

興奮性細胞に対する低出力レーザーの照射効果

Effects of low power laser irradiation on excitable cells.

04D5101 小松 光昭

指導教員 渡辺 一弘 教授

ABSTRACT

It has been reported that low-power laser irradiation (LLI) can block the conduction of nerve impulses and reduce the muscular fatigue. Since the underlying mechanism remains unclear, in this thesis, the effect of LLI on excitable cells was examined to clarify the action mechanism of LLI. We examined thermographic analysis on the effect of LLI (457-514 nm: 25-100 mW) on compound action potentials (CAPs) using the law of polar excitation in frog sciatic nerve. Negative correlations between each type of CAP amplitude and temperature deviation were obtained, resulting in good fitting curves of a quadratic function. We conclude that the suppressive effects of LLI on the polar excitations are mainly based on the thermal influence. In addition, we examined the effect of LLI (808 nm: 60 or 100 mW) on muscle contraction and conducted waveform analyses of the twitch curve, including alterations in the peak amplitudes of tension (AMP), latency (LAT), contraction period (CP), and relaxation period (RP). We conclude that LLI at relatively higher doses can influence muscle by retarding AMP attenuation and LAT prolongation, suggesting that 808 nm LLI influences both synaptic signal transmission at the neuromuscular junction and excitation-contraction coupling in the muscle fibers, but not the relaxation process.

In summary, these results facilitate the clarification of the action mechanism of LLI effects on excitable cells, and suggest a possibility of application to intractable nervous as well as muscular diseases.

Keywords: Low-power laser irradiation (LLI), Sciatic nerve, Compound action potential (CAP), Polar excitation, Gastrocnemius, Muscle contraction.

1. 序論

近年、レーザーによる治療が、従来の薬物治療・外科治療・放射線治療などでは難治の様々な疾患に対して用いられている。レーザー治療は非接触治療であるため、ウイルスなどの感染の危険性が少なく、治療による副作用が起こりにくいいため、薬物や手術に制限のある患者にも適用が可能であることや、レーザースポットを絞り込むことにより治療を要する部位のみの局所的な治療が可能である、光ファイバへの導波が可能であるなど、臨床において非常に重要な利点を有する。その中でも、組織やタンパク質を変性させない低出力レーザー照射 (Low-power Laser Irradiation: LLI) による治療が注目されている。LLIによる治療は生体の組織反応は生じるが障害は起こさない治療であり、創傷の治癒促進、疼痛緩和、抗炎症作用など、さまざまな効果が見出されており、臨床で応用されてきた。しかし、様々な波長や出力のレーザーを用いた研究が行なわれているが、生体に対する LLI の作用メカニズムについては不明な点が多く、作用スペクトルも十分に検討されていない。また、臨床においても医師の経験などに基づく治療方法が用いられているのが現状であり、そのため安全面への考慮から、末梢神経系の疾患治療にのみ用いられている。

本研究室ではこれまで、興奮性細胞の一つである神経細胞を用いた LLI の効果について研究を行ない、LLI が神経束の複合活動電位 (Compound Action Potential: CAP) を抑制することを明らかにした。そこで本研究では、神経活動に対する LLI の実験結果を再考しつつ、更なる検討を加えるとともに、もう一つの興奮性細胞群である筋肉の活動に対する LLI の効果について実験的検討を行なった。興奮性細胞に対する LLI の効果およびその作用メカニズムが解明されれば、現在において難治の神経疾患や筋疾患に対する新たな治療法開発へ結びつくこと期待される。

2. 神経活動に対する低出力レーザー照射

2.1 実験概要

神経情報の伝達には神経細胞膜に存在する種々のイオンチャネルが重要な役割を果たしていることが知られており、レーザー照射がこれらイオンチャネルに対して何らかの形で作用していると考えられている。しかし、神経膜のイオンチャネルの働きによって発生する「極興奮の法則」^{1,2)}における陰極閉回路興奮 (Cathode make excitation:

CE) と陽極開放興奮 (Anode break excitation: AE) に対する LLI の効果についての検討を行っている報告は見受けられない。これまでの筆者らの研究³⁾において、過分極性電位依存性・陽イオン非選択性電流 (I_h) の阻害剤である ZD7288 をカエル坐骨神経標本に滴下した場合の AE に対する特異的な抑制効果は可視光レーザーを照射した場合のそれと類似していることが示されている。しかしながら、その原因については形態学的変化も含めて、いまだ明確ではない。そこで本実験では、この極興奮に与える影響についてさらなる検討を加えるために、Ar⁺レーザーの波長、出力に対する実験結果を再考しつつ、特に神経標本における照射部位の特異性についての実験的検討を行なった。また、白色光源を導入して、単色性に関する特異性についても比較実験を行なった⁴⁾。さらに、レーザー照射時の温度測定実験により、LLI の作用メカニズムについて熱解析を行なった⁵⁾。

2.2 レーザー照射実験

実験装置の概要を Fig.1 に示す。実験標本として体重 55 ~ 80 g のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を使用した。摘出した神経標本を実験装置にセットする。パルス幅 10 ms の極大刺激強度で神経標本を刺激することにより極興奮が誘発される。CE と AE それぞれの CAP は神経標本上を伝導し、記録電極を介してメモリオシロスコープ上に波形が映し出される。オシロスコープに映し出された波形を X-Y レコーダにより記録し、CAP 振幅を測定する。CAP 振幅は個体により異なるため、最初の CAP 振幅を 100 % として標準化し、レーザー照射時間に伴う CAP 振幅の変化を測定した。神経標本をアクリル製の電極箱 (Chamber) により保護することでレーザー照射実験中の神経標本の乾燥を防いだ。実験には水冷式 Ar⁺レーザー (NEC 社製 GLG3600E、波長 457 ~ 514 nm、連続発振 (CW)、最大出力 2 W) を用いた。実験では、光学ミラーを用いて神経標本に対し垂直にレーザーを照射する。神経標本の太さは個体により異なるため、光学レンズを用いてビーム径を適宜調整する。電極径は約 1mm であり、陽極と陰極の間隔は約 5 mm である。刺激電極の陰極 (S2) から約 20 mm の距離に記録電極の陰極 (R1) を設置し、さらに間隔 5 mm の位置に記録電極の陽極 (R2) を設置した。照射波長を 514 nm に設定し、照射パワーを 25 mW, 50 mW, 100 mW のそれぞれの場合、および照射波長 457 nm, 488 nm に設定し、照射パワーを 50 mW に設定した場合それぞれにおいてレーザー照射による CE,

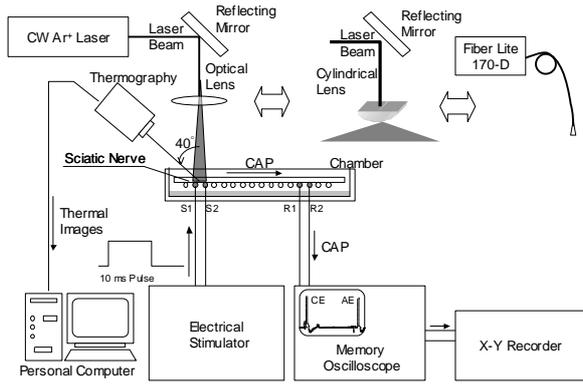


Fig.1 Schematic diagram of laser or white light irradiation system, including the nerve specimen and CAP measurement system.

