創傷治癒過程における 生物フォトンとレーザー光照射

伊藤晴美¹⁾ 黒川良望²⁾ 宇佐 史¹⁾ 田口喜雄²⁾ 稲場文男^{1), 3)}

新技術事業団稲場生物フォトンプロジェクト¹⁾ 東北大学医学部第二外科²⁾
東北大学電気通信研究所³⁾

Biphoton Emission and Laser Irradiation
in the Process of Wound Healing

H.Ito¹ Y.Kurokawa² M.Usa¹ Y.taguchi² H.Inaba^{1,3}

INABA Biophoton Project, Research Development Corporation
of Japan.¹ The 2nd Department of Surgery, Tohoku
University School of Medicine.² Research Institute of
Electrical Communication, Tohoku University.³

ABSTRACT

Spontaneously ultraweak light (biophoton) from wound surface of mouse was detected by two-dimensional photon counting system. Biophoton emission from the wound changed with the post operative time. The initial emission during the first day was not specific to the wound, but a clear wound shape discerned about two days later. The most intensive emission part of the wound moved from the edge to the center in the process of wound healing. We proposed that biophoton emission and its changes are related the external stimulus (wounding) and contained important biochemical and medical information.

In order to examine the optimal condition of irradiation of 810 nm AlGaAs diode laser for the acceleration wound healing, the experimental wound was irradiated on five conditions. The experimental animals (Wister strain male rat) were divided into five groups noticing the energy density and the power density of 810nm laser. One of two circular wounds with 1.0cm diameter on the rat dorsal was irradiated. The condition of irradiation was as follows; A 1J/cm²-17mW/cm² B 1J/cm²-50mW/cm² C 10J/cm² ~17mW/cm² D 10J/cm²-50mW/cm² E 50J/cm²-200mW/cm². As a result, the most effective condition of irradiation on accelerating of wound healing was C group. Both irradiated side and non irradiated side irradiated with the condition C was healed faster than the other 4 groups and control. It is necessary for the resolution of the mechanism of the biostimulation effect to examine the optimal condition of irradiation (wavelength , mode , energy density , power polarizing characteristics , etc.) and the transmittance characteristics of the irradiating object.

はじめに

生物フォトンとよばれる生体組織、細胞、生体関連物質由来の生物発光の約数千から数万分の1程度の極微弱発光現象がある。この生物フォトン発光現象は、近年の著しい極微弱光計測や解析技術の進展により、生物界の広い階層レベルで起こる現象として知られるようになってきた。我々は、生物フォトン発光現象を生体系が有する一連の情報処理体系の自発的な光信号であると考え”生物フォトンが、どのような生体内情報を反映しているのか”ということ

を解明することを目的として実験を進めている。これまで、マウスに創傷を作製直後には生物フォトン放出部位は非特異的であったが、48時間後には創傷内部、特に創傷縁から生物フォトンが放出されていることが分かっている^{1), 2)}。今回は創傷作製後8日目まで観察し、その治癒過程で2次元的、3次元的に観測された生物フォトン放出の応答特性について検討した。

また、我々は低エネルギー光の創傷治癒促進効果をテーマに一連の実験を行ってきた。これまで、治癒促進効果には偏光特性が重要な要素ではないかということを経験してきた^{3) 4)}。しかしながら、昨年本学会で報告したように、波長、偏光特性により最も治癒促進に有効な、例えばエネルギー密度、パワー密度、照射間隔など照射条件が異なるのではないかと考えられるような実験結果を得た⁵⁾。今回は、照射条件と治癒促進効果の関連を検討目的として、これまでと同様の実験的創傷に810 nmの半導体レーザーをエネルギー密度、パワー密度に注目し5種類の照射条件で隔日照射した場合の治癒促進効果の比較検討を行った。

創傷治癒過程における生物フォトン

〈実験方法〉

Balb/c の雄6週令で初期体重約25gのマウスを用いた。チオペンタールナトリウム 麻酔下で、背部の毛を剃毛後、肩甲骨下約1.0cm、脊椎を中心に、直径1.0cmの固有背筋におよぶ深さの創傷を作製した。測定に際し、麻酔下のマウス

を動かないよう測定台に固定して創傷作製直後から24時間間隔で創傷面からの生物フォトン発光パターンを8日間にわたり1時間測定した。測定装置は当プロジェクトの計測技術グループが開発、設計した高感度の光子計数法に基づく2次元光子計測装置を用いた。

〈測定結果〉

創傷治癒過程における

生物フォトン発光パターンの変化

直径1.0cmの創傷を作製した同一マウス背部創傷からの、生物フォトン発光を8日間測定し、2次元的に測定したデータを3次元的に画像処理した結果の一例を示す。

治癒過程で発光強度分布が変化することが分かった。創傷作製直後の発光像では、創傷という外的刺激に対して周辺組織も創傷部位と同程度の発光強度を示しており、特異的な発光部位は認められなかった。2日後、(図1a)になると創傷の形どおりに発光しているが、特に外縁部からの強い発光みられるようになった。4日後(図1b)、6日後(図1c)と創傷が治癒してゆくに従い、発光強度が高い部分は創の中心方向に移行していた。8日後(図1d)に創傷が完全に上皮化した場合、生物フォトン発光強

度は受傷直後よりもむしろ低くなっていることが認められた。創傷面に形成される凝血栓（カサブタ）からのみの発光を検討した結果、創傷治癒過程で観測された生物光子は、おもにカサブタ由来でありその表側そして上皮化が進んでいる皮下に接しているカサブタの裏側の両面から放出されていることが分かった。

創傷治癒過程におけるレーザー照射

〈実験動物〉

9週齢で Wister 系の雄ラット（初期体重約 250g 前後）の背部肩甲骨下約 1.0cm 脊椎を中心に 1.0cm 離して左右 2 つの直径 1.0cm の固有背筋に及ぶ深さの創傷を作製した。飼育室内温度は $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 60%、で自由節食、自由摂水とし個別ケージで飼育した。暗幕でケージを覆い、飼育室内照明の影響を極力小さくした。

〈照射条件〉 表 1

群	エネルギー密度 (J/cm ²)	パワー密度 (mW/cm ²)	照射時間 (sec.)
A	1	17	60
B	1	200	5
C	10	17	588
D	10	200	50
E	50	200	250
コントロール	—	—	—

810nm の AlGaAs 半導体レーザーを光源とし、表 1 に示すような 5 種のエネルギー密度、パワー密度で創傷作製直後から隔日照射した。照射径は創傷を中心に 1.5cm とし各群 10 匹の実験動物のうち 5 匹には右側の創傷に、残り 5 匹は左側の創傷に照射を行った。

〈創傷面積測定〉

創傷に光照射後、スライドガラスに創傷縁をトレースし、前回報告した VTR とコンピュータ

ーを用いたシステムを利用して、創傷面積を測定した。この結果をもとに、創傷面積縮小率を求め、創傷治癒曲線（最小二乗法で求めた 2 次近似曲線）を描き治癒程度の評価を行った。

〈測定結果〉

表 2 創傷面積縮小率 (%)
創傷面積 / 作製直後の創傷面積 × 100

		P. O. D (days)					
		0	2	4	6	8	10
A	I 100	70.9± 8.7	60.1±11.2	26.5± 8.4 ^a	34.5±11.4	10.3±4.3	2.5±2.2
	N 100	70.0± 6.8	62.2± 8.9	29.8± 5.8 ^a		10.7±2.0 ^a	5.4±1.0 ^{a, b}
B	I 100	73.8± 8.1	59.2± 6.7	26.6± 8.1 ^b	34.5±11.4	11.3±4.2	4.3±2.5
	N 100	71.5±10.4	62.5± 8.1	22.8± 6.1 ^b		10.6±3.6 ^a	3.5±1.5
C	I 100	71.5±14.1	52.1±14.5	22.9± 9.0 ^c	34.5±11.4	8.3±3.5 ^b	2.6±1.6 ^c
	N 100	70.4±11.0	51.2±15.4	22.8± 6.1 ^b		7.3±3.2 ^b	1.8±1.1 ^b
D	I 100	75.4±10.3	59.6± 7.6	33.6±10.5	34.5±11.4	8.7±0.7 ^c	2.5±1.4 ^b
	N 100	72.8± 7.3	62.5± 8.1	32.1± 9.5		12.9±5.1	6.0±2.9
E	I 100	70.0± 5.0	58.2± 5.3	26.7± 3.8 ^c	34.5±11.4	12.2±2.2	4.1±2.4
	N 100	75.7± 8.5	62.5± 8.1	27.6± 5.9 ^b		14.5±7.9	5.5±3.9
Control		100	76.5± 9.2	64.0± 8.7	35.5± 5.1	14.6±3.2	5.8±2.4

値は平均値 ± 標準誤差 2 群間の有意差

a: $p < 0.1$ b: $p < 0.05$ c: < 0.01

A, B 群間での比較（エネルギー密度 1J/cm²）
A 群、B 群のそれぞれのパワー密度は 17mW/cm²、200mW/cm² である。この場合 2 群間で有意差は認められなかった。照射側創傷においてコントロール群との比較では 6 日目以降、若干治癒日数が速い傾向がみられた。

C, D 群間での比較（エネルギー密度 10J/cm²）
パワー密度 17mW/cm² で照射した C 群においては D 群（パワー密度 200mW/cm²）と比較して、C 群の非照射側創で創縮小率が大きかった。また、C 群では、6 日目以降、照射側創、非照射側創ともにコントロールと比較して 危険率 5%、1% 以下となっており創傷治癒が有意に促進されていた。

共にパワー密度が 17mW/cm² で、エネルギー密度が A 群の 10 倍で 10J/cm² の C 群の 2 群間で有意差は認められなかった。また、パワー密度 200mW/cm² の B, D の 2 群間でも有意差は認められなかった。実験群中最も高い 50J/cm² のエネルギー密度で照射した E 群において、他 4 群、コントロールとの比較で有意差は認め

られず、特に速く治癒するとはいえなかった。

表3 創傷治癒曲線から求めた
創傷縮小に要する日数(日)

		創傷面積縮小率		
		90%	50%	10%
A	I	0.73±0.27	4.17±1.07	8.63±1.19
	N	0.83±0.24	4.05±0.23	8.67±0.33
B	I	0.79±0.30	4.06±0.48	8.97±1.03
	N	0.69±0.21	3.94±0.59	8.90±0.94
C	I	0.53±0.18 ^a	3.03±0.50 ^b	7.73±1.38 ^a
	N	0.69±0.40	3.77±1.07	8.31±1.81
D	I	0.65±0.11	3.83±0.25	7.63±1.20 ^a
	N	0.58±0.19	3.56±0.84	7.65±1.82
E	I	0.75±0.27	4.13±0.48	8.21±0.47
	N	0.81±0.46	4.06±0.89	8.88±1.38
Control		0.72±0.15	4.20±0.30	9.11±0.73

値は平均値±標準誤差 2群間の有意差

a:p<0.1 b:p<0.05

創傷面積縮小率の平均値から、創傷面積が初期面積の90%、50%、10%に縮小するのに要する日数を創傷治癒曲線から求め、表3に結果を示した。C群の照射側、非照射側がともに50%以下になる日数がはやくなっている他は、コントロールと変わらない値であった。

考察

今回の実験で、1)生物フォトンが創傷という外的刺激に対して放出されること、2)治癒過程でその放出パターンが変化すること、3)上皮化した皮膚からの生物フォトン発光強度はダークレベルまで低下すること(痂皮からの発光が特に強い)、の3点が分かった。カサブタは、組織欠損部分で皮膚が再形成されるまでの仮の皮膚として外部からの水や熱等の物理的な刺激から内部を守り、上皮化が完了すると脱落する。カサブタがフォトン放出を放出することは、何等かの機能を果たした結果であるのか、あるいは治癒過程でchemical mediator的な作用を有しているのかは現段階では分からない。創傷治癒過程での生物フォトンの様々な物理的要素(発光強度、波長分布、空間分布、時間変化、

偏光特性など)の諸特性を測定し、他の生化学的、組織学的検討を併せて行うことで、非破壊的、無侵襲な生物フォトン発光の測定が治癒程度の評価方法となり得る可能性が見いだせるであろうと考えている。

低エネルギー(レーザー)光が生体組織に及ぼす活性効果についての報告は数多いが、その場合は、光源、照射条件、照射対象は様々であり、照射効果だけでなく、もちろんメカニズムについても統一した見解は得られていないのが現状である。今回、810nmのレーザー光が創傷治癒促進効果を有すること、照射条件でその効果は異なることの2点が確認されたが、今後、より有効な照射条件を見だし、そのときの組織成分の変動や組織構造の変化について検討しなければならないと考えている。また、活性効果について考える場合には、照射対象である生体組織やその構成成分の光透過特性が検討項目として重要であろう。創傷治癒は多様な段階を含んでおり、創傷部位の透過スペクトルは変化することが予想される。組織傷害から修復までのどの段階あるいは全段階において、どのようなメカニズムで、光のどんな有効成分が作用して治癒を促進するかということを解明するのは困難であろう。しかし、低エネルギー光が生体刺激効果を有するのであれば、至適照射条件(波長、モード、エネルギー密度、パワー密度、照射時期、照射部位、照射間隔など)についての検討が必要であると同時に、照射光がどの程度取り込まれ、どのような特性を持つ光となり挙動して生体の活性化に関与しているのか、明らかにされなければならない点であると考えている。

参考文献

- 1)37回応物理学会予稿集 p1009.29p-h-16(1990) 伊藤ら
- 2)医用電子と生体工学 28.518.3PA-10(1990) 鈴木ら
- 3)日本レーザー医学会誌 8.3. 249(1987) 山本ら
- 4)日本レーザー医学会誌 9.3. 576(1988) 伊藤ら
- 5)日本レーザー医学会誌 10.3. 407(1989) 伊藤ら