

な問いを投げかけている¹⁾。LLLTは、これまでの多数の臨床経験により、副作用の少ない治療方法として広く普及しても問題ないようにも思えるが、何が障壁となっているのであろうか？

1971年のMesterらの最初の報告では、創傷治癒効果を得るためには照射パワー5-25mWのヘリウムネオンレーザーを1-1.5 J/cm²の照射エネルギー密度（フルエンス）で患部に照射することを提唱している^{3,5)}。実際、そのレーザー照射条件によって多くの有効な報告が出ているが、必ずしも効果の再現性が得られていないといった報告もある。一方では、レーザー照射による単なる温度上昇による効果であるといった意見や、術者や施設により異なった結果が表れているという意見もある。LLLTは歴史ある治療方法であるが、発展がめざましい分子生物学的的手法などを用いて治療メカニズムを解明し、治療効果を詳細に検証しなければならない新しい学際的な研究領域といえる。そのためにも、これまで積み上げられている臨床報告例を丹念に精査し、分子生物学的知見を踏まえた生物作用、細胞作用についての研究を行うことが重要であると著者らは考えている。レーザーによるLLLTが始まってすでに40年以上になる今日、毎年100を超える臨床報告例、*in vitro*研究、多数の動物実験の結果が得られているにもかかわらず、“Why doesn't everyone use it?”なのか。総説論文でよく拝見するのが、レーザー照射パラメータが統一されていないということであるが、すべての治療条件を各研究者や医療従事者にあてはめることは容易ではない。これら治療パラメータの違いによる治療結果の違いも十分考慮されるべき要因であるが、レーザーが照射される側の生体（細胞）にも目を向ける必要がある。もし種々の要因が複雑に絡み合うために適切な治療法が確立されていないとするならば、それらを網羅的に整理し、問題点を洗い出し、有効な治療方法の確立に向けて研究を行わなければならない。そこで本稿では、まず、LLLTにおける治療パラメータを列挙する。続いて、生体側からみた細胞のレーザーに対する応答例を挙げる。著者らのこれまでの研究結果から、①細胞内光受容体の存在と光受容に続く生理活性変化、②レーザー照射後の細胞内シグ

ナルカスケードの変化、③レーザー照射後の遺伝子発現調節が起こることを確認している。①から③は単独で起こっているのではなく、相互作用しながら最終的にレーザー照射後の細胞機能変化が起きていることを中心に考察する。これまでに著者らは、レーザーの波長、パワー、照射時間を変化させ（一部の波長についてはレーザーのパルス幅も変化させ）、また、照射対象となる細胞も様々な動物種および組織由来の細胞を用いてきている。その中から得られた代表的な結果についても記述する。

LLLTにおけるレーザー照射パラメータ

先に書いたが、各研究者、各報告により異なる結果が報告されており、それらはレーザー照射パラメータが異なることが主な原因であるとされている。これらのレーザー照射条件が異なれば、培養細胞・実験動物やヒトの個体差以上に得られる結果の差異も大きくなる。本稿では、過去10年間（2002年以降）のLLLTによる細胞増殖効果のみに関する約40報の報告を調査した⁶⁻⁹⁾。一つ一つの報告はそれぞれとも興味深いものであるが、ここでは照射パラメータが多岐にわたっているという点を強調して記述する（表1）。

a) 波長 (nm)

これまでのLLLTの研究では、波長405 nmから波長2940nmまで広範な波長のレーザーが使用されているが、そのほとんどの報告（80%以上）ではヘリウムネオンレーザーをはじめとした赤色光領域（632nm-670nm）のレーザーが用いられている。これは後述するチトクロムcオキシダーゼが細胞内光受容体となり、その活性を増加させる作用があるためと報告されている^{51,52)}。波長532nmのQスイッチNd:YAGレーザーと波長808nmの半導体レーザーを用いた報告の一部で過度な熱作用などによる細胞増殖の抑制効果が認められたという報告があるものの、それらレーザーを使用した他の報告および大多数の報告は、種々の細胞を用いて細胞増殖効果を報告したものである。いくつかの波長のレーザーを用いて、細胞増殖効果の波長依存性

表1. Parameters of LLLT for clinical applications

	Parameters
Technical	Laser type and wavelength (e.g. He-Ne laser, 632 nm,) Laser beam characteristics (polarized, divergent, collimated) Beam delivery system (fiber optics, hand held probe, scanner) Pulsed or continuous emission (frequency, type of pulsing and duty cycle) Peak power, Average power, Energy per pulse Power density (mW/cm ²) Name of instrument (producer)
Treatment	Treatment area (size and sites number) Dose density (J/cm ²) Treatment method (contact, pressure, distance illumination) Treatment distance, type of movement, scanning Sites of treatment (body surface or internal via fiber, etc.) Intended tissue target and its approximate distance from the skin surface Number of treatment sessions Frequency of treatment sessions (e.g. 2/week for 1 month)
Medical	Description of the problem to be treated (history of disease) Patients (number, age, sex) Exclusion criteria (pregnancy, high blood pressure, epilepsy etc) Condition of patients (acute, chronic, diabetics, other diseases) Pre-parallel-or post-medication Treated with other methods before (acupuncture, ultrasound, pharmaceuticals) Follow up (short and long term)

を報告した例もある。

b) パワー (mW)

レーザーの波長と同様、広範なレーザー照射パワーを用いた研究がおこなわれている(0.5mW-7,500mW)。多くの報告が後述するエネルギー(J)で示しているため、正確なレーザー照射パワー値が不明な報告も多い。

c) パワー密度 (mW/cm²)

照射するレーザーのパワー(mW)をスポットサイズまたは照射面積で除したものである。レーザー照射部位でのパワー密度を記載した報告、レーザーの照射対象(細胞や生体組織)近傍で測定した報告、さらには機器のマニュアルに記載されてあるパワー密度を記述しているだけという報告も散見される。これらを混同してはいけないが、報告をまとめると0.005-80cm²のエリアを照射対象とし、1-400mW/cm²のパワー密度を用いている報告が多い。

d) エネルギー (J) およびエネルギー密度 (フルエンス) (J/cm²)

エネルギー (J) は出力パワー (mW) と照射時間 (秒) の積で計算される。調べた報告では照射時間が2秒から3時間と大きな幅がある。必然的に記述されているエネルギーも0.01-1,200 Jと幅広い。これに伴い、

