

810nm低出力レーザー光が血管内皮細胞の フリーラジカル産生と消去に及ぼす影響

茂呂祐利子 渡部剛史 原田卓哉

Influence of 810nm Low-energy Laser Light on Free Radicals Synthesis and Elimination in Vascular Endothelial Cells

Yuriko MORO, Takeshi WATANABE and Takuya HARADA

In this study, we investigated the influence of low-energy laser irradiation on reactive oxygen synthesis and scavenging enzyme activity in vascular endothelial cells.

Based on the fact that low-energy laser irradiation has an anti-inflammatory action, we hypothesized that reactive oxygen synthesis decreases or reactive oxygen-scavenging enzyme increases, but actually, reactive oxygen synthesis increased in the control group but the scavenging enzyme level did not change. In the LPS affected group, reactive oxygen synthesis did not change and the scavenging enzyme decreased.

Therefore, it was assumed that the anti-inflammatory effect of low-energy laser is involved in the free radical control system but it has only a small direct influence on oxygen-scavenging enzyme synthesis.

Key words : 810nm low-energy laser, reactive oxygen-synthetic enzyme, reactive oxygen-scavenging enzyme

緒 言

低出力レーザーには細胞活性化作用、アポトーシス抑制効果、抗炎症効果等があることが報告され、創傷治癒の促進、骨の石灰化の促進、顎関節症や歯周治療の消炎、インプラント手術後の疼痛軽減等に広く臨床応用されている¹⁻⁴⁾。しかし、その作用機序の詳細については未だ十分に解明されておらず、治療の根拠のないまま臨床応用されているのが現状である。

低出力レーザーの生体への影響に関する基礎的研究では、細胞の増殖、遊走、接着、石灰化の促進、増殖因子等の発現亢進、カルシウムイオンの一過性の上昇などの報告^{1,5,6)}があるものの、何が最初のシグナルになりその後の活性化が誘導され

るのかについては不明であった。近年、低出力レーザー照射が Src tyrosine kinase を活性化し、その活性化には活性酸素種 (ROS) が関与することが報告されている^{6,7)}。また、レーザー光がミトコンドリア内の変化を通して酸化ストレスに対する保護効果を持つことや細胞接着に関与することも報告され、レーザーの生体に対する作用機序にフリーラジカルが関与していることが明らかになりつつある^{8,9)}。しかし、低出力レーザー照射により生体でどのようにフリーラジカル制御が行われているかについては詳しく解明されていない。

フリーラジカル制御とは、炎症、低酸素、放射線などのストレス下において発生した毒性のあるフリーラジカルから生体を守る機能であり、具体的には合成された活性酸素種や活性窒素種が消去

酵素等により最終的に無害な水にまで還元される反応である^{10,11)}。活性酸素 (O_2^-) は活性酸素合成酵素 (Nox) により合成され、活性酸素消去酵素 (SOD) によって消去される。炎症時には活性酸素が一酸化窒素 (NO) と反応してパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) を生成し強い細胞障害性を示すとされている (fig. 1)。

低出力レーザーには抗炎症作用があることが知られ、歯周病や顎関節症の治療に応用されている^{2,3)}。利用される低出力レーザーは He-Ne レーザー (波長: 約632nm) や半導体レーザー (波長: 約810~980nm) があり、赤や近赤外線の光は細胞内のミトコンドリアに吸収されシグナル伝達物質として活性酸素種を産生することでシグナル伝達経路を活性化する^{6,8)}。また、810nm の波長をもつ低出力レーザーは活性酸素種を生成することでレドックス感受性転写因子である NF- κ B を活性化することが報告されている^{12,13)}。NF- κ B 経路は TNF- α や IL-1 β などの炎症性メディエーター産生に関連し、低出力レーザーの抗炎症効果は NF- κ B の活性化を通して炎症性メディエーターを減少させることで得られるとされている^{14~16)}。しかし、低出力レーザーの抗炎症作用においてフリーラジカルの合成と消去がどのように行われているかについて詳細は不明である。

本研究では、培養血管内皮細胞における810nm 低出力レーザーの活性酸素の合成と消去に焦点を当て、低出力レーザーの抗炎症効果に NF- κ B の活性化だけでなく合成酵素や消去酵素といった酵素酸化系システムが関与するのかどうかについて *In vitro* で検討を行った。

材料および方法

1. 細胞培養

細胞はヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (Cryo HUVEC Pooled) (エーディア株式会社, 東京) を (fig. 2), 培地は血管内皮細胞用増殖培地 (EGM-2: ハイドロコーチゾン, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, アスコルビン酸, ヘパリン, FBS, hEGF, GA-1000) (エーディア株式会社, 東京) を用いた。通法に従い細胞を播種し, 37°C, 5% CO₂ 存在下, 湿度100%にて培養を行った。継代

には0.0025% trypsin 加0.01% EDTA 液 (エーディア株式会社, 東京) を使用した。

2. レーザー装置

レーザー装置は半導体レーザー手術装置・研究開発機 ((株)吉田製作所製, 東京) を用いた (fig. 3)。仕様は波長810±20nm, 出力0.5~5.0W (連続照射モード0.5~3.0W), 照射モードは連続照射, リピートパルス照射, シングルパルス照射モードが設定可能な半導体レーザー装置を用いた。

3. レーザーの照射条件

レーザーの照射条件は細胞増殖に最も適する条件^{17,18)}である出力0.5W - 照射時間2秒 (照射距離3.06cm, 照射野0.31cm², エネルギー密度3.2J/cm², 連続照射モード) とし, デフォーカスアダプタを装着した状態でシャーレまでの距離を一定に保ち照射を行った。

4. 実験方法

培養条件を同一にするために, それぞれの実験で培養単位面積あたり同じ割合になるように細胞数を調整し播種した。培地は, NF- κ B を活性化することを目的に EGM-2 にリポポリサッカリド (LPS, Sigma-Aldrich Japan, 東京) を0.5 μ g/ml 添加したもの (LPS 作用群) と添加しなかったもの (control 群) を用い, 培養24時間後に交換した。培地交換と同時にレーザーを至適条件下にて1回照射した。細胞に与えるストレスを少なくするために照射回数は1回とした。レーザー照射24時間後それぞれの項目について実験を行った (fig. 4)。

5. 低出力レーザーのフリーラジカル制御に対する影響

1) 活性酸素合成に対する影響

(1) 活性酸素合成酵素 (NADPH オキシダーゼ) 活性の測定

細胞を6well plate に1.2×10⁵個/well の割合で播種し, 24時間培養した。6well plate 底面に印をつけ底面部から細胞に均一にレーザー光があたるように照射した (fig. 5)。レーザー照射24時間培養後, 細胞を PBS にて洗浄し Mammalian Protein Extraction Buffer (GE Healthcare Japan, 東京) に Protease Inhibitor Mix (GE Healthcare Japan, 東京) を加えたものをタン

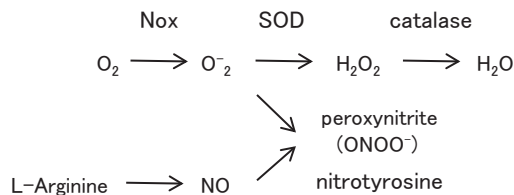


fig. 1 synthesis and elimination of free radicals

活性酸素 (O_2^-) は活性酸素合成酵素 (Nox) より合成され、活性酸素消去酵素 (SOD) によって消去される。活性酸素は一酸化窒素 (NO) と反応しパーオキシナイトライト (ONOO^-) を生成する。

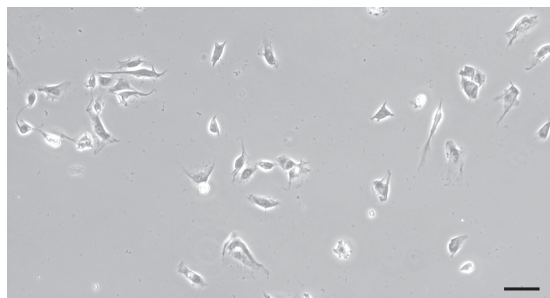
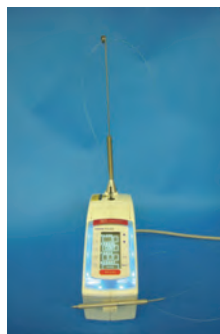


fig. 2 cultured vascular endothelial cells

細胞は培養血管内皮細胞 (HUVEC: Sanko Junyaku Co., Ltd.), 培地は血管内皮細胞基礎培地 (EBM-2) に添加因子キットを添加したものをを用い、 37°C , $5\%\text{CO}_2$ 存在下にて培養した。(bar: $50\ \mu\text{m}\ 40\times$)

バク質抽出バッファーとして用いサンプルとした。Control 群と LPS 作用群それぞれのレーザー非照射群と照射群における NADPH オキシダーゼ活性について SensoLyte[®] NADP / NADPH Assay Kit Colorimetric (ANA SPEC, Inc., USA) を用いて NADP⁺ / NADPH の変化を測定した。測定方法についてはキット添付のマニュアルに従った。

