

国立循環器病センター様向けEASY BASE DVDシステム概念図



図1：新生児行動記録装置

光フィルター保育器の開発

分担研究者 波多野直子 本間直樹（アトムメディカル株式会社）

研究要旨

早産児発達障害を予防するため、光受容体メラノプシンを制御する光フィルターを用いた次世代人工保育器の開発が求められる。この光フィルターを用いて早産児に昼夜差のある光環境を与え体重増加、睡眠覚醒の発達が促進されるかを確認する。光フィルターにおいては【早産児網膜のメラノプシンに作用する光波長580nm以下の人工光をカットするフィルター・カバー(特願2005-283286)】を基に光特性、使用形態を考慮し試作を行った。光特性においては光波長580nm以下をカットするような素材を製作、及び市販品を購入し、光透過率を測定しながら選定を行い、また光フィルターの使用形態においては実際の新生児集中治療室（Neonatal Intensive Care Unit：NICU）内で使用されている保育器や新生児ベッドに取付けられることが必須条件であり、早産児の看護における作業性、視認性が求められるため、東北大学病院周産母子センターの医療スタッフの意見を取入れ構造の検討を行った。視認性においては、NICU内の照度が80～600Lx程度であり、光フィルターで光波長580nm以下をカットしているため、室内照度によっては保育器内が暗く看護ケアがしにくい状況が生じる可能性があった。そこで、メラノプシンに作用する光波長580nm以下を出さないLEDにより人工光を作成（特願2009-011895）して、保育器内の照明灯とすることで視認性を高めた。臨床研究施設が前記以外に2施設あり、各施設で使用している保育器、新生児ベッドに対応する光フィルターを製作した。

A. 研究目的

光受容体メラノプシンを制御する光フィルターにおいて、メラノプシンに作用する光波長580nm以下の人工光をカットする必要があるため、使用を計画している素材の光特性を調べる必要がある。また、保育器内部に装着する部品については、児への生体的影響を踏まえ、安全な素材であることが必須となり、安全性試験を行わなければならない。

光フィルター（以下構造物を光フィルターとする）を検討する上で考慮した点は、NICU内で使用頻度が多い機器である保育器と新生児ベッドに視点を置いて、看護の際の作業性、視認性を重視した。これらを踏まえて光特性、使用形態の検討を行ったので報告する。

B. 研究方法

1. 光特性

光フィルターで使用される素材である塩化ビニルシート^{※1, 2, 3}とアクリル板^{※4}の光特性について分光放射照度計（ウシオ製スペクトロラディオメータ USR-40）を使用し測定を行った。

2. 安全性

安全性の指標として、保育器内で使用する塩化ビニルシートをアルデヒド類および揮発性有機化合物（VOC）の放散速度試験を株式会社住化

分析センターで行った。

3. 作業性、視認性

保育器へ装着する光フィルター2種類（図2、3）と新生児ベッドへ装着する光フィルター1種類（図4）のプロトタイプを製作し、東北大学病院周産母子センターの医療スタッフへのデモンストレーションを行い、アンケートによって改善点を抽出して光フィルターの構造を検討した。また、保育器内の視認性向上のための照明灯（特願2009-011895）の有効性を確認した。

C. 研究結果

1. 光特性

3種類の塩化ビニルシート^{※1, 2, 3}とアクリル板^{※4}の光特性を分光放射照度計で測定した結果、メラノプシンに作用する光波長580nm以下の光透過率が抑えられていることが確認できた。（図5）また、照明灯として使用するLEDについても580nm以下の光透過率が抑えられていることが確認できた。（図6）

2. 安全性

保育器内で使用する塩化ビニルシート^{※3}をアルデヒド類および揮発性有機化合物（VOC）の放散速度試験を行った。アルデヒド類に関しては不検出であり、揮発性有機化合物については

不検出または検出定量下限値レベルであった。

3. 作業性、視認性

NICU内が狭いため、光フィルターの取外し、取外し後の保管を考えると、医療スタッフには保育器カバータイプが看護ケアの作業性・安全性の面で支持された。また、アンケート結果から視認性向上の意見を取入れ、光波長580nmより長波長側で透過率が優れているアクリル板を前面へ使用した。その結果、保育器内の視認性を高め、看護面において支障が無いことを確認できた。

保育器照明灯においては、点灯時と消灯時の保育器内の照度に差があるため視認性の向上ができた。

D. 考察

光特性においては、3種類の塩化ビニルシートの中で、菱興プラスチックDA MKV 099^{*2}が580nmより長波長側からカットできており光受容体メラノプシンを制御するフィルターとして優れている。しかし、他の2種類のフィルターに比べて素材からの臭いが製造直後に強いため（製造後2-4週間で次第に臭いは消失していく）、医療スタッフによっては敬遠された。今後更に適切な光フィルターを開発するには、素材の重量や単価、前記の臭いを踏まえて、各光フィルターに適した素材を検討する必要がある。

光フィルターには、早産児（患者）と医療スタッフの両者において安全性が要求される。保育器内部は清潔領域であるため、生体適合性に反する材質は使用できない。また清拭、消毒が可能でなければならない。従って、保育器内部で使用する塩化ビニルシート^{*3}のアルデヒド類および揮発性有機化合物（VOC）の放散速度試験は必須条件である。

作業性においては、保育器オーバーラップタイプではスタッフ自身が入ることができ、保育器内部に光フィルターの部品がないことから衛生面で優れていたが、①外部モニタの確認が難しくなる、②サイズが大きいため取外した際の保管場所の確保が難しい、といった解決が難しい問題点があり、今回の保育器用光フィルターとしては採用しなかった。また、保育器カバータイプでは、収納性には優れているが、保育器内へのアクセスする部分が光フィルターに塞がれてしまうため、全てにアクセスポートを設けた。その結果、通常の看護の障害にならないようにしたことで対処でき、本研究ではこのカバータイプを保育器用に採用した。

新生児ベッドタイプでは、NICUのスペースを考慮し、授乳時および看護時には上部をスライドさせることで看護スペースを設け、取外し後は折りたためる構造にしたため作業性においては問題ない。

照明灯は670nmを中心波長とする赤色LEDであるため、光波長600nm以下の光を出さない。眼への影響については、これまでの報告より短波長の青色光が目の発達を妨げるという報告が存在するが、今回使用した可視光の長波長成分が目の発達に悪影響を及ぼす可能性は過去の報告により否定されている。

E. 結論

保育器用の光フィルター構造はNICUのスペースを考慮しカバータイプとした。素材は保育器内に使用する素材を生体への安全性面から東亜合成（株）製シート^{*3}を使用し、保育器へ被せる部分には光透過性が良く、臭いも少ない山本光学（株）製レーザーカーテンYL-600^{*1}を使用した。前面には視認性を確保する上で、シート素材よりも光透過性が良いアクリル板^{*4}を使用する。各施設で使用している保育器は4種類あり、それぞれ形状に違いがあるため、個々に対応した光フィルターを製作した。（図7-1, 7-2, 7-3, 7-4）

