

상온원적외선의 암억제효과와 치과영역에의 응용

오사카대학대학원치학연구과

寺岡 文雄

[서 언]

원적외선은 적외선의 장파장 영역에 위치하는 전자파이다. 일반적으로 원적외선 가열시간의 단축과 선택흡수에 의하여 성에너지 및 균일적이고 마일드한 가열에 의한 품질향상등의 가열효과로서 이용되고 있다. 의료분야에서는 원적외선 치료기와 암등의 온열치료로 利用되고 있다.

한편, 상온역에서는 방사강도 $K^{\circ}-7$ 가9,10 μm 부근의 방사율이 높은 재료(상온 원적외선 방사)는 대사촉진과 생리활성화가 있다고 보고 되고 있으나, 微弱에너지와 생체 관계에 있어서는 거의 해명되어 있지 않다.

치과에서 3대 질환은 우충, 치루병, 구강암으로 되어 있으며, 발증원인 및 예방 방법은 各其 다르다. 원적외선은 齒周病과 口腔암의 예방과 치료에 효과가 있다고 생각되지만, 이들에 관한 기초적 및 임상적 연구는 거의 보고되어 있지 않다.

본 연구에서는 치주병과 구강암의 예방 및 치료를 목적으로 하여, 상온 원적외선 방사 재료를 사용하여, 상온(37°C)에서, 암화세포와 정상 세포를 배양하여, 원적외선이 이들 세포에 미치는 영향에 대해서 검토 하였다.

[재료 및 방법]

1. 원적외선 방사재료

원적외선 방사 재료는 맹종죽(孟宗竹)을 감압200°C로 건류후 분쇄하여 얻어진 죽탄(竹炭)과 해조탄(海藻炭)을 사용한후, 각탄의 구조는 X선 회석장치(RINT 2000, 의학기기)와 후-리에 변환형 적외선 분광장치(FTIR-9300, 島津製作所)를 使用하여, 分析하였다.

2. 원적외선 방사재료의 방사율 측정

각탄의 원적외선 강도 및 방사율 측정은 후-리로 변환형 적외선 분광광도계(JIK-E300, JEOL)를 사용하여 37°C로서 행하였다.

방사율은 37°C에 있어서의 각탄의 방사 강도 스펙트로를 측정하여 동일 온도에서의 흑체로의 방사 강도와의 비에서 산출하였다.

3. 세포배양

세포는 합화세포로서의 Hela 組織, 正常細胞로서의 WI-38세포를 사용하여, 배양액으로서, Completo Medium(Dalbosco Modified Eagle Medium로 10%FRS, 페니실린 504/mi, 스트렙토마이신 50 μ g/mi를 첨가)를 사용하여 배양하였다.

4. 세포증식율의 측정

98결 말티프리트웰에 培養한 세포를 5×10^3 개/ml 정도로 과중하여 다음에 37°C의 5% 이산화탄소, 95% 공기속에서 배양하였다. 배양한 통법(컨트롤)과 탄의 위에, 96결 말티프레이트를 놓아둔 상태(도-1)에서, 1, 3, 6 일간 행하였다. 그후 세포증식율 WST assay에 의하여 Cell Counting Kit 8 용액을 10 μ l씩 添加하여, 炭酸가스 인큐베이터내에서 3시간 정도 색반응을 행하고, 마이크로 프레이트리-다를 사용, 검사파장 450nm, 대조파장 630nm로 하여 흡광도를 측정하였다.

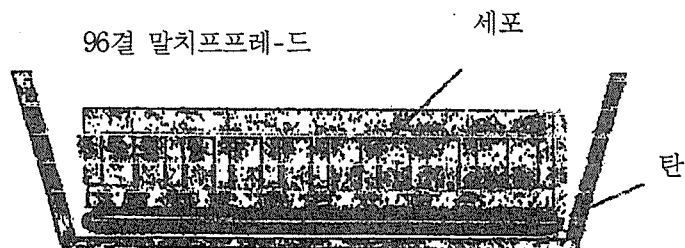


그림 1. 탄상에서의 세포증식 실험

5. 세포접착의 측정

96결 말치프레-드에 세포의 기질인 코라-겐을 코-드하여, 각 웰에 세포를 5×10^6 개/ml씩 종파하여, 다음에 37°C의 5%이산화탄소, -95%공기중에서 3시간 배양된 그후 산청을 흡인하여 0.04% 크리스탈바이올렛 용액 100 μ l를 넣어서 세정을 행하고 트라이톤 20 μ l로 가용화하여 상온에서 10분간 놓아두어 증류수를 80 μ l가하여, 마이크로 프레이트 라타를 사용하여 검사파장 590nm, 대조파장 490nm라고 吸光度를 측정하였다.

6. 물의 분석

증류수 10ml를 유리병에 넣어 세포증식과 같은 조건에서 탄의 위에 올려 놓고 1, 3, 6, 7, 10, 21, 28일간 보존후 NMR장치(JNM EX270, 日本電子)를 사용하여 물의 "O핵의 스펙트로를 얻었다. 각 NMR스펙트로부터 반치폭을 구하였다.

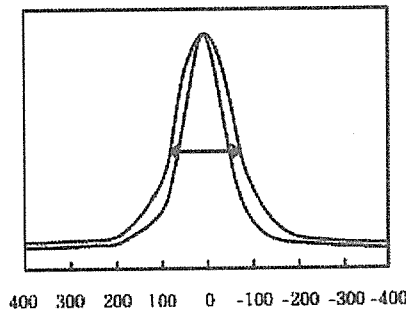


그림 2. 물의 NMR 스펙트럼과 반치폭

[결 과]

1) 탄의 적외선 흡수 스펙트럼에는 약 3300cm^{-1} ($3\mu\text{m}$)와 1250cm^{-1} ($8\mu\text{m}$) 도브로-트한 흡수파크(도-3)가 보인다. X선 회선(도-4)부터 비정질(非晶質)인 것을 알았다. 또한 37°C에서의 탄의 방사강도 스펙트럼(도-5)는 파장이 $9\mu\text{m}$ 에 파크가 있으며, 방사율(흡체로의 방사강도와 비교)은 $5.9\mu\text{m}$ 의 파장영역에 있어서 약 90%였으며, 높은 원적외선 방사를 보였다.

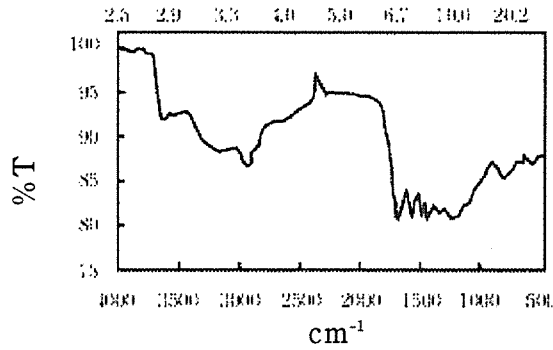


그림 3. 탄의 적외선 스펙트럼

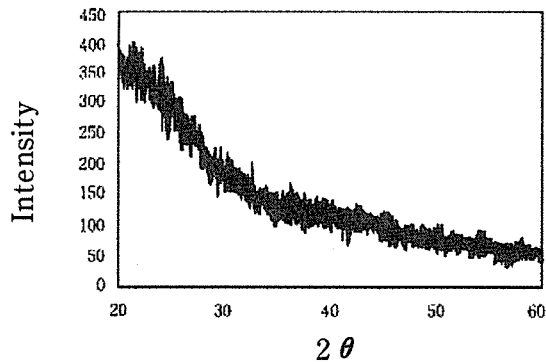


그림 4. 탄의 X선 회석상

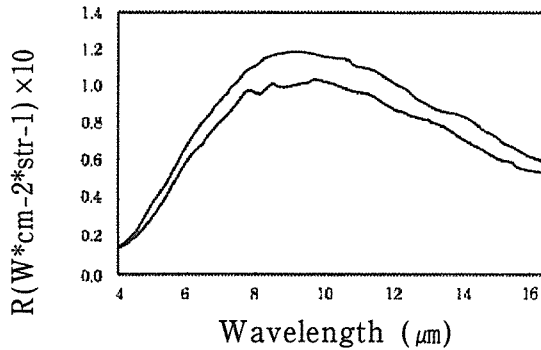


그림 5. 탄의 방사강도 스펙트럼

2) 암화세포에 있어 Hela 세포의 세포증식력은 3일째에서 콘트롤과 탄의 상에 놓인 시료와의 사이에 차가 없었지만, 6일째에서는 원적외선세포의 쪽이 세포증식력이 낮아졌다.

3) 정상세포인 WI-38세포의 세포증식력은 3일째와 6일째에 있어서도 콘트롤과

탄의 위에 놓인 시료와의 차이는 거의 볼 수가 없었다.

4) 코라-젠 상에서의 Hela 세포의 세포접착력은 컨트롤과 탄의 상에 놓인 시료와의 사이에서 차가 없었다.

5) 탄의 위에 놓인 물의 NMR스펙트럼에서는 컨트롤과 거의 동일 하였다. 그러나 6일째에서는 규격한 반치폭(半值幅)의 감소가 관찰되어 암화세포의 억제효과가 보였음을 알수 있었다.

[고 찰]

세포증식력은 암화세포의 Hela 세포에서는 3일까지는 컨트롤과 탄위에 놓인 시료와의 사이에는 차이가 없으며 6일째는 증식력은 억제되었다.

한편, 정상세포의 WI-38세포에서는 6일째에도 증식력에 컨트롤과 탄의 위에 놓인 시료와의 차는 보이지 않았다. 세포접착력은 컨트롤과 탄의 위에 놓인 시료와의 사이에 차가 없었다는 점에서 원적외선은 세포에 대하여 단시간에 작용하는것은 아니고 장시간으로 암화세포에게만 작용하는것이라고 생각된다. 암세포는 정상세포에 비하여 다음과 같은 보고가 보고되고 있다.(충분히 지지되지 않고 있는것도 있다.)

1. 암세포 중의 물의 프로톤의 완화시간이 길다.
2. 암세포 중의 물의 자가확산계수가 크다.
3. 암세포 중의 K이온농도가 낮다.
4. 암세포 중의 2가 가외온 (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+})의 농도가 높다.
5. 암세포 중의 수분량(주로 자유수)이 많다.
6. 암세포 중의 DNA 등의 생체고분자의 열변성온도가 낮다.

세포의 약 70%는 물이며, 원적외선이 물의 클러스터에 영향을 주는 것에서부터(탄의 위에 놓인 물의 NMR 스펙트럼에서는 6일째부터 급격한 감소) 암화세포 중의 물 또는 배양액의 물에 작용하여 암세포의 증식을 억제한다고 생각된다. 또한 원적외선이 암세포 중의 생체고분자에 직접작용하여 그의 콤포네이션을 변화시킨것에 의하여 암세포의 증식이 억제된다는 가능성도 있다. 어느것이든 상온역에서의 원적외선 조사에 의한 암세포의 증식이 억제된다는 원인에 관해서는 금후 실험을 실시하여 해명하는 것이 필요하겠다.

常温遠赤外線のガン抑制効果と歯科領域への応用

大阪大学大学院歯学研究科

寺岡 文雄

[緒言]

遠赤外線は赤外線の長波長領域に位置する電磁波である。一般的に遠赤外線は加熱時間の短縮や選択吸収による省エネルギーおよび均一でマイルドな加熱による品質向上などの加熱効果として利用されている。医療分野では遠赤外線治療器やガンなどの温熱治療に利用されている。一方、常温域で放射強度ピークが9,10 μ m付近の放射率が高い材料(常温遠赤外線放射材料)は代謝促進や生理活性化があると報告されているが、微弱エネルギーと生体の関係についてはほとんど解明されていない。

歯科での3大疾患は齲蝕、歯周病、口腔ガンであり、発症原因や治療および予防方法はそれぞれ異なる。遠赤外線は歯周病と口腔ガンの予防と治療に効果があると考えられるが、これらに関する基礎的および臨床的研究はほとんど報告されていない。

本研究では歯周病や口腔ガンの予防および治療を目的として、常温遠赤外線放射材料を用いて常温(37 $^{\circ}$ C)でガン化細胞と正常細胞を培養し、遠赤外線が細胞に及ぼす影響について検討した。

[材料および方法]

1. 遠赤外線放射材料

遠赤外線放射材料は孟宗竹を減圧下200 $^{\circ}$ Cに乾留後粉碎して得た竹炭と海藻炭を使用した。各炭の構造はX線回折装置(RINT 2000, 理学器械)とフーリエ変換型赤外線分光装置(FTIR-8300, 島津製作所)を用いて分析した。

2. 遠赤外線放射材料の放射率測定

各炭の遠赤外線強度および放射率測定はフーリエで変換型赤外線分光光度計 (JIK-E300, JEOL)を用いて37℃で行った。放射率は37℃における各炭の放射強度スペクトルを測定し、同一温度での黒体炉の放射強度との比から算出した。

3. 細胞培養

細胞はガン化細胞としてのHela細胞, 正常細胞としてWI-38細胞を使用し, 培養液として, Completo Medium(Dalbecos Modified Eagle Mediumで10% FRS, ペニシリン504/ml, ストレプトマイシン50 μ g/mlを添加)を用いて培養した。

4. 細胞増殖率の測定

96穴マルチプレートウェルに培養した細胞を5 \times 10³個/mlずつ播種し, 次に37℃の5%二酸化炭素95%空気の中で培養した。培養は通法(コントロール)と炭の上に, 96穴マルチプレートを置いて状態(図-1)で, 1, 3, 6日間行った。その後細胞増殖率WST assayによりCell Counting Kit 8溶液を10mlずつ添加し, 炭酸ガスインキュベーター内で3時間呈色反応を行い, マイクロプレートリーダーを用い検事波長450nm, 対照波長630nmとして吸光度を測定した。

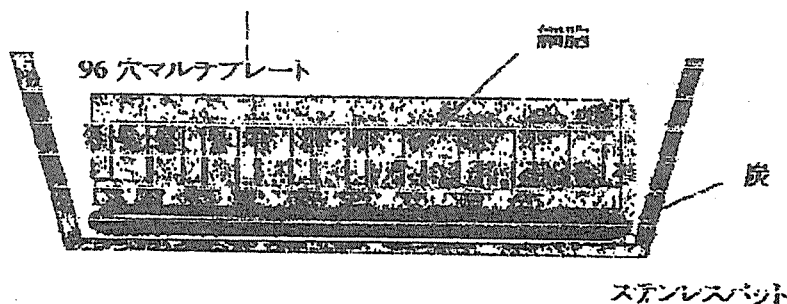


図1. 炭上での細胞増殖実験

5. 細胞接着能の測定

96穴マルチプレートに細胞外基質であるコラーゲンをコートし、各ウェルに細胞を 5×10^6 個/mlずつ播種し、次に37℃の5%二酸化炭素—95%空気中で3時間培養した。その後上清を吸引し、0.04%クリスタルバイオレット溶液100 μ lを入れて洗浄を行い、トライトンX20 μ lで可溶化し室温で10分間おき蒸留水を80 μ l加え、マイクロプレートリーダーを用い検事波長590nm、対照波長490nmとして吸光度を測定した。

6. 水の分析

蒸留水10mlをガラス瓶に入れ細胞増殖と同じ条件で炭の上において1, 3, 6, 7, 10, 21, 28日間保存後、NMR装置(JNMEX270, 日本電子)を用いて、水の ^{17}O 核のスペクトルを得た。各NMRスペクトルから半値幅を求めた。(図2)

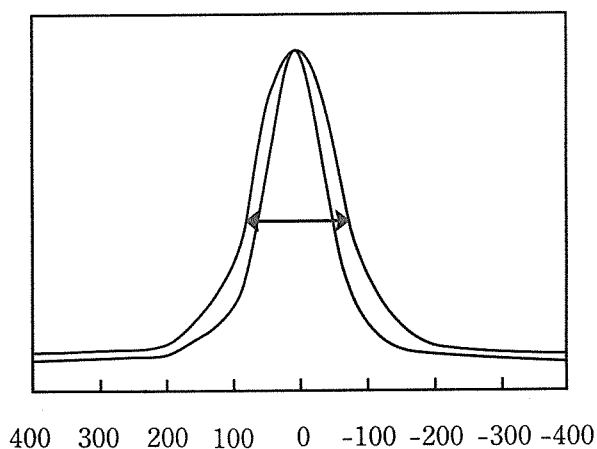


図2. 水のNMRスペクトルと半値幅

[結果]

- 1) 炭の赤外線吸収スペクトルには約 3300cm^{-1} ($3\ \mu\text{m}$)と 1250cm^{-1} ($8\ \mu\text{m}$)にブロードな吸収ピーク(図3)が見られ、X線回析(図4)から非晶質であることが分かった。また、 37°C での炭の放射強度スペクトル(図5)は波長が $9\ \mu\text{m}$ にピークがあり、放射率(黒体炉の放射強度と比較)は $5.9\ \mu\text{m}$ の波長領域において約90%であり、高い遠赤外線放射を示した。

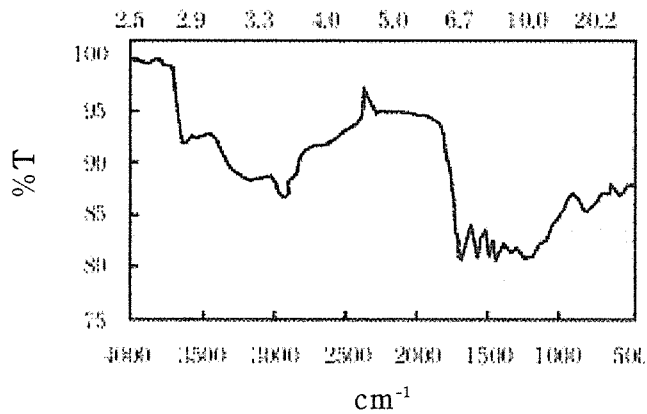


図3 炭の赤外線スペクトル

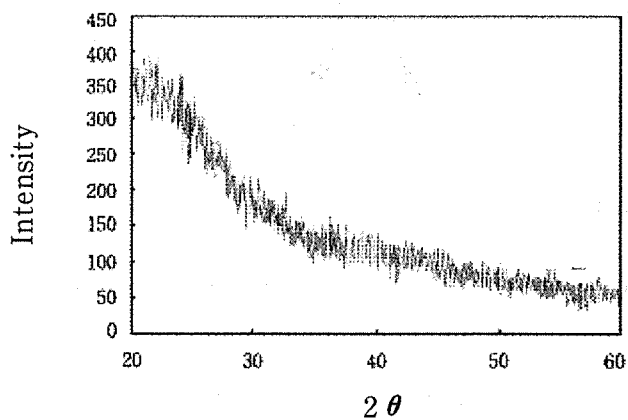


図4 炭のX線回析像

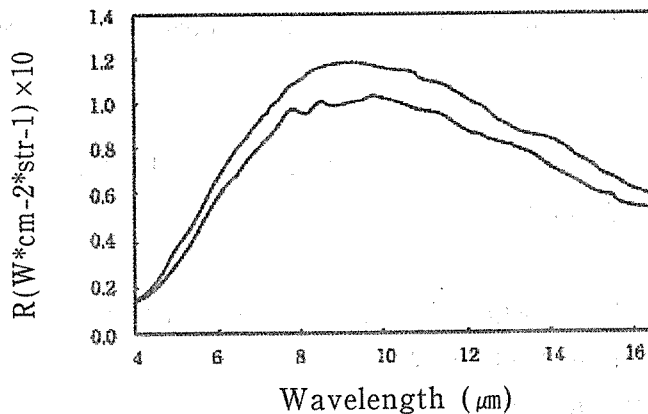


図5 炭の放射強度スペクトル

- 2) ガン化細胞であるHela細胞の細胞増殖能は3日目までは、コントロールと炭の上に置いた試料との間には差がなかったが、6日目では遠赤外線細胞の方がは細胞増殖能は低くなった。
- 3) 正常細胞であるWI-38細胞の細胞増殖能は3日目と6日目においても、コントロールと炭の上に置いた試料との間には差がほとんど見られなかった。
- 4) コラーゲン上でのHela細胞の細胞接着能は、コントロールと炭の上に置いた試料との間には差がなかった。
- 5) 炭の上に置いた水のNMRスペクトルでは3日目まではコントロールとほとんど同じであった。しかし、6日目からは急激な半値幅の減少が観察され、ガン化細胞の抑制効果がみられたことと対応していた。

[考察]

細胞増殖能はガン化細胞のHela細胞では3日までは、コントロールと炭の上に置いた試料との間には差がなく、6日目で増殖能は抑制された。一方、正常細胞のWI-38細胞では、6日目でも増殖能にコントロールと炭の上に置いた試料との間に差が見られなかった。

細胞増殖能はコントロールと炭の上に置いた試料との間には差がなかったことから、遠赤外線は細胞に対して短時間で作用するのではなくて長期間でガン化細胞にのみ作用するものと考えられる。

ガン細胞は正常細胞に比べ次に示す違いが報告が報告されている。(十分支持されていないものもある。)

1. ガン細胞中の水のプロトンの緩和時間が長い。(半値幅が小さい)
2. ガン細胞中の水の自己拡散係数が大きい。
3. ガン細胞中のKイオン濃度が低い。
4. ガン細胞中の二価カチオン(Ca^{2+} , mg^{2+} , Zn^{2+})の濃度が高い。
5. ガン細胞中の水気量(主に自由水)が多い。
6. ガン細胞中のDNAなどの生体高分子の熱変性温度が低い。

細胞の約70%は水であり、遠赤外線が水のクラスターに影響を与えることから(炭の上に置いた水のNMRスペクトルでは6日目から急激な減少)、ガン化細胞中の水または培養液の水に作用してガン細胞の増殖を抑制したと考えられる。また、遠赤外線がガン細胞の生体高分子に直接作用し、そのコンポメーションを変化させたことによりガン細胞の増殖が抑制された可能性もある。いずれにしても、常温域での遠赤外線放射によりガン細胞の増殖が抑制された原因については今後さらに行い解明する必要がある。