フルエンス (J/cm²) も、広範な設定がされている。

e) 照射対象とする細胞

最も多いのは線維芽細胞を用いた報告である。他に角化細胞、内皮細胞、幹細胞などの報告がある。それぞれの報告で異なる細胞種や由来があり、目的にあった細胞を使用している。

f) その他のパラメータを挙げれば、レーザーの特性 (polarized, divergent, collimated)、デリバリー方法 (fiber optics, hand held probe, scanner)、照射レーザーがパルス波か連続波 (frequency, type of pulsing and duty cycle)、出力 (peak power / average power / energy per pulse)、照射回数や照射時間推移、照射方法 (接触照射、接触圧、照射距離)、患者の年齢・性別や病歴、照射後の結果取得時間などが挙げられる。

著者が調べた過去10年間の LLLT の細胞増殖効果に関する報告では、ほとんどが赤色光領域 (632nm-670nm) のレーザーを用いて細胞増殖を促進するという報告であった。これらの報告の多くはヒトまたはマウスなどの哺乳類に由来する培養細胞系を使用しており、レーザー照射がおよぼす代表的な細胞作用であると言える。

レーザーに反応する細胞作用

続いて、レーザーが照射される生体側の要因について記述する。

1. 細胞内光受容体

光生物学分野でよく話題となる細胞内での光受容体とは、細胞内の特定の吸収帯を有する物質に光子が吸収されることである⁵³⁾。また、光受容体とはその分子（または分子の一部）に光子のエネルギーを吸収することのできる物質である。細胞内では特にミトコンドリア呼吸鎖内において光受容体が多く存在するといわれている。

a) チトクロム c オキシダーゼ

(Cytochrome c oxidase)

チトクロム c オキシダーゼはミトコンドリア呼吸鎖において呼吸基質からチトクロム系を経て伝達される電子を直接分子状酸素に渡す酵素である。種々の酸化状態におけるチトクロム c オキシダーゼの光吸収スペクトルが測定されており、それは光に対する生体の応答スペクトルにとっても近似している。チトクロム c オキシダーゼは特に可視域の波長600nm から近赤外領域の光に対する光受容体とされている⁵⁴⁾。これまでに、チトクロム c オキシダーゼを光受容体であるとした細胞への光作用に関する研究、特に神経系細胞を用いた研究が多く報告されている。神経細胞への赤外光照射がテトロドトキシン誘発性電位依存性ナトリウムチャンネル抑制によって促進されるチトクロム c オキシダーゼの還元状態を逆転させ、その活性を増加させることが報告されている⁵¹⁾。また、ミトコンドリアにレーザー照射を行った後、チトクロム c オキシダーゼの活性増加とポーラログラフィーによる酸素取り込み量の増加を確認し、それに続く ATP 産生増加に関する報告もある⁵²⁾。他にもレーザー照射後のチトクロム c オキシダーゼ活性や ATP 産生増加による細胞増殖促進効果についての *in vivo* および *in vitro* の研究が多く報告されている⁵⁵⁻⁶³⁾。

b) ポルフィリン

ポルフィリンとは4つのピロール環が4つのメチン基と交互に結合した大環状化合物

とその誘導体の総称である。多くは緑色または赤色を呈し、特異な吸収スペクトルおよび赤色蛍光を示す。生体内を含め、自然界に存在するポルフィリン類はピロール環の4個の窒素原子に鉄原子またはマグネシウム原子が配位して錯体を作って存在している。その中でもプロトポルフィリン IX (PPIX) の鉄錯体はヘモグロビン、カタラーゼやペルオキシダーゼなどの配位原子団として含まれ、ミトコンドリア内のチトクロムにも鉄ポルフィリンが存在している (b 型以外)。PPIX の光吸収スペクトルには波長400-650nm にかけて5つのピークが存在し、吸収波長が長いほどその吸収ピークの大きさは相対的に減少している。レーザー照射によって光子を吸収して3重項状態となった PPIX は、近傍に存在する基底状態の酸素原子にエネルギーを移動し活性酸素種を生成する。外部から PPIX またはその前駆体である5-ALAなどを投与し、局所のレーザー照射によって活性酸素種を発生させ、がん細胞や血管内皮細胞を死滅させるのが光線力学療法 (Photodynamic Therapy) として知られている。しかし、活性酸素種によって細胞を死滅させるのではなく、低いエネルギーで長時間のレーザー照射を行った際に細胞増殖活性が増加することも報告されている⁶⁴⁾。著者らも細胞を死滅させることなく、低用量の PPIX が細胞内に存在するときにレーザーを照射すると、細胞機能の変化がみられることを確認している。活性酸素種については後述するが、細胞内光受容体であるポルフィリン類は光受容後に発生する活性酸素種を介して、さまざまな生物化学反応を細胞内で行っていると考えられている。

c) フラボタンパク質 (フラビンタンパク質)

フラボタンパク質 (フラビンタンパク質) とは、リボフラビン (フラビンアデニンヌクレオチド; FAD またはフラビンアデニンモノヌクレオチド; FMN) を補欠分子団とした複合タンパク質の総称である。ほとんどのフラボタンパク質は鉄、モリブデン、銅やマンガンのような重金属を含

み、フラビン酵素として機能している。波長350-500nmにかけて吸収ピークが存在する。フラボタンパク質は生物発光、酸化ストレスによるラジカルの除去、DNA修復やアポトーシスといった広範な生物プロセスに関与している^{65,66)}。フラボタンパク質を細胞内光受容体として研究している報告も、著者らの報告も含めて、多く存在している⁶⁷⁻⁶⁹⁾。

d) その他

本稿では LLLT に関与する細胞内光受容体として主に報告されている上述の3種類を紹介したが、その他の光受容体としてロドプシン、ビリルビン、メラニン、プテリン、ビタミン B6 やビタミン K、NAD (P) H やウロカニン酸やトリプトファンなど数多く存在する。

2. レーザー照射後の細胞内シグナルカスケード
 フォトンのエネルギーが吸収された細胞内光受容体が他のタンパク質などへエネルギー遷移を繰り返して細胞内シグナルカスケードに変化を与え、そのシグナルカスケードの変化により、遺伝子発現・タンパク質発現変化へと結びついていると考える研究者が多い。しかしながら、フォトンのエネルギーを受けた光受容体が、どのようにして核内へそのシグナルを伝えているのか、また、どのようにして、シグナルが伝えられた核内で個別の遺伝子発現制御を行っているのかについて報告はされていない。後述するが、これまでに著者らは、FAD を補酵素として有している細胞内クリプトクロムを光受容体として解析を進め、未分化幹細胞の分化促進・抑制に関する研究を行ってきた^{67,68)}。光を受容したクリプトクロムの構造が変化し、そのものが核内へ移動することで自らの発現調整と *E-box* とよばれる遺伝子配列下流に存在するタンパク質の発現が制御されている可能性を示唆している。さらに、活性酸素腫などの数多くの因子が相互作用して細胞機能を制御していると考えている。本章では光受容体へのフォトンのエネルギー吸収以外に、LLLT によってどのような現象が細胞内で起きているのか、いままでわかっている範囲で記述してみたい。

a) 酸化還元経路

これまでにいくつかの活性酸素種または活性窒素種がミトコンドリアから核へのシグナル伝達に関与していると報告されている。それらは細胞内において、NAD または NADH、NADP または NADPH、グルタチオンまたは硫化グルタチオン、チオレドキシシオンまたは硫化チオレドキシシオンといった化合物と反応する⁶⁹⁾。また、これらの活性種に対するいくつかのセンサー（代表的なものとしてスーパーオキシドジスムターゼ；SOD）が細胞内に存在している⁷⁰⁾。細胞内で活性酸素種が発現すると、細胞は自身を防御するために種々の遺伝子発現制御を行う（それでも解決できない場合はアポトーシスを起こす）⁷¹⁾。特に細胞自身の増殖活性をコントロールするタンパク質が発現し、活性酸素種の有無やその量によって遺伝子発現が厳密に制御されており、活性酸素種がまるで細胞内のセカンドメッセンジャーとして振舞っている^{72,73)}。また、活性酸素種が細胞機能を変化させることも報告されている⁷⁴⁾。LLLT の分野においては、波長630nm 付近のレーザーを細胞に照射することで細胞内に活性酸素種が発生することが報告されている^{75,76)}。また、著者らも波長405nm のレーザーを細胞に照射すると、細胞内の活性酸素種量が著しく増大する現象を発見している。レーザー照射によって細胞内で活性酸素種が発生するメカニズムは不明のままであるが、細胞内に存在する PPIX などの光受容体からのエネルギー遷移の関与も考えられる。さらに、レーザー照射により増加する一酸化窒素 (NO) やその合成酵素 (iNOS) も細胞機能を制御していると報告されている⁷⁶⁻⁸⁰⁾。レーザーを照射することで光受容体の活性制御や細胞内活性酸素種発生量の制御をおこなうことによって、最終的に細胞機能を制御していると考えられている。

b) 遺伝子転写因子

上述の酸化還元経路が引き金となり、多くの転写因子の発現が変化していることが報告されている。ここでは代表的な転写因子として NF- κ B^{81,82)} の簡単な紹介にとどめ

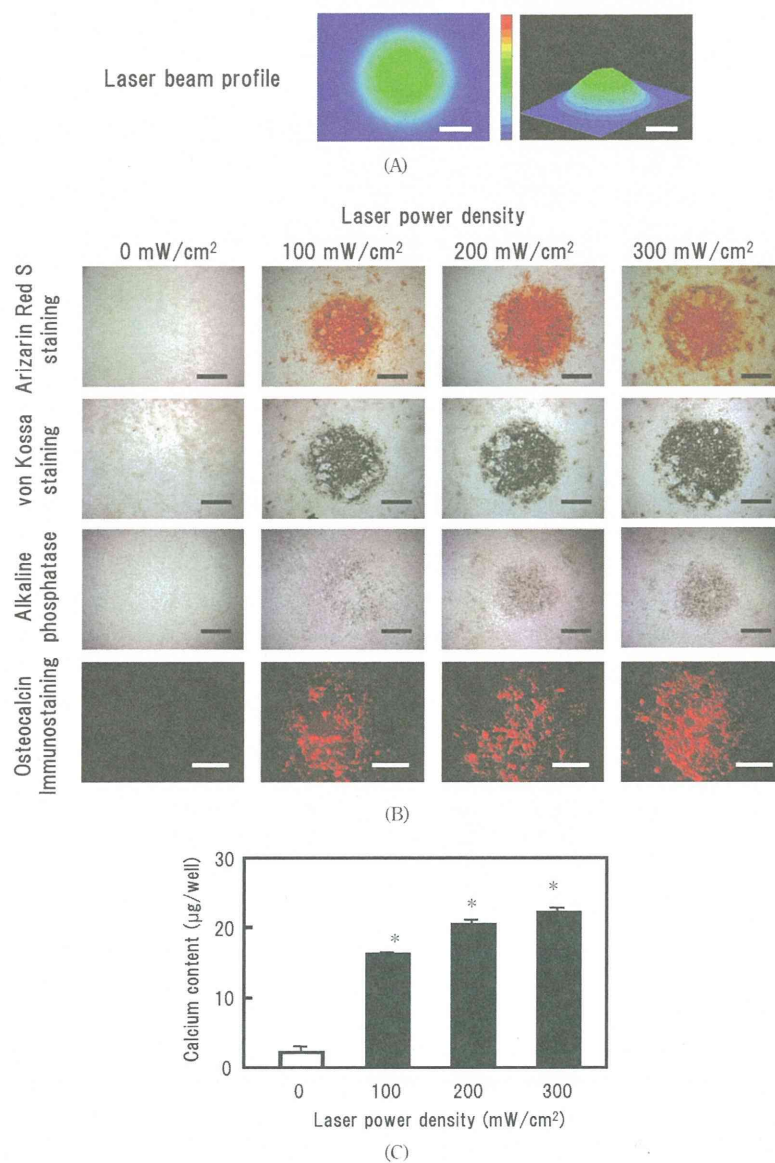
るが、一つ一つの報告を丹念に見ていくと、非常に多くの細胞機能を担っている転写因子の発現がレーザー照射によって増減していることが分かる。NF- κ B は転写因子として interleukin (IL)-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12 や tumor necrosis factor (TNF)- α など炎症性サイトカインを同時に複数発現させるだけでなく、癌細胞の増殖や不死化に重要なアポトーシス関連タンパク質も発現させる。LLLT によって生じた酸化還元経路が引き金となって NF- κ B の発現が増加することが報告されており^{81,82}、LLLT によって間接的に各種サイトカインの発現が亢進している一因とされている。

c) サーカディアンリズム

1日を1周期とするサーカディアンリズムは、生物の進化の初期に獲得された生命機能であり、単細胞生物から哺乳類・ヒトにいたるまで、現在の地球に生存する多くの生物種に見られる生命現象である。哺乳類の時計遺伝子は数種の遺伝子群からなり、安定した約24時間周期の分子リズムを作り出している。Brain-Muscle ARNT-like protein 2 (BMAL2), CLOCK (CLK), Cryptochrome (CRY), Period (PER) など、種々のタンパク質が研究されているが、これらの分子時計は体中ほぼすべての細胞に存在して細胞内の時計の役割を果たし、細胞分裂など種々の細胞活動の時間を規定している。その中でも CRY は青色光を吸収し励起される FAD を補酵素（発色団）として持っている。CRY は高等植物やショウジョウバエなどでは青色光受容体として知られているが⁸³、CRY の光受容により CRY 分子内で何が起きているのかという光受容過程は依然として不明のままである。これまでに知られている光受容体は、いずれも発色団の光異性をきっかけにその構造変化がアポタンパク質に伝わり、タンパク質全体の構造変化が引き起こされることにより光受容シグナルが伝えられている。しかし CRY の場合、発色団が FAD であるため光異性は起こりえない。光により励起された FAD から何らかの基質に電子移動が起

こることが考えられるが、詳細は明らかになっていない。

一方、骨組織は骨芽細胞による骨生成と破骨細胞による骨吸収のバランスの上に成り立っており、骨形成もまたホメオスタシスである。骨形成がサーカディアンリズムに依存するという Fu らの報告³¹ や、骨芽細胞における BMP-4 の発現にサーカディアンリズムの中心的な役割を果たす E-box motif が関与しているという Kawasaki らの報告³⁵ から、CRY は単なるサーカディアンリズムの発振だけではなく、E-box を介した種々のホメオスタシスや基礎生理現象に関与している物質であることがわかる。そこで著者らの研究では CRY の補酵素・FAD の吸収帯である波長405nm のレーザーを用い、細胞へレーザーを照射した後の CRY の細胞内分布や発現量変化について研究を行っている。図1に本研究で用いた波長405nm レーザーのビームプロファイルと、それをマウス骨髄間葉系細胞に3分間照射後、5日間骨分化培地で培養した結果を示した。そのビームプロファイルと全く同様の形状でアリザリンレッドおよび von Kossa 染色された。すなわちリン酸カルシウムの沈着が認められた。また、図1に骨芽細胞への分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ染色およびオステオカルシンの免疫染色の結果も合わせて示した。この結果からもレーザー照射群においてアルカリフォスファターゼおよびオステオカルシンの発現が亢進することを確認できた。これらの結果から、骨髄間葉系細胞に波長405nm のレーザーを照射することで、骨芽細胞への分化を促進することができた。さらに図2に CRY1 および PER2 の免疫染色の結果を示した。波長405nm レーザーを照射していない細胞は CRY1 および PER2 が細胞質に存在しているのに対し、照射した細胞は CRY1 および PER2 が核へと移行していることが明らかとなった。図3にレーザー照射24時間後の CRY1 mRNA の発現量をリアルタイム PCR 法により測定した結果を示した。レーザー非照



(A) The beam profile of the blue laser (wave length; 405nm, continuous wave). Mouse mesenchymal stromal cells were irradiated for 180 sec at various laser power densities. Scale bars = 200

(B) Histochemical analysis of laser irradiated mouse mesenchymal stromal cells.

Calcium deposition of laser irradiated mouse mesenchymal stromal cells was stained by Alizarin red-S (magnification: $\times 50$). At 5 days post-irradiation, calcium deposition had increased around the cells in a dose-dependent manner.

Calcium phosphate deposition was evaluated by von Kossa staining (magnification: $\times 50$).

The area expressing alkaline phosphatase (ALP) activity was stained (magnification: $\times 50$).

Laser irradiated samples displayed immunopositive staining for osteocalcin, a marker of osteoblast differentiation (magnification: $\times 100$).

Scale bars = 200 (for Alizarin red-S, von Kossa, and ALP staining) and 100 μ m (for osteocalcin immunostaining).

(C) The quantitative calcium content increased after laser irradiation relative to non-irradiated cells. Calcium content increases varied with laser energy. *, $p < 0.01$: significant difference between the calcium content of laser-irradiated MSCs and controls.

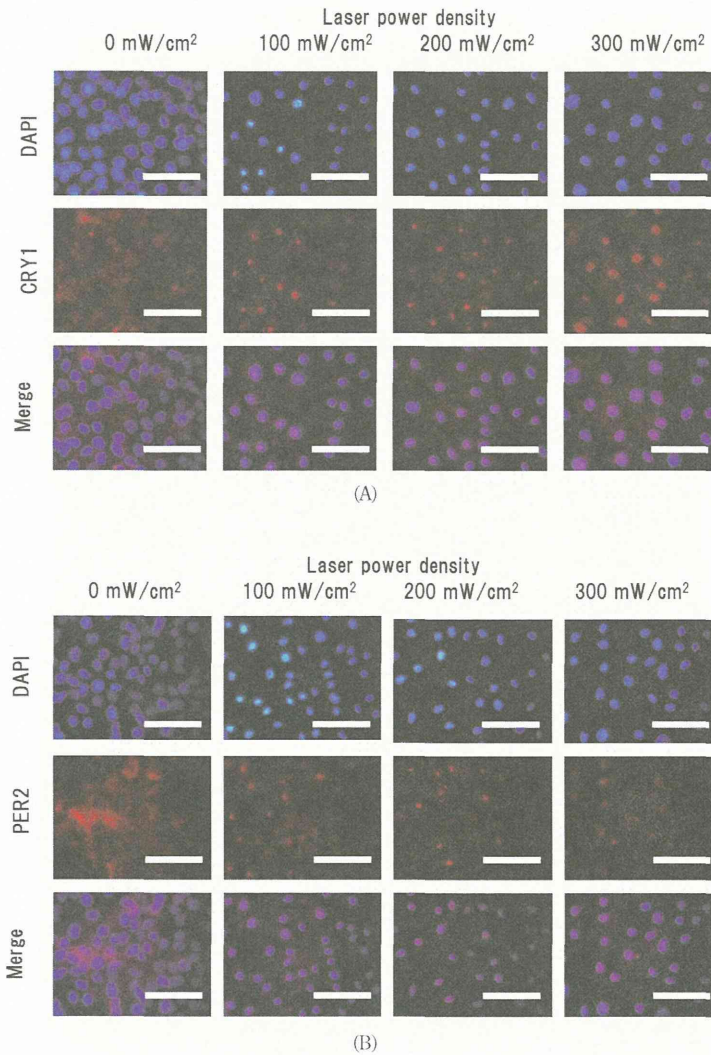


図2.

Intracellular location of mCRY1 (A) and mPER2 (B) proteins in mouse mesenchymal stromal cells 24 hr after laser irradiation. Cells were double-labeled with DAPI (blue, upper panel) and mCRY1 or mPER2 (red, center panel). The lower panel provides a merged image. mCRY1 and mPER2 localized to the cytoplasm prior to laser irradiation. After laser irradiation, proteins translocated to the nucleus. Scale bars =30 μ m

射群に比べてレーザー照射群のCRY1 mRNAが半分に低下した。サーカディアンリズムにおいては、CLOCK, BMALがヘテロダイマーを形成しPer, Cryの転写を促進する(CLOCK, BMALは転写調節領域にE-box配列をもつ遺伝子群の転写を活性化する因子である)。そこか

ら翻訳されたPER, CRYタンパク質は細胞質でヘテロダイマーを形成し核に移行する。核に移行したPER, CRYヘテロダイマーはCLOCK, BMALヘテロダイマーに結合し転写を阻害し自らの発現を抑制する。つまり、PER, CRYはE-box配列をもつ遺伝子群の転写抑制因子である。自身の転写

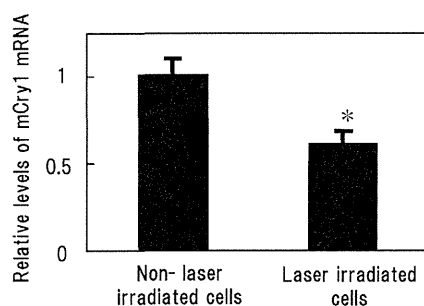


図3. mRNA levels of *mCry1* in mouse mesenchymal stromal cells 24 hr after laser irradiation (100mW/cm²) and in non-irradiated cells. Samples were normalized to *mRps18*. The mRNA levels of *mCry1* decreased after blue laser irradiation relative to non-irradiated cells. *, $p < 0.01$: significant difference between the relative mRNA levels of laser irradiated MSCs and controls.

の抑制により PER, CRY ヘテロダイマーの量が減少してくると転写抑制が解け Per, Cry の転写が再開される。このようにして遺伝子発現のネガティブフィードバック機構によってリズムが維持されている。こういった E-box 配列のオン・オフ遺伝子発現のリズムが24時間周期で起こった結果として、サーカディアンリズムが形成されることが分かっている。本研究の結果では、マウス骨髄間葉系細胞に波長405nm のレーザーを照射することで、CRY1の細胞内局在を細胞質から核へと移行させ CRY1自身の発現を抑制させることができた(図3)。さらにこれまでに著者らは同様のレーザーを用いて脂肪細胞への分化抑制⁹⁷⁾ や軟骨細胞への分化促進作用⁹²⁾ についても報告している。

おわりに

本稿では紙面の都合によりレーザー照射後の代表的な生物作用と著者らが行ってきた研究の一部についてのみ記述したが、細胞内光受容体やレーザー照射によって変化する細胞内シグナルカスケードがこれら以外にも多く存在する。LLLTが始まってすでに40年以上になろうとしている今日、“Why doesn't everyone use it?”。

統一されていないレーザー照射パラメータだけでなく、これまで積み上げられている臨床報告例を丹念に精査し、分子生物学的知見を踏まえた生物作用、細胞作用についての研究を行うことが重要であると考えている。

なお、本研究は(独)日本学術振興会 科学研究費補助金の補助を受けて行ったものである。

これからの研究の夢

レーザー医学・光生物学に関する研究は、臨床・基礎研究分野ともに多岐多方面にわたっており、いずれの分野でも新しい診断・治療方法の開発の研究が活発に行われている。本稿で紹介させていただいたレーザー・光がおよぼす細胞作用もその一分野であり、今後もそれらの適応範囲や研究のブレークスルーを目指して多くの研究結果が公表されると確信している。私はこれまでに、ドラッグデリバリーシステム、生体組織工学や再生医学についての研究を行い、数年前からレーザー医学あるいは光生物学という研究も合わせて進めているが、これまで得られた多くの研究結果から感じることは、レーザー・光に必ず生体(細胞)は反応するということである。それらのメカニズムも、使用するレーザー・細胞・実験条件などによって大きく異なり、それらを一つずつ解析して結果を積み上げていく必要がある。漠然とした記述になってしまったが、生命誕生当初から利用してきた光エネルギーを、これからはイメージングなどに代表される光診断、LLLTやPhotodynamic Therapy (PDT)を中心とした疾病の治療のツールとして積極的に利用できる技術・方法の開発を目指している。

文 献

- 1) Mester, E., Szende, B. and Gartner, P.: The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol. Radiother. (Berl)*. 9: 621-626, 1968.
- 2) Roelandts, R.: The history of phototherapy: something new under the sun? *J. Am. Acad. Dermatol.* 46: 926-930, 2002.
- 3) Mester, E., Spiry, T., Szende, B. and Tota, J. G.: Effect of laser rays on wound healing. *Am. J. Surg.* 122: 532-535, 1971.
- 4) Lanzafame, R. J.: Why doesn't everyone use it? *J. Clin. Laser Med. Surg.* 21: 335-336, 2003.
- 5) Mester, E. and Jaszszagi-Nagy, E.: Biological effects

- of laser radiation. *Radiobiol. Radiother. (Berl)*. 12: 377-385, 1971.
- 6) Azevedo, L. H., de Paula Eduardo, F., Moreira, M. S., de Paula Eduardo, C. and Marques, M. M.: Influence of different power densities of LILT on cultured human fibroblast growth: a pilot study. *Lasers in medical science* 21: 86-89, 2006.
 - 7) Brondon, P., Stadler, I. and Lanzafame, R. J.: A study of the effects of phototherapy dose interval on photobiomodulation of cell cultures. *Lasers Surg. Med.* 36: 409-413, 2005.
 - 8) Chen, C. H., Hung, H. S. and Hsu, S. 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.
 - 9) de Castro, J. L., Pinheiro, A. L., Werneck, C. E. and Soares, C. P.: The effect of laser therapy on the proliferation of oral KB carcinoma cells: an in vitro study. *Photomedicine and laser surgery* 23: 586-589, 2005.
 - 10) De Oliveira, R. F., Oliveira, D. A., Monteiro, W., Zangaro, R. A., Magini, M. and Soares, C. P.: Comparison between the effect of low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasonic irradiation in vitro. *Photomedicine and laser surgery* 26: 6-9, 2008.
 - 11) Eduardo Fde, P., Bueno, D. F., de Freitas, P. M., Marques, M. M., Passos-Bueno, M. R., Eduardo Cde, P. and Zatz, M.: Stem cell proliferation under low intensity laser irradiation: a preliminary study. *Lasers Surg. Med.* 40: 433-438, 2008.
 - 12) Eduardo, F. P., Mehnert, D. U., Monezi, T. A., Zezell, D. M., Schubert, M. M., Eduardo, C. P. and Marques, M. M.: Cultured epithelial cells response to phototherapy with low intensity laser. *Lasers Surg. Med.* 39: 365-372, 2007.
 - 13) Evans, D. H. and Abrahamse, H.: Efficacy of three different laser wavelengths for in vitro wound healing. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 24: 199-210, 2008.
 - 14) Gao, X., Chen, T., Xing, D., Wang, F., Pei, Y. and Wei, X.: Single cell analysis of PKC activation during proliferation and apoptosis induced by laser irradiation. *J. Cell. Physiol.* 206: 441-448, 2006.
 - 15) Gavish, L., Perez, L. and Gertz, S. D.: Low-level laser irradiation modulates matrix metalloproteinase activity and gene expression in porcine aortic smooth muscle cells. *Lasers Surg. Med.* 38: 779-786, 2006.
 - 16) Gulsoy, M., Ozer, G. H., Bozkulak, O., Tabakoglu, H. O., Aktas, E., Deniz, G. and Ertan, C.: The biological effects of 632.8-nm low energy He-Ne laser on peripheral blood mononuclear cells in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B.* 82: 199-202, 2006.
 - 17) Hawkins, D. and Abrahamse, H.: Biological effects of helium-neon laser irradiation on normal and wounded human skin fibroblasts. *Photomedicine and laser surgery* 23: 251-259, 2005.
 - 18) Hawkins, D. and Abrahamse, H.: Influence of broad-spectrum and infrared light in combination with laser irradiation on the proliferation of wounded skin fibroblasts. *Photomedicine and laser surgery* 25: 159-169, 2007.
 - 19) Hawkins, D. and Abrahamse, H.: How Long After Laser Irradiation Should Cellular Responses be Measured to Determine the Laser Effect? *J. Laser Appl.* 19: 74-83, 2007.
 - 20) Hawkins, D. H. and Abrahamse, H.: The role of laser fluence in cell viability, proliferation, and membrane integrity of wounded human skin fibroblasts following helium-neon laser irradiation. *Lasers Surg. Med.* 38: 74-83, 2006.
 - 21) Hawkins, D. H. and Abrahamse, H.: Time-dependent responses of wounded human skin fibroblasts following phototherapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* 88: 147-155, 2007.
 - 22) Hou, J. F., Zhang, H., Yuan, X., Li, J., Wei, Y. J. and Hu, S. S.: In vitro effects of low-level laser irradiation for bone marrow mesenchymal stem cells: proliferation, growth factors secretion and myogenic differentiation. *Lasers Surg. Med.* 40: 726-733, 2008.
 - 23) Houeld, N. N. and Abrahamse, H.: Effectiveness of helium-neon laser irradiation on viability and cytotoxicity of diabetic-wounded fibroblast cells. *Photomedicine and laser surgery* 25: 474-481, 2007.
 - 24) Houeld, N. N. and Abrahamse, H.: Laser light influences cellular viability and proliferation in diabetic-wounded fibroblast cells in a dose- and wavelength-dependent manner. *Lasers in medical science* 23: 11-18, 2008.
 - 25) Hu, W. P., Wang, J. J., Yu, C. L., Lan, C. C., Chen, G. S. and Yu, H. S.: Helium-neon laser irradiation stimulates cell proliferation through photostimulatory effects in mitochondria. *J. Invest. Dermatol.* 127: 2048-2057, 2007.
 - 26) Kreisler, M., Christoffers, A. B., Willershausen, B. and d'Hoedt, B.: Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study. *J. Clin. Periodontol.* 30: 353-358, 2003.
 - 27) Kreisler, M., Christoffers, A. B., Willershausen, B. and d'Hoedt, B.: Low-level 809nm GaAlAs laser irradiation increases the proliferation rate of human laryngeal carcinoma cells in vitro. *Lasers in medical science* 18: 100-103, 2003.
 - 28) Liu, Y. H., Ho, C. C., Cheng, C. C., Hsu, Y. H. and Lai, Y. S.: Photoradiation could influence the cytoskeleton organization and inhibit the survival of human hepatoma cells in vitro. *Lasers in medical science* 21: 42-48, 2006.
 - 29) Marques, M. M., Pereira, A. N., Fujihara, N. A., Nogueira, F. N. and Eduardo, C. P.: Effect of low-power laser irradiation on protein synthesis and ultrastructure of human gingival fibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 34: 260-265, 2004.
 - 30) Mirsky, N., Krispel, Y., Shoshany, Y., Maltz, L. and Oron, U.: Promotion of angiogenesis by low energy laser irradiation. *Antioxid. Redox Signal.* 4: 785-790, 2002.
 - 31) Mirzaei, M., Bayat, M., Mosafa, N., Mohsenifar, Z.,

- Piryaei, A., Farokhi, B., Rezaei, F., Sadeghi, Y. and Rakhshan, M.: Effect of low-level laser therapy on skin fibroblasts of streptozotocin-diabetic rats. *Photomedicine and laser surgery* 25: 519-525, 2007.
- 32) Miyata, H., Genma, T., Ohshima, M., Yamaguchi, Y., Hayashi, M., Takeichi, O., Ogiso, B. and Otsuka, K.: Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated protein kinase activation of cultured human dental pulp cells by low-power gallium-aluminium-arsenic laser irradiation. *Int. Endod. J.* 39: 238-244, 2006.
- 33) Mognato, M., Squizzato, F., Facchin, F., Zaghetto, L. and Corti, L.: Cell growth modulation of human cells irradiated in vitro with low-level laser therapy. *Photomedicine and laser surgery* 22: 523-526, 2004.
- 34) Moore, P., Ridgway, T. D., Higbee, R. G., Howard, E. W. and Lucroy, M. D.: Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg. Med.* 36: 8-12, 2005.
- 35) Mvula, B., Mathope, T., Moore, T. and Abrahamse, H.: The effect of low level laser irradiation on adult human adipose derived stem cells. *Lasers in medical science* 23: 277-282, 2008.
- 36) Mvula, B., Moore, T. J. and Abrahamse, H.: Effect of low-level laser irradiation and epidermal growth factor on adult human adipose-derived stem cells. *Lasers in medical science* 25: 33-39, 2010.
- 37) Pal, G., Dutta, A., Mitra, K., Grace, M. S., Romanczyk, T. B., Wu, X., Chakrabarti, K., Anders, J., Gorman, E., Waynant, R. W. and Tata, D. B.: Effect of low intensity laser interaction with human skin fibroblast cells using fiber-optic nano-probes. *J. Photochem. Photobiol. B.* 86: 252-261, 2007.
- 38) Pereira, A. N., Eduardo Cde, P., Matson, E. and Marques, M. M.: Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers Surg. Med.* 31: 263-267, 2002.
- 39) Pinheiro, A. L., Carneiro, N. S., Vieira, A. L., Brugnera, A., Jr., Zanin, F. A., Barros, R. A. and Silva, P. S.: Effects of low-level laser therapy on malignant cells: in vitro study. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 20: 23-26, 2002.
- 40) Poon, V. K., Huang, L. and Burd, A.: Biostimulation of dermal fibroblast by sublethal Q-switched Nd:YAG 532 nm laser: collagen remodeling and pigmentation. *J. Photochem. Photobiol. B.* 81: 1-8, 2005.
- 41) Posten, W., Wrone, D. A., Dover, J. S., Arndt, K. A., Silapunt, S. and Alam, M.: Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. *Dermatol. Surg.* 31: 334-340, 2005.
- 42) Pourzarandian, A., Watanabe, H., Ruwanpura, S. M., Aoki, A. and Ishikawa, I.: Effect of low-level Er:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *J. Periodontol.* 76: 187-193, 2005.
- 43) Reddy, G. K.: Photobiological basis and clinical role of low-intensity lasers in biology and medicine. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 22: 141-150, 2004.
- 44) Schindl, A., Merwald, H., Schindl, L., Kaun, C. and Wojta, J.: Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation. *Br. J. Dermatol.* 148: 334-336, 2003.
- 45) Skopin, M. D. and Molitor, S. C.: Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* 25: 75-80, 2009.
- 46) Taniguchi, D., Dai, P., Hojo, T., Yamaoka, Y., Kubo, T. and Takamatsu, T.: Low-energy laser irradiation promotes synovial fibroblast proliferation by modulating p15 subcellular localization. *Lasers Surg. Med.* 41: 232-239, 2009.
- 47) Tuby, H., Maltz, L. and Oron, U.: Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg. Med.* 39: 373-378, 2007.
- 48) Vinck, E. M., Cagnie, B. J., Cornelissen, M. J., Declercq, H. A. and Cambier, D. C.: Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation. *Lasers in medical science* 18: 95-99, 2003.
- 49) Vinck, E. M., Cagnie, B. J., Cornelissen, M. J., Declercq, H. A. and Cambier, D. C.: Green light emitting diode irradiation enhances fibroblast growth impaired by high glucose level. *Photomedicine and laser surgery* 23: 167-171, 2005.
- 50) Zungu, I. L., Mbene, A. B., Hawkins Evans, D. H., Houreld, N. N. and Abrahamse, H.: Phototherapy promotes cell migration in the presence of hydroxyurea. *Lasers in medical science* 24: 144-150, 2009.
- 51) Wong-Riley, M. T., Liang, H. L., Eells, J. T., Chance, B., Henry, M. M., Buchmann, E., Kane, M. and Whelan, H. T.: Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 280: 4761-4771, 2005.
- 52) Pastore, D., Greco, M., Petragallo, V. A. and Passarella, S.: Increase in $\langle H^+ \rangle / e^-$ ratio of the cytochrome c oxidase reaction in mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34: 817-826, 1994.
- 53) Sutherland, J. C.: Biological effects of polychromatic light. *Photochem. Photobiol.* 76: 164-170, 2002.
- 54) Karu, T. I. and Kolyakov, S. F.: Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomedicine and laser surgery* 23: 355-361, 2005.
- 55) Barolet, D., Duplay, P., Jacomy, H. and Auclair, M.: Importance of pulsing illumination parameters in low-level-light therapy. *Journal of biomedical optics* 15: 048005, 2010.
- 56) Chu, J., Wu, S. and Xing, D.: Survivin mediates self-protection through ROS/cdc25c/CDK1 signaling pathway during tumor cell apoptosis induced by high fluence low-power laser irradiation. *Cancer Lett.* 297: 207-219, 2010.
- 57) Karu, T. I., Pyatibrat, L. V. and Afanasyeva, N. I.: Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg. Med.* 36: 307-

- 314, 2005.
- 58) Lan, C. C., Wu, S. B., Wu, C. S., Shen, Y. C., Chiang, T. Y., Wei, Y. H. and Yu, H. S.: Induction of primitive pigment cell differentiation by visible light (helium-neon laser): a photoacceptor-specific response not replicable by UVB irradiation. *Journal of molecular medicine* **90**: 321-330, 2012.
- 59) Lim, J., Sanders, R. A., Snyder, A. C., Eells, J. T., Henshel, D. S. and Watkins, J. B., 3rd: Effects of low-level light therapy on streptozotocin-induced diabetic kidney. *J. Photochem. Photobiol. B.* **99**: 105-110, 2010.
- 60) Santana-Blank, L., Rodriguez-Santana, E. and Santana-Rodriguez, K.: Theoretic, experimental, clinical bases of the water oscillator hypothesis in near-infrared photobiomodulation. *Photomedicine and laser surgery* **28** Suppl 1: S41-52, 2010.
- 61) Silveira, P. C., Streck, E. L. and Pinho, R. A.: Evaluation of mitochondrial respiratory chain activity in wound healing by low-level laser therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* **86**: 279-282, 2007.
- 62) Wu, S., Xing, D., Gao, X. and Chen, W. R.: High fluence low-power laser irradiation induces mitochondrial permeability transition mediated by reactive oxygen species. *J. Cell. Physiol.* **218**: 603-611, 2009.
- 63) Wu, Z. H., Zhou, Y., Chen, J. Y. and Zhou, L. W.: Mitochondrial signaling for histamine releases in laser-irradiated RBL-2H3 mast cells. *Lasers Surg. Med.* **42**: 503-509, 2010.
- 64) Plaetzer, K., Kiesslich, T., Krammer, B. and Hammerl, P.: Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AIPcS4-PDT. *Photochemical & photobiological sciences* **1**: 172-177, 2002.
- 65) Massey, V.: The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* **28**: 283-296, 2000.
- 66) Eichler, M., Lavi, R., Shainberg, A. and Lubart, R.: Flavins are source of visible-light-induced free radical formation in cells. *Lasers Surg. Med.* **37**: 314-319, 2005.
- 67) Kushibiki, T. and Awazu, K.: Controlling osteogenesis and adipogenesis of mesenchymal stromal cells by regulating a circadian clock protein with laser irradiation. *International journal of medical sciences* **5**: 319-326, 2008.
- 68) Kushibiki, T. and Awazu, K.: Blue laser irradiation enhances extracellular calcification of primary mesenchymal stem cells. *Photomedicine and laser surgery* **27**: 493-498, 2009.
- 69) Schafer, F. Q. and Buettner, G. R.: Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 1191-1212, 2001.
- 70) Storz, P.: Mitochondrial ROS-radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol.* **17**: 13-18, 2007.
- 71) Liu, H., Colavitti, R., Rovira, II and Finkel, T.: Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ. Res.* **97**: 967-974, 2005.
- 72) Irani, K., Xia, Y., Zweier, J. L., Sollott, S. J., Der, C. J., Fearon, E. R., Sundaresan, M., Finkel, T. and Goldschmidt-Clermont, P. J.: Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**: 1649-1652, 1997.
- 73) Schreck, R. and Baeuerle, P. A.: A role for oxygen radicals as second messengers. *Trends Cell Biol.* **1**: 39-42, 1991.
- 74) Droge, W.: Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**: 47-95, 2002.
- 75) Lavi, R., Shainberg, A., Friedmann, H., Shneyvays, V., Rickover, O., Eichler, M., Kaplan, D. and Lubart, R.: Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J. Biol. Chem.* **278**: 40917-40922, 2003.
- 76) Borutaite, V., Budriunaite, A. and Brown, G. C.: Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**: 405-412, 2000.
- 77) Guzzardella, G. A., Fini, M., Torricelli, P., Giavaresi, G. and Giardino, R.: Laser stimulation on bone defect healing: an in vitro study. *Lasers in medical science* **17**: 216-220, 2002.
- 78) Leung, M. C., Lo, S. C., Siu, F. K. and So, K. F.: Treatment of experimentally induced transient cerebral ischemia with low energy laser inhibits nitric oxide synthase activity and up-regulates the expression of transforming growth factor-beta 1. *Lasers Surg. Med.* **31**: 283-288, 2002.
- 79) Moriyama, Y., Moriyama, E. H., Blackmore, K., Akens, M. K. and Lilje, L.: In vivo study of the inflammatory modulating effects of low-level laser therapy on iNOS expression using bioluminescence imaging. *Photochem. Photobiol.* **81**: 1351-1355, 2005.
- 80) Tuby, H., Maltz, L. and Oron, U.: Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis. *Lasers Surg. Med.* **38**: 682-688, 2006.
- 81) Eichler, M., Lavi, R., Friedmann, H., Shainberg, A. and Lubart, R.: Red light-induced redox reactions in cells observed with TEMPO. *Photomedicine and laser surgery* **25**: 170-174, 2007.
- 82) Rizzi, C. F., Mauriz, J. L., Freitas Correa, D. S., Moreira, A. J., Zettler, C. G., Filippin, L. I., Marroni, N. P. and Gonzalez-Gallego, J.: Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)-kappaB signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers Surg. Med.* **38**: 704-713, 2006.
- 83) Lee, C., Etchegaray, J. P., Cagampang, F. R., Loudon, A. S. and Reppert, S. M.: Posttranslational mechanisms regulate the mammalian circadian clock. *Cell* **107**: 855-867, 2001.
- 84) Fu, L., Patel, M. S., Bradley, A., Wagner, E. F. and Karsenty, G.: The molecular clock mediates leptin-

- regulated bone formation *Cell* **122**: 803-815, 2005.
- 85) Kawasaki, S., Ebara, S., Nakayama, K. and Takaoka, K.: The E-Box motif, recognized by tissue-specific nuclear factor(s), is important for BMP-4 gene expression in osteogenic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**: 560-565, 1999.
- 86) Kushibiki, T., Tajiri, T., Ninomiya, Y. and Awazu, K.: Chondrogenic mRNA expression in prechondrogenic cells after blue laser irradiation. *J. Photochem. Photobiol. B.* **98**: 211-215, 2010.

Regulation of the biological function by low level laser therapy

Toshihiro KUSHIBIKI, Takeshi HIRASAWA, Shinpei OKAWA and Miya ISHIHARA

J. Natl. Def. Med. Coll. (2012) **37** (4) : 267 - 279

Abstract: Low level laser therapy (LLLT) is mainly focused on the activation of intracellular or extracellular chromophore and the initiation of cellular signaling by using low power lasers. Over the past forty decades, it was realized that the laser therapy had the potential to improve wound healing and reduce pain and inflammation. In recent years, the term "low level laser therapy (LLLT)" has become widely recognized. This review will summarize the various light sources, principles of dosimetry, and several parameters of LLLT that are employed in clinical treatment. Furthermore, we will describe the mechanisms of action of LLLT at a cellular level. Finally, our recent research results that LLLT enhanced the cells differentiation will also be described.

Key words: Low Level Laser Therapy (LLLT) / intracellular chromophore
/ regulation of cells function

