アルゴンレーザーによる殺菌のメカニズム Mechanism of Bacteriocidal effect by Argon laser

岡崎 辰也

大阪医科大学整形外科学教室

〒569 大阪府高槻市大学町 2-7

TEL 0726-83-1221 FAX 0726-83-6265

TATSUYA Okazaki

Department of Orthopedic Surgery, Osaka Medical College

2-7 Daigaku-cho, Takatsuki City Osaka Pref.

要 旨

黄色ブドウ球菌をはじめとするブドウ球菌, 大腸菌, 緑膿菌や他の細菌についてのレーザーによる殺菌効果に関する報告はいくらかみられるが, レーザーによる殺菌効果のメカニズムに関しては明らかではない。本実験において著者は, アルゴンレーザーによる殺菌効果のメカニズムについて次のような方法を用いて調べた。

- a. アルゴンレーザーによる殺菌効果について増殖阻止域の形成の有無を観察することにより調べた。
- b. MRSAをはじめとする5種類の細菌に対してレーザーを照射し, 殺菌に有効な照射出力と照射時間との関係を調べた。
- c. レーザー照射後のMRSAの形態学的変化について透過型電子顕微鏡を用いて観察した。その対照として, レーザー非照射菌, 紫外線を照射した細菌, 熱処理した細菌もあわせて観察した。
- d. アクリジンオレンジにより細菌を染色し, レーザー照射群と非照射群との間の蛍光性の違いを蛍光顕微鏡を用いて観察した。
- e. レーザー照射後のMRSAのDNA変化をアガロースゲル電気泳動を用いて観察した。

以上の実験より

- a. アルゴンレーザーによりすべての細菌について増殖阻止域の形成を認めた。
- b. 照射出力と照射時間とを変化させたところ殺菌効果の出現と照射出力との間には深い関係があり, また緑膿菌では他の細菌と比べてアルゴンレーザーにより殺菌され易かった。
- c. アルゴンレーザー照射後, 細菌の細胞質および核様体付近では電子密度が上昇していた。その変化は細菌を熱処理したものと非常に類似していた。
- d. レーザー照射前後で細菌のアクリジンオレンジの蛍光性に変化はなかった。
- e. レーザー照射前後で電気泳動上, 細菌のDNAのバンドパターンに変化はなかった。

以上よりアルゴンレーザーによるMRSAに対する殺菌効果は, 光化学的作用よりも熱作

(平成7年8月24日受理, 平成7年12月2日掲載決定)

(Received August 24th 1995, Accepted December 2nd 1995)

用が主体であると考えられ、またアルゴンレーザーは細菌のDNAのバンドパターンには直接影響を及ぼさないことがわかった。

キーワード：アルゴンレーザー、殺菌効果、透過型電子顕微鏡、電気泳動法、核酸

Abstract

Bactericidal effects by laser irradiation on *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and other bacterial strains have been reported by some researchers, but little attention has been given to the bactericidal mechanism by laser irradiation. In this report, bactericidal mechanism using Argon laser was examined by means of the following method.

- a. Bactericidal effects by Argon laser were evaluated by the formation of growth-inhibitory circle of bacteria.
- b. The relationship between irradiation output and irradiation time of Argon laser was examined in 5 bacteria including MRSA.
- c. The morphological changes in MRSA after laser irradiation were observed by using the transmission electron microscope. As controls, non-irradiated bacteria, heat-treated bacteria and ultraviolet irradiated bacteria were also observed.
- d. The bacterial colony were irradiated by laser. The bacteria were stained with acridine orange, and then were compared with non-irradiated bacteria by observing with fluorescence microscope.
- e. Change of DNA by laser irradiation on MRSA was studied using Agarose gel electrophoresis.

The results of the experiments were as follows.

- a. All bacteria showed a growth inhibitory circle after laser irradiation.
- b. By changing irradiation output and irradiation time, we found that there was a close relationship between the total energy per unit area and the appearance of a bactericidal effect, and that *Pseudomonas aeruginosa* had high sensitivity to the Argon laser compared with other bacteria.
- c. The cytoplasm and nucleoid of the bacteria were seen to be higher electron dense lesion. These feature was in good agreement with the image of the cytoplasm of bacteria after heating.
- d. After irradiation, fluorescence which acridine orange emitted did not presented difference between irradiated group and non-irradiated group.
- e. DNA band pattern of MRSA on electrophoresis was not changed after laser irradiation.

In this study, it is suggested that the bactericidal effects on MRSA by Argon laser may be caused mainly by heat rather than photo-dynamic action and that laser may not directly influence band pattern of the DNA in bacteria.

Key words, Argon laser, Bactericidal effect, transmission electron microscope, electrophoresis, DNA

緒 言

近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）による感染症に対して臨床に大きな関心が寄せられている。その理由は、大病院にて分離される黄色ブドウ球菌のうち40～70%はメチシリンをはじめとするペニシリン系抗生物質や第一世代、第二世代のセフェム系抗生物質にも耐性を有し、現時点において十分な治療法が確立しておらず、免疫機構の低下している患者においては時として致命的な状態をひきおこす可能性があるからである。今後、新たに感受性の高い抗生物質が開発されたとしても再び耐性を獲得することにより治療が困難となること予想されるため、抗生物質による化学療法以外の治療法についても検討する必要があると考えた。

一方、1960年にレーザーについての技術が開発され、その数年後には各種酵素、ビタミン、DNA、抗原などの生体高分子へのレーザー照射の影響、さらに赤血球、白血球、生体細胞についての作用も検討され、生体への安全性が確かめられた結果、1970年代からは臨床医学へも応用が行われることとなり、人体への安全な適用方法もほぼ確立されている¹⁾。

レーザーの被射体に対する作用としては1) 熱作用、2) 光化学的作用、3) 光量子作用、4) 電磁的作用の4つが考えられている。殺菌効果として働く作用としては、熱作用と光化学的作用の2種類が主であろうと考えられている¹⁾。

生物に対するレーザー照射の試みについては、1963年Saksらによりルビーレーザーが緑藻（*Spirogyra*）に照射されたのが最初の報告である²⁾。その後、細菌に対するレーザー照射の実験としては、1965年Kleinらが、*P. aeruginosa*、*S. aureus*にルビーレーザーを照射したところ細菌の増殖が阻害されたと述べている³⁾。一方、1966年Mc Guffらは*S. aureus*、*P. aeruginosa*に対するルビー、He-Ne、Neodymiumの各種レーザーによる殺菌効果を調べたが、いずれも明らかな殺菌効果は認めなかったとしている⁴⁾。1970年前半にはレーザー装置の開発があまり進まなかったこともあり殺菌効果についての報告はほとんど見当たらない。しかし、1980年代より新たなレーザー装置の出現および低出力のレーザーでも細菌に色素染色を行うことにより殺菌効果の増強を期待し得るようになったのでそれによる殺菌効果の有無、殺菌効果があらわれるための照射出力の条件に関する報告がなされるようになった⁵⁾。

近年、医学領域における応用を目的としたレーザー技術には大きな進歩があり、異なった種類のレーザーをより高出力で利用できるようになった。そこで著者は、新

しい方法によるレーザー照射が、現在の大きな課題であるMRSA感染症の治療法として導入し得るか否かを検討するため、高出力（数W）のアルゴンレーザー照射によるMRSAに対する殺菌効果の有無およびそのメカニズムについて検討を行った。

材料と方法

1. 殺菌と培養

細菌は、グラム陽性菌であるMRSA標準株（JCM 8702）、5種類のMRSA臨床分離株（a～e）と以下、大阪医科大学微生物教室継代株であるMSSA（209P）、*Staphylococcus epidermidis*、グラム陰性菌も同教室継代株である*E. coli* JC-2、*E. coli* B、*Pseudomonas aeruginosa*、*Serratia marcescens*を用いた。

培地は、Heart infusion agar平板培地（HIA, Difco）、Heart infusion broth液体培地（HIB, Difco）の2種類を使用した。実験を行うにあたっては、HIA培地もしくはHIB培地にて24時間、37℃にてあらかじめ前培養した細菌を用いた。

2. レーザーの発振条件および発振方法

レーザー発振器としては、アルゴンレーザー（コヒーレント社製、波長514nm）を使用した。照射は連続発振で行い、石英ファイバー（直径400 μ m）により導光して、ファイバー先端にとりつけたハンドピースを使用し非接触照射とした。HIA平板培地直上よりハンドピース先端までの距離を照射距離とし、照射条件（照射出力、照射時間、照射距離）を各実験においてそれぞれ変化させ実験を行った。

3. アルゴンレーザーによる殺菌効果の有無

すべての細菌をHIA斜面培地にて前培養し、標準—白金耳を採取してこれを2 mlの生食に浮遊させたものを菌液とした。そこから150 μ lの菌液をとりだしHIA平板培地表面上で一様となるようにコンラージ棒を用いて塗布をした。照射距離が20mmとなるようにハンドピースをスタンドで固定し、照射出力1 Wにて、照射時間を5、10、15、20、25秒間と変化させレーザー照射を行った。照射終了後に37℃、24時間培養して増殖阻止域の有無を判定した。同操作を2回繰り返しその平均をとった。

4. 殺菌効果が表れる際のアルゴンレーザーの照射出力と照射時間との関係

MRSA標準株（JCM8702）、2種類のMRSA臨床分離株（a、b）、*P. aeruginosa*、*E. coli* Bを使用し、上記と同様にHIA平板培地に一様に菌液を塗布したのちに、照射距離を20mmに固定した状態で照射出力を0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 W、照射時間を10、20、30秒と変

化させて増殖阻止域の有無を判定した。

5. レーザー照射後の菌体の変化を透過型電子顕微鏡にて観察

生食 2 ml に一白金耳の MRSA 標準株を溶解して菌液を作り、先端直径が 1 mm 前後のガラス棒を菌液に浸し、それを HIA 平板培地に接種し、37℃、24 時間培養して、均一にアルゴンレーザー照射ができる大きさのコロニーを作成した。照射出力、照射距離をそれぞれ 1 W、10 mm に設定し、照射時間を 30 秒、60 秒、3 分と変化させて照射した。レーザー照射後、同コロニーを白金耳にて採取し電顕試料作成にとりかかった。1.5% Acrolein と 1.5% Glutaraldehyde のカコジル酢酸緩衝液で前固定し、Osmium tetroxide (カコジル酢酸緩衝液) で後固定を行った。次に、アルコール脱水を行い、常法により包埋、超薄切片を作成した。超薄切片に酢酸ウラニルと鉛の 2 重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (H-7000, 日立) にて観察した。

菌体への熱および光化学的作用による菌体の形態変化について検討するため、エッペンドルフ型マイクロチューブに入った 50 μ l の MRSA 標準株の菌液を、ホットドライバスにて 65℃、15 分間加熱したものおよび HIA 寒天平板培地上にコロニーを作成しそれに殺菌灯にて 10400 μ W sec/cm² 以上の線量の紫外線を照射したものについて透過型電顕で観察した。

6. レーザー照射した菌体のアクリジンオレンジ染色の蛍光性の変化

次に、アルゴンレーザーが細菌の核酸に直接影響しているかどうかを調べるためにアクリジンオレンジ染色の蛍光性に関する実験を行った。HIA 平板培地に MRSA 標準株のコロニーを作成してレーザーを照射した。照射出力、照射時間、照射距離をそれぞれ 1 W、30 秒、20 mm とした。照射されたコロニーを採取して 100 μ l の生食に溶解し細菌浮遊液を作った。この液をプレパラートに 1 滴滴下して乾燥させたのち、まずカルノア固定液で 20 分間固定し、0.5% アクリジンオレンジ (McIlvaine 磷酸緩衝液) で 30 分間染色後、同緩衝液で洗浄したものを蛍光顕微鏡で観察した。

7. レーザー照射後の DNA の変化

HIB 液体培地 50 ml で前培養した MRSA 標準株を 3000 rpm、10 分間遠心集菌した。生食にて 2 回細菌を洗浄し、2 ml の生食に溶解し菌液とした。エッペンドルフ型マイクロチューブに 500 μ l ずつ菌液を分注し、3000 rpm、10 分間遠心集菌して 100 μ l の生食にて細菌浮遊液を作成した。これをシャーレ中央に滴下してなるべくアルゴンレーザーが菌液全体に照射されるようにした。照射出力、

照射距離を 2 W、10 mm とし、照射時間を 20 分あるいは 30 分とした。レーザー照射後、シャーレ上の細菌を再び 300 μ l の生食を用いて溶解し、エッペンドルフ型マイクロチューブにもどして再度遠心して菌体由来の DNA を isoplant (ニッポンジーン社製) にて抽出、精製を行った。精製された DNA をエチジウムプロマイド加 1% アガロースゲルと 2% アガロースゲルを用い電気泳動装置 (ミュービット、ミニゲル型) にて 50 V の電圧のもとで 1 時間泳動を行った。電気泳動後、DNA のバンドのパターンを紫外線透過器にて観察し、ポラロイドで撮影した。

対照実験として DNA の Size marker (Ampli Size DNA Size Standard, BIO-RAD) にアルゴンレーザーを照射し、照射前後の DNA の変化を 2% アガロースゲル電気泳動にて調べた。

結 果

アルゴンレーザーによる殺菌効果の有無

図 1 は、アルゴンレーザーの照射出力 1.0 W、照射距離 20 mm において照射時間を 5、10、15、20、25 秒と変化した時の HIA 寒天培地上での増殖阻止域の有無を示したものである。これにより照射時間が 5 秒の時点で境界が不鮮明であるが増殖阻止域の形成を認め、10 秒ではすべての細菌に明らかな増殖阻止域を認めた。

殺菌効果があらわれる際のアルゴンレーザーの照射出力と照射時間との関係

照射距離を 20 mm とし、照射出力を 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 W と変化させ、また照射時間も 10、20、30 秒と照射時間

図 1 各種細菌へのアルゴンレーザー照射後の増殖阻止域の形成

1. MRSA (JCM-8702) 2. MRSA (臨床分離株)
3. *S. epidermidis* 4. MSSA (209P)
5. *P. aeruginosa* 6. *E. coli* JC-2
7. *E. coli* B

表1 殺菌効果に及ぼす照射出力と最小必要照射時間との関係

菌 種	照射出力	最 小 必 要 照 射 時 間 (秒)				
		0.2W	0.4W	0.6W	0.8W	1.0W
MRSA (JCM-8702)		>30	30	20	10	10
MRLA a		>30	30	20	10	10
MRSA b		>30	30	20	10	10
<i>P. aeruginosa</i>		20	20	10	10	10
<i>E. coli</i> B		>30	30	20	10	10
<i>Serratia</i> . M		>30	30	20	10	10

アルゴンレーザーの照射距離は平板寒天培地より20mmとした。

図2 アルゴンレーザーの照射時間を変化させた時の菌体の透過電顕所見

a. 非照射 b. 照射時間30秒 c. 照射時間60秒
d. 照射時間3分

変化させたと表1の結果が得られた。これよりグラム陽性菌であるMRSA標準株、MRSA臨床分離株とグラム陰性菌である*E. coli* B、*Serratia*. Mの間には、増殖阻止域が認められた際のレーザーの照射条件に明らかな差はなかった。すなわち照射時間が0.2Wの時には、増殖阻止域が認められるまで少なくとも30秒以上のレーザー照射が必要であり、0.4Wでは30秒、0.6Wでは20秒、0.8Wでは10秒の照射時間にて増殖阻止域の形成がみられた。しかし、*P. aeruginosa*においては0.2Wの出力でも照射時間10秒で増殖阻止域が認められ、他の細菌に比べてアルゴンレーザーにより殺菌されやすいことがわかった。

レーザー照射後の菌体の変化を透過型電子顕微鏡にて観察

図3 アルゴンレーザー照射、紫外線照射、熱処理後の菌体の透過電顕所見

a. 非照射 b. 熱処理 c. 紫外線照射
d. レーザー照射

レーザー照射前(図2 a)では菌体の中心部は電子密度が低く、その周辺部の細胞質は電子密度が高くなっており、また外膜および細胞質膜は明瞭に認められた。照射時間が30秒(図2 b)においては主に、細胞質と核中心部に電子密度の低下した部分と高くなった部分とが混在した不規則な構造が認められた。さらに照射時間が60秒(図2 c)になると細胞質、核様体付近に線状の構造物が見られ、細胞膜は不明瞭となり、細菌壁の膨化傾向が認められた。照射時間が3分(図2 d)では細菌壁は収縮し、細胞膜と細胞壁の離開する像が見られ、細胞質は雲架状の構造物により不規則となるのが観察された。

MRSAの熱処理後の変化(図3 b)を同様に透過型電顕で観察し、レーザー照射前(図3 a)、レーザー照射後(図3 d)と比較したところ、細胞質、核様体

図4 アルゴンレーザー照射による菌体の蛍光性の変化

a. レーザー照射前 b. レーザー照射後

付近にアルゴンレーザー照射後と同様に雲絮状の構造物がみられた。一方、紫外線（図3 c）では全体的として細胞質内で電子密度が多少増した程度で細菌壁に変化は認められなかった。

レーザー照射した菌体のアクリジンオレンジ染色の蛍光性の変化

アルゴンレーザーを照射した細菌と非照射の細菌とのアクリジンオレンジ染色の蛍光性を比較したところ両者に著しい蛍光性の変化は観察されなかった（図4）。

さらにDNA自体の変化の有無を調べるために、アルゴンレーザー照射後のMRSA標準株よりDNAを抽出、精製し、アガロースゲル電気泳動にてアルゴンレーザー照射前後のDNAのバンドのパターンを比較した（図5）。レーザー照射前後にてDNAのバンドのパターンに明らかな変化はなく、さらにSize markerに直接アルゴンレーザーを照射し同様な方法で観察したところこれにおいても変化は見られなかった。

考 察

1960年にルビーレーザーによる世界最初のレーザー発振が成功し、生物に対しては1963年にSaksらが緑藻にルビーレーザーを照射し、細胞レベルにおける形態学的変化を光学顕微鏡にて観察したのが最初である²⁾。1965年 Kleinらは *Serratia*, *S. aureus*, *Pseudomonas*, *Pneumococcus*, *Aspergillus niger* にルビーレーザーを照射したところ60~250 Jの照射エネルギーにおいて殺菌効果を認め、菌体外色素を産生する *Serratia*, *Pseudomonas* においては60 Jをこえたところより色素産生能が一時的に減弱したと報告している³⁾。その後、He-Ne laserが開発され、それによる殺菌効果についても検討されたが、発振器自体が低出力であるため細菌に色素処理をしてからでないと十分な殺菌効果が得られないと述

図5 アルゴンレーザー照射と非照射との間の2%アガロースゲル電気泳動によるDNAのバンドパターンの比較

a. 照射時間20秒 b. 照射時間30秒
c. 非照射 d. サイズマーカー

べられている⁵⁾。

一方、今回の実験に使用したアルゴンレーザーと同様に高出力レーザーであるcarbon dioxide laserによる殺菌作用についての研究は、歯科領域に用いる器材の消毒や褥瘡の治療⁶⁾、口腔内細菌⁷⁾に対する殺菌効果に関するものはみらるが、その殺菌のメカニズムに関する検討はほとんど触れられていない。アルゴンレーザーについては1988年柳川らが *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* にレーザーを照射して殺菌効果の有無について検

討しており、その中で菌体外色素を産生する *P. aeruginosa* が最も殺菌されやすかったと報告しているが、殺菌のメカニズムに対する記述はなされていない⁸⁾。今回の実験では高出力レーザーであるアルゴンレーザーによる殺菌効果の有無とそのメカニズムについて、主に形態学的な面より考察を行った。

まずアルゴンレーザー単独で殺菌効果が認められるかを確かめたところ、照射距離20mm、出力1Wでは照射時間が5秒以上から増殖阻止域の形成がみられアルゴンレーザー単独で十分に殺菌効果があることを認めた。また菌体外色素を産生する *P. aeruginosa* 以外では、細菌の種類（グラム陽性、グラム陰性菌）により増殖阻止域の形成に明らかな相違はみられなかった。このことから、細菌壁の構成成分の違いにより特に殺菌効果に相違はないものと考えられた。しかし、菌体外に色素産生能を有する *P. aeruginosa* においては照射出力を1Wより低下させて照射した場合、他の細菌に比べてより短い照射時間にて殺菌効果が現れている。この理由としては、*P. aeruginosa* の産生する菌体外色素である緑色の pyocyanin などの色素によりレーザーの殺菌効果が増幅されたものと考えられる。このことはすでに柳川らのアルゴンレーザーを用いた実験⁹⁾、Okamotoらによる He-Ne laser を用いた実験¹⁰⁾、Schultzらの Neodymium YAG laser を用いた実験¹¹⁾ においても同様の報告がなされている。著者は、菌体外に赤色の色素を産生する *Serratia marcescens* においても *P. aeruginosa* と同じようにレーザーによる殺菌効果の増幅が認められるのではないかと予想したが、他の細菌と殺菌効果においては差はなかった。この理由は *P. aeruginosa* に比べて色素の産生量自体が非常に少なく、さらに細菌を生食に溶解する過程においてより色素が希釈されることでアルゴンレーザーによる色素を介した殺菌増強効果が現れにくかったものと思われた。

照射出力と照射時間との関係で、照射出力が大きくなるにつれて殺菌効果が出現する時間はより短くて済むことがわかった。Schultzらは Neodymium-YAG laser を用いて *S. aureus*, *E. coli* を殺菌するには、 1.667 J/cm^2 以上のエネルギーが必要であると述べており¹¹⁾、我々の実験からも殺菌効果が現れるのにはある一定以上のエネルギーが必要であると思われた。

次に、アルゴンレーザーによる殺菌のメカニズムについて透過型電子顕微鏡を用いて形態学的に検討^{12) 13)} したところ、照射出力1W、照射時間が30秒では主に細胞質に変化がみられ、細菌壁の構造は比較的保たれていた。さらに、照射時間が長くなるにつれて細菌壁にも変化が

みられるようになり、照射時間が3分になれば細胞膜と細菌壁との間に間隔が生じて原形質分離を生じていた。以上の結果よりアルゴンレーザーによる菌体の変化はまず細胞質にて始まり、それに遅れて細菌壁に変化が現れてくると思われた。この変化については、次の2つのことが考えられる。一つは、アルゴンレーザー照射の影響がまず細胞質にあらわれ、次に少しおくれて細菌壁にも同様な影響が現れたという考えである。他の一つはアルゴンレーザーが細胞質のみに影響を与え、それにより障害を受けた細胞質の代謝経路に変化が生じたことにより細菌壁の生合成が2次的に変化したという考えである。今回の実験からは、前者の方がより説明が行い易い。それは、照射時間が30秒において細菌壁の変化がほとんどみられないのに比べ60秒では著しく変化が起っており、アルゴンレーザーによって細胞質の代謝経路に変化が生じたとしてもこれほど短時間に細菌壁に影響が生じるとは考えにくい。従ってアルゴンレーザーにおいては、細胞質のほうが細菌壁に比べてレーザーがより高率に吸収され影響が出やすいものと考えられる。

細菌に対するレーザーの作用として、現在、考えられているのは主として熱作用と光化学的作用の2つである¹⁾。アルゴンレーザーによる殺菌作用についてそのどちらがおもに関与しているかを調べるため、熱作用のモデルとして細菌を65℃、15分間加熱した後の菌体の変化を、一方、光化学的作用のモデルとしては菌体に紫外線を照射した後の変化を電顕にて観察した。熱作用のモデルでは主に、細菌壁に接している細胞質付近に電子密度の高い部分と低い部分とが混在しているのに対し、アルゴンレーザーでは同様の変化が菌体の中心部付近に起こっている。このことは、外部から菌体に熱が加わった場合と菌体内部にて熱が発生した場合との違いによるものと思われた。光化学的作用のモデルである紫外線照射後の菌体の変化はアルゴンレーザー照射後とは明らかに違っていた。従ってアルゴンレーザーによる殺菌作用としては主に熱作用による可能性が高いと考えられ、しかも熱の発生する場所としては、レーザー光が菌体内で吸収されることにより熱が発生しているのに対して、熱作用モデルの場合は主に外部から加えられた熱により菌体に変化が起こっているという点が形態学的な差として現れている可能性がある。我々の行った予備実験によるとMRSAの場合、65℃で10分間加熱することにより十分な殺菌効果が得られたことにより、少なくとも照射出力0.2W、照射時間30秒の照射条件にて培地表面上の温度は65℃以上の温度まで上昇している可能性がある。しかし、レーザーの照射出力および照射時間の変化による培

地表面上の正確な温度測定は、技術的にも困難と思われるので今後、検討の必要があると思われる。

アルゴンレーザーが細胞質のどの部分におもに作用して殺菌効果が生じているのかについては、アクリジンオレンジ染色の蛍光性の変化とDNAのバンドパターンの変化を観察したが、両者ともアルゴンレーザー照射前後で変化はなかった。このことからアルゴンレーザーは紫外線のように光化学的作用によりDNAの結合に変化をおこす可能性は少なく、またDNAは比較的高温にも安定であることよりアルゴンレーザーによる熱作用により変化は生じにくいものと考えられる。以上の結果より核酸よりはるかに熱による影響を受けやすい細胞質内の蛋白質などに対してアルゴンレーザーが熱作用を及ぼし、殺菌効果が現れているものと推測される。今回、著者が行ったようなレーザー照射後の菌体の形態学的変化に関して述べているものは見当たらないが、Adkissonらはアルゴンレーザーをラットの心筋細胞に照射してその変化を透過型電顕にて観察している¹²⁾。その報告では、レーザーを照射された部分のミトコンドリアの内膜には濃染されたスポットが観察され、それ以外の領域には変化がみられなかったとしている。またその濃染した部分は、アルゴンレーザーが同部で吸収され熱エネルギーに変化したことにより生じたものであろうと推測している。またStorbらも上皮細胞や線維芽細胞には染色をほどこしてルビーレーザーを照射し、細胞が受ける損傷の程度を透過電顕の所見より分類している¹³⁾。この実験においてもミトコンドリアには強く濃染される部分が存在し細胞膜には変化が及んでいないとしている。ミトコンドリアが強く濃染されるのは熱による変化であるとする点は著者の考えと一致するが、今回、照射したものが細菌であることから心筋細胞に存在するようなミトコンドリアは存在しないものの、それに代わる細胞質内の蛋白質を材料とする器官に変化が現れているものと考えられる。

結 論

アルゴンレーザーによる殺菌効果およびそのメカニズムについて述べた。アルゴンレーザーは他の低出力レーザーに比べ、細菌に色素を反応せずに照射しても強い殺菌効果を有していた。そして、その殺菌のメカニズムはおもに熱作用によるものであり、その作用する主たる部分は細胞質で、細菌壁の変化は細胞質内で生じた熱が2次的に作用したものであろうと考えられた。細胞質内で生じた熱は細菌のDNAの結合パターンに直接影響を与えるよりも蛋白質に変化をおよぼすことにより細菌を滅滅させるものと思われた。

稿を終えるに臨み、ご指導、御校閲を賜りました小野村敏信教授、中井益代教授に深謝します。また、終始懇切なる御指導、御鞭撻をいただきました佐野浩一助教授、後藤俊幸講師、米沢卓実非常勤講師に感謝をいたします。

参考文献

- 1) レーザー医学(渥美和彦編) 中山書店(1980)
- 2) Saks NM, Roth CA : Ruby laser as a microsurgical instrument. *Science* ; 141 : 46-47, 1963.
- 3) Klein E, Fine S, Ambrus J, Cohen E, et al : Interaction of laser radiation with biologic systems. *Studies on biologic systems in vitro*. *Fed Proc* ; 24 : 104-110, 1965.
- 4) McGuff PE, Bell EJ : The effect of laser energy radiation on bacteria. : *Med Biol* ; 16 : 191-194, 1966.
- 5) Okamoto H, Iwase T, Morioka T : Dye mediated bactericidal effect of He-Ne laser irradiation on oral microorganisms. *Lasers Surgery Med* ; 12 : 450-458, 1992.
- 6) Stellar S, Meijer R, Walia S, Mamoun S : Carbon dioxide laser debridement of decubitus ulcers. *Ann. Surg.* ; 179 (2) : 230-237, 1974.
- 7) Dedrich DN, Vaughn AS, Tulip J, Zakariasen KL, et al : Comparative bactericidal exposure for selected oral bacteria using carbon dioxide laser radiation. *Laser Surgery Med* ; 10 : 591-594, 1990.
- 8) Yanagawa T, Hashimoto K : Growth inhibitory effect of Ar-laser to *Pseudomonas aeruginosa*. *J Jpn Soc Laser med*, 9 (3) : 201-204, 1988.
- 9) Schultz RJ, Harvey GP, Fernandez-Beros ME, Krishnamurthy S, et al : Bactericidal effects of the neodymium : YAG laser in vitro study : *Laser Surgery Med*, 6 : 445-448, 1986.
- 10) Suganuma A : The plasma membrane of staphylococcus treated with HCl solutions : *J. Cell. Biol.* 21 : 290-293, 1964.
- 11) Suganuma A : Further studies on the plasma membrane of staphylococcus aureus : *J. Cell. Biol.* 30 : 208-210, 1966.
- 12) Adkisson PK, Dusan B : Argon laser micro-irradiation of mitochondria in rat myocardial cells in tissue culture : *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* ; 5 : 559-564, 1973.

- 13) Storb R, Amy RL, Wertz AK, Fauconnier B,
et al : An electron microscope study of vitally
stained single cells irradiated with a ruby la-
ser microbeam : J. Cell. Biol., 31 ; 11-29. 1966.