

# 低出力レーザーの歯肉創傷治癒に 与える影響について

谷 仁 史 草 刈 玄 野 原 廣 美\*

新潟大学歯学部歯科補綴学第2教室

(主任:草刈 玄)

\* 新潟大学歯学部口腔生化学教室

(主任:野原 廣美)

Effect of low power laser on wound healing of gingiva

Hitoshi TANI, Haruka KUSAKARI, Hiroyoshi NOHARA

*2nd Department of Prosthetic Dentistry, school of Dentistry, Niigata University*

*(Chief:Prof.Haruka KUSAKARI)*

*Department of Oral Biochemistry, school of Dentistry, Niigata University*

*(Chief:Prof.Hiroyoshi NOHARA)*

key words : low power laser, hydroxyproline,  
DNA,RNA,northern blot analysis,pro $\alpha$ 1(I)collagen

## 要 旨

低出力レーザーによる創傷治癒促進効果についての報告をみるが、口腔内、歯肉における創傷治癒についての報告はほとんどない。そこで低出力レーザーが歯肉創傷治癒におよぼす影響について検討する目的で、イヌ下顎にインプラントを植立し、レーザー照射後、インプラント周囲歯肉のDNA、RNA、ヒドロキシプロリン、I型コラーゲン mRNA について生化学的に検索を行った。

イヌ下顎両側P<sub>3</sub>、P<sub>4</sub>、M<sub>1</sub> 抜歯4ヵ月後に、チタン合金(6A1-4V)インプラントを植立、植立直後より片側のインプラント周囲歯肉にレーザー照射を行い、反対側をコントロールとした。尚、レーザー装置として半導体レーザーDSL-100(出力60mW、波長810nm、連続波、モリタ製作所)を用いた。術後3、4、5、7、14日に

インプラント周囲歯肉を採取し、DNA、RNA量は各々ジフェニルアミン、オルシノール反応により、ヒドロキシプロリン量はEdwards法により測定を行った。I型コラーゲン mRNA 測定については合成プローブを用いた。ヒドロキシプロリン量はコントロール群において術後5日で最高値となり、術後7日で有意に減少し14日と同様の値を示し変動の収束に早まりがみられた。RNA量はコントロール群、照射群でそれぞれ術後7日、5日に最高値を示し、照射群で受傷に対する組織反応の早まりがみられた。DNA量はコントロール群、照射群ともに術後5日に最高値を示し、レーザー照射による影響は認められなかった。I型コラーゲン mRNA 量はコントロール群に比べ術後3、4、5日で増加しI型コラーゲンの合成促進が認められた。

以上より、低出力レーザーは、歯肉の創傷治癒

におけるコラーゲンの代謝を促進することが示唆された。

### Abstract

The purpose of this study was to evaluate the effect of a low power laser on wound healing of gingiva surrounding inserted implants. Two titanium alloy implants (6Al-4V) were inserted into each side of mandibular edentulous area at 1 cm intervals. On one side of mandible, the mesial, distal, buccal and lingual parts of gingiva surrounding the implants were irradiated with the laser for 5 minutes once a day for a week.

Three, 4, 5, 7, 14 days after insertion of implant, the scar of gingiva was excised and the content of collagen, RNA, DNA and pro  $\alpha 1(I)$  collagen mRNA was determined. After insertion of implant, the collagen content of scar increased and reached a maximal value after 5 days and then returned to the original level on day 14. The rate of increase and decrease was promoted by laser-treatment.

The irradiation promoted the rate of increase and decrease in RNA content as in the case of collagen content, but no significant effect was observed on the DNA content. The abundance of collagen mRNA in the laser-untreated scar increased with increasing time after implantation until day 7 while that in the laser-treated group increased with accelerated rates until day 5 and the maximal level was approximately the same as that of day 7. These results suggested that low power laser irradiation exerts beneficial effect on wound healing of dog gingiva by promoting the turnover rate of collagen.

### 緒 言

一般にレーザーの作用には熱作用、光活性作用、

電磁波による作用、圧作用、イオン化作用等があるといわれている<sup>1)</sup>。医科の領域においては高エネルギーレーザーの熱作用を利用して、アルゴンレーザーによる網膜の光凝固療法<sup>2)</sup>、血管腫の治療<sup>3)</sup>、炭酸ガスレーザーのレーザーメスによる切開<sup>4)</sup>、NdYAGレーザーの内視鏡的な凝固、止血<sup>5)</sup>およびルビーレーザーの母斑の治療<sup>6)</sup>なども行われている。

一方、低出力レーザーは、1968年 Mester のルビーレーザーによる発毛促進の報告<sup>7)</sup>以来、疼痛抑制<sup>8)</sup>、抗炎症<sup>9)</sup>、創傷治癒促進<sup>10)</sup>の目的で医科の分野で広く応用されてきている。近年、歯科分野においても象牙質知覚過敏の抑制<sup>11)</sup>、根管治療後の疼痛抑制および歯周外科、抜歯、インプラント術後の創傷治癒促進の目的で臨床的に広く応用されつつある。

しかし、レーザー、特に低出力レーザーの生体におよぼす作用の詳細なメカニズムの解明はいまだ十分になされておらず、創傷治癒促進作用についての基礎的研究も多々みられるものの、その内容は主に肉眼的所見<sup>13,14)</sup>、皮膚接合強度<sup>15)</sup>、さらには植皮片移植生着<sup>16)</sup>などがほとんど占めている。また創傷治癒過程において重要な役割を果たすコラーゲンについては、皮膚におけるコラーゲン mRNA の合成に対する影響について検討された例<sup>7)</sup>はあるが、口腔内軟組織についてコラーゲン代謝の検討を行ったものはない。そこで著者らはイヌ下顎にインプラントを植立し、植立後の歯肉創傷治癒に与える低出力レーザーの影響を明らかにするために、ヒドロキシプロリン、RNA、DNAの定量を行い、さらにI型コラーゲンの遺伝子発現について検索し、検討を行った。

