

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792123

研究課題名(和文)炭酸ガスレーザー照射によるソケットプリザベーション効果

研究課題名(英文)The socket preservation effect of carbon dioxide laser irradiation of extraction sockets

研究代表者

大郷 友規(DAIGO, Yuki)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号：70435121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：近年、臨床において抜歯窩の治癒促進のために炭酸ガスレーザーを使用した低出力レベルレーザー治療照射の有用性が臨床的に報告されている。しかし炭酸ガスレーザー照射の創傷治癒への影響のメカニズムは解明されていない。本研究は炭酸ガスレーザー照射によるラットの抜歯後の抜歯窩の新生骨形成および骨組織の修復に係る細胞の発現を観察した。

抜歯後の炭酸ガスレーザー照射により抜歯窩表層から中層において早期の骨吸収と新生骨形成が行われた可能性がある。炭酸ガスレーザー照射は抜歯窩の創傷治癒を促進し、さらに歯槽骨の高さの保存が可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The usefulness of low reactive-level laser therapy using a carbon dioxide laser for socket preservation in clinical cases has recently been reported. However, the mechanism of healing promoting effects of carbon dioxide laser irradiation remains unclear. Therefore, the emergence of osteoclasts and osteoblasts change and new bone formation of rats extraction sockets by carbon dioxide-enhanced healing process were investigated.

Carbon dioxide laser irradiation has possibility to enhance the rapid bone resorption and new bone formation on the surface layer over the middle layer. It is suggested that carbon dioxide laser irradiation promotes the healing of tooth extraction sockets.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：炭酸ガスレーザー 低反応レベルレーザー治療 ソケットプリザベーション 抜歯窩創傷治癒促進 病理組織学的解析

1. 研究開始当初の背景

低出力レベルレーザー治療 (Low reactive level laser treatment ;以下 LLLT) 照射における創傷治癒促進効果について抜歯後の歯周組織保存という考えを基にレーザーを用いた「ソケットプリザベーション」への応用の有効性を検証することを考えた。

これまでは抜歯窩に自家骨や種類の骨補填材またはコラーゲンスポンジの填入を併用した術式が報告されているが、これらはすべて抜歯窩内の血餅の保持に有効であり骨再生を促すことができる物質で被覆されているものである。本当の意味でのソケットプリザベーションに導くためには徹底した抜歯窩の搔爬、窩壁からの出血による血液供給がなされ、さらに創傷治癒促進効果を期待したレーザー照射を併用することで抜歯窩の歯槽骨吸収が最小となることが臨床的に報告されている。

しかしレーザー照射が粘膜上皮の被覆 (人工的痂皮の形成) 血餅の器質化や新生骨形成に影響を及ぼすと推察されるものの EBM の確立にまで至っていない。

2. 研究の目的

レーザー照射による創傷治癒促進効果を検証した論文はいくつか散見され、そのほとんどが組織透過型の半導体レーザーと組織表面吸収型の炭酸ガスレーザーの報告である。特に組織透過型レーザーでは LLLT 照射により新生骨形成に係るアルカリフォスファターゼ活性・オステオポンチンやタイプコラーゲンの発現上昇、TGF- β ・BMP-4/7 の成長因子の発現上昇、抜歯窩内肉芽組織の癒痕組織形成の抑制効果などの基礎的な報告がある。一方国内シェアが最も多い炭酸ガスレーザーにおいては抜歯後の粘膜上皮や骨組織の治癒を促進するという臨床報告は数多くあるものの、組織学および生化学的といった基礎的な研究報告がほとんどない。

そこで組織表面吸収型の炭酸ガスレーザーの LLLT 照射による創傷治癒促進効果を解明するため、抜歯窩の歯槽骨骨梁の変化、粘膜上皮の被覆・血餅の器質化・新生骨形成等の創傷治癒における組織学的変化および新生骨形成初期に関与するとされる破骨細胞、癒痕形成に関与するとされる筋線維芽細胞の発現・分化を検証することである。

3. 研究の方法

[実験動物]

生後 5 週齢の Wistar 系雄性ラット (体重 130~150 g) を用いた。

飼育環境は 1 ゲージに 3 匹ずつ飼育し、固形・粉末飼料 (CLEA Rodent Diet CE-2、日本クレア、東京) と飲用水 (水道水) を自由摂取させた。飼育室は 24 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 50 \pm 5% に維持し、12 時間毎に明暗サイクルを繰り返した。

[実験群]

対照群としてレーザー非照射群 (以下 非照射群とする)、レーザー照射群としては抜

歯窩表層の血液凝固および血餅脱落防止を期待した HLLT (High reactive level laser treatment) 照射のみの群を L1 群、HLLT+LLLT 照射を行った群を L2 群と 2 つの群に分けた。

[観察期間]

術後 6 時間と術後 3、5、7、10、21 日とし、3 群で使用したラットは合計 99 匹 (術後 6 時間のみ各 3 匹とした) について検証した。

[実験方法]

ペントバルビタールナトリウム (東京化成工業、東京) を生理食塩水にて 64.8 mg / ml の濃度になるように希釈した麻酔薬を用いて腹腔内投与 (0.1~0.12 ml) による全身麻酔を行い、自作のラット用ヘーベルとモスキート鉗子にて可及的に歯槽骨を損傷しないように上顎左側第一臼歯を抜歯した。抜歯後において非照射群では乾綿球にて圧迫止血を行い、レーザー照射 2 群では抜歯直後の圧迫止血を行わず臨床に即して抜歯窩表層の血液凝固および血餅脱落防止つまり人工的痂皮形成を目的とした HLLT 照射を行った。さらに抜歯後 1 日に麻酔下にて非照射群では 0.025w/v% チアミトール (日本薬局方、塩化ベンザルコニウム塩化物液、日興製薬、岐阜) にて消毒を行い、一方のレーザー照射 2 群では同様に消毒を行った後に LLLT 照射を行った。

[レーザー装置]

CO₂ を発振器とした炭酸ガスレーザー (PanalaseCO₂ ; パナソニック四国エレクトロニクス、大阪)、レーザーチップは内径 0.15cm のテーパー A1 (透過率 90%) を使用した。

[照射条件]

・HLLT 照射; 血液に触れないようにレーザーチップを非接触下で照射を行った。
(1.0w、連続波、30 秒、エア無、約 152J/cm²)
・LLLT 照射; HLLT 照射により形成した抜歯窩表層の人工的痂皮にレーザーチップを接触させ照射した。(1.0W、mode、15 秒、エア無、約 40J/cm²) mode とはパルス幅を超短時間とし、照射時の peak power を上昇させることで低出力照射が可能なモードである。

[病理組織学的観察]

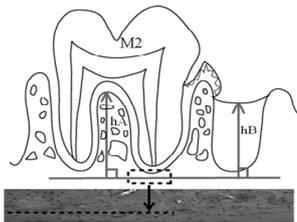
抜歯後 6 時間、3、5、7、10、21 日に麻酔薬過量投与により屠殺し、抜歯窩を含む周囲組織を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて 48 時間固定を行った。その後 10%EDTA 溶液にて 3 週間脱灰後、上昇アルコール系列で脱水してパラフィン包埋を行った。ミクロトームにて厚さ 4 μ m の矢状断連続薄切標本作製し、Hematoxylin-Eosin 染色 (H.E 染色) を施し、病理組織学的観察を行った。

[骨形態計測学的解析]

抜歯窩の新生骨形成を客観的に評価を行ううために、抜歯窩内が新生骨で満たされれば歯槽骨骨梁の形成が終了したと考えられる術後 21 日の H.E 染色切片を用いた。

計測方法は上顎骨の層板の下縁を通る線

(上顎骨層板線)を基準とし、この基準線に対して直角に第2臼歯(M2)根間中隔の最下点までの距離(hA)と基準線から抜歯を行った第1臼歯(M1)の遠心根抜歯窩表層の新生骨相当部に対し垂線を下ろした時の最下点までの距離(hB)を計測し、個体差や切片作製時の歪を補正するために計測値を hB / hA (平均値 ± 標準偏差) として算出した。



[免疫組織学的観察]

上記の病理組織学的観察の矢状断連続薄切標本作製までは同一過程である。

脱パラフィン・新水酸化後、マイクロウェーブを5分間照射して抗原不活化処理を行った。内因性ペルオキシダーゼの抑制のためブロッキング試薬(DAKO、京都)を5分間作用させ、蒸留水にて洗浄、トリス塩酸緩衝液(以下TBS)に5分間浸漬した。

