低出力レーザー照射の骨形成促進作用 —培養骨芽細胞へのレーザー照射実験を中心に—

山田邦雄, 松井宣夫, 蟹江良一, 太田弘敏,
大塚隆信, 服部正広, 脇田 郷,
加藤泰治*, 杉本吉彌**

名古屋市立大学医学部整形外科

同

分子医研生体制御*

八田なみき病院**

Stimulating Effect of Low Power Laser Irradiation on Bone Regeneration —Laser Irradiation on Cultured Osteoblasts—

Kunio YAMADA, N. MATSUI, R. KANIE, H. OHTA,
T. OTSUKA, M. HATTORI, S. WAKITA,
T. KATO*, and Y. SUGIMOTO**

Departments of Orthopaedic Surgery and
Bioregulation Res.*, Nagoya City Univ.
Medical School, and Hatta Namiki
Hospital**

enlargement of the Golgi apparatus in the laser-treated cells. In clinical use, laser therapy was given to eight patients with fractures, and we obtained good results. These findings suggest that laser irradiation photoactivates osteoblastic cells, accelerates osteoblastic calcification as well as cell proliferation, and therefore, could promote bone regeneration. Laser therapy might be of therapeutic value as a promising modality for fractures.

Abstract

We have performed *in vitro* experiments of laser irradiation on osteoblastic cells to investigate the effect on cell differentiation and calcification. Clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1) were exposed to Helium-Neon laser beam at various energy densities. ^{45}Ca accumulation was enhanced by laser irradiation at 1.0 J/cm^2 , with four sessions of irradiation resulting in a 46% increase as compared with the control. In contrast, no significant increase in alkaline phosphatase activity was produced by laser irradiation. Electron microscopic observation revealed a tendency of

はじめに

近年、低出力レーザーが生体に及ぼす様々な生物学的作用が注目されている。低出力レーザー照射が創傷治癒を促進することは広く認められており、その効果は、軟部組織の損傷ばかりでなく、骨の損傷、つまり骨折に対しても、その治癒過程を促進するという報告がある。しかし、その作用機序は明らかではなく、臨床応用はほとんど行われていない。我々は、骨形成の場で最も重要な役割をする細胞のひとつである骨芽細胞に対する低出力レーザー照射の影響を調べている。今回は、株化骨芽細胞の分化と石灰化に及ぼす影響を検討したので、若干の臨床経験とともに報告する。

図1 Changes of ^{45}Ca accumulation by laser irradiation.
Values are means $\pm$ SEM for four cultures.
* $P < 0.05$ compared to the control

1. 培養骨芽細胞へのレーザー照射実験

材料および方法

培養細胞として、マウス頭蓋冠由来の株化骨芽細胞MC3T3-E1を用いた。レーザー装置は泉工医科工業製の連続波Helium-Neon(He-Ne)レーザーで、波長632.8nm、出力8.5mW $\pm$ 20%(実測11.5mW)であった。照射実験にあたり、ビーム径をレンズ系により照射well径に合わせて広げ、パワー密度を3.03mW/cm²とした。照射方法は、 3×10^4 個の細胞を12-well plastic dish(well径22mm)に播種し、10%牛胎児血清を添加した α -MEM培地で6日間培養したものを照射実験に使用した。石灰化に関する実験では、石灰化を促進させるため、さらに5mM β -glycerophosphateを培養液に加えた。種々のエネルギー密度(0, 0.01, 0.1, 1.0 J/cm²)で1回および連日4回照射し、1回の照射時間は各々0, 3.3, 33, 330秒であった。

アルカリフォスファターゼ(ALP)活性は、最終照射後3日目にを基質と

して測定し、蛋白量あたりの活性を算出した。

^{45}Ca 取り込み量は、照射後経時的に各wellの培養液中に1 $\mu\text{Ci/ml}$ の $^{45}\text{CaCl}_2$ を加え、48時間のパルスラベルを行い、細胞および基質層中に取り込まれた ^{45}Ca の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。同時に、生細胞数を血球計算盤にて算出した。組織学的には、各試料の光顕標本を作成し、ALP染色とvon Kossa染色を施した。また、培養細胞の電顕的観察も行った。さらに、レーザー照射の熱効果の影響を調べるために、照射実験中の培養液の温度をモニターし、照射直前直後の温度を測定した。

結 果

ALP活性は、非照射群では、培養9日目で76.8 $\pm$ 3.9mU/mg protein, 培養12日目で158.3 $\pm$ 4.1mU/mg proteinであり、培養細胞が高密度状態になると急速に高くなった。しかし、照射群でも同様の傾向を示し、レーザー照射による明らかな上昇は認めなかった。細胞数あたりの ^{45}Ca 取り込み

図2 Electron micrograph of MC3T3-E1 cells on the 18th day of culture. Enlargement of the Golgi apparatus (G) is observed in the laser-treated cells.

量は、非照射群においても経時的に増加したが、照射群では、非照射群と比較し、 $1.0\text{J}/\text{cm}^2$ 照射した試料が取り込み量の増加傾向を示した。特に、 $1.0\text{J}/\text{cm}^2$ のレーザーを連日4回照射した後には有意の増加を認め、最終照射後4日目では取り込み量が46%増加していた(図1)。

組織学的には、培養9日目と12日目のALP染色ではレーザー照射による明らかな変化はなかった。また、培養18日目の細胞のvon Kossa染色では、照射群、非照射群ともに、所々に結節状の石灰化と思われる像を認めたが、照射群の方がやや強い陽性を示した。培養18日目の細胞の電顕的観察では、非照射群の細胞と比較し、照射群の細胞にゴルジ装置の拡大傾向が認められ、分泌能の亢進をうかがわせた(図2)。

培養液の温度測定では、レーザー照射による明らかな温度上昇を認めなかった。以上より、低出力レーザー照射が熱効果以外の作用により、株化骨芽細胞の石灰化を促進させることが明らかとなった。

2. 臨床経験

以上の基礎的実験の結果に基づき、低出力レーザー照射の臨床応用を試みた。手の指骨や橈骨遠位端など骨の輪郭が体表より触知可能な骨折8例を対象とし、症例7を除き新鮮な骨折にレーザー治療を行った。照射方法は、原則として、1回10分間隔日で週3回、体表より照射距離5cmにてレーザーを照射した。骨折の主な治療法は、ギプスや副子による外固定で、ギプス固定中の骨折に対しては、照射部位を開窓してレーザー照射を行った。照射回数は5回から35回で、全例にX線像上骨癒合を認めた(表1)。

考 察

低出力レーザー照射の骨形成促進作用、骨折治療促進作用に関する研究報告としては、*in vivo*での病理組織学的研究が散見される¹⁾。また、その臨床応用として、Urazalin[®]²⁾は51例の下顎骨骨折にレーザー治療を行い、固定期間を短縮し得たと述べている。

低出力レーザー照射が骨形成を促進する作用機序として、局所血液循環の増加、プロスタグランジンE₂の関与、骨形成にあずかる各種細胞自体に対するbiological effects(細胞増殖・分化の促進)などが考えられているが、いまだ不明な点が多い。現在、骨誘導因子として、電気刺激療法の有効性が実験的、臨床的に確認されており³⁾、低出力レーザーの電磁波としての作用が骨形成促進に働いていると考えられる。

今回の実験で、低出力レーザー照射により培養骨芽細胞の⁴⁵Ca取り込み量は促進されたが、ALP活性には明らかな変化を認めなかった。この理由として、非照射群のALP活性の上昇が非常に急速であったことが考えられる。我々は、前回の実験で、低出力レーザー照射が低密度状態の株化骨芽細胞、いわゆる、未分化な骨原性細胞の増殖を促進することを明らかにした⁴⁾。今回の実験結果より、低出力レーザー照射は、それだけでなく、骨芽細胞に直接作用することにより、その石灰化も促進することが示唆された。

表 1 低出力レーザーを照射した骨折症例

症例	年齢・性別	骨折部位	治療法	照射回数	照射期間	総照射エネルギー
1	30・男	中指末節骨	副子固定	11	2 週	56.1 J
2	17・男	中指基節骨	ギプス固定	5	1 週	25.5 J
3	11・男	母指中手骨	副子固定	12	4 週	61.2 J
4	19・男	母指中手骨	観血的骨接合術	8	2 週	40.8 J
5	89・女	橈骨	ギプス固定	13	4 週	66.3 J
6	11・男	橈骨	ギプス固定	9	3 週	45.9 J
7	12・男	胫骨	観血的骨接合術 ギプス固定	35	14 週	178.5 J
8	73・女	第1趾基節骨	副子固定	14	4 週	71.4 J

骨折に対する低出力レーザー治療は、体表に接触せずに行えるため感染の危険がなく、軟部組織の創傷治癒も促進するため、開放骨折に対しても応用可能である。また、組織の温度を急激に上昇させることがないので、内固定を行った手術症例にも照射できる。しかし、He-Neレーザーの組織深達度は、体表から照射した場合、間接光で10～15mmといわれ、深部の骨折に対しては効果が少ないと思われる。

結 語

1. 株化骨芽細胞MC3T3-E1を用いて、低出力レーザー照射の細胞分化と石灰化に及ぼす影響を検討した。
2. 低出力レーザー照射が骨形成を促進する作用機序として、未分化な骨原性細胞の増殖を促進するだけでなく、骨芽細胞に直接作用することにより、その石灰化も促進することが示唆された。
3. 臨床応用として、8例の骨折にレーザーを照射し、良好な結果を得た。

4. 低出力レーザー照射は、骨折治癒を促進する治療法として期待できる。

文 献

- 1) Trelles MA and Mayayo E : Bone fracture consolidates faster with low-power laser, Lasers Surg Med, 7 : 36-45, 1987.
- 2) Urazalin ZhB, Tuleuov KT, Kurmangaliev ZK, et al. : Laser therapy as part of comprehensive treatment for mandibular fractures, Stomatologiia (Mosk), 62(1) : 34-35, 1983.
- 3) 松永俊二、酒匂 崇 : 骨折治療に対する電気刺激療法、整形・災害外科、32 : 1187-1194, 1989.
- 4) 山田邦雄、松井宣夫、蟹江良一ほか : 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(3) : 93-96, 1989.