

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

小川明敬

論文題目

ラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞に間歇的な低出力 LED  
光照射が与える効果

## I . 緒言

Photobiomodulation therapy (PBMT) はレーザー、発光ダイオード (Light Emitting Diode : LED) などの光を可視および赤外波長領域で使用する光線療法の1種である。

PBMT は、口腔インプラントのオッセオインテグレーションの早期獲得にも有効であることが報告されている。しかし、その効果を得るための最適な照射条件や作用機序についてはまだまだ不明な点が多く、基礎的な研究は十分に行われているとは言えない。LED を用いた研究の多くでは赤色 LED 光がよく用いられているが、短波長の光源の方が細胞増殖により効果的との報告もある。

そこで本研究では、実験 1 として緑色 LED 光と赤色 LED 光をラットの培養骨髄由来骨芽細胞様細胞に照射し細胞増殖能を比較、検討した。また、実験 1 の結果をもとに実験 2 として緑色 LED 光の照射と創傷治癒促進効果があると報告されている線維芽細胞増殖因子 (bFGF) の添加を比較することにより緑色 LED 光の照射によるラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞の増殖および分化、石灰化能におよぼす影響について検索した。

## II . 実験 1 緑色 LED 光と赤色 LED 光の細胞増殖能の検討

### 1. 材料および方法

#### 1) LED 光の波長および照射条件

緑色 LED 光と赤色 LED 光を実験に用いた。照射条件は以下の様に設定した。

総ジュール数を  $5.6 \text{ J/cm}^2$ 、照射距離を 20 mm、照射野への出力 100 mW とし、56 秒間の単回照射と 14 秒間の間欠的な照射を 4 回行った。光照射は細胞を播種した 12 時間後に 1 回目の LED 光の照射を行い、間欠的に 4 回照射を行う群では、1.5、3.0、4.5 時間後の合計 4 回照射を行った。

## 2) 骨髄細胞の採取と培養方法および実験群

8 週齢雄性 SD ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取した。採取した細胞は骨芽細胞様細胞分化誘導培地を用いて培養を行った。培養した細胞を以下の 5 群に分けて実験を行った。Control 群：骨芽細胞分化誘導培地での培養を行い LED 光の照射なし、G14 群：緑色 LED 光を 14 秒間 4 回間欠的に照射、G56 群：緑色 LED 光を 56 秒間単回照射、R14 群：赤色 LED 光を 14 秒間 4 回間欠的に照射、R56 群：赤色 LED 光を 56 秒間単回照射。

## 3) 骨芽細胞様細胞の増殖活性の検索

LED 光の 1 回目の照射直後、1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後、12 時間後、36 時間後に骨芽細胞様細胞の増殖能の検索を行った。

## 4) 統計分析

すべてのデータは、各サンプルについてソフトウェア SPSS 27.0 を使用して、Tukey の検定を伴う一元配置分散分析を行い、すべての結果の統計的有意性を評価した ( $p < 0.01$ )。

## 2. 結果

### 1) WST-8 による細胞増殖能の評価

(1) LED 光の照射直後

G14 群では、G56 群と比較して吸光度は有意に高かった。

(2) LED 光照射の 1.5 時間後

G14 群の吸光度は、R14 群、R56 群、Control 群と比較して有意に高かった。

(3) LED 光の照射 3.0 時間後

G14 群の吸光度は、R14 群、R56 群、Control 群と比較して  $p < 0.01$  で有意に高かった。

(4) LED 光の照射 4.5 時間後

G14 群の吸光度は、G56 群、G14 群、G56 群、Control 群と比較して有意に高かった。

(5) LED 光の照射 12 時間後

G14 群の吸光度は、G56 群、R14 群、R56 群、Control 群と比較して有意に高かった。

(6) LED 光の照射 36 時間後

G14 群の吸光度は、G56 群、R14 群、R56 群、Control 群と比較して有意に高かった。

### 3. 小括

緑色 LED 光と赤色 LED 光をラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞に照射した際の細胞増殖能についてそれぞれ照射回数を変更し測定した結果、A 群では

LED 光照射直後、照射 4.5 時間後、12 時間後、36 時間後で、B 群と比較して吸光度は有意に高かった。

また、LED 光の照射 1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後、12 時間後、36 時間後で、G14 群は R14 群、R56 群、Control 群と比較して吸光度は有意に高かった。本研究の結果において照射回数が多い方が細胞増殖能は高くなり、緑色 LED 光の方が赤色 LED 光より細胞増殖能は高くなっていた。

### Ⅲ. 実験 2 緑色 LED 光と線維芽細胞成長因子の骨芽細胞様細胞に与える効果の検討

#### 1. 材料及び方法

##### 1) LED 光の波長および照射条件

緑色 LED 光の照射条件は実験 1 と同様に設定し、細胞を播種した 12 時間後に 1 回目の LED 光の照射を行い、1.5、3.0、4.5 時間後の合計 4 回照射を行った。

##### 2) 骨髄細胞の採取と培養方法および実験群

骨髄細胞の採取と培養については実験 1 と同様の方法で行なった。また、実験 2 では bFGF を 10 ng/ml の濃度で骨芽細胞分化誘導培地に加え、LED 光の比較対象として用いた。本実験では、以下の 5 群に分けて行なった。

