

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 2 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390320

研究課題名（和文）ヘモグロビン型人工赤血球を用いた妊娠高血圧症に伴う胎児低酸素への  
ナノマイクロ治療

研究課題名（英文）

Nanomicro-therapy for pregnancy-induced hypertension

研究代表者

岡村 州博（OKAMURA KUNIHIRO）

東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授

研究者番号：90124560

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、「人工酸素運搬体」利用し「妊娠高血圧症」に伴う重篤な胎児慢性低酸素症を改善する治療法を開発することである。本研究では、胎児慢性低酸素症を改善するための「人工酸素運搬体」の最適投与量を推定すると同時に、「人工酸素運搬体」の胎児組織に対する安全性を確認した。

研究成果の概要（英文）：

This research aims to develop a new method to treat fetal hypoxia under pregnancy-induced hypertension with an artificial oxygen carrier. Using a rat model, we investigated appropriate doses of an artificial oxygen carrier for treatment and also examined the safety of the artificial oxygen carrier for fetal development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：産科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード：妊娠高血圧症候群、胎児低酸素症、人工赤血球

## 1. 研究開始当初の背景

「妊娠高血圧症候群」は妊婦の4～8%に発症し、重症例では母体死亡、胎児発育遅滞、胎

児・新生児死亡を引き起し、早急な治療法の確立が求められる。

本疾患の原因は、胎盤血管発生に役割を果たすトロホプラストの子宮への浸潤不全とそれに伴う胎盤血管の狭小化であることが最近明らかになってきた。胎盤病理より妊娠高血圧症候群症例では、胎盤脱落膜・子宮筋層へのトロホプラストの浸潤が浅く、かつ胎盤脱落膜中の螺旋（らせん）動脈壁が肥厚し血管径が狭小化していることが指摘されている。つまり、螺旋動脈の血行不全により胎盤に十分な血液循環が維持できず、母体では血管内皮障害が発生し、胎児が低酸素状態になることが本疾患の主な病態である（Pijnenborg R, et al. *Placenta*. 2008, 29S:20-25）。

これまでの研究ではトロホプラスト浸潤不全のメカニズムを解明し、その因子を取り除き本疾患を治療しようとする戦略が取られてきた。実際、トロホプラスト浸潤不全には①細胞接着因子（細胞基質分解酵素（MMP）・インテグリン・VCAM-1）や②免疫因子（NK細胞・Th1型サイトカイン）が関与することが明らかになってきた。しかし残念ながら明確な関連因子および病態システム全体を特定するには至っていない。今後も長期にわたる関連因子の探索研究が継続することが予想され、「妊娠高血圧症候群」に対する根本的な治療法は現在確立していない。

## 2. 研究の目的

人工酸素運搬体にて、妊娠高血圧症候群に伴う重篤な胎児慢性低酸素症を改善する治療法を開発する。

我々は視点を変え、これまでの「胎盤形成期における螺旋動脈の狭小化に対する予防治療」でなく「胎盤形成後の既に狭小化した

螺旋動脈に対応する治療法」を本研究で開発する。具体的には狭小化した螺旋動脈においても通過可能な通常赤血球より小型で、かつ高い酸素運搬能をもつ「人工酸素運搬体（ヒト型ヘモグロビンより再合成）」を利用し胎盤組織の低酸素状態を改善する。「人工赤血球」はこれまでの我々の研究から脳梗塞といった局所血流障害由来の病態に有効であることが明らかになった（Kawaguchi AT, et al. *Stroke*. 2007 38:1626-32）。特に「人工赤血球」にもとづいた本治療は、母体が比較的安定している状態で胎盤の慢性低酸素により胎児生理の悪化が進行する症例で胎児救急蘇生法としての効果を持つ。本法ではラット動物モデルを使用し、「人工赤血球」が胎児救急蘇生目的に合致した新しい「ナノマイクロ人工臓器」治療法となるかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

これまで妊娠高血圧症モデルとしてNO合成酵素阻害剤（L-NAME）を妊娠中～後期に慢性投与したラット・モデルが多くの研究で使用されてきた。我々も同様の研究を行い、L-NAME投与中止後も母体高血圧が持続し胎児発育遅延が起こることを確認している。また、このモデルにおいては、①胎盤脱落膜の血管径・血管分布領域が形態学的に減少すること（Mayr et al., *Hypertens Pregnancy*. 2005;24:29-37）、②胎盤組織内のトロホプラストの減少およびアポトーシス（Tsukimori et al., *Am J Hypertens*. 2008;21:477-81）が報告されており、今回の「人工赤血球」を使用した新しい治療法の開発に最適なモデルとして選択した。

また、これまでの我々の研究からヘモグロビン（Hb）などの酸素運搬体をリポゾーム膜内に封入するナノカプセル型人工酸素運搬体

「人工赤血球」は構造・機能・代謝経路などが自然の赤血球に類似し安全であることが判ってきた。半減期が約 30 時間とまだ短く代替物としては不十分だが、人工臓器として赤血球にはない以下のような物性も明らかになってきた。

- ・超微細サイズ（直径 230nm）なので毛細血管までくまなく還流する
- ・高酸素親和性に調整し低酸素組織へ選択的な酸素運搬(0 ⇄ 20 mmHg)を可能とし
- ・低酸素親和性に調整し酸素負荷にて高効率の酸素運搬(40 ⇄ 150 mmHg)が見込まれ
- ・肺で酸素化され、繰り返し循環するため少量でも有効で、血漿の酸素化ともいえる。
- ・血液型・動物種にかかわらず使用可能である。

本研究では、胎盤の慢性低酸素下の胎児蘇生に、①高酸素親和性「人工赤血球」、②低酸素親和性「人工赤血球」の 2 タイプが有効か否かをそれぞれ検討する。

「妊娠母体の持続高血圧モデル」に対する高酸素親和性「人工赤血球」の投与

[対象] Wistar 系妊娠ラット

[方法]

慢性実験系の作成（担当：太田・千坂）

①妊娠 11 日（満期 23 日）に麻酔下にて母獣の内頸動脈に血管カテーテルを挿入しへパリン生食にてカテーテルを維持する。術後②妊娠 13-17 日の 5 日間、NO 合成酵素阻害剤

(L-NAME) を投与し妊娠高血圧症モデルを作成した後、③妊娠 18-22 日の 5 日間に酸素化した「人工赤血球」を投与し胎盤循環不全の治療を試みる。

実験プロトコール

妊娠 13 日以降 5 日間、ラット背部留置の頸動静脈カテーテルより L-NAME 50mg/day で持続投与を行い妊娠高血圧ラットを作成する。妊娠 18-22 日に「人工赤血球」の投与し、妊娠 22 日酸素化した人工赤血球が胎盤機能に与える影響を確認しながら、妊娠後期の低酸素状態の改善が胎児の脳・肺の成熟に与えた影響を検討する。また、妊娠高血圧症モデルの確認のため、妊娠ラットの血圧を連日測定する。

具体的な評価項目は以下の通りである。

1) 胎盤機能評価

①胎盤組織酸素飽和度測定：酸素飽和度測定プローブを直接子宮内の胎盤に挿入し、低酸素状態をリアルタイムで評価する。

②トロホブラスト浸潤：トロホブラストの脱落膜・子宮筋層への浸潤促進因子 matrix metalloproteinase -2 (MMP-2) および抑制因子 TGF  $\beta$  1・TGF  $\beta$  3 をサンプリングした胎盤組織にて評価する。合わせてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色にて胎盤内に浸潤したトロホブラストの細胞数・アポトーシスの評価を行う。

③胎盤血管形態：胎盤血管の分布・血管径を L-NAME 投与群と非投与群で比較し、胎盤循環を組織学的に評価する。

2) 胎児低酸素状態の評価

④胎仔心電図：ラット胎仔心電図計（東北大学医工学先進機構開発）にて子宮内胎仔の低酸素状態に対する影響を人工赤血球の投与前後で評価する。

⑤血流測定：胎仔脳内・体内血流の評価を小動物用超音波 Vevo770（東北大学医工学研究科所有）にて行う。

3) 胎児成熟の評価

⑥脳成熟：胎児脳の成熟度を大脳皮質髄鞘化

にて評価する。

⑦胎児肺成熟：肺組織からの Surfactant Protein-A (SP-A) mRNA・蛋白発現測定および肺胞形態の病理観察より肺成熟の評価を行う。

⑧胎仔発育：妊娠 22 日に帝王切開にて胎仔を娩出し、胎仔体重・体長ならびに胎仔脳・肺・肝・腎の重量を測定する。

4) 妊娠ラット高血圧の評価

⑨収縮期血圧：カテーテルを留置した頸動脈より連日動脈圧を測定する。

#### 4. 研究成果

胎児慢性低酸素症を改善するための「人工酸素運搬体」の最適投与量を推定すると同時に、「人工酸素運搬体」の胎児組織に対する安全性を、肺成熟・体重増加等にて確認した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔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〕

なし

#### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

岡村 州博 (OKAMURA KUNIHIRO)  
東北大学・大学院医学系研究科・名誉教授  
研究者番号：90124560

#### (2) 研究分担者

太田 英伸 (OHTA HIDENOBU)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：80422103

千坂 泰 (CHISAKA HIROSHI)  
東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号：40323026