

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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 種であり、熱ではなく光の作用によって効果を得る治療法とされている。また、Photobiomodulation therapy は Low-reactive Level Laser Therapy (LLLT) としても知られている。2010 年 10 月に更新された American Society for Laser Medicine and Surgery (ASLMS) のホームページにおいて LLLT について Low Level Laser Therapy ではなく Low Level Light Therapy と表記する見解が公表されており LLLT にレーザーだけではなく LED を用いることもあるとされている。近年では、レーザーより安価である LED が医療用レーザーと同等に治療効果があるとする報告がみられる。

PBMT には、様々な作用があり組織の切断、痛みの緩和、創傷治癒の促進、神経痛への治療などに使用されている。また、骨組織の創傷治癒への促進効果について報告され、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。さらに、PBMT は非侵襲的で最適な条件であれば副作用はなく、既存の治療法と併用しやすい。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波長 600~900 nm の赤色 LED 光がよく用いられているが、波長 500~570 nm の緑色や波長 460~500 nm の青色などの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

波長 550 nm の緑色 LED 光 (LedHUB, Omicron Laserage Laserprodukte, Rodgau, Germany) と波長 650 nm の赤色 LED 光 (LedHUB) 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 J/cm²、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。照射出力は検出器 (光パワーメーター 3664, HIOKI E. E. CORPORATION, Nagano, JAPAN) を用いて確認した。また、非接触型温度計 (TELEDYNE FLIR, Wilsonville, OR, USA) を用いて LED 光を照射した時の照射野の温度を計測し温度の上昇がみられないことを確認した。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 459-2)

2) 骨髄細胞の採取と培養方法

8 週齢雄性 SD ラット (日本クレア株式会社、東京、日本) を三種混合麻酔下にて安楽死させ、大腿骨から骨髄細胞を採取した。採取方法は猿渡らによる方法に準じた。すなわち、大腿骨の周囲軟組織を除去し両骨端を除去した。一端に 20G の注射針を挿入しシリンジを用いて α -MEM

basal medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で骨髄細胞を押し出して回収した。三種混合麻酔はメデトミジン塩酸塩 (ドミトール 7.5 μ g/ml : Nippon Zenyaku Kogyo Co., Ltd, Fukushima, Japan)、ミダゾラム (ドルミカム 0.4 mg/ml : Maruishi Pharmaceutical Co., Ltd, Osaka, Japan)、酒石酸ベトルファノール (ベトルファール 0.5 mg/ml : Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan) を生理食塩水 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) で調整して使用した。採取した細胞は 37 $^{\circ}$ C、5 %CO₂ 下のインキュベーター内で、直径 10 cm のシャーレ (Corning, NY, USA) に α -MEM basal medium、50 mg/mL Ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)、10 mM β -Glycerophosphate (Sigma-Aldrich)、10⁻⁸ M Dexmethasone (Sigma-Aldrich)、1% Antibiotec-Antimycotic (Thermo Fisher Scientific)、10%ウシ胎児血清 (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) を加えた骨芽細胞様細胞分化誘導培地を用いて培養を行った。培養開始の 24 時間後に PBS (Thermo Fisher Scientific) を用いて洗浄し、その後、80 %コンフルエントに達したところで継代を行った。Trypsin-EDTA (Thermo Fisher Scientific) 250 μ l を 10 cm シャーレに加え 3 分間インキュベートした後、細胞を回収し 1500 rpm にて 5 分間遠心分離を行った。上澄み液を除去して培養液を加え、12 well 細胞培養プレート (Corning) に 3 \times 10⁴ cells/cm² になるように播種した。培養した細胞を以下の 5 群に分けて実験を行った。Control 群 : 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

全ての群に Cell Counting Kit-8 (DOJINDO LABORATORIES, Kumamoto, Japan) を用いて 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。まず、12 well 細胞培養プレートを PBS で 2 回洗浄し、各ウェルに培養液 1000 μ l を加えて Cell Counting Kit-8 試薬 100 μ l を添加して、20 分間インキュベートした。その後、96 well 細胞培養プレート (Corning) に反応液を移し、マイクロプレートリーダー (Microplate Reader 680, BIO RAD, Hercules, CA, USA) で 450 nm の吸光度を測定して評価した。

