

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658267

研究課題名(和文)アトピーマウスを用いた羊水塞栓症モデルの作成と病態解析

研究課題名(英文)A patho-physiological study on perinatal abnormalities in NC/Tnd mice

研究代表者

松田 浩珍(Matsuda, Hiroshi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80145820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：NC/Tndマウスはアトピー性皮膚炎の自然発症モデルマウスとして、世界中で研究に用いられているが、繁殖が難しく、妊娠末期での母体死や出産時の新生児死が多く認められる。しかしながらその原因は不明であった。周産期の母体に重大な影響を与える羊水塞栓症は、アナフィラキシー様の病態を呈する。そこで本研究では、NC/Tndマウスに認められる周産期の異常に着目し、妊娠前後の免疫状態やアナフィラキシー誘導因子について検討を行った。その結果、NC/Tndマウスでは、アナフィラトキシンや血小板活性化因子の血中濃度が高く、妊娠中に流産がおりやすいTh1型の免疫状態が惹起されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：NC/Tnd mice are widely used for a study on atopic dermatitis as a spontaneous model all over the world, but breeding is difficult and there are some maternal death in the third pregnancy trimester and newborn baby death at the time of the delivery. However, the cause has been unclear. The amniotic fluid embolism which has a serious influence on a perinatal mother's body brings the anaphylactic condition of a patient. Therefore, in this study, we focused on perinatal abnormality occurred in NC/Tnd mice and examined immune status of the mice during pregnancy. As a result, the blood concentration of anaphylatoxin and the platelet activating factor was higher than the standard mice. Results indicate that the Th1 immune responses in pregnant NC/Tnd mice may involve in abnormalities that are noticed during the perinatal period.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学/獣医学・臨床獣医学

キーワード：臨床病理・病態 羊水塞栓症 動物モデル

## 1. 研究開始当初の背景

生殖の破綻に関連する疾患として、流産や死産を繰り返す不育症や、妊娠末期及び分娩時に母子共に危機的状況となる羊水塞栓症は、近年産科領域で問題となっている疾患であり、国民の関心も高い。中でも羊水塞栓症の発症は2 - 3万分娩に1例の頻度で発症し、母子ともにリスクの高い疾病であることから、その対策は急務である。しかしながら、何らかの免疫学的背景が示唆されているものの、その原因は不明で、リスク予想や根本的な予防及び治療法が確立されていない。妊娠の維持には、T helper (Th) 2型の免疫状態が必須であるが、羊水塞栓症では分娩時の母体アレルギー反応により惹起される子宮アナフィラキシー反応である可能性が示唆されている。しかし、国内外共に科学的検証はなされておらず、臨床的知見の蓄積に止まっているのが現状である。母子死亡率が極めて高い羊水塞栓症は、発症原因の解明と根本的予防及び治療法の確立が急務である。

研究代表者は、世界に先駆けアトピー性皮膚炎を自然発症するNC/Tndマウスを報告するとともに、これまで基盤研究(B)(2002 - 2004年度)、特定領域研究(1998年度)、マッチングファンド研究(2002 - 2004年度)、萌芽研究(2005年度)、その他多くの共同研究を通じて、NC/Tndマウスを用いた病態解析を行ってきた実績を有する。NC/Tndマウスは、アレルギー疾患モデルであると共に、免疫異常に起因する多くの疾患のモデルとなる可能性を秘めている。本研究で代表者は、新規性の高い羊水塞栓症モデルの開発作成及びにそれを用いた病態解析を目指した。

## 2. 研究の目的

NC/Tndマウスは、申請者によって世界に先駆け初めて報告されたアトピー性皮膚炎自然発症モデルマウスであるが、皮膚炎を伴うメスマウスの妊娠率が低く、時には周産期に死に至ることもあり、繁殖の難しいことを経験的に気付いていた。近年、ヒトにおいて妊娠～出産時期における生殖の破綻が、特に母子共に致死率の高い羊水塞栓症を誘導し、少子化も相まって社会問題化している。その発症にはアレルギーを含む何らか免疫異常の関与が示唆されているものの、その原因は未だ不明のままである。本研究の目的は、NC/Tndマウスを用いた申請者のこれまでの研究実績に立脚し、NC/Tndマウスの妊娠時の免疫状態を分子生物学的に解析するとともに、本マウスを用いて羊水塞栓症モデルの作成を行い、病態解明及び治療法開発の基礎的知見を得ることであった。

