カエル心臓の自動性に対する532/808 nm低出力レーザー照射の 相反的效果： I_h (過分極性電位依存性電流)チャネル介在の可能性

野崎 輝夫¹, 井本 信一², 荒井 誠一², 高原 弘子², 覚野 雅博¹, 木暮 信一^{1,2}

¹創価大学大学院 工学研究科 生命情報工学専攻 (〒192-8577 東京都八王子市丹木町1-236)

²創価大学 工学部 生命情報工学科 (〒192-8577 東京都八王子市丹木町1-236)

A Reciprocal Effect of 532/808 nm Low-Power Laser Irradiation on The Frog Cardiac Automatism: A Possibility of I_h (Hyperpolarization-Activated Cation Current) Channel Modulation as Its Underlying Mechanism

Teruo NOZAKI,¹ Shinichi INOMOTO,² Seiichi ARAI,² Hiroko TAKAHARA,²
Masahiro KAKUNO,¹ and Shinichi KOGURE^{1,2}

¹Department of Bioinformatics, Graduate School of Engineering, Soka University,
1-236 Tangi-cho, Hachioji, Tokyo 192-8577

²Department of Bioinformatics, Faculty of Engineering, Soka University, 1-236 Tangi-cho, Hachioji, Tokyo 192-8577

(Received December 27, 2011)

Based on our hypothesis that low-power laser irradiation (LLI) influences a hyperpolarization-activated cation current (I_h), we examined the effects of LLI on cardiac automatism of the frog heart because the I_h was firstly identified in the rabbit heart as a pacemaker channel. ECG was directly recorded. In control group, the heart rate gradually decreased and stopped with an average survival time of 14.9 ± 3.4 h (mean $\pm$ SD). 532 nm LLI induced a transient tachycardia and resulted in a prolongation of survival time, whereas 808 nm LLI did bradycardia and a reduction of survival time. An I_h blocker, ZD7288 application induced bradycardia as well as reduction of survival time. The simultaneous application of LLI and ZD7288 put out the LLI effect but remained the blocker effect. It is concluded that LLI effects on cardiac automatism are induced by a certain process of activation or inactivation in pace-making channels.

Key Words: Cardiac automatism, ECG, I_h channel, Low-power laser irradiation, ZD7288

1. 緒 言

低出力レーザー照射(LLI: Low-power laser irradiation)の治療効果に関する動物レベルでの実験結果が初めて報告されて以来38年が経過したが¹⁾, 近年ではLLIの臨床的効果は幅広く受け入れられ, 慢性痛の治療や筋・皮膚などの柔軟組織の修復, 神経再生の促進などに使用されることが多くなってきた^{2,3)}. 細胞レベルでも, とくに近赤外や赤外領域のLLIには細胞周期や細胞増殖に対する制御作用があると報告されてきた⁴⁻⁶⁾. なかには幹細胞の増殖を促す報告⁷⁻⁹⁾やガン細胞の増殖を抑制するとの報告¹⁰⁻¹⁵⁾も見られ, 今後の再生医療や抗ガン治療に結びつくものと期待されている.

一方, LLIの作用機序に関しては, 使用されている波長やパワー密度が異なることから, 理解の統一にはいまだ至っていない状況である. しかし, Karulによるreviewにはふれておく必要がある^{16,17)}. おもに赤色およ

び近赤外光のラットやヒトの皮膚細胞に対する照射効果を詳細に分析し, その結果に基づいて細胞内シグナリング経路のどの部分にどのような影響をもたらすのかを明らかにしたものである. それによると, 光受容体はミトコンドリアのチトクロムcオキシダーゼで, その光エネルギーによりミトコンドリアの膜電位や活性酸素や Ca^{2+} 濃度が上昇し, 結果として細胞質のATP・ Ca^{2+} ・cAMP濃度やpHが上昇するとされる. とくに注目されてきているのはLLIによるATP濃度上昇で, エネルギーキャリアとしての役割もさることながら, 信号伝達分子という側面でのATPの役割である^{18,19)}. ATP受容体にもさまざまなサブタイプが存在することが知られているので, ATP-signaling-systemを介してLLIが多様な影響を及ぼすことが推測される²⁰⁾.

