

低エネルギーレーザー光による生体効果の実験的考察

藤原修・岡田基広・加藤一夫・阿座上孝

電気情報工学科

(1986年9月5日受理)

Experimental Study on Bio-Effect Caused by Low Energy Laser Irradiation

Osamu FUJIWARA, Motohiro OKADA,
Kazuo KATOH, Takashi AZAKAMI

Department of Electrical and Computer Engineering

(Received september 5, 1986)

In order to study a possible mechanism causing the bio-effect of low energy laser beam, we performed preliminary experiments on the influences of laser irradiation on protein conformation (spatial structure of a protein) relating to biological activation. A method is presented of dynamically evaluating the protein conformation by use of circular dichroism (CD) spectra of the protein. Measurements were made on myoglobin and the effects of the laser irradiation on the conformation is examined by using the statistical techniques.

1. ま え が き

最近のレーザー技術の発達に伴い、レーザーの医学応用が盛んとなった。とくに、治療分野においては、レーザーメス・光凝固装置等で代表されるように、高エネルギーレーザーの熱効果を利用したものがほとんどで、これらの医療機器は既に臨床で活用されている¹⁾。一方、低エネルギーレーザー光照射による創傷等の治癒促進・ハリ効果・鎮痛効果・炎症の抑制効果などの臨床例が数多く報告されるに至り、低エネルギーレーザー光による非熱的効果の医学応用も最近注目されるようになった¹⁾⁻²⁾。これらの効果は、波長：500~700nm、レーザー出力：数mW~数10mW、照射時間：数10s~数10minのレーザー光照射により生じるとされるが、作用機序には不明な点が多く、その解明が医療分野における治療法の確立とともに期待されている。

以上のような背景を踏まえて、筆者らは、低エネルギーレーザー光の生体影響を徹視的なレベルで解明することを目的として、以下の実験を行った。まず、レーザー光が生体細胞に作用し得る対象として生体高分子(蛋白質)に注目し、これの生物活性度に影響を及ぼすとされるコンホメーション(骨格構造)が低エネルギーのHe-Neレーザー光(波長：632.8nm、量子エネルギー：1.96eV)の照射によりどのように変化するかを円二色分散計⁷⁾⁻⁹⁾を用いて調べた³⁾⁻⁶⁾。本論文は、この実験結果を述べる。

2. 蛋白質のコンホメーション¹⁰⁾⁻¹¹⁾

蛋白質は20種類のアミノ酸が一次的に数多くペプチド結合した長い鎖(ペプチド鎖)から成る生体高分子で分子量は10,000から1,000,000に及ぶ。これらの共有結合(結合エネルギーC-C間：3.6eV, C-N間：3.0eV)に基づくペプチド鎖の配列順序を1次構造、主に水素結合(結合エネルギー0.03eV)による立体的な構造を高次構造と呼ぶ。高次構造はさらに2次構造、3次構造、4次構造と分けられ2次構造(骨格構造)をとくにコンホメーションという。

一般に、蛋白質の生物活性度はコンホメーションに強く依存するので、その変化は酵素の触媒作用や生体膜機能などに何らかの影響を及ぼすとされる¹²⁾。主に水素結合からなるコンホメーションはその結合エネルギーは1次構造の共有結合エネルギーに比して約1/100ときわめて小さいので、コンホメーションは低エネルギーレーザー光照射により容易に変わり得ると考えられる。

コンホメーションはおおまかに α -ヘリックス、 β -構造、不規則構造の三つに分けられる。 α -ヘリックスはペプチド鎖の代表的な螺旋構造を称し、水素結合による安定した構造である。 β -構造は鎖が十分に伸びきって他の鎖と水素結合したシート状の構造である。不規則構造は α -ヘリックス、 β -構造のいずれにも属さない無秩序な構造である。蛋白質構造の一例として本実験で用いたミオ

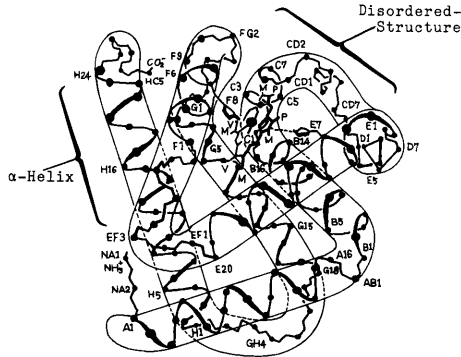


Fig. 1 Conformation model of myoglobin⁹⁾.

グロビン (Mb) の構造を図1に示す。

3. 円二色性とコンホメーション推定⁷⁾⁻⁹⁾

蛋白質コンホメーションの各含有量の推定には円二色分散計が用いられる。円二色性(Circular Dichroism;略してCDと呼ぶ)とは、溶液物質を通過する同じ強度の左右円偏光の吸収量が異なる現象をいう。CDの評価方法には二とおりある。一つは円二色度を用いる方法で、これは左右円偏光に対する吸収量の差を表す。もう一つは楕円率を用いる方法で、直線偏光に対する透過光(楕円偏光)の短軸・長軸の比で表す。蛋白質のCDは後者で評価する場合が多く、次式の平均残基楕円率(モル楕円率)がよく用いられる。

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{M_0}{10} \frac{\psi}{lc} [\text{deg} \cdot \text{cm}^2/\text{decimol}] \dots\dots\dots(1)$$

ψ : 楕円偏光の長軸に対する短軸の比の逆正接 [deg]

l : セル長 [cm]

c : 溶液濃度 [g/cm³]

M_0 : 平均残基分子量(蛋白質の1残基当りの平均分子量) [g/mol]

λ : 測定光の波長 [nm]

楕円率 $[\theta]_{\lambda}$ は蛋白質のコンホメーションに応じて特有の波長特性(CDスペクトルと呼ぶ)を示すので、CDスペクトルを測定することによってコンホメーションが逆に推定される。図2にポリ-L-リジンの各コンホメーションに対するCDスペクトルを示す。ポリ-L-リジンはpH, 温度, などの作成条件や触媒により容易にコンホメーションを変更できるので、図2に示すように各単独コンホメーションに対するCDスペクトルが測定される。そして、これらの予め測定されたCDスペクトルから任意の蛋白質のコンホメーション推定が行われる。その従来の方法はつぎのようである。まず、 α -ヘリックス, β -構造, 不規則構造だけのポリ-L-リジンの波

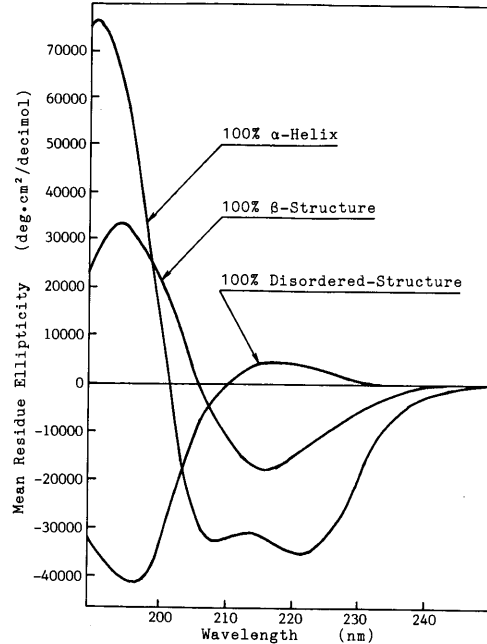


Fig. 2 Circular dichroism spectra for each content of poly-L-lysine⁷⁾.

長波長 [nm] に対する CD スペクトルをそれぞれ $[\theta_{\alpha}]_{\lambda}$, $[\theta_{\beta}]_{\lambda}$, $[\theta_{\gamma}]_{\lambda}$, 対象とする蛋白質の CD スペクトルを $[\theta]_{\lambda}$ とする。そのとき、蛋白質コンホメーションの α -ヘリックス, β -構造, 不規則構造の含有量をそれぞれ α , β , γ とすれば、これらは

$$\alpha = \frac{[\theta]_{222}}{[\theta_{\alpha}]_{222}}$$

$$\beta = \frac{[\theta]_{218} - [\theta_{\gamma}]_{218}}{[\theta_{\beta}]_{218} - [\theta_{\gamma}]_{218}} \dots\dots\dots(2)$$

で与えられる。

しかしながら、式(2)による推定法は、1波長に対するCDスペクトルを用いるので推定誤差が大きいこと、 α -ヘリックスと β -構造が共存する場合にはコンホメーションの推定ができないこと、などの問題をもつ。

