原 著

低出力レーザー照射による硬組織形成促進効果
に関する実験的研究
➤照射出力による影響について◀

目 澤 修 二 吉 田 清 司 勝 呂 尚
武 市 収 小 森 規 雄

日本大学歯学部保存学教室歯内療法学講座

(主任 : 小野瀬英雄教授)

(受理 : 平成 12 年 7 月 12 日)

In-vivo Study of Low-Power Laser Irradiation
On New Bone Formation of Rat Calvaria Defects
➤Influences of Different Power at Laser Irradiation◀

Shuji MEZAWA, Kiyoshi YOSHIDA, Hisashi SUGURO,
Osamu TAKEICHI and Norio KOMORI

Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry

(Chief : Prof. Hideo ONOSE)

(Accepted for Publication : July 12, 2000)

Abstract : Many low-power laser apparatuses have been developed, and their efficiencies have been reported for treatment of dentinal hypersensitivity or temporomandibularis. In addition, several reports indicated the application of a low-power laser. The purpose of this study was to investigate the effect of low-power laser irradiation on bone remodeling using rat calvaria with an artificially formed defect. Artificial bone defects of 4 mm in diameter were prepared by a round bur with a low-speed dental engine.

Ga-Al-As laser (830nm, 30mW, or 80mW) irradiation was applied to bone defects in right calvaria, as an experimental site, for 10 minutes once a day, and this procedure was carried out up to 1, 2, 3, 4, 5 or 6 weeks. Bone defects in left calvaria, without laser irradiation, were used as a non-irradiation site. Results obtained were as follows.

New bone formation was enhanced with 30mW laser irradiation. Particularly, 4-week irradiation showed the highest amount of new bone formation, compared with the control groups.

1. New bone formation was also enhanced with 80mW laser irradiation. Particularly, from 2-week to 4-week irradiation showed a significant difference between experimental groups, and control groups in the amount of new bone.

2. Comparing 30mW and 80mW irradiation, 80mW groups showed more new bone formation than 30mW groups after 3-week laser irradiation. However, there was no significant difference between 30mW and 80mW groups after 4-week irradiation.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 12: 2~9, 2001 Reprint requests to Dr. MEZAWA)

Key words=Low-power Laser, Rat, Bone formation

キーワード=低出力レーザー, ラット, 硬組織形成

緒 言

レーザーの医療分野での応用は、これまでにCO₂レーザー、Nd:YAGレーザーなどの高出力レーザーによる病的組織の除去や切開・凝固への利用が多く報告されてきた。しかし、近年、低出力レーザーの生体組織に対する光刺激効果¹⁻³⁾が注目されるにつれ、とくに消炎、鎮痛、創傷治癒促進などの効果に関する報告⁴⁻⁸⁾が数多くなされている。

歯科領域における低出力レーザーの臨床応用に関しては、象牙質知覚過敏症、顎関節症などに対する消炎鎮痛効果や歯科矯正治療時における除痛効果、外傷など軟組織に対する創傷治癒促進効果が報告されており⁹⁻¹¹⁾、歯科臨床におけるレーザー治療の有用性が確認されている。一方、硬組織形成促進効果に対する低出力レーザー照射の影響についての報告は少なく、骨折の治癒促進や抜歯創創傷治癒促進^{12,13)}などに対して有効であることが報告されているが、それらのメカニズムについては、いまだ十分に解明されていない。

これら低出力レーザーに対する報告は、いずれも臨床治験報告が先行しており、その基礎的検討は必ずしも十分ではなく、そのため臨床における照射条件についても論拠に基づいたものはほとんどみられず、とくに、照射出力の違いによる硬組織形成促進効果については不明な点が多い。そこで今回著者らは、低出力レーザーが持つ硬組織形成促進効果に着目し、これを解明する一環として当教室の紺¹⁴⁾の報告に基づき、硬組織形成における基礎的検討を行った。すなわち、ラットの頭蓋骨に形成した人工的骨欠損に対し、今回新たに開発された照射出力可変型低出力半導体レーザー装置(DIOTRON M80, 長田電気工業)を用いて、異なる出力の低出力レーザー照射を行い、硬組織形成に与える影響について検討した。

材料および方法

1. レーザー照射装置

半導体レーザー照射装置: DIOTRON M80 (長田電気工業)を用いた。

この照射装置は半導体レーザーダイオード(Ga・Al・As)をレーザー媒体とし、出力10~80mWまで10mW間隔に可変可能な装置で、波長830nm、照射口直径0.6mmのレーザー光を連続波で照射するものである。なお、今回

用いた照射出力30mW、80mWの場合照射口端面でのパワー密度は、それぞれ0.11、0.28W/sec.である。

2. 実験動物

実験動物として7~8週齢のWistar系雄性ラット(体重約250g, 埼玉実験動物供給所)を用いた。飼育室は、室温23±2℃、湿度65±5%に保ち、人工照明により午前6時から午後6時まで明るく、残り12時間を暗くなるように設定した。ラットの飼育は、ラット・マウス用MF固形飼料(オリエンタル酵母)と水道水を自由に与えて1週間飼育後、実験に供し、術後も同様の管理下で飼育した。

3. 人工的骨欠損の作成

人工的骨欠損はDeporterら¹⁵⁾の方法に従って作成した。すなわち、ネンプタール麻酔下で頭蓋部の正中に沿って切開線を入れ、皮膚および骨膜を剥離し、頭頂骨に正中に対して左右対称になるよう、直径4mmの円形状人工的骨欠損を2個形成した(Fig. 1)。

骨欠損の位置は、Bregumaより正中矢状縫合に沿い5mm後方で、その位置から外側に向かい8mmの点に骨欠損の中心がくるように設定した。

骨欠損の形成は、滅菌生理食塩水の注水下で#5のラウンドバーを付けた電気エンジンの低速回転(2,000rpm)によって可及的に脳硬膜を損傷しないように留意して行い、その後、ハンドカッティングインスツルメントを用いて人工的骨欠損辺縁の形態を可及的に断端が直角になるように修正した。骨欠損形成後、皮膚を旧位に戻し、骨欠損部の位置が皮膚上から確認できるよう、欠損部周囲の皮膚にタトゥーイングを施した。

なお、ラットは1条件につき3匹を用いた。

4. 実験方法

1) 半導体レーザーの照射条件

本実験に用いた出力は30mWおよび80mW(以後30mW、80mWと称する)である。

照射はラットを固定器に固定した後、照射チップの先端を骨欠損上に施したタトゥーイング上の皮膚に直接接触させ、可及的に骨欠損部に垂直になるような角度で行った。

照射条件は1日1回とし、毎日定時刻に10分間連続波で照射した。実験は術直後を含め1週間、2週間、3週間、4週間、5週間および6週間にわたり上記の条件で行った。

レーザー照射は、全ての照射群で右側に形成された人工的骨欠損に対して行い、これを照射群照射側(以後、照射

Fig. 1 Rat carvaria with an artificially formed defects

$B1+B2/A \times 100 = \text{area of bone, ratio (\%)}$

A: total defect area B1, B2: area of new bone

Fig. 2 New bone formed as percentage of defect area¹⁵⁾

側と称する)とした。また、左側の人工的骨欠損部にはレーザー照射は行わず、これを照射群非照射側(以後、非照射側と称する)とした。また、人工的骨欠損部を形成したのみで両側いずれにもレーザー照射を行わなかったものをコントロール群(以後、コントロール群と称する)とした。

2) 新生硬組織形成の評価法

各実験群ともに所定の条件でレーザーを照射したのち屠殺し、頭蓋骨を摘出した。10%中性ホルマリン緩衝液にて固定し、K-CX 脱灰液で24時間脱灰した後、通法に従いパラフィン包埋した。正中方向に沿って、厚さ6 μ mの連続切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン重染色を施し、試料とした。