1次抗体として抗ヒト平滑筋アクチン・モノクローナル抗体(50倍希釈、以下-SMA、DAKO、京都)と抗Transforming growth factor-1抗体(50倍希釈、以下TGF-1、Santa Cruz Biotechnology Inc、Europe)を用い常温で1時間反応させた。TBSにて洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを10分間反応させた。蒸留水にて洗浄後、Hematoxylin-Eosin染色(H.E染色)による対比染色を行い、光学顕微鏡にて標本の観察を行った。

[-SMA 陽性細胞数および TGF- 1 発現領域の計測]

計測部位は抜歯窩表層の肉芽組織形成部あるいは粘膜固有層に相当する領域で縦横150μmの正方形の範囲に設定した。染色性の良い3か所を選択し、-SMA陽性細胞の数を計測するとともに単位面積当たりのTGF-1陽性領域を面積で計測し各個体の平均値を算出した。

計測による解析にはデジタルマイクروسコープを用いて標本切片をスキャンし、ソフトウェア(Scion Image)を用いて計測を行った。

尚、本研究のプロトコルは大阪歯科大学動物実験指針に基づいて動物実験委員会の承認を得て行った(承認番号12-22002)。

4. 研究成果

[病理組織学的観察による評価]

<術後6時間後>

非照射群およびレーザー照射2群ともに抜歯窩は血餅で満たされていた。ただレーザー照射2群ではHLLT照射により表層に炭化層を認めたが、それ以外では3群間での変化は認めなかった。

<術後3日目>

レーザー照射2群では抜歯窩周囲から修復に向けた器質化が進行しているのに対して、非照射群では抜歯窩内のほとんどが血餅で満たされたままであった。

また抜歯窩表層～中層にかけての歯槽骨壁の強拡大像において非照射群は多核巨細胞である破骨細胞様細胞はあまり認められなかったのに対して、レーザー照射2群では非照射群と比較して多数の出現および吸収窩も顕著であった。(図1)

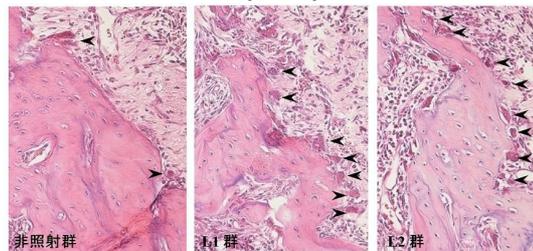


図1 術後3日 抜歯窩表層～浅層の歯槽骨壁 ➤;破骨細胞様細胞を指す。

レーザー照射2群では非照射群と比較して顕著に巨核細胞の出現を認めた。

<術後5日目>

術後3日では確認されなかった新生骨形成が、3群すべてで認めた。非照射群ではこれまでの報告と同様に抜歯窩底部からのわずかな骨新生を呈しているのに対して、レーザー照射2群では抜歯窩底部だけではなく今までに報告がない抜歯窩表層～中層にかけても未熟な骨新生像が認められた。(図2)

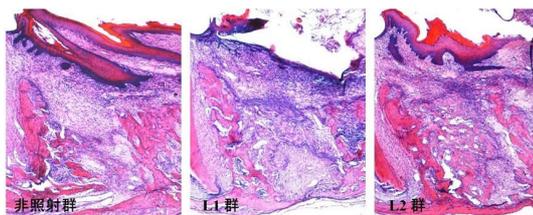


図2 術後5日 病理組織像

<術後7日目>

非照射群では破骨細胞様細胞による骨吸収と抜歯窩周囲からの骨形成が同時に進行していたのに対して、レーザー照射2群では破骨細胞様細胞はほとんど確認できず、抜歯窩の浅層～中層にかけて架橋状の新生骨形成が顕著に認められた。さらにL2群はL1群に比べ骨梁幅も大きく、骨梁が密であった。(図3)

