原著

ORIGINAL ARTICLE

皮膚知覚神経応答に対する低出力レーザー照射効果

木暮 信一, 斎藤 伸明, 高塚 和也, 土屋 孔明, 阿部 拓也, 鈴木 義和

創価大学大学院工学研究科生命情報工学専攻

(平成20年12月28日受理, 平成21年2月23日掲載決定)

Effects of Low-power Laser Irradiation on the Sensory Response of Frog Cutaneous Nerves

Shinichi Kogure, Nobuaki Saito, Kazuya Kozuka, Komei Tsuchiya, Takuya Abe, Yoshikazu Suzuki

Department of Bioinformatics, Graduate School of Engineering, Soka University

(Received December 28, 2008, Accepted February 23, 2009)

要 旨

低出力レーザー照射(LLI)が末梢神経の伝導障害を起こし鎮痛効果をもたらすことが報告されているが, その効果の神経線維特異性など不明な点が多い. そこで本研究では, 皮膚に触刺激や痛刺激を与えたときの皮膚知覚神経応答を対象として, その応答に対するLLI効果を検討した. 実験にはアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の背側皮膚-知覚神経標本を用いた. 1標本において3-5本の知覚神経を分離した. 皮膚をリンガー液に浸し, 脊髄端を糸で結んだ知覚神経を記録電極に装着した. それぞれの神経の受容野を手動のピンセットで確認してから, マニピュレータに装着した外径1 mmの針(痛刺激)とボールペン(触刺激)で5秒間の刺激を3回ずつ行い, 刺激で誘発する知覚神経応答をマルチユニット活動として記録した. コントロールを記録してから, 半導体固体レーザー(532 nm, 808 nm; 60 mW, CW)を受容野に照射して(照射面積: 28.3 mm²)同様の刺激を繰り返した. 分離した1本の知覚神経には数10本の神経が含まれているので, さまざまな振幅(100-1200 μ V)の, さまざまなパターン(tonic, phasic typeなど)の応答が混在して記録された. S/N比が高く明瞭にユニットとして分離できたものをスパイク・ヒストグラムを用いて200 μ V毎のユニットに分類した. さらに基準を設定して, 各ユニットをtactile-specific (TS), tactile-dominant (TD), pain-specific (PS), pain-dominant (PD), othersに分類した. それらのユニット数はTSが8, TDが26, PSが17, PDが35個であった. 532 nmのレーザー照射はそれら分類されたユニットの感覚応答を照射前を100%とした場合6-55%のレベルに減弱するまで抑制した(いずれのタイプでも照射前の応答と比較して有意に抑制された: $p < 0.01$). 同様に, 808 nmのレーザー照射も分類されたユニットの感覚応答を23-50 %のレベルまで抑制した($p < 0.01$). その抑制の程度において, 波長間およびタイプ間での有意差は認められなかった. 今回の結果から, 532 nmおよび808 nmの低出力レーザーには皮膚知覚神経の痛覚および触覚刺激に対する応答を減弱させる効果があると結論される. しかし, その抑制効果には刺激選択性や波長依存性は認められなかった.

キーワード: 低出力レーザー, 皮膚-知覚神経標本, マルチユニット活動, 振幅ヒストグラム, 感覚刺激選択性, 痛覚過敏

Abstract

It has been reported that low-power laser irradiation (LLI) demonstrated efficacy in treating patients with various pain syndromes and in a number of pain models. The characteristics of such effects and exact underlying mechanism, however, are still unknown. In the present study, we examined the effects of LLI on sensory responses of frog cutaneous nerve to tactile or pain stimulation to the dorsal skin surface. Fifteen frogs (*Xenopus laevis*) were used. They were anesthetized and immobilized by cooling, and their dorsal skins with 3-5 cutaneous nerves were prepared. Multi-unit activity from a sensory nerve bundle was recorded during the tactile or pain stimulation which was applied to its receptive field for 5 s each. Such stimulation was repeated three times before and during LLI (CW; 532 or 808 nm; 60 mW; 28.3 mm²). The multi-unit activity was discriminated every 0.2 mV based on amplitude histogram, selected with the responsiveness (larger than 5 impulses to one stimulus), and classified into 5 types (TS: tactile-specific, TD: tactile-dominant, PS: pain-specific, PD: pain-dominant, and others) according to difference of responses between tactile and pain stimulation. The number of TS, TD, PS, and PD type were 8, 26, 17 and 35, respectively. The 532 nm LLI suppressed unit responses of all 4 types and significantly decreased them from the control level (100 %) before LLI to the level of 6-55 % during LLI ($p < 0.01$). The 808 nm LLI also decreased sensory responses of 4 types to the level of 23-50 % ($p < 0.01$). It is concluded that the LLI has a potential to suppress the sensory nerve responses, although such effectiveness does not show wavelength-dependency as well as stimulus-selectivity.