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(457/488 nm; 50 mW)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²¹⁾。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電流(I_h)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 I_h 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²²⁾。実際、末梢神経系にも I_h チャネルタンパクのサブタイプ(HCN2・HCN4)も同定できたので、特定の波長とパワーをもつLLIと I_h チャネル阻害剤による作用の類似性が示唆された。

続いて行われたカエル腓腹筋標本を用いた実験においても、坐骨神経への連続的な電気刺激によってもたらされる単収縮曲線の振幅の減少がLLI(532/808 nm; 100 mW)により遅延することがわかった^{23,24)}。さらにカエル皮膚知覚神経標本を用いた実験でも、皮膚表面への触刺激や痛刺激に対する知覚応答がLLI(532/808 nm; 60 mW)によって抑制された²⁵⁾。末梢神経や筋にも I_h チャネルが存在することが報告されているので^{22,26)}、それらの現象も I_h チャネルを介して起こるのではないかと考えられた。

神経や筋という生体組織に対するLLI効果を明らかにするというわれわれの研究の方向はイオンチャネルをターゲットとした作用機序を想定して、上述した「ミトコンドリア活性化説」や「ATP-signaling-system仮説」と異なるように考えられる。しかし、 I_h チャネルとATP-signaling-systemを直列または並列的に配置して考える可能性は残されている。そこで、 I_h チャネルが最初に発見された心臓の洞房結節に注目し²⁷⁾、そこへのLLI効果を検討することにした。洞房結節には心臓の自動性をコントロールするペースメーカー細胞が存在し、ペースメーカーチャネルとして Ca^{2+} ・ K^+ ・ I_h チャネルが連続的に作動することが知られ、それらのチャネルへの影響は比較的容易に観測されると考えられたからである。

2. 心臓の自動性およびペースメーカーチャネル

心臓の自動性に関して、哺乳類の心臓を対象にして概略を説明する²⁹⁾。心臓は循環系の中心の臓器であり、その拍動による血液循環により動物の生命は維持されている。心臓の規則正しい拍動は自動能と呼ばれ、右心房の洞房結節に存在するペースメーカー細胞の規則的な脱分極によって一拍一拍の拍動が開始されている。この拍動にともなう心筋の電気活動を記録したものが心電図(ECG: Electroencephalogram)であり、一拍はP波(心房の収縮に対応)、QRS波(心室の収縮に対応)、T波(心室の弛緩に対応)から構成される。

洞房結節のP細胞は収縮線維が少なく、その役割はもっぱら心臓の刺激伝導系の起点になっていることである。P細胞は互いにgap junctionを形成しており、同期して細胞膜電位変化を起こしている。この膜電位変化には少なくとも4種類のペースメーカー電流が関与している。Fig. 1に示したように、大きな脱分極を引き起こす内向きの Ca^{2+} 電流、その脱分極によって起こる外向きの

Fig. 1 Simultaneous traces of action potential and pacemaker currents: NA accelerates the cardiac automatism²⁸⁾. $I_{\text{Ca-T}}$: Transient Ca current, $I_{\text{Ca-L}}$: Lasting Ca current, I_K : K current, $I_f (= I_h)$: Funny current (Hyperpolarization-activated current), I_b : Base current.

K^+ 電流、それによってもたらせられる過分極によって起こる内向きの I_h 電流(発見された当時は“奇妙な(funny)”という意味で I_f と命名された)である。もう一つのバックグラウンド電流は Na^+ の内向き流で自発的脱分極に関与しているとされるが、詳細は不明である。

Ca^{2+} は洞房結節のペースメーカー活動に必須である。 Ca^{2+} 電流は、約 $-60 \sim -50$ mVにしきい値をもつ過性の $I_{\text{Ca-T}}$ (I_{Ca} -transient)と約 -40 mVにしきい値をもつ $I_{\text{Ca-L}}$ (I_{Ca} -long-lasting)に分けられるが、それぞれのイオンチャネルはしきい値の低い $I_{\text{Ca-T}}$ の方から連続的に開く。したがってP細胞の活動電位は通常のニューロンのようなNaスパイクではなく、Caスパイクである。この大きな脱分極によってもたらされるのが K^+ 電流であり、遅延整流 K^+ 電流(I_K)と呼ばれている。 I_K は細胞外への外向き流であるから、それはCaスパイクの下降相を形成することになり、膜は次第に過分極する。膜が $-50 \sim -90$ mVまで過分極すると I_h 電流が活性化される。これは陽イオン非選択性内向き流なので、おもに Na^+ や Ca^{2+} が細胞内に流入することになり、膜電位は過分極または静止状態から脱分極側へシフトする。こうして再び $I_{\text{Ca}} \rightarrow I_K \rightarrow I_h$ が繰り返され、まさに自動性が維持されているわけである。

