

令和元年6月3日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11561

研究課題名(和文)骨細胞の機能を利用したレーザー刺激による顎骨再生医療の開発

研究課題名(英文) Development of regeneration therapy of jawbone using osteocyte functions controlled by laser irradiation

研究代表者

横瀬 敏志 (Yokose, Satoshi)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：90245803

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨組織において低出力のレーザー(LLLT)照射をして、骨細胞の機能をコントロールすることにより骨形成を促進させることを目的に実験を行った。閉経後骨粗鬆症のモデル動物として卵巣摘出(OVX)ラットと正常(Sham)ラットを用いて、脛骨にインプラントを埋入しその後半導体レーザーを低出力で照射した。その結果、OVX, Shamラットともにレーザー照射したインプラントの周囲には骨形成が促進され、非照射に比較して有意に骨形成が誘導できた。これら結果は半導体レーザーが骨細胞に作用して骨形成を誘導していることを示している。さらに、閉経後骨粗鬆症患者の骨誘導にもレーザー照射が有効であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人生100歳時代をむかえる最中、咀嚼機能を維持することは重要な課題である。このためにはインプラントは有効な咬合機能を回復させる手段である。同時に超高齢社会では骨粗鬆症患者に対するインプラント治療も同時に増加する。そのためにインプラント治療を早期に確実に成功させるために骨形成を誘導する方法は多く開発されている。今回検証したレーザー治療は低侵襲性の治療であり、副作用が少ないことが考えられる。LLLT作用が骨粗鬆症の骨組織でも骨を誘導でき、インプラント治療に応用可能であることが示された。本研究結果は今後の高齢者歯科治療の発展にも貢献でき社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to examine the effects of low reactive level laser therapy (LLLT) of diode laser on bone formation controlled by osteocytes. The tibiae from ovariectomized (OVX) and control (Sham) rats were received small implant treatment, and after that LLLT of diode laser irradiated to the tibiae and analyzed bone formation around the implants. The LLLT induced larger amount of bone formation of tibiae than no irradiation. In addition, LLLT induced bone formation in not only OVX rats, but also in Sham rats. These results indicated that LLLT can induce the bone formation, and suggested that LLLT can be applied for the bone regeneration under the estrogen deficiency.

研究分野：歯科保存治療

キーワード：Laser インプラント 閉経後骨粗鬆症 骨形成 ラット

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨組織は機械的刺激に対して敏感に反応する組織であり、その刺激受容体となっているのが骨細胞であることが知られている。骨細胞を通して骨形成を促進させたり、石灰化を亢進させたりすることは骨再生療法にとって重要な因子となる。顎骨においても咬合機能の回復には顎の骨組織の再生が基本となる。特にインプラント治療は超高齢社会において益々需要が増えることは必須であり、骨再生とインプラント治療が咬合の回復の中心となることが予想される。そこで本研究は低侵襲であるレーザー刺激に着目して、骨細胞に作用させて骨再生療法を行い、インプラント治療への応用が可能であるかを検証するための基礎実験を計画した。

2. 研究の目的

骨組織に対する再生療法にメカニカルストレスを応用することは有用な方法であることは知られており、そのカギを握るのが骨細胞であることが確認されている。また、これまでに我々はメカニカルストレスと同様な骨形成作用がレーザー照射刺激にも見られることを見出してきた。そこで本研究の目的は歯科領域で重要な咬合とインプラントに着目し、骨細胞の機能を利用してインプラント治療に重要な顎骨の再生にレーザー刺激が応用できるかを検証することである。さらに今後増加することが予想される高齢者でのインプラント治療を想定し、骨粗鬆モデル動物を使用してレーザーのインプラント治療への応用性を調べた。

3. 研究の方法

実験動物および飼育方法

本研究は明海大学動物実験倫理委員会の承認(A1729)を得て、ガイドラインに従って行った。生後 10 週齢の雌性 SD(Sprague-Dawley)ラット(日本クレア, 東京, 日本)を 60 匹使用した。動物は恒温恒湿に保たれた飼育室で、固形飼料(MF, オリエンタル酵母)および蒸留水を自由に摂取させ、12 時間サイクルで点消灯する条件で飼育した。