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 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) 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。また、G14 群の吸光度は G56 群と比較して有意差は認められないが高い傾向を示した。

(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。また、G14

群では、G56 群と比較して $p < 0.05$ で有意に高い吸光度を示していた。

(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、G14 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、G56 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総ジュール数が同じでも照射回数が多い方が細胞増殖能は高くなり、緑色 LED 光と赤色 LED 光を比較すると緑色 LED 光を照射した際の方が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

波長 550 nm の緑色 LED 光 (LedHUB) を実験に用いた。照射条件は実験 1 と同様に設定し、14 秒間の間欠的な照射を 4 回行った。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、1.5、3.0、4.5 時間後の合計 4 回照射を行った。照射出力は検出器 (光パワーメーター 3664, HIOKI E. E. CORPORATION) を用いて確認した。また、非接触型温度計 (TELEDYNE FLIR) を用いて LED 光を照射した時の照射野の温度を計測し、温度の上昇がみられないことを確認した。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 459-2)

2) 骨髄細胞の採取と培養方法

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 (Recombinant Human FGF-basic) (154a. a.) (PEPRO TECH, Cranbury, NJ, USA) 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 活性の測定には緑色 LED 光の照射 5 日後と 7 日後にラボアッセイ ALP (FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation, Gunma, Japan) を用いた。12 well 細胞培養プレートを dH_2O で 2 回洗浄し、 dH_2O を 12 well 細胞培養プレートに 1000 μl 添加した。さらに、基質緩衝液 100 μl を

添加して15分間インキュベートした。その後96well細胞培養プレートに移し、吸光度計で405nmの吸光度を測定し、検量線を用いてALP活性値を算出し評価した。

5) Alizarin Red S 染色による石灰化能の検索

石灰化能の評価のために Alizarin Red S 染色液 (FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation) を用いて染色を行った。緑色 LED 光の照射14日後と21日後に12wellプレート内の細胞を95%エタノールにて10分間固定をした。その後、PBSにて3回洗浄し1% Alizarin Red S 染色液 (FUJIFILM Wako Shibayagi Corporation) で3分間染色し、dH₂Oで4回洗浄をした。染色した細胞はデジタルカメラ (PowerShot SX720 HS, CANON INC., Tokyo, Japan) で撮影し、画像処理ソフトウェア Image J 1.53a (Rasband, W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA) で染色された陽性部位を計測して評価した。

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群と比較して有意に高い吸光度を示していた。また、LED群はFGF群と同程度の吸光度であったが、LED+FGF群と比較して有意に低い吸光度を示していた。吸光度は、LED群とFGF群は同程度でControl群、LED+FGF群の順に低くなっていた。

(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LED+FGF群との有意差はみられなかった。吸光度は、LED群とFGF群は同程度でLED+FGF群、Control群の順に低くなっていた。

(3) LED光の照射3.0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、LED+FGF群と比較しても吸光度は有意に高くなっていた。吸光度は、LED群、FGF群、LED+FGF群、Control群の順に低くなっていた。

(4) LED光の照射4.5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LED+FGF群と比較しても有意に高い吸光度を示していた。吸光度は、LED群、FGF群、Control群、LED+FGF群の順に低くなっていた。

(5) LED光の照射12時間後

LED群の吸光度はControl群と比較して有意に高い吸光度を示していた。また、FGF群、LED+FGF群と比較しても有意に高い吸光度を示していた。吸光度は、LED群、FGF群、Control群、LED+FGF群の順に低くなっていた。

(6) LED光の照射36時間後

Control群とLED群に有意差はみられなかった。また、LED群はFGF群との間にも有意差はみられなかったが、LED+FGF群との比較では、吸光度は有意に高くなっていた。吸光度は、LED群、FGF群、Control群、LED+FGF群の順に低くなっていた。

