

血管内皮細胞のtube formationにおよぼす

低出力レーザー照射の影響

—線維芽細胞とのco-cultureによる検討—

西 上 堅 二 茂呂祐利子 安 部 仁 晴 中 川 敏 浩

Effect of Low Level Laser Irradiation on Endothelial Tube Formation

—A Study of Co-culture Assay with Fibroblast—

Kenji NISHIGAMI, Yuriko MORO, Kimiharu AMBE and Toshihiro NAKAGAWA

It is well known that low level laser treatment using diode laser has healing effect on wounds. Wound healing is a complex process of coordinated interactions between various types of cells. However, the interrelationship between these cells and stimulatory effects of laser irradiation in wound healing process is not clear.

We used a diode laser with low level output. Endothelial cells and fibroblasts were cultured to perform a proliferation assay to determine the endothelial cell growth by the low level laser and/or by the soluble factors derived from fibroblasts. The effects of the low level laser on tube formation in angiogenesis were assessed using 3D co-culture model. In addition, we measured VEGF and active TGF- β 1 in the medium from the 3D co-culture model.

In the proliferation assay, fibroblasts derived from soluble factors promoted proliferation of endothelial cells, and laser irradiation with soluble factors also promoted proliferation of endothelial cells. In the 3D co-culture model, endothelial cells differentiated more than mono-culture. Laser irradiation activated maturation of endothelial cells after 24 hours. On the other hand, VEGF secretion significantly increased compared with the control 48 hours after the laser irradiation. We could not find detectable active TGF- β 1 in the medium with or without the laser irradiation.

In conclusion, low level laser irradiation promoted proliferation and differentiation of endothelial cells with soluble factors derived from fibroblasts. Moreover, we suggest that the stimulatory effects of laser irradiation were closely correlated with cell behavior such as cellular proliferation or cellular maturation.

Key words : low level laser irradiation co-culture endothelial tube formation

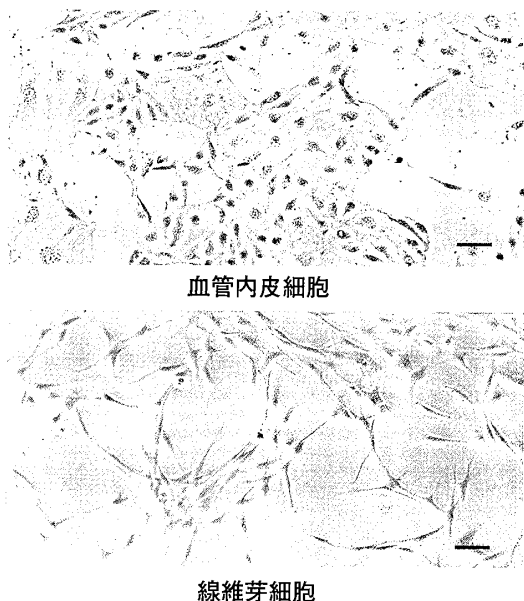


図1 使用した細胞
(bar: 50 μ m)

緒 言

近年、歯科臨床においてレーザー治療は盛んに行われ、なかでも低出力レーザー治療 (low reactive level laser treatment=LLLT) が創傷治癒促進、骨形成促進、血流の改善および疼痛緩和などを目的として幅広く応用されている¹⁻³⁾。

低出力レーザーの創傷治癒の促進効果については、動物実験でレーザー照射部位の上皮化の促進、微小血管および肉芽組織の増加等が見られるとの報告があり、事実、生体においても治癒促進効果は確認されている⁴⁻⁷⁾。

一方で、レーザーの作用機序についてはほとんど解明されておらず、レーザー治療の理論的裏づけを獲得するための基礎的な研究が急務となっている。*In vitro*において、創傷治癒に関連する線維芽細胞、血管内皮細胞、上皮細胞といった細胞にレーザー照射を行った結果では、至適な照射エネルギーは異なるものの、それぞれ細胞の増殖、分化の促進やたんぱく質、DNA合成量の増加等がみられると報告されており⁸⁻¹¹⁾、これは動物実験でのレーザーの効果と一致する。

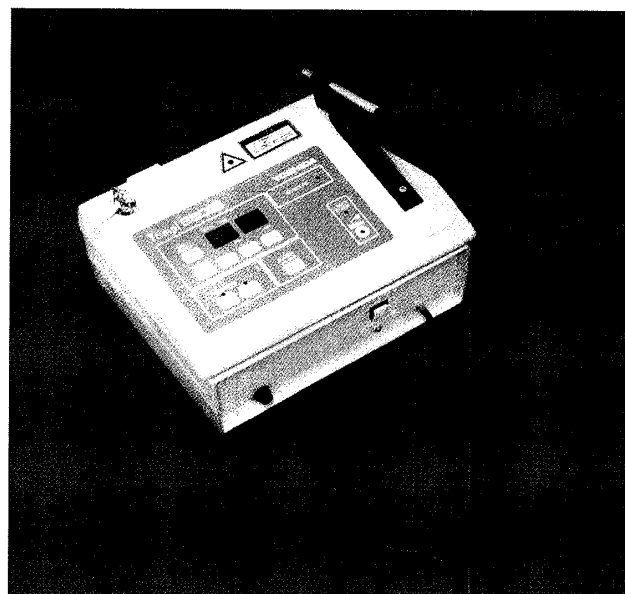


図2 使用したレーザー装置
Trinpl 830 PU (試作機) (株式会社 吉田製作所)

