赤外自由電子レーザーによる頸動脈内コレステロールの 選択的除去

石井 克典, 岩月 幸一*, 吉峰 俊樹*, 栗津 邦男

大阪大学大学院 工学研究科電子情報エネルギー工学専攻 (〒573-1028 大阪府枚方市津田山手2-9-5)

*大阪大学大学院 医学系研究科臓器制御医学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-2)

The Selective Removal of Cholesterol Oleate in the Human Carotid Artery by Infrared Free Electron Lasers

Katsunori ISHII, Kouichi IWATUKI,* Toshiki YOSHIMINE,* and Kunio AWAZU

*Institute of Free Electron Laser, Department of Electronic, Information Systems and Energy Engineering,
Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-9-5 Tsuda-Yamate, Hirakata, Osaka 573-0128*

**Department of Neurosurgery, Graduate School of Medicine, Osaka University,
2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871*

(Received August 7, 2002)

We observed and discussed the effects of Free Electron Laser (FEL) irradiation to cholesterol accumulated in the regions of arteriosclerosis in the human carotid artery, by an Infrared micro spectroscopy (FT-IR). As a result of this study, we found that we could selectively remove cholesterol only without effects to normal parts of the human body, in irradiating 5.75 μm -FEL that come from a ester bond of cholesterol ester, under the condition that average power is 5 mW, power density is $\sim 16 \text{ W/cm}^2$ and irradiation time is 30~180 sec.

Key Words: Free Electron Laser (FEL), Arteriosclerosis, Cholesterol ester, Selective removal

1. はじめに

我々は、赤外自由電子レーザー (IR-FEL) によって選択的にコレステロールエステルを除去する可能性を示してきた。これは粥状動脈硬化の主要因であるコレステロールエステル (コレステロールとオレイン酸、リノール酸などの脂肪酸がエステル結合したもの) の、エステル結合の分子振動に対応した波長 5.75 μm の FEL を照射することにより、コレステロールエステルのみが選択的に除去される現象である。この現象は粥状動脈硬化起因の心筋梗塞、狭心症、脳梗塞等の循環器系疾患の低侵襲的な予防や治療の可能性を示すもので、IR-FEL の医療応用にとっての基礎検討として極めて重要である¹⁻⁷⁾。

そこで本研究では、医療応用への基礎として、ヒトの粥状動脈硬化部位中のコレステロールをサンプルとして用いて、正常組織への侵襲度の低い選択的除去可能性を、IR-FEL を用いて検討し、顕微赤外分光法 (FT-IR) により評価・考察した。

2. *in vitro* 実験

2.1 FEL 照射サンプル

サンプルには、ヒトの左頸動脈内粥状動脈硬化部位を

用いた。摘出した動脈内膜から薄く切り出した切片を、赤外透過用 BaF₂ 基板 (直径 13 mm, 厚さ 1 mm) に貼り付けた後乾燥させた。頸動脈サンプルの作成法を Fig. 1 に示す。

Fig. 1 Cutaway view of the blood vessel in the region of arteriosclerosis.

2.2 頸動脈内膜赤外吸収スペクトル

ヒトの頸動脈内膜正常組織についての測定結果をFig. 2 (a)に、粥状動脈硬化コレステロール蓄積部位についての測定結果をFig. 2(b)に示す。Fig. 2(b)の5.75 μm 付近のピークが、コレステロールエステル特有の分子間伸縮振動に由来する赤外吸収スペクトルピークである。また、生体組織の蛋白質中に多く見られるアミドI結合のピークは6.06 μm 付近、アミドII結合のピークは6.45 μm 付近に顕著に見られる⁸⁾。

2.3 実験方法

以下のプロトコールにてFEL照射及び評価を行った。

- ①顕微赤外分光光度計(FT-IR) (Horiba: FT-520)によりFEL照射前の赤外吸収スペクトルを測定し、サンプル表面のコレステロール蓄積部位を探索する。FT-IRは赤外透過面が100 $\mu\text{m} \times 100 \mu\text{m}$ の正方形で、透過法により測定を行った。
- ②FELをコレステロール蓄積部位に照射する。FEL波長は、コレステロールエステル中のエステル結合の赤外吸収波長5.75 μm と、エステル結合に吸収のない波長と比較対照するため、生体組織の蛋白質中に多く見られるアミドI結合の赤外吸収波長6.06 μm を使用した。FEL

(b) Region of arteriosclerosis

(a) Normal

Fig. 2 Infrared absorption spectra of the human carotid artery. (a) Normal parts. (b) Cholesterol accumulated in the regions of arteriosclerosis.

照射実験系をFig. 3に、FEL照射条件をTable 1に示す。

- ③FEL照射後のコレステロール蓄積部位の赤外吸収スペクトルをFT-IRにより測定し、照射前後を比較することでFEL照射効果を評価した。

3. 実験結果

3.1 6.06 μm FEL照射結果

Fig. 4(a)に波長6.06 μm 、平均パワー5 mW(パワー密度15.9 W/cm²)、照射時間180 secのFEL照射前後の赤外吸収スペクトルを示す。

6.06 μm のFELを照射した場合、アミドIの赤外吸収スペクトルピーク値(6.06 μm 付近)は $\sim 44\%$ 低減し、コレステロールエステルの赤外吸収スペクトルピーク値(5.75 μm 付近)は $\sim 27\%$ 低減した。このコレステロールエステルの赤外吸収スペクトルピークの減少は、FEL照射による組織変性の影響と、FEL照射点のサンプル量減少起因の赤外吸収スペクトルの縮小であると考えられる。しかし、FEL照射波長6.06 μm 、平均パワー5 mW(パワー密度15.9 W/cm²)付近の照射条件では、組織の変性は小さく、照射時間の依存性は少ないと考えられる。また、6.06 μm のFEL照射では、コレステロールエステルの選択的除去は困難であるということが示された。

3.2 5.75 μm FEL照射結果

Fig. 4(b)に波長5.75 μm 、平均パワー5 mW(パワー密度15.9 W/cm²)、照射時間180 sec、Fig. 4(c)に波長5.75 μm 、平均パワー6.5 mW(パワー密度9.19 W/cm²)、照射時間30 sec、Fig. 4(d)に波長5.75 μm 、平均パワー7.8 mW(パワー密度69 W/cm²)、照射時間60 secのFEL照射前後の赤外吸

Fig. 3 FEL irradiation system and pulse structure of FEL.

Table1 FEL irradiation conditions.

Wavelength [μm]	Average Power [mW]	Irradiation Area [cm ²]	Power Density [W/cm ²]	Irradiation Time [sec]	Fig. Number
6.06	5	3.14×10^{-4}	15.9	180	Fig. 4(a)
			15.9	180	Fig. 4(b)
5.75	6.5	7.07×10^{-4}	9.19	30	Fig. 4(c)
	7.8	1.13×10^{-4}	69	60	Fig. 4(d)

Fig. 4 Infrared absorption spectra before and after irradiation of FEL. There is a mention of FEL irradiation conditions (Table 1).

収スペクトルを示す。

パワー密度 15.9 W/cm^2 でFELを照射した場合、コレステロールエステルの赤外吸収スペクトルピーク値 ($5.75 \mu\text{m}$ 付近) の低減、消失が見られた。照射時間30 secでは83 %、60 secで88 %、180 secのときは90 %で、Fig. 4(b) よりコレステロールエステルの赤外吸収スペクトルピークが消失していると捉えることができた。また、照射時間30~180 secの、計測した赤外吸収スペクトルのどの波長域においても、スペクトル形状の顕著な変化は観察されず、赤外吸収スペクトルは相似的变化であった。照射時間180 sec (Fig. 4(b)) のとき、コレステロールエステル以外の赤外吸収スペクトルピーク値の低減率は10~39 %であった。FEL180 sec照射後のサンプル表面の画像をFig. 5(a)に示す。Fig. 5(a)から、FEL照射後もサンプルに光学顕微鏡下で変化が観察されなかったことから、正常組織への影響は少ないと考えられる。

したがって、FEL照射波長 $5.75 \mu\text{m}$ 、平均パワー5 mW (パワー密度 15.9 W/cm^2)、照射時間30~180 sec付近の照射条件では、赤外分光測定からアミドI、アミドIIの赤外吸収に変化を与えず、コレステロールエステルを選択的

Fig. 5 Surface of the sample (tunica intima of the blood vessel) after irradiation of $5.75 \mu\text{m}$ FEL. (a) Power density 15.9 W/cm^2 , irradiation time 180 sec. There is no irradiation trace. (b) Power density 69 W/cm^2 , irradiation time 60 sec. The edge of irradiation trace is carbonized.

に除去できるということが示された。

パワー密度 9.19 W/cm^2 でFELを照射した場合、Fig. 3(c) のようにコレステロールエステルの赤外吸収スペクトルピーク値の低減、消失は見られなかった。照射時間60、180 secのときも同様のスペクトルが得られた。

つまり、FEL照射波長 $5.75 \mu\text{m}$ であっても、パワー密度 9.19 W/cm^2 の場合はコレステロールエステルが除去されないことが示唆された。

パワー密度 69 W/cm^2 でFELを照射した場合、過剰照射による組織の変性によって、サンプル表面の照射跡を観察した。照射後、コレステロールエステルのピークは消失した (Fig. 4(d)) が、照射点のサンプル量の減少によりスペクトル高が低く平滑になった。また、 $5.68 \mu\text{m}$ 付近になだらかなスペクトルピークが観測された。FEL 60 sec照射後のサンプル表面の画像をFig. 5(b)に示す。

4. 考 察

粥状動脈硬化病変は、いわゆるソフトプラークと呼ばれる脂質に富んだ粥状成分と、ハードプラークと呼ばれるコラーゲンに富んだ硬化組織成分とで構成され、ソフトプラークにはコラーゲンや血管成分のない細胞外脂質に富んだアテロームコアが存在する。プラークの柔らかさは、エステル化された細胞外脂質の比率により決定される。ソフトプラークは破裂・崩壊による血管閉塞、あるいはかん流組織の虚血性障害を起こしやすいものとされ臨床上重要であり、また血管内治療(経皮的血管拡張術あるいはステント留置術)においては、プラークの内容物が血管内に押し出され、重篤な合併症である塞栓症を起こしやすいものとされ、血管内治療の適応は否定的であった。赤外FELを用いる本法によりコレステロールの選択的除去がカテーテル治療により可能であれば、血管内治療はより安全に施行可能となると考えられる。

これまでに、オレイン酸コレステリル単体の脱水した薄膜をサンプルとした、コレステロールエステルの選択的除去や選択的分子振動励起効果の研究がなされてきた¹⁻⁷⁾。これらの結果から波長5.75 μm のFELによるオレイン酸コレステリル薄膜のコレステロールエステルの最適な選択的除去条件はパワー密度 4.5~7.5 W/cm^2 であると報告されている⁵⁾。

今回、ヒトの頸動脈内膜粥状動脈硬化部位中のコレステロールをサンプルとして用いて、波長5.75 μm でパワー密度15.9 W/cm^2 のFEL照射により、コレステロールエステルのみが選択的に除去できることがFT-IRの赤外吸収スペクトルから示された。また、FEL照射後の試料表面に光学顕微鏡下での血管内膜などの形態学的な変化は認められなかった。照射による正常組織への影響は無視できるレベルまで抑えられたものと考えられ、今後さらに動物モデルによる急性実験あるいは慢性実験により安全性の確認を進める予定である。

Fig. 6に、従来のオレイン酸コレステリルで観測されたコレステロールの選択的除去で報告されている条件^{1,5)}と、今回のヒトの頸動脈粥状動脈硬化部位で観測されたものの、赤外吸収スペクトルの吸光度から算出したコレステロール分解率のパワー密度依存性を示す。

Fig. 6より、オレイン酸コレステリル単体のコレステロールエステルの選択的除去は、パワー密度1~10 W/cm^2 で観測され、照射時間180 secまでは照射時間が増すごとにコレステロールの分解率も大きくなった。ヒトの頸動脈粥状動脈硬化部位のコレステロールエステルの選択的除去は、パワー密度15.9 W/cm^2 と69 W/cm^2 で観測され、パワー密度15.9 W/cm^2 のときは照射時間が増すごとにコレステロールの分解率も大きくなり、照射時間180 secで分解率は90%に達した。

また、パワー密度69 W/cm^2 ではサンプルが炭化して正常組織に影響を及ぼし、パワー密度9.19 W/cm^2 ではコレステロールエステルを除去できないことから、コレステロールエステルの選択的除去の最適条件は、これらのパワー密度の間で15.9 W/cm^2 の前後であることが示された。

Fig. 6 Power density dependence of cholesterol decomposition ratio.

ヒトの頸動脈内コレステロールエステルのパワー密度を変数とした選択的除去条件がオレイン酸コレステリルのものより高いのは、ヒトの血管細胞を構成する水や蛋白質の影響や、切り出した試料の表面の形状や厚さによるものと考えられる。

FEL過剰照射時(パワー密度 69 W/cm^2)に5.68 μm 付近に nadir かなスペクトルピークが観測されたが、これはサンプルを構成する蛋白質やコレステロールエステルが炭化したことにより、分子間結合の形態の変化によって赤外吸収スペクトルのピークが高波数側にシフトしたものと考えられる。この現象の詳細は、コレステロールの選択的除去の基礎過程として安全性・効率上重要であるため、今後詳細を明らかにしなければならない。

FEL照射によるサンプル量減少起因の赤外吸収スペクトルの相似的縮小(Fig. 4(a) (b) (d))が観測されたが、これは以下のようなメカニズムによるものであると考えられる。①高ピークパワー ($10^8 \sim 10^9 \text{ W}/\text{cm}^2$) かつ短パルス (~psec) のFELがサンプル表面に入射することによって、多数の光子が短時間に吸収され、特定の分子振動が励起される。②1つの振動モードに集中した振動エネルギーは、まず分子内に緩和し、分子内の熱エネルギーに変換される。③多くの熱エネルギーを得た最表面の分子が、分子間の結合を断ち切って蒸散する^{4,5)}。

この蒸散は、熱エネルギーが深さ方向に伝搬し温度が平均化するよりも早い過程であるため、FEL照射時にサンプル表面で局所的に生じる。従って、通常の加熱実験では観察されず、パルスレーザーであるFELの照射によってのみ観察される^{4,5)}。

5. おわりに

波長5.75 μm (パワー密度15.9 W/cm^2) の赤外自由電子レーザーを、ヒトの動脈内粥状動脈硬化部位(コレステ

ロール蓄積部位)に照射することにより、動脈内膜正常組織の損傷を抑え、選択的にコレステロールを除去できることを初めて示した。しかし、本研究のように生体試料をサンプルとした計測データはばらつきが大きいため、サンプル数と計測回数を増やして、検討を重ねなければならない。そのため、今後は、データのサンプル依存性を考慮した、コレステロールの選択的除去の最適条件を詳細化することや、正常組織への影響を検討する等、医療応用上重要となってくる低侵襲性の定量的分析を進める必要がある。

謝 辞

本研究に対し多くの助言を戴いた、大阪大学大学院工学研究科電子情報エネルギー工学専攻博士後期課程在籍の深見 裕子氏に深く感謝いたします。

参考文献

- 1) 栗津 邦男, 永井 昭夫, 会沢 勝夫: レーザー研究 **26** (1998) 369.
- 2) K. Awazu, A. Nagai, and K. Aizawa: Lasers in Surgery and Medicine **23** (1998) 233.
- 3) 深見 裕子, 前田 佳均, 栗津 邦男: 日本レーザー医学会誌 **19** (1998) 123.
- 4) 深見 裕子, 栗津 邦男: レーザー研究 **27** (1999) 840.
- 5) 深見 裕子, 栗津 邦男: レーザー研究 **28** (2000) 695.
- 6) K. Awazu and Y. Fukami: Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. A **475** (2001) 650.
- 7) K. Awazu and Y. Fukami: Rev. Sci. Instrum. **72** (2001) 2239.
- 8) 堀口 博: 赤外吸光図説総覧 (三共出版, 1993) 224, 269.