

動脈硬化部位コレステロールの 中赤外自由電子レーザーによる選択的除去

深見 裕子*, 鈴木-吉橋 幸子**, 粟津 邦男**

*防衛大学校 電気情報学群 電気電子工学科 (〒239-8686 神奈川県横須賀市走水1-10-20)

**大阪大学大学院 工学研究科自由電子レーザー研究施設 (〒573-0128 大阪府枚方市津田山手2-9-5)

Cholesterol Removal Using a MIR Free Electron Laser in an Atherosclerotic Region

Yuko FUKAMI,* Sachiko YOSHIHASHI-SUZUKI,** and Kunio AWAZU**

* Dept. of Electrical and Electric Engineering, National Defense Academy,

1-10-20 Hashirimizu, Yokosuka, Kanagawa 239-8686

** Institute of Free Electron Laser, Graduate School of Engineering, Osaka University,

2-9-5 Tsuda-Yamate, Hirakata, Osaka 573-0128

(Received March 20, 2003)

In order to estimate the optimum laser conditions for efficient dissociation of cholesterol ester in an arteriosclerotic region of blood vessels, we have investigated the relationship between the laser parameters and cholesterol ester dissociation using a MIR free electron laser (FEL). In this study, cholesteryl oleate, a typical cholesterol ester found in arteriosclerotic regions, was irradiated with 5.75- μm -FELs, which is known to cause vibration of ester bonds. The following results were obtained. (1) Ester dissociation depended upon the absorption coefficient. The macropulse duration was shorter than the thermal relaxation time, showing that the ester bonds dissociated into carboxylic acid and cholesterol by macropulse-induced thermal effects without accompanying thermal diffusion. (2) Using a wavelength of 5.75 μm , the maximum ester dissociation ratio was achieved under the optimum laser conditions of a macropulse energy density greater than 0.4 J/cm². (3) 5.75- μm -FEL was estimated to dissociate cholesterol ester under endothelial cells without thermal damage.

Key Words: MIR, Free electron laser (FEL), 5.75 μm , Cholesterol ester, Arteriosclerotic region

1. はじめに

血管疾患による死者は大変多く、その原因は高脂血症といった身近なものであり、適切な治療法の開発が急がれる¹⁾。血流を妨げ血管疾患を引き起こす可能性の高い粥状動脈硬化部位では、コレステロールが脂肪酸等とエステル結合することにより血管壁に蓄積している。このことから、粥状動脈硬化症の主要因はコレステロールエステルであるということが出来る²⁻⁶⁾。蓄積したコレステロールエステルを除去する場合、蓄積物を物理的に切削除去、または薬物により溶解除去する方法が現在用いられている。しかしながらこの方法では正常組織も同時に除去されてしまい、生体に対する負担が大きい。

我々はコレステロールエステルのエステル結合に着目し、エステルの状態を解除することでコレステロールエステルの蓄積を軽減する方法を提案する。ツールとして、高い物質選択性にて高効率に熱効果を誘起することのできる中赤外パルスレーザーが有用であると考えられる。これまで我々は、コレステロールエステルの一種であるオレイン酸コレステリルに対する中赤外自由電子

レーザー (free electron laser, FEL) 照射実験を行い、①波長 5.75- μm -FEL照射によってコレステロールエステルのエステル結合が分解しコレステロールおよびカルボン酸が生成すること⁷⁾、②①の効果は質量スペクトルを基にしたエステル分解率によって定量評価できること^{8,9)}、③①に見られたFEL照射効果は定常加熱効果と異なること¹⁰⁾、④5.75- μm -FELはタンパク質の一種であるゼラチンやアルブミンを透過し何ら照射効果を及ぼさないこと^{11,12)}、を報告してきた。

これらの結果を踏まえ本論文では、エステル分解率のFEL条件に対する依存性を検討することにより、照射効果のメカニズムの解明、高効率なエステル分解を与える照射条件の選定、コレステロールエステルを含む生体組織への中赤外FEL照射効果の見積りを行い、コレステロールエステルに対する中赤外パルスレーザーを用いた分解除去効果の有用性を検討した。

2. 中赤外FELによる コレステロールエステル除去の可能性

FELの中赤外域における連続的波長可変性¹³⁻¹⁶⁾によって、正常組織による吸収を避け、かつ、対象物質特有の光吸収に対応した波長を選択すれば、作用対象について物質レベルでの高い選択性を得ることができる。本章ではこのような効果を狙いとした、コレステロールエステルおよび中赤外FELを用いた実験について述べる。なお、本論文で用いた文字記号を全てTable 1にまとめて示した。

2.1 対象試料：オレイン酸コレステリル

本論文では、粥状動脈硬化部位からのコレステロール除去効果を基礎的な立場から検討するために、純粋な化学合成試料であるオレイン酸コレステリルを用いて実験を行った。オレイン酸コレステリルは、コレステロールエステル的一种であり、脂肪酸の部分がオレイン酸となっている¹⁷⁾(Fig. 1参照)。赤外吸収特性について、オレイン酸コレステリルは波長5.75 μm にエステル結合の伸縮振動に起因した鋭く大きな吸収ピークをもつ(吸収係数 $\mu_a = 650 \text{ cm}^{-1}$, 光深達長 $\delta = 15 \mu\text{m}$)。この吸収ピークはコレステロールエステルに特徴的で、このピークの有無に

よって組織内でコレステロールエステルの蓄積部位を識別することができる。さらにこの振動モードに照射波長を合わせることで、コレステロールエステルにエネルギーを効率よく供給し、効果的な照射を行うことが可能であると考えられる。熱特性としては、中赤外域における熱緩和時間は $\tau_{\text{therm}} = 10 \sim 100 \mu\text{s}$ 程度であること¹⁸⁾、定常加熱によって300 $^{\circ}\text{C}$ で炭化することが分かっている¹⁰⁾。

