

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

本田 由馬

論文題目

低出力レーザー光による骨組織への創傷治癒促進効果

## I. 緒言

近年、Low reactive level laser therapy (LLLT) により消炎作用、創傷治癒促進作用などが期待できることが報告され、骨組織の創傷治癒においても骨形成の促進効果により骨の創傷治癒が促進することが報告されている。しかし、その消炎・鎮痛効果や創傷治癒の促進効果を定量化して客観的な評価が行われていない。そこで本研究では、低出力レーザーの一つである He-Ne レーザーを使用し、LLLT の創傷治癒に対する促進効果を検討することを目的としてラットの大腿骨に実験的に形成した骨欠損の治癒過程をモデルに用いて、欠損部の骨再生に対する LLLT の骨形成促進効果を実験動物用のマイクロ CT を用いた定量評価により検討した。

## II. 対象および方法

### 1. 実験動物

実験には 8 週令の雄性 SD ラットを用いた。

### 2. 実験創

骨欠損を形成するために、まず、術前に吸入麻酔を行った後、塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg、ミダゾラム 2.0 mg/kg、酒石酸ブトルファノール 2.5mg/kg の三種混合麻酔薬を腹腔内に投与した後、局所麻酔として塩酸リドカインを 0.5 ml 注射した。大腿骨の術野を剃毛して 70 %エタノールで清拭した後に No. 11 のメスを用いて長さ 20 mm の皮膚切開を行い、さらに筋の走行に沿って切開して大腿骨遠位端の表面を露出させた。その後、

左右両側大腿骨の遠心端から 10 mm の位置に、オートクレーブにより滅菌した直径 1.6 mm のラウンドタイプスチールバーを用いて滅菌生理食塩水を注水しながら骨髓にまで達する深さ約 2.4 mm の骨欠損を伴う創傷を形成した。その後、創傷部を滅菌生理食塩水で洗浄した後に圧迫による止血を行い、筋肉および皮膚に対してポリグリコール酸合成吸収糸で縫合し、閉創した。

### 3. レーザー光照射

レーザー光照射には He-Ne レーザーを用いた。この装置によるレーザー光は波長 632.8 nm の連続波、出力は 25 mW である。本実験ではレーザー光照射に際して、創表面からレーザープローブの距離を 25 mm とし、照射野の直径が 10 mm になるように調整した。閉創後に片側の創傷部に He-Ne レーザー光照射を行い、これを照射側とした。レーザー光照射を行わなかったもう一方の創傷部を対照群とした。レーザー光の照射条件は、照射出力 25 mW、照射時間 5 分とした。この照射条件では照射熱量 6.0 J、パワー密度 40.6 mW/cm<sup>2</sup>、エネルギー密度は 9.6 J/cm<sup>2</sup> となる。なお、非接触型温度計にて表面温度上昇について確認した。術直後にレーザー光照射を開始し、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。両群ともに、術後 7 日および 14 日に実験動物を屠殺して大腿骨を摘出し、70 %エタノールで固定した後に検索に用いた。本研究は愛知学院大学動物実験倫理委員会の承認を得て、ガイドラインに従って行った (承認番号 AGUD No. 266)。

#### 4. マイクロ CT による画像解析

術後 7 日および 14 日に摘出した大腿骨における骨欠損創の水平断層画像 (大腿骨の長軸に対して垂直方向) を得るために、マイクロ CT を用いて CT 撮影を行った。撮影条件は管電圧 90 kv、管電流 88  $\mu$ A とし、スライス厚 20  $\mu$ m、断層画像解像度 480 $\times$ 480 pixel、撮影倍率 10 倍、撮影時間 2 分にて撮影を行った。得られたマイクロ CT 画像を用いて、皮質骨直下の海綿骨部の最外側から深部への 15 スライスに対して、創傷部に形成された硬組織について 3D-BON を用いた画像解析を行い、骨体積、骨表面積、骨密度、骨梁数、骨梁の幅、骨梁間隙、骨梁中心間距離および骨面に対する骨量を計測して検索した。

#### 5. 統計学的解析

非照射群とレーザー光照射群の骨体積および骨表面積、骨密度、骨梁数、骨梁の幅、骨梁間隙および骨梁中心間距離の平均値について、統計的に有意差があるかを判定するために  $t$  検定を用いた。

### III. 結果

#### 1. $\mu$ CT画像所見

処置後7日では、対照群と比較してレーザー光照射群では骨髓部に形成された石灰化物の信号強度が高くなっていた。処置後14日では、対照群およびレーザー光照射群ともに骨髓部に形成された石灰化物の体積は減少し、密度が疎になっていた。

## 2. 骨体積

創傷部の骨髓腔内における骨体積は、処置後7日ではレーザー光照射群 (0.8 mm<sup>3</sup>) では対照群 (0.7 mm<sup>3</sup>) と比較して骨体積は有意に大きくなっていた ( $p<0.01$ )。また、処置後14日の骨体積ではレーザー光照射群 (0.5 mm<sup>3</sup>) は対照群 (0.6 mm<sup>3</sup>) と比較して少ない傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

