

## 凝固モード炭酸ガスレーザー照射後 ラット顎二腹筋の組織変化

加藤美菜<sup>1</sup> 遊佐淳子<sup>2</sup> 櫻井裕子<sup>2</sup> 伊東博司<sup>2</sup>

### Histopathological Changes of the Rat Digastric Muscle after the Irradiation of CO<sub>2</sub> Laser in Coagulation Mode

Mina KATO<sup>1</sup>, Junko YUSA<sup>2</sup>, Yuuko SAKURAI<sup>2</sup> and Hiroshi ITO<sup>2</sup>

This study was undertaken to clarify the histopathological changes of skeletal muscle tissue produced by CO<sub>2</sub> laser in coagulation mode.

Laser irradiation to the rat digastric muscle was achieved with the parameters of 600  $\mu$  sec. pulse duration, 6 msec. off time, 5W peak power, and 5.1J/mm<sup>2</sup> average energy density. The muscle sections 0, 3, 6, 12 hours and 1, 3, 5, 7, 10, 14 days after the irradiation were fixed with paraformaldehyde and embedded in paraffin. The sections were stained with hematoxyline-eosin (H-E) for histopathological observation, or processed immunohistochemically to examine the expression of desmin, BrdU, and heat shock proteins (Hsp25 and Hsp72/73).

Immediately after the irradiation, a demarcated, hemispheric laser wound consisting of coagulation necrosis was observed. In the wound, although the nuclei of muscle cells were visible, those cells had lost the immunoreactivity to antibodies against desmin and Hsp25. On the next day, a few living cells were observed to show expression of desmin or uptake of BrdU in the necrotic zone, and the circumference of the wound was lined by Hsp72/73-positive cells. Between the 3rd and 10th days, the necrotic tissue was replaced first by the newly formed connective tissue, and then by newly formed muscle tissue. During that period, desmin positive cells within the laser wound increased in number, but there were no Hsp25-positive cells in the wound. The replacement by newly formed muscle tissue was completed on the 14th day. The repair process of the laser-induced wound progressed more rapidly than that of a electrocautery-made wound, where foreign body granuloma formed.

These results indicate that the necrotic muscle tissue produced by CO<sub>2</sub> laser in coagulation mode promotes the repair process rather than disturbing it, by accelerating the proliferation and differentiation of muscle precursor cells.

Key words : CO<sub>2</sub> laser, rat, muscle, wound healing, desmin

受付：平成24年2月28日，受理：平成24年4月24日  
奥羽大学大学院歯学研究科口腔病理学専攻<sup>1</sup>  
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<sup>2</sup>  
(指導：伊東博司教授)

Department of Oral Pathology, Ohu University,  
Graduate School of Dentistry<sup>1</sup>  
Division of Oral Pathology, Department of Oral  
Medical Sciences, Ohu University School of Dentistry<sup>2</sup>  
(Director : Prof. Hiroshi Ito)

## 緒 言

炭酸ガスレーザーを生体組織に照射すると、組織内水分が瞬時に沸騰、気化するために、照射部の組織が蒸散し、消失してしまう。炭酸ガスレーザーのこの作用を利用して、現在、外科領域における処置および治療に炭酸ガスレーザーが頻用されている。最近、歯科・口腔外科において、従来よりも低出力のパルス波炭酸ガスレーザーが、口腔粘膜の潰瘍あるいは炎症性病変などの表在性病変に対して使用され、良好な結果をもたらしている。このような低出力パルス波炭酸ガスレーザーは凝固モード炭酸ガスレーザーと呼ばれ、従来の高出力連続波炭酸ガスレーザーがもつばら組織の除去に用いられていたのとは異なり、凝固モード炭酸ガスレーザーは組織の凝固を作用の主体としている<sup>1)</sup>。これにより、炭酸ガスレーザーによる治療が組織損傷の少ない、より保存的なものとなり、歯科・口腔外科領域では口腔粘膜を含めた口腔軟組織疾患の治療に凝固モード炭酸ガスレーザーが高頻度で使用されるようになってきた<sup>2,3)</sup>。

現在、凝固モード炭酸ガスレーザーは歯科臨床において広く用いられているが、この種の炭酸ガスレーザーを照射された口腔周囲組織の変化、およびその治癒過程についての報告は少ない。それら報告は、凝固モードの炭酸ガスレーザー照射を受けたラット歯肉<sup>4)</sup>あるいはラット口蓋動脈<sup>5)</sup>の組織変化を、病理組織学的および免疫組織学的に検討している。凝固モードの炭酸ガスレーザーを照射したラット皮膚の組織変化についての報告<sup>6)</sup>では、照射後の組織変化は皮膚表面から760～1150  $\mu\text{m}$ の深さまでに生じていたと記載されていることから、舌粘膜あるいは頬粘膜に生じた病変の処置に凝固モード炭酸ガスレーザーを使用すると、それら粘膜の直下に位置する骨格筋組織にも、レーザー照射による組織変化が生じることが考えられる。しかしながら、凝固モード炭酸ガスレーザー照射後の骨格筋における組織変化についての報告は現在までない。

熱ショックタンパク質(Hsp)は熱刺激など種々のストレスによって合成が促進されるタンパク質として当初同定されていたが<sup>7)</sup>、その後、Hspが

正常細胞において分子シャペロンとして機能することが明らかにされている<sup>8)</sup>。Hspはその分子量によりいくつかのファミリーに分類されている。それらHspの中で骨格筋細胞の防御反応と適応反応において重要な役割を果たしているのは、Hsp25およびHsp72であることが知られている<sup>9)</sup>。ヒトHsp27のhomologueであるラットHsp25はラット正常骨格筋において発現し<sup>10)</sup>、筋細胞に特異的な中間径フィラメントであるデスミンなどの細胞骨格タンパク質と結合していると考えられているが<sup>9)</sup>、レーザー照射後骨格筋におけるHsp25の発現状況は解明されていない。Hsp72およびHsp73はHsp70ファミリーを構成するHspであり、Hsp72は熱刺激に反応して速やかに合成されるが、Hsp73は刺激に対する応答性のない、構成的タンパク質であるとされる<sup>10)</sup>。レーザー照射を受けたラット歯周組織<sup>11)</sup>および皮膚<sup>6)</sup>におけるHsp72/73の局在が報告されているが、その発現状況を、レーザー照射を受けた骨格筋において明らかにした研究は現在までない。

以上のように、レーザー照射を受けた骨格筋の組織変化過程、およびレーザー照射後骨格筋におけるHspの発現状況はいずれも解明されていない。そこで、本研究では、ラット顎二腹筋に凝固モード炭酸ガスレーザー照射を行い、レーザー照射を受けた筋組織において、どのような組織反応および治癒過程が展開されるかを病理組織学的に検討し、また、レーザー照射部位におけるHspの発現状況を免疫組織化学的に解明した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物と実験装置

実験動物として6～7週齢体重200～250gの雄性Wistar系ラット(日本クレア)150頭を用いた。動物実験は奥羽大学動物実験規程に従い、動物実験委員会の承認を得て行った(許可番号:21年度第3号,22年度第28号,23年度第45号)。50mg/kgのバントバルビタールナトリウム(Nembutal<sup>®</sup>, ABOTT)腹腔内投与による麻酔下、剃毛後、両側の顎二腹筋前腹を剖出し、レーザー光を照射した(レーザー群)。

レーザー発振装置としてPanalasC05 $\Sigma$ <sup>®</sup>(パナ

ソニックデンタル)を使用した。照射は内径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5W、パルス幅0.6m秒、休止時間6m秒、パルス数151.5ppsの照射条件で行った<sup>4,12)</sup>。照射に際しては、両側顎二腹筋前腹中央部の2×3mmの範囲にコンタクトチップを20秒間走査させた。この照射による照射面エネルギー密度は5.1J/mm<sup>2</sup>と算出される。この照射により、筋組織表面に肉眼的な白濁が生じた。

対照として電気メス処置を行った。この処置には球形チップを用い、レーザー照射時と同様、顎二腹筋前腹中央部でチップを走査させて行った(電気メス群)。電気メス処置によって筋表面に変色が生じ、この変色域の大きさが、レーザー照射群における白濁域の大きさと同じとなるように、電気メスの出力は4Wに、チップの走査時間は5秒にそれぞれ設定した。

## 2. 標本作製

レーザー照射後または電気メス処置後0, 3, 6, 12時間, 1, 3, 5, 7, 10, 14日後, ペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下に、リン酸緩衝4%パラホルムアルデヒド(pH7.4)を大動脈起始部から注入して、灌流固定を行った後に両側顎二腹筋を採取した。採取後の試料には同様の固定液により4℃一晩の浸漬固定を行った。なお、灌流固定15分前に細胞増殖活性を検討するため、5-Bromo-2'-deoxyuridine (BrdU, SIGMA) 100mg/kgを腹腔内に投与した。固定終了後、通常によりアルコール脱水とパラフィン包埋を行い、厚さ4μmの連続切片を作製した。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後、以下の免疫組織化学的検索を行った。

表1 使用抗体

抗体	希釈倍率	クローン	反応時間	製造会社
マウス抗ヒトデスミンモノクロナール抗体	1:100	D33	1時間	DAKO JAPAN
ヤギ抗マウスHsp25ポリクロナール抗体	1:400	—	1時間	Santa Cruz Biotechnology
マウス抗ヒトHsp72/73モノクロナール抗体	1:100	W27	1時間	Calbiochem
マウス抗BrdUモノクロナール抗体	1:30	Bu20a	20分	DAKO JAPAN

## 3. 免疫組織化学

表1に示した一次抗体を使用し、抗Hsp25抗体にはLSAB法を、その他の一次抗体には高分子ポリマー間接法を適用した<sup>13)</sup>。キシレンによる脱パラフィンを行ってから、BrdU染色のための切片を4N HClに浸漬してDNAを単鎖化した<sup>14)</sup>。脱パラフィン後あるいはDNAの単鎖化後にすべての切片を0.3%過酸化水素水添加リン酸緩衝生理食塩水(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。その後、Hsp25染色では抗体の非特異的反応を防止するために切片と正常ロバ血清を室温で20分反応させた。一次抗体の反応は室温で表1に示す時間にて行った。Hsp25染色には二次抗体として、ビオチン標識抗ヤギIgG(1:100, Chemicon)を室温で30分反応させ、さらに、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ニチレイバイオサイエンス)を室温で10分反応させた。Hsp25以外の染色には二次抗体として、ペルオキシダーゼ標識アミノ酸ポリマーを結合した抗マウス抗体(ニチレイバイオサイエンス)を室温で30分間反応させた。ペルオキシダーゼはDABキット(ニチレイバイオサイエンス)にて発色させ、核染色はヘマトキシリンで行った。なお、一次抗体に換えてPBSで反応を行った切片を陰性対照とした。

## 結果

### 1. 病理組織学的所見

レーザー照射直後、照射部位には筋表面を底面とした半球状を呈する壊死巣が形成され、壊死巣表層は軽度膨隆していた。壊死巣辺縁部の壊死筋線維は好酸性硝子様を呈し、それら硝子様壊死筋線維領域が壊死巣を縁取るのが観察された。壊死巣内部の筋線維には空胞化がみられ、横紋は不明瞭となっていたが、筋細胞の核は認められた(図1a, b)。照射後3時間から12時間では、壊死巣辺縁部において、壊死筋線維は断裂し、断裂によって生じた間隙および壊死筋線維間隙は水腫により開大して、同部には好中球が浸潤していた(図1c, d)。壊死巣内部では壊死筋線維の核は消失していたが、好中球浸潤は認められなかった。

照射1日後においては、壊死巣辺縁部では好中

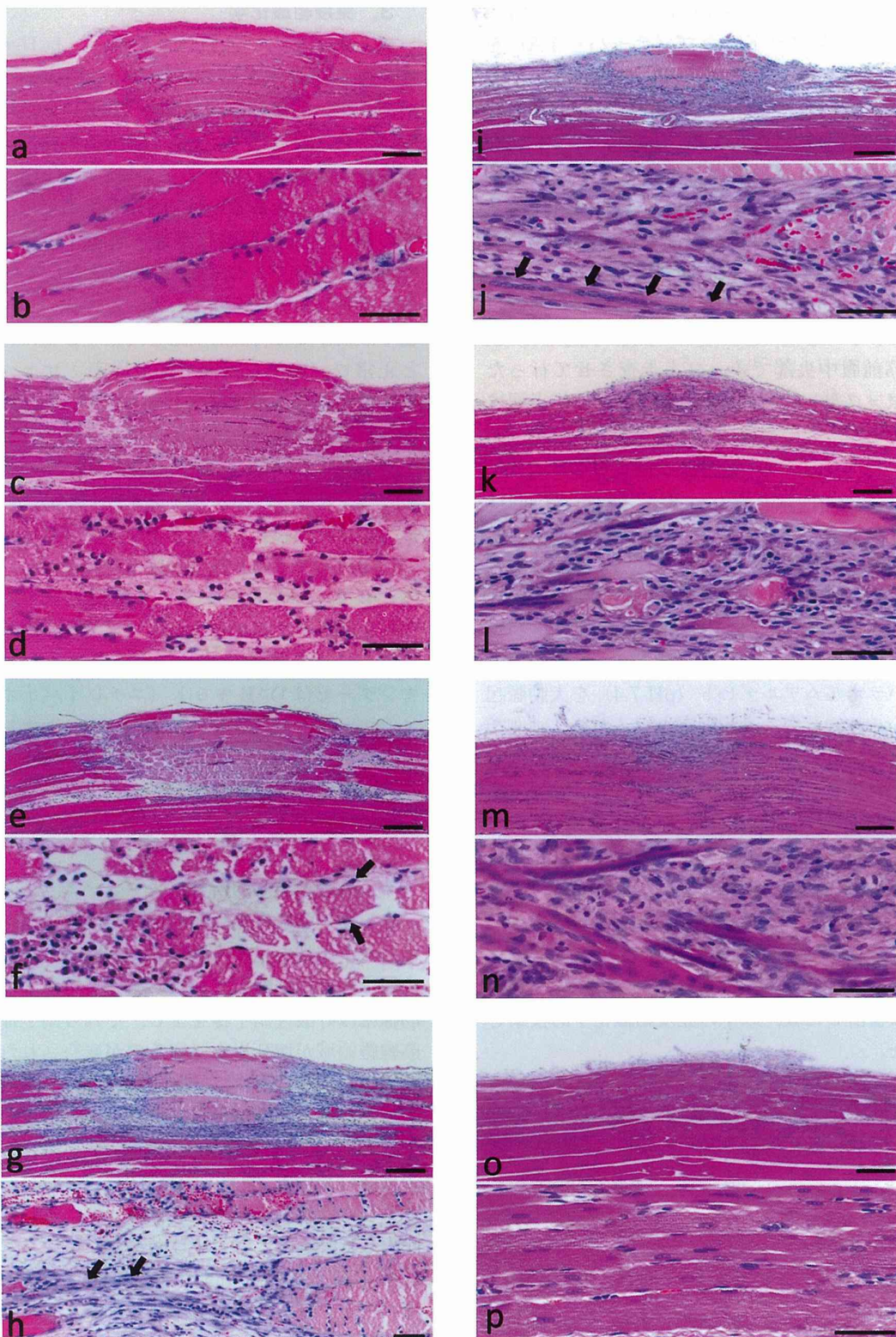


図1 凝固モード炭酸ガスレーザー照射による顎二腹筋組織の変化，H-E染色

- a, b: 照射後0時間。硝子様壊死筋線維で縁取りされた半球状の壊死巣が形成され、壊死巣は軽度膨隆し(a)、壊死筋線維表面には細胞核がみられる(b)。
  - c, d: 照射後6時間。壊死巣辺縁部の筋線維は断裂し(c)、同部には好中球が浸潤している(d)。
  - e, f: 照射後1日。壊死巣は軽度縮小し(e)、壊死巣辺縁部では生細胞(矢印)が認められる(f)。
  - g, h: 照射後3日。壊死巣を置換する肉芽組織がみられ(g)、肉芽組織内では正常筋線維に連なる、紡錘形細胞の束状配列(矢印)が観察される(h)。
  - i, j: 照射後5日。壊死巣の器質化が進み(i)、壊死筋線維間には多数の紡錘形細胞が認められ、壊死巣周囲では筋管細胞(矢印)が出現している(j)。
  - k, l: 照射後7日。壊死筋線維は少量となり(k)、肉芽組織内には多核を有する再生筋線維がみられる(l)。
  - m, n: 照射後10日。壊死筋線維は消失し(m)、壊死組織を置換した肉芽組織では太い再生筋線維が不規則な走行を示す(n)。
  - o, p: 照射後14日。レーザー創は再生筋線維で置換され(o)、再生筋線維には横紋がみられる(p)。
- スケールバー：a, c, e, g, i, k, m, o=500  $\mu$ m,  
b, d, f, h, j, l, n, p=100  $\mu$ m

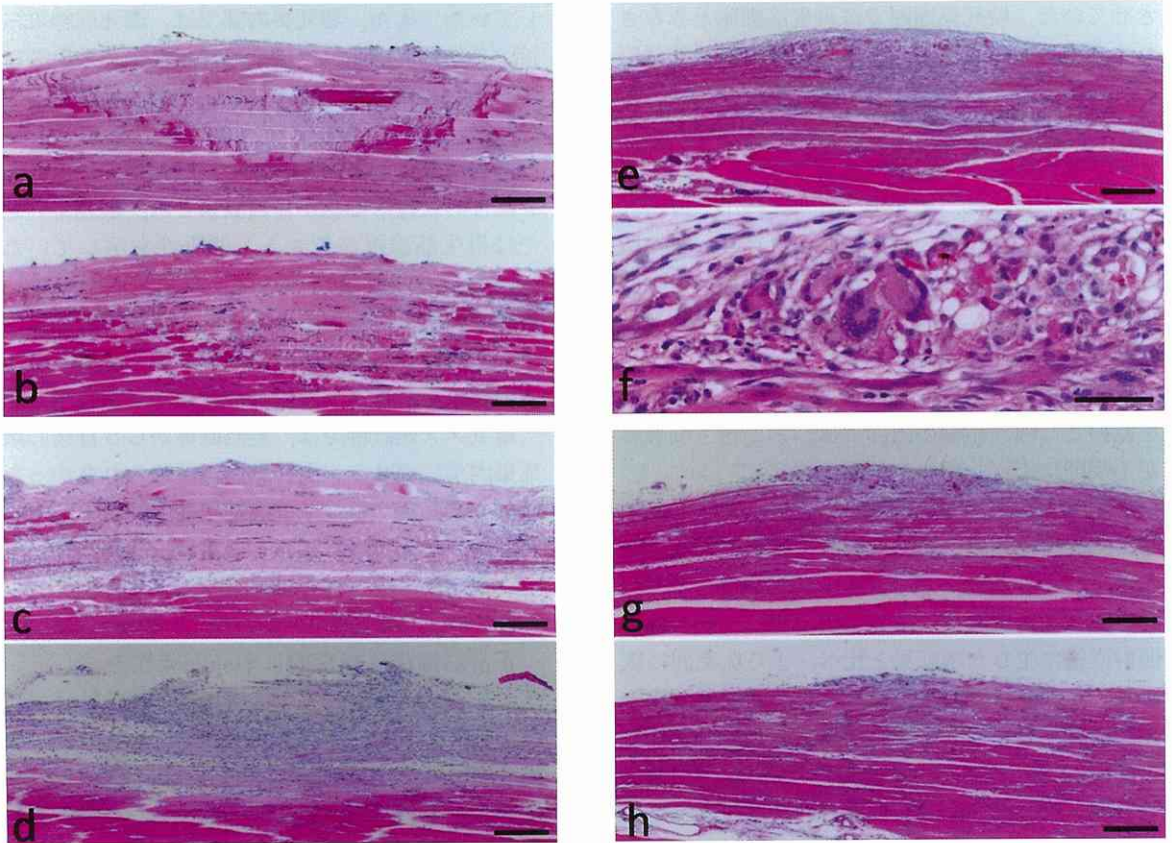


図2 電気メス処置による顎二腹筋組織の変化，H-E染色

- a: 処置後0時間，b: 処置後6時間，c: 処置後1日。壊死巣の広がりレーザー創と比べ大きく、壊死巣と周囲組織との境界は不明瞭である。
  - d: 処置後5日。壊死巣周囲に肉芽組織がみられる。
  - e, f: 処置後7日。電気メス創の表層には異物肉芽組織が形成され(e)、そこには多核巨細胞が観察される(f)。
  - g: 処置後10日，h: 処置後14日。異物肉芽組織は時間の経過とともに縮小するが、14日後でも残存している。
- スケールバー：a~e, g, h=500  $\mu$ m  
f=100  $\mu$ m

球浸潤が観察されたが、壊死巣内部には好中球の浸潤はなく、同部の壊死筋線維間には生細胞が散在性に出現し、それら生細胞の一部は紡錘形の形態を示していた(図1e, f)。

照射3日後では、壊死巣周囲において、断裂した壊死筋線維と置き換わる肉芽組織が観察され、同部には正常筋線維に連なる、長紡錘形細胞の束状配列が観察された。また、壊死巣内部における生細胞の個数は照射1日後と比べ増加し、壊死筋線維間隙のみならず、壊死筋線維内に生じた亀裂においても生細胞が認められた(図1g, h)。

照射5日後になると、壊死巣の大きさが減少する一方、壊死巣内の生細胞はその分布密度を上昇させていた。壊死巣周囲では再生筋細胞とみなされる細胞は太さを増し、それらの多くが長紡錘形の形態をとっていた。また、壊死巣周囲では、多数の核が筋線維の中央部に数珠状に配列した筋管細胞が認められた(図1i, j)。

照射後7日では、壊死巣はさらに縮小し、壊死筋線維間には多数の紡錘形細胞が存在し、また壊死巣周囲の肉芽組織には多核を有する太い再生筋線維がみられた。それら筋線維の一部は、複数の細胞核を筋線維の周縁部に有していた(図1k, l)。

照射後10日、壊死筋線維は消失し、壊死組織を置換した肉芽組織の内部では、太い再生筋線維が不規則に走行していた(図1m, n)。

照射後14日では、肉芽組織はすべて再生筋線維で置き換えられ、再生筋線維には横紋が観察された(図1o, p)。

電気メス処置直後に生じた壊死巣は、レーザー照射直後に生じた壊死巣と比べ、より広範囲に広がり、レーザー照射後にみられた、硝子様筋線維領域が壊死巣を縁取る所見は観察されず、壊死巣と周囲組織との境界は不明瞭であった(図2a)。電気メス処置後3時間から5日の病理組織所見は、同時期のレーザー照射群の病理組織所見とほぼ同様であった(図2b~d)。しかしながら、処置後7日では、多核巨細胞を伴った異物肉芽組織が、レーザー巣の表面を覆って存在していた(図2e, f)。この異物肉芽組織は処置後10日には大きさを減じていたが、処置14日後においても残存していた(図2g, h)。

## 2. 免疫組織化学的所見

すべての免疫染色において、陰性対照切片には陽性反応が全く認められなかった。

### 1) デスミンの発現

レーザー照射直後に壊死筋線維のデスミン染色性は消失し、その後のいずれの時点においても、壊死筋線維はデスミン陰性であった(図3a~e)。

照射後1日の壊死巣辺縁部では、デスミン陽性の紡錘形単核細胞が壊死筋線維間に少数認められた(図3b)。照射後3日、壊死巣周囲の肉芽組織において、束状に配列する長紡錘形細胞がデスミン強陽性を示し、それらデスミン陽性細胞は壊死筋線維と正常筋線維とをつなぐように束状配列していた。また、壊死巣内部では、壊死筋線維に接する紡錘形細胞と、壊死筋線維に生じた亀裂に侵入した細胞とに強い陽性反応が観察された(図3c, d)。

照射後5日および7日では、壊死巣内にデスミン陽性の紡錘形細胞が多数観察され、壊死巣周囲では再生筋線維がデスミン強陽性を示していた(図3e)。照射後10日には、肉芽組織内の太い再生筋線維に陽性反応がみられ、また肉芽組織内では、樹枝状あるいは紡錘形の繊細な胞体を有する細胞にもデスミンの局在が認められた(図3f)。

電気メス処置群では、処置直後から5日後の壊死巣内部にデスミン陽性細胞は認められなかった。電気メス処置7日後では肉芽組織内の再生筋線維がデスミン強陽性を示すとともに、異物肉芽組織内にはデスミン陽性の不定形物がみられた(図3g)。

### 2) Hsp25の発現

正常筋線維は恒常的にHsp25陽性を示していた。レーザー照射直後には壊死巣の染色性は失われ(図4a, b)、その後のいずれの時点でも、壊死筋線維におけるHsp25染色性の減弱(図4c, d)ないしHsp25染色性の消失(図4e)が観察された。レーザー照射後3時間~7日の壊死巣においてHsp25染色陽性の紡錘形単核細胞は認められず、照射3日後以降にみられた再生筋線維においてのみHsp25強陽性反応が観察された(図4a~f)。

電気メス処置直後から処置5日後までのHsp25染色所見は、同時期のレーザー照射群のHsp25染色所見とほぼ同様であった。なお、電気

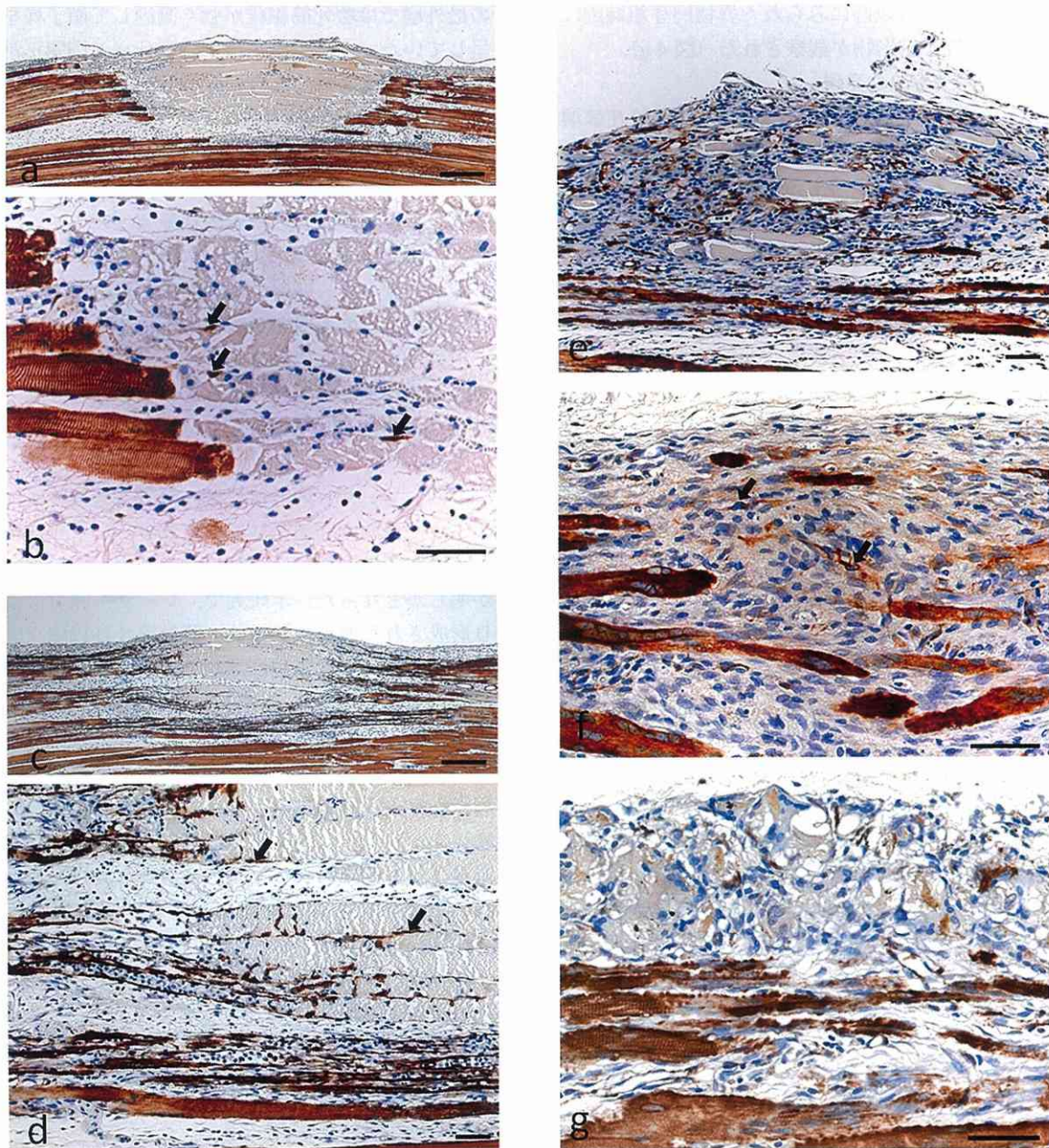


図3 デスミン免疫染色

- a, b: 照射後1日。レーザー創の壊死筋線維はデスミン陰性であるが、レーザー創辺縁部ではデスミン染色陽性の細胞(b,矢印)が少数みられる。
- c, d: 照射後3日。壊死巣周囲ではデスミン強陽性を示す紡錘形細胞が束状配列し、壊死巣内では壊死筋線維に接するデスミン陽性細胞 (d,矢印) がみられる。
- e: 照射後7日。壊死巣内では多数のデスミン陽性細胞が観察される。
- f: 照射後10日。肉芽組織内では、太い再生筋線維と紡錘形あるいは樹状で繊細な胞体を有する細胞(矢印)とがデスミン染色陽性を示す。
- g: 電気メス処置後7日。異物肉芽組織内にデスミン陽性不定形物がみられる。

スケールバー：a, c=500 μm

b, d~g=100 μm

メス処置7日後以降にみられた異物肉芽組織内にHsp25陽性不定形物が観察された(図4g)。

### 3) Hsp72/73の発現

レーザー照射群におけるHsp72/73の局在は壊死巣と正常組織との境界部において散在性に、かつ壊死巣を囲むように観察された(図5a)。Hsp72/73陽性を示していたのは紡錘形細胞と毛細血管内皮細胞であり、正常筋線維および壊死筋線維はいずれもHsp72/73陰性であった。Hsp72/73陽性反応は照射後3時間から観察され始め、陽性反応強度および陽性細胞数はいずれも照射後12時間から1日で極大となり、照射7日後以降にはHsp72/73発現は認められなかった。

電気メス処置後のHsp72/73陽性反応は、処置後12時間から3日においてのみ観察された。レーザー照射後と同様に、壊死巣と正常組織の境界部にHsp72/73の発現が観察されたが、レーザー照射後にみられたようなHsp72/73陽性細胞が壊死巣を取り囲む形態は明らかではなかった(図5b)。

### 4) BrdUの取り込み

レーザー照射群におけるBrdUの取り込みは、壊死巣周囲では照射後1日から10日まで観察され、壊死巣内では照射後3日から10日までみられた。両部位においてBrdU陽性核の個数は照射7日後と比べて照射10日後に減少していた。レーザー照射後のBrdU陽性反応は、正常筋線維に連なる長紡錘形細胞、肉芽組織内の紡錘形細胞および壊死筋線維に接する紡錘形細胞にみられた(図6a)。

電気メス処置群では処置後1日から5日の壊死巣周囲においてのみBrdUの取り込みが観察され、壊死巣内ではすべての観察時点においてBrdU陽性反応は認められなかった(図6b)。

## 考 察

本研究は、凝固モード炭酸ガスレーザー照射を受けた骨格筋組織における、組織変化および治癒過程を、電気メス処置後の骨格筋組織と比較しつつ、病理組織学および免疫組織学的に解明することを目的として行われた。凝固モード炭酸ガスレーザーをラット顎二腹筋に照射すると、照射直後に半球状の壊死組織が形成され、その壊死組織

の最外層では壊死筋線維が強く凝固して硝子様を呈していた。それら硝子様物は壊死巣と周囲正常組織と境界線をなすように配列して、壊死組織と周囲組織との境界は明瞭であった。これに対し、電気メス処置直後では壊死組織が、レーザー照射直後と比べ、より広範囲に広がり、また、壊死筋線維からなる硝子物の境界線状配列は明らかではなく、壊死組織と周囲組織との境界は不明瞭であった。レーザー照射により形成された壊死領域と周囲組織との境界が明瞭であることは、本研究で用いたパルス波炭酸ガスレーザーの特性である、切除範囲を正確に制御できるという事項が、筋肉組織においてもあてはまることを示しているとみなされる。

今回、レーザー照射後には、電気メス処置後にみられた異物肉芽組織は形成されず、レーザー創の治癒期間は、電気メス創のそれと比べ短いことが明らかとなった。本研究で、レーザー照射により形成された壊死筋線維は、照射後3日以降、肉芽組織により壊死巣辺縁部から器質化されつつ照射10日後には消失し、照射後14日では筋線維の再生が完了していた。この間、壊死筋線維に対する異物反応は軽度であって、壊死巣辺縁部で好中球浸潤がみられたのみであり、異物肉芽組織の形成はなかった。これに対し電気メス処置群では処置後7日から異物肉芽組織が観察され、レーザー創の治癒が終了した術後14日においても異物肉芽組織が残存していた。

レーザー照射を受けて壊死に陥った結合組織は、コラーゲン変性の明らかな表層領域とH-E染色では変化が明らかではない深層領域とに区別される<sup>9)</sup>。かつては、その表層壊死領域がレーザー創の治癒を遅らせる元凶とされてきた<sup>15,16)</sup>。しかしながら、本研究と同様の照射条件で凝固モード炭酸ガスレーザーを皮膚または歯肉に照射した報告があり<sup>4,6)</sup>、それらはレーザー照射によって壊死に陥った結合組織は治癒を阻害するものではなく、むしろレーザー創の保護に一定の役割を果たしていると述べている。本研究では、レーザー照射によって生じた壊死筋線維は照射後7日まで残存していたが、異物肉芽組織の形成は全観察期間を通じてみられなかった。このことから、レーザー照



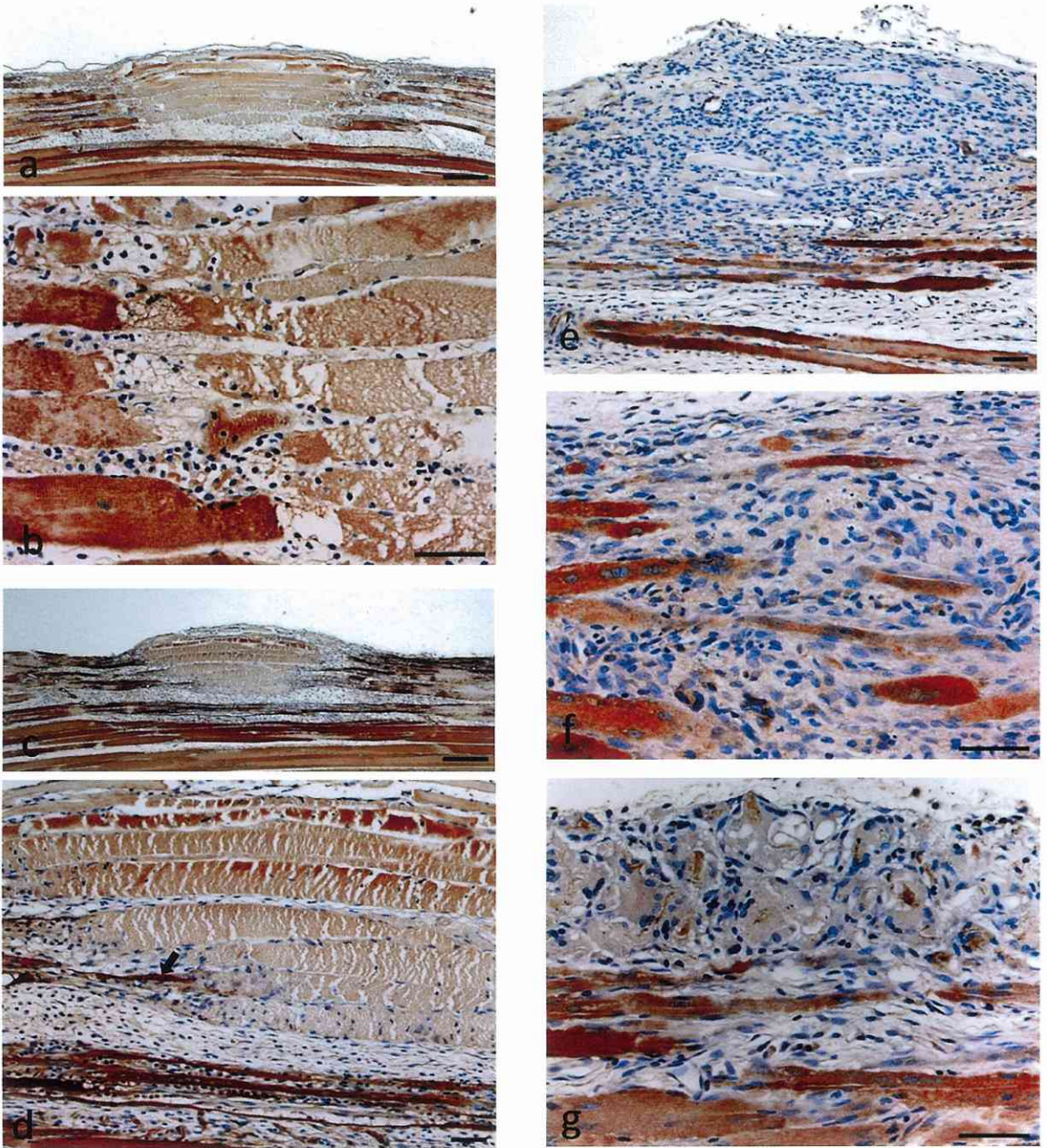


図4 Hsp25免疫染色

- a, b: 照射後1日。レーザー創の壊死筋線維はHsp25の染色性が減弱ないし消失している。
- c, d: 照射後3日。壊死巣周囲ではHsp25陽性を示す再生筋線維 (d, 矢印) がみられるが、壊死巣内ではHsp25陽性細胞は認められない。
- e: 照射後7日, f: 照射後10日。壊死巣内(e)および肉芽組織内(f)のいずれにおいてもHsp25陽性の紡錘形細胞は観察されない。
- g: 電気メス処置後7日。異物肉芽組織内にHsp25陽性の不定形物がみられる。
- スケールバー: a, c=500  $\mu$ m  
b, d~g=100  $\mu$ m



図5 Hsp72/73染色

a: 照射後1日, b: 電気メス処置後1日。レーザー照射後には壊死巣の輪郭線上に配列するHsp72/73陽性反応 (a, 矢印: 紡錘形細胞, 矢頭印: 血管内皮細胞) がみられるが, 電気メス処置後の陽性反応 (b, 矢印) はそのような配列を示さない。

スケールバー: a, b=100  $\mu$ m

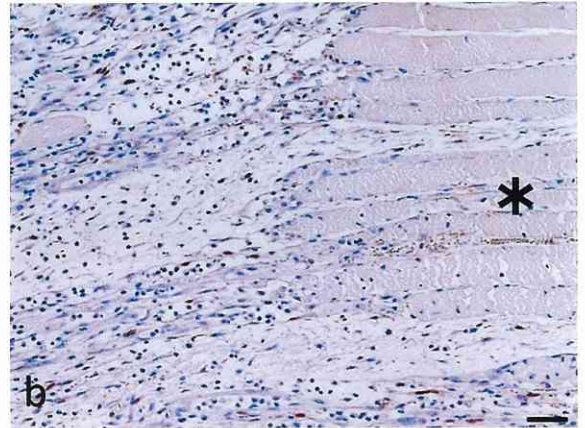
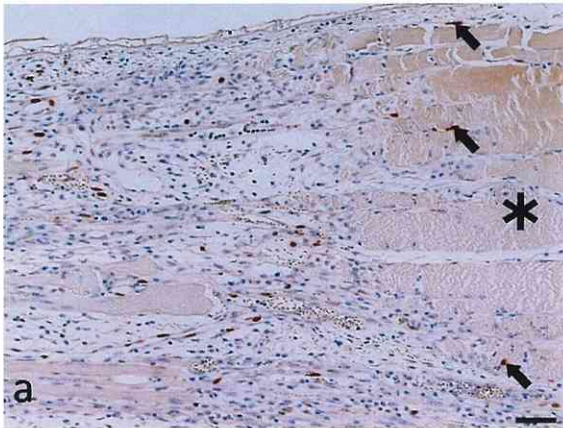


図6 BrdU染色

a: 照射後3日, b: 電気メス処置後3日。レーザー照射後には壊死巣内(\*)にBrdU陽性反応 (a, 矢印) がみられるが, 電気メス処置後の壊死巣内にはBrdU陽性反応が認められない。

スケールバー: a, b=100  $\mu$ m

射により生じた壊死筋組織は、異物として排除されるのではなく、レーザー照射により壊死に陥った結合組織と同様に、レーザー創の治癒を促進しているのではないかと推察がなされる。

今回の免疫染色では、レーザー照射によって生じた壊死巣と壊死巣を器質化する肉芽組織とにおいて、デスミン陽性の単核細胞が観察された。デスミンは筋細胞に特異的な中間径フィラメントであって、筋線維のZ帯に局在している<sup>17)</sup>。また、骨格筋の再生過程においては、サテライト細胞<sup>18)</sup>

およびサテライト細胞から分化した筋芽細胞<sup>9)</sup>に局在しているとされることから、レーザー照射後の壊死巣や肉芽組織にみられたデスミン陽性単核細胞はサテライト細胞または筋芽細胞であると考えられる。本研究では、電気メス群の壊死巣にはデスミン陽性細胞が認められず、レーザー群では壊死巣内すなわち壊死筋線維間にデスミン陽性単核細胞がみられ、壊死筋線維が消失した照射後10日の肉芽組織内にも樹枝状あるいは紡錘形のデスミン陽性細胞が観察された。このように、レー

レーザー群の壊死領域と電気メス群の壊死領域とでは、デスミン陽性細胞の出現状況が全く異なるという現象が今回確認された。また、免疫染色において、レーザー群と電気メス群とでは陽性細胞の出現状況が異なるという現象は、デスミン染色のみならず、BrdU染色でも観察された。すなわち、レーザー群ではBrdU陽性細胞が壊死巣周囲だけではなく、壊死巣内部でも認められたのに対し、電気メス群では壊死巣周囲においてのみBrdU陽性細胞が観察された。凝固モード炭酸ガスレーザー照射後組織におけるBrdUの取り込みについては、横手ら<sup>19)</sup>の報告があり、その報告は、手術用金属メス創におけるBrdU取り込み状況と比較して、レーザー照射後組織ではより多くのBrdU取り込みがみられたと述べている。筋の再生に際しては、筋線維に付着していたサテライト細胞の分裂と分化により生じた筋芽細胞がさらに分裂、分化し、その後に融合することにより筋管細胞が生ずるとされていることから<sup>20)</sup>、本研究のレーザー照射後に形成された壊死巣内および壊死巣周囲のBrdU陽性細胞はDNA合成中の、サテライト細胞あるいは筋芽細胞であるとみなすのが妥当と考えられる。ただし、それらBrdU陽性細胞の分化段階を明らかにするためには、BrdU陽性細胞においてサテライト細胞および筋芽細胞の分化マーカー<sup>20)</sup>を詳細に検討する必要がある。

本研究では、レーザー照射後に生じた壊死巣内に、デスミン陽性細胞とBrdU陽性細胞すなわち増殖サイクルに入っている細胞とが出現していたことは、先に記した、レーザー照射後壊死組織がレーザー創の治癒を促進するという現象が、レーザー照射後壊死筋組織においても生じていることを示していると推察される。また、この現象にはレーザー光の光生物学的活性化反応<sup>21)</sup>が関与していることも考えられる。

本研究では、レーザー照射を受けた筋組織におけるHsp25の局在状況を観察したところ、正常筋線維でみられたHsp25の局在が、レーザー照射後の壊死筋線維において消失し、その後に出現した再生筋線維は強いHsp25陽性反応を示していたのが確認された。これまでに、レーザー照射後の筋組織におけるHsp25については報告がな

く、凝固モード炭酸ガスレーザー照射を受けた歯根膜の線維芽細胞と毛細血管内皮細胞とにおけるHsp25局在を免疫組織化学的に観察した報告があり<sup>1)</sup>、その報告では、Hsp25が、レーザー照射後の組織修復の開始と進展に重要な役割を果たしているであろうとの推察がなされている。本研究ではHsp25の強陽性反応がレーザー照射後の再生筋線維でみられたが、サテライト細胞および筋芽細胞とみなされる細胞にはHsp25の局在は認められなかった。このことから、再生筋線維の分化がある程度進行すると、Hsp25がその再生筋線維において発現するとの推察がなされ、Hsp25発現は再生筋線維の分化段階を示す指標となりうる可能性も考えられる。

今回のHsp72/73免疫染色では、歯肉に本研究と同じレーザーを照射したYamasakiら<sup>4)</sup>の観察と同様に、レーザー創の輪郭線をなすHsp72/73陽性像が観察されている。この観察所見は、結合組織だけでなく、骨格筋組織においてもHsp70ファミリーの局在が壊死領域の輪郭線となりうることを示すものである。また、本研究のレーザー照射直後には、照射を受けた筋線維の表面に細胞核が認められたが、正常筋線維に豊富に存在する中間径フィラメントであるデスミンの局在は観察されなかった。Hsp70ファミリーの局在で輪郭された、レーザー照射による壊死巣に存在する細胞は、組織学的に正常の形態をとっていたとしても、実際は死に陥りつつある細胞であるということが電子顕微鏡観察で確認されており<sup>4)</sup>、今回、レーザー照射直後に観察された、デスミン陰性で細胞核を有している筋線維は、凝固モードレーザー照射によって生じた壊死細胞の特徴を示すものであると思われる。

本研究の免疫染色では正常筋線維にHsp72/73陽性反応は観察されなかった。レーザー照射後骨格筋におけるHsp70ファミリー発現についての研究や報告は見あたらず、運動負荷をかけた骨格筋におけるHsp72発現量の増加を確認した研究<sup>22)</sup>や、ラットの正常長指伸筋におけるHsp72発現量を測定した報告<sup>9)</sup>がある。しかしながら、本研究では正常筋線維においてHsp72/73は認められなかった。正常筋線維におけるHsp70ファミリー

の免疫組織学的局在状況については今後更なる検討が必要である。

## 結 論

凝固モード炭酸ガスレーザーを照射された骨格筋における組織変化を解明するために、ラット頸二腹筋に凝固モード炭酸ガスレーザーを照射し、その後の組織変化を病理組織学的ならびに免疫組織学的に観察、検討して、以下の結果を得た。

1. 処置直後、レーザー群の壊死組織と周囲組織との境界は明瞭であったが、電気メス群では壊死組織と周囲組織との境界は不明瞭であった。

2. レーザー創では異物反応はほとんど認められず、レーザー照射後14日でレーザー創の治癒が完了していたが、電気メス創では処置後7日以降に異物肉芽組織が観察され、電気メス処置後14日でも異物肉芽組織が残存していた。

3. レーザー群では、壊死巣内および肉芽組織にデスミン陽性細胞とBrdU陽性細胞とがみられたが、電気メス群の壊死巣内および肉芽組織には、それら陽性細胞は認められなかった。

4. 本研究の骨格筋再生過程において、サテライト細胞あるいは筋芽細胞とみなされる細胞にはHsp25の発現は認められなかったが、再生筋線維においてはHsp25の発現が観察された。

5. レーザー群におけるHsp72/73の陽性反応は、壊死巣の輪郭線上に観察された。

以上の結果から、凝固モード炭酸ガスレーザー照射により骨格筋に生じたレーザー創の治癒期間は、骨格筋における電気メス創の治癒期間と比べ短いことが確認され、凝固モード炭酸ガスレーザー照射によって生じた壊死組織はレーザー創の治癒を促進していることが推察された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御懇篤な指導をしてくださいました本学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔病理学分野前教授、山崎(福岡)章先生に深謝いたします。また、同分野前助教、奥山(石坂)典子先生の多方面にわたる協力に感謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第52回奥羽大学歯学会(平成23年11月12日 郡山)にて発表した。

## 文 献

- 1) Yamasaki, A., Ito, H., Yusa, J., Sakurai, Y., Okuyama, N., Ozawa, R. : Expression of heat shock proteins, Hsp70 and Hsp25, in the rat gingiva after irradiation with a CO<sub>2</sub> laser in coagulation mode. *J. Periodontal Res.* **45** ; 323-330 2010.
- 2) 大浦教一：歯周外科処置の補助への応用. 歯科用炭酸ガスレーザーの臨床-技術編-(松本光吉編著) 第2版; 55-58 口腔保健協会 東京 2006.
- 3) 広江雄幸：術後疼痛の緩和および術後の開口障害の予防への応用. 歯科用炭酸ガスレーザーの臨床-技術編-(松本光吉編著) 第2版; 66-68 口腔保健協会 東京 2006.
- 4) Yamasaki, A., Tamamura, K., Sakurai, Y., Okuyama, N., Yusa, J., Ito, H. : Remodeling of the rat gingiva induced by CO<sub>2</sub> laser coagulation mode. *Lasers Surg. Med.* **40** ; 695-703 2008.
- 5) 櫻井裕子, 遊佐淳子, 奥山典子, 加藤美菜, 小澤 亮, 伊東博司：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. *奥羽大歯学誌* **37** ; 21-28 2010.
- 6) 玉村清治, 奥山(石坂)典子, 櫻井裕子, 伊東博司：炭酸ガスレーザー凝固モード照射に対する組織反応-照射条件が壊死範囲ならびに修復過程に及ぼす影響について-. *奥羽大歯学誌* **38** ; 9-19 2011.
- 7) Tissibres, A., Mitchell, H. K., Tracy, U. : Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* : relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84** ; 389-398 1974.
- 8) 由良 隆：ストレス応答研究の歴史. ストレス蛋白質(永田和宏編); 1-9 中外医学社 東京 1994.
- 9) Larkins, N. T., Murphy, R. M., Lamb, G. D. : Absolute amounts and diffusibility of HSP72, HSP25 and  $\alpha$ B-crystallin in fast- and slow-twitch skeletal muscle fibers of rat. *Am. J. Cell Physiol.* (in press, Epub ahead of print)
- 10) Liu, Y., Steinacker, J. M. : Changes in skeletal muscle heat shock proteins : pathological significance. *Front. Biosci.* **6** ; D12-25 2001.
- 11) Welch, W. J. : Mammalian stress response : cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol. Rev.* **72** ; 1063-1081 1992.
- 12) 園田正人, 山崎 章：ラット口蓋粘膜における炭酸ガスレーザーパルス波照射後の治癒過程. *奥羽大歯学誌* **35** ; 95-104 2008.
- 13) 和泉伸一, 伊藤 仁, 梅村しのぶ, 長村義之, 鴨志田伸吾, 川井健司, 芹澤昭彦, 堤 寛, 名倉 宏：5. 超高感度法. 渡辺・中根 酵素抗体法(名倉 宏, 長村義之, 堤 寛編)改訂四版;

- 147-150 学際企画 東京 2002.
- 14) 横手優介, 伊東博司, 山崎 章: 炭酸ガスレーザーパルス波照射に対するラット口腔粘膜の組織変化. *口科誌* **56**; 341-349 2007.
- 15) Luomanen, M., Meurman, J. H., Lehto, V. P.: Extracellular matrix in healing CO<sub>2</sub> laser incision wound. *J. Oral Pathol.* **16**; 322-331 1987.
- 16) Hobbs, E. R., Bailin, P. L., Wheeland, R. G., Ratz, J. L.: Superpulsed lasers: minimizing thermal damage with short duration, high irradiance pulses. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **13**; 955-964 1987.
- 17) Folpe, A. L., Gown, A. M.: Desmin. In *Enzinger and Weiss's Soft tissue tumors*. (Ed., Weiss, S. W., Goldblum, J. R.) 5th ed.; 137-138 MOSBY Philadelphia 2008.
- 18) Boldrin, L., Muntoni, F., Morgan, J. E.: Are human and mouse satellite cells really the same? *J. Histochem. Cytochem.* **58**; 941-955 2010.
- 19) 藤田尚男, 藤田恒夫: 骨格筋の発生, 成長, 再生. *標準組織学 総論* 第4版; 257-261 医学書院 東京 2002.
- 20) Yablonka-Reuveni, Z., Day, K., Vine, A., Shefer, G.: Defining the transcriptional signature of skeletal muscle stem cells. *J. Anim. Sci.* **86**: E207-E216 2008.
- 21) 大城俊夫: 痛みに対する低反応レベルレーザー療法と応用に関する再考. *日レ医学誌* **9**; 33 1988.
- 22) 内藤久士, 小林裕幸, 内田桂吉, 大森大二郎, 千葉百子, 山倉文幸, 米田継武: 持久的トレーニングが若齢および老齢ラット骨格筋の熱ショックタンパク質の発現に及ぼす影響. *順天堂医学* **46**; 203-210 2000.

著者への連絡先: 加藤美菜, (〒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  
 Reprint: Mina KATO, Division of Oral Pathology, Department of Oral Medical Sciences, Ohu University School of Dentistry  
 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan