

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12512

研究課題名(和文)体外循環血への青色LED光照射による免疫制御システムの構築

研究課題名(英文)Development of Photopheresis -Extracorporeal blood irradiation model in Rats

研究代表者

大井 文香(Oi, Fumika)

徳島大学・大学院理工学研究部・学術研究員

研究者番号：40594750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ラットをモデル動物とし血液を体外循環中にLED光を照射する実験法の構築と、循環・照射前後の血液成分等の変化の測定ができた。青色光、UVA光青緑色光の3種波長のLED光照射装置をそれぞれ作製し導出血液をポンプで送液する回路と組合せた。無照射・循環をコントロール群とした。各実験前後の血液学的検査、白血球分画等の測定を行った。循環前後の数値の変化を比較すると無照射・青緑色光・青色光照射群では変化が少なかったため、さらに増減率に着目したところ、青色光照射群に血小板数減少傾向が見られた。UVA光照射群ではリンパ球数が著しく減少した。血液成分や全身症状に対し照射波長に特有な影響があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using adult male SD rats, we made an extracorporeal blood irradiation circuit system. The blood flow was regulated at 0.2ml/min using a peristaltic pump, and the circulation setting time was 1hour. We made three kinds of irradiation instruments, blue (465nm, 14.8mW/cm²), blue Green (505nm, 10.8mW/cm²), UVA (365nm, 15.7mW/cm²), and a circuit system. The circulation experiment without irradiation was as a control. Hematologic test and white blood cell (WBC) count differential test were performed before/after the each extracorporeal blood irradiation experiment. There was little significant difference between the rates of hematologic tests from irradiated with the Blue-Green light circulation and control. We observed that the Blue light irradiation slightly decreased with platelet count, and the UVA light irradiation decreased with lymphocyte count. It was suggested those changes depended on wavelength of lights.

研究分野：生体医工学

キーワード：生体医工学 LED光 光照射 体外循環 動物モデル

1. 研究開始当初の背景

関節リウマチ、潰瘍性大腸炎などの自己免疫疾患に対しては、数多く研究が進められ、それらの成果から、幾つかの免疫細胞の過剰反応が発症と憎悪に関与することが解明され始めていた。また、治療方法で用いられる、免疫抑制剤の副作用、高額な薬価、重症化への対応など、社会的視点からも新たな治療法が期待されていた。

研究開発当初自己免疫疾患の治療法の一方法として、光を利用した治療法も着目されており、研究者らは、徳島大学が取り組んでいる「LED ライフプロジェクト」研究において、LED 光を用いて、光が持つ生物への影響を解明していく研究を進めていた。

本研究では生命体への光の影響を医学分野の課題解決に結び付けられるように、医工学分野と医学の分野との研究連携体制を整え、装置の作製から動物実験結果に現れた変化のメカニズム解明を目指した一連の研究アプローチとして、LED 光を用いた光照射を利用して自己免疫疾患を治療できるような方法を見出すための実験系を構築し、安全性を確かめ、さらに、より効果のある条件を見出すことを目的として、研究をスタートさせた。

体外に血液を導出して、循環するシステムを利用した治療法に関する研究は、血液循環と濾過システムを備えた、白血球除去療法モデル動物実験法、血液透析モデル実験法、手術のための人口心肺術モデル実験法、感染動物の血液浄化法モデル、など、対象疾患に対して、それぞれ特徴を兼ね備えた動物モデル実験法の開発が進められていた。

しかしながら、動物を対象として、体外に導出した血液を循環させた系に可視光照射するシステムを組み合わせて、処置の効果、血液等への影響を見出す動物モデル実験系の研究報告は非常に少なく、また、照射光の波長と強度を視点に、生物への照射光が及ぼす影響に関する研究報告も少ない状況であった。このような状況が、本研究を開始する大きな起動力となった。

