総説

REVIEW ARTICLE

近赤外低反応レベルレーザー照射による腎炎抑制効果

大和 正典, 金田 明, 片岡 洋祐

独立行政法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター

(平成 25 年 12 月 13 日受理, 平成 26 年 1 月 23 日掲載決定)

Low-reactive Level Near-infrared Laser Irradiation Suppresses Glomerulonephritis in Rats

Masanori Yamato, Akira Kaneda, Yosky Kataoka

RIKEN Center for Life Science Technologies

(Received December 13, 2013, Accepted January 23, 2014)

要 旨

われわれは WKY ラットに抗糸球体基底膜抗体を静脈内投与することで糸球体腎炎ラットモデルを作成し, 体外からの低反応レベルレーザー照射が抗炎症効果を発揮するかどうかを検討した. レーザーの照射 (波長 830 nm, 出力 2 W, 皮膚表面のスポットサイズ 2.27 cm², 照射パワー密度 880 mW/cm²) は抗糸球体基底膜抗体投与日より 14 日間, 1 日 1 回 250 秒ずつ背部皮膚表面から両腎臓へ向けて行った. その後, 腎臓を摘出し, 生化学および組織学両面から炎症の状態を検討したところ, レーザー照射が腎炎病態を有意に軽減することを確認した.

キーワード: 近赤外低反応レベルレーザー, 腎臓, 糸球体腎炎, ラット

Abstract

We demonstrated the anti-inflammatory effect of daily external low-reactive level laser irradiation (LLLI) in an animal model of crescentic glomerulonephritis. Crescentic glomerulonephritis was induced in rats by intravenous injection of antibody for glomerular basement membrane (GBM). The rats were irradiated with a low-reactive level diode laser with an infrared wavelength of 830 nm from the shaved skin surface once a day for 14 days (irradiation spot size on the skin surface, 2.27 cm²; power intensity, 880 mW/cm²; irradiation mode, continuous mode; irradiation time, 250 s; energy, 500 J; energy density, 220 J/cm²). After laser irradiation for 14 days, the kidneys were taken, and the extent of inflammation was evaluated. LLLI showed anti-inflammatory effect on the renal tissue.

Key words: Near-infrared low-reactive level laser, kidney, glomerulonephritis, rat

1. 背景

組織温度にほとんど影響しないような低出力のレーザー照射が神経痛の緩和や, 外傷・関節炎などに対する鎮痛・抗炎症効果を発揮すると報告されて以来, 25 年以上が経過した. 今日では麻酔科, 整形外科, 皮膚科, 耳鼻

咽喉科, 産婦人科, 歯科等, 臨床でも広く使用されている. その作用メカニズムについては未だ不明な点が多いが, ささまざまな疾患モデル動物や培養細胞を用いた基礎研究結果が発表されている. Castano らは, 関節炎を誘発させたラットに波長 810 nm のレーザーを照射したところ, 炎

症マーカーの一つである血清中のプロスタグランジン E2 が減少し、関節炎の改善度と相関することを報告している¹⁾。また、Gavish らは Lipopolysaccharide (LPS) による刺激を加えた培養マクロファージに対して波長 780 nm の半導体レーザーを照射することにより、炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-1 β および IL-6 の産生が抑制されることを報告している²⁾。マクロファージが産生する炎症性サイトカインは、ほぼすべての炎症関連疾患に共通して関与すると考えられていることから、多くの炎症疾患がレーザー照射による治療対象となりうることを示唆している。さらに、Rizzi らは筋肉の外傷に対し、波長 904 nm のレーザー照射が抗炎症作用を示し、この現象に活性酸素種の産生の抑制と、nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 活性化の抑制が関与することを報告している³⁾。NF- κ B は炎症に関連するさまざまな遺伝子発現を制御する転写因子である。最近、Zhang らは関節炎を起こしたラットに対する近赤外レーザーの抗炎症メカニズムを調べるため、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、レーザーの照射によって CCL2 ケモカインの発現が抑制されることを示した⁴⁾。

このように近赤外低反応レベルレーザー照射はさまざまな炎症性疾患に対して抗炎症効果を示すことが報告されているが、皮膚や関節炎など、比較的体表面に近い部位を対象とした検討が多く、内臓器への効果についてはほとんど検討されていない。本論文では、われわれが試みた対外からの腎臓への低反応レベルレーザー照射による抗炎症効果を紹介し、その作用メカニズムに関して仮説を立てながら考察する。

2. 糸球体腎炎モデル動物の作成と近赤外低反応レベルレーザー照射

われわれは 8 週齢の Wister Kyoto (WKY) ラットに抗糸球体基底膜 (Glomerular Basement Membrane: GBM) モノクローナル抗体 (anti-GBM) を麻酔下に静脈内投与することにより惹起される糸球体腎炎モデルを作成し、波長 830 nm の近赤外低反応レベルレーザーの抗炎症作用を評価した。Anti-GBM は腎臓や肺の組織基底膜の主な構成タンパク質である IV 型コラーゲンの NC1 領域を認識する抗体である⁵⁾。そのため糸球体毛細血管にそって抗体が沈着し、抗原抗体反応により白血球浸潤が惹起され、結果として重篤な腎炎を発症することが知られている。レーザー照射 (出力 2 W、皮膚表面のスポットサイズ 2.27 cm²、照射密度 880 mW/cm²) は anti-GBM 投与日より 1 日 1 回 14 日間、ラット覚醒環境で背部皮膚上へのスポット照射により 250 秒ずつ両腎臓に向けて実施した。なお、覚醒条件下のラットへ安定したレーザー照射を実現するため、照射中、ラットを筒型の容器中に収納した (Fig.1)。レーザー非照射群も同様の措置を行った。14 日後に腎臓を摘出し、組織学・生化学の両面から検討を行った。また、別のラットをイソフルレン麻酔科に開腹し、腎臓表面に熱電対を挿入した状態でレーザーの照射を行い、250 秒間の照射による組織温度の変化を観察した。すべての動物実験は、当研究所の倫理委員会の承認を受け、動物実験指針に則って実施した。

Fig.1 Photograph of laser irradiation to the kidney of rat. In order to relieve the stress on rats, the size of box was designed to be loose, and laser irradiation was carried out in the opened box to allow the rat to escape freely.

Fig.2 (a) Histochemical observation of rat glomerulus 14 days after administration of anti-GBM (PAS staining, x400; upper photograph). Arrowheads indicate crescent formation. (b) Percentage of glomeruli with crescent formation was calculated in each experimental group. * $p < 0.05$. Error bars, SD. Reference⁶⁾ partially edited.

3. 近赤外低反応レベルレーザーの糸球体腎炎軽減効果

ホルマリン固定した腎組織切片を periodic acid-Schiff (PAS) 染色法により染色し、顕微鏡下で半月体形成の程度を評価した。anti-GBM の投与により、全体の約 8 割の腎糸球体において半月体の形成が観察され、メサンギウム細胞の増殖や糸球体肥大を伴った重篤な炎症所見が観察された (Fig.2)。また、免疫組織化学染色により、anti-GBM 投与群では ED-1 陽性の M1 マクロファージ、および CD-8 リンパ球の糸球体への浸潤が確認された。これらの炎症所見はいずれもレーザーの照射群において軽減されていた。なお、正常ラットの糸球体においては

Fig.3 Change in tissue temperature at the surface of kidney. Diode laser was automatically switched off at 250 seconds after the start of irradiation. Measurement was continued for 120 seconds after the end of irradiation. Reference⁶⁾ partially edited.

半月体の形成等, 上記の炎症所見はまったく観察されなかった。

次に, 腎皮質において炎症性サイトカインの遺伝子発現を Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法により確認したところ, anti-GBM 投与によって炎症性サイトカイン発現が増強されたのに対し, レーザー照射群では発現が軽減されていることが確認された。こうした結果から, 近赤外低反応レベルレーザーは腎炎に対し抗炎症効果をもたらすことがわかった。また, 250 秒のレーザーの照射により腎臓表面で 0.8 から 1.0°C の腎周囲組織温度の上昇を認めたが, 照射終了後 2 分以内に元の組織温度まで低下することを確認した (Fig.3)⁶⁾。

4. 低反応レベルレーザー照射がもたらす鎮痛・抗炎症のメカニズム

今回の腎炎モデル動物に対する低反応レベルレーザー照射の検討ではマクロファージやリンパ球浸潤の抑制と, 炎症性サイトカイン発現の抑制を確認することができた。われわれはラットを対象とした過去の腎炎モデル実験で, 腎臓局所炎症が支配神経軸索の分岐を促進する結果, 求心性神経活動を促進することで痛みの増強をもたらすこと, さらに, 神経軸索の分岐が炎症を増悪させる一因であることを報告している^{7,8)}。また, これまでに近赤外低反応レベルレーザーが神経組織のエネルギー代謝に作用し, 細胞内アデノシン三リン酸 (ATP) の量を増加させること, また, 細胞膜のカリウムチャネルを開口させて細胞膜抵抗を低下させ, 膜電位の安定化をもたらすことで, 神経活動を抑制することを報告してきた。こうした現象を考え合わせると, 低反応レベルレーザー照射による鎮痛効果は少数の特異的な作用点を通して発揮されるというよりも, これら複数の段階, 複数の細胞種への作用を通して発揮されている可能性を考慮すべきであろう。具体的には, レーザー照射による末梢組織の鎮痛・抗炎症効果は, (1) 痛みを伝える求心性神経伝達の抑制, (2) 免疫担当細胞の膜安定化による炎症物

Fig.4 Hypothetical mechanisms of anti-inflammatory effect by low-reactive level laser irradiation.

質の遊離・産生の抑制, (3) 局所循環の改善による酸素供給と発痛物質の洗い流し等によりもたらされるものと考えられる (Fig.4)。また, 今回の検討では, 250 秒間のレーザー照射により腎臓表面で 0.8 から 1.0°C の組織温度上昇を引き起こすことを明らかにした。組織温度の上昇は循環血液中のマクロファージの活性化を引き起こし, サイトカイン産生を上昇させる可能性がある^{9,10)}が, 本研究ではレーザー照射時間は 250 秒と短く, さらに炎症が緩和されたことから, レーザー照射による効果は組織温度の上昇によるものではないと思われる。

本研究において, 免疫組織染色により, ED-1 陽性の M1 マクロファージの浸潤が増加すること, レーザーの照射によりそうした M1 マクロファージ浸潤が抑制されることを確認した。M1 マクロファージがサイトカイン産生などを介して炎症反応を増強する一方, M2 マクロファージは抗炎症サイトカインの産生, 血管新生, 創傷治癒に関与することが知られている^{11,12)}。Aki らは, GBM 腎炎モデル動物を用いた検討で, M1 マクロファージの糸球体内への浸潤により M2 マクロファージの活性化が引き起こされることを報告している¹³⁾。これらのことから, M2 マクロファージも腎炎病態の進行に関与していることを示唆している。レーザーの照射による腎炎抑制効果は M1 マクロファージと M2 マクロファージの機能的なバランスに影響を与えた結果である可能性も考えられる。

5. おわりに

今日まで、低反応レベルレーザー治療は副作用や苦痛のきわめて少ない治療法として、疼痛緩和や創傷治癒の促進などに一定の成果を上げてきた。近年では光源をLEDにして装置を小型化、安価にすることで在宅治療への利用も期待され始めている。今回は腎炎モデル動物を用いた基礎研究を紹介した。臨床において、抗GBM抗体産生による腎炎は肺出血や腎不全を引き起こし、予後も悪いことが知られている。現在、腎炎の治療にはステロイド剤やシクロフォスファミドなどの抗炎症薬が用いられているが、これらの薬剤は長期間の使用によりしばしば重篤な副作用を引き起こす。われわれの今回の実験結果は深部に位置する腎臓に体外から光を届けることで直接抗炎症効果を発揮できる可能性を示唆しており、将来、難治性腎炎の治療の一助となることに期待したい。今後は組織の温度上昇を避けつつ、より光を効率よく深部まで到達させるためのシステム開発と条件検討が必要となるであろう。

利益相反の開示

本論文に関して、開示すべき利益相反はない。

参考文献

- 1) A.P. Castano, T. Dai, I. Yaroslavsky, R. Cohen, W.A. Apruzzese, M.H. Smotrich, M.R. Hamblin: Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time. *Lasers in surgery and medicine*, 39(6): 543-550, 2007.
- 2) L. Gavish, L.S. Perez, P. Reissman, S.D. Gertz: Irradiation with 780 nm diode laser attenuates inflammatory cytokines but upregulates nitric oxide in lipopolysaccharide-stimulated macrophages: implications for the prevention of aneurysm progression. *Lasers in surgery and medicine*, 40(5): 371-378, 2008.
- 3) C.F. Rizzi, J.L. Mauriz, D.S. Freitas Corrêa, A.J. Moreira, C.G. Zettler, L.I. Filippin, N.P. Marroni, J. González-Gallego: Effects of low-level laser therapy (LLLT) on the nuclear factor (NF)- κ B signaling pathway in traumatized muscle. *Lasers in surgery and medicine*, 38(7): 704-713, 2006.
- 4) L. Zhang, J. Zhao, N. Kuboyama, Y. Abiko: Low-level laser irradiation treatment reduces CCL2 expression in rat rheumatoid synovia via a chemokine signaling pathway. *Lasers in Medical Science*, 26(5): 707-717, 2011.
- 5) T. Kohda, S. Okada, A. Hayashi, S. Kanzaki, Y. Ninomiya, M. Taki, Y. Sado: High nephritogenicity of monoclonal antibodies belonging to IgG2a and IgG2b subclasses in rat anti-GBM nephritis. *Kidney international*, 66(1): 177-186, 2004.
- 6) M. Yamato, A. Kaneda, Y. Kataoka: Low-level laser therapy improves crescentic glomerulonephritis in rats. *Lasers in Medical Science*, 28(4): 1189-1196, 2013.
- 7) T. Ikeura, Y. Kataoka, T. Wakabayashi, T. Mori, Y. Takamori, S. Takamido, K. Okazaki, H. Yamada: Effects of sensory denervation by neonatal capsaicin administration on experimental pancreatitis induced by dibutyltin dichloride. *Med. Mol. Morphol.*, 40(3): 141-149, 2007.
- 8) S. Takamido, Y. Kataoka, A. Tanano, Y. Cui, T. Ikeura, M. Shimatani, Y. Kubota, K. Okazaki, H. Yamada: Intrapaneatic axonal hyperbranching of dorsal root ganglia neurons in chronic pancreatitis model rats and its relation to pancreatic pain. *Pancreas*, 33(3): 268-279, 2006.
- 9) Q. Jiang, L. DeTolla, N. van Rooijen, I.S. Singh, B. Fitzgerald, M.M. Lipsky, A.S. Kane, A.S. Cross, J.D. Hasday: Febrile-range temperature modifies early systemic tumor necrosis factor alpha expression in mice challenged with bacterial endotoxin. *Infection and immunity*, 67(4): 1539-1546, 1999.
- 10) Q. Jiang, L. Detolla, I.S. Singh, L. Gatdula, B. Fitzgerald, N. van Rooijen, A.S. Cross, J.D. Hasday: Exposure to febrile temperature upregulates expression of pyrogenic cytokines in endotoxin-challenged mice. *The American journal of physiology*, 276(6 Pt 2): R1653-1660, 1999.
- 11) S. Gordon: Alternative activation of macrophages. *Nature reviews. Immunology.*, 3(1): 23-35, 2003.
- 12) S.D. Ricardo, H. van Goor, A.A. Eddy: Macrophage diversity in renal injury and repair. *The Journal of clinical investigation*, 118(11): 3522-3530, 2008.
- 13) K. Aki, A. Shimizu, Y. Masuda, N. Kuwahara, T. Arai, A. Ishikawa, E. Fujita, A. Mii, Y. Natori, Y. Fukunaga et al.: ANG II receptor blockade enhances anti-inflammatory macrophages in anti-glomerular basement membrane glomerulonephritis. *American journal of physiology. Renal physiology*, 298(4): F870-882, 2010.

著者紹介

大和 正典 (Masanori Yamato)

2003年3月、京都薬科大学薬学部卒業。
2005年3月、同大学大学院修士課程修了。
2009年3月、大阪市立大学大学院医学研究科修了(医学博士)。同年4月から2013年3月まで、独立行政法人理化学研究所分子イメージング科学研究センター研究員。2013年4月より、独立行政法人理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センター細胞機能評価研究チーム研究員。