エキシマレーザー照射によるラット大腿骨の 病理組織学的変化

東京医科歯科大学歯学部口腔病理学講座 落合 聡、茅野照雄、山本 肇、
浜松ホトニクス(株)中央研究所 佐藤勝彦、藤坂伸一*、垣内岳春*

Effect of Excimer Laser Irradiation on Rat Femur

Satoru Ochiai, Teruo Kayano, Hajime Yamamoto, Katsuhiko Sato,
Shin-ichi Fujisaka, Takeharu Kakiuchi

The possibilities of bone tissue ablation without thermal damage by 248nm KrF excimer laser irradiation were examined.

The rat femur was cut by laser at pulse width : 15 nsec, power density : 2.6 kW/cm², pulse repetition rate : 30 Hz, and irradiated time : 3 minutes. The femur was amputated by dental diamond disc for the control.

The femurs were examined histopathologically at timed sequence from 1 hour to 16 weeks after operation.

The femur could be amputated by laser irradiation but its wound healing was prolonged. The laser ablation stump showed massive necrosis probably due to the thermal injury and these necrotic bones likely disturbed the wound repair. But a carbonized layer, which it can be seen in high energy laser irradiation area such as Nd:YAG or CO₂ laser was not seen in the stump.

It was suggested that cause of thermal injury was not primary effect of the excimer laser irradiation but secondary phenomenon due to prolonged irradiation time, high energy density and peak power that is required for amputation of the rat femur.

緒 言

エキシマレーザーの生体骨組織切断能とその治癒過程を検索し、興味ある知見を得たので報告する。

材料と方法

発振波長 248 nm の KrF エキシマレーザー装置を用いて、以下の動物実験を行った。

体重 200 g の Wistar 系ラット 60 匹を 2 群に分け、一方をエキシマレーザー切断群、他方をダイヤモンドディスク切断群とした。レーザーの照射条件は、パルス幅 15 nsec、最大出力 4 MW、平均出力 1.8 W、パワー密度 2.6 kW/cm²、スポットサイズφ 0.3 mm、繰返し周波数 30 Hz とした。切断は、観血的に左大腿骨を露出したラットを小動物用の手術台に固定し、大腿骨骨幹中央部を横断する方向にレーザー光が照射されるよう、レーザー出光部下へ 2.0 mm/min の速度で手術台ごと移動した。なお、大腿骨の切断には 1 往復、すなわち約 3 分間の照射が必要であった。

一方、対照群では、歯科用ダイヤモンドディスクを装着した歯科用電気エンジンを用いて、同部位を切断した。

両群とも術中は切断部位に生理的食塩水を滴下し、局所の乾燥を防止した。また、両群とも切断後の骨の整復、固定は行わず、筋層および皮膚の縫合を行い、抗生物質を投与した。切断後 1 時間から 112 日まで、各群 3 匹ずつから大腿骨を経時的に摘出し、ヘマトキシリン-エオシン染色の脱灰組織標本を作製し、光顕的に観察した。

結 果

今回の実験に用いたラットの大腿骨は直径約 2.5 mm で個体差はなかった。

切断直後の肉眼所見：エキシマレーザー照射 3 分

後に大腿骨は切断され、骨髓露出部からは大量の出血が認められた。切断面とその周囲に炭化層はみられず、断端部皮質骨に凝血塊と思われる茶褐色の付着物が認められる程度で、概ね平滑な切断面が得られた。

一方、ダイヤモンドディスクによる切断は、約5秒で切断が可能であったが、切断面の状態や出血の程度等についてエキシマレーザ切断創との差は認められなかった (fig. 1)。

fig. 1

1時間後：エキシマレーザ切断群では切断部位から著明な出血、線維素の滲出および好中球の浸潤がみられ、その直下の骨髓腔には出血を伴う広範な骨髓細胞と内骨膜の壊死がみられた。また、骨の外表面では広範な外骨膜の壊死が認められた。

一方、ダイヤモンドディスク切断群では、切断部位からの出血がみられ、線維素の滲出および好

fig. 2

中球の浸潤は軽度であった。また、断端部付近の骨髓細胞および内外骨膜の壊死は僅かにみられる程度であった (fig. 2)。

3日後：エキシマレーザによる切断部位には断端部皮質骨の壊死、線維素の滲出および微小な膿瘍の形成がみられ、その奥の骨髓には、広範な骨髓細胞と内骨膜の壊死が認められた。内骨膜および骨髓組織の壊死部と生存部との境界部では、未分化間葉系細胞の増生がみられた。また、皮質骨の外表面では、断端部とその付近の外骨膜の壊死が認められた。外骨膜は断端部から僅かに離れた部分にはみられたが、その部分では僅かな類骨形成を伴う反応性肥厚が生じていた。

一方、ダイヤモンドディスクによる切断部位は、線維素の滲出および円形細胞浸潤を伴う線維芽細胞の増生を主体とする肉芽組織によって被包され、その奥の骨髓組織には毛細血管の拡張が認められた。内骨膜には反応性的変化はみられなかったが、皮質骨の外表面では、断端部からその周囲にわたる広範な類骨の形成を伴う外骨膜の著明な反応性肥厚がみられた (fig. 3)。

fig. 3

7日後：エキシマレーザ切断部は、線維芽細胞の増生を主体とする肉芽組織で被包されていた。そして、3日後までの骨髓腔にみられた骨髓細胞と内骨膜が凝固壊死に陥っていた部分は、その奥の骨髓から増生し壊死巣内に侵入してきた、未分

化間葉系細胞を主体とする肉芽組織に置換されつつあった。この肉芽組織が皮質骨内面を被う部分では、類骨と線維性の新生骨の形成が進行していた。しかしながら、断端付近には未だに骨髓細胞と内骨膜の壊死が残存していた。断端部の外骨膜は壊死した状態のままであるが、僅かに離れた部分では、類骨と軟骨の形成を伴う外骨膜の著明な反応性肥厚が認められた。

一方、ダイヤモンドディスク切断部は、内外骨膜の増生が連結した幼若な線維性組織で被包され、肥厚した内骨膜中には皮質骨内面から伸びた新生線維骨が、断端を橋渡し“bone bridge”するほどに形成されていた。外骨膜は断端部からその周囲にかけて一様に肥厚し、軟骨および類骨の形成も著明に認められた。断端付近の皮質骨の骨小腔中の骨細胞の消失が僅かにみられたが、その程度はエキシマレーザ切断創と比較して極めて軽微であった (fig. 4)。

fig. 4

14日後： エキシマレーザによる切断部は、7日後のものにみられた骨髓腔深部からの未分化間葉系細胞の増生と、これに被われた皮質骨内面からの新生骨の形成が進行していたが、断端部の骨髓腔はようやく幼若な肉芽組織で置換された状態であった。断端部付近の皮質骨の骨小腔は空虚で断端から僅かに離れた部分まで骨新生を伴う外骨膜の反応性肥厚がみられたが、切断先端までには

達していなかった。これらの新生骨には改造が認められ、造血骨髓組織の出現もみられた。

一方、ダイヤモンドディスクによる切断創は、これを被う薄い筋組織と線維性被包組織直下に、未熟な線維性骨組織がみられ、これによる断端の閉鎖が認められた。内骨膜の反応性変化は断端先端部に限局化しているのに対して、外骨膜の反応は進行し、著しい骨の新生による肥厚と改造に伴う造血骨髓組織の出現がみられ、一部には軟骨も認められた。(fig. 5)。

fig. 5

42日後： エキシマレーザによる断端部は線維性組織で被包されていた。14日後のものにみられた骨髓腔深部からの未分化間葉系細胞の増生と、これに被われた皮質骨内面からの新生骨の形成がさらに進行し、線維骨からなる天蓋様組織が完成し、深部の骨髓組織と断端側の骨髓腔を埋める幼若な肉芽組織との間を境し、徐々に断端側へせり上がる傾向を示した。この天蓋様組織と対応する位置まで外骨膜の反応性骨新生が進行しており、これらの新生骨には改造が行われ、造血骨髓組織も出現していた。骨小腔が空虚な断端部付近の皮質骨は、骨髓腔側、外側の両方から破骨細胞性の吸収を受け始めていた。

一方、ダイヤモンドディスクによる切断創は、これを被う薄い線維性被包組織直下に、混棒状に広がった未熟な線維性骨組織がみられ、密な骨梁

から均一な厚さの新生骨組織による断端の閉鎖が認められた。外骨膜の反応は進行し、著しく肥厚した新生骨梁の表層に皮質骨様の板状骨が出現し、二重の皮質骨構造を呈していた。これらの新生骨には改造とともに造血骨髓組織の出現がみられ、一部では既存の皮質骨が吸収されていた (fig. 6)。

112日後：エキシマレーザによる断端では、42日後のものにみられた断端部皮質骨の吸収がさらに進行し、同時に骨髓側から42日後にみられた天蓋様の組織がせり上がって、結果的に新生骨で閉鎖された新たな断端を形成していた。断端を閉鎖した新生骨は緻密化し、皮質骨様になって、二重の皮質骨構造を呈していた。

一方、ダイヤモンドディスクによる切断部では、断端部を被う新生骨が益々緻密化し、外骨膜性に生じた新たな皮質骨もその厚さと緻密さを増し、改造も盛んに行われていた (fig. 7)。

以上のように、断端部にみられる新生骨の形成様式は、両群で大きな対照性を示した。すなわちエキシマレーザ切断創では、広範に壊死した骨髓の奥から増生してきた肉芽組織に接する皮質骨内面から新生骨が生じ、肉芽組織が増生して舞台がせり上がるように壊死巣を吸収して断面を埋める

のに対して、ダイヤモンドディスク切断創では、内外骨膜から増生してきた未分化間葉系細胞が断面を被うと同時に、両骨膜から生じた新生骨が“橋渡し”をするように断面を被う所見が認められた。

考 察

エキシマレーザによって生体骨の切断は可能であったが、経時的な観察からレーザ照射による組織の壊死、吸収を伴う創傷治癒の遅延が認められた。エキシマレーザによる非熱的な組織の切開が可能であることは、現在までに数多く報告されており¹⁻³⁾、今回の実験でも炭酸ガスレーザやNd:YAGレーザなどによる生体骨の切断の際に生じる炭化層が生じていないことから、エキシマレーザによる生体骨の切開現象は、炭酸ガスレーザやNd:YAGレーザの場合の熱効果によるものではないものと思われた。エキシマレーザ切断部に生じた組織の変性や壊死は、熱的な組織傷害によるものと考えられるが、これは大腿骨の1方向からレーザ照射を行っているため、切断に当たって微妙なレーザ光のfocusにずれが生じること、骨の蒸散部には周囲から流れ込んでくる大量の出血を伴う流動骨髓組織が存在し、レーザ光の深達性が阻害され、切断には長時間のレーザ照射を必要としたことなど、悪条件が重なったため切開局所の温度上昇が、切開現象とは異なる次元の副作用として生じたものと思われた。

以上の考察から、エキシマレーザによる熱的影響の極めて軽微な生体組織の切開の可能性は、照射条件に大きく依存するものと考えられ、今後、照射対象毎の詳細な至適条件の検討を行う必要があることが示唆された。

本研究の一部は、医療、福祉機器技術の研究開発の一環として、NEDO（新エネルギー・産業技術総合開発機構）から委託を受けて、実施したものである。

文 献

- (1) R. Srinivasan : Science. 234: 559-565, 1986.
- (2) 佐藤勝彦他 : 0 pulse E. 109 : 94-100, 1988.
- (3) 久保宇一他 : 日本レーザ医学会誌. 10: 463-466, 1989