

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11183

研究課題名(和文) 歯科用レーザー照射併用による抜歯窩創傷治癒促進効果

研究課題名(英文) Effects of wound healing in the tooth extraction socket from concomitant use of dental laser therapy

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：アメリカ食品医薬品局は抜歯後のレーザー照射には半導体レーザーと炭酸ガスレーザーが創傷治癒にとって有効であると定義している。しかし、EBMとなり得る基礎的研究報告はほとんどない。本研究では臨床手技に準じてラットの抜歯後、各レーザー照射を行い、抜歯窩の創傷治癒への影響について病理組織学的に検証を行った。その結果、抜歯後の各レーザー照射ともに創傷治癒の早期の段階で新生骨の形成と骨梁の成熟を認めた。また抜歯窩粘膜の癒痕収縮も抑制され、粘膜の陥凹が少なく、歯槽骨頂も高く維持できた。

研究成果の概要(英文)：The United States Food and Drug Administration has stipulated that the use of laser radiation from semiconductor and carbon dioxide gas lasers is effective for promoting wound healing after tooth extraction. However, there are almost no reports of basic research considered to have reached the status of evidence-based medicine. In this study, depending on the clinical procedure, we used each type of laser therapy after tooth extraction performed on rats, and then performed histopathological verification to determine the effects of this radiation on wound healing in the tooth extraction socket. Results show that formation of new bone and maturation of bone trabeculae were observed during the early stages of wound healing when either form of laser radiation was used after tooth extraction. We were also able to inhibit scar contraction of the extraction socket mucosa, minimize mucosal concavity, and maintain the height of the alveolar crest.

研究分野：歯科・補綴系歯学

キーワード：半導体レーザー 炭酸ガスレーザー 低出力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効果 病理組織学的解析

1. 研究開始当初の背景

アメリカ食品医薬品局(以下;FDAとする)は歯科用レーザー装置による歯科治療での使用用途を規定した指針の中の1つに“Coagulation of extraction sites(抜歯窩の血液凝固)”がある。この治療に推奨しているレーザー装置はレーザー光が組織深部まで到達できる半導体レーザーと組織表面で吸収される炭酸ガスレーザーと性質が相反する2機種である。実際の歯科臨床では抜歯窩の治癒期間の短縮を図りつつ、歯槽骨高さを可及的に温存する(この考え方をソケットプリザベーションという)ためには、徹底した抜歯窩壁の搔把と出血による血液供給、確実な血餅保持が重要となり、これを可能にしたのが抜歯窩へのレーザー照射である。これまでレーザーによる抜歯後のLLLT照射が粘膜上皮の被覆、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基礎的研究報告が非常に少なかった。それを受けて、臨床手技に従い炭酸ガスレーザーを使用した抜歯窩への照射により組織学的観察にて抜歯窩表層に架橋状の新生骨形成、抜歯窩粘膜の陥凹抑制(歯槽骨吸収の最小化)、新生骨形成に關与する多数の細胞出現と創傷治癒を遅延させる筋線維芽細胞の出現抑制による創傷治癒促進効果があることを報告した。一方、半導体レーザーの場合では抜歯窩創傷治癒の促進に関する臨床報告はあるものの、組織学的および細胞学的な基礎的研究は少なく、また照射条件が臨床に準じていないため客観的評価が困難であった。以上より、性質の異なる2機種のレーザーにおける抜歯窩への創傷治癒過程の組織学的な検証により、LLLT照射がそれぞれの創傷治癒機転、形態さらには照射方法・条件の相違を解析することが重要である。

2. 研究の目的

FDAが「抜歯窩への応用」に推奨する半導体レーザーおよび炭酸ガスレーザーを用いて抜歯窩へのLLLT照射による抜歯窩への創傷治癒効果の相違の解明および比較検討するために抜歯窩の血餅の器質化、歯槽骨骨梁の変化、新生骨の形成および抜歯窩粘膜上皮の癒痕組織形成に關与する筋線維芽細胞分化、発現、遊走を病理組織学的および形態計測学的に検証する。

3. 研究の方法

実験動物には5週齢のWistar系雄性ラット(体重130~150g)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±2℃、湿度50%±5%に維持し、12時間毎の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抜歯後にHLLT+LLLT照射を行った炭酸ガスレーザー照射群(以下、CO₂群とする)と半導体レーザー群(以下、Diode群とする)の2群とに分けた。

[観察期間]

術後6時間と術後3、5、7、10および21日目とし、3群で使用したラットは合計99匹(術後6時間のみ各群3匹とした)について検証を行った。

[実験方法]

ペントバルビタールナトリウムを生理食塩水にて64.8mg/mlの濃度となるように希釈した麻酔薬を用いて腹腔内投与(0.1~0.12ml)による全身麻酔を行い、自作のラット用ヘーベルとモスケッ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、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は行わず臨床に則して各レーザー装置にてHLLT照射による血液凝固を行った。さらに、抜歯翌日に非照射群はジアミトールにて消毒を行い、レーザー照射2群では同様の消毒後に各レーザー装置にてLLLT照射を行った。

[使用するレーザー装置と照射条件]

・炭酸ガスレーザー

PanasonicC05;パナソニック四国エレクトロニクス、大阪。波長10600nm、レーザーチップは内径0.15mmのテーパーA1(透過率90%)。

・半導体レーザー

ilase;Biolase,Inc,USA。波長940nm、レーザーチップはスポット径0.4mm²ファイバー。

[各レーザー装置の照射条件]

・炭酸ガスレーザー

(1)HLLT照射;抜歯窩表層の血液にレーザーチップを非接触下で照射。(1.0W、Continuous-wave mode、30秒間、約152J/cm²)。

(2)LLLT照射;抜歯窩表層の痂皮にレーザーチップを僅かに接触下で照射(1.0W、mode、15秒間、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。(Pulses time=0.0008秒、pulses interval=0.03秒、1 cycle=0.0308秒)

・半導体レーザー

(1)HLLT照射;抜歯窩表層の血液にレーザーチップを接触下で照射。(1.0W、Continuous-wave mode、60秒間、約152J/cm²)。

(2)LLLT照射;抜歯窩表層の痂皮にレーザーチップを僅かに接触下で照射(1.0W、CP1mode、48秒間、約40J/cm²)。CP1modeとはインターバルをとることで組織への熱の蓄積を回避するGated pulses modeである。(Pulses time=0.0001秒、pulses interval=0.0002秒、1 cycle=0.0003秒)

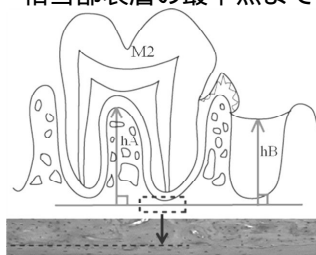
[病理組織学的観察]

術後6時間と術後3、5、7、10および21日に麻酔薬過量投与により屠殺、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溶液にて脱灰、上昇アルコール系列で脱水し、パラフィン包埋を行った。さらに厚さ4 μ mの矢状断連続薄切標本を作製し、Hematoxylin-Eosin染色を施し、病理組織学的解析を行った。

[骨形態計測学的解析]

抜歯窩が新生骨で満たされ、ほぼ歯槽骨骨梁の形成が終了したと思われる抜歯後21日のH-E染色標本を用いて、上顎骨の層板の下縁を通る線(上顎骨層板線)を基準線(下図の黒色の点線)とし、この基準線に対して垂直に第二臼歯(M2)の根間中隔の最下点までの距離(hA)と第一臼歯(M1)の遠心根新生骨相当部表層の最下点までの距離(hB)を計算