## 3. 研究の方法

本研究は以下の2点を確立および解析することを目的に実施し、本疾患病態の本質解明とその制御法開発のための基礎的知見とすることとした。

### (1) NC/Tndマウスの周産期における免疫状態の解析

アトピー体質を有するNC/Tndマウスを利用し、その妊娠期間中の子宮局所および全身の免疫状態を解析評価し、皮膚炎の病勢や引っ掻き行動の増減を評価した。また、前進的な免疫状態を知る指標として以下の測定を実施した。

血漿中のIgEおよびIgG抗体価、およびサイトカイン濃度をELISA法により測定した。また、血漿中のアナフィラトキシン(補体C3及びC5)の濃度をELISA法で測定した。さらに、末梢血中単核球から磁気ビーズ自動分離装置によりCD4陽性T細胞を分離し、フローサイトメトリー法を用いて細胞内サイトカイン(IL-4及びIFN- など)の検出を行い、妊娠中のTh1型あるいはTh2型免疫反応の優位性を評価した。

### (2) 羊水塞栓症の誘導と病態解析

胎児タンパクに対するTh2型の免疫反応を惹起したNC/Tndマウスに妊娠後期に超音波観察下の人為的操作により羊膜に裂傷を惹起、非自己タンパクである胎児抗原を漏出させ母体の病勢変化を解析し、効率的マウスモデルの作成と病態解析を実施した。

### (3) 妊娠子宮における胎児形成と母体免疫反応の免疫組織学的解析

妊娠を誘導したNC/Tndマウス及び標準マウスから、経時的に妊娠子宮を採取して、以下の項目について解析、NC/Tndマウスと標準マウスを比較・検討した。また、肥満細胞を欠損するNC/NgaTnd-Wsh/Wshマウスを用いて、妊娠時の肥満細胞の意義を検討した。

さらに、子宮・胎盤・胎児における炎症性細胞などを特異染色法による病理組織学的に解析した。また、妊娠子宮に浸潤する免疫細胞の種類や胎盤から胎児への血管・神経などの侵入・分布状態について、各種抗体を用いた免疫組織学的に解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 妊娠マウスにおける痒み(引っ掻き行動)の推移

NC/Tndマウスを交配させ、経時的に引っ掻き行動数の推移をSCLABA-Realを用いて調べた。妊娠したマウスでは引っ掻き行動数が減少し、出産後(4週目)には妊娠前のレベルに戻った。妊娠しなかったマウスの引っ掻き行動は、ほとんど変化しなかった(図1)。

妊娠マウスで引っ掻き行動が減少したことから、血中サイトカインレベルを測定したところ、IL-4やIL-5など、Th2型サイトカインの濃度が低下し、IFN-gammaなどTh1型のサイトカインが上昇していることが明らかとなった。このことは、NC/Tndマウスでは、妊娠維持に必要なTh2型の免疫状態を保ち難いことを示唆している。

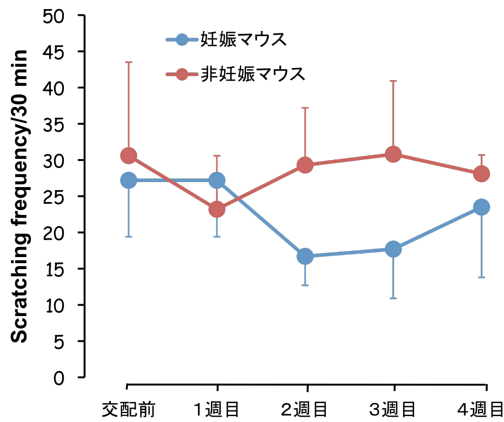


図1 妊娠マウスの引っ掻き行動数の推移

### (2) 血中因子の推移

血清中の血小板活性化因子 (PAF) を ELISA 法で測定したところ、妊娠の時期に関わらず NC/Tnd マウスでは BALB/c マウスに比べて高くなっていた (図2)。このことは、NC/Tnd マウスの血小板が活性化しやすい状態であることを示唆する。

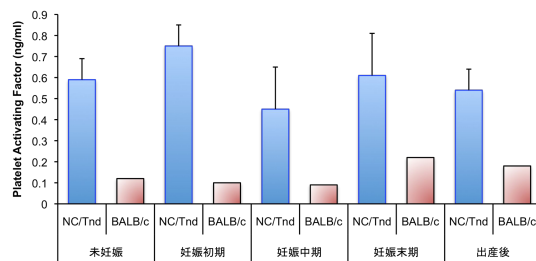


図2 血中 PAF の推移

さらに、補体の中でもアナフィラキシーの原因となる C3 の血清中濃度を ELISA 法で測定した。BALB/c マウスと比較して NC/Tnd マウスでは C3 値が高かったが、妊娠が進むにつれてやや減少し、出産後には元のレベルに戻った (図3)。このような妊娠中の血清 C3 値の低下は、C3 が末梢組織などに分布している可能性を示唆する。

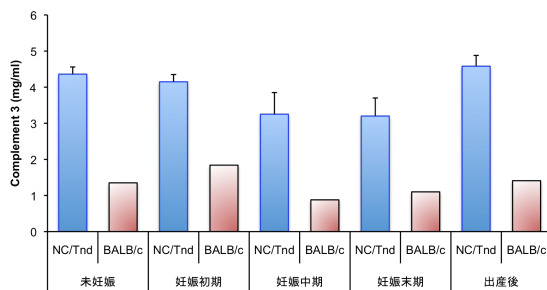


図3 血中 C3 濃度の推移

このような NC/Tnd マウスにおける PAF や C3 の高値は、このマウスがアナフィラキシー体質であることを示唆するのも知れない。

### (3) 子宮における肥満細胞数の推移

NC/Tnd マウスの子宮の各部位における肥満細胞をトルイジンブルー染色法で検出した。未妊娠子宮と比べ、妊娠が進むにつれて内膜や筋層の肥満細胞が減少するものの、外膜の肥満細胞数に大きな変化はなかった (図4)。肥満細胞は脱顆粒すると検出しにくくなることから、妊娠中期あるいは後期の内膜や筋層では、肥満細胞が脱顆粒している可能性がある。

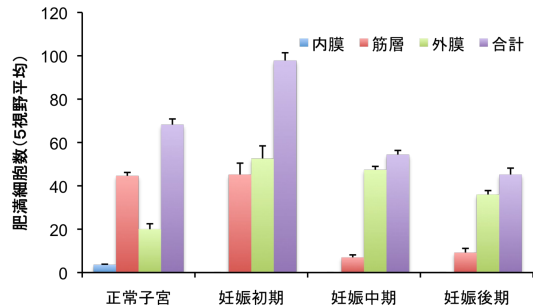


図4 子宮の各部位における肥満細胞数の推移

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

- Higuchi H, Tanaka A, Nishikawa S, Oida K, Matsuda A, Jung K, Amagai Y, Matsuda H. Suppressive effect of mangosteen rind extract on the spontaneous development of atopic dermatitis in NC/Tnd mice. *J. Dermatol.* 40(10):786-96. 2013. doi: 10.1111/1346-8138.12250. 査読あり
- Amagai Y, Tanaka A, Matsuda A, Oida K, Jung K, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Matsuda H. Topical application of ketoprofen improves gait disturbance in rat models of acute inflammation. *BioMed Res. Int.* 2013:540231. 2013. doi: 10.1155/2013/540231. 査読あり
- Kobayashi T, Hayakawa K, Tanaka A, Matsuda H. Increased Expression of Gelatinase and Caspase Activities in the Skin of NC/Tnd Mice: A Model for Atopic Dermatitis. *Dermatitis.* 2013;24(5):254-5. doi: 10.1097/DER.0b013e31829f2895. 査読あり
- Amagai Y, Matsuda H, Tanaka A. Abnormalities in itch sensation and skin barrier function in atopic NC/Tnd mice. *Biol Pharm Bull.* 2013;36(8):1248-52. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23902968> 査読あり

