

炭酸ガスレーザー凝固モード照射後の ラット口蓋動脈における組織変化

櫻井裕子 遊佐淳子 奥山典子
加藤美菜 小澤 亮 伊東博司

Histopathological Changes at Rat Palatine Arteries after Irradiation of Coagulation Mode CO₂ Laser

Yuuko SAKURAI, Junko YUSA, Noriko OKUYAMA
Mina KATO, Ryou OZAWA and Hiroshi ITO

A histopathological and immunohistochemical study was conducted to clarify the histopathological changes in rat palatine artery tissue after irradiation of CO₂ laser in coagulation mode. Throughout the experimental period, coagulative necrosis of the artery was observed in the laser wound, but neither disruption of the arterial wall nor artery obstruction occurred. On the 5th and 7th day post-irradiation, α -SMA positive spindle cells accumulated in the outer area of the arterial necrosis. On the 7th day after irradiation, flattened cells which showed von-Willebrand factor immunoreactivity lined the inner surface of the necrotic tissue in the arterial wall. From these observations, it was suggested that blood stream in arterioles is preserved after coagulation mode CO₂ laser irradiation.

Key words : CO₂ laser, α -SMA, von-Willebrand factor

緒 言

炭酸ガスレーザーを生体に照射すると、組織内水分が爆発的に高温となるため、組織が気化し、蒸散する。この特性により、かつて炭酸ガスレーザーはもっぱら小腫瘍の切除や粘膜疾患の蒸散に用いられてきた¹⁻³⁾。近年では、従来の炭酸ガスレーザーでは重大な問題となっていた、レーザー照射野周囲の熱損傷を極力抑えた、スーパーパルス波炭酸ガスレーザーが広く用いられている。スーパーパルス波レーザーの照射モードの中で、口腔外科処置後の疼痛緩和や象牙質知覚過敏症⁴⁾

の治療に効果を上げている照射モードは、ピークパワーを低く設定することにより生じる組織凝固作用を効果の主体とし、凝固モードと呼ばれている。

炭酸ガスレーザー凝固モードの照射で生じる組織凝固について観察、検討した報告はわずかであり、それらのうちの一つである Yamasaki ら⁵⁾の報告では、炭酸ガスレーザー凝固モード照射を受けた歯肉粘膜固有層では限局性の凝固壊死が生じ、その壊死組織は徐々に吸収されていくが、排除されることはなく、照射後の治癒過程において歯肉の輪郭は保たれていることを明らかにした。しか

受付：平成22年1月8日，受理：平成22年2月2日
奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔病理学分野

Division of Oral Pathology, Department of Oral
Medical Sciences Ohu University School of Dentistry

しながら、凝固モードレーザー照射後の組織変化の詳細については未だに不明な点が多い。そこで、本研究では低出力パルス波レーザーの照射を受けた組織に生じる変化を詳細に解明する目的で、炭酸ガスレーザー凝固モード照射後の口蓋動脈を病理組織学的ならびに免疫組織学的に検討した。

材料および方法

1. 実験動物と実験装置

実験動物として7週齢体重200～250g 雄性 Wistar ラット（日本クレア社，東京）を用いた。動物の取り扱いは、奥羽大学動物実験規定に従った。50mg/kg のペントバルビタールナトリウム（ソムノベンチル，三共製薬社，東京）腹腔内投与による麻酔下，ラットを実験台に固定し開口させ，口蓋動脈走行部分の口蓋粘膜にレーザー光を照射した（図1）。

レーザー発振装置として PanalasC05Σ（松下電器産業（株），大阪）を使用した。照射条件は内径1.5mm のコンタクトチップ（テーパー 1A）を用い，ピークパワー 5 W，パルス幅600 μsec，パルス数165.02pps の SP モードとした。照射は，コンタクトチップの方向が血管の走行に垂直になる様にし，30秒間行った。この条件下でのレーザー光は，defocus beam としてコンタクトチップ内径の範囲を照射し，仕様上の照射面エネルギー密度は17.35J/mm²となる。比較のため，滅菌済み外科用メスによって照射相当部を長さ1.5mm，幅1.5mm になるように骨面までの軟組織を切除した。切除後，滅菌ガーゼにより圧迫止血を行った。