(2) 培養血管内皮細胞における活性酸素合成酵素 (Nox-1, Nox-2, Nox-4) の定量
細胞を 10well テフロンプリント・スライドガラス (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) に 5×10^3 個 / well の割合で播種した。10well テフロンプリント・スライドガラスの well 毎に底面部から細胞に均一にレーザー光があたるように照射した (fig. 5)。培地は EGM-2 にリポポリサッカライド (Sigma-Aldrich Japan, 東京) を $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$



type: diode laser (Ga-Al-As)
wavelength: $810\pm 20\text{nm}$
output: $0.5\sim 3.0\text{W}$
mode: continuous wave

fig. 3 laser equipment used for experiment

レーザー装置は、出力 $0.5\text{W}\sim 3.0\text{W}$ まで設定可能な (株) 吉田製作所製半導体レーザー手術装置・研究開発機を用いた。

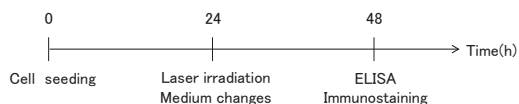


fig. 4 time course of experiment

細胞を播種し、培養 24 時間後に培地交換した。同時にレーザーを 1 回照射し、培養 48 時間後、ELISA による定量と免疫染色を行った。

添加したもの (LPS 作用群) と添加しなかったもの (control 群) を用い、レーザー照射 24 時間培養後の細胞を 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 大阪) にて固定した。一次抗体は anti-Nox1 (Atlas Antibodies AB., Sweden), rabbit anti-Nox2/gp91phox Polyclonal Antibody (Bioss Inc., USA), rabbit anti-Nox4 Polyclonal Antibody (Bioss Inc., USA) を用い、二次抗体は VECTASTAIN ABC キット (Vector Laboratories, USA), 発色は DAB 基質キット (ニチレイ, 東京) を用いて免疫染色を行った。Control 群と LPS 作用群それぞれのレーザー非照射群と照射群における Nox-1, Nox-2, Nox-4 の発現について検討を行った。

2) 活性酸素消去に対する影響

(1) 活性酸素消去酵素 (Mn-SOD) 合成量の測定

Control 群と LPS 作用群それぞれのレーザー非照射群と照射群における血管内皮細胞の Mn-SOD 発現量の変化について Human Superoxide

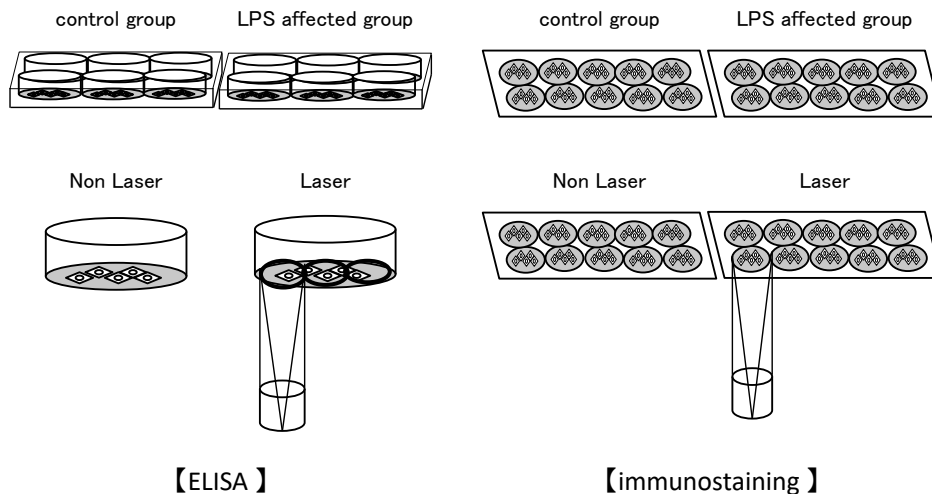


fig. 5 method

細胞を播種し、培地はEGM-2にリポポリサッカリドを添加したもの（LPS作用群）と添加しなかったもの（control群）を用いた。レーザーをシャーレあるいはスライドガラス底面から1回照射し、非照射群（Non Laser）と照射群（Laser）をそれぞれ比較した。

Dismutase2 ELISA (Ab FRONTIER., Korea) を用いて測定した。サンプルは活性酸素合成酵素の定量と同様の方法で採取し、測定方法についてはキット添付のマニュアルに従った。

(2) 培養血管内皮細胞における Mn-SOD の発現様相

Control 群と LPS 作用群それぞれのレーザー非照射群と照射群の血管内皮細胞における Mn-SOD 発現について Mouse Anti-Manganese Superoxide Dismutase (MNSOD) Monoclonal Antibody (EMD Millipore., Germany) を用いて免疫染色を行った。免疫染色は活性酸素合成酵素の定量と同様の手法により行った。

3) ニトロチロシンに対する影響

(1) ニトロチロシン合成量の測定

パーオキシナイトライト (ONOO⁻) についてニトロチロシンをマーカーとして定量した。Control 群と LPS 作用群それぞれのレーザー非照射群と照射群におけるニトロチロシン合成量の変化について MWLSS™ Nitrotyrosine ELISA (Northwest Life Science Specialties, LLC., USA) を用いて測定した。サンプルは活性酸素合成酵素の定量と同様の方法で採取し、測定方法についてはキット添付のマニュアルに従った。

(2) 培養血管内皮細胞におけるニトロチロシンの発現様相

Control 群と LPS 作用群それぞれのレーザー非照射群と照射群における血管内皮細胞のニトロチロシンの発現について Nitrotyrosine monoclonal antibody (Abnova., Taiwan) を用いて免疫染色を行った。免疫染色は活性酸素合成酵素の定量と同様に行った。

6. 統計解析

データは平均値±標準誤差で表記した。統計は Kruskal Wallis H-test 後 Bonferroni 補正 Mann-Whitney U-test を行い、control 群、LPS 作用群におけるレーザー非照射群と照射群をそれぞれ比較した。有意水準が 5% で統計的に有意差があると判定した。

結 果

1. 活性酸素合成酵素の動態におけるレーザー照射の影響

1) Control 群

NADPH オキシダーゼ活性は、レーザー照射により 5.3% の有意な増加が認められた (fig. 6)。免疫染色において、培養血管内皮細胞にはたんぱく発現している。非照射群と比べ、照射群では

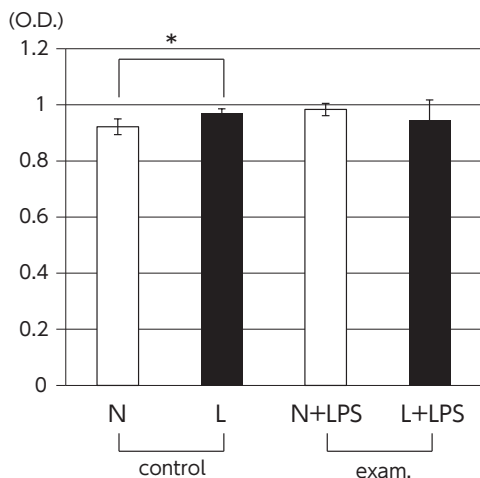


fig. 6 change in NADPH oxidase activity

N : Non Laser irradiation L : Laser irradiation

LPS : Lipo polysacalide

* : U-test , P < 0.05 Mean±SD (n=8)

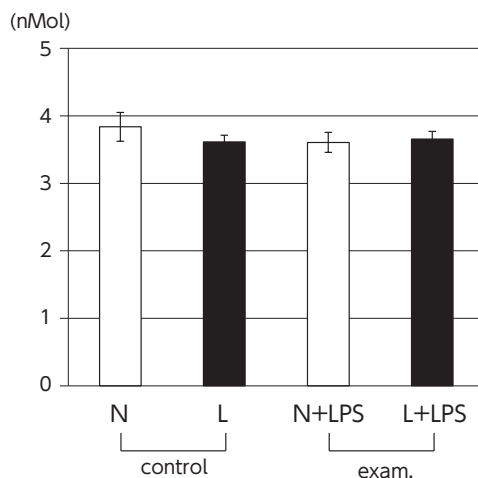


fig. 8 change in synthesis amount of nitrotyrosine

N : Non Laser irradiation L : Laser irradiation

LPS : Lipo polysacalide

* : U-test , P < 0.05 Mean±SD (n=8)

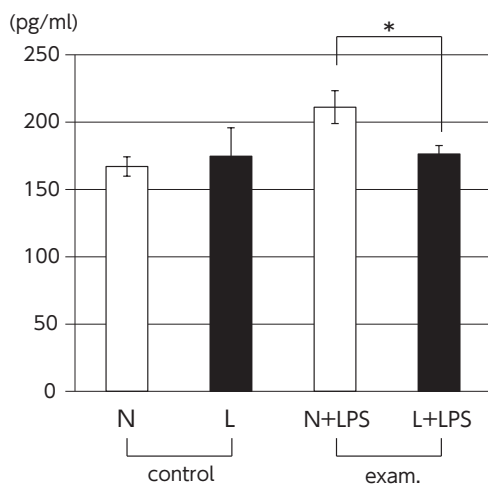


fig. 7 change in synthesis amount of Mn-SOD

N : Non Laser irradiation L : Laser irradiation

LPS : Lipo polysacalide

* : U-test , P < 0.05 Mean±SD (n=8)

Nox-1, Nox-2発現の増強が認められたが, Nox-4には変化が認められなかった (fig. 9, table 1)。

2) LPS 作用群

レーザー照射後において NADPH オキシダーゼ活性量の有意差は認められなかった (fig. 6)。免疫染色において, 培養血管内皮細胞に Nox-1, Nox-2, Nox-4が発現しているが, 非照射群と比