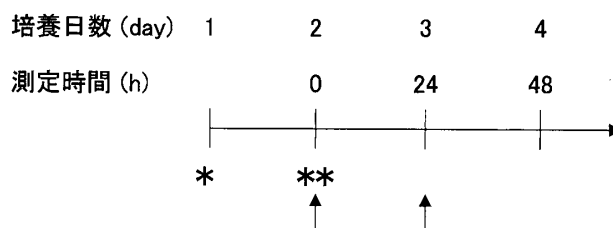


図3 レーザー照射のタイムコース
(* : endothelial cell seeding ** : fibroblast seeding ↑ : laser irradiation)

しかし、レーザーの臨床応用の際、生体組織には多数の細胞が混在するために、特定の細胞のみにレーザーが照射されることはなく、組織修復のための細胞間相互作用がなされるなかで、それぞれの細胞がレーザーによってどのように反応するかについてはまったくわかっていない。

本研究では、レーザー照射における創傷治癒促進、特に血管新生に及ぼす影響を明らかにする目的で、*in vitro*実験系として3D co-culture modelを構築し、線維芽細胞存在下における内皮細胞の動態について検討した。

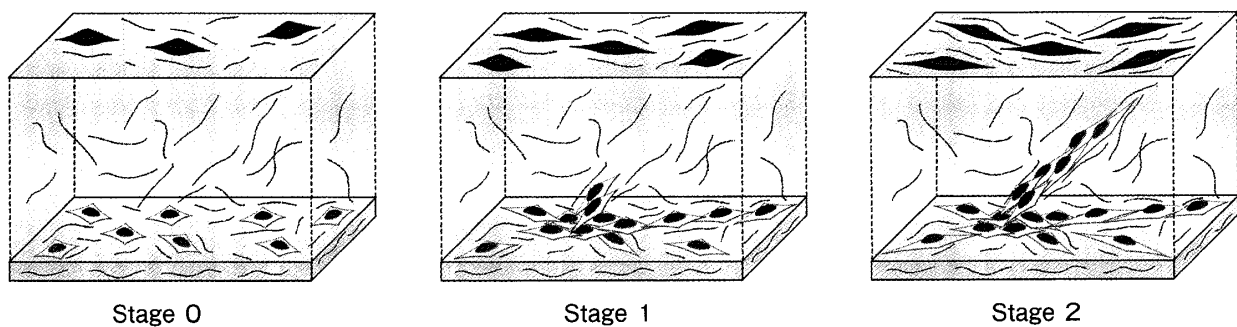


図4 内皮細胞の分化のシエーマ
(stage 0 : monolayer, stage 1 : migrate/align, stage2 : capillary like tube formation)

材料および方法

1. 培養方法

細胞は、正常ヒト新生児包皮微小血管内皮細胞 (HMVEC (NB)) (クラボウ, 大阪) および正常ヒト新生児包皮皮膚線維芽細胞 (NHDF (NB)) (クラボウ, 大阪) を用いた (図1)。

内皮細胞の培養には、正常ヒト血管内皮細胞基礎培地 (HuMedia-EB2) に、HuMedia-MvG増殖添加剤セット (FBS, hEGF, ハイドロコーチゾン, ゲンタマイシン, アンフォテリシンB, hFGF-B, ヘパリン, dbcAMP) (クラボウ, 大阪) を加えたものを用いた (HuMedia-MvG)。

線維芽細胞の培養には、正常ヒト皮膚線維芽細胞基礎培地 (Medium106S) に、低血清増殖添加剤 (LSGS:FBS, hEGF, ハイドロコーチゾン, hFGF-B, ヘパリン) (クラボウ, 大阪) を加えたものを用い、通法に従い37℃, 5% CO₂気相下にて培養を行った。

2. レーザーの照射条件および照射方法

レーザー装置は吉田製作社製, Trinpl 830 PU (試作機) を使用した (図2)。仕様は発信源: Ga-Al-As半導体, 波長: 830±10nm, 出力: 800mW, 発振モード: 連続波であり, ファイバー径は500μmのものを用いた。

レーザーの照射条件は、茂呂ら⁸⁾を参考に、内皮細胞の増殖率が最も高いとされる, パワー密度 6.7mW/cm²-60secとし, インキュベーター内にて1日1回照射した。レーザー照射のタイムコー

スを図3に示す (図3)。

3. 内皮細胞の増殖率の測定

NHDFを96wellマイクロプレート (SUMILON, 東京) に播種し, HuMedia-MvGにて24時間培養後, 培地を採取した。採取した培地は遠心分離し (5500×g 5分) (HITACHI, 東京), 細胞を除き, 以下の実験に用いた。