2. 標本作製

照射 1, 3, 5, 7 日後，麻酔下にて口蓋粘膜を口蓋骨と一塊として採取後，直ちに4%リン酸緩衝パラホルムアルデヒドにて固定した。固定後，採取試料は10日間10% EDTA 溶液にて脱灰をした後，パラフィンに包埋し，厚さ4 μm の連続切片を作成した。ヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色を施して病理組織学的に検討した。創傷治癒に関わる細胞の動態を把握するために以下の免疫組織化学的検索を行った。

3. 免疫組織化学

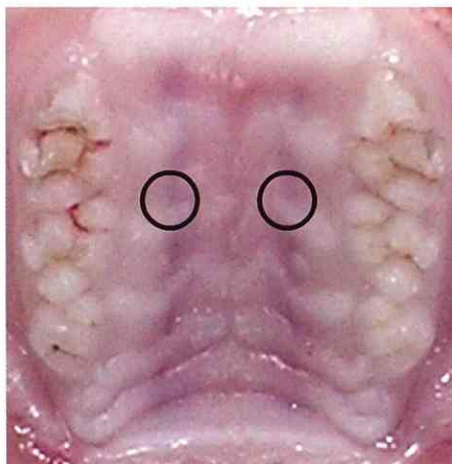


図1 ラット口蓋。レーザー照射部位を示す。

表1 使用抗体

抗体	希釈倍率	クローン	反応時間	製品会社
マウス抗ヒト α-SMA モノクローナル抗体	1:50	1A4	1時間	ダコ・ジャパン社，東京
ウサギ抗ヒト von Willebrand factor ポリクローナル抗体	1:400		30分	ダコ・ジャパン社，東京

免疫組織化学では表1に示した一次抗体を用い，Labeled-streptavidin biotin (LASB法)で行った。抗α平滑筋アクチン（以下α-SMA）抗体は血管平滑筋のマーカーとして，抗 von-Willebrand factor（以下vWF）抗体は，血管内皮細胞の同定と血漿成分の検出のため用いた。キシレンにより脱パラフィンを行ったのち，vWFのために Proteinase K（ダコ・ジャパン社，東京）を用いて抗原の賦活化を行った。切片を0.3%過酸化水素 PBS に室温で20分浸漬して内因性ペルオキシダーゼを除去した後，抗体の非特異的反応を防止するために，切片にヤギ正常血清を室温で20分反応させた。次いでα-SMAに対する二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗マウス IgG（1:100，CHEMICON 社，USA）を室温で30分反応させ，vWF に対してはビオチン標識ヤギ抗ラビット IgG（1:100，CHEMICON 社，USA）を室温で10分反応させた。ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ニチレイ社，東京）を室温で10分反応させた後，0.02% 3-3' ジアミノベンチジン・4HCl/0.05M トリス塩酸緩衝液，pH7.6

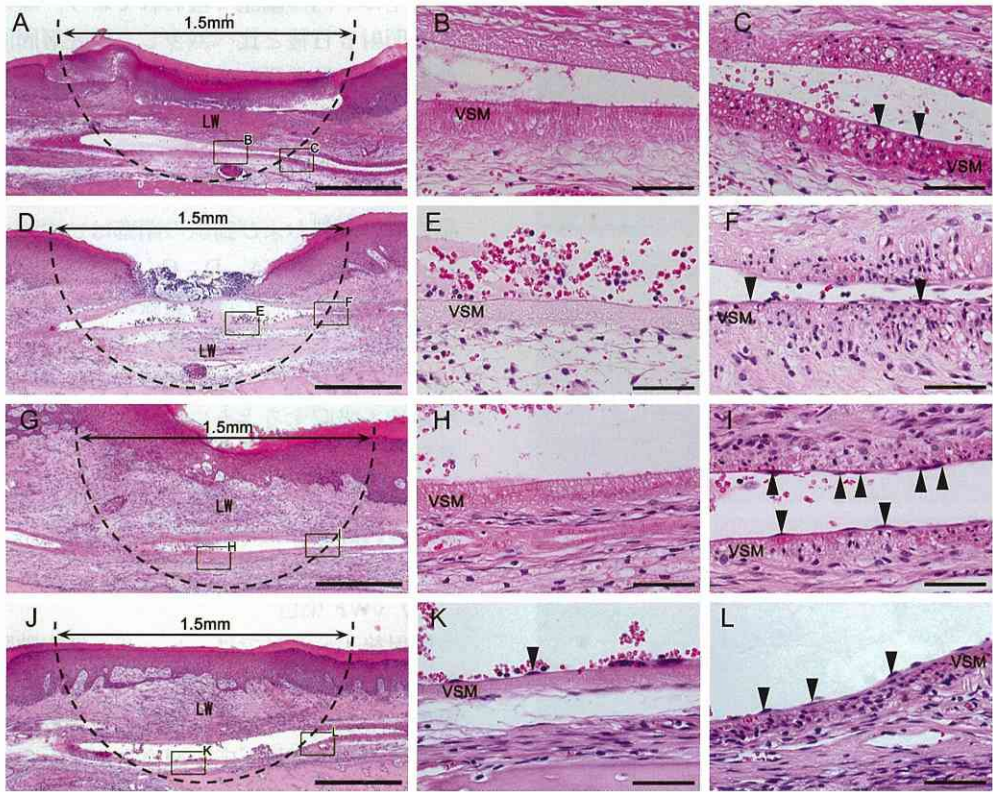


図2 炭酸ガスレーザー凝固モード照射後の組織変化。H-E染色。
 A, B, C：照射後1日 D, E, F：照射後3日 G, H, I：照射後5日 J, K, L：照射後7日
 B, E, H, K：レーザー創中心部 C, F, I, L：創辺縁部
 LW：レーザー創 VSM：血管平滑筋 矢頭：血管内皮細胞
 A, D, G, Jのスケールバー：500 μm B, C, E, F, H, I, K, Lのスケールバー：50 μm

(DAB 基質キット，ニチレイ社，東京) にて発色させた。核染色はヘマトキシリンで行った。一次抗体に代えてPBSで反応を行った切片を陰性対照としたが，これら対照切片すべてにおいて陽性反応は認められなかった。

結 果

1. 病理組織学的所見

レーザー照射後1日では，照射を受けた粘膜上皮が長さ約1.5mmにわたり凝固壊死に陥っていた。Yamasakiら⁵⁾によると，凝固モードレーザー照射によって生じる口蓋粘膜の創傷は，壊死に陥った上皮を底面とした半球状の形態をとるとされている。本研究における照射後1日では，その

ような半球状レーザー創の内部に位置していると見なされる口蓋動脈の壁が，凝固壊死の所見を呈しているのが観察された(図2A, B)。すなわち，動脈壁の形態は保たれていたが，内皮細胞は認められず，筋層内および外膜では細胞核が消失していた。ただし，動脈壁の断裂および動脈腔の閉鎖はいずれも認められなかった。レーザー創と周囲正常組織との境界部では，ほとんどの内皮細胞が消失し，筋層では細胞核は凝縮しており，また，筋層内では空胞変性が見られた(図2C)。

レーザー照射3日後では，レーザー創内部の動脈の壊死筋層外側で紡錘形細胞が粗に配列していた。創と周囲組織との境界部では，内皮細胞が動脈壁内面の一部を覆っているのが観察され，筋層

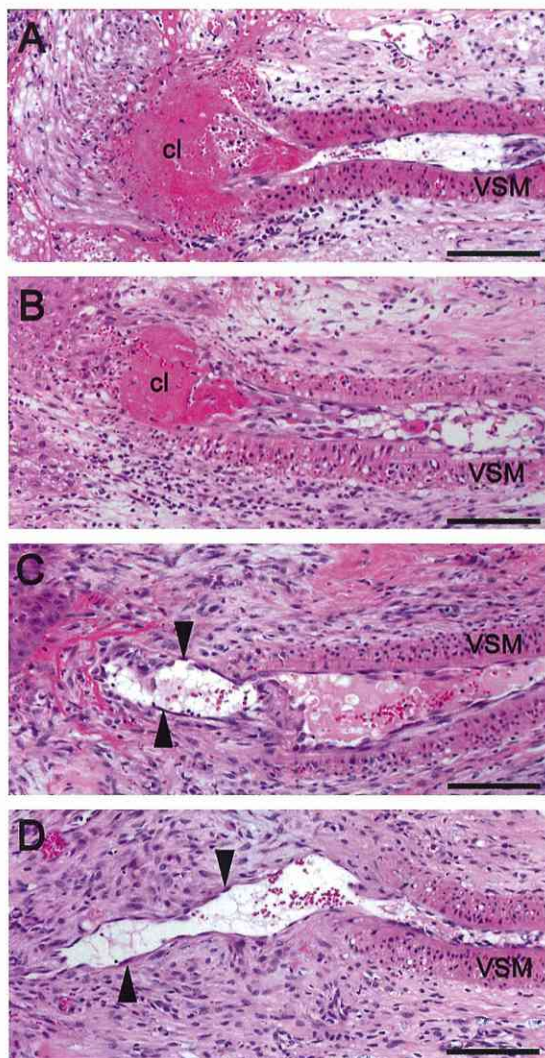


図3 メス切除後の組織変化。H-E 染色。

A: 切除後1日 B: 切除後3日 C: 切除後5日

D: 切除後7日

cl: 凝血塊 VSM: 血管平滑筋

矢頭: 血管内皮細胞 スケールバー: 50 μm

内の空胞の数は減少していた(図2D, E, F)。

照射後5日, レーザー創内の壊死筋層外側では紡錘形細胞が数個積み重なっているのが認められた。レーザー創と周囲組織の境界部では, 内皮細胞数が3日と比べ増加していた。筋層内では新生細胞の核と思われる泡状核が少数見られた(図2G, H, D)。

照射後7日では, レーザー創内動脈の内腔面は

ほぼ全体が内皮細胞で覆われており, 壊死層の厚さが照射5日後と比べ減少し, 壊死層周囲では紡錘形細胞が数を増していた。周囲組織との境界部では, 筋層内において生細胞の核が増加していた(図2J, K, L)。

なお, レーザー照射後の全実験期間を通じて, 動脈壁の断裂および動脈の閉塞はいずれも認められなかった(図2A, D, G, J)。

メス切断後1日では, 動脈の断端に凝血塊が形成されており, 切断3日後では凝血塊が1日後と比べ小さくなっていった。切断5日後では動脈腔が凝血塊を吸収するように伸展しており, 伸展した動脈腔は内皮細胞で裏装されていた。切断後7日では動脈腔はさらに伸展していたが, 切断された動脈の再疎通は見られなかった(図3)。

2. 免疫組織化学的所見

1) vWF 染色

照射後1~5日では, レーザー創内動脈の壊死筋層において瀰漫性の陽性反応が見られ, 境界部動脈では創内動脈と同様の瀰漫性染色所見と内皮細胞における陽性反応が観察された。7日後では, レーザー創内動脈と境界部動脈のいずれにおいても内皮細胞が強い陽性反応を示し, 動脈壁内で瀰漫性陽性反応を示す領域が狭小化していた(図4)。

2) α -SMA 染色

照射後1, 3日のレーザー創においては, 動脈壁における α -SMA染色陽性反応は認められなかった。この時点の境界部領域では種々の程度の陽性反応が見られた。照射5, 7日後のレーザー創では壊死筋層外側に存在する紡錘形細胞に α -SMAの明らかな局在が観察され, 境界部の染色所見は1, 3日後と同様であった(図5)。

考 察

本研究においては, 凝固モードレーザーを照射した口蓋動脈の組織変化を病理組織学的ならびに免疫組織化学的に検討した。その結果, 照射後1日から7日までの期間, 動脈壁に壊死が観察されたが, 動脈壁の断裂や動脈内腔の閉塞はともに認められなかった。照射後7日で, 壊死に陥った動脈の内面を覆うvWF陽性の内皮細胞が観察され, 照射5, 7日後ではレーザー創内の動脈壁筋層の

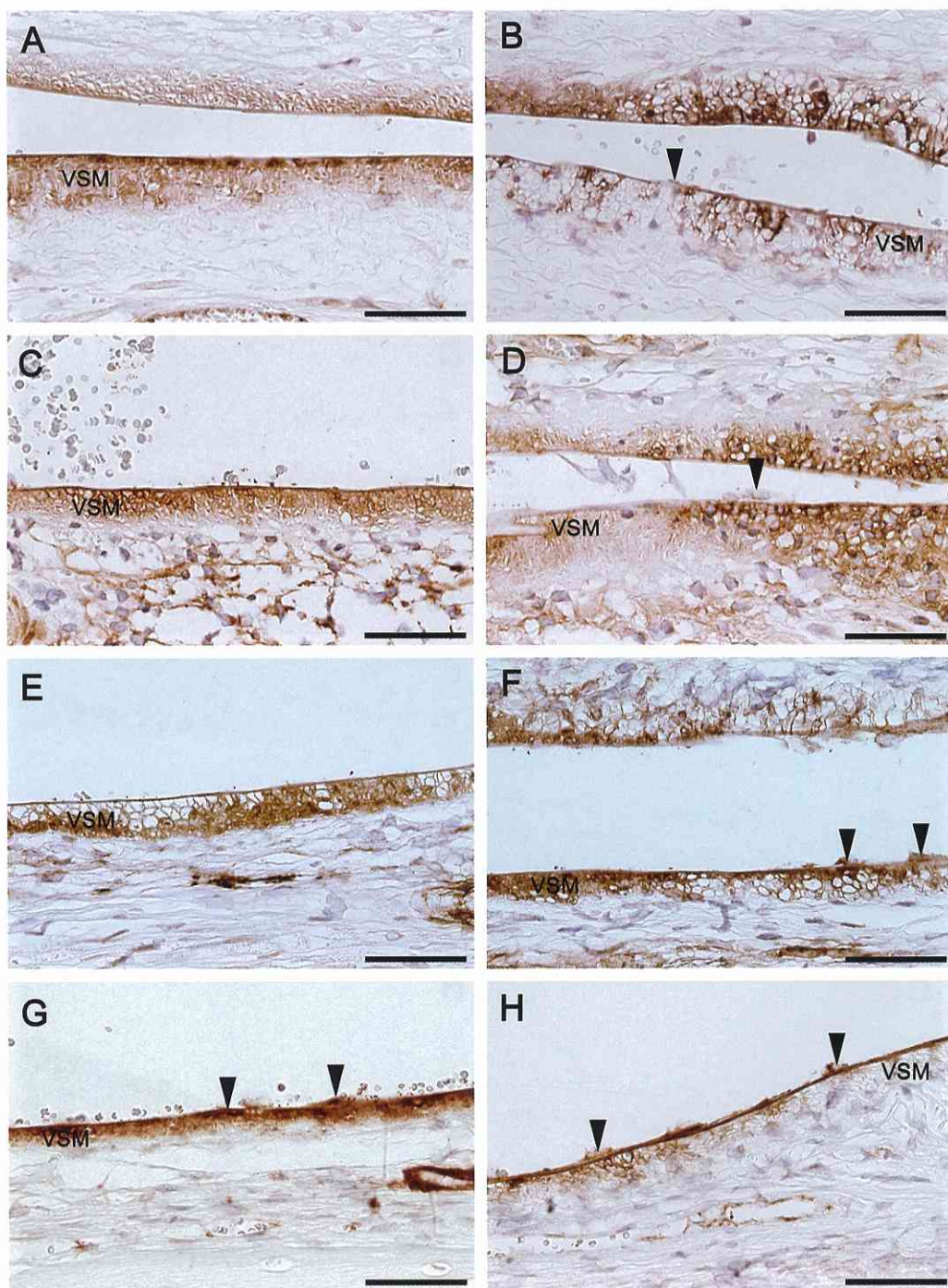


図4 von-Willebrand factor 免疫染色。

A, B: 照射後1日 C, D: 照射後3日 E, F: 照射後5日 G, H: 照射後7日

A, C, E, G: レーザー創中心部 B, D, F, H: 創辺縁部 VSM: 血管平滑筋

矢頭: 血管内皮細胞 スケールバー: 50 μ m

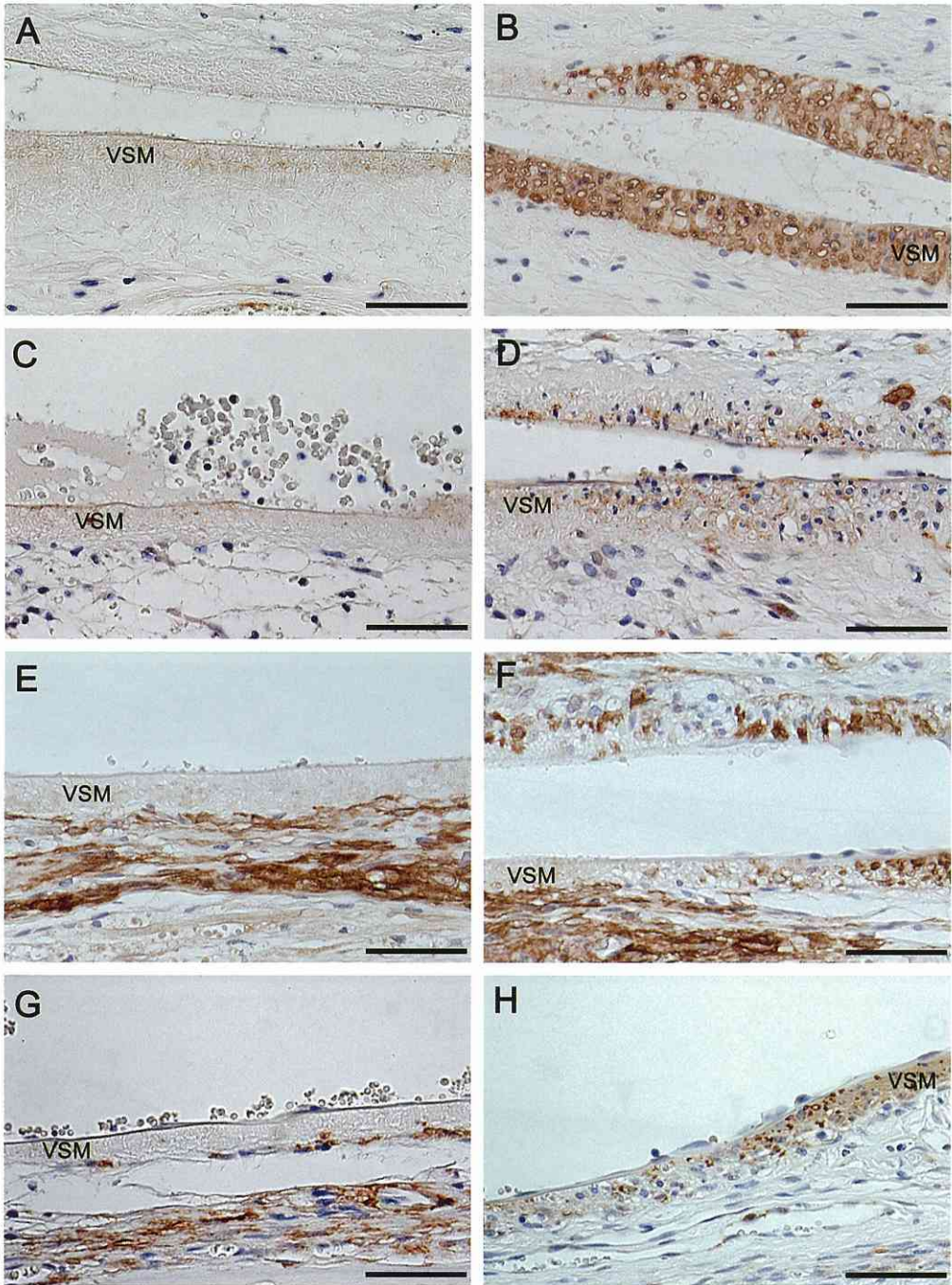


図5 α -SMA免疫染色

A, B: 照射後1日 C, D: 照射後3日 E, F: 照射後5日 G, H: 照射後7日

A, C, E, G: レーザー創中心部 B, D, F, H: 創辺縁部

VSM: 血管平滑筋 スケールバー: $50\mu\text{m}$

外側で紡錘形細胞の層状配列が見られ、それら細胞は α -SMA陽性を示していた。

今回の研究と同様に、凝固モードレーザーをラット臼歯部口蓋側歯肉に照射し、その後の組織変化を観察したYamasakiら⁵⁾の報告では、照射によって歯肉結合組織に凝固壊死が生じるが、壊死巣は新生結合組織により吸収されつつ歯肉が再生し、その際、歯肉の輪郭は保たれていると記載されている。本研究においても、Yamasakiら⁵⁾の観察結果と同様に、動脈組織の凝固壊死が観察されたが、動脈の輪郭は保たれており、壁の断裂は生じていなかった。

本研究では、レーザー創内において動脈腔の閉塞、動脈壁の破綻はともに認められなかったことから、凝固モードレーザー照射を受けた動脈で、壁の破綻および動脈腔の閉鎖は生じず、血流が維持されていたと思われる。岡田⁶⁾は実験的に切断したイヌ頸動脈の外科的吻合を、炭酸ガスレーザーを用いて行った後、吻合部の耐圧試験を施行し、レーザーによる吻合直後から、吻合部は300mmHgの血圧によっても離解しないことを示し、そのような耐圧性が生じるのは、動脈壁内コラーゲン線維の融解によるゾル化・ゲル化の発生や組織液が糊状となることで、動脈断端が互いに結合するためと推察している。本研究で見られたレーザー創内部の壊死動脈壁においても、同様のことが生じて血液の流出が妨げられて、同部動脈で血流が維持されていた可能性が推察される。

今回の観察では、照射1, 3, 5日後にレーザー創内の動脈内面で内皮細胞が見られなかった。内皮細胞が存在しない人工血管では血栓形成により血管腔が閉塞するとされている一方、人工血管設置後15日までに内皮細胞が人工血管内面を裏装すれば、人工血管の開存性が保たれるという報告がある⁷⁾。また、低出力炭酸ガスレーザーによりイヌ頸動脈を吻合した場合には、吻合部において血栓形成はなく、内膜における損傷は認められないという報告⁸⁾がある。これら報告と、今回、レーザー照射により壊死に陥った動脈において血栓形成および動脈腔閉塞はともに生じなかったことを考慮すると、凝固モードレーザー照射を受け壁が壊死に陥った動脈でも、血流が維持されている

可能性が強く支持される。ただし、壊死動脈における血流の維持については、今後、血管造影などの方法により、確認する必要がある。

本研究において、照射後5, 7日のレーザー創内部動脈の外層に、 α -SMA陽性紡錘形細胞の層状配列が見られた。これら細胞は、将来、血管の筋層をなす平滑筋細胞の前駆細胞である可能性が考えられる。また、それら α -SMA陽性細胞は、壊死筋層を器質化する肉芽組織を構成する筋線維芽細胞である可能性も推察される。ラット大腿動脈の吻合後治癒過程を記載した報告⁹⁾では、吻合部筋層では硝子様変性が生じたのちに、周囲の平滑筋細胞が変性部に侵入して、筋層の再生がなされると記載されている。一方、血管平滑筋細胞は血管平滑筋周囲の中胚葉性間葉細胞に由来するという論文¹⁰⁾もある。これらの事項を考慮しつつ、今後、レーザー照射で生じた動脈壁壊死巣が治癒していく過程を詳細に観察し、動脈壁筋層を再構成する細胞の由来、機能等を検討すべきであろう。

結 論

凝固モード炭酸ガスレーザー照射を受けたラット口蓋動脈の組織変化について検討した。レーザー照射を受けた口蓋動脈では、動脈壁の壊死が見られたが、動脈壁の破綻と動脈腔の閉塞はなく、照射後も動脈血流が維持されていることが推察された。照射後7日で壊死動脈壁内面は内皮細胞で裏装されていたが、筋層の再生は完了していなかった。

文 献

- 1) Ishii, J., Fujita, K. and Komori, T.: Laser surgery as a treatment for oral leukoplakia. ; *Oral Oncol* **39**; 759-769 2003.
- 2) 渡辺晋一: レーザー治療の原理と応用; *日レ医誌* **19**; 249-257 1998.
- 3) Loh, H. S.: A clinical investigation of the management of oral lichen planus with CO₂ laser surgery. ; *J Clin Laser Med Surg* **10**; 445-449 1992.
- 4) 小池 靖, 富永昭彦: 象牙質知覚過敏の処置へのレーザー応用. *歯科医療* **15**; 37-46 2001.
- 5) Yamasaki, A., Tamamura, K., Sakurai, Y., Okuyama, N., Yusa, J. and Ito, H.: Remodel-

- ing of the rat gingiva induced by CO₂ laser coagulation mode. ; *Laser Surg Med* **10** ; 695-703 2008.
- 6) 岡田昌義 : レーザーによる新しい血管吻合法に関する基礎的並びに臨床的研究の動向. *日レ医誌* **29** ; 50-56 2008.
- 7) Lepidi, S., Aabatangelo, G., Vindigni, V., Deriu, G. P., Zavan, B., Tonello, C. and Cortivo, R. : In vivo regeneration of small-diameter(2mm) arteries using a polymer scaffold. ; *FASEB J* **20** ; 103-105 2006.
- 8) 森井栄作 : 動脈吻合後の治癒経過に関する免疫

組織化学的ならびに電子顕微鏡的研究. *奥羽大歯学誌* **19** ; 572-587 1992.

- 9) Hirschi, K. K., Majesky, M. W. : Smooth muscle stem cells. ; *Anat Rec* 276A ; 22-33 2004.

著者への連絡先 : 櫻井裕子, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔病理学分野

Reprints requests : Yuuko SAKURAI, Division of Oral Pathology, Department of Oral Medical Sciences, Ohu University School of Dentistry

31-1 Misumido, Tomita Koriyama, 963-8611, Japan