### 実験材料および方法

#### 1. 実験動物

雑種成犬18頭(体重10~15kg)を用いた。

#### 2. レーザー装置

レーザー照射装置として半導体レーザーを用いた(図1)。表1にレーザーの仕様を示す。

本装置はGa-Al-Asを発振器としたレーザーで連続波、間欠波の切り替えを持ち、また出力に

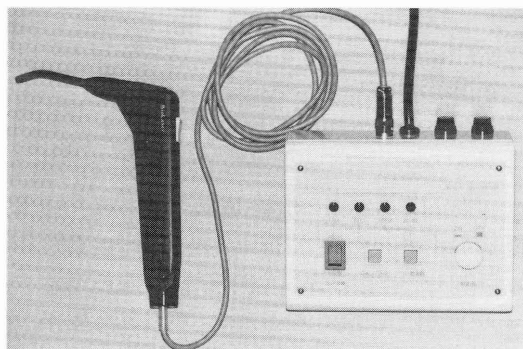


図1 レーザー装置

表1 レーザーの仕様

**SPECIFICATION**

Model	DSL-100 (J. MORITA CO. LTD)
Transmitter	Ga-Al-As
Output	30/60mW
Radiation	1, 5, 10, 20Hz and Continuous wave
Wavelength	810nm

おいても30mW、60mWの切り替えをもつ。本体はスリーウェイシリンジ様の照射部と電源部からなる。照射スイッチはデッドマン型であり、0.5、1、2、3分の時間設定が可能である。

3. インプラント

インプラント材料として鏡面研磨を施したチタニウム合金 (6Al-4V) 円柱型φ4.1mm、長さ12mmを使用した。

4. インプラントの植立

下顎両側臼歯部を被験部位とし塩酸ケタミン (ケタラル®) 0.5~1.5mlの筋肉内注射とベントバルビタール (ネプタール®) 0.5ml/kgの静脈内注射による全身麻酔下に、下顎第3、第4前臼歯および第1後臼歯を抜去した。抜去後約4ヶ月後に上記と同様の方法で全身麻酔を施し、チタニウム合金を植立した。

インプラントの植立には、植立におけるぶれを最小限にするために犬歯、第2後臼歯にわたるガ

イド装置を設け、コントラヘッドの動きを規制しながらインプラントの植立を行った。減速コントラを用い生理食塩水注水下に規格のバーにより粘膜骨膜組織を摘出し、一連の規格バーを用いてインプラント窩洞を第2後臼歯より1cm間隔で形成し、片側2本両側で計4本の植立を行った。植立後咬合の影響を排除するため対合歯との距離が2mmとなるように調整を行い、術後は軟性飼料にて飼育を行った。

5. レーザー照射

レーザー照射は、粘膜よりプローブ先端までの距離を30mmとし、可及的に粘膜面に垂直になるようにインプラント体1本につき近遠心側、頬舌側の4カ所に各5分間行った。またインプラント周囲歯肉全周にレーザー光がおよぶようにインプラント体の一部を照射野に含めて行った。この照射を片側のみに術直後より毎日1回最大7日間行い、反対側をコントロールとした。

6. 歯肉採取

術後3、4、5、7、14日にインプラント周囲2mm幅で歯肉の採取を行った。

7. ヒドロキシプロリンの定量

採取した試料は湿重量を測定した後メスで細切し、真空乾燥した。乾燥した試料は-80℃にて保存し、Edwardsらの方法<sup>18)</sup>に準じてヒドロキシプロリンの定量を行った。すなわち、試料に6N塩酸を湿重量10mg当たり1ml添加して封管し、電気定温乾燥機中で110℃、24時間加水分解したものを開封し、60℃で塩酸を吸引した。このようにして得られた試料にリン酸緩衝液 (pH6.5) を添加して溶解させ、適正濃度 (約2 μgHyp/ml) に調整してヒドロキシプロリン定量のための試料とした。これらの試料0.75mlにヒドロキシプロリン標準溶液0.75ml、0.05MクロラミンT試薬0.75mlを加えて室温で20分間反応させ、アルデヒド過塩素酸試薬0.75mlを加えて、60℃15分間加熱発色させた後、分光光度計を用いて550nmにて比色定量を行った。

8. RNA, DNAの定量

1) RNA, DNAの抽出

RNA, DNAの抽出は、Schmit & Thann-

hauser 法<sup>19)</sup>に準じて行った。すなわち、採取した試料(約20mg)をホモジナイズし、得られたホモジネート6 mlに氷冷した60% PCA (Perchloric acid)を終濃度5%になるように添加し、5分間氷冷の後5000r.p.m., 10分間の遠心を行い、上清を捨て、得られた沈澱に1 N KOH 0.5mlを添加し37°Cで20時間インキュベートした。この後5分間氷冷し、1/5容量の6 N HClを添加し中和を行い、さらに等量の10% PCAを加え15分間氷冷した。氷冷の後5000r.p.m., 10分間の遠心を行い、得られた上清と、再度5% PCA 0.6mlを加え同様の遠心を行い得られた上清とをRNA分画とした。さらに、この遠心により得られた沈澱に5% PCA 1.0mlを添加したものを90°Cで15分間インキュベートし、氷冷後5000r.p.m., 10分間の遠心を行い、得られた上清と再度5% PCAを加え同様の遠心を行い得られた上清とをDNA分画とした。

## 2) RNAの定量

RNAの定量にはオルシノール反応<sup>20)</sup>を用いた。すなわち、試料0.75mlに対しオルシノール試薬 (orcinol 1g, FeCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 0.5g, conc HCl 100ml) 0.75mlを加え、沸騰水浴中で20分間加熱し、冷却後、分光光度計を用いて660nmにて吸光度を測定した。尚、標準液としてYeast RNAを用いた。

## 3) DNAの定量

DNAの定量にはBurtonの方法<sup>21)</sup>を用いた。すなわち、ジフェニルアミン試薬 (redistilled acetic acid 100ml, conc H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5ml, diphenylamine 1.5g) 20mlに16mg/mlのacetoaldehydeを0.1ml加えた溶液1 mlに試料0.5mlを混合し、25°C、18時間インキュベートの後、分光光度計を用いて600nmにて吸光度を測定した。なお標準液には仔ウシ胸線DNAを用いた。

## 9. ノーザンプロット分析

### 1) RNAの抽出

RNAの抽出にはAGPC法<sup>22)</sup>を改良して行った。すなわち、採取した試料に2 mlのSolution

D (4M guanidinium thiocyanate, 25mM sodium citrate, pH7.0, 0.5% sarcosyl, 0.7% β-mercaptoethanol)を添加し、ポリトロン (Brinkmann社)を用いてホモジナイズした。このホモジネートに2 ml Tris 飽和 phenol, 0.2ml 2M sodium acetate, pH4.0, 0.4ml chloroform/isoamyl alcohol(49:1)を添加し、攪拌の後15分間氷冷し、10000xg、4°Cで20分間の遠心を行った。得られた上清に2倍容量の氷冷エタノールを加え、-20°Cで一昼夜静置し、10000xg、4°Cで30分間の遠心を行った。得られたペレットに0.4ml SET buffer(10mM Tris · Cl, 1mM EDTA, 0.1% SDS)を加え、マイクロチューブに移し、等量のTris 飽和 phenol / chloroform / isoamyl alcohol(25:24:1)を加えフェノール抽出を2回行い、さらに得られた上清に等量のchloroformを加え、4°Cで10000xg、1分間の遠心を行い、得られた上清に1/10容量の3 M sodium acetate, pH5.2、2倍量の氷冷エタノールを加え、-80°Cで30分間静置し、4°Cで10000xg、20分間の遠心を行い、得られたRNAペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥させ適当量の再蒸留水に溶かし、260nm/280nmにて吸光度の測定を行った。尚、Poly A<sup>+</sup>RNAの精製はOligo(dT)セルロースカラムを用いて行った。

### 2) 電気泳動

電気泳動は、Maniatis<sup>23)</sup>の記載に従って行った。すなわち、上記で得られたRNA 10 μgに、再蒸留水4.5 μl, 5xformaldehyde gel-running buffer(0.02M MOPS, pH7.0, 8mM sodium acetate, 1mM EDTA, pH8.0) 2.0 μl, formaldehyde 3.5 μl, formamide 10.0 μlを加え65°Cで15分間の反応の後、氷冷し、2 μlのloading buffer(50% glycerol, 1mM EDTA, pH8.0, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF)を加え、1xformaldehyde gel-running buffer, 2.2M formaldehydeを含む1% Agarose gelにて電気泳動を行った。

### 3) 電気泳動

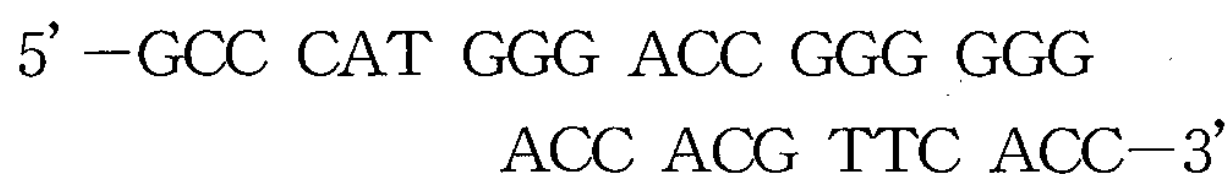
ゲルからメンブレンへのRNAのトランスファー



は、50mM NaOH/10mM NaCl で gel を30分間処理の後、Trans Blot(Bio-Rad社)を用いて0.5xTAE(40mM Tris, 20mM sodium acetate, 1mM EDTA)中にて Zeta-Probe blotting membranes(Bio-Rad社)を用いて行った。

4) プローブ

オリゴヌクレオチドDNAプローブとしては、ヒトプロα1(I)コラーゲンに特異的なcDNAの塩基配列中の、哺乳類間での相同性が比較的高い部分、アミノ酸残基814-823相当部分のオリゴヌクレチオドを合成し(宝酒造に合成委託)、用いた。そのヌクレオチド配列は以下の通りである<sup>24)</sup>。



5) プローブのラベリング

Maniatisら<sup>25)</sup>の記載に従い、oligonucleotide (3pmol/μl)1.0 μl, 10xbacteriophage T4 polynucleotide kinase buffer(0.05M Tris·Cl, pH7.6, 0.01M MgCl<sub>2</sub>, 5mM dithiothreitol, 0.1mM spermidine HCl, 0.1mM EDTA, pH 8.0)2.0 μl, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP(sp. act. 5000Ci/mmole; 10mCi/ml)5.0 μl, H<sub>2</sub>O 15 μl, BacteriophageT4 polynucleotide kinase(10unit/μl)2.0 μlを混合し、37°Cで45分間インキュベートした。インキュベートの後、スパンカラムによりプローブの精製を行った。

6) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは Angelini の方法<sup>6)</sup>を改良して行った。すなわち、5 xSSC(150mM sodium chloride, 15mM sodium citrate), 20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.0, 7%SDS, 10xDenhardt's(0.02% Bovine serum albumin, 0.02% Polyvinylpyrrolidone, 0.02% Ficoll), 100 μg/ml denatured, fragmented salmon sperm DNA, 100 μ/ml Yeast RNA を含む溶液中にて55°Cで6時間プレハイブリダイゼーションを行い、この後1x10<sup>6</sup>cpm/mlとなるようにプローブを加え、55°Cで20時間のハイブリダイゼーションを行い、3xSSC, 10xDenhardt's, 5%

SDS, 25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(ph7.5)を含む溶液中にて55°Cで30分間洗浄を2回行い、さらに1xSSC/1%SDSの溶液中にて55°Cで30分間洗浄した後、-70°Cでオートラジオグラフィーを行った。

結 果

1. レーザー照射のヒドロキシプロリン量への影響

図2、表2にインプラント植立後のヒドロキシプロリン量(μg/mg wet weight)の変化を示す。ヒドロキシプロリン量は、コントロール群において術後3日で20.2±0.47 μg、術後4日で24.4±2.40 μg、術後5日で25.6±4.25 μgと最高値を示し、その後7日で20.5±2.30 μg、14日で16.8±2.90 μgと暫時減少した。

一方、レーザー照射群においては術後3日で19.3±1.67 μg、術後4日で24.7±3.32 μgと最高値を示し、以後5日で21.1±1.88 μgとなり、術後7日では15.1±0.40 μgとコントロール群とに有意の差がみられ(p<0.01)術後14日での16.6±1.50 μgと減少した。

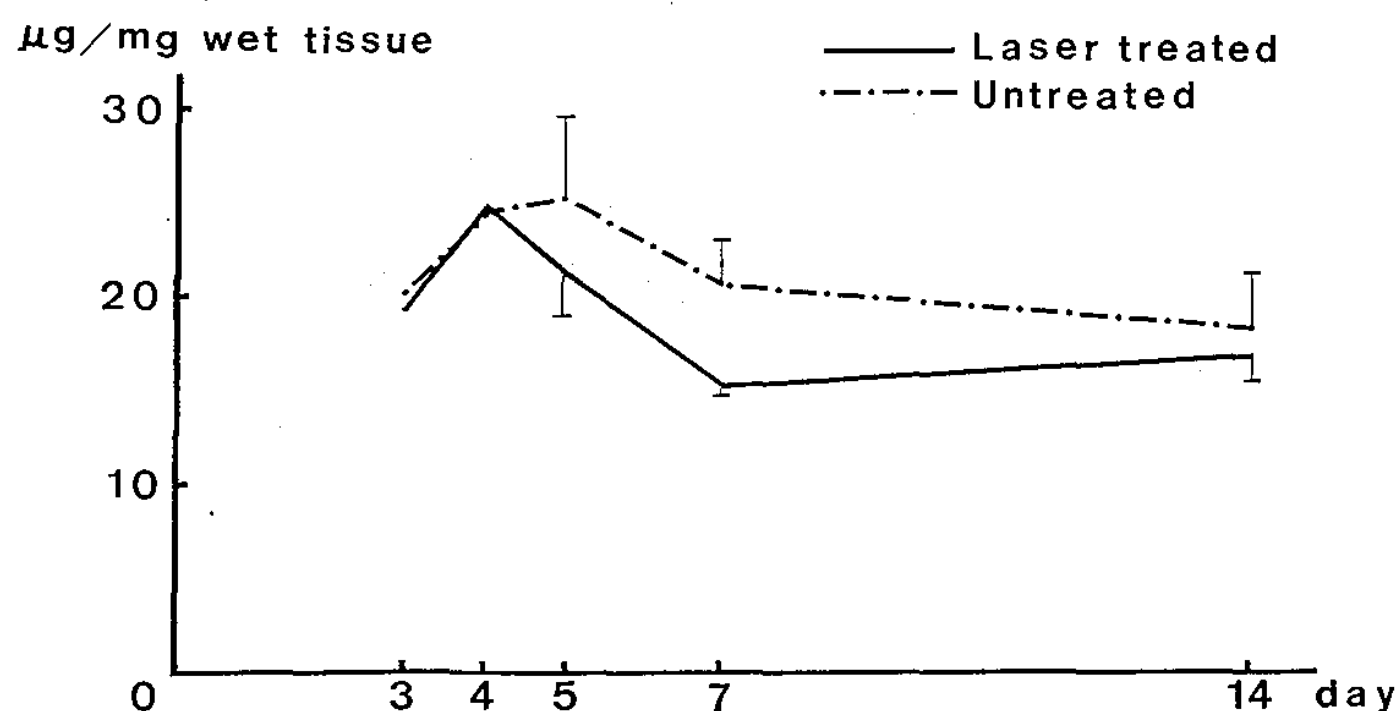


図2 ヒドロキシプロリン量の変化

表2 ヒドロキシプロリン量の変化

Hydroxyproline		μg/mg wet weight				
day	3	4	5	7	14	
Laser Irradiation	19.3 ±1.67	24.7 ±3.32	21.1 ±1.88	15.1* ±0.40	16.6 ±1.50	
Control	20.2 ±0.47	24.4 ±2.40	25.6 ±4.25	20.5* ±2.30	16.8 ±2.90	

\* P<0.01

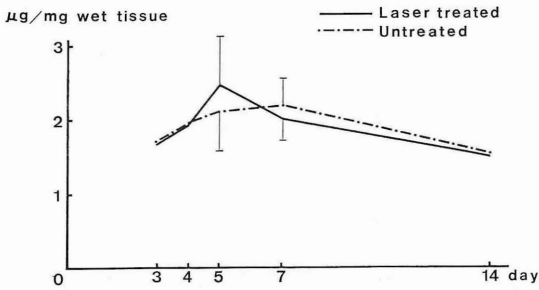


図3 RNA量の変化

表3 RNA量の変化

RNA	µg/mg wet weight				
day	3	4	5	7	14
Laser Irradiation	1.68 ± 0.16	1.92 ± 0.16	2.47 ± 0.57	2.10 ± 0.47	1.52 ± 0.22
Control	1.73 ± 0.29	1.94 ± 0.30	2.13 ± 0.56	2.20 ± 0.34	1.57 ± 0.04

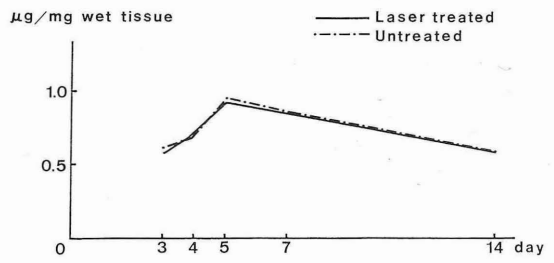


図4 DNA量の変化

表4 DNA量の変化

DNA	µg/mg wet weight				
day	3	4	5	7	14
Laser Irradiation	0.58 ± 0.15	0.70 ± 0.13	0.92 ± 0.08	0.84 ± 0.02	0.59 ± 0.11
Control	0.61 ± 0.13	0.69 ± 0.02	0.95 ± 0.12	0.85 ± 0.02	0.59 ± 0.09

1.5 µgの値とほとんど変わりのない値を示した。コントロール群との比較においては術後5日、7日で低値を示した。

2. RNA量への影響

図3、表3に術後のRNA量 (µg/mg wet weight) の変化を示す。RNA量はコントロール群において術後3日で1.73±0.29 µg、4日で1.94±0.30 µg、5日で2.13±0.56 µg、7日で2.20±0.34 µgと術後7日まで上昇を示し、術後14日では1.57±0.04 µgと下降した。

一方、照射群では術後3日で1.68±0.16 µg、4日で1.92±0.16 µg、5日で2.47±0.57 µgと術後5日で最高値を示し、以後7日で2.10±0.47 µg、14日で1.52±0.22 µgと暫時減少した。

3. DNA量への影響

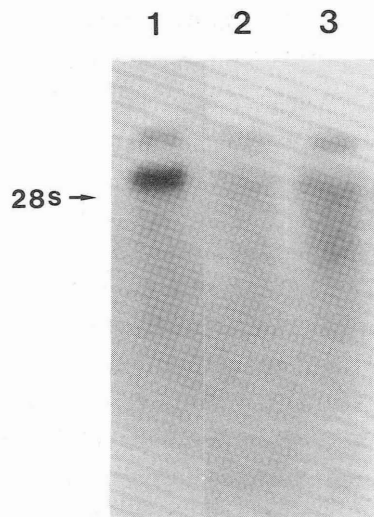
図4、表4に術後のDNA量 (µg/mg wet weight) の変化を示す。DNA量はコントロール群、照射群とに差はなく、術後5日でそれぞれ0.95±0.12 µg、0.92±0.08 µgと最高値を示し、その後術後7日、14日と経時的に減少した。

4. コラーゲンmRNA量への影響

図5に合成DNAプローブを用いての犬歯肉プロα1(I)コラーゲン mRNAのハイブリダイゼーションパターンを示す。lane 1は1 µgの poly

図5 プロα1(I)コラーゲンのハイブリダイゼーションパターン

NORTHERN BLOT HYBRIDIZATION



Lane1; 1ug of polyA<sup>+</sup> RNA  
Lane2; 5ug-of total RNA  
Lane3; 10ug of total RNA

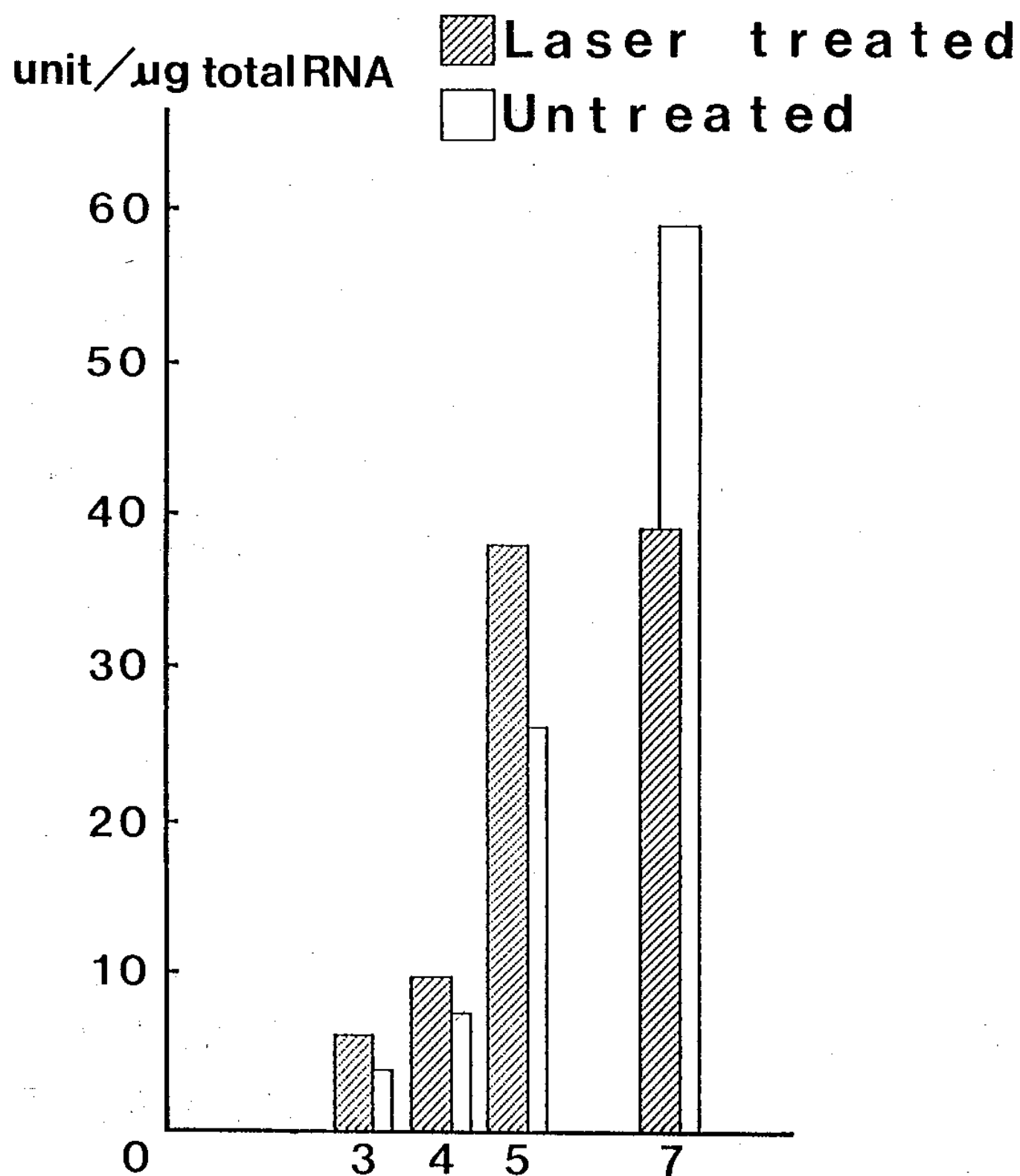


図6 プロα1(I)コラーゲンmRNA量の変化

A<sup>+</sup>RNA、lane 2および lane 3はそれぞれ5 μg および10 μgのtotal RNAのハイブリダイゼーションパターンである。合成プローブは特異的に約4.8および5.8kbのmRNAとハイブリダイズしている。尚、4.8kbのmRNAが優勢であった。

図6に術後のmRNA量の変化を示す。mRNAはコントロール群において術後7日までの実験期間中経時的に2次曲線を描いて上昇した。

一方、照射群では術後5日までコントロール群と同様にmRNA量は2次曲線的に上昇し、いずれの日時においてもコントロール群に比べ1.3~1.5倍高い値を示したが、術後5日、7日ではほぼ同値をとり上昇の終焉がみられた。

## 考 察

### 1. 本研究の意義について

近年、創傷に伴う炎症の軽減、治癒促進の目的で nonsteroidal anti-inflametry drug などの薬物利用がなされ、最近ではEFGをはじめとする各種成長因子の臨床応用が試みられている<sup>27)</sup>。しかしこれらの薬剤の利用にはその投与方法、投与量により副作用がみられる。

一方、低出力レーザーも、疼痛抑制<sup>8)</sup>、抗炎症<sup>9)</sup>、創傷治癒促進<sup>10)</sup>の目的で臨床応用されてきている。その効果は組織の温度上昇をほとんど伴わない非熱的作用によるものであり、組織への為害作用が認められないことから、レーザー照射単独あるいは前述の薬剤との併用により、より大きな治癒促進効果をもたらすことが期待される。低出力レーザーによる創傷治癒促進効果に関して Mester<sup>28)</sup>はその生体活性効果としてコラーゲン新生の促進、酸素活性の亢進、血管の再生促進、血流の改善、細胞分裂の活発化、生体活性物質の産生をあげている。しかし、創傷治癒促進効果について基礎的に検討を行ったもののほとんどは皮膚における肉眼的および組織学的所見によるものであり、また in vivo おける生化学的所見についてほとんどなされておらず<sup>17,29)</sup>、特に口腔内創傷治癒過程におけるコラーゲンの代謝に注目したものはない。

近年、低出力レーザーは歯科の分野においても創傷治癒促進、象牙質知覚過敏などの疼痛抑制の目的で臨床で広く用いられているものの、その基盤となる基礎的研究はほとんど見られない<sup>30)</sup>。インプラント植立における軟組織の反応は基本的に他の口腔軟組織の創傷治癒と同様であるといわれている<sup>31)</sup>。それゆえ、インプラント植立に伴う創傷の治癒に与えるレーザーの影響を検討することは歯周外科、抜歯後の創傷治癒促進、あるいは口腔内軟組織の潰瘍性疾患へのレーザーの臨床応用におけるレーザーの有効性およびその作用を解明する研究法の一つとして有用なものと考えられる。

そこで本研究では低出力レーザーが歯肉創傷治癒に与える影響を調べるため、インプラント植立後のインプラント周囲歯肉にレーザー照射を行い、その影響をコラーゲンの代謝を中心に検索し、検討を行った。

### 2. レーザー照射について

本研究では、出力60mW、波長810nm、連続波の条件で半導体レーザーを使用した。照射部位については本レーザーがプローブ先端から30mmの位置での照射野の直径が5mmになる defocus type であることから歯肉粘膜からの距離を30mmに設定し、インプラント周囲歯肉を近心、遠心、

頬側および舌側の4部位に分け照射を行った。

照射時間に関しては、明確な規定はないが臨床的には、1～3分を1単位として、1～数単位照射により効果を得たという報告が多く<sup>11,32,33)</sup>、また線維芽細胞を用いた *in vitro* の実験において頻回照射によりレーザーの効果が増強されたとの報告<sup>34)</sup>がみられることから、インプラント周囲歯肉各部に5分間/日の照射をインプラント植立直後より最大7日間行った。尚、出力に関しては著者らの過去の実験結果を参考に決定した<sup>35)</sup>。

### 3. ヒドロキシプロリン量について

コラーゲンは歯肉中のタンパク質の約60%を占め、そのうちの約90%がI型コラーゲンである<sup>36)</sup>。I型コラーゲンは他の結合組織においても多量にみられ、結合組織の維持、機能において、また創傷治癒過程における血管性反応及び各種炎症性細胞による創傷組織の浄化に続く肉芽組織、結合組織の形成ならびにその成熟において重要な役割をはたしている。

ヒドロキシプロリンは、コラーゲンの特異的構成アミノ酸として含まれている。また、エラスチン、エクステンシン、補体の第1成分の亜成分C1q、アセチルコリンエステラーゼなどにも含まれているが、一般のタンパク質には存在しない。コラーゲンでは全アミノ酸の約10%がヒドロキシプロリンであり、コラーゲンの定量法として、加水分解後のヒドロキシプロリンを定量することが行われている<sup>37)</sup>。

本研究においても、創傷治癒過程におけるコラーゲン代謝を研究する手段の一つとして、インプラント植立後のインプラント周囲歯肉に含まれるヒドロキシプロリン量を経時的に測定した。インプラント植立後、ヒドロキシプロリン量は3日、4日と増加し、5日で最高に達し、以後7日、14日と減少した。Zeitsら<sup>38)</sup>はラット穿孔肉芽での<sup>3</sup>H-prolineのコラーゲンへの取り込み実験を行い、創傷治癒の初期での総コラーゲン量の増加は5日目で最高に達し、その後減少したと述べ、この減少は治癒過程の後期(7日目)に認められるコラーゲナーゼ活性の増加によるものとしており、著者らのコントロール群の結果として一致している。

これに対し、レーザー照射群ではインプラント植立後4日で最高に達し、5日目ではすでに減少が始まり、7日目ではさらに減少し最低値を示し、14日目でも同様の値を示した。この結果は、レーザー照射が創傷治癒過程におけるコラーゲンの代謝回転を促進することを示している。一方、Kanaら<sup>29)</sup>はラット背部全層皮膚欠損の治癒において、He-Neレーザーを毎日4 J/cm<sup>2</sup>照射することにより瘢痕組織中のヒドロキシプロリン量の増加が促進されることを報告している。また、Lamら<sup>34)</sup>も線維芽細胞を用いた実験において、He-Neレーザー照射により<sup>3</sup>H-prolineの取り込みが増加することを報告している。本研究においてはレーザー照射による創傷治癒過程の初期におけるヒドロキシプロリン量の増加の明確な促進が認められなかった。その理由としては創傷治癒過程にある組織のみを採取できなかった可能性、レーザーの種類の違い、動物種の違い、組織の違い等が考えられる。一方、コラーゲン分解活性については、線維芽細胞のコラーゲナーゼ活性は、レーザー照射の影響を受けないというLamら<sup>34)</sup>の報告がある。しかし、創傷から単離した肉芽組織ではコラーゲン分解活性は認められないというGrilloら<sup>39)</sup>の報告もあり、これらの相違は実験系並びに測定方法の違いによるものと考えられる。

### 4. RNA量について

RNA量はコントロール群においてインプラント植立後3日、4日、5日と増加し、植立後7日目で最高に達し、以後減少したのに対し、照射群では植立後5日目で最高に達し、RNAの代謝回転がレーザー照射により促進されていることが示唆された。Grecoら<sup>40)</sup>はラット肝細胞からミトコンドリアを抽出し、ミトコンドリアにおけるRNAおよびタンパク質合成におよぼすHe-Neレーザーの影響を検討し、レーザー照射により、RNAおよびタンパク質の合成が著しく増加したと述べている。また、Bosatraら<sup>41)</sup>が *in vitro* でHe-Neレーザーを線維芽細胞に照射し、電顕による観察を行った結果、ミトコンドリアやゴルジ装置などが増加しタンパク質合成の促進が示唆されると報告している。これらのことから本研究にお



いてもレーザー光が細胞諸器官に何らかの作用をおよぼし細胞活性が高められていることが考えられる。

### 5. プロ $\alpha$ 1(I)コラーゲン mRNA量について

創傷治癒過程の早期において Gay ら<sup>42)</sup>はIII型コラーゲン合成が受傷直後より始まり、やや遅れてI型コラーゲンの合成が始まると述べている。コラーゲンの合成は他のタンパク質と同様に transcriptional level および translational level で制御されており<sup>43)</sup>、Merlino ら<sup>44)</sup>はその合成量と mRNA 量が一致すると述べている。

本研究においては、ヒドロキシプロリンおよび全RNA量に対するレーザー照射の影響を検討したところ、これらの代謝回転は促進されるが、それらの合成の促進は認められなかった。そこでさらに鋭敏に、直接的にコラーゲン合成の変化を知ることのできる mRNA の測定を Northern blot 法により行った。その結果コントロール群ではインプラント植立後3日、4日では mRNA 量は少なく、5日以降2次曲線的に増加した。一方、照射群においても同様の増加を示したが、コントロール群に比べそのレベルは各時点で高く、植立後7日ではすでに低下が認められ、治癒初期におけるプロ $\alpha$ 1(I)コラーゲンmRNAの合成の促進が認められた。Saperia ら<sup>17)</sup>は、豚背部の創傷治癒過程における He-Ne レーザーの影響を調べるため、I型およびIII型コラーゲンmRNAを定量し、コントロール群では両 mRNA とともに創傷治癒後期まで合成が増加するが、レーザー照射群では治癒中期に両 mRNA の合成が著名に増加し、治癒後期には減少することを報告している。この結果は、コラーゲンmRNAの合成がレーザー照射により促進されると共に低下の時期が早められるという著者らの結果と一致する。

近年、コラーゲン合成あるいは創傷治癒の促進物質として種々の成長因子が注目されている。

TGF- $\beta$ <sup>45)</sup>、PDGF<sup>46)</sup>、EGF<sup>47)</sup>、CDGF<sup>48)</sup>等により創傷治癒促進がみられたとの報告が多数みられ、なかでも TGF- $\beta$ はコラーゲン合成を transcriptional level で促進すると報告<sup>49)</sup>されている。

本研究において、低出力レーザー照射により創

傷治癒促進が認められ、またI型コラーゲン mRNA 合成も transcriptional level において促進されることから、低出力レーザーが創傷治癒過程において、これらの成長因子サイトカインの合成、分泌に何らかの影響をおよぼす可能性が考えられる。

### 6. DNA量について

DNA量に関しては照射群、コントロール群ともに、植立後5日で最高に達し、以後14日まで減少し、両者に差がみられず、レーザー照射はDNA合成に影響を与えないことが示唆された。同様の結果は in vitro における実験においてもみられている。Lam ら<sup>34)</sup>の線維芽細胞を用いて実験によれば、He-Ne および Ga-As レーザー照射により <sup>3</sup>H-thymidine の取り込み量は増加せず、DNA合成は促進されなかったと述べている。また、Balboni ら<sup>50)</sup>も線維芽細胞を用い同様の結果を報告している。しかし、Boulton ら<sup>51)</sup>の線維芽細胞を用いた実験、折笠ら<sup>52)</sup>の骨芽細胞様細胞を用いた実験では、レーザー照射により細胞増殖が促進される結果を報告している。これらの結果の相違は細胞の種類、細胞の培養条件、レーザーの照射条件等の相違によるものと考えられる。

## 結 論

低出力レーザーが歯肉創傷治癒に与える影響を調べるため、イヌ下顎にインプラントを植立し、植立直後よりレーザー照射を行い、生化学的に検討した結果、以下の知見を得た。

1. レーザー照射によりヒドロキシプロリンの代謝回転に速まりがみられ、特に治癒後期におけるコラーゲンの分解が促進されることが示唆された。
2. RNAは、レーザー照射によりその代謝回転に速まりがみられた。
3. プロ $\alpha$ 1(I)コラーゲン mRNA はレーザー照射によりその合成に促進がみられた。
4. DNAはレーザー照射による影響を受けなかった。

以上の結果から、低出力レーザー照射は口腔軟組織の創傷修復促進に有用な治療法であることが

示唆された。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤な御指導ならびに御援助を賜りました口腔生化学教室の先生方に厚く謝意を表します。

また本研究に多大なる御協力を頂いた歯科補綴学第2教室の先生方に謹んで謝意を表します。

### reference

- 1) 桜井靖久, 菊地 真: レーザー光による手術—コヒーレントな光の利用. 日本物理学会誌, **32**: 146—154, 1977.
- 2) Krasnow, M. M.: Laser puncture of anterior chamber angle in glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.*, **7**: 674—678, 1973.
- 3) Apfelberg, D. B., Maser, M. R., Lash, Hh.: Argon laser management of cutaneous vascular deformities: a preliminary report. *West. J. Med.*, **124**: 99—101, 1976.
- 4) Kaplan: The carbon dioxide laser in clinical surgery. *Israel. J. Med. Sci.*, **9**: 79—83, 1973.
- 5) Kiefhaber, P., Nath, G., Moritz, K.: Endoscopical control of massive gastrointestinal hemorrhage by irradiation with a high power Nd—YAG laser. *Progress in Surgery.*, **15**: 140—155, 1977.
- 6) Ohsiro, T., Maruyama, Y., Nakajima, H. et al: Treatment of pigmentation of the lips and oral mucosa in Peutz—Jeghers syndrome using ruby and argon lasers. *Br. J. Plast. Surg.*, **33**: 346—349, 1980.
- 7) Mester, E., Ludany, G., Selyei, M. et al: The stimulating effect of low power laser rays on biological systems. *Laser Rev.*, **1**: 3, 1968.
- 8) Walker, J. B.: Relief from chronic pain by low power laser irradiation, *Neurosci. Lett.*, **43**: 339—344, 1983.
- 9) Mester, E., Nagylucskay, S., Tisza, S.: Laser stimulation of wound healing. *Acta chir. Acad. Sci. hung.*, **17**: 49—55, 1976.
- 10) Mester, E., Ludany, G., Frenyo, V. et al: Experimental and clinical observations with laser. *Panminerva Med.*, **13**: 538, 1971.
- 11) 松本光吉, 船井博雄, 若林 始, 他: Ga—Al—As 半導体レーザーによる象牙質知覚過敏の処置に関する研究. *日歯保誌.*, **28**: 766—771, 1985.
- 12) 清水良一, 白川正順 著: 低出力レーザーの基礎と臨床. 64—76, デンタルフォーラム社, 東京, 1985.
- 13) Surinchak, J. S., Alago, M. L., Bellamy, R. F. et al: Effect of low—level energy lasers on the healing of full—thickness skin defects. *Lasers Surg. Med.*, **2**: 267—274, 1983.
- 14) Hunter, J., Leonard, L., Snider, G. et al: Effects of low energy laser on wound healing in a porcine model. *Lasers Surg. Med.*, **3**: 285—290, 1984.
- 15) Braverman, B., McCarthy, R. J., Ivanovich, A. D. et al: Effect of helium—neon and infrared laser irradiation on wound healing in rabbits. *Lasers Surg. Med.*, **9**: 50—58, 1989.
- 16) 久保田潤一郎: Gallium aluminium arsenide 半導体レーザーの皮弁生着に対する効果. *慶応医学*, **62**: 339—350, 1985.
- 17) Saperia, D., Glassberg, E., Lyons, R. F. et al: Demonstration of elevated type I and type III procollagen mRNA levels in cutaneous wounds treated with helium—neon laser. Proposed mechanism for enhanced wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **138**: 1123—1128, 1986.
- 18) Edwards, C. A., O'Brein, W. D. Jr.: Modified assay for determination of hy-

- droxyproline in a tissue hydrolyrate. Clin. Chi. Acta., **104**: 161-167, 1980.
- 19) Schmidt, G., Thannhauser, S. J.: A method for the determination of desoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoproteins. J. Biol. Chem., **161**: 83-89, 1945.
- 20) Schneider, W. C.: Determination of nucleic acids in tissues by pentose analysis. Methods in Enzymology, **3**: 680-684, 1957.
- 21) Burton, K.: Determination of DNA concentration with diphenylamine. Methods in Enzymology, **12**: 163-166, 1968.
- 22) Chomczynski, P., Sacchi, N.: Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem., **162**: 156-159, 1987.
- 23) Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: Molecular Cloning, 7. 43-7. 45, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 24) Mon-Li Chu, Myers, J. C., Bern, M. P. et al: Cloning and characterization of five overlapping cDNAs specific for the human pro  $\alpha 1(I)$  collagen chain. Nuc. Acids Res., **10**: 5925-5934, 1982.
- 25) Maniatis, T., Fritsch, E. F., Sambrook, J.: Molecular cloning, 11. 31-11. 32, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- 26) Angelini, G., de Preval, C., Gorski, J. et al: High-resolution analysis of the human HLA-DR polymorphism by hybridization with sequencespecific oligonucleotide probes. Proc. Natl. Acad. Sci., **83**: 4489-4493, 1986.
- 27) 高久史磨: 増殖因子の臨床応用. 蛋白質核酸酵素, **36**: 1406-1410, 1986.
- 28) Mester, E., Spiry, T., Szende, B. et al: Effect of laser rays on wound healing. Am. J. Surg., **122**: 532-535, 1971.
- 29) Kana, J. S., Hutschenreiter, G., Haina, D. et al: Effect of low power density laser radiation on healing of open skin wounds in rat. Arch. Surg., **116**: 293-296, 1981.
- 30) 佐澤史朗, 那須優則, 松岡嘉生他: ラット舌の創傷治癒過程に及ぼす低出力レーザー照射効果の細胞動態的研究. 歯学, **79**: 399-412, 1991.
- 31) 井上 孝: インプラント, 移植材と歯周囲組織. 山村武夫監修, 下野正基, 飯島国好編集, 治癒の病理-ペリオ・エンドの臨床のために-. 105-120, 医歯薬出版, 東京, 1988.
- 32) 神川嘉代男, 田和宗徳, 香山太志: 低出力レーザーによる痛みの治療, 日レーザー医学会誌., **5**: 215-220, 1985.
- 33) 白川正順: 顎口腔領域への低出力レーザーの応用. 73-80, デンティスト社, 東京, 1988.
- 34) Lam, T. S., Abergel, R. P., Uitto, J. et al: Laser stimulation of collagen synthesis in human skin fibroblast cultures. Laser. life Sci., **1**: 61-77, 1986.
- 35) Orikasa, N., Tani, H., Shimakura, M. et al: Effect of low power laser in bone histomorphometry. LASER Optoelectronics in Medicine 1989, 414-417, 1990.
- 36) Narayanan, A. S., Page, R. C.: Connective tissues of the periodontium; A summary of current work. Collagen Rel. Res., **3**: 33-64, 1983.
- 37) 永井 裕, 藤木大三郎 編集: コラーゲン実験法, 51-56, 1985.
- 38) Zeitz, M., Ruiz-Torres, A., Merker, H. J.: Collagen metabolism in granulating wounds of rat skin. Arch. Dermatol. Res., **263**: 207-214, 1978.
- 39) Grillo, H. C., Gross, J.: Collagenolytic activity during mammalian wound repair. Devel. Biol., **15**: 300-317, 1967.

- 40) Greco, M., Guida, G., Perlino, E. et al: Increase in RNA and protein synthesis by mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**: 1428-1434, 1989.
- 41) Bosatra, M., Jucci, A., Olliaro, P. et al: In vitro fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy. *Dermatologica*, **168**: 157-162, 1984.
- 42) Gay, S., Viljanto, J., Raekallio, J. et al: Collagen types in early phases of wound healing in children. *Acta. Chir. Scand.*, **144**: 205-211, 1978.
- 43) Bornstein, P., Sage, H.: Regulation of collagen gene expression. *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.*, **37**: 67-106, 1989.
- 44) Merlino, G. T., MoKeon, C., de Crombrughe, B. et al: Regulation of the expression of genes encoding types I, II and III collagen during chick embryonic development. *J. Biol. Chem.*, **258**: 10041-10048, 1983.
- 45) Roberts, A. B., Sporn, M. B., Assoian, R. K. et al: Transforming growth factor type  $\beta$ : Rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**: 4167-4171, 1986.
- 46) Serior, R. M., Griffin, G. L., Kimura, A. et al: In *Methods in Enzymology*, **169**: 233-244, 1989.
- 47) Buckley, A., Davidson, J. M., Kamerath, C. G. et al: Sustained release of growth factor accelerates wound repair. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**: 7340-7344.
- 48) Davidson, J. M., Klagsbrun, M., Holl, K. E. et al: Accelerated wound repair, cell proliferation, and collagen accumulation are produced by a cartilage-derived growth factor. *J. Cell Biol.*, **100**: 1219-1227, 1985.
- 49) Ignotz, R. A., Endo, T., Massague, J.: Regulation of fibronectin and type I collagen mRNA levels by transforming growth factor- $\beta$ . *J. Biol. Chem.*, **262**: 6443-6446, 1987.
- 50) Balboni, G. C., Brandi, M. L., Zonefrati, R. et al: Effect of He-Ne/I. R. laser irradiation on two lines of normal human fibroblasts in vitro. *Arch. Ital. Anat. Embriol.*, **91**: 179-188, 1986.
- 51) Boulton, M., Marshall, J.: He-Ne laser stimulation of human fibroblast proliferation and attachment in vitro. *Lasers. life Sci.*, **1**: 125-134, 1986.
- 52) 折笠紀晶, 草刈 玄, 川瀬知之ほか: 低出力レーザーの骨に対する影響. *補綴誌.*, **35**: 339-350, 1991.