

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

八谷 文貴

論文題目

種々の照射条件でHe-Ne レーザー照射した各種
培養細胞におけるLow Level Laser Therapy (LLLТ)
効果の発現

生体に対し低エネルギーのレーザーを照射すると、レーザー光による様々な作用とそれに対応する生体反応により Low Level Laser Therapy (LLLT) 効果が生じる。しかし、LLLT 効果の作用機序については未だ不明な点も多く、特に病態学的に異常な細胞にも同様な LLLT 効果が認められるかは明らかではない。

本研究は、He-Ne レーザーの LLLT 効果を検討する目的で、正常な細胞と病態学的に異常な細胞に対し、種々のエネルギー密度と照射時間でレーザー照射したときの細胞増殖活性を比較検討した。さらに病態学的に異常な細胞に対する He-Ne レーザー照射が細胞周期やコラゲナーゼの分泌に対する影響を検討することを前提として、まずは正常な細胞における細胞周期、および MMP1 や TIMP1 の分泌に対する He-Ne レーザー照射の影響について比較検討した。

材料および方法

株化培養ヒト正常歯肉由来線維芽細胞 (HGF-1)、株化培養ヒト口腔頰粘膜由来扁平上皮癌細胞 (H157) および株化培養ヒト口腔底由来扁平上皮癌細胞 (H314) の3種の細胞を、phenol red を含有しない D-MEM で培養した。次いで、採取した細胞を遠心分離し (174×g、10 min)、遠心管内でペレット状になった細胞に対して He-Ne レーザー (GLS5700、NEC、波長 : 632.8 nm) を下方から4つの照射条件 (L1 : 1.38 J/cm²、10 分、L2 : 5.75 J/cm²、42 分、L3 : 5.75 J/cm²、10 分、Cont : 非照射) で照射した後、 3.0×10^4 cells/well

の播種密度で培養した。

細胞増殖活性は、培養開始時、3、6、12、24、48、72 あるいは 120 時間後、培養細胞に WST-8 を用いて呈色反応させ、吸光度 (OD = 450) を値とした。細胞周期は、12、24 あるいは 48 時間後、4',6-diamidino-2-phenylindole を添加し、フローサイトメトリーを用いて吸光度を測定し G₀/G₁ 期の細胞率の値とした。MMP1 および TIMP1 の分泌は、12、24 あるいは 48 時間後の培養液を採取し、それぞれ ELISA 法を使用して呈色反応させ吸光度を値とした。

得られた各結果は *t* 検定にて統計処理を行った。

結果及び考察

細胞増殖活性は、レーザー照射群の L1 および L3 では正常、異常のいずれの細胞においても非照射群すなわち Cont 群に比べ有意に高く、L2 ではいずれの細胞においても有意に低い活性を認めた ($p < 0.05$)。これらは、He-Ne レーザー照射により電子伝達系の短時間の活性化や ATP 合成の増加などの LLLT 効果が惹起され細胞増殖が促進された一方で、長時間のレーザー照射による直接的な作用が細胞死もしくは細胞増殖活性の抑制を惹起し、活性を失わなかった一部の細胞が増殖したためと推察された。

細胞周期は、レーザー照射群ではいずれの照射条件においても G₀/G₁ 期の細胞率は有意に低かったが ($p < 0.05$)、その期間は照射条件により異なっていた。これは、レーザー照射した G₀ 期の細胞において、一部の細胞は照

射の影響により細胞周期が亢進する一方で、一部の細胞は細胞周期が停止もしくは著しく速度が低下したためと推察された。

MMP1 の分泌は、レーザー照射群の L3 の培養 48 時間の照射条件においてのみ Cont 群に比べ有意に低く ($p < 0.05$)、また TIMP1 の分泌はいずれの照射条件においても有意な差異は認められなかった ($p > 0.05$)。これらにより、He-Ne レーザー照射した細胞における MMP1 や TIMP1 の分泌には至適な照射条件の存在することが明らかとなった。

結 論

He-Ne レーザーは、照射条件によっては正常な細胞だけでなく病態学的に異常な細胞に対しても LLLT 効果を有することが明らかとなった。しかしながら、その程度や様相は細胞により異なっており、また He-Ne レーザー照射した細胞の細胞増殖活性、細胞周期、あるいは MMP1 や TIMP1 の分泌においては、それぞれ至適な照射条件の存在することが明らかとなった。