AE の CAP 振幅の経時変化を測定した。同様の条件で実験を繰り返し、CAP 振幅の平均 (mean) 標準誤差 (Standard error of the mean: SEM) を求めた。また、レーザー非照射群 (Control) と照射群、CE と AE 間それぞれの有意差検定には Student の t 検定を用いた。

実験結果の代表的なものを Fig.2 に示す。レーザー照射前の CAP 振幅を 100 % とし、照射時間に対する CAP の変化を CE, AE それぞれについてプロットした。全ての照射条件において Control 群と比較して CAP 振幅の減少が確認された ($p < 0.05$)。Fig.2(a), (b), は波長 514 nm においてそれぞれ 25 mW, 50 mW で照射したときの変化、(c) は波長 488 nm, 50 mW 照射時の変化を表している ($n=10$)。照射 30 min の時点での CE と AE の CAP 振幅の平均は (a) では $88.4 \pm 19.7 \%$, $76.3 \pm 8.3 \%$, (b) では $82.3 \pm 4.3 \%$, $72.1 \pm 6.5 \%$, (c) では $79.8 \pm 7.9 \%$, $54.4 \pm 13.2 \%$ であった。波長 514 nm, 100 mW 照射において $84.7 \pm 12.7 \%$, $75.2 \pm 8.9 \%$ であり、同一波長の実験では照射パワーによらずほぼ同程度の抑制効果が確認された。レーザー照射 30 min までの各時間において CE と AE の有意差検定を行ったところ、25 mW においては照射後 20 min から 30 min まで、50 mW においては照射後 30 min において両者間に有意差が認められ ($p < 0.05$)、CE と比較して AE の CAP 振幅の減少が大きかった。100 mW においては両者間に有意差が認められなかった。波長 457 nm 照射における照射 30 min での CE と AE の CAP 振幅の平均はそれぞれ $46.8 \pm 17.9 \%$, $43.4 \pm 14.0 \%$ 、であり、同一の照射パワーであっても、照射波長を短波長にすることで神経活動の大きな抑制効果が得られることがわかった。また、CE と AE の有意差検定においては、波長 457 nm において有意差は認められなかったが、488 nm の場合において照射 10 min から両者間に有意差が認められ ($p < 0.01$)、AE の CAP 振幅が大きく抑制されていることがわかった。514 nm 照射において有意差が確認されたのは照射 30 min であり、このことから AE の CAP 振幅に対し、より大きな抑制効果を与える波長は 488 nm であることが示唆された。

以上の結果から AE に対して選択的に抑制効果を与える

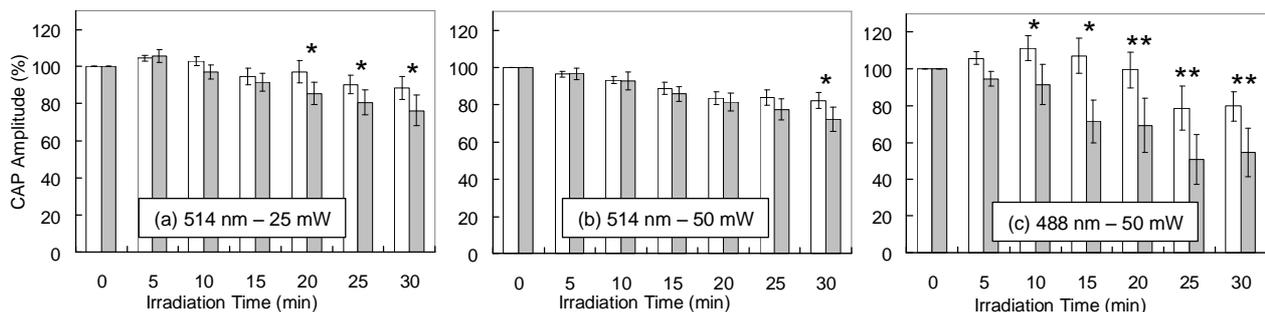


Fig. 2 Averaged alterations of standardized CAP amplitude: CE (white bars), and AE (gray bars). $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**).

レーザー照射条件が存在することが示唆された。また、シリンドリカルレンズを用いて神経標本全体へレーザー照射を行なう実験系を構築し、同様の実験を行なったところ、CAP の抑制効果は得られるものの、CE の CAP 振幅と AE の CAP 振幅には有意差が認められず、AE の発生部位に対してレーザーを照射することにより選択的な抑制効果が得られる、即ち AE の“発生”のメカニズムに影響を与えていることがわかった。さらに、レーザー光源の特長である単色性について検討を行なうために、神経標本の CAP 発生部位へ白色光源 (Fiber Lite 170-D) を照射する実験を行なったところ、CAP の抑制効果は得られたが、CE と AE の有意差は認められず AE への選択的な抑制効果は得られなかった。

2.3 LLI 効果の熱解析

一般に、神経活動へのレーザー照射効果については熱作用、光化学作用、電磁界作用、そしてこれらの複合作用による観点から論じられてきた^{6,7)}。上述のようないオンチャンネルを構成するタンパクへの選択的な効果は熱作用だけではなく、光化学作用の介在も考えられる。そこで、カエル坐骨神経標本の CAP への作用、特に AE への抑制効果が熱作用によるものかどうかという点を明らかにするため、温度変化との相関性について検討を行なった。神経標本表面のレーザー照射部の温度変化を測定するため、非接触温度測定が可能なサーモグラフィ (日本アビオニクス社製, TVS-700, 撮像波長 8~14 μm , 画素数 320x240 pixel) を使用した。また、サーモグラフィの較正のために、シース型熱電対 (安立計器社製, CHAL-010, シース外径 0.25 mm) を用いて、予めレーザー照射前の神経標本の温度測定を行ない、放射率設定を行なった。レーザー照射前の神経標本の温度分布画像および、照射開始から照射 30 min までの温度分布画像を取得し、それぞれの画像群におけるレーザー照射部の温度変化について熱解析を行なった。

レーザー照射部の温度変化の平均 ($n=5$) と CAP 振幅の変化を Fig.3 に示す。いずれの波長においても、照射直後から約 1 min で約 6 $^{\circ}\text{C}$ の急激な温度上昇がみられ、その後は緩やかな温度上昇が見られた。レーザー照射 30 min の時点での到達温度は、514 nm では 38.9 ± 2.4 $^{\circ}\text{C}$ 、波長 488 nm では 40.9 ± 2.5 $^{\circ}\text{C}$ であった。両照射間において 22 min からの温度上昇に有意な差があり ($p < 0.01$)、波長 488 nm 照射の温度上昇が大きかった。これは神経標本の波長に対する吸収率の差がもたらすものと考えられ、予備実験においても、波長 488 nm の光は 514 nm の光と比較して吸収率が高いという結果が得られている。Fig.3 (c) は CAP 振幅変化と神経表面の温度変化との間の負の相関関係について示したものである。すべての場合において相関関係が認められ、その相関関係は 2 次関数で近似したとき非常に強い相関係数 (514 nm: CE, $R^2 = 0.9302$; AE, $R^2 = 0.9663$; 488 nm: CE, $R^2 = 0.9702$; AE, $R^2 = 0.9993$) を示すものであった。さらに CAP 振幅が最初の 2/3 (67%) になるまでの温度変化を「温度閾値」と定義すると、514 nm の CE および AE の温度閾値は 20.3 $^{\circ}\text{C}$ と 17.3 $^{\circ}\text{C}$ となり、一方 488 nm の CE および AE の温度閾値は 17.8 $^{\circ}\text{C}$ と 12.1 $^{\circ}\text{C}$ となった。

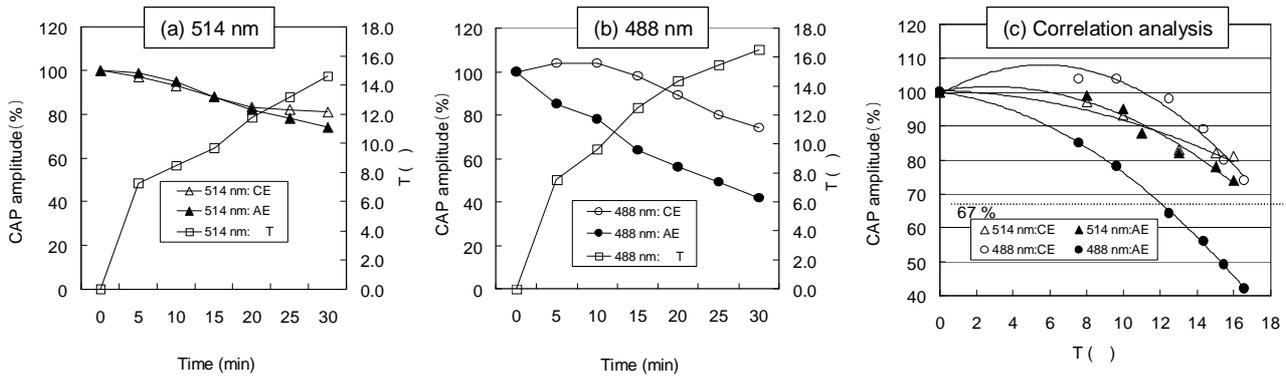


Fig.3 Alterations of CE, AE, and temperature deviation during 514 (a) or 488 nm LLI (b). Correlation analyses between the temperature deviation and each type of CAP amplitude (c).

2.4 考察

以上の実験結果から AE に対して選択的に作用するレーザー照射条件が存在し、その作用は CAP の“発生”に対して顕著であるということがわかった。よって、最適な照射波長のレーザーを CAP “発生”部位に局所的に照射することにより、AE を選択的に抑制する可能性が示唆された。

神経活動に対するレーザー照射効果についてはイオンチャンネルへの影響などさまざま議論されている。CE と AE の興奮性はそれぞれ異なるイオンチャンネルの働きにより発生しており、特に AE は持続的な過分極によって引き起こされる CAP であることから Ih チャンネルの関与が考えられている³⁾。Ih チャンネルは、心筋細胞で発見され、近年の研究において脳内の広い領域で神経細胞膜にも存在することが明らかになった。また、てんかん脳においてこの Ih チャンネルのはたらきが長期にわたり増強されていることが報告され⁸⁾、てんかん様発作波の発現に関与していると考えられている。AE に対して大きな抑制効果を示すレーザー照射条件が存在することは、レーザー照射が Ih チャンネルに作用している可能性を示すものである。今後の研究により、CE には影響を与えず AE のみを効果的に抑制する照射条件を見出すことができれば、レーザー照射によるてんかん治療にさらに一歩近づくとと言える。

また、熱解析の結果から、本研究の LLI 効果は基本的に熱作用に基づいている可能性を示唆している。また、いずれの波長の場合も CE より AE の温度閾値が低いことは、影響を与えているチャンネル分子が異なる可能性を示し、またそのチャンネル分子が 488 nm レーザーには高い感受性をもっている可能性を示している。熱エネルギー受容の仕方の違い、また光化学作用の関与も考えられる。したがって、本研究で得られた「LLI(488 nm・50 mW)による AE への選択的抑制」は、熱作用による Na⁺・K⁺チャンネルの阻害効果を基本としつつ、AE 発生に深く関与する Ih チャンネルへの熱作用または光化学作用が付加されて現出するものと考えられる。その抑制効果が顕著になるまでに 10~30 min という長い連続照射が必要になる理由は不明であるが、片岡ら⁹⁾によるラット海馬培養標本を用いての「近赤外レーザー(830 nm)の 10-15 min 照射が組織内 ATP 含有量を増加させ、それにより ATP 感受性 K チャンネルを開口させ、膜電位の過分極変化と膜抵抗の低下を引き起こし、興奮抑制効果をもたらす」という報告と類似のメカニズムが作用している可能性が考えられる。

