原

著

アルゴンイオンレーザーのメラニン色素褪色 効果の *in vitro* における解析

鈴木 順 子

東京医科歯科大学歯学部口腔病理学教室（主任・指導：山本 肇教授）

（1988年12月16日 受付）

In Vitro Study on Decolorization Effect of Argon Ion Laser

Junko Suzuki

Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University
(Chief: Prof. Hajime Yamamoto)

Many experimental treatments for oral pigmented lesions with several kinds of lasers have been applied and consequently, the argon ion (Ar^+) laser is used clinically as one of the most effective lasers for decolorizing. This *in vitro* study was carried out to clarify the depigmentation mechanism by low energy Ar^+ laser irradiation. Each cultured human melanotic malignant melanoma cell colony was irradiated by the laser at 0.31 J/cm^2 . Each colony was fixed in time sequence and examined microscopically and ultramicroscopically.

The present study disclosed the tyrosinase inactivation and decrease in the number of melanosomes of the lased melanoma cells. Subcellular degeneration was very mild and the mature melanin granules markedly decreased concomitantly with the increased secretion of the granules. These findings suggest that Ar^+ laser irradiation evokes decolorization effect by the mechanism of 1) organelle-specific injury, 2) hypersecretion of melanosomes and 3) maturation arrest of melanosomes, related to its photoactivity.

I. 緒 言

口腔粘膜におけるメラニン色素沈着はしばしば観察される病変で、審美的な障害となることがある¹⁾が、正常粘膜に傷害を与えることなしに色素沈着症を効果的に治療する方法は長らく知られていなかった。しかし、最近になってレーザー医学の進歩と普及に伴いレーザー照射による色素沈着症の治療が臨床的に試みられ、その有用性が喧伝されるようになってきた^{1,2)}。

医用レーザーはそのエネルギー密度によって高エネルギーレーザーと低エネルギーレーザーの二つのカテゴリーに大きく分けられる³⁾。高エネルギーレーザーは組織を凝固、蒸散、炭化することにより外科用メスとして用いられることはよく知られている。これに対し、低エネルギーレーザーは鍼灸治療や難治性創傷の治癒促進などのいわゆる生体への刺激作用として利用されており、診断・計測にも活用されるなど非観血的な治療・診断機器として利用されている。その作用機序として

は高エネルギー照射の際に生じるような組織障害は起こさず、主にその光学的活性により細胞、組織に形態的あるいは機能的な変化を起こさせることによるものと考えられている。低エネルギーレーザーを粘膜の色素沈着症に照射した臨床的な経験から、430~530 nm の波長をもつアルゴンイオンレーザーは最も褪色効果をもつレーザーであるといわれている。その理由としては、DOPA (DL-dihydroxy phenylalanine)-melanin の吸光スペクトルが 250~1,200 nm の範囲において波長の短い光線ほど吸光度が高くなることから、可視光レーザーの中で最も波長の短いものの一つであるアルゴンイオンレーザーが特にメラニン細胞に吸収されやすいためであろうと考えられている。しかし、低エネルギーアルゴンイオンレーザーのメラニン色素褪色機序の詳細についてはいまだに解明されていない。そこで、本研究ではこの点を明らかにするために培養中のヒトのメラニン色素産生細胞にアルゴンイオンレーザーを照射し、その後の培養細胞の変化を観察することによって、メラニン色素褪色効果の作用機序の解明を試みたところ興味ある知見が得られたので報告する。

II. 実験材料および方法

実験に用いた細胞はメラニン色素産生性ヒト悪性黒色腫培養細胞株 (HMV-II) である。この細胞はヒトの腔原発悪性黒色腫由来のメラニン色素産生能をよく保持している細胞株であり、細胞倍加時間は約35時間である⁵⁾。この HMV-II 細胞を 2-well のチェンバースライド (LAB-TEK MILES Scientific Co., U. S. A.) の20%牛胎仔血清を含む Ham's F-10 (GIBCO Lab. Co., U. S. A.) 培養液 2ml 中に50~100個ずつつき、37℃、5% CO₂ にて培養した。2-well チェンバースライドは培養細胞を培養状態のまま固定、染色することが可能であるため、組織学的あるいは酵素組織学的に観察するのに適している。細胞はコロニーが肉眼的に確認でき、レーザー照射に適する直径約1mm の大きさとなるまで約2週間培養し、

一方の well から独立した適当な大きさのコロニーを一つ選び、連続波アルゴンイオンレーザー (波長: 514.5 nm, GLG 3200, NEC Co., Japan) を以下の条件で照射した。すなわち、スライドガラス上の細胞に 120 mW の強さで照射されるように、210ワットメートル (COHERENT Co., U. S. A.) を用いて調整し、30分間照射を行った。このときのスポットサイズは直径約3mm であり、したがって照射エネルギー密度は 0.31 J/cm² である (図1)。チェンバースライドの他方の well からも適当な大きさのコロニーを選び対照とした。レーザーを照射したコロニーおよび対照として選んだコロニーは、それぞれ照射直後、2日後および10日後に通法に従って固定し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡によってそれぞれ観察し比較検索した。

1. 光学顕微鏡の検索

レーザー照射群と対照群との細胞は、培養期間中は位相差顕微鏡を用いて観察した。DOPA反応および Fontana-Masson 染色標本作製のため、照射直後、2日後および10日後にチェンバースライドごとリン酸緩衝10%ホルマリンにて30分間常温にて固定し、4℃、0.2Mリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で保存した。スライドガラス上の細胞にはチロシナーゼ活性を検索する目的で DOPA 反応⁶⁾を、メラニン顆粒の染色のために Fontana-Masson 染色⁷⁾をそれぞれ施して観察した。

図1 チェンバースライドに培養した HMV-II 細胞に対するレーザー照射法の模式図

レーザー発振装置から発振されたアルゴンイオンレーザーをダイクロミックミラーによって反射させ、スライドガラスを通して細胞に照射する。レーザーのエネルギーはスライドガラス上で計測した

2. 電子顕微鏡的検索

光学顕微鏡的に観察した特定の細胞群を電子顕微鏡的に観察するため、以下の方法により試料を作製した⁸⁾。チェンバースライドに付着している細胞を0.1Mリン酸緩衝1% glutaraldehyde (pH 7.4) を用い、4℃にて1時間固定した後、0.1Mリン酸緩衝8% ショ糖液 (pH 7.4) に浸し4℃で保存した。細胞は1%四酸化オスミウムで約1時間再固定後、1%酢酸ウラン50%エタノールでブロック染色を行った。細胞は通法に従いエタノール系列により脱水を行い、チェンバースライド上に密着倒立させたゼラチンカプセル (Lily Co., U. S. A.) を用いて EPON 812 (TAAB Co., England) に包埋した。重合終了後、ウルトラミクロトーム (Porter Blum II, Ivan Sorvall Inc., U. S. A.) を用いて培養面に平行に厚さ2~3 μmの準超薄切片を作製し、メチレンブルーで染色後、光学顕微鏡によって観察した。電子顕微鏡的観察のために細胞の核が最も大きくみえる切片を選択し、先端を平坦にトリミングしたエポンブロックにエポキシ系接着剤を用いて切片を接着することによって再包埋を行い、ダイヤモンドナイフを用いてウルトラミクロトーム (ULTRACUT-OmU 4, REICHEL T JUNG Co., Austria) によって超薄切片を作製した。切片は1%酢酸ウラン50%エタノールとアルカリ性3%クエン酸鉛にて電子染色後、透過型電子顕微鏡 (HITACHI H-600, Japan) にて観察した。レーザー照射群および対照群の各日程における各細胞群の中から無作為に10個の細胞を選び、10,000倍以上に拡大して、メラノソーム数を計数した。メラノソームは電子顕微鏡的にその成熟段階を4段階に分けた。すなわち、小胞体およびゴルジ体より無構造の小胞として生じたものを stage I, これに内部構造の生じたものを stage II, メラニン沈着の開始したものを stage III, 完全にメラニン化したメラノソームを stage IV とした。stage I, II, III のメラノソームはプレメラノソームと呼ばれているが^{9,10)}、本研究では stage I については今回の拡大倍率では明確な判別が困難であったため計数を行わず、stage II,

III および IV の各段階別にメラノソームの計数を行い、その割合を計算した。

Ⅲ. 結 果

1. 光学顕微鏡的検索

1) 位相差顕微鏡所見

レーザー照射直後、2日後、10日後の培養中の黒色腫細胞を位相差顕微鏡にて観察したところ、照射直後の細胞には変性、培養器面であるスライドガラスからの剥離や形態的变化などの変性像はみられず、またメラニン色素の褪色もはっきりとは認められなかった。照射2日後の細胞においても同様に、変性像は認められなかったが、若干の褪色傾向が認められた。照射10日後においては、対照群の細胞には、日数の経過に伴って著明なメラニン色素の増加がみられるのに対し、レーザー照射群の細胞には、メラニン色素の増加は認められなかった (図2)。また、レーザー照射群のコロニーの細胞数は同日の対照群のコロニーの細胞数に比較して、やや減少傾向がみられた。

2) DOPA 反応および Fontana-Masson 染色

DOPA 反応の結果、対照群の細胞が高いチロシナーゼ活性を示すのに対し、レーザー照射群の細胞には明らかな活性を示さない細胞が多く認められた。また、Fontana-Masson 染色の結果は、対照群の細胞が日数の経過に伴いメラニン顆粒の目立った増加を示すのに対し、レーザー照射群の細胞では明らかなメラニン顆粒の減少を示した。これらの対比はレーザー照射後10日目において最も著明であった (図3)。

2. 電子顕微鏡的検索

1) 一般的観察所見

光学顕微鏡的には、メラニン色素の褪色傾向以外の変性はほとんど認められなかったが、電子顕微鏡的にはいくつかの変性がみられた。すなわちレーザー照射直後の細胞では、細胞内浮腫、小胞体の拡張およびミトコンドリアの腫大などの変化が認められたが、これらの変性はいずれも比較的軽度であり、照射後2日目以降の細胞にはほとんど認められなかった。一方ミエリン様構造物

図2 レーザー照射後10日目の位相差顕微鏡写真

レーザー照射後の細胞(2a)は対照群の細胞(2b)に比較して、目立った変性像もなく褪色が認められる

図3 レーザー照射後10日目の細胞に Fontana-Masson 染色を施した標本の顕微鏡写真

レーザー照射群の細胞(3a)は対照群の細胞(3b)に比較して、メラニン顆粒の量が少なくなっている

図4 レーザー照射直後の細胞にみられた変性像

*：無構造の小胞，矢印：破裂したメラノソーム，矢頭：ミエリン様構造物，ミトコンドリアの腫大も認められる

図5 レーザー照射後10日目の細胞にみられたメラノソーム分泌像

図6aに実線で囲んだ部分の拡大像。突出した部分に比較的成熟したメラノソームが入っている

(Myelin figure) や、脂肪滴に類似した無構造の小胞 (Intracellular vesicle) がレーザー照射群の細胞には多く観察され (図4, 表1), またレーザー照射直後の細胞にはメラノソームの破裂あるいは腫大も認められた。これらの変化は、レーザー照射後2日目の細胞にも認められたが10日目の細胞では明瞭ではなかった。*in vivo* においては、メラノサイトからケラトサイトへのメラノソーム運搬時にメラノソーム分泌像が観察される⁷⁾ が、*in vitro* においても、これに対応されるメラノソーム分泌像が観察された (図5)。このメラノソーム分泌像は、レーザー照射後2日目の細胞において対照群の細胞よりも高い頻度で観察された (表1)。

2) 各 stage におけるメラノソーム数の解析

照射2日後および10日後のレーザー照射群のメラノソーム数は対照群に比較して著しく少なかった (図6, 表2)。表2, 3に示すように、1細胞当たりの各 stage 別のメラノソーム数と、各 stage におけるメラノソーム数の割合の推移を解

表1 照射直後, 2日後, 10日後の各群の細胞のうち, メラノソーム計数に用いた10個の細胞中でそれぞれの細胞内小器官の変性像が観察された細胞数

	immediate		2 days		10 days	
	C.	L.	C.	L.	C.	L.
Myelin figures	8	10	5	9	2	7
Intracellular vesicles	3	10	6	10	9	10
Autophagosomes	4	2	4	5	5	5
Melanin secretion	3	2	1	4	5	3

C：対照群，L：レーザー照射群

析してみると、対照群の細胞においては、日数が経過するにつれてメラノソームの総数は増加し、特に stage III と IV の成熟したメラノソーム数の割合が増加した。これに対し、レーザー照射群においてはメラノソーム総数の減少がみられ、照射後10日目には、stage II のメラノソームの割合は対照群に比較してやや大きくなっており、stage IV のメラノソームについては対照群に比較してかなり少ない傾向を示した。なお、t-検

図6 レーザー照射後10日目のレーザー照射群と対照群の細胞の比較
レーザー照射群の細胞(6a)は対照群の細胞(6b)に比較してメラノソーム
の数が著しく少ない。ミトコンドリアや小胞体など周囲の細胞小器官の変性
はほとんど回復している

表2 レーザー照射直後, 2日後, 10日後の各群の
1細胞当たりのメラノソーム数(平均値)

	Melanosome Stage			
	II	III	IV	Total
Argon ion laser irradiated group				
immediate	7.6	52.9	3.9	63.8
2 days	3.8***	37.5*	4.0	45.3**
10 days	3.8*	37.7***	2.0**	43.5***
Control group (unlased)				
immediate	6.9	46.5	5.3	58.7
2 days	13.2	60.6	14.0	87.8
10 days	9.6	132.6	42.0	184.2

実験群と対照群の平均値はt-検定により有意差
を検定した

***: $p < 0.05$, **: $p < 0.10$, *: $p < 0.20$

表3 レーザー照射直後, 2日後, 10日後の各群の
細胞における各 stage ごとのメラノソーム数の
割合(平均値)

	Melanosome Stage			
	II	III	IV	Total(%)
Argon ion laser irradiated group				
immediate	11.9	82.9	5.2	100.0
2 days	8.4*	82.8**	8.8	100.0
10 days	8.7*	86.7*	4.6**	100.0
Control group (unlased)				
immediate	11.8	79.2	9.0	100.0
2 days	15.0	69.0	15.9	99.9
10 days	5.2	72.0	22.8	100.0

実験群と対照群の平均値はt-検定により有意差
を検定した

** : $p < 0.10$, * : $p < 0.20$

定によりメラノソーム数の有意差を検定すると,
照射後2日目の stage II, 10日目の stage III お
よび総数に, 対照群と比較して危険率0.05以下で
有意差が認められた。

IV. 考 察

今回の実験結果から明らかなように, 本研究で
は, アルゴンイオンレーザーをメラニン色素産生

性悪性黒色腫培養細胞に照射することによって、メラニン色素褪色効果が得られることを *in vitro* で初めて実証することに成功したといえよう。すなわち、レーザー非照射の対照群の細胞が培養日数の経過に伴ってメラニン色素の沈着を増したのに対し、レーザー照射群の細胞は、レーザー照射後、細胞の色調が明らかに褪色したことが位相差顕微鏡によって観察された。このようなレーザー照射群の細胞におけるメラニンの褪色は、Fontana-Masson 染色、電子顕微鏡による観察の結果によっても裏づけられた。

メラノサイトにおけるメラニン生成機序は、生化学的にも超微構造的にも詳細に研究されている^{7,8)}。本研究で観察された対照群の細胞における経時的なメラノソームの総数および各 stage のメラノソームの割合の変遷の状態は、培養中の悪性黒色腫細胞においても、メラニン生成能が *in situ* のメラノサイトと良く対応されるほど保持されていることを示しており、本細胞が本研究課題の遂行において、研究対象とするのにきわめて優れた細胞株であることを示している。アルゴンイオンレーザー照射によって、培養黒色腫細胞は明らかな褪色を示したが、これは超微形態学的には、1細胞当たりのメラノソーム総数の減少とメラノソーム各 stage の占める割合の変化としてとらえられた(表2, 3)。メラノソーム総数の減少と、その破壊像は互いに符合した現象であり、メラノソームの増加がみられないこととクロシナーゼの不活性化の所見とは、アルゴンイオンレーザー照射によるプレメラノソーム形成およびメラニン生成の障害を示唆するものと考えられる。レーザー照射群の細胞における未成熟なメラノソーム(stage II)の割合の増加傾向は、レーザー照射群の細胞におけるメラノソーム成熟の障害を示唆しているものと考えられ、クロシナーゼの不活性化もこれに関与しているものと思われる。また、レーザー照射群の細胞において、メラノソームの分泌亢進が認められた(表1)。このことは、メラノソーム破壊像の存在とともに、レーザー照射群における成熟したメラノソーム(stage IV)数の

減少に関係しているものと考えられる。

透過型電子顕微鏡による観察結果のうち、照射直後に出現したメラノソーム以外の細胞内小器官の変性が、照射後2日目には消失する現象は、これらの変性がメラノソームの破壊とは異なり可逆的なものであることを示しており、アルゴンイオンレーザー照射がメラノソームに特異的に障害を与えることを示唆しているものと考えられる。

レーザーの生物学的効果は、レーザー光のコヒーレント特性によるといわれている。レーザー光はそのコヒーレント特性により、ある限られた時間と空間における秩序ある高光子密度の状態を実現することにより、エントロピー増加をほとんど伴わずにエネルギーや運動量のみを運ぶことができるということから、レーザー光を吸収した部位において非常な高温が発生すると考えられている¹¹⁾。Murphy ら¹²⁾はヒト皮膚に、Garcia ら¹³⁾は培養ヒトメラノサイトに紫外線領域のパルス波 XeF エキシマレーザー(波長=351 nm)を照射して、本研究の実験結果と同様なメラノソームの腫大や破裂といった選択的障害を観察しているが、これはレーザー照射により、メラノソームとその周囲の細胞内小器官との間に大きな温度差が生じるために起きるのではないかと述べるとともに、細胞内に生じたこのような大きな温度差が、急速な体積の増加や微小な蒸散作用を生じさせ、パルス波によって生じる衝撃波とともにメラノソームの構造的破壊を起こすのではないかと推察している。本研究においても同様なメラノソームの選択的障害がみられたが、このことは連続波アルゴンイオンレーザー照射によっても、細胞内小器官ごとのレーザー吸収率に差があることにより生じる温度差が十分に大きいために、パルス波 XeF エキシマレーザーと同様な変化が生じたものと考えられる。

本研究において電子顕微鏡的に認められたミエリン様構造物と多くの脂肪滴に類似した無構造小胞は、一般的に自己消化に関連した事象と考えられている¹⁴⁾が、これらの変化は本研究でも培養日数の経過に伴った変動が認められたものの、いず

れの観察時期においてもレーザー照射群の方に出現頻度が高いことが認められた。このことは本実験の場合、レーザー照射によるメラノソームの破壊に伴ってこれらの変化が生じたものである可能性が高いと考えられる。内腔にメラノソームを貪食した自己食胞 (autophagosome) のみられる細胞は、レーザー照射群においても表 1 に示したように、照射後の培養日数の経過に伴う増加傾向はみられなかったが、このことは自己食胞はメラニン褪色機序に直接的には関係していないことを示唆するものと考えられる。

Nakajima ら¹⁵⁾は、培養チャイニーズハムスター線維芽細胞に $100\sim 400 \text{ J/cm}^2$ のアルゴンイオンレーザーを照射し、娘染色体の異常と、一時的な細胞周期の阻止とが起きることを報告し、このアルゴンイオンレーザーの光子エネルギーは紫外線の約半分にすぎないため DNA レベルでの変化は起こらず、染色体レベルでの遺伝子学的毒性をもつにとどまるであろうと述べている。今回の実験に用いたアルゴンイオンレーザーのエネルギーは 0.31 J/cm^2 であり、Nakajima らの用いたレベルの約 $1/100$ にも満たず、本実験に用いた程度のアルゴンイオンレーザー照射では、直接的な DNA レベルの変化を招来することはないと思われる。しかし、本研究においてレーザー照射後 10 日目の観察で、HMF-II 細胞の倍加時間 (約 35 時間) の 7 倍相当の時間が経過しているにも関わらずメラニン産生能は回復する傾向が認められなかったことは、レーザー照射によってメラニン産生能に恒常的な変化が生じたものとも考えられ、何らかの遺伝子学的な変化が起きている可能性を示すものであり、Nakajima らの述べているように、レーザー光を吸収することにより DNA 結合タンパクや DNA 修復酵素に振動や構造的変化が生じたことが推察される。

本実験で設定したレーザーの照射条件は、予備実験によって褪色効果の認められたものであるが、必ずしも褪色効果を得るための最適な照射条件ではない可能性もある。また、照射エネルギー密度との用量-反応の相関についても今後検討の

必要がある。しかしいずれにしても、アルゴンイオンレーザー照射によるメラニン色素褪色効果は、メラノサイトに対する直接的な非殺細胞的效果によってもたらされたものであり、レーザーの細胞生物学的効果の一端を明らかにし得たものと考えられる。

本実験は可視光レーザーの中で比較的短い波長の低エネルギーアルゴンイオンレーザーのただ 1 回の照射によって、ヒト黒色腫細胞のメラニン色素を褪色させることを明らかにし、その機序としてメラノソームの 1) 選択的破壊、2) 分泌亢進、および 3) 成熟阻害が考えられることを示した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始懇切なご指導、ご校閲を賜りました主任山本肇教授に深く謝意を表します。また、実験に使用した HMF-II 細胞を提供して頂きました東京医科歯科大学医学部第 2 病理学教室春日孟教授に厚くお礼申しあげます。さらに、終始ご教示、ご校閲を賜った口腔病理学教室茅野照雄講師に心より感謝いたしますとともに、ご助言、ご協力を頂いた口腔病理学教室の皆様にも厚くお礼申しあげます。

本研究の一部は第 77 回日本病理学会総会、International Congress of Laser in Dentistry, Tokyo 1988、および第 53 回口腔病学会総会において発表した。また、本研究の一部は昭和 61 年度文部省科学研究費補助金 (試験研究(2), 60870064)、および昭和 63 年度文部省科学研究費補助金 (試験研究(2), 62870072) の援助のもとに行われた。

文 献

- 1) 於保孝彦, 奈良美夫, 森岡俊夫: 歯肉メラニン色素沈着症に対するアルゴンレーザーの応用. 日本レーザー医学会誌 7: 207-208, 1987.
- 2) 長澤明範: 口腔粘膜色素沈着症に対するレーザー治療効果—その治験的検討—. 日本レーザー医学会誌 6: 515-518, 1986.
- 3) Atsumi, K.: Recent advance in laser medicine and surgery in Japan. (Edited by Joffe, S. N. and Oguro, Y.) Advances in Nd: YAG Laser Surgery. New York, 1988, Springer-Verlag, Chap. 9, 599-622.
- 4) Anderson, R. R., Parrish, B. S. and Parrish, J. A.: The optics of human skin. J. Invest. Derm. 77: 13-19, 1981.

- 5) 春日 孟, 野尻イチ, 古瀬 健, 久保あい子, 野田攸子, 菅野春夫, 坂元吾偉 : 色素形成の強いヒト黒色腫培養細胞株 (HMV-II) の樹立. 第35回日本癌学会総会記事 : 102, 1976.
- 6) Lillie, R. D. and Fullmer, H. M. : Histopathologic Technic and Practical Histochemistry. 4th edn., New York, 1976, McGraw-Hill Book Comp., Chap. 11, 523-524.
- 7) Luna, L. G. : Manual of Histologic Staining of Armed Forces Institute of Pathology. New York, 1968, McGraw-Hill Book Comp., Chap. 7, 104-105.
- 8) Miyamoto, H., Oginome, J. and Takeshita, K. : A method of simultaneous electron microscopic observation on the same spot indicated under light microscopy. J. Clin. Electron Microscopy 12 : 5-6, 1979.
- 9) Toda, K. and Fitzpatrick, T. B. : The origin of melanosomes. (Edited by Kawamura, T., Fitzpatrick, T. B. and Seiji, M.) Biology of Normal and Abnormal Melanocytes. Tokyo, 1971, University of Tokyo Press, 265-278.
- 10) Ghardially, F. N. : Ultrastructural Pathology of Cell and Matrix. 2nd edn., London, 1982, Butterworth, 599-615.
- 11) Inaba, H. : Essentials of Laser. Proceedings of the International Congress of Laser in Dentistry. (In Press)
- 12) Murphy, G. F., Shepard, R. S., Paul, B. S., Menkes, A., Anderson, R. R. and Parrish, J. A. : Organelle-specific injury to melanin containing cells in human skin by pulsed laser irradiation. Lab. Invest. 49(6) : 680-685, 1983.
- 13) Garcia, R. I., Tan, O. T., Flynn, E., Szabo, G. and Parrish, J. A. : Effects of ultraviolet excimer laser radiation on human melanocyte cultures. (Edited by Bagnara, J., Klaus, S. N., Paul, E. and Scharf, M.) Proceedings of the XIIth International Pigment Conference, Giessen, Federal Republic of Germany. Tokyo, 1985, University of Tokyo Press, 569-576.
- 14) Ghardially, F. N. : Ultrastructural Pathology of Cell and Matrix. 2nd edn., London, 1982, Butterworth, 458-465.
- 15) Nakajima, M., Fukuda, M., Kuroki, T. and Atsumi, K. : Cytogenetic effects of argon laser irradiation on chinese hamster cells. Rad. Res. 93 : 598-608, 1983.