総	説
---	---

レーザーの生体作用解明へのアプローチ

山 本 肇 茅 野 照 雄

東京医科歯科大学歯学部口腔病理学講座

An Approach to Biological Effects of the Lasers

Hajime Yamamoto and Teruo Kayano

Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry,
Tokyo Medical and Dental University

I. 序 言

レーザー光は、位相がそろい、波長が一定しており、単色性、指向性にきわめて優れた、高エネルギー密度の光束である¹⁾。したがって、レーザーの生体に及ぼす作用は、第一義的には「光」としての作用と思われる。しかしながら、レーザーの発見の当初からとくに注目されたのは、組織を一瞬のうちに凝固・炭化・気化・蒸散させることができる、レーザーの高エネルギーによる熱作用であった。これを利用したものがレーザー・メスであり、その有用性は、あらゆる臨床各科において、医療技術として定着しつつあることから明らかである²⁾。

歯科医療におけるレーザー応用の幕開けは、齲蝕の予防に代表される。すなわち、歯の硬組織レベルでのレーザー照射による耐酸性の効果を活用したものである。当然のことながら、臨床応用における照射条件は、被照射歯の歯髄への為害性がないことが必須である³⁾。ところが、そのような照射条件でレーザーを照射した場合、歯髄に、新たな硬組織が形成されていることが明らかにされ、レーザーは、歯髄を囲む厚い歯の硬組織を介して、歯髄に何らかの影響を及ぼしていることが示された⁴⁾。ここで注目されるのは、レーザーを

数カ月前にたった1回照射しただけで、歯髄に硬組織が形成されたことであり、レーザーの細胞に及ぼす生物学的効果として、きわめて興味ある所見であった。

本稿では、われわれが行った研究成果を中心に、レーザーが生体に及ぼす作用効果の本態について解明を試みてきた研究の足跡と、将来の展望について述べてみたい。

II. レーザーの生活歯髄に及ぼす影響に関する実験的研究

完成したヒトの歯では、エナメル質が無生物的であるのに対して、象牙芽細胞に裏打ちされた象牙質は、ある意味ではまさに生きている状態にあるといえる。そして、歯髄細胞は適当な刺激が加えられると、第二象牙質を形成することができる dormant な状態にある細胞である⁵⁾。もちろん、刺激が中断すれば第二象牙質の産生も中断する。このような点からも、ラット臼歯は歯科医学的にみてヒトの歯と相同のものとみてよいであろう。

レーザー照射による歯質への耐酸性の付与に際しては、レーザーのエネルギーの吸収を良くするために、歯面に黒色塗料（墨）を塗布する。歯面に墨を塗布して、連続波 Nd:YAG レーザーを1回照射したラット臼歯には、新生象牙芽細胞の

誘導にいたる歯髓の細胞動態を伴って、第二象牙質が多量、かつ進行性に形成される⁶⁾。すなわち、照射直後に生じた、象牙芽細胞層を中心とする軽度の変性が、速やかに回復するとともに、細胞緻密層にかけて未分化間葉系細胞が増生し、時間の経過とともに、細胞稀薄層に前象牙芽細胞が、続いて象牙芽細胞層に新生象牙芽細胞が出現し、回復した既存の象牙芽細胞とともに、盛んに第二象牙質を形成する。

これに対して、歯面に墨を塗布せずに、連続波 Nd : YAG レーザーを照射した場合には、レーザーによる第二象牙質の形成は認められない⁶⁾。

これらの結果は、黑色塗料を塗布して、連続波 Nd : YAG レーザーを照射した場合には、塗布しなかった場合に比較して、象牙芽細胞の賦活化を促す情報が、厚い硬組織を通して、歯髓に伝達されているものと理解することが可能であろう。この「情報源」は、いくつかあげられているレーザーの生物学的作用のうちの、どの作用に由来するものであろうか。

レーザーを照射したときの歯髓の温度については、ヒトの乳歯と幼若小白歯の抜去歯に、超音波 Q スイッチ Nd : YAG レーザーを照射した場合、墨を塗布しないもののほうが塗布したものよりも、髓室腔での温度が著しく高い⁷⁾。Nd : YAG レーザーが、生体に及ぼす主な作用は、一般的に熱の作用と考えられている。前記の Nd : YAG レーザー照射による第二象牙質の形成では、墨を塗布しなかったものは、墨を塗布したものの、3 倍以上の照射エネルギー密度でも、第二象牙質は形成されなかった⁶⁾。象牙芽細胞の賦活化を促す情報を、温度に変換されるレーザーの熱作用に求めるとすれば、墨を塗布した場合と塗布しない場合との、エネルギー密度の大小と、歯髓の細胞組織反応の有無とは、正の相関を示さないことから、矛盾を生じることとなる。すなわち、第二象牙質の形成を促したものは、レーザーの熱以外の作用に、「情報源」を求める必要があろう。

いずれにしても、たった 1 回の照射で、第二象牙質の形成にいたるまでの、数カ月にわたる歯髓

の細胞動態を惹起する情報（指令）を dormant な状態にある歯髓細胞に与えたレーザーの細胞生物学的な効果を、レーザーの「光」としての情報作用⁸⁾に求めることは、きわめて、魅力的な仮説ではなかろうか。

Ⅲ. レーザーの細胞に及ぼす効果を解析するための *in vitro* の実験系の意義

最近、破壊作用を伴わない低エネルギーレーザー光による、生体組織の刺激・活性作用が、医学の各分野において、とみに注目されつつある^{9,10)}。報告されたものには、創傷や難治性潰瘍の治癒促進、消炎、浮腫の改善、瘢痕の縮小、血行の改善、皮弁生着の促進、腫瘍組織の変性、皮膚科的疾患の治癒、代謝活性化、鎮痛、疼痛の緩解、知覚障害や神経麻痺などに対する鍼灸の効果といったさまざまなものがある。これらの作用機序を、統一的に理解することが可能であるか否かは別としても、低エネルギーレベルでのレーザー照射による生体のいろいろな反応現象を、細胞生物学的に説明することを試みることは、きわめて魅力的な課題である。

この課題の解明には、レーザーを組込んだ *in vitro* の実験系が有用であろう。すなわち、低エネルギーを利用したレーザーの効果は、病巣の微小環境の細胞や組織に対する、直接的な作用に基づく効果であると考えられるものがある。したがって、組織・細胞レベルにおける作用点や作用機序を明らかにするために、対象となる微小環境を培養系に再現してレーザーを照射し、照射後の微小環境の形態学的・機能的動態を、経時的に観察することは、きわめて興味深いものである。

以上の観点から、レーザーの培養細胞に対する直接的な作用効果と作用機序とを検索し、あわせて、その生物学的效果を活用した、レーザーの細胞工学的応用を可能とするシステムを開発することができれば、現在、レーザーの生体に対する生物学的效果の作用機序として考えられている、①光作用、②熱作用、③光化学作用、④圧力作用および⑤電磁界作用などについて、その本質を解

明する手掛かりを得ることが可能となると思われる。

IV. レーザーによるメラニン色素沈着症の治療効果の作用機序

メラニン色素沈着症に対するレーザー照射の褪色効果は、臨床的に経験されているところである¹¹⁾。

一般に、*in vivo*の現象を*in vitro*の実験系で解明しようとするとき、対象とする組織・細胞の*in vivo*と*in vitro*との異なる環境における、形態や機能の相同性を明らかにすることが、*in vivo*実験系と*in vitro*実験系との接点としての必要条件である。その意味で、メラニン色素産生能とDOPA反応（メラニン色素を産生する過程に関係するチロシナーゼ酵素の活性の有無を判定する反応）とは、*in vivo*におけるメラノサイトと*in vitro*における悪性黒色腫培養株細胞HMV-IIとの関係において、共通の相同性を確かめる指標として優れているものである。

HMV-IIのコロニーにアルゴン・イオンレーザーを1回だけ照射し、培養を続けると、黒色であったコロニーは徐々に褪色し、かつ、DOPA反応も減弱することが明らかにされ¹²⁾、さらに、レーザー照射後のHMV-II細胞では、メラニン色素の分泌(*in vivo*における、メラノサイトが隣接するケラチノサイトに、色素を注入することに対応)が亢進し、同時に、胞体には未熟なメラニン顆粒（チロシナーゼ酵素活性をもつ）が減少していることも示された¹³⁾。もちろん、レーザー照射による細胞傷害としての変性過程の現象ではないことも示されている。

これらの結果は、臨床的に経験されているレーザー効果を、*in vitro*の系で初めて再現したものであり、レーザーの褪色効果が、メラノサイトに対する、直接的な効果であることを明らかにしたものである。作用効果としては、ひとつには分泌促進が証明された。興味ある所見は、未熟なメラニン顆粒が減少していた点であり、この現象が、メラニン色素形成能の変化によるものであるとす

れば、レーザーによる、細胞の機能分化形質（この場合はメラニン色素形成能）の修飾の可能性を示唆する重要な知見といえよう。

光線とメラノサイトとの関係は広く経験されている。太陽光線が皮膚にあたると二つの光生物学的反応が起こる¹⁴⁾。一つは血管の反応で、太陽光線に曝露された直後から起こり、24時間後にピークに達する。第2の反応はメラノサイトの反応であり、肉眼的には褪色の反応(suntan)として表れる。このとき、メラノサイトにみられる変化は、メラニン色素の産生亢進と周囲ケラチノサイトへの注入促進およびメラノサイトの数的増加である。これらの細胞反応の引き金となったものは、紫外線であり、1回の曝露でもメラニン色素の形成が惹起される。

ここで興味深いのは、同じ紫外線でも波長によって、メラノサイトの反応が異なることである。すなわち、長波長域では、メラニン色素の形成亢進と注入促進とが、中波長域ではメラノサイトの数的増加と注入促進とが、それぞれ惹起される。そのうえ、1回曝露ではメラノサイトの数的増加は起こらず、2回以上の頻回曝露で数的増加が起こる。このように、メラノサイトは光を感じて、波長依存性に反応態度を異にする細胞である。

紫外線の場合には、メラニン色素の形成が活性化されて、色素沈着が亢進するのに対して、アルゴン・イオンレーザーの場合には、メラニン色素の褪色が起こる。いずれにしても、メラニンを産生する細胞（メラノサイト）に対する「情報源」としての「光」の作用を目の当たりにする思いである。

V. レーザー・マニプレーターを組込んだ細胞工学分野顕微鏡の開発

細胞には、遺伝情報としての作業指令を細胞質へ発する核と、細胞としての機能を発現する細胞質とがある。細胞質には種々の細胞内小器官が発達し、有機的な機能単位を形成している。レーザーを照射した場合の「情報」の「受容器」が、細

胞のいずれの構造にあるのかを明らかにすることは、レーザーの細胞に対する効果を解明するうえで、重要な課題である。

個々の細胞や細胞内小器官レベルに焦点を絞って、レーザー照射ができるシステムの有用性は、細胞生物学の方面からも注目されているところである^{15~18)}。しかし、これらの試みは、レーザーの集光性と破壊作用とを、技術として応用したものであって、医学的な立場から、レーザーの細胞生物学的な効果を解析したり、あわせて、その細胞生物学的な応用を試みたものではない。われわれが開発に取り組んでいる「レーザー・マニプレーターを組込んだ細胞工学用顕微鏡¹⁹⁾」とは、このシステムが、レーザーの医学的応用に関する研究を、基礎医学の立場から推進してきた、ひとつの結果としての必然性があるものである点が異なっている。

われわれのシステムの詳細はすでに報告してある^{12,20)}が、基本的には、恒温装置付きの培養倒立顕微鏡にレーザーを組込んだもので、対物レンズで絞ったレーザーのマイクロビームを、モニター上に入力した標的細胞（集団）の、任意の部位に照射することができるものである。照射部位の複雑な選択も、レーザー照射のためのソフトウェアを開発することによって、モニター上にマウス入力で設計したとおりに、顕微鏡の高精度ステージが自動的に微動走査して、照射することができるようにした。もちろん、モニターの同軸を使って、コマ撮り VTR 装置により、レーザー照射後

図 レーザー・マニプレーターを組込んだ細胞工学用顕微鏡システムの全景

の細胞（集団）の形態学的変化を、長時間にわたって撮影し、連続的に記録することもできる（図）。そして、必要に応じて、細胞や培養液を回収して、形態学的、生化学的あるいは分子生物学的な手法による、さまざまな検索を行うことも可能である。

現状のシステムで可能な細胞工学的応用に関するものは、以下のようなものがある。

① cell micromanipulation：細胞の任意の部位の穿孔や切断ができる。これは、細胞の超微細手術が非接触的にできる、理想的な方法である。

② 巨細胞形成：核小体にレーザーを照射すると、細胞は巨大化し、核分裂や細胞分裂を起こさない。

③ 細胞融合：隣接する細胞の接触部（細胞膜）にレーザーを照射することによって、細胞を融合できる。

④ 細胞集団の一部の除去：立体的な細胞集団の一部を、レーザー照射によって除去することが可能である。レンズで絞ったレーザーの効果は、焦点の一点に集中し、上下の光が通過した部位には効果が及ばないことを利用することによって、集団の内部の一部を非接触的に破壊除去することができる。ガラス毛细管を加工した microprobe を用いた従来の micromanipulation は、機械的な破壊であって、立体の内部のみを操作することは困難であった。

VI. レーザー・マニプレーターを組込んだ細胞工学用顕微鏡の応用の可能性

われわれが開発した「レーザー・マニプレーターを組込んだ細胞工学用顕微鏡」を用いた、本システムの細胞工学的応用に関する基礎的研究の成果は、レーザーのマイクロビーム照射による、非接触的な cell and organ micromanipulation の実現の可能性を、強く示唆するものである。

予備実験とはいえ、レーザー照射による細胞の巨大化や細胞融合の可能性が示されたことは、きわめて重要な成果であると考えられる。この技術を応用すれば、直接的な証明がなされていない、

破骨細胞に代表される多核細胞の由来, すなわち, それらの形成機序を明らかにすることも可能となると思われる。

レーザーのマイクロビーム照射による cell micromanipulation, すなわち, 細胞レベルでの超微細手術 (microdissection) の可能性は, すでに指摘されてきたことである^{15, 16)}。生物学の分野では, 細胞内小器官のレーザー照射による選択的破壊実験が行われ, 照射後の細胞機能の変化や脱落, あるいは形態の変化と関連づけることによって, 当該細胞内小器官の機能を類推することが行われている。また, レーザー照射によって染色体の一部に選択的に障害を与えることによって, 特定の遺伝子の存在場所とその機能を研究する方法として, 遺伝子工学的にも注目されている。さらに最近では, 分子生物学の方面でも, きわめて高能率な DNA トランスフェクションの方法として, その実用化が期待されている¹⁷⁾。

レーザーを核に照射すると, 細胞が巨大化するとの報告²¹⁾があり, われわれの予備実験の結果でも, 核小体が, 巨細胞化の Hot spot である可能性が示唆された。

われわれの予備実験のうち, とくに注目されるのは, レーザー照射による細胞融合の可能性である。今後, 至適照射条件などを明らかにする必要があるが, 任意の細胞同士を明視下に融合できる, きわめて応用範囲の広い, 重要な細胞工学的技術となることが期待される。

また, このシステムは, 細胞集団を照射対象とした場合には, 器官培養法を組み合わせることによって, 異種細胞間相互作用や cell-cell communication に代表される, 組織器官発生などの生命現象に関する, 次元の異なった新たな側面からの情報を得ることも可能であろう。

レーザーの生物学的効果は, レーザーの媒質・波長によっても異なることが知られている。われわれのシステムは, システムに導光できるレーザーであれば, その細胞生物学的効果について検索することができる普遍性をもっている。したがって, 将来, レーザー医学の主体となるであろう半

導体レーザー, あるいは, すでにその生物学的な効果が確認されている Nd:YAG レーザーや色素レーザーなどを本システムに組込んで, その生物学的効果やその作用機序を明らかにし, あわせて, その細胞工学的応用の可能性をも, 検索することができるものである。

VII. 将来の展望

レーザーの医学的応用は, 生体組織の気化・蒸散, 炭化, 凝固・壊死をもたらす, 高エネルギーレベルのレーザーを利用したものから, 非破壊的な低エネルギーレベルのレーザーを応用した診断や治療にまで, その有用性の期待はますます高まってきている。これらのなかには, 従来は不可能であった診断や治療を, 可能とするものも含まれている。

どのようなものにしる, 医療機器として定着するためには, 適応症に対して, 期待以上の安定した治療効果があるばかりでなく, その作用機序が明らかであることが, 臨床応用や安全性の面から必要である。しかしながら, レーザーの生体に及ぼす効果の作用機序については, 明らかにされたものが少ないのが現状である。

生命現象における光の重要性は, いまさら言を待たないが, 低エネルギーレーザー光の生体へのさまざまな作用を考えると「情報源」である「光」として, レーザーを捉えてみることは興味ある視点と思われる。

低エネルギーレベルのレーザーの, 生体にもたらす諸現象の作用機序を解明するためには, レーザーの生体に対する作用の素過程ともいべきものを, 明らかにする必要がある。レーザーを培養系に組込んだわれわれのシステムは, 生体内で複雑に絡んでくる無限の因子を断ち切って, レーザー自身の純粋な作用から, 諸現象を解析できる研究戦略機器として優れているばかりでなく, 新たな現象を生み出す実験系としても, 将来の展開が期待されるものである。

VIII. 結 語

エナメル質齲蝕の初期病巣の観察²²⁾と、レーザーの効率的な高エネルギー付与能とを結びつけた、基礎歯科医学の立場からの試み²³⁾は、レーザー照射による齲蝕の予防と抑制、さらには初期エナメル質齲蝕の治療³⁾へと、臨床歯科医学へ応用・還元されつつある。また、これらの研究の展開のなかで発見された、レーザー照射による第二象牙質の形成促進効果^{4,6)}は、歯内療法の方から注目され、生活断髄法への応用を試みたところ、良好な dentin bridge の形成促進効果が明らかにされた²⁴⁾。これは、レーザー照射を併用した「生物学的歯内療法^{25,26)}」の実現を期待させるものである。

これらの展開は、基礎歯科医学と臨床歯科医学とが、見事に融和した結果であるといえよう。すでに述べてきたように、レーザーの医学的応用の研究がまさに、生命科学の領域とも深く関わろうとしている今こそが、基礎医学と臨床医学だけにとどまらず、広く学際的な領域での研究体制を整えるときであるといえよう。

「レーザー・マニプレーターを組込んだ細胞工学用顕微鏡」の開発研究の一部は、文部省科学研究費補助金(課題番号: 60870064, 61480373, 62870072)の援助のもとに行われた。

文 献

- 1) 難波 進, 久保宇一: レーザーの基礎的原理とレーザー光の性質. レーザー医学 (渥美和彦責任編集), 東京, 1980, 中山書店, 3-49.
- 2) 佐野文男: レーザー外科の現状と未来展望. 日本臨床 45: 710-715, 1987.
- 3) Yamamoto, H. and Kayano, T.: Prevention of dental caries and treatment of early caries using the Nd: YAG laser. in Advances in Nd: YAG laser surgery (ed. by Joffe, S. N. and Oguro, Y.), New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, 1988, Springer-Verlag, 227-234.
- 4) 大久保 勉, 山本 肇: レーザ照射によるう蝕抑制の実験的研究. 東北大学歯学雑誌 1: 19-25, 1982.
- 5) Ten Cate, A. R.: Oral Histology 3rd ed., 1989, C. V. Mosby.
- 6) 中村幸生: 連続波 Nd: YAG レーザー照射によるラット生活歯髓の病理組織学的変化. 口病誌 54: 705, 1987.
- 7) 山田恵子: 小児歯科領域におけるレーザーによる齲蝕予防に関する研究. 小児歯誌 23: 575-591, 1985.
- 8) 稲場文男: “生命現象とレーザー”. 日本レーザー医学会誌 7: 1-3, 1987.
- 9) 田口喜雄, 黒川良望, 大原 到, 稲場文男, 葛西森夫: 低出力光照射の創傷治癒促進効果. 日本臨床 45: 749-755, 1987.
- 10) 神川喜代男, 田和宗徳: 鎮痛, 消炎作用. 日本臨床 45: 756-761, 1987.
- 11) 於保孝彦, 森岡俊夫: 歯肉メラニン除去への応用. レーザーの歯科への臨床応用とその基礎 (森岡俊夫, 松本光吉編著), 東京, 1988, クインテッセンス出版, 104-108.
- 12) 茅野照雄, 山本 肇: レーザーの細胞工学的応用. 日本レーザー医学会誌 8: 15-19, 1987.
- 13) 鈴木順子: 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. 口病誌 56: 38-46, 1989.
- 14) 神保孝一: メラニン色素をめぐる最近の考え方. 病理と臨床 5: 1056-1064, 1987.
- 15) Berns, M. W., Aist, J., Edward, J., et al.: Laser microsurgery in cell and developmental biology. Science 213: 505-513, 1981.
- 16) Berns, M. W.: Cells 2nd ed. Philadelphia, New York, Chicago, San Francisco, Montreal, Toronto, London, Sydney, Tokyo, Mexico City, Rio de Janeiro, Madrid, 1983, Saunders College Publishing.
- 17) Tsukakoshi, M., Kurata, S., Nomiya, Y., Ikawa, Y. and Kasuya, T.: A novel method of DNA transfection by laser microbeam cell surgery. Appl. Phys. B35: 135-140, 1984.
- 18) 永田哲士, 臼田信光: レーザービーム照射細胞の電顕ラジオグラフィによる観察. 組織培養 12: 40-45, 1986.
- 19) 山本 肇, 茅野照雄: レーザ・マニプレーターを組込んだ細胞工学用顕微鏡の開発. 口病誌 53: 362, 1986.
- 20) 茅野照雄, 山本 肇: レーザ・マニプレーターを組込んだ細胞工学用顕微鏡の開発. 病態生理 7: 229-234, 1988.
- 21) Cremer, T., Turner, A., Liaw, L-H. and Berns, M. W.: Giant cell formation produced by laser microbeam irradiation of chromatin in Chinese hamster cells. Exp. Cell Res. 134: 49-63, 1981.
- 22) 山本 肇, 松田耕策, 佐藤勝彦, 大家 清: エ

- ナメル質表層の微細構造と齲蝕感受性との関連について. 虫歯のシンポジウム, 齲蝕感受性—エナメル質の構造と組成 (須賀昭一, 石井俊文編), 東京, 1976, 口腔保健協会, 195-210.
- 23) Yamamoto, H. and Ooya, K.: Potential of yttrium-aluminum-garnet laser in caries prevention. *J. oral Path.* 3: 7-15, 1974.
- 24) 海老原 新: Nd: YAG レーザーの生活断髄法への応用に関する実験的研究. *日歯保誌* 32: 1670-1684, 1989.
- 25) Nagasawa, A.: Nd: YAG laser therapy in dental and oral surgery. in *Advances in Nd: YAG laser surgery* (ed. by Joffe, S. N. and Oguro, Y.), New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris, Tokyo, 1988, Springer-Verlag, 235-246.
- 26) 庄司 茂: レーザーと歯髓の硬組織化. レーザーの歯科への臨床応用とその基礎 (森岡俊夫, 松本光吉編著), 東京, 1988, クインテッセンス出版, 166-171.