2.2 中赤外FELとコレステロールエステルの相互作用

FELはマイクロおよびマクロパルスの2重パルス構造をもつ(Fig. 2 (a))。本研究で用いたピークパワーを考慮するとマイクロおよびマクロパルスいずれによっても、誘起されるのは主に熱効果であると考えられる¹⁸⁾。まずマイクロパルスについて、パルス幅は $\tau_m = 5 \text{ ps}$ 、パルス間隔は $\tau_m' = 50 \text{ ns}$ である。パルス間隔 τ_m' が熱緩和時間 τ_{therm} より短いので、熱効果に対してはマイクロパルス列を連続波として扱うことができる、すなわち熱効果に関する相互作用時間はマクロパルスを考慮する必要があると考えられる。マクロパルスのパルス幅は $\tau_M = 15 \mu\text{s}$ 、パルス間隔は $\tau_M' = 0.1 \text{ s}$ である。マクロパルス幅 τ_M は熱緩和時間 τ_{therm} よりも短い程度であり、熱閉込め効果、すなわち光吸収領

Table 1 Parameters and their labels used in this article.

Parameter	Label	Unit	Value etc.
FEL IRRADIATION			
Wavelength	λ	μm	= 5.75, 6.10, 6.82
Bam spot size	s	cm^2	= 2.0×10^{-3}
Macropulse energy density	E_M	J/cm^2	= 0.1 - 1.6
Macropulse duration	τ_M	sec	= 2×10^{-6} - 15×10^{-6}
Macropulse interval	τ_M'	sec	= 100×10^{-3}
Macropulse peak power	P_M	W/cm^2	= E_M/τ_M
Micropulse duration	τ_m	sec	= 5×10^{-12}
Micropulse interval	τ_m'	sec	= 5×10^{-8}
irradiation area	s	cm^2	= 0.1
Irradiation time	t	sec	= 30 - 5400
Incident pulse number	n	-	= $10 \text{ ts}/S$, 1 - 100
CHOLESTERYL OLEATE SAMPLE			
Carbonization point	T_c	$^{\circ}\text{C}$	= 300 $^{\circ}\text{C}$
Absorption coefficient	μ_a	cm^{-1}	= 650 (@ $\lambda = 5.75 \mu\text{m}$)
Optical penetration depth	δ	μm	= $1000/\mu_a$, = 15×10^{-6} (@ $\lambda = 5.75 \mu\text{m}$)
Thermal relaxation time	τ_{therm}	sec	= 10^{-4} - 10^{-5}
Sample thickness	d	μm	= 50
Cholesterol content	C_d	mol%	
Ester dissociation ratio	R_d	%	
CALCULATIONS AT CHAP. 4			
Incident macropulse energy At The Upper Normal Tissue, Thickness	E_M	J/cm^2	vertical axis in Fig. 7
E_M , which rise temperature...	D	μm	Horizontal axis in Fig. 7
to 60 $^{\circ}\text{C}$	$E_{MP}(D)$	J/cm^2	Dark gray curve in Fig. 7
to 100 $^{\circ}\text{C}$	$E_{Mb}(D)$	J/cm^2	Gray curve in Fig. 7
to 374 $^{\circ}\text{C}$	$E_{Mc}(D)$	J/cm^2	Light gray curve in Fig. 7
At the cholesteryl oleate E_M , of which penetrated light can cause...			
Ester dissociation	$E_{Mmin}(D)$	J/cm^2	Black curve in Fig. 7
Vaporization	$E_{Mvap}(D)$	J/cm^2	Black dotted curve in Fig. 7

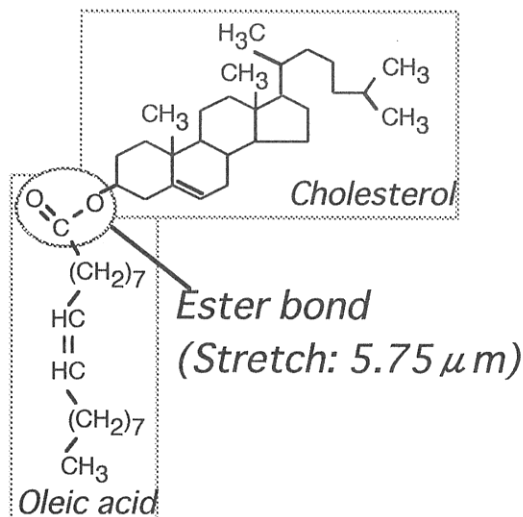


Fig. 1 Molecular structure of cholesteryl oleate. Cholesteryl oleate molecule consists of cholesterol and oleic acid, which are connected by an ester bond.

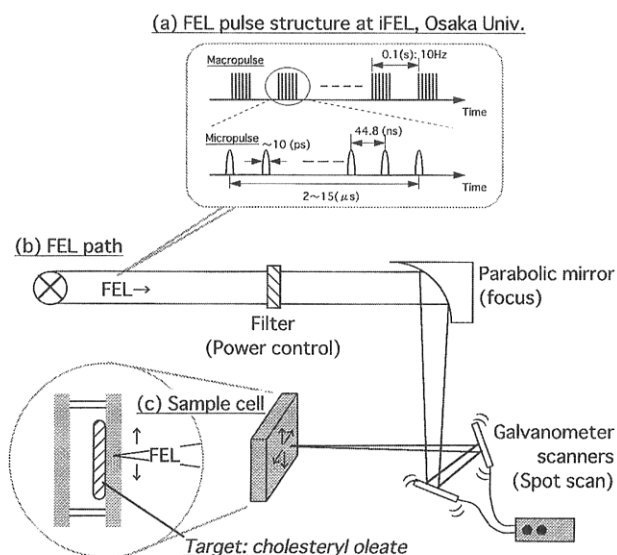


Fig. 2 Pulse structure of FEL (a), Optical path used in FEL irradiation experiments (b), and the ZnSe sample cell (c).

