低出力レーザー照射後の培養細胞の経時的観察

高木茂樹、中川敏浩、山本茂久

奥羽大学 歯学部 口腔解剖学第2講座

Dynamic observation on culture cells by SOFT LASER irradiation.

Shigeki Takagi, Toshihiro Nakagawa, Shigehisa Yamamoto

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

Abstract

The SOFT LASER has been used in a wide range of applications. However, the mechanism of in the SOFT LASER has not yet been elucidated.

In order to clarify the effects of the SOFT LASER, we constructed a laser irradiation system to irradiate individual cells in vitro.

We used the apparatus to investigate the morphological changes of osteogenic MC3T3-E1 cells.

As compared with the non-irradiated group, the irradiated group well proliferated.

Especially, the F mode irradiated cell multiplied by cell division 18hours later.

These results suggest that the biological and direct effects are clarified by the SOFT LASER.

緒言

近年、歯科領域における低出力レーザーは、広範囲にわたり臨床応用され、創傷・難治性潰瘍の治療促進効果、消炎効果、鎮痛・疼痛緩解効果、知覚障害・神経麻痺改善^{1~6)}等など、著明な効果があると報告されている。しかしながら、

その効果についての基礎的研究報告は少なく⁷⁾、低出力レーザーがどのような過程を経て、組織あるいは細胞に対して作用しているかはまったく不明である。また、生物学的作用についても未だ十分に解明されておらず、その臨床応用についての意義は必ずしも確立されているとは言

い⁸⁾。
難い。

そこで今回我々は、低出力レーザーの細胞・組織レベルにおける生物学的作用やその直接的作用を明らかにするためには、微小環境を培養系に移してレーザーを照射し、照射後の細胞の形態変化を経時的に観察することが極めて有用であろうと考え、これらの作用を明らかにする第一歩として、個々の細胞単位レベルでのレーザー照射が可能なレーザー光照射システム(図1)を開発し、培養下で骨芽細胞に分化し、骨組織を形成する能力を有する骨原性細胞株を用い、至適条件下での細胞の形態変化について検索したので報告する。

材料・方法

実験に用いた細胞は、C57BL/6マウス新生仔頭蓋冠より樹立した骨原性細胞株(MC3T3-E1)である。

また、実験には、SEDATELEC社製STOMALASERを低出力レーザー照射装置として使用した。STOMALASERは、ガリウム・ヒ素レーザーダイオードを発振源とし、出力2mW、波長904nmで、200nsのパルスとして放射する近赤外線レーザー装置である。STOMALASERは、レーザーをパルス変調させることによって7種類の周波数モード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のあることが報告されている。そこで今回は、骨疾患に有効とされているFモード(47.5Hz)を選択し、開発したレーザー光照射システムを使用し、分裂直後の培養細胞を用い、一方を照射細胞、他方を非照射細胞とし、照射後の細胞の形態変化について観察した。

1. 顕微鏡本体
2. レーザー照射光学系
3. レーザー装置
4. ピンホール照射機構
5. 光路切換装置
6. TVモニター装置
7. アイセーフ機構

図1 レーザー光照射システム

結果

照射2時間後では、非照射細胞は星形に近い形態をしていたのに対し、照射細胞の形態は、紡錘形を呈していた。

照射4時間後では、非照射細胞は短い細胞質突起と小さな胞体を有する星形であり、照射細胞の形態は細長い紡錘形へと変化した。

照射6時間後では、非照射細胞の形態は、やや胞体が大きくなるものの突起を有する星形であったのに対し、照射細胞は紡錘形から多角形へと変化した。

照射8時間後では、非照射細胞は照射後6時間後の形態とほぼ同様突起を有する星形であったのに対し、照射細胞は、突起を有する多角形から大きな胞体を有する紡錘形へとその形態は変化した。

照射12時間後では、非照射細胞はやや胞体が大きくなるもののその形態は星形を呈していたのに対し、照射細胞の形態は、紡錘形から大きな胞体を有する多角形へと変化した。

照射14時間後では、非照射細胞の形態は、星形から多角形へと変化した胞体も大きくなり、一方、照射細胞の形態は、かなり大きな胞体を有する多角形を呈していた。

照射15時間後では、非照射細胞の形態は、多角形から紡錘形へと変化した、照射細胞は、2本の長い細胞質突起を有する紡錘形とその形態は変化した。

照射16時間後では、非照射細胞は紡錘形を呈し、その形態は照射8時間後の照射細胞とほぼ同様であったのに対し、照射細胞はすでに分裂を完了し、長い細胞質突起を有する形態を呈していた。

考察

レーザー光照射システムを用い、細胞の経時的形態変化を観察した結果、照射14時間後までの非照射細胞は、胞体はやや大きくなるものの、顕著な形態変化は認められなかった。これに対し、照射細胞は紡錘形からかなり大きな胞体を有する多角形へと変化した。さらに、照射16時間後では、非照射細胞は紡錘形に変化したのに対し、照射細胞はすでに分裂を完了し、長い細胞質突起を有する形態を呈していた。

要するに、骨系の細胞に対し、骨疾患に有効とされるFモードで細胞分裂の活性化が認められたことは、低出力レーザーの細胞に対する直接的作用あるいは生物学的効果を形態学的に裏付けるものであり、加えてこれまで経験的に判

断されていたレーザーの生体組織への作用を細胞レベルで明らかにした。

In vitroにおけるこの事実は、臨床において低出力レーザーの骨成長・骨修復促進作用についての研究の中で、骨折および骨移植部に各種低出力レーザーを照射することにより、治癒が促進する⁷⁾という報告や骨折部に低出力レーザーを照射することにより骨膜・新生骨梁の厚さが増し、豊富な骨芽細胞を認めた⁹⁾という報告を裏付ける事柄として重要な成果であると考えられる。

結論

低出力レーザーの作用機序を解明する目的の第一歩として、開発したレーザー照射システムを使用し、培養下で骨組織を形成する能力を有する正常細胞由来の骨原性細胞株MC3T3-E1を用い、低出力レーザー照射がどのような影響を及ぼすかについて検討した。その結果、至適条件下で照射を行った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、低出力レーザーは細胞に対し直接的に作用し、細胞の機能発現を促進していることが明かとなった。

参考文献

- 1) Plog, F. M. W.: Lasers in Medicine. John Willey and Sons, Chichester-New York, Brisbane Toronto: 21-37, 1980
- 2) Mester, E.: Lasers in Medicine, Laser application in promoting of wound

healing, John Willey and Sons, Chichester-New York, Brisbane Toronto: 83-95, 1980

- 3) 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
- 4) 武井秀憲ほか：Nd:YAGレーザー及びCO₂レーザーの微小血管構造に及ぼす効果, 日本レーザー医学誌, 5(3) : 351-354, 1985
- 5) 森川公博ほか：Ga-As半導体レーザーの治療効果に関する実験的研究, 日歯保誌, 29 : 787-795, 1986
- 6) 松本光吉, 白須賀哲也：象牙質知覚過敏症に対する光化学療法, 日本医学会誌, 6 : 247-250, 1986
- 7) 長沢明範ほか：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
- 8) 渥美和彦：レーザー医学の現況についての展望, 日本臨床, 45 : 685-696, 1987
- 9) Trelles, M. A. and Mayayo, E. : Bone fracture consolidates faster with low-power laser, Lasers Surg Med, 7 : 36-45, 1987