

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791826

研究課題名(和文)ラット胎仔横隔膜ヘルニアモデルにおける肺低形成予測因子の確立及び治療への応用

研究課題名(英文)A prediction and a therapeutic strategy for lung hypoplasia in a rat CDH model

研究代表者

津田 弘之(TSUDA, HIROYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40571328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトCDHの検討で、生存群の羊水中ラメラ体数は死亡群に比し、有意($P < 0.01$)に低値を示した。ratにおいてもCDH群では、肺重量($p < 0.001$)、ラメラ体数($p < 0.001$)ともに有意に低値であり、相関関係も認められた。また胎仔肺組織でのABCA3発現につきウエスタンブロットで検討したが、有意差を認めなかった。CDHモデルにおける薬剤投与による検討では、塩酸ピルフェニドン(ピレスパ)群、柴朴湯群それぞれで肺重量・ラメラ体数に明らかな肺低形成予防効果は認めなかった。羊水中ラメラ体数は、横隔膜ヘルニアにおける肺低形成の程度を予測する指標として有用であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：We initially enrolled 19 cases diagnosed with CDH prenatally. LBC was significantly higher in the surviving group than in deceased group ($p < 0.01$). In the rat experiment, we collected amniotic fluid and lung tissue from newborns at E21 and confirmed the presence of lamellar bodies in both the amniotic fluid. We also confirmed a similar lamellar body size in amniotic fluid and type II alveolar cells comparable to the lamellar body findings in human amniotic fluid. Next, after exposure of pregnant rats to a 100 mg dose of nitrofen, 48.8% (61/125) of newborns had diaphragmatic hernias. LBC was significantly higher in control than in CDH ($p < 0.01$) rats. Furthermore, lung weight was also significantly higher in control than in CDH ($p < 0.01$) newborn rats. We examined the expression of ABCA3 in lung tissues from newborn rats, delivered at E21, by Western blotting. ABCA3 expression did not differ significantly between controls and rats with CDH.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：横隔膜ヘルニア 肺低形成 ラメラ体 羊水

1. 研究開始当初の背景

先天性胎児横隔膜ヘルニア(以下 CDH)はその発生率が約 1/2,500 と先天異常のなかでも比較的その頻度は高い。近年の新生児医療の目覚ましい進歩にもかかわらず、CDH 児の mortality は 50-60% と高い。横隔膜ヘルニアでは、胎児期に腹腔内臓器が胸腔内に陥入することにより肺低形成が生じるため、出生後の各種治療に反応しないことが予後不良の主な原因である。したがって、胎児期に肺低形成の程度を正確に予測すること、また胎児期に生じる肺低形成を出来る限り予防することが臨床非常に重要である。本研究では、CDH における胎児期の肺低形成の予測、またその予防法につき新たな指標および新たな治療法を確立することを目的としている。

(1) 肺低形成の予測

現在胎児肺低形成の予測ツールとしてエコー、MRI が用いられている。エコーを用いた指標として、lung area to head circumference ratio (LHR)、lung-thorax transverse area ratio (L/T 比)などが報告されており、MRI では肺体積の測定や肺-肝信号比などが報告されている。しかし、これらの指標は計測にある程度の熟練が必要で、検者間の測定誤差の問題などもあり、臨床応用に関しては未だ議論の余地を残している。そこで今回、羊水中ラメラ体に注目し、CDH 症例における肺低形成の程度を評価する客観的な指標として有用かどうかを検討することを目的とし本研究を計画した。

ラメラ体は型肺胞上皮細胞内に存在する肺サーファクタントの貯蔵型物質である。妊娠後期になるとラメラ体は肺胞上皮細胞内から肺胞中へ分泌され、その後肺胞液とともに羊水中に流出するため、羊水中で検出することができる。羊水中ラメラ体は肺成熟の指標として数多くの報告があり、ラメラ体数が多い場合、児は肺成熟していると判断できる。ラメラ体はその大きさが 1~2 μm であり、血小板の大きさと類似していることから血球測定器にてその数がカウントできるので、安価で簡便かつ再現性のある結果が得られるなどの利点があり、臨床で用いられている。

(2) 肺低形成の予防

近年、CDH に対する胎児治療の一つとして子宮鏡下の胎児気管閉塞術が論文で報告されている。しかし現時点では明らかな有用性は証明されておらず、一般臨床への適応は困難な状況である。また、動物実験レベルであるが、経母体ステロイド投与ならびにレチノイン酸投与が CDH に伴う肺低形成を改善させたという報告がある。しかし、これらの薬剤に関しても現在のところ臨床応用には至っていない。そこで、今回我々は臨床応用が可能な

胎児肺低形成に対する新たな薬剤治療の確立を目的とし、ラット胎仔 CDH モデル(肺低形成モデル)において母体に塩酸ピルフェニドン(ピレスパ®)、柴朴湯を投与することで、胎仔の肺低形成が予防できるかどうかを検討することとした。

塩酸ピルフェニドン(ピレスパ®)は現在肺線維症の治療薬として日本で保険適応を受け使用されている。本薬剤は IL-1 や IL-6 を抑制するなど、ステロイドと同様の抗炎症効果に加え、TGF- β や TNF- α などを抑制するなどといった抗線維化作用も併せ持っており、肺低形成に対してステロイド以上の予防効果が期待できる可能性がある。(CDH 肺は病理学的に線維化の所見が見られるとする報告がある。)

柴朴湯はステロイド受容体の down regulation 抑制作用があることが報告されており、本薬剤のステロイド様作用により肺低形成が予防できる可能性が期待される。また、柴朴湯は副作用が少なく妊婦にも安全に使用できる薬剤であることから、すぐに臨床応用が可能な薬剤であるとも言える。

2. 研究の目的

- ・羊水中ラメラ体に注目し、CDH 症例における肺低形成の程度を評価する客観的な指標として有用かどうかを検討すること。
- ・ラット胎仔 CDH モデル(肺低形成モデル)においても同様に肺低形成の程度と羊水中ラメラ体が相関するかどうかを検討すること。
- ・母体に塩酸ピルフェニドン(ピレスパ®)、柴朴湯を投与することで、胎仔の肺低形成が予防できるかどうかを検討すること。

3. 研究の方法

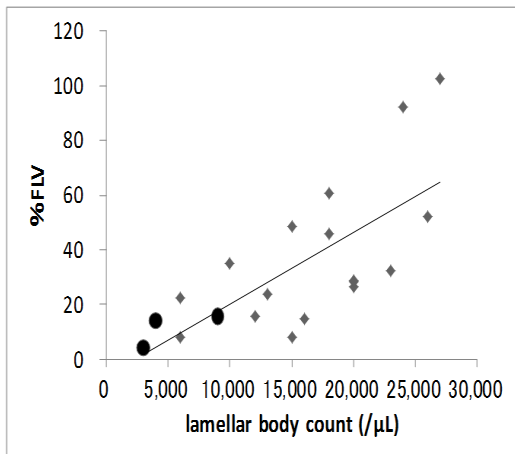
臨床研究に対しては、胎児 CDH と診断された症例に対し、帝王切開時に羊水の採取を行い、羊水中のラメラ体数を測定した。採取された羊水は遠心せずすぐに血球測定器にかけカウントした。羊水検体採取に関しては、当院倫理委員会の承認を得た。羊水中ラメラ体数と児の予後について検討した。動物実験に関しては、実験動物として Sprague-Dawley (SD) ラットを使用した。妊娠ラット (pregnant day9) に nitrofen 100mg を内服させることによって胎児横隔膜ヘルニアモデルを作成した。胎児の横隔膜の欠損に関しては実体顕微鏡を用いて確認した。Day 21 (term) に開腹術を施行し、胎児の体重と肺重量を計測し、さらに羊水と胎児肺組織を採取した。羊水中のラメラ体数を測定し、胎児肺重量との関係を調べた。ラットの羊水中ラメラ体数は血球計算板を用いた目視カウントにて計測した。また、採取した肺組織に対しラメラ体の特異抗体である ATP binding cassette A3 (ABCA3) を用いて Western blot を行い、normal 群と

CDH 群それぞれにおける発現の違いについて検討した。次に、nitrofen による CDH モデルラットに対し、day9 から day20 まで母獣に塩酸ピルフェニドン(ピレスパ®)を 300mg/kg/日、柴朴湯を 1,500mg/kg/日それぞれ投与した。各種薬剤投与した群に対し、Day 21(term)に開腹術を施行し、胎仔の体重と肺重量を計測し、さらに羊水と胎仔肺組織を採取し同様の検討をおこなった。統計解析は SPSS を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

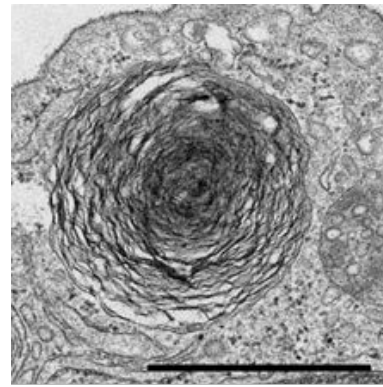
臨床データとして、我々は age-match させた CDH 症例 19 例と呼吸機能に異常を認めなかった control 症例 57 例において羊水中ラメラ体数を測定し比較した。CDH 群の羊水中ラメラ体数は $15,600/\mu\text{L}$ 、control 群の羊水中ラメラ体数は $61,700/\mu\text{L}$ であり、CDH 群で有意にラメラ体数が少なかった($P < 0.05$)。

また CDH 群 19 例の検討において、生存した 13 例の羊水中ラメラ体数 $1.6 \pm 0.7 \times 10^4/\mu\text{L}$ に対し、死亡群 3 例の羊水中ラメラ体数は $0.5 \pm 0.3 \times 10^4/\mu\text{L}$ であり、有意($P < 0.01$)に低値を示した。羊水中ラメラ体数と胎児 MRI で撮影した胎児肺 volume との間には有意な正の相関を認めた($P < 0.01$) (下図参照)



● : 死亡 ◆ : 生存
($r = 0.7164$ $P = 0.001$)

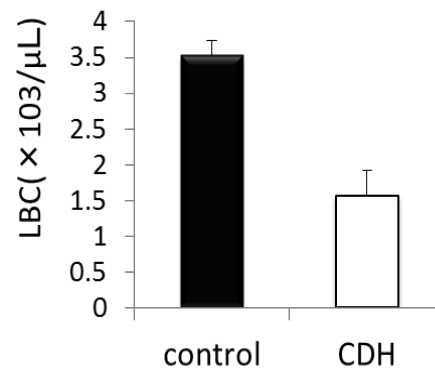
我々は SD ラットにおいて day 21(term)で出生した新生児の肺組織と羊水を採取し、電子顕微鏡にてラメラ体の存在を確認した。ラットにおいても Ⅱ型肺胞上皮細胞内にラメラ体が認められ、さらにその大きさも $1\sim 2\mu\text{m}$ と、ヒトのラメラ体と同様の大きさであることが確認された(下図参照)。



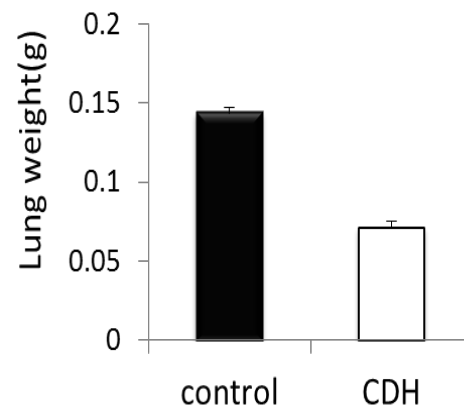
(bar 1.0 μm)

母獣ラットに nitrofen 100mg を内服させた後出生した胎仔の 48.8%(61/125)で CDH が確認された。羊水中ラメラ体数は normal 群で $3527 \pm 211/\mu\text{L}$ 、CDH 群で $1564 \pm 358/\mu\text{L}$ であり、CDH 群で値が有意に少なかった($P < 0.01$)。また胎仔の肺重量は normal 群で $0.143 \pm 0.024\text{g}$ 、CDH 群で $0.071 \pm 0.022\text{g}$ であり、CDH 群で有意に肺低形成であることが示された($P < 0.01$)。さらに肺重量と羊水中ラメラ体数には有意な相関関係が認められた($r=0.5762$ $P < 0.001$) (下図参照)。

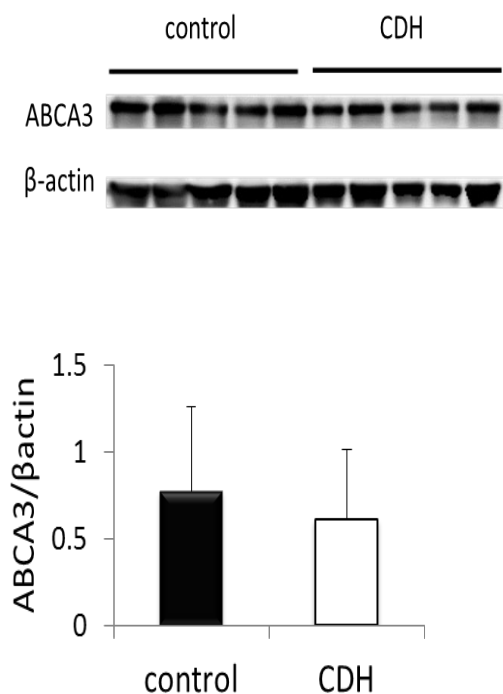
・羊水中ラメラ体数の比較



・肺重量の比較



ラット肺組織に対し、ラメラ体の特異抗体である ABCA3 の発現を Western blot で確認したが CDH 群と normal 群で有意差は認めなかった(下図参照)。



一方、CDH モデルにおける薬剤投与による検討では、塩酸ピルフェニドン(ピレスパ®)群、柴朴湯群それぞれにおいて、肺重量(0.112±0.021g, 0.07±0.012g)・ラメラ体数(1277±285/μL, 1466±243/μL)であり、明らかな肺低形成予防効果は認めなかった。ヒト臨床研究の結果より、以下の点が明らかになった。

- ・臨床において、羊水中ラメラ体数は CDH における予後予測に有用である。
- ・今回の結果は、羊水中ラメラ体数が肺低形成と相関することを推測させた。
- ・ラット CDH モデルにおいて胎仔肺重量と羊水中ラメラ体数には相関関係がある
- ・Western blot の結果により、単位肺重量あたりの ABCA3 発現量は一定である。

以上の結果から羊水中ラメラ体は肺低形成予測の指標として有用であることが実証された。

一方、CDH における肺低形成に対する予防に関しては、塩酸ピルフェニドン(ピレスパ)、柴朴湯ともに現在のところ明らかな有効性は見いだせていない。今後のさらなる検討が望まれる。

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 1 件)

Amniotic lamellar body counts and congenital diaphragmatic hernia in humans and in a rat model. Watanabe Y, Tsuda H, Kotani T, Sumigama S, Mano Y, Hayakawa M, Sato Y, Kikkawa F. *Pediatr Res.* 2013 Mar;73(3):344-8. (査読あり)

〔学会発表〕(計 1 件)

先天性横隔膜ヘルニアの予後 羊水中ラメラ体を使用して
渡部百合子、津田弘之、澤田雅子、諸井博明、今井健史、松川哲、中野知子、服部友香、真野由紀雄、炭竈誠二、小谷友美、吉川史隆
第 65 回 日本産科婦人科学会 (H25.5.11 口イトン札幌、札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

先天性横隔膜ヘルニア
津田弘之、炭竈誠二、伊藤美春、早川昌弘
NEONATAL CARE Vol.26 2013 November
メディカ出版 総ページ 116 (P. 1117-1123)

6. 研究組織

(1)研究代表者

津田 弘之 (TSUDA HIROYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40571328

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし