特集/自由電子レーザーの医学応用

粥状動脈硬化部位コレステロールエステルの自由電子レーザー分解に関する基礎的検討

深見 裕子¹⁾, 前田 佳均¹⁾, 栗津 邦男²⁾

¹⁾ 大阪府立大学総合科学部

〒591-8531 大阪府堺市学園町1-1

TEL 0722-52-1161 FAX 0722-54-9927

²⁾ (株)自由電子レーザー研究所

〒573-1028 大阪府枚方市津田山手2-9-5

TEL 0720-96-0411 FAX 0720-96-0421

Photodynamic processes of cholesteryl oleate using IRFELs

Yuko FUKAMI¹⁾, Yoshihito MAEDA¹⁾ and Kunio AWAZU

¹⁾ Department of Materials Sciences, Osaka Prefecture University

Gakuen-cho 1-1, Sakai, Osaka 591-8531 JAPAN

²⁾ Free Electron Laser Research Institute, Inc.

Tsuda-yamate 2-9-5, Hirakata, Osaka 573-0128 JAPAN

要 旨

コレステロールエステルは粥状動脈硬化部位に特異的に蓄積する。コレステロールエステルへの自由電子レーザー (FEL) 照射効果をラマン分光法およびフーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) によって検討した。

この結果、エステル結合 (RCOOR') の C=O 伸縮振動に対応した 5.79 μm の FEL を照射することによって、エステル結合が解離すること、さらに照射時間の経過に伴いアルデヒド (RCHO)、カルボキシラト (RCOO⁻)、カルボン酸 (RCOOH) およびケトン (R₂C=O) へと段階的に化学変化することを明らかにした。

キーワード: 自由電子レーザー, PDT, 動脈硬化, コレステロールオレイト, エステル結合

Abstract

Photodynamic processes induced by an infrared free electron laser (IRFEL) were examined by Raman spectroscopy and Fourier transform infrared microspectroscopy (FT-IR) for cholesteryl oleate which is specifically accumulated in the arteriosclero-

tic region on the arterial walls as a function of the FEL exposure time. We found that the exposure of $5.79 \mu\text{m}$ -FELs induces not only dissociation of ester (RCOOR') bonds but also chemical changes of the ester (RCOOR') bonds to aldehyde (RCHO), carboxylic acid (RCOOH), carboxylate (RCOO^-) or ketone ($\text{R}_2\text{C}=\text{O}$) bonds.

Key words : Free electron laser, arteriosclerotic region, PDT, cholesterol-ester, ester

1. 目的

粥状動脈硬化症の主要因であるコレステロールは、脂肪酸（オレイン酸、リノール酸など）とエステル結合することにより血管壁に蓄積される¹⁾。これに対し多様な治療法が提案されており、その中で、半導体レーザーと mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) を用いた PDT などが検討されている²⁾。

一方、近年日本においても自由電子レーザー (FEL) 発振装置が開発され^{3, 4, 5)}、FEL 利用研究が可能となったことをうけ、Awazu et al.⁶⁾

は波長 $5.75 \mu\text{m}$ の赤外 FEL を粥状動脈硬化症を起こした家兎動脈切片に照射し、中膜弾性線維を損傷することなくコレステロールエステルのみを除去した。

そこで本論文では、エステル結合の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動のエネルギーに対応した波長の FEL をコレステロールオレイトに照射し、エステル結合を中心とした化学結合の変化を顕微フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) およびラマン分光法を用いて測定し、赤外 FEL と生体高分子との相互作用のメカニズムを検討した。

図1 FEL照射前後のコレステロールオレイトのIR吸収スペクトル。
上から未照射、10秒間照射、1分間照射、5分間照射した部分である。

図2 FEL照射前後のコレステロールオレイトのラマンスペクトル。
上から未照射, 10秒間照射, 1分間照射, 5分間照射した部分である。

2. 方法

照射用試料にはコレステロールオレイト (Sigma: #C-9253) を用いた。コレステロールオレイトを CCl_4 に溶解させ, 溶液 ($6.0 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$) を赤外透過性 BaF_2 基板 (直径13mm, 厚さ1.0mm) に塗布した後, 乾燥させコレステロールオレイト膜 (厚さ $\sim 200 \mu\text{m}$) を作製した。

FELの波長はエステル結合の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に対応した $5.79 \mu\text{m}$ を用いた。平均パワーは3 mWであった。入射角は 60° , 照射点の半径は約 $500 \mu\text{m}$ であった。照射時間を10秒, 1分, 5分間と変化させて, 室温および空气中で, 試料へ照射した。照射点の変化は顕微鏡の対物レンズを介して観察することができる。

IR吸収スペクトルを透過光から顕微フーリエ変換赤外分光計 (Horiba: FT-520) によって測定した。ラマンスペクトルを波長 514.5 nm ,

100mWのアルゴンイオンレーザーにより励起し, ラマン分光装置 (Jobin Yvon: RAMANOR U-1000) によって測定した。アルゴンイオンレーザーによる試料の損傷はなかった。

3. 結果

3-1 FT-IRの結果

図1にFELを照射した部分のIR吸収スペクトルを示す。 1737 cm^{-1} にエステル基に特徴的な $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に起因した吸収ピークが観察された^{7,8)}。照射時間の経過とともに 1737 cm^{-1} の吸収ピーク強度は減少し, その半値幅も低波数側に 30 cm^{-1} 程度の広がりを見せた。 $1170 \sim 1250 \text{ cm}^{-1}$ の吸収バンドは, 主としてエステル内の $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 逆対称伸縮振動に帰属できる。この $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 逆対称伸縮振動に起因する吸収バンドも, 照射時間の経過につれて強度が減少した。5分間照射の部分

図3 FEL照射によるエステル結合のC-O-C逆対称伸縮振動のIR吸収強度の変化

では、 $1620\sim 1700\text{cm}^{-1}$ のブロードな吸収バンドが顕著になった。

3-2 ラマン分光の結果

図2にFELを照射した部分のラマンスペクトルを示す。 1735cm^{-1} の強度の小さいラマンピークがエステル基のC=O伸縮振動に起因している。5分間照射後には、このラマンピークは消失した。 $1200\sim 1400\text{cm}^{-1}$ に強度の大きいラマンピークが複数観察された。これらのラマンピークは、 $>\text{C}=\text{C}<$ のCH変角およびカルボキシラトの CO_2 対称伸縮振動に帰属できる。照射後、この $1200\sim 1400\text{cm}^{-1}$ の複数のラマンピークのうち 1300cm^{-1} 付近の

ラマンピークは 1295cm^{-1} から 1300cm^{-1} にわずかにシフトした。照射時間の経過とともに、 $1300\sim 1400\text{cm}^{-1}$ のバンドのラマン強度は増加した。 1400cm^{-1} のピークは $-\text{CH}_3$ の変角、 1670cm^{-1} のピークはC=C結合の伸縮、 $2800\sim 3000\text{cm}^{-1}$ のバンドはコレステロールオレイト分子がもつ $-\text{CH}$ 、 $-\text{CH}_2$ 、 $-\text{CH}_3$ のCH伸縮振動である。また、 3010cm^{-1} のピークは $>\text{C}=\text{C}<$ のCH伸縮振動に帰属できる。FEL照射時間に応じて、 1400cm^{-1} から 3010cm^{-1} の間にあるすべてのラマンピークは、徐々に強度が減少した。5分間照射後は、 2790cm^{-1} にアルデヒドのCH伸縮振動に起因するラマンピークが観察された。

4. 考 察

4-1 エステル結合の解離

図3にFEL照射前後の $1150\sim 1220\text{cm}^{-1}$ のIR吸収スペクトルをピーク分離した結果を示す。吸収スペクトルは(a) 1169cm^{-1} および(b) 1185cm^{-1} にピークをもつローレンツ関数によって複数のスペクトルに分解できた。

1169cm^{-1} の吸収ピーク(a)はコレステロールオレイト分子の $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ の縦ゆれ振動に起因する。 1185cm^{-1} の吸収ピーク(b)はコレステロールとオレイン酸をつなぐエステル結合のC-O-C逆対称伸縮振動に起因する。

照射の経過によって 1185cm^{-1} の吸収ピーク(b)の強度は減少していく。これはC-O-C結合のFEL照射による減少を示している。これから、FEL照射によってコレステロールとオレイン酸を結合しているC-O-C結合が解離する過程を段階的に観察することができた。また、5分間照射部の 1185cm^{-1} の吸収ピーク(b)はガウス関数を用いて分離できた。これは、C-O-C結合がFEL照射によって結合長や結合力が変化し分布したためであると考えられる。

一方、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ の縦ゆれ振動に起因する 1169cm^{-1} の吸収ピーク(a)の強度は減少したが、半値幅はほとんど変化しなかった。これからFEL

図4 FEL照射によるカルボキシラトの CO_2 逆対称伸縮振動のIR吸収強度の変化

照射によってエステル結合の $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 結合が特に選択的に励起されたと考えられる。以上のことをまとめると、 $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 結合の解離には次の2つの化学的過程が考えられる。

- i) $\text{R}-\text{COO}-\text{R}' \rightarrow \text{R}-\text{CO}- + \text{R}'-\text{O}$
- ii) $\text{R}-\text{COO}-\text{R}' \rightarrow \text{R}-\text{COO}^- (\text{カルボキシラト}) + \text{R}'-$

ここで、コレステロールオレイト $\text{R}-\text{COO}-\text{R}'$ のうち、 R はオレイン酸側、 R' はコレステロール側を示す。

4-2 カルボキシラトの生成

図5 FEL照射によるエステル結合の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動のIR吸収スペクトルの変化

図4にFEL照射前後の $1500 \sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ のIR吸収スペクトルを示す。カルボキシラトの生成を確認するためにスペクトルをピーク分離した。

未照射部の 1735 cm^{-1} の吸収ピークはエステル結合の $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に帰属できる。 1735 cm^{-1} の吸収ピーク以外には $1500 \sim 1750 \text{ cm}^{-1}$ では目立ったピークは見られなかった。FEL照射によって、1

図6 FEL照射によるコレストロールオレイトの化学結合の変化

530 $\sim$ 1700 cm^{-1} に複数の吸収バンドがあらわれた。特に1538 cm^{-1} および1558 cm^{-1} の吸収ピーク強度が増加したこと、5分間照射後に1620 $\sim$ 1700 cm^{-1} の吸収バンドがあらわれたことは顕著な変化である。これらの新しいIR吸収強度の増加はカルボキシラトの CO_2 逆対称伸縮振動に帰属することができる。また、1620 $\sim$ 1700 cm^{-1} の吸収バンドにはケトンの $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動も寄与している。以上のことからエステル結合の $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ 結合が解離したときに生成するカルボキシラトがFEL照射後に存在することが確認された。また、カルボキシラトおよびケトンは、解離したエステル結合に酸素が付加したときにも生成すると考えられる。

4-3 エステル結合の解離にともなう化学変化

図5にFEL照射前後の1700 $\sim$ 1750 cm^{-1} のIR吸収スペクトルをピーク分離した結果を示す。これらのスペクトルは(a)1737 cm^{-1} 、(a')1739 cm^{-1} 、(b')1734 cm^{-1} および(c')1723 cm^{-1} にピークをもつローレンツ関数に分離できた。未照射部の1737 cm^{-1} の吸収ピーク(a)はエステル結合に特徴的な $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動に帰属できる。FELを10秒間照射した部分の吸収スペクトルでは1737 cm^{-1} の吸収ピーク(a)の強度の減少とともに新しく1723 cm^{-1}

の吸収ピーク(c')が観察された。1723 cm^{-1} の吸収ピーク(c')にはアルデヒド、カルボン酸およびケトンの $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動が寄与している。1分間照射した部分において1737 cm^{-1} の吸収ピーク(a)は1739 cm^{-1} の吸収ピーク(a')および1734 cm^{-1} の吸収ピーク(b')に分離できた。1734 cm^{-1} の吸収ピーク(b')は結合状態が変化し弱くなったエステル結合に起因すると考えられる。さらに照射の経過によって1734 cm^{-1} の吸収ピーク(b')の強度が減少するとともに、1723 cm^{-1} の吸収ピーク(c')の強度が増加した。

以上のことから、FEL照射によってエステル結合は次の段階的変化をすることが明らかになった。

- (1) エステル結合の不安定化
- $\downarrow$
- (2) エステル結合の解離
- $\downarrow$
- (3) アルデヒド (RCHO), カルボン酸 (RCOOH)

およびケトン ($\text{R}_2\text{C}=\text{O}$)への化学変化

4-4 FELのエステル結合への照射効果

図6にFT-IRおよびラマン分光の結果から得られたFEL照射効果によるコレストロールオレ

イトのエステル結合部の化学結合の変化をまとめた。FEL照射によって分子振動を強励起されたエステル結合の化学結合の変化は、図中の矢印(a)および矢印(b)に示した次の2つの過程が考えられる。

さらに、解離後生成した、 $R-CO-$ 、 $R'-O$ 、 $R-COO-$ (カルボキシラト) および $R'-$ は酸素や水素の付加反応によってアルデヒド、カルボン酸、ケトンおよびカルボキシラトへと化学変化する過程(c)、(d)および(e)をたどることがわかった。以上の化学反応をまとめると次のようになる。

これらの化学反応に寄与する水素や酸素ラジカルの起源は明らかではない。水素についてはコレステロールオレイト分子に存在する $-CH$ 、 $-CH_2$ 、 $-CH_3$ 結合からの解離によることが考えられる。一方、酸素原子はコレステロールオレイト1分子につき2原子しか含まれていない。したがってコレステロールオレイト分子以外が酸素の起源である可能性が高い。また、FEL照射は空気で行われていること、作製したコレステロールオレイト膜には水分が含まれていることから、これらがFEL照射によって解離し水素原子や酸素原子の起源として化学変化に寄与している可能性もある。

5. 結 論

エステル結合の $C=O$ 伸縮振動に対応した波長

5.79 μm の赤外自由電子レーザー (FEL) をコレステロールエステル的一种であるコレステロールオレイトに照射し、その分子振動の変化を顕微フーリエ変換赤外分光法 (FT-IR) およびラマン分光法を用いて測定し、化学結合の変化を検討し、以下の結論を得た。

1. FEL照射によるコレステロールオレイトの分子振動の変化を、FT-IRおよびラマンスペクトルの変化から観察した。
2. 波長5.79 μm のFEL照射が、エステルの $C=O$ 結合および $C-O-C$ 結合に顕著な変化を与えた。
3. コレステロールオレイトの化学結合は、FEL照射時間に依存してエステルから次の段階的な化学結合への変化として観察できた。
 - (1) エステル結合の不安定化 (結合長の変化、結合力の変化)
 - (2) エステル結合の解離 ($C-O-C$ 結合の解離)
 - (3) アルデヒド、カルボキシラト、カルボン酸およびケトンへの化学変化。

謝 辞

本研究に対し、多くの助言をいただいた大阪府立大学林良一教授に深く感謝いたします。また自由電子レーザー研究所運営管理室各位ならびに雑喉章室長より頂戴したご支援に深く感謝いたします。

文 献

- 1) D. Voet and J. G. Voet : Biochemistry, 2nd Ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995.
- 2) J. Hayashi, T. Saito and K. Aizawa, Lasers Surg. Med. 21 (1997) 287.
- 3) T. Tomimasu, K. Saeki, Y. Miyauchi et al.: The FELI FEL facilities-challenges at simultaneous FEL beam sharing systems and UV-range FELs, Nucl Instr and Meth in Phys Res A 375 : 626-631, 1996
- 4) K. Saeki, S. Okuma, E. Ohshita et al.: Optical cavities for IR-FELs at the FELI, Nucl Instr and Meth in Phys Res A 375 : 10-12, 1996

- 5) A. Kobayashi, K. Saeki, S. Okuma et al.: Optical property of infrared-FELs at the FELI, Nucl Instr and meth in Phys Res A 375 : 317-321, 1996
- 6) K. Awazu et al.: Nucl instr and Meth in Phys Res B (Proc. FELFA'98) in press.
- 7) 尾崎幸洋, 岩崎秀夫 : 生体分子分光学入門, 67, 共立出版, 1992.
- 8) 浜口宏夫, 平川暁子編 : 日本分光学会測定法シリーズ17「ラマン分光法」, 229-235, 学会出版センター, 1988.