2) ALP活性の評価

(1) LED 光の照射 5 日後

LED 群は Control 群と比較して吸光度は有意に高くまた、FGF 群、LED+FGF 群と比較しても有意に高い吸光度を示していた。吸光度は、LED 群、FGF 群、LED+FGF 群、Control 群の順に低くなっていた。

(2) LED 光の照射 7 日後

LED 群は Control 群と比較して有意に高い吸光度を示していた。また、LED 群は FGF 群、LED+FGF 群と比較しても吸光度は有意に高くなっていた。吸光度は、LED 群と FGF 群、LED+FGF 群、Control 群の順に低くなっていた。

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 Control 群及 FGF 群との間に有意差は見られなかった。しかし、LED+FGF 群と比較して有意に高い陽性面積率を示していた。陽性面積率は、LED 群、FGF 群、Control 群、LED+FGF 群の順に低くなっていた。

(2) LED 光の照射 21 日後

LED 群は Control 群および FGF 群との間には、有意差は見られなかった。しかし、LED+FGF 群と比較して有意に高い陽性面積率を示していた。陽性面積率は、LED 群と FGF 群、Control 群、LED+FGF 群の順に低くなっていた。

IV. 考察

1. PBMT について

PBMT は、非侵襲的で簡便であり歯科領域では、口内炎や歯周治療などに用いられている。現在行われている治療法と併用することによりさらに改善されることも示唆されている。しかし、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。伏見らは外科的に作製した円形切除創に赤色 LED 光、緑色 LED 光、青色 LED 光を照射しそのサイズを 2 日おきに測定している。その結果、赤色 LED 光と緑色 LED 光では、13 日目に上皮化を認め創傷治癒を促進することを示している。また、LED 光の分子メカニズムの検索も行っており、培養されたヒト皮膚線維芽細胞に赤色光、緑色光、青色光の LED 照射を行い、照射後 0、4、8、24 時間で mRNA を細胞から抽出して成長因子、炎症性サイトカイン、および放出される可能性のある細胞マトリックスタンパク質などの発現を分析している。その結果、赤色 LED 光と緑色 LED 光を照射したときのみレプチン、IL-8 の有意な増加がみられたが、VEGF に関しては緑色 LED 光の照射をしたときのみ有意な増加がみられたとしている。これらのことから PBMT による血管新生はレプチン、VEGF、IL-8 が増加するため促進していると考えられる。

また、照射する光の波長によって創傷治癒のメカニズムは異なると言われている。赤色光と赤色光よりも低波長である緑色や青色の光のメカニズムには違いがあり、赤色光に関しては活性酸素によるミトコンドリアの活性化の可能性があると報告されている。一方で、緑色光と青色光の作用機序についてはまだ判明してないことが多いが骨芽細胞の分化が TRP チャンネル阻害薬のカプサゼピンや SKF96365 によって阻害されることが報告されている。このことから TRP チャンネルの活性化が骨芽細胞の分化を引き起こしていると考えられる。

波長によりメカニズムが異なるためそれぞれ光の波長により使用用途にも違いがある。赤色光に関する報告は緑色光や青色光と比較すると多く、生体賦活作用について基礎研究が進められてきた。

歯科領域に関する臨床研究においては、口腔内の治癒の促進やインプラントの安定性を促進することが報告されている。青色光源は尋常性痤瘡や乾癬などの治療に用いられ、活性酸素増加による殺菌効果や細胞アポトーシス誘導のようなメカニズムでその効果を得ようとすることが多い。また、緑色光は赤～近赤外領域光と青色領域光の中間に位置し、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 の結果でも、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 14 秒間 4 回間欠的に照射した群は赤色 LED 光を 14 秒間 4 回間欠的に照射した群、赤色 LED 光 56 秒間照射した群、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. 照射条件の決定について

