

半導体パルスレーザー照射による神経細胞の機能破壊に関する研究 - てんかん外科手術の新技术提案に向けて -

著者	平山 祐哉
発行年	2014
学位授与年度	平成26年度
学位授与番号	17104甲生工第226号
URL	http://hdl.handle.net/10228/5310

半導体パルスレーザー照射による神経
細胞の機能破壊に関する研究
-てんかん外科手術の新技术提案に向けて-

平山 祐哉

目次

第1章	序論	1
第2章	細胞・神経の構造，興奮の原理およびてんかんについて	3
2.1	細胞の興奮	3
2.1.1	膜電位	3
2.1.2	細胞膜の電気的性質	6
2.1.3	細胞膜の活動電位	8
2.2	神経細胞	14
2.2.1	神経の興奮伝導	14
2.2.2	神経線維束の活動電位	16
2.2.3	海馬	18
2.3	細胞，神経の死・変性	19
2.4	てんかん	20
2.4.1	てんかんとは	20
2.4.2	てんかんの薬物治療	21
2.4.3	てんかんの外科治療	22
第3章	レーザーとその医療応用	25
3.1	レーザーとは	25
3.1.1	誘導放出	26
3.1.2	共振器	28
3.1.3	レーザー発振	30
3.1.4	レーザー照射による効果	31
3.2	半導体パルスレーザー	32
3.3	細胞，神経に対するレーザー照射の効果	34
第4章	ウシガエル坐骨神経の信号伝播機能破壊実験	36
4.1	実験の目的と方法	36
4.1.1	ウシガエル坐骨神経	37
4.1.2	実験装置	39
4.1.3	実験手順	47
4.2	実験結果	50

4.3	考察	57
第5章	ラット海馬スライスにおけるてんかん様放電の消失実験	60
5.1	実験の目的と方法	60
5.1.1	ラット海馬スライス	60
5.1.2	実験装置	63
5.1.3	実験手順	68
5.2	実験結果	71
5.3	考察	80
第6章	結論	82
	謝辞	85
	参考文献	85

第1章 序論

本論文は、てんかんの新しい外科手術法の提案に向けた基礎的検討を目的とし、半導体パルスレーザー照射による神経細胞の機能破壊に関する研究についてまとめたものである。

てんかんは、患者数が非常に多い脳の代表的な疾患であり、てんかん原性域と呼ばれる部位からの異常興奮(てんかん発作)によるてんかん波の発生、伝播によって症状が引き起こされる [1]。てんかん発作の症状は、てんかん原性域の位置やてんかん波の伝播範囲によって異なるが、意識の消失を伴うけいれんや強直発作などが挙げられる。発作症状の持続時間も様々であり、数秒で終わる場合もあれば数分以上におよぶ場合もある。加えて、発作の発生予測については現在も研究が行われているが実現されていない。以上の事から、てんかん患者は自動車免許の取得や就労などに制限があり、健全な社会生活を営むことが困難である [2]。てんかん患者に対する治療方法としては、薬物治療と外科手術による治療の2種類がある。軽度のてんかんであれば、神経活動を抑制する薬品(抗てんかん薬)によって治療可能であるが、難治てんかんとも呼ばれる重度のてんかんの場合は、薬物による発作の抑制が困難であり、てんかん原性域およびその周辺の脳領域に対する外科的治療(主に切除手術)が行われる。しかしながら、外科手術には以下に挙げるような問題点が存在する：(1)長時間(8~10時間程度)かつ複数回の開頭手術が必要であること、(2)術後に合併症・後遺障害の危険性があること。また、現在のてんかん外科手術では、原性域推定のための検査入院と手術入院といった、複数回の入院が必要な点も挙げられる。これらの点から、現在のてんかん外科手術は患者に大きな負担を強いており、より安全で簡便かつ後遺障害のリスクも少ない高度な外科治療方法が求められている。光ファイバーを用いたレーザー照射による手術法を提案することで、上述のてんかん外科手術法の問題点の解決が可能であると考えられる。手術では光ファイバーを挿入するための穴を空けるだけで良いので、頭蓋骨を大きく除去する必要がない。大がかりな開頭手術が不要であれば、術後の後遺障害や合併症の危険性もより低下する。

パルスレーザーは、Maimanらによって1960年に発明され、レーザーの医療応用の代表的な例は、高出力レーザーを用いたレーザーメスや穿孔用のドリルとしての利用などが挙げられるが、近年では低出力レーザーの利用や、レーザー照射による神経・細胞への影響・効果に関する調査が盛んに行われている [3]。また、レーザーを神経に照射することで、信号伝播機能を一時的、部分的に阻害することが可能であるという報告もある [4] [5]。これらの低出力レーザーに関する医療

応用は、特に歯科医療の分野で顕著であり、低出力レーザーを照射することで口内炎、歯肉炎や抜歯創などの治癒促進効果があるという報告がされている [6] [7]。また、単パルスレーザーを照射することによって、神経細胞の発火を可能とする報告も見られる [8] [9]。

レーザー照射による神経や細胞の効果については様々な研究報告が見られるが、レーザーとそれらの効果・影響に関する因果関係や原理等については未解明の部分が多く、医療応用の分野でも最適なレーザーパラメータ(波長, エネルギー, 照射時間等)が使用されているとは言い難い。また、高出力と低出力の照射効果が正反対と言っても過言ではなく、さらにその出力の境界があいまいである。レーザーをてんかん外科手術に利用する場合、原性域部分の細胞は確実に破壊しなければならないが、周辺の健常部分の損傷は避けなければならない。このようなデリケートな調整を行うためには、既存の研究から得られた知見だけでは不十分である。

そこで本研究では、レーザー照射を用いたてんかん外科手術法提案のための基礎研究として、レーザー出力と神経・細胞の機能破壊の関係調査、および機能破壊の発生機序を調べることを目的として実験を行う。実験では、ウシガエル坐骨神経およびラット海馬スライスに対して、半導体パルスレーザーを照射し、活動電位およびてんかん様放電の発生・伝播がレーザーの出力によってどのように変化するかを確認し、レーザー出力と機能破壊の関係や機能破壊に至る要因について検討する。

以下に本論文の構成を示す。

第1章は序論である。

第2章では、神経・細胞の構造、興奮の原理について説明し、てんかんと既存のてんかん治療法の概要について述べる。

第3章では、レーザーの基本原理と半導体レーザーについて説明し、レーザー照射による神経・細胞の効果・影響について既存の研究を紹介する。

第4章では、ウシガエル坐骨神経に対するパルスレーザー照射実験について、実験対象・方法・結果と考察を述べる。

第5章では、ラット海馬スライスに対するパルスレーザー照射実験について、第4章と同様に述べる。

第6章は、結論である。

第2章 細胞・神経の構造，興奮の原理およびてんかんについて

本章では，細胞や神経の基本的な構造，興奮の原理と，実験で用いる神経線維束および海馬について述べる．また，てんかんについての概要およびその治療法についても述べる．

2.1 細胞の興奮

脳を構成している神経細胞は，脂質二重層の膜で覆われている．この膜は細胞膜と呼ばれていて，膜の内外は様々なイオン物質で満たされている．細胞膜自体は，イオンを透過しない性質を持つが，細胞膜に存在する膜タンパク(イオンチャネル)やイオンポンプによって，イオン物質は膜の内外に移動することができる．イオンチャネルには， K^+ イオンのみを透過させる K^+ イオンチャネルや， Na^+ イオンのみを透過させる Na^+ イオンチャネルなどが存在する．イオンチャネルによるイオンの移動は細胞膜内外のイオン濃度勾配に依存した受動的な移動であるが，イオンポンプはエネルギーを必要とする能動的な移動(イオン濃度勾配とは逆方向の移動を行う)である．イオンポンプには Na^+ イオンと K^+ イオンを交換する Na^+-K^+ ポンプなどが存在し，特定のイオンの濃度差を偏らせる働きがある．これらの機構の働きによって，すべての細胞の細胞膜の両側には細胞内外のイオンの濃度差に基づく電位差(膜電位)が存在する．外界からの刺激(stimulus)の無い状態(静止状態)における膜電位を静止膜電位という．多くの細胞は膜電位を外界の変化に応じて変化させることによって環境の変化に対応し，一定以上の刺激を与えられることで活動電位を発生(発火)させる [10]．

2.1.1 膜電位

細胞膜内外のイオン濃度差と細胞膜のイオンに対する選択的透過性(イオンチャネル)により，静止状態の細胞膜の両側には一定の電位差が存在する．これを静止膜電位という．静止状態にあるとき，細胞内には Na^+ イオンや Cl^- イオンが少なく， K^+ イオンが多い状態となる．したがって，細胞内は細胞外に対して負電荷をもつので，細胞外液の電位を 0 とすれば，静止膜電位は負の符号を持つ．細胞が静

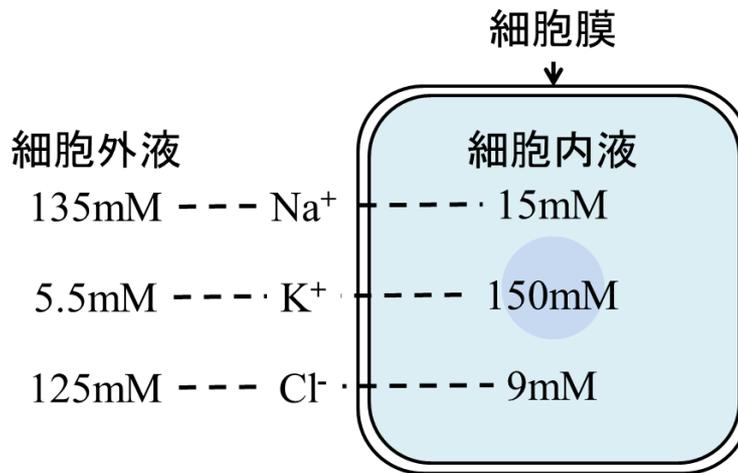


図 2.1: 細胞膜内外のイオンの濃度差 ([10] より一部を変更して引用) .

止状態にある限りこの電位差は安定である．静止膜電位の値は多くの細胞で-60mV から-100mV の範囲にある．

細胞の膜電位について考える際には，細胞内外にあるすべてのイオンを考える．これらのイオンのうち，細胞膜を透過しないイオンは膜電位の成立に関与しないので除外でき，実際にはK⁺，Na⁺，Cl⁻ の3種のイオンを考慮する．細胞膜の静止電位は以下に示すゴールドマンの式によって表すことができる．膜電位 V_m は，

$$V_m = -\frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i} \quad (2.1)$$

と表すことができる．ここで， $[]_o$ は各イオンの細胞外液濃度 ([mM])， $[]_i$ は細胞内液濃度 ([mM])， P は各イオンの透過性定数， R は気体定数 (8.31[J/mol/K])， T は絶対温度 (K)，そして F はファラデー定数 (96500[C/mol]) である．この式の右辺に負符号が付いているのは，通常膜電位が外液の電位を 0 とする負の符号を取るためである．図 2.1 に示すように，K⁺ 濃度は細胞外液より細胞内液が，Na⁺ と Cl⁻ の濃度は細胞内液より細胞外液のほうが高い．細胞外液の K⁺ 濃度を変化させると，図 2.2 に示すように細胞膜の静止電位 V_m と外液の K⁺ 濃度の対数との間にはほぼ直線関係が見られ，その勾配は 18 で 58mV である．このことから，静止膜電位は近似的に K⁺ の平衡電位 E_K と考えて良い．つまり，静止状態での膜電位は，

$$V_m = -\frac{RT}{F} \ln \frac{[K^+]_i}{[K^+]_o} = E_K \quad (2.2)$$

となる．

外液 K⁺ 濃度が低くなると静止膜電位と $[K^+]_o$ の関係が直線からずれていく．こ

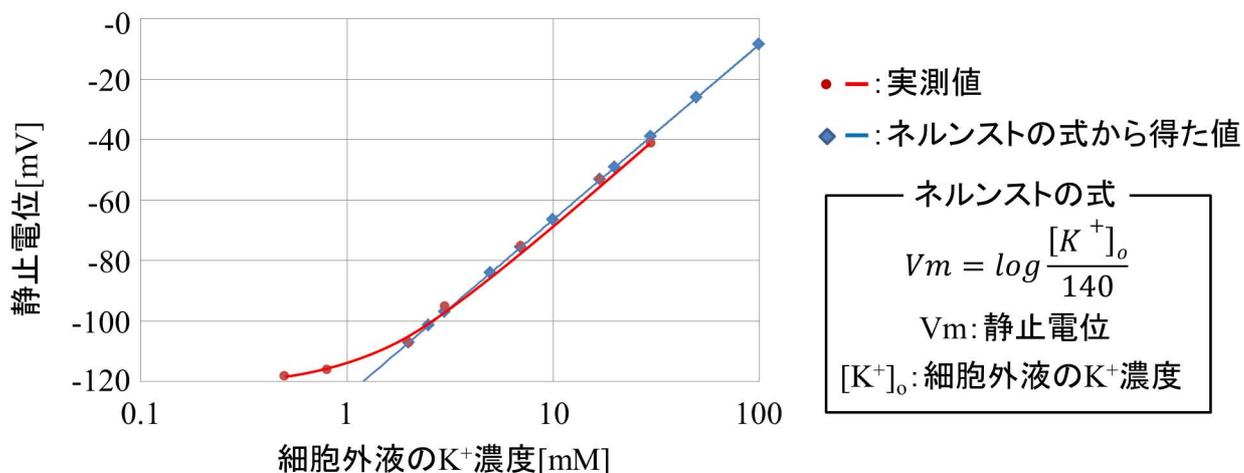


図 2.2: 静止電位と細胞外液の K^+ イオン濃度の関係 ([10] より一部を変更して引用) .

これは, $[K^+]_o$ が小さくなると P_{Na} が P_K に対して十分小さいとして無視できなくなるためである. この場合には Na^+ も考慮して,

$$V_m = -\frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i}{P_K[K^+]_o + P_{Na}[Na^+]_o} \quad (2.3)$$

となる.

また, 図 2.1 の K^+ , Cl^- の細胞内外の濃度差から, K^+ と Cl^- についてはドナン平衡と呼ばれる平衡条件が成り立っている. よって, K^+ と Cl^- の平衡電位は等しく, $E_K = E_{Cl}$ である. よって, P_{Cl} は P_K と同様に大であるとみなされるので, Cl^- に関する項は式 (2.1) から除外できる. ドナン平衡状態にあるので, 静止状態の細胞膜の K^+ と Cl^- に対する透過性は高いが, Na^+ に対する透過性は低い. しかしながら, Na^+ の透過性は完全に 0 ではないので, Na^+ はわずかつ濃度差に従って細胞外から細胞内に拡散していく. もし, 細胞内液の Na^+ 濃度が上昇し続けると, 細胞内の電気的中性条件によって, 同量の K^+ が細胞内に拡散し, 細胞内外の静止電位差が減少していく. これを防ぎ静止電位を維持するため, Na^+ は拡散による受動的分布ではなく, ナトリウムポンプと呼ばれる機構による能動的分布が行われる.

細胞膜の静止電位についてまとめると, 以下のようなになる.

1. 静止状態の細胞膜は K^+ と Cl^- を透過させるが, Na^+ はほとんど透過させない.
2. 細胞内には細胞膜を透過できない陰イオンが存在する. これらは有機リン酸, 有機硫酸などのイオンやたんぱく質の極性基と考えられる.

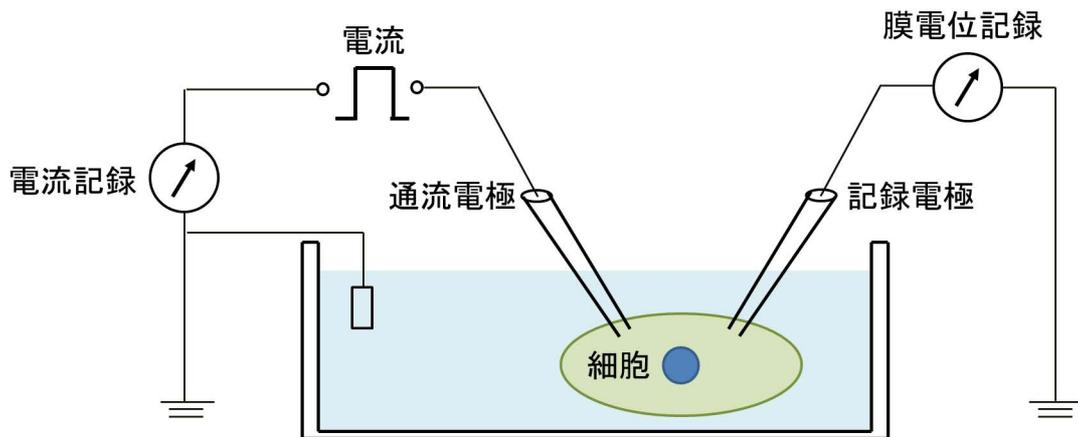


図 2.3: 細胞膜の電気的性質を調べる実験 ([10] より一部を変更して引用) .

3. この細胞内の不透過性陰イオンの存在により, K^+ と Cl^- はドナン平衡の条件に従って, 受動的に分布する .
4. この結果, 膜電位は近似的に K^+ あるいは Cl^- の平衡電位と等しくなる .
5. Na^+ は細胞膜の Na^+ に対する透過性が低いため, 正常な静止電位の値にはほとんど無関係である .

2.1.2 細胞膜の電気的性質

図 2.3 のように, 細胞に 2 本の細胞内微小電極を刺入し, 一方の電極を膜電位の記録に用い, 他方の電極により細胞膜をよぎって電流を流すことによって, 細胞膜の電気的性質を調べることができる. この時, 一方の電極を記録電極, 他方を通流電極という.

通流電極により一定の強さの電流を細胞膜をよぎって流すと, 記録電極により記録される膜電位は図 2.4 のような経過を取って変化し, ある一定の値に落ち着く. この時電流の強さを I , 膜電位の変化を V とすると, 両者の間にはオームの法則が成り立つ.

$$V = I \cdot R \quad (2.4)$$

つまり, 細胞膜は電流に対してある抵抗値を示す. これを膜抵抗という. また, 一定の強さの電流 I を与えた時, 膜電位変化はただちに一定値 V になるのではなく, 指数関数的な経過で V に近づく. これは, 細胞膜が薄いリン脂質の 2 分子層であり, その両側に静電気を蓄積する性質があるためである. これは電気回路における

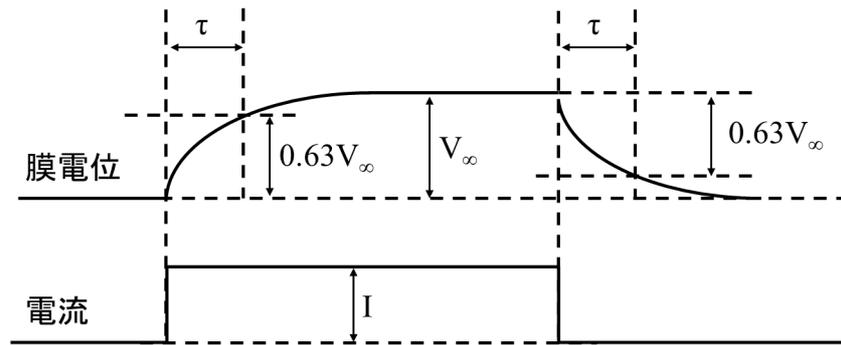


図 2.4: 一定の強さの電流を流した時の膜電位変化 ([10] より一部を変更して引用) .

蓄電器 (コンデンサ) と同様であり、与えられた電流はまず蓄電器としての細胞膜を充電するのに用いられる。細胞膜のもつ電気を蓄える性質を膜容量という。通流電極により与えていた電流を切ると、膜電位は元の値に戻るが、この場合もただちに返るのではなく、指数関数的な経過を取る。これは、膜容量の放電によるものである。電流を時間 $t=0$ で細胞膜に与えた時、任意の時間 t における膜電位変化を V_t とすると、

$$V_t = V_\infty(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (2.5)$$

と表すことができる。 V_∞ は膜の充電が完了された時の電位変化の大きさである。 τ を細胞膜の時定数という。電流を止めた後膜電位が元に戻る経過は同様に $t=0$ で電流を止めたとして、

$$V_t = V_\infty e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.6)$$

となる。細胞膜の時定数 τ は、細胞膜の膜抵抗を R 、膜容量を C とすると、

$$\tau = RC \quad (2.7)$$

となる。

膜抵抗と膜容量は図 2.5 のようにそれぞれ細胞膜のイオンチャネルと脂質層に対応する。つまり、図 2.6 の (1), (2) に示すように細胞膜に与えた電流はまず主として脂質層の両側に静電気として蓄積され、膜容量が充電されると (3) のようにイオンチャネルのみに流れるようになる。この時、膜電位変化、電流および膜抵抗の間にはオームの法則が成り立つ。電流を切ると、図 2.6(4) ~ (6) に示すように、膜容量を充電していた電気量が膜抵抗を流れ、放電が完了すると膜電位変化は元のレベルに戻る。膜抵抗、膜容量を比較する際には、細胞膜の単位面積についての

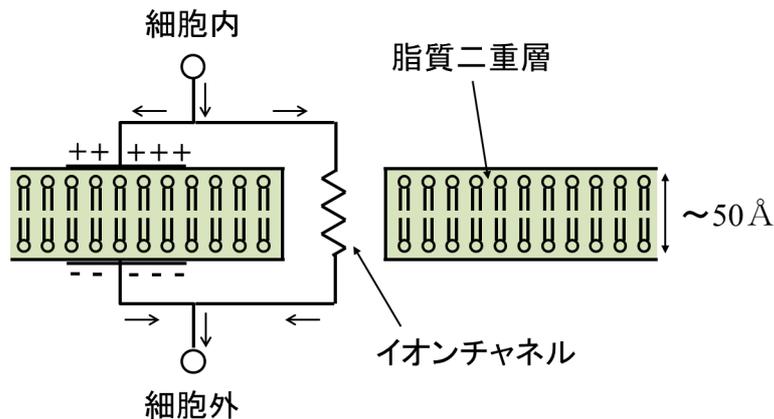


図 2.5: 脂質層とイオンチャネルの電気回路的な対応 ([10] より一部を変更して引用) .

値を用いる．膜抵抗は細胞によって様々であり，数 $100\Omega/\text{cm}^2$ から数 $\text{k}\Omega/\text{cm}^2$ の値を示す．これは主に，細胞膜のイオンに対する透過性による．膜容量は多くの細胞で約 $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ である．

細胞膜をよぎって流れる電流が小さい時には，すべての細胞の膜は図 2.5 のように膜容量と膜抵抗が並列に並んだ電気回路としてふるまう．このように膜を単純化した電気回路を等価回路という．図 2.5 の等価回路が当てはまる限り，膜に流す電流の向きを変化させた時の膜電位変化は符号が異なるので，まったく対称的になる．膜をよぎって細胞内から細胞外に向かって流れる電流，すなわち外向き電流を流した時は，膜電位は外液の電位 (=0) に近づく方向に変化する．この方向の電位変化を脱分極という．逆に，膜に内向き電流を流した時には，外液の電位との差が大きくなる方向に変化する．これを過分極という．図 2.7 に脱分極，過分極を示す．膜に電流を流すことによって生ずる膜電位変化はすべて電気緊張電位という．膜を通過する電流がある値以上に大きくなると，多くの細胞は図 2.5 のような単純な等価回路としてふるまわなくなる．内向き電流による過分極は電流の大きさに比例して大きくなるのに対し，図 2.8 に示したように，外向き電流による脱分極は増大の度合いが小さくなる．外向き電流に対する膜抵抗は電流が大きくなるにつれ，減少していく．この現象を膜の整流作用という．

2.1.3 細胞膜の活動電位

活動電位は神経線維，筋線維ばかりでなくある種の受容器細胞（味覚や嗅覚細胞など）や分泌細胞（インスリン分泌細胞，下垂体の細胞など）にも見られる．活動電位の主な機能は次の 2 つである．

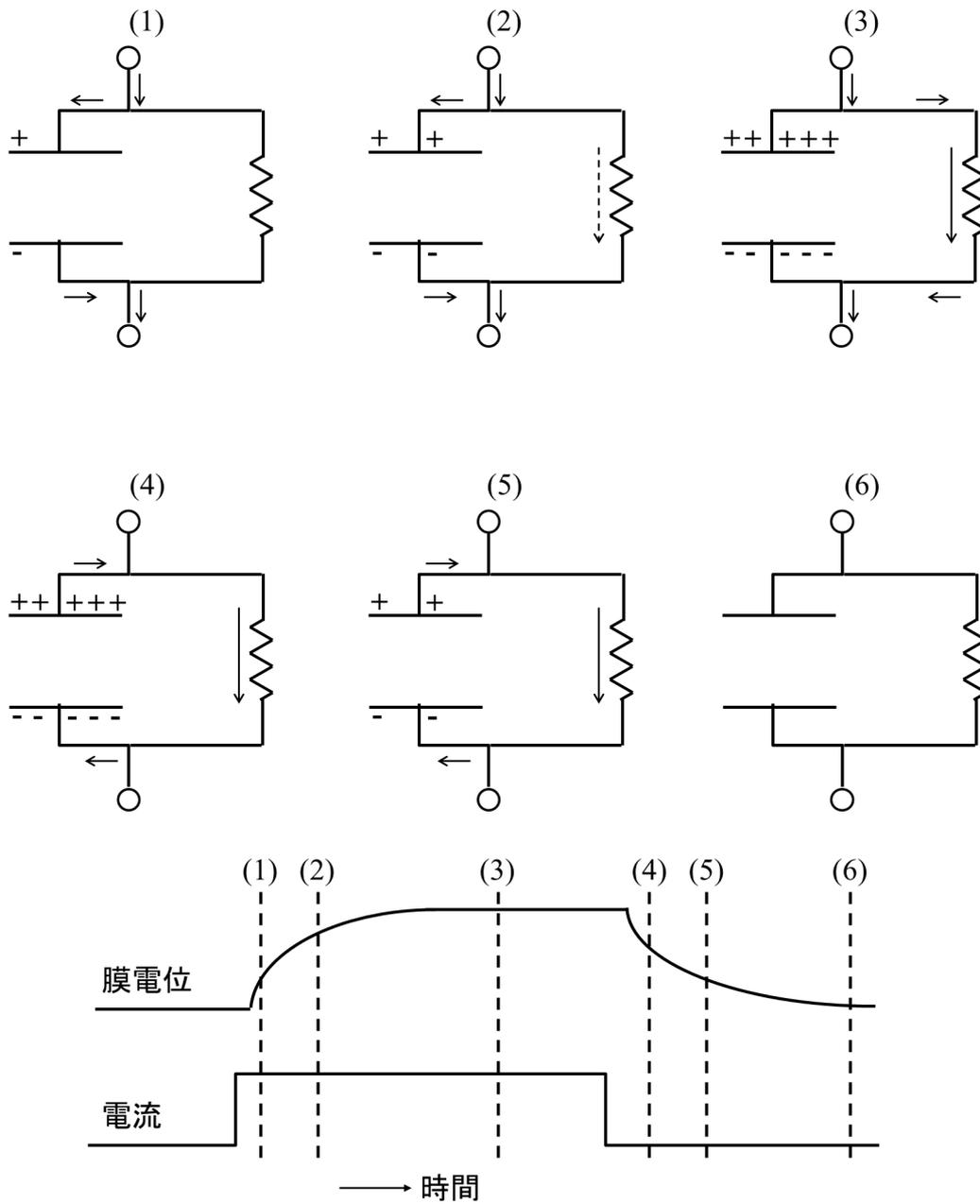


図 2.6: 細胞膜に電流を流した時の膜容量，膜抵抗に流れる電流の分布 ([10] より一部を変更して引用) .

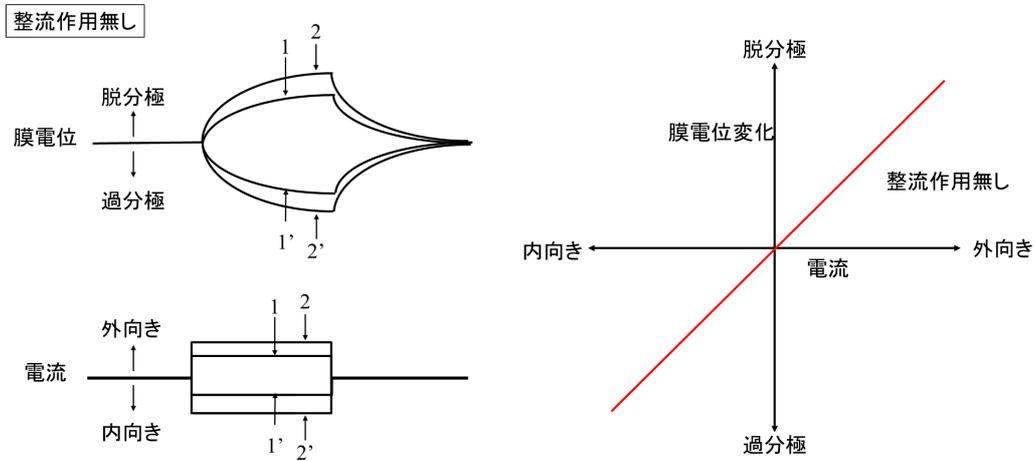


図 2.7: 脱分極と過分極 (整流作用無し)([10] より一部を変更して引用) .

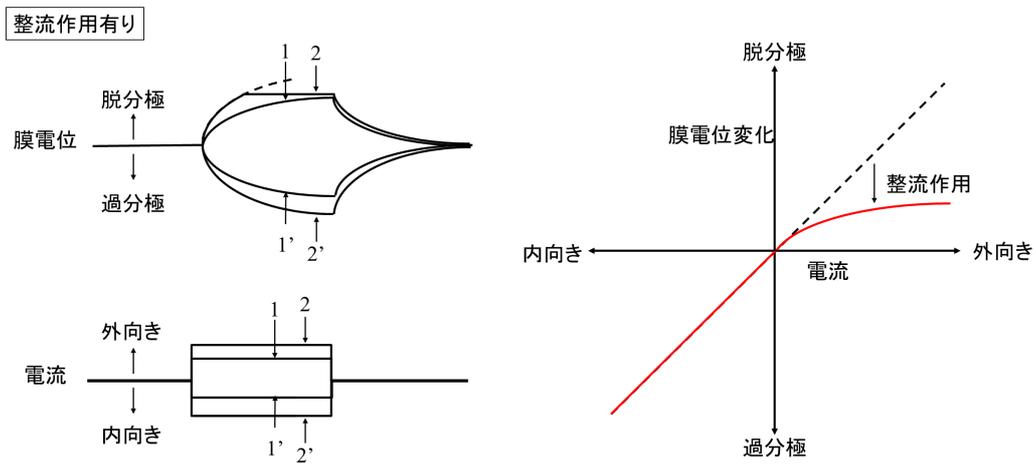


図 2.8: 膜の整流作用を考慮した際の脱分極 ([10] より一部を変更して引用) .

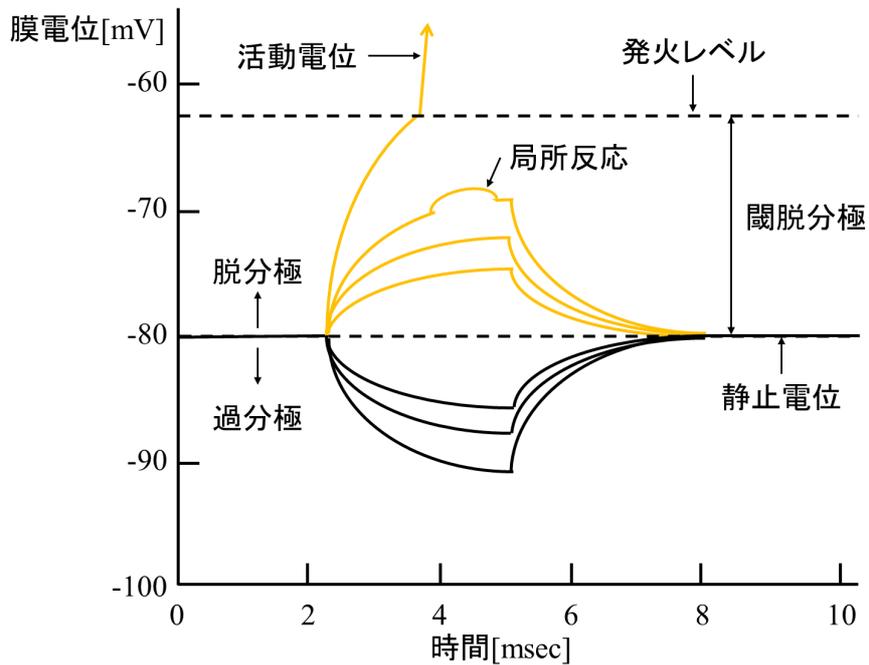


図 2.9: 活動電位の発生 ([10] より一部を変更して引用) .

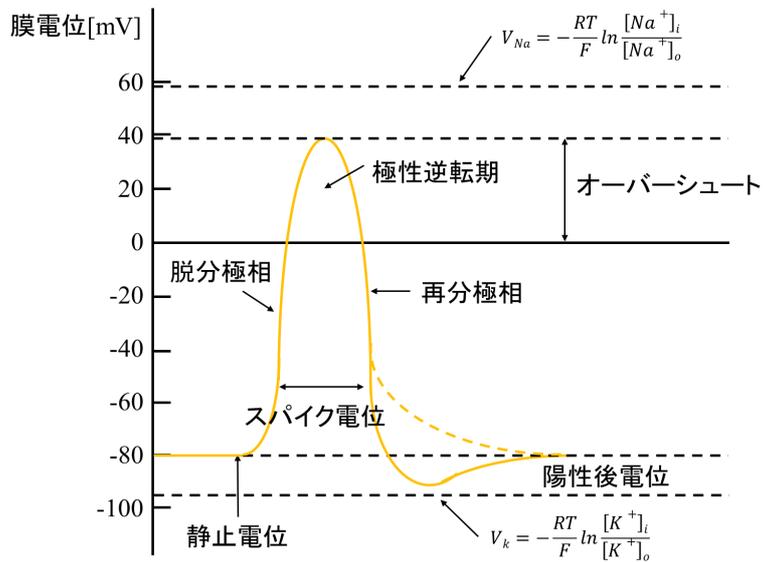


図 2.10: 活動電位の経過と名称 ([10] より一部を変更して引用) .

1. 神経線維あるいは筋線維の長軸にそって情報を速やかに長い距離にわたって伝える。
2. 効果器の反応たとえば筋肉の収縮，神経伝達物質やホルモンの分泌などの調整を行う。

興奮すなわち活動電位の発生過程は，2.1.2 で示した図 2.3 の実験装置で調べることができる。通流電極により細胞膜に外向き電流を与え，その強さを次第に強くしていくと，電気緊張電位による脱分極の値が増大していく。図 2.9 に示すように，脱分極がある臨界値を超えると，膜電位は与えた電流とは無関係に急激な変化を示す。これが活動電位である。細胞膜による活動電位の発生を興奮という。活動電位を発生させるのに必要な脱分極のレベルを臨界脱分極あるいは発火レベルという。また，臨界脱分極を起こす強さの外向き電流を閾電流という。閾電流よりもやや小さな外向き電流では，電気緊張電位の上に小さなこぶ状の電位変化が見られ，これを局所反応という。一方，内向き電流による過分極では電流の強さを強くしても活動電位は発生しない。図 2.10 に活動電位の経過と各部分の名称を示す。膜電位が発火レベルに到達すれば即座に活動電位が発生し，与えられた電流のその後の経過とは無関係に自動的に膜電位変化が進行する。これを自己再生的過程という。活動電位が発生すると膜電位は急激に減少して 0 になり，さらに +30 ~ 50mV の値に達する。つまり，膜電位の符号が逆転し，細胞内部が外部に対して正になる。この期間を，活動電位の極性逆転あるいはオーバーシュートという。活動電位の大きさは常に一定であり，外向き電流の強さを増大しても変化することはない。この活動電位の大きさが刺激強度によらず一定である性質を，全か無かの法則 (all-or-none law) という。

活動電位はオーバーシュートに達した後自動的に静止電位のレベルに戻る。この静止電位の回復を再分極という。活動電位の最初の静止電位からの立ち上がりを脱分極相といい，これに続く静止電位への回復を再分極相という。活動電位の主な部分は棘状でありスパイク電位と呼ばれる。スパイク電位の持続時間は 1 ~ 5msec であり，膜電位の極性逆転期すなわちオーバーシュートを含む再分極相の後期のゆっくりした部分を後電位という。神経線維の後電位は，いったん静止電位より過分極した後に静止電位に戻る。これを陽性後電位という。

細胞膜イオン透過性の変化から活動電位の発生過程を見ると以下のようなになる。

1. 細胞膜をよぎる外向き電流は膜電位の脱分極を引き起こす。
2. 脱分極が発火レベルに達すると，細胞膜の Na^+ 透過性の増大が起こる。
3. 細胞外液の高濃度の Na^+ が細胞膜を通過して細胞内に拡散により入る。この Na^+ 流入は細胞膜に内向き電流を引き起こし，さらに脱分極を増大させる。この過程は自己再生的に進行するので，活動電位の急激な脱分極相にあたる。

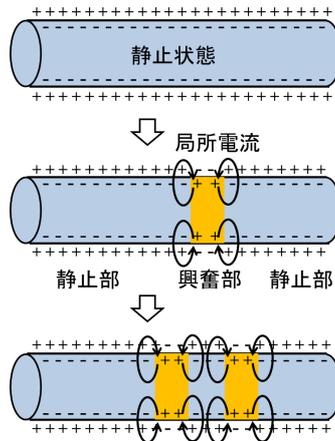


図 2.11: 神経，筋線維における興奮の伝導 ([10] より一部を変更して引用) .

4. 膜電位は細胞外液の電位と等しくなった後，さらに増大し Na^+ 平衡電位である $+58\text{mV}$ に近づく．このため活動電位のオーバーシュート，すなわち膜電位の極性逆転が起こる．
5. 膜電位がほぼ Na^+ の平衡電位に達すると， Na^+ の拡散と膜電位がつり合うため， Na^+ の細胞内への流入が止まる．
6. Na^+ 透過性の増大は一過性で再び自動的に減少に転ずる．これは，細胞膜が元来備えている性質によるもので，これを Na 不活化過程という．
7. Na^+ 透過性増大よりやや遅れて， K^+ の透過性も増加する．これにより，細胞内の K^+ は細胞膜をよぎって外に移動する．これは外向き電流を引き起こす．この過程と Na^+ 透過性減少が膜電位の急激な再分極相を引き起こす．

活動電位が発生し終わった時，脱分極相で細胞内に流入した Na^+ と再分極相で細胞外に出た K^+ の数は等しい．1回の活動電位で流入する Na^+ の量はわずかだが，細胞が繰り返し活動電位を発生すると，次第に細胞内に蓄積される．活動電位発生の原動力は，細胞内外の Na^+ 濃度差による Na^+ の流入なので， Na^+ が蓄積されると活動電位が発生しなくなる．ナトリウムポンプは細胞内の Na^+ を細胞外に排出することで活動電位発生を維持している．

先に述べたように，神経線維，筋線維などの円筒状細胞では，活動電位はその長軸にそって伝播する．静止状態の神経線維，筋線維では細胞の内側が，外側に対して負の静止電位として存在する．これは，図 2.11 に示すように細胞膜の外側に正，内側に負の荷電が向かい合っている状態に相当する．細胞膜の一部が興奮し活動電位を発生すると，この部分の膜電位は逆転し，細胞の内側が外側に対し

て正となる．これは細胞膜の内側に正，外側に負の荷電が向き合っている状態である．この結果，興奮部とその周りの静止部との間に電位差が発生し，電流が+から-に向かって流れる．この電流を局所電流といい，興奮部の膜には内向き電流，静止部の膜には外向き電流が生じる．静止部の外向き電流は膜の脱分極を引き起こし，この値が発火レベルに達すれば，この静止部位からも活動電位が発生する．このようにして興奮部に隣接した静止部の膜に次々と局所電流が起こり，興奮は線維の長軸に沿って両方向に伝播していく．活動電位は全か無かの法則に従うので，興奮は神経または筋線維長軸にそってどこまでも衰えることなく伝えられる．これを興奮の非減衰性伝導という．

2.2 神経細胞

前節で述べたように，活動電位は神経線維においても発生し，神経線維の長軸にそって信号の伝播を行う．

神経細胞は，細胞体とそれから伸びる一本の長い軸索と多数の樹状突起からなり，それらを合わせてニューロンという．ニューロンには感覚ニューロン，介在ニューロン，運動ニューロンなどがある．軸索は神経線維とも呼ばれる．神経線維は他の神経細胞，筋細胞，感覚の受容器細胞などと接続しており，情報を活動電位として速やかに伝える役割を果たしている．これを興奮の伝導という．活動電位の経過は非常に速く，神経線維に衝撃が生じていることにたとえて，伝導しつつある活動電位を神経インパルス，あるいは単にインパルスという．

神経細胞の核は細胞体にある．神経線維の直径は $0.1 \sim 20 \mu\text{m}$ で，細胞体を出る起始部や終末部以外の大部分は髄鞘で覆われており，これを有髄神経線維という．髄鞘を持たない無髄神経線維もある．

末梢の運動神経線維や感覚神経線維は有髄であり，自律神経節後線維や一部の感覚神経線維は無髄である．高等動物の中樞神経系では，大脳や小脳の神経線維は有髄であり，脳幹の神経線維の多くは無髄である．髄鞘は脂質を主成分とするので電気抵抗が高く，軸索を周囲の組織液から絶縁している．髄鞘は $1 \sim 2\text{mm}$ ごとにランビエ絞輪で中断されており，ここでのみ神経線維が細胞外液と接している．この構造によって，有髄神経での興奮伝導は絞輪と絞輪との間を飛ばして絞輪部のみを不連続的に伝導していく．このような伝導の様式を跳躍伝導という．一般に有髄神経の伝導速度は無髄神経に比べて大きい．

2.2.1 神経の興奮伝導

興奮伝導とは，活動電位が神経線維に沿って伝播することである．活動電位は，全か無かの特性を持ち，大きさは一定で，かつ不応期のために2発重なることが無い．従って神経線維一本については，その信号は0か1のデジタル信号であり，

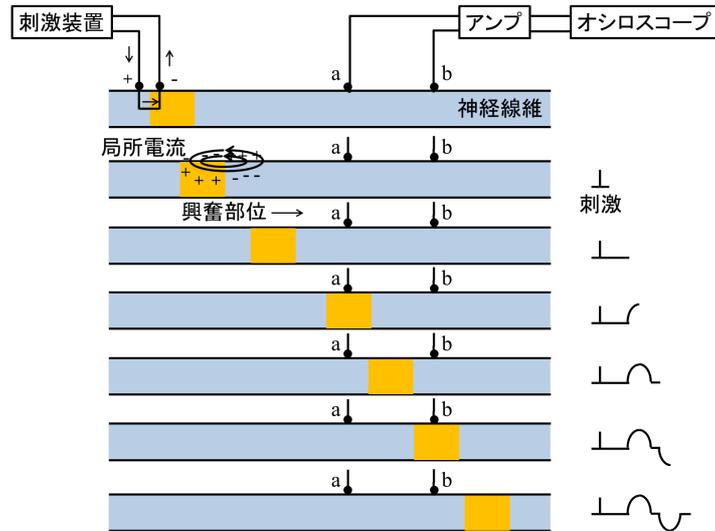


図 2.12: 活動電位の発生とその伝導 ([10] より一部を変更して引用) .

信号の強さはインパルスの発生頻度 (Hz) となって現れる．興奮の伝導については，さらに以下に示す興奮伝導の 3 原則と呼ばれる特徴がある．

1. 両方向性伝導

神経線維の 1 点を人工的に電気刺激すると，そこに生じた活動電位は両方向に伝導する．実際に生体内では伝導の方向は決まっており，一方向である．

2. 絶縁性伝導

解剖学でいう神経には多数の神経線維が含まれるが，1 本の神経線維の興奮が他の神経線維に乗り移ることは無い．

3. 不減衰伝導

興奮の大きさは伝導中に減弱せず，神経線維の末端まで伝わる．これは興奮を担うイオンチャンネルが線維の末端まで分布していることによる．

図 2.12 に示すように刺激装置，記録装置 (オシロスコープなど) とカエル等の坐骨神経を使い，神経の一端に単一の電気刺激を与え，適当な所に一对の記録電極を置くことで，活動電位の発生とその伝導を観察できる．

ここでは，一本の神経線維について考える．刺激電極の+から-に流れる電流の一部が線維の中をよぎり，-極で細胞膜を外向きに流れる所で脱分極が起こる．脱分極が，活動電位の臨界膜電位を超えた場合に活動電位が発生する．すなわち，-の刺激電極の所で活動電位が発生する．

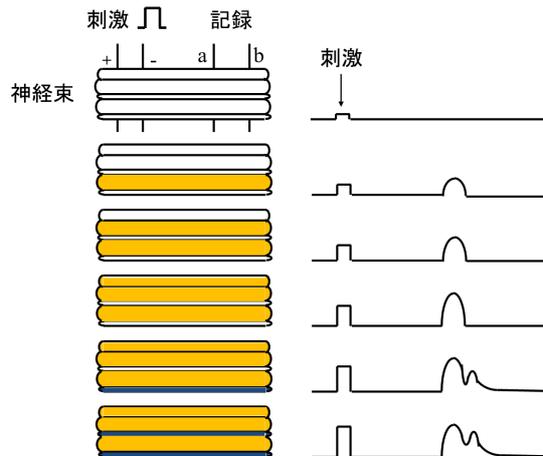


図 2.13: 神経束の興奮 ([10] より一部を変更して引用) .

-の刺激電極で発生した活動電位は2.1.3で述べたように局所電流を発生させ、隣接した静止部の領域に外向き電流を流し、脱分極とそれによる活動電位の発生を引き起こす。つまり、興奮部位が刺激電極の代わりとなって、隣接部位で活動電位を発生させる。この過程を繰り返すことで興奮の伝導が行われる。局所電流は興奮部の両側に発生するが、直前に興奮が起こった部位(図2.12の刺激電極の左側)は不応期にあるので、活動電位は発生しない。このように、興奮部位は神経線維の狭い範囲であり、この領域が次々に移動していく。

図2.12のDに示すように、興奮が記録電極aにさしかかると、興奮部位は非興奮部位(記録電極b)に対して負の電位になる。図ではこれを上向きに記録している。興奮部位が両電極間を経て電極bに達すると、状態は逆転し下向きの電位(正の電位)が記録される。実際の実験では、電極a-b間の距離は1~3cm程度しかとれず、負と正の電位変化が接近して二相性に記録される。これを二相性活動電位という。

上述した活動電位は細胞外記録であり、かつ二点間の電位差を記録したものである。2.1で述べた細胞内記録による100mV近い活動電位とは異なり、1mV程度の電位変化しか記録されない。

2.2.2 神経線維束の活動電位

解剖学的な1本の神経には、感覚神経、運動神経、自律神経が混入し、大小さまざまな直径の神経線維も含まれている。2.2.1で説明したものや本論文で述べる実験で使用したウシガエルの坐骨神経についても同様であり、1本1本の活動電位の記録では全か無かとなるが、神経線維束(神経束)では記録が異なる。

表 2.1: ウシガエルの神経線維と伝導速度 ([10] より引用)

分類	伝導速度 [m/sec]
A α	42
A β	25
A γ	17
A δ	13
B	4.2
C	0.3 ~ 0.4

図 2.13 に示すような、比較的太い神経線維グループに属する 3 本と、細いグループに属する 2 本からなる神経束を考える。閾電流は、各神経線維ごとに少しずつ異なる。弱い刺激電流ではどの神経線維も興奮しないが、刺激を強くしていくと、ある強度でまず 1 本の太い神経線維 (図 2.13 の黄色の神経線維) が興奮し、伝導してきた活動電位が記録される。さらに強度を強くしていくと、第 2, 第 3 の太い神経線維が興奮し、活動電位が大きくなっていく。このように、神経束での細胞外記録では、活動電位は興奮した神経線維の数の増加にしたがって大きくなる。

さらに刺激強度を強くすると、細い神経 (図 2.13 の青色の神経線維) が興奮する。細い神経線維は太い神経線維に比べ興奮の伝導速度が小さいので、その活動電位は、太い神経線維グループから発生した活動電位に遅れて、別の波形として記録される。刺激の強度を強くすると、第 2 の細い神経線維も興奮し、第 2 の波形も大きくなる。この波形の分離を峰分かれという。

一般に、太い神経線維ほど電流刺激に対する閾値が小さく、伝導速度が大きい。また、図 2.13 の最下段の図のように、神経束のすべての神経が興奮するために必要な刺激電流の大きさを飽和電流、あるいは極大刺激という。通常、神経束を用いた実験では、各神経の興奮の有無が実験結果に影響を与えることを避けるために、この極大刺激を与えて実験を行う。

カエルの坐骨神経を長く取り出し、その一端を比較的強い電流で刺激して、活動電位を記録すると、何種類かの伝導速度の異なる神経線維が存在することが確認できる。これらは、伝導速度によって分類されており、伝導速度の大きい神経線維は A α 線維、A β 線維などと呼ばれる。表 2.1 にカエルの坐骨神経で見られる神経線維の分類とその伝導速度について示す。

本研究では特に、A α 線維と C 線維に注目して実験を行う。この A α 線維は有髄神経であり、C 線維は無髄神経である。

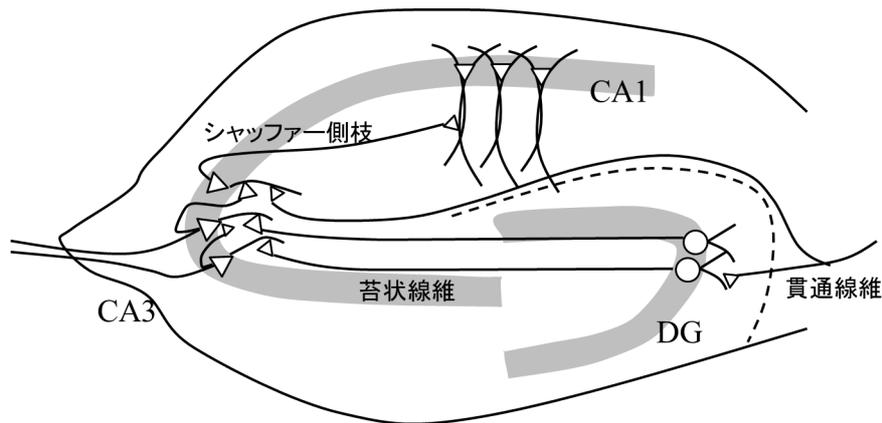


図 2.14: 海馬の構造 .

2.2.3 海馬

海馬 (Hippocampus) は、海馬体 (hippocampal formation) と呼ばれる大脳辺縁系の一部である [11] . 1950 年代に、H.M. というイニシャルの重責てんかん患者が海馬を取り除く手術を行った後、人や出来事などを記憶することができなくなった事から、記憶や学習に重要な部位であると言われるようになった .

海馬は、脳中央部から側頭部にかけて存在し、新皮質に覆われている . 図 2.14 は、海馬を長軸方向に対して垂直に切断した時の断面図である .

図のように、馬蹄形の 2 本の線がかみ合わさったような形になっている . 線に見える部分は神経細胞の細胞体が密集して存在している部分であり、それ以外の部分は主に樹状突起や軸索が張り巡らされている .

海馬は、狭義にはアンモン角 (CA: Cornu Ammonis) と歯状回 (DG: Dentate Gyrus) からなるとされるが、場合によっては海馬台 (sub: subiculum) までを含めることもある . アンモン角は主に、CA1, CA2, CA3 の 3 つの領域に分けられている . また、表層から順に (1) 白板 (2) 上昇層 (3) 錐体細胞層 (4) 放射層 (5) 網上層 (6) 分子層の 6 層構造になっている (図 2.15 左) . 歯状回は、表層から順に、(1) 分子層 (2) 顆粒細胞層 (3) 多形細胞層の 3 層からなる (図 2.15 右) .

DG の顆粒細胞は、貫通枝を通して嗅内皮質 (EC: Entorhinal Cortex) から投射を受け、苔状繊維 (Mossy fiber) と呼ばれる軸索を介して CA3 領域への錐体細胞へ投射する . CA3 領域の錐体細胞は、シャッフアー側枝 (Schaffer 側枝) と呼ばれる軸索を伸ばしていて、CA1 領域の網上層でシナプスを形成する . さらに、CA1 の錐体細胞から海馬台を通して EC 領域へと投射されていく . このように、海馬内に形成された DG-CA3-CA1 という回路網は 3 シナプス回路と呼ばれる . この回路は、薄板構造と呼ばれる構造単位を形成する要素であると考えられている .

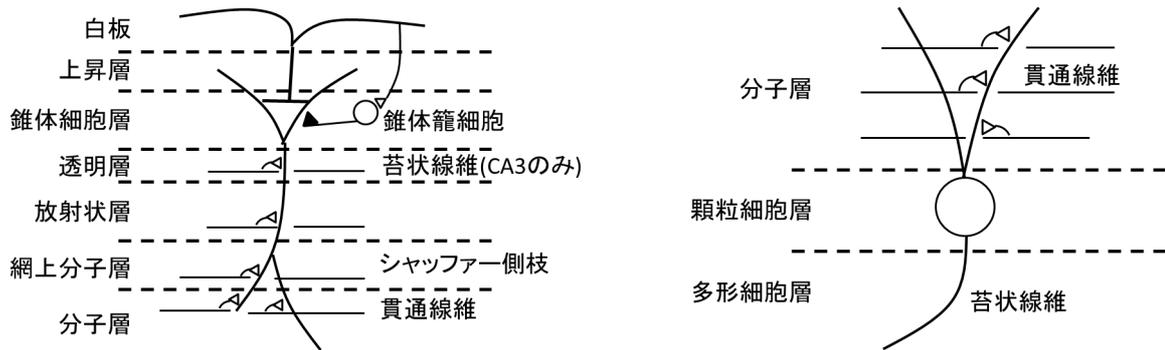


図 2.15: 錐体細胞層(左)と顆粒細胞層(右)の構造。

2.3 細胞，神経の死・変性

細胞の死には，プログラムされた死と呼ばれるアポトーシスと，損傷などの外的要因によるネクローシス(壊死)の2種類がある[12]．アポトーシスは，オタマジャクシがカエルに変態する際に尻尾が消える，といったものに代表される．アポトーシスには，細胞を生存，あるいは死亡させる何らかの因子が関わっている．神経細胞も，生成された細胞の半数以上が生まれてすぐに死んでいる．神経細胞のアポトーシスは，細胞を生存させるための栄養素，軸索や神経細胞間の接続にも依存する．アポトーシスによって死亡する細胞は，細胞の凝縮，細胞骨格や核の崩壊，DNAの分解といった変化を遂げ，周囲の細胞に害を与えることなく消滅する．また，外的な刺激によってアポトーシスが誘発されることもあり，がん細胞を2時間の間43℃に熱すると，12時間後にはがん細胞の50%がアポトーシスによって消失する，という報告もある[13]．

一方，ネクローシスは熱や衝撃などの外的損傷による細胞の死である[14]．ネクローシスによる細胞の死は，細胞の膨張や破裂などが起こり，周囲の細胞に害を与える炎症反応を引き起こす可能性がある．本研究では，半導体パルスレーザーを神経に照射するので，照射部位の温度の上昇が考えられる．細胞の温度変化や熱に対する応答については，熱ショックタンパク質の活動による細胞の保護機構などが知られている．一方，神経細胞の高温に対する耐性等についての研究報告は少ない．しかしながら，細胞の主な構成要素であるタンパク質や脂質は熱によって変性が起こり，本来の機能を失うのでレーザー照射で発生する熱によって神経細胞が損傷されネクローシス起きることは十分に考えられる．

2.4 てんかん

2.4.1 てんかんとは

てんかんは、WHOが1973年に編纂したてんかん辞典において「てんかんとは、種々の成因によってもたらされる慢性的脳疾患であって、大脳ニューロンの過剰な発射に由来する反復性の発作(てんかん発作)を特徴とし、それに様々な臨床症状および検査所見がともなう」と定義されている[1]。かつては子供の病気と考えられてきたが、老若男女誰にでも発病の可能性がある。

てんかんの発生原理はシナプスの異常な発火であるが、その原因としては、(1)シナプスの伝達効率の異常、(2)興奮性アミノ酸の放出亢進、(3)抑制性アミノ酸GABAの放出減少および神経の膜の異常などが挙げられる。これらの原因を元にして、てんかんの発生モデルが作られており、てんかんの発生原理のさらなる解明が行われている。てんかん発作が起こる原因は、(1)出産時や乳幼児期等における脳の損傷、(2)大脳皮質の形成異常、(3)刺激性腫瘍の3つに大きく分類することができる。検査等で原因が特定されたてんかんを症候性てんかん、原因不明のものを特発性てんかんと呼ぶ。また、てんかん発作の発生源(異常発火の起点)をてんかん原性域という。てんかん発作を誘発する要因としては、睡眠不足、過呼吸、過度の疲労、精神的不安、月経や発熱などが挙げられる。また、特定の刺激(光刺激、読書や数学など様々)によって誘発される反射てんかんと呼ばれる症状も存在する。てんかん発作中の脳波は正常時と比較して特に異常であるが、発作が起きていない時(発作間欠期)の脳波においても異常波が観測されることがある。この間欠期脳波は、てんかんの診断、発生予測に役立つ重要な情報になると考えられている。てんかん発作中に見られる異常脳波は棘波や鋭波と呼ばれる脳波であり、突発的で持続時間の短い先鋭な波形を示す。それぞれの持続時間は、棘波が1/50~1/14秒、鋭波が1/14~1/5秒程度である[15]。

てんかんの症状は、異常脳波が起こった脳部位や拡がり方によって分類がなされる。大きな分類として、脳全体から発作が起こる全般発作と脳の一部から発作が始まる部分発作に分けられる。全般発作では、短時間の意識消失が起こる欠神発作、意識消失とともに全身の硬直とけいれんが起きる強直間代発作などがある。部分発作では、意識消失を伴わず身体部位のけいれんや異常感覚を伴う単純部分発作、意識消失を伴う複雑部分発作、部分発作から全般発作に移行する二次性全般発作などがある。てんかんの症状や型は、てんかん原性域となる脳部位と対応していることも多く、治療の方策を立てる上で大変重要である。

てんかん患者は、健全な社会生活を送る上で、様々な大きな問題にさらされている。てんかんの発作は発症のコントロールが難しく、発作発生の予測も困難なため、てんかんに理解のある職場や自宅で可能な仕事に限られるなど、職業選択の幅が狭められてしまう。また、近年では就労の条件として運転免許所持を求められることが多く、免許の取得に制限のあるてんかん患者の就労障害となってい

る。運転免許については、2002年の道路交通法の改正により絶対的欠格事由から相対的欠格事由に変更され、一定の基準による運転免許の取得が可能となったが、全てのてんかん患者が免許を取得できるわけではない[2]。加えて、てんかん患者による事故等が発生した場合は、ニュースや新聞等でてんかんの事が大きく取り上げられ、社会的な偏見にさらされるといった事態も起きている。てんかんの治療には薬物(抗てんかん薬)が用いられることが多いが、これらの薬には催奇性や母乳を介した乳児への影響を及ぼすものがあり、妊娠・出産や育児の際に特別な配慮が必要とされてしまう。てんかんへの理解が進むにつれて、差別、偏見や社会生活の困難さは小さくなっているが、てんかんの根治治療の必要性は大きい。WHOによると、世界におけるてんかんの有病率は平均0.82%とされているが、発展途上国には1%を超える地域もあるなど地域差がみられる。日本における有病率は、人口の0.5~1%とされており、総患者数は60~120万人になる。しかしながら、上述の通りてんかんは日常生活における困難を伴うため、その影響は患者のみならず患者の家族にも大きな負担を強いている。この点からもてんかんの根治治療が求められている。

てんかんの治療では、抗てんかん薬と呼ばれる薬を用いた薬物治療と、てんかん原性域やその周辺領域に外科手術を施す外科治療の2つが行われている。てんかん患者は、まず薬物治療によるてんかん発作の抑制治療が選択されるが、抗てんかん薬による効果が得られない場合(このようなてんかんを難治性てんかんと呼ぶ)、外科手術が検討される。

2.4.2 てんかんの薬物治療

てんかんの薬物治療においては、抗てんかん薬(AED:Antiepileptic Drug)と呼ばれる薬を飲むことで、てんかんの発作抑制を行う治療が行われる[16]。抗てんかん薬は、主に以下に示すどちらかの作用を利用して、てんかん発作の抑制を行う。

- 興奮刺激系のイオンチャネル(グルタミン受容体)の抑制
- 抑制系のイオンチャネル(GABA(a)受容体)の賦活

抗てんかん薬の種類は数多く、てんかんの発作型によって使い分けられる。通常、抑制系のGABA(a)受容体の働きを活性化させる抗てんかん薬は部分発作に、興奮刺激系のグルタミン受容体の働きを抑制する抗てんかん薬は全般発作に有効であるとされる。現在の所、てんかん患者に最初に処方される抗てんかん薬として、部分発作の場合はカルバマゼピン、全般発作の場合にはバルプロ酸という薬が推奨されている。

薬物治療では、血中の抗てんかん薬濃度(薬物毎に目安となる治療有効血液濃度域が存在する)、副作用や個人差に注意を払わなければならない。薬物治療は単剤の処方から始められ、薬の量を漸増させて効果と副作用の発生状態を確認してい

く、薬の種類によって異なるが、抗てんかん薬の副作用としては、眠気やふらつき、嘔吐、催奇性、歯肉肥厚などが挙げられる。加えて、てんかんの発作型と薬の組み合わせによる影響などもあるため、抗てんかん薬の選択には慎重な判断が必要とされる。効果がみられない場合は、抗てんかん薬の種類の変更が行われ、それでも無理な場合は多剤併用治療が行われる。多剤併用治療でも効果が得られない場合は、難治性てんかんの分類となり外科治療についての検討が行われる。難治性てんかんの患者数は全ててんかん患者の20%程度と言われている。

薬物治療は、てんかんの根治を目的としたものではなく、てんかん発作を起こさないための対処療法である。そのため、薬物治療が終了するのは、時間の経過により自然にてんかん原性域が消失した場合のみである。治療の終了は、発病年齢、発作型、発作の抑制期間、脳波の所見などの要素から慎重に検討・判断がなされる。

2.4.3 てんかんの外科治療

外科治療は、前節で述べた薬物治療では発作の抑制が困難な、難治性てんかんの患者に対して適用される [17]。てんかんの外科治療はいくつかの段階を経る必要があり、(1) 術前検査によるてんかん原性域の推定と原性域周辺の脳機能調査、(2) てんかんの型、原性域および脳機能マップを元に手術法と手術部位の決定、(3) 実際の手術、といった流れで実施される。てんかんの外科手術法はその目的によって、原性域を取り除く手法と、てんかん波の伝播阻害や抑制を行う手法の2種類に大まかに分類することができる。以下では、術前検査、定位脳手術と代表的なてんかん外科手術法について述べていく。

- 術前検査 ([18])

てんかん原性域推定の術前検査としては、まず侵襲性の低い検査である頭皮脳波、脳磁図 (MEG: Magnetoencephalography)、単一光子放射断層撮影 (SPECT: Single photon emission computed tomography)、ポジトロン断層法 (PET: Positron emission tomography)、核磁気共鳴画像法 (MRI: Magnetic resonance imaging) やコンピュータ断層撮影 (CT: Computed tomography) などの方法を用いて、脳活動の計測や画像診断から腫瘍や形成異常などのてんかん原性域と考えられる部位の推定を行う。上記の検査で原性域のおおよその位置を推定後に、頭蓋内脳波や深部脳波の計測を行う。これらの検査は開頭手術が必要であり侵襲性が高いが、より高精度な原性域推定のために必要とされる。原性域の決定のためには脳波と臨床発作の情報が必要となるため、慢性電極 (頭蓋内に電極を留置する) による脳波記録と、ビデオ撮影による発作の観察の同時記録が行われる [19]。脳機能検査は、推定したてんかん原性域が切除可能か否かを判断するために行われるものであり、脳機能マッピングや和田テストな

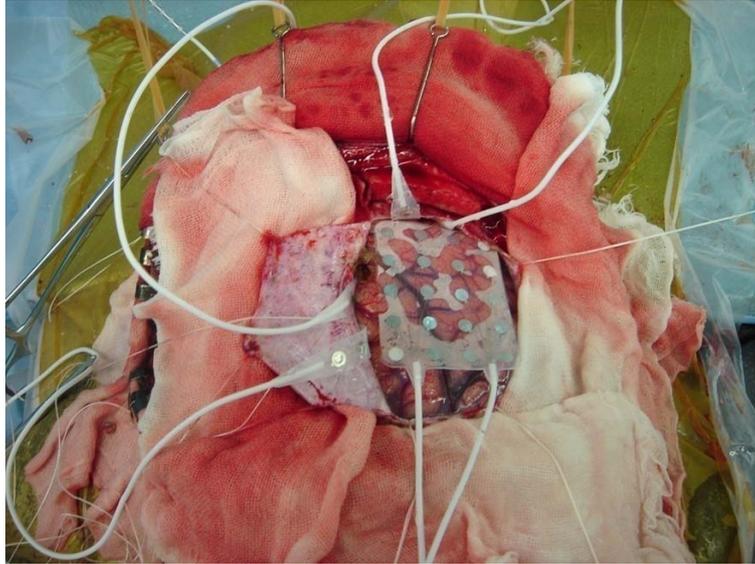


図 2.16: 開頭手術中の写真．中央のシート状の物がかかっている部分が開頭され露出している脳である．この手術は術前検査用の電極 (シート電極) を脳表に載せる手術である．手術内容によるが，この写真のように頭蓋骨を大きく取り除く場合もあり，患者へ与える負担はより大きくなる．

どが代表的な方法である．これらの検査によって脳の各部位の機能や言語優位半球を調べ，原性域の切除による後遺障害の検討がなされる．

- 定位脳手術

定位脳手術は脳の特定部位に電極やプローブ等を正確に (誤差 1mm 以内) 到達させるための手法であり，てんかんの他にパーキンソン病や脳腫瘍の手術等でも用いられる [20, 21]．手術の目的は，(1) 手術用プローブを挿入し，腫瘍などの疾患部位を破壊する，(2) 電極を留置して脳深部の脳波を計測する，(3) 脳深部刺激療法 (DBS: Deep brain stimulation) のための刺激電極を留置する，の 3 種類に大きく分けられる．定位脳手術では，定位脳手術装置と呼ばれる装置を患者の頭部に装着する．この装置を取り付けた状態で MRI や CT を撮影し，その画像から手術装置を基準とした脳の 3 次元座標を設定する．これによって，その後の手術における目標部位の位置を精確に決定することが可能となる．

- てんかん外科手術

- 原性域を取り除くことを目的とする手術

原性域の除去を行う手術としては、皮質焦点切除術、側頭葉切除術やガンマナイフなどの手法が挙げられる。それぞれ、皮質焦点切除術、側頭葉切除術はてんかん原性域の存在する部位による区別であり(海馬や扁桃体などに存在する場合を特に内側側頭葉てんかんという)、ガンマナイフは放射線の照射によって原性域の破壊を行う手法である [20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30] .

– てんかん波の伝播阻害や抑制を目的とする手術

てんかん波の伝播阻害のための手術は、脳の一部を切断する手法と、脳に様々な刺激を与える手法の2種類に分けられる。前者の例としては、軟膜下皮質多切術 (MST:Multiple subpial transaction)、脳梁離断術、半球離断術などが、後者には脳深部刺激療法や局所冷却法などが挙げられる [31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46]

てんかん外科治療における最大の問題点は、ほぼすべての手術法において侵襲性の高い開頭手術が必要とされることである(図 2.16)。上記手術法の中では、ガンマナイフ法は開頭を必要としないが、放射線を用いる治療法なので放射線障害など別の重要な問題が生じる。また、原性域推定のためには、頭蓋内脳波や深部脳波のデータが必要になるので、術前検査においても開頭手術は実施される。複数回の手術とそれによる長期間の入院など患者への大きな負担が懸念される。本論文で検討するレーザー照射による外科手術法は、原性域除去手術における大がかりな開頭を必要としないので、現在の主流な外科手術法と比較してより安全、かつ患者の負担軽減も可能になると考えられる。

第3章 レーザーとその医療応用

3.1 レーザーとは

レーザーは近代の科学により新しく誕生した光源の一つである。レーザー (laser) は light amplification by stimulated emission of radiation(光の誘導放出による増幅)の頭文字を綴ったものである。光の波長や位相の整い具合をコヒーレンスと呼び、レーザーとは光を増幅し、コヒーレントな光を発生させる装置(レーザー装置)、またはその光(レーザー光)をさす [47, 48, 49]。

原子・分子の誘導放出を用いる方法を光波の領域で実現したのがレーザーである。初めてのレーザー発振は1960年のルビーを増幅媒質に用いたパルスレーザーであった。

電気回路の発振において、発振の基本は増幅と正帰還である。図3.1に発振回路の構成を示す。

発振回路では増幅器の出力を帰還回路により入力に戻す。帰還させた出力信号の位相が入力の位相と一致する場合は、入力信号が増えて増幅器に入力されるので、出力はさらに大きくなる。このような帰還と増幅の繰り返しにより、発振状態となる。発振器の出力は増幅器への信号入力が大きくなると、増幅率が低下する作用により、一定値に制限される。このとき、増幅器の増幅率は帰還回路などで生じる損失とつり合っている。増幅器の増幅帯域で、最も大きな帰還増幅率をもつ周波数の信号が効率よく増幅されるので、この周波数で発振が生じる。発振

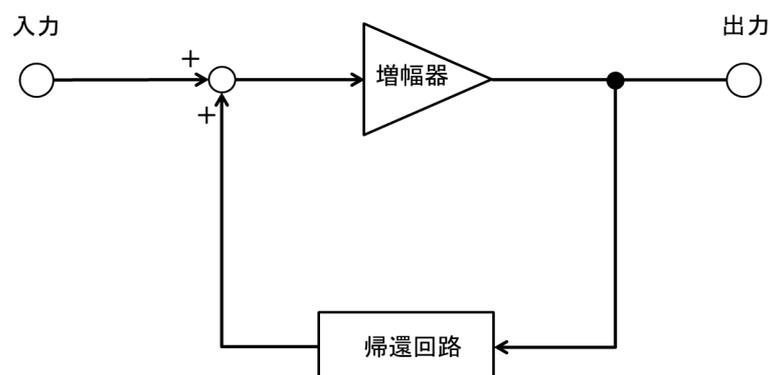


図 3.1: 発振回路の構成 ([48] より一部を変更して引用)。

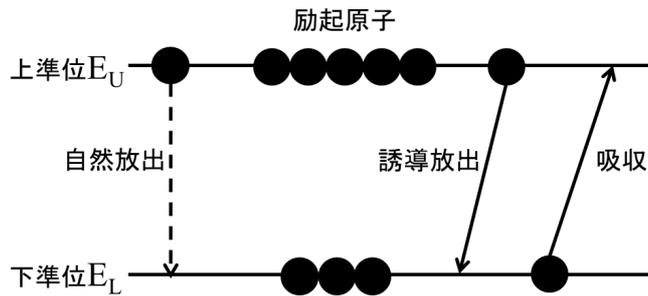


図 3.2: 原子準位間の遷移 ([48] より一部を変更して引用) .

器では入力に信号源をつながなくとも発振は生じる．増幅器の入力には，いろいろな周波数を含むわずかなノイズが常に加わっている．わずかなノイズが増幅されて，特定の周波数における発振に至る．

レーザー発振も，上記の電気回路の発振の例と同じ原理により動作する．光の周波数は 10THz と電気回路の周波数に比べきわめて高いので，増幅器に相当する部分には原子・分子の誘導放出現象を利用する．また，帰還回路に相当する部分は光反射鏡で構成された共振器である．ノイズ光(自然放出光)が増幅されて，共振器により帰還される．光が増幅されると次第に増幅率が飽和して，帰還回路の損失とつり合って，出力光の強度が一定となる．以下では小型のレーザーとしてよく用いられている He-Ne レーザー(発振波長 632.8nm)，あるいは同様の気体レーザーについて，レーザーの発振の原理を説明する．

3.1.1 誘導放出

光の増幅には原子や分子の誘導放出が用いられる．図 3.2 に原子の準位の中で光学遷移が可能な上準位と下準位を示す．原子の周りの電子は離散的なエネルギー準位を占めるが，外部からエネルギーを受け取ると高い準位に上がる．多数の原子が空間に閉じ込められているとき，エネルギーが与えられると，一部の原子の電子はエネルギーを受け取って，励起原子の数が増える．

熱的に励起された原子の集団は熱平衡になるので，一般的には上の準位ほど励起された原子の数は少なくなる．エネルギー E に対して，準位の密度 N は指数関数的に減少する．励起原子を発生させる方法はいくつかあるが，気体の場合は放電がよく用いられる．気体放電は熱平衡状態ではないが，励起準位原子密度は一般には準位エネルギーの増加とともに減少する．しかし，特別な準位において，選択的に励起される過程がある場合や，準位の寿命が長く励起原子が滞在しやすい状況が生じた場合は，上の準位の密度が下の準位の密度より多くなる場合がある．

このような準位間では密度の大小が逆転しており，準位密度は「反転分布」状態であると呼ばれる．反転分布は光の増幅に欠かせない条件であるので，反転分布が生じるように準位を選択し，選択的に励起できる過程を工夫する．

光が増幅されるためには，光と原子系の相互作用が必要である．原子の光の放出，吸収は量子力学に基づいている．2つの準位間で電子の遷移が生じることにより，光の放出と吸収が生じる．準位間のエネルギーと光子エネルギーは一致し，その関係は次式により与えられる．

$$E_U - E_L = h\nu \quad (3.1)$$

E_U, E_L, h, ν はそれぞれ上下準位のエネルギー，プランク定数，光子の周波数を表す．原子と相互作用できる光子は式(3.1)の関係を満たす周波数のものだけであるが，相互作用には自然放出，吸収，誘導放出の3つの過程がある．

励起原子はしばらくすると光子を放出して下位の準位に移る．このような励起準位の寿命による光の放出過程を自然放出と呼ぶ．

第2の過程は吸収で，式(3.1)を満たす周波数の光の中に下の準位にある原子が置かれると，原子の軌道を回る電子は光電場により励起されて，光エネルギーを吸収して上の準位に移る．原子が光子を吸収する確率は，光子の作る電場の密度に比例する．

第3の過程は誘導放出である．上の準位にある原子に式(3.1)を満たす光が入射すると，軌道電子が励起されて下の準位に遷移する．このとき，式(3.1)で表される光子を放出(誘導放出)するので，励起した光子と放出された光子で光子は2個となる．誘導放出される光子の光波としての位相は，入射した光子と一致し，また方向も入射光子と同じなので，入射光子が2倍に増幅される．

以上の3過程の発生割合は，自然放出，吸収，誘導放出に対してそれぞれ式(3.2)，(3.3)，(3.4)で与えられる．

$$A_U N_U \quad (3.2)$$

$$B_{LU} N_L \rho \quad (3.3)$$

$$B_{UL} N_U \rho \quad (3.4)$$

ここで， $A_U, B_{LU}, B_{UL}, N_U, N_L, \rho$ はそれぞれ，上準位のA係数，下から上への遷移に対するB係数，上から下への遷移に対するB係数，上の準位密度，下の準位密度，外部からの光のエネルギー密度である．アインシュタインがこれらの定数を導入し，これらの定数の間には熱平衡時の条件から以下の関係があることを示した．

$$A_U = \frac{8\pi h\nu^3}{c^3} B_{UL} \quad (3.5)$$

$$g_U B_U = g_L B_L \quad (3.6)$$

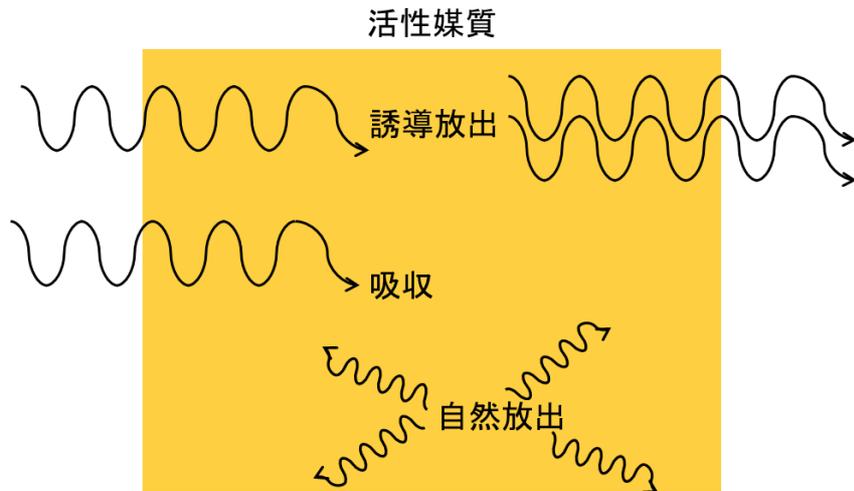


図 3.3: 活性媒質中での光過程 ([48] より一部を変更して引用) .

ここで, g_U, g_L はそれぞれの準位の統計的重率と呼ばれ, 準位のスピンの縮退度を示し, 準位特有の整数である .

グロー放電で励起された気体はプラズマとなるが, レーザーに用いられるプラズマは弱電離状態で, イオンや電子, 励起された原子やイオンの密度は励起されていない原子 (基底準位にある原子) の密度に比較して小さい . 誘導放出が生じるような媒質は活性媒質と呼ばれるが, $N_U > N_L$ のときプラズマは活性媒質の一つである (図 3.3) .

光の増幅は誘導放出により行われるが, 同時に吸収も発生する . 自然放出は等方的に生じるので, 光の増幅には寄与せず, むしろ位相がそろわないのでノイズとなり, 発振における初期の信号となる . 活性媒質への単位面積当たりの入射光を I とし, 活性媒質を長さ Δx 通過するとき, 増加した光強度を $I + \Delta I$ とすると

$$\frac{\Delta I}{I} = (N_U - \frac{g_U}{g_L} N_L) B_U \frac{h\nu}{c} f(\nu) \Delta x = G(\nu) \Delta x \quad (3.7)$$

により与えられる . ここで c は光の速度であり, $\rho c = I$ である . $f(\nu)$ はスペクトル線の形状関数であり, スペクトル線の広がりを与える .

$\frac{\Delta I}{I} = G(\nu) \Delta x$ と置くと, $G(\nu)$ は利得定数と呼ばれる . 式 (3.7) を x に関して積分すると, 長い距離光が進むときの利得が得られる . このとき利得は $\exp(gx)$ により与えられ, 光強度は距離とともに指数関数的に増幅される .

3.1.2 共振器

図 3.1 に示したように, 増幅器のほかに帰還回路が必要である . レーザーでは周波数が高いので帰還のために反射鏡を用いる . 反射鏡を向かい合わせて繰り返し

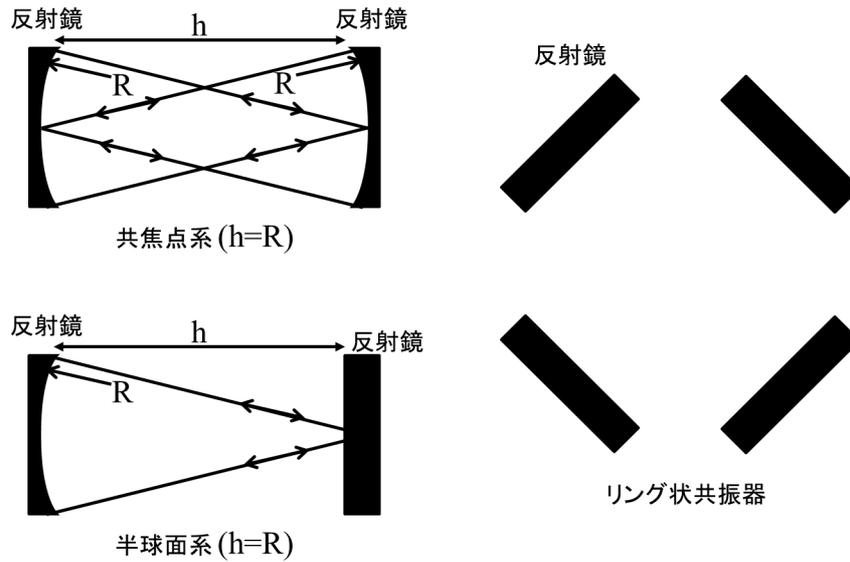


図 3.4: 共振器の構成 ([48] より一部を変更して引用) .

往復できるようにした光学系は，共振器と呼ばれる．図 3.4 に共振器の構成を示す．

活性媒質中で増幅された光を反射鏡により帰還させ，繰り返し増幅する．レーザーが発振しやすいためには，光学系における損失が小さいことが必要である．

可視光気体レーザーでは増幅率が低いので，高い反射率 (90 % 以上) の誘電体多層膜鏡を対向して用いる．また，向かい合わせた平面鏡では，反射光が回折により広がるために回折損失が生じる．損失を減らすように凹面鏡を組み合わせた光学系として，鏡の曲率半径 (R) が鏡間距離 (h) に等しい共焦点系，平面鏡と局面鏡を曲率半径と鏡面距離が等しくなるよう組み合わせた半球面系などが用いられる．繰り返し反射により，光が共振器から漏れないほど損失が少ないので，レーザー発振を得やすい．

2 枚の反射鏡を用いた共振器の構造は，多光束干渉が生じるファブリー・ペロー干渉計と同じ構造となる．反射鏡の間に活性媒質が入るので，反射鏡の間隔は 1m 程度の距離となる場合もある．繰り返し多重反射により重なった電磁界が干渉により，打ち消しあわないためには，

$$\frac{1}{\lambda} = \frac{\nu}{c} = \frac{N}{2h} \quad (3.8)$$

を満たす必要がある．鏡の間隔 h は波長に比べてきわめて大きいので，整数 N は大きな数字となる．反射鏡の間隔により限られた波長が選択されるが，共振器の中に存在できる電磁波は式 (3.8) で選ばれ，モードと呼ばれる (図 3.5) . 特に式 (3.8) は光軸方向に電磁界が存在できる条件であるので，縦モードと呼ばれる．反射鏡に凹面鏡を用いると，縦モードを決める式は平面の場合の式 (3.8) より複雑になり

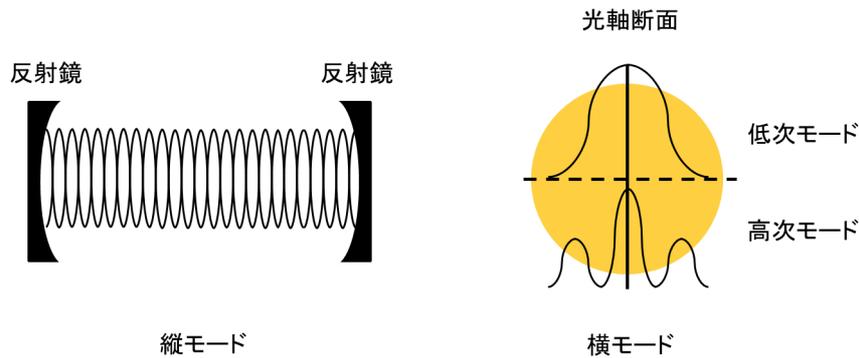


図 3.5: 共振器のモード ([48] より一部を変更して引用) .

補正が加わるが，同様の関係式が得られる．

一方，共振器の中の電磁界は反射鏡や活性媒質の大きさが限られているので，半径方向の限られた領域にのみ存在できる．すなわち，半径方向にも境界条件がある．このため，図 3.5 に示したように光軸に垂直な断面の電磁界も境界条件を満たした特定の分布だけが存在できる．このような電磁界の存在条件は横モードと呼ばれ，断面の電磁界分布を決める．共振器内部の電磁界分布は一つの縦モードと横モードにより与えられるので，共振周波数の精密な値は両方のモード数により決定される．

3.1.3 レーザー発振

共振器の中にレーザー活性媒質を置くと，発光した光が誘導放出により増幅される．増幅が損失を上回ると発振に至る．図 3.6 に示すように，活性媒質を共振器の中に入れた光学系において，活性媒質の増幅定数を G とし，一つの反射鏡による反射による損失を L ，活性媒質の距離を h とすると，発振に至る条件は，

$$(1 - L)^2 \exp(2Gh) \geq 1 \quad (3.9)$$

により与えられる．損失 L は反射鏡の回折や反射率，光学系の散乱などによる．増幅定数 G は活性媒質の励起により増えるので，増幅が損失を上回った時点でレーザー発振が生じる．さらに媒質の励起が高まると，光量が増加するが，誘導放出も増えるので，増幅定数は低下し，損失とつりあった式(式 (3.9) の等式条件) が成り立つ [48] .

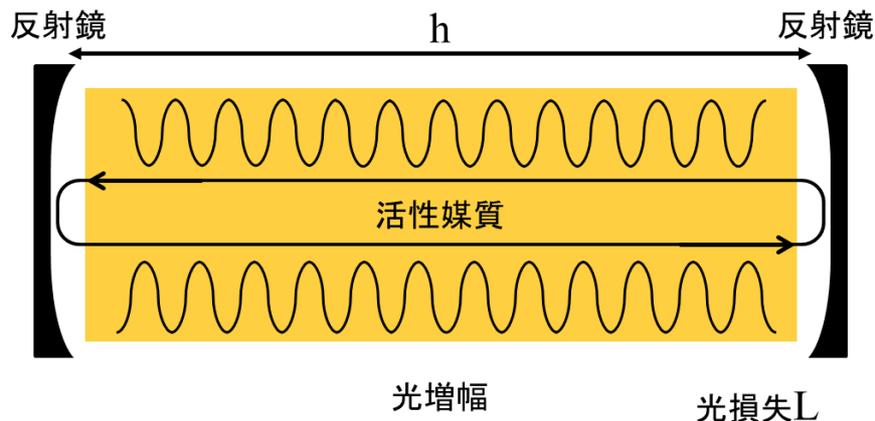


図 3.6: レーザーの構造 ([48] より一部を変更して引用) .

3.1.4 レーザー照射による効果

現在，レーザーは様々な機器に用いられているが，それは以下のようなレーザーの特徴を利用している [49] .

1. 小さなスポットに正確に集光可能，よく制御された光が作成可能
2. 集光されたレーザービームは極めて高い光密度，高エネルギーを持つ
3. レーザー光はコヒーレントである
4. レーザーは直線状に進む

しかしながら，低出力のレーザーであっても害を与える可能性があるという欠点も存在する．特に目は，レーザーポインターのような一般に低出力とされるレーザーの照射であっても失明を起こす危険性がある．また，レーザーの低出力，高出力の分類に関しては，明確な基準が無く，照射対象に大きな変化，損傷を与えるか否かで決定される．

レーザーの応用は，レーザーの持つ出力の高低によって大きく2種類に分けることが出来る．低出力レーザーは，バーコードリーダー，光ディスク読み取り，光通信やレーザー距離センサーなどに代表されるような，レーザー光の直進性や反射の特長を利用し，物体の走査や計測，通信等に利用されている．

一方，高出力レーザーは，外科治療，材料加工などといった，切断，穿孔等に用いられる．これは，レーザー光の集光性の高さと，それによるエネルギーの収束という特長を利用しているが，物体を切断するには物体にレーザー光のエネルギーを吸収させ，照射部位を高温にする必要がある．物体によってレーザー光の吸収率は異なるが，この吸収率は光の波長に依存している．例として，鉄は波長

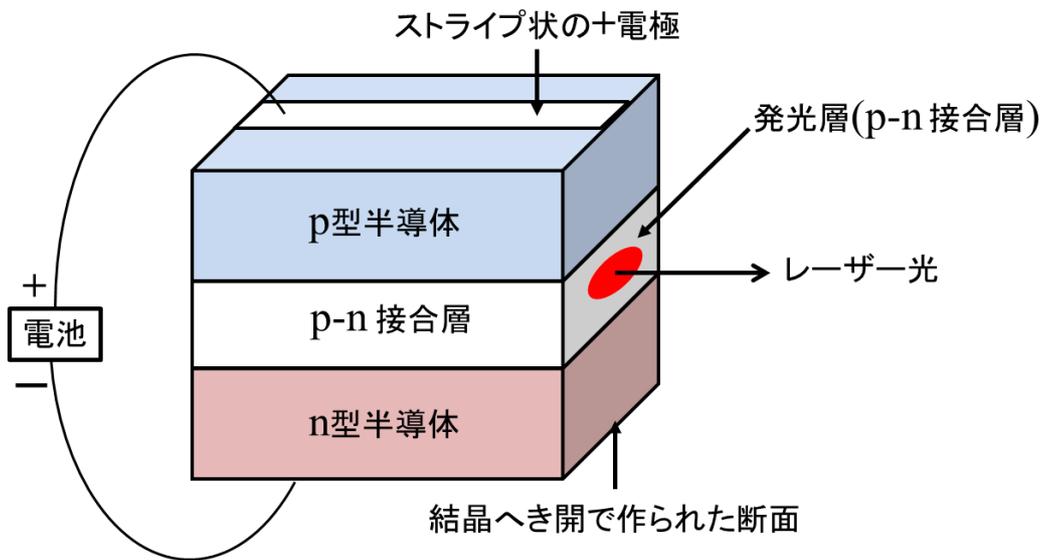


図 3.7: ダイオード型サンドイッチ構造 ([47] より一部を変更して引用) .