Control 群：骨芽細胞分化誘導培地で培養を行い LED 光の照射はなし、LED

群：緑色 LED 光を 14 秒間 4 回間欠的に照射、FGF 群：培養液に FGF-2 を添

加し LED 光の照射はなし、LED+FGF 群：培養液に FGF-2 を加え緑色 LED 光

を照射。

### 3) 骨芽細胞様細胞の増殖活性の検索

骨芽細胞様細胞の増殖能の検索は実験 1 と同様に検索を行なった。

### 4) ALP 活性の検索

ALP 活性の測定は緑色 LED 光の照射 5 日後と 7 日後に行った。

### 5) Alizarin Red S 染色による石灰化能の検索

Alizarin Red S 染色液を用いて緑色 LED 光の照射照射 14 日後と 21 日後に染色を行った。

### 6) 統計分析

すべてのデータは、実験 1 と同様の統計処理を行った。

## 2. 結果

### 1) WST-8 による細胞増殖能の評価

#### (1) LED 光の照射直後

LED 群は Control 群、LED+FGF 群と比較して有意に高い吸光度を示していた。

#### (2) LED 光照射の 1.5 時間後

Control 群と比較して LED 群の吸光度は有意に高くなっていた。また、LED 群は FGF 群と同程度の吸光度を示した。

#### (3) LED 光の照射 3.0 時間後

LED 群の吸光度は Control 群、FGF 群、LED+FGF 群と比較して有意に高くな

っていた。

(4) LED 光の照射 4.5 時間後

LED 群の吸光度は Control 群、FGF 群、LED+FGF 群と比較して有意に高くなっていた。

(5) LED 光の照射 12 時間後

LED 群の吸光度は Control 群、FGF 群、LED+FGF 群と比較して有意に高くなっていた。

(6) LED 光の照射 36 時間後

LED 群は LED+FGF 群と比較すると、吸光度は有意に高くなっていた。

2) ALP 活性の評価

(1) LED 光の照射 5 日後

LED 群の吸光度は Control 群、FGF 群、LED+FGF 群と比較して有意に高くなっていた。

(2) LED 光の照射 7 日後

LED 群の吸光度は Control 群、FGF 群、LED+FGF 群と比較して有意に高くなっていた。

3) Alizarin Red S 染色による石灰化能の評価

(1) LED 光の照射 14 日後

LED 群は LED+FGF 群と比較して有意に高い陽性面積率を示していた。

(2) LED 光の照射 21 日後

LED 群は LED+FGF 群と比較して有意に高い陽性面積率を示していた。

#### IV. 考察

##### 1. PBMT について

PBMT は、どのようなメカニズムで作用するのかについては不明な点が多い。緑色光は、臨床においてあまり用いられていないが、赤色光よりも内皮細胞の細胞増殖や骨芽細胞の分化により効果的であったことが報告されている。本研究の実験 1 でも、LED 光の照射 1.5 時間後、3.0 時間後、4.5 時間後、12 時間後、36 時間後で、緑色 LED 光を回間欠的に照射した群は赤色 LED 光を間欠的に照射した群、赤色 LED 光を単回照射した群、Control 群と比較して吸光度は有意に高かったため実験 2 に緑色 LED 光を用いることとした。

##### 2. 細胞増殖能の評価

本研究の細胞増殖能の検索で、4.5 時間後と 12 時間後に緑色 LED 光の照射で FGF 群、LED+FGF 群、Control 群と比較して有意に高い値を示している。緑色 LED 光の照射は骨芽細胞様細胞の増殖能を促進することが判明した。

##### 3. ALP 活性と石灰化能の評価

本研究の ALP 活性の評価では LED 光の照射 5 日後と 7 日後で LED 群は FGF 群、LED+FGF 群、Control 群と比較して有意に高い値を示した。また、Alizarin Red S 染色では、照射 14 日後で LED 群は FGF 群、LED+FGF 群、Control 群と比較して高い傾向がみられた。この結果から、緑色 LED 光の照射は骨芽細胞様細胞に対して分化能、石灰化能を高めることが示唆された。



#### 4. bFGF との併用について

本研究では、LED+FGF 群は Control 群と比較して細胞増殖能や石灰化能は、低い傾向であった。LED 光の照射と bFGF を併用した群については bFGF が産生されることにより過剰になり、細胞増殖能や石灰化能が阻害されたと考えられる。

以上のことから、骨芽細胞様細胞への緑色 LED 光の照射は、bFGF の添加と同様に創傷治癒を促進すると考えられる。しかし、その条件によっては創傷治癒を遅延させてしまう可能性が考えられた。

#### V. 結論

本研究の結果から、低出力の緑色 LED 光の照射は、ラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞に対して細胞増殖能や分化能および石灰化能を促進させることが明らかとなった。また、その効果は間歇的に複数回照射することで増加することが判明した。さらに、赤色 LED 光の照射や培養液への bFGF を添加した場合と比較して細胞増殖能や分化能においても緑色 LED 光照射で高い効果がみられ緑色 LED 光照射は骨組織再生に有用であることが示唆された。