低出力レーザー照射によるラット大動脈平滑筋の張力変化 ： *in vitro*における検討

杉本光代、肥後礼子、松尾洋孝、田畑晋司
守本祐司、荒井恒憲、菊地 眞
防衛医科大学校医用電子工学講座

Laser induced tension change in rat aortic smooth muscle : *in vitro* study

Mitsuyo Sugimoto, Reiko Higo, Hirotaka Matsuo, Shingi Tadata
Yuji Morimoto, Tsunenori Arai, Makoto Kikuchi

Department of Medical Engineering, National Defense Medical College

Abstract : We reported that vascular ring of a rat thoracic aorta reproducibly showed either contraction or relaxation during irradiation with low power laser (wavelength = 325 nm , 351 nm , 458 nm , 514.5 nm , 800 nm). To study the thermal effect , the tension of vascular rings was observed isometrically with the same absorbed energy by Argon ion laser irradiation at each wavelength (351 nm , 458 nm , 514.5 nm , 800 nm) . Furthermore, to investigate the mechanism of laser induced vasorelaxation , the tension changes in normal buffer were compared with those in the buffer containing the following drug: 1) guanylate cyclase inhibitor (10^{-5} M methyleneblue) ; 2) nitric oxide synthetase inhibitor (10^{-4} M L-NMMA , 10^{-4} M L-NAME) ; 3) the optical isomer of L-NAME (10^{-4} M D-NAME) ; 4) 10^{-4} M NaNO_2 .

Laser irradiation of the wavelength ranging from the ultraviolet to the short visible induced vasorelaxation. Otherwise, vasocontraction was caused by the irradiation at the long visible to the near-infrared. At each wavelength the vascular rings tended to contract with the higher absorbed energy . The vasorelaxation caused by ultraviolet laser irradiation (325 nm) was inhibited by methyleneblue, and not influenced by L-NMMA. Moreover, the photovasorelaxation was enhanced by NO_2 containing molecules (L-NAME , D-NAME) or NaNO_2 .

These results suggest that the photovasocontraction is due to the thermal effect of laser irradiation and the photovasorelaxation is due to the primary photochemical effect of the irradiation . We conclude that the primary photochemical effect may be ascribed to NO like substance generated by laser irradiation .

図1. ヒト大動脈の照射波長に対する吸収係数及び散乱係数³⁾。このグラフより今回選択した4つの波長における吸収係数及び散乱係数を求め、血管の受ける吸収熱量が一定になるような照射強度を計算した。

図2 4つの各照射波長のレーザー照射による血管の張力変化。縦軸は上向きが血管の収縮を、下向きが弛緩を表す。横軸に示す数値は、一定にした3通りの吸収熱量を示す。

はじめに

近年、経カテーテル的血管内視鏡における照明光として、また血管形成術の光源としてレーザーが使用されている。しかし、レーザー照射の血管に与える影響は、レーザー治療を行う上で重要であるにもかかわらず、いまだにその詳細は明らかではない。

我々はラット大動脈を用い、*in vitro*で、種々の波長のレーザー照射による張力変化に対する熱作用の関与を調べた。さらに、照射による弛緩現象の機序を調べるために各種薬物を用いて検討した。

材料・方法

材料及び実験系は松尾らの方法^{1) 2)}に準じた。ラット胸部下行大動脈より作成したリング標本をKrebs液中に懸垂し、norepinephrine (10^{-5} M) 投与後、レーザー光を血管外膜側から垂直に60秒間照射した。血管の張力変化を張力トランスデューサーにより、等尺性に測定した。レーザー光源として、He-Cdレーザー (波長325 nm)、Arレーザー (351 nm、488 nm、514.5 nm)、Ti:Sapphireレーザー (800 nm) を用いた。

実験(1): レーザーの熱作用を検討する上で、血管に照射された光のうち反射光と透過光を差し引いた分が血管に吸収され、この吸収光が全て熱に変換されると仮定した。血管の受ける吸収光は照射波長によって異なることは明らかであるが、今回は以下にのべる

方法で、各照射波長毎に吸収光が一定になるように照射強度を調整した。図1はPrince³⁾らによって報告された人大動脈平滑筋の吸収係数、散乱係数であるが、この図より今回選択した各照射波長における吸収係数を求めた。さらにラット大動脈壁厚を測定し、これらの数値をBeerの数式に代入し、次の条件式を満たすように各波長毎に照射強度の比を決定した。

$$\begin{aligned} I_{351 \text{ nm}} (1 - \exp^{-dA_{351 \text{ nm}}}) \\ &= I_{458 \text{ nm}} (1 - \exp^{-dA_{458 \text{ nm}}}) \\ &= I_{514.5 \text{ nm}} (1 - \exp^{-dA_{514.5 \text{ nm}}}) \\ &= I_{800 \text{ nm}} (1 - \exp^{-dA_{800 \text{ nm}}}) \\ &= \text{const.} \end{aligned}$$

($I_{351 \text{ nm}}$, $I_{458 \text{ nm}}$, $I_{514.5 \text{ nm}}$, $I_{800 \text{ nm}}$ は各照射波長の照射強度、 d は大動脈壁厚、 $A_{351 \text{ nm}}$, $A_{458 \text{ nm}}$, $A_{514.5 \text{ nm}}$, $A_{800 \text{ nm}}$ は図1より求めた吸収係数) 今回の実験では const. を小中大的3通り設定した。

