平成 22 年度日本レーザー医学会総会賞受賞論文**AWARDED ARTICLE****自由電子レーザー照射による関節炎ラットに対する抗リウマチ作用**

久保山 昇^{1,5}, 多田 充裕^{2,5}, 境 武志^{5,6}, 野上 杏子³,
中尾 圭佐³, 早川 建³, 佐藤 勇³, 安孫子 宜光^{4,5}

¹ 日本大学松戸歯学部薬理学講座

² 日本大学松戸歯学部歯科総合診療学講座

³ 日本大学量子研究所

⁴ 日本大学松戸歯学部生化学・分子生物学講座

⁵ 日本大学松戸歯学部口腔科学研究所

(平成 23 年 6 月 14 日受理, 平成 23 年 7 月 12 日掲載決定)

Anti-rheumatic Activities of Free Electron Laser Irradiation on Arthritis in Rats

Noboru Kuboyama^{1,5}, Mitsuhiro Ohta^{2,5}, Takeshi Sakai³, Kyouko Nogami³,
Keisuke Nakao³, Ken Hayakawa³, Isamu Sato³, Yoshimitsu Abiko^{4,5}

¹Department of Pharmacology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

²Department of Oral Diagnosis, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

³Department of Institute of Quantum Science of Nihon University

⁴Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo,

⁵Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

(Received June 14, 2011, Accepted July 12, 2011)

要 旨

Collagen 誘発性関節炎 (CIA) ラットを用いて, 自由電子レーザー (FEL) 照射による抗リウマチ作用を検討した. CIA ラットは, 抗原として collagen と不完全アジュバントを乳化させたエマルジョンを背部皮内に免疫し作製した. 動物は 1 群 5 匹とし, 対照群, CIA 群, CIA ラットに FEL 照射した動物を FEL 群, デキサメタゾンを 0.3 mg/kg を 1 週間に 3 回腹腔内投与した動物を DEX 群とした. FEL 群は, 波長 1,750 nm, 総照射エネルギー密度 5 J/cm², 照射時間 500 および 1,000 秒とし 1 週間に 6 回, 2 週間膝関節部位に照射した. 関節炎の腫脹は, 後肢足蹠の厚さにより評価した. CIA ラットの踵骨および大腿骨上顆の骨吸収は Micro-CT で測定した. 血清中炎症性サイトカインと MMP-3 は, ELISA を用いて測定した. CIA 発症後 2 週目の FEL-500, FEL-1000 群の腫脹抑制率は, 23.3±3.7 %, 31.0±5.8 % を示した. FEL 照射は, CIA ラットの踵骨および大腿骨の骨糜爛と骨吸収を抑制し, 血清中 IL-1β, IL-6, CRP および MMP-3 の上昇を有意に抑制した.

キーワード: collagen 誘発性関節炎, 自由電子レーザー, 足蹠腫脹, Micro-CT (Micro-computed tomography), 炎症性サイトカイン

Abstract

The present investigation was carried out to study the anti-rheumatic activities of free electron laser (FEL) irradiation on hind paw inflammation in rat collagen-induced arthritis (CIA) models. CIA was induced in 6-week-old female Lewis rats by immunization with intradermal injections of bovine type II collagen emulsified in complete Freund's adjuvant. The animals were subdivided into the following groups: control group, CIA group and FEL irradiated CIA group (FEL group). FEL group was irradiated at 1,750 nm with a dose of 5 J/cm² for 500s and 1,000s in knee joints six times a week for 2 weeks. The hind paw swelling was assessed by measuring the thickness of the two hind paws with a digital caliper. The lateral femur bone and hind paw resorption were evaluated by Micro-CT. The serum levels of the inflammatory cytokines and arthritic factor MMP-3 were determined by ELISA. In FEL-500 and FEL-1000 groups at 2 weeks after arthritis induction, swelling inhibition index was 23.3±3.7% and 31.0±5.8 %, respectively. FEL irradiation decreased the bone erosion and reduced the bone resorption in CIA rats. IL-1 β , IL-6 and MMP-3 serum levels were significantly lower in FEL groups.

Key word : Collagen-induced arthritis, Free electron laser irradiation (FEL), Hind paw swelling, Micro-computed tomography (Micro-CT), Inflammatory cytokines

1. 緒言

関節リウマチ (RA) は自己免疫疾患と考えられ、関節滑膜細胞の炎症性増殖が顕著で、滑膜細胞や周辺組織へ増殖肉芽組織であるパンプスが形成され、パンプスから炎症性サイトカインや MMP-3 などのプロテアーゼの分泌が促進して骨・軟骨破壊に至る¹⁻³⁾。

RA に対する光線治療として、我々は、Collagen 誘発性関節炎 (CIA) ラットを用いて、直線偏光近赤外線 (NIR) 照射による抗リウマチ作用を検討した結果、NIR 照射はラット後肢足趾の腫脹と踵骨の骨吸収および骨糜爛を抑制した。また、炎症性サイトカインおよび MMP-3 濃度の上昇を有意に抑制したことから、NIR 照射は実験的関節リウマチに対して有効であることを明らかにした⁴⁾。

一方、近年自由電子レーザー (FEL) は、電子加速器による高エネルギー電子ビームを磁界中で直接光子エネルギーに変換してレーザー光を得るため、発振波長が可変であり、レーザー光への変換効率が高いことから、生体に対して生ずる光化学反応、光熱反応、光衝撃反応を臓器・細胞、DNA の各レベルで制御できる可能性があり、医療・バイオ分野等への応用が進展している^{5,6)}。Fig.1 (a) 現在、その臨床応用として、コレステロールの分解・除去、硬組織の表面改質、細胞内への色素導入等が報告されている。FEL 治療をさらに推進するためには、既存のレーザーと FEL 照射による生体内での相互作用や修飾作用の違いを明らかにする必要がある⁷⁻¹⁰⁾。

そこで、本研究では、ヒト関節リウマチの動物モデルとして広く汎用されている CIA ラット^{11,12)} を用いて、自由電子レーザー (FEL) 照射による抗リウマチ作用を検討した。

2. 材料および方法

2.1 実験動物

実験動物は、6 週齢の Lewis 系雌性ラット (日本チャールス・リバー (株)) を使用した。飼育は室温 23±1℃、

Fig.1(a) Photograph of electron accelerator system utilized in this study.

(b) Observation hindpaw swelling in collagen-induced arthritis rats at 7 day after arthritis induction.

湿度 $60 \pm 10\%$ 、12 時間ごとの明暗サイクルの環境下で、飼料は固形飼料 (MF®, オリエンタル酵母工業 (株)) を、飲料水は濾過水道水をそれぞれ自由摂取させた。1 週間予備飼育した後、一般状態の観察および体重測定を行い、順調に発育した体重 157.3 ± 6.8 g の動物を使用した。なお、本実験は日本大学松戸歯学部実験動物倫理委員会の承認 (承認番号 08-0004) を得、日本大学松戸歯学部実験動物指針に基づいて行った。

2.2 CIA ラットの作製

CIA ラットの作成は、7 週齢の Lewis 系雌性ラットに初回感作として、抗原としてウシ II 型 collagen 0.8 mg および Adjuvant Peptide 0.2 mg を 0.01M 酢酸 0.5 ml に溶解した後、等量の Adjuvant Incomplete に懸濁させ、動物 1 匹当たり 1 ml を 0.1 ml 約 10 ヶ所に分けて背部に皮内投与した。その後、尾根部に同エマルジョン 0.1 ml を 2 回追加免疫して関節炎を発症させた (Fig.1 (b))。

2.3 FEL の照射条件

Fig.1 (a) は FEL 装置の電子線形加速器で、荷電粒子に運動エネルギーを与えて加速し、高いエネルギーの粒子ビームを得るために用い、日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設の FEL 照射装置を使用した¹³⁾。FEL 照射ビームとラット膝関節の距離は 20 cm、照射エリアはラット膝関節を中心にして直径 1.5 cm の均一な照射野で、波長 1,750 nm の 5 ~ 6 J/pulse、照射時間 500 および 1,000 秒間連続照射で、総照射エネルギー密度 5 ~ 6 J/cm² の条件で行った (Fig.2 (a) (b)) 実験期間を 2 週間として、無麻酔下でラット膝関節部位を中心に 1 週間に 6 回合計 12 回照射した。

2.4 関節炎の評価

ラット後肢足蹠の腫脹は、週 1 回実体顕微鏡を用いて、足蹠の側面から両側後肢の足蹠の厚さを計測し、腫脹率および腫脹抑制率を求め平均値を算出して評価した。

2.5 Micro-CT

実験終了後、右側大腿骨および踵骨を摘出し、骨幹端部海綿骨と骨幹部皮質骨の骨形態計測を行った。マイクロ CT (Micro-CT) は、実験動物用マイクロ X 線 CT (R-mCT, リガク (株)) を用いた。撮影条件は管電圧 90 kV、管電流 150 μ A、撮影倍率 10 倍、撮影時間 2 分で 360 度回転し撮影した。画像のボクセル解像度は $20 \times 20 \times 20$ μ m で、ラットの骨微細構造を表示するように設定した。3D イメージは I-view (モリタ製作所) で再構成し、volume rendering により 3 次元画像の再構築を行った。

2.6 実験方法

動物は、最終感作 2 週間後に腫脹率が 90% 以上の CIA ラットを 1 群 5 匹とし 5 群に分け、CIA ラットを CIA 群、CIA ラットに 1 週間に 6 回 2 週間、1 回 500 秒および 1000 秒 FEL 照射したラットをそれぞれ FEL-500 群、FEL-1000 群、CIA ラットにデキサメタゾン (ステロイド性抗炎症剤) を 0.3 mg/kg を 1 週間に 3 回腹腔内投

Fig.2(a) FEL irradiation system image of collagen-induced arthritis rat.

(b) Photograph of FEL irradiation in collagen-induced arthritis rat.

与した動物を DEX 群とした。また、全くの無処置を対照群とした。実験期間中は、動物の一般状態を観察し、週 1 回体重および後肢足蹠の厚さを測定した。また、FEL 照射 2 週目に動物はペントバルビタールナトリウムで腹腔内麻酔下で Micro-CT を用いて、踵骨および大腿骨上顆の CT 画像を得て各群で比較した。

2.7 炎症性サイトカインおよび MMP-3 濃度

FEL 照射 2 週目に、ラットの外頸静脈から採血し、血清のみを採取した。血清中の炎症性サイトカイン濃度は、ELISA kit (R & D System) を用いて、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 および CRP を測定した。リウマトイド因子である MMP-3 (matrix metalloproteinase-3) 濃度は、Assay kit (Cosmo Bio) を用いて 4-アミノフェニール水銀酢酸による活性化法にて励起波長 (330 nm)、蛍光波長 (395 nm) で蛍光強度を測定して算出した。

2.8 統計学的処理

実験結果は、平均値 $\pm$ 標準偏差 (Mean $\pm$ SD) で表した。対照群、CIA 群と FEL-500、FEL-1000 群の各群の比較には Tukey の多重比較検定を行った。危険率 5% ($p < 0.05$) 未満を統計学的に有意な変化として判定した。

3. 結果

3.1 体重変化

体重変化は、Fig.3 に示した。実験開始時の各群の平均体重は 157.3 ± 6.8 g で、初回 collagen 感作後第 2, 3, 4 および 5 群は徐々に体重減少が認められ、4 週間後には対照群と比較すると有意 ($p < 0.01$) な体重減少を示した。実験終了時、対照群は 225 ± 11 g に対して、それぞれ 176 ± 25 g ($p < 0.001$)、 185 ± 27 g ($p < 0.01$)、 186 ± 23 g ($p < 0.01$)、 192 ± 26 g ($p < 0.01$) と有意に体重減少を示した。ただし、各 CIA 群間では平均体重に有意の差は認められなかった。

3.2 CIA ラットの足趾腫脹

CIA ラットの後肢足趾腫脹率の経時的変化は、Fig.4 (a) に示した。実験開始時の各群の平均足趾の厚さは 3.23 ± 0.38 mm で、コラーゲン初回感作後 2, 4 週の腫脹率は、それぞれ $60.2 \pm 7.3\%$ (5.17 ± 0.54 mm)、 $97.8 \pm 10.8\%$ (6.39 ± 0.71 mm) と足趾は急激に腫脹し、後肢に加え前肢にも腫脹が認められた。また、実験には、ラットの足趾腫脹率が 90% 以上の動物を CIA 発症ラットとして使用した。FEL 照射後 2 週目の腫脹率は、CIA 群で $103.6 \pm 11.8\%$ 、FEL-500、FEL-1000 群および DEX 群ではそれぞれ $79.3 \pm 9.6\%$ 、 $71.8 \pm 8.4\%$ 、 $61.6 \pm 7.3\%$ を示した。

腫脹抑制率は、Fig.4 (b) に示した。CIA 群に対して FEL-500、FEL-1000 群および DEX 群の腫脹抑制率は 1 週目で、それぞれ $22.4 \pm 1.8\%$ 、 $29.5 \pm 2.0\%$ 、 $39.4 \pm 3.2\%$ 、2 週目でそれぞれ $23.3 \pm 3.7\%$ 、 $31.0 \pm 5.8\%$ 、 $40.8 \pm 6.2\%$ を示し、各群 2 週目の腫脹抑制率が最も高値を示した。

Fig.5 (a) に FEL 照射 2 週目の対照群、CIA 群、FEL-500 および FEL-1000 群の後肢足趾部位を示した。関節炎はコラーゲン 2 回目感作後から認められ、複数の関節が腫脹したが後肢の足根関節の肥大が最も顕著で、FEL 群および DEX 群は、CIA 群と比較すると肉眼的にも明らかに後肢足趾の発赤・腫脹が軽度で、関節炎の発症が遅延する傾向が観察された。また、CIA 群では、足趾の発赤・腫脹に伴い歩行困難が認められたのに対して、FEL 群および DEX 群は、歩行能の改善が認められた。但し、大腿骨および後肢膝関節部位の腫脹は、対照群と比較して実験群において肉眼的に顕著な変化は認められなかった。

3.3 Micro-CT による踵骨および大腿骨上顆の画像解析

Fig.5 (b)、Fig.5 (c) に実験終了 2 週目、それぞれのラット踵骨と大腿骨の Micro-CT 画像の代表例を示した。CIA 群の踵骨は顕著な骨壊死と骨吸収が認められ、さらに骨密度の低下と中足骨にまで骨破壊が及んでいた。FEL 群と DEX 群は CIA 群と比較すると、踵骨部位の骨壊死と骨吸収は軽度抑制され、中根骨および中足骨の骨吸収も軽減されていた。膝関節部位および大腿骨骨幹端部では、各群で肉眼的および腫脹による厚さの計測では有意差は認められなかった。Micro-CT 画像による大腿骨骨幹端部の組織画像では、CIA 群の大腿骨の骨幹端海綿骨は対照群と比較すると骨梁が少なく粗荒な構造を呈していた。また、海綿骨の骨吸収は顕著で、さらに骨密度の低下が認められた。FEL 群と DEX 群は CIA 群と比較すると、大腿骨の骨幹端部海綿骨の骨吸収は軽度抑制された。

Fig.3 Changes in body weight on FEL irradiation in collagen-induced arthritis rats. Data were shown as the mean $\pm$ S.D. of 5 animals in each group.

** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. control group.

Fig.4(a) Effects of FEL irradiation on hind paw swelling index in CIA rats. Data were shown as the mean $\pm$ S.D. of 5 animals in each group.

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs. CIA group.

(b) Effects of FEL irradiation on swelling inhibition index in CIA rats. Data were shown as the mean $\pm$ S.D. of 5 animals in each group.

3.4 炎症性サイトカインおよび MMP-3 濃度

FEL 照射 2 週目の IL-1 β 濃度は、Fig.6 (a) に示した。対照群は 64.0 ± 4.3 pg/ml に対して、CIA 群は 159.4 ± 19.8 pg/ml と約 2.5 倍の有意 ($p < 0.001$) な上昇を示した。また、FEL-500、FEL-1000 群および DEX 群はそれぞれ 127.0 ± 26.8 ($p < 0.05$)、 124.8 ± 21.8 ($p < 0.01$)、 114.3 ± 16.8 ($p < 0.01$) pg/ml を示し、CIA 群と比較すると有意に減少した。IL-6 濃度は、対照群で 48.3 ± 7.2 pg/ml に対して、CIA 群は 362.8 ± 57.3 pg/ml ($p < 0.001$) と約 7.5 倍の上昇を示した。また、FEL-500、FEL-1000 群および DEX 群はそれぞ

Fig.5(a) Photograph of hind paw in CIA rats at 2 weeks after arthritis induction.

(b) Micro-CT image of the calcaneus bone in CIA rats at 2 weeks after arthritis induction.

(c) Micro-CT image of the femur bone in CIA rats at 2 weeks after arthritis induction.

Fig.6 Anti-inflammatory effect of FEL irradiation on serum levels of CIA rats at 2 weeks after arthritis induction.

(A): IL-1 β , (B): IL-6, (C): CRP, (D): MMP-3

Data were shown as the mean $\pm$ S.D. of 5 animals in each group.

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ vs. CIA group.

れ 288.4 ± 41.7 ($p < 0.01$), 277.0 ± 61.5 ($p < 0.01$), 228.3 ± 34.3 ($p < 0.001$) pg/ml を示し, CIA 群と比較すると有意に減少した (Fig.6 (b)). CRP 濃度は, 対照群で 24.8 ± 3.5 pg/ml に対して, CIA 群は 58.8 ± 8.3 pg/ml ($p < 0.001$) を示した. CIA 群と比較すると FEL-500, FEL-1000 群および DEX 群は, それぞれ 34.2 ± 5.3 ($p < 0.001$), 44.8 ± 11.2 ($p < 0.05$), 28.1 ± 5.8 ($p < 0.001$) pg/ml を示し, FEL-1000 群は FEL-500 群より逆に高値を示した (Fig.6 (c)). なお, 血清中 TNF- α 濃度は, 各群で検出限界以下であった. MMP-3 濃度は, Fig.6 (d) に示した. 対照群で 0.124 ± 0.017 pg/ml に対して, CIA 群は 0.226 ± 0.046 pg/ml ($p < 0.001$) を示した. CIA 群と比較すると FEL-500, FEL-1000 群および DEX 群は, それぞれ 0.157 ± 0.026 ($p < 0.05$), 0.152 ± 0.043 ($p < 0.05$), 0.126 ± 0.024 ($p < 0.001$) pg/ml を示した (Fig.5 (b)). FEL 照射および DEX 群ともに, CIA ラットの血清中炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6, CRP) および MMP-3 値の上昇を有意に抑制した.

4. 考察

関節リウマチは, 増殖性滑膜炎を特徴とする全身性進行性疾患で, 増殖した滑膜組織は慢性的細胞浸潤と血管成分に富む炎症性肉芽を形成し, 関節軟骨・骨の破壊を招く難病である. 近年, その治療法は疼痛を緩和するという治療から, 関節を破壊しない薬物療法に変化している. TNF- α をターゲットとする TNF 阻害薬は, 強力な抗炎症作用と関節破壊抑制効果を持つことから, 臨床で汎用されているが, TNF- α は宿主免疫能力を減弱させるため, 種々の感染症をはじめとする重篤な副作用が報告されている¹⁴⁾. したがって, 副作用の少ない効果的な薬物療法は, 確立されていない.

ウシ II 型 collagen を感作して作製した CIA ラットは, RA 患者にきわめて類似した関節炎を発症し, 血清中に II 型 collagen に対する抗体が出現して自己免疫疾患の症状を示す¹⁵⁾. さらに, 滑膜細胞の増殖と骨・軟骨の破壊と破骨細胞の活性化が見られ, 様々なサイトカインの関与もヒト関節リウマチに酷似している. 本実験でも, CIA ラットは, コラーゲン感作後に関節炎が発症し, 発症部位は主に手・足関節や足趾で, ヒトの RA と類似した腫脹, 発赤, 発熱などの肉眼的所見を呈した.

筆者らの研究グループはこれまでに *In vitro* の実験系で, 関節リウマチ患者由来の膝滑膜細胞に SV40 遺伝子で不死化させた樹立株細胞に IL-1 β , TNF- α を作用させ, 同時に FEL 照射し増殖, 血管新生, 骨・軟骨破壊に関与するといわれているキモカイン IL-8 の産生に対する影響を検討した. その結果, FEL によって産生量の低下がみられた. 次いで, 培養細胞系から mRNA を回収し Affymetrix Gene Chip (47,000 遺伝子) を用いて, トランスクリプトーム解析, Gene Spring 解析ソフトを用いて遺伝子発現のプロファイリングおよび Gene Chip 解析データを情報伝達系コーデータベースを応用して, 抗炎症作用に関与する情報伝達系を検索した. その結果, IL-1 β , TNF- α 刺激細胞は多数の遺伝子発現を変動させ, その中には, 炎症性サイトカイン, キモカイン, 炎症系転写因子が含まれ, 自由電子レーザー照射に

よって、これらの炎症促進に関与する NF- κ B シグナル系, apoptosis シグナル系, cytokine シグナル系の遺伝子群の mRNA レベルの低下が認められた。また, FEL は MH7A 細胞 IL-1 β 刺激による情報伝達系, 特に apoptosis /proliferation, cytokine/chemokine, NF- κ B 系を変動させることで IL-1 β 刺激による炎症促進へのシグナルを抑制することが示唆される¹⁶⁻¹⁸⁾。

次に、腫脹抑制率は FEL-500, FEL-1000 群それぞれ 23.3 $\pm$ 3.7%, 31.0 $\pm$ 5.8% を示し、2 週目の腫脹抑制率が最も高値を示した。FEL 照射は CIA ラットの足趾腫脹を有意に抑制した。CIA ラットはパンヌスから産生された炎症性サイトカインが、組織および関節内に停滞して足趾部位の炎症反応を惹起しており、これを FEL 照射は浸透・散乱しながら組織および関節内循環を改善した結果、後肢および足趾の発赤、発熱および腫脹を抑制したことが示唆される。また、本実験で使用した FEL は、波長 1,750 nm で既存のレーザーより高出力の多波長であるため、生体深達度の高い波長帯で、表皮・真皮を透過して深部組織および関節の血液循環に影響を及ぼしている可能性が示唆される¹⁹⁾。Micro-CT による踵骨側面画像解析から、CIA ラットの踵骨および大腿骨の骨密度の低下と吸収・破壊を FEL 照射により抑制することを明らかにした。骨芽細胞樹立株 (MC3T3-E1 細胞) を用いた培養系実験でも低出力レーザー (LLL) 照射により、アルカリフォスファターゼやコラーゲンの産生量を増大し、骨結節数および骨面積が増加した²⁰⁾。近年、Micro-CT により、骨梁微細構造を三次元的に解析する試みがなされており、踵骨・大腿骨による骨密度および骨梁構造の評価は、骨粗鬆症や代謝性骨疾患を診断、治療効果の判定に手指骨、腰椎などの測定部位とともに臨床では極めて重要である²¹⁾。

次に、RA では、炎症部位で主に活性化マクロファージから産生される炎症性サイトカインが過剰に産生され、関節炎と破骨細胞の誘導を引き起こす²²⁻²³⁾。このため、これらの過剰な炎症性サイトカインを抑制することが重要である。本実験では、CIA 群の IL-1 β および IL-6 濃度の上昇を FEL 群は有意に抑制した。そして、これらの炎症性サイトカインを産生するマクロファージや滑膜細胞に対して FEL 照射が影響を及ぼしていることが示唆される。本研究と類似した実験で、CIA ラットに dexamethasone (DEX) 0.01, 0.1 mg/kg を経口投与するとそれぞれ約 30%, 75% の腫脹抑制率を示し、CIA ラットの IL-1 β 濃度の上昇を DEX はそれぞれ 15, 47% 抑制したことを報告している²⁴⁾。本実験結果と比較すると、FEL 群は 0.01 mg/kg DEX とほぼ同様な腫脹抑制率を示した。ただし、DEX に関しては、0.1 mg/kg 経口投与で 75% の腫脹抑制率に対して、本実験では 0.3 mg/kg 腹腔内投与で 40.8% であった。IL-1 β および IL-6 は RA における骨吸収性サイトカインで、滑膜線維芽細胞の RANKL 発現や MMP-3 などを誘導し、破骨細胞分化を促進して関節破壊に関与する²⁵⁻²⁷⁾。また、*in vitro* の培養細胞系では、我々は、*in vitro* で RA 患者の培養滑膜細胞に LLL を照射すると IL-1 β の産生を抑制することを明らかにした²⁸⁾。さらに、抗炎症作用に関して、ヒト

歯肉線維芽細胞を用いた実験では、LPS 刺激で上昇した PGE₂, IL-1 β および PA 産生量をいずれも LLL 照射により抑制した²⁹⁻³¹⁾。

次に、関節部位の炎症や急性組織障害により活性化されたマクロファージは、炎症性サイトカインを分泌し、それが肝細胞で CRP の産生を誘導して、血中 CRP 濃度を上昇させる¹⁾。本実験では、対照群、CIA 群および FEL 群、それぞれ 23.2 $\pm$ 5.3, 44.8 $\pm$ 6.7, 29.3 $\pm$ 8.1 pg/ml を示し、FEL 照射により CRP 濃度の上昇を有意 ($p < 0.01$) に抑制した。RA の発症・増悪化では、関節滑膜組織から分泌される MMP-3 が軟骨基質のプロテオグリカン分解し、さらに軟骨基質の II 型コラーゲンが露出・分解を受けて軟骨の変性・消失する。従って、MMP-3 は関節リウマチマーカーで濃度の上昇は、関節軟骨の破壊に密接に関与している^{2,32)}。また、MMP-3 の産生に炎症性サイトカインが関わるため、CRP と相関することが報告されている³³⁾。本実験で FEL 照射により、炎症性サイトカインと MMP-3 濃度上昇が抑制されたことから、関節軟骨の変性が抑制されたことを示唆している。*In vitro* の実験で、歯周病原菌由来の LPS でヒト歯肉線維芽細胞を刺激して PGE₂, IL-1 β および PA 産生量の上昇を、いずれも LLL 照射により抑制されており、FEL も同様なメカニズムで抗炎症作用を発揮していることが示唆される^{33,34)}。以上の結果より、FEL 照射はヒトの RA に類似した CIA ラットに対して、足趾腫脹、血清中炎症性サイトカインおよび MMP-3 濃度を抑制し、抗炎症作用および骨破壊抑制作用を示し、RA の治療に対して有効であることが示唆された。今後、光線療法と薬物療法を併用することで、RA 患者のステロイド剤などの投与量を大幅に減量でき、長期投与による薬物療法の副作用を軽減する可能性も示唆される。今後、自由電子レーザーの特徴を生かして波長の差異による生物学的効果の違いを解明することによってレーザー医療の開発に貢献できるものと考えている。

5. 結論

CIA ラットに FEL 照射し、後肢足趾の腫脹の経時的变化、血清中の炎症性サイトカインおよび MMP-3 濃度、Micro-CT による後肢足趾の画像解析を行い以下の結論を得た。①後肢足趾の腫脹を抑制した。②踵骨の骨吸収および骨壊爛と大腿骨の骨幹端部海綿骨の骨吸収を抑制した。③血清中炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6) および MMP-3 濃度の上昇を有意に抑制した。以上の結果から、NIR 照射は関節リウマチの炎症反応の抑制に有効であることが示唆された。

参考文献

- 1) M.J. Plant, A.L. Williams, J.D. Jessop, et al.: Relationship between time-integrated C-reactive protein levels and radiologic progression in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 1473-1477, 2000.
- 2) C. Ribbens, B. Andre, J.M. Jaspard, et al.: Matrix metalloproteinase -3 serum levels are correlated with disease activity and predict clinical response in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 27: 888-893, 2000.

- 3) M. Feldmann, F.M. Brennan, R.N. Maini: Rheumatoid arthritis. *Cell*, 85: 307-310, 1996.
- 4) 久保山昇, 多田充裕, 佐藤裕介, 木場秀夫, 伊藤孝訓, 松井大, 梶原浩喜, 馬場正英, 安孫子直光: 直線偏光近赤外線照射による collagen 誘発性関節炎ラットに対する抗リウマチ作用. *日本レーザー医学誌*, 31(1): 11-17, 2010.
- 5) S. Zhang, T. Chen, L.H. Ge: Scanning electron microscopy study of cavity preparation in deciduous teeth using the Er:YAG laser with different powers. *Lasers Med Sci*, 25: 54-57, 2010.
- 6) I.I. Wernick, T.C. Marshall: Experimental test of the inverse free-electron-laser accelerator principle. *Phys Rev A*, 46:3566-3568, 1992.
- 7) B. Spyropoulos: 50 years LASERS: *in vitro* diagnostics, clinical applications and perspectives. *Clin Lab*, 57:131-142, 2011.
- 8) Y. Pinhasi, Y. Lurie, A. Yahalom: Space-frequency model of ultrawide-band interactions in free-electron lasers. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 71:52-59, 2005.
- 9) Y. Nakajima, K. Iwatsuki, et al.: Medical application of an infrared free-electron laser: selective removal of cholesterol ester in carotid artery atheromatous plaques. *J Neurosurg*, 104: 426-428, 2006.
- 10) K. Aizawa, A. Kameyama, et al.: Influence of free-hand vs uniform irradiation on tensile bond strength in Er:YAG-lased dentin, 10: 295-299, 2008.
- 11) D.E. Trentham, A.S. Townes, A.H. Kang: Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J Exp Med*, 146: 857-868, 1977.
- 12) W. Ando, J. Hashimoto, A. Nampei, et al.: Imatinib mesylate inhibits osteoclastogenesis and joint destruction in rats with collagen-induced arthritis (CIA). *J Bone Miner Metab*, 24: 274-282, 2006.
- 13) Y. Hayakawa, I. Sato, K. Hayakawa, et al.: First lasing of LEBRA FEL at Nihon University at a wavelength of 1.5 μ m. *Nucl Instrum Methods Phys Res A*, 483: 29-33, 2003.
- 14) J. Keane, S. Gershon, R.P. Wise, et al.: Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor α -neutralizing agent. *N Engl J Med*, 345: 1098-1104, 2001.
- 15) M. Tsuji, K. Fujii, T. Nakano, Y. Nishii: 1 α -hydroxyvitamin D3 inhibits Type collagen-induced arthritis in rats. *FEBS Lett*, 337: 248-250, 1994.
- 16) N. Kuboyama, L. Zhang, Y. Abiko, et al.: Reduction of interleukin-1 β expression in rheumatoid arthritis by linear polarized near infrared light irradiation. *Laser Therapy*, 19: 263-269, 2010.
- 17) Zhang. Lin, Zhao. Jian, Kuboyama Noboru, Abiko Yoshimitsu: Low-level laser irradiation treatment reduces CCL2 expression in rat rheumatoid synovia via a chemokine signaling pathway. *Lasers Med Sci*, 26:103-113, 2011.
- 18) L. Zhang, H. Kajiwar, N. Kuboyama, Y. Abiko: Reduction of CXCR4 expression in rheumatoid arthritis rat joints by low level diode laser irradiation. *Laser Therapy*, 20: 53-58, 2011.
- 19) 小森万希子: 低出力レーザーおよび直線偏光近赤外線照射の皮膚微小循環に対する効果. *日レ歯誌*, 19: 26-29, 2008.
- 20) Y. Ozawa, N. Shimizu, Y. Abiko, et al.: Low-energy laser irradiation stimulated bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*, 22: 347-354, 1998.
- 21) T. Sone, T. Tamada, Y. Jo, et al.: Analysis of three dimensional microarchitecture and degree of mineralization in bone metastasis from prostate cancer using synchrotron microcomputed tomography. *Bone*, 35: 432-438, 2004.
- 22) M. Feldmann, F.M. Brennan, R.N. Maini: Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu Rev Immunol*, 14: 397-440, 1996.
- 23) F.A. Houssiau, J.P. Devogelaer, S.J. Van, et al.: Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum*, 31: 784-788, 1988.
- 24) S. Cuzzocrea, E. Mazzon, R.D. Paola, et al.: Effects of combination M40403 and dexamethasone therapy on joint disease in a rat model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 52:1929-1940, 2005.
- 25) W. Boyle: Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423:337-342, 2003.
- 26) T. Suda: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, 20:345-357, 1999.
- 27) M.M. Sandra, J. Anamaria, N. Jamil: Low-level laser therapy on hands of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*, 30: 147-154, 2011.
- 28) H. Takayanagi: Involvement of receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synovialocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43: 259-269, 2000.
- 29) T. Takema, M. Yamaguchi, Y. Abiko: Reduction of plasminogen activator activity stimulated by lipopolysaccharide from periodontal pathogen in human gingival fibroblast by low-energy laser irradiation. *Laser Med Sci*, 15: 35-42, 1999.
- 30) K. Nomura, M. Yamaguchi, Y. Abiko: Inhibition of interleukin 1 β production expression in gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. *Lasers Med Sci*, 16: 218-223, 2001.
- 31) Y. Sakurai, M. Yamaguchi, Y. Abiko: Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*, 108: 29-34, 2000.
- 32) I. Ishikawa, F. Nishigaki, S. Mutoh, et al.: Prevention of progressive joint destruction in collagen-induced arthritis in rats by a novel matrix metalloproteinase inhibitor, FR255031. *British J Pharm*, 144: 133-143, 2005.
- 33) G. Huet, R.M. Flipo, C. Thiebaut: Measurement of Elastase and Cysteine Proteinases in Synovial Fluid of Patients with Rheumatoid Arthritis, Sero-Negative Spondylarthropathies, and Osteoarthritis. *Clin Chem*, 38: 1694-1697, 1992.
- 34) Y. Sakurai, M. Yamaguchi, Y. Abiko: Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur J Oral Sci*, 108: 29-34, 2000.

著者紹介

久保山 昇 (Noboru Kuboyama)

1973 年, 日本大学理工学部卒業. 1991 年, 日本大学松戸歯学部薬理学講座専任講師. 2007 年, 日本大学松戸歯学部口腔分子薬理学講座准教授. 2011 年, 日本大学松戸歯学部薬理学講座教授. 歯科基礎医学会 (評議員), 日本薬理学会 (評議員).

多田 充裕 (Mitsuhiro Ohta)

1988 年, 日本大学松戸歯学部卒業.
1992 年, 日本大学大学院松戸歯学研究科博士課程修了(口腔診断学専攻).
2007 年より日本大学松戸歯学部歯科総合診療学講座講師, 現在に至る. 日本顎関節学会認定医, 日本口腔診断学会指導医.

境 武志 (Takeshi Sakai)

生年月日: 1976 年 10 月 26 日. 2004 年, 日本大学大学院理工学研究科博士後期課程(量子理工学専攻)修了. 日本大学量子科学研究所高エネルギー加速器研究機構加速器研究施設研究員, 現在に至る.

野上 杏子 (Kyouko Nogami)

生年月日: 1977 年 2 月 10 日. 2004 年, 日本大学大学院理工学研究科博士後期課程(物理学専攻)修了. 日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設ポスドクター, 現在に至る.

中尾 圭佐 (Keisuke Nakao)

生年月日: 1977 年 6 月 19 日. 2006 年, 日本大学大学院理工学研究科博士後期課程(量子理工学専攻)修了. 日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設助手, 現在に至る.

早川 建 (Ken Hayakawa)

生年月日: 1949 年 4 月 6 日. 1978 年, 東北大学大学院理学研究科博士後期課程(原子核理学専攻)修了. 日本大学量子科学研究所電子線利用研究施設教授, 現在に至る.

佐藤 勇 (Isamu Sato)

昭和 38 年, 東北大学大学院理学研究科卒業. 東京大学原子核研究所助手, 高エネルギー物理学研究所加速器研究部教授, 総合大学院大学数物科学研究科加速器理学教授, 日本大学原子力研究所教授, 現在に至る.

安孫子 宜光 (Yoshimitsu Abiko)

昭和 47 年, 日本大学歯学部卒業. 昭和 53 年, 米国アラバマ大学客員講師(昭和 55 年迄). 平成 4 年, 日本大学教授(松戸歯学部, 生化学講座), 現在に至る.

平成 9, 10, 14 年, 文部省学術審議会専門委員(科研費第一段審査担当委員).

平成 18 年~, 文部省学術審議会専門委員(科研費第二段審査担当委員). 平成 15-19 年, 厚生労働省専門委員(歯科医師国家試験委員, 幹事委員). 平成 17 年~, 日本学術振興会特別研究員等審査会専門委員. 平成 18 年~, 文部科学省大学設置・学校法人審議会専門委員(大学設置分科会). 中国第武漢大学口腔医学院客員教授, 名誉教授, 米国ルイジアナ州立大学医学センター研究教授, 中華民国台北医学大学客員教授. 日本歯科基礎医学会(理事 1998 ~ 2000 年, 歯科基礎医学会雑誌編集委員 1995 ~ 1999 年, 常任理事 2006 ~ 2012 年), 日本生化学会(評議員 1992 年~); 国際歯科研究学会日本部会(JADR)(理事 1999 年~, 事務局長 2001-2002 年, 会長 2002 年~); 国際歯科研究学会(IADR)(学会誌 J Dental Res 編集委員, Pan Asia Pacific Federation (PAPF), 会長 2004 ~ 2005 年; Regional Board Member, 2006 ~ 2008 年; 日本歯周病学会(理事 2005 年~, 日本歯周病学会誌 編集委員 2003 年~; 日本レーザー歯学会(評議員 2000 年, 理事 2001 年~, 学術委員会副委員長 2003 年~).