

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

芳山 昌典

論文題目

器官培養ラット下顎頭への低出力半導体レーザー光
照射の影響

I. 緒言

近年、創傷治癒の促進・疼痛の緩和などに対する低出力レーザー光照射療法 (Low reactive level laser therapy : LLLT) の有効性が報告され、その抗炎症作用・疼痛減少作用などの効果が注目されている。しかし LLLT については臨床応用が先行しており、その効果を客観的に評価することは困難と考えられ、顎関節症に対するレーザー光照射の効果についても基礎的検討は充分になされていないのが現状である。そこで本研究ではラットから摘出した下顎頭の器官培養を行い、血流等の影響を受けない状態で低出力半導体レーザー光照射を行い、下顎頭の軟骨細胞および下顎頭の成長に対する低出力半導体レーザー光の影響について組織学的に検索した。

II. 対象および方法

1. 実験動物

本実験には妊娠17日目のWister/STラットを用いた。安楽死を施した実験動物から胎児を摘出し、両側の下顎頭部を無菌的に摘出して実験に使用した。摘出した下顎頭は次のような4群 (n=5) に分けた。対照群：基本培地による器官培養のみ、F+L-群：基本培地にbFGFを添加した器官培養、F-L+群：基本培地による器官培養とレーザー光照射、F+L+群：基本培地にbFGFを添加した器官培養とレーザー光照射とした。

これらの下顎頭は 5%CO₂ インキュベーター下で 37°Cにて器官培養を行った。培養液には BGJb 培地に抗菌剤を加えて無血清の基本培地として用いた。

また、レーザー光照射の対照群として bFGF を加えた培養液および bFGF を加えない培養液を使用して器官培養を行った。培養液は 48 時間ごとに交換し、培養期間は 8 日間とした。

2. レーザー光照射

摘出した下顎頭に半導体レーザー（波長 633 nm、CW 発振（連続波発振））を用いてレーザー光照射を行った。照射条件は、照射出力 250 mW、照射距離 10 mm、照射時間 30 秒とし、照射野の直径が 5 mm となるように調整した。この照射条件では照射熱量 7.5 J、パワー密度 1.3 W/cm^2 となる。培養開始時にレーザー光照射を開始して以後は 24 時間の間隔で 4 日目までの計 5 回の照射を行った。本実験は愛知学院大学動物実験倫理委員会の承認を受け、ガイドラインに従って実施した（承認番号 AGUD No. 327）。

3. 組織学的検索

組織学的検索のために、前述の各群の下顎頭について培養開始時および培養 8 日目にホルマリンで固定した後、パラフィンに包埋して 3 μm の連続組織切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施して光学顕微鏡で観察し、組織学的に検索した。

4. 組織形態計測学的検索

HE 染色組織標本の画像に対して ImageJ を用いて表層+増殖層、分化層の厚さ、下顎頭の幅径・縦径および幅径/縦径比を計測して組織形態計測学的に検索した。

5. 免疫組織化学的検索

細胞増殖関連タンパクであるProliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) に対して免疫組織化学的検索を行った。

各群の下顎頭は培養開始時および培養8日目にホルマリン固定した後にパラフィンに包埋して3 μ mの連続組織切片（各下顎頭あたり5枚）を作製し、PCNA免疫組織化学染色を行った。

6. 統計学的解析

対照群、F+L-群、F-L+群、F+L+群の各群間における統計的な有意差の判定のため、統計学的解析には一元配置分散分析の後、Tukeyの多重比較検定を用いて検討し、危険率5%以下を有意とした

III. 結果

1. 組織学的検索 (H-E染色所見)

培養開始時のすべての群において、下顎頭の表層には線維芽細胞および膠原線維がみられ、その下層には増殖層、分化層、肥大層が順次認められた。表層では楕円形核を有する紡錘形の線維芽細胞がみられ、増殖層では類円形核をもつ細胞が密に認められた。分化層では楕円形核を有する扁平な軟骨細胞と軟骨基質が認められた。肥大層では楕円形から類円形の軟骨細胞が不規則にみられた。

2. 組織形態計測学的検索

培養8日の対照群の下顎頭では、培養開始時の下顎頭と比較して増殖層と分化層の厚さは減少し、細胞数は減少していた。また、肥大層は不規則になっていた。さらに、対照群とF+L-群の下顎頭では分化層の厚さは減少していたが、F+L-群では対照群と比較して表層、増殖層、分化層、肥大層の細胞配列は不規則になっていた。F-L+群およびF+L+群では下顎頭は対照群よりも大きくなり、分化層および肥大層は大きく、細胞数は増加していたが、表層、増殖層、分化層、肥大層の細胞配列は不規則になっていた。また、さらに、レーザー光を照射した両群共に下顎頭の幅径は対照群よりも大きく、軟骨細胞が多く認められた。下顎頭の大きさは、対照群、F+L-群、F-L+群、F+L+群の順に大きくなっており、また、F+L-群およびF-L+群では対照群とF+L+群の間隔的な組織学的所見が認められた。各群の表層+増殖層の厚さにあまり変化はみられなかったが、細胞数は減少していた。分化層の厚さはF+L+群が最も厚く、対照群、F+L-群、F-L+群、F+L+群の順に厚くなっていた。縦径ではF+L+群が最も大きく、F+L-群とF-L+群はほぼ同じで、対照群が最も小さかった。幅径において、F+L+群が最も大きく、対照群およびF+L-群と比較して有意な差が認められた。その大きさは、対照群、F+L-群、F-L+群、F+L+群の順に大きくなっていった。またF-L+群の幅径／縦径比は対照群と同様に培養開始時よりも大きい傾向がみられ、F+L-群、F+L+群では培養開始時とほぼ同等であった。

3. 免疫組織化学的検索

PCNA免疫組織化学を行い、細胞増殖について検討を行った。各群では増殖層および分化層にPCNA陽性細胞を認めた。また、F+L-群やF-L+群、F+L+群では肥大層にも陽性細胞が認められ、F-L+群、F+L+群では著明にみられた。対照群と比較してF-L+群、F+L+群では陽性細胞数が有意に増加していた。

IV. 考察

本研究では、血流等の影響を受けない状態でラットから摘出した下顎頭の器官培養を行い、その下顎頭の軟骨細胞および下顎頭の成長に対する低出力半導体レーザー光の影響について組織学的および組織形態計測学的に検索した。培養開始時と比較して培養8日の下顎頭では、分化層の厚さや縦径および幅径が小さくなっていた。しかし、比較対照として行ったbFGFを添加したF+L-群の結果では下顎頭は対照群よりも大きくなり、分化層および肥大層は大きい傾向が認められ、細胞数は増加していた。レーザー光照射のみを行ったF-L+群では対照群およびF+L-群よりも縦径および幅径、分化層および肥大層は大きい傾向が認められ、細胞数は増加していた。このことから、培養液へのbFGFの添加と比較して、レーザー光照射の方がより軟骨細胞を増殖させると考えられた。また、F+L+群では下顎頭は最も大きく、分化層および肥大層の細胞数も多かった。この結果は、レーザー光照射とbFGF添加が相乗効果として、より軟骨細胞の増殖活性を高めていることが示唆された。

本研究の環境での器官培養下顎頭において、低出力半導体レーザー光照射の影響は分化層および肥大層の軟骨細胞に強くみられた。これらのことから、低出力半導体レーザー光照射は、下顎頭における軟骨細胞の増殖活性および分化を高めることが示唆された。また、顎関節部の疾患に対して用いた際にも軟骨細胞の増殖や分化の促進などの効果が得られると考えられた。

V. 結論

以上の結果より、低出力半導体レーザー光照射（波長 633 nm）により下顎頭における細胞増殖は bFGF 添加と同等に促進された。また、低出力半導体レーザー光照射は、軟骨組織の増殖を起こす bFGF の添加よりも、器官培養した下顎頭の大きさを増大させることが判明した。さらに、その組織構築は正常であり、特に分化層および肥大層の細胞数が増加しており、下顎頭における軟骨細胞の増殖および分化の促進を認めた。