Key word : Amplitude histogram, Cutaneous nerve, Hyperalgesia, Low-power laser irradiation, Multi-unit activity, Sensory responses, Stimulus selectivity.

1. 緒言

現在、低出力レーザー照射 (Low-power laser irradiation: LLI) の臨床的な効果は幅広く受け入れられ、慢性痛の治療や傷ついた筋や皮膚組織といった柔軟組織の修復、神経再生を促進させるために使用されることが多くなってきた。例えば、傷害や抜歯による痛みの鎮痛、関節炎の治療や傷害された神経組織の回復などが挙げられる^{1,2)}。その作用として、Mester et al. は Ar⁺レーザーや He-Ne レーザー照射がコラーゲンの産生や白血球の参集および血管形成を誘導することをあげている³⁾。また、LLI が血流を増加させるという報告もあり、Maegawa et al. は LLI による血管平滑筋細胞内の細胞質 Ca²⁺ の減少や NO 関与によって起こる血流の増加が傷の治療や痛みの軽減の重要な要因であると報告している⁴⁾。そのほか LLI が神経系や免疫系に対して有益な効果をもつことも報告されている⁵⁾。

鎮痛効果に関する直接的な研究では、たとえば手根隧道症の患者に対する LLI と経皮性電気刺激の併用が二重盲検法による痛覚テストの結果を改善するとともに正中神経応答の潜時を改善すると報告されている⁶⁾。Pinheiro et al. は三叉神経痛を含む顎骨顔面痛の患者に LLI 治療を施し、疼痛緩和を得ている⁷⁾。動物実験レベルでは、ラット後肢へのフロイド補助液注入による疼痛モデルにおいて、LLI が鎮痛効果をもたらすと同時に β -エンドルフィン前駆体の mRNA 発現を増加させたと報告されている⁸⁾。LLI による鎮痛効果のメカニズムについてはいまだに不明な部分が多いが、一般的には、熱作用というよりは直接的な光化学作用による2次的な生化学的過程の変化に基づくのではないかと考えられている⁹⁾。すなわち、LLI による神経性の疼痛緩和ではセロトニン¹⁰⁾やエンド

ルフィンの放出を促進させる機序¹¹⁾、またミトコンドリアの ATP 産生を増加させる機序¹²⁾、さらに抗炎症効果を介した機序¹³⁾に基づいていると提案されている。

われわれはカエル坐骨神経標本を用いた生理学的実験において、Ar⁺レーザーが複合活動電位の発生および伝導を抑制すること、とくに陽極開放興奮の発生を選択的に速く阻害することを報告した¹⁴⁾。陽極開放興奮は神経膜が過分極性電位から静止電位へ戻るときに発生する興奮なので、通常の Na チャネルだけでなく過分極性電位依存性 (Ih) チャネルが関係しているのではないかと考え、レーザー照射の代替として Ih チャネル阻害剤 ZD7288 を滴下したところ、陽極開放興奮の選択的抑制が認められた¹⁵⁾。実際、末梢神経系にも Ih チャネルタンパクの HCN2 や HCN3 の発現も同定できたので、特定の波長とパワーをもつ LLI と Ih チャネル阻害剤との類似性が推測されたわけである。他の研究でも、末梢神経に Ih チャネルが存在することが電気生理学的に証明され¹⁶⁻¹⁸⁾、また末梢感覚受容器に HCN1-4 が存在することが免疫組織学的に同定されている¹⁹⁾。さらに、A β および A δ 神経線維の自発放電は ZD7288 で抑制され^{20,21)}、一方、A δ や C 神経線維は LLI により神経線維内小器官の微細な変化が起こりやすいことが報告されている²²⁾。

したがって、末梢神経レベルでの痛覚過敏を含む感覚過敏が Ih チャネルの異常発現や異常活動によって引き起こされる可能性は十分考えられることである。また、Ih チャネル阻害剤効果との類似性から、適切なパラメータの LLI がそうした過敏症を緩和する治療になることが期待できる。本研究はその可能性をさらに高めるために、カエル皮膚一知覚神経標本を用いて、痛刺激や触刺激に

対する知覚神経応答を観測し、その応答に対するLLI効果を検討することを目的とした。

2. 対象と方法

本実験の全ては「ヘルシンキ宣言」および「創価大学動物実験規定」に則り行われた。

2.1 標本の作製

実験には15匹のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を用いた。一般的な神経生理学実験で行われている標本作製手法に従って、低温麻酔で非動化させ、脊髄および脳破壊によって安楽死させたアフリカツメガエルから背側皮膚-知覚神経標本を作製した^{23,24)}。皮膚標本には4-6本の知覚神経があり、その脊髄端を糸で結んだ。約3 cm×3 cmの皮膚を知覚神経の長さ(10-15 mm)の関係で裏返して、その4隅をピンでチャンパー底のコルク板にとめた。知覚神経をフック電極にかけ、チャンパー内のTasaki-Ringer液中に不関電極を入れ、マルチユニット活動を双極誘導した。皮膚が浸る程度にチャンパー内にTasaki-Ringer液を入れた (Fig.1)。

2.2 実験装置

皮膚知覚神経のマルチユニット活動(周波数帯域: 300 Hz-10 kHz)は生体電気現象用増幅器(日本光電, AVB-21)を通してメモリオシロスコープ(日光光電, VC-11)で波形観測しつつ、データレコーダー (SONY, PC203AX) に記録した。皮膚への刺激には、痛刺激として針(直径: 1 mm, 先端接触部の直径: 0.1 mm)を用い、触刺激としてボールペン(直径: 1 mm, 先端接触部の直径: 0.3 mm)を用いた。それらをマニピュレーターに装着し、あらかじめピンセットの先端で検索した知覚神経の受容野の中心に刺激が加えられるようにマニピュレーターをセットした。皮膚表面から1 mmの深度で5秒間刺激を加えた。それぞれの刺激をレーザー照射前および照射中に3回ずつ、約10秒間のインターバルで繰り返した。

Fig.1 Schematic diagram of the recording and LLI system. Two types of diode laser generators were used. Pin or ball-point pen was manipulated as pain or tactile stimulation, respectively.

2台のレーザー発生装置を用いた。ともにポータブル型の半導体レーザー (SUWTECH, LDC-2500: Nd:YVO₄, CW, 532 nm, 0-180 mW) (Power Technology Inc., IQ1A250: CW, 808 nm, 0-200 mW) で、その出力をレーザー用ミラーを介してそれぞれの知覚神経の受容野へ誘導した。出力はともに60 mWに固定し、照射面積は28.3 mm²であった。皮膚から脊髄へ向かう知覚神経の起始部と受容野の中心は多くの場合5 mm以上離れていたが、3 mm以内のものもあった。それらは、受容野とともに知覚神経そのものにもレーザー照射の影響が及ぶ可能性が予想されたので、実験対象から除外された。

2.3 マルチユニット活動の分類

フック電極で双極誘導された知覚神経のマルチユニット活動は数10 μ Vから数mVの振幅を示した。S/N比に基づき、神経活動が明瞭な振幅100 μ V以上のものを選択した。第1段階としてマルチユニット活動をAmplitude Histogram (ADInstruments, Spike Histogram Module for ChartTM) を用いて、200 μ Vの振幅ごとに分類した (Fig.2)。第2段階は感覚刺激応答の応答性の判定で、1回5秒間の刺激に対して5発以上のインパルス活動を示すものを応答したものとした。この基準に合わないものを無応答とした。応答したユニットは第3段階において、痛刺激または触刺激のうちどちらにどの程度強く反応したのかという基準(刺激受容面積が広ければそこに存在する各種感覚受容器の数は多いことから、その総和である知覚神経応答

Fig.2 A flow chart for classification of unit activity. The multi-unit activities were discriminated according to their amplitudes, sorted based on responsiveness, and finally classified into TS, TD, PS, and PD type.

は強い反応を示す。一方、刺激受容面積が狭ければ、逆の場合が予想される。にもかかわらず、例えば、狭い領域を刺激する痛刺激に対する応答が広い領域を刺激する触刺激に対する応答より強ければ、それは痛刺激に特異的に反応する痛覚受容器である自由神経終末由来のものが多数を占めていると定義し、PSタイプにする)に基づいて、以下のような4種類に分類された。

- ・TS (Tactile-specific) タイプ：圧倒的に触刺激によく応答を示すもので、触刺激応答を2割にしても痛刺激応答よりインパルス数が多いというもの ($T-P \geq 0.8T$: TまたはPは触刺激, 痛刺激に対するインパルス応答)。
- ・TD (Tactile-dominant) タイプ：どちらかという触刺激応答が強く、触刺激応答を5割にしても痛刺激応答よりインパルス数が多いというもの ($T-P \geq 0.5T$)。
- ・PS (Pain-specific) タイプ：刺激受容面積が圧倒的に狭い(痛刺激の場合は触刺激の約1/10)にもかかわらず痛刺激によく応答を示すもの ($P-T > 0$)。
- ・PD (Pain-dominant) タイプ：触刺激応答の方が強いにもかかわらず、刺激受容面積の狭さを考慮して痛刺激応答がどちらかといえば支配的と考えられるもの ($P > 0.5T$)。

以上のように、照射前のコントロール実験によりマルチユニット活動はそれぞれのタイプのユニットに分類され、照射中にその応答活動がどのように変化するかが検討された。

2.4 統計解析

解析結果は平均値±標準誤差偏差(SEM)で表した。照射前のコントロールと照射中の知覚神経応答の間での有意差検定にはStudent's t-test (分散未知, 対応あり, 両側検定)を用いた。

3. 結果

使用した15標本のうち、5標本のデータはS/N比やマルチユニット活動の低振幅の観点から除外された。532 nmでのLLI効果が検討されたのは4標本で、知覚神経数は12本であった。808 nmでのLLI効果は6標本、22本の知覚神経で検討された。

3.1 マルチユニット活動の典型例

典型的なマルチユニット活動をFig.3に示した。全体のトレースから、振幅が約70, 120, 150, 170, 200, 220, 270 μ Vのユニットが認められる。上段の方が触刺激応答で、レーザー照射前(Fig.3A-a)では刺激期間中tonicに応答するものが多い。刺激のon-off時にphasicに応答するものも含まれている。痛刺激に対しても発射頻度は低下するもののtonic応答が認められ、むしろphasic応答が明瞭になっている(Fig.3B-a)。532 nm・60 mWのレーザー照射中では、触刺激に対するtonic応答が刺激の繰り返しに従って強く減弱していることがわかるが、phasic応答の方はあまり影響を受けていない(Fig.3A-b)。一方、痛刺激に対しては最初から応答の減弱が認められ、繰り返しに従い急速に応答が抑制されている(Fig.3B-b)。

Fig.3 A typical example of the multi-unit activity to tactile (A) or pain stimulation (B) before (a) and during LLI (532 nm, 60 mW) (b). The stimulations (5 s each) were repeated three times with an interval of 5-10 s.

いくつかの例において、レーザー照射切断後に同様な刺激を繰り返した。その場合、最初の1-2回目の応答に減弱効果が認められ、その後刺激を繰り返すに従い徐々に応答が照射前のレベルに回復する傾向を示した。

3.2 532 nm LLIの結果

Fig.4Aおよび4Bは別な例である。触刺激に対するマルチユニット応答の一部を時間軸方向に拡大したもので、上段のトレースが照射前(Fig.4A-a)、下段のトレースが照射中のものである(Fig.4A-b)。Peak to peakで測定して、100-1200 μ Vの振幅のさまざまなユニット活動が認められる。その1本の知覚神経のマルチユニット活動をAmplitude Histogramで200 μ Vごとに分類したものを示した(Fig.4B)。この1本の皮膚知覚神経にはそれぞれの振幅が200-399, 400-599, 600-799, 800-999, 1000-1199 μ Vの5個のユニットが含まれていた。それぞれの知覚応答(3回の刺激に対して応答した総インパルス数)は、照射前の痛刺激に対するものが白色、触刺激に対するものが薄灰色で示され、照射中の痛刺激に対するものが濃灰色、触刺激に対するものが黒色で示されている。そのうち刺激に対する応答性を示したものは3個(図中のa-c)であった。照射前のインパルス応答の基準に従って、aとbはPDタイプ、cはTDタイプに分類された。照射中では、aの痛刺激応答は8.1%減弱し、照射前を100%とすると91.9%となった。bは42.5%減弱し、57.5%となった。cの触刺激応答は45.8%減弱し、照射前の100%から54.2%となった。いずれのタイプのユニットも532 nm LLIにより知覚応答が抑制されることを示した。

Fig.4 A: An expanded multi-unit activity to tactile stimulation before (a) and during LLI (b).

B: Sensory responses of the unit discriminated by the amplitude histogram software. Responses to pain (white) or tactile stimulation before 532 nm LLI (light grey), and those to pain (dark grey) or tactile stimulation during LLI (black bar) are shown at every unit amplitude. According to the criteria, a, b, and c were classified into PD, PD, and TD type, respectively.

C: Effects of 532 nm LLI on the sensory responses of classified units. When averaged response of each type before LLI (white) was standardized as 100%, all types showed a response decrement during LLI with a significant difference ($p < 0.01$), except TS type.

532 nm LLIの結果をまとめたものがFig.4Cである。テストされた知覚神経数は12本であり、分類されたユニット数はPSタイプが8個、PDタイプが11個、TSタイプが1個、TDタイプが10個の総計30個であった。照射前の応答を100 %とすると、532 nm LLI中ではPSタイプの痛覚応答は45 %減弱し、 54.5 ± 10.7 %になった。同様にPDタイプでは59 %減弱し、 40.8 ± 7.7 %になった。TSタイプは1例のみで100 %から5.9 %に減少した。TDタイプの触覚応答は67 %減弱し、 33.0 ± 6.7 %になった。TSタイプを除いて、それぞれのタイプの照射前と照射中の応答間に

Fig.5 A: An expanded multi-unit activity to pain stimulation before (a) and during LLI (b).

B: Sensory responses of the unit discriminated by the amplitude histogram software. Responses to pain (white) or tactile stimulation before 808 nm LLI (light grey), and those to pain (dark grey) or tactile stimulation during LLI (black bar) are shown at every unit amplitude. According to the criteria, a, b, c, and d were classified into TD, PD, TD, and PD type, respectively.

C: Effects of 808 nm LLI on the sensory responses of classified units. When averaged response of each type before LLI (white) was standardized as 100%, all types showed a response decrement during LLI with a significant difference ($p < 0.01$).

は有意差が認められた ($p < 0.01$)。しかし、それぞれのタイプの照射中の応答間で有意差を検定したところ、いずれの間にも認められなかった。

3.3 808 nm LLIの結果

808 nm LLIを用いた結果をFig.5に示す。Fig.5Aおよび5Bはその一例である。痛刺激に対するマルチユニット応答の一部を時間軸方向に拡大したもので、上段のトレースが照射前 (Fig.5A-a)、下段のトレースが照射中のものである (Fig.5A-b)。Peak to peakで測定して、100-1200 μ

Vの振幅のさまざまなユニット活動が認められる。そのマルチユニット活動をAmplitude Histogramで200 μ Vごとに分類したものを示した(Fig.5B)。この1本の皮膚知覚神経にはそれぞれの振幅が200-399, 400-599, 600-799, 800-999, 1000-1199 μ Vの5個のユニットが含まれていた。Fig. 4Bと同様に、それぞれの知覚応答(3回の刺激に対して応答した総インパルス数)は照射前の痛刺激に対するものが白色、触刺激に対するものが薄灰色で示され、照射中の痛刺激に対するものが濃灰色、触刺激に対するものが黒色で示されている。そのうち刺激に対する応答性を示したものは4個(図中のa-d)であった。照射前のインパルス応答の基準に従って、aとcはTDタイプ、bとdはPDタイプに分類された。照射中では、aの触刺激応答は54.1 %減弱し、照射前を100 %とすると45.9 %になった。bの痛刺激応答は86.8%減弱し、13.2 %になった。cの触刺激応答は54.2%%減弱し、45.8 %になった。dの痛刺激応答は11.1 %減弱し、88.9 %になった。いずれのタイプのユニットも808 nm LLIにより知覚応答が抑制されることを示した。

808 nm LLIの結果をまとめたものがFig.5Cである。テストされた知覚神経数は22本であり、分類されたユニット数はPSタイプが9個、PDタイプが24個、TSタイプが7個、TDタイプが16個の総計56個であった。照射前の応答を100 %とすると、808 nm LLI中ではPSタイプの痛覚応答は82 %減弱し、28.0 $\pm$ 4.0 %になった。同様にPDタイプでは60 %減弱し、39.6 $\pm$ 5.6 %になった。TSタイプの触覚応答は77 %減弱し、23.3 $\pm$ 7.4 %になった。TDタイプでは50 %減弱し、49.7 $\pm$ 6.8%になった。TSタイプを除いて、それぞれのタイプの照射前と照射中の応答間には有意差が認められた($p<0.01$)。また、照射中のPSとTDの応答間、およびTSとTDの応答間で有意差が認められた($p<0.05$)。

4. 考察

本実験では、アフリカツメガエルの背側皮膚-知覚神経標本を用いて、皮膚への触刺激および痛刺激に対する知覚神経応答を記録し、その応答に対するLLI効果を検討した。その結果、532 nmおよび808 nmのLLI(ともに60 mW)は、照射前の応答100 %から23-55 %までに有意に抑制した($p<0.01$)。532 nm LLIは痛刺激応答より触刺激応答をより強く抑制する傾向が認められ、一方808 nm LLIは痛刺激応答をより強く抑制する傾向が認められたが、(照射中のPSとTDの応答間で有意差($p<0.05$)が認められたのみで)その傾向は統計学的に有意ではなかった。

これらの効果は、いわゆる感覚系に特有な順応現象に基づくものであろうか。照射前に触刺激を3回、痛刺激を3回繰り返し、それから約20秒間経過した後レーザー照射を開始し、触刺激を3回、痛刺激を3回繰り返したわけである。しかし、Fig.3に明らかなように、照射前の応答にはほとんど順応現象らしきものは見られなかった(Fig.3A-aおよびFig.3B-a)。照射中の最初の応答で感作のような現象が認められる場合があったが(Fig.3Ab上段ト

レース)、2回目、3回目と繰り返すに従って強い減弱が認められた。今回の解析では3回の応答を加算しているので、その中に順応による応答の減弱が含まれていることは否定できないが、その影響はわずかであると考えられる。今後、照射前および照射中の刺激回数を10回ほどにして、明らかに順応現象が認められるときのLLI効果を検討する必要がある。また、レーザー照射切断後の応答の回復特性も詳細に検討する必要がある。皮膚組織に不可逆的なダメージを与えたのかどうかを明らかにしたい。

LLI効果の作用機序として、まず熱作用があげられる。とくに本研究においても生体組織への深達度が高い近赤外レーザーを使用しているため、熱作用による感覚の鈍化が十分推測できる。Orchardson et al.は歯質にLLI (Nd:YAG, 1064 nm, 1-3 W)を加え、60秒以内に歯根からの神経の複合活動電位が不可逆的に消失したことを示し、歯質の温度上昇によるものと報告している²⁵⁾。われわれもカエル坐骨神経の極興奮の振幅がAr⁺レーザー(488 nm, 50 mW)により減少し、その減少が神経表面の温度上昇と相関するところから、熱作用が中心的な機序ではないかと報告した²⁶⁾。しかし、今回の実験では皮膚はリンガー液に浸してあるので、LLIによる熱はむしろ拡散しやすく、実際組織表面の温度上昇は0.5-1.7°Cでわずかであった。また皮膚内には温覚受容器も存在するので²³⁾、それはLLIにより温度上昇を感知して知覚神経の活動を増加させることが推測される。結果は逆であったところから、今回得られたLLIによる知覚神経応答の抑制効果にレーザーの熱作用が関与する可能性は低いのではないかと考えられる。

したがって、むしろ光化学作用に基づくさまざまな機序が関係していると考えられる。LLIによる鎮痛効果のメカニズムについてはいまだに不明な部分が多いが、光化学作用による2次的な生化学的過程の変化に基づくのではないかと考えられ⁹⁾、たとえば、LLIによる神経性の疼痛緩和ではセロトニンやエンドルフィンの放出を促進させる機序があげられている^{10,11)}。また、ミトコンドリアのATP産生を増加させる機序や抗炎症効果を介した機序に基づいていると報告されている^{12,13)}。Hagiwara et al.は末梢性炎症のラットモデルを用いて、LLI (GaAlAs, 830 nm, 200 J/cm²)が内因性の β -エンドルフィンの分泌を促進して鎮痛効果をもたらすことを報告している⁸⁾。しかし、こうした効果は数10分から数時間後に発現してくるもので、本実験のようにレーザー照射開始後数10秒間で発現する点を考慮すると、異なる機序が働いているのではないかと考えられる。

今回、皮膚知覚神経の感覚応答が受容野へのLLIによって即応的に減弱したことから、感覚受容器やそこからの知覚神経へ直接的に影響を与えた可能性が高い。刺激により誘発するマルチユニット活動の減弱現象から、当然活動電位発生に関わるNa⁺チャネルやK⁺チャネルの開閉に影響を与えていることが考えられる^{14,22,27,28)}。しかし、近年注目されているIhチャネルへの影響も除外することはできない。末梢神経にIhチャネルが存在することは電気生理学的に証明され¹⁶⁻¹⁸⁾、免疫組織学的にも証明され

ている¹⁵⁾。また、Luo et al. は末梢感覚受容器にHCN1-4が存在することを免疫組織学的に同定し、Ihチャネルが急性の損傷で発生する痛みや慢性の神経痛の発現に直接的に関与することをラットモデルを用いて証明している¹⁹⁾。さらに、 $A\beta$ および $A\delta$ 神経線維の自発放電はIhチャネルの特異的阻害剤であるZD7288で抑制され^{20,21)}、一方、 $A\delta$ やC神経線維はLLI (Nd:YAG, 1064 nm, 70 mJ/pulse, 9.8 W/cm²)により神経線維内小器官の微細な変化が起こりやすいことが報告されている²²⁾。われわれは、カエル坐骨神経標本を用いた「極興奮の法則」に関する実験において、Ihチャネル阻害剤のZD7288の滴下とLLI (Ar^+ , 488 nm, 50 mW)がともに陽極開放興奮の発生を選択的に阻害するというを示した^{14,15)}。以上のことから、本研究で得られた皮膚知覚神経応答が受容野へのLLIによって減弱するということは、LLIの皮膚への温熱効果というよりも感覚受容器や知覚神経のIhチャネルを含むイオンチャネルへの光化学作用に基づくと考えられる。

一般的に神経障害をもつ患者の自発性の痛みや痛覚過敏は脊髄後根神経節細胞および末梢から中枢への求心性神経の異常活動といわれ、痛みの動物モデルにおいて脊髄後根神経節細胞を圧迫すると求心性神経でIh電流が増加して自発活動が促進され、Ih阻害剤であるZD7288を全身投与すると濃度依存的に求心性神経の自発活動が抑制されると報告されている¹⁹⁻²¹⁾。そうしたことを根拠にIhチャネル阻害剤が痛覚過敏症などを含む感覚過敏の治療に有効であると提案されている。われわれがすでに示したIh阻害剤効果とLLI効果の類似性^{14,15)}、そして今回の結果を総合的に考慮すると、LLIにも除痛に関する治療法としての可能性は十分に考えられるところである。そのためにはLLIの最適パラメータを明らかにすることや、感覚のモダリティー選択性、効果の持続性を明らかにすることが必要であろう。

5. 結言

本研究では、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の背側皮膚-知覚神経標本を用いて、皮膚に触刺激や痛刺激を与えたときの皮膚知覚神経応答を対象として、その応答に対するLLI効果を検討した。知覚神経のマルチユニット活動を振幅ヒストグラムソフトウェアで分類し、さらに痛刺激または触刺激に特異的に反応するPSタイプとTSタイプ、どちらかという痛刺激に反応するPDタイプ、どちらかという触刺激に反応するTDタイプに分類した。532 nmのレーザー照射 (60 mW) はそれら分類されたユニットの感覚応答を照射前を100%とした場合6-55%のレベルに減弱するまで抑制し ($p<0.01$)、808 nmのレーザー照射も分類されたユニットの感覚応答を23-50%のレベルまで抑制した ($p<0.01$)。その抑制の程度において、波長間およびタイプ間での有意差は認められなかった。今回の結果から、532 nmおよび808 nmの低出力レーザーには皮膚知覚神経の痛覚および触覚刺激に対する応答を減弱させる効果があると結論される。その作用機序として、近年皮膚の感覚受容器や知覚神経で発現が証明されてい

るIhチャネルへの影響が考察され、痛覚過敏や感覚過敏へのLLI治療が期待された。

謝辞

本研究はMEXT HAITEKU (2004-08) の支援のもと実施された。本実験の実施に際し、多大なご協力をいただいた秋山聡氏、曹歡喜氏 (創価大学工学部生命情報工学科) に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) Pogrel M. A., Chen J. W., Zhang K.: Effects of low energy gallium arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes. *Lasers Surg Med*, 20: 426-432, 1997.
- 2) Basford J. R.: Low intensity laser therapy: Still not an established clinical tool. *Lasers Surg Med*, 16: 331-342, 1995.
- 3) Mester E., et al.: Effect of laser rays on wound healing. *Am J Surg*, 122: 532-535, 1971.
- 4) Maegawa Y. et al.: Effects of near-infrared low-level laser irradiation on microcirculation. *Lasers Surg Med*, 27: 427-437, 2000.
- 5) Ohta A., Abergel R. P., Uitto J.: Laser modulation of human immune system: inhibition of lymphocyte proliferation by a gallium-arsenide laser at low energy. *Lasers Surg Med*, 7: 199-201, 1987.
- 6) Naeser M. A., et al.: Carpal tunnel syndrome pain treated with low-level laser and microamperes transcutaneous electric nerve stimulation: A controlled study. *Arch Phys Med Rehabil*, 83: 978-988, 2002.
- 7) Pinheiro A. L., et al.: Low-level laser therapy in the management of disorders of the maxillofacial region. *J Clin Laser Med Surg*, 9: 267-275, 1991.
- 8) Hagiwara S., et al.: GaAlAs (830 nm) low-level laser enhances peripheral endogenous opioid analgesia in rats. *Lasers Surg Med*, 39: 797-802, 2007.
- 9) Ohshiro T., Calderhead R.: Development of low reactive-level laser therapy and its present status. *J Clin Laser Med Surg*, 9: 267-275, 1991.
- 10) Walker J. B.: Relief from chronic pain by low power laser irradiation. *Neurosci Lett*, 43: 339-344, 1983.
- 11) Yamamoto H., et al.: Antinociceptive effects of laser irradiation of Hoku point in rats. *Pain Clin*, 8: 43-48, 1988.
- 12) Passarella S.: He-Ne laser irradiation of isolated mitochondria. *J Photochem Photobiol B*, 3: 642-643, 1989.
- 13) Ailioaie C., Lupusoru-Ailioaie L. M.: Beneficial effects of laser therapy in the early stages of rheumatoid arthritis onset. *Laser Ther*, 11: 79-87, 1999.
- 14) Matsuda Y., et al.: Effects of argon laser irradiation on polar excitations in frog sciatic nerve. *Lasers Surg Med*, 38: 608-614, 2006.
- 15) Matsuda Y., et al.: Effects of hyperpolarization-activated channel blocker ZD7288 on polar excitations of frog sciatic nerve. *J Physiol Sci*, 58: 99-104, 2008.
- 16) Ingram S. L., Williams J. T.: Modulation of the hyperpolarization-activated current (Ih) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *J Physiol (Lond)*, 492-97-106, 1996.
- 17) Scroggs R. L., et al.: Variation in IH, IIR, and ILEAK between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size. *J Neurophysiol*, 71: 271-279, 1994.
- 18) Cardenas C. G., et al.: Serotonergic modulation of

hyperpolarization-activated current in acutely isolated rat dorsal root ganglion neurons. *J Physiol (Lond)*, 518: 507-523, 1999.

- 19) Luo L., et al.: Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. *Neurosci*, 144: 1477-1485, 2007.
- 20) Chaplan S. R., et al.: Neuronal hyperpolarization-activated pacemaker channels drive neuropathic pain. *J Neurosci*, 23: 1169-1178, 2003.
- 21) Yao H., et al.: Upregulation of the hyperpolarization-activated cation current after chronic compression of the dorsal root ganglion. *J Neurosci*, 23: 2069-2074, 2003.
- 22) Wessellmann U., Kerns J. M., Rymer W. Z.: Laser effects on myelinated and nonmyelinated fibers in the rat peroneal nerve: A quantitative ultrastructural analysis. *Exp Neurol*, 129: 257-265, 1994.
- 23) Adrian E. D., Zotterman Y.: The impulses produced by sensory nerve endings- Part III. Impulses set up by touch and pressure. *J Physiol*, 61: 465-483, 1926.
- 24) 日本生理学会編：生理学実習書. 南江堂, 306-309, 1977.
- 25) Orchardson R., Peacock J. M., Whitters C. J.: Effects of pulsed Nd:YAG laser radiation on action potential conduction in nerve fibers inside teeth *in vitro*. *J Den*, 26: 421-426, 1998.
- 26) 小松光昭ほか：カエル坐骨神経の極興奮に対する低出力 Ar⁺レーザー照射効果の熱解析. *日本レーザー医学会誌*, 29: 127-133, 2008.
- 27) Tsuchiya K., et al.: Diode laser irradiation selectively diminishes slow component of axonal volleys to dorsal roots from the saphenous nerve in the rat. *Neurosci Lett*, 161: 65-68, 1993.
- 28) Tsuchiya K., et al.: Laser irradiation abates neuronal responses to nociceptive stimulation of rat-paw skin. *Brain Res Bull* 34: 369-374, 1994.

著者紹介

木暮 信一(Shinichi Kogure)

1950年生まれ. 1979年3月群馬大学大学院医学研究科修了. 医学博士. 2002年4月より創価大学大学院工学研究科・教授. 専門分野は神経生理学, とくに「難治性てんかんの発現メカニズム」に関する実験研究を行ってきた. 最近では「難治性疾患のレーザー治療の開発」へ研究テーマが移りつつある. 日本生理学会および日本てんかん学会評議員. アメリカてんかん学会・北米神経科学学会・日本レーザー医学会などの会員. 1997年「てんかん治療研究振興財団・研究褒賞」受賞.

斎藤 伸明(Nobuaki Saito)

1985年生まれ. 創価大学大学院工学研究科生命情報工学専攻在籍中. 「皮膚知覚神経応答に対する低出力レーザー照射効果」の研究とともに「海馬CA1野のてんかん様発作波誘発閾値に対するレーザー照射効果」も行ってきた.

高塚 和也(Kazuya Kozuka)

1985年生まれ. 創価大学大学院工学研究科生命情報工学専攻在籍中. 「心臓の自動性に対するレーザー照射効果」が主たる研究テーマである.

土屋 孔明(Komei Tsuchiya)

1985年生まれ. 創価大学大学院工学研究科生命情報工学専攻在籍中. 「海馬てんかん様発作波の周波数解析」が主たる研究テーマである.

阿部 拓也(Takuya Abe)

1987年生まれ. 創価大学工学部生命情報工学科在籍中. 「心臓の自動性に対するレーザー照射効果(532 nm)」が主たる研究テーマである.

鈴木 義和(Yoshikazu Suzuki)

1984年生まれ. 創価大学工学部生命情報工学科在籍中. 「心臓の自動性に対するレーザー照射効果(808 nm)」が主たる研究テーマである.