原 著

高出力レーザーの低出力照射がラット骨髓細胞 三次元培養の石灰化に及ぼす影響

五味 一博 八島 章博 白川 哲
金指 幹元 関根 章子 小林 一行
長野 孝俊 松井 康太郎 山口 博康
新井 高

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室

(主任：新井 高教授)

(受理：平成 17 年 2 月 28 日)

Effects on Mineralization by Low-level Irradiation of Hard Laser in Three-dimensional Cultured Rat Bone Marrow Cells

Kazuhiro GOMI, Akihiro YASHIMA, Satoshi SHIRAKAWA,
Mikimoto KANAZASHI, Akiko SEKINE, Kazuyuki KOBAYASHI,
Takatoshi NAGANO, Koutarou MATSUI, Hiroyasu YAMAGUCHI,
and Takashi ARAI

Department of Periodontics and Endodontics, Tsurumi University, School of Dental Medicine
(Chief: Prof. Takashi ARAI)

(Accepted for Publication: February 28, 2005)

Abstract: Recently, the photobioactive reaction (PAR) effect which causes proliferation and differentiation of cells by using a high-power laser with a low output has been developed, and is used by lowering the output and shortening the irradiation time for low level-laser treatment (LLLT) to promote healing. However, there is little research on the use of low-output irradiation of high-power laser for cultured osteoblast cells.

This study evaluated the effect of low-level irradiation of hard laser, which uses a CO₂ laser and a semiconductor laser, on the mineralization of cultured rat bone marrow cells. We used a three-dimensional culture system of rat bone marrow cells to simulate the in vivo condition.

A significant difference of calcium amount under 2.6 W laser irradiation was found. However, the semiconductor laser did not lead to any increase of calcium amount.

This result shows that CO₂ laser irradiation has the effect of promoting calcification by osteoblasts, and optimal energy seems to exist around 2.6 W. However, there was no effect of promoting calcification by semiconductor laser irradiation.

In this study, laser did not promote calcification without the addition of dexamethasone, which accelerates osteoblast differentiation. This result shows that laser did not promote the differentiation to osteoblasts, and it was thought that laser promoted calcification of differentiated osteoblasts. The highest expression of HSP27 was shown under 2.6 W of CO₂ laser irradiation, which yielded the highest amount of calcium. It seems possible that the cascade of HSP27 involved the calcification of osteoblasts, which is stimulated by laser irradiation.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 16 : 10 ~ 15, 2005 Reprint request to Dr. GOMI)

Key words = Laser, Calcium volume, Heat shock protein27

キーワード=レーザー, カルシウム量, ヒートショックプロテイン 27

序 論

歯科領域で用いるレーザーには大きく分けて低出力レーザー（ソフトレーザー）と高出力レーザー（ハードレーザー）とがある。低出力レーザーには創傷治癒の促進効果があることが示されており^{1,2)}、歯科領域ではアフタ、骨折部および抜歯創などに応用され治癒および骨形成の促進効果を期待して用いられている³⁻⁶⁾。特に骨の修復に関する低出力レーザーの影響については培養細胞や創傷治癒モデルを用いて多くの報告がされており、レーザー照射により培養骨芽細胞の細胞増殖、Alkaline Phosphatase (ALP) 活性あるいは nodule 形成が上昇すること⁷⁻⁹⁾、実験動物の実験的骨折部にレーザーを照射することで治癒や骨形成の促進が生じることが示されている¹⁰⁻¹⁴⁾。これに対し高出力レーザーは細胞の蒸散を引き起こす photobiodestructive reaction (PDR) 効果により切開や病巣部の除去などを行う high level laser treatment (HLLT) を目的として用いられてきた。しかし、高出力レーザーを低出力で用いることで細胞の増殖や分化を引き起こす photobioactive reaction (PAR) 効果が得られることが知られるようになり¹⁵⁾、出力を下げ照射時間を短くすることで治癒促進に用いる low level laser treatment (LLLT) を目的として用いられるようになってきた¹⁶⁾。特に炭酸ガス (CO₂) レーザーは Nd:YAG レーザーや Er:YAG レーザーといった他のハードレーザーと比較し治癒促進効果に優れていることが報告されている¹⁷⁻²⁰⁾。Tang ら²¹⁾ は CO₂ レーザーの低出力照射により人工的骨折部の治癒および石灰化が促進したと報告しており、田島は²²⁾ CO₂ レーザーをラット脛骨に照射することで骨髄側において早期に骨の再生が始まることを示している。また、CO₂ レーザー照射周囲の組織に mitogen-activated protein kinase (MAPK) である extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) がリン酸化して活性化することを示し、細胞増殖が促進される可能性が報告されている²³⁾。

しかしながら高出力レーザーの低出力照射が培養細胞に与える影響についての報告は少なく²⁴⁾、特に骨芽細胞に与える影響についての報告は見当たらない。また、菅田らの報告^{25,26)}にあるように高出力レーザーの照射による 13-19℃ の温度上昇など、生体が種々のストレスにさらされると発現し、生体防護に働くヒートショックプロテインに関する検討もほとんどされていない。

本研究では高出力レーザーとして CO₂ レーザーと半導体レーザーを用い、これまで明らかにされていなかった低出力照射を行った場合の培養骨髄細胞に及ぼす影響について、カルシウム量と骨芽細胞への分化マーカーであるオステオカルシン (OC)、骨シアロタンパク質 (BSP) および骨芽細胞に発現する代表的なヒートショックプロテインで

あるヒートショックプロテイン 27 (HSP27)²⁷⁾ の遺伝子発現を指標として検索した。また、レーザーは組織内においてその効果を発揮することから、骨髄細胞をより組織内の状態に近づけるために 3 次元ゲル内培養を行うことにより評価した。さらにレーザー照射が骨芽細胞への分化の促進に影響するかについて検討した。

材料と方法

レーザー装置

本実験では CO₂ レーザーとしてオペレーター 03S (ヨシダ, 東京) および高出力半導体レーザーとしてライトサージ 3000 (オサダ, 東京) を使用した。

細胞採取

骨髄細胞は Maniopoulos ら²⁸⁾ の方法に従い、雄性 Wistar 系ラット (体重約 125g) の大腿骨より細胞懸濁液を得た。すなわち、ラットより摘出した大腿骨を 1 mg/ml ペニシリン G (Sigma, U.S.A.), 500 µg/ml ゲンタマイシン (Sigma, U.S.A) を含む α -Minimum Essential Medium (α -MEM, 大日本製薬, 大阪) 中にて 4 回洗浄した。その後可及的に軟組織を除去後、大腿骨の両骨頭を切除し上述の 1/10 量の抗菌薬、10% 牛胎児血清 (Gibco, U.S.A.), 50 µg/ml アスコルビン酸 (Sigma, U.S.A.), 10mM β -グリセロリン酸ナトリウム (Sigma, U.S.A.), 10⁻⁸M デキサメタゾン (Sigma, U.S.A) を含む full supplement α -MEM (FS- α -MEM) 15ml をシリンジに取り、24G の注射針で骨管内を洗い流すことにより骨髄細胞懸濁液を採取した。得られた骨髄細胞懸濁液 15ml を T-75 フラスコ (Falcon, U.S.A.) に取り CO₂ インキュベーター中で培養し、24 時間後にメディウムを交換し浮遊した細胞および血球などを取り除いた。以後 2-3 日おきに新しい FS- α -MEM と交換しながら 1 週間培養し、初代培養の細胞を本実験に用いた。

三次元培養

10 倍濃度の α -MEM、胎児牛血清、抗菌薬、アスコルビン酸、 β -グリセロリン酸ナトリウムおよびデキサメタゾンを 0.3% コラーゲン溶液 (cellgen I-PC, KOKEN, TOKYO) 中に溶解し FS- α -MEM と同濃度になるように添加し、0.26% 濃度の三次元培養用コラーゲン培地を作製した。この培地に 0.1% トリプシン (Sigma, USA) を用いフラスコより剥離、回収した細胞を 1.5 × 10⁵ cells/ml となるように調整し懸濁させた。24well ディッシュにコラーゲンゲル細胞懸濁液を 1 ml ずつ加え、CO₂ インキュベーター中で 12 時間培養しゲル化を確認した後、ゲル上に FS- α -MEM を 1.5ml 加えた。

レーザー照射

ゲル 3 次元培養開始 3 日目にメディウムを吸引除去した状態でレーザー照射を行った。各レーザーの照射条件を以

表 1 OC, BSP, HSP27 の PCR プライマー

OC	sense: 5' CATATGCTCAACAATGGACTT 3' antisense: 5' CTAAACGGTGGTGCCATAGAT 3' (size 151bp)
BSP	sense: 5' TGTCTCAGAGATCCGACAGAC 3' antisense: 5' ACCGAGAGATGTAGCCATGTT 3' (size 158bp)
HSP27	sense: 5' GGAGACTTCAAATGAAGAGGA 3' antisense: 5' TCCTCGTCGCTTTCCTTCATT 3' (size 216bp)

下に示す。

CO₂ レーザー群：24well dish 底部からチップ先端までの照射距離 300mm, 照射径 10.3mm に固定し, 各 5well に対し 2.0, 2.2, 2.4, 2.6, 2.8, 3.0W の条件で 20 秒間照射を行った。このときのパワー密度は 2.40, 2.64, 2.88, 3.12, 3.36, 3.60 W/cm² となる。

半導体レーザー群：24well dish 底部からチップ先端までの照射距離 12mm, 照射径 14.4mm に固定し, 各 5well に対し 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0, 2.0, 3.0W の条件で 20 秒間照射を行った。このときのパワー密度は 0.06, 0.18, 0.31, 0.49, 0.61, 1.22, 1.83 W/cm² となる。

コントロール群：レーザー非照射で, 条件を同じにするために実験群のレーザー照射中にはメディアムを除去しクリーンベンチ内に静置し, その後メディアムを加え実験を続けた。

各実験群培地の交換は 2 から 3 日おきに FS- α -MEM を用いて行った。

カルシウム測定

レーザー照射 1 週間後に 0.2% コラゲナーゼ (ワコー, 大阪) を 0.5ml 添加し, 4 時間インキュベートし, コラゲンゲルを溶解した後にカルシウム C テストワコーキット (ワコー, 大阪) を用いカルシウムの定量を行った。

なお, 統計処理は対応のない t 検定を用いた。

RT-PCR

レーザー照射の影響による遺伝子発現の変動を調べるためにレーザー照射 3 日後に PCR を行った。レーザー照射 3 日後のラット骨髓細胞より RNA-zol B (TEL-TEST INC, TX, USA) を用いてトータル RNA を分離し, それを元に Ready to go You-primed First-Strand Beads kit (Amersham-Pharmacia Biotech, NJ, USA) を用いて PCR テンプレートを調製した。グリセロアルデヒド-3 リン酸-デヒドロゲナーゼ (GAPDH) (Clontech, CA, USA) をコントロールとして細胞数を調整し, OC, BSP および HSP27 のプライマー (表 1) を用いて PCR を行い特定の遺伝子を増幅した (Perkin-Elmer/GeneAmp PCR system 9600)。PCR 反応 (94℃, 5 分間 / 94℃, 30 秒間, 55℃, 30 秒間, 72℃, 30 秒間) を 1 サイクルとして, 計 30 サイクル / 72℃, 10 分間) 終了後 4.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, エチジウムブロマイド染色し紫外線下で

確認した。

また, レーザー照射が骨芽細胞分化に与える影響を調べる目的で, 細胞採取時および三次元培養液に骨芽細胞への分化促進因子であるデキサメタゾン添加および無添加の試料を作製した。そして上述した条件下で培養開始 3 日目に CO₂ レーザー: 2.6W および半導体レーザー: 0.5W で 20 秒の照射を行い, 照射 1 週間後にカルシウムを測定し, レーザー非照射の試料をコントロールとした。

結 果

本実験に用いた照射条件においては半導体レーザーおよび CO₂ レーザー照射後にゲル培地の形態的な変化は認められなかった。

カルシウム量の測定

CO₂ レーザー照射群では図 1 に示すように, 2.0, 2.2, 2.4W においてコントロールより若干高いカルシウム量を認めたが有意差は認められなかった。一方, 2.6W ではコントロールに対し有意に高いカルシウムの増加が認められた。しかし, 2.8, 3W では逆にコントロールに対して有意にカルシウム量が減少していた。2.6W 照射時のパワー密度は 3.12W/cm² であり, エネルギー密度は 62.4J/cm² であった。

半導体レーザー照射群では図 2 に示すように, 照射エネルギーが 0.1W から増加するに従いカルシウム量は減少傾向を示した。特に 0.8, 1.0, 2.0, 3.0W ではコントロールと比較して有意差を認めた。

RT-PCR

CO₂ レーザー照射群では, カルシウム量が最も多かった 2.6W において OC, BSP および HSP27 の遺伝子発現の増強が認められた (図 3)。これに対し半導体レーザーは照射後 3 日後では 0.1 から 0.8W の間で OC, BSP および HSP27 の遺伝子発現はコントロールと比較し同程度あるいは若干増加する傾向を示したが, その後は照射エネルギーが増加するに従い発現が減少する傾向を示した (図 4)。

デキサメタゾン添加群では, コントロール, CO₂, 半導体照射ともにデキサメタゾン無添加群と比較し高いカルシウム量を示した。特に CO₂ レーザー照射群では, カルシウム量が最も多かった。これに対し, デキサメタゾン無添

図 1 CO₂ レーザー照射とカルシウム量との関係

図 2 半導体レーザー照射とカルシウム量との関係

加群では各試料間に差は認められなかった (図 5)。

考 察

低出力レーザーは、組織に対し治癒を促進し^{1,2)}、細胞の機能を亢進させることが知られており、特に骨系の細胞については数多くの研究が行われている⁷⁻⁹⁾。しかしながら、高出力レーザーの低出力照射が培養細胞に与える影響について検索した報告は少なく、CO₂ レーザーを低出力照射したときの培養線維芽細胞の PGE2 産生を調べた報告²⁴⁾ などが散見されるが、骨芽細胞に与える影響についての報告は見当たらない。しかしながら、CO₂ レーザーをラット脛骨に低出力照射することで骨組織の形成促進が認められている²²⁾ との報告もあることから、培養骨芽細胞に対しても石灰化の促進を生じることが考えられる。これまでの報告では、骨芽細胞の分化マーカーである ALP 活性を調べたり、平板培養で形成された bone nodule 数を計測することで骨形成の評価を行っているが、実際に沈着したカルシウム量を測定している研究は少ない。そこで今回我々は、レーザー照射により 3 次元培養基質中に形成された石灰化物を、カルシウム量の測定を行うことで評価した。また、レーザーは組織内を通過する過程でその効果を

図 3 CO₂ レーザー照射による OC, BSP, HSP27 の遺伝子発現

図 4 半導体レーザー照射による OC, BSP, HSP27 の遺伝子発現

図 5 デキサメタゾン添加、未添加の条件下でのカルシウム産生量

発揮すると考えられており、さらに CO₂ レーザーの作用がメカニカルストレスに近いものとする報告もあることから²⁴⁾、生体内部での状態を反映する環境としてコラーゲンをを用い 3 次元培養モデルによる実験を行った。2 次元培養よりも 3 次元培養モデルで行う方が、レーザーの効果をより発揮しやすいと考えられる。

ラット骨髄細胞をコラーゲンゲル内で 3 次元培養し、培養 3 日目に高出力レーザーの低出力照射を行い、培養開始 1 週間後にゲル内に沈着したカルシウム量を測定したところ、CO₂ レーザー照射群では 2.0, 2.2, 2.4W においてコントロールより若干高いカルシウム量を認めたが有意差は

認められなかった。しかしながら、2.6W ではコントロールに対し有意に高いカルシウム量が認められた。また、2.8, 3W では逆にコントロールに対して有意にカルシウム量が減少していた。このことから、CO₂ レーザーには骨芽細胞に作用し石灰化を促進させる効果があることが示され、その至適エネルギー量は2.6W 付近に存在すると考えられる。また、このエネルギー量を超えると細胞に傷害を引き起こす可能性があることが示唆された。さらにPCRの結果も、2.6W においてOC, BSPの発現が最も高く、カルシウム量の結果を支持している。

これに対し、半導体レーザーでは最もエネルギー量の少ない0.1W において、コントロールとほぼ同等のカルシウム量を示したが、エネルギー量が増大するごとにカルシウム量が減少した。また、PCRによっても0.1W においてOC, BSPの発現量が最も高く、その後エネルギー量が増えるにつれて発現が低下していた。この結果は、半導体レーザーの低出力照射には骨芽細胞に石灰化を促進させる作用がなく、また照射量が増すことにより石灰化を抑制する可能性があることを示していると考えられる。

本実験では2.6W というある一定のエネルギー量のCO₂ レーザー照射によって石灰化の促進が確認できたが、そのメカニズムについて考えてみると、2つの経路が考えられる。1つは骨髄細胞が骨芽細胞に分化する過程を促進させる経路であり、もう一方は骨芽細胞に分化した細胞の石灰化能を促進させる経路である。そこでレーザーの照射が骨芽細胞への分化に影響しているかについて検討したところ、骨芽細胞分化促進因子であるデキサメタゾンが無添加の場合、コントロール、CO₂ レーザーおよび半導体レーザー間でカルシウム量の差は認められず、低い値を示した。これに対しデキサメタゾン添加群では、CO₂ レーザー照射群にのみカルシウム量の増加が認められたことから、レーザー照射に伴うカルシウム量の増加は、骨芽細胞への分化促進によるのではなく、分化した骨芽細胞の石灰化能を亢進させることにより生じていることが示された。

さらに、骨芽細胞における石灰化亢進の経路を検討してみると、OC, BSPの遺伝子の発現が上昇していることから、骨芽細胞の骨基質の産生が亢進した結果としてカルシウム量が増加したことが考えられる。しかしながら、田島ら²³⁾はラット耳介にCO₂ レーザーを照射した際、組織の蒸散された部位から離れた、レーザーの低出力照射の効果が得られると考えられる領域に存在する骨格筋細胞にmitogen-activated protein kinase (MAPK) であるextracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) がリン酸化して活性化していることを確認している。また、Kawamuraら²⁹⁾は骨芽細胞においてp38 MAPKの活性化によってHSP27が誘導されることを報告している。さらに本実験においてCO₂ レーザーで最もカルシウム量が

多かった2.6WでHSP27の発現が最も高い結果を得たが、これは骨を形成している骨芽細胞においてHSP27が多く発現しているという報告³⁰⁾とも一致している。これらのことからHSP27が骨基質の産生を含め、骨代謝の過程において重要な役割を演じていることが考えられる。

今後さらにレーザー照射による石灰化促進の経路について検討する必要があると考えられる。

結 論

ラット骨髄細胞の3次元培養条件下において、CO₂ レーザーおよび半導体レーザーを低出力で照射したところ、CO₂ レーザーにおいて2.6W 20秒照射すなわち62.4J/cm²のエネルギー密度において石灰化の促進が認められたが、半導体レーザーでは石灰化の促進は認められなかった。

この石灰化の促進は、レーザーによる骨芽細胞への分化促進によるものではなく、分化した骨芽細胞における石灰化促進作用によることが示された。さらに、3次元培養は*in vitro*において*in vivo*の状態をある程度再現できることから、レーザー実験モデルとして適していると考えられる。

文 献

- 1) Mester, E., Mester, A.F. and Mester, A.: The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med*, **5**: 31-39, 1985.
- 2) Braverman, B., McCarthy, R.J., Ivankovich, A.D., Forde, D.E., Overfield, M. and Bapna, M.S.: Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg Med*, **9**: 50-58, 1989.
- 3) Honmura, A., Ishii, A., Yanase, M., Obata, J. and Haruki, E.: Analgesic effect of Ga-Al-As diode laser irradiation on hyperalgesia in carrageenin-induced inflammation. *Lasers Surg Med*, **13**: 463-469, 1993.
- 4) Kubota, J. and Ohshiro, A.: The effects of diode laser low reactive-lever laser therapy (LLLT) on flap survival in a rat model. *Laser Therapy*, **1**: 127-133, 1989.
- 5) Braverman, B., McCarthy, R.J., Ivankovich, A.D., Forde, D.E., Overfield, M. and Bapna, M.S.: Effect of helium-neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg Med*, **9**: 50-58, 1989.
- 6) Anneroth, G., Hall, G., Ryden, H. and Zetterqvist, L.: The effect of low-energy infra-red laser radiation on wound healing in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **26**: 12-17, 1988.
- 7) Ozawa, Y., Shimizu, N., Kariya, G. 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.
- 8) 高橋政人, 横瀬敏志: 骨芽細胞におけるSoft laserの影響に関する研究. 明海大学歯学雑誌, **26**: 208-215, 1997.
- 9) Ueda, Y. and Shimizu, N.: Pulse irradiation of low-power laser stimulates bone nodule formation. *J Oral Sci*, **43**: 55-60, 2001.
- 10) Trelles, M.A. and Mayayo, E.: Bone fracture consolidates faster with low-power laser. *Lasers Surg Med*, **7**: 36-45, 1987.
- 11) Abe, T.: Diode laser LLLT-enhanced bone fusion of femoral shaft fracture complicated by chronic osteomyelitis: a case report. *Laser Therapy*, **2**: 175-178, 1990.

- 12) Nagasaka, A., Kato K. and Negishi, A.: Bone regeneration effect of low level lasers including argon laser. *Laser Therapy*, **3** : 59-62, 1991.
- 13) Garavello-Freitas, I., Baranauskas, V., Joazeiro, P.P., Pado-vani, C.R., Dal Pai-Silva, M. and da Cruz-Hofling, M.A.: Low-power laser irradiation improves histomorphometrical parameters and bone matrix organization during tibia wound healing in rats. *J Photochem Photobiol B*, **70** : 81-89, 2003.
- 14) Luger, E.J., Rochkind, S., Wollman, Y., Kogan, G. and Dekel, S.: Effect of low-power laser irradiation on the mechanical properties of bone fracture healing in rats. *Lasers Surg Med*, **22** : 97-102, 1998.
- 15) 大城俊夫: 痛みに対する低反応レベルレーザー療法—方法と応用に関する再考. *日レ医*, **9** : 33-41, 1988.
- 16) Ohshiro, T. and Calderhead, R.G.: Development of low reactive-level laser therapy and its present status. *J Clin Laser Med Surg*, **9** : 267-275, 1991.
- 17) Friesen, L.R., Cobb, C.M., Rapley, J.W., Forgas-Brockman, L. and Spencer, P.: Laser irradiation of bone: II. Healing response following treatment by CO₂ and Nd:YAG lasers. *J Periodontol*, Jan; **70** : 75-83, 1999.
- 18) McDavid, V.G., Cobb, C.M., Rapley, J.W., Glaros, A.G. and Spencer, P.: Laser irradiation of bone: III. Long-term healing following treatment by CO₂ and Nd:YAG lasers. *J Periodontol*, **72** : 174-182, 2001.
- 19) Nowak, K.C., McCormack, M. and Koch, R.J.: The effect of superpulsed carbon dioxide laser energy on keloid and normal dermal fibroblast secretion of growth factors: a serum-free study. *Plast Reconstr Surg*, **105** : 2039-2048, 2000.
- 20) Peng, X.: A new multipurpose CO₂ laser therapy instrument. *J Clin Laser Med Surg*, **13** : 33-35, 1995.
- 21) Tang, X.M. and Chai, B.P.: Effect of CO₂ laser irradiation on experimental fracture healing: a transmission electron microscopic study. *Lasers Surg Med*, **6** : 346-352, 1986.
- 22) 田島直人: ラット脛骨組織の骨形成能に対する炭酸ガスレーザー照射の影響について. *日レ歯誌*, **14** : 32-43, 2003.
- 23) 田島直人, 横瀬敏志, 門倉弘志, 安達広太郎, 柿坪秀具, 松岡哲朗, 藤枝和夫, 長谷川彰彦, 片山 直: ラット骨格筋細胞における MAPK の発現に及ぼす CO₂ レーザーの影響について. *日歯保存誌*, **45** : 583-590, 2002.
- 24) 堅田尚生: レーザー照射が線維芽細胞の PGE2 産生に及ぼす影響. *愛知大歯誌*, **32** : 159-167, 1994.
- 25) 菅田文雄, 大森康以知, 田中昭男, 遊津隆義, 千田 彰, 五味明良, 神谷一有, 長谷川二郎: 象牙質に対する炭酸ガスレーザーの照射効果. *日レ歯誌*, **5** : 73-80, 1994.
- 26) Anic, I., Dzuber, A., Vidvic, D. and Tudja, M.: Temperature and surface changes of dentine and cementum induced by CO₂ laser exposure. *Int Endod J*, **26** : 284-293, 1993.
- 27) Lyndon, F.C. and Uoshima, K.: Differential estrogenic regulation of small Mr heat shock protein expression in osteoblasts. *J Biol Chem*, **269** : 7869-7873, 1994.
- 28) Maniopoulos, C., Sodek, J. and Melcher, A.H.: Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and Tissue Res*, **254** : 317-330, 1988.
- 29) Kawamura, H., Otsuka, T., Matsuno, H., Niwa, M., Matsui, N., Kato, K., Uematsu, T. and Kozawa, O.: Endothelin-1 stimulates heat shock protein 27 induction in osteoblasts: involvement of p38 MAP kinase. *Am J Physiol*, **277** (6 Pt 1) : E1046-1054, 1999.
- 30) Tiffée, J.C., Griffin, J.P. and Cooper, L.F.: Immunolocalization of stress proteins and extracellular matrix proteins in the rat tibia. *Tissue Cell*, **32** : 141-147, 2000.