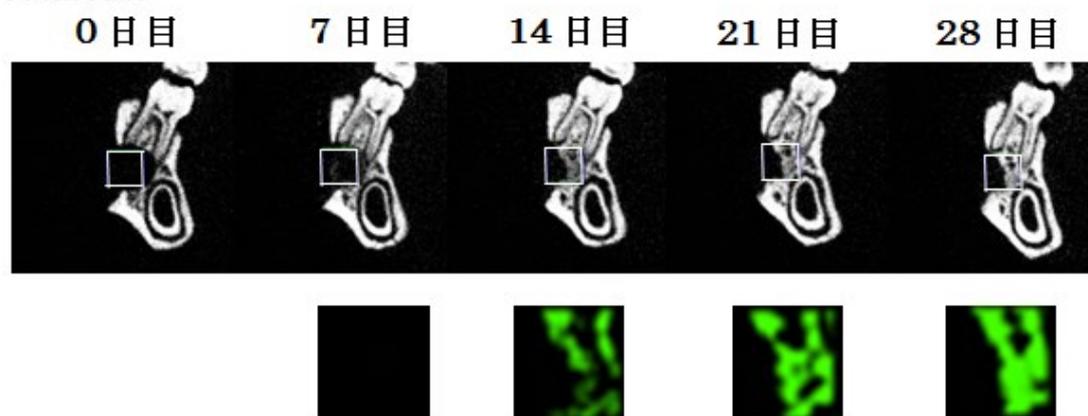
第1図 骨欠損モデルとレーザー照射装置

ラット頭部右側面観の模式図(a)で、下顎第一臼歯(M1)と第二臼歯(M2)間の根尖付近に形成した径1.8 mmの骨欠損(BD)の位置を示す。bは、照射距離を一定に保つ上で有用な照射装置先端部のスペーサー(黒い部分)を示す。

レーザー照射群

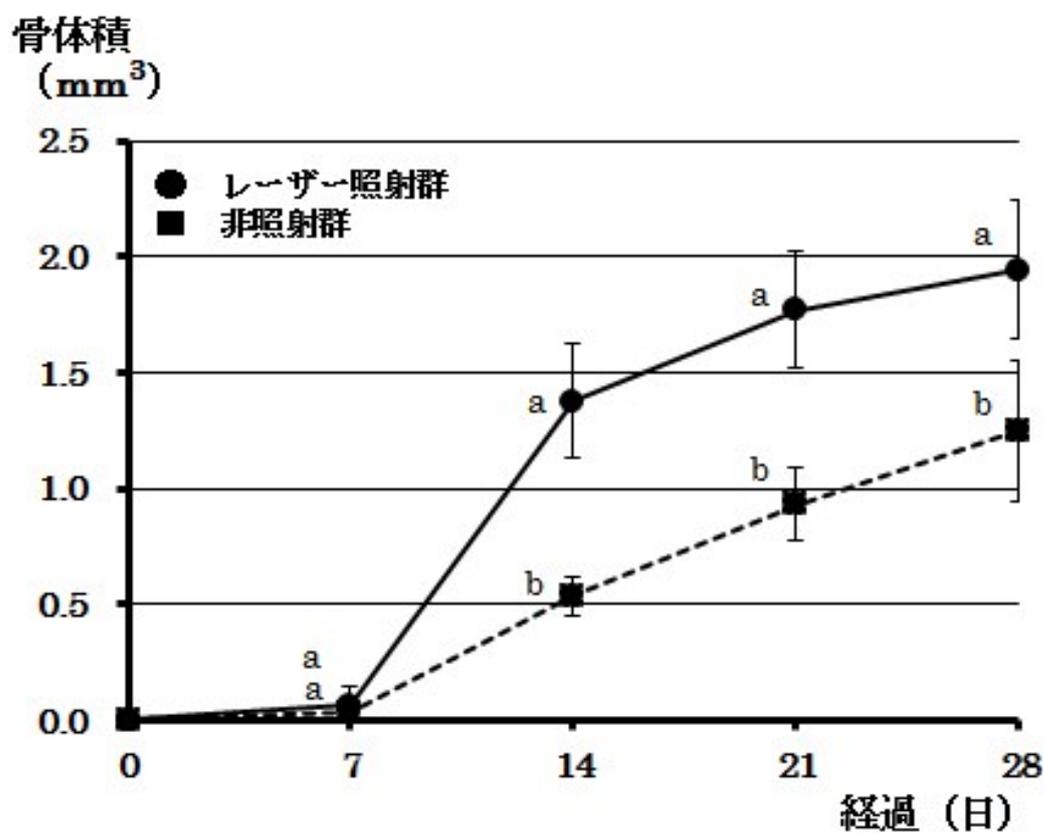


非照射群



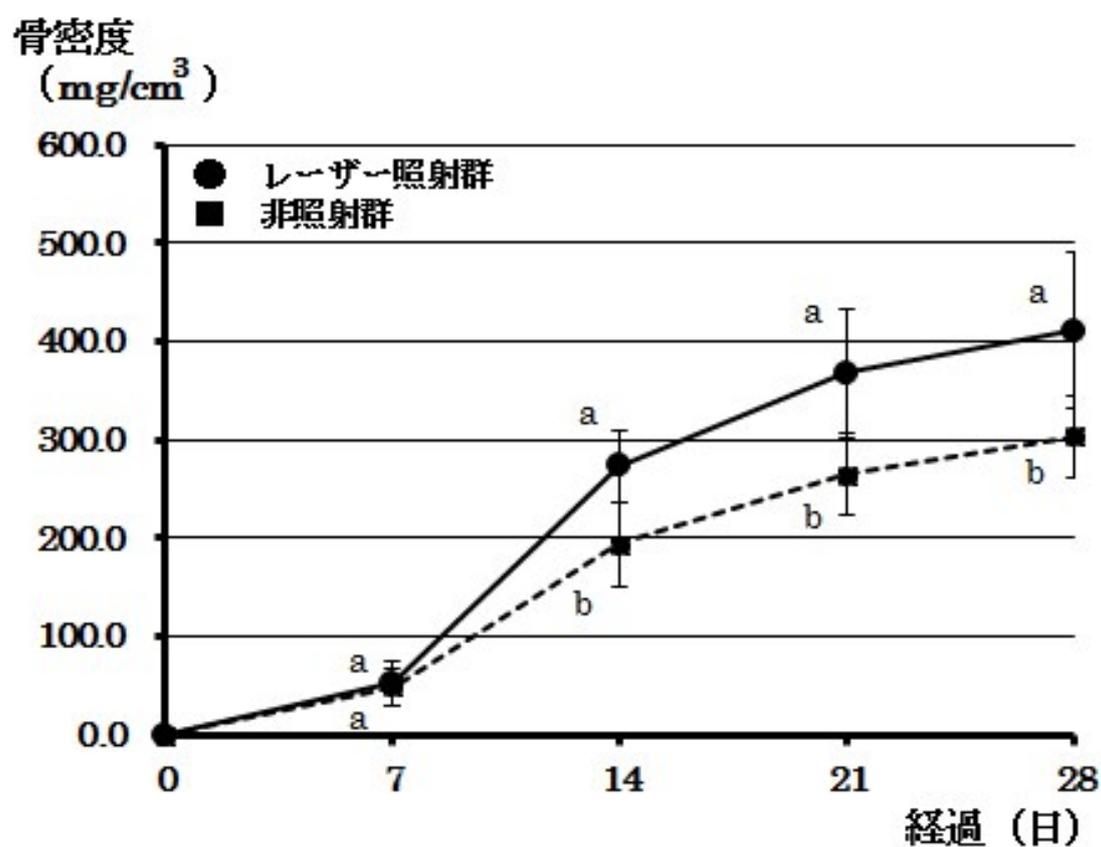
第2図 レーザー照射群・非照射群における骨再生の経日変化

各群とも上段は骨欠損部を含む下顎骨の前頭断マイクロCT画像であり，図中の矩形部分（関心領域）における差分画像を下段に示している。緑：骨添加部，赤：骨吸収部



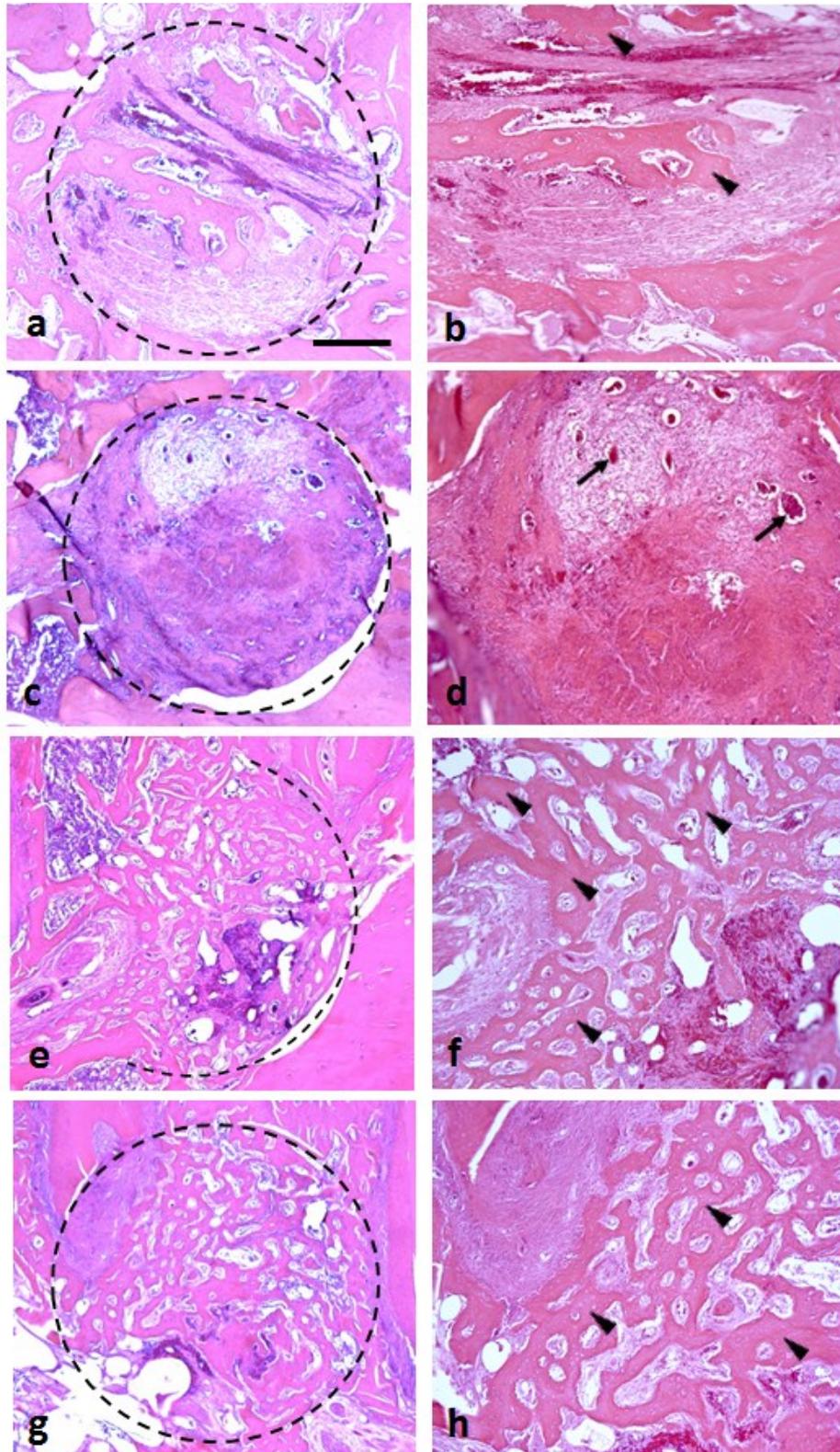