1) Soluble factorによる影響

96wellマイクロプレートにHMVECをそれぞれ1×10³個の割合で播種し, HuMedia-MvGにて24時間培養後, NHDFが産生した因子 (soluble factor) を含む培地 (EC+) とHuMedia-MvG (EC) に交換し, 培養を行った。24時間および48時間後, それぞれの細胞を0.025% trypsin-0.01% EDTA-PBS溶液で分散させ, トリパンブルー染色にて生細胞数をカウントし, 増殖率を測定した。なお, 統計はMann-Whitney検定を用いた。

2) レーザー照射による影響

上記と同様の方法で細胞を培養し, ECおよびEC+にそれぞれレーザー照射を行い, cell-counting kit8 (堂仁堂, 熊本) にて細胞数を測定し, レーザー照射24時間, 48時間後の増殖率を非照射群と比較した。統計はMann-Whitney検定を用いた。

4. 3D co-culture modelの作成と評価

内皮細胞の三次元培養には, Fibrin Gel In Vitro Angiogenesis Assay Kit (Fibrinogen Solution, Thrombin Solution, Positive Control Angiogenic Supplement) (CHEMICON

International, Inc., USA) を用いた。

培地はHuMedia-MvGからhFGF-Bを除いたものを用い、さらにkitに含まれるPositive Control Angiogenic Supplementを使用した。

Fibrinogen solution, Thrombin solutionを用いて、12wellマイクロプレート（旭テクノグラス、船橋）にfibrin gel層を形成し、HMVECを 1.5×10^4 個/cm²の割合で播種した。24時間培養後、新たなfibrin gel層をHMVECの上に重積し、その上にNHDFをHMVEC100に対して1の割合で播種した。以下の実験はすべてのこの播種比率にて行った（図3）。

3D co-culture modelにレーザーを照射し、照射直後（0）、24、48時間後の形態変化を倒立位相差顕微鏡（TMD, Nikon, 東京）にて観察した。コントロールとして、HMVECのみをgel上で培養したものを用い、比較を行った。

内皮細胞の分化の評価については、HMVECの動態をそれぞれ3段階に分類した。まず、HMVECが単層の状態をstage0、次に、HMVECが多層化し、細胞が一行に並んだ状態をstage1とし、最後に、HMVECがcapillary like tube formationを形成した状態をstage2とした（図4）。

5. 3D co-culture model における血管新生因子の測定

3D co-culture modelにおけるレーザー照射24、48時間後の培地上清中に含まれるVEGFおよびactive TGF- β 1について、それぞれHuman VEGF ELISA Kit, Human TGF- β 1 ELISA Kit（Ray Bio, USA）を用いて検索した。

HMVECおよびNHDFのみをgel上に播種したものをコントロールとし、co-culture同様に採取した培地中に含まれるVEGFおよびactive TGF- β 1について測定した。値はOD値で示し、統計はMann-Whitney検定を用いた。

結 果

1. 内皮細胞の増殖率

1) Soluble factorによる影響

Soluble factorがHMVECの増殖率にどのような影響を及ぼすかについて検索した結果、HMVECの細胞数はEC、EC+ともに経時的に増

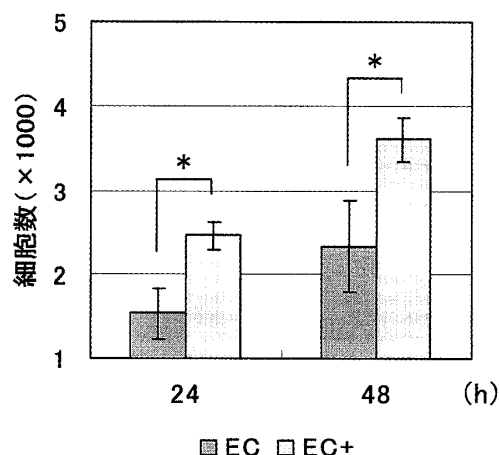


図5 内皮細胞の増殖に及ぼすsoluble factorの影響
(EC: endothelial cell, EC+: endothelial cell with soluble factor)
Mean \pm SD (n=6)
*: U-test, $P < 0.05$ vs. EC

		0 h	24h	48h
HMVEC	N	0	0	0~1
	L	0	0~1	1~2
CO	N	0~1	1~2	2
	L	0~1	2	2

図9 3D co-culture modelにおける内皮細胞分化のstage
(HMVEC: endothelial mono-culture, CO: co-culture) (N: 非照射群 L: 照射群)
(stage 0: monolayer, stage 1: migrate/align, stage2: capillary like tube formation)

殖し、ECと比較して、EC+は培養24時間後で約60%、48時間後では約54%の増殖を示した（図5）。

2) レーザー照射による影響

次に、soluble factorの有無によるレーザー照射の影響について調べたところ、ECは照射24時間後では有意差は認められなかったものの、48時間後では約7%の増加がみられた。また、EC+は、照射24時間後で約6%の増加を示し、48時間後では有意差は認められなかった（図6）。