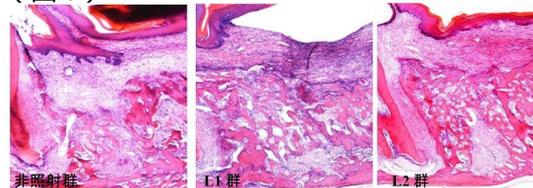


図3 術後7日 病理組織像

<術後10日目>

3群すべてにおいて抜歯窩内は新生骨で満たされ、骨髄中および骨梁周囲には細胞の存在が多く認められた。ただ非照射群では骨梁

幅が狭く未熟であった。

<術後 21 日目>

3 群ともに抜歯窩内は成熟した新生骨で満たされており、骨梁も密に形成されていた。しかし、非照射群では歯槽骨頂部に皿状の陥凹を呈したのに対して、レーザー照射 2 群では歯槽骨頂部は平坦でほとんど陥凹を呈しなかった。(図 4)

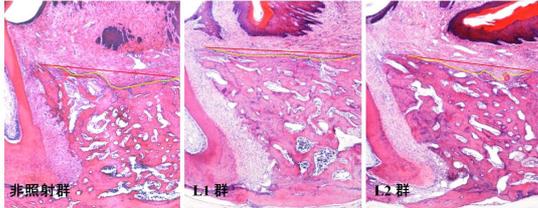


図 4 術後 21 日 病理組織像

非照射群では根間中隔を結んだラインに対して抜歯窩表層部の新生骨のラインがかなり低い位置となり、それが皿状の陥凹を呈している。

レーザー照射 2 群ではほとんど陥凹を呈しなかった。

[骨形態計測学的観察による評価] (図 5)

歯槽骨の高さ指数 ($= hB / hA$) は非照射群 (0.652 ± 0.079) に比べ、L2 群 (0.766 ± 0.039) は有意に高い値を示した。L1 群 (0.761 ± 0.085) では統計学的な有意な差を示さなかったが L2 群と同じ傾向を呈した。

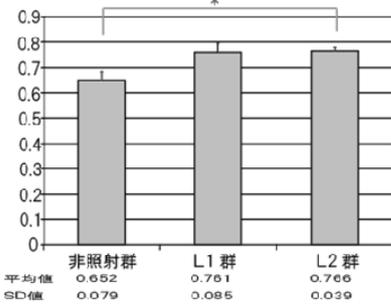


図 5 術後 21 日の歯槽骨高さの計測結果

[免疫組織学的解析]

= -SMA 陽性細胞数 =

抗 -SMA 抗体を用いた免疫染色はしばしば筋線維芽細胞のマーカーとして用いられる。本研究では抜歯窩内の筋線維芽細胞の発現を観察することで抜歯窩内の組織の癒痕化の程度を比較し、創傷治癒の促進効果が認められるのかを判断することを考えた。(図 6)

<術後 6 時間>

L1 および L2 群とも LLLT 照射前であること、また抜歯窩内は血餅で満たされているため細胞成分が認められなかった。そのため非照射群と変化がなかった。

<術後 3~7 日>

L2 群では -SMA 陽性細胞数は非常に少なかったのに対して、非照射群では逆に抜歯窩表層の肉芽組織部に有意に多くの出現が認められた。

<術後 10、21 日>

非照射群、L2 群ともに有意な差は認めなかった。(図 6) 顕微鏡的に観察において L1 群の -SMA 陽性細胞の出現は非照射群と L2 群の中間程度であると思われる(数値的データはなく肉眼的所見)

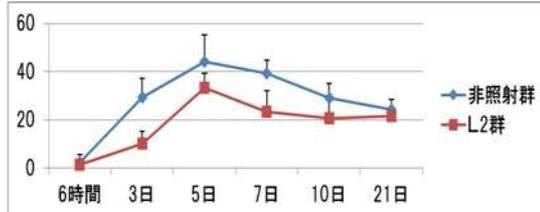
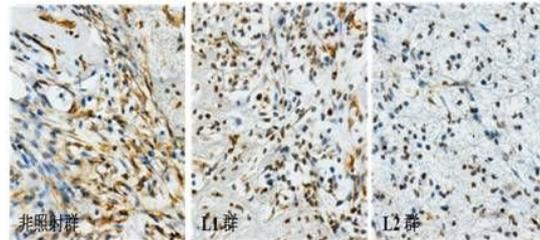


図 6 -SMA の発現および測定結果

非照射群 vs L2 群 = 術後 6 時間後両群ともにほぼ 0、術後 3 日 = 16.65 ± 8.79 個 vs 38.28 ± 10.51 個、術後 7 日 = 38.43 ± 10.46 個 vs 55.28 ± 5.16 個)