新生硬組織形成の評価は、Deporterらの方法¹⁵⁾に従った。すなわち、万能投影機を用いて50倍に拡大し、既存の骨形態、人工的骨欠損部(defect area)および新生硬組織部(area of new bone)に分けてトレースした。人工的欠損部は欠損部左右の既存の骨辺縁をフリーハンドで結び、その範囲を人工的骨欠損部とし、また新生硬組織部分も同様に拡大像上に描いてトレースし、既存骨の断端から新生した部分とした。

次いで、トレース上の人工的骨欠損部と新生硬組織部の面積をエリアカーブメータ(牛方商会, X-PLAN360dII+)を用いて求め、人工的骨欠損部と、新生硬組織の面積とか

ら新生硬組織形成の割合(%)を算定した(Fig. 2)。

計測に用いた切片は、1試料あたり人工的骨欠損部中央部に相当する人工的骨欠損部断端の最大幅径部と、その部分の左右に隣接する標本の計3枚であり、それぞれ新生硬組織を算定したのち、これらを平均し1試料の成績とした。また、各照射期間における出力条件間の比較はStudent-tを用いた。

3) 組織学的形態観察

各試料とも光学顕微鏡($\times 200$)を用いて硬組織形成の観察を行った(Fig. 6~8)。

成 績

半導体レーザー各照射群(30, 80mW)およびコントロール群(両側非照射群)の成績をTable 1~3およびFig. 3~5に示す。

1. 30mW 照射群について

照射群照射側では1週後で10.33%, 2週後で16.66%, 3週後で35.59%, 4週後で66.66%, 5週後で74.30%, 6週後で77.04%と経時的に硬組織形成量が増加している。照射群非照射側およびコントロール群においても経時的増加が認められる。

4週後で照射側と非照射側および照射側とコントロール群との間で有意差($p \leq 0.05$)が認められた。

2. 80mW 照射群について

照射群照射側では1週後で7.44%, 3週後で18.47%, 3週後で45.79%, 5週後で76.22%, 6週後で81.66%と経時的に形成量が増加している。照射群非照射側およびコントロール群においても経時的な増加が認められる。

照射側と非照射側およびコントロール群では、2週後で照射側とコントロール群との間、3週後および4週後で照射側と非照射側および照射側とコントロール群との間で有意差($p \leq 0.05$)を認めた。

3. コントロール群および非照射群について

コントロール群は、1週後から5.55%, 11.62%, 34.04%, 49.81%, 72.94%, 6週目になると77.24%と経時的に上昇するのに対して、非照射群では30mWで1週目から5.37%, 10.96%, 33.19%, 49.64%, 72.03%, 6週目には74.79%, 80mWでは1週目から5.94%, 13.21%, 34.91%, 46.98%, 73.43%, 6週目には76.86%となり各々の条件の間に有意な差($p \leq 0.05$)は認められなかった。

4. 組織学的形態観察

3週目、4週目、6週目の各照射条件照射群およびコントロール群の代表的な組織像をFig. 6~8に示す。

両側骨断端より扁平骨で認められるような膜性骨化が認められる。

Fig. 3 30mW Laser Irradiation

Fig. 4 80mW Laser Irradiation

Fig. 5 30, 80mW Laser Irradiation

考 察

低出力レーザー応用の報告は、1968年に Mester^{16,17)}が 1 J/cm^2 という弱いルビーレーザーを、脱毛したマウスに照射し、発毛の促進されたことを認めたことに始まる。Mester はその後、潰瘍（外傷、熱傷、放射線潰瘍、糖尿

Fig. 6 3 Week-Laser after Irradiation

病、老人性あるいは術後の皮膚欠損など）60 症例以上に He-Ne レーザー（出力 20mW エネルギー密度 4 J/cm^2 ）を週 2 回照射し、全例の約 2/3 にあたる 45 例を平均 6 週間で治癒させたと報告している。このような軟組織に対する創傷治癒促進作用のほか、消炎作用、鎮痛作用に関する多くの報告がされている。