2. 3D co-culture modelによる形態観察

内皮細胞単独で培養した場合、レーザー照射0時間後、細胞は非照射群、照射群ともに単層のstage0の状態であり、両者に変化は見られなかった。24時間後では、非照射群でstage0であったが、照射群では一部で多層化が認められstage1に移行

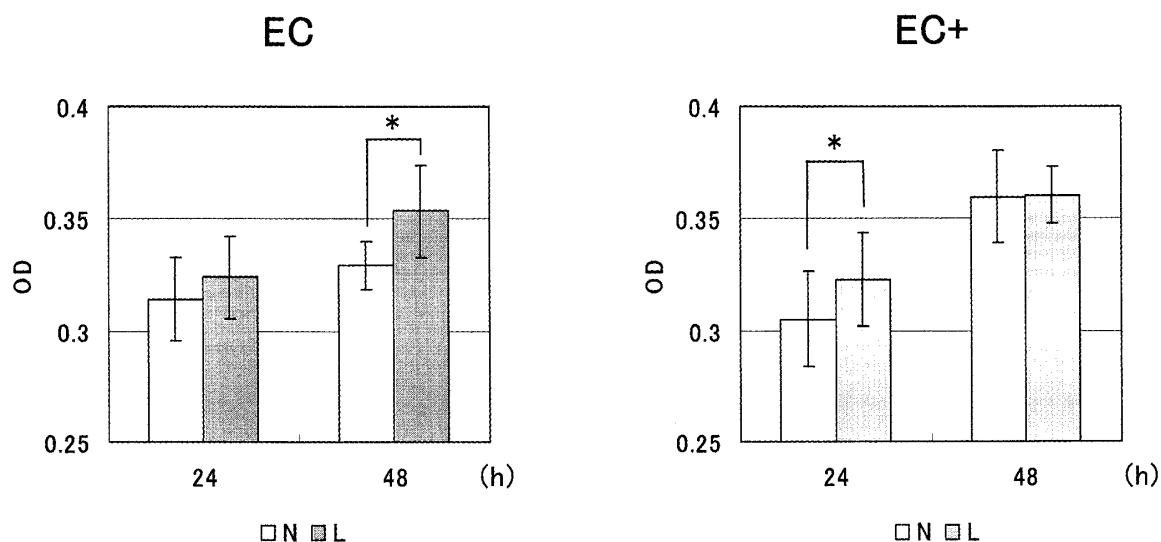


図6 Soluble factorの有無によるレーザーの影響

(EC : endothelial cell, EC+ : endothelial cell with soluble factor) (N : 非照射群 L : 照射群)

Mean \pm SD (n=12)

* : U-test, $P < 0.05$ vs. control

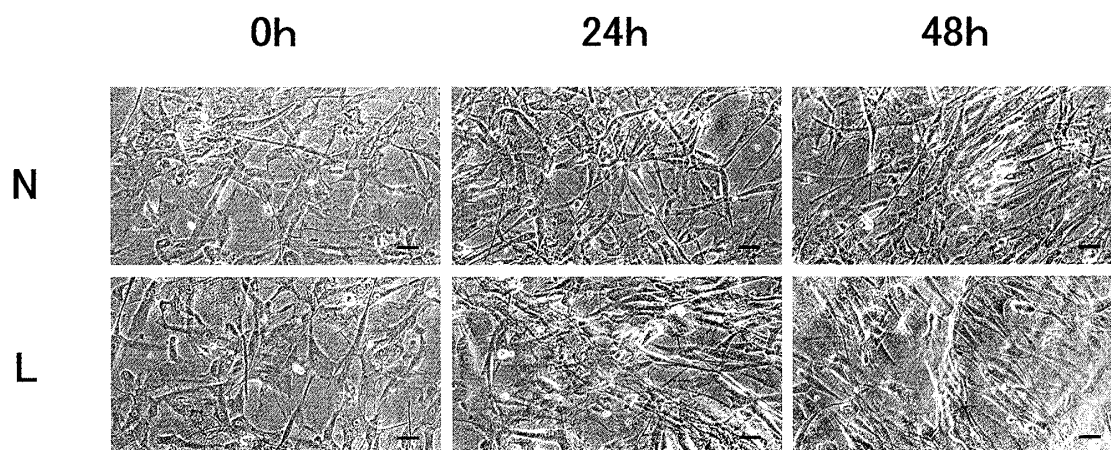


図7 内皮細胞の経時的変化(mono-culture)

(N : 非照射群 L : 照射群) (bar : 50 μ m)

レーザー照射群において経時的に分化が促進している。

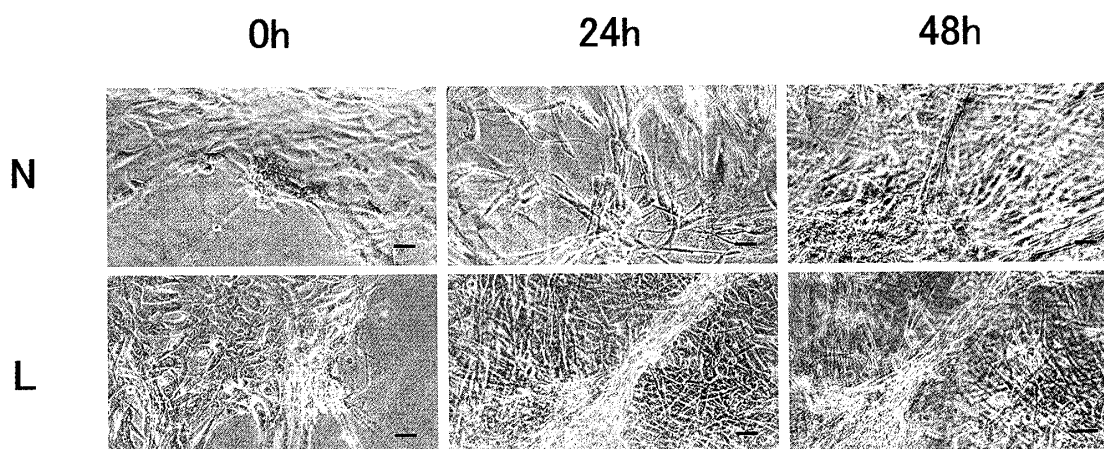


図8 内皮細胞の経時的変化(co-culture)

(N : 非照射群 L : 照射群) (bar : 50 μ m)

レーザー照射群において照射24時間をピークに分化が促進している。

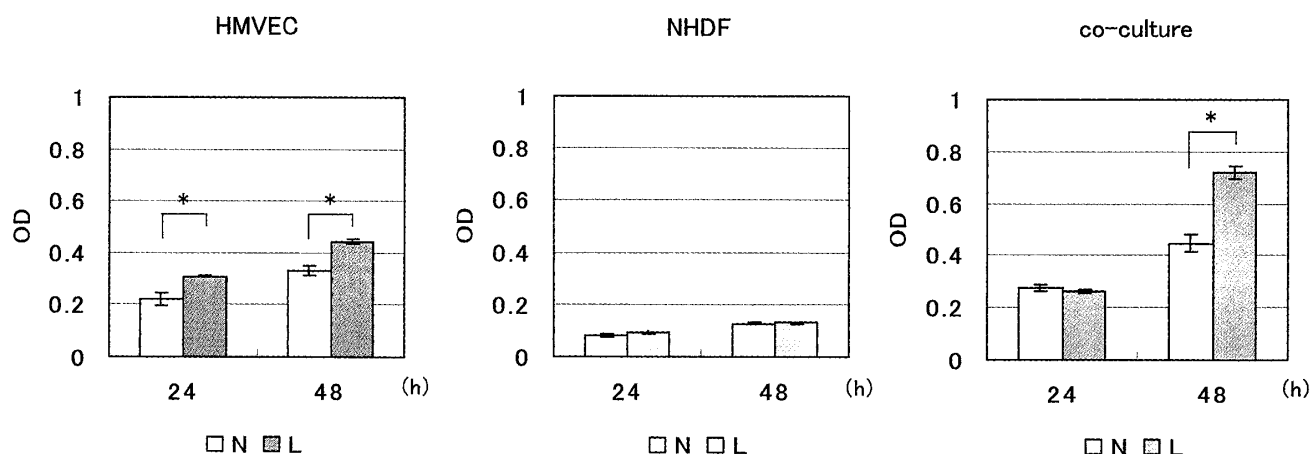


図10 VEGFの動態

(HMVEC : endothelial mono-culture, NHDF : fibroblast mono-culture, co-culture : endothelial co-culture with fibroblast)

(N : 非照射群 L : 照射群) Mean ± SD (n=4) * : U-test, P < 0.05 vs. control

しつづつあった。48時間後では、非照射群はstage0～1であったが、照射群ではstage1となり、レーザー照射群において分化が促進した(図7, 9)。

Co-cultureで培養した場合、レーザー照射0時間後では、非照射群、照射群ともにstage0～1であり、内皮細胞単独に比べstageが進んだ状態であった。24時間後では非照射群ではstage1～2の間であるのに対し、照射群ではcapillary like tube formationを認める stage2の状態となり、両者に大きな差が見られた。48時間後では、非照射群もstage2の状態となるものの、照射群では24時間に比べ、大きな変化は認められなかった(図8, 9)。

3.3D co-culture modelにおける血管新生因子

血管新生因子のレーザー照射における変化について検索した。

1) VEGF

HMVECでは非照射群、照射群ともに経時的にOD値は上昇し、レーザー照射24時間後では約38%, 48時間後では約34%の増加が認められた。また、NHDFではレーザー照射24時間後HMVECに比べその値はわずかであり、48時間後において増加するものの、いずれにおいてもレーザー照射により有意差は認められなかった。

