

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791870

研究課題名(和文) 低出力レーザー照射効果の新規解析

研究課題名(英文) Further elucidation of photo-chemical effects of low-energy laser irradiation on cultured cells.

研究代表者

中野 健二郎 (NAKANO KENJIRO)

愛知学院大学・歯学部・助教

研究者番号：20454316

研究成果の概要(和文)：申請者らは、培養細胞へ低出力レーザーを照射し、低出力レーザー照射による光化学効果を分子生物学的解析することを目的とした。その結果、低エネルギーレーザー照射は、一般に細胞増殖能を活性化させる一方で、特異的な細胞種に特定の波長のレーザー光を照射、あるいは同一波長でも照射されたエネルギー量によっては、その増殖能は抑制されるという逆の影響が発現することも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Further elucidation of photo-chemical effects of low-energy laser irradiation on cultured cells are required. The present reported mainly our studies on effects of low-energy laser irradiation with He-Ne laser. We have been also examining effects of He-Ne laser irradiation on proliferation activity of rat bone-marrow-derived osteoblastic cells. Results of the study suggest that He-Ne laser irradiation stimulates both proliferation and differentiation capacity of the cells. We also examined effects of He-Ne laser irradiation on a growth of mouse colonic-carcinoma-derived tumor cells. Results of the study showed that a brief irradiation stimulated proliferation of the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 2,400,000 | 720,000   | 3,120,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：細胞・組織、遺伝子、歯学

## 1. 研究開始当初の背景

レーザー治療は、この20年間ほどで目覚ましい発展を遂げ国内臨床に定着し、歯科領域においても広く活用されている。また、レーザー照射が患者の身体に危害が及ぶ事が無いように医療安全への対応も重要な事項である。しかしながら、レーザーによる光化学効果は未だ不明な点が多く、レーザーに関する研究は国内外を問わず広く行われてい

る。さらにレーザー光は出力媒体により多種多様で、その効果および作用は大きく異なっている。そこで治療目的に応じたレーザー光の基礎的知識、エビデンスが必要とされるが、現在では臨床研究に先立つ基礎研究が国内外を問わず大きく遅れている。

申請者らは、これまで1984年から現在まで低出力レーザーである He-Ne レーザーを用いて基礎研究および臨床研究行ってきた

た。(He-Ne レーザー治療器”Soft Laser632”の臨床使用成績 第1報、愛知学院誌 23:p773-780、1985)

## 2. 研究の目的

近年、悪性脳腫瘍に対する外科処置において、低エネルギーレーザーを応用した光線力学的治療 (Photo Dynamic Therapy: PDT) が盛んに行われている。すなわち、腫瘍細胞へ選択的に取り込まれる光感受性物質に対して、その物質を励起するレーザー光を照射することにより、腫瘍細胞を変性あるいは壊死させる処置法である。さらに、低エネルギーレーザー照射した部分の血流が増加するので、その効果に抗癌剤投与を組み合わせ、より効率的な抗腫瘍効果を発揮させることにも応用されている。現在、この治療技術は、機能温存を考慮した侵襲の少ない治療法であることから、心肺機能低下などのリスクを伴った症例に盛んに応用されている。

しかしながら、低エネルギーレーザーの悪性腫瘍部への照射は禁忌ともされている。その理由として、低エネルギーレーザー照射が細胞の周期や増殖能を促進するという報告がされているからである。一方で、これらを抑制するという報告もおこなわれており、低エネルギーレーザー照射された腫瘍細胞の挙動の詳細は未だ不明であり、腫瘍細胞に対するレーザー照射の安全性が確認されていないことが挙げられる。すなわち、低エネルギーレーザー照射が病態学的に異常な細胞に及ぼす影響を検討した研究は十分とはいえないのが現状である。

そこで申請者らは、これまでに He-Ne レーザーを細胞に照射したときの細胞の挙動を明らかにする目的で、これまでに He-Ne レーザー照射の生体に対する影響について多くの基礎的な動物実験や臨床研究を行い、その効果を確認してきた。

続いて、近年のデンタルインプラント治療における技術革新により、インプラント体へのオッセオインテグレーションが容易かつ確実に獲得できるようになった。そのため適応症例は拡大し、さらにインプラント治療自体の一般化も進むに伴い、より困難な症例への対応が求められるようになった。

しかしながら、本治療の失敗例は少なくとも数%程度はあるといわれており、その多くはインプラント体埋入後の初期固定に原因があるといわれている。

そこで申請者らは、He-Ne レーザーがもつ様々な作用を期待し、インプラント体埋入の際に He-Ne レーザー照射を骨孔周囲の骨組織に対して行うことにより、創傷治癒促進効果、とくに新生骨組織の形成促進効果を期待し、インプラント体の良好な初期固定を獲得するべく検討を試みた。