し、個体差や切片作製時の歪を補正するための測定値を指数 hB/hA (平均値 \pm 標準偏差) として M1 の高さを算出した。

[免疫組織学的観察および解析]

免疫染色を行う目的は抜歯窩表層の肉芽組織部あるいは粘膜固有層に相当する領域における瘢痕収縮を引き起こし、瘢痕組織形成に関与するとされる筋線維芽細胞の発現を観察することである。その細胞に関連する抗体として抗ヒト平滑筋アクチン・モノクローナル抗体(以下、SMAとする)を使用した。

染色方法として前述の病理組織学的観察における矢状断連続薄切標本作製まで行い、脱パラフィン・親水化、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社、京都)を5分間作用させ、蒸留水で洗浄し、トリス塩酸緩衝溶液(以下、TBSとする)に5分間浸漬した。1次抗体には50倍希釈したSMA(DAKO社、京都)を用い、常温で1時間反応させた。反応後、蒸留水にて洗浄し、マイヤーのヘマトキシリン染色液による対比染色を行った。

計測方法について、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において縦横150 μ mの正方形の範囲とし、染色性の良い3カ所を選び、SMA陽性細胞数を計算し、各個体の平均値を算出した。計測機器はデジタルマイクロスコープ(VH-9000、株式会社KEYENCE、大阪)を用いて画像をスキャンし、ソフトウェア(NIH 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16-01011)。

4. 研究成果

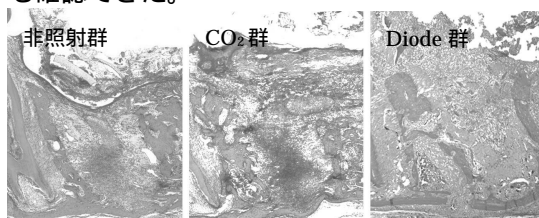
[病理組織学的観察]

<抜歯後6時間後>

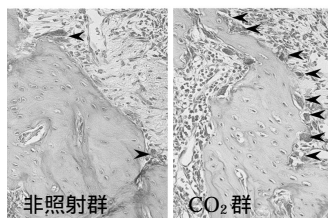
非照射群およびレーザー照射2群ともに抜歯窩内は血餅で満たされていた。ただ、レーザー照射2群は抜歯窩表層へのHLLT照射により炭化層を認めたが、それ以外に3群間では3群間に組織学的変化は認めなかった。

<抜歯後3日目>

非照射群では抜歯窩内のほとんどが血餅で満たされていたのに対して、レーザー照射2群では抜歯窩壁から器質化が進行し、その中央に血餅を認める程度であった。さらにDiode群ではさらに抜歯窩底部からの器質化も確認できた。

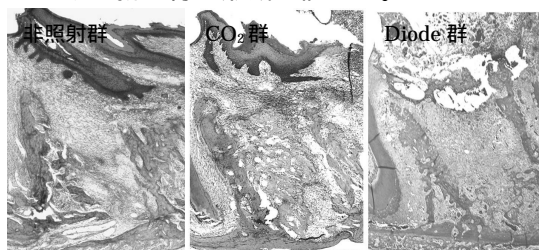


またこの時期の抜歯窩壁の強拡大像において非照射群およびDiode群では多核巨細胞である破骨細胞様細胞があまり確認できなかったのに対して、CO₂群では抜歯窩浅層部に多数の出現を確認し、骨吸収像も顕著であった。



<抜歯後5日目>

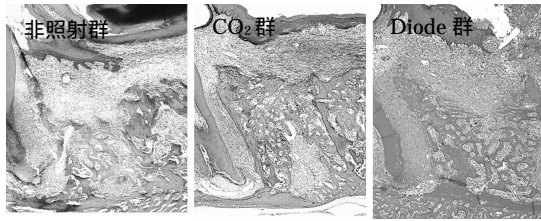
抜歯後3日目には確認できなかった抜歯窩内の新生骨が3群すべてにおいて確認できた。新生骨形成の状態について非照射群では抜歯窩底部から僅かに形成を認めたのに対して、Diode群では抜歯窩底部から抜歯窩中間を満たす新生骨の存在と抜歯窩の中層～浅層を満たす器質化を認めた。さらにCO₂群では抜歯窩底部だけでなく抜歯窩中層～浅層にかけて新生骨の形成を認めた。



