

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

ファイバーレーザー励起波長可変・中赤外光源と生体分光への応用

研究代表者 鈴木 将之 (大学病院 眼科)

緒言

光を用いた分光法は、試料を非破壊かつ *in vivo*、リアルタイムで分析することが可能である。特に分子の基本振動を直接的に励起可能な中赤外分光は、ラベルフリーのバイオイメージングへの応用が期待されている。従来の中赤外分光はマイケルソン型FT-IR分光法が主に用いられる。しかしFT-IR分光はリアルタイム計測が困難であり、得られる情報は線形分光の範囲を超えない。一方、パルス幅100 fs (fsは10⁻¹⁵秒)以下の短パルスレーザーを用いた非線形分光は(二光子吸収分光やコヒーレントラマン分光など)、リアルタイム計測が可能であり、線形分光では得られない情報を取得することが可能である。

非線形効果を引き起こすことができる中赤外域の短パルスレーザーは直接発振が困難である。そのため赤外域のチタンサファイアレーザーを励起源とした光パラメトリック過程を利用した波長変換にて、中赤外域の短パルス光生成を行っている。チタンサファイアレーザーは固体レーザー励起であり、装置は大型かつ複雑な光学素子で構成されており、長期間の安定性が低いなどの課題がある。そのため臨床現場には不向きであり、新たに簡便かつ小型の光源開発が望まれる。チタンサファイアレーザーに代わる新たな光源として波長1000 nm帯で発振可能なイッテルビウム (Yb) 系材料のレーザーが注目を浴びている。特に波長976 nmのレーザーダイオード (Laser Diode: LD) の高度化とファイバー型光学素子の進展により、波長1000 nm帯のYbファイバーレーザーの出力特性は著しく進展し続けている。ファイバーレーザーは導波路構造を有するため、高安定かつ小型、高出力化が可能であり、メンテナンスフリーが実現可能である。

そこで本研究では、チタンサファイアレーザーに代わる新たな光源開発を目的として小型で高効率、高安定動作が可能なYbファイバーレーザーシステムの要素技術開発を行った。具体的にはYbファイバーを用いた発振器と増幅器および回折格子を用いたパルス圧縮器で構成されるYbファイバーレーザーシステムの開発を進めた。

材料と方法

Fig. 1 に開発したYbファイバーレーザーシステムの

概略図を示す。システムはYbファイバー発振器とYbファイバー増幅器、パルス圧縮器から構成されている。発振器から出射されるレーザーは、増幅器にて出力増大される。このとき発振器からの波長1040 nmのレーザーはYbファイバー増幅器中を伝搬すると正の分散が加算されるためパルス幅が伸長される。そこでファイバーで加算された正の分散と同じ量の負の分散を与えてパルス圧縮を行う。

発振器はLDと波長分割多重通信 (wave division multiplexer: WDM), Yb添加ファイバー (Yd-doped fiber: YDF), コリメーションレンズ (collimation lens: CL), 4分の1波長板 (quarter wave plate: QWP), 2分の1波長板 (half wave plate: HWP), 偏光ビームスプリッター (polarizing beam splitter: PBS), 反射型回折格子 (diffraction grating: DG), ミラー (mirror: M), ファラデーアイソレータ (Faraday isolator: FI) を用いたリング型の共振器構成と

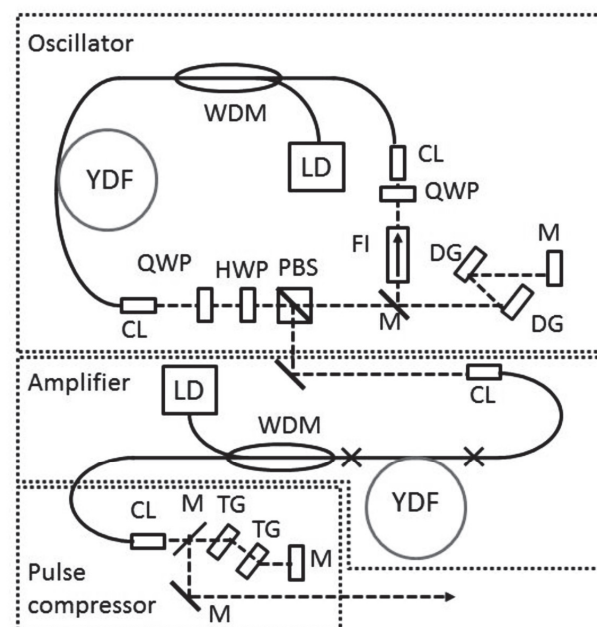


Fig. 1. Schematic layout of the Yb fiber laser system. LD: laser diode, WDM: wave division multiplexer, YDF: Yd-doped fiber, CL: collimation lens, QWP: quarter wave plate, HWP: half wave plate, PBS: polarizing beam splitter, DG: diffraction grating, M: mirror, FI: Faraday isolator, and TG: transmission grating.

した. LDから出射される波長 976 nmの光はWDMを用いてファイバー内に導かれ, YDFを励起する. YDFで励起された波長 1040 nmの光は共振器内でレーザーとして発振する. レーザーの伝搬方向はFIで制御し, Fig.1 においては反時計回りで伝搬する. 発振器のモード同期は非線形偏波回転法を用いた. 非線形偏波回転法は光カー効果を利用するためパルス幅 100 fs以下のパルス生成が可能である. HWPと2枚のQWPを用いて光の偏波制御を行い, モード同期発振を得た. 2枚のDGを用いて発振器内のファイバーの分散補償を行った. そしてPBSを用いて発振したレーザーは共振器の外部に取り出される. つぎに取り出された光はミラーを用いてYbファイバー増幅器へ導かれる. 増幅器はCLとYDF, WDMを用いた後方励起型のシングルパス構成とした. CLを用いてYbファイバー内に入射された波長 1040 nmのレーザーはYDFで増幅される. 増幅された光は, CLを用いて再び空間中に取り出されてパルス圧縮器へ伝搬される. 透過型回折格子 (transmission grating: TG) 対を用いてパルス圧縮器を構成し, ファイバー増幅器で加算された正の分散の補償を行った.

結 果

発振器のファイバーの全長を1350 mmに固定して, 2枚の回折格子 600 lines/mmの間隔を調整して共振器内の分散値を制御した. 回折格子間隔を 28 mmとしたときに出力 100 mW, スペクトル幅 110 nmを得ることに成功した (Fig. 2). つぎにYbファイバー増幅器にて発振器からのレーザーの増幅を行った. Ybファイバーの長さを 2 mに固定して増幅試験を行った. 励起LDエネルギー 700 mWのとき出力 350 mWを得た. しかし波長 1060 nmより長波長側における増幅率は低かった. 最後に回折格子対を用いてパルス圧縮を行い, パルス幅 70 fsが得られた.

考 察

発振器内の分散値をゼロに近づけたとき最も広いスペクトルが得られた. その理由は共振器内に蓄積される光のピーク強度が高くなり, 光パルスは自己位相変調効果を引き起こした結果, スペクトルが広がったと考えられる. 光のピーク強度はレーザーのエネルギーをパルス幅で割った値で定義される. 分散がゼロに近いときパルス幅は短くなる. そこで回折格子対の間隔を調整して発振器内の分散値がゼロから離れた値に設定するとスペクトル幅は狭くなった. これは光のパルス幅が広がることでピーク強度が下がり, 共振器内で自己位相変調が生じなかったためである.

増幅器において波長 1060 nmより長波長側の増幅率が低い理由は増幅器内にて利得狭窄を生じた結果である. Fig. 3 に増幅後のスペクトルとYbファイバーの誘導放出断面積 (emission cross-section) の計算結果を示す. Fig. 3の灰色実線に示すように, Ybファイバーの利得帯域は波長 980 nmから 1150 nmである. しかし波長 1060 nm

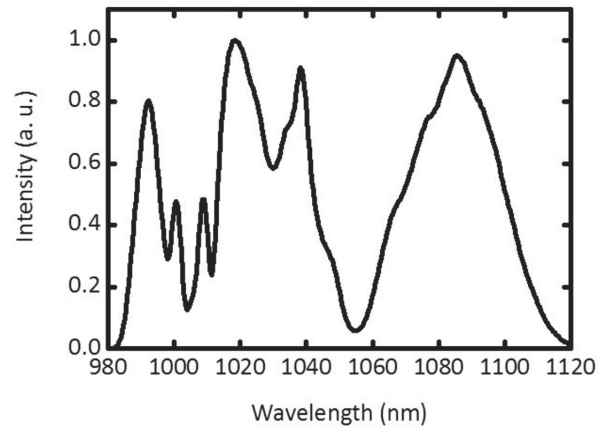


Fig. 2. Measured output spectrum from oscillator. The bandwidth of the output spectrum was measured to be 110 nm (full width at half maximum).

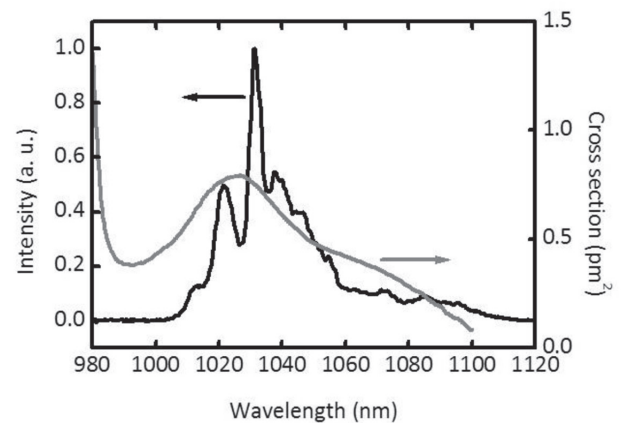


Fig. 3. Measured output spectrum from Yb fiber amplifier, and calculated emission cross-sections for Yb fiber. The black and gray curves represent the amplified spectrum, and the calculated emission cross-section, respectively.

より長波長側の誘導放出断面積は, ピークの約 2 分の 1 程度であった. レーザー発振は誘導放出断面積に依存し, 高い誘導放出断面積を有する波長域においてレーザー発振は比較的容易に起こる. スペクトルフィルターを用いて波長 1050 nm以下のレーザーをカットして増幅試験も行った. このとき出力は約 2 分の 1 に低下した. 以上のことから波長 1060 nm以上の波長域における増幅率の低下はYbファイバーの有する誘導放出断面積の低下によるものと判断した.

パルス圧縮器を用いて得られたパルス幅 70 fsは発振器から得られるレーザーを再圧縮したパルス幅 30 fsよりも長い. レーザーのパルス幅とスペクトル幅は不確定性原理により定義され, それらの値を掛け合わせた値は一定値となる. すなわちスペクトル幅が広くなればパルス幅は短くなる. 本実験において発振器からのレーザーを圧縮したパルス幅と比較して増幅後の圧縮したパルス幅が長く

なった理由は、増幅器で生じた利得狭窄によるスペクトル幅の狭帯域化に起因するものである。ただし増幅後に再圧縮したパルス幅は 100 fs 以下であり、非線形効果を起こすには十分に短いと考えられる。

以上の要素試験からパルス幅 100 fs 以下の大出力 Yb ファイバーレーザー開発の見込みが得られ、設計指針を明確とすることができた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご支援とご協力を頂いた眼科（寄付講座）の黒田寛人教授と米谷新教授に感謝いたします。また学内グラントの助成を頂き、審査員の先生方に感謝申し上げます。

学内グラント 報告書

平成26年度 学内グラント終了時報告書

気道由来 ATP による重症喘息の病態解析とバイオマーカー臨床活用への検討

研究代表者 柚 知行 (大学病院 呼吸器内科)

諸 言

気管支喘息は様々な刺激への応答による慢性アレルギー性気道炎症に起因する、気道過敏性、可逆性気道狭窄をきたす疾患である。喘息のアレルギー性気道炎症は、Th2カスケードを基盤とした免疫応答といえるが、アスピリン喘息や非アレルギー性喘息、難治性喘息に認められるように通常のアレルギー性免疫応答とは異なった機構が病態を修飾していることが明らかとなっている¹⁾。

Th1, Th2, Th17カスケードに代表とされる獲得免疫応答、自然免疫応答以外に、生体のストレスや外傷で誘導される際に、炎症部位から放出されるメディエーターによって炎症を進行させるメカニズムが存在する。この伝達分子はDanger signalと命名されATP, HAGM-1, S100, UAなどが知られている²⁻⁵⁾。これらの中でATPは、好中球遊走の誘導機能のように自然免疫に深く関与していることが示され^{4, 6)}、アレルギー性気道炎症の関連性が報告され始めている。免疫反応の発端となる樹状細胞をATPは分化成熟、遊走させることで一連のTh2カスケードを誘導する⁷⁾。同様に、ATPはCa²⁺流入を介した直接の好酸球活性機能を有し、CD11b発現、活性酸素産生、IL-8産生、脱顆粒させることが明確にされている⁸⁾。当研究室でも、ATPによる好酸球遊走能や接着を誘導することを見出している⁹⁾。また気道上皮においては、アルテルナリアの刺激によるIL-33産生にATPが寄与していることが解明されている¹⁰⁾。

In vivoにおいても、ATPによるアレルギー性気道炎症の誘導、制御に関する研究が報告されている。OVA感作マウスをOVA刺激するとBAL中ATPが増加する。マウス中のATPを阻害すると、メサコリン負荷試験での気道抵抗とアレルギー性気道炎症の全ての特徴を備えた組織、BAL中のT細胞、好酸球浸潤、IL-5、IL-13の増加が消失した。またATP+OVA感作マウスではOVA感作マウスに比較し、アレルギー性気道炎症の増悪を認め、これらの現象が、ATPによる樹状細胞の活性化に続く炎症誘導に起因することが示された⁷⁾。これらの現象はP2Y2レセプター欠損マウスでは認められないことから、ATPはその受容体であるP2Y2レセプターの活性化を介してアレルギー性気道炎症を進展させることが報告されている¹¹⁾。

以上の細胞および実験的動物モデルにおける結果は、喘息患者にも反映されると期待できる。実際、COPDやCystic fibrosisとのATPの関連性が報告されている。COPDの気管支肺胞洗浄液(BAL)ではATPが高値を示し重症度と関連する。また健常者に比較し、COPDの末梢血好中球の遊走能やエラスターゼ分泌、BAL中Mφのサイトカイン産生やMMP(マトリックスメタプロテアーゼ)産生はATPにより亢進していることが解明されている¹²⁾。

現在までにヒトの気管支喘息におけるATPに関する検討はほとんど報告されていない。ATPは既存の免疫経路とは異なる過程を辿り炎症反応を促進させる。今回気管支喘息の病態へのATPの寄与を解明するために、喀痰中のATP濃度を測定し、気管支喘息の臨床像および喀痰中の細胞成分、炎症メディエーターと比較検討した。

対象と方法

当院呼吸器内科、アレルギーセンターを通院する、日本アレルギー学会喘息予防・管理ガイドライン2012¹³⁾の診断基準を満たす気管支喘息患者および健常者を対象とした。適格基準を満たす症例から説明後承諾書を取得し、症例の基本情報取得および誘発喀痰、呼吸機能検査を行った。本研究は埼玉医科大学病院IRB、埼玉医科大学倫理委員会から承認を得ている(IRB承認番号13-083、倫理委員会承認番号788)。

誘発喀痰はヨーロッパ呼吸器学会のタスクフォースに準じて行う。超音波ネブライザーを用いて4.5%食塩水の固定濃度で吸入後、咽喉頭部に絡んだ痰を軽い咳払いをして喀出し集痰した。採取した喀痰は、視覚的観察により唾液部分を除去した後、dithiothreitol (DTT) で処理した。次に遠心し、細胞成分と上清成分に分離した。細胞成分はサイトスピン後メイグムザ染色を行い、各細胞数をカウントした。上清成分は500 μl ~ 1 ml に分注し-70℃で凍結保存した。上清中のATP濃度を市販のEnzyLight™ (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA) を使用して測定した。ATPの測定キットでの測定感度下限値は0.1 μMであった。呼吸機能は呼吸機能検査ガイドライン2004に従い、2回測定し最高値を採用した。

統計学的解析は一元配置分散分析を用い、Bonferroni検定法にてpost hoc検定解析した。p < 0.05を有意と判定した。値は平均値 ± SDで示した。

結 果

症例は、喘息 50 名、健常者 15 名であった。患者背景を表 1 に示す。2 群間の年齢、性別、喫煙歴の程度は同様であった。喀痰細胞分画では、健常者群で扁平上皮細胞が多いのに対して、喘息群でマロファージが多かった。また喘息群で好酸球が多い傾向を示した。誘発喀痰検査により喘息症状が増悪した症例は認められなかった。

喀痰中ATPは健常者に比較し喘息で有意に上昇していた(喘息群 379.1 ± 21.9 nM, 健常者群 366.8 ± 7.9 nM, $p=0.375$, 図1)。また喘息予防・管理ガイドライン 2012 に基づく重症度に分類して解析すると、軽症持続型と中等症持続型では喀痰中ATPに差は認められなかったが、中等症持続型に比較し重症持続型喘息で有意に上昇していた(軽症持続型 372.6 ± 7.3 nM, 中等症持続型 372.0 ± 7.4 nM, 重症持続型 391.5 ± 32.1 nM, $p=0.003$ (中等症持続型 V.S. 重症持続型)。

型), 図 2)。さらに喀痰中ATPは好中球と正の相関関係を示した ($R=0.3$, $p=0.01$, 図 3)。

考 察

本研究では喘息患者の喀痰中のATPを測定し、喘息の気道にはATPが増加し、特に重症の喘息で顕著であることが示された。また喀痰中ATPは喀痰好中球増加と関連していることを見出した。重症喘息では好中球性気道炎症を有する症例が多いことが報告されている¹⁴⁾。本研究に認められた気道中の好中球とATPが連関性を考慮すると、ATPが喘息の重症化に寄与していることが推測される。ATPは活性化好中球の遊走能を制御することが報告されている¹²⁾。さらにLommatzschらの研究ではCOPD患者の喀痰中好中球は、健常者に比較しATPによる遊走能、好中球エラスターゼが亢進していることが報告されている¹²⁾。好中球性気道炎症の関与による喘息の難治化

表 1. 患者背景. $p < 0.05$ を有意差ありとした。値は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。N.S.; non specific (有意差なし)

	健常者	喘息	P 値
症例数, (人)	15	50	-
男性/女性, (人)	10/5	34/16	N.S.
年齢, (才)	52.4 $\pm$ 14.1	54.6 $\pm$ 17.1	N.S.
喫煙歴, (有り, 人)	0	5 (10%)	-
喘息重症度, (人)	-	7/25/18	-
(軽症持続型/中等症持続型/重症持続型)			
喀痰細胞比率			
総細胞数, (x 10 ⁵ / ml)	8.1 $\pm$ 9.4	7.7 $\pm$ 7.3	N.S.
扁平上皮, (%)	38.1 $\pm$ 19.6	22.9 $\pm$ 20.7	0.02
好酸球, (%)	1.3 $\pm$ 3.1	8.3 $\pm$ 13.4	0.07
好中球, (%)	55.5 $\pm$ 19.6	49.5 $\pm$ 23.7	N.S.
リンパ球, (%)	1.7 $\pm$ 1.1	2.6 $\pm$ 6.2	N.S.
マクロファージ, (%)	3.9 $\pm$ 5.3	17.0 $\pm$ 17.7	0.01

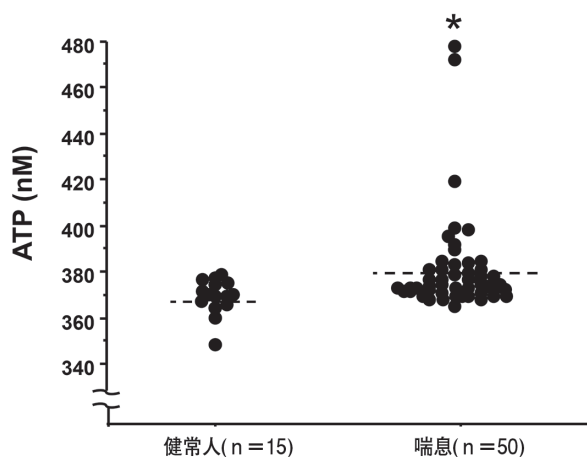


図 1. 喘息患者の喀痰中ATP濃度. *: $p=0.037$, 点線は平均値.

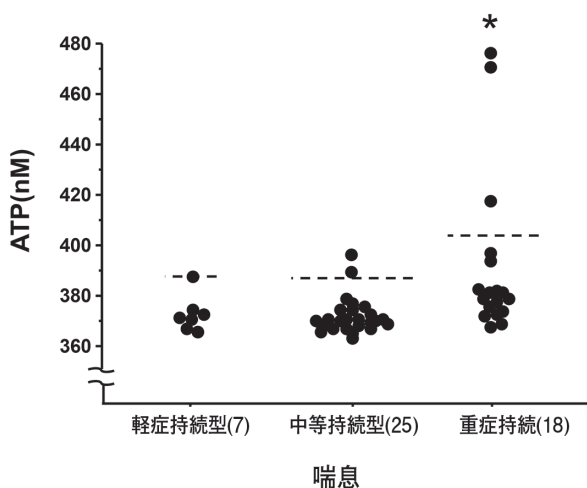


図 2. 重症度別喘息患者の喀痰中ATP濃度. *: $p=0.003$, 中等症持続型V.S. 重症持続型. 点線は平均値.

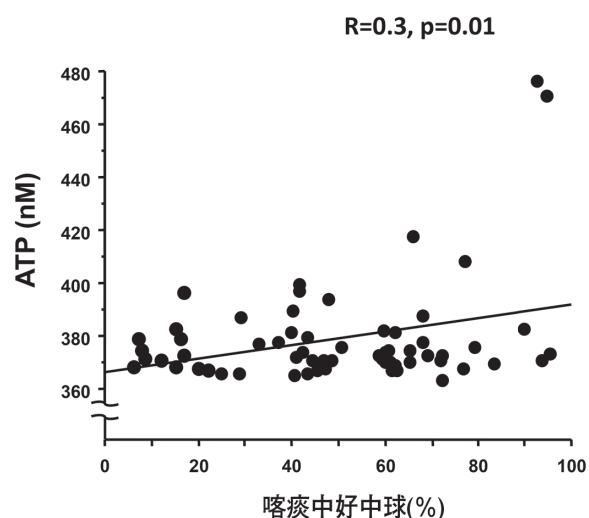


図 3. 喀痰中好中球比率と喀痰中ATP濃度の関係.

は以前より知見が集積されており、喘息においてもATPは好中球を活性化させることで、アレルギー性気道炎症を修飾していると推測される。

ATPの受容体はP2 レセプターである。COPDでは末梢血好中球のP2Y2 レセプター発現が亢進していることが示されている¹²⁾。今後喘息症例でも同レセプター発現が亢進しているかを検討することが課題の一つに挙げられる。また重症喘息に寄与するサイトカイン、ケモカインはまだ明確なものは示されていない。本研究からTh1 やTh17 関連のサイトカインが候補として考えられ、今後の検討していくことは有意義と考えられる。

研究成果リスト

学会発表

The 2016 American Academy of Allergy, Asthma & Immunology Annual Meeting 発表予定

参考文献

- 1) Holgate ST. Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nat Med* 2012; 18(5): 673-83.
- 2) Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 1-5.
- 3) Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 2003; 425: 516-21.
- 4) Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Junger WG, et al. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science* 2006; 314: 1792-5.
- 5) Kono H, Rock KL. How dying cells alert the immune system to danger. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 279-89.
- 6) Junger WG. Immune cell regulation by autocrine purinergic signalling. *Nat Rev Immunol* 2011; 11: 201-12.
- 7) Idzko M, Hammad H, van Nimwegen M, Kool M, Lambrecht BN, et al. Extracellular ATP triggers and maintains asthmatic airway inflammation by activating dendritic cells. *Nat Med* 2007; 13: 913-9.
- 8) Ferrari D, Sala A, Panther E, Norgauer J, Idzko M, et al. Activation of human eosinophils via P2 receptors: novel findings and future perspectives. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 7-15.
- 9) Kobayashi T, Soma T, Nakamoto H, Kita H, Nagata M, et al. ATP drives eosinophil effector responses through P2 purinergic receptors. *Allergol Int* 2015 (in press).
- 10) Kouzaki H, Iijima K, Kobayashi T, O'Grady SM, Kita H. The danger signal, extracellular ATP, is a sensor for an airborne allergen and triggers IL-33 release and innate Th2-type responses. *J Immunol* 2011; 186: 4375-87.
- 11) Müller T, Robaye B, Vieira RP, Ferrari D, Idzko M,

- et al. The purinergic receptor P2Y2 receptor mediates chemotaxis of dendritic cells and eosinophils in allergic lung inflammation. *Allergy* 2010; 65: 1545-53.
- 12) Lommatzsch M, Cicko S, Müller T, Lucattelli M, Idzko M, et al. Extracellular adenosine triphosphate and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181: 928-34.
- 13) 日本アレルギー学会：喘息予防・管理ガイドライン 2012. 東京: 協和企画; 2012. p. 3-7.
- 14) Moore WC, Hastie AT, Li X, Meyers DA, Bleecker ER, et al. Sputum neutrophil counts are associated with more severe asthma phenotypes using cluster analysis. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133(6): 1557-63.