- (5) Jung K, Miyagawa M, Matsuda A, Amagai Y, Oida K, Okamoto Y, Takai M, Nishikawa S, Jang H, Ishizaka S, Ahn G, Tanaka A, Matsuda H. Antifungal effects of palmitic acid salt and ultrapure soft water on *Scedosporium apiospermum*. *J. App. Microbiol.* 115(3): 711-717. 2013.  
doi: 10.1111/jam.12298.  
査読あり
- (6) Tanaka A, Jung K, Matsuda A, Jang H, Kajiwara N, Amagai Y, Oida K, Ahn G, Ohmori K, Kang K, Matsuda H. Daily intake of Jeju ground water improves the skin condition of the model mouse for human atopic dermatitis. *J. Dermatol.* 40(3): 193-200. 2013.  
doi: 10.1111/1346-8138.12055.  
査読あり
- (7) Ohmori K, Nishikawa S, Oku K, Oida K, Amagai Y, Kajiwara N, Jung K, Matsuda A, Tanaka A, Matsuda H. Circadian rhythms and the effect of glucocorticoids on expression of the clock gene *period1* in canine peripheral blood mononuclear cells. *Vet. J.* S1090-0233 (12) 00432-00437. 2012.  
doi: 10.1016/j.tvjl.2012.10.010.  
査読あり
- (8) Tanaka A, Amagai Y, Oida K, Matsuda H. Recent findings in mouse models for human atopic dermatitis. *Exp Anim.* 61(2): 77-84. 2012.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22531722>  
査読あり
- (9) Matsuda A, Tanaka A, Pan W, Okamoto N, Oida K, Kingyo N, Amagai Y, Xia Y, Jang H, Nishikawa S, Kajiwara N, Ahn G, Ohmori K, Matsuda H. Supplementation of the fermented soy product ImmuBalance™ effectively reduces itching behavior of atopic NC/Tnd mice. *J. Dermatol. Sci.* 67(2): 130-139. 2012.  
doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.05.011.  
査読あり

〔学会発表〕(計6件)

- (1)張孝善、松田浩珍、他  
A study on impaired-skin barrier functions in NC/Tnd mice, a model for human atopic dermatitis  
EAACI 2012  
2012年6月19日  
スイス・ジュネーブ

- (2) 張孝善、松田浩珍、他  
アトピー性皮膚炎モデルマウスにおける皮

膚 pH と皮膚バリア損傷の関連性  
日本獣医学会学術集会  
2012年9月14日  
岩手県、岩手大学

- (3) 張孝善、松田浩珍、他  
Influence of the potential hydrogen on skin barrier function and immune responses in NC/Tnd mice, a model for human AD  
EAACI-WAO Congress 2013  
2013年6月23日  
イタリア・ミラノ

- (4) 張孝善、松田浩珍、他  
アトピー性皮膚炎治療における皮膚 pH 調節の重要性  
日本獣医学会学術集会  
2013年9月22日  
岐阜県、岐阜大学

- (5)安キンネ、松田浩珍、他  
カジメに含まれる dieckol のアトピー性皮膚炎症状に対する治療効果  
日本獣医学会学術集会  
2013年9月22日  
岐阜県、岐阜大学

- (6)松田浩珍(招待講演)  
The benefits of comparative approaches for atopic dermatitis  
ISMA 2013  
2012年12月5日  
オーストリア・ウィーン

〔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〕  
ホームページ等  
[http://www.tuat.ac.jp/~mol\\_path/](http://www.tuat.ac.jp/~mol_path/)

6. 研究組織

- (1)研究代表者  
松田 浩珍 (Matsuda Hiroshi)  
国立大学法人東京農工大学・農学研究院・教授  
研究者番号: 80418673

- (2)研究分担者  
なし