<抜歯後7日目>

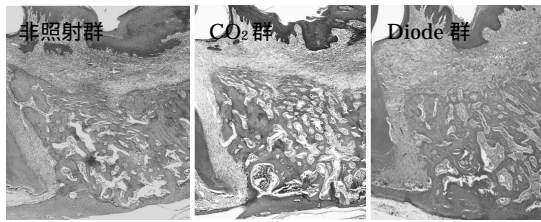
非照射群において破骨細胞様細胞による骨吸収と抜歯窩周囲からの骨形成が同時に進行していたのに対して、レーザー照射2群では炭化層が消失し破骨細胞様細胞がほとんど認められなかった。一方、新生骨形成についてDiode群では抜歯窩底部～浅層付近まで認めたが、CO₂群は抜歯窩底部からだけでなく抜歯窩浅層～中層にかけて架橋状の新生骨形成も認めた。さらにレーザー照射2群間ではCO₂群の方がDiode群と比較して骨梁幅

も大きく、密であった。



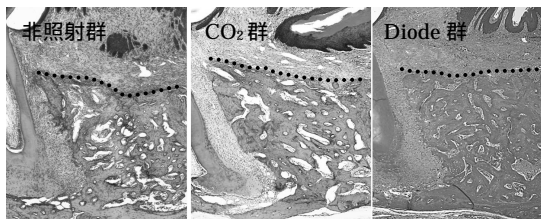
< 抜歯後 10 日目 >

3 群すべてにおいて抜歯窩内が新生骨で満たされ、骨髄中および骨梁周囲には多くの細胞の存在が認められた。しかし、非照射群は骨髄の領域が広く未成熟であった。



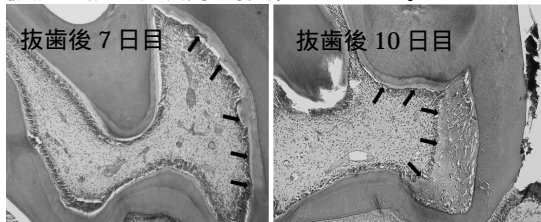
< 抜歯後 21 日目 >

3 群すべてにおいて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、非照射群では抜歯窩の歯槽骨頂中央部に皿状の陥凹が確認できたのに対して、レーザー照射 2 群はほとんど平坦で陥凹はなかった。



< レーザーの誤照射による隣接歯の影響 >

抜歯窩に炭酸ガスレーザーを照射する際、隣接歯（上顎左側第二臼歯）への誤照射によりエナメル質および象牙質に炭化や実質欠損等の器質の変化を認めなかったものの、歯髄腔に病理組織学的変化が生じた。

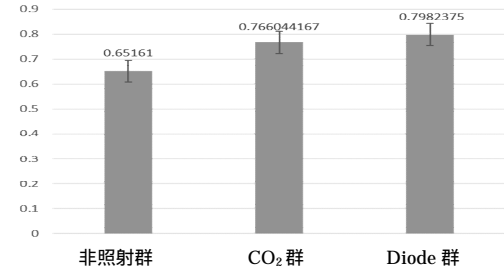


抜歯後 7 日目では歯髄組織中に炎症性細胞の浸潤や血管拡張等の炎症所見はなかったが僅かに血管の充血を認めた。しかし第一臼歯の抜歯窩への炭酸ガスレーザー照射側に面した近心側の象牙質歯髄面に沿った層状の修復象牙質が出現した。抜歯後 10 日目でも 7 日目と同様の組織的变化であるが、修復象牙質の形成が歯髄腔中央に向かって不規則な形状を呈し、広範囲に及んでいた。

[骨形態計測学的解析]

抜歯後 21 日目における抜歯後の歯槽骨頂の高さの指数 ($=hB/hA$) は非照射群で 0.652 ± 0.079 に比べ、CO₂ 群 0.766 ± 0.039 と Diode

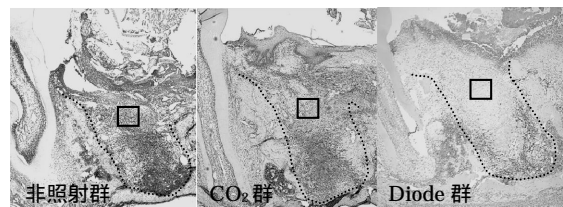
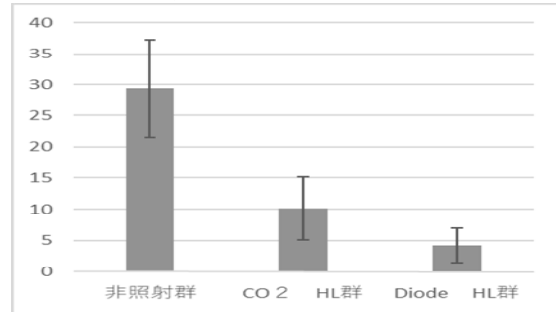
群 0.798 ± 0.036 は統計学的に有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。



[免疫組織学的解析]

< SMA 陽性細胞数 >

一般的に抜歯窩において癒痕組織形成に関わる筋線維芽細胞 (SMA 陽性細胞) の発現が抜歯窩創傷治癒過程早期の肉芽組織期 (ラットでは 3 日目前後) に認められる傾向が解かり、本研究での発現数は非照射群では 29.389 ± 7.846 個に対して CO₂ 群 10.130 ± 5.019 個、Diode 群 4.194 ± 2.733 個 ($P < 0.05$) とレーザー照射群の方が有意に細胞発現の減少を呈した。



また SMA 陽性細胞は非照射群では抜歯窩内全体から抜歯窩粘膜浅層付近まですべての領域で発現を認めたのに対して、CO₂ 群では抜歯窩粘膜表層 ~ 抜歯窩浅層までは発現が非常に少なく、Diode 群においては抜歯窩深層付近まで発現を認めなかった。

[まとめ]

臨床手技に準じて抜歯後の炭酸ガスレーザーまたは半導体レーザーの照射により抜歯窩の創傷治癒の早期の段階で新生骨の形成と骨梁の成熟を認めた。しかし、抜歯窩の新生骨の形態は両レーザーで異なるものの、また抜歯窩粘膜の癒痕収縮も抑制され、粘膜の陥凹が少なく、歯槽骨頂も高く維持できた。

以上より抜歯後のレーザー照射は抜歯窩の創傷治癒の促進と歯槽骨の可及的な温存にとって有効であることが示唆された。

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 1 件)

大郷友規、大郷英里奈、福岡宏士、石川昌嗣、柿本和俊、高橋一也、小正裕

- ・ラット抜歯窩の創傷治癒を目的とした炭酸ガスレーザー照射による隣接歯への影響
- ・日本レーザー歯学会誌 査読；有
- ・第 27 巻 第 3 号 63 - 70 頁 2016 年

〔学会発表〕(計 1 件)

大郷友規、大郷英里奈、石川昌嗣、福岡宏士、柿本和俊、高橋一也、小正裕

- ・ラット抜歯窩創傷治癒を目的とした炭酸ガスレーザー照射による隣接歯への影響
- ・第 28 回日本レーザー歯学会総会学術大会
- ・2016 年 7 月 16 日 愛知県名古屋市 ウィンクあいち (愛知県産業労働センター)

6 . 研究組織

- (1)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