一方、co-cultureでは非照射群、照射群ともに経時的にOD値は上昇し、レーザー照射24時間後では有意差は認められないものの、48時間後で約60%の増加を示した(図10)。

2) Active TGF-β1

HMVEC, NHDF, co-cultureすべてにおいて培地上清中測定限以下であり、active TGF-β1は検出できず、レーザー照射を行っても同様であった(データ示さず)。

考 察

低出力レーザー照射により、血管内皮細胞の増殖および分化が促進すること¹²⁾、線維芽細胞においても増殖の促進、マイトジェン活性およびI型collagen産生が増加することなど、従来、個々の細胞における効果については報告がなされている^{5,11)}。また、*In vitro*での血管新生では、細胞の産生する様々な因子(soluble factor)が培養上清中に存在し、その相互作用により線維芽細胞が内皮細胞の分化を促進させるとされている¹³⁾。しかし、同一環境下で両者にレーザー照射した場合の変化については不明である。

そこで本研究では、soluble factorを介した相互作用に注目し、線維芽細胞存在下における低出

力レーザー照射の影響について、内皮細胞の増殖と分化に焦点をあて検索を行った。

1. 内皮細胞の増殖率の変化

線維芽細胞が産生したsoluble factorが内皮細胞の増殖にどのような影響を及ぼすかについて検索したところ、soluble factorは内皮細胞の増殖を促進することが明らかとなった。Soluble factorの有無によるレーザーの影響については、その存在下においても、レーザー照射によって増殖はさらに促進した。Kipshidzeらは、低出力レーザー照射した線維芽細胞から採取した調整培地は、内皮細胞の増殖を促進すると報告し¹⁴⁾、本研究での結果と一致する。

しかし、照射48時間後では増殖に変化は見られなかった。この原因として、培地中に含まれる増殖因子の増加によるレセプターの過飽和が原因である可能性、細胞の増殖が亢進したことにより、contact inhibitionが生じた可能性等が考えられる。この点については今後、培地中の増殖因子の定量を含めて検討していきたい。

2. Tube formation

内皮細胞をculture plateに培養すると、二次元的に増殖するのみであるが、gel等を用いて培養することにより、三次元的に増殖し、生体での動態に近いcapillary like tubeの形成まで観察することが可能となる¹⁵⁾。そこで本研究では、通常の二次元培養に加え、fibrin gelを用いた三次元培養システムにより検討した。

線維芽細胞と内皮細胞のco-cultureによるtube formationの動態については、促進と抑制の相反する報告がある^{13,16)}。本研究では、線維芽細胞とのco-cultureによって内皮細胞のtube formationは促進した。Nehlsらは、線維芽細胞と内皮細胞の接着により血管新生の抑制が起こると報告している¹⁷⁾。本研究においては、細胞間接着による相互作用についての検討は行っていないが、tube formationの抑制は観察されなかった。このことから、細胞間接着のない環境下では、内皮細胞の分化にsoluble factorの影響がより強く現れると考えられる。また、co-cultureにおけるレーザー照射の分化への影響を比較した結果、レーザー照射によって、さらにtube formationは促進された。

しかし、細胞の分化が進み、tube formationがなされた後には変化は認められなかった。

低出力レーザーが増殖と分化を促進することは、骨芽細胞様株化細胞を用いた実験でも明らかにされ、未分化な細胞にレーザー照射すると分化を促進すること、培養後期よりも培養初期の照射が効果的であるとされている^{9,18)}。これらの原因について、石丸は細胞のレーザーに対する感受性の変化を挙げている⁹⁾。今回、tube formation後に変化がみられない要因として、内皮細胞においても石丸の報告同様、レーザーに対する感受性が低下した可能性が考えられる。また細胞周期により、レーザー照射の影響が異なるという見解などもあり^{19~20)}、さらに詳細な検討が必要である。

レーザー照射による分化を促進するもう一つの要因として、fibrin gelの存在が挙げられる。レーザー照射と3Dバイオマトリックスとの関係について、間葉幹細胞に低出力レーザー照射した実験では、Biomatrix-Laser systemが、間葉幹細胞の骨芽細胞への分化とそれに続く骨化を増強している²¹⁾。

本研究でも、線維芽細胞が産生する増殖因子や細胞外マトリックスの作用だけでなく、fibrin gelによる足場の形成や、局所での血管新生因子の捕捉、蓄積作用により、早期にtube formationに必要な微小環境が構築されたことが、その促進の要因である²²⁾。さらに、soluble factorにより細胞が増殖し活性化している時期のレーザー照射によって、その増強がなされ、分化の促進がみられたものと推測される。

3. VEGFおよびTGF- β 1の動態

VEGFは血管新生には必須の促進因子であり、内皮細胞の増殖、遊走、接着、tube formationの一連の過程に関与する²³⁾。内皮細胞および線維芽細胞はそれぞれVEGFを産生しており、co-cultureにおいても、培地中にVEGFの存在が確認されている²²⁾。