この自動性に影響を与えるのは周知のように自律神経系である。交感神経系は心拍数や収縮力を増加させ、逆に副交感神経系は減少させる。前者は、交感神経末端から分泌されたノルアドレナリン(NA)が β_1 アドレナリン受容体に結合し、複雑なセカンドメッセンジャーシステムを介して細胞内への Ca^{2+} 流入を増加させることなどにより実現されている。一方、後者は、副交感神経である迷走神経終末部でつくられるNOによってアセチルコリン(ACh)の放出が増大し(同時に交感神経末からのNA放出を抑制)、ムスカリン性ACh受容体刺激はGタンパク

を介してCa²⁺チャネルを抑制することなどにより実現されている。それぞれの効果は相反的である点が特徴である。

カエルの心臓は2心房1心室であり、左心房は肺からの酸素を多く含んだ血液を受け取り、右心房は体循環からの静脈血を受け取る。心室はわかれていないが、2種類の血液は混合されずに溜まる傾向があるため、酸素を多く含む血液は体循環に入り、酸素の乏しい血液は肺循環の方へ移動する。また、興奮の伝導系として、心拍動は右心房手前の静脈洞より発生し、この興奮は左右の心房筋、次いで心房漏斗→心室筋→心臓球へ伝わる。したがって、哺乳類の洞房結節にあたる静脈洞がペースメーカー部であるといえる³⁰⁾。

3. 実験方法

本研究は「ヘルシンキ宣言(2000年改訂版)」および「創価大学動物実験規定」を遵守して遂行された。

3.1 動物および手術方法

実験にはアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)を62匹用いた。一般的な生理学実習で行われている標本作成法に従って、低温麻酔で非動化させ、背側から脊髄を切断し、ゾンデを用いて脊髄および脳破壊を行った。リンガー液を充たしたシャーレ中で動物を背位に置き、腹部中心から胸骨に沿って切開し、さらに胸骨も部分切除し、心臓を直視できるようにした。リンガー液を除去した後、再びリンガー液をシャーレに注ぎ、心室表面が液面上になるように注意深くリンガー液を充たした。

3.2 心電図の記録方法

リンガー液面上に配置された心室の左右端に双極型ボール電極を接触させ、左側を+極、右側を-極になるようにしてECGを記録した。ボール電極から記録されるECGをメモリ・オシロスコープ(band-pass filter: 1.5–300 Hz)で増幅しながら観測し、サーマルレコーダーで記録するとともにDATレコーダーに記録した。

3.3 レーザー装置および照射方法

2台のレーザー発生装置を用いた。一方は波長532 nmのもの(SUWTECH, LDC-2500, Nd:YVO₄, 0–180 mW)で、他方は波長808 nmのもの(Power Tech. Inc., IQ1A250, 0–200 mW)で、いずれも連続発振型である。平均出力をともに30 mWに固定し、照射面積が12.6 mm²になるように調整して(238 mW/cm²)、実験開始から心停止に至るまで、ペースメーカー部である静脈洞への照射を実施した。周辺のリンガー液の温度上昇は0.1–0.3 °Cで、液面上の心室表面の温度上昇は最大1.2 °Cであった。

3.4 薬物および滴下方法

薬剤としてI_hチャネル阻害剤であるZD7288(ZD: 4-ethylphenylamino-1,2-dimethyl-6-methyl aminopyrimidinium chloride; 1 mM)を用いた。薬剤滴下はマイクロピペット

を用いて、1時間おきに50 μlずつ静脈洞へ滴下した。薬剤滴下のコントロールとして蒸留水(DW)の滴下実験も同様な方法で行った(自律神経系の伝達物質であるNAやAChの滴下実験も行っているが、本報告には含まれていない)。

3.5 実験内容

本研究の実験内容は、①コントロール実験およびDW滴下実験、②532/808 nm LLI実験、③ZD滴下実験、④LLIとZDの併用実験から構成された。LLIおよびZD滴下は心停止に至るまで続けられた。ECGはoff-lineで解析され、1分間当たりの心拍数を1時間毎に計測し、実験開始時の心拍数(/min)を100%としてその後の値を基準化した。

本実験における“心停止”は基準化された心拍数が5%以下に到達した時点とした。実験開始時点から心停止の時点に至るまでの時間を生存時間として計測した。

3.6 統計解析方法

結果の数値は平均値±標準偏差で示した。統計学的検定にはStudent *t*-test(両側検定・対応なし)またはWelch-testを用いて、有意差を $p < 0.01$ (**), $p < 0.05$ (*)のように設定した。

4. 結果

実験には62匹の動物が用いられたが、実験開始時の心拍数(/min)が20拍以下のものやECG波形の振幅が1 mV以下のもの、実験途中で突然心停止に至ったものは解析対象から除外した。以下の解析対象となった動物数は合計で48匹であった。

4.1 コントロール実験およびDW滴下実験

最初にコントロールとして、LLIまたは薬剤滴下を行わずに、ECGを記録しながら放置した実験($n = 7$)を行った。Fig. 2AにECGデータの代表例を示したが、すべての動物が時間の経過とともに心拍低下を起こすという傾向を示した。実験開始時の心拍数(/min)を100%とすると、1時間後に $82.2 \pm 20.7\%$ 、5時間後に $65.3 \pm 17.8\%$ 、10時間後に $53.0 \pm 27.6\%$ 、15時間後に $24.4 \pm 13.5\%$ と徐々に減少した(Fig. 2B)。心停止に至るまでの、すなわち心臓の活動時間は平均して 14.9 ± 3.4 時間であった(Fig. 2C)。

また、DWを1時間ごとに静脈洞に50 μlずつ滴下した実験($n = 8$)では、1時間後に $85.9 \pm 20.9\%$ 、5時間後に $80.9 \pm 16.1\%$ 、10時間後に $62.5 \pm 29.7\%$ 、15時間後に $27.1 \pm 24.4\%$ と減少した(Fig. 2B)。心停止に至るまでの活動時間は 14.8 ± 3.0 時間であった(Fig. 2C)。活動時間に関して、コントロールとDW群との間に有意差はなかった($p = 0.9804$)。したがって、以下、検定の比較対象としてコントロール群のデータを用いた。

Fig. 2 A: Chronological ECG traces of the control group animal. B, C: Alterations of standardized heart rate (B) and durations of cardiac automatism (C) in control (open circles and white bar) or DW (gray dots and gray bar) group. Exponential fitting curves and their correlation coefficients are added in B.

4.2 532/808 nm LLI実験

実験開始とともに532 nm LLIを静脈洞に行った実験群 ($n=8$)では、開始時の心拍数(/min)を100%とすると、1時間後に $86.5 \pm 13.1\%$ 、5時間後に $83.1 \pm 19.2\%$ 、10時間後に $67.2 \pm 26.0\%$ 、15時間後に $35.7 \pm 30.5\%$ となり、コントロール群に比較して減少速度が緩徐になった (Fig. 3A). 心停止に至るまでの活動時間は 19.3 ± 3.5 時間で、コントロール群と比較して有意に延長した ($p < 0.05$) (Fig. 3B).

一方、808 nm LLI実験群 ($n=6$)では、1時間後に $62.9 \pm 23.6\%$ 、5時間後に $27.5 \pm 22.1\%$ 、9時間後に $25.8 \pm 25.6\%$ となり、コントロール群に比較して急激に減少した (Fig. 3A). 心停止に至るまでの活動時間は 8.9 ± 3.2 時間で、コントロール群と比較して有意に短縮した ($p < 0.05$) (Fig. 3B). また、活動時間を532 nmと808 nm LLI実験群で比較した場合、有意な差が見出せた ($p < 0.01$).

532 nm LLIと808 nm LLIの心拍数の減少速度および活動時間の長さに対する影響は、前者が緩徐および延長、後者が急激および短縮というような相反的效果を示した (データは示さないが、それは交感神経伝達物質のNAと副交感神経伝達物質のAChを滴下したときの相反的效果と類似するものであった).

4.3 ZD滴下実験

LLIは行わず、 I_h チャネル阻害剤であるZD (1 mM)を1時間毎に $50 \mu\text{l}$ ずつ静脈洞へ滴下した実験群 ($n=7$)では、1時間後に $81.5 \pm 30.7\%$ 、3時間後に $30.9 \pm 27.8\%$ 、7時間

後に $21.2 \pm 15.8\%$ となり、コントロール群に比較して急激に減少した (Fig. 4A). 心停止に至るまでの活動時間

Fig. 3 Alterations of standardized heart rate (A) and durations of cardiac automatism (B) in 532 nm (dark gray dots and bar) or 808 nm LLI (light gray dots and bar) group. Exponential fitting curves and their correlation coefficients are added in A. In this and the following figures, control group data is added easily to compare with others.

は 6.3 ± 3.9 時間で、コントロール群($p < 0.01$)と比較して有意に短縮した(Fig. 4B).

4.4 LLIとZD滴下の併用実験

実験開始からLLIの連続照射を行いながら、1時間毎のZD滴下(1 mM, 50 μ l)を繰り返す併用実験を行った。

532 nm LLIとZD滴下の併用実験群($n = 6$)では、開始時の心拍数(/min)を100%とすると、1時間後に $71.1 \pm 20.0\%$ 、5時間後に $42.4 \pm 16.0\%$ 、9時間後に $22.9 \pm 23.4\%$ となり、コントロール群と比較すると減少速度が上昇したが、ZD滴下群と比較するとあまり差がなかった(Fig. 5A)。心停止に至るまでの活動時間は 8.3 ± 4.3 時間で、コントロール群と比較すると有意に短縮したが($p < 0.01$)、ZD滴下群と比較すると有意差はなかった($p = 0.4453$) (Fig. 5B)。

808 nm LLIとZD滴下の併用実験群($n = 6$)では、心拍数(/min)は1時間後に $57.2 \pm 22.2\%$ 、5時間後に $31.0 \pm 9.4\%$ 、10時間後に $15.0 \pm 11.0\%$ となり、コントロール群と比較すると減少速度が上昇したが、ZD滴下群と比較するとあまり差がなかった(Fig. 5A)。心停止に至るまでの活動時間は 9.8 ± 2.9 時間で、コントロール群と比較すると有意に短縮したが($p < 0.05$)、ZD滴下群と比較すると有意差はなかった($p = 0.1279$) (Fig. 5B)。また、両併用群の活動時間において有意差はなかった($p = 0.5310$)。

5. 考 察

5.1 結果のまとめ

本研究の結果は以下のようにまとめられる。

- ① カエル心臓の自動性に対して532 nm LLI(30 mW)は

Fig. 4 Alterations of standardized heart rate (A) and durations of cardiac automatism (B) in ZD application group (gray dots and bar). Exponential fitting curve and its correlation coefficient are added in A.

Fig. 5 Alterations of standardized heart rate (A) and durations of cardiac automatism (B) in the groups of simultaneous application of 532 nm LLI and ZD (gray dots and bar), or 808 nm LLI and ZD (light gray dots and bar). Exponential fitting curves and their correlation coefficients are added in A. In this figure, ZD group data (dark gray dots and bar) is added easily to compare with others.

一過性の頻脈化を示しながら、その後次第に心拍数(/min)を減少させたが、非照射群と比較するとその減少速度は緩やかであった。また心停止までに至る活動時間を有意に延長させた。

- ② 対照的に、808 nm LLI(30 mW)は徐脈化を示しながら心拍減少速度を速め、活動時間を有意に短縮させた。
- ③ I_h チャネル阻害剤であるZD7288の1時間毎の滴下(1 mM; 50 μ l)は急激な徐脈化を引き起こし、最大の活動時間短縮をもたらした。
- ④ LLIとZDの併用実験では、532 nm LLIとZDの組合せ、808 nm LLIとZDの組合せ、ともにLLI効果がマスクされた。Fig. 6にコントロール群の活動時間(t_c)を基準として、それぞれの手法による活動時間(t_s)から $(t_s - t_c)/t_c \times 100(\%)$ を算出して、それぞれの手法による効果の割合を表してある。それに基づく、532 nm LLIは活動時間を約30%延長させ、逆に808 nm LLIは約40%短縮させるということになる。併用実験での結果がそれぞれの相加性に基づく仮定した場合の結果が加えられてあるが、実測値はその加算値にはあわず、むしろZDだけの効果に近いことが示された。

5.2 I_h 阻害剤の効果－従来の研究結果との比較

すでに述べたように、 I_h チャネルが最初に発見されたのはウサギの洞房結節であり、心臓のペースメーカーに参与しているとされた²⁷⁾。その後、大脳皮質や視床を

Fig. 6 Standardized effect of each procedure on the duration of cardiac automatism based on the calculation of $(t_x - t_c)/t_c \times 100(\%)$, where t_c is the duration of cardiac automatism of control group while t_x is that of each procedure. Light gray bars are added according to the simple summation of each component to compare with the experimental data.

はじめとして神経系に広く存在していることが報告され、その機能として神経や筋活動のペースメーカーだけでなく、静止膜電位の安定性維持という役割も報告されてきた^{30,31)}。遺伝子レベルの研究も進み、 I_h チャンネルに4種のサブタイプ(Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel: HCN1-4)があり、その特性や分布が明らかにされている³²⁾。心臓に多く存在するのはHCN4で、過分極に対してゆっくりと開き、陽イオンの内向き流を発生させる。

I_h チャンネル阻害剤としては Cs^+ やZD7288が知られ、とくにZDは整脈剤として開発されたものである³³⁾。本研究におけるカエル心臓の静脈洞に対するZD滴下効果は、高濃度であったため極端な徐脈化と自動性の短縮をもたらしたが、それはHCN4チャンネルの開口を遅らせ、陽イオンの内向き流を抑制したと考えられる。その作用は従来ウサギやラットで報告されてきた効果と矛盾はない。

5.3 心臓へのLLI効果

最初に述べたように、さまざまな細胞や組織へのLLI効果が報告されてきたものの、心臓への影響を試みたものは少ない。臨床報告としては次のような例をあげることができる³⁴⁾。冠状動脈疾患をもつ患者に経皮的にHe-Ne LLI(CW; 632 nm; 10 mW)を1日15分間、週6日行い、それを1か月続けたところ、トレッドミル・テストや歩行テストを含むさまざまなテストによるスコアが有意に改善されたというものである。その原因として、その波長のLLIは2-5 cmほど透過し、NOを介する血管拡張を引き起こし、血管新生を促進させることが考えられている。実験的なものとしては、新生仔ラットの心筋細胞を培養し、その拍動のon-offや同期性をフェント秒パルスレーザー(780 nm; 15-30 mW)で制御できる可能性を示した報告がある³⁵⁾。そこでは同期した拍動が現れるとき Ca^{2+} 濃度が高く、同期活動が停止すると Ca^{2+} 濃度が低下する点から、 Ca^{2+} チャンネルへの作用または細胞内 Ca^{2+} 濃

度制御系への作用を想定しているようである。

本研究の結果はむしろ I_h チャンネルへの影響を示すものであったが、ペースメーカーチャンネルとして考えると、それらは連動するので矛盾をきたすものではないと考えられる。

5.4 自動性に対する532/808 nm LLIの相反的效果-自律神経作用との類似性

ここでは示されなかったが、同様の実験系でNAやAChの滴下実験が行われている。実験開始より1時間毎にNA(60 μM , 50 μl)を静脈洞に滴下すると、最初一過性の頻脈化が起こり、その後徐々に徐脈化が進むものの、心停止までの活動時間は 21.0 ± 5.9 時間であり、コントロール群と比較して有意に延長した($p < 0.01$)。一方、ACh(60 μM , 50 μl)の滴下は直後から徐脈化が起こり、活動時間は 11.5 ± 1.5 時間と有意に短縮した($p < 0.01$)。これらの結果は従来から確立されている交感神経作用および副交感神経作用の相反性を示すものであった²⁸⁾。

その自律神経系の神経伝達物質による相反的效果と、532 nmおよび808 nm LLIによる自動性への相反的效果は類似するものであった。本研究の実験系では中枢からの神経支配は断たれているので、LLIsの相反的效果は自律神経系の末端部への影響として考えることができる。すなわち、532 nm LLIは交感神経末端部に作用し活動電位を発生させてNAを放出させる、一方、808 nm LLIの方は副交感神経末端部に作用し活動電位を発生させてAChを放出させる、という機構である。しかし、それぞれ波長の異なるLLIが交感・副交感系を選択的に刺激することは考えにくいことである。したがって、自律神経-心筋接合部を想定すると、LLIsのpre側への影響は考えにくく、むしろレセプターから始まるpost側への影響を考えた方が適切であろう。

5.5 自動性に対するLLI効果の作用機序

心臓の自動性は心筋のペースメーカー細胞の歩調取り機能により発現し、それは自律神経支配のもとで調節されている。本研究におけるLLIsの自動性への相反的效果が上述した自律神経系の末端部への影響としては考えにくいところから、心筋側への影響が注目される。

第一の可能性としてあげられるのは、532 nm LLIによるNAの $\beta 1$ 受容体への選択的作用と808 nm LLIによるムスカリン型ACh受容体への選択的作用に基づく説明である。これは、NAが放出されたとき心筋側で Ca^{2+} チャンネルの開口確率が上昇し頻脈化がもたらされ、AChが放出されたとき Ca^{2+} チャンネルの開口確率が低下し徐脈化がもたらされるという性質³⁶⁾に根拠を求めるものである。それぞれの受容体の活性化・不活性化が波長の異なるLLIで特異的に調節されるのかどうかは今後解明するべき重要な問題であるが、その結果起こる Ca^{2+} 濃度やcAMP合成の変化が自動性の調節に結びつくことは十分考えられることである。

第二の可能性はペースメーカーチャンネルへの作用に基

づく説明であり、本実験で得た結果はそのうちの I_h チャネルへの作用を示唆した。すなわち、532 nm LLIは I_h チャネルを活性化させ(開口確率や開口速度を上昇させる)、逆に808 nm LLIはそれを不活性化させる(開口確率や開口速度を低下させる)というものである。 I_h チャネル発見時にその電気生理学的特性が詳細に検討されたように²⁷⁾、もし単一チャネルレベルでパッチクランプが行われ、2種類のLLI中の I_h 電流の動態がとらえられれば、その説明に科学的根拠を与えることになる。本実験では試していないが、その他の Ca^{2+} チャネルや K^+ チャネル阻害剤との併用実験も検討する必要がある。前述したように、 Ca^{2+} は自律神経系による自動性調節の最終ターゲットであり、一方ペースメーカー電流の基本をなすものでもあるので、 Ca^{2+} 電流へのLLI効果の検証は喫緊の課題である。

第三の可能性は心筋への直接的な効果である。従来、骨格筋の筋収縮へのLLI効果については幅広く研究が行われ、とくに赤色から近赤外光のLLIには筋疲労遅延効果があると報告されてきた²⁴⁾。その作用機序に関しても、ミトコンドリアの呼吸鎖系のチトクロームcオキシダーゼによる吸収、それに続くATP合成系の活性など次第に明確になりつつある。近年、532 nm LLIによってもミトコンドリアの活性が証明され、それはミトコンドリア膜のprotoporphyrin IXを介しているといわれる³⁷⁾。本研究の532/808 nm LLIによる自動性への相反的效果がミトコンドリア活性を介する可能性は高いが、先行研究が示すところは“相反的”ではないので、心筋そのものへの直接的效果だけでは説明は困難である。したがって、第三の可能性だけではなく、第一および第二の可能性とのカスケードが自動性へのLLIの相反的效果を説明する作用機序としてより適切であると考えられる。

6. 結 言

本研究では、「LLIは(イオンチャネルの一つである) I_h チャネルに影響を与える」という仮説をもとに、 I_h チャネルが最初に発見された心臓を標的にして、カエル心臓の自動性に対するLLI効果を検討した。532 nm LLI (30 mW)は一過性の頻脈化とそれに続く緩徐な徐脈化と自動性の延長をもたらし、一方、808 nm LLI (30 mW)は比較的急激な徐脈化と自動性の短縮をもたらし、波長の異なる2種類のLLIによる自動性への相反的效果は、 I_h チャネル阻害剤であるZDを併用させた場合、LLI効果が消失されZD効果だけになるとみなされたので、LLIの相反的效果はペースメーカーチャネルの一つである I_h チャネルの活性化/不活性化によって媒介されていると結論された。

謝 辞

本実験の遂行にあたり多大なご協力をいただいた高塚 和也氏(創価大学大学院工学研究科生命情報工学専攻、2010年修了)に感謝の意を表します。本研究は

MEXT HAITEKU(2009–2013)の支援のもと実施された。

参考文献

- 1) I. B. Kovács, E. Mester, and P. Görög: *Experientia* **30** (1974) 1275.
- 2) J. R. Basford: *Lasers Surg. Med.* **16** (1995) 331.
- 3) M. A. Pogrel, J. W. Chen, and K. Zhang: *Lasers Surg. Med.* **20** (1997) 426.
- 4) H. Loevschall and D. Arenholt-Bindslev: *Lasers Surg. Med.* **14** (1994) 347.
- 5) P. Moore, T. D. Ridgway, R. G. Higbee, E. W. Howard, and M. D. Lucroy: *Lasers Surg. Med.* **36** (2005) 8.
- 6) X. Gao and D. Xing: *J. Biomed. Sci.* **16** (2009) 4.
- 7) H. Tuby, L. Maltz, and U. Oron: *Lasers Surg. Med.* **39** (2007) 373.
- 8) B. Mvula, T. Mathope, T. Moore, and H. Abrahamse: *Lasers Med. Sci.* **23** (2008) 277.
- 9) J. F. Hou, H. Zhang, X. Yuan, J. Li, Y. J. Wei, and S. S. Hu: *Lasers Surg. Med.* **40** (2008) 726.
- 10) R. Sroka, M. Schaffer, C. Fuchs, T. Pongratz, U. Schrader-Reichard, M. Busch, P. M. Schaffer, E. Dühmke, and R. Baumgartner: *Lasers Surg. Med.* **25** (1999) 263.
- 11) Y. H. Liu, C. C. Ho, C. C. Cheng, Y. H. Hsu, and Y. S. Lai: *Lasers Med. Sci.* **21** (2006) 42.
- 12) 村山 秀之, 貞 包慧, 山之端 万里, 木暮 信一: *日本レーザー医学会誌* **30** (2009) 135.
- 13) 竹村 香央里, 村山 秀之, 福崎 由美, 洪 鳳玉, 貞 包慧, 三木 恵美子, 山之端 万里, 木暮 信一: *日本レーザー医学会誌* **31** (2011) 382.
- 14) H. Murayama, K. Sadakane, B. Yamanoha, and S. Kogure: *Lasers Med. Sci.* **27** (2012) 87.
- 15) F. Y. Ang, Y. Fukuzaki, B. Yamanoha, and S. Kogure: *Lasers Med. Sci.* (2011) Epub ahead of print.
- 16) T. I. Karu: *Photochem. Photobiol.* **84** (2008) 1091.
- 17) T. I. Karu: *IUBMB Life* **62** (2010) 607.
- 18) G. Burnstock: *Exp. Pharmacol.* **194** (2009) 332.
- 19) B. C. Khakh and G. Burnstock: *Sci. Am.* **12** (2009) 84.
- 20) G. Burnstock: *BJU Int.* **107** (2011) 192.
- 21) Y. Matsuda, M. Niwa, H. Iwai, S. Kogure, N. Honjoe, M. Komatsu, Y. Ishii, and K. Watanabe: *Lasers Surg. Med.* **38** (2006) 608.
- 22) Y. Matsuda, F. Y. Ang, K. Nakajima, and S. Kogure: *J. Physiol. Sci.* **58** (2008) 99.
- 23) 久保 富洋, 米津 貴久, 長尾 明典, 蛭子 法子, 木暮 信一, 松田 芳樹, 小松 光昭, 石井 良夫, 渡辺 一弘: *日本レーザー医学会誌* **29** (2008) 18.
- 24) M. Komatsu, T. Kubo, S. Kogure, Y. Matsuda, and K. Watanabe: *Lasers Surg. Med.* **40** (2008) 576.
- 25) 木暮 信一, 齊藤 伸明, 高塚 和也, 土屋 孔明, 阿部 拓也, 鈴木 義和: *日本レーザー医学会誌* **30** (2009) 18.
- 26) H. Yao, D. F. Donnelly, C. Ma, and R. H. LaMotte: *J. Neurosci.* **23** (2003) 2069.
- 27) D. DiFrancesco, A. Ferroni, M. Mazzanti, and C. Tromba: *J. Physiol.* **377** (1986) 61.
- 28) L. H. オピー (岩瀬 三紀/横田 充弘監訳): *オピーの心臓生理学* (西村書店) (2008).
- 29) 日本生理学会: *生理学実習書* (南江堂) (1991).
- 30) H. C. Pape and D. A. McCormick: *Nature* **340** (1989) 715.
- 31) H. C. Pape: *Annu. Rev. Physiol.* **58** (1996) 299.
- 32) T. Notomi and R. Shigemoto: *J. Comp. Neurol.* **471** (2004) 241.
- 33) S. Gasparini and D. DiFrancesco: *Pflugers Arch.* **435** (1997) 99.
- 34) P. Życiński, M. Krzemińska-Pakuła, A. Kierus, E. Trzos, T. Rechciński, L. Figiel, M. Kurpesa, M. Plewka, Ł. Chrzanowski, and J. Drożdż: *Kardiologia Pol.* **65** (2007) 1.
- 35) N. I. Smith, Y. Kumamoto, S. Iwanaga, J. Ando, K. Fujita, and S. Kawata: *Opt. Express* **16** (2008) 8604.
- 36) D. M. Bers: *Nature* **415** (2002) 198.
- 37) P. Kaššák, T. Przygodzki, D. Habodászova, M. Bryszewska, and L. Šikurobá: *Gen. Physiol. Biophys.* **24** (2005) 209.