本実験では、上記の問題点を解決する一方法として、多波長に対するCDスペクトルの測定データから最小自乗法を用いたコンホメーション推定法を提案する。これによれば、コンホメーションの各含有量は

$$\begin{pmatrix} \alpha \\ \beta \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \Sigma([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})^2 \Sigma([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \\ \Sigma([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \Sigma([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})^2 \end{pmatrix}^{-1} \begin{pmatrix} ([\theta]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \\ ([\theta]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \end{pmatrix}$$

$$\gamma = 1 - \alpha - \beta \dots\dots\dots(3)$$

で計算される(導出は付録参照)。

TABLE 1 conformation contents of several proteins⁷⁾.
unit : %

	Myoglobin			Lisozyme			Ribonuclease		
	α	β	γ	α	β	γ	α	β	γ
Eq. (2)	67.9	—	—	27.6	—	—	9.0	—	—
Eq. (3)	69.0	3.8	27.1	30.3	7.9	61.8	10.5	30.7	58.8
	(r=0.998)			(r=0.995)			(r=0.981)		
X-Ray diffraction	74	0	26	30	10	60	15	36	49

r : correlation coefficient

表1は文献(7)の各種蛋白質に対するCDスペクトルの測定データを用いて式(2), 式(3)から求めたコンホメーションとX線回折による場合との比較を示す。表より式(3)は妥当であることがわかる。

4. 実験

4.1 試料

蛋白質としては構造がすでに判明しているミオグロビン(Mb)を用いた。これはは乳類の筋肉中に含まれるヘム蛋白質の一種で、ヘモグロビンと同様、酸素の貯蔵および運搬機能を持つ球状の赤色色素蛋白質である。本実験では馬の骨格筋より採取した粉末状の Mb (SIGMA CHEMICAL COMPANY No. 0630 MYOGLOBIN TYPE I) をリンゲル液 (NaCl 0.86, KCl 0.03, CaCl₂ 0.033 w/v%, pH 6.6) に溶かし、これの0.1mg/ccの溶液(褐色)を一つの試料とした。

4.2 実験装置と測定法

照射に用いたレーザーは最大出力2.5mWのHe-Neレーザー(波長632.8nm, 量子エネルギー1.96eV)である。

図3はCD測定用のセル内の試料配置とレーザー光の照射方法を示す。図のように試料を注入孔よりセル(液相厚さ1.0mm, 容積0.06cm³)に入れセルの側面よりレーザー光の照射(スポットサイズ1.0mm²)を行う。本実験

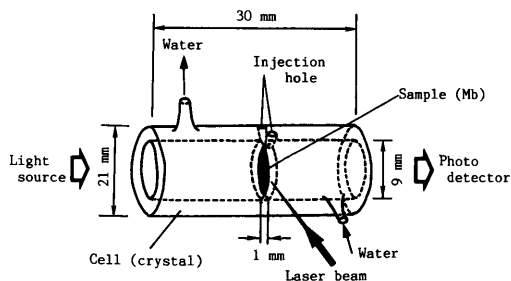


Fig. 3 Configuration of sample in the cell for the measurement of CD spectra and the irradiation way of laser beam.

では円二色分散計に装着されたセル内の試料にレーザー光の照射を行うためにミラーの反射を用いたので照射電力は試料直前では1.5mWとなった。また、透過光の電力は入射電力とほとんど変わらなかった。したがって、試料に吸収されるレーザー光の電力はきわめて小さいものと考えられる。

なお、セル内には恒温水が還流しており、試料の温度は一定に保たれている。本実験ではこれを30±0.1℃に設定した。

図4は円二色分散計(日本分光J-40S)とデータ処理装置のブロックダイアグラムを示す。この装置では波長200~250nmのCDスペクトルが約40sで測定できる。測定のデータはデータプロセッサに蓄えられ、これよりX-Yレコーダに出力されるが、本実験ではデータプロセッサの出力に通信回線RS-232Cを介してパーソナルコンピュータに接続した。これにより、CDスペクトルデータからコンホメーションの各含有量が式(3)を用いて瞬時に計算推定され、その結果はフロッピーディスクに記録される。

表2は実験条件を示す。実験Aはレーザー光を照射しない対照群(試料数11)であり、CDスペクトルを1分毎に90分間測定する。実験B~Fはレーザー光照射群(照射時間に応じて5群に分ける)であり、この場合はレーザー光

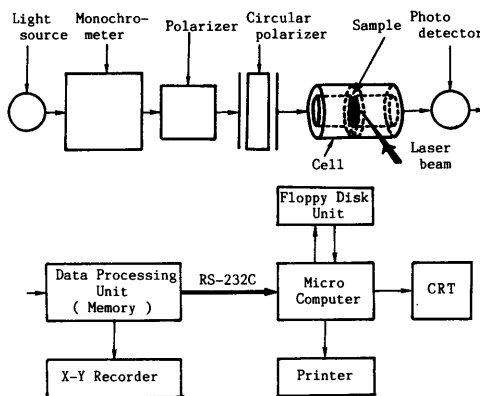


Fig. 4 Schematic diagram of CD measurement apparatus.

TABLE 2 Experimental condition.

Group	Duration		Number of Sample
	control	Irradiation	
A	90 min	0 min	11
B	60 min	2 min	5
C	60 min	5 min	5
D	60 min	7 min	7
E	60 min	10 min	5
F	60 min	30 min	9

照射前後の CD スペクトルをそれぞれ 1 分毎に 30 分間測定する(表 2 参照)。なお、レーザ照射による試料の温度変化はいずれも $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 以内であり、照射しない場合のそれとほとんど同じであった。

4.3 実験結果と考察

図 5 は実験 A の Mb の CD スペクトル測定例を示す。点線はポリ-L-リジンの CD スペクトルを示す。実験 A および F によるコンホメーションの各含有量の時間変化の一例を図 6 (a), (b) に示す。同図(b)のレーザ照射中は含有量の推定が不可能であるため空白にしてある。図 6 より、コンホメーションの各含有量はかなり揺らいでいることがわかる。つぎに、図の領域 I と II の測定データの揺らぎについて、照射群のそれを対照群のそれと比較して統計的に調べる。

図 7 は実験 A の領域 I と II における各コンホメーション含有量の確率分布を正規確率紙上に示したものである。これはコンホメーションの各含有量がある量を超える時間率として求めた。図により、コンホメーションの各含有量は近似的に正規確率分布に従うことが知られる。照射群に対しても同様の傾向が得られた。

図 8 は実験 B, C に対してレーザ照射前後のコンホメーション変動に対する確率分布を比較して示す。図により、レーザ照射により動揺のばらつきが増大していることが確かめられる。

すべての実験について測定されたコンホメーションの各含有量の平均値と分散値のそれぞれの比を表 3 にまと

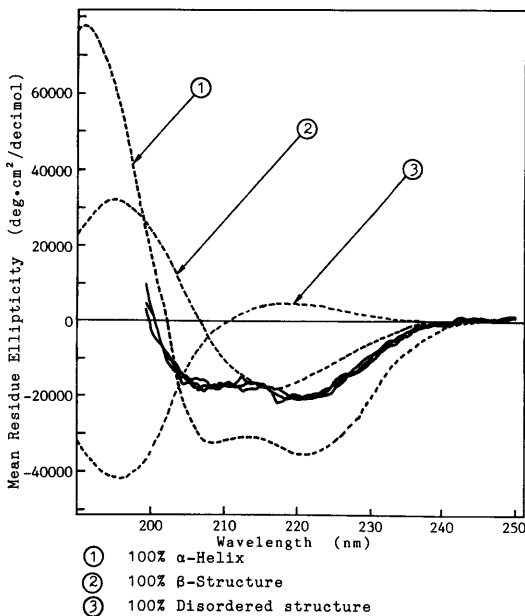


Fig. 5 Measured CD spectra of myoglobin.

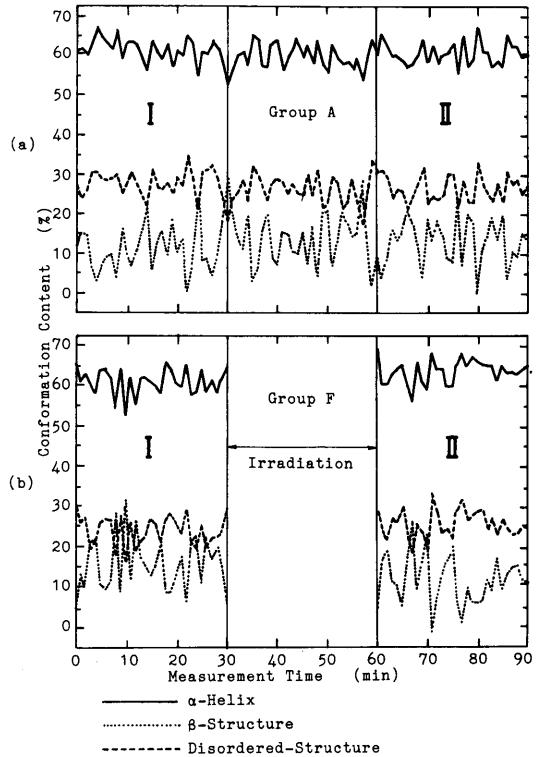


Fig. 6 Conformation contents obtained from the CD spectra of myoglobin.

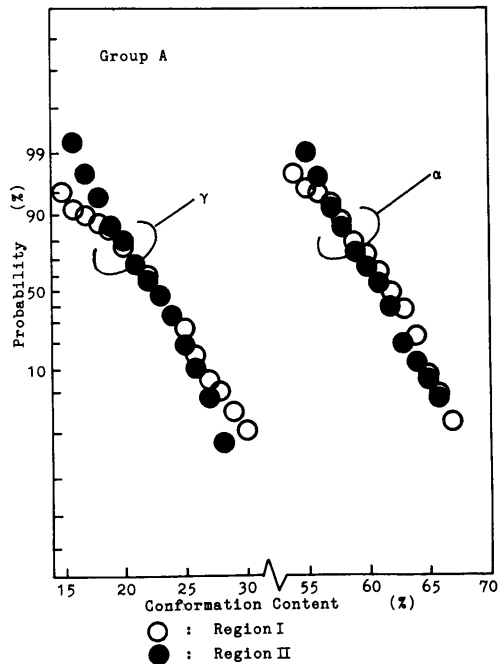


Fig. 7 Probability distributions of the content fluctuations of myoglobin conformation.

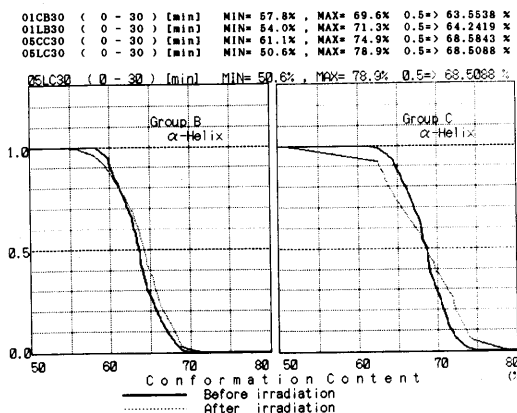


Fig. 8 Probability distributions of the content fluctuations of myoglobin conformation.

めて示す。照射時間に対してグラフ化したものを図9に示す。この図より、コンホメーションの平均値はレーザー光の照射により変化していないこと、分散値は照射時間とともに増大し、その効果は10分程度で飽和していること、などが知られる。

TABLE 3 Ratio of mean and dispersion values of conformation content.

Group	$\bar{\alpha}_{II}/\bar{\alpha}_I$	$\sigma_{\alpha II}^2/\sigma_{\alpha I}^2$	$\bar{\gamma}_{II}/\bar{\gamma}_I$	$\sigma_{\gamma II}^2/\sigma_{\gamma I}^2$
A	0.997	1.378	0.992	1.321
B	1.009	1.158	1.011	0.956
C	1.009	1.683	0.973	1.411
D	1.013	1.013	1.002	1.159
E	1.005	2.100	0.986	1.387
F	1.005	2.029	0.988	1.741

$\bar{\alpha}$ and $\bar{\gamma}$ represent the mean values of α and γ , respectively. σ_{α}^2 and σ_{γ}^2 represent the dispersion values of α and γ , respectively. Subscripts of α and γ express the cases of region I and II, respectively.

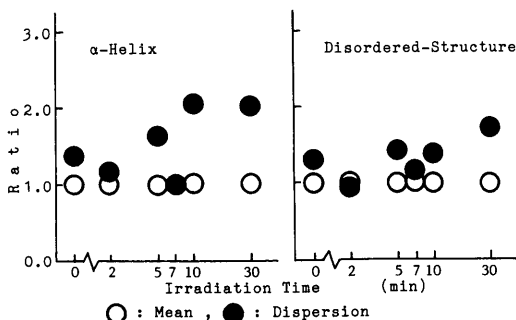


Fig. 9 Dependence of ratio of mean and dispersion values of conformation content on the irradiation time.