一方、Trelles と Mayayo¹⁸⁾ は骨組織に対する低出力レーザーの応用について検討を加えた。すなわち、骨折、骨移植部および病的に破壊、吸収された歯槽骨に対して、ソフトレーザーを照射することにより、骨膜、新生骨の増加と X 線写真上での骨折線の早期消失が認められると報告している。

しかし、一定の照射条件を用いて組織標本や X 線写真の観察を行い、硬組織形成に対する低出力レーザーの有効性について報告しているが、1 回の照射時間あるいは照射時期、照射出力などの照射条件を変えて検討を加えていないため、至適条件についてはいまだ不明である。

低出力レーザーの有効な照射期間および照射時間について

Fig. 7 4 Week-Laser after Irradiation

ては、これまで必ずしも適切な規定がなされておらず、機種、疾病によって様々である。本研究では、Trelles ら¹⁸⁾ がラットの骨折に対して有効な照射時間が 10 分であると報告していることや、教室の紺の研究に基づき、10 分の照射時間を設定した。

本研究では、1 週間照射した群においても、30、80mW とともにコントロール群との間に有意な差は認められなかった。これは、外科的侵襲を受けた部位は炎症を惹起し、それが消退した後、肉芽を形成するのに 1 週間程度¹⁹⁾を要することが知られており、そのため 1 週間という短い期間では、レーザー照射によって硬組織の形成を認めるまでには至らなかったものと考えられた。しかし、2 週目になると 80mW 照射群とコントロール群との間に有意差が認められ、とくに 3 週目と 4 週目では、経時的に新生硬組織の割合は増加した。加えて、3 週目では 30mW 照射群においてもコントロール群と比較して有意な硬組織新生を認めた。

4 週間照射群における新生硬組織の割合は 72.79% と大きく、コントロール群に比べ、有意に大きくなったものの、

Fig. 8 6 Week-Laser after Irradiation

30mW 照射群も 66.66% と増大し、有意な差が認められなかった。また、5 週目、6 週目と経過するのに伴い、コントロール群も増大する傾向にあるため、有意差が認められなかった。このことから、80mW のレーザー照射は、術後 3~4 週目までの治癒を促進する効果を有することが示唆された。さらに照射期間を 6 週と延長すると、すべての条件において 70% 以上の新生硬組織形成量が認められた。これは、骨折による循環障害により、骨断端部では壊死が生じるため、骨髓循環再生までは周囲の軟組織からの骨膜性毛細血管からの血行が重要とされており¹⁹⁾、脈管の早期治癒が骨形成と密接な関係を持つことから、レーザー照射が軟組織に対して何らかの影響を与えているものと考えられるが、レーザー照射表層の皮膚への影響は認められなかった。

教室の紺の報告¹⁴⁾では、レーザー装置の違いにかかわらず、5 週目には 100% の硬組織形成を認めたと報告している。そこで本研究では頭蓋骨に形成した人工的骨欠損を紺が作成した大きさより直径を 1 mm 拡大し、完全修復まで

Table 1 30mW Lase Irradiation

week	Irradiation (R)	Irradiation (L)	Control
1	10.03(3.24)	5.37(1.10)	5.55(3.06)
2	16.66(2.57)	10.96(3.14)	11.62(2.77)
3	35.59(3.41)	33.19(2.79)	34.04(4.01)
4	66.66(4.93)	49.64(2.62)	49.81(3.99)

5	74.30(4.59)	72.03(3.25)	72.94(2.77)
6	77.04(3.10)	74.79(5.25)	77.24(3.92)

N=3

unit: new bone (%), mean (SD)

*: Student-*t* ($p \leq 0.05$)

Table 2 80mW Lase Irradiation

week	Irradiation (R)	Irradiation (L)	Control
1	7.44(1.64)	5.94(3.64)	5.55(3.06)
2	18.47(3.16)	13.21(2.88)	11.62(2.77)

3	45.79(2.91)	34.91(4.60)	34.04(4.01)

4	72.79(4.83)	46.98(5.86)	49.81(3.99)

5	76.22(3.64)	73.43(2.45)	72.94(2.77)
6	81.66(3.24)	76.86(1.66)	77.24(3.92)

N=3

unit: new bone (%), mean (SD)

*: Student-*t* ($p \leq 0.05$)

の硬組織形成率の推移を検討することを目的としたため、6週目に100%の硬組織形成を得られなかったのではないかと考えられた。

レーザー光の組織浸透性は、発振される波長あるいは組織固有の反射率および吸収率などに影響される。またレーザーにより与えられた刺激が照射された局所のみでなく遠隔の組織にも作用することが報告されているが、紺の報告と同様に本研究でも非照射側ではコントロール群と有意差が認められず、レーザー照射は頭蓋骨の正中を越えて離れた位置の骨欠損部には影響を与えないことが認められた。

以上のことから、低出力レーザー照射により、骨欠損部

に硬組織形成を促進することが推察された。とくにその促進効果が顕著に現れるのは、出力の違いにより形成率は異なるものの、照射後2~4週の間であり、その促進効果は出力の高い80mWの方が術後早期に治癒効果を認めることが明らかとなった。

川戸らの報告²⁰⁾では、80mWと140mWを比較、検討しているが、140mW照射群ではコントロール群と比較して硬組織形成が抑制されたとしている。従って、低出力レーザーの出力の違いが治癒過程における消炎効果、硬組織形成因子の誘導に影響しているものと考えられた。なお、その作用は12mm離れた骨欠損部に影響を与えなかった。

Table 3 30, 80mW Lase Irradiation

week	30mW Irradiation	80mW Irradiation	Control
1	10.03(3.24)	7.44(1.64)	5.55(3.06)
2	16.66(2.57)	18.47(3.16)	11.62(2.77)
3	35.59(3.41)	45.79(2.91)	34.04(4.01)
4	66.66(4.93)	72.79(4.83)	49.81(3.99)
5	74.30(4.59)	76.22(3.64)	72.94(2.77)
6	77.04(3.10)	81.66(3.24)	77.24(3.92)

N=3

unit: new bone (%), mean (SD)

*: Student-t ($P \leq 0.05$)

これらのことから、骨欠損部の治癒促進には 80mW 低出力レーザーを 10 分間局所へ直接照射することが有効であることが示唆された。

すでに、低出力レーザーの生物学的作用機序としてコラーゲンの新生促進、組織酵素活性の亢進、血管新生の促進、細胞の活性化、免疫能の向上等が報告されており²¹⁻²³⁾、かつ軟組織の創傷治癒促進作用も報告されているが、その作用機序については未だ不明な点も多い。

今後は、*in vitro* におけるレーザー照射による各種サイトカインの発現および影響を解明するため、検討が必要であると思われる。

結 論

低出力レーザー照射による硬組織形成促進効果を検討するため、人工的骨欠損を有するラット頭蓋骨に低出力半導体レーザーを照射し、経時的に硬組織形成量を測定した結果、以下の結論を得た。

1. 30mW 照射群では硬組織形成促進効果が認められ、とくに照射 4 週目でコントロール群と比較して、新生硬組織形成量は有意に増大した。

2. 80mW 照射群でも硬組織形成促進効果が認められ、とくに照射 2 週目から 4 週目にかけてコントロール群と比較して硬組織形成量に有意な差が認められた。

3. 30mW 照射群と 80mW 照射群とを比較したところ、3 週目では 80mW 照射群が硬組織形成量に有意な差を示したが、4 週目になると有意差は認められなくなった。