実験動物の作製

10 週齢の雌性ラット 60 匹にイソフルラン(エスカイン, ファイザー, USA)による吸入麻酔およびペントバルビタール(ソムノペンチル, 共立製薬)の腹腔内投与(1 μ L/g)により全身麻酔を施行した。30 匹は後背部腰椎周囲の剃毛, 70%エタノールによる消毒を行い、皮膚および筋層を切開し卵巣を露出後、卵管の結紮および切断により両側の卵巣を摘出し、筋層および皮膚の縫合を行い、OVX 群とした。また、卵巣摘出を行わない擬似手術を行った 30 匹を Sham 群とした。

インプラント埋入

術後 2 週間飼育後、各群それぞれのラットに上記同様の麻酔を施行し、両側脛骨を露出させ、脛骨遠位骨端より 15mm 近心側の位置に歯科用スチールラウンドバー(1.5mm)を用いて注水下で骨髄穿孔を行い、滅菌された純チタン製スクリュータイプインプラント(全長 2mm, スレッド部の直径 1.4mm, ピッチ 0.6mm, 表面性状は機械加工面の純チタン製, 西村金属, 福井, 日本)を徒手的に埋入した。

半導体レーザー照射

OVX 群および Sham 群から無作為にラットを各 15 匹選び、インプラント埋入荷後に半導体レーザー(OPELASER FILIO, ヨシダ, 東京, 日本)を波長 808nm, 出力 2.0W, 照

照射時間を 60 秒, 照射径 24.8mm, 連続波, インプラント埋入部位から照射口までの距離を 50mm, 総エネルギー量を 19.51J/cm² の照射条件で 1 回の照射を行い, 2, 3, 4 週間飼育を行った。なおレーザー未照射の動物群を対称群とした。

デジタルエックス線撮影及びトルク値測定

レーザー照射後 2, 3, 4 週目に脛骨採取を行い, デジタルエックス線画像処理装置(コンピュータ, ヨシダ)を用いて, 管電流 0.8mA, 管電圧 60kV の条件で撮影を行った。エックス線撮影後, インプラント体の引き抜き試験を実施した。除去トルク値測定には, Tohnichi Torque driver FTD2-S (FTD2-S, 東日製作所, 東京, 日本)を使用し, 固定された脛骨からインプラント体を反時計回転させ, オッセオインテグレーションが破壊された最大トルク値を記録した。

切片作製および H-E 染色

脛骨を 4 週目の 10%中性緩衝ホルマリン(和光純薬, 東京, 日本)にて 24 時間固定し, 10%ギ酸クエン酸ナトリウム(和光純薬)にて 5 日間 4℃ で脱灰を行った。脱灰完了後, エタノール系列(和光純薬)にて脱水後, クリアプラス(ファルマ, 東京, 日本)で透徹し, パラフィン(TissuePrep, Fisher Scientific, Hudson, USA)に包埋し, 4 μm の連続切片を作製した。一般染色としてヘマトキシリンエオジン染色(以下 H-E 染色)を適法に従い実施した。

骨形態計測

デジタルカメラ付き光学顕微鏡(BX41, オリンパス, 東京, 日本)で切片画像を取り込み, 画像解析ソフト ImageJ(NIH, Bethesda, MD, USA)を用いて, 骨髄穿孔させた範囲を単位面積(Tissue Area; TA)とし, 新生骨面積(Bone Area; BA)の割合(Bone Area / Tissue Area ; BA/TA %)を計測した。

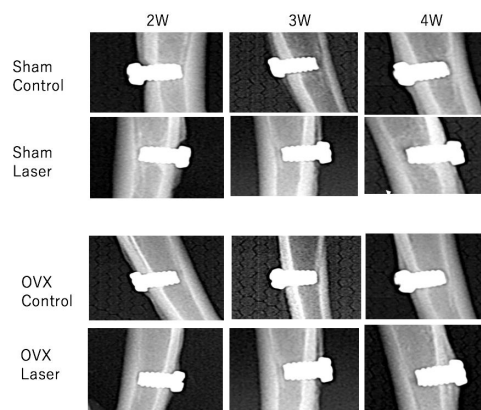
統計解析

トルク値および骨形態計測の結果に対して統計学的解析を行い, 2 群間比較には Mann-Whitney *U*-test を, 3 群間以上の比較には Kruskal-Wallis *H*-test 後, 多重比較に Bonferroni 補正 Mann-Whitney *U*-test を用い, 結果は平均 ± 標準偏差(SD)で示し, 5%以下の危険率で有意差を検定した。

4. 研究成果

デジタルエックス線写真所見

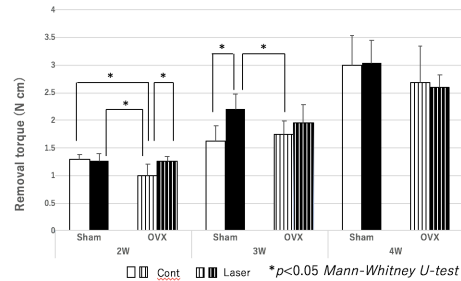
インプラント体周囲に形成された骨量を観察するため, デジタルエックス線写真撮影を行った。インプラント埋入後 2 週間後のエックス線像では, Sham レーザー照射群においてインプラント体周囲に骨様不透過像が認められたが, 他群においては認められなかった。次に, 3 週間後の Sham 群ではインプラント体周囲に明瞭な骨様不透過



像が認められ、OVX 群においてもインプラント体周囲に骨様不透過像が認められた。4 週間後では全ての群でインプラント体周囲に明瞭な骨様不透過像が認められ、特に Sham レーザー照射群でインプラント体周囲骨髓腔内に広がる骨様不透過像が認められた。

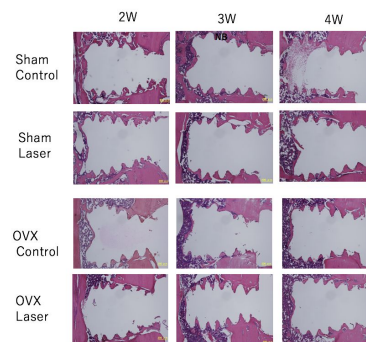
除去トルク値測定

オッセオインテグレーションの程度を評価するため、インプラント体を除去する際に発生するトルク値を測定した。埋入 2 週間後の平均除去トルク値は Sham 対称群 1.3 ± 0.08 Ncm, Sham レーザー群 1.27 ± 0.14 Ncm, OVX 対称群 1.0 ± 0.2 Ncm, OVX レーザー照射群 1.26 ± 0.09 Ncm であり、Sham 対称群と OVX 対称群, Sham レーザー群と OVX 対称群, OVX 対称群と OVX レーザー照射群の間に有意差が認められた。埋入 3 週間後の測定値は、Sham 対称群 1.62 ± 0.28 Ncm, Sham レーザー群 2.2 ± 0.27 Ncm, OVX 対称群 1.75 ± 0.23 Ncm, OVX レーザー照射群 1.95 ± 0.34 Ncm を示し、Sham 対称群と Sham レーザー群, Sham レーザー群と OVX 対称群の間に有意差が認められた。埋入 4 週間後の測定値は、Sham 対称群 3.0 ± 0.53 Ncm, Sham レーザー群 3.03 ± 0.41 Ncm, OVX 対称群 2.68 ± 0.66 Ncm, OVX レーザー照射群 2.6 ± 0.22 Ncm を示し、群間内の有意差は認められなかった。



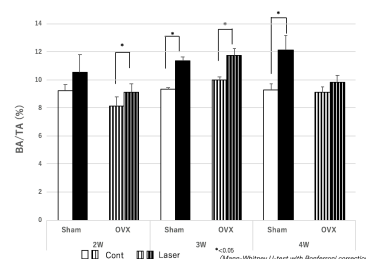
H-E 染色所見

埋入後 2 週後では、Sham レーザー群でインプラント体周囲に連続した新生骨の形成が認められた。OVX 群ではどちらもインプラント体周囲に新生骨の断片が認められるが、新生骨の連続性は認められなかった。埋入後 3 週後では、全ての群でインプラント体周囲に連続した新生骨の形成が認められた。特に、Sham レーザー群および OVX レーザー群で形成された新生骨は、対称群と比較してその幅に厚みが認められた。埋入後 4 週後では、全ての群でインプラント体周囲に連続した新生骨の形成が認められた。インプラント体周囲に形成された新生骨内に埋入された骨細胞を認め、皮質骨とインプラント体周囲新生骨との連続性を認めた。



骨形態計測

インプラント体周囲に形成された新生骨量を評価するため、骨形態計測を行った。埋入 2 週間後の新生骨面積は、Sham 対称群 $9.24 \pm 0.41\%$, Sham レーザー群 $10.53 \pm 1.26\%$, OVX 対称群 $8.11 \pm 0.66\%$, OVX レーザー照射群 $9.13 \pm 0.59\%$ であり、OVX 対称群と OVX レーザー照射群の間に有意差が認められた。埋入 3 週間後は、Sham 対称群 9.33



±0.12% , Sham レーザー群 11.35 ±0.27% , OVX 対称群 10.01 ±0.19% , OVX レーザー照射群 11.72 ±0.52% を示し , Sham 対称群と Sham レーザー群 , OVX 対称群と OVX レーザー照射群との間に有意差が認められた . 埋入 4 週間後は , Sham 対称群 9.29 ±0.4% , Sham レーザー群 12.11 ±1.04% , OVX 対称群 9.12 ±0.39% , OVX レーザー照射群 9.83 ±0.47% を示し , Sham 対称群と Sham レーザー群の間に有意差が認められた .

結論

以上のことから半導体レーザーは正常及びエストロゲン欠乏状態の骨組織のインプラント治療に対して骨形成誘導能を有し、超高齢者の骨再療法に有効である可能性が示された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1 横瀬敏志、山崎崇秀、上田堯之、門倉弘志、増田宜子：骨代謝におけるレーザーの作用
大阪インプラント研究会、Vol.32, 7-13, 2018.

2 Satoshi Yokose, Perry R Klokkevold, Henry H Takei, Hiroshi Kadokura, Tesuya Kikui, Yasushi Hibino, Hirotaka Shigeta, Hiroshi Nakajima, Hiroshi Kawazu: Effects of surface microtopography of titanium disks on cell proliferation and differentiation of osteoblast-like cells isolated from rat calvariae. Dental Material Journal, 37: 272-277, 2018.

3 門倉弘志、山崎崇秀、上田堯之、日下洋平、横瀬敏志：ラット頭蓋骨由来初代培養細胞系の骨細胞様細胞分化について 日歯科保存誌、60:128-134, 2017.

〔学会発表〕(計 2 件)

1 Hidetaka Yamazaki, Hiroshi Kadokura, Takayuki Ueda, Satoshi Yokose:
Effects of Diode Laser Irradiation on Bone Healing in Rat Tibiae. 17th World Federation for Laser Dentistry. Nagoya, Japan, July, 2016.

1 山崎崇秀、上田堯之、加藤邑佳、門倉弘志、横瀬敏志：OVX ラットにおけるオッセオインテグレーションに及ぼす半導体レーザー照射の影響 第 30 回日本レーザー歯学会、東京、2018 年 10 月

〔図書〕(計 1 件)

横瀬敏志 監著：Nd:YAG Laser Book 基礎と最新臨床応用 インサイシブジャパン株式会社、デンタルダイアモンド社、東京 2019

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：山崎崇秀

ローマ字氏名：Yamazaki, Takahide

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。