低出力レーザー照射による細胞内カルシウム動態の関与

渡辺 智、守本祐司、飯塚 仁、杉峰啓憲、薬師寺忠幸、松尾洋孝、
早川あけみ*、荒井恒憲、菊地 眞

防衛医科大学医用電子工学、*名古屋大学医学部細胞機能解析研究室

Change in Intracellular Calcium Level by Low Power Laser Irradiation

Satoru Watanabe, Yuji Morimoto, Jin Iizuka, Yoshinori Sugimine,
Tadayuki Yakusiji, Hirotaka Matsuo, Akemi Hayakawa*,
Tsunenori Arai, and Makoto Kikuchi

Department of Medical Engineering, National Defense Medical College

*The Equipment Center for Research and Education, Nagoya Univ., School of Medicine

Abstract

Many researchers have reported that low power laser relieves inflammation, pain and promotes healing of injury. To clarify the biological effect of low power laser, we investigated the influence of low power laser on proliferation potency, apoptosis and intracellular calcium level of T-cell. Either T-cell from BALB-c mouse or Molt-4 (Human T-cell leukemia cell) was irradiated with a semiconductor laser (wavelength = 830 nm, intensity = 50 mW/cm²). The irradiation period was set to 4 s, 40 s, 400 s. After staining the T-cell with Propidium Iodine dye, apoptotic cell was counted by a flowcytometer. Changes in density of intracellular calcium was measured with the combination of calcium sensitive fluorescent dye (Fluo-3) and a fluorospectrophotometer. The laser irradiation did not induce apoptosis of either T-cell with any irradiation period. The number of either cell was unchanged. The density of intracellular calcium of either cell was also unchanged. We concluded the low power laser at 830 nm may not affect metabolism of the T-cell line.

<緒言>

1970 年代初頭より、低出力レーザーによる消炎、鎮痛および傷創治癒促進効果の臨床知見が数多く報告されている。しかし、その作用機序の詳細についていまだ結論を見ていない。最近、生体組織の機能発現にアポトーシス現象の重要性

が注目されている。そこで今回は低出力レーザーによるアポトーシス発現への影響を調べ、さらにアポトーシスに深くかかわりあるカルシウム動態につき検討を加えた。

＜実験材料・方法＞

材料は、非増殖性の細胞と増殖性の細胞の2通りを用いて検討した。非増殖性の細胞として6～8週令雄性 BALB-cマウス胸腺から採取したT細胞を用いた。また、増殖性の細胞としてヒトT細胞白血病細胞であるMolt-4を用いた。BALB-cマウスの細胞は $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、0.4 mlを24穴ウェルに播種した。Molt-4は、 $0.5 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、同様に播種した。両細胞とも培地にはRPMI-1640を用いた。播種1時間後、レーザー照射し、24時間静置培養した。レーザーの照射条件は、波長830 nm半導体レーザーを用い、照射強度は $50 \text{ mW}/\text{cm}^2$ とし、照射時間は0 s, 4 s, 40 s, 400 sの4通り設定した。

細胞数変化をWST-1アッセイキットで測定した。アポトーシス細胞の数は、Vindelov⁽¹⁾らの方法により細胞を処理し、Propidium Iodine染色後フローサイトメトリーを用いて細胞周期およびDNA含量を測定することによって求めた。細胞内Ca動態は、Ca感受性色素Fluo-3-AMを細胞に取り込ませた後、カルシウムイオノフォアA23187を負荷し、蛍光分光光度計で測定した。

＜実験結果＞

図1はレーザー照射17時間後の細胞数を示している。BALB-c細胞、Molt-4ともに群間によって15%程度のばらつきはあったが、有意差は認められなかった。図2はレーザー照射24時間後のアポトーシスの様子を示している。照射時間とともに増加する傾向にあったが、それぞれの群間で有意差は見られなかった。図3はレーザー照射17時間後におけるカルシウムイオノフォア（A23187）に対するCa濃度の増加を示している。

ここでもそれぞれの群間で有意差は認められなかった。

図1 レーザー照射17時間後の細胞数変化
縦軸は非照射時の細胞数を対照としたときの相対的数値

図2 レーザー照射24時間後のアポトーシス
縦軸は全細胞数に占めるアポトーシス細胞の割合

図3 レーザー照射17時間後の細胞内Ca濃度
縦軸=A23187負荷後の細胞内Ca濃度/A23187負荷前の細胞内Ca濃度

<考察>

今回の実験では、細胞数、アポトーシスの程度、細胞内Ca濃度のいずれの測定項目においても低出力レーザー照射による変化を認めなかった。

Karuらは低出力レーザーの効果として増殖期にある細胞の増殖効果を挙げており、照射エネルギーが $0.1 \sim 1 \text{ J/cm}^2$ のとき最大の効果があると報告している(2)。今回の実験では、4-40 s照射が同等のエネルギーレベルにあたる。しかし、非増殖性細胞 (BALB-c由来のT-cell) のみならず、増殖性細胞 (Molt-4) においても増殖効果はなかった。

その理由の1つには、照射波長の違いが挙げられる。彼女らの報告では照射波長が630 nmであり、照射光は細胞内のミトコンドリアに受容されると考えている。ミトコンドリアの持つ生体色素のうち最大の吸収波長領域は400-600 nmにかけて存在するが、我々の使用した830 nmの波長はミトコンドリアの吸収波長域を大きくはずれ

ている。実際、preliminaryな吸光度測定によって、この細胞は830 nmの光をわずか0.05%しか吸収しない。よって、ミトコンドリアに対する影響はほとんどないと考えられる。

また、彼女らの使用している細胞は主に子宮頸癌由来であるHela細胞やfibroblast系の細胞であり、今回我々が使用したT細胞とは性格が異なる。Hela細胞やfibroblastはいわゆる付着細胞であり、増殖期において他の細胞と接着してコロニーを形成する。一方、T細胞は浮遊細胞であり増殖期においても個々が独立して存在している。付着細胞であれば、一つの細胞からのsignal、mediatorが周辺の細胞に送られやすく、小さな変化が増幅されやすいとも考えられ、光照射による効果の違いは、このような細胞膜の性格の違いに由来する可能性もある。

<結論>

830 nmの低出力レーザー照射 (照射エネルギー: $0.2 \sim 20 \text{ J/cm}^2$) は、T-cell系の細胞代謝に影響を与えないと考えられる。

<参考文献>

- (1) Vindelov LL, et al: Cytometry 3: 323-7 (1983)
- (2) Karu TI: Health Physics 56: 691-704 (1989)