本研究において、内皮細胞のみの定量結果では、VEGFは経時的に増加し、レーザー照射24、48時間後ともに発現が亢進していた。この結果は形態観察の結果を裏付ける。線維芽細胞のみの定量結果では、経時的に微量ながら増加するものの、レー

レーザー照射による有意差は認められなかった。通常、低出力レーザー照射により、線維芽細胞の増殖因子の産生は増加すると報告されている¹⁰⁾。しかし今回、レーザー照射による有意差が認められなかったのは、線維芽細胞の播種数が少ないこと、あるいは線維芽細胞のVEGF産生量が少ないことが原因ではないかと考えられる。

Co-cultureでは、VEGFの発現は内皮細胞のみの結果同様、経時的な増加を示すものの、形態変化の著しい24時間後では、レーザー照射による値に差がみられず、分化が進んだ48時間後では有意差が認められるようになった。変化の見られなかった時期は、初期の増殖からtube formation等を行う分化段階へのスイッチングが行われる時期であり、内皮細胞へのVEGFの取り込みが一時的に変化すると推測される。このことが、レーザー照射後のVEGFの動態になんらかの影響を及ぼしている可能性がある。

本研究では、レーザー照射後のactive TGF- β 1の動態についても検討した。TGF- β 1は潜在型の活性化により生物学的活性を発現するとされ²⁴⁾、内因性のactive TGF- β 1にはtube formation抑制効果があるとの報告がある²⁵⁾。

内皮細胞、線維芽細胞それぞれの培地中に分泌されるTGF- β 1は潜在型であり^{25~26)}、co-cultureでは、ペリサイトや平滑筋細胞と内皮細胞との細胞間接触によって潜在型TGF- β 1の活性化が起こることが報告されている²⁴⁾。しかし、本研究ではmonoおよびco-cultureともにTGF- β 1の活性化は認められなかった。加えて、TGF- β 1は熱や酸処理によっても活性化することが知られ²⁷⁾、宮田らはヒト歯髄細胞を使った実験で、レーザー照射を行っても、TGF- β 1は潜在型から活性型にならないと報告しており²⁸⁾、今回の結果と同様である。

4. Co-cultureにおける低出力レーザーの効果

本研究で、内皮細胞は線維芽細胞存在下で早期に分化した。これは、内皮細胞、線維芽細胞両者に細胞間相互作用が働いていることを示しており、レーザー照射は分化をさらに促進した。このことから、co-cultureにおける低出力レーザー照射は内皮細胞の生物学的活性を増強し、細

胞間相互作用とともに、tube formationを促進することが明らかとなった。さらに、低出力レーザーによる細胞の活性化は内皮細胞の分化stage、特にtube formation前において顕著であり、VEGFの発現についても内皮細胞の分化に伴い増加した。

以上のことから、生体においては、細胞間の相互作用によってレーザーの効果に変化する可能性が示唆される。

結 論

線維芽細胞存在下における血管内皮細胞のtube formationに及ぼすレーザー照射の影響について検討した結果、以下の結論を得た。

1. 線維芽細胞が産生した因子は内皮細胞の増殖を促進し、因子存在下であってもレーザー照射によってさらに増殖は促進された。

2. 線維芽細胞存在下において内皮細胞は早期に分化し、培養初期のレーザー照射によって内皮細胞のtube formationが促進された。

3. Co-cultureにおけるレーザー照射後のVEGFの発現は、内皮細胞の分化に伴い増加した。

以上の結果から、血管内皮細胞の線維芽細胞存在下における増殖および分化は、線維芽細胞の産生する因子、特にVEGFによって促進し、細胞間相互作用によって変化する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終わるに臨み、終始御懇篤なるご指導、御校閲を賜りました奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野山本茂久教授に対し衷心より感謝の意を表します。

本論文の要旨は、第43回奥羽大学歯学会（平成19年6月 郡山市）において発表した。

文 献

- 1) 松岡嘉生：ラット抜歯窩治癒過程に及ぼす低出力レーザーの影響に関する研究. 歯学 78 ; 1225-1245 1991.
- 2) 川崎宏一郎, 清水典佳：低出力レーザー照射が実験的歯の移動に伴う歯槽骨形成に与える影響. 日レ医誌 20 ; 215-222 1999.
- 3) 鎗田敏之, 草刈 玄：低出力レーザーの歯肉微小循環系に及ぼす影響. 補綴誌 37 ; 407-419 1993.
- 4) 葛西真一, 山本康弘, 小谷裕美, 安藤修敏ほ