本研究では、まず、健常なラットをモデル動物として、その体外循環血液に LED 光を照射するモデル実験系を確立し、次に、その実験系を用いて、照射による影響を調べる研究を計画した。本モデル同様の実験系において、病態モデル動物対象に実験を行い回復に導く条件を見いだせば、いわゆる治療法を見出すきっかけになる可能性を持っていることも期待できた。

さらに、本研究の成果として簡易で定常的なモデルが構築できれば、照射光の波長と強度による影響を、血液成分だけでなく、各組

織に局在している細胞に対して、その作用とその機構を考察して解明して行く研究の一方法となり得ることも期待できた。さらに、実験で作成した装置を小型化して簡便さを増す研究は、医工学分野の視点において、治療機器開発の出発点にもなり得るということも期待できた。

2. 研究の目的

ラットをモデル動物として、定常的に体外循環実験を行うことができる実験方法を構築することを第 1 の目的とした。さらに、循環血液に青色 LED 光を照射して、血液成分等が受ける影響を見出していくことを第 2 の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象動物

SD ラット (オス、体重 3500g 以上 日本チャールスリバー社) を徳島大学医歯薬学研究部動物資源研究部門動物実験施設内において、飼育しながら、実験を行った。

(2) 麻酔・前処置

ラットに対しイソフルラン持続麻酔を施し、ヘパリン (200 単位) を尾静脈から投与した。回路を接続する前に頸静脈採血部位から採血を行った。

(3) 循環回路

麻酔を持続した状態で、頸静脈を採血部位に、チューブ (BPU-T30 Primetech、140 cm、以下 BPU チューブと略す) を接続した。平面渦巻き状の格納板を作製し、BPU チューブを納めた。BPU チューブはペリスタリックミニポンプ (Fisher Science) に接続し、さらに、三方コックを介して再びチューブを接続した。この BPU チューブは大腿静脈にカニューレションして、ラット体内に血液を返還した。このような一連の接続をラットに装着すると回路となり、これを循環実験に用いた。

(4) LED 光照射装置作製と放射率測定

照査装置としては、青色光、青緑光、UVA 光の照射波長の LED 素子を並列した装置をそれぞれ作製した。それぞれの照射装置のピーク波長の測定と、電流値を変化させたときの放射束を測定し照度を算出した。

青色 LED 光照射装置では、NCSB (NICHIA) を用いた。青緑色光照射装置

では、NCSE (NICHIA) を用いた。UVA 照射装置では、NVSU233A U365 (NICHIA) を用いた。

導出した血液に対し BPU チューブを通して LED 照射を行った。本チューブは、ほぼ透明で厚さ 0.33mm であることから、光は透過するとみなしてチューブ外から照射する方法を選択し、平面で渦巻き状に格納する仕様の格納板を作製し、さらに、その格納板に水平な面の上部から LED 光を照射するように照射装置を組合せた。

(5) 循環・照射

ペリスタルティックポンプの送液強度は、予め 0.2ml/min になる送液条件を設定した後、その条件を用いて導出した血液を送液した。循環回路を一巡した血液が実験対象動物内に戻るのを確認した時点から 1 時間が経過する間、LED 照射を行った。

(6) 循環・照射後の処置

採血はラットの頸静脈の採血部位から、循環の前後に行った。創部は縫合し、麻酔覚醒後は、通常飼育を継続し、術後の生存の状態を観察した。

(7) 測定

血液学的検査、白血球分画検、LDH 値、GOT 値の測定は、株式会社トランスジェニックに測定依頼し、検査値を得た。

無照射群、青色光照射群、青緑色光照射群、UVA 光照射群の研究期間内に得られた結果をそれぞれ比較した。

4. 研究成果

(1) 体外循環モデルの確立

本研究期間中に、無照射群 (n=9)、青色光照射群 (n=9)、青緑色光照射群 (n=5)、UVA 光照射群 (n=3) の 1 時間の循環・LED 照射実験を行い、それぞれの実験前後の、血液学的検査、白血球分画、また、LDH、GOT 値の測定を行うことができた。

また、それぞれの実験後のラットの生存の確認も行った。

無照射群では、9 例のうち 9 例が循環・照射実験後も生存していた。青色光照射群では 9 例中 2 例が循環直後に死亡した。青緑色光照射時の死亡例は無かった。UVA 光照射群は 3 例の実験を行ったところで 3 例とも術後翌日から 3 日後に死亡した。実験はこの時点で中止した。

体外循環時間を 1 時間とする実験は無照射時、LED 照射時においても定常的に行うことができた。

図 1 に実験の 1 例として、青色 LED 照射

射・循環の様子を示した。

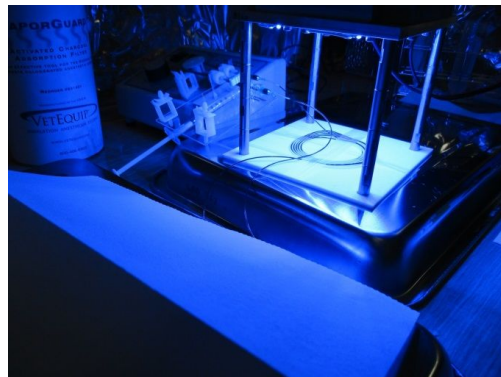


図 1 . 青色光照射体外循環実験の様子

(2) 照射光の照度、熱量

青色 LED 照射装置は NCSE (NICHIA) を用いた。青色 LED 光のピーク波長は 465nm、照度は 14.8mW/cm² であった。青緑色光照射装置では、NCSE (NICHIA) を用いた。ピーク波は 505nm、照度は 10.8mW/cm² であった。UVA 照射装置は、NVSU233A U365 (NICHIA) を用いた。ピーク波長は 365nm、照度は 15.7mW/cm² であった。

それぞれの LED 照射装置の放射束と電流値の関係を図 2 に示した。

放射束と電流値の関係

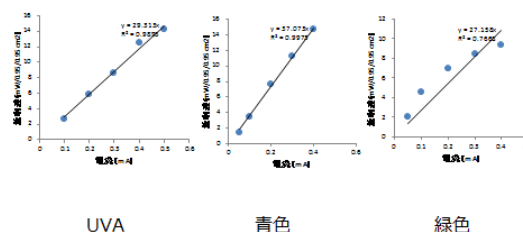


図 2 . 放射束と電流値の関係

平面渦巻き照射盤に対し、1 時間の照射を行った際の熱量は、図 2 に示した結果より、青色光は 2.45W/cm²、青緑色光は 1.79W/cm²、UVA 光は 1.93W/cm²、と算出できた。

(3) 循環・LED 照射前後の血液検査値への影響

本研究期間中に、無照射群 (n=9)、青色光照射群 (n=9)、青緑色光照射群 (n=5)、UVA 光照射群 (n=3) の 1 時間の循環・LED 照射実験を、かつ、血液学的検査、白血球分画、LDH 値、GOT 値の測定を行うことができた。

また、それぞれの実験後のラットの生存

「LED 光照射ラット体外循環モデルの構築」
大井文香、中川忠彦、岡本耕一、高山哲治
曾我部正弘、岡久稔也、芥川正武、榎本崇宏、
木内陽介

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大井 文香 (Oi, Fumika)
徳島大学・大学院理工学研究部・
学術研究員
研究者番号 : 40594750

(2) 研究分担者

中川 忠彦 (Nakagawa, Tadahiko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医
学系) ・特任助教
研究者番号 : 40634275

岡久 稔也 (Okahisa, Toshiya)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医
学系) ・特任教授
研究者番号 : 60304515

曾我部 正弘 (Sogabe, Masahiro)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部 (医
学系) ・特任講師
研究者番号 : 60732790