

令和元年5月20日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10085

研究課題名(和文) 妊娠中期に動脈管の血管リモデリングを促進させる因子の解明

研究課題名(英文) Elucidation the promoter of ductus arteriosus remodeling in fetal sheep

研究代表者

齋藤 昌利 (SAITO, MASATOSHI)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：00451584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中期において子宮内炎症が胎子の動脈管壁の内膜肥厚を促進させることをヒツジ胎子を用いて検証した。対照群5例と炎症群5例のヒツジ胎子の動脈管組織を摘出し、組織学的検討を行った。短軸切片における断面積のうち内膜肥厚の面積の割合(平均±SEM)は、対照群 0.0372 ± 0.0034 、炎症群 0.0322 ± 0.0032 と有意差を認めなかった。また成熟度スコアも2群間に有意差はなかった。以上より今回の検討では子宮内炎症は動脈管の内膜肥厚を促進させる因子であるとは示せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超早産児の予後を改善する上では動脈管の内膜肥厚を促進させる治療の開発がきわめて重要であるが、未だそのような臨床研究報告は国内外においてなされていない。本研究では子宮内炎症が動脈管の内膜組織を成熟させると仮定し検証を行ったが、証明することはできなかった。しかし結果から高乳酸血症をきたすような慢性的な低酸素により内膜肥厚が促進される可能性が示唆された。本研究は動脈管の内膜肥厚を促進させる治療を開発する臨床研究のための橋渡しの研究となった。

研究成果の概要(英文)：The study was performed to make clear that the intrauterine inflammation could promote intimal thickening development of fetal ductus arteriosus using chronically instrumented premature fetal sheep. The fetuses were divided into two groups; control and inflammation groups (each n=5). After the autopsy, we carried out histological examination. The ratio (mean±SEM) of intimal thickening area to the cross-sectional area was compared between the two groups. There was no difference between the control (0.0372 ± 0.0034) and inflammation group (0.0322 ± 0.0032). Moreover, no difference was found between the two in the developmental score. The results could not suggest that the intrauterine inflammation would promote intimal thickening development of fetal ductus arteriosus.

研究分野：胎児生理学

キーワード：動脈管 内膜肥厚 ヒツジ 胎児 子宮内炎症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

早産児は出生後に動脈管が自然閉鎖しにくいいため動脈管開存 (PDA) に陥りやすい。PDA の本質的病態は、動脈管を介した左右短絡血流をもたらす体血流量の減少、肺血流量の増加、うっ血性心不全である。したがって、早産児が血行動態的に有意な PDA (hemodynamically significant PDA, 以下 hsPDA) に曝されると、体血流量減少による脳白質損傷、虚血性腸炎、腎前性腎不全、肺うっ血による肺出血、うっ血性心不全による脳室内出血の危険性が高まる。多数の臨床研究によって、hsPDA は慢性肺疾患、壊死性腸炎、未熟性網膜症、神経発達遅滞と関連することが指摘されているため、hsPDA は早産児の長期予後に重大な影響を与える危険因子であると言わざるを得ない。

動脈管がその解剖学的閉鎖に至るには、(1) 胎生期の動脈管壁リモデリングと、(2) 出生直後の動脈管壁平滑筋の収縮、の両方が必要とされる。動脈管壁のリモデリングとは、中膜筋層内の平滑筋細胞が内皮細胞層直下に遊走浸潤して生じる内膜肥厚のことを指し (図 1)、平滑筋細胞に存在する EP4 受容体が prostaglandin (PG) E2 に刺激されることによって妊娠中期から徐々に形成される。これが出生後の解剖学的閉鎖では、平滑筋収縮による機能的閉鎖の後に動脈管の内腔に栓をする決定的な役割を担う。したがって、未熟性の強い超早産児では動脈管壁の内膜肥厚が発達していないため、動脈管が解剖学的な閉鎖には至らない危険性がある。さらに、その内科的治療として出生後に indomethacin のような cyclooxygenase (COX) 阻害剤を反復投与すれば、PGE2 刺激による内膜形成が阻害されるため、たとえ一過性の動脈管収縮は得られても解剖学的閉鎖にまでは至らない可能性が高い。実際に、超早産児では 16-32% が COX 阻害剤による治療に対して抵抗性を示し、生後 7 日までに動脈管が自然閉鎖する割合は 34% と報告されている。そのため超早産児の予後を改善する上では動脈管の内膜肥厚を促進させる治療の開発がきわめて重要であるが、未だそのような臨床研究報告は国内外においてなされていない。

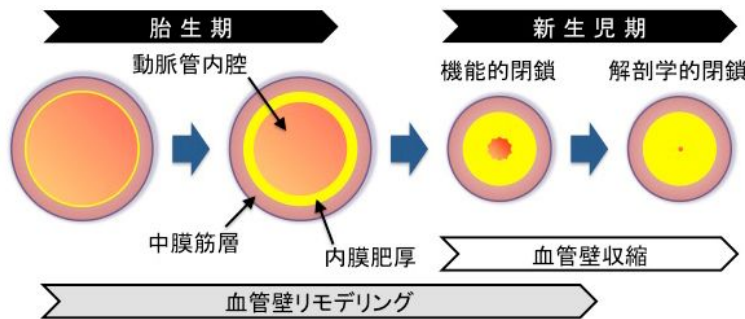


図 1. 動脈管が解剖学的に閉鎖するまでの経過

胎生期には動脈管内腔に向けて徐々に内膜肥厚が進む。出生後の平滑筋の収縮による機能的閉鎖を契機に、肥厚した内膜が動脈管の内腔に栓をする形になって解剖学的閉鎖が完成する。

2. 研究の目的

本研究では妊娠中期のヒツジ胎仔を用いて、胎生期に動脈管壁の内膜肥厚を促進させる因子を明らかにする。予備実験において、対照群のヒツジ胎仔では妊娠 107 日 (満期 147 日, ヒト妊娠 29 週相当) 以降でなければ動脈管壁の内膜肥厚は観察されなかった。一方、胎仔に子宮内炎症を負荷すると妊娠 101 日 (ヒト妊娠 27 週相当) であっても内膜肥厚が観察された (図 2)。

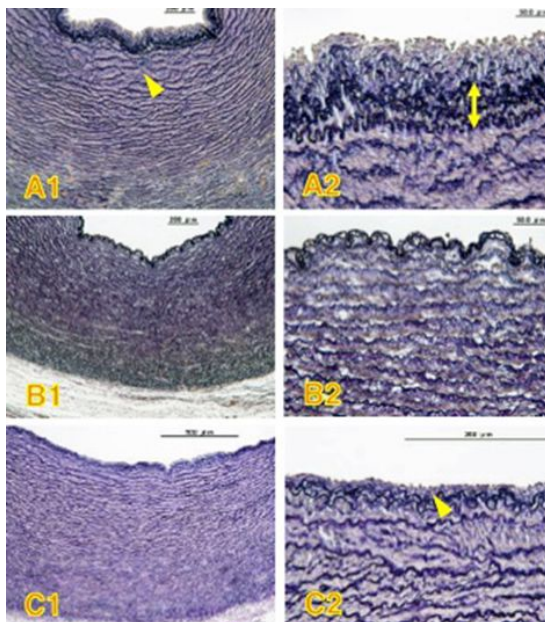


図 2. ヒツジ胎仔の動脈管組織像。

予備実験で得られた動脈管の組織像を示した。A: 妊娠 107 日の対照群。

中膜筋層内では弾性線維が断裂し (A1 矢頭), 内弾性板は大きく波打って一部が断裂 (A2 矢印), 内弾性板から血管内腔に向かって明らかな内膜肥厚が観察された。妊娠中期に観察される動脈管リモデリング像として矛盾しない。

B: 妊娠 103 日の対照群。

この時期では、はまだ中膜筋層に弾性線維の断裂はなく、内弾性板と内膜内皮細胞層は密着しており有意な内膜肥厚は観察されない (B1, B2)。

C: 妊娠 101 日の子宮内炎症負荷群。

中膜筋層内での弾性線維の断裂 (C1) と内弾性板の一部断裂が認められ (C2) 軽度だが明らかな内膜肥厚が観察された (C2 矢頭)。動脈管リモデリングにおける初期像と考えられた。

(倍率 x50: A1, B1, C1; x200: A2, B2, C2)

したがって、子宮内炎症やそれに伴うストレスホルモンの分泌は内膜肥厚を促進させる可能性がある。そのため本研究では、ヒツジ胎仔の慢性実験系を作成して子宮内炎症を負荷した後に、胎仔を剖検に供し、動脈管壁の内膜肥厚の程度を組織学的に評価する。

本研究の成果は、出生後に動脈管の解剖学的閉鎖が得られるかどうかを見通した上で、子宮内炎症を合併した胎児の至適な分娩のタイミングを考慮するための礎となることが期待され、動脈管の内膜肥厚を促進させる治療を開発する臨床研究のための橋渡しの研究として位置付けられる。

3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験委員会の承認 (2016 医動-293) のもと東北大学医学部附属動物実験施設内において実施された。対象として妊娠期間が確定した Suffolk 種ヒツジの胎仔を用いた。ヒツジの発情期が夏期であるため実験は 10~3 月にかけて 3 年間で合計 15 回行った。

(1) 慢性実験系の作成

妊娠 91-97 日に全身麻酔下に母獣を開腹して子宮を切開し、胎仔の右腋窩動脈、腹部大動脈、上下大静脈、羊水腔内にカテーテルを留置、心電図電極を固定した後、胎仔を子宮内に戻して閉腹した。以後、胎仔動脈圧、中心静脈圧、羊水内圧を連続監視してパソコンに記録した。

(2) 母獣子宮内での負荷実験

手術後 48 時間を経た胎仔 (n=10) をランダムに 2 群に分けた (対照群, 炎症群)。炎症群には術後 48 時間から 5 日間連日 granulocyte- colony stimulating factor (G-CSF; Neutrogin®) 50 µg/日を静注し、術後 96 時間に 1 回だけ羊水腔内に endotoxin (E. coli 055:B5) 20 mg を注入して胎仔に壊死性の臍帯炎を誘導した。対照群には G-CSF の代わりに生理食塩水を投与して、endotoxin を負荷しなかった。

(3) 動脈管における内膜肥厚の組織学的評価

手術後 10 日に母獣を帝王切開して、胎仔を剖検に供し、動脈管の組織像を 2 群間で以下の 2 通りの方法で比較した。動脈管組織は肺動脈と大動脈の中間位から採取し、エラスチカ・ワンギーン染色を用いた。

面積比による内膜肥厚の評価

動脈管の短軸切片 (輪切り切片) において内腔を除いた断面積 (Aa) と内膜肥厚面積 (Ai) を計測し、その比 (Ai/Aa) をそれぞれ比較した。

内膜肥厚の成熟度スコアを用いた評価

動脈管の短軸切片において内腔を 6 等分し、それぞれの部位の成熟度を以下のようにステージ分類し、スコア化した。その合計点を成熟度を表す指標として比較した。

ステージ 0 (0 点): 内弾性板の断裂を認めない

ステージ 1 (1 点): 内弾性板の二重化を認める

ステージ 2 (2 点): 内弾性板の断裂と内腔への平滑筋細胞の遊走を認める

ステージ 3 (3 点): 平滑筋細胞の遊走により顕著な内膜肥厚を認める

(4) 統計学的解析

内膜肥厚の組織学的評価における対照群と炎症群の有意差の検定には Mann-Whitney U-test を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

3 年間で合計 15 例のヒツジ胎仔を本実験のために準備し、結果として 10 例 (対照群 5 例, 炎症群 5 例) を解析に用いることができた。除外された 5 例の内訳は、不受胎 2 例, 実験開始前の子宮内胎仔死亡 2 例, 慢性実験系の作成手術時の術中死亡 1 例であった。

対象の基礎データを表 1 に示した。

表 1. 対象の基礎データ

群 (例数)	対照群 (n=5)	炎症群 (n=5)
単胎/多胎	4/1	4/1
雄/雌	2/3	4/1
剖検時妊娠日齢	102.6 ± 0.4	103.8 ± 1.0
剖検時体重 (kg)	1.13 ± 0.14	1.11 ± 0.08

数値データはいずれも「平均 ± 標準誤差」で示した。

2 群間において、胎仔数、単胎双胎比、剖検時の妊娠日齢、剖検時の体重に差はなかったが、性別では対照群で雌が多く、炎症群で雄が多く、偏りが認められた。

内膜肥厚の組織学的評価の結果を表 2 に示した。

表 2. 内膜肥厚の組織学的評価

群 (例数)	対照群 (n=5)	炎症群 (n=5)	P 値
短軸断面積 : Aa (μm^2)	5543299 \pm 444748	5190722 \pm 330807	0.691
内膜肥厚面積 : Ai (μm^2)	2103385 \pm 33784	165594 \pm 16384	0.310
内膜肥厚の割合 : Ai/Aa	0.0372 \pm 0.0034	0.0322 \pm 0.0032	0.151
成熟度スコア合計点	8.4 \pm 1.1	6.4 \pm 0.7	0.222

数値データはいずれも「平均 \pm 標準誤差」で示した。

面積比による内膜肥厚の評価では、内膜肥厚の割合 (Ai/Aa) の平均値は有意差を認めなかったが、対照群の方が高値であった。また成熟度スコアを用いた評価においても、有意差を認めなかったが、平均値は対照群の方が高スコアであった。そのため子宮内炎症に曝されると動脈管の成熟が促され、内膜肥厚が進むという当初の仮説を証明することはできなかった。

妊娠 103 日で組織を採取した予備実験では、内弾性板の断裂は認めなかった。しかし今回の対照群 (妊娠 102.6 \pm 0.4 日) で採取された組織では内膜肥厚を認めるものが多く、内弾性板の断裂に加え、平滑筋細胞の遊走を確認できるものもあった。この成熟度の違いを生んだ原因として、高乳酸血症の関連が示唆された。ヒツジ胎子を胎内でモニタリングした慢性実験中の乳酸値の最高値は、平均で 93.2 \pm 25.2 mg/dL と高く、組織の慢性的な低酸素状態が動脈管組織の成熟を促進した可能性がある。

今後は今回の検討と同じく妊娠 103 日前後で、慢性低酸素やアシデミアの影響を除外した対照群の組織学的評価が必要である。また妊娠高血圧症候群などの慢性低酸素に曝されていた胎児においても動脈管組織の成熟が促進されている可能性があり、今後の検討課題と考えられた。

< 引用文献 >

Clyman RI, Noori S. The very low birth weight neonate with hemodynamically significant ductus arteriosus during the first postnatal week. In: Kleinman CS, Seri I, Polin RA, Hemodynamics and Cardiology. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Saunders; 2012: 269-291.

Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, et al. Chronic activation of the prostaglandin receptor EP4 promotes hyaluronan-mediated neointimal formation in the ductus arteriosus. J Clin Invest 2006; 116: 3026-34.

Wickremasinghe AC, Rogers EE, Piecuch RE, Johnson BC, Golden S, Moon-Grady AJ, Clyman RI. Neurodevelopmental outcomes following two different treatment approaches (early ligation and selective ligation) for patent ductus arteriosus. J Pediatr 2012; 161: 1065-72.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Ito S, Yokoyama U, Saito J, Sato S, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Saito M, Hanita T, Matsuda T, Ishikawa Y. Attenuation of ductus arteriosus intimal thickening in preterm sheep twins compared with singletons. J Physiol Sci 2017; 67(6): 723-9. (査読あり)
DOI: 10.1007/s12576-017-0565-5

Usuda H, Watanabe S, Miura Y, Saito M, Musk GC, Rittenschober-Böhm J, Ikeda H, Sato S, Hanita T, Matsuda T, Jobe AH, Newnham JP, Stock SJ, Kemp MW. Successful maintenance of key physiological parameters in preterm lambs treated with ex vivo uterine environment therapy for a period of 1 week. Am J Obstet Gynecol 2017; 217(4): 457.e1-457.e13. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.ajog.2017.05.046

Kemp MW, Saito M, Usuda H, Molloy TJ, Miura Y, Sato S, Watanabe S, Clarke M, Fossler M, Schmidt A, Kallapur SG, Kramer BW, Newnham JP, Jobe AH. Maternofetal pharmacokinetics and fetal lung responses in chronically catheterized sheep receiving constant, low-dose infusions of betamethasone phosphate. Am J Obstet Gynecol 2016; 215(6): 775.e1-775.e12. (査読あり)
DOI: 10.1016/j.ajog.2016.08.017

[学会発表] (計 3 件)

伊藤智子, 横山詩子, 齋藤純一, 佐藤信一, 白田治夫, 渡邊真平, 北西龍太, 埴田卓志, 松田直, 石川義弘. 多胎妊娠では動脈管内膜肥厚が抑制される. 第 62 回日本新生児成育医学学会

術集会 (埼玉); 2017 年

Watanabe S, Matsuda T, Usuda H, Kitanishi R, Saito M, Hanita T, Kobayashi Y. The redistribution of cardiac output by vasopressin infusion in the premature fetal sheep. 43rd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2016 (Cambridge, UK); Sep 17-20, 2016.

Hanita T, Matsuda T, Usuda H, Kitanishi R, Saito M, Watanabe S, Kobayashi Y. Magnetic resonance imaging is useful for detecting acute phase of cerebral white matter injury in preterm ovine foetus. 43rd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2016 (Cambridge, UK); Sep 17-20, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

<http://www.ped.med.tohoku.ac.jp/newborn/lineup/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

研究分担者氏名：齋藤 昌利

ローマ字氏名：(SAITO, masatoshi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：00451584

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：松田 直

ローマ字氏名：(MATSUDA, tadashi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：非常勤講師

研究者番号 (8 桁)：50361100

研究分担者氏名：埴田 卓志

ローマ字氏名：(HANITA, takushi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：30400360

研究分担者氏名：北西 龍太

ローマ字氏名：(KITANISHI, ryuta)

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：非常勤講師

研究者番号 (8 桁)：20436116

研究分担者氏名：渡邊 真平

ローマ字氏名 : (WATANABE, shimpei)

所属研究機関名 : 東北大学

部局名 : 大学病院

職名 : 助手

研究者番号 (8 桁) : 70509413