実験(2): guanylate cyclase (GC) 阻害薬のmethylene blue^{4) 5)}、NO合成酵素阻害薬のL-NAME及びL-NMMA^{6) 7)}をそれぞれ投与前後に紫外域照射し、張力変化を観察した。さらに、L-NAMEの光学異性体でNO合成酵素阻害作用を持たないD-NAME、亜硝酸イオンの供給源としてNaNO₂の投与による影響も比較検討した。

図3. 薬物投与前後における紫外域レーザー照射 (325 nm) による血管張力変化。照射において血管の弛緩が認められ薬物非投与時と比較するとMB投与による減少、L-NMMA投与による増大が認められる。

結果

実験(1): 紫外域 (351 nm) レーザー照射では弛緩のみが、近赤外域 (800 nm) では収縮のみが観察された (図2)。可視域 (488 nm, 514.5 nm) では収縮と弛緩の両方が観察された。また可視域では、吸収熱量の小さいときには弛緩が観察され、大きくなるにつれ収縮が起こりやすい傾向が認められた。このように、レーザー照射による血管の収縮は吸収熱量に、弛緩は照射波長に大きく依存した。これらの現象は内皮を除去した血管でも同様に認められた。

実験(2): 紫外域照射による血管弛緩はMB投与によって抑制されたが、L-NMMA投与によって変化しなかった (図3、表1)。しかし、L-NMMAと同じNO合成酵素阻害薬であるL-NAME投与によって、照射による弛緩は増大した。さらに、D-NAME、NaNO₂投与によっても照射による弛緩は増大した。

考察

血管の受ける吸収熱量を一定にしても、各照射波長で異なる血管張力変化が引き起こされることが分った。吸収熱量の等しい条件下で波長が短いときには弛緩が、長いときには収縮が起こりやすい傾向が観察された。また、吸収熱量の小さいときには弛緩が、大きくなるにつれ収縮が起こりやすい傾向が認められた。したがって、今回の実験により光照射による血管の収縮は熱作用、弛緩

は光照射による初期効果としての光化学的作用が考えられる。

GC活性を抑制すると紫外域照射による血管弛緩は減弱したことより、光照射による弛緩反応はguanylate cyclaseを介した反応であると考えられる。内皮を除去した血管でも照射による弛緩反応が認められたこと、またNO合成阻害薬投与下の照射による弛緩は減弱しなかったことから、内皮に存在するNO合成酵素はこの弛緩反応に関与してないことが示唆された。

さらに、L-NAME、D-NAME、NaNO₂投与後、照射による弛緩が増大したが、これらの物質はすべてニトロ基 (-NO₂) または亜硝酸イオン (NO₂⁻) を有している点が共通している (図4)。溶液中の亜硝酸イオンに紫外線照射するとNOが生成されることがTreininらにより次式のように示されている⁸⁾。

光が上記薬物のニトロ基または亜硝酸イオンに作用し、同様のメカニズムでNO様物質が発生し、血管弛緩反応が起きている可能性が考えられる。この仮説を支持するものとして、ニトロ基を有するN-nitro-L-arginine投与後、光照射による血管弛緩増強現象の報告がある⁹⁾。したがって、光照射による血管弛緩現象は、内皮を介さないNO様物質の生成が関与している可能性が考えられる。

Drugs	Changes in photorelaxation
methyleneblue	↓
L-NMMA	→
L-NAME	↑
D-NAME	↑
NaNO ₂	↑

表1. 紫外域レーザー照射に認める血管弛緩の各薬物投与による影響：矢印は薬物非投与時における照射時に認める血管弛緩との比較を示す。methyleneblue投与で減少、L-NMMA投与で不変、L-NAME、D-NAME、NaNO₂投与で増大した。

図4. L-NAMEとL-NMMAの構造式。両薬物共にNO合成酵素阻害薬であるが、L-NAMEはニトロ基を有している点でL-NMMAと異なる。

参考文献

- 1) 田畑晋司、他：低出力レーザー照射による大動脈平滑筋張力に対する影響につて：照射波長と照射強度に対する影響。第14回日本レーザー医学会大会論文集 1993: 553-556.
- 2) 松尾洋孝、他：可視域レーザー照射による平滑筋の収縮に対するカルシウムの影響に関する検討。第14回日本レーザー医学会大会論文集 1993: 557-560.
- 3) Prince MR, *et al*: Preferential light absorption in atheromas *in vitro*: implication for laser angioplasty. J Clin Invest 1986; 78: 295-302.
- 4) Marczin N, *et al*: Methylene blue inhibits nitrosodilator-and endothelium-derived relaxing factor-induced cyclic GMP accumulation in cultured pulmonary arterial smooth muscle cells via superoxide anion. J Pharmacol Exp Ther 1992; 263: 170-179.
- 5) Szabo C, *et al*: Effects of small changes in extracellular magnesium concentration on tone of ferine mesenteric arteries: involvement of endothelium. Acta Physiol Hung 1992; 79: 295-303.
- 6) Gross SS, *et al*: Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by N_G-aminoarginine, N_G-nitroarginine and N_G-methylarginine. Biochem Biophys Res Commun 1990; 170: 96-103.

- 7) Palmer RMJ, *et al*: L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. Biochem Biophys Res Commun 1988; 153: 1251-1256.
- 8) 松永和樹：内因性NO合成阻害薬 N-nitro-L-arginine の光活性化血管弛緩作用。血管 1993; 16 :10.
- 9) Treinin A, *et al*: Absorption spectra and reaction kinetics of NO₂, N₂O₃, and N₂O₄ in Aqueous Solution. J Am Chem Soc 1970; 92: 5821-5828.