

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20612006  
 研究課題名（和文） 中赤外波長可変ナノ秒パルスレーザーによるコレステロールエステルの  
 選択的分解除去  
 研究課題名（英文） Selective Removal of Cholesteryl Ester by Mid-infrared  
 Tunable Nanosecond Pulsed Laser  
 研究代表者  
 栗津 邦男（AWAZU KUNIO）  
 大阪大学・工学研究科・教授  
 研究者番号：30324817

## 研究成果の概要（和文）：

粥状動脈硬化症の低侵襲な血管内治療法の開発を目的として、波長  $5.75\mu\text{m}$  の中赤外波長可変ナノ秒パルスレーザーを用い、粥状動脈硬化組織の切削について検討を行った。正常組織に低侵襲に粥状動脈硬化組織を除去可能なことが分かった。本技術は、粥状動脈硬化病変部位と正常部位で切削反応に差をつけることができ、現在先進医療で行われているエキシマレーザー血管形成術と比較して原理的に血管壁を穿孔しにくく、従来法より安全に治療を行うことができる。

## 研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to develop a novel less-invasive laser angioplasty. In this study, we examined the removal of atherosclerotic tissue by using the mid-infrared tunable nanosecond pulsed laser with a wavelength at  $5.75\mu\text{m}$ . Selective removal of atherosclerotic tissue without a side effect to normal was observed. This technique does not perforate a vessel wall compared with a conventional excimer laser angioplasty and realize a safe treatment of atherosclerosis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：レーザー医学

科研費の分科・細目：量子ビーム科学

キーワード：レーザー治療、粥状動脈硬化症、レーザー血管形成術、中赤外レーザー、差周波発生

## 1. 研究開始当初の背景

日本国民の3大疾患による年間死亡者数において、心疾患や脳血管疾患などの血管疾患が大きな割合を占めている。低侵襲かつ安全

な血管疾患の診断・治療法の確立が21世紀の社会において急務である。血管疾患の主要因である粥状動脈硬化病変の治療法は、狭窄・閉塞した血管内腔を拡張し、末梢血流を

早期に再開させ増加させることである。狭窄した動脈を再開通させるために、一般的には経カテーテル的血管拡張術（経皮的血管形成術）（percutaneous transluminal angioplasty; PTA）が行われている。現在、バルーンとステント留置の併用法が広く普及している。しかしながら、PTA が適応できない高度狭窄病変や完全閉塞病変も存在する。

これら PTA 不適応病変に対して、レーザー血管形成術（狭窄や閉塞病変部にレーザーを照射し、病変部を蒸散・除去し、血管内腔を拡大する治療法）が行われている。エキシマレーザー血管形成術は、光化学アブレーションにより動脈硬化部位を分解除去することができ、局所的な熱発生がなく、血管周辺組織への熱損傷が問題視されない安全な治療法と言われているが、対象非選択的な相互作用であるため、正常血管壁への誤照射の場合、血管壁の貫通といった危険を伴う。

我々は先行研究で、狭窄・閉塞部分の粥腫性プラークの主成分であるコレステロールエステルのエステル結合の C=O 伸縮振動（励起波長は  $5.75 \mu\text{m}$ ）に着目し、粥状動脈硬化部位のみに相互作用を与える安全なレーザー血管形成術の開発を試み、波長  $5.75 \mu\text{m}$  が正常組織に反応せずにコレステロールエステルに選択的に吸収され、分解反応を起こすことを見出した。

しかしながら、レーザー血管形成術は高度狭窄病変に対して適応するため、物理的な除去作用が必要など、いくつかの問題があった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、差周波発生方式の中赤外波長可変小型固体レーザーを用い、粥状動脈硬化部位を選択的に分解除去可能な、新規血管内レーザー血管形成術を開発することである。具体的には、波長  $5.75 \mu\text{m}$  のナノ秒パルスレーザーが正常組織に低侵襲に粥状動脈硬化内膜のみを選択的に分解除去可能かどうか、その時の血管組織への熱的影響（切削痕周囲の熱損傷幅）、アブレーション飛散物の大きさについて *in-vitro* レベルで検討を行った。また、中空光ファイバーを導光路に用いた血管内治療用カテーテルを開発し、血管内で波長  $5.75 \mu\text{m}$  による治療が可能かどうか検討を行った。

## 3. 研究の方法

### 3.1 試料と前処理方法

動脈硬化試料として、WHHLMI ウサギ（神戸大学医学部附属動物実験施設から分与、メス、24 月齢）の胸部大動脈を使用した。50 mg/ml のペントバルビタールナトリウムを外縁耳静脈投与し安楽死させ、その後開胸し、胸部大動脈を摘出した。約  $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$  の WHHLMI

ウサギ胸部大動脈血管片を照射試料として用いた。対照の正常試料として、日本白色種ウサギ（メス、体重  $2 \sim 2.4 \text{ kg}$ ）の胸部大動脈を使用した。前処理方法は WHHLMI ウサギと同様である。

なお、本研究における動物実験は、大阪大学大学院工学研究科動物実験委員会から承認されており、大阪大学動物実験委員会が定める動物実験規定を遵守し実施された。

### 3.2 光源と照射方法

#### (1) 光源

図 1 に差周波発生方式（Difference Frequency Generation; DFG）の中赤外波長可変小型固体レーザー（川崎重工業株式会社と理化学研究所との共同開発、以下 DFG レーザーと略す）の概略図を示す。DFG レーザーは、波長  $1064 \text{ nm}$  の Nd:YAG レーザーと波長を  $1180 \sim 1350 \text{ nm}$  で可変な Nd:YAG レーザー励起 Cr:forsterite レーザーを非線形光学結晶  $\text{AgGaS}_2$  に入射させることにより、両レーザーの差周波である中赤外波長（波長  $5.5 \sim 10 \mu\text{m}$ ）のレーザーを発生する。パルス幅  $5 \text{ ns}$ 、繰り返し数  $10 \text{ Hz}$  である。

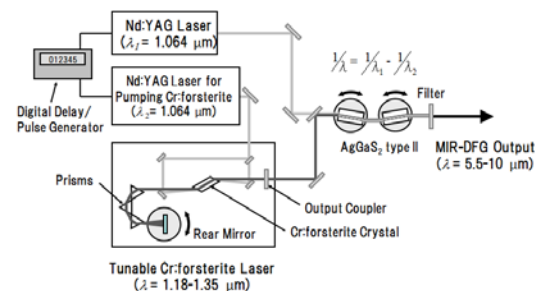


図 1 DFG レーザーの概略図

#### (2) 照射方法

##### ① 切削深さの検討

試料への DFG レーザー照射は、血管片の内臓側から垂直に照射を行った。照射条件は波長  $5.75, 5.88, 6.09 \mu\text{m}$ 、平均パワー密度  $35-80 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間  $0-30 \text{ s}$  で行った。試料の状態は乾燥状態と膨潤状態の 2 種類について検討を行った。

##### ② アブレーション飛散物の大きさの検討

スライドガラス上にワッシャーを固定し、中に試料と生理食塩水を入れ、スパーサーを挟み試料上方にフッ化バリウムを固定した。このとき試料とフッ化バリウム基板間の距離を  $1 \text{ mm}$  とした。照射光学系は切削効果の検討時と同じ光学系を使用した。照射条件は波長  $5.75 \mu\text{m}$ 、平均パワー密度  $70-80 \text{ W/cm}^2$ 、照射時間  $3-10 \text{ s}$  で行った。

##### ③ 血管内治療用カテーテルを用いた実験

内径  $0.70 \text{ mm}$ 、外径  $0.85 \text{ mm}$ 、長さ約  $1 \text{ m}$  の中空光ファイバーを導光路として用いた。

先端部に血液などの水分の侵入を防止し、かつ集光することで平均パワー密度を向上させるためのマイクロダイヤモンドレンズを取り付けた。入射した光は幅 1.5×奥行き 1.2 mm のマイクロダイヤモンドにより集光され、表面からの約 1 mm で集光する。集光位置でのビーム径は 100 μmφ であった。カテーテル先端の外径は 1.8 mmφ であった。

実際の血管の中を模擬した試料を作成し、中空光ファイバーと血管内視鏡を用いて照射を行った。WHHLMI ウサギ胸部大動脈の内膜のみを用い、チューブで試料を挟んだ。試料を挟んで一方に空気、もう一方にラットから採取した血液をセットし、血液側から注射器により圧力を加え、レーザー照射により内膜部が貫通した場合に血液が流れるようにした。撮影開始、6 秒後に He-Ne レーザーによりガイド光を 6 秒照射し、その後 DFG レーザーを照射した。照射条件は波長 5.75 μm、平均パワー密度 45 W/cm<sup>2</sup>、照射時間は 0-21 s で行った。