- か：損傷・潰瘍の治療. 日レ医誌 18 ; 27-34 1997.
- 5) 桜木 修, 日下部豊寿, 金子知生, 金 壮律ほか：ラット口蓋における癒痕組織形成に対するGa-Al-As半導体レーザーの影響. 北海道歯誌 27 ; 130-138 2006.
- 6) 石原康守, 阪口周吉, 小谷野憲一, 佐藤勝彦ほか：半導体パルスレーザーによる肉芽形成促進効果. 日レ医誌 7 ; 81-82 1987.
- 7) 山口万枝, 山田一郎, 増本一真, 田中秀生ほか：Nd : YAGレーザーを用いた口腔疾患の治療経験. 日レ歯誌 11 ; 116-121 2000.
- 8) 茂呂祐利子, 中川敏浩, 安部仁晴, 斎藤 勇ほか：培養細胞の増殖におよぼすレーザーの出力とエネルギー密度に関する研究. 奥羽大歯学誌 30 ; 271-279 2003.
- 9) 石丸透子：低出力レーザー照射が骨芽細胞様株化細胞のアルカリホスファターゼ活性に与える影響. 日大歯学 77 ; 293-300 2003.
- 10) Saygun, I., Karacay, S., Serdar, M., Ural, A. U. *et al.* : Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts. *Lasers Med Sci* 10 ; <http://www.springerlink.com/content/3171454p1m18635q/> 2007.
- 11) 松尾隆昌：低出力半導体レーザー照射が培養ヒト線維芽細胞様細胞(HT-1080)におけるTIMPおよびMMP遺伝子発現に与える影響. 愛院大歯誌 38 ; 37-46 2000.
- 12) 茂呂祐利子, 中川敏浩, 安部仁晴：半導体レーザー照射が血管新生に及ぼす影響. 日レ歯誌 17 ; 104-117 2006.
- 13) Velazquez, O. C., Snyder, R., Liu, Z. J., Fairman, R. M. *et al.* : Fibroblast-dependent differentiation of human microvascular endothelial cells into capillary-like 3-dimensional networks. *FASEB J* 16 ; 1316-1318 2002.
- 14) Kipshidze, N., Nikolaychik, V., Keelan, M. H., Shankar L. R. *et al.* : Low-power helium : neon laser irradiation enhances production of vascular endothelial growth factor and promotes growth of endothelial cells in vitro. *Lasers Surg Med* 28 ; 355-364 2001.
- 15) Chalupowicz, D. G., Chowdhury, Z. A., Bach, T. L., Barsigian C. *et al.* : Fibrin II induces endothelial cell capillary tube formation. *J cell Biol* 130 ; 207-215 1995.
- 16) Montesano, R., Pepper, M. S. and Orci, L. : Paracrine induction of angiogenesis in vitro by Swiss 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 105 ; 1013-1024 1993.
- 17) Nehls, V., Herrmann, R., Hühnken, M. and Palmetshofer, A. : Contact-dependent inhibition of angiogenesis by cardiac fibroblasts in three-dimensional fibrin gels in vitro : implications for microvascular network remodeling and coronary collateral formation. *Cell Tissue Res* 293 ; 479-488 1998.
- 18) 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.
- 19) Fukuhara, E., Goto, T., Matayoshi, T., Kobayashi, S. *et al.* : Optimal low-energy laser irradiation causes temporal G2/M arrest on rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 79 ; 443-450 2006.
- 20) 佐藤俊一, 高橋孝志, 横野雅之, 稲葉文男ほか：低エネルギーレーザー光照射に伴う細胞電気泳動度の変化特性II. 細胞周期同調HeLa細胞による実験. 日レ医誌 8 ; 115-116 1987.
- 21) Abramovitch-Gottlib, L., Gross, T., Naveh, D., Gershen, S. *et al.* : Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci* 20 ; 138-146 2005.
- 22) Berthod, F., Germain, L., Tremblay, N., and Auger, F. A. : Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro. *J Cell Physiol* 207 ; 491-498 2006.
- 23) 渋谷正史：血管内皮細胞増殖因子VEGFの作用機構. 実験医学 22 ; 1056-1062 2004.
- 24) 佐藤靖史：TGF- β と血管病変—血管新生と粥状動脈硬化症を中心に. 実験医学 10 ; 1908-1912 1992.
- 25) Vailhé, B., Lecomte, M., Wiernsperger, N. and Tranqui, L. : The formation of tubular structures by endothelial cells is under the control of fibrinolysis and mechanical factors. : *Angiogenesis* 2 ; 331-344 1998.
- 26) Fujiwara, M., Muragaki, Y. and Ooshima, A. : Upregulation of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor in cultured keloid fibroblasts : relevance to angiogenic activity. *Arch Dermatol Res* 297 ; 161-169 2005.
- 27) 宮園浩平：潜在型TGF- β ：その構造と多彩な機能. 実験医学 10 ; 1839-1844 1992.
- 28) 宮田博史, 大島光宏, 山口洋子, 小木曾文内ほか：低出力半導体レーザー照射が培養ヒト歯髓細胞の成長因子産生に及ぼす影響. 日大歯学 80 ; 41-49 2006.

著者への連絡先：西上堅二，(〒963-8611)郡山市富田町字
三角堂31-1 奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学
分野

Reprint requests : Kenji NISHIGAMI, Division of Oral
Histology, Department of Morphological Biology, Ohu
University, school of Dentistry.
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan