

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者 服部 剛大

論文題目

低出力青色波長の LED 光照射がラットの骨髄由来
骨芽細胞様細胞および骨創傷治癒に与える効果

I. 緒言

現在、Low reactive Level Laser Therapy (LLLT) は骨折や抜歯創などの治癒促進、歯科用インプラント治療に有効であることが報告され、骨形成促進を目的とした LLLT が注目されている。また、近年では発光ダイオード (LED) が医療用レーザーと同様な効果をもたらすことが認められた。

そこで本研究では *in vitro* (実験 1) として LED 光照射が骨髄由来骨芽細胞様細胞の細胞増殖能・分化能・石灰化能に与える LLLT の効果について検索した。また、それらを基に *in vivo* (実験 2) としてラットの頭蓋骨に人工的骨欠損を作製して LED 光を照射し、骨の創傷治癒に対する LLLT の効果について検索した。

II. 材料および方法

1. 実験 1 ラット骨髄由来骨芽細胞様細胞への LED 光照射の影響

8 週令 SD 系雄性ラットの大腿骨から骨髄細胞を採取して骨芽細胞分化誘導培地で培養し、実験に用いた。

LED 光照射は細胞を播種してから 12 時間後に開始した。細胞増殖能の検索には Cell Counting Kit-8 を用いた。実験における各データは、それぞれ統計学的解析として Tukey の HSD 検定を伴う一元配置分散分析を行い、有意水準を 5% および 1% として評価した。

1) 細胞増殖能への青色 LED 光の照射条件の確立

LED 光の照射条件は波長 455 nm、照射出力実測値 100 mW または 50 mW、

照射距離 20.8 mm、総ジュール数は 5.6 J/cm^2 とした。細胞は次のような5群に分けた。Control 群：細胞培養のみ、Blue 14s 群：14 秒間の光照射を4回 (1.5 時間の間隔)、Blue 56s 群：56 秒間の光照射を1回、Blue 28s 群：28 秒間の光照射を4回 (1.5 時間の間隔)、Blue 112s 群：112 秒間の光照射を1回。光照射 (開始) の4.5 時間後に細胞増殖能を検索した。

2) 赤色と青色 LED 光照射による細胞増殖能の比較

LED 光の照射条件は波長 455 nm または 655 nm、照射出力実測値 100 mW、照射距離 20.8 mm、総ジュール数は 5.6 J/cm^2 とした。培養細胞は次のような5群に分けた。Control 群、Blue 14s 群、Blue 56s 群、Red 14s 群：波長 655 nm、14 秒間の光照射を4回 (1.5 時間の間隔)、Red 56s 群：波長 655 nm、56 秒間の光照射を1回。光照射 (開始) の直後および 1.5、3.0、4.5、12、36 時間後に細胞増殖能を検索した。

3) bFGF 添加細胞培養と青色 LED 光照射による細胞増殖能・分化能・石灰化能の比較

LED 光の照射条件は波長 455 nm、照射野実測値 100 mW、照射距離 20.8 mm、照射は 14 秒間として、総ジュール数は 5.6 J/cm^2 とした。培養細胞は次のような4群に分けた。Control 群、LED 群：細胞培養・14 秒間の光照射を4回 (1.5 時間の間隔)、FGF 群：bFGF を添加して細胞培養、LED・FGF 群：bFGF を添加して細胞培養・14 秒間の光照射を4回 (1.5 時間の間隔)。FGF 群および LED・FGF 群には bFGF (10 ng/ml) を添加した培地を使用した。1 回目

の LED 光照射直後および 1.5、3.0、4.5、12 時間後に細胞増殖能を検索した。3、7 日後にラボアッセイ ALP を用いて Alkaline Phosphatase (ALP) 活性値を求め、7 日後に ALP 染色を行い、細胞分化能を検索した。また、14、28 日後に Alizarin Red 染色を行い、石灰化能を検索した。

2. 実験 2 ラットの頭蓋骨に作製した人工的骨欠損に対する青色波長 LED 光の照射が与える効果

1) 実験動物

10 週令 SD 系雄性ラットを用いた。

2) 人工的骨欠損の作製

ラットの頭頂骨に直径 4.6 mm の円形の人工的骨欠損を 2 個形成した。

3) LED 光の照射

照射条件は波長 455 nm、照射出力実測値 29 mW または 3 mW、照射時間 10 分間、照射距離 18.7 mm、総ジュール数 121.8 J/cm² または 12.6 J/cm² とした。光照射は閉創直後から始め、その後も 1 日ごとに計 7 回行った。

実験開始の 2 週間後に Control 群：光照射なし、LED 群：29 mW の LED 光照射、の頭頂骨を摘出した。4 週間後に Control 群、LED 強群：29 mW の LED 光照射、LED 弱群：3 mW の LED 光照射、の頭頂骨を摘出して検索に用いた。

4) 硬組織形成の評価法

摘出した頭頂骨は CT 撮影および画像解析を行った。欠損の作製直後および 2、4 週間後の冠状断 CT 画像で人工的骨欠損部の最大幅径を計測し、形

成された硬組織の割合を算出した。

7) 統計分析

実験 1 と同様に行った。

III. 結果

1. 実験 1

1) 細胞増殖能への青色 LED 光の照射条件の確立

(1) 細胞増殖能

Blue 14s 群は全ての群の中で最も高く、Control 群および Blue 56s 群、Blue 28s 群より有意に高かった。また、Blue 28s 群は Control 群および Blue 112s 群より有意に高かった。

2) 赤色と青色 LED 光照射による細胞増殖能の比較

(1) 細胞増殖能

Blue 14s 群の細胞増殖能はいずれの実験期間においても最も高かった。また、照射時間では、青色および赤色波長の LED 光照射ともに 14 秒間の照射が 56 秒間よりも細胞増殖能が高いことが判明した。

3) bFGF 添加細胞培養と青色 LED 光照射による細胞増殖能・分化能・石灰化能の比較

(1) 細胞増殖能

LED 群の細胞増殖能はいずれの実験期間においても最も高かった。

1 回目の LED 光照射直後では LED 群は FGF 群より有意に高かった。1 回

目の LED 照射から 1.5 時間後では LED 群および FGF 群、LED・FGF 群は Control 群より有意に高かった。3.0 時間後および 4.5 時間後では LED 群は Control 群および FGF 群、LED・FGF 群より有意に高かった。12 時間後では LED 群は Control 群および LED・FGF 群より有意に高かった。

(2) 細胞分化能

LED 群の細胞分化能はいずれの実験期間においても最も高かった。

1 回目の LED 照射から 3 日後では LED 群の ALP 活性値は Control 群および FGF 群、LED・FGF 群より有意に高かった。7 日後では LED 群および LED・FGF 群の ALP 活性値は Control 群および FGF 群より有意に高かった。また、1 回目の LED 照射から 7 日後では LED 群の ALP 染色の陽性率は FGF 群より有意に高かった。

(3) 細胞石灰化能

1 回目の LED 照射から 14、28 日後では LED 群、LED・FGF 群、FGF 群の陽性率 (Alizarin Red 染色) は Control 群より有意に高かった。また、FGF 群では LED 群、LED・FGF 群より高い傾向がみられたが有意な差みられなかった。

2. 実験 2

2、4 週間後では LED 光を照射した群で形成された硬組織の割合は Control 群より高かったが、有意差は認められなかった。

IV. 考察

1. 実験1

1)の結果から、総ジュール数が同じ場合、長い照射時間を単回行うよりも短い照射時間を複数回行った方が高い細胞増殖能を示すことが示唆された。2)の結果から、青色波長の光源による LLLT で細胞賦活効果が認められ、その効果は赤色波長の光源よりも高いということが考えられた。3)の結果から、LED 光の照射は bFGF を添加した培地を用いた培養よりも細胞増殖能および分化能に有意な促進効果が認められ、石灰化能でも同程度の促進効果を有することが示唆された。

これらは、光の複数回照射による反復的な刺激により、細胞増殖能や分化能、石灰化能が上昇したためと推察された。

2. 実験2

LED 光を照射した群は Control 群より硬組織の形成の促進的作用を示す傾向がみられた。これは LED 光による LLLT の効果で局所の血液循環が促進されることによって毛細血管の再生が促進された結果、硬組織の形成を促進させたと考えられた。また、硬組織形成量が有意的に高く示さなかった原因として LED 光の特性や短波長などが原因で骨欠損部まで想定していた光の照射量が十分かつ正確に到達していなかった可能性が考えられた。

V. 結論

本研究の結果から、ラットの骨髄由来骨芽細胞様細胞に対する間歇的な低出力の青色 LED 光の複数回照射は、細胞増殖能・分化能・石灰化能を促

進させることが明らかとなった。その効果は赤色 LED 光照射より高い増殖能が認められた。また、培地への bFGF 添加より高い増殖能・分化能がみられ、同程度の石灰化能が認められた。さらに、ラット頭蓋骨の人工的骨欠損に対する間歇的な青色 LED 光の複数回照射が骨の創傷治癒の促進に対する効果があることが判明した。

以上の結果から、青色 LED 光照射による LLLT は骨組織の形成に有用であることが示唆され、レーザー光と比較して LED 光を用いることが安全性や安価で幅広い供給および医療での幅広い使用が可能となり、今後の臨床応用が期待される。