低出力炭酸ガスレーザーによる接合皮膚の創傷治療

古内 泰生・藤田 靖・篠木 邦彦・亀井 達哉

Wound healing of low-output CO₂ laser adhesion skin

Yasuo FURUUCHI・Yasushi FUJITA・Kunihiko SHINOKI
Tatsuya KAMEI

Abstract: The following experiments were performed to examine the effect of low-output CO₂ laser on wound healing process.

Two wounds, incised 2 cm in length, were created on the back of rat. One of the wounds was sutured for control group, the other was closed by irradiation of low-output CO₂ laser.

Hydroxyproline contents were spectrophotometrically determined by Edwards' method, and water contents were estimated at the same time.

Histological findings were obtained after staining with hematoxylin and eosin.

The results were as follows.

On the first day after 200 mW irradiation, degenerated layer of tissue and inflammatory response on the surface of wound were observed.

On the first day after suture, necrosis and inflammatory response were found.

Until 7 experimental days, hydroxyproline contents showed a higher level in irradiated group than in control group.

Water contents of two groups varied near the same way.

There were few differences in histological findings between irradiated group and control group.

In the incised wound, heat stimulation by laser irradiation promoted collagen synthesis and hastened healing.

Key words: low-output CO₂ laser, wound healing, skin adhesion

緒 言

1960年, Maiman¹⁾ がルビー結晶にキセノンランプの光を当てて赤色光の発振に成功して以来, レーザーの研究開発は目覚ましく, あらゆる分野において幅広く利用されるようになった. 医学領域においても, レーザーのもつ高エネルギーによる熱作用, ならびにその発振波長と生体の組織吸収率との相互関係から生ずる選択的吸収

性の相違を利用した応用がなされている.

炭酸ガスレーザーはその特性からこれまでは主に高出力での応用がなされてきたが, われわれは低出力炭酸ガスレーザー装置を試作して, その応用について検討を重ねてきた. 古内²⁾ は, ラットの背部に作成した皮膚全層切除創に毎日低出力の炭酸ガスレーザーを照射したところ, 出力密度 100~200 mW/cm² の時に非照射の対照群に比べて創面積の縮小率が大きくなり, 創部のコラーゲン合成が促進されたことを報告した. また, 藤田ら^{3,4)} は, 試作した低出力炭酸ガスレーザー装置を用いてラットの皮膚を接合したところ, その抗張力は縫合群よりも強くなり, また血管吻合に用いたところ, 手術時間の短縮・血管の開存率の向上がみられた, などの良好な成績を得た. しかし, その機序について明確な説明はなされていない.

東北大学歯学部第1口腔外科学教室
(指導: 林 進武前教授)
First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Faculty of Dentistry, Tohoku University (Director: ex-Prof. Susumu Hayashi)
受付日: 昭和61年11月25日

そこで今回著者は、藤田らの実験を基礎として、低出力炭酸ガスレーザーによって接合した皮膚の治癒過程について、ハイドロキシプロリン量を測定することにより生化学的な検索を行い、あわせてその組織学的な変化についても検討を加えたところ、興味ある知見を得たので以下に報告する。

レーザー装置

使用したレーザー装置は、持田製薬社製メディレーザー S・MEL 442 型を低出力/高出力切替型に改良したものである。本機は、発振波長 $10.6\ \mu\text{m}$ 、レンズ焦点 $75\ \text{mm}$ 、焦点径 $0.15\ \text{mm}$ で、出力は連続的に調節でき、低出力時の最大出力はハンドピース先端で $1.5\ \text{W}$ 、高出力時の最大出力は同じく $65\ \text{W}$ である。

実験動物

実験に使用した動物は、13～15週齡、体重 $200\sim 250\ \text{g}$ の雄のウィスター系ラット（船橋農場）で、実験期間中はオリエンタル固型飼料 F-2 で飼育し、水は自由に与えた。

なお、ラットには実験の全期間を通じて、創の作成・接合時の麻酔以外何らの薬物も与えていない。また、創面には被覆・包帯等をせず、むき出しのまま飼育した。

実験方法

1) 創の作成、レーザー照射法と試料の採取

Pentobarbital $25\ \text{mg/kg}$ を腹腔内に注射して麻酔したラットの背部を剃毛した後に、鋼刃メスを用いて、図1のごとく長さ $2\ \text{cm}$ の皮膚全層切開創を左右に2か所作成した。右側の切開創は、藤田ら³⁾の抗張力試験の結果、最も成績が良好であった $200\ \text{mW}$ の出力で、創に沿ってレーザーを照射して接合した。左側の切開創は、絹糸にて約 $5\ \text{mm}$ 間隔で3針縫合して対照とした。

創接合後、12時間・24時間・3日・5日・7日目および14日目に、切開線をはさんで約 $2\ \text{mm}\times 15\ \text{mm}$ の大きさの皮膚を採取してハイドロキシプロリン定量のための試料とし、また一部は組織学的検索のための試料とした。

本実験に用いたラットは、各群7～10匹ずつ、総数47匹であった。

2) 含有水分量の測定およびハイドロキシプロリンの定量

採取した試料は鋭利なカミソリで細切した後に湿重量を測定し、真空凍結乾燥機（東京理化学器械製モデル FD-1）にて -50°C 、到達真空度 $6.7\times 10^{-2}\ \text{Pa}$ ($5\times 10^{-4}\ \text{Torr}$) で、12時間凍結乾燥した。乾燥後の重量を測定し

図1 ラット背部皮膚の全層切開創
右側：レーザー照射，左側：縫合

て乾燥重量とし、これと湿重量とから試料中の水分含有量を求めた。凍結乾燥した試料は -80°C にて保存し、Edwards ら⁵⁾の方法に準じてハイドロキシプロリンを定量した。

試料をバイレックスチューブ ($24\times 130\ \text{m/m}$) に入れ、 $6\ \text{N}$ 塩酸を湿重量 $10\ \text{mg}$ あたり $1\ \text{ml}$ 添加して密栓し、電気定温乾燥機中で 110°C 、24時間加水分解したものを、そのまま東京理化学器械製ミニベーパー（モデル S-3）に装着して、 60°C で塩酸を吸引除去した。このようにして得られた試料にリン酸緩衝液 ($\text{pH } 6.5$) を添加して溶解させ、適性濃度（約 $2\ \mu\text{g Hyp/ml}$ ）に調整して、ハイ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 $3\ \text{ml}$ に $0.05\ \text{M}$ クロラミンT試薬 $1.5\ \text{ml}$ を加えて室温で $20\sim 25$ 分酸化させ、アルデヒド過塩素酸試薬 $1.5\ \text{ml}$ を加えて、 60°C 15分間加熱発色させた後、分光光度計（HITACHI モデル 101）を用いて $550\ \text{nm}$ にて比色定量した。別にハイドロキシプロリンの標準試薬を用意し、試料と同様の処理をして標準曲線を作成した。

3) 組織標本の作成

採取した創部の組織を 10% 中性ホルマリン液にて固定後、通法に従ってパラフィンに包埋し、厚さ $4\ \mu$ の切片標本を作成、ヘマトキシリン-エオジン染色をほどこして、創の治癒過程を組織学的に検索し、対照と比較した。

実験結果

1) 皮膚接合部の肉眼的所見

レーザー照射群では、創接合直後の炎症性反応は軽度で、創表面に熱による凝固がみられ(写真1)、時間の経過とともに表皮部分は痂皮を形成したが、7日後には脱落した。これに対して対照群では、創接合直後から3日後まで炎症性の反応が強くみられ、接合部に痂皮を形成したが、やはり7日後までに脱落した。14日後には、レーザー照射群と対照群間の肉眼的な創の治癒過程に差

写真 1 創接合24時間後の肉眼的所見

レーザー照射によって接合した創の表面には、組織の変性と炎症性の反応が認められる。縫合によって接合した創の炎症性反応はより強度である。

はみられなかった。
2) 含有水分量の変化
切開創接合部の含有水分量の経日的変化を表1、図2に示す。

レーザー照射群では、術後12時間目に66.3%±1.52%であるのが、24時間後には63.1%±1.61%に減少し、以後3日後には67.8%±2.03%に増加し、5日後の69.8%±0.94%、7日後の70.6%±1.64%と漸増した。一方、対照群においても似たような傾向を示し、12時間後には66.0%±1.52%であるのが、24時間後には64.3%±1.60%と減少し、以後3日目には70.0%±0.88%、5日後には69.5%±1.31%、7日後には71.3%±1.50%と増加を示した。14日間にはレーザー照射群と対照群の値は逆転したが、7日後までは、有意差は認められないもののほぼ平行した値をとり、レーザー照射群よりも対照群で含

図 2 含有水分量の変化

表 1 含有水分量の変化 (%)

術 後 日 数		1/2	1	3	5	7	14
レーザー照射群	M	66.3	63.1	67.8	69.8	70.6	69.1#
	SD	1.52	1.61	2.03	0.94	1.64	1.51
対 照 群	M	66.0	64.3	70.0	69.5	71.3	66.2
	SD	1.52	1.60	0.88	1.31	1.50	1.38

P<0.005

表 2 ハイドロキシプロリン量の変化 (g/100 g tissue)

術 後 日 数		1/2	1	3	5	7	14
レーザー照射群	M	3.06	3.33§	2.74*	2.83	2.61§	2.69#
	SD	0.24	0.22	0.21	0.24	0.14	0.12
対 照 群	M	2.95	3.13	2.52	2.70	2.37	2.98
	SD	0.24	0.12	0.11	0.17	0.11	0.05

* P<0.05, § P<0.025, # P<0.005

図3 ハイドロキシプロリン量の変化

写真2 レーザー照射群, 24時間後
(H-E 染色, $\times 16$)
創の表面に組織の融解がみられる。

写真3 対照群, 24時間後
(H-E 染色, $\times 16$)
創の表面は凝血で覆われている。

写真4 レーザー照射群, 7日後
(H-E 染色, $\times 16$)

有水分量が多い傾向をみせた。

3) ハイドロキシプロリン量の変化

切開創接合部のハイドロキシプロリン量の経日的変化を表2, 図3に示す。

レーザー照射群では, 術後12時間目に $3.06 \text{ g} \pm 0.24 \text{ g}$ であるのが, 24時間後には $3.33 \text{ g} \pm 0.22 \text{ g}$ と最高値を示した後, 3日後には $2.74 \text{ g} \pm 0.21 \text{ g}$ まで急激に減少し, 7日後には $2.61 \text{ g} \pm 0.14 \text{ g}$ となった。一方対照群では, 術後12時間目に $2.95 \text{ g} \pm 0.24 \text{ g}$ であるのが, 24時間後には $3.13 \text{ g} \pm 0.12 \text{ g}$ にまで増加し, 3日目には $2.52 \text{ g} \pm 0.11 \text{ g}$ と減少し, 7日目には $2.37 \text{ g} \pm 0.11 \text{ g}$ となった。レーザー照射群・対照群のとり値は, 14日目には逆転したが, 7日目まではほぼ平行した動きを示し, レーザー照射群の方が対照群よりも常に高い値を示した。スチューデントの t 分布検定の結果, 24時間, 3日, 7日, 14

日目にそれぞれ有意差が認められた。

4) 皮膚接合部の組織学的所見

レーザー照射群では, 創の接合直後・24時間後の組織像は, 皮膚表面の照射部位に相当する組織が融解して無構造を呈している。また24時間後には, 接合部およびその周辺に炎症性細胞の浸潤が認められる(写真2)。

一方, 対照群の24時間後では, 創表面は凝血に覆われており, 接合部とその周辺にはやはり, 炎症性細胞の浸潤がみられる(写真3)。

写真 5 対照群, 7日後
(H-E 染色, $\times 16$)

しかし, 7日後になると両群ともに上皮が再生され, 接合部には未熟なコラーゲンの層がみられるようになるが, 両群の治癒過程には大きな差は認められない(写真4, 5)。14日後になると, 両群ともに新生上皮は薄くなり, 瘢痕が形成された。

考 察

鋭利な切開創に対して, 創部の組織を周囲組織も含めて採取し, そこに含まれるハイドロキシプロリンを定量して, その創傷治癒過程について分析した報告例は比較的多い。大管⁶⁾は, ラットの背部に筋膜直上に達する切開創を作成して縫合し, 創を中央にはさんだ幅1cmの皮膚片を試料としてハイドロキシプロリンの定量を行った。その結果, 縫合群では創作成後3日目までハイドロキシプロリン量は増加し, 5～7日目にかけて減少して以後平坦化する傾向がみられた。また Adamsons⁷⁾は, モルモットに作成した切開創のハイドロキシプロリンを測定した結果, 創の中央部では6日目から9日目にかけて増加してピークに達し, 15日目から低下し始めたとして述べている。また橋本⁸⁾は, 家兎の口唇を縫合して, その創を中央にして両側1mmの組織を切除して試料とし, ハイドロキシプロリンの定量を行った。その結果, 創傷部分のハイドロキシプロリンは創作成後1か月まで増加を続け, 以後平坦化したと述べている。

藤田ら⁹⁾は, ラット背部皮膚に全層切開創を作成して, 一方を炭酸ガスレーザー照射により接着し, 他方を縫合して対照群として創の抗張力を測定した。その結果, レーザー照射群では接合直後から抗張力を示し, 7

日目には200mW照射群で765gに達するのに対して, 対照群では接合直後は測定不能で, 7日目には420gと明らかにレーザー照射群の方が強い抗張力を示した。しかし14日目になると, 対照群の抗張力も増加して両群間の差は少なくなるが, レーザー照射群のうち100mW以上の照射群では対照群よりも高い抗張力を示し, 特に200mW照射群では, 対照群の1,545gに対して1,900gと全期間を通じてレーザー照射群では対照群に比べて高い抗張力を示したと述べている。そして, 創接合の初期にレーザー照射群の抗張力が対照群に比べて増加した原因は, 炭酸ガスレーザーの熱によって表面の組織が融解して生体組織接着剤として働いたためであろうと述べている。生体組織接着剤としては, 久保ら⁹⁾がフィブリン接着剤を皮膚接合に用いて, 切開創の治癒過程について縫合群と比較した実験を行っている。その結果, 強い張力が作用しない部位であれば, 創の哆開も認められず十分に創閉鎖の目的は達せられるが, その治癒過程は縫合群と変わりはないと述べている。

しかし, レーザー照射群のハイドロキシプロリン量が対照群に比べて常に高い値をとってほぼ平行した動きを示し, 有意差が認められたことから考えると, 炭酸ガスレーザーは単なる生体組織接着剤として作用したのではなく, レーザー照射の刺激によってコラーゲン合成のいずれかの段階が早まって, 治癒機転が縫合群よりも早期に開始されたために, 抗張力が増加したものと考えられる。また, 水分含有量は術後24時間目にレーザー照射群・対照群ともに急激に減少している。これはこの時期の創傷部位の細胞成分が増加し, 間接的に線維芽細胞の増殖・遊走によってコラーゲンが増加したことを示していると思われる。術後24時間目の組織像からもそのことはうかがわれる。

一方, Arレーザーを用いた Kana ら¹⁰⁾の実験によると, 10J/cm² 毎日照射によってコラーゲン合成が著しく促進され, 同一ラットの照射創と非照射創の両方の瘢痕組織でハイドロキシプロリンが増加したと述べている。また, Bosatra ら¹¹⁾が *in vitro* で He-Ne レーザーを線維芽細胞に照射した実験では, ミトコンドリア・ゴルジ装置などが増加してタンパク合成が促進され, 線維芽細胞から多量の線維が分泌されたとして述べている。また Brunner ら¹²⁾によると, He-Ne レーザー照射によってレーザー照射群の肉芽組織の重量が対照群に比べて10～25%増加したと述べている。これらはすべて低出力レーザーの光刺激効果についての報告であり, 他にも Mester^{13,14)}, Kovács¹⁵⁾, Yang Fu-Show ら¹⁶⁾が低出力レーザーの創傷治癒促進効果や免疫能を向上させる作用について論文を書いている。それに対して, この実験では創接合時に皮膚が受けるレーザーの熱的作用について, 直接定量的に測定することは不可能であったが, レーザー照射24時間後の組織像からも明らかのように, 皮

膚表面では熱によって表皮と真皮の上部が変性し、無構造を呈した。したがって、炭酸ガスレーザーが赤外線であるという特性上、線維芽細胞を活性化してコラーゲン合成を促進したのは、単なる光刺激効果によるとは考えにくい。

Ar レーザー・He-Ne レーザーなどのレーザー光は短波長の電磁波であり、これらの電磁波は大きな光子エネルギーで生体を構成する分子の結合に作用して高励起を与え、光化学効果を生じるのに対して、波長の長い電磁波である赤外線は、主に分子の振動を励起し、その結果、熱効果を生じるといわれている。炭酸ガスレーザーは波長 $10.6\ \mu\text{m}$ の赤外線であり、生体に入射した場合、熱効果が支配的であるといわれている¹⁷⁾。そして、古内²⁾が報告したように、炭酸ガスレーザーは低出力で用いた場合、その熱的な効果によって、創傷治癒の初期にコラーゲン合成を促進するような作用を有することが確認されている。また Finger ら¹⁸⁾は、家兎の眼の強膜に 43°C の熱を加えたところ、線維芽細胞が活性化されて $70\sim 150\ \text{nm}$ の新生コラーゲン線維が産生されたことを確認した。以上のことから、われわれの実験で接合した皮膚の抗張力が大きくなったのは、低出力炭酸ガスレーザーの熱的效果によって線維芽細胞が活性化され、新生コラーゲン線維の産生が促されて創傷治癒が促進されたことによるものと考えられた。

結 語

出力 $200\ \text{mW}/\text{cm}^2$ の炭酸ガスレーザーをラット背部皮膚の切開創に照射して接合し、その治癒過程について生化学的・組織学的な検索を行い、縫合した対照群と比較した。その結果、レーザー照射群のハイドロキシプロリン量は、7日目までは対照群に比べて常に高い値を示した。このことから第一次治癒創においては、レーザー照射の熱的刺激によって線維芽細胞が活性化されてコラーゲン合成のいずれかの段階が早まり、治癒機転が対照群よりも早期に開始されるものと考えられた。しかし、組織学的には著しい差は見出し得なかった。

本論文の要旨は、第40回日本口腔科学会総会（昭和61年5月、福岡）において発表した。

引用文献

- 1) Maiman, T.H.: Stimulated optical radiation in ruby. *Nature* 187: 493-494 1960.
- 2) 古内泰生: 低出力炭酸ガスレーザーの創傷治癒に与える影響に関する実験的研究——皮膚全層切除創の治癒過程に対する影響—— *日口外誌* 33: 53-65 1987.
- 3) 藤田 靖, 篠木邦彦, 他: Micro-Laser Surgery の応用に関する実験的研究. *日口外誌* 30: 1672-1677 1984.
- 4) 藤田 靖, 篠木邦彦, 他: Micro-Laser による微小血管吻合について. *形成外科* 28: 317-322 1985.
- 5) Edwards, C.A. and O'Brien, W.D.: Modified assay for determination of hydroxyproline in a tissue hydrolyzate. *Clinica Chimica Acta* 104: 161-167 1980.
- 6) 大菅志郎: ラット背部皮膚における創傷治癒の生化学的研究. *慶応医学* 52: 43-57 1975.
- 7) Adamsons, R.J., Musco, F., et al.: The chemical dimensions of a healing incision. *Surg Gyn Obst* 122: 515-521 1966.
- 8) 橋本 治: 口唇縫合創の治癒に関する実験的研究——瘢痕の引っ張り強さ, ハイドロキシプロリン定量, 組織所見について——. *日口外誌* 31: 417-431 1985.
- 9) 久保四郎, 山本悦秀, 他: フィブリン接着剤の口腔外科領域への応用に関する基礎的ならびに臨床的検討. 第1報・フィブリン接着剤のラット背部皮膚切創に対する創傷治癒効果. *日口外誌* 28: 1577-1584 1982.
- 10) Kana, J.S., Hutschenreiter, G., et al.: Effect of low-power density laser radiation on healing of open skin wounds in rats. *Arch Surg* 116: 293-296 1981.
- 11) Bosatra, M., Jucci, A., et al.: In vitro fibroblast and dermis fibroblast activation by laser irradiation at low energy. *Dermatologica* 168: 157-162 1984.
- 12) Brunner, R., Haina, D., et al.: Applications of laser light of low power density. Experimental and clinical investigations. *Curr Probl Derm* 15: 111-116 1986.
- 13) Mester, E., Toth, N., et al.: The biostimulative effect of laserbeam. *LASER-TOKYO* '81: 22-4-22-7 1981.
- 14) Mester, E., Spiry, T., et al.: Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg* 122: 532-535 1971.
- 15) Kovács, L., Varga, L., et al.: Experimental investigation of photostimulation effect of low energy He-Ne laser radiation. *LASER-TOKYO* '81: 22-14-22-16 1981.
- 16) Fu-Shou, Y., Rong, Y., et al.: An immunologic study of nitrogen laser treatment for tumors. *LASER-TOKYO* '81: 11-29-11-32 1981.
- 17) 若木守明, 横田英嗣, 他: 炭酸ガスレーザーの生体への作用の熱的解析. *医用電子と生体工学* 17 (特別号): 686-687 1979.
- 18) Finger, P.T., Curtin, B.J., et al.: Scleral hyperplasia induced by heat. *American Journal of Ophthalmology* 102: 25-32 1986.