域 ($= s\delta$) 内のみ誘起される熱効果が得られると考えられる。また、マクロパルス間隔 τ_M' は熱緩和時間 τ_{therm} より十分長いので、各パルスによって誘起された熱効果はパルス間隔内において緩和し、各マクロパルスは独立した熱効果を誘起すると考えられる。

2.3 FEL照射系

FEL照射用試料として、ZnSeセルに閉込められたオレイン酸コレステリル膜 (Fig. 2 (c)) を用いた。1 mg のオレイン酸コレステリルを赤外透過性 ZnSe マド (厚さ 2 mm, 直径 32 mm) 上 20 mm² の範囲に塗布し、スパーサー (テフロン製, 厚さ 1 mm, 内径 30 mm) を用いて封じた。塗布されたオレイン酸コレステリルは厚さ $d = 50 \mu\text{m}$ ($> \delta = 15 \mu\text{m}$) とした。ZnSe マドの外側から FEL をコレステロールエ

ステル試料表面に対して照射した。

FEL照射に用いた光路を Fig. 2 (b) に示す。FEL は放物面鏡 (直径 50 mm, 焦点距離 300 mm) を用いて集光され、集光点面積は $s = 1.0 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$ (直径 350 μm) であった。ガルバノメータスキャナ (GSI lumonics: CX-660) によって集光点を試料表面上 $S = 0.2 \text{ cm}^2$ の範囲で二次元的に走査し照射実験を行った。ガルバノメータスキャナの試料表面上での走査速度を約 10^2 m/s とし、集光点の移動速度がマクロパルス幅 ($\tau_M = 15 \mu\text{s}$) に対して十分遅く、マクロパルス間隔 ($\tau_M' = 0.1 \text{ s}$) に対して十分速くなるように設定した。

2.4 コレステロールエステル分解率, R_d

FEL照射後、試料をクロロホルムに溶解し、その溶液を質量分析器 (JEOL: JMS-AX500) によって分析した。試料のイオン化にはキセノン原子による高速原子衝撃 (fast atom bombardment, FAB) 法を用いた。マトリックスは 3-ニトロベンジルアルコール ($\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{CH}_2\text{OH}$) であった。質量分析部は磁場型質量分析計であった。

Fig. 3 (a), (b) にオレイン酸コレステリルおよびコレステロールの質量スペクトルをそれぞれ示す。 $m/z = 370$ 近傍の質量数領域 I ($m/z = 365 \sim 375$) および $m/z = 385$ 近傍の質量数領域 II ($m/z = 378 \sim 390$) に着目する。コレステロールのスペクトル (b) は領域 I および II に質量信号が検出された一方、オレイン酸コレステリル (a) からは領域 I にのみ質量信号が検出された。領域 I および II には、図中に示したフラグメントイオン I および II がそれぞれ対応すると考えられ、フラグメントイオン II はコレステロールおよびオレイン酸コレステリルのいずれからも生成し、フラグメントイオン II はコレステロールからのみ生成された。

この領域 I および II の信号強度の比を用いることで、コレステロール・オレイン酸コレステリル混合試料内のコレステロールの含有率 C_d mol% を求めることができる。FEL照射によってエステル結合が解離し、コレステロールが生成することを考慮すると、この値は試料内におけるエステル分解率に相当する。さらに光深達長 δ を考慮する

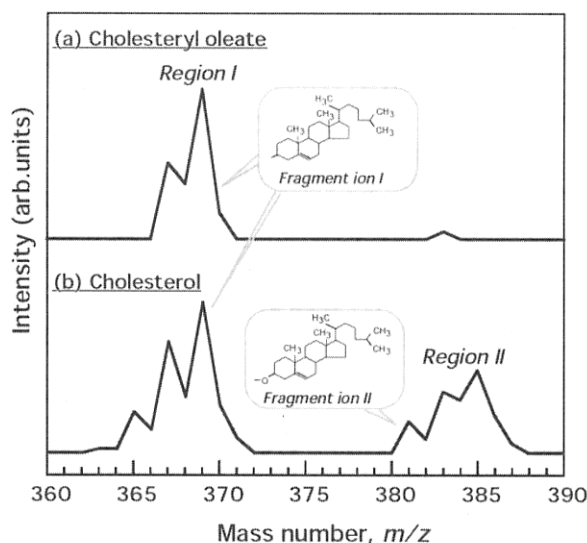


Fig. 3 Mass spectra of cholesteryl oleate (a) and cholesterol (b) are shown.

ことによつて、光吸収領域(=sδ)におけるコレステロールエステル分解率 R_d %を得ることができる⁹⁾。本論分ではこの R_d をFEL照射試料の評価に用いた。