が 500 ~ 700nm のアルゴンレーザーやルビーレーザーなどの照射ではエネルギーの 70% 程度を吸収するが、波長 1060nm(近赤外) の YAG レーザーの場合はエネルギーのほぼ全てを反射してしまい、吸収が起こらない。すなわち、鉄はルビーレーザー照射によって切断加工が可能だが、YAG レーザーを用いた場合は反射が起こるのみで加工はできない。生体組織の吸収率に関しては、その組成によって異なるが、一般にヒトの皮膚はどの波長帯のレーザー光であっても 30 ~ 50% 程度を吸収するとされ、特に、炭酸ガスレーザーなどの波長 10600nm の赤外光はほぼ 100% エネルギーを吸収する。レーザーメスには炭酸ガスレーザーを利用したものが用いられる。

3.2 半導体パルスレーザー

レーザーは活性媒質によって固体レーザー、気体レーザー、色素レーザー、半導体レーザーなどに分けられる。本研究で使用するレーザーは半導体レーザーである。半導体レーザーは、図 3.7 に示すように p 型と n 型半導体を中央部で接合させたダイオード型サンドイッチ構造を持ち、この p-n 接合層からレーザー光線が発振される。p-n 接合部分を活性層と呼び、活性層を挟む両側の層をクラッド層という。

レーザー光は、p 側のストライプ電極に沿って活性層中に出来るストライプ状の反転分布領域に導かれながら、半導体結晶中を進行・増幅し、結晶境界の端面に

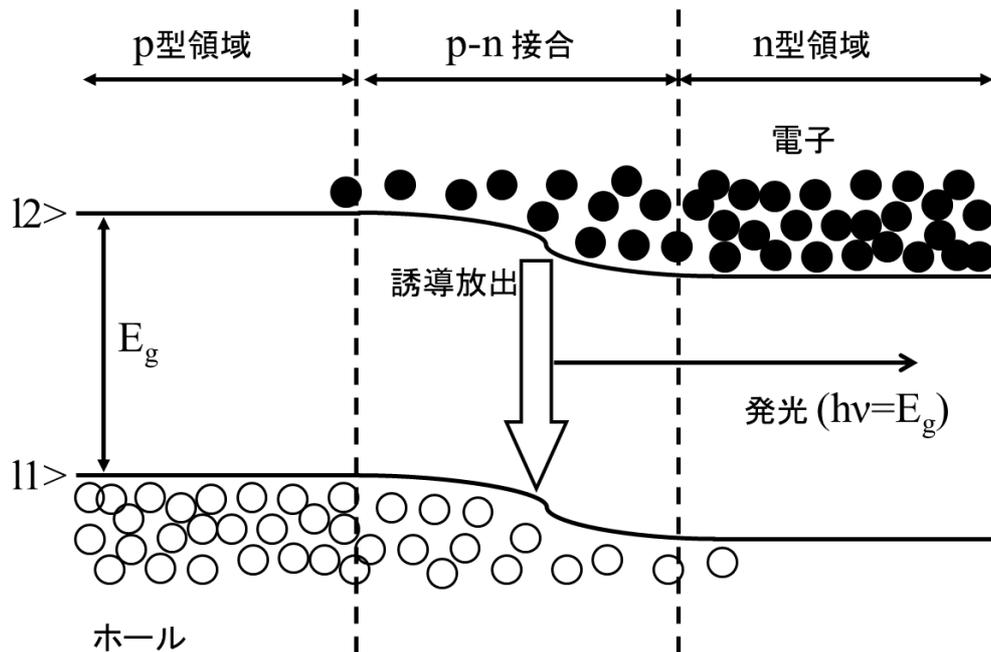


図 3.8: エネルギー・バンド図 ([47] より一部を変更して引用) .

出来ている平行な鏡面で反射を繰り返し発振生成される．そして，レーザー光線はこの両端面から前方と後方の2方向へと空気中に出射される．

図 3.8 に半導体 p-n 接合のエネルギー・バンド図を示す．n 型領域の 2 階には電子が，p 型領域の 1 階にはホールが数多く存在する．ここで，順方向のバイアスを加えると，エネルギー・バンドは平になっていき，n 側からは多量の電子が p 側へ，p 型からは多量のホールが n 型へ注入され，p-n 接合領域に多量の電子とホールが集まる．この領域では，2 階の電子数が非常に多く，1 階ではホールが多い．つまり，電子が少ない状況が実現され，反転分布条件が満たされる．これにより，この p-n 接合のある活性層域で一気に誘導放出を起こし光の増幅作用を始める．

半導体レーザーの特長として，結晶の持つ「へき開」作用による共振器の形成が挙げられる．へき開とは，結晶の一部に傷をつけ結晶面にそって割ることのできる性質で，このへき開面は常に結晶面にそって平行にできる．このへき開面を鏡として用いると自然に共振器が形成される．他のレーザーのように，外部に鏡を設置し，その平行位置調整や光学軸合わせを行う必要がなく，信頼性が高くメンテナンスが不要である．

本実験では，半導体レーザーに対して，パルス電流源を接続してバイアスを加えているのでパルス状のレーザーが出力される(半導体パルスレーザー)．

3.3 細胞，神経に対するレーザー照射の効果

細胞および神経に対するレーザー照射に関しては，動物実験による神経生理学，レーザー光学および医学などの幅広い分野で研究が行われており，レーザー光の吸収による熱の効果と光学的エネルギーそのものが与える効果があるといわれている [50]．しかしながら，レーザー照射に関する研究は，波長・出力・照射方法や照射時間など依存すると思われるパラメータが多いこと，研究されている分野が幅広いために知識・知見の分散や共有が進んでいないことなどの要因のため，未解明な部分が多いことでも知られている．上述した，レーザー照射による細胞への効果についても，その機序や原因が完全に解明されているわけではない．

医療分野に関するレーザー照射の利用は，出力の高低でおおよそ分類することができる．まず，高出力レーザーはレーザーメス，穿孔用ドリル，静脈瘤やヘルニアの治療など外科手術に向けての利用が中心であり，レーザー照射による熱的作用を利用している [3, 51]．

一方，低出力レーザーは近年になって注目されてきた分野である．低出力レーザーを細胞や神経線維に照射した場合，細胞内小器官やイオンチャンネルに影響を与えていると言われているが，その因果関係に関しては未解明であり，今後の研究成果が期待されている．神経線維に対する照射の事例では，ラットの伏在神経やカエルの坐骨神経にレーザーを照射した報告がある．伏在神経とは，主に皮膚に分布する神経であり，体性感覚刺激(熱，触覚など)を伝播する．伏在神経に対して，半導体レーザーを照射した場合，痛みに関する刺激のみ伝播が阻害されたとする報告がある [5]．カエル坐骨神経は本研究でも利用している神経だが，既存の研究では半導体レーザーではなく，アルゴンレーザーを照射した実験が報告されている [4]．この報告では，レーザーを最大 30 分間照射しているが，信号伝播機能は一時的に阻害されるのみで，時間経過によって回復が見られている．また，神経毒であるテトロドトキシンとの対照実験も行っており，アルゴンレーザー照射の効果がテトロドトキシン塗布の効果と類似していることから，レーザー照射はイオンチャンネル阻害剤と同等の効果があるとしている．信号伝播機能の一時的な阻害，可逆的な変化に関する研究は見られるが，不可逆な変化や機能破壊に関する報告は少ない．しかしながら，レーザーポインターの目に対する照射の危険性からも推測できるように，低出力レーザーの照射であっても，照射部位には温度の上昇や，エネルギーの収束による細胞への影響が起こると考えられる．培養細胞に対してレーザーを照射する実験の報告もあり，細胞の樹状突起の退縮，糸状突起の崩壊や，ミトコンドリア，小胞体の変異が確認されている [59][60]．医療の分野では特に，低出力レーザー治療 (LLLT:Low-Level Laser Treatment あるいは Low-Level Laser Therapy) と呼ばれる分野での報告が行われている．この治療は歯科においての利用が盛んであり，口内炎や抜歯創の治癒促進効果や鎮痛作用があるとの報告がみられる [6][7]．これらの研究報告では，レーザーの出力が，数 mW から 10W 前後までのレーザーを低出力レーザーとしている．

上述したように、低出力レーザー照射では、細胞や神経に熱や破壊的ではない様々な効果があらわれることが報告されている。それらの効果はおおよそ、組織・細胞の再生促進や代謝の活性化 [57, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72]、疼痛の軽減・抑制 [73, 74, 75]、筋肉けいれんの抑制 [71]、投与した薬品の効果増大 [69]、といったものである。

また、レーザー照射による活動電位の誘発(光刺激と呼ばれる)に関する報告もあり、光刺激はレーザー光の照射によって細胞の膜やイオンチャンネルに影響を与えて活動電位を誘発していると考えられている [8, 9, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58]。

以上のように、レーザー照射は様々な医療応用が行われているが、神経の興奮性増大 [76]、神経や感覚受容野の機能障害 [77, 78, 79]、細胞の壊死・熱凝固の誘発 [80]、などデメリットとなりうる部分も見られる。使用されているレーザーの波長(レーザー媒質)は短波長(紫外光レーザー)から長波長(遠赤外光レーザー)まで様々である。照射方法や照射時間も同様であるが、活動電位の誘発には照射時間の短い(μsec 単位)短パルス照射、LLLTの場合は連続パルスあるいは連続照射で長時間(60分など)の照射など目的によってある程度の傾向がみられる場合もある。

本研究で用いる半導体パルスレーザー(波長808nm)は、上述した各分野での報告と比較すると低出力レーザーに分類される。しかしながら、実験中、最大出力で照射した場合、坐骨神経や海馬スライスを焼き切ることが可能であることを確認している。関連研究とはレーザー媒質の種類、すなわち波長の種類が異なる報告もあるので既存研究と同様に考えることは出来ないが、少なくともこのレーザーを照射によって、照射部位にある坐骨神経や海馬細胞の温度が上昇することは十分に考えられる。

第4章 ウシガエル坐骨神経の信号伝播機能破壊実験

4.1 実験の目的と方法

2章において、細胞・神経の興奮伝導とてんかんの概要について述べた。てんかんは脳疾患の一つであり、異常脳波であるてんかん波がてんかん原性域と呼ばれる疾患部位から発生し、他の脳部位や脳全体に拡散することでてんかん発作と呼ばれる症状を発生させる疾患である。てんかん外科手術では、主にてんかん原性域の除去を目的とした手術を行うことになるが、既存の手術方法の大半は大がかりな開頭手術を必要とする手術である。開頭手術は手術時間が長く、長期間の入院を必要とするため患者への負担も大きく、また後遺障害のリスクも持つ。これらの理由から、より簡便かつ安全でリスクの小さい手術方法が求められており、レーザーを利用した手術方法を提案できれば、これらの問題解決が可能であることを示唆した。

3章では、レーザーの基本原理と、レーザー照射が与える神経細胞への効果や医療利用に関する事例の紹介を行い、レーザー出力の高低によってその効果が大きく異なる点を示した。出力の高低の分類については明確な基準はないものの、本実験で使用する半導体パルスレーザー（波長 808nm）はそれらの事例を基にした場合、低出力レーザーに分類される。低出力レーザー照射は、近年特に注目されている研究分野である。高出力レーザーは、レーザー照射（および照射対象の光吸収）によって発生する熱の効果を主に使用している。一方、低出力レーザー照射による効果は、明確な結論は出ていないものの、レーザー光の持つ光エネルギーによって引き起こされているのではないかとされている。その照射効果としては、信号伝播の阻害、神経損傷や細胞の回復促進および代謝の活性化、疼痛や筋肉けいれんの軽減と抑制、薬品の効果増大など、高出力レーザー照射とは全く異なる報告が挙げられている [4, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93]。実際の医療利用についても歯科医療の分野において低出力レーザー照射は用いられており、口内炎や抜歯創の治癒効果促進や鎮痛効果が報告されている [6, 7]。これらの研究報告では、細胞および神経には可逆的な変化が起こっているという報告が主で、不可逆な変化について言及されている報告はほぼ見られない。

しかしながら、本研究ではてんかん原性域にレーザーを照射し、てんかんを完治させることが目的であるので、不可逆的な変化、すなわち原性域部分の細胞の完



図 4.1: ウシガエル .

全な破壊 (あるいは細胞の信号伝播機能破壊) が必要とされており, 上記に挙げた研究報告だけでは知見が不足している. また, 原性域以外の正常な領域への損傷は避けなければならないので, 照射部位以外の広い範囲に影響を及ぼす可能性のある高出力レーザーを利用することはできず, レーザー出力のデリケートな調節が求められる. そこで, 本章ではてんかん原性域を破壊するために必要なレーザー出力の基礎的調査として, カエル坐骨神経に半導体パルスレーザーを照射し, 信号伝播機能の完全な破壊に必要なレーザーの出力と照射時間の関係を実験によって確認する.

本節では, 実験に用いるウシガエルとその坐骨神経の摘出方法, 実験装置と実験の手順を説明する [94].

なお, 4章および5章のすべての実験は, 医学研究の倫理的原則であるヘルシンキ宣言と, 九州工業大学動物実験の倫理基準に従い, 適切な条件下で実施した.

4.1.1 ウシガエル坐骨神経

実験には, 食用ガエルとしてよく知られているウシガエルを用いる. ウシガエルは長命な生物であり, 加齢に伴って体長, 体重が大幅に増加していくが, 今回の実験では, 体長約 17cm(口先から肛門までの長さ), 体重約 300 ~ 500g のカエルを 10 匹使用した. 図 4.1 が坐骨神経摘出前のウシガエルの写真である. 坐骨神経は, 中枢(背骨)から末梢(後肢)まで伸びる神経束であり, 2章で述べたように感覚, 介在, 運動などの様々な種類, 太さの神経線維が集まっている. 坐骨神経は背骨から左右の後肢まで 1 本ずつ伸びているので, 1 匹のカエルから 2 本摘出できる.

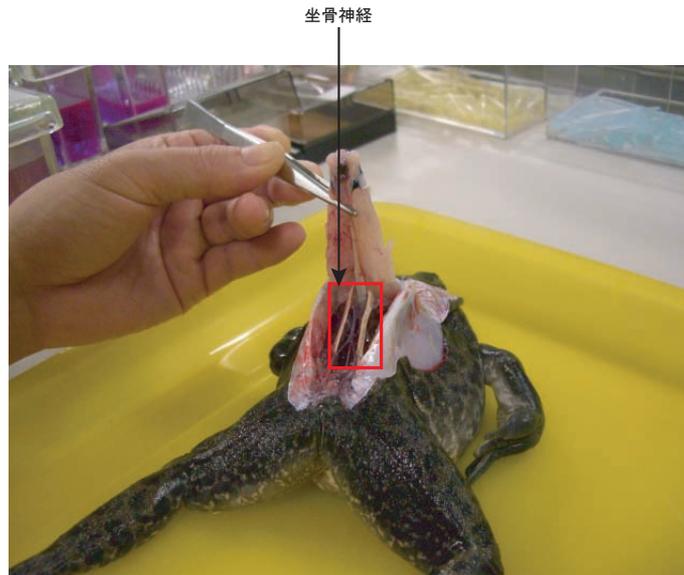


図 4.2: 背骨と中枢側の坐骨神経を露出，赤の四角で囲まれた中にある，白色の紐状の物体（ピンセットで持ち上げた背骨から 2 本伸びている）が坐骨神経である．

ウシガエルから，坐骨神経を摘出する手順は以下ようになる．なお，神経の摘出および実験においては，神経の乾燥を防ぐためにリンガー（リングル）液と呼ばれる液体で神経を湿らせておく．リンガー液とは，その生物の体液と同じ性質の液体であり，体外に摘出した神経や細胞の活動を維持させるために用いる．カエル用のリンガー液の組成は， $\text{NaCl}:116\text{mM}$ ， $\text{KCl}:1.2\text{mM}$ ， $\text{CaCl}_2:1\text{mM}$ ， $\text{NaHCO}_3:2.7\text{mM}$ である．

1. ウシガエルを腹腔内注射による麻酔で眠らせ，その後，頭部後方から千枚通しを刺して脊柱の切断および脊髄，脳の破壊を行う．麻酔は 2% トリカインスルホン酸メタンを 5ml 注入する．
2. 肛門から鋏を入れて胴の左右にある骨にそって背中部分の肉を切り，背骨とそれにつながる坐骨神経（左右 2 本）を露出させる（以降の操作は各神経ごとに行う）(図 4.2)．坐骨神経のつながっていない背骨部分は不要なので切り落としても良い．
3. 同様に，肛門付近から膝まで（末梢側）を切り，神経を露出させる（図 4.3）．
4. 背骨側（中枢側）の坐骨神経を木綿糸で縛り，背骨の根元付近で切断する．木綿糸は神経を取り扱い易くするため（ピンセット等で直接神経を握ると神経が潰れ，機能が破壊されてしまう）と，実験時に神経の乾燥を防ぐ（木綿糸をリンガー液に浸して水分を吸い上げる）ために用いる．

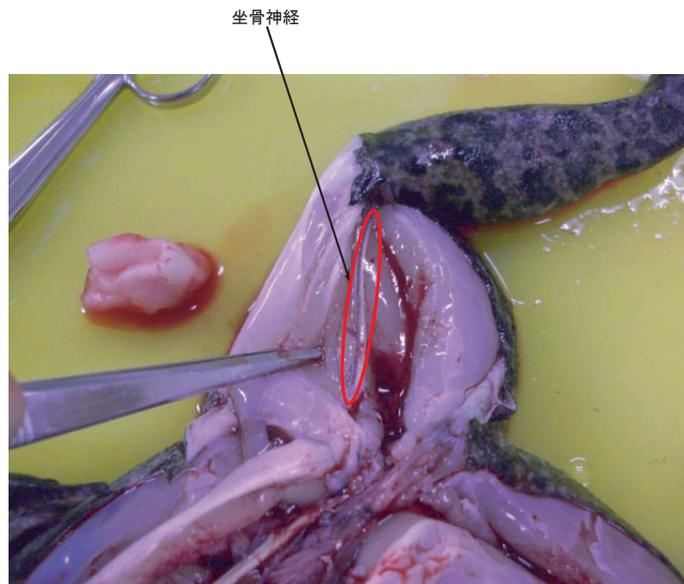


図 4.3: 後肢 (末梢側) の坐骨神経を露出 .

5. 血管などの不要な部分を除去しながら , 膝部分までの坐骨神経を取り出す .
6. 末梢側の坐骨神経も同様に木綿糸で縛り , 切断する .
7. 坐骨神経が乾燥しないようリンガー液に浸しながら , 残った不要部分 (血管や脂肪など) を除去する .
8. 取り出した坐骨神経は状態の悪化を避けるためリンガー液に浸しておく .

4.1.2 実験装置

図 4.4 にウシガエル坐骨神経実験で使用した実験装置の全体を示す . 実験装置は主に , パルス電流刺激装置 , 実験チャンバ , 記録装置 , 半導体パルスレーザーからなる .

各装置について , 以下に説明する .

1. 刺激装置

パルス電流刺激装置は刺激装置 (Stimulator) とアイソレータ (Isolator) からなる . 刺激装置 (日本光電製 , SEN-7203) は , 一定の大きさの矩形波電圧をアイソレータに対して出力し , アイソレータ (日本光電製 , SS-201J) は刺激装置の出力を受け , 矩形波電流 (パルス電流) を出力する . 刺激装置は , パルス幅 ,

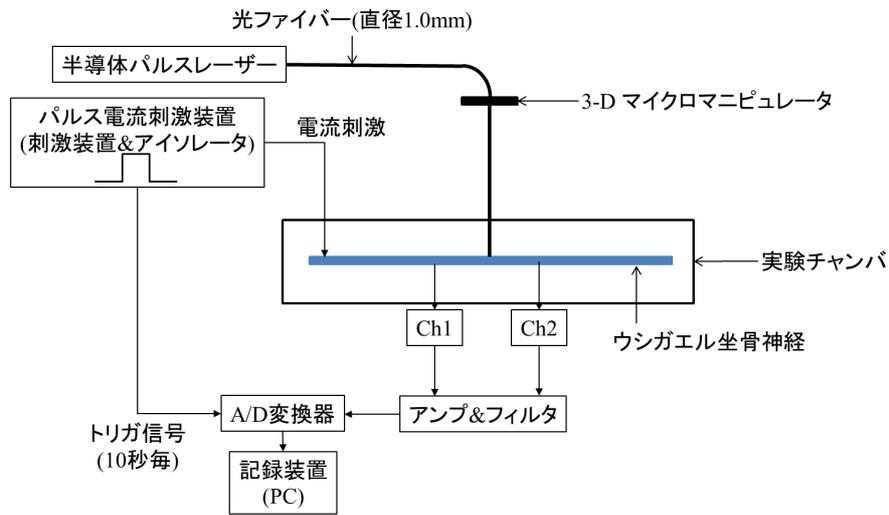


図 4.4: ウシガエル坐骨神経実験装置の概形図 .

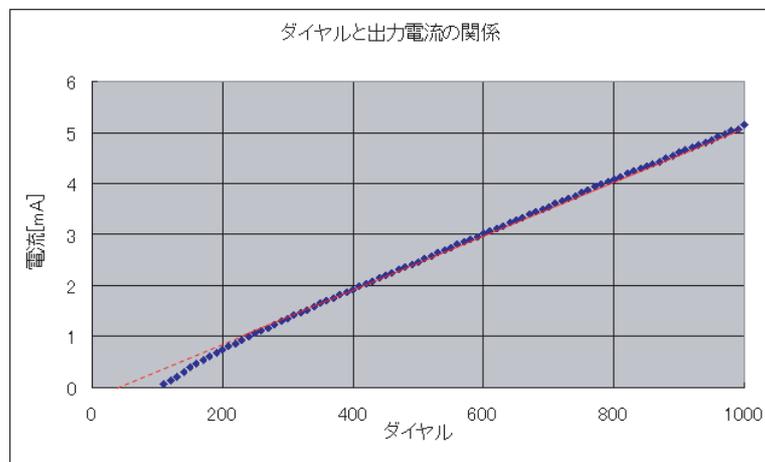


図 4.5: 最大電流設定 5mA 時のダイヤルと出力電流の関係 . 青の点が実測値 , 赤の点線は実測値から得た回帰直線である . ダイヤルは 200 以下の設定ではほぼ電流が出力されていない .

パルス間隔および電圧の大きさを設定できる。電圧の大きさは、0～1000までのダイヤル(分解能1)で指定する(ダイヤルの大きさがそのまま電圧の大きさになるわけではない)。アイソレータは、最大電流の設定ができ、入力される電圧に対して出力する電流の大きさの調整が可能である。

今回の実験では、刺激装置のダイヤル以外のパラメータは固定する。刺激装置のパルス幅は10msec、パルス間隔は10sec、アイソレータの最大電流設定は5mAとする。アイソレータの最大電流設定が5mA時の、刺激装置のダイヤルと出力電流の関係を図4.5に示す。赤線はダイヤルと出力電流の回帰直線であり、電流をI、ダイヤル数をNとすると、 $I = 0.0054N - 0.25$ の関係となる。今回の実験では、一般的なウシガエル坐骨神経実験で用いられるパルス幅とパルス間隔の設定と比較して大きな値を設定している。これは伝導速度の速い神経(A α 神経線維、有髄神経)と、遅い神経(C神経線維、無髄神経)の応答を同時に観測するためである。伝導速度の遅いC神経の応答は、パルス幅とパルス間隔の設定が小さい場合には記録できない。なお、刺激の強度は坐骨神経(神経束)のすべての神経線維が発火する極大刺激とするので、実験毎に刺激強度は異なる。通常、坐骨神経が大きくなる(太くなる)につれ、極大刺激となるパルス電流の大きさ(=ダイヤルの大きさ)も増大する。

2. 実験チャンバ

実験チャンバの写真を図4.6に示す。チャンバの主となる部分は坐骨神経を入れる箱状の部分である。箱部分は厚さ2mmの亚克力製で、坐骨神経を載せる(各種電極も兼ねる)ために直径0.65mmの銀線を張っている。各銀線間の距離(電極間距離)は5mmである。電極(ターミナル)は刺激用に1組2本、記録用に2組4本とアースに1本の計7本を使用する。実際には、16本の電極を用意しているが、これは坐骨神経の載せる用途も兼ねており、さらに記録電極と刺激電極の位置設定の変更も可能とするためである。

刺激電極からパルス電流を流すと坐骨神経で活動電位が発生・伝播する。2章で述べたように坐骨神経の信号伝播は神経の長軸に沿って伝播するので、発生した活動電位は刺激電極(坐骨神経の一方の端)から記録電極の方向(他方の端)に向かう。途中の1箇所のアースを取り、2箇所を記録電極として用いる。Ch1がレーザー照射位置より刺激電極に近い部分、Ch2がレーザー照射位置よりも遠い部分である。レーザー照射部位はこの2箇所の記録電極の間に設定する。Ch1、Ch2の記録を見ることで、レーザー照射によって信号伝播機能が破壊される事を確認する。記録電極からの出力は、オシロスコープおよび記録装置に入力される。

実験中は、坐骨神経の乾燥を防ぐためにチャンバの両端にリンガー液を浸した綿を置き、坐骨神経に結びつけた木綿糸を綿に浸しておく。また、レーザー照射部位以外は、亚克力製のふたを被せる。

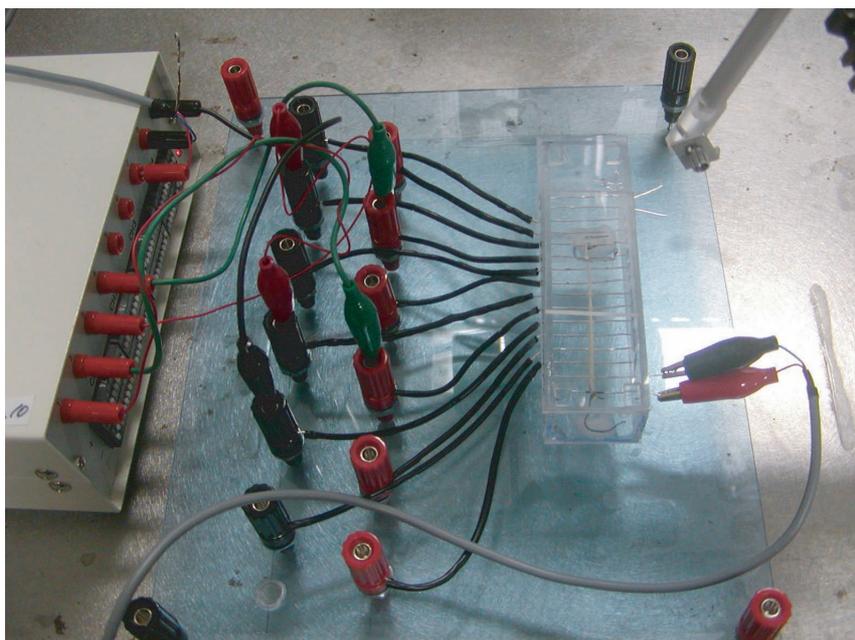


図 4.6: 実験チャンバ, 右側の箱状の部分が坐骨神経を設置するチャンバ本体であり, 16本の銀線が平行に張られている. 左側は銀線を接続したターミナルであり, 刺激装置, 記録装置およびアースはこの部分に接続する. 実験では画像下側部分を刺激電極としており, 活動電位は画像上側に向かって伝播する.

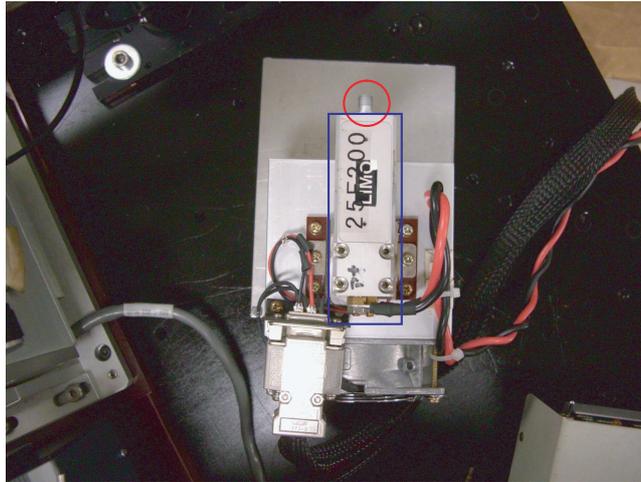


図 4.7: 半導体レーザー．青の四角で囲まれた部分がレーザー本体（レーザーダイオード）であり，赤の丸で囲まれた部分がレーザー発射部分である．

3. 半導体パルスレーザー

実験に用いる半導体レーザー，レーザーに電流を流すパルスドライバおよび発射されたレーザー光を通す光ファイバーをそれぞれ，図 4.7，図 4.8，図 4.9 および図 4.10 に示す．光ファイバーの断面は直径約 1mm の円形である．図 4.7 中の青囲み部分がレーザーダイオード本体であり，赤丸部分からレーザーが発射される．レーザーは DILAS 製のレーザーダイオードを用いており，レーザー発振体である半導体は，GaAs(ガリウム砒素)と GaSb(アンチモン化ガリウム)で作成された化合物半導体である．レーザーは，波長 808nm の近赤外光レーザーであり，パルスドライバ側でパルス幅，デューティ比およびダイオード電流の設定を行う．ダイオード電流は，0A から 44.4A まで設定可能である．

パルスレーザーの出力に関する評価は，単位面積当たりの 1 パルス分のエネルギー（パルスエネルギー， $[mJ/cm^2]$ ）で行う．図 4.11 の色つき部分が，パルス一個分のレーザーが持つパルスエネルギーであり，レーザーパワーの時間積分によって求められる．

今回の実験では，コヒレンス製のパワーエネルギーセンサー (3SIGMA) とエネルギーセンサヘッド (J25LP-MB) を用いて，レーザーのパルスエネルギーを計測する．

ダイオード電流とパルスエネルギーの関係を調べた結果を図 4.12 に示す．なお，レーザー光の見た目については，ダイオード電流を 8.0A 以上にすると肉眼で赤色光が確認でき，それ以下のダイオード電流では肉眼での観察が出来



図 4.8: パルスドライバ . レーザーダイオードに流す電流の大きさ , パルス幅 , デューティ比をこの装置で設定する . また , レーザーダイオードは高温に弱いため , 温度表示および冷却用ファンのコントロールもされている .

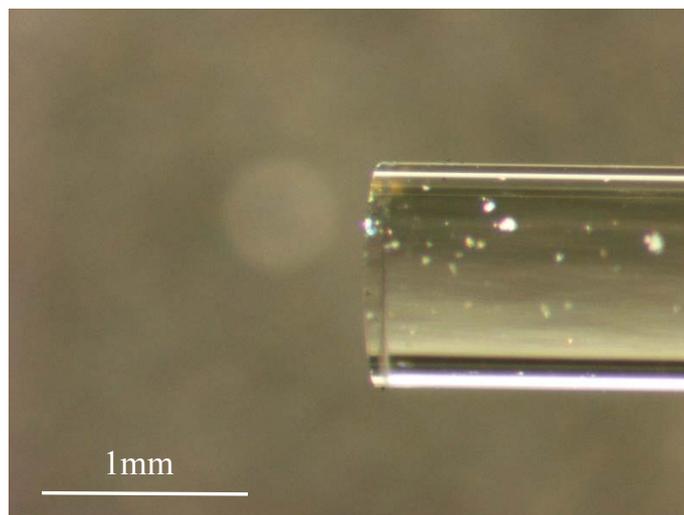


図 4.9: 光ファイバーの先端 . ファイバーは直径約 1mm の円形である .

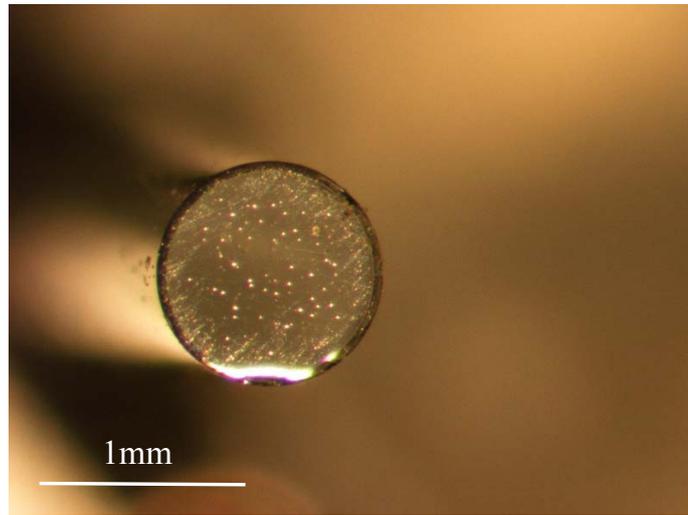


図 4.10: 光ファイバーの先端の断面．光ファイバー先端はガラスカッターで切った後に研磨を行っている．

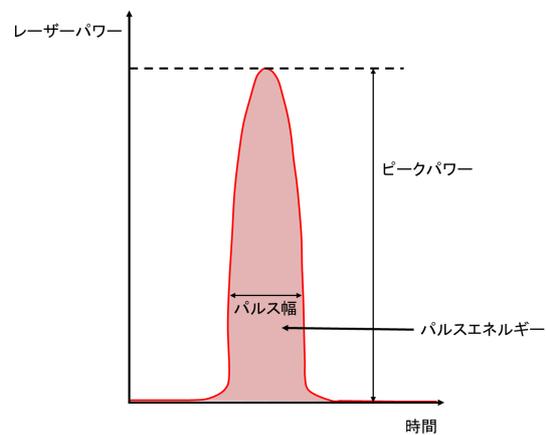


図 4.11: レーザーのパワーと出力エネルギーの関係 ([49] より一部を変更して引用) . パルスエネルギーはレーザーパワーの時間積分で得られる (色のついた領域が 1 発のレーザーが持つパルスエネルギーである) .

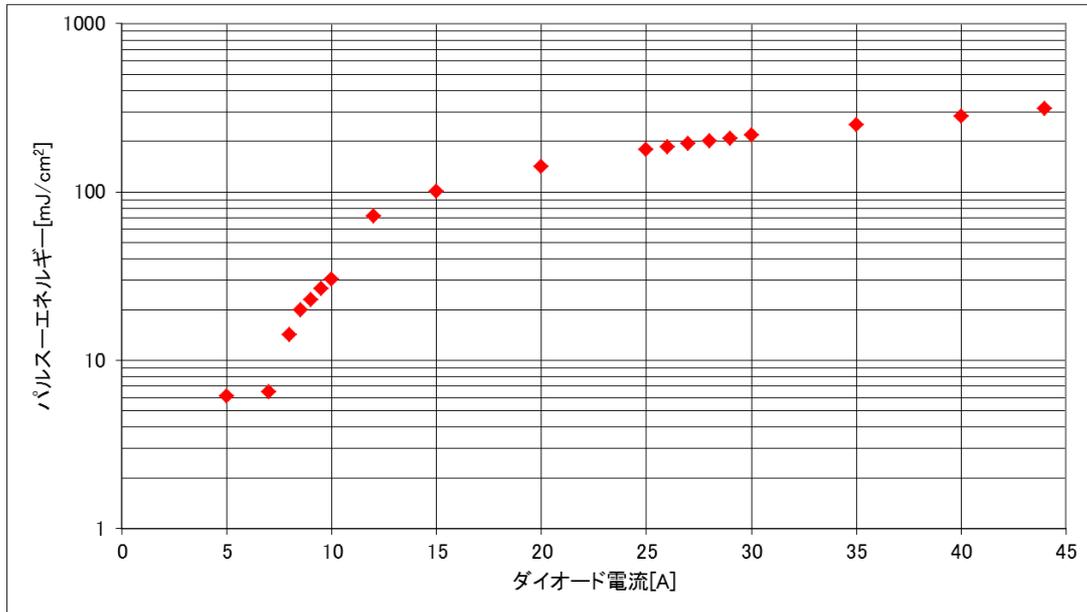


図 4.12: ダイオード電流とパルスエネルギーの関係 .

ない．肉眼での確認もできず，計測されるエネルギーのばらつきも大きいため，図 4.12 の結果ではダイオード電流 5.0A 以下の計測結果の信頼性は低い．実験では，パルス幅を $990\mu\text{sec}$ ，デューティ比を 5%(パルス周波数 50Hz) と固定し，パルスエネルギーを 13.9, 24.1, 32.9, 63.3, 100.0, 125.3mJ/cm² と変化させて，坐骨神経に照射する．

4. 記録装置 (PC)

実験装置の項で説明したように，記録電極からの信号はアンプ(ゲイン:500)とバンドパスフィルタ(0.5-1000Hz)を通して，オシロスコープと A/D 変換機 (Axon Instruments 製，DIGIDATA1322A) を介して PC への入力となされる．信号の観察と記録は主に PC で行った．使用するソフトは Axon Instruments 製の pCLAMP ver.10.2 である．pCLAMP は刺激装置のパルス電流入力と同期を取りながら，Ch1 と Ch2 の活動電位を記録する．Ch1 と Ch2 の記録を比較し，神経線維の特定およびレーザー照射による信号伝播機能の破壊を確認する．サンプリング周波数は 100kHz とする．本実験では，坐骨神経に触れさせた銀線から電位の記録が行われる．この記録方法では活動電位以外に，坐骨神経表面を湿らせているリンガー液を流れる電流による電位変化も記録されることになるが，活動電位と表面電流による電位変化は伝播速度に明確な差異があるので，区別は容易である．また，神経線維の状態変化や記録電

極部の坐骨神経の本数が活動電位の値に影響を与えるため、極大刺激を与えた場合であっても、Ch1 と Ch2 で電位の大きさに差がある、レーザー照射によらず時間の経過によって活動電位のピーク値がわずかに変動する、といったことが起こる。

4.1.3 実験手順

本実験では、半導体パルスレーザーのパルスエネルギー（出力）を様々に変えて坐骨神経に照射した時の、信号伝播機能の変化（破壊）の確認と、破壊に至るまでの時間の計測を行う。また、有髄神経線維と無髄神経線維における、信号伝播機能の破壊に必要なレーザーの出力および照射時間の差異も併せて確認する。

4.1.2の実験装置の部分で述べたように、坐骨神経の活動電位（信号の伝播）はCh1 と Ch2 の二つの電極で記録される。活動電位はCh1 から Ch2 に向かって伝播しており、レーザーはCh1 と Ch2 の間に照射されるので、信号伝播機能の破壊が起きた場合、Ch2 の活動電位記録に変化が起こる。今回の実験において、信号伝播機能が破壊されたとする判断の基準は、Ch2 の A α 神経線維の活動電位ピーク値の大きさがレーザー照射前に比べて 10% の大きさまで減少した時とする。また、レーザー照射を開始してから 5 分後の Ch2 の A α 神経線維の活動電位ピーク値に変化が見られない場合は、その出力のレーザーでは信号伝播機能を破壊しないと考え、実験を終わる。

レーザーの照射時間によって、実験時間は大幅に異なるが、共通の流れを以下に示す。

1. 坐骨神経の準備と刺激装置のダイヤル設定

リンガー液に浸した綿をチャンバ両端に置き、坐骨神経をチャンバ内の銀線上に載せ、ふたを被せる。刺激装置のダイヤルを変化させて電流刺激を行い、極大刺激となる刺激強度に調節し、一端刺激装置は止める。

2. 半導体パルスレーザーの準備

半導体レーザーの発射部分に光ファイバーを接続し、光ファイバー先端からレーザーが発射されることを確認する。その後、ふたに空けた穴から光ファイバーをチャンバ内に挿入し、ファイバー先端が坐骨神経に触れた状態で固定する。固定には 3-D マニピュレータなどを使用する。図 4.13 と図 4.14 に坐骨神経と光ファイバーを設置した状態のチャンバ周辺の画像を示す。画像中心が坐骨神経（白い紐状の物体）の設置されたチャンバである（16 本張られた銀線上に坐骨神経が載せられている）。チャンバ中央部分に差し込まれている黒い棒状の物体が光ファイバー（黒い被膜で覆われている）であり、坐骨神経に接している先端部分のみ被膜をはがしている。

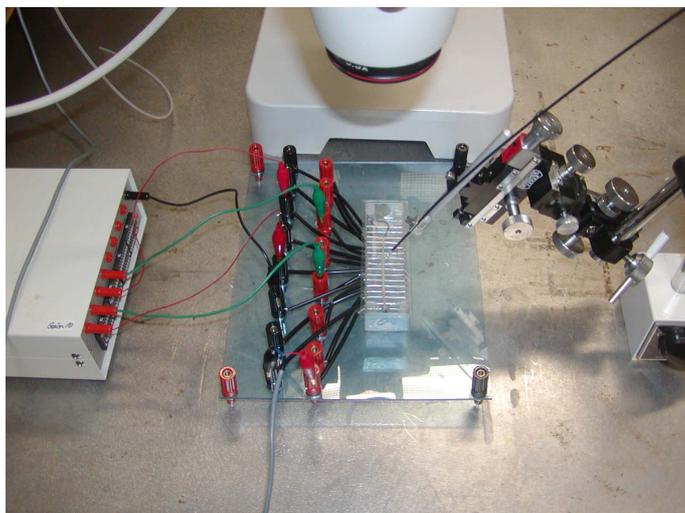


図 4.13: 坐骨神経, 光ファイバーおよび各電極の接続を済ませた状態の実験チャンバ. 画像右の3-D マニピュレータに固定されている黒い棒状の物体が光ファイバーである(黒い部分は被膜である).



図 4.14: 図 4.13 の実験チャンバ部分の拡大画像. チャンバに張られた銀線上に坐骨神経(白い紐状の物体)が載せられていることが分かる. 4.1.1 で述べたように, 坐骨神経の両端は木綿糸で縛っており, チャンバ端に置いたリンガー液で湿らせた綿に触れさせている. 光ファイバーはチャンバふたの中央に空けられた穴からチャンバ内に挿入しており, 先端は坐骨神経に接している.

3. 正常状態での記録

記録装置での記録を開始し，坐骨神経に電流刺激を与える．実験開始後5分間は，レーザーは照射せず，正常な状態での活動電位を記録する．刺激装置からの電流刺激は以後，実験終了まで継続し，記録装置も常に記録を取る．

4. レーザー照射中の記録

5分間の正常時の記録を取った後に続けてレーザーの照射を始める．先に述べたように，5分経過後にCh2の活動電位に変化が見られなければ，その時点でレーザーの照射を止める．Ch2の活動電位に変化(減少)が見られた場合は，レーザーの照射を続ける．照射時間は最大で60分間とし，その間にCh2のA α 神経線維の活動電位ピーク値が照射前の10%まで減少した場合はその時点でレーザーを止める．

5. レーザー停止後の記録

レーザー停止後は，10分間記録を行い，実験を終了する．既存の研究報告において，レーザー照射後に信号伝播機能の回復が見られているので，今回の実験で回復が起こるかを確認するためである．

6. 後日の確認

レーザー照射の後日(1日後)にも，記録を行い，信号伝播機能に回復が見られるかを確認する．

7. データの解析

取得した記録からCh2のA α 神経線維とC神経線維の活動電位のピーク値を抽出し，その時間的变化を確認する．

図4.15に得られる記録の一例を示し，その拡大図である図4.16と，図4.17にそれぞれ，A α 神経線維とC神経線維の活動電位を緑枠，青枠で囲んだ部分に示す．図は2段構成になっており，上段がCh1，すなわちレーザー照射位置よりも前部の記録であり，下段がCh2，すなわちレーザー照射位置よりも後部の記録を示している．また，図4.16の最下段に，刺激電極からのパルス電流の入力の様子も併せて表示する．

A α 神経線維は図4.16の記録開始時のベースラインを基準として活動電位のピーク値を抽出するが，C神経線維は活動電位が収まった後の安定した部分を基準として，活動電位のピークとの差分の絶対値を活動電位のピーク値として抽出する．これは，C神経線維の応答がレーザーの照射によって大きくゆらぐためである．

レーザーパルスエネルギーの設定は，4.1.2で示したよう6種類とする．これは，パルスエネルギーが25mJ/cm²付近から活動電位の減少が見られるようになり，

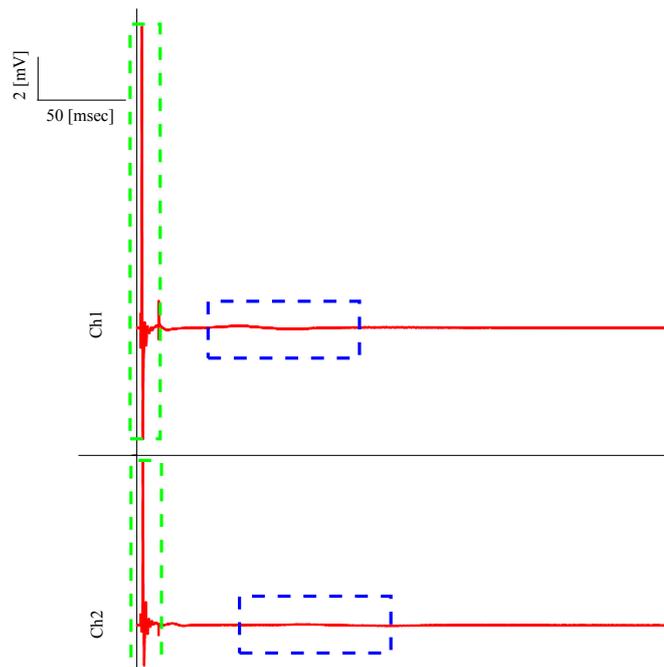


図 4.15: 活動電位の記録の一例．極大刺激を与えているが，軸の設定が大きすぎるため，このままでは各神経線維の活動電位は確認できない．緑の点線と青の点線で囲んだ部分にそれぞれ， $A\alpha$ 神経線維 (有髄) と C 神経線維 (無髄) の活動電位が記録されている．

100mJ/cm² 付近から数分の照射で活動電位が消滅したことを予備実験で確認した上での設定である．実験およびデータの取得は，各出力のレーザーごとに 1 回行う (n=1) ．

4.2 実験結果

4.1.3 で示した図 4.16 と図 4.17 は，レーザー照射前の応答である．レーザーを照射し，信号伝播機能が破壊された後 (レーザー停止から 10 分後) のデータを，図 4.18 と図 4.19 に示す．Ch1 の活動電位は消えておらず，Ch2 の活動電位のみが消滅していることから，時間の経過によって神経の状態が悪化し，信号伝播機能が自然に失われたのではなく，レーザー照射によって Ch1-Ch2 間の信号伝播機能が破壊されたことが分かる．図 4.20 にレーザーのパルスエネルギー 100mJ/cm² で照射した実験における，Ch2 の $A\alpha$ 神経の活動電位ピーク値の時間変化のグラフを示す．この図から分かるように，レーザー照射開始から活動電位ピーク値が減少していき，レーザー照射を止めた後も活動電位の回復が見られないことが確認できる．また，Ch1 と Ch2 活動電位ピーク値の時間差から各神経線維の活動電位の

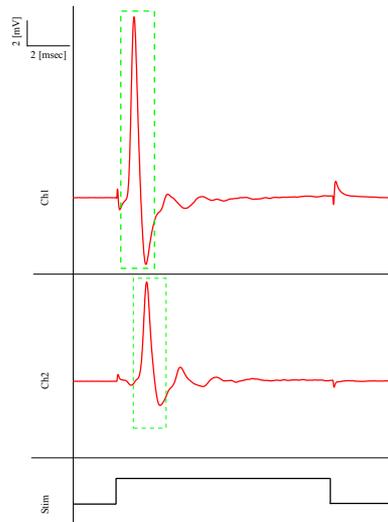


図 4.16: $A\alpha$ 神経線維の活動電位．図 4.15 の緑の点線で囲まれた部分を拡大している．四角で囲まれた部分が $A\alpha$ 神経線維の活動電位であり，その後の波形は他の神経線維の応答である．また，最下段は刺激装置の信号を示しており，刺激装置の立ち上がりと立ち下がりと同期して記録されている部分は電流刺激によるアーチファクトである．

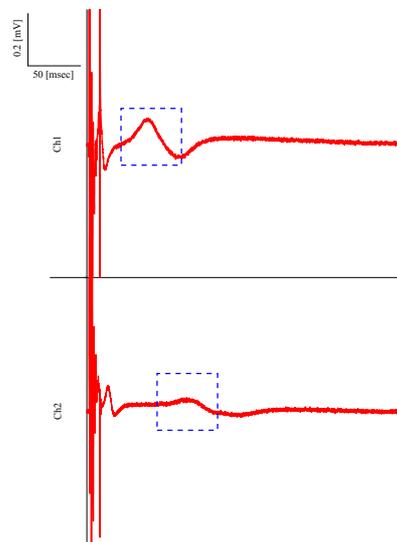


図 4.17: C 神経線維の活動電位．図 4.15 の青の点線で囲まれた部分を拡大している．C 神経線維の応答は $A\alpha$ 神経線維の応答と比較して活動電位ピークも小さく，刺激の入力から大きく遅れて応答するため，図 4.16 で示した $A\alpha$ 神経線維の応答と同一の軸設定で観察することは難しい．また，2 章で示したように伝導速度も遅いため，Ch1 と Ch2 で見られるピーク位置のずれも $A\alpha$ 神経線維と比べて大きい．

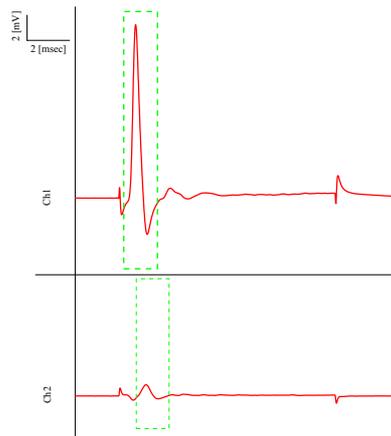


図 4.18: レーザー照射後の $A\alpha$ 神経線維の活動電位．図 4.16 と比較して明らかに Ch2 の $A\alpha$ 神経線維の活動電位ピーク値が減少していることが確認できる．一方，Ch1 の活動電位ピーク値はほぼ変化しておらず，時間経過によって坐骨神経全体の状態が悪化したのではなく，レーザー照射によって Ch1-Ch2 間の信号伝播機能が破壊され，活動電位の伝播が阻害されていることが分かる．

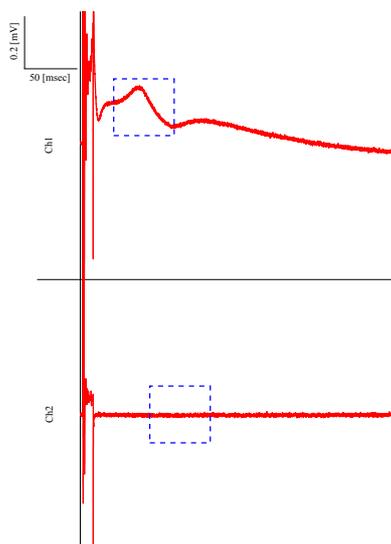


図 4.19: レーザー照射後の C 神経線維の活動電位．図 4.18 と同様に，Ch2 の活動電位ピーク値のみが減少（こちらはほぼ消失）していることが確認できる．この結果から，同出力・同時時間のレーザー照射において，C 神経（無髄神経線維）の方が $A\alpha$ 神経（有髄神経線維）よりも機能破壊の度合いが大きいことが分かる．

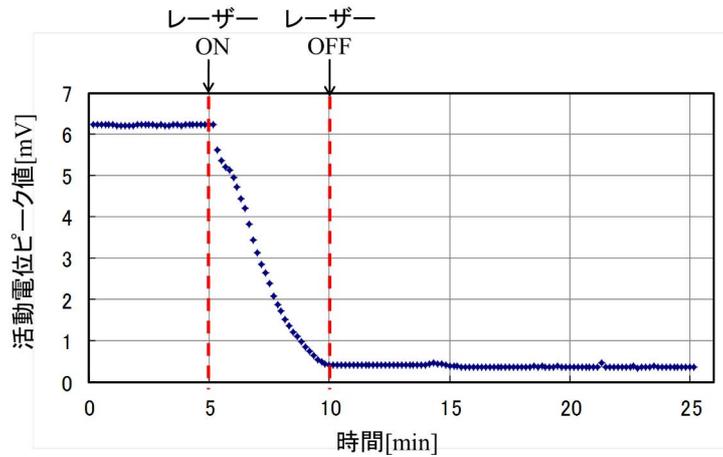


図 4.20: Ch2 の A α 神経線維の活動電位ピーク値の時間変化 (パルスエネルギー: 100mJ/cm²) . レーザー照射開始からすぐに活動電位ピーク値が減少していき, 約 5 分間の照射でピーク値が照射前の 10% まで減少している . レーザーを止めた後も活動電位ピーク値は回復せず, 不可逆な機能破壊が起きていることが確認できる .

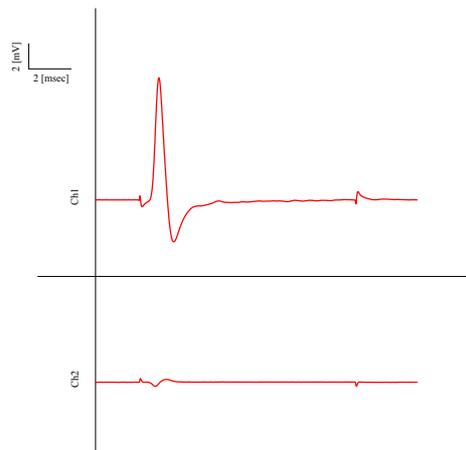


図 4.21: レーザー照射から 1 日経過後の A α 神経線維の活動電位 . Ch1 の活動電位は 1 日経過後もまだ確認できるが, レーザー照射によって機能破壊された Ch2 の活動電位は回復が見られない .

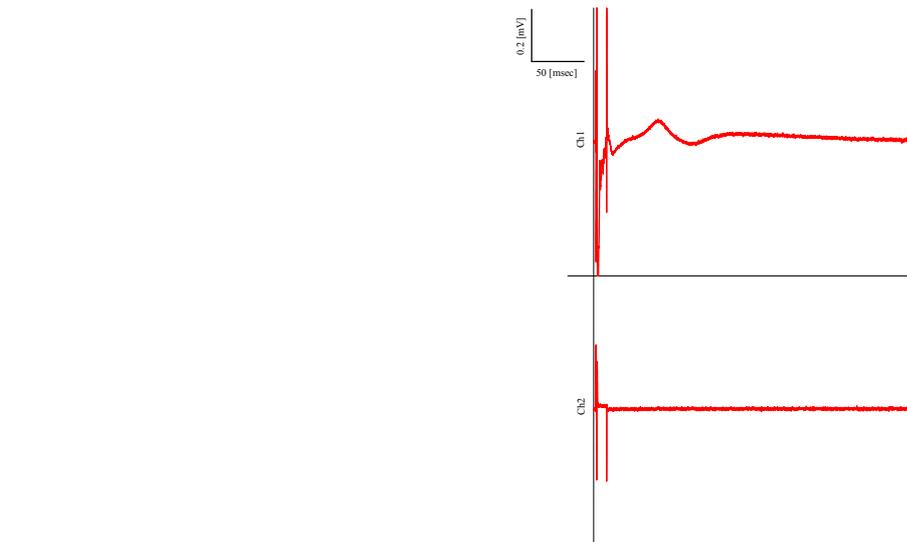


図 4.22: レーザー照射から 1 日経過後の C 神経線維の活動電位．図 4.21 と同様に Ch2 の活動電位は回復していないことが確認できる．

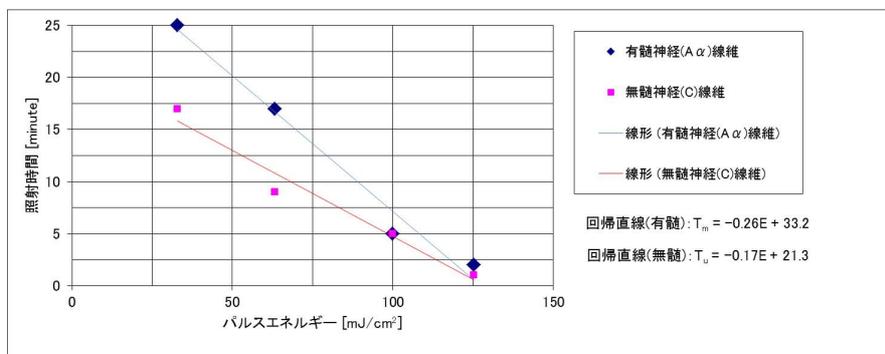


図 4.23: パルスエネルギーと信号伝播機能破壊に必要な照射時間の関係 (n=1)([97] より一部を変更して引用)．横軸はレーザーのパルスエネルギー，縦軸は Ch2 の各神経線維の活動電位ピーク値が，照射前の 10% に減少するまでのレーザー照射時間である．青の記録が A α 神経 (有髄神経線維)，赤の記録が C 神経 (無髄神経線維) であり，直線はそれぞれの計測結果から得た回帰直線である．レーザーの出力が高くなると，両者の照射時間はほぼ同じとなるが，出力が低い場合，無髄神経線維の方がより短時間の照射で完全な機能破壊が起こる．

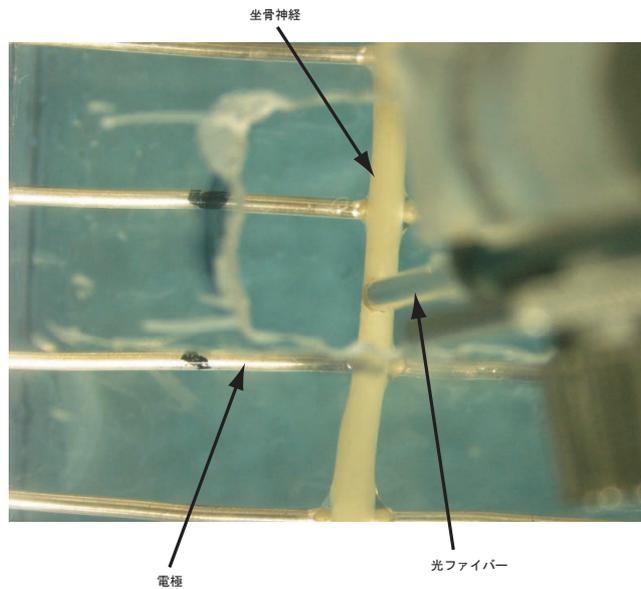


図 4.24: レーザー照射前の坐骨神経の拡大画像．坐骨神経を観察するため，光ファイバーは若干傾けているもののほぼ坐骨神経に対して垂直に接しており，発射されたレーザーのほぼすべてが坐骨神経に当たるようになっている．

伝導速度を計算することもできる． $A\alpha$ 神経については照射前(図 4.16)の伝導速度は 34.5m/sec であり，照射後(図 4.18)では 41.7m/sec と速度が上昇している．

実験では，4.1.3 で述べたように，レーザーのパルスエネルギーを 6 種類に変えて照射を行ったが，有髄神経，無髄神経ともに 60 分間のレーザー照射で Ch2 の活動電位の消失が見られた(信号伝播機能の破壊が起きた)のは $32.9\text{mJ}/\text{cm}^2$ からであった．また，レーザー照射による活動電位の消失を確認してから 1 日経過後の記録を図 4.21 と図 4.22 に示す．これらの記録から，時間経過による信号伝播機能の回復が無い(不可逆な機能破壊が起きている)ことを確認した．

図 4.23 に，パルスエネルギーと信号伝播機能が破壊されるまでに必要なレーザーの照射時間をプロットしたグラフを示す．得られたデータからは，回帰直線の計算も行っている．信号伝播機能の破壊に要する時間はレーザーのパルスエネルギーと線形の関係にあり，その比例係数は， $A\alpha$ 神経線維では -0.26，C 神経線維では -0.17 である．しかしながら，4.1.3 の実験手順でも述べたように，今回は，各出力のレーザーについて，1 回ずつしか実験を行っていないので，この比例係数の信頼性は低い．

図 4.24 はレーザー照射部位の坐骨神経を拡大した写真である．写真右側から坐骨神経に対して伸びているガラス棒状の物体がレーザーの光ファイバーである．また，図 4.25 と図 4.26 にレーザー照射中と照射後の写真を示す．写真は，レーザー

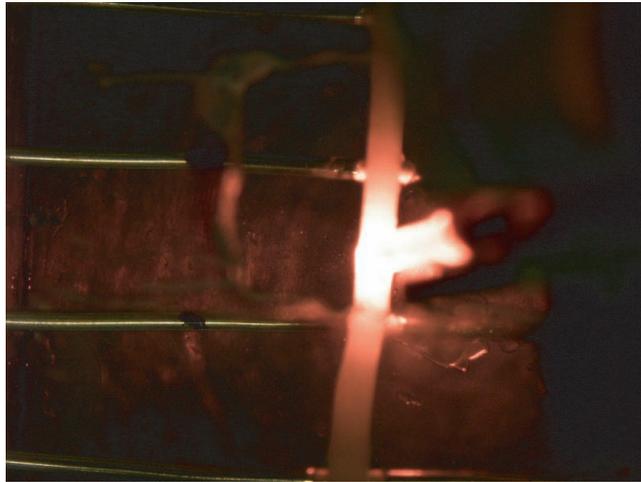


図 4.25: レーザー照射中 (パルスエネルギー: $63.3\text{mJ}/\text{cm}^2$) の坐骨神経の拡大画像 . 照射中はレーザーの発光のため坐骨神経の状態は確認できない .

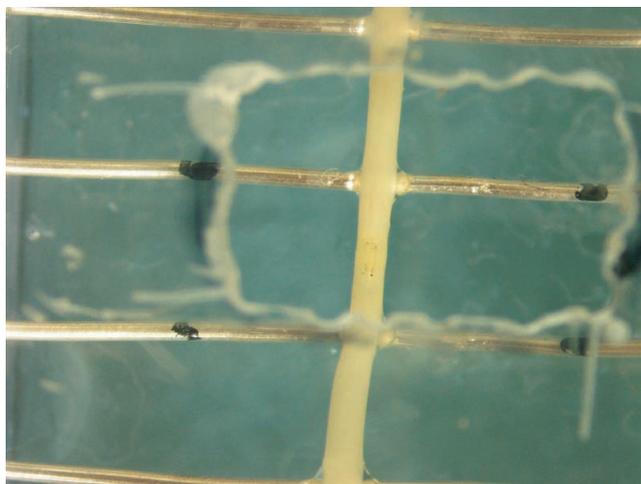


図 4.26: レーザー照射後の坐骨神経の拡大画像 . 光ファイバーはすでに取り外している . 図 4.24 と比較して , レーザー照射部分は周囲と比較して乾燥している (色の变化も多少ある) . しかしながら , 熱による焦げや物理的な損傷は見られない .

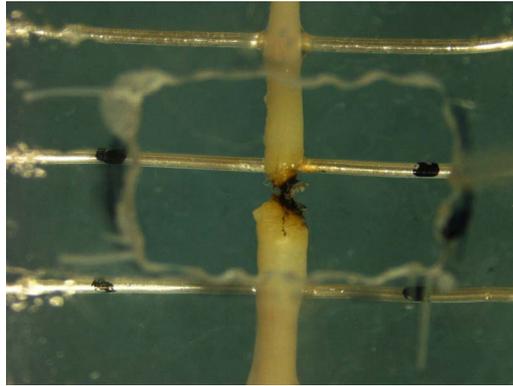


図 4.27: 最大出力でレーザーを照射した場合の坐骨神経の状態．レーザー照射によって高熱が発生し坐骨神経に黒焦げおよび熱による切断が発生していることが確認できる．

のパルスエネルギーが $63.3\text{mJ}/\text{cm}^2$ の時のものである．照射中はレーザーの発光があるので，坐骨神経の状態を確認することはできない．照射後の坐骨神経は，照射部分に乾燥が見られるものの，熱による焦げ跡や物理的な損傷は見られなかった．

4.3 考察

関連研究の紹介で述べたように，レーザー照射が与える神経細胞への効果の因果関係や生物学的根拠はまだ明確な結論が出ておらず，議論が続いている．その要因としては，検討すべきパラメータが多岐に渡るため，いまだ十分な調査がなされていない，ということが挙げられる．既存の研究報告と比較検討する際も，波長・出力・照射方法(単発か連続か，パルス波か連続波かなど)・照射時間など，多くのパラメータがあり，どのパラメータが大きな影響を与えているかの検討は困難である．しかしながら，レーザー照射が与える効果において，重要な要因の一つはレーザー光の波長であると言える，レーザー光が与える効果は，光の吸収による熱効果と光エネルギーそのものが与える効果の2つに大きく分けられると言われており [50]，照射対象のレーザー光吸収率は波長に依存しているからである．

本研究で用いたレーザーとほぼ同波長帯の近赤外光レーザーに関する各種文献をあたると，[73] や [95] はレーザー照射によって照射部位周辺組織の温度の上昇と，組織 ATP の含量が増加していると報告しており，レーザー照射によって組織内の ATP (Adenosine Triphosphate: アデノシン三リン酸) を刺激することで細胞のカリウムチャネルの活性化を誘発，その結果として神経活動の抑制が起きていると検討している．また，[71] は，本実験よりもさらに出力の高い $12\text{J}/\text{cm}^2$ のダイオー

ドレーザー照射によって神経伝達物質の放出にレーザーが影響を与えることを確認している。[74]の報告では、赤外線連続波レーザーを軸索に照射しており、このレーザー照射によって軸索流 (Axonal Flow) が阻害されていることを報告している。波長は異なるものの、本実験と同様に30分以上レーザーを照射しているにも関わらず、レーザー照射後に信号伝播機能が部分的に回復している事例もある[4]。この報告では、アルゴンガスレーザー (波長450~500nm, 連続波レーザー) を使用しており、テトロドトキシン塗布との対照実験から、レーザー照射がイオンチャネル阻害剤と同等の効果を持つのではないかと結論している。これらの報告では主に、レーザー光の効果によって細胞や神経活動に影響が出ていると考察されており、本実験においても、レーザー光そのものが坐骨神経のイオンチャネル開閉機構の障害等を誘発し、活動電位の伝播阻害が起こったと考えることはできる。

しかしながら、2, 3章で述べたレーザー照射によるエネルギーの収束とそれによる温度上昇の効果、神経細胞の熱による変性や今回使用した赤外光が水や生体組織に比較的吸収されやすい点などから、レーザー照射によって照射部位の温度が上昇したことで、神経線維が変性し神経の信号伝播機能が失われたとも考えられる。[73]の報告でも照射部位の温度が4.5 程度上昇した結果が述べられている。本実験では照射部位の温度変化は計測していないので、照射部位の温度がどの程度上昇しているかは不明であるが、レーザーのパルスエネルギーを最大の202.5mJ/cm²に設定して照射した場合、坐骨神経が完全に焼け焦げることを確認している (図4.27)。それ以下の出力のレーザー照射である図4.26のような結果においても、坐骨神経表面は乾燥しており、温度は上昇しているはずである。熱によって神経を構成するタンパク質や脂質が破壊 (組織変性) を起こし、活動電位の伝播阻害 (神経の機能破壊) が起こった可能性は十分に考えられる。本実験のレーザー照射効果の主な作用が熱によるものである、という結論を補足するものとして、[55]や[96]のように、神経活動の抑制は一時的であるという結果や、全く効果がないなど、本実験で得られた不可逆的な機能破壊とは異なる報告も挙げられる。加えて、図4.23に示したように、無髄神経線維の方が有髄神経線維に比べて短時間のレーザー照射で機能破壊が起こる、という結果も挙げられる。有髄神経と無髄神経の差異は髄鞘の有無であり、髄鞘を構成するシュワン細胞は脂質を主成分としている。神経線維における活動電位の発生と伝播には、刺激電流による脱分極と局所電流の発生が必要であるが、そのためには細胞膜が正常に機能していなければならない。温度の上昇によって、細胞膜が変性し、信号伝播機能が失われるのであれば、髄鞘が断熱材として働く有髄神経は無髄神経に比べてより長い時間、信号伝播機能を保持できると考えられる。また、レーザー照射前後において、活動電位の伝導速度が上昇している点も熱の発生を裏付けている。活動電位の伝導速度は組織の温度によっても変化し、高温になるほど伝導速度は速くなるからである。熱による変性は不可逆なものであるため、熱損傷によって機能破壊されたため、10分後や1日後の電流刺激に対しても活動電位が発生・伝播しなくなった、という結論は妥当な実験結果であると言える。

熱による神経の機能損傷は起きているものの、図 4.26 から分かる通り、極端な熱損傷(焼け焦げ)を伴うことなく機能損傷が可能であるという結果を得ている。この結果は、赤外線レーザー照射の熱による機能破壊には大きな熱量を必要としない、ということを示唆している。本研究では当初、レーザー照射によりてんかん原性域を焼灼する(焼き切る)ことを目標としていたが、レーザー出力の境界領域をより精密に調査することで、組織の熱損傷を最小限に抑えながら、てんかん原性域の機能(てんかん波の発生)を破壊する、ということの可能性を見出した。2.3 で述べたように無髄神経に早く効果が現れることも含めて、今後の更なる実験と検討によって、当初の目標以上に低リスクな手術方法を提案できると考えられる。

また、レーザー照射部分と Ch1 および Ch2 の電極間の距離はそれぞれ 10mm 程度である。レーザー照射後は Ch2 の活動電位のみが消失していることから、レーザー照射による効果が及んだ領域は 10mm 以下であると考えてよい。熱の伝播による損傷の可能性はあるものの、レーザー照射では照射部分近傍の微小な領域のみを機能破壊することが可能であり、精密な手術に対してもレーザー照射手術法は有効であることを示した。

第5章 ラット海馬スライスにおける てんかん様放電の消失実験

5.1 実験の目的と方法

4章において、ウシガエル坐骨神経に半導体パルスレーザーを照射した場合の、信号伝播機能の不可逆的な破壊に必要なレーザー出力と照射時間の関係を確認した [97]。実験結果では、 $32.3\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以上のパルスエネルギーを持つレーザーを照射することで、60分以内に坐骨神経の信号伝播機能の破壊が可能であり、パルスエネルギーを大きくすることで、必要な照射時間を短くすることができる。この実験では、レーザー照射前後の活動電位の伝導速度変化や、有髄・無髄神経線維の機能破壊に必要な照射時間の差異、不可逆的な機能破壊が起きている等の結果から、熱による損傷がレーザー照射効果の主なものと結論づけた。レーザー照射によって照射部位周辺の温度が上昇し、神経線維の組織変性が起きた結果、神経の信号伝播機能が破壊され、活動電位の伝播が阻害されたと考えられる。しかしながら、熱の発生・伝播は照射部分周囲 10mm 以下の範囲であり、機能破壊には大きな熱損傷も必要としないことが確認された。

本章では以上の結果を踏まえて、てんかん様放電を自発させたラット海馬スライスの CA3 領域に半導体パルスレーザーを照射し、てんかん様放電の伝播阻害 (CA3 領域の信号伝播機能の破壊) に必要なレーザーの出力と照射時間を実験によって確認する。

本節では、実験に用いるラットとその海馬スライスの作成方法、実験装置と実験の手順を説明する。

5.1.1 ラット海馬スライス

実験には、4-6 週齢の Wistar ラットを用いる。図 5.1 が Wistar ラットの写真である。解剖の方法には胸部打撃法と心臓灌流法がある。胸部打撃法は、心臓を破裂させて血液の循環を止めた上で脳を取り出す方法であり、心臓灌流法は心臓から人工脳脊髄液 (ACSF:Artificial cerebrospinal fluid) を注入し、脳を ACSF で満たしてから脳を取り出す方法である。今回は心臓灌流法を用いて実験を行った。ACSF とは、脳脊髄液 (CSF:Cerebrospinal fluid) に近い組成を持つ人工の液体の事である。脳脊髄液は脈絡叢で作られる廃液であり、脳の水分含有量の調節



図 5.1: Wistar ラット .

や形を保つ働きをする液体である．ACSF に脳のスライス標本を浸しておくことで，神経細胞を長時間生きた状態に保つことが可能となる．今回の実験では， K^+ の濃度が異なる 2 種類の ACSF (Normal ACSF と High potassium ACSF) を使用している．それぞれの ACSF の組成は，(1) Normal ACSF: $NaCl:123mM$, $KCl:3mM$, $CaCl_2:2mM$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O:1.3mM$, $NaHCO_3:26mM$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O:1.25mM$, $glucose:10mM$, (2) High potassium ACSF: $NaCl:123mM$, $KCl:5mM$, $CaCl_2:2mM$, $MgCl_2 \cdot 6H_2O:1.3mM$, $NaHCO_3:26mM$, $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O:1.25mM$, $glucose:10mM$, となっている．

以下に，Wistar ラットから脳を摘出する手順を述べる．

1. 使用する ACSF (Normal ACSF) に混合ガス (酸素:95% , 二酸化炭素:5%) をバブリングし，十分に冷やす (約 $0^\circ C$) (以下で使用する ACSF は全てこの ACSF を使用する) .
2. ラットを腹腔内注射による麻酔 (5% ペントバルビタール溶液を体重 1kg に対して 90mg) で眠らせ，解剖用トレイに仰向けに乗せて四肢をテープで固定する .
3. 腹部から胸部にかけての皮を切り取り，腹部を切開し横隔膜の下まで切り開く .

4. 心臓を傷つけないように横隔膜と左右の肋骨を前肢の付け根付近まで切り、心臓を露出させる。鉗子を使い、肋骨を開いた状態で固定する。
5. 右心房と左心室に切れ目を入れ、左心室の切れ目からシリンジを大動脈に挿入し ACSF を注入する。右心房の切れ目は血液の再循環を防ぐためであり、血液が排出されていることを確認できる。ACSF が体中に行き渡ると肝臓や目の色が白く変化したり、右心房の切れ目から ACSF が出るなどの変化がみられる。今回使用したラットの場合、20～30ml 程度を注入する。
6. 上記の変化を確認後、頸部を切断する。
7. 頭頂部分の皮を大まかに切り開き、頭蓋を露出させる。
8. 脳幹部から鋏を入れ、骨の左右端に沿って頭蓋骨を切る。
9. 鋏の片刃を滑り込ませ、引きはがすように頭蓋骨を取り除く。
10. 硬膜が残っている場合は、脳を傷つけないように慎重に切り取る。
11. 脳神経線維を切りながら脳を取り出し、ACSF で満たしたビーカーに入れる。

約 0 の ACSF を注入しているので、脳の生理機能は冷却によってほぼ麻痺した状態となっているが、損傷を最小限にするために上記の作業は素早く行う必要がある(横隔膜の切開から約 5 分程度で行うのが理想である)。

取り出した脳を使って、続けて海馬スライスを作成する。スライス作成にはビブラトーム (LEICA VT2000S) を使用し、スライス厚は $400\mu\text{m}$ とした。また、今回の実験では、左脳側の海馬のみを使用する。海馬スライス作成までの手順は以下ようになる。

1. 脳をビーカーから取出し、外気で温められないように注意しながら、ACSF で湿らせたろ紙を敷いたシャーレ(このシャーレも氷で冷やしておく)に載せ、カミソリ刃を使い小脳を取り除く。
2. 正中線からわずかに右脳側を切り、左脳部分のみにする。
3. 左脳部分からさらに、前頭部、脳下部を取り除き、ビブラトームのトレイに乗せやすい状態にする(ここまでの作業をトリミングという)。
4. トリミングされた左脳部分と固定用の寒天をトレイに接着し、ビブラトームに設置する。スライスは saggital 方向に行う。
5. ビブラトームでスライスを作成する。

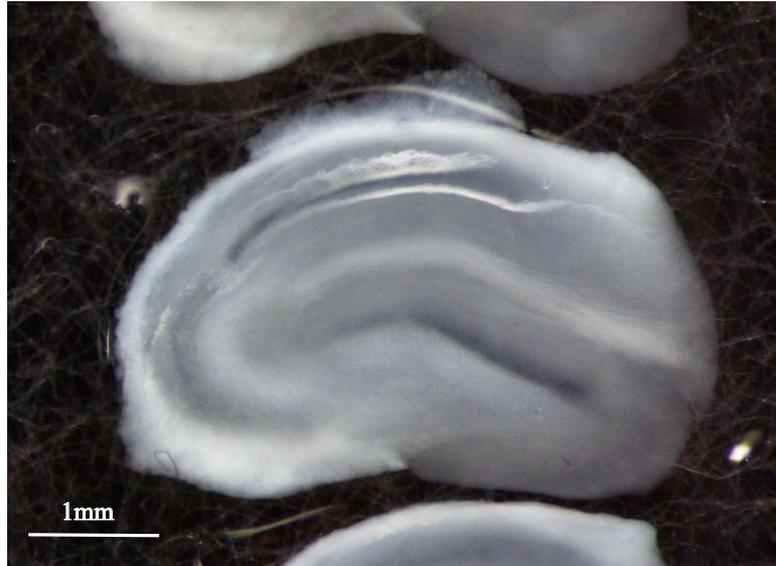


図 5.2: ラット海馬スライス .

スライス作成中の温度上昇を避けるため、ビプラトーム内には ACSF が満たしてあり、その周辺部を氷水で冷却する。作成したスライスはさらにトリミングを行い、海馬部分のみを摘出する。

ラット海馬スライスの拡大鏡写真と概形図を図 5.2 および図 5.3 に示す。海馬スライスの構造は 2 章で述べたとおりであるが、信号は図 5.4 に示すように DG CA3 CA1 という経路で伝播する。DG 領域に刺激電極を設置、苔状繊維を電流刺激し、DG と CA3 の各領域で電位記録を行うことで、レーザー照射による機能破壊が起きた領域がどこまで及ぶかも確認できる。

5.1.2 実験装置

図 5.5 と図 5.6 にラット海馬スライス実験で使用した実験装置全体の概形図を示す。実験装置は電流刺激実験とレーザー照射実験の 2 種類があり、主にベースユニット、記録装置、半導体パルスレーザー、パルス電流刺激装置からなる。

各装置について、以下に説明する。

1. ベースユニット

ベースユニットを図 5.7 に示す。ベースユニットは蒸留水で満たしたバスと実験チャンバからなり、その構成の概形図を図 5.8 に示す。バスの水温はサー

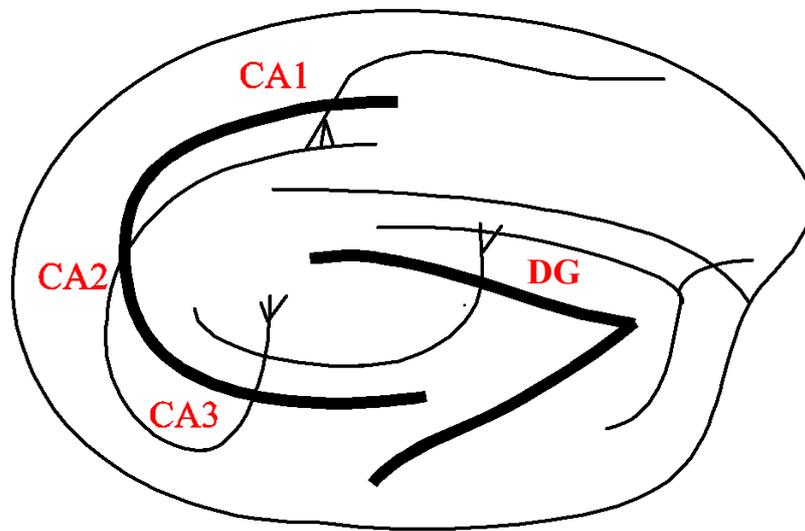


図 5.3: 海馬スライスの概形図 ([98] より引用) .

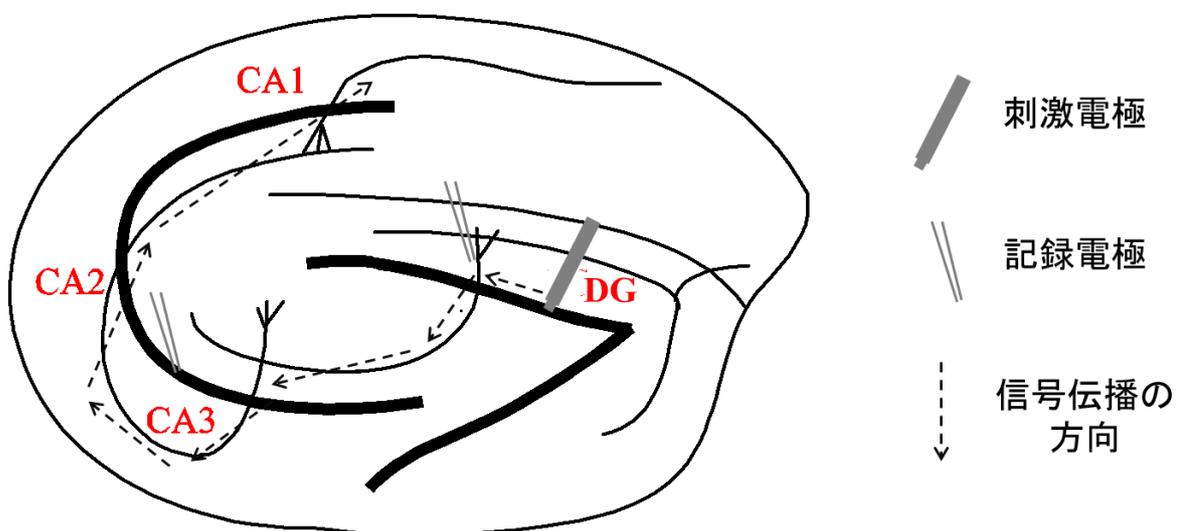


図 5.4: 海馬の信号伝播 . DG 領域の顆粒細胞層を刺激すると , DG CA3 CA1 と信号伝播される ([98] より一部を変更して引用) .

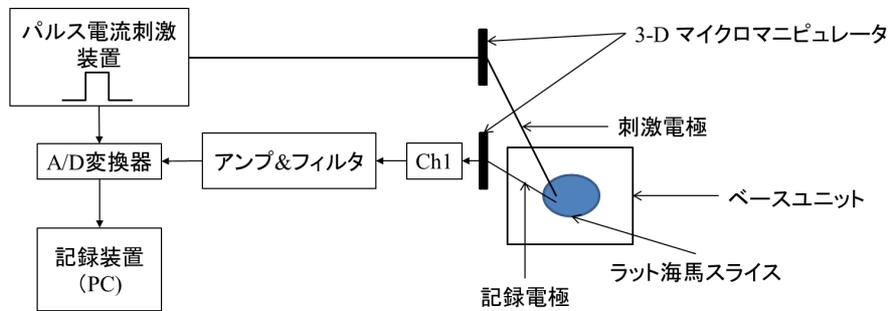


図 5.5: ラット海馬スライス電流刺激実験装置 .

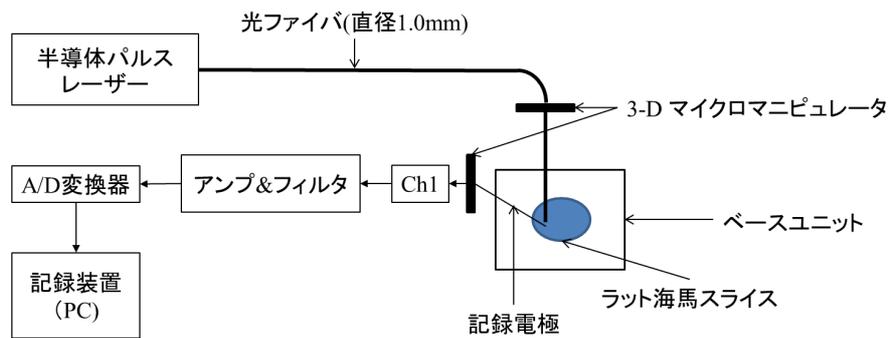


図 5.6: ラット海馬スライスレーザー照射実験装置 .

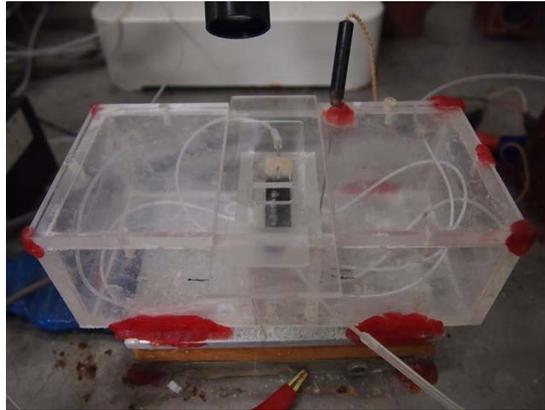


図 5.7: ベースユニット．中央の黒い部分が海馬スライスを設置する溝の部分である．その周囲の箱部分はベースユニット内の湿度を保ち，かつ海馬スライスに流す ACSF の温度を上げるためのバス部分である．バスの右上に，細いシリコンチューブが接続されている．このチューブが ACSF に接続されている．

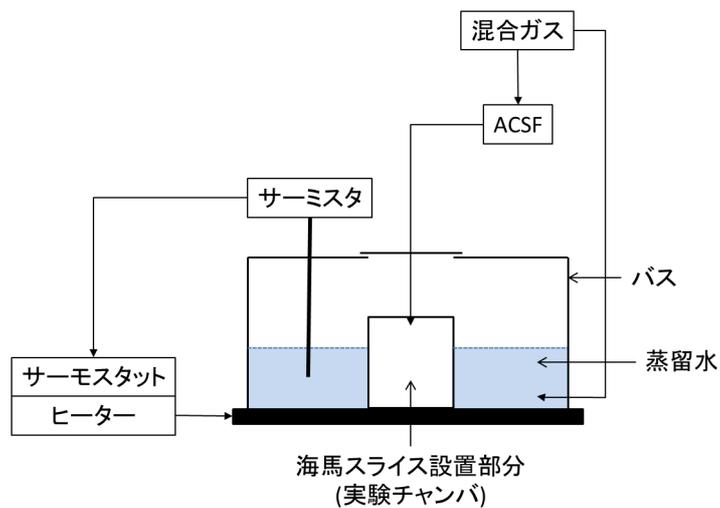


図 5.8: ベースユニットの概形図．サーミスタ，サーモスタットおよびヒーターはバス内の蒸留水の温度を約 33℃ に保つ．ACSF はチャンバ内に一定の速度で流れ込むようにしなければならないので，輸液セットのような装置に入れられている．ACSF(輸液セット)と実験チャンバはシリコンチューブで接続されており，チューブはバス内を通過してチャンバにつながっているため，ACSF はバスを通過することで温度を上昇させてチャンバ内に流れる，

ミスタとサーモスタットによって約 33℃ に保たれている。チャンバには、海馬スライスを設置するための溝があり、海馬スライスと不関電極をこの溝に設置する。溝には海馬スライスの状態を保つための ACSF が常に流れるようになっており、その温度はチューブをバス内に通すことで約 33℃ まで上昇している。また、混合ガスを ACSF とバスの両方にバブリングすることで、前者は ACSF の酸素濃度を上げ、後者はベースユニット内の湿度を高い状態で保つようにしている。海馬スライスをチャンバに設置し、装置を動かすことでスライスの温度が上昇し、細胞の活性が回復する。ACSF は一定の間隔で ACSF がチャンバ内に流れるように、輸液セットのような器具に入れてシリコンチューブでチャンバと接続する。

2. パルス電流刺激装置

パルス電流刺激装置は、刺激装置 (日本光電製, SEN-3301) とアイソレータ (日本光電製, SS-201J) を用いる。これらの装置の概要は前章のウシガエル実験とほぼ同様である。本実験では、海馬スライスがてんかん様放電を自発させる状態にするので、レーザー照射中は電流刺激を必要としない。電流刺激は、レーザー照射前後での、海馬スライス内の信号伝播の状態確認のためにのみ行う。刺激電極は双極子電極 (内管: プラチナイリジウム, 直径 50 μ m, 外管: ステンレス, 直径 200 μ m, FHC 製) を使用している。

3. 記録装置

記録装置の構成も、刺激装置と同様に前章のウシガエル実験のものと同様となっている。記録電極からの信号は、プリアンプ (ゲイン: 200), バンドパスフィルタ (2-2000Hz), A/D 変換機 (Axon Instruments 製, DIGIDATA1322A) を介して、PC に入力される。使用したソフトは Axon Instruments 製の pClamp ver.8.1 であり、サンプリング周波数は 10kHz とする。本実験では細胞外電位記録法を用いて記録を行う。この方法は、細胞の膜電流が引き起こす細胞外の媒質 (ACSF) の電位を測定するものである。細胞外電位記録法には、単極導出法と双極導出法があり、今回は不関電極の電位を基準としたときの記録電極の電位を測定する単極導出法を用いる。記録電極は先端径約 20 μ m のガラス電極を用いる。ガラス電極は、ニードルプラー (Narishige, PB-7) を用いてガラス管を加熱して引きちぎり、ガラスピペット状に成形したものである。ガラス電極内には ACSF を満たす。ガラス電極の先端径の大きさによって記録対象となる細胞の数が変化するが、今回は電極の先端径を 40 μ m とし、複数の細胞の活動電位によって発生する電位変化の総和を記録する (集合電位記録法)。不関電極は Ag/AgCl 焼結電極を使用する。

4. 半導体パルスレーザー

実験に用いる半導体レーザーも、前章のウシガエル実験のものと同様であり、光ファイバーも同一の物を用いている。ダイオード電流とパルスエネルギー

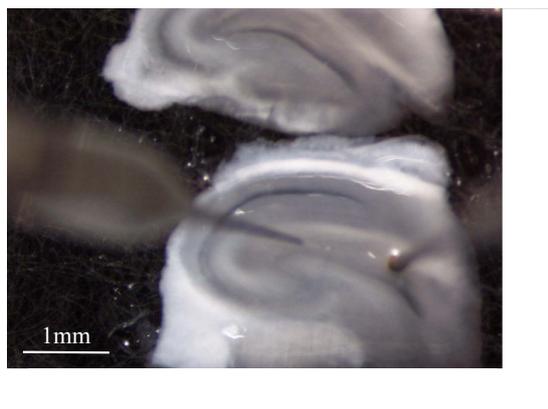


図 5.9: 電流刺激による海馬スライス DG 領域の応答記録実験の拡大鏡画像。画像の右側から刺激電極，左側から記録電極が伸びている。刺激電極が DG の顆粒細胞層上に設置してあり，同じく DG 領域の分子層上に記録電極が設置してある。この状態(各電極の位置は多少ずれても構わない)で電流刺激を行うことで，活性の回復した海馬スライスであれば活動電位やシナプス電位が観察できる。

の関係も前章に示した通りである。本実験でのレーザーのパルスエネルギーの設定は，6.5，14.1，20.0，22.9，26.7，30.4，100.6mJ/cm² の 7 種類とした。

5.1.3 実験手順

本実験では，4 章の実験と同様に半導体パルスレーザーのパルスエネルギー(レーザー出力)を様々に変えてラット海馬スライス CA3 領域に照射し，自発させたてんかん様放電の消失および消失に必要な照射時間とパルスエネルギーの関係を確認する。実験の流れを以下に示す。

1. ラット海馬スライスの準備

5.1.1 の手順で取り出したラット海馬スライスを実験チャンバに設置する。この時，海馬スライスと設置面である溝(図 5.7 で示した黒い部分)の間にレンズペーパーを敷く。これは，ACSF で濡れたペーパーを介して海馬スライスの下面にも ACSF が流れるようにするためである。設置する際は，チャンバ内を一時的に ACSF で満たしておき，海馬スライスに物理的な損傷を与えないように十分注意する。海馬スライス設置後に，キムワイブ等で不関電極と ACSF が接触するようにしておく。その後，ACSF の滴下を始め，海馬スライス表面が薄く湿る程度にチャンバ内の ACSF の量を調整する(おおよそ 4 ~ 5 秒に一滴程度の滴下速度でよい)。

2. 正常状態での電流刺激による電位記録

手順1の後、2~3時間程度経過すると、冷やしていた海馬スライスの温度が流れ込む ACSF によって上昇し、それに伴い海馬スライスの活性も回復する。活性が回復したラット海馬スライスを用いて、電流刺激による DG と CA3 領域での活動電位およびシナプス電位の確認を行う。刺激電極と記録電極を DG 領域に設置した時の海馬スライスの拡大鏡画像を図 5.9 に示す。海馬スライスは薄いので、電極の設置は 3-D マニピュレータを使い、慎重に行う。電流刺激のパルス幅は $200\mu\text{ sec}$ 、電流の大きさは適当に設定する。記録後に刺激電極は取り外し、記録電極は CA3 領域に設置した状態にする。電流刺激に対して活動電位等の応答が得られない海馬スライスは、すでに状態が悪くなっているので実験では使用しない。