### 3.3 評価方法

#### (1) 切削深さおよび熱損傷幅の観察・定量

DFG レーザーを照射後、試料を Tissue-Tek 0. C. T. Compound で冷凍固定し、凍結完了後クライオトームで 10 μm 厚に薄切した。薄切した試料はスライドガラスに貼付した。切削深さは、光学顕微鏡像のデジタルデータから Adobe Photoshop5.0 で定量した。

熱損傷幅はヘマトキシリン・エオジン染色した試料で観察・定量を行った。DFG レーザー照射後、スライドガラスに貼付された試料をエタノール (99.5%) で洗浄した後、ヘマトキシリン溶液に 5 分間浸漬させた。5 分経過後、蒸留水によりヘマトキシリン溶液を洗い流し、エオジン溶液に 1 秒浸漬し、その後蒸留水で洗い流した。その後、エタノール 70%、80%、99.5% の順番に浸漬し、脱水を行い、脱水完了後、余分なエタノールを取り除き、レモゾールを滴下しカバーガラスにより封入した。レモゾールの乾燥後、切削と同様に観察を行い、照射痕の側壁面の熱損傷幅を定量した。

#### (2) アブレーション飛散物の大きさの検討

DFG レーザー照射後、上方に固定しておいたフッ化バリウムに付着した飛散物を 5 ml の蒸留水で回収した。回収した飛散物を目開きが 35 μm 間隔のフィルターに通し、大きな飛散物を分離した。その後、遠心分離機により液量を 1 ml に減らし、Flow Cytometer により粒径及びその数を測定した。フィルターで回収された飛散物は顕微鏡にてその粒径および数を測定した。

#### (3) 血管内治療用カテーテルを用いた実験

マイクロダイヤモンド付き中空光ファイバーと一緒に挿入した血管内視鏡により、観察中の映像を確認した。

### 4. 研究成果

#### (1) 乾燥試料への照射結果

図 2 に乾燥状態の動脈硬化試料へ、波長 5.75、5.88、6.09 μm、平均パワー密度 35 W/cm<sup>2</sup>、照射時間 0-30 s で照射したときの切削深さを示す。波長 5.88 および 6.09 μm では照射時間とともに切削が進み血管壁の貫通が観測されたのに対し、波長 5.75 μm では照射時間が長くなっても切削深さが 150 μm 付近(病変部位である内膜と正常部位である中膜との境界)で止まることが観測された。

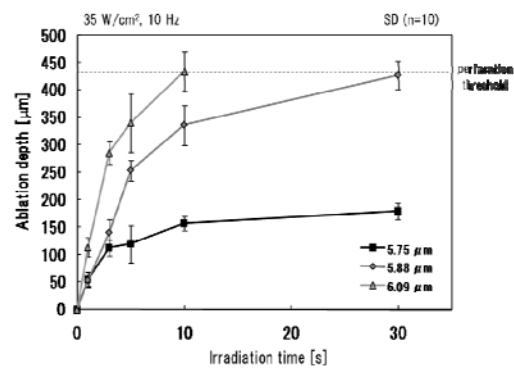


図 2 粥状動脈硬化試料の切削における波長 5.75、5.88、6.09 μm の比較 (乾燥状態)

図 3 に乾燥状態の動脈硬化試料および正常試料へ、波長 5.75 μm、平均パワー密度 35 および 40 W/cm<sup>2</sup>、照射時間 0-30 s で照射したときの切削深さを示す。同じ照射エネルギー条件において、正常試料と粥状動脈硬化試料の間に切削の差が観測された。すなわち、正常組織に低侵襲に粥状動脈硬化組織を選択的に切削できることが示された。

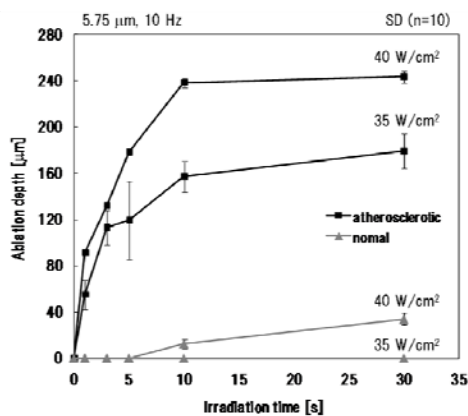


図 3 波長 5.75 μm における粥状動脈硬化試料と正常試料の切削の比較 (乾燥状態)