3. 筋収縮に対するレーザー照射

神経活動への LLI 実験から、LLI が神経の興奮性を抑制する結果が得られ、神経細胞の興奮性にレーザーが何らかの影響を及ぼしていることがわかった。そこで、もう一つの興奮性細胞である筋肉に対しても何らかの効果が得られるのではないかと考えた。

筋組織に対する LLI の効果については、筋疲労を軽減させると報告されており、Lopes Martins et al. は 655 nm

の Ga Al As レーザー照射が、頻回刺激によりもたらされる筋疲労の間接的な代謝物質であるクレアチンキナーゼの活性を下げると報告している¹⁰⁾。一方、Nicolau らはマウス神経筋接合部へレーザー照射を行ない、655 nm の可視光では何らの効果も観測されないが、830 nm の近赤外レーザーではシナプス伝達効率の抑制が見られ、シナプス後膜のレセプターや 2 次情報伝達系へ影響を与えているのではないかと報告している¹¹⁾。しかし、これらのレーザー照射効果は不明な点が多く、最適なレーザー照射パラメータについては検討の余地があり、レーザー出力や照射エネルギー密度などの照射条件による効果の差異が指摘されている。本研究では、808 nm の近赤外レーザーを用いて、カエル腓腹筋標本の筋収縮に対する LLI 実験を行ない¹²⁾、筋収縮に対する LLI の効果と作用メカニズムについて実験的検討を行なった。

3.1 実験概要

実験標本は神経細胞への LLI 実験と同様にアフリカツメガエルを用い、坐骨神経-腓腹筋標本を作製した。実験装置の概要を Fig. 4 に示す。刺激装置として電気刺激装置 アイソレータ(日本光電社製, SEN-7203 / SS-104J)、記録系として変位/張力トランスデューサ用増幅器内蔵のメモリオシロスコープ(日本光電社製, TB611T/VC-11)を用いた。実験データはサーマルレコーダ(日本光電社製, RTA1-1100M)に記録するとともに、データレコーダ(SONY 社製, PC203AX)にも記録した。設置された腓腹筋の中心部の表面から 5 mm の位置に、ファイバレーザー(Power Technology 社製, IQ1A250, 波長 808 nm, CW)の出射口を固定し照射した。照射位置でのビーム径は約 5 mm、照射面積は約 0.79 cm²(標本の表面積の約 58%)であった。摘出した標本はアキレス腱を糸で固定し、張力トランスデューサに固定されており、坐骨神経に対し電気刺激(1 ms pulse, single shot)を行ない、腓腹筋標本の単収縮を観察しながら極大刺激強度を決定した。極大刺激を用いて 600 s(10 min)の刺激期間中 1 Hz で刺激を与え、誘発される単収縮波形の変化を観測するとともに、サーモグラフィを用いて筋肉の温度変化を観測した。

実験は、レーザー非照射時(Control)、60 mW 照射、100 mW 照射の 3 通りの条件を各 10 回行なった。実験により得

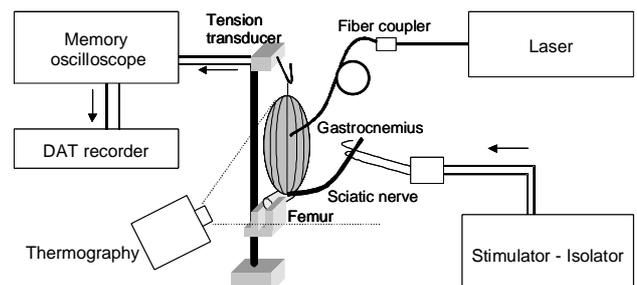


Fig.4 Schematic diagram of the recording, stimulating, and laser-irradiating system.