## 3. 骨表面積

創傷部の骨髓腔内に形成された骨組織の骨表面積は、処置後7日では対照群 (8.3 mm<sup>2</sup>) と比較してレーザー光照射群 (11.8 mm<sup>2</sup>) では有意に大きくなっていた。また、術後14日ではレーザー光照射群 (8.9 mm<sup>2</sup>) では対照群 (10.0 mm<sup>2</sup>) と比較して低い傾向を示したが有意差はみられなかった。

## 4. 骨密度

創傷部の骨髓腔内における骨密度は、術後7日ではレーザー光照射群 (39.4 %) の方が対照群 (57.0 %) より有意に高かったが、術後14日 (対照群48.8 %、レーザー光照射群39.4 %) では逆に低い傾向が認められた。

## 5. 骨梁数

骨梁数は術後7日のレーザー光照射群 (4.6/mm) では対照群 (3.6/mm) と比較して有意に多くなっていたが、14日 (対照群4.6/mm、レーザー光照射群4.4/mm) では両群に差はほとんどみられなかった。

## 6. 骨梁の幅

骨梁の幅については、術後7日(対照群155.7  $\mu\text{m}$ 、レーザー光照射群153.9  $\mu\text{m}$ )、14日(対照群109.9  $\mu\text{m}$ 、レーザー照射群121.0  $\mu\text{m}$ )ともに対照群とレーザー光照射群の間に有意な差はみられなかったd。

#### 7. 骨梁間隙

骨梁間隙においては、術後7日ではレーザー光照射群(85.0  $\mu\text{m}$ )は対照群(98.3  $\mu\text{m}$ )に比較して小さい傾向がみられたが、術後14日ではレーザー光照射群(154.1  $\mu\text{m}$ )における骨梁間距離は対照群(101.8  $\mu\text{m}$ )よりも有意に大きくなっていった。

#### 8. 骨梁中心間距離

骨梁中心間距離においては、術後7日ではレーザー光照射群(231.7  $\mu\text{m}$ )は対照群(272.9  $\mu\text{m}$ )に比較して小さい傾向がみられたが、有意差はみられなかった。また、術後14日ではレーザー光照射群(251.8  $\mu\text{m}$ )における骨梁中心間距離は対照群(227.7  $\mu\text{m}$ )よりも大きい傾向がみられたが、有意差は認められなかった。

#### 9. 骨面に対する骨

骨梁の面積に対する骨面の周囲長は骨面に対する骨量を表す形状的特徴のパラメータであり、梁間隙や骨梁中心間距離と同様の傾向がみられたが、対照群(7日:16.5、14日:17.2)とレーザー光照射群(7日:13.4、14日:22.6)の間に有意な差はみられなかった。

#### IV. 考察

本研究ではラット大腿骨に実験的に形成した骨欠損の治癒過程を用いて、マイクロCTによる骨形成量の定量的評価を行い、欠損部の骨再生に対するLLLTの骨形成促進効果について検討した。術後7日では骨体積、骨密度、骨梁数、骨梁の幅は大きくなり骨梁間隙や骨梁間距離は小さかったが、術後14日では骨体積、骨密度、骨梁数、骨梁の幅は低く、骨梁間隙や骨梁間距離は大きくなっていた。これにより骨の創傷治癒においてレーザー照射により術後7日には初期仮骨が形成されて増加し、14日では初期仮骨は吸収されて縮小して骨芽細胞の増殖が起こり、骨新生が促進されていることが示唆された。

これらのことから、本研究におけるレーザー照射群では対照群と比較して術後の早期における骨組織の形成が促進され、その後の骨吸収、骨改造においても治癒が促進していると考えられた。また本研究では5日間の連日照射を行ったところ、骨組織における創傷治癒の促進効果が認められたことから、創に対するレーザー照射はできるだけ早期に開始し、連日もしくは隔日での継続的、長期的に行うことが理想的であると考えられた。以上の結果から、LLLTは血管新生による血流量の増加や線維芽細胞の活性化によるコラーゲンの合成により結合組織が形成されて創傷治癒を促し、その後の骨組織の再生にも促進的な効果を及ぼす可能性を支持する結果と考えられた。

## V. 結論

(論文内容の要旨)

No. ....7.....

愛知学院大学

本研究では、照射出力 25 mW、照射時間 5 分、照射熱量 6.0 J、パワー密度  $40.6 \text{ mW/cm}^2$ 、エネルギー密度  $9.6 \text{ J/cm}^2$  の条件で骨欠損部に He-Ne レーザー光照射を行った結果、低出力 He-Ne レーザー光照射により比較的初期段階で骨形成促進効果が認められ、同レーザーの LLLT 効果が確認された。したがって、低出力 He-Ne レーザー光照射は骨の再生や創傷治癒を促進する可能性が示唆された。