培養血管内皮細胞に対する半導体レーザーの影響

西園 浩文、宮崎 康博、森山 一郎、
伊東 一則、昇 卓夫、大山 勝

鹿児島大学医学部
耳鼻咽喉科学教室

Effects of Diode Laser Irradiation for The Activites of Growth Promotion in Cultured Mucosal Endothelial Cells.

Hirofumi NISHIZONO, Yasuhiro MIYAZAKI, Ichiro MORIYAMA, Kazunori ITHO, Takuo NOBORI, Masaru OHYAMA

Department of Otolaryngology, Faculty of Medicine, Kagoshima University, Kagoshima

To evaluate the diode laser application to microangio surgery, the effects of the laser irradiation on the growth promotion activities in cultured mucosal endothelial cells. Human mucosal microvascular endothelial cells (HMMECs) from the inferior turbinate on a patient with hypertrophic rhinitis or nasal allergy. The cells were plated at a density of 5×10^3 cells into multiwell culture chambers ($2 \text{ cm}^2/\text{well}$) coated with collagen and incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air. Laser irradiation were performed on the every second day. Cell growth assay were performed on the 2nd, 4th and 6th day after harvest. Cells numbers were counted in a Coulter counter. On the other hand the activities of growth promotion were monitored by ^3H -thymidine incorporation after laser irradiation at energy densities varying from 0.5 J/cm^2 to 50 J/cm^2 . After once diode laser irradiation, both the numbers of HMMECs and ^3H incorporation were inhibited. Morphological study was done by a phase-contrast microscope, no change of cell configuration was observed following diode laser irradiation.

はじめに

今回我々は半導体レーザーを血管吻合に応用することを目的に、その基礎実験として培養血管内皮細胞増殖に対する半導体レーザーの影響を検討した。

材料および方法

今回用いた半導体レーザーはSONYの工業用レーザー装置を改造した Model SCL18 循環式水冷、波長780(780-830)nm、最大出力3.5Wである。図1に示すように小型軽量で操作性に優れているという特徴を持っている。

血管内皮細胞は当科で確立したヒト下鼻甲介由来の血管内皮細胞を用いた¹⁾。手術時に摘出した下鼻甲介の上皮を可及的に除去後、酵素処理にて細胞成分を遊離させ血管内皮細胞を単離した。胎盤由来のコラーゲンをコーティングしたシャーレ上でEGCF(endothelial cell growth factor)およびFBS(fetal bovine serum)を含むMCD B107中でCO₂インキュベーターを用いて培養した。

まず細胞増殖法で半導体レーザーの血管内皮細胞への影響を検討した。血管内皮細胞をコールターカウンターで5000個に調整し24wellのプラスチックデッシュに播種した後、隔日に5J/cm²の半導体レーザーを3回照射し2日目、4日目、6日目、にコールターカウンターにて細胞数をカウントした。

次に更に詳細にDNA合成法を用いて半導体レーザーの血管内皮細胞増殖に対する影響を検討した。同様の方法で各well15000個ずつ血管内皮細胞を播種し72時間後に0.4uCiの³Hthymidineを加え37°Cで12時間インキュベートした後、PBSにて洗浄し、1NのNaOHで溶解、放射線活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。レーザー照射条件はパワー密度0.1w/cm², 1w/cm²とし、照射時間5秒または50秒のエネルギー密度0.5J/cm², 5J/cm², 50J/cm²の条件で照射した。レーザー照射はコンタミネーションを防止するために図2のようなプラスチック性のレーザー照射用滅菌箱を作製しその中でデッシュの蓋をとって行った。

結果および考察

図3は血管内皮細胞培養7日目の写真である。一層の敷石状に配列する様子が観察される。位

相差顕微鏡による観察では半導体レーザー照射による形態学的変化は認められなかった。図4は隔日3回の半導体レーザー照射を行った血管内皮細胞の細胞増殖法による細胞数の変化である。血管内皮細胞播種後2日目、コントロール群は4675±349.5個であった。一方、半導体レーザー5J/cm²、1回照射後の細胞数は2536±372.6個と細胞増殖が抑制されていた。半導体レーザー照射2回目、3回目後の播種後4日目、6日目においては両者の細胞数に差は認められなかった。図5は各条件下のサイミジン取り込み量を示す。サイミジン取り込みからみたDNA合成能はレーザー照射群でやや抑制される傾向にあった。しかしレーザー照射エネルギーと細胞増殖抑制の程度とは一定の関係は認められなかった。

今回、培養血管内皮細胞増殖に対する半導体レーザーの影響を細胞増殖法、およびDNA合成法で検討した。これまで繊維芽細胞²⁾³⁾、RA滑膜細胞⁴⁾等についてレーザー照射の影響が検討されている。繊維芽細胞ではその増殖には影響せずコラゲナーゼ活性を高める報告がある。またRA滑膜細胞では増殖抑制が認められたとの報告がある。このようにレーザー照射は細胞の機能になんらかの影響を与えている。近年レーザーを用いた血管縫合が行われはじめ臨床でも応用されている。しかし血管内皮細胞へのレーザー照射の基礎的検討は少ない。今回の実験ではレーザー照射により細胞増殖が抑制される傾向が認められた。しかしその抑制の程度とレーザー照射エネルギーとの間には一定の関係は認められなかった。細胞増殖法の検討においてレーザー照射2回目以降コントロール群との細胞数の差が認められなかったことはレーザー照射の回

数により異なる作用を与えている可能性もあり、今後とも検討する予定である。

参考文献

- 1) Katsunori Fukuda et al: Establishment of Human Mucosal Microvascular Endothelial Cells From Inferior Turbinate in Culture: Am J Otolaryngol 10:85-91, 1989.
- 2) Dan J, Castro: Effect of the Nd:YAG laser on DNA Synthesis and Collagen Production in Human Skin Fibroblast Cultures. Annals of plastic surgery 3:214-222, 1983
- 3) 野本種邦他: 低出力レーザーの結合組織代謝に及ぼす影響. 第11回日本レーザー医学会大会大会論文集57-60, 1990.
- 4) 山田邦雄他: 低出力レーザー照射がRA滑膜培養細胞のDNA合成能に及ぼす影響. 日本レーザー医学会誌vol.10(4)3-9, 1990.

図1 半導体レーザー (SONY SCL18)

図2 半導体レーザー照射風景

図3 ヒト下鼻甲介血管内皮細胞培養
7日目の位相差顕微鏡像

図4 培養血管内皮細胞増殖に対する半導体レーザー照射の影響

図5 ^3H -Thymidine取り込みからみた半導体レーザー照射によるDNA合成能の変化