3. FEL照射効果のメカニズム

本章では、各種FELパラメータに対する照射効果の依存性を分析し、本研究で観察されたFEL照射効果が熱効果であることを検証する。

3.1 パラメータ依存性

まず、FELの照射波長依存性を観察するために3つの波長を用いた。(1)エステル結合を振動励起する $5.75\ \mu\text{m}$ 、(2)エステル結合を励起しないが吸収係数は $5.75\ \mu\text{m}$ と同程度である $6.82\ \mu\text{m}$ 、および(3)オレイン酸コレステリルが顕著な吸収を持たない波長 $6.10\ \mu\text{m}$ 。ピーク帰属および吸収係数は、(1) $5.75\ \mu\text{m}$ について、エステル結合伸縮振動の吸収ピーク、吸収係数 $\mu_a = 650\ \text{cm}^{-1}$ 、(2) $6.82\ \mu\text{m}$ について、メチレン基変角振動の吸収ピーク、 $\mu_a = 500\ \text{cm}^{-1}$ 、また(3) $6.10\ \mu\text{m}$ ではピークはなく $\mu_a < 50\ \text{cm}^{-1}$ であった。FELを照射した試料の質量スペクトルをFig. 4 (a), (b)および(c)にそれぞれ示す。マクロパルスエネルギーは $E_M = 1.0\ \text{J/cm}^2$ 、入射パルス数は $n = 100$ であった。どの試料からもコレステロールエステルの存在を示すフラグメントイオンIの質量信号が質量数領域I($m/z = 365 \sim 375$)に観察された。さらに、 $5.75\ \mu\text{m}$ および $6.82\ \mu\text{m}$ 照射後の試料からは、コレステロールの存在を示すフラグメントイオンIIの信号が質量数領域II($m/z = 378 \sim 390$)に観察された。これらの結果から、励起した振動モードに関わりなく、オレイン酸コレステリル分子内のエステル結合が解裂したことが分かった。以上の結果から、FEL照射効果の波長依存性は

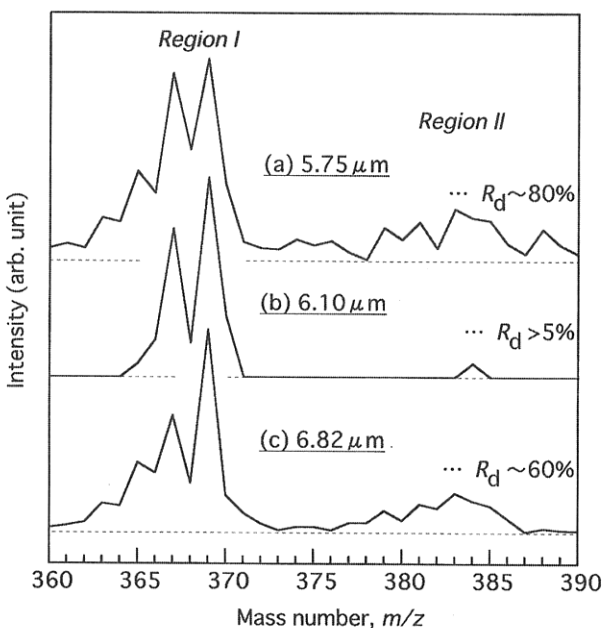


Fig. 4 Mass spectra of the samples irradiated by FELs, of which wavelengths were (a) $5.75\ \mu\text{m}$, (b) $6.10\ \mu\text{m}$, and (c) $6.82\ \mu\text{m}$, respectively.

吸収係数の違いに起因すること、すなわち吸収エネルギー量に依存する熱効果を反映するということが分かった。

次に波長を $5.75\ \mu\text{m}$ に固定し、マクロパルスエネルギー密度を $E_M = 0.1 \sim 1.6\ \text{J/cm}^2$ の範囲で変化させた。マクロパルスのエネルギーはピークパワーとパルス幅の積で決まる($E_M = P_M \tau_M$)ため、ピークパワーとパルス幅によって E_M を変化させた。Fig. 5にマクロパルスエネルギー密度を横軸として、エステルの分解率 R_d をプロットした。波長は $\lambda = 5.75\ \mu\text{m}$ 、入射パルス数は $n = 100$ であった。図中×印で示されたデータ点が(1)のパルス幅 τ_M を変化させた結果、○印が(2)のピークパワー P_M を変化させた結果に対応する。図を見ると分かるように、今回実験に用いたパラメータ範囲においては、どちらのパラメータを変化させた場合も R_d の E_M 依存性の傾向に違いが観察されなかった。このことから、エステルの分解がマクロパルス単位で誘起される熱効果であるということが分かる。Fig. 5から分かるように、 R_d の E_M 依存性には3つの段階があった。:

- (1) $E_M < 0.4\ \text{J/cm}^2$... $R_d < 5\%$, 主に観察されたのは融解等の可逆変化
- (2) $E_M = 0.4 \sim 1.0\ \text{J/cm}^2$... $R_d = 80\%$, エステル結合の高効率分解
- (3) $E_M > 1.2\ \text{J/cm}^2$... $R_d = 80\%$ の高効率エステル分解および、顕著な蒸散効果

実際のコレステロールエステル除去治療に対しては、(2)エステル高効率分解および、(3)エステル分解と蒸散の、2つの段階が有用であると考えられる(4章参照)。

Fig. 6に、エステル分解率 R_d の入射マクロパルス数 n に対する依存性を示す。 n は各集光点あたりの入射マクロパルス数である。波長を $\lambda = 5.75\ \mu\text{m}$ 、マクロパルスエネルギーを $E_M = 1.0\ \text{J/cm}^2$ とした。入射パルス数 $n = 20$ までは、 n が増加するにつれ R_d も増加し80%に達した。 n と R_d の関係は指数関数： $R_d = 0.8(1 - 0.78^n)$ で近似できた。

FEL照射による熱効果は1マクロパルス毎に独立に誘起

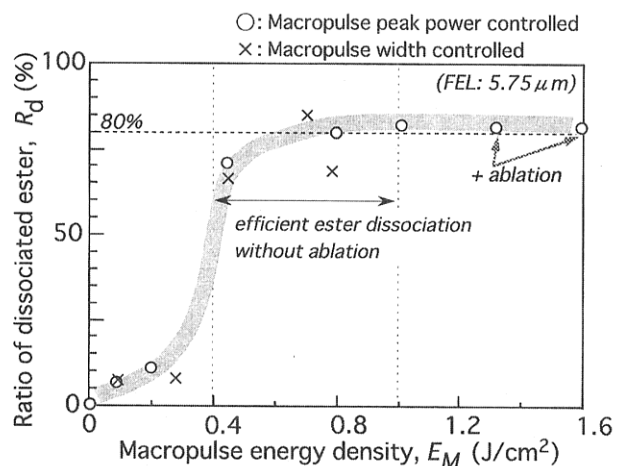


Fig. 5 Ester dissociation ratio, R_d , as a function of macropulse energy density, E_M .