文 献

- 1) 渥美和彦：レーザーの医療への応用。別冊サイエンス 88, 日経サイエンス, 144-151, 1989.
- 2) 桜井靖久, 菊地 真：レーザー光の生体への作用機序。レーザー医学, 1 版, 中山書店, 27-40, 1980.
- 3) 渥美和彦：レーザー光の生体への影響。レーザー歯学, 1 版, 医歯薬出版, 39-52, 1986.
- 4) 齋藤 毅, 目澤修二：低出力レーザーによる鎮痛と創傷治癒促進, オサダダイオトロン臨床。The Quintessence 別冊最新歯科用レーザー, 85-87, 1997.
- 5) A. Honmura, A. Ishii, M. Yanase, J. Obata, Haruki E: Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. Lasers Surg. Med., 13: 463-469, 1993.
- 6) J. Kubota, T. Ohshiro: The effects of diode laser low reactive-level laser therapy (LLLT) on flap survival in a rat model. Laser Therapy, 1: 127-133, 1989.
- 7) 柳瀬昌弘, 本村明江, 坂牧玲子, 小幡純一: Ga-Al-As Diode Laser の鎮痛, 抗炎症効果。日本レーザー医学会誌, 8: 207-208, 1987.
- 8) 河野 透, 葛西真一, 小谷裕美, 水戸廸郎, 齊藤孝成: 低出力レーザーの鎮痛効果に関する臨床的ならびに基礎的研究。日本レーザー医学会誌, 10: 85-88, 1989.
- 9) 保地富夫: 低出力レーザーによる象牙質疼痛抑制効果。岐阜学誌, 17: 534-546, 1990.
- 10) 清水典佳: 低出力レーザーの矯正臨床応用, 矯正治療中の疼痛軽減及び治療期間の短縮を目指して。日大口腔科学, 23: 381-382, 1997.
- 11) C. Zhang, K. Matsumoto, Y. Kimura, T. Harashima, F.H. Takeda and H. Zhou: Effects of CO₂ laser in treatment of cervical dentinal hypersensitivity. J. Endod., 24: 595-597, 1998.
- 12) T. Abe: Diode laser LLLT-enhanced bone fusion of femoral shaft fracture complicated by chronic osteomyelitis. Laser Therapy, 2: 175-178, 1990.

- 13) 篠原秀樹, 石井正倫, 黒須良玄, 石月 満, 曾沢勝夫, 加藤治文, 黒須篤平, 早田義博: 皮膚・組織欠損, 火傷, 骨折等に対する低出力レーザーの臨床応用. 日本レーザー医学会誌, **10**: 73-76, 1989.
- 14) 紺 健一: 低出力レーザー照射による骨組織形成促進作用に関する実験的研究, とくに照射期間および照射時間による影響について. 日レ歯誌, **3**: 35-44, 1992.
- 15) D.A. Deporter, N. Komori, Thomas P.H., Amy S., Alan G., Paula H., Karen P.: Reconstituted bovine skin collagen enhances healing of bone wounds in the rat calvaria. *Calcif. Tissue Int.*, **42**: 321-325, 1988.
- 16) Mester, E.: Clinical results of wound-healing stimulation with laser and experimental studies of the action mechanism. *Laser surgery*, 190-213, 1980.
- 17) Mester, E.: Laser application in promoting of wound healing. *Laser in Medicine*, 83-95, 1980.
- 18) M.A. Trelles, E. Mayayo: Bone fracture consolidation faster with low-power laser. *Laser Surg. Med.*, **7**: 36-45, 1987.
- 19) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明: 骨の化学, 1 版, 医師薬出版, 東京, 212-221, 1985.
- 20) 川戸貴行, 小森規雄, 勝呂 尚, 目澤修二, 斎藤 毅: 低出力レーザー照射による硬組織形成促進作用に関する実験的研究, とくに異なる出力による影響について. 日レ歯誌 (抄録集), **10**: 84, 1999.
- 21) Yamada, K.: Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). *J. Jpn. Orthop. Assoc.*, **65**: 787-799, 1991.
- 22) K. Morimoto, H. Takagi, Y. Ozawa, N. Shimizu, T. Iwasawa and Y. Kozawa: Morphology of osteoblast-like cells irradiated by low-power laser. *Jpn. J. Oral Biol.*, **38**: 304-308, 1996.
- 23) S.R. Young, M. Dyson and P. Bolton: Effect of light on calcium uptake by macrophages. *Laser Therapy*, **2**: 53-56, 1990.