光技術を用いた中枢神経活動・代謝制御

片岡 洋祐

大阪市立大学大学院 医学研究科・システム神経科学 (〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町1-4-3)

Control of Activity and Metabolism of the Central Nervous System by Photo-Technology

Yosky KATAOKA

Department of Physiology, Osaka City University, Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585

(Received March 7, 2007)

Low-reactive level laser therapy and photo-dynamic therapy have become popular in many clinical fields. Herein, the possible application of these techniques to the central nervous system is discussed. Low-reactive level laser irradiation with a wavelength of 830 nm has been shown to suppress neuronal activities in the rodent brain and increase tissue ATP levels. Such effects of lasers may facilitate the protection of neurons from ischemic brain insults. In addition to these techniques, we have demonstrated that photo-oxidation of the cerebral cortex by photo-irradiation following the injection of photosensitizing dye induces spreading depression, the propagation of neuronal membrane depolarization throughout the cortical hemisphere. Spreading depression potentially induced the proliferation of progenitor cells, which have multipotency in cellular differentiation. Thus, this photo-dynamic technique may facilitate the regeneration of brain tissue. We believe that these phototherapeutic techniques will usher in a new frontier in the medical science of the central nervous system.

Key Words: Low-reactive level laser, Near-infrared, Photo-oxidation, Brain, Neuron

1. はじめに

医療現場では光技術はなくてはならないツールとなっている。特に近年、内視鏡や顕微鏡に代表される生体観察・診断ツールに加え、低反応レベルレーザーによる疼痛緩和やPDT (Photo-dynamic therapy) による癌治療など、光技術は疾患治療にも応用されはじめ、患者にやさしい医療技術の一つとして広がりを見せている。ここでは低反応レベルレーザー照射による神経機能の制御とそのメカニズムに関する細胞生物学的研究について解説し、さらに光増感色素と光照射を組み合わせた光組織酸化技術による脳内未分化細胞の増殖・分化誘導技術の開発について紹介する。超高齢化社会を迎えるわが国において、これらの技術は、将来、中枢神経機能改善や神経再生に応用できる可能性がある。

2. 低反応レベルレーザー照射による神経機能制御

2.1 低反応レベルレーザーの神経代謝への作用

レーザー光が発見されて以来、紫外・可視・近赤外光がもつ生体作用について研究がなされ、細胞増殖活性や細胞代謝、神経機能に影響を与えることがわかってきた。また、生体内の光受容物質に関して、ミトコンドリア

のチトクロームCオキシダーゼが候補の一つに挙げられ、いくつかの波長帯域の光を吸収すること、その結果、ミトコンドリア呼吸鎖の機能に影響を与えることが議論されており¹⁾、実際、単離したミトコンドリアを用いた研究で、アデノシン-3-リン酸(ATP)産生が促進することが確認されている²⁾。

われわれも、げっ歯類の中枢神経組織を対象に近赤外半導体レーザー(波長830 nm)の低反応レベル照射実験をおこない、組織内ATP含量への影響を調べた。ラット頭頂部の頭蓋骨を一部除去し、大脳皮質組織に対してレーザー照射(照射密度4.8 W/cm²)を15分おこなった実験では、照射直後の組織中のATP含有量が15-20%上昇していること、一方、アデノシン-2-リン酸(ADP)含有量には影響しないことを見出した³⁾。さらに、同レーザー照射によるATP増加作用はラット海馬スライス標本を用いたin vitro実験系においても確認できた^{4,5)}。なお、ATP増加作用は波長652 nmおよび940 nmのレーザーでは実現できなかったことから、波長特異性があるものと考えられたが、これら効果と波長の関係を単純にミトコンドリア機能分子の光吸収特性から説明するには困難な点もある。今後、細胞の酸化・還元状態やpH環境などにより変化する各分子状態と光作用との関係を視野に入れた検討が進むことに期待したい。

2.2 低反応レベルレーザーの神経伝達機能への作用

低反応レベルレーザー照射が神経伝達機能を抑制する効果に関しては、Walkerらによるヒト末梢神経へのHe-Neレーザー光(波長632.8 nm)の照射実験にまで遡ることができる⁶⁾。以来、わが国を中心にいくつかの基礎研究結果が報告されている。特に1980年代から1990年代初頭にかけては主にHe-Neレーザー光を中心に、それ以降は組織透過性にすぐれる近赤外レーザー光による報告が多い。IwaseらはHe-Neレーザーを用いて、ウサギ脳嗅皮質ニューロンにおける膜電位の過分極現象を報告した⁷⁾。Shimoyamaらは同レーザー光がラット後根神経節ニューロンの膜電位を脱分極し、膜抵抗を低下させる作用を有する事実を報告する一方⁸⁾、上頸神経節ニューロンにおいては膜電位の過分極変化による神経シナプス伝達抑制現象を報告している⁹⁾。近赤外レーザー光においては、Tsuchiyaらがラット末梢求心性神経伝達を抑制する効果を報告しており^{10,11)}、Miuraらはそれらの抑制効果がナトリウムチャネルの開口現象による膜の脱分極によって得られたものだとしている¹²⁾。しかし、何れの報告においてもレーザー光の受容物質が何かといった詳細な細胞内メカニズムについては言及されていない。

われわれも砂ネズミ大脳皮質に対して近赤外レーザーを低反応レベルで照射したところ、ニューロン活動を5-10分程度で可逆的に抑制できることを確認した^{13,14)}。さらに、ラット海馬スライスを用いた研究から、同レーザー照射が興奮性シナプス伝達を抑制することを見出した。培養海馬ニューロンを用いたパッチクランプ実験では、レーザー照射により、ニューロンの細胞膜電位が10-20 mV過分極し、同時に膜抵抗が25 %減少することが判明し、レーザー照射によるシナプス伝達抑制が細胞膜上のカリウムチャネルの開口現象を介したカリウムイオン透過性の増大によることが強く示唆された¹⁵⁾。上述のように、同レーザー照射が組織内ATP含有量を増加させるはたらしがあることから、細胞内ATPの増加が細胞膜上のATP感受性カリウムチャネルを活性化し、チャネル開口確率を増大させてシナプス伝達抑制効果を発揮した可能性が考えられた(Fig. 1 (a))¹⁶⁾。さらに本仮説は以下の実験結果においても支持された。すなわち、ATP感受性カリウムチャネル活性化剤の投与下ではレーザー照射によるシナプス伝達抑制効果が消失した。逆にレーザー照射をおこなってシナプス伝達が抑制された状態では同薬剤による抑制効果が消失した。

これまでの多くの基礎研究データは、これらレーザー効果が広範な組織の温度上昇によってもたらされたものではないことを支持している。一方、われわれが示したATP-カリウムチャネル活性化説は一つの仮説ではあるが、細胞内ATP濃度の上昇によるナトリウム-カリウム交換ポンプの活性上昇など、他の可能性を否定するものではない。また、1分以内の短時間照射と数分以上の長時間照射では神経応答に違いがあるなど、レーザー照射時間の長短によってニューロンへの作用メカニズムが異なる可能性もある。低反応レベルレーザー照射による神経機能抑制効果が複数の細胞内メカニズムを介してもたらさ

Fig. 1 Possible mechanisms of inactivation of excitatory neurotransmission by near-infrared low-reactive level laser irradiation or photo-dynamic tissue oxidation. (a) Near-infrared low-reactive level laser irradiation increases intracellular ATP levels and suppresses excitatory synaptic transmission via an increase in the open probability of potassium channels. (b) Photo-activation of photosensitizing dye inactivates excitatory synaptic transmission via the production of singlet oxygen, which oxidizes tissue proteins including receptors.

れていると考えるのが妥当であろう。

2.3 低反応レベルレーザーの中枢神経疾患治療応用の可能性

脳は他の臓器に比し、大量(2-30倍)のATP(エネルギー)を消費してその機能を維持している。そのエネルギーの多くはニューロン細胞膜で機能するイオンポンプに費やされ、これにより膜内外のイオン環境が維持されている。脳卒中などで虚血負荷が与えられると数分以内にニューロンのATP含有量が低下し、結果、イオンポンプ機能の低下を引き起こして細胞膜内外のイオン環境を破綻させ、虚血性脳障害を引き起こす。つまり、中枢神経細胞におけるATPレベルは、虚血時の脳障害を決定する最重要因子であり、その確保は神経細胞保護の観点からもっとも効果的な手段であるものと予想される。近赤外低反応レベルレーザー照射が中枢神経組織におけるATP含有量を増加させ、さらに無秩序に起こる神経興奮を抑制する効果を持つことから、将来、虚血性脳障害や低酸素性脳障害の治療にも利用できるのではないかと期待される。Iwaseらはラット海馬スライス標本を対象に低酸素・低グルコース負荷をおこなったところ、He-Neレーザー照射群

において神経伝達機能の低下が軽減されたことを報告している¹⁷⁾。今後、近赤外レーザーにおいても虚血性神経機能障害を軽減できるのか、基礎的検証が待たれる。また、実際の治療応用には、パルスレーザー照射法の開発など、レーザー光を脳内広範囲に一定以上の強度で照射できる新たな照射技術の開発も必須であろう。

3. 光酸化法による中枢神経機能制御

3.1 光酸化法によるシナプス伝達抑制

低反応レベルレーザー照射による神経伝達抑制技術の他に、光増感色素の投与と光照射を組み合わせる脳局所組織を酸化し(光酸化法: Photo-dynamic tissue oxidation), 局所神経伝達を可逆的に抑制する方法も開発された^{13,18)}(Fig. 1 (b))。ラット海馬スライス内の興奮性シナプス伝達を対象とした実験では、光増感色素であるローズベンガル(吸収波長560 nm)を組織液中へ投与して細胞内へ取り込ませ、その後、20-30秒という短時間の光照射(ハロゲン光50 mW/cm²)をおこない、活性酸素種を発生させて局所組織を酸化したところ、シナプス伝達機能がほぼ完全に不活化されることが観察された。その後、組織酸化負荷を中止すると、シナプス伝達機能は徐々に回復した。軸索上を伝搬する活動電位はこの程度の組織酸化負荷では抑制されず、本法は神経伝達機能の中でも特にシナプス伝達を効果的に抑制することがわかった。

本法は癌治療等で知られるPhoto-dynamic therapy (PDT)と同じ原理であるが、PDTでは光増感色素を取り込んだ細胞を殺してしまうのに対し、本法ではシナプス伝達が他の神経機能よりも酸化ストレスに脆弱である性質を利用し、よりマイルドな組織酸化負荷で可逆的にシナプス伝達を抑制することを目指したものである。脳内神経サーキットの研究において、局所の神経回路のみを抑制し、通過線維には作用しない本技術は、脳内局所の神経機能を調べるツールとしてたいへん有用である。

3.2 光酸化法の中枢神経再生医療への応用の可能性

最近、光酸化法を中枢神経再生技術に応用できる可能性が見出された。これは大脳皮質のきわめて限局した領域に光酸化ストレスを与えて同領域の神経細胞膜に集団的脱分極刺激を与え、これを起点として神経細胞膜の脱分極現象を皮質半球全体に伝播(脱分極波: Spreading depression)させて達成されたものである(Fig. 2 (a))¹⁹⁾。脱分極波の回数は光酸化の負荷時間により制御できる。ラットを用いた一連の組織化学的研究から、発生させた脱分極波の回数に依存して、大脳皮質内で大量の細胞が新生・増殖してくることが観察された(Fig. 2 (b))^{20,21)}。これは、ニューロンへのカルシウムイオン流入により、BDNF・bFGF・プロスタグランジンなどの細胞増殖を誘導する内因性物質が産生・放出されたためと考えられた。さらに、増殖細胞の性質やその後の分化過程を検討した結果、分裂したのはニューロン細胞体に密着して存在する未分化細胞(Perineuronal germinal cell)であり²²⁾、分裂後、オリゴデンドロサイトやアストロサイトのグリア

Fig. 2 Spreading depression-induced cell proliferation in the rat cerebral cortex. (a) Schema of induction of spreading depression, propagation of neuronal/glial membrane depolarization throughout the unilateral cortex, by photo-dynamic tissue oxidation. (b) Images of proliferating cells (immunostaining for BrdU-labeled nuclei) in a cerebral cortex that underwent spreading depression and cells of the opposite hemisphere. Bars, 50 μ m. Note that spreading depression facilitated cell proliferation.

細胞群と未熟ニューロンの3系統の細胞へと分化する可能性が示された。これらの研究から、成熟後もわれわれの脳内には高い増殖能と多分化能を保持した未分化細胞が存在することが証明された。また、光酸化技術により成熟脳内に存在する未分化細胞の増殖・分化を制御できる可能性が見出され、将来、ヒトの再生医療にも光が応用される可能性が出てきた。今後、脱分極波を発生させる方法として、光増感色素の投与を必要としない短パルスレーザーを利用するなど、生体傷害性のより低い光技術の開発が進むことにも期待したい。

4. おわりに

超高齢化社会に向かって突き進むわが国にとって、脳卒中や認知症の予防・治療法の開発は急務である。特に高齢者は既に基礎疾患を有していることが多く、従来の治療手技に耐え得ないケースも多い。また、国民の医療費負担が高まる中、高額医療の代替となる技術開発も急がれる。今日まで、低反応レベルレーザー治療は副作用や患者の負担のきわめて少ない治療法として、末梢組織の除痛や炎症の緩和・創傷治癒促進などに一定の成果を挙げてきた。また、近年のPDT(Photo-dynamic therapy)技術も、悪性腫瘍の治療における患者の負担軽減に貢献している。今回紹介した基礎研究は、中枢神経疾患においても光技術が利用できる可能性を示すものである。今後はレーザー工学の発展はもちろん、ターゲット分子に特異的な光増感分子の開発など、化学・物理学・生物学な

どのさまざまな分野の融合研究からさらに進んだ光技術
応用が提案され、新しい医療パラダイムの開拓や治療対
象の広がりをもたらすものと期待される。

参考文献

- 1) T. Karu: J. Photochem. Photobiol. B Biol. **49** (1999) 1.
- 2) S. Passarella, E. Casamassima, S. Molinari, D. Pastore, E. Quagliariello, I. M. Catalano, and A. Cingolani: FEBS Lett. **175** (1984) 95.
- 3) N. Mochizuki-Oda, Y. Kataoka, Y. Cui, H. Yamada, M. Heya, and K. Awazu: Neurosci. Lett. **323** (2002) 207.
- 4) 小田一望月 紀子, 片岡 洋祐, 山田 久夫, 栗津 邦男: 日本レーザー治療学会誌 **2** (2004) 53.
- 5) 小田一望月 紀子, 片岡 洋祐, 田村 泰久, 山田 久夫, 山田 廣成: 日本レーザー治療学会誌 **4** (2005) 14.
- 6) J. B. Walker and L. K. Akhanjee: Brain Res. **344** (1985) 281.
- 7) T. Iwase, N. Hori, and T. Morioka: Laser Med. Surg. **4** (1988) 166.
- 8) N. Shimoyama, K. Iijima, T. Mizuguchi, M. Shimoyama, and Y. Hori: Pain Res. **6** (1991) 111.
- 9) M. Shimoyama, Y. Fukuda, N. Shimoyama, K. Iijima, and T. Mizuguchi: J. Clin. Laser Med. Surg. **10** (1992) 337.
- 10) K. Tsuchiya, M. Kawatani, C. Takeshige, T. Sato, and I. Matsumoto: Neurosci. Lett. **161** (1993) 65.
- 11) K. Tsuchiya, M. Kawatani, C. Takeshige, and I. Matsumoto: Brain Res. Bull. **34** (1994) 369.
- 12) A. Miura and M. Kawatani: Pain Res. **11** (1996) 175.
- 13) 片岡 洋祐: 生物物理学雑誌 **41** (2001) 247.
- 14) H. Riquimaroux and Y. Kataoka: *Temporal firing activities of auditory cortical neurons and modification of their activities by laser irradiation. Plasticity and signal representation in the auditory system* (J. Syka and M. M. Merzenich, Springer, New York, 2004) p167.
- 15) 片岡 洋祐: ペインクリニック **24** (2003) 541.
- 16) 片岡 洋祐, 小田一望月 紀子, 田村 泰久, 崔 翼龍, 山田 久夫: 日本レーザー治療学会誌 **2** (2004) 45.
- 17) T. Iwase, N. Hori, T. Morioka, and D. O. Carpenter: Laser Surg. Med. **19** (1996) 465.
- 18) Y. Kataoka, H. Morii, K. Imamura, Y. Cui, M. Kobayashi, and Y. Watanabe: Eur. J. Neurosci. **12** (2000) 4417.
- 19) Y. Cui, Y. Kataoka, Q. H. Li, C. Yokoyama, A. Yamagata, N. Mochizuki-Oda, J. Watanabe, H. Yamada, and Y. Watanabe: Biochem. Biophys. Res. Commun. **300** (2003) 631.
- 20) Y. Tamura, Y. Kataoka, Y. Cui, and H. Yamada: Neurosci. Res. **50** (2004) 129.
- 21) Y. Kataoka, Y. Tamura, Y. Cui, and H. Yamada: Acta Histochem. Cytochem. **38** (2005) 93.
- 22) Y. Kataoka, Y. Tamura, Y. Takamori, Y. Cui, and H. Yamada: Med. Mol. Morphol. **39** (2006) 28.

レーザーワード

低反応レベルレーザー (low-reactive level laser)

高熱を発生する高出力レーザーが医学的に組織の切開や凝固・止血など、外科手術を中心に使用されているのに対し、低反応レベルレーザーは可視から近赤外波長域の比較的出力の低いレーザーを利用し、熱効果ではなく光化学効果を期待するものである。これまでに生体の創傷や潰瘍の治癒促進作用・鎮痛効果・抗炎症効果などが

見出され、ペインクリニックをはじめ、麻酔科・整形外科・皮膚科・耳鼻咽喉科・歯科領域などで幅広く利用されている。一方、生体への作用機序に関しては未だ不明な点も多く残されている。低反応レベルレーザー治療は Low-reactive level laser therapy (LLLT) と呼ばれる。

(片岡 洋祐)