原 著

培養ヒト顎関節滑膜細胞に近赤外線照射が及ぼす影響について

多田 充裕^{1,4)} 小倉 直美^{2,4)} 酒巻 裕之^{2,4)}
内田 貴之^{1,4)} 齊藤 孝親^{1,4)} 笹原 廣重^{1,4)}
安孫子 宜光^{3,4)} 松井 大⁵⁾

¹⁾ 日本大学松戸歯学部口腔診断学教室 (主任: 笹原廣重教授)

²⁾ 日本大学松戸歯学部口腔外科学教室 (主任: 中村武夫教授)

³⁾ 日本大学松戸歯学部生化学教室 (主任: 安孫子宜光教授)

⁴⁾ 日本大学松戸歯学部口腔科学研究所

⁵⁾ 東京医研株式会社開発部

(受理: 平成 15 年 1 月 7 日)

Effects of Near-Infrared Irradiation in Cultured Synovial Cells from Human TMJ

Mitsuhiro Ohta^{1,4)}, Naomi Ogura^{2,4)}, Hiroyuki Sakamaki^{2,4)},
Takashi Uchida^{1,4)}, Takachika Saito^{1,4)}, Hiroshige Sasahara^{1,4)},
Yoshimitsu Abiko^{3,4)}, Masaru Matsui⁵⁾

¹⁾ Department of Oral Diagnostics, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University
(Chief: Prof. Hiroshige SASAHARA)

²⁾ Department of Oral Surgery, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University
(Chief: Prof. Takeo NAKAMURA)

³⁾ Department of Biochemistry, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University
(Chief: Prof. Yoshimitsu ABIKO)

⁴⁾ Research Institute of Oral Science, School of Dentistry at Matsudo, Nihon University

⁵⁾ Engineering Development Department, Tokyo Iken Co., LTD

(Accepted for Publication: January 7, 2003)

Abstract: Biostimulatory effects of near-infrared irradiation, such as anti-inflammation and relieving pain have been reported. However, the molecular based mechanisms are not elucidated yet.

Human synovial tissues were obtained from the patient with a condylar process fracture of the TMJ undergoing extraction of the mandibular head and arthroplasty. The cells were isolated from TMJ synovial tissues and primary cultured using outgrowth method. The confluent-stage cells were treated with IL-1 β , as the same time, near-infrared irradiation was treated to the cells. Three levels of band pass filtering were set at the 700-800 nm, 800-900 nm, and 900-1000 nm wavelengths and irradiation was conducted. The amounts of chemokines in conditioned medium were measured by ELISA kit.

After synovial cells were exposed to IL-1 β , the production of IL-8 and MCP-1 was elevated, though the amounts of increase were reduced at early time after irradiation as compared to without irradiation. The

production of IL-8 were significantly reduced at the 900-1000 nm wavelength, and the production of MCP-1 were significantly reduced at the 700-800 nm, 800-900 nm, and 900-1000 nm wavelengths.

These findings suggest that near-infrared irradiation may have anti-inflammatory effect on TMJ disorder through the reduction of chemokines production. And the results at each filter waveband were different, which suggested that a difference in potency may be likely.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 14 : 18~24, 2003 Reprint requests to Dr. OHTA)

Key words=Synovial cells, Near-infrared, Chemokine

キーワード=滑膜細胞, 近赤外線, ケモカイン

緒 言

近年, 簡便で副作用の少ない低出力レーザーや近赤外線を用いた光線療法が, 種々の疾患に対する治療に応用されるようになってきている¹⁻³⁾。近赤外線照射は, 光作用と輻射熱とによる組織血流の改善⁴⁾, 神経興奮性の抑制⁵⁾, 筋の弛緩および生体活性物質産生促進⁶⁾などにより, 創傷治癒の促進や疼痛緩和の効果があるとされており, 疼痛をはじめとする顎機能障害の諸症状に対しても有効であることが臨床研究により報告されている⁷⁻¹²⁾。しかしながら, 顎関節症に対する近赤外線照射作用機序の詳細については, いまだ不明な点が多い。

顎関節症は咬合性の慢性外傷性因子, 外来性外傷, 咀嚼筋の緊張や異常習癖および精神的ストレスなどが複合して発症すると考えられている。近年, 顎関節の滑液解析が行われるようになり, 変形性顎関節症患者の滑液中ではInterleukin (IL)-1 β などの炎症性サイトカイン濃度が正常者よりも高値を示すことが報告され¹³⁾, 疼痛との関連が示唆されている。このことから, IL-1 β は顎関節症の発症および進展において重要な役割を担っているものと考えられている。すでに我々は, 培養ヒト顎関節滑膜細胞にIL-1 β を作用させると, IL-8¹⁴⁾およびMonocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1産生量が増加し, さらに3.8 J/cm²のエネルギー密度の低出力半導体レーザーを照射することによりIL-8およびMCP-1産生量が減少するという結果を得ている。

IL-8およびMCP-1は代表的なケモカインで, IL-8はおもに好中球, MCP-1は単球の遊走, 活性化に関与しており, 顎関節症患者の滑液ではIL-8量が上昇していることが報告されている¹⁵⁾。これらのケモカインは生体の恒常性維持に必須であるものの, 産生が過剰になると炎症の増大, 組織破壊を引き起こすものと考えられる。

本研究では, 近赤外線照射が顎関節滑膜細胞にどのような影響を及ぼすのかを検討することを目的とし, 培養ヒト顎関節滑膜細胞にIL-1 β を作用させた後に, 低出力半導

体レーザー照射にてIL-8およびMCP-1産生が抑制されたエネルギー密度(3.8J/cm²)になるよう設定した3種類の波長帯の近赤外線照射を行い, IL-8およびMCP-1の産生を測定し検討を行った。

実験方法

1. 培養ヒト顎関節滑膜細胞

インフォームド・コンセントを行った左側顎関節突起骨折患者の下顎頭摘出術および顎関節形成術施行時に顎関節滑膜を採取し, 顎関節滑膜細胞の初代培養を行った。すなわち, メスにて細分した滑膜を35mmディッシュ内にカバーガラスにて固定し, 20% 牛胎児血清(Fetal calf serum; FCS), penicillin G 100 μ g/ml(萬有製薬), kanamycin 100 μ g/ml(明治製薬), fungizone 250ng/ml(CHROMOGENIX)を含む, Ham F12培地(Gibco Laboratories)にて, 37 $^{\circ}$ C, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂(サンヨーマルチガスインキュベーター MCO-175M)条件下で培養を行った。35mm ディッシュ内にoutgrowthしてきた顎関節滑膜細胞がコンフルエントになった時点を継代数1代とした。得られた顎関節滑膜細胞は, 10% FCSおよび抗生物質を含むHam F12培地を用い37 $^{\circ}$ C, 5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂条件下にて継代培養を行った。培地は3日ごとに交換し, 実験には継代数8~10代の細胞を用いた。

2. 顎関節滑膜細胞の免疫染色法

顎関節滑膜細胞を2穴ラブリックチャンバースライド(Nalge Nunc International)に5 $\times$ 10⁴ cells/wellにて播種し, 10% FCSおよび抗生物質含有Ham F12培地で24時間培養後, 2% FCSおよび抗生物質含有Ham F12培地に交換し, さらに24時間培養した。その後, 培地を取り除きphosphate buffered saline (PBS)で2回洗浄後, 4%パラホルムアルデヒド溶液にて10分間固定した。さらにPBSで2回洗浄し乾燥後, 免疫染色に使用するまで-80 $^{\circ}$ Cにて保存した。細胞の免疫染色は, DAKO LSABキット(DAKO)を用いて行った。一次抗体として細胞

