

CO<sub>2</sub>レーザー照射はチタン上のヒト歯根膜線維芽細胞に対する  
リポ多糖(LPS)の影響を抑制し細胞の増殖および機能を回復させる

若林庸生

松本歯科大学大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

(主指導教員: 八上公利)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

CO<sub>2</sub> laser radiation restores the growth and function of  
human periodontal ligament fibroblasts  
affected by lipopolysaccharide (LPS) on titanium

Tsuneo Wakabayashi

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine, Matsumoto  
Dental University

Chief Academic Advisor: Kimitoshi Yagami

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

## 要旨

【目的】 近年、口腔インプラント周囲炎に対して、レーザーによる外科治療が応用されるようになってきた。その目的は、インプラント表面に付着した細菌や炎症性肉芽組織を除去し、インプラント表面への新たな骨と歯肉組織の再生を促すこととされている。しかし、レーザーによるインプラント表面の変化や周囲の骨および歯肉組織への影響について詳細な報告は少ない。そこで本研究では、チタン表面へレーザーを照射した際のチタン材料表面の変化と Lipopolysaccharide (LPS) 存在下におけるヒト歯根膜線維芽細胞の変化について検証した。

【材料および方法】 チタン板上でヒト由来歯根膜線維芽細胞を培養し、LPS 添加 24 時間後に CO<sub>2</sub>レーザーを出力 2.0w/sec で 0～60 秒間照射した。その後一定期間培養し、チタン表面の性状変化を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。細胞の変化については、細胞数を 4',6- Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI)にて計測した。また、細胞の付着状態に関してはアクチンを、細胞の分化や機能についてはI型コラーゲンおよび VEGF をそれぞれ免疫染色にて観察した。さらに、RT-PCR 法を用いてI型コラーゲンおよび VEGF の遺伝子発現変化を解析した。

【結果】 チタン板の研磨面および粗造面に CO<sub>2</sub>レーザーを 60 秒間照射したところ、チタン表面の形状の変化は認められなかった。CO<sub>2</sub>レーザー照射を行ったチタン板における細胞数は、培養 3 日目において減少した。しかし、7日目では研磨面および粗造面ともにチタン表面は殆どが細胞で覆われていた。LPS 添加により、細胞増殖は7日目まで抑制されたが、CO<sub>2</sub>レーザー照射群では増加していた。また、LPS 添加によりI型コラーゲンおよび VEGF の mRNA 発現およびそれらのタンパク産生は低下したが、CO<sub>2</sub>レーザー照射群では培養時間に比例して研磨面と粗造面ともに増加した。

【考察】 チタン表面への CO<sub>2</sub>レーザーの照射は、チタン表面の性状に関わらずその表面形態に変化を与えなかった。また、CO<sub>2</sub>レーザーの照射は LPS によるヒト歯根膜線維芽細胞への影響を抑制し細胞増殖および機能発現を回復させた。以上のことより、チタン表面への CO<sub>2</sub>レーザー照射は線維芽細胞の増殖と分化を促進し、組織再生に必要なコラーゲン産生や血管形成を促すことが示唆された。

## 緒言

口腔インプラントは、従来の補綴治療に較べて、咀嚼機能や審美性を向上させる有効な療法である。インプラントの維持には口腔細菌や化学物質による周囲組織炎やインプラント構造体の劣化を防止することが不可欠である<sup>(1)</sup>。近年、口腔インプラントに発症するインプラント周囲炎に対して、レーザーによる外科治療が応用されるようになってきた<sup>(2)</sup>。その目的は、インプラント表面に付着した細菌や炎症性肉芽組織を除去し、インプラント表面への新たな骨と歯肉組織の再生を促すこととされている。

インプラント周囲炎を含む歯周疾患は、歯肉辺縁のプラークの蓄積によって引き起こされた炎症が、上皮付着の剥離を起こし、歯周組織に波及していく疾患である。そのプラークを構成するグラム陰性菌由来のリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) が、歯周疾患の発病および進行に大きな役割を演じていると考えられている<sup>(3)</sup>。また、歯周病原性細菌と考えられている

*Porphyromonas gingivalis*や*Actinobacillus actinomycetemcomitans*由来のLPSは、さまざまな生物学的活性を有し、特に歯周病における歯槽骨に対する強い吸収促進作用が報告されている<sup>(4)</sup>。したがって、インプラント周囲炎の治療においてLPSを完全に除去することは、インプラント周囲組織の再生と維持に重要である。

インプラントの表面形態によるインプラントへの細菌感染を低減する効果として、スケーリングやチタンブラシなどによるチタン表面の平滑化がある<sup>(5)</sup>。また、クロルヘキシジンやフッ化ナトリウムによるバイオフィルム内の細菌の殺菌効果も報告されている<sup>(6)</sup>。しかし、インプラント形状の変化やチタンの腐食性の問題がある<sup>(7)</sup>。

Kato ら<sup>(8)</sup>は、細菌汚染チタンインプラントに対して CO<sub>2</sub> レーザーを照射することにより殺菌効果が得られることを報告している。また、島津ら<sup>(9)</sup>は、アナターゼ型のチタンへの CO<sub>2</sub> レーザーの照射により酸化チタンが形成され活性酸素の働きによりバイオフィルムの形成が阻止される可能性を示した。CO<sub>2</sub> レーザーは長波長帯で遠赤外線型レーザーに分類され、表面吸収型レーザーと深部透過型レーザーの中間的効果を持つ<sup>(10)</sup>。そして、波長が長い金属にほとんど反応せず、ガラスやポリエチレンなどの透明体でも加工が可能であることや、単位面積当たりの熱エネルギーが他のレーザーと比較して最も高いため、臨床では歯肉処置、口腔内殺菌や凝血など軟組織の外科的処置に用いられている。しかし、生体内への熱の蓄積があり、過度の照射で組織壊死などを誘発する危険性が指摘されている<sup>(11)</sup>。一方、CO<sub>2</sub> レーザーは歯髄細胞の神経再生の活性化や、Vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現を促進する作用が報告されている<sup>(12, 13)</sup>。VEGF は組織の再生の際に血管誘導をする因子で

あり、インプラント周囲炎後の歯肉や骨の再生に必要ある<sup>(14)</sup>。

そこで、本研究ではチタン表面に付着したヒト歯根膜線維芽細胞へ LPS を作用させ、CO<sub>2</sub> レーザーを照射した際のチタン材料表面の変化と歯根膜線維芽細胞の変化について検証した。

## 材料および方法

### 1. 細胞培養

研磨加工 (# 800)もしくは粗造加工 (Al/Si ブラスト処理)された JIS Grade 2 のチタン板(株式会社ヨシオカ, 10x10x1 mm)を, アセトン・エタノールにて洗浄した後に高圧蒸気滅菌して使用した. ヒト由来歯根膜線維芽細胞 (Lonza Group Ltd, Switzerland)は通法に従って専用培地 Mesenchymal stem cell basal medium (MSCBM)/線維芽細胞増殖因子(b-FGF) (Lonza Group Ltd)を用いて5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて継代培養した. 継代培養した細胞は実験開始前に 0.05% Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)/0.25%トリプシンにて処理し, D-Minimal essential medium (D-MEM)/10% ウシ胎児血清 (FBS) (JRH Bioscience, Lenexa, KS, USA)培地に細胞数  $1 \times 10^5$  cells/ml にて6穴マルチプレートに配置したチタン板上に播種した.

### 2. ヒト歯根膜線維芽細胞の LPS 添加と CO<sub>2</sub>レーザー照射

チタン板に細胞を播種して 24 時間培養後, 一部の培養群 (n=6)に 0.1~1.0  $\mu$ g/ml の Lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, USA)を添加してさらに 24 時間培養した. CO<sub>2</sub>レーザー (OpeLaser®, 吉田製作所, 東京)はチタン表面から5mm の距離にて出力 2.0w/sec で 10 および 60 秒間照射した. 一定期間培養後, チタン表面の性状および付着細胞の変化を観察した. CO<sub>2</sub>レーザー照射および LPS 未添加で培養した細胞を対照とした.

### 3. チタン表面形態変化の観察

走査型共焦点レーザー顕微鏡 (LEXT-OLS4100, オリンパス, 東京)を用いて走査モード:3D, 対物レンズ型式: UMPLFLBD 5x, 画像サイズ: 1024 x 1024  $\mu$ mの条件で走査電子顕微鏡画像 (SEM)撮影および表面粗さ計測を行い, 算術平均粗さ ( $Ra(\mu m) = 1/l \cdot \int_0^l |f(x)| dx$ )にて評価した.

### 4. ヒト歯根膜線維芽細胞の組織化学的観察

研磨面および粗造面のチタン板上で培養したヒト歯根膜線維芽細胞に CO<sub>2</sub>レーザーを照射して7日間培養後, 細胞を4%Paraformaldehyde(PFA)/PBS で固定した. 細胞の生存に関して 4',6- Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI: Vector Laboratories, CA, USA)にて核染色して細胞数を計測した. 細胞の付着状態に関してアクチンを Phalloidin (Vector Laboratories, CA, USA)にて蛍光染色した. 細胞の分化と機能発現について抗ヒト I 型コラー

ゲンウサギ抗体(Abcam PLC, Cambridge, UK)および抗ヒト VEGF ヒツジ抗体(PeproTech, NJ, USA)を一次抗体としてそれぞれ免疫標識した。そして、蛍光染色として I 型コラーゲンは VectaFluor R.T.U. DyLight<sup>®</sup> 488 Anti-Rabbit IgG (Vector Laboratories) にて、VEGF はロダミン抗ヤギ IgG 抗体 VectaFluor R.T.U. DyLight<sup>®</sup> 594 Anti-Rabbit IgG (Vector Laboratories) にて、それぞれ蛍光顕微鏡 (Axio Vision2, Zeiss, Germany) で観察した。

また、I 型コラーゲンを染色した標本各5視野のデジタルイメージ写真を画像処理ソフト (ImageJ 1.47v, <http://imagej.nih.gov/ij/>, USA) で処理し、蛍光染色陽性面積を計測して I 型コラーゲンタンパク質量として定量解析を行った。

## 5. 遺伝子発現解析

CO<sub>2</sub> レーザーを照射して7日培養後に、total RNA を抽出し RT-PCR 法にて遺伝子発現変化を解析した。すなわち、TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Cells-to-CT<sup>™</sup>Kit を用いて細胞から total RNA を抽出した後、逆転写反応により各サンプルのテンプレート DNA を作成した。PCR は TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Applied Bio Systems, CA, USA) のプロトコールに従い、各サンプルのテンプレート DNA に I 型コラーゲン (Assay ID: Hs00164004\_m1), VEGF (Assay ID: Hs00900055\_m1), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, Assay ID: Hs03929097\_g1) をプローブとして加え反応させた。mRNA の発現解析は、Applied Step One plus PCR System<sup>®</sup> (Applied Bio Systems) を用いた。

## 6. 統計分析

データ解析は、welch の検定を用いて統計学的処理を行い  $P$  値は  $P < 0.05$  を\*,  $P < 0.01$  を\*\*として示し、 $P < 0.05$  を有意とした。

## 結果

### 1. CO<sub>2</sub>レーザー照射によるチタン表面の変化

CO<sub>2</sub>レーザー60秒間照射によるチタン表面の形状は、研磨面(図1A: a, b)および粗造面(図1A: c, d)ともにSEM像における表面所見に変化はなかった。表面粗さ(Ra)の計測では、研磨面では未照射面(図1B: e)が Ra:17.73±0.55 μmなのに対して、60秒間照射後(図1B: f)では Ra: 17.42±0.31 μmと変化がなかった。また、粗造面の表面粗さは未照射面(図1B: g)が Ra: 18.17±1.25 μmなのに対して、60秒間照射後(図1B: h)では Ra:17.82±1.63 μmと変化がなかった。

### 2. CO<sub>2</sub>レーザー照射によるヒト歯根膜線維芽細胞の付着状態の変化

対照として培養された未処理のヒト歯根膜線維芽細胞は、研磨面は研磨傷の方向に整列し(図2a, d)、粗造面では樹枝状に突起を伸ばして隙間なく付着していた(図2g, j)。CO<sub>2</sub>レーザー照射後3日目における細胞の付着状態は、研磨面では粗造面に比べて減少し、10秒よりも60秒のほうが少なかった(図2b, c, h, i)。照射後7日目では、研磨面および粗造面ともに付着細胞が増加しチタン表面が細胞で覆われていた(図2e, f, k, l)。いずれの条件でも付着した細胞は、配列や突起の方向性に変化はなく、I型コラーゲン染色に強い陽性を示した。

### 3. CO<sub>2</sub>レーザー照射によるヒト歯根膜線維芽細胞の細胞数の変化

CO<sub>2</sub>レーザー照射によるチタン表面の細胞数の変化を図3に示した。研磨面では対照(243±12.2 cells/area)に比べて照射後3日目まで減少(183±9.1 cells/area)していたが(図3A)、粗造面では対照(196±9.8 cells/area)に対して照射後に若干の減少(194±9.7 cells/area)を示すのみであった(図3B)。いずれの表面性状でも照射後7日目には対照に比べて細胞数の増加が確認された(図3A,B, 研磨面:225±12.9 cells/area, 粗造面: 201±4.6 cells/area)。また、LPS添加した細胞数の変化を14日目と比較すると、未照射では研磨面が 238±25.7 cells/area, 粗造面が 193±15.2 cells/area であったのに対して、照射後は研磨面が 297±9.2 cells/area, 粗造面が 215±20.4 cells/area と回復を示した(図3A,B)。

### 4. CO<sub>2</sub>レーザー照射によるヒト歯根膜線維芽細胞の基質産生能の変化

歯根膜線維芽細胞はCO<sub>2</sub>レーザー照射により、I型コラーゲン mRNA の発現を培養3日目まで研磨面および粗造面ともに増加した。その効果は、照射時間に比例して上昇した(図4A)。

LPS 添加された細胞は I 型コラーゲンのタンパク質産生が低下した(図 4B, LPS). しかし, CO<sub>2</sub>レーザー照射7日目では, I 型コラーゲンのタンパク質産生(図 4B, Laser)が増加した. そして, LPS 添加後に CO<sub>2</sub>レーザー照射を行った細胞では, I型コラーゲンのタンパク質産生が有意に増加した(図 4B, LPS+Laser).

アクチンのタンパク質産生は, 対照(図5a)に比べて LPS 添加により著明に低下した(図5b)が, CO<sub>2</sub>レーザー照射7日目の細胞では, アクチンのタンパク質産生(図5c)が増加した. そして, LPS 添加後に CO<sub>2</sub>レーザー照射を行った細胞では, アクチン(図5d)のタンパク質産生が回復した.

#### 5. CO<sub>2</sub>レーザー照射によるヒト歯根膜線維芽細胞の VEGF 発現への影響

CO<sub>2</sub>レーザー照射されたヒト歯根膜線維芽細胞は, 研磨面および粗造面ともに対照に比べて VEGF を強く発現していた(図6e, g). LPS 添加により VEGF 産生は減少した(図6f)が, CO<sub>2</sub>レーザー照射によりそれは回復した(図6h).

VEGF mRNA 発現は, CO<sub>2</sub>レーザー照射によりいずれの表面性状においても増加した(図7研磨面:1.14 倍、粗造面:1.12 倍). また, いずれの表面性状においても LPS 添加により VEGF mRNA 発現は減少した(図7, 研磨面:0.63 倍、粗造面:0.60 倍). しかし, LPS 添加によるそれらの影響は, いずれの表面性状においても CO<sub>2</sub>レーザー照射により VEGF mRNA 発現を回復した(図7, 研磨面:1.01 倍、粗造面:1.06 倍).

## 考察

今回我々は、チタン表面で培養したヒト歯根膜線維芽細胞に対して LPS を作用させ、そこへ CO<sub>2</sub> レーザーの照射を行い細胞の増殖と分化について検討した。その結果、CO<sub>2</sub> レーザーの照射は細胞の一時的な減少や機能低下を起こしたが、細胞は再び増殖し機能発現を速やかに回復した。さらに、LPS を添加した細胞において VEGF の産生が増加した。これらのことより、レーザー照射はチタン表面の性状に変化を与えることなく LPS の影響を減少させ、細胞の増殖と分化を促進し、組織再生因子の発現増加を促すことが示唆された。

CO<sub>2</sub> レーザーのエネルギーはチタンには吸収されにくく、チタン表面の変色や構造変化を起こさないとされている<sup>(10, 15)</sup>。実際に本研究のチタン表面解析結果においても、CO<sub>2</sub> レーザー照射による表面粗さの変化は見られなかった(図1)。一方、細胞増殖に対しては、CO<sub>2</sub> レーザーの照射時間に比例して研磨面および粗造面ともに3日目では減少していたが、7日目ではいずれの照射時間や表面でもアクチンの産生増加とともに(図5)細胞の増殖が確認された(図2, 3)。さらに、CO<sub>2</sub> レーザーの照射により線維芽細胞の形質である I 型コラーゲンの産生も上昇させることが観察された(図4)。この結果は、Khadra ら<sup>(16)</sup>が報告した低出力レーザーによるチタン表面で培養した骨芽細胞の増殖効果と共通するものである。インプラントへの細菌感染を低減する効果として、スケーリングやチタンブラシなど機械的作用によるバイオフィルムの除去やチタン表面の研磨による清掃法がある<sup>(5)</sup>。すなわち、平滑なチタン面に対して歯肉線維芽細胞は付着するが細菌の付着性の低いことを利用した再生法である。しかし、粗造面の陥凹部やインプラントと骨の間隙などの細部への到達は難しく完全ではない。また、Kato ら<sup>(8)</sup>は、チタンの表面構造の違いにより殺菌率に差はなく、微細構造間での反射により凹凸微細構造内へ入り込んだ細菌に対しても到達するとしている。したがって、CO<sub>2</sub> レーザーはスケーラーや研磨ブラシ等による清掃法に較べて、もともとのチタン表面の形状に変化を与えずに付着物や細菌を分解除去できる可能性がある。

Giannelli ら<sup>(17)</sup>は、LPS をコートしたチタン板上でマクロファージを培養し YAG レーザーを照射したところ、マクロファージの活性や一酸化窒素産生を低下させることを報告している。今回の実験では、チタン板上の線維芽細胞に LPS を添加し iNOS 遺伝子の発現変化を観察した。そして、研磨面および粗造面ともに CO<sub>2</sub> レーザー照射後3日目で iNOS 発現が高値を示し、その後7日目で減少していた(結果表示なし)。このことは、CO<sub>2</sub> レーザー照射は細胞に対して一時的に活性酸素産生の誘因になるものの、細胞増殖が見られる3-7日目では細胞への影響が減少することを意味する。したがって、今回の条件での CO<sub>2</sub> レーザー照射は、LPS による

iNOS の発現を抑制することにより、線維芽細胞の増殖や I 型コラーゲンの産生および VEGF の発現等を妨げずにチタン表面へ細胞を付着させたと考えられる。

I 型コラーゲンは、歯肉組織再生において重要な基質タンパクである。インプラント周囲のポケットの拡大を防ぐ意味でも線維芽細胞による I 型コラーゲンの産生が予後に大きく影響する。今回の結果から、研磨面、粗造面ともに CO<sub>2</sub> レーザー照射後に I 型コラーゲンのタンパク質産生(図2)と遺伝子発現(図2, 4)の増加が確認されたが、LPS 添加後の研磨面における発現増加が顕著であった。以上の実験結果は、CO<sub>2</sub> レーザーの照射が研磨面における繊維芽細胞の付着効果を促進し、インプラント周囲ポケットへの細菌の侵入を防御する可能性を示す。今回の実験でさらに興味深いのは、CO<sub>2</sub> レーザー照射による VEGF 発現の増加である。CO<sub>2</sub> レーザーの照射はヒト歯根膜線維芽細胞の VEGF mRNA の発現およびタンパク質産生を、いずれの表面性状におけるチタン板上でも上昇させた。さらに、CO<sub>2</sub> レーザー照射は、ヒト歯根膜線維芽細胞において LPS 添加により減少された、VEGF の mRNA 発現とタンパク質の産生を回復させた(図6, 7)。この結果は、Jiang ら<sup>(12)</sup>による創傷癒合の初期における CO<sub>2</sub> レーザー照射によって発現誘発される VEGF が、線維芽細胞増殖と血管形成に関与しているという知見と一致するものである。以上より CO<sub>2</sub> レーザー照射は、インプラント周囲炎後の付着歯肉の再生に寄与することが期待される。

## 結論

チタン表面におけるヒト歯根膜線維芽細胞への CO<sub>2</sub>レーザーの照射は、付着細胞数の一時的な減少や機能低下を起こしたものの、培養3日後より細胞が増加し、細胞のチタン表面への付着およびI型コラーゲン産生が速やかに回復した。さらに、その効果は LPS 添加した細胞においても VEGF の産生を増強した。これらのことより、CO<sub>2</sub>レーザー照射はチタン表面の性状に変化を与えることなく、LPS の影響を阻害し、線維芽細胞の増殖と分化を促進して組織再生に必要な血管形成を促す可能性が示唆された。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて下さり、ご指導とご校閲をいただきました松本歯科大学大学院歯学独立研究科の諸先生方に謹んで感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際しましてご協力をいただきました歯科理工学講座の永澤 栄教授、口腔衛生学講座の定岡 直助教に深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) Todescan S, Lavigne S, Cholakis A.K. (2012) Guidance for the Maintenance Care of Dental Implants: Clinical Review. *J Can Dent Assoc* 78: 1-8.
- 2) Ashnagar S, Nowzari H, Nokhbatolfoghahaei H, Yaghoub Zadeh B, Chiniforush N, Choukhachi Zadeh N. (2014) Laser treatment of peri-implantitis: a literature review. *J Lasers Med Sci* 5: 153-162.
- 3) Sakamoto E, Mihara C, Ikuta T, Inagaki Y, Kido J, Nagata T. (2015) Inhibitory effects of advanced glycation end-products and *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide on the expression of osteoblastic markers of rat bone marrow cells in culture. *J Periodontal Res* 30.
- 4) Lewkowicz N, Mycko MP, Przygodzka P, Ćwiklińska H, Cichalewska M, Matysiak M, Selmaj K, Lewkowicz P. (2015) Induction of human IL-10-producing neutrophils by LPS-stimulated Treg cells and IL-10. *Mucosal Immunol* 29.
- 5) Rabe P, Twetman S, Kinnby B, Svensäter G, Davies JR. (2015) Effect of fluoride and chlorhexidine digluconate mouthrinses on plaque biofilms. *Open Dent J* 31: 106-111.
- 6) Zhao B, van der Mei HC, Subbiahdoss G, de Vries J, Rustema-Abbing M, Kuijjer R, Busscher HJ, Ren Y. (2014) Soft tissue integration versus early biofilm formation on different dental implant materials. *Dent Mater* 30: 716-727.
- 7) Nakagawa M, Matuya S, Udoh K. (2002) Effect of Fluoride and Dissolved Oxygen Concentrations on the Corrosion Behavior of Pure Titanium and Titanium Alloys. *Dental Materials Journal* 21: 83-92.
- 8) Kato T, Kusakari H, Hoshino E. (1998) Bactericidal efficacy of carbon dioxide laser against bacteria-contaminated titanium implant and subsequent cellular adhesion to irradiated area. *Lasers Surg Med* 23: 299-309.
- 9) 島津昌光, 高橋直斗, 神谷弘幸, 田中壽晃, 相馬英明, 菊池槇太郎. (2000) レーザー照射による抗菌チタン材の簡易作成と海洋汚損生物付着防除への応用. *室工大紀要* 50: 83-90.
- 10) Pang P, Andreana S, Aoki A, Coluzzi D, Obeidi A, Olivi G, Parker S, Rechmann P, Sulewski J, Sweeney C, Swick M, Yung F. (2011) Laser energy in oral soft tissue applications. *J Laser Dent* 18: 123-131.
- 11) Rayan GM, Stanfield DT, Cahill S, Kosanke SD, Kopta JA. (1992) Effects of rapid pulsed CO2 laser beam on cortical bone in vivo. *Lasers Surg Med* 12:615-620.

- 12) Jiang X, Ge H, Zhou C, Chai X, Ren QS. (2012) The role of vascular endothelial growth factor in fractional laser resurfacing with the carbon dioxide laser. *Lasers Med Sci* 27: 599-606.
- 13) Lee DH, Murakami S, Khan SZ, Matsuzaka K, Inoue T. (2013) Pulp responses after CO<sub>2</sub> laser irradiation of rat dentin. *Photomed Laser Surg* 31:59-64.
- 14) Hen G, Nicenboim J, Maysel O, Asaf L, Shin M, Busolin G, Hofi R, Almog G, Tiso N, Lawson ND, Yaniv K. (2015) Venous-derived angioblasts generate organ-specific vessels during embryonic development. *Development* 2. pii: dev.129247.
- 15) Park JH1, Heo SJ, Koak JY, Kim SK, Han CH, Lee JH. (2012) Effects of laser irradiation on machined and anodized titanium disks. *Int J Oral Maxillofac Implants* 27:265-72.
- 16) Khadra M, Lyngstadaas SP, Haanaes HR, Mustafa K. (2005) Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material. *Biomaterials* 26: 3503–3509.
- 17) Giannelli M1, Bani D, Tani A, Pini A, Margheri M, Zecchi-Orlandini S, Tonelli P, Formigli L. (2009) In vitro evaluation of the effects of low-intensity Nd:YAG laser irradiation on the inflammatory reaction elicited by bacterial lipopolysaccharide adherent to titanium dental implants. *J Periodontol* 80: 977-984.

## 図の説明

### 図1. CO<sub>2</sub>レーザー照射によるチタン表面形状の変化の観察

(A) 共焦点レーザー顕微鏡による SEM 写真を示す. (a) 研磨面:未照射, (b) 研磨面:CO<sub>2</sub>レーザー60 秒間照射, (c) 粗造面:未照射, (d) 粗造面:CO<sub>2</sub>レーザー60 秒間照射.

(B) 共焦点レーザー顕微鏡による表面起伏曲線とそれぞれの計測値を示す. (a) 研磨面:未照射, (b) 研磨面:CO<sub>2</sub>レーザー60 秒間照射, (c) 粗造面:未照射, (d) 粗造面:CO<sub>2</sub>レーザー60 秒間照射. 表は面粗さ分析値 (Ra) を示す.

### 図2. CO<sub>2</sub>レーザー照射後の歯根膜線維芽細胞の変化

I 型コラーゲン免疫蛍光染色写真を示す. 研磨面 (a,b,c,d,e,f,) および粗造面 (g,h,i,j,k,l) 上でヒト歯根膜線維芽細胞を3日間培養した後, CO<sub>2</sub>レーザーを 10 秒 (b, e, h, k), 60 秒 (c, f, i, l) 照射した. a, d, g, j は未照射を示す. CO<sub>2</sub>レーザー照射後3日目 (a, b, c,g,h,i) および7日目 (d, e, f) に細胞を固定した. 間接免疫染色法は抗ヒト I 型コラーゲンウサギ抗体を反応させた後, 抗ウサギ・IgG フルオレセイン抗体 (DyLight® 488 Anti-Rabbit IgG) にて標識した. x100.

### 図3. CO<sub>2</sub>レーザー照射と LPS 添加に対する歯根膜線維芽細胞数の変化

(A) 研磨面上と(B)粗造面上の細胞数の変化を示す. CO<sub>2</sub>レーザーの照射時間は 60 秒である. Cells/area: 10 mm x10 mm のチタン板上の5視野の平均細胞数を示す. Non: 対象, LPS: LPS (100 ng/ml) 添加, laser: CO<sub>2</sub>レーザー照射, LPS + Laser: LPS (100 ng/ml) 添加 + CO<sub>2</sub>レーザー照射.

### 図4. CO<sub>2</sub>レーザー照射時間と表面性状による歯根膜線維芽細胞の I 型コラーゲンの遺伝子発現とタンパク産生の変化

(A) I 型コラーゲン mRNA の発現の変化を示す. 研磨面上と粗造面上の細胞に CO<sub>2</sub>レーザーを 0 秒 (未照射), 10 秒, 60 秒それぞれ照射した. 培養1日目と3日目に total RNA を抽出し RT-PCR にて I 型コラーゲン mRNA 発現を計測した. RQ: Relative Quantity. \*p<0.01.

(B) I 型コラーゲンタンパクの産生の変化を示す. 研磨面上と粗造面上の細胞に, Non: 対照, LPS: 1  $\mu$  g/ml LPS 添加, Laser: CO<sub>2</sub>レーザー照射, LPS+Laser: 1  $\mu$  g/ml LPS 添加 + CO<sub>2</sub>レーザー照射を行った. 培養 14 日目に細胞を固定し, 抗ヒト I 型コラーゲンウサギ抗体で染色し, 陽性細胞数を計測した. CO<sub>2</sub>レーザーの照射時間は 60 秒である. \*p<0.05.

図5. LPS 添加によるアクチン産生の変化とそれにおよぼす CO<sub>2</sub>レーザー照射の効果

粗造面上で歯根膜線維芽細胞を7日間培養後, phalloidine による蛍光染色(赤色蛍光)を行った. (a)対照(Non), (b)LPS 添加(100 ng/ml), (c)CO<sub>2</sub>レーザー照射, (d)LPS 添加(100 ng/ml) + CO<sub>2</sub>レーザー照射. CO<sub>2</sub>レーザーの照射時間は 60 秒である. x100.

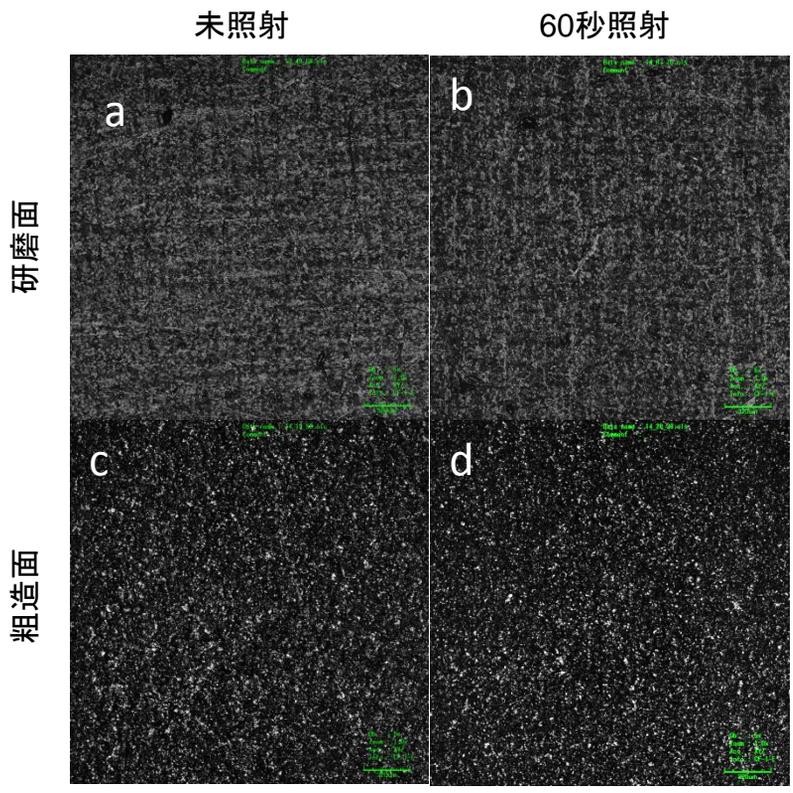
図6. LPS 添加による VEGF 産生の変化と, それにおよぼす CO<sub>2</sub>レーザー照射の効果

培養 14 日後の研磨面における細胞を DAPI 染色(a, b, c, d; 青色蛍光)および VEGF 染色(e, f, g, h; 赤色蛍光)を行い蛍光顕微鏡で観察した. 一次抗体として抗ヒト VEGF 抗体を 20 分間反応させたのちロダミンにて標識した. (a, e) 対照, (b, f)LPS 添加(100 ng/ml), (c, g) CO<sub>2</sub>レーザー照射, (d, h)LPS 添加(100 ng/ml) + CO<sub>2</sub>レーザー照射. CO<sub>2</sub>レーザーの照射時間は 60 秒である. x100.

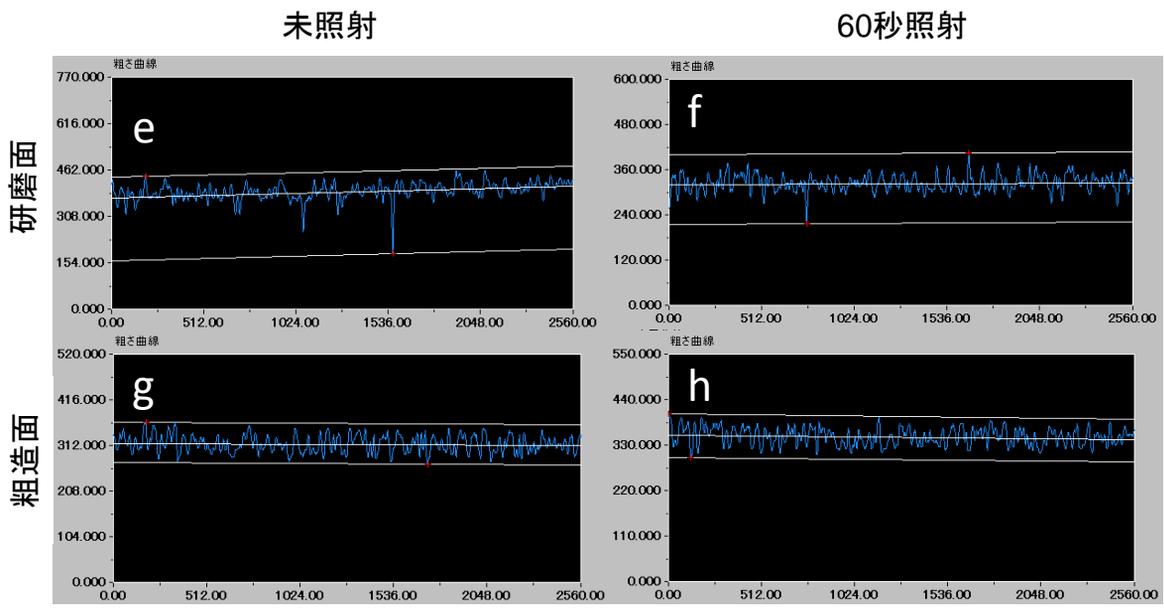
図7. 歯根膜線維芽細胞の VEGF mRNA 発現に対する LPS と CO<sub>2</sub>レーザー照射の効果

それぞれの処理、Non:対照, LPS: 1  $\mu$  g/ml LPS 添加, Laser:CO<sub>2</sub>レーザー照射, LPS + Laser: 1  $\mu$  g/ml LPS 添加 + CO<sub>2</sub>レーザー照射を行った後, 7日間培養して total RNA を抽出し RT-PCR にて VEGF mRNA 発現倍率を計測した. CO<sub>2</sub>レーザーの照射時間は 60 秒である. RQ: Relative Quantity. \*p < 0.05

**A**



**B**



Ra ( $\mu\text{m}$ )	未照射	照射(60秒/cm <sup>2</sup> )
研磨面	17.73±0.55	17.42±0.31
粗造面	18.17±1.25	17.82±1.63

图1 若林

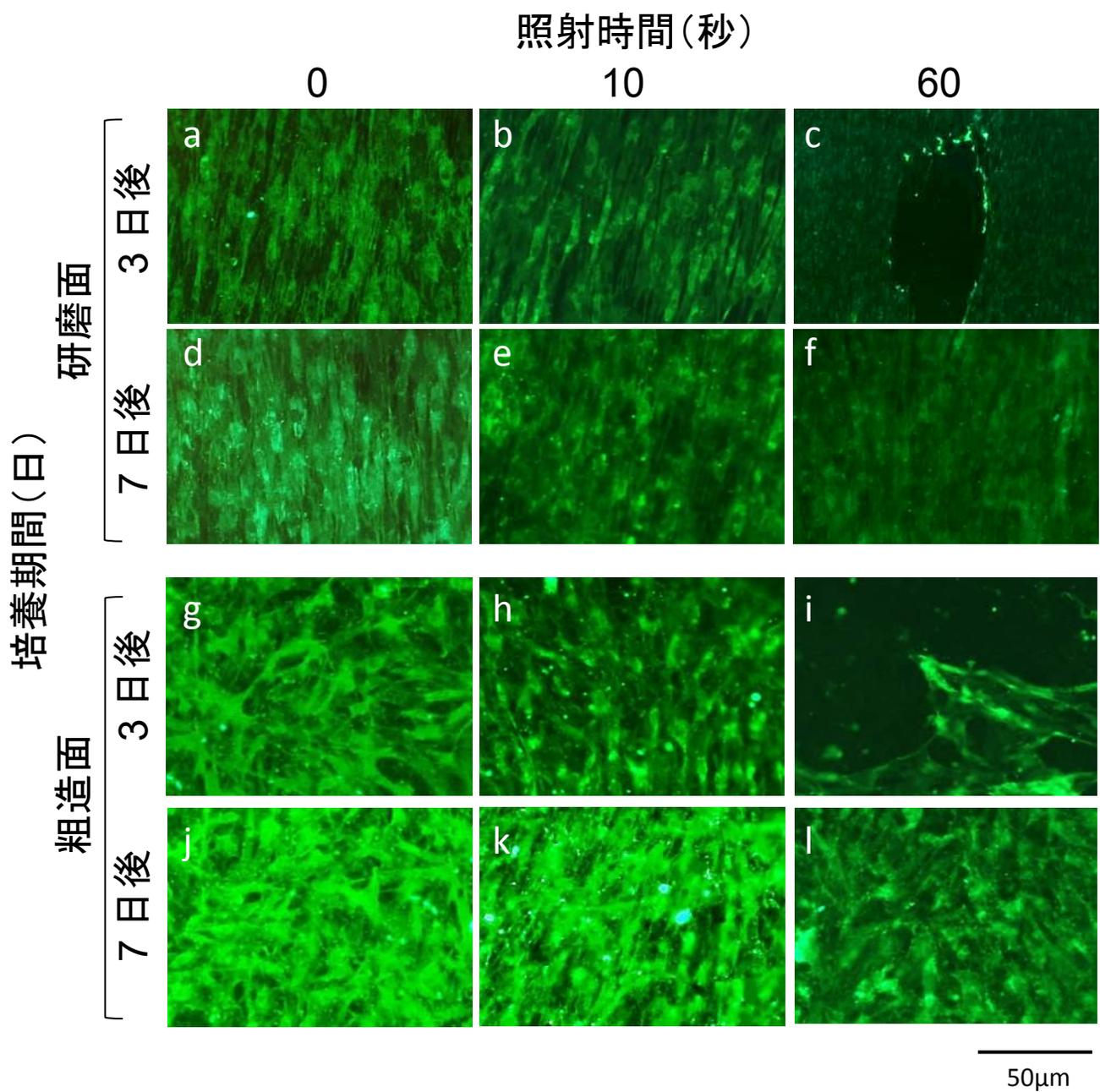
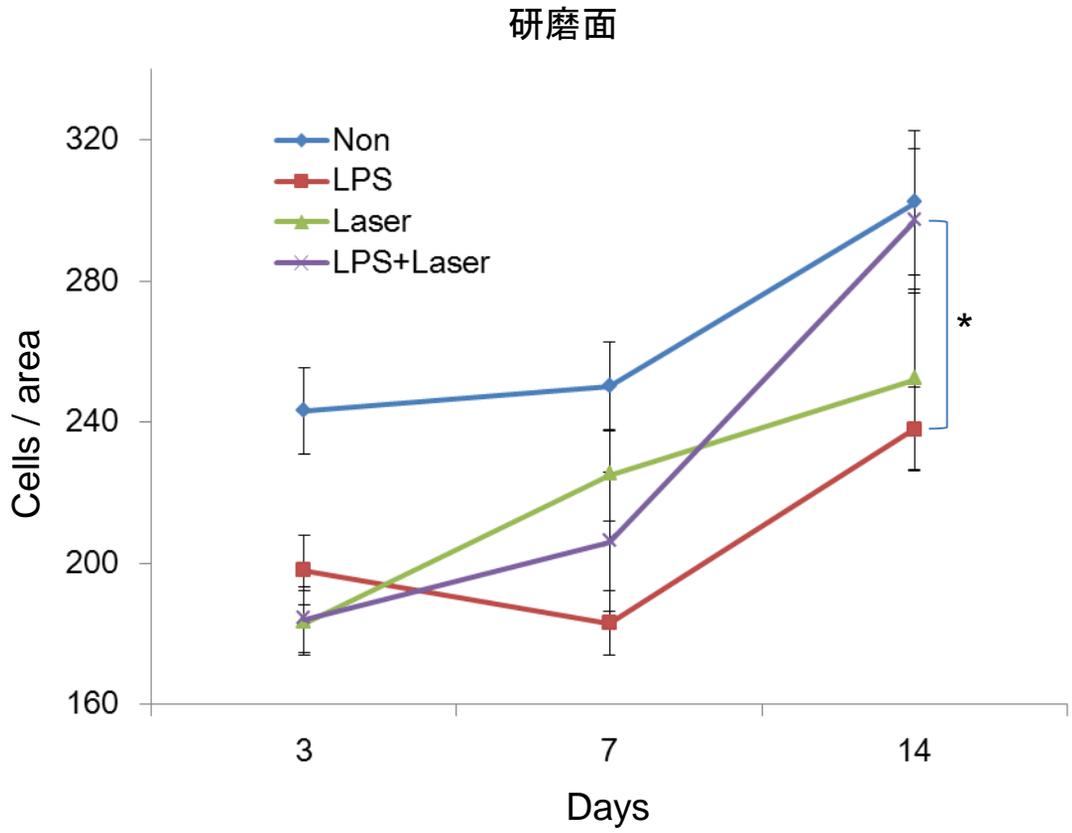


図2 若林

A



B

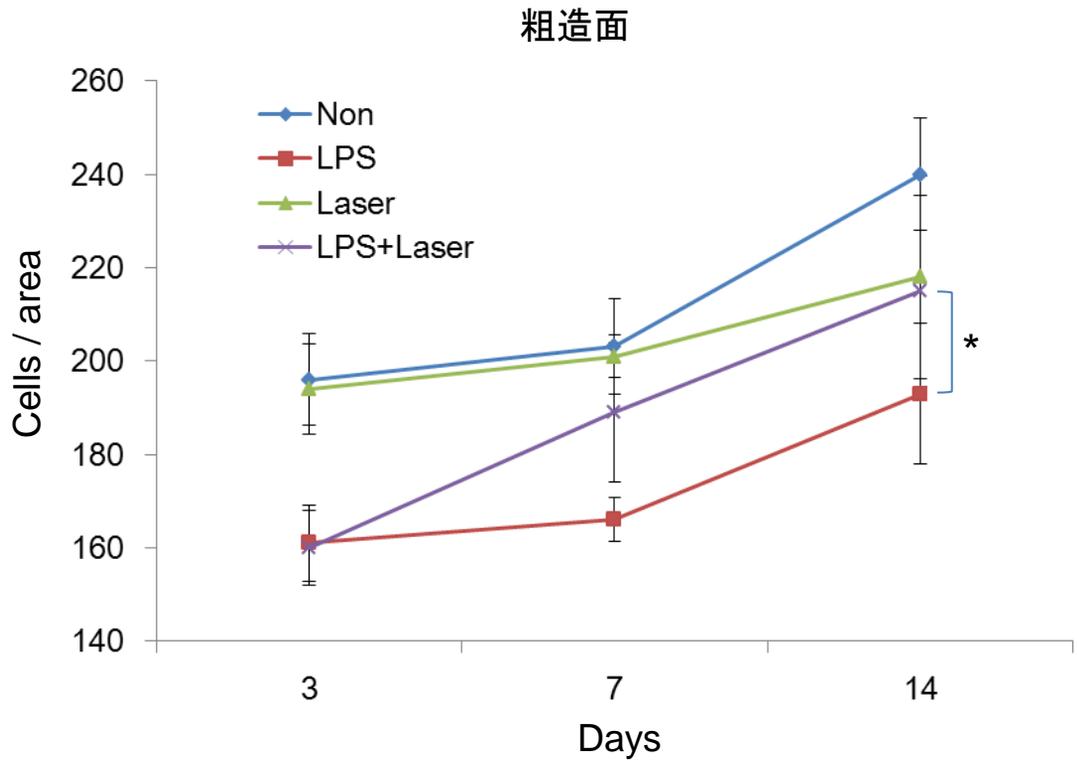


图3 若林

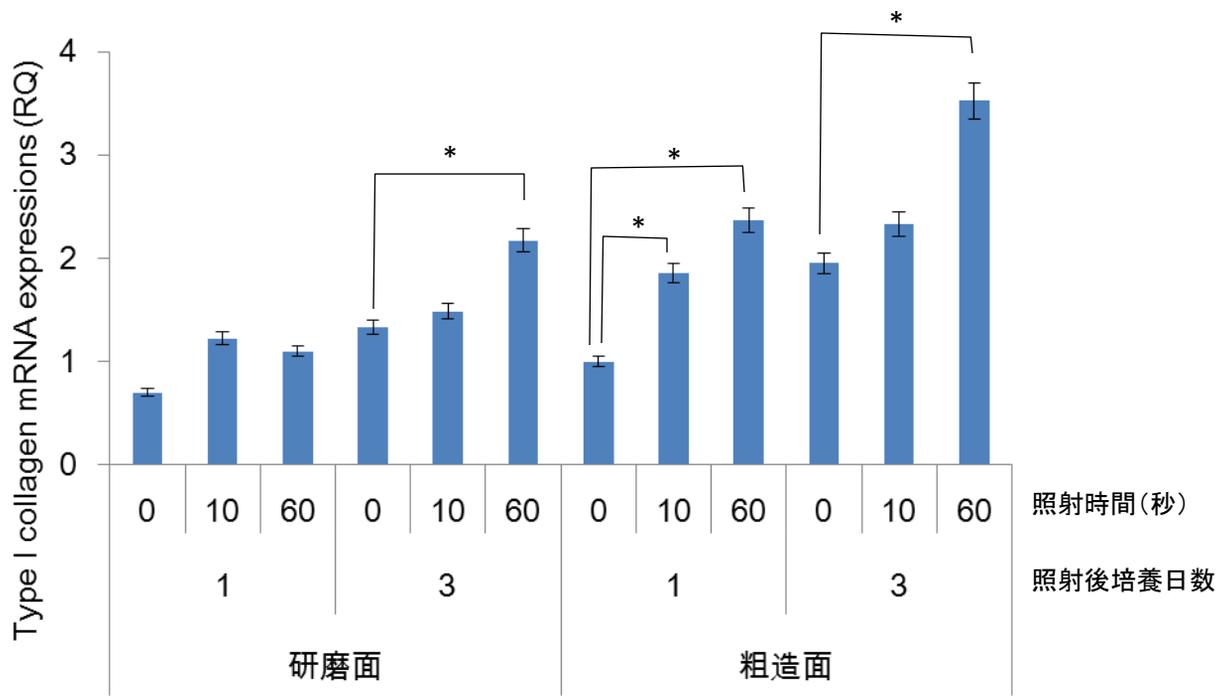
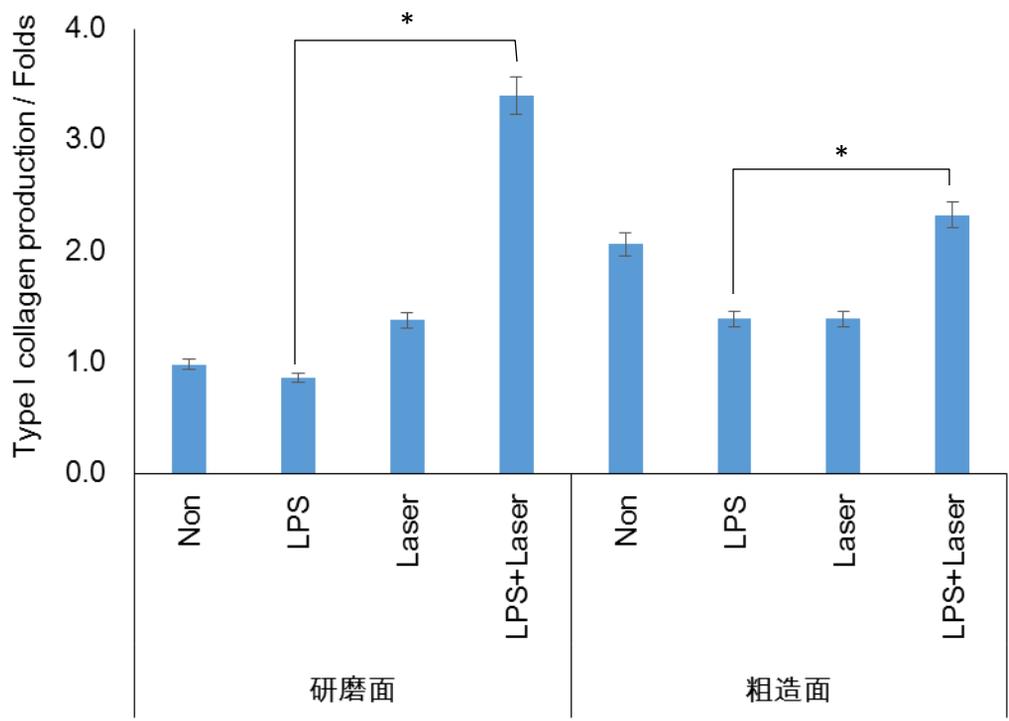
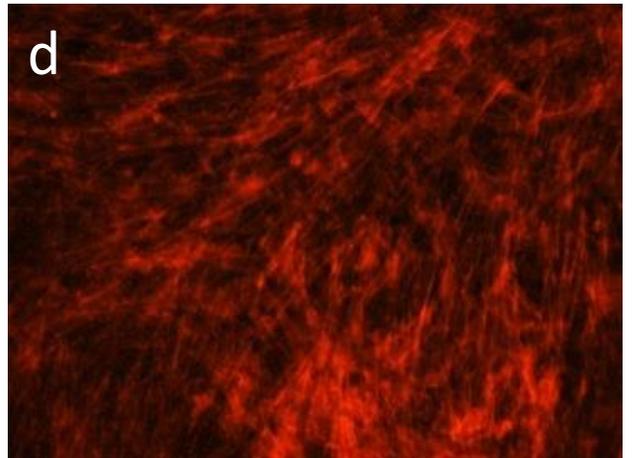
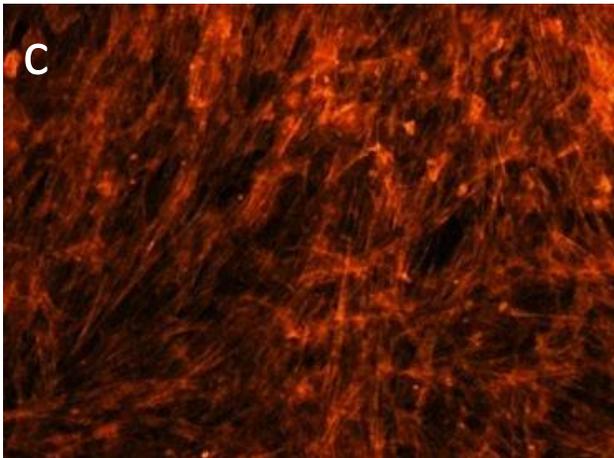
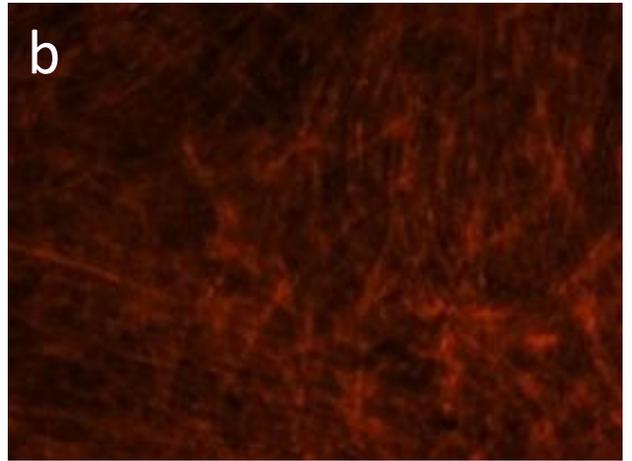
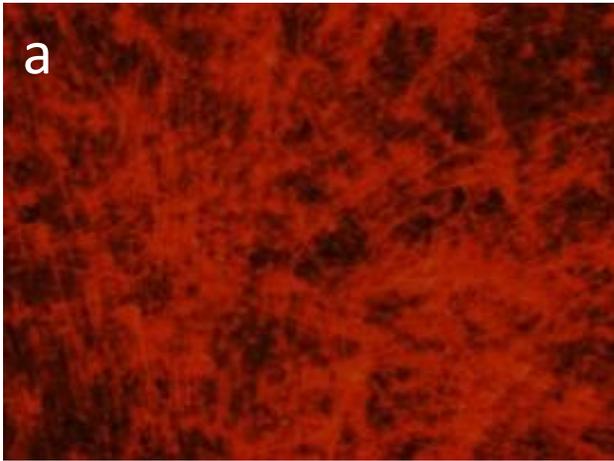
**A****B**

图4 若林

Non

LPS



Laser

LPS+Laser

50μm

图5 若林

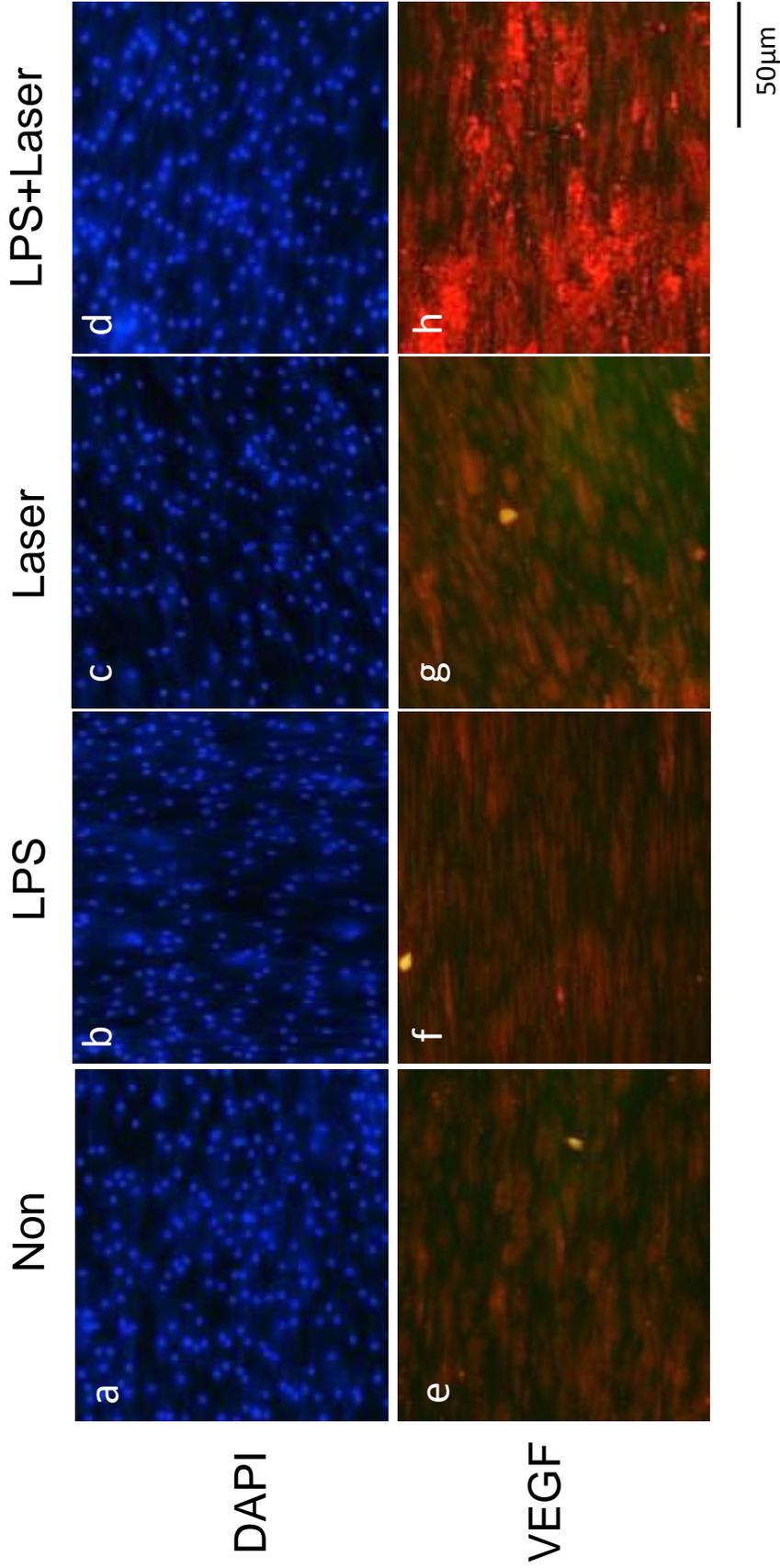


图6 若林

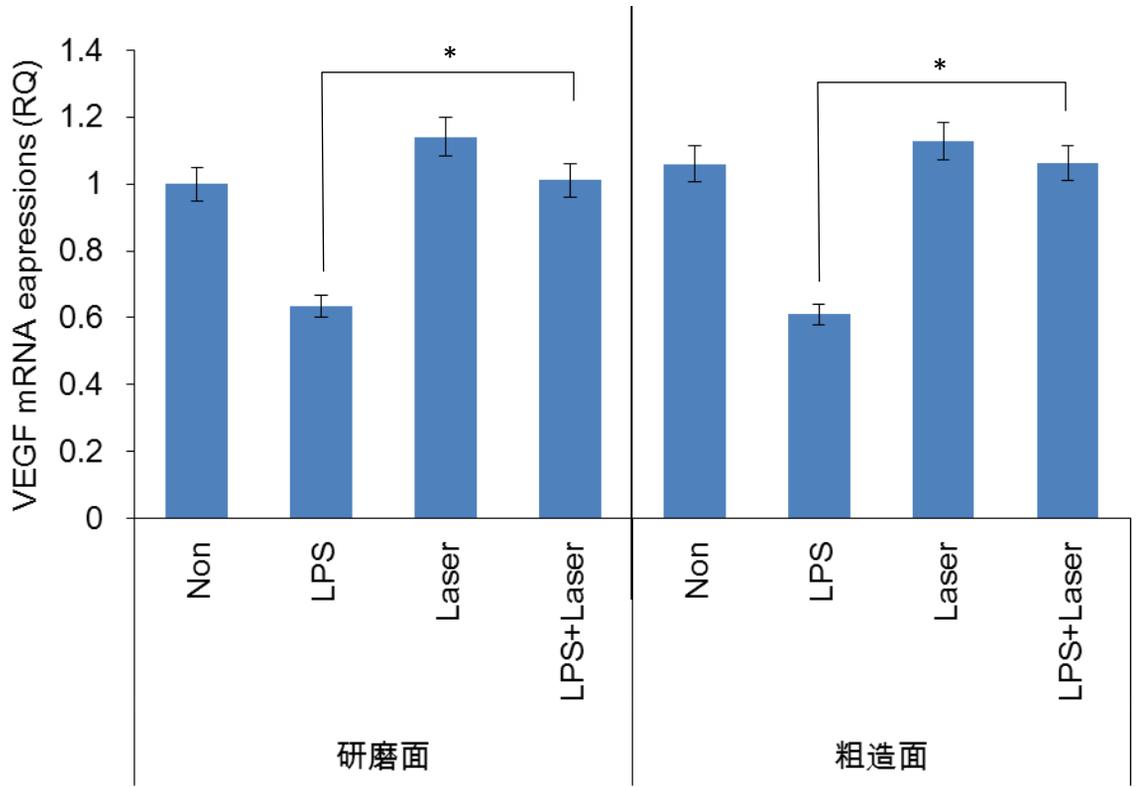


图7 若林