(2) 膨潤試料への照射結果

膨潤状態で正常部位には低侵襲に動脈硬化部位を除去することのできる適切な照射条件を決定した。図4に膨潤状態の正常試料へ、波長  $5.75\mu\text{m}$ 、平均パワー密度  $80\text{ W/cm}^2$ 、照射時間  $0\text{--}30\text{ s}$  で照射したときの切削断面を示す。図5に膨潤状態の動脈硬化試料へ、波長  $5.75\mu\text{m}$ 、平均パワー密度  $80\text{ W/cm}^2$ 、照射時間  $0\text{--}30\text{ s}$  で照射したときの切削断面を示す。図6に膨潤状態の動脈硬化試料および正常試料へ、波長  $5.75\mu\text{m}$ 、平均パワー密度  $80\text{ W/cm}^2$ 、照射時間  $0\text{--}30\text{ s}$  で照射したときの切削深さを示す。乾燥状態と同様、同じ照射エネルギー条件において、正常試料と粥状動脈硬化試料の間に切削の差が観測された。すなわち、正常組織に低侵襲に粥状動脈硬化組織を選択的に切削できることが示された。この正常組織に低侵襲な動脈硬化組織の選択的切削効果は、平均パワー密度  $60\text{--}80\text{ W/cm}^2$  で実現可能なことが分かった。

図7に膨潤状態の動脈硬化試料へ、波長  $5.75\mu\text{m}$ 、平均パワー密度  $70$  および  $80\text{ W/cm}^2$ 、照射時間  $0\text{--}30\text{ s}$  で照射したときの照射痕近傍の熱損傷幅を示す。熱損傷幅は照射時間とともに若干の増加傾向が観られるが有意な差はなく、約  $10\text{--}20\mu\text{m}$  であった。

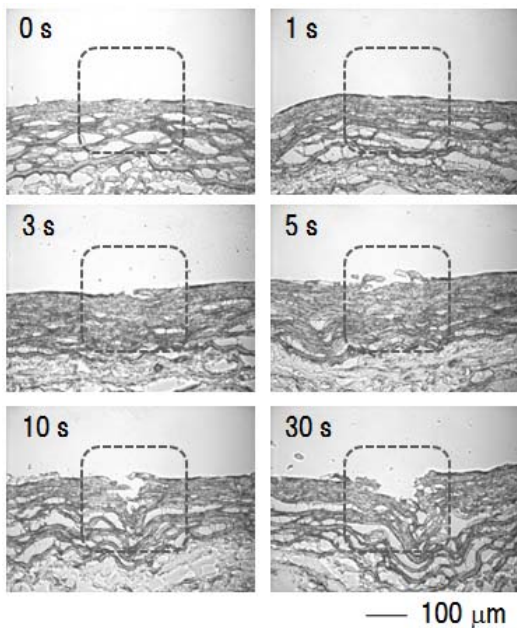


図4 波長  $5.75\mu\text{m}$ 、平均パワー密度  $80\text{ W/cm}^2$ 、照射時間  $0\text{--}30\text{ s}$  における正常試料の切削断面 (膨潤状態)

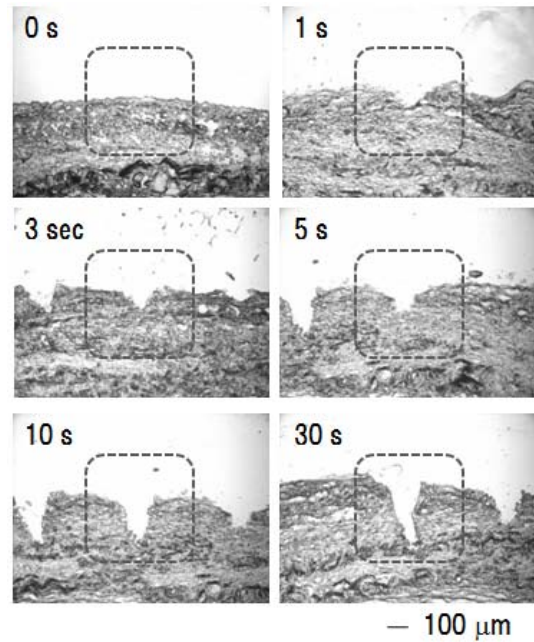


図5 波長  $5.75\mu\text{m}$ 、平均パワー密度  $80\text{ W/cm}^2$ 、照射時間  $0\text{--}30\text{ s}$  における動脈硬化試料の切削断面 (膨潤状態)

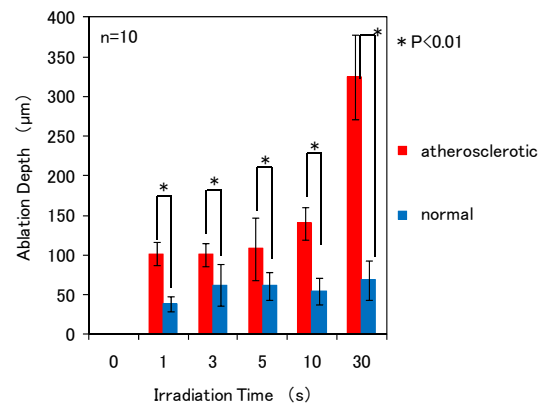


図6 波長  $5.75\mu\text{m}$  における粥状動脈硬化試料と正常試料の切削の比較 (膨潤状態)

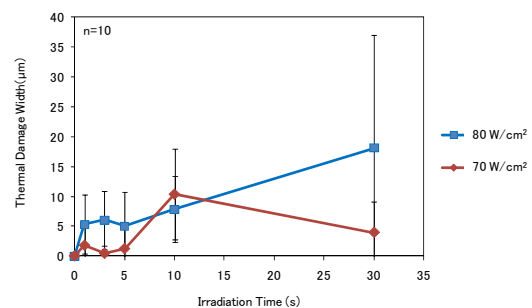


図7 波長  $5.75\mu\text{m}$  における粥状動脈硬化試料の熱損傷幅 (膨潤状態)

図 8 に波長 5.75  $\mu\text{m}$ 、平均パワー密度 80  $\text{W}/\text{cm}^2$ 、照射時間 0-30 s で照射したときに生成されるアブレーション飛散物の大きさと数の関係を示す。動脈硬化試料からは油滴状の飛散物が観察され、約 88%が直径 10  $\mu\text{m}$  以下、約 0.05%が 35  $\mu\text{m}$  以上であった。飛散物の大きさは従来法のエキシマレーザーによる血管形成術と同程度かやや大きいことが分かった。約 10%程度発生する 10  $\mu\text{m}$  以上の飛散物の生成をいかに抑えるか、もしくはどのように回収しながらレーザー照射を行うかが重要であることが示唆された。

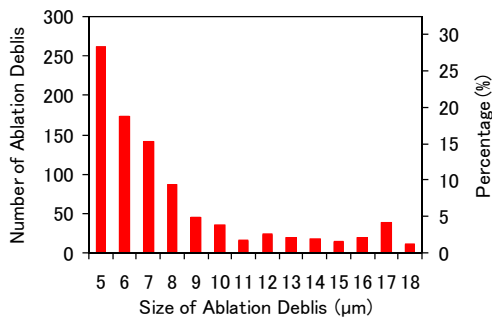


図 8 アブレーション飛散物の大きさと数の関係

最後に臨床で用いる場合に必要となる治療用カテーテルを開発し、血管内環境を模擬した照射環境で動脈硬化試料へレーザーを照射した。図 9 に照射時間経過に伴う血管内視鏡観察の結果を示す。観察時間 27 s 後（照射時間 15 s 後）より試料裏面に存在する血液の流入が観察され、波長 5.75  $\mu\text{m}$  のファイバー導光により、動脈硬化試料を切削し、血流を再開させることが可能であることを示すことができた。

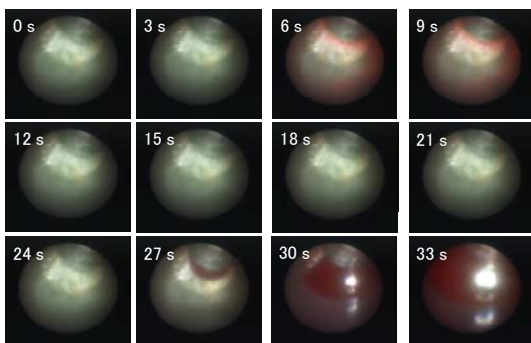


図 9 治療用カテーテルを用いた照射の血管内視鏡による観察

本技術は従来法で用いられるエキシマレーザーと比べ、正常組織に低侵襲に動脈硬化組織を選択的に切削可能なことから、治療の安全性の観点から優位であることが示され

た。しかしながら、副作用の原因となる飛散物の大きさに関してはわずかに大きい可能性があり、生成の抑制もしくは飛散物の回収方法に工夫が必要なことが分かった。今後は、血管内治療用カテーテルを用いた *ex-vivo* 実験による詳細なデータ取得、*in-vivo* 実験による安全性の検討などを行うことにより、臨床への適応が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

① H. Hazama, K. Ishii, K. Awazu: Less-invasive Laser Therapy and Diagnosis using a Tabletop Mid-infrared Tunable laser, *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 3(4): 285-292, 2010, 査読有.

② K. Ishii, H. Tsukimoto, H. Hazama, K. Awazu: Selective Treatment of Atherosclerotic Plaques using Nanosecond Pulsed Laser with a Wavelength of 5.75  $\mu\text{m}$  for Less-invasive Laser Angioplasty, *Proceedings of SPIE*, 7373: 73731E, 2009, 査読有.

③ 石井克典, 月元秀樹, 間久直, 粟津邦男: 波長 5.75  $\mu\text{m}$  のナノ秒パルスレーザーによる低侵襲なレーザー血管形成術の開発, *日本レーザー医学会誌*, 30 (2): 126-134, 2009, 査読有.

④ K. Ishii, H. Tsukimoto, H. Hazama, K. Awazu: Selective Removal of Cholesteryl Ester in Atherosclerotic Plaque by Nanosecond Pulsed Laser at 5.75  $\mu\text{m}$  for Less-invasive Laser Angioplasty, *Proceedings of SPIE*, 7161: 71612T, 2009, 査読有.

⑤ 石井克典, 月元秀樹, 間久直, 粟津邦男: 波長 5.75  $\mu\text{m}$  のナノ秒パルスレーザーによる粥状動脈硬化症の低侵襲血管形成術の開発, *生体医工学*, 46(5): 529-535, 2008, 査読有.

〔学会発表〕(計 35 件)

① K. Ishii, M. Saiki, H. Hazama, K. Awazu: Development of Selective Laser Treatment Techniques using Mid-infrared Tunable Nanosecond Pulsed Laser, 32nd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE EMBC 2010), 2010.8.31-9.4, Sheraton Buenos Aires Hotel & Convention Center, Buenos Aires, Argentina.

②月元秀樹, 石井克典, 間久直, 栗津邦男 :  
波長  $5.75 \mu\text{m}$  のレーザー血管形成術の開発 -  
アブレーション飛散物及び血管内治療カテ  
ーテルの検討 -, レーザー学会学術講演会第  
30 回年次大会, 2010. 2. 2-4, 千里ライフサイ  
エンスセンター, 大阪府豊中市.

③K. Ishii, H. Tsukimoto, H. Hazama, K.  
Awazu: In-vitro Study of Novel  
Less-invasive Laser Angioplasty using the  
Pulsed Laser with a Wavelength of  $5.75 \mu\text{m}$ ,  
World Congress on Medical Physics and  
Biomedical Engineering 2009 (WC 2009),  
2009. 9. 7-12, Munich ICM, Munich, Germany.

④K. Ishii, H. Tsukimoto, H. Hazama, K.  
Awazu: Selective Treatment of  
Atherosclerotic Plaques Using Nanosecond  
Pulsed Laser with a Wavelength of  $5.75 \mu\text{m}$   
for Less-invasive Laser Angioplasty,  
European Conference on Biomedical Optics  
(ECBO) 2009, 2009. 6. 14-18, ICM, Munich,  
Germany.

⑤石井克典, 月元秀樹, 間久直, 栗津邦男 :  
波長  $5.75 \mu\text{m}$  のナノ秒パルスレーザーによる  
低侵襲な血管形成術の開発, 第 29 回日本レ  
ーザー医学会総会, 2008. 11-15-16, 東京工  
科大学八王子キャンパス, 東京都八王子市.

[図書] (計 1 件)

①石井克典, 栗津邦男 : 第 16 章 生体分子振  
動領域での新しいレーザー診断・治療, 次世  
代光医療 - レーザー技術の臨床への橋渡し  
- (栗津邦男監修), シーエムシー出版,  
171-183, 2010.

[その他] (計 2 件)

①石井克典, 月元秀樹, 間久直, 栗津邦男 :  
平成 21 年度日本生体医工学会論文賞・阪本  
賞, 2010 年 6 月.

②石井克典 : 第 29 回日本レーザー医学会 総  
会賞, 2008 年 11 月.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗津 邦男 (AWAZU KUNIO)  
大阪大学・工学研究科・教授  
研究者番号 : 30324817

### (2) 研究分担者

石井 克典 (ISHII KATSUNORI)  
大阪大学・工学研究科・助教  
研究者番号 : 20512073