

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20048

研究課題名(和文) 全身性炎症反応における体内時計制御を目的とした新たな光療法の開発

研究課題名(英文) Regulation of the circadian clocks by phototherapy in the systemic inflammatory response syndrome

研究代表者

小山 淑正(Oyama, Yoshimasa)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40468012

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：現在までに光治療に関して十分なメカニズムの解明は行われておらず、さらなる研究展開により新たな作用機序の解明が期待されている。本研究では各種波長光の照射がリポポリサッカライド投与による全身性炎症反応に対して及ぼす影響を、行動リズム解析や抗サイトカインおよびケモカインを測定することで、光療法において重要となる要素の探索と光の適切な照射方法を確立することを目的とした。各種波長光照射はリポポリサッカライド投与前後のマウスの行動リズムへの影響を認めなかったが、緑色光照射はリポポリサッカライド投与後の炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を有意に抑制し、抗炎症サイトカインを増加させ、抗炎症効果効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Phototherapy has been used to control the inflammation or treat circadian rhythm disorders. However, the mechanism of phototherapy is still unclear. We investigated the anti-inflammatory effect of phototherapy on the systemic inflammatory response syndrome using the analysis of behavior rhythm and measuring cytokines production. While phototherapy had no effect on behavior rhythm after the systemic inflammatory response syndrome, green or red LED exposure showed significant decreases of the inflammatory cytokines production, but inducing anti-inflammatory cytokine. Based on these data, specific wavelength of light might play an important role in anti-inflammatory activities.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：光治療 敗血症

1. 研究開始当初の背景

重症敗血症は集中治療領域において主要な致死的病態である。一方で、最近では高齢化、ハイリスク手術、多剤耐性菌の増加により発症率は増加の一途をたどっている。さらに、重症敗血症から生存回復しても、日常生活に支障をきたすような機能障害を残す患者が多いことが問題となっている。このように、敗血症は発症率、死亡率が高いだけでなく、生存者にも解決すべき問題が多い病態である。

そこで、我々はより簡便で、安全性が高く、治療効果を有した治療法の開発を目標に、光に着目してきた。光による抗炎症効果は広く知られており、紫外線によるビタミンD産生がその主因であると考えられている。一方で、光は概日リズムの形成にも重要な役割を果たしている。概日リズムは代謝、免疫、認知といった身体的、精神的な行動を制御することが知られている。しかしながら、現在までに光治療に関して十分なメカニズムの解明は行われておらず、さらなる研究展開により新たな生理作用や作用機序の解明が期待されている。

2. 研究の目的

本研究ではリポポリサッカライド (LPS) を用いた敗血症性ショックモデルに対し、光療法を行い、抗炎症効果を検討する。これにより、光療法において重要となる要素の探索と光の適切な照射方法を確立する。さらに、マウスの行動解析を行い、概日リズムとした。これらにより、敗血症治療における新たな患者管理の方法としての基礎研究を提案したい

3. 研究の方法

(1) 各種波長 LED 照射がマウス回転輪運動に及ぼす影響

まず、株式会社デンケン (大分、由布市) に協力を仰ぎ、各種波長 LED 灯具 (波長: 465、590、620、830nm、照度: 100uW/cm²) を作成して頂いた。

C57/BL6 マウス (週齢 6 週) を使用した。マウスを 12 時間毎の明暗環境 (7 時 ~ 19 時: 明環境 (白色蛍光灯 200 ルクス)、19 時 ~ 7 時: 暗環境) で 1 週間飼育した。続いて、マウスを行動解析用回転輪を備えたケージ (室町機械) に移動し 1 週間飼育後、各種波長 LED (波長: 465、590、620、830nm) 照射を 2 週間行った (図 1)。マウスの回転輪運動は CompACT AMS Ver.3 マウス行動解析用ソフトウェア (室町機械) を用いて記録した。記録された回転輪運動データは、Biodare2 ソフトウェアを用いて行動リズムの振幅および周期を解析した

(2) 各種波長 LED 照射が LPS 投与後のマウス回転輪運動に及ぼす影響

(1) と同様の環境でマウスを飼育した。行動解析用回転輪を備えたケージに移動し、(白色蛍光灯 200 ルクス) 8 日目 19 時に LPS 5mg/kg を腹腔内投与し、引き続き各種波長 LED (465、590、620、830nm) の照射を開始し、1 週間マウスの行動解析を行った。LPS 投与後にマウスの行動活性の抑制を認めるが、回復に伴い回転輪運動を再開する。本研究では LPS 投与後から回転輪運動再開までの期間を計測した。Chronoshop ソフトウェアを用いて回転輪運動の再開時点の同定し、さらに回転輪運動再開後の行動リズムの振幅を検討した。

(3) 各種波長 LED 照射が LPS 投与によるサイトカイン分泌に及ぼす影響

まず、対照光源の開発のため、株式会社デンケン (大分、由布市) に協力を仰ぎ、赤 (Red: ピーク波長 620nm)、緑 (Green: ピーク波長 520nm)、青 (Blue: ピーク波長 465nm) を組み合わせた RGB 白色光源を作成して頂いた。対照 RGB 光源の照度はマウスの通常飼育環境である 200 ルクス相当に調整した。

C57/BL6 マウス (週齢 6 週) を使用した。マウスを 12 時間毎の明暗環境 (7 時 ~ 19 時: 明環境 (RGB 白色 LED 200 lux)、19 時 ~ 7 時: 暗環境) で 1 週間飼育した。続いて、明環境時間において、各種単波長光 (波長: 465nm、520nm、620nm) あるいは RGB 白色 LED の環境でそれぞれ 1 週間飼育した (図 2)。

各種 LED 照射 8 日目に LPS (10 mg/kg) を腹腔内投与し、12 時間後に採血。血漿中サイトカイン、ケモカインを Bio-plex™ を用いて測定した。

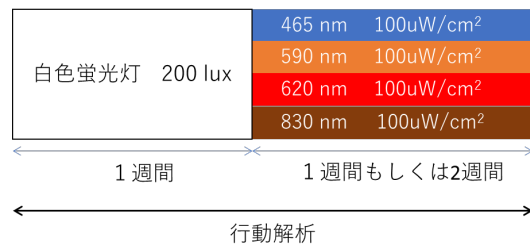


図 1 方法 (1) および (2) の光照射方法

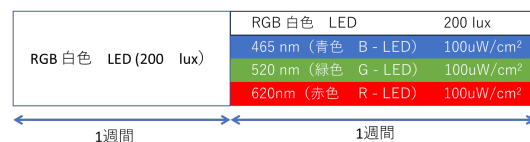


図 2 方法 (3) の光源照射方法

統計解析：得られたデータは一元配置分散分析を用い、多重比較として全群比較には Tukey 法、対照群との比較には Dunnett 法を用いた。P 値 0.05 未満を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 各種波長 LED 照射がマウス回転輪運動に及ぼす影響

12 時間後毎の明暗環境下では各種波長光によるマウスの行動リズムの振幅 (Amplitude) に変化を認めなかった (図 3)。周期 (Period) は 465nm、590nm、620nm LED 光では 24 時間であったが、830nm 光で 23.1 時間に短くなった (図 4)。我々が用いた C57/BL6 マウスは恒常暗環境では、行動周期が 23 時間に短くなることが知られており、830nm 光照射もそれと同等であった。つまり、マウスの可視光範囲でのみ光照射による行動リセット効果があることが示唆された。

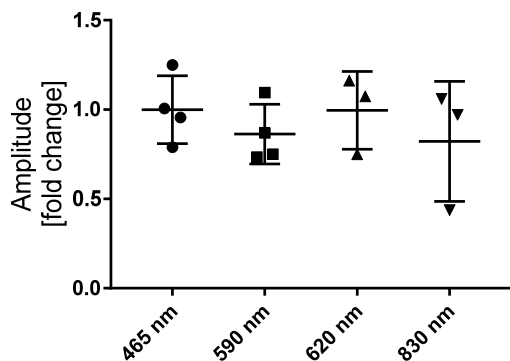


図 3 各種波長 LED 照射中の行動リズムの振幅 (Amplitude)。465nm の振幅を 1 として相対的变化量を示す。

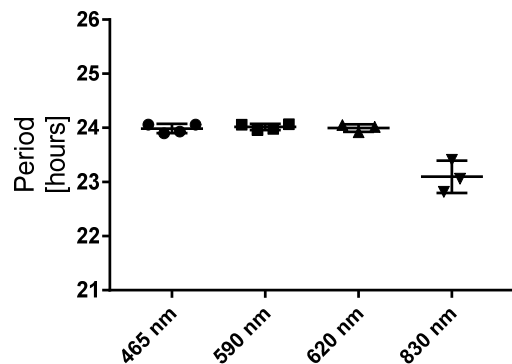


図 4 各種波長 LED 照射中の行動リズムの周期 (Period)。

(2) 各種波長 LED 照射が LPS 投与後のマウス回転輪運動に及ぼす影響

各種波長 LED 照射による LPS 投与後のマウス回転輪運動再開までの期間を検討した。各群で回転輪運動再開までの期間に差を認めなかった (図 5)。回転輪運動再開後の行動リズムの振幅には固体による変動が大きく、有意差を認めなかった (図 6)。

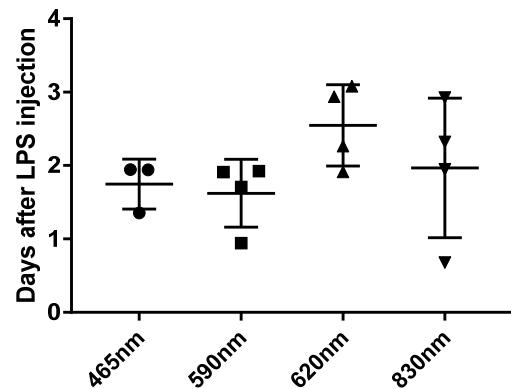


図 5 LPS 投与後から各種波長 LED 照射開始後の回転輪運動再開までの日数

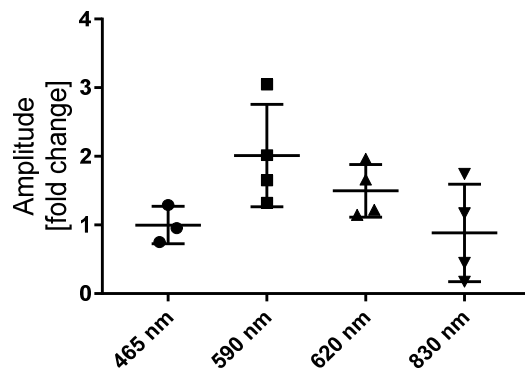


図 6 LPS 投与後から各種波長 LED 照射開始後の回転輪運動再開後の行動リズムの振幅 (Amplitude)。465nm の振幅を 1 として相対的变化量を示す。

(3) 各種波長 LED 照射が LPS 投与によるサイトカイン分泌に及ぼす影響。

各種波長光と 3 波長 LED を組み合わせた白色 LED を対照光として比較した。緑色 LED 照射は炎症性サイトカイン産生 (IL-6, IL-1b) を有意に抑制した。赤色 LED 照射は IL-6 の産生を有意に抑制した。また、走化因子 KC 産生も緑色、赤色 LED で有意な抑制をみとめた (図 7)。

一方で、抗炎症性サイトカインである IL-10 は緑色 LED で有意に上昇しており、他の波長に見られない特色を認めた (図 8)。

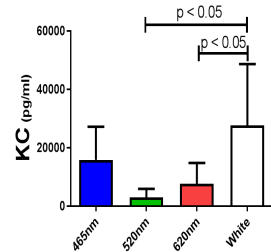
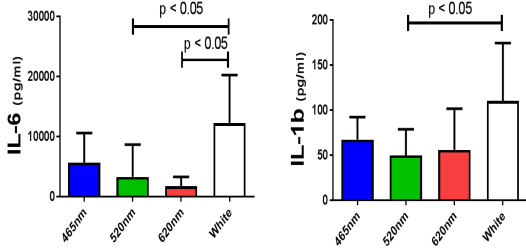


図7 LPS 投与後の各種波長照射の効果（炎症サイトカイン、ケモカイン）

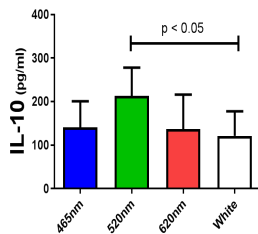


図8 LPS 投与後の各種波長照射の効果（抗炎症性サイトカイン）

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Yoshimasa Oyama, Shigekiyo matsumoto, Tetsuya Uchino, Takaaki Kitano, Effect of Phototherapy on a Septic Mice Model: Optimal Wavelength of Light, Anesthesiology 2016 annual meeting, 2016 年 10 月（シカゴ、米国）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小山 淑正 (OYAMA Yoshimasa)

大分大学 医学部・助教

研究者番号：40468012

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

松本 重清 (MATSUMOTO Sigekiyo)

林田 辰徳 (HAYASHIDA Tatsunori)