Li らはラット骨髄間葉系細胞に赤色 LED 光の照射を 1 日 1 回の照射よりも複数回の照射をした方がラット骨髄間葉系細胞の増殖が多かったと報告している。Eslamian らは、ラットの口蓋の急速拡大後の中口蓋縫合における骨再生を LLLT の単回照射と複数回照射で比較をしている。複数回の低出力レーザー光の照射では骨再生を改善しているが、単回照射では改善できなかったと報告している。また、我々の実験 1 での結果でも緑色 LED 光を 14 秒間 4 回間欠的に照射した群は、LED 光照射直後、照射 4.5 時間後、12 時間後、36 時間後で、緑色 LED 光 56 秒間照射した群と比較して吸光度は有意に高かった。そのため、照射を単回照射ではなく 4 回照射にすることとした。また、Pagin らは MC3T3 細胞に 3 J/cm^2 および 5 J/cm^2 の LED 光と赤色レーザー光の照射を行い細胞増殖について検索したところ 24 時間後に非照射群と比較して 5 J/cm^2 の LED 光の照射では 3.6 倍、 3 J/cm^2 の赤色レーザー光の照射では 6.8 倍、 5 J/cm^2 の赤色レーザー光の照射では 10.1 倍に細胞増殖が促進されたと報告している。三上らは、青色レーザー光をマウス由来骨芽細胞様細胞に 1 分間の照射を行いその効果を検討している。レーザー光の照射 7 日目の ALP 活性において 5.6 J/cm^2 で効果が最大であったと報告している。これらのことから照射出力を 5.6 J/cm^2 に決定した。

3. 細胞増殖能の評価

我々と使用した細胞は異なるが、Vinck らは、培養線維芽細胞に赤外線低レベルレーザーと 950 nm、660 nm、570 nm の発光ダイオードを照射し MTT 試験を行なった結果、緑色 LED 光の照射が有意に高い細胞増殖能を示したと報告している。

本研究の細胞増殖能の検索でも、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おり Vinck らと同様の結果であった。また、LED 光の波長は異なるが Chang らは、MC3T3-E1 細胞に 1 日 1 回 630 nm と 810 nm の LED 光の照射を行ったところ、細胞増殖能の検索では 1 回目の照射後 1 日目から 5 日目で、非照射群と比較して照射群で細胞増殖能は有意に促進されていた。ALP 活性やアリザリンレッド染色においても 7 日目と 14 日目で非照射群よりも照射群で有意に細胞分化能、石灰化能は促進されていたと報告している。上記より緑色 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。

4. ALP 活性と石灰化能の評価

レーザー光を用いた報告であるが Merigo らは、マウスから調整した骨髄間質細胞に波長 532 nm のリン酸チタニルカリウムレーザーで週 3 回照射したところ、骨形成分化や細胞外マトリックスの石灰化を促進したと報告している。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 染色では有意差は見られなかったが、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レーザー光と同様に分化能、石灰化能を高めることが示唆された。

5. bFGF との併用について

本研究では、bFGF に関して培養骨芽細胞様細胞に対する LED 光の照射の比較対象として用いた。Wan らは脱灰骨マトリックスインプラントを用いた骨誘導モデルにおいて、インプラントあたり 15 ng の bFGF を投与すると軟骨細胞数と骨量が増加したが、インプラントあたり 1900 ng では軟骨と骨の形成が大きく阻害されたと報告している。また、LED 光の照射により bFGF が産生されると報告されている。本研究では、bFGF を用いて LED と併用した 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、最適な照射条件の決定は大変難しく、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。

最後に、本研究の条件下でのラットの骨髄由来培養骨芽細胞様細胞に緑色 LED 光 (波長 550 nm) の照射を行うことで bFGF と同様の細胞増殖能、ALP 活性、石灰化能の促進がみられた。PBMT の術式は簡便であり非侵襲的であるが、使用するレーザーや LED の波長や出力や照射時間、照射回数など設定すべき条件が大変多く、その効果を比較するのが難しい。今後、詳細な検討が行われることによる確立が求められる。

V. 結論

本研究の結果から、低出力の緑色 LED 光 (波長 550 nm) 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 (波長 650 nm) 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た。

以上の結果から、緑色 LED 光照射による Photobaiomodulation therapy は骨組織再生に有用であることが示唆された。また、LED 光を用いることがレーザー光よりも安全性が高いことや安価で幅広い使用が可能となり、今後さらなる LED 光の臨床応用が期待される。