*現時点で L1 群についての解析は時間が不十分であるため計測データは記載していません。

= TGF- 1 の解析 =

TGF- 1 は線維芽細胞を筋線維芽細胞へ分化する作用がある。そのため初期の TGF- 1 の発現は抜歯窩の癒痕組織化を誘導し、創傷治癒を遅延させることが言える。またその後の抜歯窩の創傷治癒では TGF- 1 の発現は新生骨形成を誘導するものと考えられている。

<術後 6 時間、3 日>

両群において肉芽組織形成はほとんど認められなかった。

<術後 5 日、7 日>

L2 群では非照射群に対して有意に TGF- 1 陽性像は少ない。特に非照射群では抜歯窩表層の肉芽組織形成部に TGF- 1 陽性像が多くみられた。(図 7)

<術後 10 日>

抜歯窩の新生骨形成に作用すると考えられる時期と思われ、L2 群の TGF- 1 陽性像が急激に増加した。恐らくこの時期は抜歯窩の骨新生を誘導するためではないかと考えられるが、もう少しこれに関しては考察が必要であると考えている。

<術後 21 日>

非照射群および L2 群において抜歯窩の創傷治癒が終了した時期であると思われ、術後 10 日から急激に TGF- 1 陽性像の発現が減少している。(図 8)

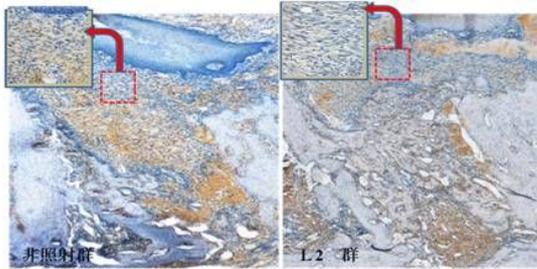


図7 術後5日 TGF- 1の発現

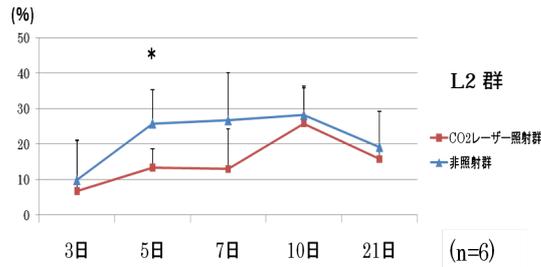


図8 TGF- 1陽性領域の面積の計測結果

以上より炭酸ガスレーザーを使用した抜歯窩の創傷治癒に関して、HLLT 照射が抜歯窩表層の血餅を炭化させ作り出した人工的痂皮により物理的に抜歯窩表層の早期の粘膜閉鎖を図ることができた。このことが抜歯窩内の血餅の保持、外界との交通を遮断し良好な創傷治癒を促すといった直接的効果であると考えられる。また LLLT 照射においては炭酸ガスレーザーの照射深度が 0.05mm と非常に浅いことと今回の研究で観察された抜歯窩浅層～中層にかけての架橋状の新生骨形成の位置とが一致する。これは炭酸ガスレーザーの LLLT 照射により術後 3 日において骨リモデリングの初期に出現する破骨細胞の有意な遊走、出現、 α -SMA 陽性細胞の発現減少等による癒痕組織形成の抑制等を認めた。さらにこれまでの炭酸ガスレーザーを使用した LLLT 照射では前骨芽細胞を遊走、増加させる basic fibroblast growth factor (bFGF) の合成促進、骨芽細胞の骨シアロタンパク質やオステオカルシンの発現誘導等のレーザー光と組織の生体相互の作用、つまり LLLT 照射による間接的効果として働いている可能性が推察されたと考える。

本研究はこれまで臨床的に報告されていた炭酸ガスレーザーを用いた抜歯窩の創傷治癒促進および歯槽骨レベルの保持に対して、実験動物を使用した基礎的研究として病理組織学および形態計測学的に解析したものであるとして十分にエビデンスになり得ると考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

大郷友規

・炭酸ガスレーザー照射における抜歯窩創傷治癒への効果

・平成 24 年度日本補綴歯科学会関西支部会

・2013 年 3 月 2 日 滋賀県大津市

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 大郷友規 (DAIGO, Yuki)

大阪歯科大学・歯学部・講師(非常勤)

研究者番号: 70435121