第3図 再生骨の体積変化

同日の異符号間で $p < 0.05$



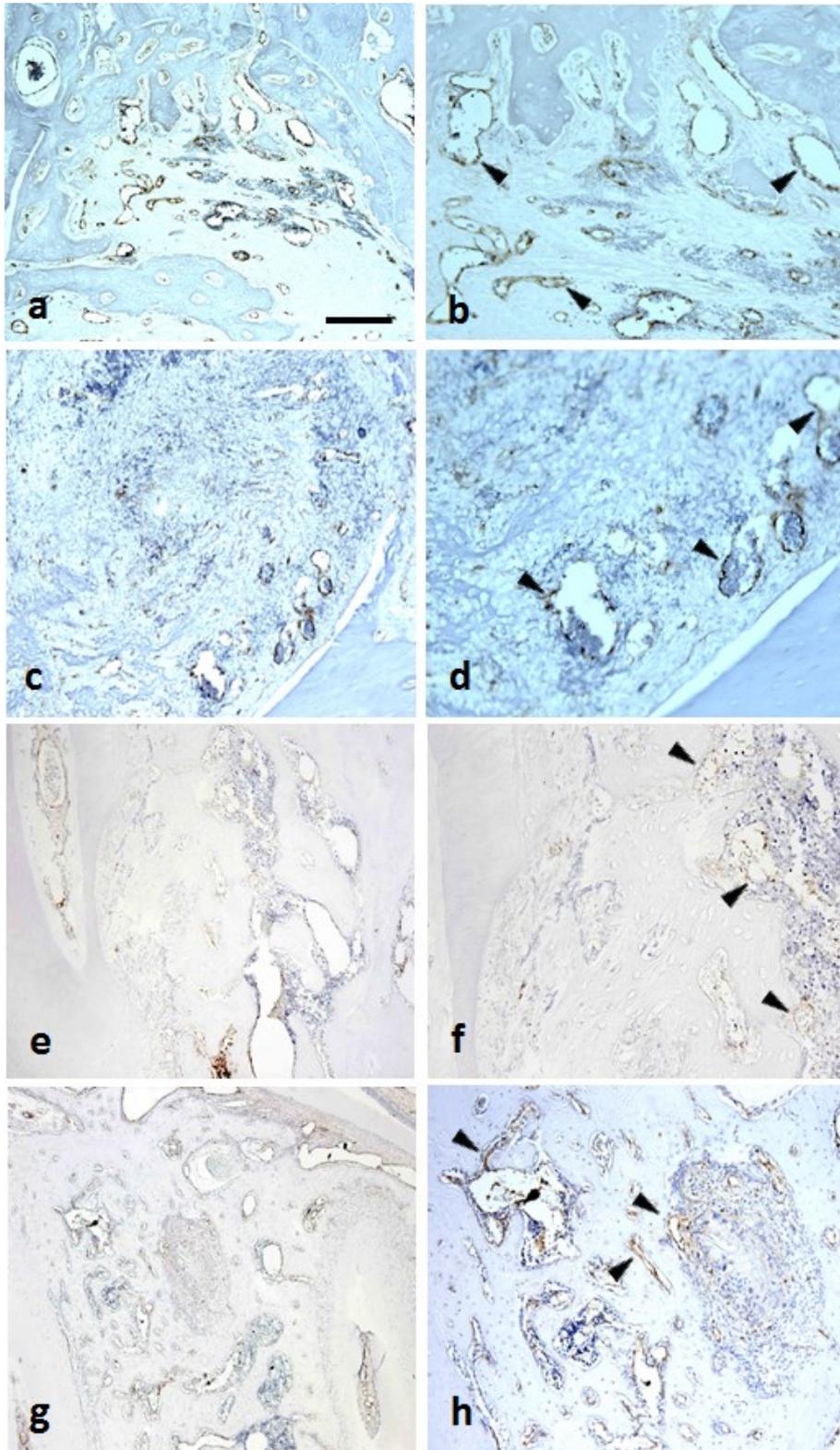
第4図 再生骨の密度変化

同日の異符号間で $p < 0.05$



第5図 骨欠損治癒過程の組織学的変化

術後7日目(a-d)および14日目(e-h)のレーザー照射群(a, b, e, f)と非照射群(c, d, g, h)のHE染色像を示す。点線は形成した骨欠損の外形痕跡。右の各図は対応する左図の拡大像。左図はどれも同倍率で図a中のスケールは200 μ m。矢印; 毛細血管の拡張像, 矢頭印; 再生骨梁



第6図 骨欠損治癒過程での血管新生

術後7日目(a-d)および14日目(e-h)のレーザー照射群(a, b, e, f)と非照射群(c, d, g, h)での抗vWF抗体免疫染色像を示す。右の各図は対応する左図の拡大像。左図はどれも同倍率で図a中のスケールは200 μ m。右図においてvWF陽性の血管内皮を矢頭印で例示している。