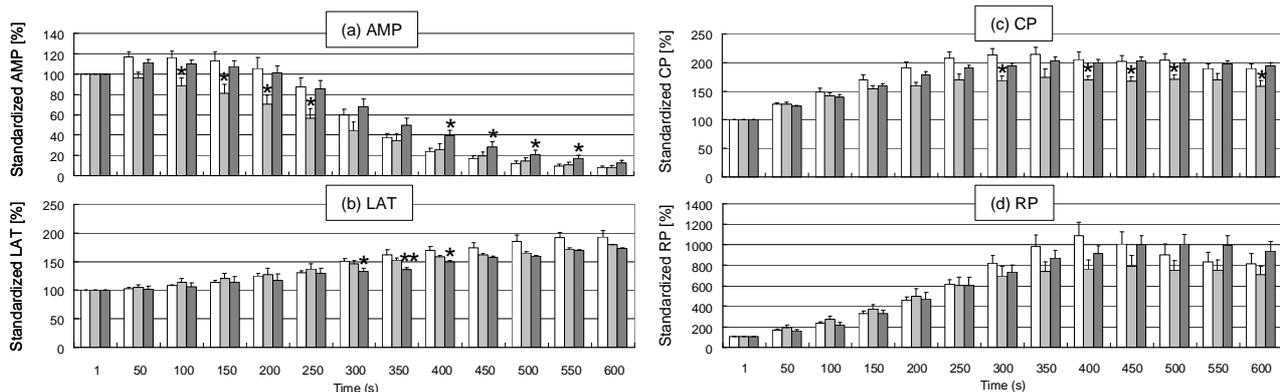


Fig.5 Averaged alterations of AMP (a), LAT (b), CP (c) and defined RP (d) during experiment: control group (white bars), 60 mW LLI group (light-gray bars), and 100 mW LLI group (dark-gray bars).

られた単収縮波形の波形解析から、振幅 (Amplitude: AMP), 潜時 (Latency: LAT), 収縮期 (Contraction period: CP), 弛緩期 (Relaxation period: RP) それぞれの値を測定した。得られたデータの個体差を考慮するため、実験開始直後の値をそれぞれ 100 %として標準化し、時間ごとに平均を求めた。有意差検定には Student の t 検定 (分散未知, 対応なし, 両側検定) を用いて Control 群とレーザー照射群との比較・検討を行なった。

3.2 実験結果

実験結果を Fig.5 に示す (a) から (d) はそれぞれ AMP, LAT, CP, RP の 50 s ごとの平均値と標準誤差を表している。レーザー照射の初期段階 (1~200 s) では Control 群の AMP は上昇する傾向を示すのに対し、60 mW 照射群では有意に減少 ($p < 0.05$) しており、100 mW 照射群では有意差は認められなかった。また、350~550 s の期間においては、Control 群、60 mW 照射群は同程度の減少を示しているのに対し、100 mW 照射群の AMP は有意に高い値を示し ($p < 0.05$)、AMP の減少が遅延する傾向を示した。このことから、波長 808 nm の LLI による筋疲労軽減効果が示唆された。

また、Control 群の LAT は時間とともに緩やかに延長していく傾向を示すのに対し、どちらの照射群も LAT の延長が遅延する傾向を示し、特に 100 mW 照射群では 300~400 s において有意差が認められた ($p < 0.05, 0.01$)。CP の比較においては、Control 群と 100 mW 照射群は同様の傾向を示すが、60 mW 照射群は比較的低い値を示し、いくつかのデータでは Control 群との有意差が認められた ($p < 0.05$)。RP の比較においては、いずれの場合においても同様の傾向を示し、有意差は認められなかった。

サーモグラフィによる温度測定結果から、レーザー照射部の温度上昇の平均 ($n=5$) は Control, 60 mW, 100 mW 照射においてそれぞれ、0.66, 1.61, 4.09 であり、有意差は認められないものの、レーザー照射条件による温度上昇の差が確認された。

3.3 考察

以上の結果から波長 808 nm の LLI が筋収縮の AMP 減少を遅延することが示唆され、筋疲労を軽減する可能性を示すと考えられた。また、単収縮の波形解析から、LLI の作用は筋収縮の緩和過程ではなく、神経筋接合部における情報伝達や筋線維の興奮収縮連関に影響を与えている可能性が示唆された。近赤外レーザー (GaAlAs, 830 nm, 12 J/cm²) をマウス神経筋接合部に照射した Nicolau らの研究で、シナプス伝達効率を抑制すると報告されている¹¹⁾。本研究の 60 mW 照射群では 100~250 s において AMP が有意に減少しており、その時点での照射エネルギーは 7.6~19.0 J/cm² であった。波長やエネルギー密度を考慮すると、本研究においても Nicolau らと類似した結果が得られている。このことは、60 mW の LLI がシナプス後膜におけるシナプス伝達効率を抑制する影響を与えていることを示唆している。一方、100 mW 照射群においては AMP の減少を遅延させる結果が得られており、比較的高い照射エネルギーを用いるこ

とにより、LLI による筋疲労軽減効果が得られると考えられる。照射量による温度上昇の差が確認されていることから、熱発生による筋疲労軽減の可能性も考えられる。しかし、照射エネルギーを大きくすることにより、筋組織に損傷を与える可能性も考えられ、最適な照射エネルギーを検討するとともに、近赤外よりも生体に対する吸収率が比較的高いとされている可視光レーザーによる実験、およびレーザー照射時の熱との相関性についても検討をしていく必要がある。

4. 結論

本研究では興奮性細胞である神経細胞および筋細胞に対する LLI の効果について実験的検討を行なった。神経活動に対する LLI の効果については CAP の抑制が認められ、効果的な照射条件が存在する可能性が示唆された。また、その作用は熱作用による Na および K チャネルの阻害効果を基本としつつ、AE 発生に深く関与する Ih チャネルへの熱作用または光化学作用が付加されて現出するものと考えられた。筋収縮に対する LLI の効果については、波長 808 nm の LLI によって筋疲労が軽減する可能性が示唆され、筋収縮の緩和過程ではなく、神経筋接合部における情報伝達や筋線維の興奮収縮連関に影響を与えている可能性が示唆された。

生体に対する LLI の効果については、様々な照射条件の下で数々の研究や活発な議論がなされており、本研究の実験結果および熱解析は LLI の作用メカニズム解明の一助となるものであり、新たな疾患治療への応用の可能性を示唆するものであると考えられる。

謝辞

本研究を行なうにあたって多大なる御助言を戴いた、生命情報工学科・木暮教授に心から感謝いたします。

参考文献

- 1) A. L. Hodgkin and A. F. Huxley: J Physiol. **116** (1952) 497-506.
- 2) A. L. Hodgkin and A. F. Huxley: J Physiol. **117** (1952) 500-544.
- 3) Y. Matsuda, et al.: Lasers Surg Med. **38** (2006) 608-614.
- 4) 小松光昭 et al.: レーザー研究. **35**(2007) 252-258.
- 5) 小松光昭 et al.: 日本レーザー医学会誌. **29** (2008) 127-133.
- 6) 前多一雄: 歯科放射線. **12** (1972) 84-101.
- 7) 亀井達哉: 日本口腔外科学会雑誌. **34** (1988) 54-66.
- 8) M. Kitayama et al.: Epilepsia. **44** (2003) 20-24.
- 9) 片岡洋祐 et al.: 第28回レーザー学会予稿集. (2008) s6-7.
- 10) R. A. B. Lopes Martins et al.: J Appl Physiol. **101** (2006) 283-288.
- 11) R. A. Nicolau et al.: Lasers Surg Med. **35** (2004) 236-241.
- 12) M. Komatsu et al.: Lasers Surg Med. **40** (2008) 576-583.