図1 SUPER LIZER HA-2200 LE2改良型

特性マーカーである抗ヒト線維芽細胞マーカー抗体 (Diagnostic Biosystems), 抗ヒトビメンチン抗体 (COSMO BIO Co., LTD), 抗ヒト HLA class II 抗体 (YLEM S.R.L.), 抗ヒトマクロファージマーカー抗体 (YLEM S.R.L.) および抗ヒト樹状細胞マーカー抗体 (COSMO BIO Co., LTD) を用いた。最後にマイヤーのヘマトキシリンにて核染色後, 脱水, 透徹, 封入した。

3. IL-1 β 刺激および近赤外線照射装置

顎関節滑膜細胞を, 24 穴マルチプルプレートに 3×10^4 cells/well にて播種し, コンフルエント確認後, 2% FCS および抗生物質を含む Ham F12 培地に交換し 24 時間培養した。次いで, 1.0U/ml IL-1 β を作用させ, インキュベーター内で近赤外線照射を行った。近赤外線照射装置には, 波長 600~1600nm, 最大出力 2,200mW の SUPER LIZER HA-2200 LE2 改良型 (東京医研) (図1) を用いた。波長は 700-800nm, 800-900nm および 900-1000nm となるよう 3 種類のバンドパスフィルターを設置し, それぞれの波長における近赤外線照射を培養プレートの細胞表面に対して高さ 18cm より垂直方向に光パワー 0.5W にて 1 秒間照射, 1 秒間停止のサイクル照射 (平均パワー密度: $0.056\text{W}/\text{cm}^2$) で 11 分 25 秒間行った。この照射条件で 3 種類の波長帯のエネルギー密度は, いずれも $3.8\text{J}/\text{cm}^2$ である。培養液の存在下および非存在下でレーザー照射を行って調べたところ, 両条件でのエネルギー量に差は認められなかった。このことから培養液中の赤色物質による吸収は軽微と考えられ, 照射時に培養液を取り除かず実験を行った。

4. ELISA 法による IL-8 および MCP-1 の測定

近赤外線照射を行ってから 2, 4, 6 時間後に培養上清を採取し, 使用まで -80°C 下にて保存した。IL-8 および

MCP-1 の測定は, ELISA キット (Biosource International) を用いた。IL-8 および MCP-1 の産生量については, 滑膜細胞数 10^6 個あたりの培養上清中の量に換算して表示した。

5. 統計学的検索

得られたデータは, IL-1 β 刺激のみで近赤外線未照射の群と IL-1 β 刺激後に 700-800nm, 800-900nm, 900-1000nm の 3 種類のバンドパスフィルターを設置した近赤外線を照射した合計 4 群について多重比較 (Scheffe's test) を行い, 危険率 5% 未満を有意な差とした。

結 果

1. 顎関節滑膜細胞の細胞マーカー

顎関節滑膜細胞に対して各種細胞マーカーによる免疫染色を行ったところ, 線維芽細胞のマーカーである線維芽細胞マーカーとビメンチンは染色されたが, マクロファージマーカー, HLA class II および樹状細胞マーカーは染色されなかった (図2)。

ネガティブコントロールは, 一次抗体を作用させず, 二次抗体のみ反応させた。結果は示さないが, 細胞マーカーによる免疫染色では, IL-1 β を作用させたときと作用させないときとは差は認められなかった。

2. 近赤外線照射による IL-8 および MCP-1 産生への影響

顎関節滑膜細胞に IL-1 β を作用させた後に 3 種類の波長帯の近赤外線照射をそれぞれ行い, 2, 4, 6 時間後の培養上清中の IL-8 および MCP-1 量を測定した。

IL-1 β を作用させることにより, コントロールと比較して IL-8 および MCP-1 産生量は増加するが, さらに近赤外線を照射することにより, IL-8 産生量は 2 時間後で 900-1000nm の波長帯において他の 3 群と比較して有意な低下が認められたが, 4, 6 時間後では大きな差は認められなかった (表1)。また, MCP-1 産生量は, 2 時間後において IL-1 β のみ作用させた場合と比較して 3 種類すべての波長帯で有意に低下しており, 4, 6 時間後においても IL-1 β のみ作用させた場合と比較して 3 種類すべての波長帯で低下する傾向であったが有意差は認められなかった (表2)。