新生児ベッド用の光フィルターは新生児ベッドを包む形態で、授乳時および看護時には上部を引き出し、作業スペースを設ける必要があった。（図8）

保育器内部の視認性はメラノプシンに作用する光波長580nm以下を出さないLEDを用いたことによって向上したと考えられる（特願2009-011895）。（図9）

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

（国内学会）

なし

（国際学会）

なし

G. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）

1. 特許取得

次頁参照

2. 実用新案登録

なし
3. その他
なし

※1 塩化ビニルシート：山本光学社製レーザーカーテン YL-600、

※2 塩化ビニルシート：菱興プラスチック社製 DA MKV 099
※3 塩化ビニルシート：東亜合成社製
※4 アクリル板：山本光学社製レーザーウィンドウ YL-500

特許出願状況

	出願番号	発明者	発明の名称	出願日
1	特願 2008-272984	松原照巳・小池英二・ 若林啓介・小林心一・ 本間直樹ら	保育器	平成 20 年 10 月 3 日
2	特願 2008-244595	松原照巳・小池英二・ 本間直樹ら	保育器	平成 20 年 9 月 24 日
3	特願 2008-244595	松原照巳・小池英二・ 本間直樹ら	保育器	平成 20 年 9 月 24 日
4	特願 2008-244596	茨 聡・松原照巳・小池 英二・小林心一・本間 直樹ら	保育器	平成 20 年 9 月 24 日
5	特願 2008-174209	本間直樹・小林心一・ 松原一雄	保育器におけるグロメッ ト構造	平成 20 年 7 月 3 日

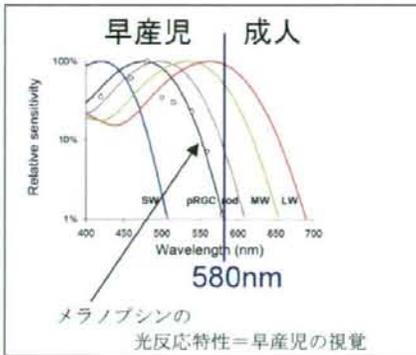


図 1. メラノプシンの反応特性



図 4. 新生児ベッド装着タイプ



図 2. 保育器オーバーラップタイプ

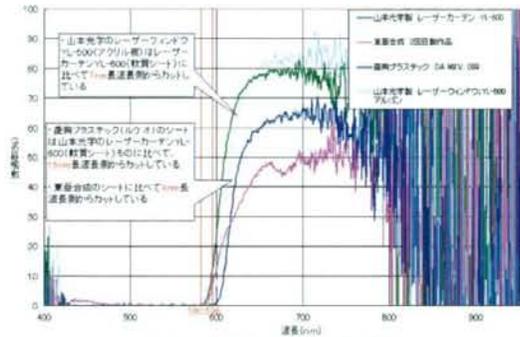


図 5. 各素材の透過率特性



図 3. 保育器カバータイプ

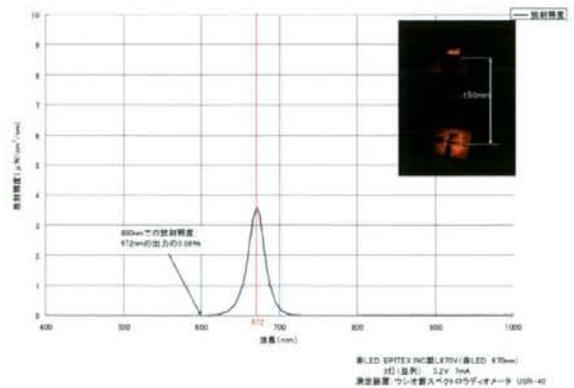


図 6. LED の透過率特性



図 7-1. 保育器用光フィルタ
ドレーガー社製 8000IC



図 7-3. 保育器用光フィルタ
アイソレット社製 C2000



図 7-2. 保育器用光フィルタ
ドレーガー社製カレオ



図 7-4. 保育器用光フィルタ
アトムメディカル社製 V-2100G



図 9. 照明灯



図 8. 新生児ベッド用光フィルタ

厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業）
分担研究報告書

「新生児唾液試料のホルモン濃度測定による発達評価」

分担研究者 飯郷雅之 宇都宮大学農学部・准教授

研究要旨

光受容体メラノプシンを制御する光フィルターを用いた次世代人工保育器が早産児の生物時計や身体の発達に寄与しているかどうか明らかにするため、唾液試料を用いて非侵襲的にホルモン濃度の測定を行った。生物時計の指標ホルモンとしてメラトニン、ストレス指標ホルモンとしてコルチゾール、身体の発達指標ホルモンとしてインスリン様成長因子(IGF-I)を選択した。まず、ラジオイムノアッセイ(RIA)による測定系を確立し、測定に必要な試料の量を調べたところ、メラトニン、コルチゾール、IGF-Iの測定には、それぞれ最低200, 25, 20 μ lの試料が必要であった。新生児から採取される唾液試料には限りがあるのでメラトニンを対象から除外し、コルチゾールとIGF-Iを対象とした測定を行い、新生児唾液試料におけるコルチゾール・IGF-Iホルモン量の生後発達や日内変動の有無を評価した。その結果、コルチゾール濃度の日リズムが確認される対象児が見いだされたが、その位相は成人と異なっていた。よって、コルチゾール日リズムの形成とその位相の光同調の有無により光受容体メラノプシンを制御する光フィルターを用いた次世代人工保育器が早産児の生物時計や身体の発達に寄与しているかどうか明らかにすることができると考えられた。また、IGF-I測定においても唾液中IGF-I濃度が顕著な生後発達を示す可能性が示唆され、唾液中IGF-I濃度を対象児の発達指標として使用できると考えられた。以上、本研究によって、光受容体メラノプシンを制御する光フィルターを用いた次世代人工保育器が早産児の生物時計や身体の発達に寄与しているかどうか明らかにするための客観的指標はほぼ確立された。今後は、次世代人工保育器使用の有無の効果を検証する必要がある。

A. 研究目的

光受容体メラノプシンを制御する光フィルターを用いた次世代人工保育器が早産児の生物時計や身体の発達に寄与しているかどうか明らかにするために、対象児の生物時計機能の発達や児が保育環境から受けるストレス強度、および児の成長因子分泌能を客観的に評価するための指標が必要である。そこで本研究においては、生物時計の指標ホルモンとしてメラトニン、ストレス指標ホルモンとしてコルチゾール、身体の発達指標ホルモンとしてインスリン様成長因子(IGF-I)を選択して、指標ホルモンの生後発達の評価を行うことを試みた。非侵襲的にホルモン濃度の測定が可能であることから試料は唾液を用いることとし、各ホルモンの濃度はラジオイムノアッセイ(RIA)により測定した。

B. 研究方法

1. 試料

東北大学病院および宮城県立こども病院において1日に4-8回採取された唾液試料を用いた。これらの試料は参加医療機関より宇都宮大学農学

部に凍結した状態で送付され、 -80°C で保存した。凍結試料は各ホルモンの測定直前に解凍し、遠心分離(10000 \times g, 4°C , 2分)を行い、上清をRIAによるホルモン測定に供した。