以上のことを目的とし、申請者らはこれまでの研究結果を基に分子生物学的な解析を行い、低出力レーザーの照射効果を詳細に解析し明らかにすべく研究をおこなった。

## 3. 研究の方法

本研究は、以下の2項目により構成されている。

- ①細胞増殖能の測定
- ②細胞内遺伝子発現の解析実験

### ①細胞増殖能の測定

マウス結腸癌由来腫瘍細胞 (Colon26 Cell) およびラット骨髄由来骨芽細胞様細胞を用いて実験を行った。

ラット骨髄由来骨芽細胞様細胞の採取方法を図に示す(図1)。

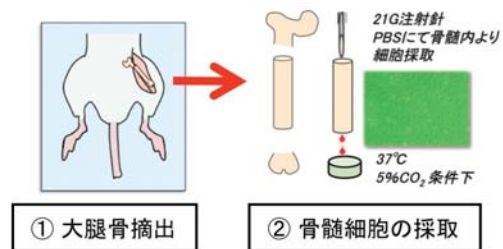


図1 骨髄細胞採取方法

これらの細胞を 1%ペニシリン-ストレプトマイシン、5%FBS 含む細胞培養液 RPMI を用いて 37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて培養を行った。実験に必要な細胞数へ増加させた後、細胞を遠心管に入れ、1000 回転/分にて 10 分間沈下した。ペレット状となった底面の細胞へ後述の条件にてレーザー照射を行った。

He-Ne レーザーは、Soft Laser 632 (W. L. T 社) を用いて出力 6mW 条件下にて照射を行い、照射を行わなかった群をコントロール群とした。その後、細胞を 96 穴 Well プレートに播種し培養を行った。

細胞増殖能は Cell Counting Kit-8 (同仁化学) を用いて、その吸光度より測定した。

本研究方法を図示する(図2)。

参考文献: Effects of He-Ne Laser Irradiation on Gingival Fibroblasts: Miyajima Kuniaki et al, Aichi-Gakuin Dental. Science, p59-69、1994

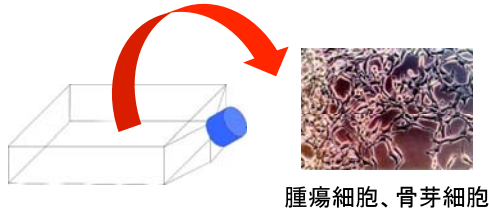
### ②細胞内遺伝子発現の解析実験

前述の細胞増殖能測定実験により得られた細胞より RNA を抽出し RT-PCR 操作により発現遺伝子の抽出を行う (Power SYBR® Green Cells-to-CT™ Kit)。

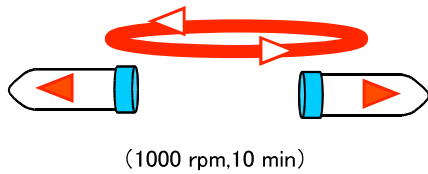
その後、定量 RT-PCR (7900HT Fast Real Time

PCR System)にて増幅、遺伝子発現を確認し、レーザー照射による細胞内での機能変化を確認評価した。

### 1. 細胞培養



### 2. 細胞を遠心分離



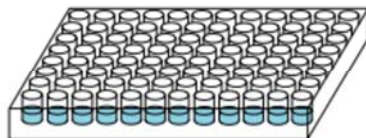
### 3. レーザー照射



Soft Laser 632 (W.L.T社)

遠沈管底部に集められた細胞にレーザーを照射する。

### 4. 細胞播種および培養



レーザー照射された細胞を培養

### 5. 吸光度測定



マイクロプレートリーダー (MODEL680, BIO-RAD)

図2 細胞増殖能の測定

本研究では、18S Thomas (18S) を内在コントロールとして、アルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシンの遺伝子発現を定量的に解析した。

### 4. 研究成果

#### ①細胞増殖能の測定

マウス結腸癌由来腫瘍細胞およびラット骨髄由来骨芽細胞に対するHe-Neレーザー照射の細胞増殖能への影響を検討した。得られた成果によると、マウス結腸癌由来腫瘍細胞は、短時間の照射は細胞増殖能を促進するが、長時間の照射は逆に細胞増殖能を抑制する作用が新たに判明した。

一方、ラット骨髄由来骨芽細胞は、He-Neレーザー照射により細胞増殖能を促進する作用が明らかとなった。研究結果を図に示す(図3および図4)。

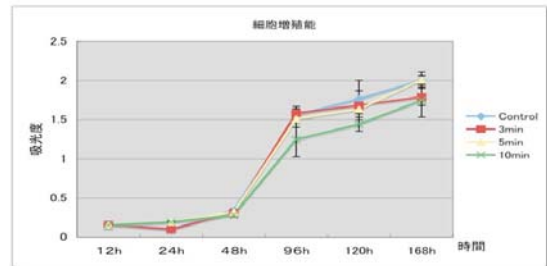


図3 細胞増殖能(Colon26 Cell)

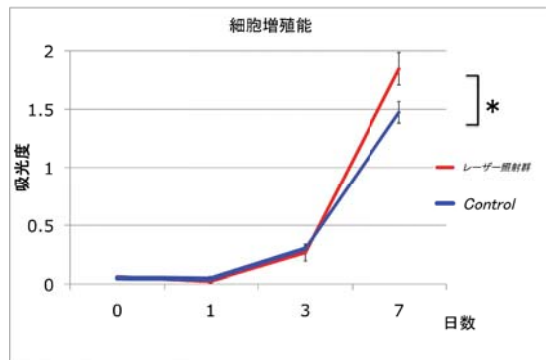


図4 細胞増殖能(骨芽細胞)

申請者らが行った研究により、低エネルギーレーザー照射は、一般に細胞増殖能を活性化させる一方で、特異的な細胞種に特定の波長のレーザー光を照射あるいは同一波長でも照射されたエネルギー量によっては、その増殖能は抑制されるという逆の影響が発現することも明らかとなった。

②細胞内遺伝子発現の解析実験

He-Ne レーザー照射により、ラット骨髄由来骨芽細胞の増殖能とアルカリフォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシンの mRNA の発現上昇を示した。これら定量 RT-PCR による遺伝子発現の上昇により、増殖能および分化能双方の活性を高めたことが示唆された。

また分化能においても照射群に高い発現が認められ、インプラント体への骨芽細胞付着に対する LLLT 効果があると示唆された。遺伝子発現の上昇を図に示す。

アルカリフォスファターゼ(図5)、オステオポンチン(図6)、オステオカルシン(図7)

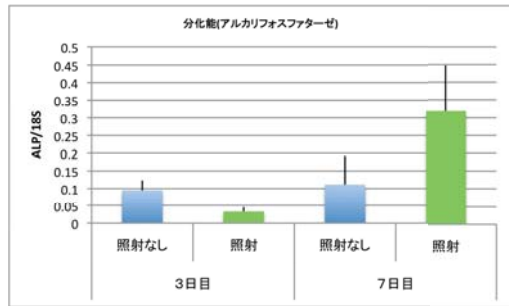


図5 細胞内遺伝子発現 (アルカリフォスファターゼ)

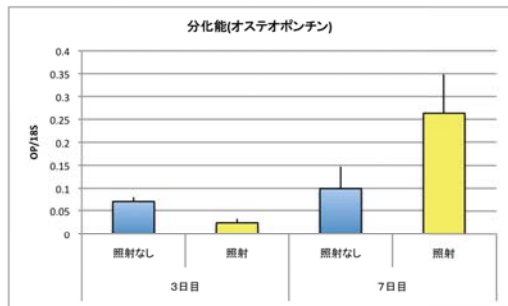


図6 細胞内遺伝子発現 (オステオポンチン)

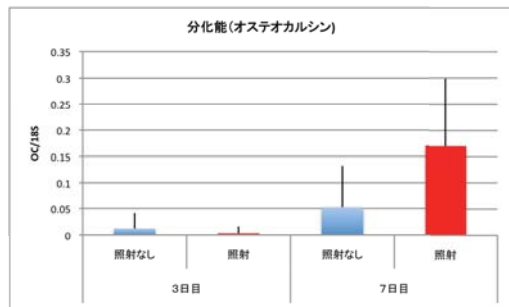


図7 細胞内遺伝子発現 (オステオカルシン)

これらの研究により、細胞に対する低エネルギーレーザー照射の影響は、照射される細胞の種類によって異なることはもちろんのこと、波長、照射時間、エネルギー量などによっても異なることが判明した。しかしながら、低エネルギーレーザー照射の光化学作用に関し、その詳細は未だ明らかになっていない。今後、さらなる研究が必要と思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①中野健二郎、青山剛大、成橋昌剛、山田三良、佐藤かおり、久保勝俊、吉田和加、富士谷盛興、前田初彦、千田 彰、ヘリウムネオンレーザーによる低エネルギーレーザー照射が腫瘍細胞に及ぼす影響、日本レーザー歯学会誌、査読有り、21 巻 3 号、2010、pp. 173-178、

[学会発表] (計 2 件)

① 青山剛大、中野健二郎、吉田和加、久保勝俊、富士谷盛興、前田初彦、千田 彰、He-Ne レーザー照射が骨芽細胞におよぼす影響に関する研究、日本レーザー歯学会・学術大会、2010 年 11 月 14 日、名古屋、

②吉田和加、久保勝俊、杉田好彦、佐藤恵美子、鳥居亮太、福澤 蘭、青山剛大、中野健二郎、田中貴信、千田 彰、前田初彦、異なるチタン表面処理によるラット骨髄由来骨芽細胞様細胞の遺伝子発現への影響、日本口腔科学会学術集会、2011 年 4 月 21 日-22 日、東京、

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中野 健二郎 (NAKANO KENJIRO)  
愛知学院大学・歯学部・助教  
研究者番号：20454316

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：