3. ACSF の切り替え、てんかん様放電の自発確認

手順2によって、海馬スライスが活動電位、シナプス電位を発生させることが確認できた後に、チャンバ内に流す ACSF を Normal ACSF から High potassium ACSF に変更する。ACSF のカリウム濃度を 3mM から 5mM に上昇させることで、海馬スライスの CA3 領域からてんかん様放電が自発するようになる。切り替えてからしばらく (30 分程度) 待つと、CA3 領域に設置したままにしておいた記録電極が、てんかん様放電を記録するようになる。てんかん様放電の自発を確認したのちに、その自発の状態 (頻度、振幅など) を確認する。

4. レーザー照射、電位記録

ファイバー先端が海馬スライスに接触しないように、CA3 領域に光ファイバーを設置し、電位記録とレーザー照射を行う。この時、レーザー照射による効果を正確に確認するため、ファイバー先端 (レーザー照射位置) は CA3 領域に設置してある記録電極の真上に当たるようにする。ファイバー設置前後の海馬スライスの拡大鏡画像を図 5.10 に示す。レーザー照射前後の記録時間は各 3 分間、レーザーの照射時間は最大 5 分間とする。てんかん様放電が照射中に消失した場合は途中でレーザー照射を終了する。

5. レーザー照射後の電流刺激による電位記録

照射後に、手順2と同様に刺激電極と記録電極を設置し、電流刺激による電位記録を行う。

6. データの解析

取得した記録から自発させたてんかん様放電の発生頻度・振幅等のレーザー照射による変化を確認し、レーザーエネルギー・照射時間との関係や、照射前後の海馬スライスの状態確認等を行う。活動電位およびシナプス電位と、てんかん様放電は波形と持続時間に大きな差があるため、区別は容易である。

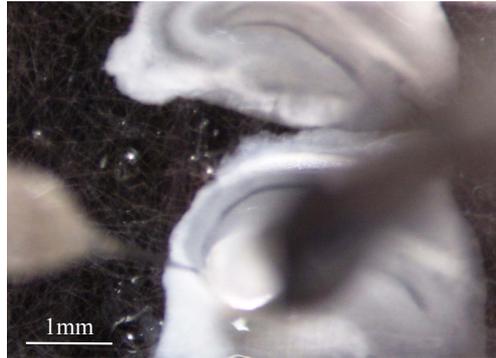


図 5.10: 光ファイバーを設置した状態の拡大鏡画像．ピントが合わせられないため見難い状態だが，画像右側から光ファイバーが，左側からは図 5.9 と同じく記録電極が伸びている．ファイバーの直径が海馬スライスと比べて大きいため，海馬スライスや記録電極が隠れてしまっているが，CA3 領域に設置された記録電極の真上からレーザーが当たるように，ファイバー先端位置を調節する．また，ファイバ先端は海馬スライスに接触しないように設置する．

レーザーパルスエネルギーは 5.1.2 で述べたとおり 7 種類とし，各エネルギーの照射実験を 3 個体ずつ行う ($n=3$) ．

また，実験終了後の海馬スライスは，ヘマトキシリン-エオシン染色 (H-E 染色) を行い，レーザー照射部位の細胞組織の状態を確認する．H-E 染色の手順は次のとおりである．まず，染色前の処置として，以下の作業を行う．

1. 実験終了後の海馬スライスを 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液に一晩浸ける．
2. さらに 30%スクロース水 (0.1%りん酸緩衝液でスクロースを溶かす) に一晩以上浸ける (浸ける期間の目安としては，水面に浮いているスライスが完全に沈むまでである) ．
3. ミクロトームを用いて元のスライス (厚さ $400\mu\text{m}$) から，厚さ約 $40\sim 60\mu\text{m}$ のスライスを作成する ．
4. 手順 3 で作成したスライスをスライドガラスに載せ，1%ゼラチン水で固定する ．

スライドガラスにスライスが固定された後に染色に移る．染色の手順は，以下のようなになる ．

1. マイヤーヘマトキシリン溶液に5分間浸ける。
2. 純水で洗浄する。
3. エオシン Y 溶液に5分間浸ける。
4. 純水で洗浄する。
5. 濃度の異なるアルコール(70%, 80%, 95%, 100%)に順次浸ける(70%で2分間, 80%で1分間, 95%で2分間を1回と1分間を2回, 100%で5分間を3回)。
6. キシレン溶液に浸ける(5分間を3回)(キシレンは気化しやすく, 毒性もあるためドラフトチャンバー内で行う)。
7. カバーガラスで封入する。

5.2 実験結果

ACSF を切り替える前の, 正常かつ活性が回復した海馬スライスにおける, 電流刺激に対する応答を図 5.11 の左に示す。図は, 刺激電極と記録電極をどちらも DG 領域に設置して得た記録である(図 5.9 の状態)。電流刺激直後のアーチファクトに続いて, 丸印で囲んだ部分にシナプス電位と活動電位が記録されていることが確認できる。正常な海馬スライスでは CA3 領域においても同じような応答が確認できる。

図 5.11 の右は, Normal ACSF から High potassium ACSF に切り替え, 十分な時間が経過した後の, CA3 領域の電位記録である。電流刺激は行っていない(刺激によるアーチファクトがない)が, シナプス電位や活動電位とは波形が明確に異なる応答(てんかん様放電)が確認できる。この図は, てんかん様放電の波形を正確に見るために時間軸を拡大しているが, 実際の記録では時間軸が大きくなるため, 図 5.12 のような波形が記録される。この図において, 一本の線のように見える大きな振幅の波一つ一つが, 図 5.11 で示したてんかん様放電である。

5.1.3 で述べたように, てんかん様放電の自発が確認できた後に, レーザー照射を行う。レーザー照射中の CA3 領域での電位記録を図 5.12 と図 5.13 に示す。赤の四角で囲まれた領域がレーザー照射をしている部分であり, それ以外の部分が照射前後の記録となる。図 5.12 はパルスエネルギーが $14.1\text{mJ}/\text{cm}^2$ の実験結果である。てんかん様放電の頻度や振幅について, 照射開始からしばらくはほぼ変化がないが, 途中から振幅は小さくなり, 頻度は上昇していることが確認できる。そして, 照射後には頻度と振幅どちらも減少している(照射前の頻度は約 6 回/分, 照射後は約 0.3 回/分, 振幅も約 10% 減少している)。図 5.13 は, パルスエネルギー $22.9\text{mJ}/\text{cm}^2$ の実験結果である。レーザー照射の途中から波形の急激な変化が起き

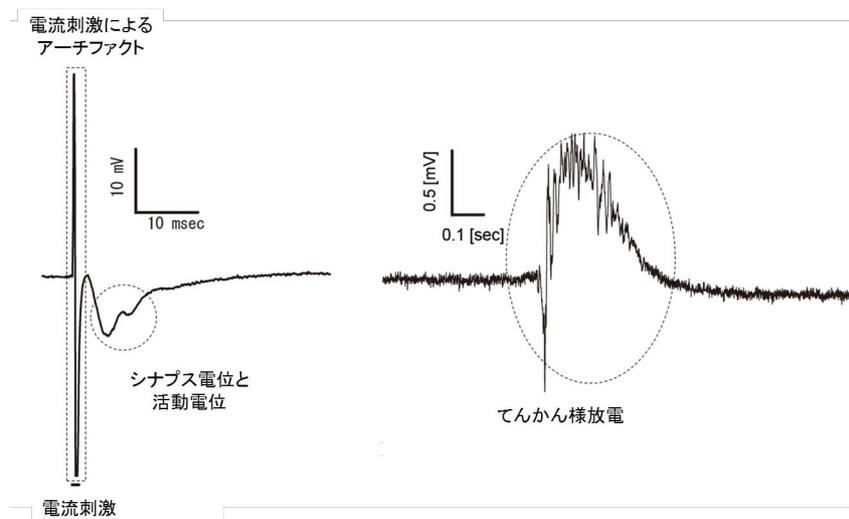


図 5.11: 左:正常時の電流刺激に対する DG 領域の応答 (シナプス電位と活動電位), 右:CA3 領域で記録した自発てんかん様放電 ([98] より一部を変更して引用). シナプス電位と活動電位は電流刺激によるアーチファクトの後に発生していることが確認できる (二つの電位が重なり合った合成活動電位である). 一方, てんかん様放電は, ACSF のカリウム濃度の上昇によって自発させたものであるため, 電流刺激を必要としない (刺激によるアーチファクトがない).

ている. この部分を拡大した図を図 5.14 に示す. 拡大図から, 振幅の減少, 頻度の一時的な増加が起きており, その後てんかん様放電が消失, 照射後の 3 分間では再発も起きていないことが確認できる.

図 5.15 と図 5.16, および図 5.17 と図 5.18 は, それぞれ図 5.12 と図 5.13 の実験におけるラット海馬スライスでのレーザー照射前後での拡大鏡写真であり, 丸で囲んだ部分がレーザー照射部分である. 光ファイバーを設置した状態では, 図 5.10 のように, 照射部分の状態が確認できないので, ファイバーを外した状態で撮影している. 照射後の画像はどちらも拡大鏡で観察できる範囲での変化 (熱損傷や組織の消失など) は確認できない.

図 5.19 に, パルスエネルギーを横軸に取り, てんかん様放電が消失するまでのレーザーの照射時間を縦軸に取ったグラフを示す. 赤点は, レーザー照射によっててんかん様放電が完全に消失し, 照射後 3 分間では再発を確認できなかった記録である. 一方, グラフ中の黒点および青点はそれぞれ, てんかん様放電が消失せず放電の様子も変化しなかった実験結果と, 放電の完全な消失は起きていないが頻度と振幅が照射前と比較して減少した実験結果の記録を示している. この図 5.19 の結果から, 本実験の結果をレーザーのパルスエネルギーを基準として 3 種類に分類した (図 5.19 中の破線および括弧の数字部分). それぞれの分類は, (1) パルスエネ

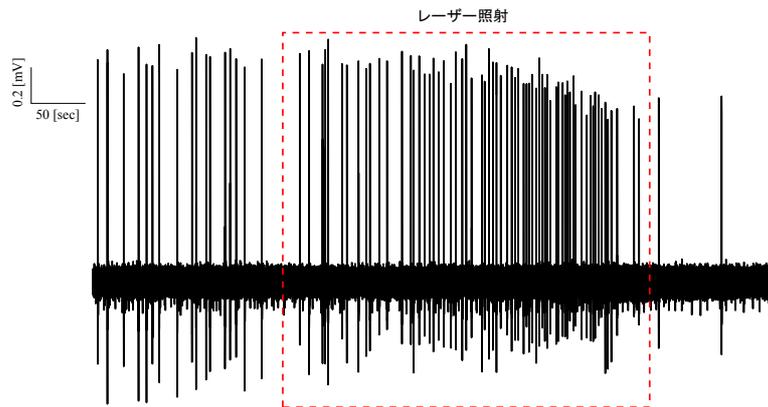


図 5.12: パルスエネルギー $14.1\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射時における CA3 領域の記録 ([98] より一部を変更して引用)．一本一本の大きな振幅の波形がそれぞれてんかん様放電を示している．照射開始からしばらくは変化が見られないが，途中からてんかん様放電の振幅は小さくなり，頻度が上昇している．照射終了後は振幅は減少したままとなり，頻度は照射前と比較しても小さくなっている．

ルギー $14\text{mJ}/\text{cm}^2$ 未満：効果なし，(2) パルスエネルギー $14\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以上 $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ 未満：部分破壊効果，(3) パルスエネルギー $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以上：完全破壊効果，と名付けた．それぞれレーザーの照射後のてんかん様放電の状態が照射前と比較して，変化なし，頻度・振幅の減少，完全な消失，の実験結果と対応している．

完全破壊効果を与えるレーザーの照射後に，電流刺激を行い DG 領域で電位記録を行った結果を図 5.20 に示す．完全破壊効果となるレーザーを照射した後は，CA3 領域では活動電位，シナプス電位およびてんかん様放電のいずれも確認されず，CA3 領域 (レーザー照射部分) の機能は完全に破壊されている．一方，DG 領域では，活動電位とシナプス電位の発生が確認でき，レーザー照射による破壊効果を受けていないことが分かる．

また，図 5.21 に図 5.13 の海馬スライスの H-E 染色後の顕微鏡画像を示す．丸で囲まれたレーザー照射部分 (CA3 領域) の赤色が照射していない部分よりも薄くなっていることが確認できる．さらに拡大した図 5.22 を見ると，レーザー照射をしていない領域よりも細胞間の隙間が大きくなっていることが確認できる．H-E 染色では細胞質の部分が赤く染まるため，レーザー照射部分では細胞質の減少が起きていることが分かる．この領域は，細胞死 (ネクローシス) が発生している．ネクローシスが起きているのは，照射部分周辺 (CA3 領域) のみであり，上記したレーザー照射後の電流刺激による記録において，DG 領域は刺激に対する応答があり，CA3 領域は応答が無い，という結果からもレーザー照射による破壊領域が CA3 領域周辺のみであることが分かる．

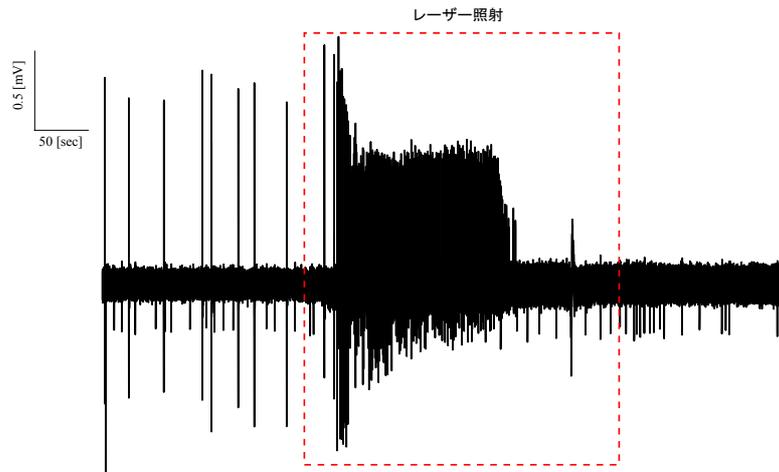


図 5.13: パルスエネルギー $22.9\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射時における CA3 領域の記録 ([98] より一部を変更して引用)．照射開始からすぐに，てんかん様放電の振幅が小さくなり，頻度は大きく上昇している．そして照射の途中でてんかん様放電は完全に消失し，照射後の3分間では再発が見られない．



図 5.14: 図 5.13 のレーザー照射中の部分を拡大した画像．元の図ではつぶれてしまっていたが，拡大図ではレーザー照射中にてんかん様放電の頻度が大きく上昇していることが明確に確認できる．放電の振幅についても照射の途中からさらに小さくなり，その後に消失したことが確認できる．

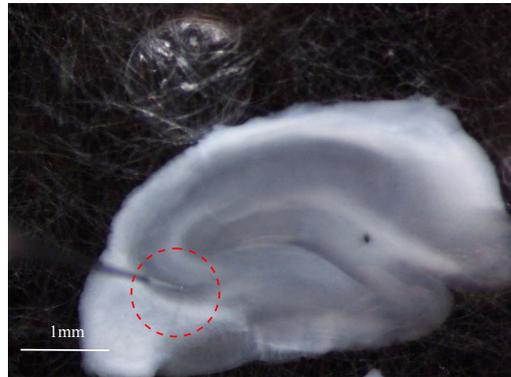


図 5.15: パルスエネルギー $14.1\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射時の海馬スライス (照射前)([98] より一部を変更して引用) . 赤の丸で囲んだ部分に記録用ガラス電極が設置しており, この部分に図 5.10 のように光ファイバーを設置する .

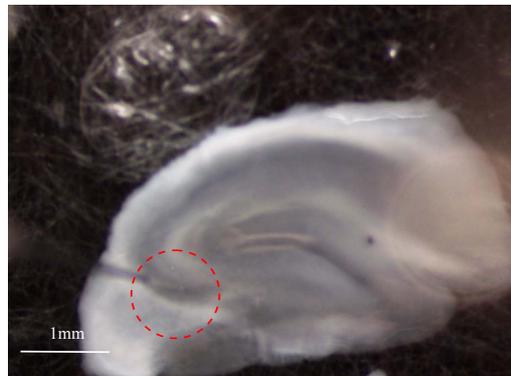


図 5.16: パルスエネルギー $14.1\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射時の海馬スライス (照射後)([98] より一部を変更して引用) . 拡大鏡で観察できる範囲では, レーザ照射による外見的な損傷 (焦げや組織の消失) は確認できない .

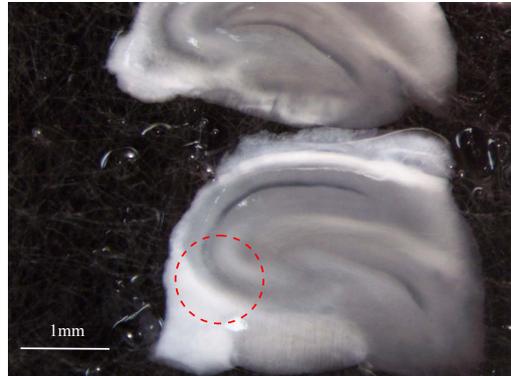


図 5.17: パルスエネルギー $22.9\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射時の海馬スライス (照射前)([98] より一部を変更して引用) . 図 5.15 と同様である .

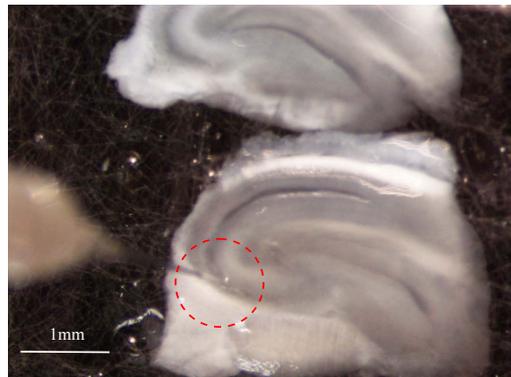


図 5.18: パルスエネルギー $22.9\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射時の海馬スライス (照射後)([98] より一部を変更して引用) . こちらも図 5.16 と同様に損傷は確認できない .

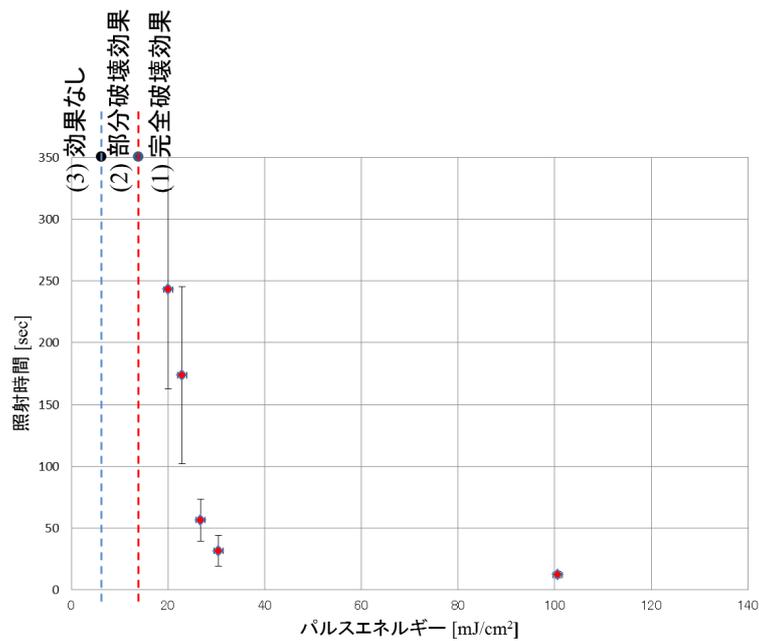


図 5.19: ラット海馬スライス実験での、パルスエネルギーとてんかん様放電の消失に必要な照射時間の関係 (n=3)([98] より一部を変更して引用) . 赤の記録はてんかん様放電の完全な消失と再発の起きていない記録, 青の記録は放電の頻度と振幅の減少した記録 (完全な消失はしていない), 黒の記録は放電の状態にほぼ変化が見られなかった記録を示しており, それぞれのレーザー照射による効果を, 完全破壊効果, 部分破壊効果, 効果なし, と名付けた .

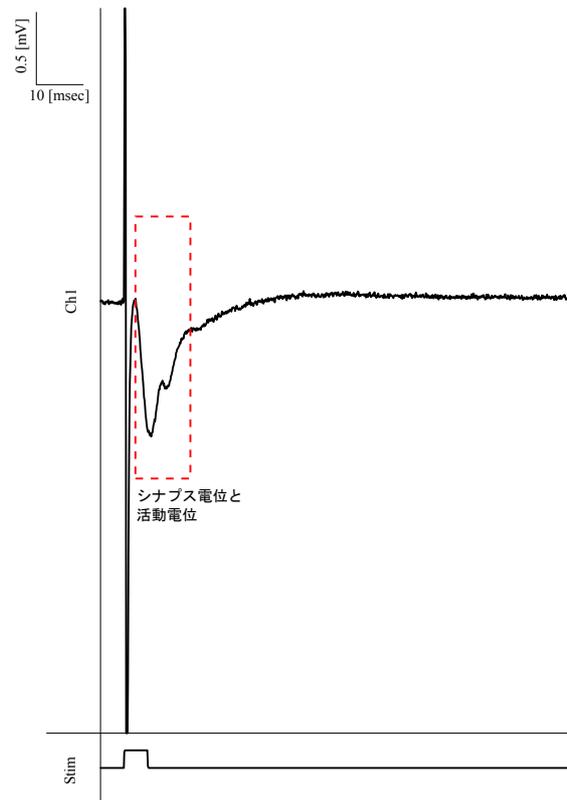


図 5.20: 完全破壊効果のレーザーを照射した後の DG 領域での電流刺激に対する応答記録 (刺激部分も DG 領域) . レーザー照射によって CA3 領域のてんかん様放電は消失している (CA3 領域の機能破壊が起きている) が , DG 領域では正常な電位記録が行えており , レーザー照射による破壊効果が DG 領域には及んでいないことが確認できる .

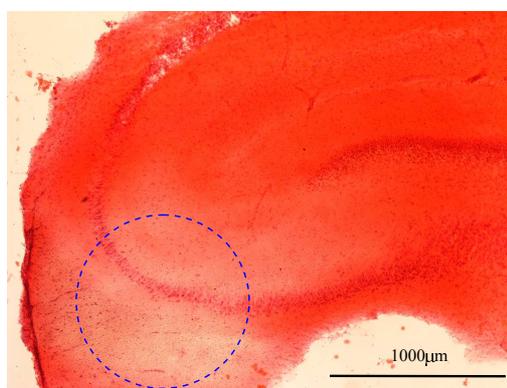


図 5.21: パルスエネルギー $22.9\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射後の海馬スライス H-E 染色画像 ([98] より一部を変更して引用) . 青丸で囲んだ部分がレーザー照射部分であり, その周辺領域の赤色が薄くなっている (細胞質が減少している) ことが確認できる .

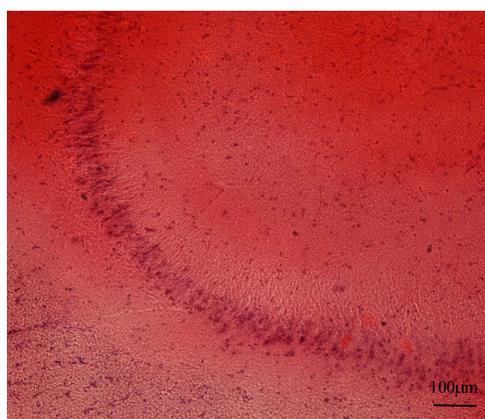


図 5.22: 図 5.21 のレーザー照射部分拡大画像 ([98] より一部を変更して引用) . 画像左下がレーザー照射部分である . 図 5.21 よりも明確に , レーザー照射部分の赤色が非照射部分と比べて薄くなっていることが分かる .

5.3 考察

4章で述べたように，細胞や神経に照射されたレーザー光の効果は，吸収されて熱的影響を与えるものと，光エネルギーそのものが影響を与えるものの2種類に大きく分けられ，レーザーの波長が大きな要因の一つであると考えられる．

ウシガエル坐骨神経の実験では，熱による坐骨神経の機能破壊が起きていると結論付けた．その裏付けとして，活動電位の伝播速度の上昇や，不可逆的な機能破壊が起きていること，および有髄・無髄の神経線維の照射時間の比較結果などを挙げている．加えて，拡大鏡画像による照射後の坐骨神経を見ても，照射部分の坐骨神経は乾燥しており，大きな発熱(坐骨神経の焼灼)は確認されていないものの，温度上昇は十分に考えられた．また，この実験では，拡大鏡画像から見た坐骨神経の乾燥している範囲や，記録電極の位置から，レーザー照射によって発生する熱は照射部分周辺には，ほぼ拡散していなかったと考えられる．実験で使用したレーザーは神経や細胞組織に吸収されやすい近赤外光の波長帯であるが，水にも良く吸収される．ウシガエル実験の場合は，坐骨神経表面を継続的にリンガー液で湿らせてはいなかったため，リンガー液が吸収して発生する熱についてはほぼ考える必要がなく，発生した熱は坐骨神経の吸収によるものがその大半であると考えてよい．

一方，本章の海馬スライス実験では，ラット海馬スライスの周辺(上下も含む)をACSFが灌流する構造の実験装置を用いているので，レーザー光はラット海馬スライスだけではなくACSFにも照射されており，ACSFがレーザー光を吸収して発熱している可能性が十分に考えられる．したがって，熱的影響は海馬スライスが吸光したことで発生する熱と，ACSFから発生する熱の2種類を考えなければならない．しかしながら，実験中はチャンバ内には常にACSFが流れ続けているため，発生した熱は即座に拡散してしまうとも考えられる．海馬スライス実験で照射したレーザーの出力は，ウシガエル実験よりもさらにエネルギーが小さく，かつ照射時間も最大で5分間と短いので，その発熱量もウシガエル実験よりもさらに小さいと考えてよい．拡大鏡画像からも熱による外見的な損傷は確認していないが，海馬スライスの温度計測は行っていないので，正確な温度変化は不明である．そのため，本実験ではレーザー光の吸収による熱損傷が発生したかという点については結論付けることはできないが，大きな熱の発生は無いと考えられる．

光エネルギーそのものが細胞に与える効果は，研究が続けられてはいるものの未解明な部分が多く，発生機序や原因等は未だ不明である．現在のところ，イオンチャネルの開閉機構に与える機械的影響，細胞内小器官への影響などが考えられている[5, 4, 59, 60, 73, 71]．本実験においても，レーザー光そのものの影響による，イオンチャネル開閉機能の抑制や破壊もしくは細胞膜の破壊等が起き，その結果としてシナプス電位，活動電位，およびてんかん様放電の発生が抑制されたとも考えられる．これらの効果の裏付けとして，まず，図5.12および図5.13の照射途中から，てんかん様放電の振幅の減少と頻度の増加が起きている点が挙げ

られる．この実験では，集合電位記録法を取っており，ガラス電極周辺の複数の細胞の電位が記録されている．振幅の減少は，レーザー照射によってこれらの細胞のいくつかは破壊されたことによるものと考えてよい．一方，頻度の増加については，レーザー照射によって光刺激が誘発されていると考えられる．光刺激は，[53, 54, 56, 57, 58]等の報告で見られるように，レーザー光の光エネルギーによって細胞のイオンチャンネル開閉機構に影響を与えることで発生していると考えられている．電流刺激のようにアーチファクトが存在しないため，明確に結論付けることはできないが，2つの図のレーザー照射中のてんかん様放電の頻度は明らかに照射前よりも増加しており，レーザー照射による光刺激によって，てんかん様放電が誘発されていることは十分に考えられる．レーザー光のエネルギーの上昇や長時間の照射に伴って，チャンネルや細胞膜に与える影響も大きくなり，最終的に照射部位の細胞のいくつか，もしくはほぼ全ての細胞が破壊され，結果としててんかん様放電が消失したと考えられる．また，H-E染色の結果から得られた細胞損傷の状態も，レーザー照射が細胞膜に影響を与えたことを示唆している．5.2で示したように，レーザー照射後の海馬スライスでは細胞質の減少が起きており，これは細胞膜が破壊されたことで，細胞内の物質が流れ出てしまった(ネクローシスが発生した)と考えられる．上記のように，光エネルギーが細胞膜やイオンチャンネルに効果を及ぼし，破壊してしまったと考えれば，このH-E染色も妥当な結果であると言える．

今回の実験では最大照射時間を5分間としているが，5.2のグラフで示した分類(1)や(2)に当たるパルスエネルギーの場合でも，より長時間の照射を行うことで，分類(3)と同様の完全破壊効果を与える可能性がある．一方，より高出力なパルスエネルギーの場合，より短時間の照射で破壊効果を得られると考えられるが，この場合は発生する熱も大きくなると考えられるため，上記で述べた光エネルギーだけでなく温度による影響も考慮しなければならなくなる可能性がある．今回の実験で考慮されていない点として，レーザー光の浸透深さと長期的観測の点が挙げられる．浸透深さの程度は，吸光率と同様に照射対象と波長によって変動するが，一般的に高出力なレーザー光ほどより深くまで浸透するとされている．レーザー照射後は3分間しか経過観察をしていないので，より長時間経過後の細胞の状態，てんかん様放電の回復や電流刺激に対する応答の変化が起きる可能性はある．

第6章 結論

本研究では、てんかん外科手術の新しい手術法の提案に向けた基礎的研究を目的とし、半導体パルスレーザー照射による、ウシガエル坐骨神経およびラット海馬スライス信号伝播機能の不可逆的な破壊についての実験を行った。以下に得られた成果を述べる。

まず2章では、実験対象となる細胞および神経についての構造、発火の原理や信号の伝播経路等について説明し、さらに、てんかんという疾患についての概要と既存の薬物治療と外科手術について述べた。そして、現在の外科手術法では、長時間・複数回の開頭手術、長期に渡る入院や後遺障害のリスクなどの問題点があり、レーザー照射を用いた外科手術を提案することで、これらの問題点が解決可能であることを示唆した。

3章では、レーザー発振の原理と本実験で使用する半導体パルスレーザーの構造・特徴について述べた。また、細胞や神経組織に対するレーザー照射の効果および医療分野における利用例についての既存研究を紹介した。これらの研究報告では、レーザーの出力によって利用方法を大まかに分けることができ、高出力レーザーは、レーザーメスや静脈瘤の除去などのレーザー照射によって得られる発熱や物理的な損傷を目的として利用されている。一方、本研究で使用するレーザーも含まれる、低出力レーザー照射は近年特に注目を集めている分野である。低出力レーザー照射については未解明な部分が多いが、熱的、破壊的な効果は与えず、細胞内小器官やイオンチャネル等に影響があると検討されている。その医療利用は様々であり、疼痛の抑制、細胞や組織の再生促進・活性化、投薬効果の増大などの効果が報告されている。てんかん外科手術へのレーザー照射適用を考えた場合、てんかん原性域は破壊するが周辺の正常領域は破壊しない、というレーザー出力のデリケートな調整が求められる。しかしながら、出力の高低の境界が明確でなく、高出力と低出力の利用例が極端であるため、既存の研究報告だけでは知見が不足している。低出力レーザー照射の研究において、神経や軸索の機能の遮断・抑制に関する報告も見られるが、一時的な抑制でしかなく本研究の目的とは合致していない。したがって、出力の低いレーザー照射による、細胞や神経の信号伝播機能の不可逆的な破壊について実験的に確認する必要があることを示した。

4章では、本研究の基礎的検討として、ウシガエル坐骨神経を電流刺激して発生させた活動電位の伝播をレーザー照射によって阻害する実験を行った。最大照射時間は60分とし、レーザーのパルスエネルギーを変化させて実験を行った結果、パルスエネルギーを 32.3mJ/cm^2 以上にして照射を行うことで、坐骨神経の信号伝播

機能を破壊し、活動電位の伝播を阻害できることを確認した。実験では、レーザー照射部位の前後 10mm 前後の 2ヶ所に記録電極 (Ch1 および Ch2) を設置しており、2 点の記録を比較することでレーザー照射による神経の機能破壊と、機能破壊の起きた神経細胞の部位がレーザー照射部分周辺の小さな領域 (10mm 以下程度) に限定されていることを示した。また、坐骨神経に含まれる有髄神経線維と無髄神経線維のレーザー照射に対する耐性についても確認しており、無髄神経線維の方がより短時間のレーザー照射で機能破壊が可能であることを確認した。これは、髄鞘を持つ有髄繊維と持たない無髄繊維の構造によるものであると考えられる。本実験で用いる半導体レーザーの波長は、水や細胞組織等の吸光率が高く発熱しやすい波長帯である 808nm であり、最大出力による照射実験では、坐骨神経の焼灼が確認された。また、レーザー照射前後での活動電位伝播速度の上昇や有髄・無髄神経線維への効果から、この実験ではレーザー照射による熱の効果が大きいと結論付けた。しかしながら、上述した $32.3\text{mJ}/\text{cm}^2$ 程度のレーザー照射においては、ある程度の発熱は起きていると考えられるが、肉眼で確認できる熱損傷や神経の過剰な乾燥は確認されなかった。この結果は、比較的低出力なレーザー照射であれば、大きな発熱を伴わない細胞の機能破壊の可能性を示唆していると言える。

5 章では、4 章の実験からレーザー照射によって神経細胞機能の不可逆的な破壊が可能である、という結果が得られた事を受けて、てんかん様放電を自発させたラット海馬スライス CA3 領域にレーザー照射を行い、CA3 領域の機能破壊によるてんかん様放電の消失実験に移った。レーザーの最大照射時間は 5 分間とし、ウシガエルの実験と同様にパルスエネルギーを変化させてレーザー照射を行った。この実験では、パルスエネルギー $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以上のレーザーを照射することで、CA3 領域の細胞機能を破壊し、てんかん様放電の消失が可能であることを確認した。実験では完全破壊効果以外に部分破壊効果と名付けた結果も得られており、 $14\text{mJ}/\text{cm}^2$ 以上、 $20\text{mJ}/\text{cm}^2$ 未満のレーザー照射では、てんかん様放電の頻度と振幅の減少が見られた。本実験においても、4 章の実験と同様にレーザー照射によって起こる機能破壊の範囲と発熱についての検討を行っているが、ウシガエル実験よりもさらに低出力なレーザー照射で機能破壊が起きている点、海馬スライスの周囲は常に ACSF が流れ続けている点、拡大鏡画像による観察の 3 点から発熱量はさらに小さいはずであり、光エネルギーによる効果によって細胞の機能破壊が起きていると考えた。機能破壊の範囲は、照射部位である CA3 領域周辺 (光ファイバーの直径とほぼ同程度) のみと考えられ、DG 領域には破壊がおよんでいないことを確認した。発熱についても、また、実験後に H-E 染色による組織の変性についても確認を行った。染色結果から、レーザー照射部分とその周辺ではネクローシスが起きていると考えられる。このネクローシス部分は、CA3 領域 (照射部分) のみであることから、レーザー照射によって細胞破壊が起きていることに加えて、上でも述べた機能破壊の範囲が CA3 領域のみである、という点の裏付けにもなっていると言える。

以上に述べてきたことから、波長 808nm の半導体連続パルスレーザーを用いて、

特定の出力以上のレーザー照射を行うことで、神経細胞の不可逆的な機能破壊、活動電位およびてんかん様放電の消失と伝播阻害が可能であることを本論文は示した。さらに、てんかん外科手術への適用を考えた場合、レーザー照射手術法のいくつかの特徴が実験結果から得られた。まず、脳組織はその多くが無髄神経線維で構成されていると言われており、レーザー照射の効果が及びやすいのも無髄神経線維であるので、レーザー照射は脳に対する手術法として有効であると考えられる。次に、大きな熱損傷の無い比較的低出力なレーザーであっても短時間(数分間)の照射で十分な効果(機能破壊)が得られるので、手術の短時間化の可能性を持っている。さらに、レーザー照射による機能破壊効果が広い範囲まで拡大せず、照射部分周辺のみにも留まっているので、対象部分のみを正確に機能破壊することが可能である。これは一方で、パルスエネルギーと照射時間を手術ごとに変更することで、様々な目的の手術に適応可能であることも意味している。照射部位が深部にあり、周辺の細胞や浸透による影響を避ける場合は低出力・長時間照射で損傷を最大限に避け、照射時間の長期化による影響(組織の乾燥など)を避ける場合は高出力・短時間照射、といったように照射部位や目的とする破壊領域などに対して、柔軟な対応が可能である。レーザー照射による細胞破壊はネクローシスを引き起こしているため、破壊領域周辺の細胞への悪影響が懸念されるが、これは既存の手術法においても同様であり、脳の一部を損傷する以上、この問題を完全に回避することは困難である。また、今回の実験では、正確な発熱量の計測、レーザーの浸透深さの確認や3次元的な機能破壊領域の確認など検討されていない点が残っている。加えて、近赤外光の連続パルスレーザーのみを使用したか、3章で述べた関連研究報告からも示されるように、波長や照射方法など検討すべきパラメータは多く存在する。これは、課題が山積しているといえるが、レーザー照射による外科手術法確立の可能性が未だ十分に残されているともいえる。本研究で得られた知見は決して多くはないが、今後のさらなる研究のための一つの知見となるはずである。

謝辞

本研究を遂行するにあたり，昼夜を問わず懇切丁寧なご指導を賜りました九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報専攻 堀尾 恵一准教授と九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報専攻 山川 烈名誉教授(一般財団法人 ファジィシステム研究所理事長・所長)に心から感謝いたします。

実験を行う際のご指導，並びに本論文をまとめるにあたり，有意義なご助言とご討論をいただいた，九州工業大学大学院生命体工学研究科脳情報専攻 石塚 智准教授，粟生 修司教授および Zimin Lev Grigorievich 博士に心から謝意を申し上げます。

また，研究に対する意見や激励だけでなく，公私共にお世話になり，共に研究を続けてきた山川研究室，堀尾研究室および石塚研究室の皆様，そして実験動物の飼育管理等でもお世話になった九州工業大学技術職員の伊藤 康子様感謝いたします。

最後に，博士取得までの長い期間にわたり優しく見守ってくれた両親と家族に心から感謝します。

なお，この博士論文は，平成 20 年度採択特別推進研究『ソフトコンピューティング技術による「てんかん」原性域の特定と低侵襲治療法の確立』における低侵襲治療法の基礎研究として実施いたしました。関係各位ならびに関係部署に深く感謝いたします。

参考文献

- [1] 兼本 浩祐, てんかん学ハンドブック第2版, 医学書院, 2006.
- [2] 日本てんかん学会法的问题検討委員会, “道路交通法改正にともなう運転適性の判定について,” てんかん研究, vol. 20, no. 2, pp. 135-138, 2002.
- [3] Fishman AJ, Moreno LE, Ivera A, Richter CP, “CO₂ Laser Fiber Soft Cochleostomy: Development of a Technique Using Human Temporal Bones and a Guinea Pig Model,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 42, no. 3, pp. 245-256, 2010.
- [4] Matsuda Y, Niwa M, Iwai H, Kogure S, Honjoe N, Komatsu M, Ishii Y, Watanabe K, “Effects of Argon Laser Irradiation on Polar Excitations in Frog Sciatic Nerve,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 38, pp. 608-614, 2006.
- [5] Tsuchiya K, Kawatani M, Takeshige C, Sato T, Matsumoto I, “Diode laser irradiation selectively diminishes slow component of axonal volleys to dorsal roots from the saphenous nerve in the rat,” *Neuroscience Letters*, vol. 161, pp. 65-68, 1993.
- [6] 葛西 眞一, 山本 康弘, 小谷 裕美, 安藤 修敏, 神谷 和則, 河野 透, “損傷・潰瘍の治療,” 日本レーザー医学会誌, vol. 18, pp. 27-34, 1997.
- [7] 目澤 修二, “低出力レーザーの鎮痛効果および骨組織形成促進効果に関する研究,” 日本レーザー医学会誌, vol. 17, pp. 43-50, 1996.
- [8] Czopf J, Redei T, Kellenyi L, Kozma L, “Human neuronogram and cortical potentials evoked by laser impulses,” *Lasers in the Life Sciences*, vol. 3, no. 2, pp. 71-82, 1989.
- [9] Allegre G, Avriillier S, Albefessard D, “Stimulation in the rat of a nerve-fiber bundle by a short UV pulse from an excimer-laser,” *Neuroscience Letters*, vol. 180, no. 2, pp. 261-264, 1994.
- [10] 杉 晴夫, 宮崎 俊一, 岩村 吉晃, 金子 章道, 栗原 敏, 中山 貢一, 吉岡利忠, 明間 立雄, 人体機能生理学, 南江堂, 1985 .

- [11] Gordon MS, The synaptic organization of the Brain 5th edition, Oxford University Press, 2003.
- [12] Bruce Alberts, Dennis Bray, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, Essential 細胞生物学, 南江堂, 1999.
- [13] Michael G White, Michael Emery, Doris Nonner, John N Barrett, “Caspase activation contributes to delayed death of heat-stressed striatal neurons,” *Journal of Neurochemistry*, vol.87, pp.958-968, 2003.
- [14] 今堀 和友, 山川 民夫, 生化学辞典 第4版, 東京化学同人, 2007.
- [15] 高橋 幸利, アトラスてんかんの発作間欠・発作時の脳波を読む, 診断と治療社, 2007.
- [16] 井上 有史, 日本てんかん学会ガイドライン作成委員会 “日本てんかん学会ガイドライン作成委員会報告 成人てんかんにおける薬物治療ガイドライン,” てんかん研究, vol. 23, no. 3, pp. 249-253, 2005.
- [17] Luders HO, Textbook of epilepsy surgery, INFORMA, United Kingdom, 2008.
- [18] 横田 英典, 小黒 恵司, 渡辺 英寿, “てんかん外科の術前診断の現状,” 脳神経外科ジャーナル, vol. 16, no. 3, pp. 164-170, 2007.
- [19] 馬場 好一, “てんかん外科における侵襲的術前評価: 術中皮質脳波から慢性頭蓋内脳波まで,” 脳神経外科ジャーナル, vol.16, no. 3, pp. 171-176, 2007.
- [20] 高倉 公朋, 菊池 晴彦, 先端医療シリーズ 16 脳神経外科 機能的神経外科の最先端, 先端医療技術研究所, 2002.
- [21] 板倉 徹, 定位脳手術入門, 医学書院, 2005.
- [22] 亀山 茂樹, 日本てんかん学会ガイドライン作成委員会, “日本てんかん学会ガイドライン作成委員会報告 新皮質てんかんの外科治療ガイドライン,” てんかん研究, vol. 23, no. 2, pp. 167-170, 2005.
- [23] 亀山 茂樹, 師田 信人, 福多 真史, 大石 誠, 増田 浩, “新皮質てんかんに対する裁断的皮質切除術: 術前評価, 手術適応と手術成績,” 脳神経外科ジャーナル, vol.11, no. 9, pp.584-591, 2002.
- [24] 三國 信啓, 橋本 信夫, “皮質てんかん原性焦点に対する切除術,” 脳神経外科ジャーナル, vol. 15, no. 3, pp. 195-202, 2006.
- [25] 川合 謙介, “側頭葉てんかんに対する切除術: 求められる手術成績とその向上のために,” 脳神経外科ジャーナル, vol. 15, no. 1, pp. 27-35, 2006.

- [26] Penfield W, Baldwin M, “Temporal lobe seizures and the technic of subtotal temporal lobectomy,” *Annals of Surgery*, vol. 136, no.4, pp. 625-634, 1952.
- [27] Wieser HG, Yasargil MG, “Selective amygdalohippocampectomy as a surgical treatment of mesiobasal limbic epilepsy,” *Surgical Neurology*, vol. 17, no. 6, pp. 445-457, 1982.
- [28] Wieser HG, “Selective amygdalo-hippocampectomy for temporal lobe epilepsy,” *Epilepsia*, vol. 29, no. 2, pp. S100-113, 1988.
- [29] Regis J, Bartolomei F, Hayashi M, Roberts D, Chauvel P, Peragut JC, “The role of gamma knife surgery in the treatment of severe epilepsies,” *Epileptic Disord*, vol. 2, no. 2, pp. 113-122, 2000.
- [30] Regis J, Rey M, Bartolomei F, Vladyka V, Liscak R, Schrottner O, Pendl G, “Gamma knife surgery in mesial temporal lobe epilepsy: a prospective multicenter study,” *Epilepsia*, vol. 45, no. 5, pp. 504-515, 2004.
- [31] 清水 弘之, 脳を守るためのてんかん手術, 日本文化科学社, 2005.
- [32] 清水 弘之, “てんかん外科における MST(multiple subpial transection) の意義: 現状と展望を踏まえて,” 脳神経外科ジャーナル, vol. 11, no. 6, pp. 389-395, 2002.
- [33] Benifla M, Otsubo H, Ochi A, Snead OC III, Rutka JT, “Multiple subpial transections in pediatric epilepsy: indications and outcomes,” *Child’s Nervous System*, vol. 22, no. 8, pp. 992-998, 2006.
- [34] Morrell F, Whisler WW, Bleck TP, “Multiple subpial transection: a new approach to the surgical treatment of focal epilepsy,” *Journal of Neurosurgery*, vol. 70, no. 2, pp. 231-239, 1989.
- [35] 清水 弘之, “海馬多切術の手術手技,” 脳神経外科ジャーナル, vol. 15, no. 1, pp. 51-56, 2006.
- [36] Shimizu H, Kawai K, Sunaga S, Sugano H, Yamada T, “Hippocampal transection for treatment of left temporal lobe epilepsy with preservation of verbal memory,” *Journal of Clinical Neuroscience*, vol. 13, no. 3, pp. 322-328, 2006.
- [37] 馬場 啓至, 小野 智慧, 戸田 啓介, 馬場 史郎, “脳梁離断術の歴史と手術適応,” 脳神経外科ジャーナル, vol. 16, no. 3, pp. 177-183, 2007.
- [38] Asadi-Pooya AA, Sharan A, Nei M, Sperling MR, “Corpus callosotomy,” *Epilepsy and Behavior*, vol. 13, no. 2, pp. 271-278, 2008.

- [39] Reutens DC, Bye AM, Hopkins IJ, Danks A, Somerville E, Walsh J, Bleasel A, Ouvrier R, MacKenzie RA, Manson JI, “Corpus callosotomy for intractable epilepsy: seizure outcome and prognostic factors,” *Epilepsia*, vol. 34, no. 5, pp. 904-909, 1993.
- [40] 川合 謙介, 清水 弘之, “難治性てんかんに対する大脳半球切除術と大脳半球離断術,” *脳神経外科ジャーナル*, vol. 16, no. 3, pp. 184-193, 2007.
- [41] Binder DK, Schramm J, “Transsylvian functional hemispherectomy,” *Child’s Nervous system*, vol. 22, no. 8, pp. 960-966, 2006.
- [42] 川合 謙介, “難治性てんかんに対する迷走神経刺激法の現状,” *脳神経外科ジャーナル*, vol. 16, no. 3, pp. 194-202, 2007.
- [43] Schachter SC, Saper CB, “Vagus nerve stimulation,” *Epilepsia*, vol. 39, no. 7, pp. 677-686, 1998.
- [44] Loddenkemper T, Pan A, Neme S, Baker KB, Rezai AR, Dinner DS, Montgomery EB Jr, Luders HO, “Deep brain stimulation in epilepsy,” *Journal of Clinical Neurophysiology*, vol. 18, no. 6, pp. 514-532, 2001.
- [45] Imoto H, Fujii M, Uchiyama J, Fujisawa H, Nakano K, Kunitsugu I, Nomura S, Saito T, Suzuki M, “Use of a Peltier chip with a newly devised local brain-cooling system for neocortical seizures in the rat. Technical note,” *Journal of Neurosurgery*, vol. 104, no. 1, pp. 150-156, 2006.
- [46] Yang XF, Rothman SM, “Focal cooling rapidly terminates experimental neocortical seizures,” *Annals of Neurology*, vol. 49, no. 6, pp. 721-726, 2001.
- [47] 平田 照二, わかる半導体レーザーの基礎と応用, CQ 出版社, 2001.
- [48] 羽根 一博, 光工学, コロナ社, 2006.
- [49] 黒澤 宏, レーザー基礎の基礎, オプトロニクス社, 1999.
- [50] Alfred V, Vasan V, “Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues,” *Chemical Reviews*, vol. 103, no. 2, pp. 577-644, 2003.
- [51] Dianxue Z, Hefu C, Jindong W, “The clinical study of percutaneous disc decompression of treating herniation of cervical disc with Nd:YAG laser,” *Proceedings of the SPIE-the International Society for Optical Engineering*, vol. 596, pp. 5967Y1-7, 2005.

- [52] Kotter R, Schubert D, Dyhrfeld-Johnsen J, Luhmann HJ, Staiger JE, “Optical release of caged glutamate for stimulation of neurons in the in vitro slice preparation,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, no. 1, pp. 11003, 2005.
- [53] Mahadevan-Jansen A, Mariappan K, Albea J, Konrad PE, Duco JE, “Optical stimulation of neural tissue,” *2003 IEEE LEOS Annual Meeting Conference Proceedings*, vol. 1, pp. 372, 2003.
- [54] Wells J, Kao C, Jansen ED, Konrad P, Mahadevan-Jansen A, “Application of infrared light for in vivo neural stimulation,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 10, no. 6, pp. 64003, 2005.
- [55] Safavi-Farokhi Z, Bakhtiary AH, “The effect of infrared laser on sensory radial nerve electrophysiological parameters,” *Electromyography and Clinical Neurophysiology*, vol. 45, no. 6, pp. 353-356, 2005.
- [56] Rhee AY, Li G, Wells J, Jonathan K, Joseph PY, “Photostimulation of sensory neurons of the rat vagus nerve - art. no. 68540E,” *Conference on Optical Interactions with Tissue and Cells XIX*, 2008.
- [57] Katz E, Kim D, Ilev I, Krauthamer V, “Effects of optical irradiation parameters on safe peripheral nerve stimulation with infrared light,” *Conference on Photons and Neurons*, 2009.
- [58] Tozburun S, Cilip CM, Lagoda GA, Burnett AL, Fried NM, “Continuous-wave ingfrared optical nerve stimulation for potential diagnostic applications,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 15, no. 5, pp. 55012, 2010.
- [59] 齋藤 勇, “低出力レーザー照射が神経細胞の細胞内小器官におよぼす影響 -特に共焦点レーザー顕微鏡による観察-,” *奥羽大医学誌*, vol. 34, no. 1, pp. 27-38, 2007.
- [60] 茂呂 祐利子, 中川 敏浩, 安部 仁晴, 齋藤 勇, 山本 茂久, “培養細胞の増殖におよぼすレーザーの出力とエネルギー密度に関する研究,” *奥羽大医学誌*, vol. 30, no. 4, p. 271-279, 2003.
- [61] Carnegie DJ, Stevenson DJ, Mazilu M, Gunn-Moore F, Dholakia K, “Guided neuronal growth using optical line traps,” *Optics Express*, vol. 16, no. 14, pp. 10507-10517, 2008.
- [62] Rao GN, Kulkarni SS, Koushika SP, Rau KR, “In vivo nanosecond laser axotomy: cavitation dynamics and vesicle transport,” *Optics Express*, vol. 16, no. 13, pp. 9884-9894, 2008.

- [63] Difato F, Dal MM, Marconi E, Ronzitti G, Maccione A, Fellin T, Berdondini L, Chierigatti E, Benefenati F, Blau A, “Combined optical tweezers and laser dissector for controlled ablation of functional connections in neural networks,” *Journal of Biomedical Optics*, vol. 16, no. 5, pp. 51306, 2011.
- [64] Shamir MH, Rochkind S, Sandbank J, Alon M, “Double-blind randomized study evaluating regeneration of the rat transected sciatic nerve after suturing and post operative low-power laser treatment,” *Journal of Reconstructive Microsurgery*, vol. 17, no.2, pp. 133-137, 2001.
- [65] Giuliani A, Lorenzini L, Gallamini M, Massella A, Giardino L, Calza L, “Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress,” *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 9, pp. 8, 2009.
- [66] Rochkind S, El-Ani D, Nevo Z, Shahar A, “Increase of neuronal sprouting and migration using 780 nm laser phototherapy as procedure for cell therapy,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 41, no. 4, pp. 277-281, 2009.
- [67] Hellman AN, Vahidi B, Kim HJ, Mismar W, Steward O, Jeon NL, Venugopalan V, “Examination of axonal injury and regeneration in micropatterned neuronal culture using pulsed laser microbeam dissection,” *Lab on a Chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2083-2092, 2010.
- [68] Zhang LX, Tong XJ, Yuan XH, Sun XH, Jia H, “Effects of 660-nm Gallium-Aluminum-Arsenide low-energy laser on nerve regeneration after acellular nerve allograft in rats,” *Synapse*, vol. 64, no. 2, pp. 152-160, 2010.
- [69] Putilina MV, Kozlov VI, Vakhtin VI, “Clinical efficiency of applying low-intensity laser therapy in treating dyscirculatory encephalopathy,” *Low-level laser therapy*, vol. 4422, pp. 98-101, 2001.
- [70] Basford JR, Hallman HO, Matsumoto JY, Moyer SK, Buss JM, Baxter GD, “Effects of 830 nm continuous-wave laser-diode irradiation on median nerve function in normal subjects,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 13, no. 6, pp. 597-604, 1993.
- [71] Nicolau RA, Martinez MS, Rigau J, Tomas J, “Neurotransmitter release changes induced by low power 830 nm diode laser irradiation on the neuromuscular junctions of the mouse,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 35, no. 3, pp. 236-241, 2004.

- [72] Nuevo CLRB, Nicolau RA, Zangaro RA, Brugnera A, Pacheco MTT, "Effect of far infrared therapy on inflammatory process control after sciatic crushing in rats," *2nd International engineering Conference on Light-Activated Tissue Regeneration and Therapy*, 2007.
- [73] Mochizuka-Oda N, Kataoka Y, Yamada I, Awazu K, "Effects of near-infrared laser on neural cell activity," *AIP Conference Proceedings*, vol. 716, pp. 192-195, 2004.
- [74] Chow RT, David MA, Armati PJ, "830 nm laser irradiation induces varicosity formation, reduces mitochondrial membrane potential and blocks fast axonal flow in small and medium diameter rat dorsal root ganglion neurons: implications for the analgesic effects of 830 nm laser," *Journal of the Peripheral Nervous System*, vol. 12, no. 1, pp. 28-39, 2007.
- [75] Seiryu M, Deguchi T, Fujiyama K, Sakai Y, Daimaruya T, Takano-Yamamoto T, "Effects of CO₂ laser irradiation of the gingiva during tooth movement," *Journal of Dental Research*, vol. 89, no. 5, pp. 537-542, 2010.
- [76] Gallar J, Acosta MG, Gutierrez AR, Belmonte C, "Impulse activity in corneal sensory nerve fibers after photorefractive keratectomy," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 48, no. 9, pp. 4033-4037, 2007.
- [77] Holz FG, Ronacher B, Krahe R, "UV-laser ablation of sensory cells in living insects," *Applied Physics A-Materials Science and Processing*, vol. 68, no. 4, pp. 379-385, 1999.
- [78] Akchurin GG, Akchurin GG, Seliverstov GA, Trofimov AY, "Technology and mechanism of neuron inactivation by N-2 laser radiation ($\lambda=337$ nm), mercury-vapor lamp ($\lambda=365$ nm) and low-coherence UV-A sun radiation," *Conference on Photonic Therapeutics and Diagnostics*, 2005.
- [79] Akchurin GG, Seliverstov GA, Pravdin A, Akchurin GG, Trofimov AY, "UV-A fiber-optic technique of the local function injury of the bundle of axons using radiation of N-2 laser ($\lambda=337$ nm)," *Saratov Fall Meeting 2004: Optical Technologies in Biophysics and Medicine VI Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers*, vol. 5771, pp. 349-352, 2005.
- [80] Xiaosen L, Jiangang L, Chunkan T, Xiufeng L, Lingyan C, Weimin P, Zhonghua S, Jian L, Xiaowu N, "Physical analysis on laser-induced cerebral damage," *Proceedings of the SPIE - The International Society for Optical Engineering*, vol. 5630, no. 1, pp. 723-731, 2005.

- [81] Whitters CJ, Hall A, Creanor SL, Moseley H, Gilmour WH, Strang R, Saunders WP, "A clinical study of the pulsed Nd:YAG laser-induced analgesia," *Journal of Dentistry*, vol. 23, no. 3, pp. 145-150, 1995.
- [82] Orchardson R, Peacock JM, Whitters CJ, "Effects of pulsed Nd:YAG laser radiation on action potential conduction in isolated mammalian spinal nerves," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 21, no. 2, pp. 142-148, 1997.
- [83] Orchardson R, Peacock JM, Whitters CJ, "Effects of pulsed Nd:YAG laser radiation on action potential conduction in nerve fibers inside teeth in vitro," *Journal of Dentistry*, vol. 26, no. 5-6, pp. 421-426, 1998.
- [84] Tsuchiya K, Kawatani M, Takeshige C, Sato T, Matsumoto I, "Laser irradiation abates neuronal responses to nociceptive stimulation of rat-paw skin," *Brain Research Bulletin*, vol. 34, no. 4, pp. 369-374, 1994.
- [85] Rochkind S, Nissan M, Alon M, Shamir M, Salame K, "Effects of laser irradiation on the spinal cord for the regeneration of crushed peripheral nerve in rats," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 28, no. 3, pp. 216-219, 2001.
- [86] Rochkind S, "Central nervous system transplantation benefited by low-power laser irradiation," *Lasers in Medical Science*, vol. 7, pp. 143-151, 1993.
- [87] Anders JJ, Vorke RC, Woolery SK, Merwe WPV, "Low power laser irradiation alters the rate of regeneration of the rat facial nerve," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 13, no. 1, pp. 72-82, 1993.
- [88] Midamba ED, Haanaes RH, "Low reactive level 830 nm GaAlAs diode laser therapy (LLLT) successfully accelerates regeneration of peripheral nerves in human," *Laser Therapy*, vol. 5, no. 3, pp. 125-129, 1993.
- [89] Iijima K, Shimoyama N, Shimoyama M, Mizuguchi T, "Evaluation of analgesic effect of low-power He:Ne laser on postherpetic neuralgia using VAS and modified McGill pain questionnaire," *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, vol. 9, no. 2, pp. 121-126, 1991.
- [90] Khullar SM, Vrodin P, Barkvoll P, Haanaes HR, "Preliminary study of low-level laser for treatment of long-standing sensory aberrations in the inferior alveolar nerve," *Journal of Oral Maxillofac Surgery*, vol. 54, no. 1, pp. 2-8, 1996.
- [91] Pogrel MA, Chen JW, Zhang K, "Effects of low-energy gallium-aluminum-arsenide laser irradiation on cultured fibroblasts and keratinocytes," *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 20, no. 4, pp. 426-432, 1997.

- [92] Abergel RR, Lyons RF, Castel JC, Dwyer RM, Unitto J, “Biostimulation of wound healing by laser: experimental approaches in animal models and fibroblast cultures,” *Journal of Dermatologic Surgery and Oncology*, vol. 13, no. 2, pp. 127-133, 1987.
- [93] Walker MD, Rumpf S, Baxter GD, Lowe AS, “Effect of low-intensity laser irradiation (600 nm) on a radiation-impaired wound-healing model in murin skin,” *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 26, no. 1, pp. 41-47, 2000.
- [94] 日本生理学会, 新・生理学実習書, 南江堂, 1991.
- [95] Kataoka Y, “Control of activity and metabolism of the central nervous system by photo-technology,” *Review of Laser Engineering*, vol. 35, no. 7, pp. 453-456, 2007.
- [96] Longo L, Postiglione M, Gabellini M, Longo D, “Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) treated with low level laser therapy (LLLT): a case report,” *Proceedings of Laser Florence 2008 AIP Conference*, vol. 1142, no. 1, pp. 72-74, 2008.
- [97] Hirayama Y, Yamakawa T, Ishizuka S, Grigorievich ZL, Yamakawa T, “Irreversible blocking of polar excitations on frog sciatic nerve using semiconductor pulse laser irradiation,” *Journal of Automation, Mobile Robotics and Intelligent Systems*, vol. 3, no. 4, pp. 210-212, 2009.
- [98] Hirayama Y, Ishizuka S, Grigorievich ZL, Yamakawa T, “Disappearance of epileptic bursts on rat hippocampal slices by using laser irradiation,” *International Journal of Intelligent Computing in Medical Sciences and Image Processing*, vol. 4, no. 2, pp. 154-164, 2011.