2. メラトニンの測定

RIA用ガラスチューブに唾液試料(100 μ l)または標準曲線作成用スタンダード(100 μ l; 0.39-200 pg/tube)を分注し、RIA用緩衝液(100 μ l)を加えた後、抗メラトニン血清(100 μ l, 6000倍希釈; Stockground, Surrey, UK), 標識ホルモン(100 μ l, 約10000dpm; O-Methyl- ^3H melatonin (85 Ci/mmol, Amersham Japan)を分注し、攪拌した後、 4°C で一晩インキュベートした。その後、B/F分離(抗体に結合した抗原と非結合の抗原を分離すること)のためにデキストラン-チャーコール(DCC; 250 μ l)を加え、 4°C で15分間インキュベートした後、遠心分離(2000 \times g, 4°C , 15分)を行い、上清をあらかじめシンチレータ(2 ml; クリアゾルI, ナカライテスク)を分注したシンチレーションバイアルに移し、ふたをしてよく攪拌した後、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。GraphPad Prismによりデータ処理を行い、各試料のメラトニン濃度を計算した。

3. コルチゾールの測定

唾液試料 (25-100 μ l) を試験管に取り、ジエチルエーテル 1 ml を加えてよく攪拌して抽出した後、試料を急速凍結し、凍結しなかったジエチルエーテル層を別の試験管に移した。試料を溶解した後、再度この操作をくり返し、ジエチルエーテル層をあわせた。遠心エバポレータにて乾固した後、RIA用緩衝液に溶解し、抽出済唾液試料とした。

RIA用ガラスチューブに抽出済唾液試料 (25 μ l) とRIA用緩衝液 (75 μ l) , または標準曲線作成用スタンダード (100 μ l ; 0.16-800 pg/tube) を分注し、RIA用緩衝液 (100 μ l) を加えた後、抗コルチゾール血清 (100 μ l, 6000倍希釈; 神戸川研究所), 標識ホルモン (100 μ l, 約20000dpm; [1,2,6,7-3H(N)]-Hydrocortisone, Perkin Elmer) を分注し、攪拌した後、4°Cで一晩インキュベートした。その後、B/F分離のためにデキストラン-チャーコール (DCC ; 250 μ l) を加え、4°Cで15分間インキュベートした後、遠心分離 (2000 \times g, 4°C, 15分) を行い、上清をあらかじめシンチレータ (2 ml ; クリアゾルI, ナカライテスク) を分注したシンチレーションバイアルに移し、ふたをしてよく攪拌した後、液体シンチレーションカウンタにより放射活性を測定した。GraphPad Prismによりデータ処理を行い、各試料のコルチゾール濃度を計算した。

4. IGF-Iの測定

IGF-I (24-41) RIA kit (S2144 ; Peninsula) を用いて唾液試料中のIGF-I濃度を測定した。操作はキットに添付のプロトコールに従い、B/F分離の後、 γ -カウンタにより放射活性を測定した。GraphPad Prismによりデータ処理を行い、各試料のIGF-I濃度を計算した。

(倫理面への配慮)

宇都宮大学において東北大学病院から送付された試料を受領する際には、試料情報を伝えないブラインド測定を行うこととし、測定終了後に東北大学病院にデータを送付し、対象児のデータと照合した。

C. 研究結果

1. RIAによるホルモン測定系の確立

標準曲線と唾液試料の希釈系列の平行線検定により、各ホルモンが正しく測定されていることを確認した。測定に必要な試料の最低量を調べたところ、メラトニン、コルチゾール、IGF-I

の測定には、それぞれ最低200, 25, 20 μ lの試料が必要であった。また、交差反応する物質が存在する可能性を考え、同一児からの唾液試料の日周リズム測定に際しては、同一量の試料を用いるのが良いことが判明した。

上記の結果を鑑み、新生児から採取される唾液試料には量的制約があるのでメラトニンを対象から除外し、コルチゾールとIGF-Iを対象とした測定を行い、新生児唾液試料におけるコルチゾールおよびIGF-I濃度の生後発達や日内変動の有無を評価した。

2. コルチゾール

成人2名の唾液試料を用いた測定の結果、コルチゾール濃度は8時にピークを示す日周リズムを示した (図1)。この結果はこれまでに報告された唾液中コルチゾールの動態と一致しており、測定系の有効性が確認された。

続いて、対象児 (12例) の唾液試料を対象として測定を行ったところ、換算週令31週の対象児を含むすべての試料でコルチゾールを測定することができた (図2- 図6)。一日を通じてコルチゾール濃度が高い値を示し続ける対象児はみられなかった。また、KS (39w4d) (図2A), KA (35w5d) (図4A), YM (38w5d) (図5D), KS (33w6d) (図6C) においては、唾液中コルチゾール濃度が日周リズムを示しているように見受けられた。

3. IGF-I

対象児 (13例) の唾液試料を対象として測定を行ったところ、すべての試料でIGF-Iを測定することができた (図2- 図6)。そのレンジは0.1 ng/ml から26ng/mlであった。RG (42w2d)

(図2D), KA (35w5d) (図4B), KA (36w4d) (図4D) においては唾液中IGF-I濃度が日周リズムを示しているように見受けられた。これらの対象児の換算週令は35-42週であった。日周リズムを示さない換算週令31-33週の対象児の唾液中IGF-I濃度はすべて1 ng/ml以下であった。

D. 考察

1. コルチゾール

一日を通じてコルチゾール濃度が高い値を示し続ける対象児はみられなかったことから、対象児に大きなストレスはかかっていないものと推察される。

日周リズムの有無を検討したところ、4例の対象児において日周リズムが形成されているように見受けられたが、その位相には個人差が存在し、成人とは異なっていた。よって、新生児の日

周リズム形成過程においては、コルチゾールの日周リズムがフリーランする状態でまず形成された後に、環境の明暗サイクルに生物時計が光同調し、成人と同じ位相のコルチゾール日周リズムへと変化するのではないかと考えられる。この過程をモニターすることにより、光受容体メラノプシンを制御する光フィルターを用いた次世代人工保育器が早産児の生物時計機能の発達に寄与しているかどうかを検討することができると思われる。

2. IGF-I

対象児の唾液中IGF-I濃度の絶対値と日周リズムの有無には個人差が見られた。これは、児の発達過程で唾液中IGF-I濃度が劇的な生後発達とステージ特異的な日周リズムの発現を示す可能性を強く示唆している。唾液試料を用いたIGF-I測定による児の発達評価はまだ途に着いたばかりであり、今後さらに測定を行いデータを蓄積することにより、対象児の発達指標として確立されることが期待される。

E. 結論

本研究の結果、唾液中のコルチゾールおよびIGF-IのRIAによる測定系が確立され、これらのホルモンの日周リズムが形成された対象児を見つけ出すことが可能となった。よって、光受容体メラノプシンを制御する光フィルターを用いた次世代人工保育器が早産児の生物時計や身体の発達に寄与しているかどうか明らかにするための客観的指標はほぼ確立されたと言える。今後は、次世代人工保育器使用の有無の効果を検証する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sunuma T, Amano M, Iigo M (2009) Food-entrainable circadian oscillator in goldfish: Multiple daily feeding times and food anticipatory activity. *Fisheries Science* 75: 207-214.
- 2) Ono H, Nakao N, Yamamura T, Kinoshita K, Mizutani M, Namikawa T, Iigo M, Ebihara S, Yoshimura T (2009) Red jungle fowl (*Gallus gallus*) as a model for studying the molecular mechanism of seasonal reproduction. *Animal Science Journal* (in press).
- 3) Aoyama M, Maejima Y, Suzuki T, Iigo M, Sugita S (2009) Androgen suppresses

corticotropin-induced increase in plasma cortisol level but enhances the increase in plasma aldosterone level in goats. *Journal of Veterinary Medical Science* (in press).

- 4) Ohta H, Xu S, Moriya T, Iigo M, Watanabe T, Nakahata N, Chisaka H, Hanita T, Matsuda T, Ohura T, Kimura Y, Yaegashi N, Tsuchiya S, Tei H, Okamura K (2008) Maternal feeding controls fetal biological clock. *PLoS ONE* 3: e2601.
- 5) Amiya N, Amano M, Iigo M, Yamanome T, Takahashi A, Yamamori K (2008) Interaction of orexin/hypocretin-like immunoreactive neurons with melanin-concentrating hormone and α -melanocyte-stimulating hormone neurons in the brain of a pleuronectiform fish, barfin flounder *Fisheries Science* 74: 1040-1046.

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 新井菜津美, 青山真人, 杉田昭栄, 柳沢忠, 飯郷雅之. ハシブトガラス (*Corvus macrorhynchos*) 緑色光感受性オプシン遺伝子の cDNA クローニング. 日本分子生物学会第 8 回春季シンポジウム「躍動する分子生物学 - 北の大地から -」. 札幌市, 2008 年 5 月 26-27 日.
- 2) 飯郷雅之, 阿部朋孝, 水澤寛太, 藤堂剛. ゼブラフィッシュ末梢細胞の生物時計に対する温度パルスの影響. 第 15 回日本時間生物学会学術大会, 岡山大学, 2008 年 11 月 8-9 日.
- 3) 筋野貢, 古河恵一, 藤岡厚子, 鯉沼聡, 長野護, 飯郷雅之, 重吉康史. 腎臓の時計遺伝子発現にたいするグルココルチコイドの影響. 第 15 回日本時間生物学会学術大会, 岡山大学, 2008 年 11 月 8-9 日.

(国際学会)

- 1) Takahashi D, Uesaka M, Fujita S, Azuma T, Yanagisawa T, Iigo M. Deep-brain photoreceptive molecules in fish. *5th World Fisheries Congress*. Yokohama, Japan. Oct. 20-24, 2008.
- 2) Watanabe Y, Endo M, Abe T, Tsukamoto T, Yanagisawa T, Iigo M. Identification of light-induced genes in photosensitive zebrafish peripheral cells. *5th World Fisheries Congress*. Yokohama, Japan. Oct. 20-24, 2008.
- 3) Saito Y, Aoki Y, Azuma T, Iigo M, Yanagisawa T. Molecular cloning of the second prepro-thyrotropin-releasing hormone cDNA in the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *5th World Fisheries Congress*. Yokohama, Japan. Oct. 20-24, 2008.

- 4) Saito Y, Kambayashi S, Amiya N, Yasuo S, Yoshimura T, Amano M, Yanagisawa T, Iigo M. Pharmacological and molecular characterization of melatonin receptors in ayu (*Plecoglossus altivelis*), an osmerid teleost. *Japan Taiwan Bilateral Science & Technology Symposium*. Utsunomiya University, Japan. Nov. 10-12, 2008.
- 5) Watanabe Y, Endo M, Abe T, Tsukamoto T, Yanagisawa T, Iigo M. Identification of light-induced genes in photosensitive zebrafish peripheral cells by DNA microarray. *Japan Taiwan Bilateral Science & Technology Symposium*. Utsunomiya University, Japan. Nov. 10-12, 2008.
- 6) Arai N, Sugita S, Aoyama M, Yanagisawa T, Iigo M. Molecular cloning of rhodopsin (RH1) cDNA from the retina of the jungle crow (*Corvus macrorhynchos*). *Japan Taiwan Bilateral Science & Technology Symposium*. Utsunomiya University, Japan. Nov. 10-12, 2008.
- 7) Kimijima M, Uesaka M, Takahashi D, Yanagisawa T, Iigo M. Molecular cloning of parainopsin cDNA from the pineal organ of the masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Japan Taiwan Bilateral Science & Technology Symposium*. Utsunomiya University, Japan. Nov. 10-12, 2008.
- 8) Tsunoda M, Kasahara K, Saito Y, Abe T, Yanagisawa T, Iigo M. Molecular cloning and expression analysis of GPR54 in medaka (*Oryzias latipes*) and two salmonids, sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) and masu salmon (*O. masou*). *Japan Taiwan Bilateral Science & Technology Symposium*. Utsunomiya University, Japan. Nov. 10-12, 2008.

G. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

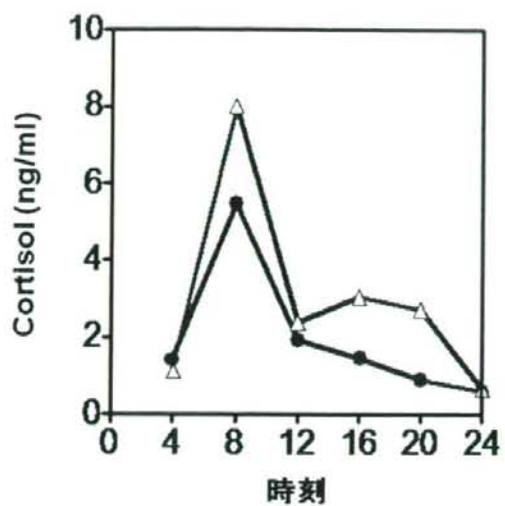


図1. 成人唾液中コルチゾールの測定結果.

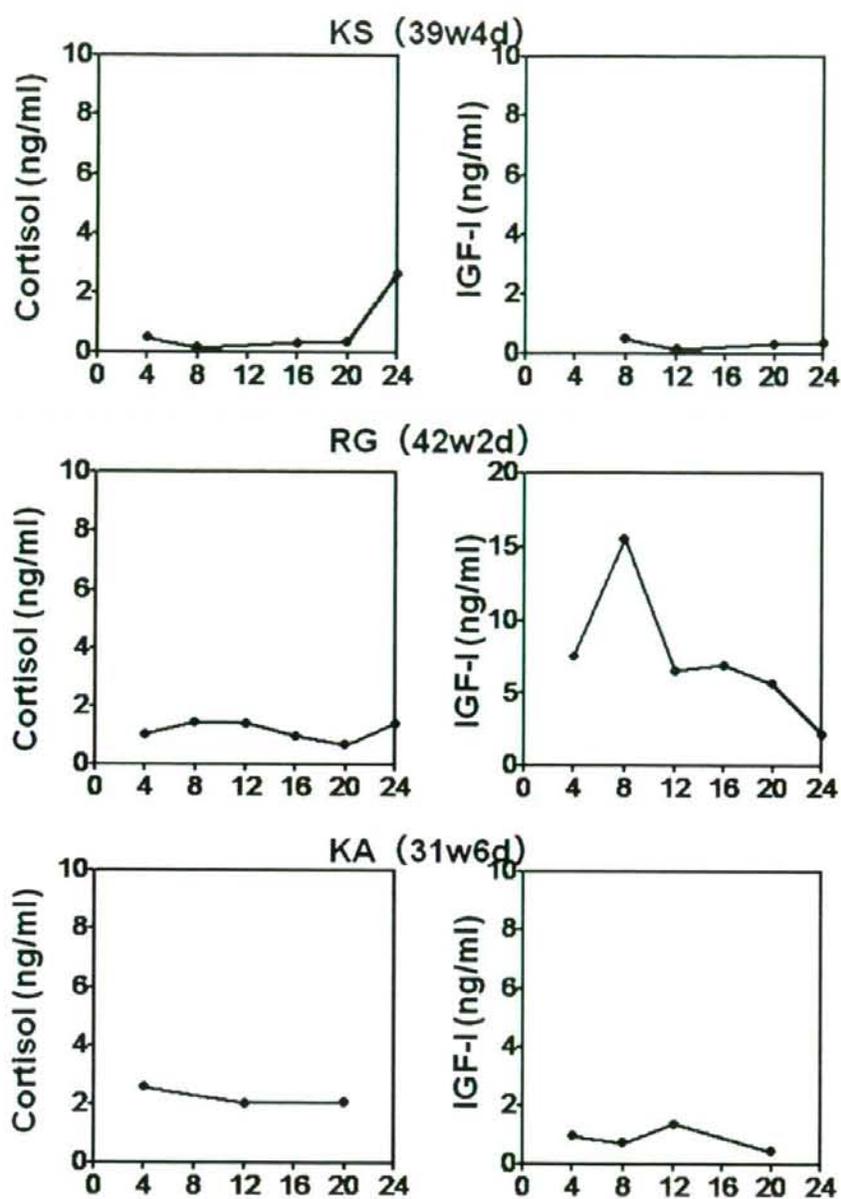


図2. 新生児唾液中コルチゾールとIGF-Iの測定結果
(その1) .

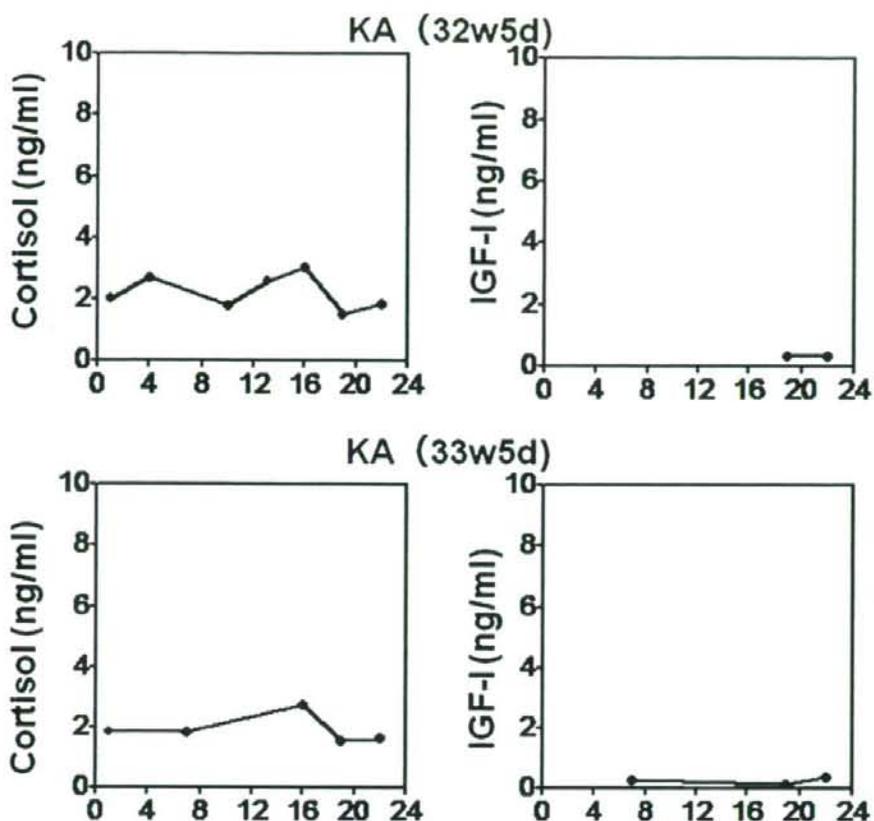


図3. 新生児唾液中コルチゾールとIGF-Iの測定結果
(その2) .

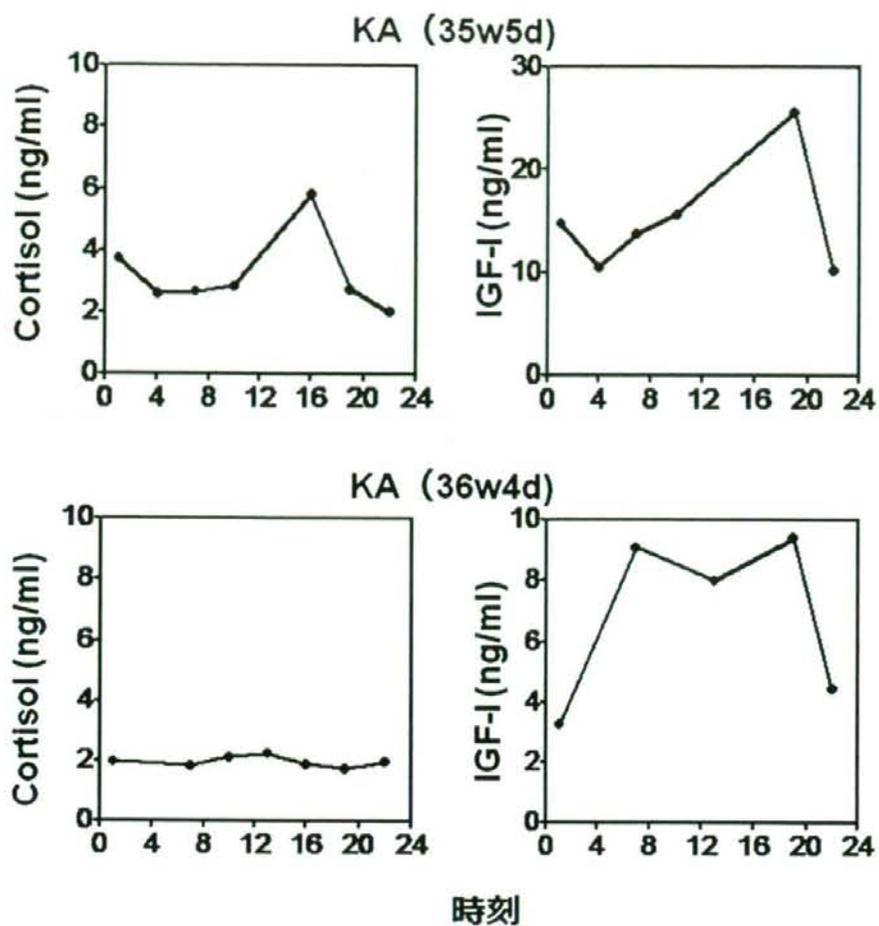


図4. 新生児唾液中コルチゾールとIGF-Iの測定結果 (その3) .

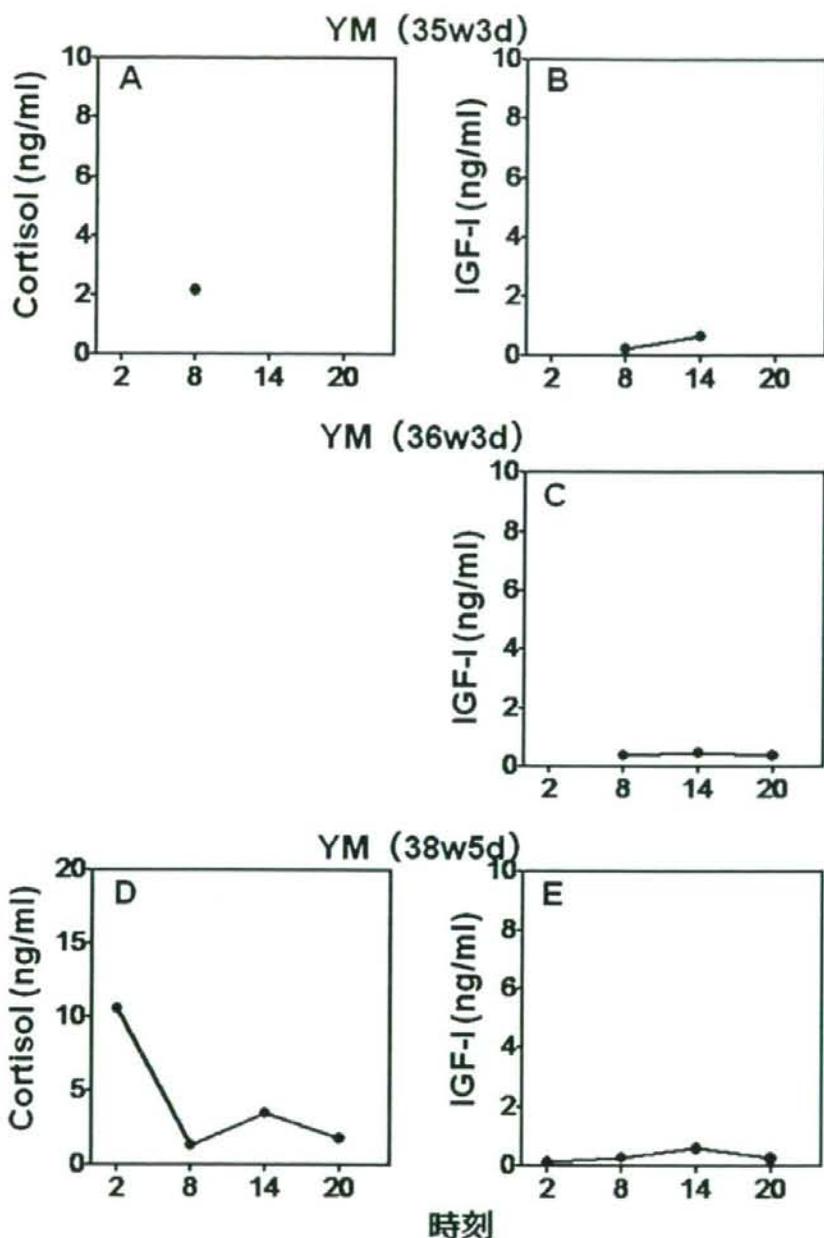


図5. 新生児唾液中コルチゾールとIGF-Iの測定結果 (その4) .

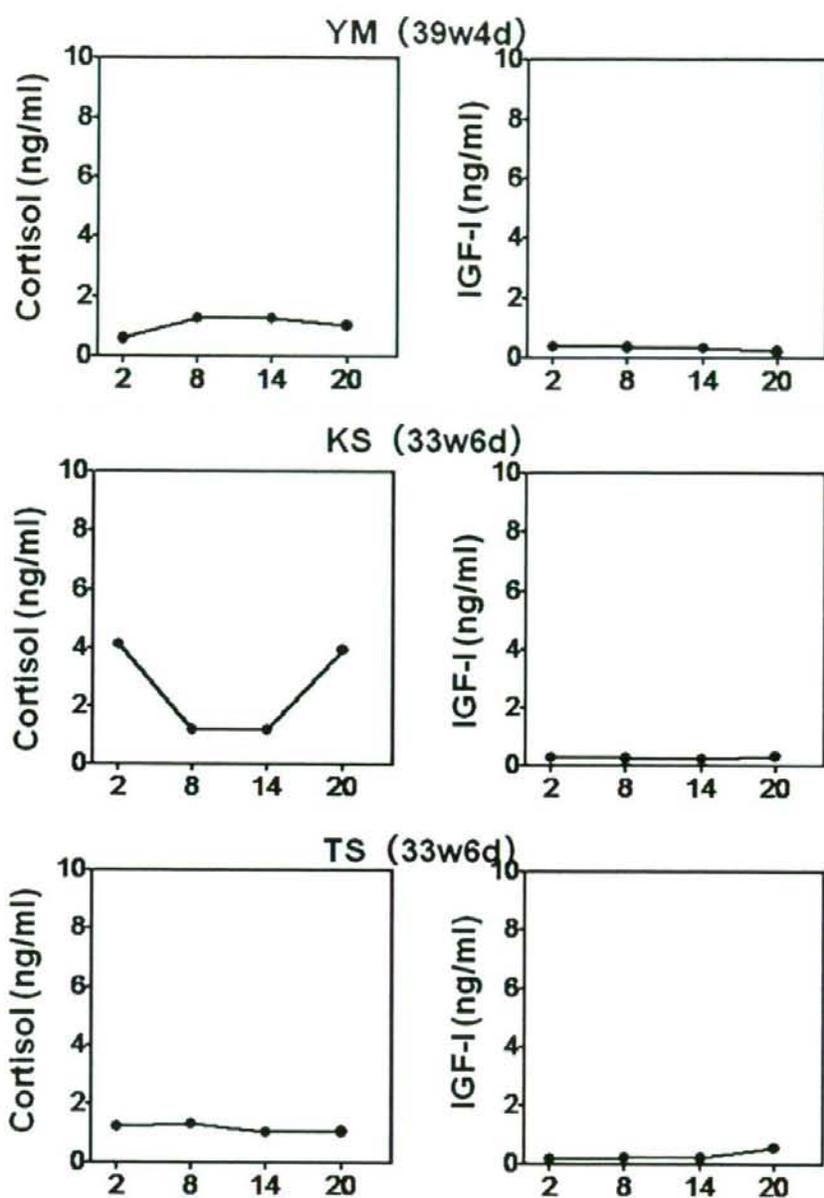


図6. 新生児唾液中コルチゾールとIGF-Iの測定結果
(その5) .

「成長因子の時間生物学的効果」

分担研究者 守屋孝洋 東北大学大学院薬学研究科・准教授

研究要旨

グレリンはオーファン受容体のGrowth hormone secretagogue (GHS) 受容体の内因性リガンドとして発見されたホルモンであり、生体内では主に胃において合成・分泌され、成長ホルモンの分泌促進作用などを介して児の発達に重要な役割を果たしている。また、グレリンの血中濃度は日内変動を示すことが報告されているが、この分泌リズムの生理的意義は明らかになっていない。そこで本研究では、新生ラットを対象にし、生後の体重増加および組織重量に対するグレリン投与の効果およびその投与時刻依存性について検討することを目的とした。その結果、新生期のグレリン投与がラットの体重増加を促進する作用を有することが初めて明らかになった。また、その体重増加作用は明期の投与では観察されず、暗期の投与で顕著にあらわれた。また、出生8日目の組織重量はいずれの臓器においても溶媒投与群とグレリン投与群の間に差は観察されなかったことから、グレリンによる体重増加は、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、脾臓以外の組織で起こっていることが示唆された。グレリンは新生児内でも分泌され、さらに血中のみならず、母乳中にも分泌されることが知られているので、本研究で明らかとなったグレリンの体重増加作用の時刻依存性は、母および児の生体リズムの発達における重要性を強く示唆するものである。

A. 研究目的

グレリンはオーファン受容体のGrowth hormone secretagogue (GHS) 受容体の内因性リガンドとして発見されたホルモンであり、生体内では主に胃において合成・分泌され、摂食促進作用、心血管系保護作用、交感神経抑制作用などに加え、成長ホルモンの分泌促進作用などを介して児の発達に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。最近の研究により、夜行性動物のラットでは、グレリンの血中濃度は休息期（明期）に高く、活動期（暗期）に低くなるという日内変動を示すこと（Bodosi *et al.*, 2004）、およびこの日内リズムは24時間の概日リズムに重要な時計遺伝子*clock*の変異マウスによって認められなくなることが報告され（Turek *et al.*, 2005）、内因的な時計機構によって制御されていることが明らかにされた。一方、母乳中にもグレリンが含まれていること、および周産期の児においてもグレリンが発現していることが報告されている（Hayashida *et al.*, 2002）、母乳中のグレリン含量および児の体内のグレリン量の日内リズムが発達に与える影響については全く知られていない。

そこで、本研究では、新生ラットを対象にし、生後の体重増加および組織重量に対するグレリン投与の効果およびその投与時刻依存性について検討することを目的とした。あわせて、血中

グレリン濃度を評価する測定系を確立することも目的とした。本研究によりホルモン分泌リズムの児の発達における生理的役割が明らかになれば、周産期の母子における日内リズムの重要性が再確認されるだけでなく、新生児集中治療室（Neonatal Intensive Care Unit: NICU）等での新生児ケアの光環境の重要性についても提言できることになるとと思われる。

B. 研究方法

SD系新生ラット（雄性）を対象とした。動物は恒温(23±2°C)条件及び明暗条件下(明期; 12時間、暗期; 12時間)で飼育した。水、餌は自由に与えた。母ラット1匹について、新生ラットを6匹飼養させた。

グレリン (rat acyl-ghrelin, Peptide Institute, Japan) は滅菌生理食塩水に溶解させ、出生2日目から出生7日目まで、1日1回、新生ラットに腹腔内投与 (1 nmol / 0.1 mL / pup) した。投与時刻は明期開始6時間後 (zeitgeber time (ZT)6)、あるいは暗期開始6時間後 (ZT18) に行い、対照群は生理食塩水を投与した。各群の新生ラット数は10~11とした。

薬物投与時に新生ラットの体重測定を行い、出生8日目に十分なエーテル麻酔を施して安楽死させ、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、脾臓を摘出し、その組織湿重量を測定した。

二群間の有意差検定は、Unpaired Student's *t*-testを用いて行った。

(倫理面への配慮)

全ての実験は、東北大学実験動物飼育管理施設委員会の承認(No. 20 薬動21号)及び東北大学遺伝子組換え実験安全専門委員会に承認された遺伝子組み換え実験計画「時計遺伝子レポータートランスジェニックラットを用いた体内時計の発振機構の解明」(研研76号)に従って行われた。

C. 研究結果

新生期の体重増加に対するグレリン投与の影響を検討した。その結果を図1~4に示す。いずれの群においても新生ラットの体重は測定期間を通じて増加した。出生4日目までは、ZT6およびZT18のいずれの投与時刻においても、その体重に溶媒投与群とグレリン投与群に有意な差は観察されなかった。ところが、グレリンのZT18投与は、出生5日目から7日目にかけていずれの測定時間においても、溶媒投与群と比較して有意に新生ラットの体重を増加させた。ZT6の投与では、いずれの測定時間においても、グレリン投与群と溶媒投与群の間に新生ラットの体重に有意な差は観察されなかった。また、溶媒投与群において、ZT6投与群とZT18投与群の間に有意な差は観察されなかった。

出生8日目に十分なエーテル麻酔を施して安楽死させ、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、脾臓を摘出し、その組織湿重量を測定したところ、いずれの臓器重量においても、溶媒投与群とグレリン投与群の間に有意な差は観察されなかった(図5)。

D. 考察

本研究により、新生期のグレリン投与がラットの体重増加を促進する作用を有することが初めて明らかになった。また、その体重増加作用は明期(ZT6)の投与では観察されず、暗期(ZT18)の投与で認められた。また、出生8日目の組織重量はいずれの臓器においても溶媒投与群とグレリン投与群の間に差は観察されなかったことから、グレリンによる体重増加は、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、胃、脾臓以外の組織で起こっていることが示唆された。グレリン受容体は発達期においても全身の様々な組織に発現していることが知られている。今後は、骨・筋肉など体幹を構成する組織に対するグレリン投与の影響を検討する必要がある。

今回の研究により、グレリンの体重増加効果は暗期に投与した場合にのみ、顕著に観察され

た。成体ラットを用いた研究により、血中のグレリン濃度は休息期(明期)に高く、活動期(暗期)に低くなるという明瞭な日内リズムを示すことが知られている(Bodosi *et al.*, 2004)。グレリンは空腹により胃からの分泌が亢進されることが知られており、グレリンの血中濃度における日内リズムは時計遺伝子の発現制御に加え、休息期(明期)=絶食時間における胃からのグレリン分泌の亢進、活動期(暗期)=摂食時間における分泌の抑制といった食事による受動的な影響が関与していると考えられる。これを発達期の新生ラットにあてはめて考えてみると、母ラットは休息期にその仔に授乳することが知られているので、母の休息期=明期では、仔のグレリン血中濃度は低く、母の活動期=暗期では、仔のグレリン血中濃度は高くなっていることが予想される。今回のグレリン投与による体重増加促進効果は暗期において顕著に観察されたが、これは仔のグレリン濃度が高まっていると予想される時間帯に対応する。今後、新生ラットにおける血中および尿中グレリン濃度の日内変動を解析することに加え、母ラットの母乳に含まれるグレリン含量を定量化することが必要であると思われる。

グレリンの体重増加効果における時刻依存性のメカニズムについても今後検討していく必要がある。グレリン受容体はGqタンパク質共役型の7回膜貫通型受容体であるが、受容体の発現量における日内変動などの薬力学的因子や、代謝酵素等の日内変動による薬物動態学的因子の関与など、血中および尿中グレリン濃度を測定することによって明らかにする必要がある。

E. 結論

本研究により、ラットにおいてグレリンは新生仔の体重増加を促進する作用を有すること、およびその効果は暗期に投与した場合に顕著に観察されることが明らかとなった。また、体重増加は骨・筋肉など、体幹を構成する組織に作用している可能性が示唆された。血中グレリン濃度は日内変動を示すことが明らかとなっているので、本研究で明らかとなったグレリンの体重増加作用の時刻依存性は、母および児の生体内リズムの発達における重要性を強く示唆するものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Moriya T, Aida R, Kudo T, Akiyama M, Doi M, Hayasaka N, Nakahata N, Mistlberger R, Okamura H and Shibata S, The dorsomedial

hypothalamic nucleus is not necessary for food-anticipatory circadian rhythms of behavior, temperature or clock gene expression in mice. *Eur. J. Neurosci.* (2009) in press

- 2) Ohta H, Xu S, Moriya T, Iigo M, Watanabe T, Nakahata N, Chisaka H, Hanita T, Matsuda T, Ohura T, Kimura Y, Yaegashi N, Tsuchiya S, Tei H, Okamura K, Maternal feeding controls fetal biological clock. *PLoS ONE.* (2008);3(7):e2601
- 3) Bastos GN, Moriya T, Inui F, Katsura T, Nakahata N, Involvement of cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus. *Neuroscience.* 2008;155:454-462.
- 4) Horie N, So K, Moriya T, Kitagawa N, Tsutsumi K, Nagata I, Shinohara K, Effects of oxygen concentration on the proliferation and differentiation of mouse neural stem cells in vitro. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2008;28:833-845.
- 5) So K, Moriya T, Nishitani S, Takahashi H and Shinohara K, The olfactory conditioning in the early postnatal period stimulated neuronal stem/progenitor cells in the subventricular zone and increased neurogenesis in the olfactory bulb of rats. *Neuroscience.* 2008;151:120-128.
- 6) Shimazoe T, Morita M, Ogiwara S, Kojiya T, Goto J, Kamakura M, Moriya T, Shinohara K, Takiguchi S, Kono A, Miyasaka K, Funakoshi A and Ikeda M, Cholecystokinin-A receptors regulate photic input pathways to the circadian clock. *The FASEB Journal.* 2008; 22:1479-1490.

2. 学会発表 (国内学会)

- 1) Bastos Gilmar, 守屋孝洋, 乾文恵, 桂崇之, 中畑則道, Cyclooxygenase-2 is involved in lipopolysaccharide-induced impairment of the newborn cell survival in the adult mouse dentate gyrus, 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 仙台, 2008年5月19日(ポスター発表), 講演要旨集, p108, 2008
- 2) 桂崇之, 守屋孝洋, 中畑則道, プロスタグランジン D₂ 及び 15-デオキシ- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂ による神経幹細胞の機能調節, 第5回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 仙台, 2008年5月19日(ポスター発表), 講演要旨集, p117,

2008

- 3) 守屋孝洋, 乾文恵, 鷹弥生, 中畑則道, 成熟後のマウス体内時計光同調に対する胎児期の増殖阻害剤投与の促進効果, 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008年7月11日(ポスター発表), プログラム, p172, 2008
- 4) 桂崇之, 守屋孝洋, 中畑則道, マウス海馬由来神経幹細胞の自己複製能に対する PGD₂ 及び 15d-PGJ₂ の調節機構, 第31回日本神経科学大会, 東京, 2008年7月11日(ポスター発表), プログラム, p268, 2008
- 5) 守屋孝洋, ニューロン新生を調節するプロスタグランジン J₂ の新規標的タンパク質の解析, 平成20年度神経回路・分子脳科学合同夏班会議, 札幌, 2008年8月7日(口頭発表), 第4領域ポスターセッション要旨集, p4-08, 2008
- 6) 守屋孝洋, 小野塚寛, 桂崇之, 中畑則道, 神経幹細胞における extracellular signal-regulated kinase 依存的な時計遺伝子の周期的発現機構, 生体機能と創薬シンポジウム 2008, 東京・星薬科大学, 2008年9月5日(口頭発表), YAKUGAKU ZASSHI, 128 (Suppl.3) p149, 2008
- 7) バストス ジルマラ, 守屋孝洋, 乾文恵, 桂崇之, 中畑則道, シクロオキシゲナーゼ-2 を介したリポ多糖による成体マウス歯状回における細胞新生抑制機構, 生体機能と創薬シンポジウム 2008, 東京・星薬科大学, 2008年9月5日(口頭発表), YAKUGAKU ZASSHI, 128 (Suppl.3) p145, 2008
- 8) 守屋孝洋, 小野塚寛, 桂崇之, 中畑則道, 神経幹細胞における分子時計の上皮成長因子 (EGF) 誘発性同調機構について, 第59回日本薬理学会北部会, 仙台・仙台市情報・産業プラザ, 2008年9月27日(口頭発表), 第59回日本薬理学会北部会プログラム・抄録集, p39, 2008
- 9) バストス ジルマラ, 守屋孝洋, 乾文恵, 桂崇之, 中畑則道, Lipopolysaccharide suppresses the newborn cell survival in adult mouse dentate gyrus in a cyclooxygenase-2-dependent manner, 第59回日本薬理学会北部会, 仙台・仙台市情報・産業プラザ, 2008年9月27日(口頭発表), 第59回日本薬理学会北部会プログラム・抄録集, p40, 2008
- 10) 守屋孝洋, バストス ジルマラ, 中畑則

なし

道、成体マウス歯状回の細胞新生における概日変動の分子基盤について、第47回日本薬学会東北支部大会、岩手医科大学・薬学部、2008年10月26日（口頭発表）、第47回日本薬学会東北支部大会・講演要旨集、p42、2008

- 11) 守屋孝洋、小野塚寛、桂 崇之、篠原一之、中畑則道、上皮成長因子 (EGF) による神経幹細胞の時計遺伝子発現調節機構、第15回日本時間生物学会学術大会、日本・岡山、岡山大学・創立五十周年記念館・農学部、2008年11月8日（ポスター発表）、時間生物学・第15回日本時間生物学会学術大会 抄録集、14 (2) p73、2008
- 12) 小野塚寛、守屋孝洋、鷹 弥生、太田英伸、程 肇、松田 直、岡村州博、中畑則道、アドレナリン受容体を介した肝臓における概日時計の同調機構、第15回日本時間生物学会学術大会、日本・岡山、岡山大学・創立五十周年記念館・農学部、2008年11月9日（ポスター発表）、時間生物学・第15回日本時間生物学会学術大会 抄録集、14 (2) p79、2008
- 13) 守屋孝洋、ニューロン新生を調節するプロスタグランジン J₂ の新規標的タンパク質の解析、平成20年度特定領域研究「統合脳」5 領域・冬の公開シンポジウム・合同領域班会議、日本・東京一ツ橋学術総合センター、2008年12月13日（口頭発表）、第4領域口演セッション要旨集、p13-4、2008

(国際学会)

- 1) T. MORIYA, F. INUI, Y. TAKA, N. NAKAHATA, The gestational disturbance of neurogenesis by an antimetabolic agent facilitates the photic entrainment of the biological clock in mouse offspring, Neuroscience 2008, 米国・ワシントン ワシントン・コンベンションセンター、2008年11月17日（ポスター発表）、Society For Neuroscience Final Program Monday、p126、2008

G. 知的財産権の出願・登録（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他