原 著

ソフトレーザー照射後の線維芽細胞の経時的形態変化

高 木 茂 樹 土 肥 宏 樹 中 川 敏 浩
臼 井 龍 一 山 本 茂 久

奥羽大学歯学部口腔解剖学第2講座

(主任：山本茂久教授)

(受理：平成8年1月5日)

Morphological Changes with the Passage of Time of Fibroblasts After Soft Laser Irradiation

Shigeki TAKAGI, Hiroki DOHI, Toshihiro NAKAGAWA,
Ryuichi USUI and Shigehisa YAMAMOTO

2nd Department of Oral Anatomy Ohu University, School of Dentistry

(Chief: Prof. Shigehisa YAMAMOTO)

(Accepted for Publication: January 5, 1996)

Abstract: To elucidate empirical findings about the accelerated wound healing after soft laser irradiation, we examined how soft laser rays activated mouse normal fibroblasts with varying exposure conditions. Then, we observed interesting morphological changes in the fibroblasts under the optimal exposure conditions.

We used a gallium-arsenide diode soft laser system with the mean output of 2mW emitting a beam of 904nm wavelength. The cells tested were fibroblasts from mice. We evaluated various exposure conditions on the basis of the growth of mitochondria defined by MTT colorimetry 24 hours after exposure. Next, cellular exposure was made with the optimal exposure conditions, and compared cells with and without exposure to the soft rays immediately, 5, 10, 15 and 18 hours after exposure for their morphologic changes.

The optimal condition selected for the mouse fibroblasts was 4-minute A mode irradiation repeated three times. The morphologic examination showed that those fibroblasts were originally spindle-shaped immediately after cell division in both groups. Five hours later the fibroblasts without exposure to the soft ray had changed from the spindle-shaped to polygons, while the exposed ones were spindle-shaped with long cytoplasmic filaments. Ten hours later the not exposed cells had changed to big polygonal bodies, while the exposed cells had changed to the spindle shape with several cytoplasmic filaments. Fifteen hours the not exposed cells remained the same polygonal shapes as before, while the exposed cells almost began to divide. Eighteen hours later the not exposed cells had changed in shape from polygonal to spindle-shaped, while the exposed cells had completed the cell division to be spindle-shaped with long cytoplasmic filaments. In summary, it was clearly demon-

strated that the soft laser rays directly act on the fibroblasts to accelerate their cell growth.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 7: 1~5, 1996 Reprint requests to Dr. Takagi)

Key words=Soft laser: Fibroblasts: Morphological changes

キーワード=ソフトレーザー: 線維芽細胞: 形態変化

緒 言

近年、各種の医用レーザーの開発が進み、それらの臨床応用が活発に行われている。とくに歯科領域において、ソフトレーザーが口腔領域の疾患、抜歯創の治癒あるいは骨折治療に応用され、その促進効果が報告^{1,2)}されている。しかしながら、その臨床効果については数多くの基礎的研究が報告³⁻⁸⁾されているにも関わらず、未だ一致した見解を見るに至っていない。

これに対し、高木⁹⁻¹¹⁾は骨系細胞を用い、ソフトレーザー照射が細胞に及ぼす影響を検討した結果、ソフトレーザーは骨系細胞に対し直接作用し、細胞の機能を促進しているとすでに報告している。

加えて今回著者らは、日常経験的に判断されている治癒促進効果を解明すべく第一歩として、ソフトレーザー照射が線維芽細胞の活性化にいかに関与しているかについて、正常マウス線維芽細胞を用い、とくにソフトレーザーの照射条件を検索し、併せて至適条件下における細胞の形態変化を観察したところ興味ある知見が得られたので報告する。

材料と方法

1. 使用したソフトレーザー装置

実験では、SEDATELEC 社製 STOMALASER をソフトレーザー照射装置として使用した。本レーザーは、ガリウム・ヒ素レーザーダイオードを発振源とし、平均出力 2 mW、波長 904 nm で、200 ns のパルスとして放射する近赤外線レーザー装置である。また、レーザーをパルス変調させることにより 7 種類のパルスモード (A~G: 47.5~3040 Hz) の出力が可能であり、これら 7 種類のパルスモードはそれぞれ特異な効果があることが報告されている。

2. 培養方法

実験に用いた細胞は、マウス由来線維芽細胞 Balb/3T3 clone A31 (大日本製薬: 大阪) である。細胞は、Dulbecco's Modification Eagle Medium (DME) (三光純薬: 東京) に牛胎仔血清 (Costa Mesa, CA: USA) を 10% 加え、さらに硫酸カナマイシン (明治製薬: 東京) を 60 μ g/ml の割合で添加した培地で、温度 37°C、湿度飽和状態、CO₂ を 5% 混和した条件にて培

養し、Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS) で作製した 0.003% actinase E (科研製薬: 東京) - 0.02% EDTA で分散、継代した。

3. 細胞の増殖能の測定

マイクロプレート 96 well (平型) (Falcon, Becton, Dickinson, Overseas, Inc: USA) を使用し、非照射群、照射群の各 well 内に 1000 個の細胞を植え込み培地を加え、前培養を 24 時間行なった。照射は、2 または 4 分間照射を照射開始から 2 時間間隔で行い、照射回数については 1~5 回とし、周波数は A (190 Hz), C (760 Hz), E (3040 Hz), F (47.5 Hz) モードを選択使用した (照射群)。なお、この際のレーザーのビーム径は、照射 well 径の 70% 程度であり、エネルギー密度は 1.03 J/cm² である。対照としては、同様の方法で培養し、照射しないものを用いた (非照射群)。

増殖能の測定は、照射 24 時間後にミトコンドリアの増殖を MTT 比色定量法 (EIA リーダー Model 2550 BIO-RAC) を用い行った。

4. 細胞の形態変化の観察

ϕ 60 mm のポリスチレンディッシュ (Falcon, Becton, Dickinson, Cockeysville, MD: USA) 内に 500 個の細胞を植え込み培地を加え、前培養を 24 時間行なった。その後、分裂直後の細胞を選択、一方を照射細胞、他方を非照射細胞とし、細胞レベルで照射が可能なレーザー光照射システム¹²⁾を使用し、至適条件下で照射を行い、照射直後、5, 10, 15, 18 時間後の非照射細胞ならびに照射細胞の形態変化について観察した。なお、照射は細胞核を避け細胞質を標的とした。また、この際のレーザーのビーム径は、 ϕ 1.6 μ m、標本面でのエネルギー量は、レーザー出射口の総エネルギー量の約 35% である。

結 果

1. 照射条件について

1) 2 分間照射

A, C, E, F モードを前培養後から 2 時間間隔でそれぞれ 1~5 回照射した結果、非照射群に比べ照射群において増殖が認められ、照射回数は、各モード群ともに 3 回照射群で増殖を示した。そこで、3 回照射群での周波数においては、A モードは 115%, C モードは 103%,

図 1 Effect of Mode of Two-Minute Laser Irradiation on BALB/3T3 Cells

図 2 Effect of Mode of Four-Minute Laser Irradiation on BALB/3T3 Cells
* P<0.05 Compared to control

E モードは106%, F モードは111%とわずかではあるが他群に比べ A モードで増殖は良好であった (図 1)。

2) 4 分間照射

2 分間照射と同様の条件下で実験を行った結果, 非照射群と比較すると照射群において増殖が認められ, 照射回数は 2 分間照射と同様 3 回照射群で効果的に増殖が認められた。また, それぞれ 3 回照射群における各モードの増殖をみると, A モードは135%, C モードは110%, E モードは108%, F モードは113%と A モードにおいて有意に大きな値を示した (図 2)。

2. 細胞の形態変化について

標的となる細胞に対しレーザー照射が可能なレーザー光照射システムを使用し, 分裂直後の細胞を選択, 照射開始から 2 時間間隔で 4 分間 3 回照射の条件下にて A モードを用い照射した。その結果, 分裂直後の細胞はともに紡錘形を呈していた (図 3)。

図 3 照射直後 (矢印: 照射細胞)

照射 5 時間後の非照射細胞の形態は, 紡錘形から多角形へと変化したのに対し, 照射細胞は長い細胞質突起を有する紡錘形を呈していた (図 4)。

図 4 照射5時間後(矢印:照射細胞)

図 6 照射15時間後(矢印:照射細胞)

図 5 照射10時間後(矢印:照射細胞)

図 7 照射18時間後(矢印:照射細胞)

照射10時間後の非照射細胞は、大きな胞体を有する多角形へと変化したのに対し、照射細胞は数本の細胞質突起を持つ紡錘形へとその形態は変化した(図5)。

照射15時間後の非照射細胞の形態は、照射10時間後の非照射細胞と同様多角形であったのに対し、照射細胞の形態は分裂直前の様相を呈していた(図6)。

照射18時間後になると、非照射細胞は多角形から紡錘形へとその形態は変化したのに対し、照射細胞はすでに分裂を完了し、その形態は長い細胞質突起を有する紡錘形を呈していた(図7)。

考 察

歯科領域においてソフトレーザーが盛んに臨床応用され、とくに口腔領域の疾患あるいは抜歯窩に対し著明な効果があると報告^{1,2)}されている。しかしながら、その臨床効果についての基礎的研究報告³⁻⁶⁾も成されているが、ソフトレーザーが細胞の機能を促進するとの報告がある一方、相反する報告も散見されており、未だ推察の域を脱していないのが現状である。その理由として、照射方法、分析方法、使用する細胞の植え込み数あるいはレーザーの波長、周波数、エネルギー密度など、さまざま

な因子の相異が挙げられる。さらに、レーザー光の生体における吸収率は、レーザーの波長に深く関与することや複雑な生体内機構にあってはレーザーが細胞、組織の活性化にいかに関与しているかについては、不明である。そこで本研究では、この点に着目し、組織透過性が高く、さらに同波長でありながら7可変型式の特徴を備えたストマレーザーを選択し、まず照射条件を検索した。その結果、照射回数は、各モード群ともに4分間3回照射で良好な増殖を認めた。また、周波数においては、Aモードで有意に大きな値を示した。以上、本細胞に対し特異的にAモードで顕著な増殖を示したことは、照射に際しその周波数の選択が極めて重要であることを示唆した結果である。

高木¹¹⁾は、骨系細胞を用い、レーザー照射後にThymidineの誘導体であるBrdUを培養液に添加し、抗体を用い免疫染色を行った。その結果、骨系細胞に対し、Fモード照射群において他群よりDNA合成の促進が顕著であり、ソフトレーザー照射が細胞に対し直接的に作用していると報告している。また著者らは、ヒト表皮角化細胞における増殖能を測定したところ、特定の周波数で良好な増殖を認めた結果をすでに得ている。こ

これらのことを考え合わせると、各種培養細胞に対するソフトレーザー照射の効果を左右あるいは助長する因子はその周波数の違いが決定的であることは明らかである。

そこで、至適条件下における細胞の形態変化では、照射18時間後の非照射細胞は、胞体がやや大きくなるものの分裂の様相は認められなかった。一方、Aモード照射細胞はすでにこの時期に分裂を完了していた。このように、形態学的にもAモードで分裂を早期に認めたことは、ソフトレーザーは細胞に対し、直接的に作用し、細胞の機能とくに増殖能を促進していることが判明した。

いずれにせよ、今回の結果はこれまで経験的に判断されていた照射条件を細胞レベルで証明し、加えて、均一な細胞群からなる実験系において、同波長のソフトレーザーで照射回数や周波数の違いにより細胞の増殖能に大きな違いがみられたことは、極めて興味深い事実である。

結 論

著者らは、日常経験的に判断されている治癒促進効果を解明すべく第一歩として、ソフトレーザー照射が線維芽細胞の活性化にいかに関与しているかについて、正常マウス線維芽細胞を用い、とくにソフトレーザーの照射条件の立場から検索し、併せて至適条件下における細胞の形態変化を観察した結果、以下の結果を得た。

1. 本細胞に対し、照射回数は4分間3回照射において効果的な増殖を示した。

2. 本細胞に対し、各周波数群においてAモードで顕著な増殖を示した。

3. 至適条件下における照射18時間後の照射細胞は、すでに分裂を完了し、その形態は長い細胞質突起を有する紡錘形を呈していた。

以上の結果から、ソフトレーザーは細胞に対し直接的に作用し、至適条件下において細胞の増殖能を促進していることが明らかとなった。

文 献

- 1) 神川喜代男, 大西俊輝, 鈴木正根, 金谷元徳, 柴本 博: 痛みに対するレーザー治療. 日本レーザー医学会誌, 3: 345-348, 1982.
- 2) 清水良一: 低出力レーザー照射による口腔顔面部の炎症性病変の治療効果. 日歯評, 502: 236-242, 1984.
- 3) 長沢明範, 浅井 浩, 山本 肇, 加藤一: レーザーの骨組織修復促進効果に関する試験的研究. 日本レーザー医学会誌, 7: 73-74, 1987.
- 4) Trelles, M. A. and Mayayo, E.: Bone Fracture Consolidates Faster With Low-Power Laser. Lasers in Surgery and Medicine, 7: 36-45, 1987.
- 5) Ohta, A., Abergel, R. P. and Utitto, J.: Laser Modulation of Human Immune System: Inhibition of Lymphocyte Proliferation by a Gallium-Arsenide Laser at Low Energy. Lasers in Surgery and Medicine, 7: 199-201, 1987.
- 6) 新谷博明, 落合 力, 永井哲夫, 野本種邦: 低出力レーザーの基礎的研究II. 細胞 DNA 合成に及ぼす影響について. 日本レーザー医学会誌, 7: 95-96, 1987.
- 7) 山田邦雄, 松井宣夫, 蟹江良一, 大塚隆信, 服部正広, 加藤泰治: 低出力レーザーの関節組織(軟骨, 骨, 滑膜)に及ぼす生体作用. 日本レーザー医学会誌, 10: 93-96, 1989.
- 8) 山田邦雄, 松井宣夫, 大塚隆信, 服部正広, 加藤泰治: 低出力レーザー照射が RA 滑膜培養細胞の DNA 合成能に及ぼす影響について. 日本レーザー医学会誌, 10: 3-10, 1990.
- 9) 高木茂樹, 中川敏浩, 藤山正之, 山本茂久: ソフトレーザーの効果に関する基礎的研究. 日本レーザー医学会誌, 13: 21-26, 1992.
- 10) 高木茂樹, 中川敏浩, 山本茂久: ソフトレーザー照射後の培養細胞の経時的形態変化. 口腔組織培養研究会誌, 3: 1-6, 1994.
- 11) 高木茂樹: 骨系細胞に対するソフトレーザーの効果. (印刷中)
- 12) 高木茂樹, 中川敏浩, 藤山正之, 山本茂久: 培養細胞用半導体レーザー照射システムの試作. 日本レーザー医学会誌, 13: 17-20, 1992.