ベレーザー照射群では Nox-2発現の増強が認められた (fig. 9, table 1)。

2. 活性酸素消去酵素の動態におけるレーザー照射の影響

1) Control 群

レーザー照射による Mn-SOD タンパク発現には有意差は認められなかった (fig. 7)。免疫染色において, 培養血管内皮細胞には Mn-SOD が発現しているが, レーザー照射群と非照射群との間に Mn-SOD 発現に違いは認められなかった (fig. 9, table 1)。

2) LPS 作用群

レーザー照射により Mn-SOD タンパク量は 16.5%の有意な減少が認められた (fig. 7)。免疫染色においても, 培養血管内皮細胞にみられた Mn-SOD 発現は, レーザー照射群では非照射群よりも Mn-SOD タンパク発現は減少傾向が認められた (fig. 9, table 1)。

3. ニトロチロシンの動態におけるレーザー照射の影響

1) Control 群

レーザー照射によるニトロチロシタンパク発現に有意差は認められなかった (fig. 8)。免疫染色において, 培養血管内皮細胞にはニトロチロシ

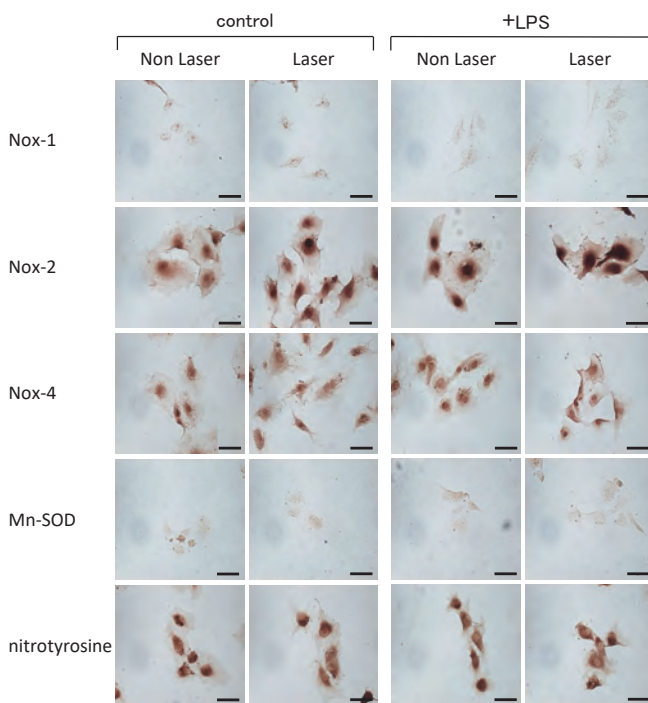


fig. 9 aspects of protein expression (bar : 50 μ m 40 \times)

ンが発現しているが、非照射群とレーザー照射群それぞれのニトロチロシン発現に違いは認められなかった (fig. 9, table 1)。

2) LPS 作用群

レーザー照射によりニトロチロシタンパク発現に有意差は認められなかった (fig. 8)。免疫染色において、培養血管内皮細胞にニトロチロシンが発現しているが、非照射群と照射群との間に発現の違いは認められなかった (fig. 9, table 1)。

考 察

低出力レーザーの抗炎症作用メカニズムについては従来より PGE₂産生の抑制や COX, i-NOS, IL-2, IL-1 β 発現の減少など炎症にかかわる因子についていくつかの報告がなされている^{16,19~21)}。近年、この抗炎症効果には NF- κ B の活性化が必要であり、これに活性酸素種や活性窒素種といったフリーラジカルの関与が指摘されている^{13,22)}。

本研究では歯周病等の LPS 誘導性炎症性疾患を想定し、低出力レーザーの抗炎症作用における

活性酸素の合成、消去および一酸化窒素との反応物質であるパーオキシナイトライトの動態について検討を行った。

control 群では、低出力レーザー照射により活性酸素合成酵素活性が有意に上昇し発現量も増加した。これは低出力レーザー照射により ROS の発現が増加するとの報告と一致している¹⁵⁾。一方で、LPS 作用群では低出力レーザー照射による合成酵素活性に有意な変化はなく Nox 類の発現状況にも変化がなかった。Huang らは酸化ストレスを受けた細胞へのレーザー照射は細胞内 ROS の発現を減少させると報告しており²²⁾ 本研究結果とは異なっていた。Lim らは、ROS の発現は時間依存性に減少することや LPS によるレドックスシグナルに HSP27 が関与し ROS 産生を調整すると報告している^{23,24)}。また、Sharm らは ROS の発現量はレーザーのエネルギーフルエンスによって異なるとも報告している²⁵⁾。今回、LPS 作用群において低出力レーザー照射により活性酸素発現に有意な減少が認められなかつ

table 1 change in protein expression

	Control		+LPS	
	Non Laser	Laser	Non Laser	Laser
Nox-1	+	++	+	+
Nox-2	++	+++	++	+++
Nox-4	++	++	++	++
Mn-SOD	+	+	+	±
nitrotyrosine	+	+	+	+

(± : weakly positive reaction + : positive reaction
++ : moderate positive reaction +++ : strong positive reaction)

た原因は不明であるが、前述の因子が関係しているのではないかと推測された。

一方、活性酸素消去酵素 (Mn-SOD) の発現については *In vivo* による実験でレーザー照射により活性が上昇するとの報告^{26,27)}、あるいは酸化ストレスにより上昇していた Mn-SOD 活性を下げるといった報告があるものの^{28,29)}、本研究の control 群では、活性酸素合成が増加しても Mn-SOD は変化しない、LPS 作用群では活性酸素の合成に変化がなくても Mn-SOD 発現量が有意に減少したことから、低出力レーザー照射による Mn-SOD 発現は活性酸素の発現に依存していないと推測された。

さらに、活性酸素と一酸化窒素の反応物質であるパーオキシナイトライトの発現についてニトロチロシンを指標に検討したが、低出力レーザー照射によるニトロチロシン発現の変化は control 群、LPS 作用群ともに認められなかった。パーオキシナイトライトの発現については *In vivo* による実験で ROS の低下により発現が減少する³⁰⁾、i-NOS の減少により発現が減少するとの報告がある³¹⁾。さらに、SOD 活性化はみられてもパーオキシナイトライトの発現に変化がないとの報告がある³²⁾。我々は以前の報告で低出力レーザー照射により i-NOS の減少を確認しているが³¹⁸⁾、ニトロチロシンに変化は認められないことから Mn-SOD と同様に実験系の違いが影響したのではないかと推測された。

また、今回我々はヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における Mn-SOD、ニトロチロシンの発現について形態学的に検討した。酸化ストレス下のヒト臍帯静脈血管内皮細胞において Mn-SOD、ニトロチロシンの発現は報告されている

ものの^{33,34)}、低出力レーザー照射後の発現については不明である。今回、血管内皮細胞における Mn-SOD、ニトロチロシン発現の変化は ELISA による定量結果と同様であった。*In vitro* における低出力レーザー照射後の Mn-SOD、ニトロチロシンの発現について、形態学的な検索はほとんどなされておらず詳細は不明であるが、ラット前脛骨筋細胞ではレーザー照射後ニトロチロシン発現は減少し、SOD 遺伝子発現は増加すると報告されており³¹⁾ 本研究結果とは異なっていた。この点についても実験系の違いや細胞種の違いなどが影響したのではないかと推測された。

以上のことから、本研究では活性酸素、一酸化窒素、活性酸素消去酵素およびパーオキシナイトライトの発現が認められることから低出力レーザーの抗炎症作用にフリーラジカルの関与が考えられるが、炎症時において当初我々が予想していたレーザー照射による活性酸素やパーオキシナイトライト生成の減少、あるいは活性酸素消去酵素の増加といった知見は得られなかった。このことは Macedo らの提唱する低出力レーザーは活性酸素のスカベンジャーを直接活性化し、酵素抗酸化システムとは独立しているという推測と一致する^{35,36)}。しかし、作用メカニズムの詳細は不明であり、低出力レーザーによる酸化ストレス低減のメカニズムの解明にはさらに詳しい検討が必要である。

結 論

低出力レーザー照射による培養血管内皮細胞における細胞内抗酸化系の変化は以下の通りであった。

1. レーザー照射により NADPH オキシダーゼ活性および発現は control 群では上昇するが、LPS 作用群では変化はなかった。
2. レーザー照射により活性酸素消去酵素の発現は control 群では変化しないが、LPS 作用群では減少した。
3. レーザー照射によりパーオキシナイトライトの発現は control 群、LPS 作用群ともに変化しなかった。

以上のことから、培養血管内皮細胞における 810nm 低出力レーザーの抗炎症効果において低

出力レーザーによる酵素抗酸化システムの関与は少ない可能性が示唆された。

本研究に関して、開示すべき利益相反関係にある企業などはない。

謝 辞

本研究は若手研究 (B) 「低出力レーザーの作用機序に関する基礎的研究—フリースラジカル制御による検討—」 JSPS科研費 24792150の助成を受けたものです。

また、稿を終えるに際し、本研究にあたりご協力いただきました株式会社吉田製作所、奥羽大学口腔機能分子生物学講座の皆様へ深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Farivar, S., Malekshahabi, T. and Shiari, R. : Biological effects of low level laser therapy. *J. Lasers Med. Sci.* **5** ; 58-62 2014.
- 2) Kathuria, V., Dhillon, J.K. and Kalra, G. : Low level laser therapy : A panacea for oral malodors. *Laser Ther.* **24** ; 215-223 2015.
- 3) Ayyildiz, S., Emir, F. and Sahin, C. : Evaluation of low-level laser therapy in TMD patients. *Case Rep. Dent.* 2015 ; <http://dx.doi.org/10.1155/2015/424213> 2015.
- 4) Tang, E. and Arany, P. : Photobiomodulation and implants : implications for dentistry. *J. Periodontal Implant Sci.* **43** ; 262-268 2013.
- 5) Ozawa, Y., Simizu, N. and Abiko, Y. : Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone* **22** ; 347-354 1998.
- 6) Gao, X. and Xing, D. : Molecular mechanisms of cell proliferation induced by low power laser irradiation. *J. Biomed. Sci.* **16** ; <http://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/1423-0127-16-4> 2009.
- 7) Zhang, J., Xing, D. and Gao, X. : Low-power laser irradiation activates Src tyrosine kinase through reactive oxygen species-mediated signaling pathway. *J. Cell Physiol.* **217** ; 518-528 2008.
- 8) Giuliani, A., Lorenzini, L., Gallamini, M., Massella, A., Giardino, L. and Calzà, L. : Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells : effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. *BMC Complement Altern. Med.* **15** ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2672926/2009>.
- 9) Karu, T., Pyatibrat, L. and Afanasyeva, N. : Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg. Med.* **36** ; 307-314 2005.
- 10) Rutkowski, R., Pancewicz, S. A., Rutkowski, K. and Rutkowska, J. : Reactive oxygen and nitrogen species in inflammatory process. *Pol. Merkur Lekarski.* **134** ; 131-136 2007.
- 11) Montezano, A. and Touyz, R. : Reactive oxygen species and endothelial function—role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* **110** ; 87-94 2012.
- 12) Chen, A., Huang, Y., Sharma, S. and Hamblin, M. : Effects of 810-nm laser on murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Photomed. Laser Surg.* **29** ; 383-389 2011.
- 13) Chen, A., Arany, P., Huang, Y., Tomkinson, E., Sharma, S., Kharkwal, G., Saleem, T., Mooney, D., Yull, F., Blackwell, T. and Hamblin, M. : Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One.* **6** ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3141042/2011>.
- 14) Rizzi, C., Mauriz, J., Freitas, D., Moreira, A., Zettler, C., Filippin, L., Marroni, N. and Gallego, J. : Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg. Med.* **38** ; 704-713 2006.
- 15) Yin, K., Zhu, R., Wang, S. and Zhao, R.C. : Low level laser (LLL) attenuate LPS-induced inflammatory responses in mesenchymal stem cells via the suppression of NF- κ B signaling pathway *in vitro*. *PLoS One.* **12** ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5464618/2017>.
- 16) Wu, J., Chen, C., Wang, C., Ho, M., Yeh, M. and Wang, Y. : Low-power laser irradiation suppresses inflammatory response of human adipose-derived stem cells by modulating intracellular cyclic AMP level and NF- κ B activity. *PLoS One.* **8** ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3546978/2013>.
- 17) Chen, H., Hung, S. and Hsu, H. : Low-energy laser irradiation increases endothelial cell proliferation, migration, and eNOS gene expression possibly via PI3K signal pathway. *Lasers Surg. Med.* **40** ; 46-54 2008.
- 18) Moro, Y., Watanabe, T. and Harada, T. : Influence of low-energy laser irradiation on nitric oxide expression in vascular endothelial cells. *Ohu University Dental Journal* **43** ; 103-110 2016.
- 19) Sakurai, Y., Yamaguchi, M. and Abiko, Y. : 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.
- 20) Yang, X., Askarova, S., Sheng, W., Chen, J. K., Sun, A., Sun, G., Yao, G. and Lee, J. : Low energy laser light (632.8 nm) suppresses amyloid- β peptide-induced oxidative and inflammatory responses in astrocytes. *Neuroscience* **171** ; 859-868 2010.
- 21) Aimbire, F., Ligeiro de Oliveira, A., Albertini, R., Corrêa, J., Ladeira de Campos, C., Lyon, J., Silva Jr, J. and Costa, M. : Low level laser therapy (LLLT) decreases pulmonary microvascular leakage, neutrophil influx and IL-1beta levels in airway and lung from rat subjected to LPS-induced inflammation. *Inflammation* **31** ; 189-197 2008.
