

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06282

研究課題名(和文) 早産における分子状水素の予防効果と母獣長期投与の胎仔への影響

研究課題名(英文) Maternal administration of hydrogen water might be protective for the lps-induced preterm labor in mice.

研究代表者

中野 知子 (Nakano, Tomoko)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：90754953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：周産期医療が発達しているにも関わらず、早産の合併症による新生児死亡や脳性麻痺の発生率も改善していない。早産の病態に炎症が関与すること、さらに酸化ストレスや炎症性サイトカインが児の予後に影響することが報告されている。今回我々は近年抗酸化作用や抗炎症作用があるといわれている分子状水素に着目し、炎症性早産モデルマウスにおける効果について検討した。その結果受傷前に50%飽和水素水を母獣に投与した群では妊娠期間の延長を認め、また子宮組織の炎症性サイトカインなどの早産に関わる因子の発現を有意差を持って抑制した。また50%飽和水素水母獣投与による胎仔催奇形性は認めず、安全に母体へ投与できることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Intrauterine infection is a common trigger for preterm birth and is also a risk factor for the subsequent development of neurodevelopmental abnormalities in the neonates. Hydrogen water (HW) has been already reported to have both antioxidant and anti-inflammatory action. In this study, it is investigated whether effected uterus tissues in Lipopolysaccharide(LPS)-induced preterm models by Hydrogen water(HW). HW+LPS group was decreased delivery within 24 hours after LPS administration compared with LPS group. IL-6 and TNF-alpha was significantly increased in LPS group compared with control groups, but suppressed in HW+LPS group. Contraction-associated proteins(CAPs), cox-2, connexin43, and oxytocin receptor, were also increased in LPS group compared with control group, but suppressed in HW+LPS group. Metalloproteinase-3(MMP-3), Endothelin-1(ET-1) were same result, too. Furthermore, Hydrogen water did not show fetal damage.

研究分野：周産期

キーワード：早産 分子状水素

1. 研究開始当初の背景

早産とは妊娠 22 週から妊娠 37 週未満の出生を示すが、世界で毎年 1500 万人の早産児が出生しており、早産率は 9.6% と増加傾向である。早産の合併症である新生児死亡や重篤な後遺症の脳性麻痺の発生率も改善していないため、家族の経済的・精神的負担も大きい。その早産の病態のなかで、感染症が重要な位置を示している。細菌性膣症から上行性に炎症反応が波及して絨毛膜羊膜炎 (chorioamnionitis; CAM) を引き起こし、最終的に破水や陣痛発来して分娩までにいたるまでの過程については、様々な分子生物学的な研究がされているものの、まだ不明な点は多い。

我々の研究室ではこれまでに、本学豊國研究室との共同研究で、胎児低酸素脳障害モデル動物を作成し、母獣に分子状水素を飽和させた飽和水素水 (水素水; ブルー・マーキュリー社) の自由飲水を受傷前後に行い、胎仔脳障害が改善することを証明した。また炎症性早産モデル動物として Lipopolysaccharides (LPS) を腹腔内投与 (i.p.) するモデルは多くの研究ですで使用されているが、LPS i.p. 前に母獣に分子状水素水を自由飲水させたところ、胎仔肺障害が改善したことを確認した。さらに preliminary な実験結果で、水素水母獣投与によって、胎仔脳のアポトーシスを抑制し、そのメカニズムとして羊水中の IL-6 の発現の制御が関与していることを確認している。

2. 研究の目的

自然早産の原因の約半数に感染・炎症を認める。早産のメカニズムとして酸化ストレスや炎症性サイトカイン、子宮収縮関連タンパクが関わることが報告されており、本研究では近年抗酸化作用と抗炎症作用があると報告されている分子状水素に着目した。

(1) 分子状水素母獣投与で、早産および子

宮内炎症の制御が可能かを検討し、作用機序を解明する。

(2) 分子状水素は食品添加物として認可されているが、胎児への安全性は不明である。母体に投与することによる胎児への影響を動物モデルで考察し、得られた知見をもとに新たな早産予防法の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 動物モデルによる分子状水素母獣投与の早産抑制効果の検討

妊娠 15.5 日目で LPS i.p. する群の受傷後 24 時間以内の児娩出を確認し、LPS i.p. する 24 時間前に母獣に 50% 飽和水素水 (Hydrogen Water; HW) を自由飲水させる HW-LPS 群と比較した。

メカニズムの解明として、妊娠 15.5 日目に PBS i.p. した群をコントロール群 (Cont) とし、LPS i.p. した LPS 群と、妊娠 14.5 日目から母獣に 50% 飽和水素水 (HW) を自由飲水開始して妊娠 15.5 日目に LPS i.p. した HW-LPS 群の 3 群で、i.p. 24 時間後に回収した子宮組織の mRNA の半定量 RT-PCR を行い、炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- α 、IL-8)、子宮収縮関連タンパク (prostaglandin-endoperoxide synthase 2、connexin43 (Cx43)、oxytocin receptor (OTR))、また既報告でも早産のメカニズムに深く関わると報告されている Matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)、エンドセリン-1 (Endothelin-1; ET-1) の発現を比較検討した。

(2) 分子状水素の母獣投与による胎仔への影響を検討

催奇形性試験では、妊娠 5.5 日目から 15.5 日目の器官形成期に限定して母獣に 50% 飽和水素水を自由飲水させた。その後自然分娩に至った新生仔の外表奇形や死産率を確認した。コントロール群は通常水を自由飲水し、同じく自然分娩に至った新生仔を確認した。

また、毒性試験のプロトコールは、妊娠 0.5 日目から母獣にコントロール群は通常水を、水素水群は 50%飽和水素水を自由飲水させた。自然分娩した後も引き続き水素水群の母獣に 50%飽和水素水を自由飲水させ、新生仔の体重を記録した。生後 21 日目で離乳させたあと、水素水群の新生仔には生後 70 日目(10 週齢)まで 50%飽和水素水を自由飲水させ、体重を記録した。

4. 研究成果

(1) 動物モデルによる分子状水素母獣投与の早産抑制効果の検討

妊娠継続時間についての検討

妊娠 15.5 日目に LPS i.p. した LPS 群と、妊娠 14.5 日目から母獣に 50%飽和水素水 (HW) を自由飲水させて、妊娠 15.5 日目に LPS i.p. した HW-LPS 群で妊娠延長時間を比較したところ、LPS 群では 10 匹すべて 24 時間以内に児娩出となったが、HW-LPS 群では 10 匹中 4 匹が 24 時間以上の妊娠継続時間の延長を認めた。(図 1)

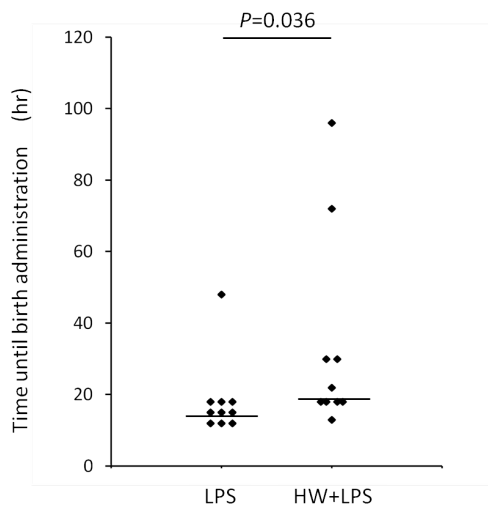


図 1. LPS 投与後の妊娠継続時間 (n=10, mean ± SEM, p 値は Mann-Whitney test)

子宮組織 mRNA の半定量 RT-PCR

i.p. 後 24 時間で回収した子宮組織を用いて、各群の炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- α 、IL-8) の mRNA レベルで比較検討したと

ころ、Cont 群より LPS 群で発現が上昇し、HW-LPS 群で発現が低下していた。子宮収縮関連タンパク (Cox-2、Cx43、OTR)、MMP-3、ET-1 の発現も同様に Cont 群に対し LPS 群は発現が上昇していたが、水素水-LPS 群で低下していた。(図 2,3,4)

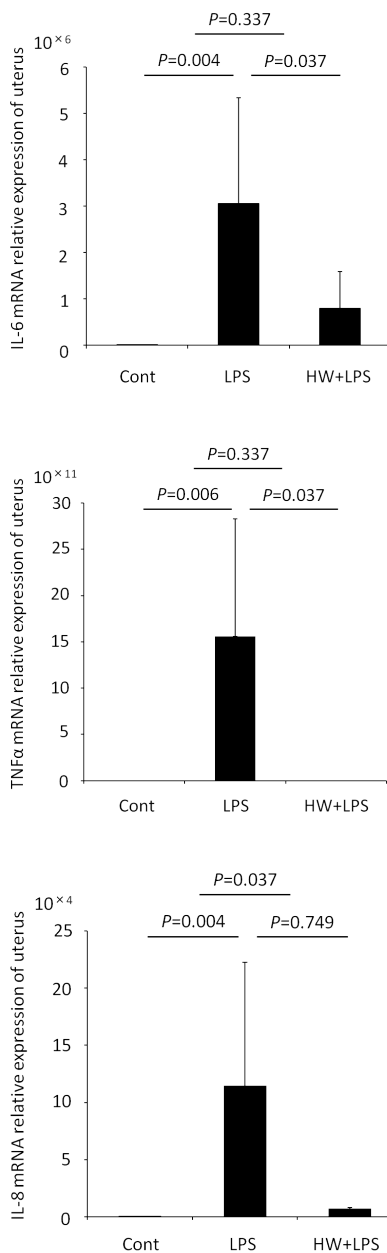


図 2. 炎症性サイトカイン (IL-6, TNF α , IL-8) の比較検討 (n=6, mean ± SEM, それぞれ p 値は Mann-Whitney test)

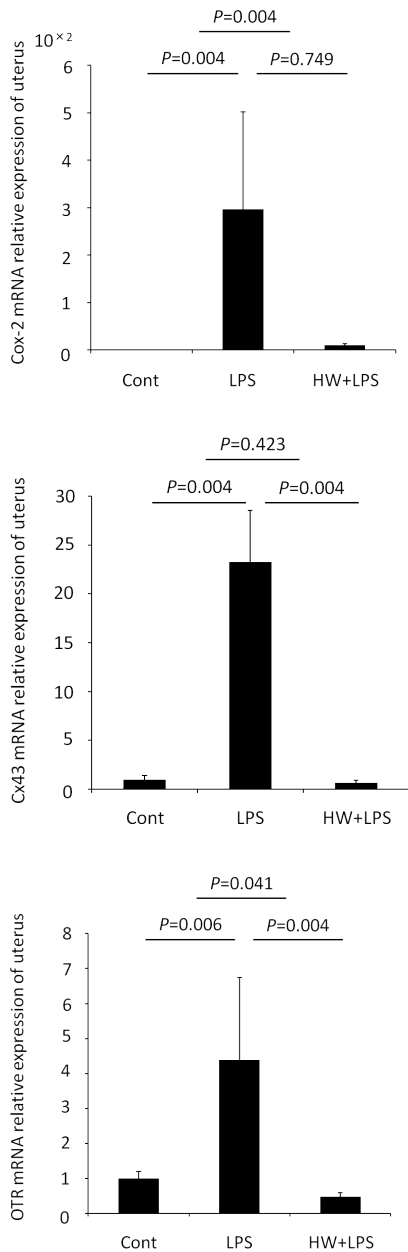


図 3. 子宮収縮関連タンパク (Cox-2, Cx43, OTR) の比較 (n=6, mean ± SEM, p 値は Mann-Whitney test, OTR mRNA (Cont VS HW+LPS) のみ t 検定)

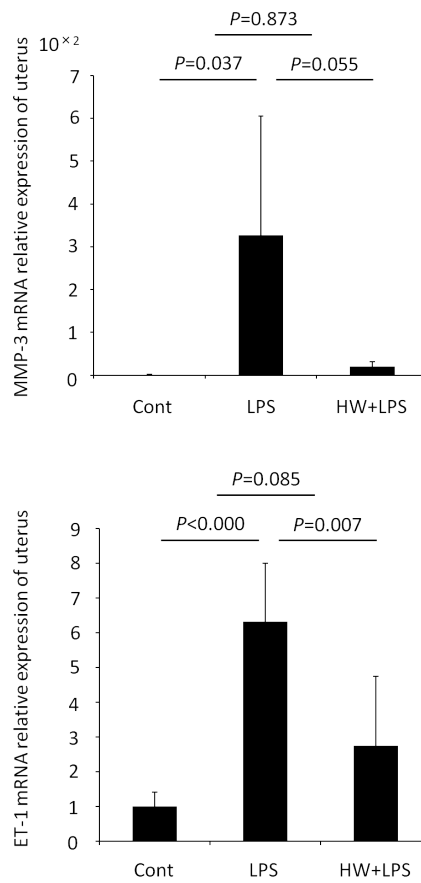


図 4. MMP-3、ET-1 の比較 (n=6, mean ± SEM, p 値は MMP-3 は t 検定、ET-1 は Mann-Whitney test)

(2) 分子状水素の母獣投与による胎仔への影響を検討

催奇形性試験

妊娠 5.5 日目から 15.5 日目の器官形成期に限定して母獣に 50%飽和水素水を自由飲水させ、その後自然分娩に至った新生仔は、通常水を自由飲水したコントロール群と比較して、明らかな外表奇形を認めず、また死産率についても有意な差を認めなかった。

毒性試験

妊娠 0.5 日目から母獣にコントロール群は通常水を、水素水群は 50%飽和水素水を自由飲水させた。自然分娩した後も引き続き水素水群の母獣に 50%飽和水素水を自由飲水させ、新生仔の体重を記録したところ、コントロール群と水素水群では有意な差は認めなかった。(図 5)

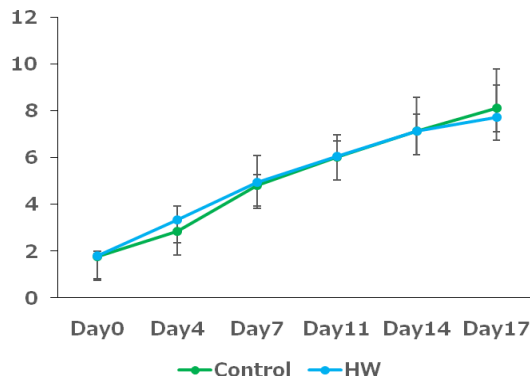


図 5. 日齢 17 までの新生仔の体重
(control 群 n=79, HW 群 n=81 で検討)

さらに、新生仔は日齢 21 で離乳後、雄と雌に分けて、引き続き通常水群と水素水群でそれぞれ 4-6 匹/ゲージで飼育し、体重を週 1 回計測したところ、雄では水素水群が体重が大きい傾向であったが、雄雌ともに両群とも明らかな発育不全や運動障害は認めなかった。

以上の結果から、炎症性早産に対し、50%飽和水素水は予防効果があることが推測された。現在の早産の治療薬として我が国で使用可能なものは塩酸リトドリンや硫酸マグネシウムがある。一方で塩酸リトドリンについては肺水腫などの母体副作用があることから、欧米では使用されていない。欧州では、オキシトシン受容体拮抗薬（日本は未発売）が主流で、米国では急性期治療として硫酸マグネシウムが第一選択であり、さらに硫酸マグネシウムは児の神経保護作用があることも報告されている。しかし硫酸マグネシウムは母体血中濃度が中毒域となると筋力低下、腱反射の減弱、嘔気・嘔吐、呼吸停止、心停止を起こしうる。また胎児は胎児心拍監視モニターの基線細変動の減少や呼吸様運動の減少を認める。新生児高マグネシウム血症は呼吸障害や筋緊張低下、反射の低下を認め、母体の長期投与（1 週間以上）による新生児の頭蓋骨形成異常なども指摘されている。また基礎研究では早産の原因として酸化スト

レスや炎症性サイトカインの関与が指摘されているものの、子宮収縮抑制に重点が置かれており、抗炎症・抗酸化ストレス作用に根ざした治療薬はない。

今回我々の研究で、分子状水素の短期・長期投与の妊婦への早産予防効果と胎児への安全性が確認されたため、母体の副作用もほとんどなく、児にも脳障害や肺障害へ保護的に作用し、炎症を抑えることで早産そのものも予防する新規の治療法となる可能性があり、早産のハイリスク群と考えられている早産既往症例や子宮頸管長短縮症例などに予防的に投与することで、周産期予後を画的に改善する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

中野知子、Maternal administration of hydrogen water might be protective for the Ips-induced preterm labor in mice、Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI), 2015.9.17-19 (ブタペスト、ハンガリー)

中野知子、子宮内炎症による早産に対する水素水母獣投与の効果、第 67 回日本産科婦人科学会学術集会、2015/4/12、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 知子 (NAKANO, Tomoko)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：90754953