

平成22年5月14日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19591275  
 研究課題名（和文）ラットを用いた子宮内炎症に起因する  
 新生児慢性肺疾患の成立機序解明に関する研究  
 研究課題名（英文）Studies to establish the mechanisms of neonatal chronic lung disease  
 due to intrauterine inflammation with rats  
 研究代表者  
 長 和俊（CHO KAZUTOSHI）  
 北海道大学・北海道大学病院・准教授  
 研究者番号：10312365

研究成果の概要（和文）：エンドトキシン出生前投与により，肺胞表面積と肺胞数が減少し，平均肺胞半径は大きくなった．このエンドトキシンによる肺傷害は生後のステロイド投与により軽減されなかった．エンドトキシンのよる肺胞数増加抑制は持続したが，ステロイド投与による肺胞数増加抑制は一過性であったことから，子宮内炎症とステロイドの生後投与は異なる機序により肺胞数増加を抑制することが示唆された．

研究成果の概要（英文）：Postnatal administration of steroids did not induce a significant change in the pulmonary structure with respect to the alveolar surface density, numerical density of alveoli and the average of alveolar radius in the rats treated with antenatal lipopolysaccharide. These results suggest that postnatal steroids do not exert favorable effects on chronic lung disease induced by intrauterine inflammation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学分野

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：新生児、慢性肺疾患、子宮内炎症、エンドトキシン、ステロイド

## 1. 研究開始当初の背景

慢性肺疾患(chronic lung disease, CLD)は、早産児の生命予後と長期の発育・発達予後を規定する疾患であり，その予防と治療は新生児医療における中心的課題である．CLDは，その成立機序と臨床的特徴から，気管支肺異形成（bronchopulmonary dysplasia, BPD）と new BPD に大別することができる．BPD

は未熟な肺組織が，生後に人工換気，酸素投与，感染症などによる損傷を受け，修復の過程で気腫化，線維化などの異形成を生じるものである．一方 new BPD は主に絨毛膜羊膜炎などの子宮内炎症や絨毛膜血腫による血性羊水に起因して肺胞新生や微細血管系の発達が停止した結果生ずるもので，肺胞の数が少なく，個々の肺胞が大きいことが特徴で

ある。new BPD に対する特異的な治療法は確立しておらず、臨床では BPD に準じてステロイド投与が行われている。動物実験では出生前あるいは出生後に投与したステロイドが肺胞の発達を妨げることが報告されている。前回の実験で Ueda らは、妊娠ラットの羊水腔へ Lipopolysaccharide (LPS) を投与した後に出生させた新生仔ラットの肺が、new BPD に相当する大きくて数の少ない肺胞構造を呈し、この変化が成獣に至るまで持続することを報告した。

## 2. 研究の目的

羊水腔内にエンドトキシンを投与することにより惹起した子宮内炎症に基づく肺損傷に対して、生後に投与したステロイドが抑制効果を持つか否かを検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

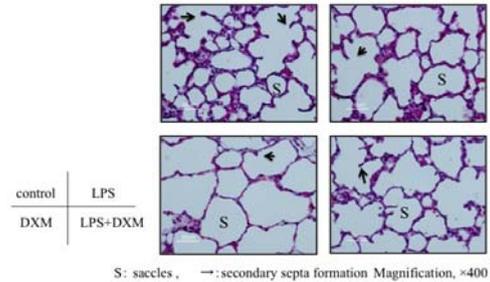
以下の動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認のもと北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内にて行なった。生後 8 週以降の WKAH/hkm 近交系ラットを用い、交配し妊娠 21 日目のラットを吸入麻酔下に開腹し、各胎仔の羊水腔に LPS を注入して閉腹した。LPS 投与 24 時間後の妊娠 22 日に再び開腹して子宮を摘出し、新生仔を出生させ臍帯を切断した後、あらかじめ経膈分娩した里親ラットに哺育させた。日齢 1 から 4 に新生仔ラットにデキサメタゾン(デカドロン注射液, DXM) を皮下投与した。DXM は日齢 1 に 0.1  $\mu\text{g/g}$ 、日齢 2 に 0.05  $\mu\text{g/g}$ 、日齢 3 に 0.025  $\mu\text{g/g}$ 、日齢 4 に 0.01  $\mu\text{g/g}$  を生理食塩水で希釈調整して投与した。日齢 7 および 14 に肺の摘出を行った。ラット仔を安楽死させた後に気管切開を行い、切開口より 10%緩衝ホルマリン溶液を注入した。肺は 20cm 水柱圧で 20 分間灌流固定した後に摘出し 48 時間以上 10%緩衝ホルマリン溶液で固定した。ラットを 4 群にわけた。1) LPS 群(羊水腔へ LPS を投与, 生後に生理食塩水を投与), 2) LPS+DXM 群(羊水腔へ LPS を投与, 生後に DXM を投与), 3) DXM 群(羊水腔へ生理食塩水を投与, 生後に DXM を投与), 4) コントロール群(羊水腔, 生後に生理食塩水を投与)

固定した左前肺を使用してパラフィン包埋後 4  $\mu\text{m}$  に薄切し Hematoxylin-Eosin 染色を行い、光学顕微鏡にて評価を行った。肺胞構造の定量的評価には Morphometry 法を用い、単位体積あたりの肺胞表面積と肺胞数、および平均肺胞半径を算出した。この操作を日齢 7 および 14 の各群について 5 匹の仔ラットに対して行った。

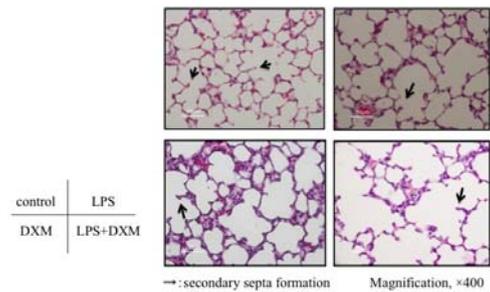
肺胞表面積、肺胞数および平均肺胞半径の比較には one-way ANOVA を用い、群間の比較には Scheffe の方法を用いた。それぞれ  $p < 0.05$  を有意とした。

## 4. 研究成果

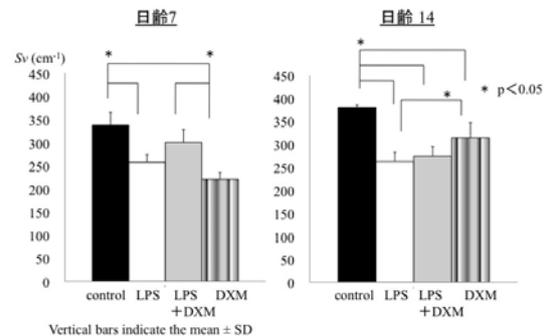
日齢 7 ではコントロール群に比べ、LPS 群、LPS+DXM 群、DXM 群で肺胞腔の拡大がみられ、さらに DXM 群では肺胞壁の菲薄化がみられた。



日齢 14 では、コントロール群で肺胞壁が菲薄化し、肺胞は小さく肺胞数が増加していたが、LPS 群や LPS+DXM 群では肺胞は大きく肺胞数は減少していた。DXM 群では肺胞壁の肥厚がみられた。

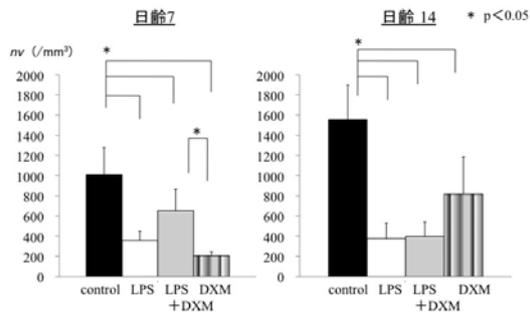


単位体積あたりの肺胞表面積 ( $\text{cm}^{-1}$ ) は、日齢 7 でコントロール群 ( $337.5 \pm 28.0$ ) に比べ LPS 群 ( $257.5 \pm 16.8$ ), DXM 群 ( $220.2 \pm 15.3$ ) で有意に小さく ( $p < 0.001$ ), 日齢 14 でも有意差を認めた。LPS+DXM 群は日齢 7 ( $300.0 \pm 28.3$ ), 日齢 14 ( $274.2 \pm 20.9$ ) で LPS 群 (日齢 7 ( $257.5 \pm 16.8$ ), 日齢 14 ( $262.0 \pm 20.2$ )) との間に有意差を認めなかった。

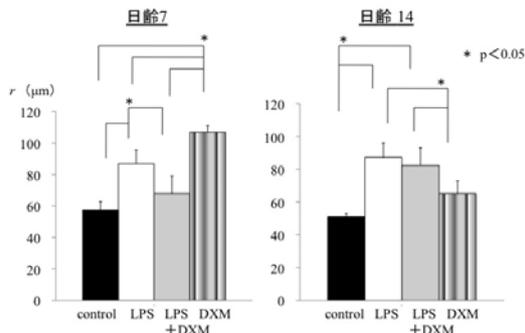


単位体積あたりの肺胞数 ( $/\text{mm}^3$ ) は、コントロール群に比べ、いずれの群でも有意に少なかった。LPS+DXM 群の日齢 7 ( $651.1 \pm 214.9$ ), 日齢 14 ( $398.0 \pm 140.7$ ) の肺胞数は、

相当する LPS 群の日齢 7 (359.3±91.8), 日齢 14 (375.8±155.3) の肺胞数と有意差を認めなかった。



平均肺胞半径 ( $\mu\text{m}$ ) は, 日齢 7 でコントロール群 ( $57.3 \pm 5.5$ ) に比べ LPS 群 ( $86.8 \pm 8.9$ ), DXM 群 ( $107.0 \pm 4.2$ ) で有意に大きかった ( $p < 0.001$ ). LPS+DXM 群の平均肺胞半径は, 日齢 7 ( $67.9 \pm 11.2$ ) では LPS 群に比べ有意に小さかった ( $p = 0.015$ ) が, 日齢 14 ( $82.4 \pm 10.8$ ) では LPS 群 ( $87.3 \pm 8.8$ ) との間有意差を認めなかった。



生後に投与した DXM は胎児期 LPS 暴露による肺構造変化を軽減しなかった。

ヒトの臨床では, CLD に対するステロイド投与は炎症性サイトカイン抑制に加えて, 肺浮腫の軽減, 顆粒球エステラーゼ産生抑制, 顆粒球浸潤の抑制, 肺血管抵抗の低下, 線維化抑制などを期待して行われる。また, ステロイドには肺の成熟を促進する作用があり, 出生前に経母体的に投与されたステロイドは胎児肺の II 型肺胞上皮細胞の成熟を促進し, RDS の発症率を低下させる。

肺の正常な発達過程では, 肺胞構造の成熟と肺胞数の増加がバランスを保って進行する。生後早期にステロイドを投与されたラットでは, 肺胞数が増加する以前に肺胞間質の菲薄化および肺毛細血管の成熟が生ずる結果, 肺胞新生が抑制されることが報告されている。今回の実験では, DXM 群において日齢 7 では肺胞の菲薄化と肺胞新生の抑制が認められたが, 日齢 14 では肺胞壁は肥厚しており, 肺胞数の増加も認められたことから, DEM による成熟の促進と肺胞新生の抑制は一過

性であったと判断した。胎児期あるいは生後早期に投与されたステロイドは, 肺構造の成熟と肺胞新生の抑制をもたらすが, その効果の持続期間はステロイドの投与時期と投与方法により異なると考えられた。また, 出生前に投与された LPS と生後に投与された DXM はともに肺胞壁の成熟促進と肺胞新生の抑制を生ずるが, その機序は異なる可能性があると考えられた。

今後は, 子宮内炎症が肺胞数増加を抑制する機序の解明をすすめ, さらに生後の治療により肺胞数増加を促進して慢性肺疾患の進行を抑制する方法の開発を行う計画である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 20 件)

- ① 小西祥平、新生児慢性肺疾患モデルラットに対する生後ステロイド投与の影響、北海道医学雑誌、2010、印刷中
- ② 長和俊、周産期と肺サーファクタント、日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌 40、2009、82-86
- ③ 長和俊、肺サーファクタント、Neonatal Care 21、2008、322-380
- ④ 長和俊、呼吸の評価、周産期医学 3、2007、35-38

〔学会発表〕 (計 20 件)

- ① 小西祥平、慢性肺疾患モデルラットに対する生後ステロイド投与の影響、第 45 回日本周産期・新生児医学会、2009 年 7 月 12 日～14 日 (名古屋)
- ② 長和俊、RDS臨床のUp-to-date (シンポジウム：肺サーファクタント臨床のUp-to-date) 日本肺サーファクタント・界面医学会第 44 回学術集会、2008 年 10 月 11 日 (大宮)

〔図書〕 (計 7 件)

- ① 長和俊、新生児呼吸管理、メディカ出版 (大阪)、2010、311
- ② 長和俊、母体ステロイド投与が児に及ぼす影響、新生児内分泌ハンドブック (新生児内分泌研究会 編著)、メディカ出版 (大阪)、2008、pp200-206

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長 和俊 (CHO KAZUTOSHI)  
北海道大学・北海道大学病院・准教授  
研究者番号：10312365

(2) 研究分担者

水島正人 (MIZUSHIMA MASATO)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号：40455671  
里見達郎 (SATOMI TATSUO)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
研究者番号：004555669  
渡辺麻衣子 (WATANABE MAIKO)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
研究者番号：304555670

(3) 連携研究者

なし