5. む す び

低エネルギーレーザー光の短時間照射(数秒から数分)による生体効果には目ざましいものがあり、医学応用分野においてはこれらの臨床的研究が盛んである。本実験では低エネルギーレーザー光照射による生体作用機序の微視的解明を目的として、生体構成物質である蛋白質(本実験ではMbを取り上げた)に注目し、これに低エネルギー(出力2.5mW)のHe-Neレーザー光を照射した場合のコンホメーション変化をCDスペクトルにより調べた。その結果、Mbのコンホメーションの各含有量は正規分布にしたがい時々刻々と変動していること、その時間的動揺の平均値はレーザー光照射によりほとんど変わらないが、分散値は照射前に比して増大すること、レーザー光照射によるコンホメーション変動の促進効果は10分程度の照射で飽和すること、などが判明した。

本実験では蛋白質コンホメーションの動的変動に対する微弱レーザー光照射の影響を調べたが、コンホメーション変動の促進効果の持続性と照射時間との関係、レーザー光の出力および波長(レーザー光の種類)に対するコンホメーション変動の依存性などの検討が今後の課題である。

謝 辞

実験の遂行に当たり測定装置の便宜を計って下さいました本学物質工学科教授滝沢章先生、同助教授辻田義治先生、同助手木下隆利先生に厚く御礼申し上げます。また、実験を協力して頂いた同電子工学科卒研究生山崎哲也君に感謝する。

文 献

- 1) 渥美和彦監修：“レーザーの臨床”，Medical planning (昭56-11)
- 2) “低エネルギーレーザー医学国際シンポジウム”，(昭和60-07)
- 3) 岡田，加藤，阿座上，藤原“低エネルギーレーザー光の蛋白質の骨格構造に与える影響”，昭和60年東海連大，No. 414
- 4) 岡田，藤原，加藤，阿座上“低エネルギーレーザー光の蛋白質の骨格構造に及ぼす影響”，信学技報，EMCJ 85-118 (昭61-03)
- 5) 岡田，藤原，加藤，阿座上“微弱電力レーザー光を照射した蛋白質コンホメーションの動的測定”，昭和61年東海連大予稿

- 6) 山崎, 岡田, 藤原, 加藤, 阿座上 “微弱電力レーザー照射による蛋白質コンホメーション変動の促進効果”, 昭和61年東海連大予稿
- 7) N. Greenfield and G. D. Fasman: “Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation”, *Biochemistry*, **8**, pp. 4108-4166, Oct., 1969
- 8) 浜口, 武貞: “蛋白質の施光性”, 学会出版センター, (昭55-01)
- 9) 高分子学会高分子実験学編集委員会編: “高分子における分光学”, 共立出版, (昭55-01)
- 10) 田伏岩夫: “酵素反応機構”, 学会出版センター, (昭52)
- 11) 丸山清史: “酵素化学入門”, 丸善 (昭56)
- 12) 布施, 多気: 生体電磁環境研究会資料, No. 86-2

付 録

式(3)の導出

任意の蛋白質の CD スペクトル $[\theta]_{\lambda}$ が

$$[\theta]_{\lambda} = \alpha[\theta_{\alpha}]_{\lambda} + \beta[\theta_{\beta}]_{\lambda} + \gamma[\theta_{\gamma}]_{\lambda}$$

で表せるものとすれば,

α, β, γ ($\alpha + \beta + \gamma = 1$) は

$$e = \Sigma \{ [\theta]_{\lambda} - (\alpha[\theta_{\alpha}]_{\lambda} + \beta[\theta_{\beta}]_{\lambda} + \gamma[\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \}^2$$

を最小にするように決定すればよい。それゆえ,

$$\frac{\partial e}{\partial \alpha} = \frac{\partial e}{\partial \beta} = 0$$

から

$$\Sigma \{ (\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \{ ([\theta_{\gamma}]_{\lambda} - [\theta]_{\lambda}) + \alpha([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) + \beta([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \} = 0$$

$$\Sigma \{ (\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \{ ([\theta_{\gamma}]_{\lambda} - [\theta]_{\lambda}) + \alpha([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) + \beta([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \} = 0$$

となり, これらを整理すれば,

$$\begin{aligned} & \{ \Sigma([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})^2 \} \alpha \\ & + \{ \Sigma([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \} \beta \\ & = \Sigma([\theta]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \\ & \{ \Sigma([\theta_{\alpha}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \} \alpha \\ & + \{ \Sigma([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})^2 \} \beta \\ & = \Sigma([\theta]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda})([\theta_{\beta}]_{\lambda} - [\theta_{\gamma}]_{\lambda}) \end{aligned}$$

を得る。上式の連立方程式を解けば, 本文の式(3)が求まる。