- 22) Huang, Y., Nagata, K., Tedford, C., McCarthy, T. and Hamblin, M. : Low-level laser therapy (LLLT) reduces oxidative stress in primary cortical neurons *in vitro*. *J. Biophotonics.* **6** ; 829-838 2013.
- 23) Lim, W., Choi, H., Kim, J., Kim, S., Jeon, S., Zheng, H., Kim, D., Ko, Y., Kim, D., Sohn, H. and Kim, O. : Anti-inflammatory effect of 635 nm irradiations on *in vitro* direct/indirect irradiation model. *J. Oral Pathol. Med.* **44** ; 94-102 2015.
- 24) Lim, W., Kim, J., Kim, S., Karna, S., Won, J., Jeon, S., Kim, S., Choi, Y., Choi, H. and Kim, O. : Modulation of lipopolysaccharide-induced NF- κ B signaling pathway by 635 nm irradiation via heat shock protein 27 in human gingival fibroblast cells. *Photochem. Photobiol.* **89** ; 199-207 2013.
- 25) Sharma, S., Kharkwal, G., Sajo, M., Huang, Y., Taboada, L., McCarthy, T. and Hamblin, M. : Dose response effects of 810 nm laser light on mouse primary cortical neurons. *Lasers Surg. Med.* **43** ; 851-859 2011.
- 26) Klebanov, G., Poltanov, E. and Vladimirov, I. : Effect of low intensity laser light in the red range on macrophage superoxide dismutase activity. *Biofizika* **48** ; 462-473 2003.
- 27) Zhang, H., Hou, J., Shen, Y., Wang, W., Wei, Y. and Hu, S. : Low level laser irradiation precondition to create friendly milieu of infarcted myocardium and enhance early survival of transplanted bone marrow cells. *J. Cell Mol. Med.* **14** ; 1975-1987 2010.
- 28) Silveira, P., da Silva, L., Pinho, C., De Souza, P., Ronsani, M., Scheffer, L. and Pinho, R. : Effects of low-level laser therapy (GaAs) in an animal model of muscular damage induced by trauma. *Lasers Med. Sci.* **28** ; 431-436 2013.
- 29) Takhtfooladi, M., Takhtfooladi, H., Sedaghatfar, H. and Shabani, S. : Effect of low-level laser therapy on lung injury induced by hindlimb ischemia/reperfusion in rats. *Lasers Med. Sci.* **30** ; 1757-1762 2015.
- 30) Rubio, C., Simes, J., Moya, M., Soriano, F., Palma, J. and Campana, V. : Inflammatory and oxidative stress markers in experimental crystallopathy : their modification by photostimulation. *Photomed. Laser Surg.* **27** ; 79-84 2009.
- 31) Assis, L., Moretti, A., Abrahão, T., Cury, V., Souza, H., Hamblin, M. and Parizotto, N. : Low-level laser therapy (808 nm) reduces inflammatory response and oxidative stress in rat tibialis anterior muscle after cryolesion. *Lasers Surg. Med.* **44** ; 726-735 2012.
- 32) Klebanov, I., Poltanov, A., Chichuk, V., Osipov, N. and Vladimirov, A. : Changes in superoxide dismutase activity and peroxynitrite content in rat peritoneal macrophages exposed to He-Ne laser radiation. *Biochemistry* **70** ; 1335-1340 2005.
- 33) La Rocca, G., Di Stefano, A., Eleuteri, E., Anzalone, R., Magno, F., Corrao, S., Loria, T., Martorana, A., DiGangi, C., Colombo, M., Sansone, F., Patan, F., Farina, F., Rinaldi, M., Cappello, F., Giannuzzi, P. and Zummo, G. : Oxidative stress induces myeloperoxidase expression in endothelial cells from patients with chronic heart failure. *Basic Res. Cardiol.* **104** ; 307-320 2009.
- 34) Dernbach, E., Urbich, C., Brandes, P., Hofmann, K., Zeiher, M. and Dimmeler, S. : Anti-oxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells : evidence for enhanced resistance against oxidative stress. *Blood* **104** ; 3591-3597 2004 .
- 35) Macedo, A., Moraes, L., Mizobuti, D., Fogaça, A., Santos, F., Moraes, R., Hermes, T., Pertille, A. and Minatel, E. : Low-level laser therapy (LLLT) in dystrophin-deficient muscle cells : Effects on regeneration capacity, inflammation response and oxidative stress. *PLoS One.* **10** ; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4470633/2015>.
- 36) Lim, W., Kim, J., Lim, C., Kim, S., Jeon, S., Karna, S., Cho, M., Choi, H. and Kim, O. : Effect of 635 nm light-emitting diode irradiation on intracellular superoxide anion scavenging independent of the cellular enzymatic antioxidant system. *Photomed. Laser Surg.* **30** ; 451-459 2012.

著者への連絡先：茂呂祐利子，(〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部放射線診断学講座

Reprint requests : Yuriko MORO, Department of Radiology and Diagnosis, Ohu University School of Dentistry

31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan