Nd:YAG レーザーがヒト歯肉線維芽細胞に与える影響について —照射出力および照射距離に関する検討—

吉 橋 直 弥 村 檉 悦 子
五十嵐(武内)寛子 沼 部 幸 博

日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座

(受付 : 2013 年 4 月 1 日, 受理 : 2013 年 7 月 16 日)

The Effect of Nd:YAG Laser Irradiation on Human Gingival Fibroblasts — A Study of the Irradiation Output and Distance —

Naoya YOSHIHASHI, Etsuko MURAKASHI,

Hiroko TAKEUCHI-IGARASHI and Yukihiro NUMABE

Department of Periodontology, School of Life Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

(Received: April 1, 2013, Accepted for Publication: July 16, 2013)

Abstract: This study was performed in order to investigate the effects of Nd:YAG laser irradiation on human gingival fibroblasts (Gin-1), as represented by cell proliferation activity rate and TGF- β 1 and Type I collagen production rate, as well as HSP47 expression.

Gin-1 cells were irradiated for 10 seconds at laser outputs of 2 W (5 pps/400mJ, 100pps/20mJ) and 7.2W (40pps/180mJ, 90pps/80mJ), at irradiation distances of 10mm or 20mm. Culture supernatant was recovered after 3 and 5 days of culture following laser irradiation and investigated for cell proliferation rate (modified MTT), and TGF- β 1 and Type I collagen production rate (ELISA method). Gin-1 was also subjected to immunofluorescent staining after 3 hours of culture following laser irradiation, and observed for HSP47 expression by confocal laser scanning microscopy.

On the 5th day of culture, both of the groups irradiated by 2 W at 10mm exhibited significantly higher cell proliferation rates than controls, and on the 3rd day of culture the group irradiated by 7.2W (90pps/80mJ) at 10mm exhibited significantly higher TGF- β 1 production rates than controls. Among the 10mm irradiation groups on the 3rd day, both of the 7.2W groups exhibited significantly higher Type I collagen production rates than controls. Intracytoplasmic HSP47 expression was found in all groups.

Thus, high-output laser irradiation with an increased irradiation distance exerts a cell activating effect without harmful heating, similar to that of low-output laser irradiation.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 24 : 72 ~ 82, 2013 Reprint requests to Dr. YOSHIHASHI)

Key words = Pulse rate, Pulse energy, Irradiation distance

キーワード=パルスレート, パルスエネルギー, 照射距離

緒 言

歯科用レーザーのひとつにNd:YAG レーザーがある。このレーザー光の波長は1,064nmであり、近赤外線域に属する。このレーザーは、水に吸収されないため組織中の水分にも影響されず、組織内での透過、散乱および深達性

が大きいこと、また黒色色素に選択的に吸収されやすくヘモグロビンにも吸収されることから、健康歯肉と比較し炎症を有する歯肉に選択的に作用する特徴がある。Nd:YAG レーザーを用いた治療には照射出力(W)を低くし可逆的影響を目的とした低出力レーザー治療(low-level laser therapy : LLLT)と、照射出力(W)を高くし不可逆的

影響を目的とした高出力レーザー治療 (high-level laser therapy: HLLT) がある。前者は疼痛緩和¹⁾、血流の改善・促進²⁾、抗炎症作用³⁻⁵⁾、術後の創傷治癒促進⁶⁾、そして後者は歯肉切開⁷⁾、歯肉のメラニン色素沈着の除去^{8,9)}、フラップ手術時の不良肉芽組織の除去¹⁰⁻¹⁴⁾、止血および歯周ポケット内照射による掻爬・殺菌¹⁵⁻²²⁾などで用いられ、歯周治療領域で幅広く臨床応用されている。

Nd:YAG レーザーの照射対象の多くは歯周組織の構成組織のひとつである歯肉である²³⁾。さらに Nd:YAG レーザーの組織深達性という特徴から主たる歯肉の構成細胞であるヒト歯肉線維芽細胞はレーザーの作用を強く受け、術後の組織の治癒に大きく関与すると考えられる。

ヒト歯肉線維芽細胞は他の歯周組織構成細胞と同様に様々な成長因子を産生し、歯周組織の恒常性維持を担っている²⁴⁾。特に歯周組織の創傷治癒促進や組織再生に深く関与する代表的な生理活性物質である Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) および Type I collagen (以下 collagen) はヒト歯肉線維芽細胞の機能と構造の維持に深く関与している。

TGF- β 1 は、TGF- β スーパーファミリーの1つで、分子量 12.5KDa の2量体のポリペプチドである^{25,26)}。従来 TGF- β 1 は、増殖のみを促進する因子²⁷⁾と考えられていたが、細胞の種類もしくは培養条件により増殖促進と増殖抑制の両者が認められることが報告された²⁸⁾。さらに TGF- β 1 の作用として、細胞分化、細胞外マトリックスの蓄積、免疫機能の抑制、単球の遊走促進、骨再生能などが知られている²⁹⁾。

Collagen は、真皮、靱帯、腱、骨、軟骨などを構成するタンパク質のひとつで、多細胞動物の細胞外マトリックスの主成分である。体内に存在している collagen の総量は、ヒトでは、全タンパク質の約 30% を占め、その構造は3本の分子量 95KDa のポリペプチド鎖が右巻きに絡み合った構造を呈している³⁰⁾。

TGF- β 1 と collagen は歯周組織の恒常性を維持するために各々が重要な役割を担っているが、両者は歯肉の創傷治癒過程において互いに密接な関係を持つ。創傷治癒過程の初期にヒト歯肉線維芽細胞によって TGF- β 1 が産生され、その TGF- β 1 のオートクリン・パラクリン作用により collagen 産生が誘導されることが報告されている³¹⁾。よって、レーザー照射が組織の治癒に影響を与えているとするならば、TGF- β 1 や collagen 産生にも変化が生じていることが考えられる。

一般的にレーザー光は平行光であるが、本研究で用いた歯科用 Nd:YAG レーザーのレーザー光は、集光レンズによって集光され、拡散光として対象物に照射される。よって照射条件を考慮する際、レーザーのパワー密度 (強度) は照射距離の2乗分の1に減弱する性質があることから、

Bar = 100 μ m

図1 ヒト正常歯肉線維芽細胞 (Gin-1)

照射距離を変化させることにより単位面積当たりのレーザーの強度を変化させることが可能である^{32,33)}。また、パルスレート (pps) とパルスエネルギー (mJ) の組合わせで照射出力 (W) が決定されるが、同一照射出力 (W) であってもパルスレート (pps) とパルスエネルギー (mJ) の組合わせによってはレーザー光の照射対象物への効果が異なる。以上より、照射距離と照射出力 [高出力, 低出力, パルスレート (pps) $\times$ パルスエネルギー (mJ) の異なる組合わせ] という照射条件を変えると Nd:YAG レーザー照射のヒト歯肉線維芽細胞に対する影響は異なることが推測される。

そこで本研究は、照射距離および照射出力 [低出力, 高出力, パルスレート (pps) とパルスエネルギー (mJ)] を変化した Nd:YAG レーザー照射がヒト歯肉線維芽細胞に与える影響について検索することを目的とし、細胞増殖、TGF- β 1 および collagen 産生、さらに熱ストレスマーカーとして報告されている Heat Shock Protein 47 (以下 HSP 47) の発現を評価した。

材料および方法

1. 研究材料

1) ヒト正常歯肉線維芽細胞

培養細胞はヒト正常歯肉線維芽細胞株 ((株) DS ファーマバイオメディカル, 大阪, 以下 Gin-1) を使用した。Gin-1 を 10% Fetal Bovine Serum (Moregate Biotech, Bulimba, Australia), 50U/ml Penicilin G (Life Technologies, Carlsbad, USA), 50 μ g/ml Streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, USA) および 0.25 μ g/ml Amphotericin B (Life Technologies, Carlsbad, USA) 添加 D-MEM/F-12 培地 (Life Technologies, Carlsbad, USA) にて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下で継代・培養を行い、4~7 継代した細胞を研究に用いた (図1)。

2) 使用した歯科用レーザー装置およびレーザー照射用ステント

歯科用レーザー機器として歯科用パルス Nd:YAG レーザーネオキュア 7200 ((株) 松風, 京都, 以下 レーザー) を使用し (図 2A), レーザー導光チップは直径 320 μ m の極細ファイバーを用いた。

細胞に対し均一にレーザー照射を行うためにステント ((株) 技巧舎, 神奈川) (図 2B) を作製し, ハンドピース (図 2C) に装着し研究に使用した (図 2D)。

2. 研究方法

1) 照射条件

照射出力 (W) は, $(W) = \text{パルスレート (pps)} \times \text{パルスエネルギー (J)}$ で示される。そこで, 照射出力を 2 W (5 pps/400mJ, 100pps/20mJ 群), 7.2W (40pps/180mJ, 90pps/80mJ 群) とした (表 1)。なお, レーザー照射時間および回数は, 10 秒間 1 回照射とした。

照射距離は, 20mm と 10mm の 2 群について検討した。すなわち, 照射距離をファイバー導光の先端から各ウェルプレート底面までの距離とし, 20mm 照射群をファイバー導光の先端から 96 ウェルプレート底面までの距離, 10mm 照射群をファイバー導光の先端から 384 ウェルプレート底面までの距離とした (図 3)。

2) Gin-1 へのレーザー照射方法

レーザー照射プロトコルを図 4 に示す。

20mm 照射群においては 96 ウェルプレートに 500 個/ウェルで Gin-1 を播種した。また, 10mm 照射群において 384 ウェルプレートに 250 個/ウェルで Gin-1 を播種した。

図 2 歯科用パルス Nd:YAG レーザーネオキュア 7200 (A) 照射用ステント (B: ステント, C: ハンドピース, D: ステント装着時)

表 1 歯科用パルス Nd:YAG レーザーネオキュア 7200 出力表
パルスエネルギー (mJ)

	20	30	40	50	60	80	100	120	140	160	180	200	250	300	350	400
0							SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP	SP
2													0.5	0.6	0.7	0.8
5							0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.3	1.5	1.8	2.0
10				0.5	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6	1.8	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
15			0.6	0.8	0.9	1.2	1.5	1.8	2.1	2.4	2.7	3.0	3.8			
20		0.6	0.8	1.0	1.2	1.6	2.0	2.4	2.8	3.2	3.6	4.0				
25	0.5	0.8	1.0	1.3	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0				
30	0.6	0.9	1.2	1.5	1.8	2.4	3.0	3.6	4.2	4.8	5.4	6.0				
35	0.7	1.1	1.4	1.8	2.1	2.8	3.5	4.2	4.9	5.6	6.3	7.0				
40	0.8	1.2	1.6	2.0	2.4	3.2	4.0	4.8	5.6	6.4	7.2					
50	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0	5.0	6.0	7.0							
60	1.2	1.8	2.4	3.0	3.6	4.8	6.0	7.2								
70	1.4	2.1	2.8	3.5	4.2	5.6	7.0									
80	1.6	2.4	3.2	4.0	4.8	6.4										
90	1.8	2.7	3.6	4.5	5.4	7.2										
100	2.0	3.0	4.0	5.0	6.0											

* 歯科用パルス Nd:YAG レーザーネオキュア 7200 出力表 引用
単位: (W)

各々の Gin-1 を 37℃, 5% CO₂ 条件下にて 48 時間培養した後に各ウェル内の培地を廃棄後, レーザー照射を行った。照射後, 再び培地を添加して, 3 日および 5 日間, 培養を行った。

3) 細胞増殖率の測定

レーザー照射後, 3 日および 5 日後の培地中に Cell Counting Kit-8 WST-8 ((株) 同仁化学研究所, 熊本) を添加して 37℃, 5% CO₂ 条件下にてインキュベートし, 吸光度 450nm の条件でマイクロプレートリーダー (Benchmark Plus, バイオ・ラッド・ラボラトリーズ (株), 東京) にて Optical density (以下 OD) 値を測定した。なお, レーザー非照射群 (以下 対照群) の OD 値を 1 とし, 対照群と各レーザー照射群との比率を算出し, これを細胞増殖率とした。

4) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法によるレーザー照射後の FCM 中の TGF-β1 産生率の測定

レーザー照射後, 3 日および 5 日後の培養上清 (Fibroblast conditioned medium: 以下 FCM) を回収し, FCM 中の TGF-β1 産生率測定の前処理として, 各 FCM 中に 1 N HCl を添加し, TGF-β1 を活性化させた後に 1.2N NaOH にて中和を行った。その後, Human TGF-β1 Immunoassay kit (Quantikine, R&D system, Inc., Minneapolis, USA) を用いてレーザー照射後の TGF-β1 産生量を測定し, 各レーザー照射群との比率を TGF-β1 産生率とした。

5) ELISA 法による FCM 中の collagen 産生率の測定

レーザー照射後, 3 日および 5 日後の FCM を回収し, FCM 中の collagen 産生率測定の前処理として, 0.1mg/ml

図 3 各ウェルプレートにおける照射距離の模式図

図 4 本実験におけるレーザー照射のプロトコル

図 5 細胞増殖率 20mm 照射群

7.2W (90pps/80mJ) 群では対照群と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の減少が認められた ($p < 0.01$)。レーザー照射後 5 日目においてすべてのレーザー照射群では対照群と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の減少が認められた ($p < 0.05$)。

図 6 細胞増殖率 10mm 照射群

レーザー照射後 3 日目において 7.2W (90pps/80mJ) 群では対照群と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の減少が認められた ($p < 0.05$)。レーザー照射後 5 日目において 2 W 両群では対照群と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の増加が認められた ($p < 0.05$)。

pepsin/50mM 酢酸溶液を添加した後に 200mM Tris/150mM NaCl 溶液にて中和処理を行った。その後、ヒトコラーゲン タイプ 1 ELISA kit (ACBio, 東京) を用いてレーザー照射後の collagen 産生量を測定し、各レーザー照射群との比率を collagen 産生率とした。

6) HSP47 発現の観察

Gin-1 を 8 ウェルカルチャースライド (Becton Dickinson Bioscience, San Jose, USA) に播種して培養を行い、サブコンフルエント状態の Gin-1 に対し、20mm もしくは 10mm の照射距離でレーザー照射後、3 時間培養を行った。培養後、0.01M PBS で 1 回洗浄して 4% パラホルムアルデヒド/0.01M PBS を用いて 4℃ 下で固定を行った。0.01M PBS

で 3 回洗浄後、非特異タンパク質 (10% 正常ヤギ血清) を用いて室温にて 30 分間静置しブロッキングを行った。次に一次抗体として 1% BSA/0.01M PBS を用いて 2,000 倍に希釈された Anti-Hsp47 antibody (ab88115, abcam®, Cambridge, UK) を添加して 4℃ 下で一晩静置、3 回洗浄後に、二次抗体として 1% BSA/0.01M PBS を用いて 1,000 倍に希釈された goat anti mouse IgG Alexa Fluor® 488 (A-11017, Invitrogen Corp., Carlsbad, USA) を添加し、遮光下で室温にて 2 時間静置した。3 回洗浄後、0.01M PBS を用いて 1,000 倍に希釈された DAPI Nucleic Acid Stain (Cambrex Bio Science Inc. MD, East Rutherford, USA : 以下 DAPI) で遮光下にて 1 分染色し、3 回洗浄を行い

図 7 TGF-β1 産生率 20mm 照射群

レーザー照射後 3 日目および 5 日目においてすべてのレーザー照射群では対照群と比較し差は認められなかった。

図 8 TGF-β1 産生率 10mm 照射群

3 日目において、7.2W (90pps/80mJ 群) では対照群と比較し統計学的に有意な TGF-β1 産生率の増加が認められた ($p < 0.05$)。7.2W (90pps/80mJ 群) で 7.2W (40pps/180mJ 群) と比較し統計学的に有意な TGF-β1 産生率の増加が認められた ($p < 0.05$)。

Vecta shield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) にて封入後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM700, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて HSP47 の発現について観察を行った。

7) 統計学的解析

各照射条件下での細胞増殖率、TGF-β1 および collagen 産生率は ANOVA および Dunnett 検定を用いて、統計学的解析を行った。解析ソフトウェアは STATVIEW J-4.5 (HULINKS, Inc., 東京) を用いた。なお、有意水準 5% ($p < 0.05$) 未満の場合を有意差ありとした。

結 果

1. 細胞増殖率

1) 20mm 照射群

レーザー照射後 3 日目において 2 W 両群および 7.2W

(40pps/180mJ 群) では対照群と比較し細胞増殖率の差は認められなかった (図 5)。しかしながら、7.2W (90pps/80mJ 群) では対照群と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の減少が認められた ($p < 0.01$)。レーザー照射後 5 日目においてすべてのレーザー照射群では対照群と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の減少が認められた ($p < 0.05$)。

2) 10mm 照射群

レーザー照射後 3 日目において対照群では 7.2W (90pps/80mJ 群) と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の増加が認められた ($p < 0.05$) (図 6)。また、2 W (5 pps/400mJ 群) では 7.2W 両群と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の増加が認められた ($p < 0.05$)。さらに 2 W (100pps/20mJ 群) では 7.2W (90pps/80mJ 群) と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の増加が認められた ($p < 0.05$)。レーザー照射後 5 日目において 2 W 両群では対照群と比較し

図 9 Collagen 産生率 20mm 照射群

5 日目においてすべてのレーザー照射群では対照群と比較し差は認められなかった。

図 10 Collagen 産生率 10mm 照射群

レーザー照射後 3 日目において 7.2W 両群では対照群と比較し統計学的に有意な collagen 産生率の増加が認められた (7.2W (90pps/80mJ 群) ($p < 0.05$), 7.2W (40pps/180mJ 群) ($p < 0.01$)).

統計学的に有意な細胞増殖率の増加が認められた ($p < 0.05$)。また、2W (5pps/400mJ 群) では 2W (100pps/20mJ 群) と比較し統計学的に有意な細胞増殖率の増加が認められた ($p < 0.05$)。

2. FCM 中の TGF- β 1 産生率

1) 20mm 照射群

レーザー照射後 3 日目および 5 日目においてすべてのレーザー照射群では対照群と比較し、差は認められなかった (図 7)。

2) 10mm 照射群

レーザー照射後 3 日目において 7.2W (90pps/80mJ 群) では対照群と比較し統計学的に有意な TGF- β 1 産生率の増加が認められた ($p < 0.05$)。また、7.2W 両群では、7.2W (90pps/80mJ 群) で 7.2W (40pps/180mJ 群) と比較し統計学的に有意な TGF- β 1 産生率の増加が認められ

た ($P < 0.05$)。しかしながら 5 日目においてすべてのレーザー照射群では対照群と比較し、差は認められなかった (図 8)。

3. FCM 中の collagen 産生率

1) 20mm 照射群

レーザー照射後 3 日目においてすべてのレーザー照射群では対照群と比較し collagen 産生率は差は認められなかった (図 9)。5 日目においてすべてのレーザー照射群では対照群と比較し、差は認められなかった。

2) 10mm 照射群

レーザー照射後 3 日目において 7.2W 両群では対照群と比較し統計学的に有意な collagen 産生率の増加が認められた (7.2W (90pps/80mJ 群) ($p < 0.05$), 7.2W (40pps/180mJ 群) ($p < 0.01$) (図 10)。また 7.2W 両群では 2W (5pps/400mJ 群) と比較し統計学的に有意な collagen 産

図 11 20mm 照射群における蛍光免疫染色による HSP-47 の発現の検討

すべての群で細胞質内において顆粒状の HSP47 の発現（緑）が観察された。

A：対照群，B：2w（5 pps/400mJ 群），C：2w（100pps/20mJ 群），D：7.2w（40pps/180mJ 群），E：7.2w（90pps/80mJ 群）（青色：核・緑色：HSP47）

図 12 10mm 照射群における蛍光免疫染色による HSP-47 の発現の検討

すべての群で細胞質内において顆粒状の HSP47 の発現（緑）が観察された。

A：対照群，B：2w（5 pps/400mJ 群），C：2w（100pps/20mJ 群），D：7.2w（40pps/180mJ 群），E：7.2w（90pps/80mJ 群）（青色：核・緑色：HSP47）

生率の増加が認められた ($p < 0.05$)。5 日目においてすべてのレーザー照射群では対照群と比較し、差は認められなかった。

4. 共焦点レーザー顕微鏡による HSP47 発現の観察

1) 20mm 照射群

対照群では細胞質内全体で顆粒状の HSP47 の発現が認められた（図 11A）。2W 両群でも対照群と同様に顆粒状の発現が認められた（図 11B, C）。7.2W（40pps/180mJ 群）では細胞質の細胞膜近傍に HSP47 の発現が認められた（図 11D）。そして 7.2W（90pps/80mJ 群）では、細胞質長軸方向先端部に発現が認められた（図 11E）。

2) 10mm 照射群

対照群と同様にすべてのレーザー照射群で細胞質内全体において顆粒状の HSP47 の発現が観察され、各群での発現に差は認められなかった（図 12）。

考 察

1. 細胞増殖率について

Nd:YAG レーザーは多岐に渡り歯周治療に応用されており、特にポケット内照射は組織深達性という特長から、従来の手用スケーラーを用いたデブライドメントと比較してより効果的な搔爬・殺菌を行うことができると報告されている^{14-22, 34, 35}。しかしながら一方では Nd:YAG レーザー照射を行う際は硬組織や歯髄への熱影響が懸念され、適切な照射条件の見極めが重要不可欠となるが、Nd:YAG レーザーの組織および細胞レベルに与える影響を検索した研究^{36, 37}は少ない。

Nd:YAG レーザーが Gin-1 の増殖能に与える影響を評価するために細胞増殖率を測定した。20mm 照射群の 5 日目においてすべてのレーザー照射群では統計学的に有意な減

少が認められた。これは5日目では細胞増殖が低下したことから、対数増殖期から増殖が停止した定常期に移行したためと推測される。10mm照射群の3日目における7.2W (90pps/80mJ 群) では対照群と比較し統計学的に有意な細胞増殖の減少が認められ、5日目における2W 両群では統計学的に有意な増加が認められた。10mmの照射距離は20mmの照射距離の4倍のレーザーの強度のエネルギーを細胞に与えることとなる。故に3日目ではGin-1の細胞増殖率は一時的に低下したと考えられる。しかし5日目では細胞増殖が回復しGin-1本来の通常の細胞増殖過程を取り戻したと推測される。さらに20mm照射群では3日目、10mm照射群では5日目まで共に細胞増殖率の増加が認められたが10mm照射群において20mm照射群と比較し、より細胞増殖率の増加が認められた。また出力の違いによる影響を分析すると、10mmおよび20mm照射群においては2W 両照射群においては細胞増殖の亢進が認められ、賦活化が示された。これはYuら³⁸⁾のLLLTは細胞増殖を促進するという報告と一致している。パルスレート (pps) およびパルスエネルギー (mJ) の違いを解析すると、10mm, 20mm照射群共に7.2W (90pps/80mJ 群) において細胞増殖率の減少が認められた。すなわち、これは同出力 (W) であってもパルスレート (pps) が大きい照射条件においてレーザー照射による熱や光の影響が細胞に蓄積するためと考えられる。

2. TGF- β 1 の変化について

TGF- β 1 は、歯周組織の再生に関与する重要な増殖因子であるが、細胞増殖を誘導するタンパク質としても報告されており^{39,40)}、様々なレーザー照射による線維芽細胞への影響を評価する指標の一つとして用いられている⁴¹⁻⁴³⁾。対照群と比較し20mm照射群の3日目および5日目、10mm照射群の5日目では差は認められなかった。しかしながら10mm照射群の3日目において7.2W (90pps/80mJ 群) では対照群と比較し統計学的に有意な増加が認められ、このことからヒト歯肉線維芽細胞株であるGin-1に対するNd:YAGレーザー照射はTGF- β 1産生を促進させる可能性が示唆された。Yongyanら⁴¹⁾はヒト皮膚由来線維芽細胞に対し照射距離5mm, 1.5J/cm²の条件でレーザー照射を行ったところ、TGF- β 1が増加したと報告している。すなわち、高出力とみなされる1.5J/cm²のレーザー照射であっても、照射ではなく5mmという照射距離をとることでTGF- β 1産生が増加するという点で本研究と一致している。

また、7.2W 両群を検討すると7.2W (90pps/80mJ 群) で7.2W (40pps/180mJ 群) と比較し統計学的に有意な増加が認められたことからパルスレート (pps) が大きい場合、TGF- β 1の産生を促す可能性が示唆された。

3. collagen の変化について

collagen は歯肉および歯根膜の主要な細胞外マトリク

スであり、歯の支持組織の構成要素としての役割を持つ。照射距離がcollagen産生率に与える影響としては20mm照射群では対照群と比較し差が認められず、10mm照射群の3日目において対照群と比較して7.2W 両群で統計学に有意な増加が認められた。これらの結果から20mmの照射距離ではcollagen産生に対するレーザー照射の影響は3日目の初期段階では見られないが5日目には経時的にかつ緩徐に増加すると考えられる。一方、10mmの照射距離では7.2W 両群では統計学に有意な増加が認められたことから、レーザー照射の影響が大きく、3日目という初期段階で速やかにcollagen産生を促進させる働きがあることが明らかになった。またHuaxuら⁴⁴⁾のマウスの皮膚に対する2.5J/cm²のNd:YAGレーザー照射を行った研究およびHakki³⁰⁾らのヒト歯肉線維芽細胞に対する6J/cm²のレーザー照射を行った研究は、本研究と同様にレーザー照射によるcollagen産生の増加を示したと報告している。

4. HSP47 の変化について

HSP47は細胞が恒常性を維持している時に発現が認められ、通常procollagenに結合しているタンパク質であるが⁴⁵⁻⁴⁸⁾、細胞変性に至る熱影響を受容すると発現が阻害される^{49,50)}と報告されている。Nd:YAGレーザーは組織深達性に優れ、組織内の水分に吸収されず組織内に熱が蓄積しやすいため、レーザー照射時の熱影響を考慮する必要がある^{32,33)}。線維芽細胞に対しCO₂レーザーを照射した場合のHSP47の発現に関する報告はある^{51,52)}が、Nd:YAGレーザーにおける報告はない。そこで、Gin-1に対する熱影響を評価するために蛍光免疫化学的手法を用いてHSP47の発現の有無を調べた。その結果、対照群と同様にすべてのレーザー照射群では細胞質内に顆粒状のHSP47の発現が認められた。このことから本研究のレーザー照射条件下では恒常性が喪失する程の熱影響は認められなかったと考えられる。しかし、熱影響がないと断定するにはHSP47の定量的評価および他のHSPの検索が必要である。

TGF- β 1, collagen および HSP47 はいずれも線維芽細胞の働きに関係し⁵³⁾、これまでもレーザー照射による創傷治癒効果の評価に用いられてきた⁵⁴⁾。よって本研究においてもレーザーの影響の効果の評価の指標として用いた。本研究においては、距離、出力 (W) および同出力におけるパルスレート (pps) × パルスエネルギー (mJ) の違いについて検索を行うにあたり結果から細胞変性を示すような不可逆的な影響を与えるまでには至らなかった。

本研究においてNd:YAGレーザー照射によりGin-1に対して細胞増殖、TGF- β 1 および collagen 産生の増加が認められた。特に照射距離10mm, 7.2W 両群の高出力照射においてもHSP47の発現が阻害される不可逆的な熱影響は受けることなくTGF- β 1 および collagen 産生の促進

が認められた。また、同出力 (W) においてもパルスレート (pps) の大きい条件下では細胞増殖の抑制が認められた。このことからこれらの作用は正常な創傷治癒過程の促進であることが示唆される。今後、Nd:YAG レーザーによる創傷治癒効果をより明らかにするためには、Gin-1 の賦活化または損傷を評価するタンパク質発現の検索、および動物を用いた実験など更なる検討が必要であると考えられる。

以上のことから不可逆的影響を細胞に与えるとされる高出力での Nd:YAG レーザー照射であっても対象物より 10mm の照射距離をとり、パルスレート (pps) を低く、パルスエネルギー (mJ) を高く設定した照射条件にすることで、Gin-1 に対して不可逆的な侵襲が生じず、細胞賦活作用が認められる可能性が示唆された。

結 語

本研究は Nd:YAG レーザー照射で、ヒト歯肉線維芽細胞に対する照射距離および照射出力を変化させた場合の影響について *in vitro* で検討し、以下の結論を得た。

1. 細胞増殖率の測定では 20mm 照射群および 10mm 照射群の 3 日目で 7.2W (90pps/80mJ 群) を対照群と比較し統計学的に有意な減少が認められた。また 10mm 照射群の 5 日目で 2 W 両群では対照群と比較し統計学的に有意な増加が認められた。

2. 培養上清中の TGF- β 1 産生率の測定では 10mm 照射群の 3 日目で、7.2W (90pps/80mJ 群) では対照群と比較し統計学的に有意な増加が認められた。さらに 7.2W (90pps/80mJ 群) で、7.2W (40pps/180mJ 群) と比較し統計学的に有意な増加が認められた。

3. 培養上清中の collagen 産生率の測定では 10mm 照射群の 3 日目で 7.2W 両群では対照群と比較して統計学的に有意な増加が認められた。また、2 W 群 (5 pps/400mJ 群) と比較し 7.2W 両群では対照群と比較し統計学的に有意な増加が認められた。

4. HSP47 は、すべての群で発現が認められた。

以上の結果から Nd:YAG レーザーを 10mm の照射距離でヒト歯肉線維芽細胞に照射すると 7.2W の高出力であっても HSP47 発現が観察され、TGF- β 1 および collagen 産生率の増加が認められることにより、細胞賦活作用が示された。

謝 辞

稿を終わるにあたりご指導ご鞭撻を賜りました本学歯周病学講座の諸先生方に心からお礼申し上げます。

文 献

1) Kara C, Süleyman H, Tezel A, et al: Evaluation of pain levels

- after Nd:YAG laser and scalpel incisions: an experimental study in rats. *Photomed Laser Surg*, 28 : 635-638, 2010.
- 2) Yamaguchi H, Kobayashi K, Sato Y, et al: Nd:YAG laser irradiation of the human dental pulp: implications as a predictor of pulp hemodynamics. *Lasers Surg Med*, 26 : 270-276, 2000.
- 3) Grassi RF, Pappalardo S, Frateiacchi A, et al: Antibacterial effect of Nd:YAG laser in periodontal pockets decontamination: a *in vivo* study. *Minerva Stomatol*, 53 : 355-359, 2004.
- 4) Wang Z, Ding Y, Wu Y: The effect of pulsed Nd:YAG laser used as an adjunct to subgingival scaling and root planning. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 21 : 292-294, 2003.
- 5) Liu CM, Shyu YC, Pei SC, et al: *In vitro* effect of laser irradiation on cementum-bound endotoxin isolated from periodontally diseased roots. *J Periodontol*, 73 : 1260-1266, 2002.
- 6) Chen YJ, Jeng JH, Lee BS, et al: Effects of Nd:YAG laser irradiation on cultured human gingival fibroblasts. *Lasers Surg Med*, 27 : 471-478, 2000.
- 7) White JM, Goodis HE, Rose CL: Use of the pulsed Nd:YAG laser for intraoral soft tissues surgery. *Lasers Surg Med*, 11 : 455-461, 1991.
- 8) Atsawasuwan P, Greethong K, Nimmanon V: Treatment of gingival cases. *J Periodontol*. hyperpigmentation for esthetic purposes by Nd:YAG laser: report of 4, 71 : 315-321, 2000.
- 9) Novaes AB Jr, Pontes CC, Souza SL, et al: The use of acellular dermal matrix allograft for the elimination of gingival melanin pigmentation: case presentation with 2 years of follow-up. *Pract Proced Aesthet Dent*, 14 : 619-623, 2002.
- 10) Matsui K, Yuasa M, Yoshida T, et al: Clinical observation of periodontal tissues after periodontal flap surgery Combined with Nd:YAG laser irradiation. *J Jpn Soc Periodontol*, 48 : 307-314, 2006.
- 11) Dilsiz A, Canakci V, Aydin T: The combined use of Nd:YAG laser and enamel matrix-proteins in the treatment of periodontal infrabony defects. *J Periodontol*, 81 : 1411-1418, 2010.
- 12) De Andrade AK, Feist IS, Pannuti CM, et al: Nd:YAG laser clinical assisted in class II furcation treatment. *Lasers Med Sci*, 23 : 341-347, 2008.
- 13) Sjöström L, Friskopp J: Laser treatment as an adjunct to debridement of periodontal pockets. *Swed Dent J*, 26 : 51-57, 2002.
- 14) Eltas A, Orbak R: Effect of 1,064-nm Nd:YAG laser therapy on GCF IL-1 β and MMP-8 levels in patients with chronic periodontitis. *Lasers Med Sci*, 27 : 543-550, 2012.
- 15) Slot DE, Kranendonk AA, Van der Reijden WA, et al: Adjunctive effect of a water-cooled Nd:YAG laser in the treatment chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 38 : 470-478, 2011.
- 16) Qadri T, Javed F, Poddani P, et al: Long-term effects of a single application of a water-cooled pulsed Nd:YAG laser in supplement to scaling and root planing in patients with periodontal inflammation. *Lasers Med Sci*, 26 : 763-736, 2011.
- 17) Gómez C, Domínguez A, García-Kass AI, et al: Adjunctive Nd:YAG laser application in chronic-periodontitis: clinical, immunological, and microbiological aspects. *Lasers Med Sci*, 26 : 453-463, 2011.
- 18) Qadri T, Poddani P, Javed F, et al: A short-term evaluation of Nd:YAG laser as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontal inflammation. *J Periodontol*, 81 : 1161-1166, 2010.

- 19) Slot DE, Kranendonk AA, Paraskevas S, et al: The effect of a pulsed Nd:YAG laser in non-surgical-periodontal therapy. *J Periodontol*, 80 : 1041-1056, 2009.
- 20) Yukna RA, Carr RL, Evans GH: Histologic evaluation of an Nd:YAG laser-assisted new attachment procedure in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 27 : 577-587, 2007.
- 21) Slot DE, Kranendonk AA, Paraskevas S, et al: The effect of a pulsed Nd:YAG laser in non-surgical periodontal therapy. *J Periodontol*, 80 : 1041-1056, 2009.
- 22) 石川和弘, 福田光男, 箕浦伸吾, 他 : Nd:YAG レーザーによる歯肉縁下歯石除去に関する基礎的研究. *日歯保存誌*, 36 : 902-909, 1993.
- 23) Thomas MH: Tissues and cells of the periodontium. *Periodontol*, 19-93 : 9-38, 2000.
- 24) 森口隆彦 : 形成外科 ADVANCE シリーズ 傷の治療 : 最近の進歩, 井上邦雄分担執筆 : 3. 創傷治癒と線維芽細胞, 克誠堂出版 (改訂第2版) : 21-29, 2005.
- 25) Sporn MB, Roberts AB: *in Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer-Verlag, Heidelberg, 95 : 419-472, 1990.
- 26) Miyazono K, Hellman U, Wernstedt C, et al: Latent high molecular weight complex of transforming growth factor beta 1. Purification from human platelets and structural characterization. *J Biol Chem*, 263 : 6407-6415, 1988.
- 27) Jacques E, Nör, Luisa DiPietro, Joanne E: Murphy-Ullrich, Richard O. Hynes, Jack Lawler, and Peter J. Polverini. Activation of Latent TGF- β 1 by Thrombospondin-1 is a Major Component of Wound Repair. *Oral Biosci Med*, 2 : 153-161, 2005.
- 28) 佐々木富美子, 楠木健司, 小川 豊 : ヒト線維芽細胞培養における各種血清の比較および TGF- β 含有量の検討. *熱傷*, 3 : 32-37, 2005.
- 29) 田村隆明, 山本 雅編著 : 分子生物学イラストレイテッド. 遠田悦子, 松島綱治, 後藤由季子, 野島 博, 田沼靖一, 渋谷正史分担執筆, 第7章 真核細胞の増殖と死, 東京, 2009, 羊土社, 197-242.
- 30) Hakki SS, Bozkurt SB: Effects of different setting of diode laser on the mRNA expression of growth factors and type I collagen of human gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci*, 7 : 325-331, 2012.
- 31) Horstmeyer A, Licht C, Scherr G, et al: Signalling and regulation of collagen. I synthesis by ET-1 and TGF- β 1. *FEBS J*, 272 : 6297-6309, 2005.
- 32) 森岡俊夫編著 : レーザー歯学 (Laser in Dental Medicine). 前田三男分担執筆, 第1章 レーザー光の概念, 東京, 1986, 医歯薬出版, 2-13.
- 33) Tsuda T, Miserendino LJ, Pick RM: Lasers in Dentistry. Harris DM, Pick RM, Tsuda T, 分担執筆, 第2章 レーザー物理学, 19-29, Miserendino LJ, Levy G, Miserendino CA, Tsuda T, 分担執筆, 第3章 生体組織とレーザーの相互作用, 東京, 2004, クインテッセンス出版, 31-44.
- 34) Sculean A, Schwarz F, Berakdar M, et al: Non-surgical periodontal treatment with a new ultrasonic device (Vector-ultrasonic system) or hand instruments. *J Clin Periodontol*, 31 : 428-433, 2004.
- 35) De Andrade AK, Feist IS, Pannuti CM, et al: Nd:YAG laser clinical assisted in Class II furcation treatment. *Lasers Med Sci*, 23 : 341-347, 2008.
- 36) Beldüz N, Yilmaz Y, Ozbek E, et al: The effect of neodymium-doped yttrium aluminum garnet laser irradiation on rabbit dental pulp tissue. *Photomed Laser Surg*, 28 : 747-750, 2010.
- 37) Tokita Y, Sunakawa M, Suda H: Pulsed Nd:YAG laser irradiation of the tooth pulp in the cat: 1. Effect of spot lasing. *Lasers Surg Med*, 26 : 398-404, 2000.
- 38) Yu Hai-yan, Chen Da-Fang, Wang Qi, et al: Effects of lower fluence pulsed dye laser irradiation on production of collagen and the mRNA expression of collagen relative gene in cultured fibroblasts *in vitro*. *Chinese Medical Journal*, 119 : 1543-1547, 2006.
- 39) Rumalla VK, Borah GL: Cytokins, growth factors and plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*, 108 : 718-733, 2001.
- 40) Gorti GK, Koch RJ: Modulation of wound healing and scarformation. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 10 : 287-291, 2002.
- 41) Dang Y, Ye X, Weng Y, et al: Effects of the 532-nm and 1,064-nm Q-switched Nd:YAG lasers on collagen turnover of cultured human skin fibroblasts: a comparative study. *Lasers Med Sci*, 25 : 719-726, 2010.
- 42) Kuo YR, Wu WS, Jeng SF, et al: Suppressed TGF- β 1 expression is correlated with up-regulation of matrix metalloproteinase-13 in keloid regression after flashlamp pulsed-dye laser treatment. *Lasers Surg Med*, 36 : 38-42, 2005.
- 43) Takeuchi H, Kubota S, Murakashi E, et al: Effect of transforming growth factor- β 1 on expression of the connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) gene in normal human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Periodont Res*, 44 : 161-169, 2009.
- 44) Liu H, Dang Y, Wang Z, et al: Laser Induced Collagen Remodeling: A Comparative Study In Vivo on Mouse Model. *Lasers Surg Med*, 40 : 13-19, 2008.
- 45) Sauk JJ, Smith T, Norris K, et al: Hsp47 and the translation-translocation machinery cooperate in the production of alpha 1 (I) chains of type I procollagen. *J Biol Chem*, 269 : 3941-3946, 1994.
- 46) Satoh M, Hirayoshi K, Yokota S, et al: Intracellular interaction of collagen-specific stress protein HSP47 with newly synthesized procollagen. *J Cell Biol*, 133 : 469-483, 1996.
- 47) Kurkinen M, Taylor A, Garrels JI, et al: Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen or gelatin. *J Biol Chem*, 259 : 5915-5922, 1984.
- 48) Nagata K, Yamada KM: Phosphorylation and transformation sensitivity of a major collagen-binding protein of fibroblasts. *J Biol Chem*, 261 : 7531-7536, 1986.
- 49) Nagata K, Saga S, Yamada KM: A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein. *J Cell Biol*, 103 : 223-229, 1986.
- 50) Jain N, Brickenden A, Ball EH, et al: Inhibition of procollagen I degradation by colligin: a collagenbinding serpin. *Arch Biochem Biophys*, 314 : 23-30, 1994.
- 51) Yasuda Y, Ohtomo E, Tsukuba T, et al: Carbon dioxide laser irradiation stimulates mineralization in rat dental pulp cells. *Int Endod J*, 42 : 940-946, 2009.
- 52) Yamasaki A, Tamamura K, Sakurai Y, et al: Remodeling of the rat gingiva induced by CO₂ laser coagulation mode. *Lasers Surg Med*, 40 : 695-703, 2008.
- 53) Martelli-Junior H, Cotrim P, Graner E, et al: Effect of transforming growth factor- β 1, interleukin-6, and interferon- γ on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol*, 74 : 296-306, 2003.
- 54) Ohashi S, Abe H, Takahashi T, et al: Advanced glycation end products increase collagen-specific chaperone protein in mouse diabetic nephropathy. *J Biol Chem*, 279 : 19816-19823, 2004.