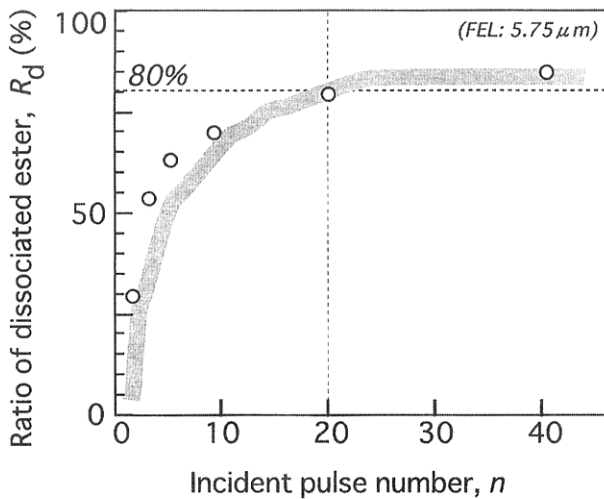


Fig. 6 Ester dissociation ratio, R_d , as a function of the incident macropulse number, n .

されるという結果が得られていることを考え合わせると、光吸収領域(= $s\delta$)において、1マクロパルス毎に未反応のオレイン酸コレステリルに対しておよそ0.8(1~0.78) = 18%の割合で、エステル分解が順次起こったと考えられる。

3.2 オレイン酸コレステリルにおけるFELの熱効果

定常加熱実験の結果からは、300 °C以下の加熱によってオレイン酸コレステリルの分子構造に何ら変化はなく、300 °Cを超えると炭化が生じることが分かっている⁹⁾。この炭化の初期に、分子内で比較的非対称かつ偏った電荷配置をもつエステル結合がまず解裂し引き続き様々な熱化学反応が誘起され、炭化物質が生成すると考えられる。以上からオレイン酸コレステリルの反応について次の条件があることが分かる。

- (a) 分子構造変化が起こるための温度に関する条件として、試料温度が300 °Cに達すること
- (b) 炭化が起こるためにはさらに時間に関する条件として、ある一定の時間温度条件(a)が満足され続けること

(a)が満たされた場合、オレイン酸コレステリルには分子内の化学結合構造の変化が生じ、(a)(b)ともに満足された場合には炭化が生じると考えられる。

一方、FEL($\lambda = 5.75 \mu\text{m}$)照射時の試料表面温度を見積ると、融解等の可逆変化が主に観察された $E_M < 0.4 \text{ J/cm}^2$ では推定表面温度は300 °C以下、分解率 R_d が急激に増加し80%に達した $E_M > 0.4 \text{ J/cm}^2$ では300 °Cを超える¹⁰⁾。定常加熱により炭化が300 °Cから始まったことを踏まえると、次のような過程が考えられる：

- ① 試料温度が300 °Cに達すると、上記分子構造変化の温度条件(a)が満たされ、エステルの分解が多くの分子において生じる(このことは高いエステル分解率 R_d という結果に反映される)
- ② 熱拡散が τ_{therm} の間に生じ、炭化が生じる間もなく試料は冷却される(炭化の時間条件(b)は満足されない)
- ③ エステルの分解物としてコレステロールおよびカル

ボン酸が観測される

②の過程は、FELの誘起する瞬間的な加熱効果によって説明される。熱緩和時間 τ_{therm} 程度の時間が経過するとFEL照射試料の温度は室温に戻る。このように、先に挙げた温度条件(a)および時間条件(b)の2つのうち、時間条件(b)が満たされないためにFEL照射試料においては炭化が生じないと結論できる。

また、1マクロパルスによるエステル分解率が18%に留まる(3.1節参照)理由として、マクロパルスによって温度条件(a)が満たされている時間は、全てのエステルが分解するために必要な時間よりも短いということが考えられる。光深達長内においてマクロパルスエネルギーが吸収され、温度上昇およびそれに伴うエステル結合解裂反応が生じる。生成した分解物はこの光深達長内にある濃度で分布し、分解物濃度は入射パルスが重なるごとに増加すると考えられる。このことから、1パルスの中赤外レーザーによってエステル分解が高効率に起こるために次の2つの条件が挙げられる：

- (a) 試料温度が300 °Cを超えるという温度条件
- (c) 温度条件(a)が一定時間満足され続けるという時間条件

これらの条件から、1パルスによってエステル分解を高効率に行うためには、パルス幅を長くして(a)の満足される時間を長くするという方法が考えられる。しかしながら、この場合、炭化の時間条件(c)をも満足する可能性、さらにパルス幅が熱緩和時間を超えた場合には周辺正常組織に対する熱損傷が起こる可能性が生じる。よって、エステル分解率の増加に対しては入射パルス数を選択する方法が適当であると考えられる。

次に蒸散効果について考察する。蒸散効果の有無はマクロパルスが誘起する温度上昇から判断できると考えられ、蒸散の観察された $E_M > 1.2 \text{ J/cm}^2$ のときの試料表面温度見積りから、次の温度条件が挙げられる：