考 察

今回我々は, 顎関節滑膜細胞に IL-1 β を作用させた後に近赤外線照射を行い, ケモカイン産生に対してどのような影響を及ぼすかについて検討した。

滑膜細胞は, 電子顕微鏡的にマクロファージ様細胞の A 型滑膜細胞と, 線維芽細胞様細胞の B 型滑膜細胞の 2 種類が存在するといわれている¹⁰⁾。そこで, 得られた滑膜細胞

図 2 顎関節滑膜細胞の免疫染色

a. 線維芽細胞マーカー, b. ビメンチン, c. マクロファージマーカー, d. HLA class II, e. 樹状細胞マーカー, f. ネガティブコントロール (倍率; $\times 400$)
線維芽細胞マーカーおよびビメンチンのみ陽性を示した。

表 1 近赤外線照射による IL-8 産生への影響

刺激	時間		
	2	4	6
Control	1.22±0.17	1.60±0.39	1.69±0.07
IL-1 β	4.56±0.75	8.57±1.17	20.08±2.20
IL-1 β + 近赤外線 (700-800)	4.19±0.71	8.87±0.93	22.28±2.55
IL-1 β + 近赤外線 (800-900)	4.11±0.67	7.95±0.35	21.65±1.39
IL-1 β + 近赤外線 (900-1000)	2.49±0.05	8.02±0.57	21.18±1.54

単位: ng/10⁵ cells, Mean±S.D. (n=3)

*p<0.05: Scheffe's test

表 2 近赤外線照射による MCP-1 産生への影響

刺激	時間		
	2	4	6
Control	14.37±1.66	34.18±3.00	34.46±9.45
IL-1 β	45.71±2.50	77.39±8.03	82.60±7.72
IL-1 β + 近赤外線 (700-800)	18.33±4.58	55.52±1.84	74.50±7.38
IL-1 β + 近赤外線 (800-900)	22.96±2.60	55.56±6.62	81.24±4.90
IL-1 β + 近赤外線 (900-1000)	17.54±1.52	62.70±9.38	76.50±9.32

単位: ng/10⁵ cells, Mean±S.D. (n=3)

*p<0.05: Scheffe's test

胞が A 型滑膜細胞であるのか, B 型滑膜細胞であるのか, その性質を調べるために, 各種細胞マーカー抗体を用い, 免疫染色法にて検討した。今回顎関節から得られた滑膜細胞は, 線維芽細胞に特異的なマーカーである線維芽細胞マーカーとビメンチンで陽性を示した。一方, マクロファージに特異的なマーカーであるマクロファージマーカー, HLA class II, 樹状細胞マーカーは陰性を示したことから線維芽細胞様細胞であることが示唆された。慢性関節リウマチ患者の膝関節滑膜より得られた培養滑膜細胞を用いた検討では, 種々の抗体を用いて細胞マーカーを検索すると, 線維芽細胞マーカーでは陽性であり, 筋細胞マーカー, 平滑筋細胞マーカー, 血管内皮細胞マーカーでは陰性であると報告されている¹⁷⁾。今回得られた滑膜細胞は, 線維芽細胞マーカーのみ陽性であることで一致した。よって, 本実験で初代および継代培養した細胞を, ヒト顎関節滑膜細胞として実験に供することとした。

近赤外線照射による疼痛治療における作用機序については明確にはされていないが, 近赤外線は遠赤外線を含む通常赤外線の中でも水にも血液にも吸収されにくいいため生体深達度が高く, その波長域は半導体や He-Ne などの単一

波長の低出力レーザー波長域を含むものであり, 低出力レーザーとほぼ同じ効果を発現する¹⁸⁾ものと考えられている。さらに, 光源が赤外線灯のために高エネルギーを供給できる特徴を有している。

近赤外線治療は, 歯科領域においては顎関節症の疼痛緩和に対して有効であることが報告されている⁷⁻¹²⁾。その作用機序には不明な点が多いが, 以下のように考えられている。すなわち, 疼痛が発現すると交感神経系の緊張により四肢末梢の血管収縮が起り, それが組織の虚血を導いて発痛物質を放出することにより, さらに疼痛を増強させる¹⁸⁾が, 温熱療法などはこれら末梢組織の血管拡張により疼痛の悪循環を絶つと考えられる。また, 光線療法による交感神経ブロック療法も交感神経のおよぶ末梢領域の血管収縮を改善し, 疼痛の悪循環を絶ち疼痛緩和を導き, これが全身性の交感神経過緊張の抑制に働き全身性の効果を認めるものと考えられている¹⁸⁾が詳細は不明である。

顎関節症に対する近赤外線治療については, 臨床的な研究に比較して生化学的および細胞学的レベルでの研究は, ほとんどないのが現状である。近年, 顎関節症患者の滑液を用いた生化学的な研究から, IL-1 β , Tissue necrosis

factor- α (TNF- α)¹⁹⁾, IL-6²⁰⁾などの炎症性サイトカイン濃度が正常者と比較して高い値を示すことが報告されており, 関節疾患への関与が示唆されている。これらは破骨細胞の骨吸収機能を誘導することから, 細胞外マトリックスや骨代謝において重要な因子として作用していると考えられている。IL-1 β を作用させることにより, コントロールと比較してIL-8およびMCP-1産生量は増加したが, 近赤外線照射を行うと, IL-8産生量は2時間後で900-1000nmの波長帯において有意に低下し, MCP-1産生量は2時間後において3種類すべての波長帯で有意に低下した。IL-8およびMCP-1は, 好中球やマクロファージが遊走・活性化させるケモカインである。これら免疫担当細胞は, 恒常性維持に重要であるものの, 活性酸素や種々の酵素を産生することにより, 組織破壊を引き起こす。また, 多量のIL-1 β やTNF- α を産生するため, 滑膜細胞が刺激されケモカイン産生が上昇するという連鎖が起こるものと考えられる。よって, IL-8およびMCP-1産生量を減少させ, このような連鎖を抑制させることにより, 消炎, 基質破壊抑制効果があると示唆される。

本実験で使用した近赤外線照射装置は, 痛みの治療に用いられる光線の波長である600-1600nmの範囲の近赤外線を, さらに3つの波長帯に分けて, それぞれ先端ユニットを変えることによって照射できるものである。波長600nm以下のものは血中ヘモグロビンに吸収されやすく, 波長1600nm以上のものは水分の吸収率が高くなることから, 波長の違いによる生体への影響は, 生体深達度と波長の持つ固有な光子エネルギーに反映されることが考えられる。よって, 波長帯の違いによりケモカイン産生量に違いが認められたことは, 影響を受けやすい特異的な波長があるものと考えられ, 近赤外線による熱作用も考慮する必要がある。今後さらに詳細に波長帯を分けるような条件を設定するとともに, 培養上清中の温度変化についても検討する必要があると考えられる。

結 論

培養ヒト顎関節滑膜細胞において, IL-1 β 刺激で増加したIL-8およびMCP-1の産生は, 近赤外線照射を行うことによって早期に抑制され, 近赤外線照射が炎症反応の抑制に有用であることが示唆された。また, その効果は近赤外線の波長の違いによって異なる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の一部は, 文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業, および平成14年度日本大学学術研究助成金(個02-115)による。

文 献

- 1) 井上和彦, 千葉純司, 橋本俊彦, 関根千晶: 低出力レーザーの整形外科への応用. 日レ医誌, **22**(1): 31-39, 2001.
- 2) 佐伯 茂: 星状神経節近傍照射の臨床. 痛みと臨, **2**(2): 206-213, 2002.
- 3) 大長珠美, 山田一郎, 式守道夫, 福田廣志, 橋本賢二: 直線偏光型近赤外線治療器 SUPER LIZER HA-550[®]の口腔・顎・顔面領域への応用 一第1報・頸部廓清術後の患者について一. 日レ歯誌, **11**: 35-38, 2000.
- 4) 輪嶋義一郎, 設楽敏朗, 井上哲夫, 小川 龍: 直線偏光型近赤外線治療器(スーパーライザーTM)による星状神経節近傍照射の皮膚温, 皮膚血流量に及ぼす影響. 麻酔, **45**: 433-438, 1996.
- 5) 河合正仁, 土屋喜由: 低出力レーザーによる末梢感覚神経伝導の遮断. ペインクリニック, **16**: 533-539, 1995.
- 6) 小川節郎: Super Lizer (直線偏光近赤外線治療器). 医学, **68**(11): 567-572, 1998.
- 7) 奥田真弘, 天野 蒼, 宗行万之助, 松村佳彦, 田川俊郎: 直線偏光近赤外線照射による顎関節症の治療. ペインクリニック, **16**(6): 905-908, 1995.
- 8) 福原大子, 奥 猛志, 横山幸三, 重田浩樹, 小椋 正: 思春期顎関節症の治療法としてのSUPER LIZER[®]の有効性に関する研究. 小児歯誌, **36**(4): 634-638, 1998.
- 9) 岩片信吾, 野村修一, 鈴木政弘, 櫻井直樹, 斎藤 彰, 河野正司: 顎機能障害に対する直線偏光型近赤外線照射療法の即時的効果. 新潟歯会誌, **25**(1): 43-49, 1995.
- 10) 野村修一, 岩片信吾, 河野正司: スーパーライザー(SL)による光線療法顎関節症への応用. 慢性疼痛, **14**(1): 143-147, 1995.
- 11) Yokoyama, K. and Oku, T.: Rheumatoid arthritis affected temporomandibular joint pain analgesia by linear polarized near infrared irradiation. Can J Anesth., **46**(7): 683-687, 1999.
- 12) Yokoyama, K. and Sugiyama, K.: Temporomandibular joint pain analgesia by linear polarized near-infrared irradiation. Clin J Pain., **17**: 47-51, 2001.
- 13) Takahashi, T., Kondo, T., Fukuda, M., Yamazaki, Y., Toyosaki, T. and Suzuki, R.: Proinflammatory cytokines detectable in synovial fluids from patients with temporomandibular disorders. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., **85**: 135-141, 1998.
- 14) Tobe, M., Ogura, N., Abiko, Y. and Nagura, H.: Interleukin-1 β stimulates interleukin-8 production and gene expression in synovial cells from human temporomandibular joint. J Oral Maxillofac Surg., **60**: 741-747, 2002.
- 15) Endo, H., Akahoshi, T., Takagishi, K., Kashiwazaki, S. and Matsushima, K.: Elevation of interleukin-8 (IL-8) levels in joint fluids of patients with rheumatoid arthritis and the induction by IL-8 of leukocyte infiltration and synovitis in rabbit joint. Lymphokine Cytokine Res., **10**: 245-252, 1991.
- 16) 覚道健治: 滑膜組織. 上村修三郎, 杉崎正志, 柴田孝典編, 顎関節小辞典, 東京, 1990, 日本歯科評論社, 38-41 頁
- 17) 加藤哲司: 慢性関節リウマチ滑膜細胞におけるNF- κ Bの活性化と各種抗リウマチ薬による抑制, 名古屋市大医会誌, **47**: 239-250, 1996.
- 18) 渡部一郎, 眞野行生: 直線偏光近赤外線照射療法の臨床的研究. 臨神生, **29**(1): 29-35, 2001.

- 19) Shafer, D.M., Assael, L., White, L.B. and Rossomando, E.F.: Tumor necrosis factor- α as a biochemical marker of pain and outcome in temporomandibular joints with internal derangements. *J Oral Maxillofac Surg.*, **52** : 786-791, 1994.
- 20) Fu, K., Ma, X., Zhang, Z. Pang, X. and Chen, W.: Interleukin-6 in synovial fluid and HLA-DR expression in synovium from patients with temporomandibular disorders. *J Orofac Pain.*, **9** : 131-137, 1995.