- (d) 試料温度が800 °C以上になること

定常加熱の場合は、この条件が満たされる以前に条件(a)(b)が満足され炭化反応が起こるため、蒸散が起こらない。このことは定常加熱実験の結果から理解できる。

これらの考察から、FEL照射によって起こるエステル分解や蒸散の効果は、マクロパルスが誘起する、定常加熱よりも時間幅の短い(μs ~ ms)熱効果によって生じることが分かった。本節で述べた(a)~(d)の条件の組合せによって、誘起される反応が決定される：

- ・ (d)が満たされる \Rightarrow 蒸散
- ・ (a)および(c)が満たされる \Rightarrow エステル分解
- ・ (a)および(b)が満たされる \Rightarrow 炭化

前者2過程は中赤外パルスレーザーである中赤外FELによってのみ誘起される過程である。中赤外FELのパルスによると、瞬間的な加熱とそれに伴う炭化のないエステル分解や蒸散が誘起できる。

4. コレステロール除去に適したFEL条件

4.1 コレステロールエステル分解に適したFEL条件

3章においてレーザーパラメータ依存性を観察し、その効果のメカニズムを考察した。ここでは、高い分解率($R_d = 80\%$)を与えるFELパラメータをまとめて再掲する：

- ・波長： $\lambda = 5.75 \mu\text{m}$ (エステル結合振動励起)
- ・パルスエネルギー： $E_M >$
 - ① 0.4 J/cm^2 (エステル分解)，② 1.2 J/cm^2 (エステル分解および蒸散)
- ・パルス幅： $\tau = 10 \sim 100 \mu\text{s}$ (熱閉込め)
- ・パルス間隔： $\tau > \text{ms}$ (室温への緩和)
- ・パルス数： $n = \text{数十パルス}$ (数十 J/cm^2)

3.1節において、吸収係数の大きな波長であればエステル分解が誘起されることが分かった。生体に対する照射では、生体組織を構成するタンパク質および水の赤外吸収波長から離れた波長を用いる必要がある。波長 $5.75 \mu\text{m}$ は、 $3 \mu\text{m}$ 帯や $6.82 \mu\text{m}$ に比較して正常組織による吸収の少ない波長であり、生体応用に最適であると考えられる⁹⁾。

4.2 生体適用時の照射効果の見積もり

コレステロールエステルが正常組織に覆われている場合、まずFELは正常組織に入射し一部が正常組織に吸収され、残りの光がコレステロールエステルに入射する。吸収された光は、正常組織で条件によっては熱損傷を伴う温度上昇、コレステロールエステル層においては分解および蒸散効果をもたらす。本節では、正常組織の上からFELが入射したときの、コレステロールエステル分解効果および、正常組織に対する熱損傷を見積る。

4.2.1 水/コレステロールエステル2層モデル

本節では、正常組織(厚さ $D \mu\text{m}$)を介してコレステロールエステルにFEL(マクロパルスエネルギー $E_M \text{ J/cm}^2$)が入射する場合を想定する。生体軟組織を、その80%以上を構成する水に近似し、光および熱特性の数値は水のものをを用いた。

Fig. 7に見積りによって得られた各種条件を示した。横軸は正常組織の厚さ D 、縦軸は正常組織の上から入射するFELのマクロパルスエネルギー E_M である。図中黒線はエステル分解に必要なとされる最低入射パルスエネルギー $E_{Mmin}(D)$ である。この黒線より上の E_M および D の組合せを用いれば、正常組織下のコレステロールエステルに、分解に必要なエネルギーが到達することになる。正常組織厚 D が大きくなるにつれ、必要な入射パルスエネルギーは指数関数的に増加する。また、蒸散の条件についても同様にして図中黒点線のプロット $E_{Mvap}(D)$ が得られる。

正常組織へのレーザー照射時における要求は、熱損傷が小さいことである。組織温度が 60°C (タンパク質変性温度)、 100°C 、 374°C (水の臨界温度)となるマクロパルスエネルギーを、Fig. 7にそれぞれ濃灰色($E_{Mp}(D)$)および淡灰色($E_{Mb}(D)$)の実線、および淡灰色の点線($E_{Mc}(D)$)で示した。このプロット線の下領域にある D と E_M の組合せが、レーザー照射によっても到達温度が 60°C 、 100°C もしくは 374°C を超えない、すなわちタンパク質変性や水の爆発蒸散が起らない条件となる。

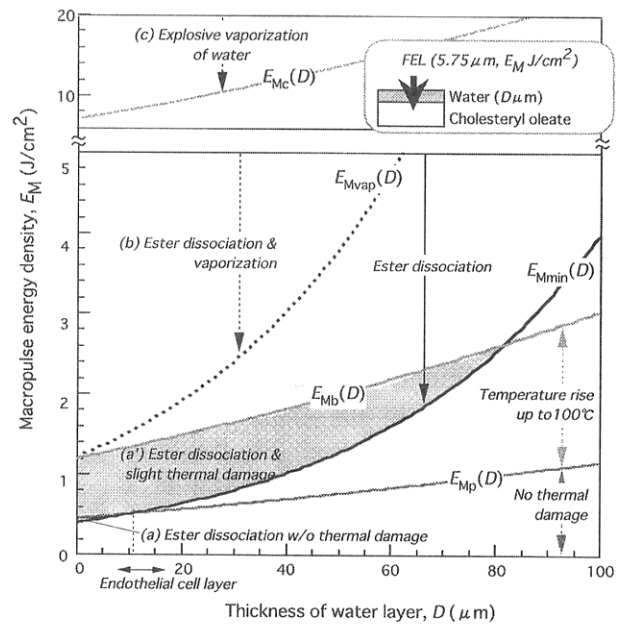


Fig. 7 Estimation of 5.75- μm -FEL irradiation effects onto 2-layer-model of water/cholesteryl oleate.

4.2.2 期待される治療効果

本節では、各曲線によって仕切られた領域(Fig. 7 (a)~(c))において期待される治療効果を検討する。

Fig. 7領域a, a':ソフトな除去…内皮細胞に熱損傷を及ぼさないエステル分解。Fig. 7領域(a)の部分は、非侵襲であることと、コレステロールエステルに対する高分解率を同時に満たす条件である。たとえば正常組織厚 $D = 13 \mu\text{m}$ 、入射パルスエネルギー $E_M = 0.5 \text{ J/cm}^2$ という条件の組合せがこの中に含まれる。血管内壁のコレステロールエステル蓄積部位を覆っている血管内皮細胞はおよそ $D = 10 \mu\text{m}$ の厚さであることが知られており¹⁷⁾、先ほどの照射条件の組合せに対する現実的な適用が可能であると考えられる。

コレステロールエステルはエステル分解により遊離コレステロールになることで、コレステロール逆転送系等の生体内代謝系によって肝臓に再吸収されることが可能となる¹⁾。代謝の効果については*in vivo*の照射実験および経過観察を行う必要があるが、エステル分解、肝臓への再吸収によって結果的に血管内腔を拡張することができると考えられる。また、内皮細胞は血管の弾性等重要な特性を制御する機能をもつ¹⁷⁾ため、これに損傷がない条件は低侵襲性に優れた照射方法であると言える。コレステロールエステルに対する波長 $5.75 \mu\text{m}$ 光の光深達長は $\delta = 15 \mu\text{m}$ 程度と浅いため、このソフトな除去による治療は主に、粥状物質の蓄積が軽度の場合および、内径 1mm 以下程度の細い血管内に照射する場合における適用が適当であると考えられる。

Fig. 8に内皮細胞を介したFEL照射系の模式図を示す。光源はファイバークレーテルを通して血管内に導光され、ファイバー端は内皮細胞層の上部に密着させ、血液等が挟まらないようにする。これによってコレステロー

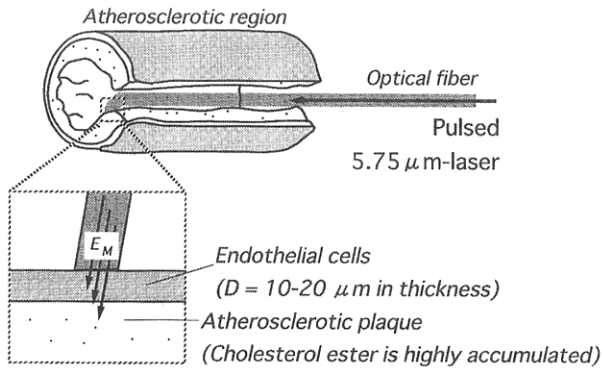


Fig. 8 Proposed irradiation setup using 5.75- μm -FEL for clinical use.

ルエステルと光源の間隔 D を $20\ \mu\text{m}$ 以下とすることができる。ファイバー端における出射パルスエネルギーを $0.5\ \text{J}/\text{cm}^2$ にして照射することにより、約 $10\ \mu\text{m}$ 厚の内皮細胞に熱損傷なく、コレステロールエステルの高効率分解を実現できると考えられる。さらに、正常組織の温度上昇を $100\ ^\circ\text{C}$ まで許容する場合には、ファイバー端とコレステロールエステル蓄積部位の間隔は $D = 80\ \mu\text{m}$ まで広げることが可能であり、照射時の幾何的条件が緩和される (Fig. 7領域(a'))。このような系において照射を行う場合、必要なパルス数は数十パルス程度、 $10\ \text{Hz}$ のFELを用いれば照射時間は数秒で十分であると考えられる (3.1節参照)。

また、今回想定した照射波長 $\lambda = 5.75\ \mu\text{m}$ は正常組織に対して吸収が少なく照射効果は小さいので、誤照射による損傷は小規模に留まる。照射部位の正常組織(内皮細胞)の下にコレステロールエステルがなく、動脈壁に入射した場合にも、その上昇温度は表面の内皮細胞における見掛け温度を超えることはない。このように、この照射方法は熱効果の低侵襲性だけでなく、照射生成物の安全性や誤照射に対する低危険性からも、安全性が高い方法であるということが出来る。中赤外レーザーを用いたこのような照射条件および照射配置は、血管内皮細胞の下の粥状硬化部位からコレステロールエステルを除去する方法として実際に役立つと考えられる。

Fig. 7領域b: ハードな除去…エステル分解を伴った蒸散。領域(b)は粥状物質にコレステロールエステルを蒸散するエネルギーが入射するような照射条件である。粥状物質が多量に蓄積し、血管内部の閉塞度が高い場合、低侵襲性よりも除去の高効率性が優先される。この場合には蒸散効果をともなった「ハードな除去効果」が有効となると考えられる。治療効果としては、物理的な粥状物質蒸散除去により高効率な血管内腔拡張が行えると考えられる。加えて、蒸散されなかった蓄積物にもエステル分解の照射効果が生ずると考えられ、更なる血管内腔拡張が期待できる。このエステル分解を伴う点が、従来のレーザーによる蒸散・焼灼と異なる点である。

Fig. 7領域c: 爆発蒸散除去…正常組織の気化による組織除去。波長 $5.75\ \mu\text{m}$ のレーザー光によっても正常組織内の水を吸収体とした従来のレーザーと同様の効果を生ずる

ことが可能である。 $E_{\text{Mc}}(D)$ の曲線より上のエネルギーでは必ず水は爆発的に蒸散し、光吸収領域に相当する部分が除去される¹⁸⁾。この過程はコレステロールエステルによる吸収に関係のない、水を介した熱効果であり、従来中赤外レーザーの誘起する効果と同様の効果である。コレステロールエステルに選択的に照射効果を及ぼす過程ではないため低侵襲性に欠けるが、効果的な除去効果が得られると考えられる。

最後に、光吸収領域の周辺における熱効果について考察しておく。波長 $5.75\ \mu\text{m}$ のFELが正常組織層を透過し、下層のコレステロールエステルに $E_{\text{M}} = 0.4\ \text{J}/\text{cm}^2$ 以上のマクロパルスエネルギーが到達すると、コレステロールエステル表面の温度は $T_{\text{irr}} = 300\ ^\circ\text{C}$ 以上になると推測された (3.4節参照)。中赤外パルスレーザーによって誘起されたこの高温状態は熱閉込め効果によるものであり、バルク(周辺組織)に対するエネルギーとしては十分小さいものと見なすことができる。さらに、オレイン酸コレステリルの比熱が $1.6\sim 1.8\ \text{J}/(\text{gK})$ であるのに対し、正常組織の主成分である水の比熱は $4.2\ \text{J}/(\text{gK})$ であり、約3倍程度大きい。このように、正常組織/コレステロールエステル界面での熱伝導によっても、その温度上昇は熱損傷の殆ど起こらない程度に留まることが推測できる。

5. まとめ

本論文では、中赤外レーザーによる動脈硬化部位コレステロールエステル除去についての基礎検討を目的として、中赤外FELをオレイン酸コレステリルに照射し、質量スペクトルに基づくエステル分解率を用いて照射効果を定量的に評価し、以下の結論を得た。

- (1) 中赤外FELのマクロパルスは熱緩和時間程度の瞬間的な熱効果を誘起し、結果として炭化のないエステル分解や蒸散が起こることが分かった。
- (2) FEL照射条件[波長: $5.75\ \mu\text{m}$, マクロパルスエネルギー: $0.4\ \text{J}/\text{cm}^2$ 以上, パルス数: 数十パルス以上, パルス幅: 熱緩和時間以下]によって、80%以上のエステル分解率が得られることが分かった。
- (3) 医療応用への基礎検討として、経血管ファイバー導光による血管内皮細胞層を介して波長 $5.75\ \mu\text{m}$ の中赤外パルスレーザーを照射することによって、内皮細胞層に熱損傷のないコレステロールエステル除去効果が得られる可能性を示した。

以上のことから、中赤外パルスレーザーによる生体内コレステロールエステルに対して、その局所的・瞬間的な熱効果を用いた、エステル分解および蒸散による除去効果が、医療の現場において有力なツールとなる可能性を示した。今後、コレステロールエステルを含む生体において照射効果を評価し¹⁹⁾、さらに生体の代謝の影響を観察することが必要であると考えられる。

謝 辞

自由電子レーザー発振にご尽力いただきました三菱電

機システムサービス隈昭一郎氏ならびに田中幹朗氏に感謝いたします。質量分析にご協力いただきました大阪府立大学松原浩博士に心より感謝いたします。資料収集にご協力いただきました近畿大学佐野秀氏に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 中野重徳：コレステロール（新星出版社，東京，1997）。
- 2) T. Takano, K. Ananuma, J. Ohkuma, and K. Kanasaki: *Acta. Histochem. Cytochem.* **19** (1986) 135.
- 3) T. Takano and C. Mineo: *J. Pharmbio-Dyn.* **13** (1990) 385.
- 4) J. Hayashi, T. Saito, and K. Aizawa: *Therapeutic Res.* **16** (1995) 3064.
- 5) T. Saito, J. Hayashi, H. Sato, H. Kawabe, and K. Aizawa: *Med. Electron. Microsc.* **29** (1997) 137.
- 6) J. Hayashi, T. Saito, and K. Aizawa: *Lasers Surg. Med.* **21** (1997) 287.
- 7) Y. Fukami, Y. Maeda, and K. Awazu: *Nucl. Instrum. Methods B* **144** (1998) 229.
- 8) Y. Fukami, M. Heya, H. Matsubara, and K. Awazu: *Proc. Int. Symp. Infrared Free Electron Laser and its Application, Tokyo, 2002*, *Jpn. J. Appl. Phys. Suppl.* **41-1** (2002) 2132.
- 9) Y. Fukami and K. Awazu: *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) 3716.
- 10) 深見裕子，栗津邦男：レーザー研究 **27** (1999) 840.
- 11) K. Awazu, A. Nagai, and K. Aizawa: *Lasers Surg. Med.* **23** (1998) 233.
- 12) K. Awazu and Y. Fukami: *Nucl. Instrum. Methods A* **475** (2001) 650.
- 13) C. A. Brau: *Free-Electron Lasers* (Academic Press, New York, 1990) p. 51.
- 14) K. Saeki, S. Okuma, E. Oshita, K. Wakita, A. Kobayashi, and T. Tomimasu: *Nucl. Instrum. Methods A* **375** (1996) 10.
- 15) A. Kobayashi, K. Saeki, E. Oshita, S. Okuma, K. Wakita, A. Zako, A. Koga, Y. Miyauchi, A. Nagai, M. Yasumoto, and T. Tomimasu: *Nucl. Instrum. Methods A* **375** (1996) 317.
- 16) T. Tomimasu, T. Takii, Y. Kanazawa, A. Zako, A. Nagai, and M. Yasumoto: *Nucl. Instrum. Methods B* **144** (1998) 1.
- 17) D. Voet and J. G. Voet: *Biochemistry 2nd ed.* (John Wiley & Sons, New York, 1995).
- 18) M. H. Niemz: *Laser-Tissue interactions* (Springer-Verlag, Berlin, 1996).
- 19) 石井克典，岩月幸一，吉峰俊樹，栗津邦男：レーザー研究 **30** (2002) 742.