

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870737

研究課題名(和文) 生後の栄養管理で未熟児網膜症発症を予防するための基礎研究

研究課題名(英文) Postnatal Nutrient Effects on Retinopathy of Prematurity Rat Model

## 研究代表者

齋藤 雄太 (SAITO, YUTA)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：70407477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：未熟児網膜症は出生体重が小さいほど、生後の体重増加が不良なほど発症や重症化のリスクとなる。最近では生後の発育・発達促進のため生後早期の栄養管理が重要視されるようになってきたが、積極的な栄養管理が未熟児網膜症の発症予防につながるというエビデンスは少ない。そこで今回我々は低出生体重や体重増加が網膜症に与える影響を未熟児網膜症の動物モデルを用いて基礎的に検討した。

その結果、我々の用いた動物モデルでは体重増加を促進することが網膜血管発達の促進や網膜症の抑制になるとはいえなかった。むしろ低出生体重で生後の栄養摂取量が少ないほうが網膜症は軽症であった。

研究成果の概要(英文)：In preterm human infants, risk of retinopathy of prematurity (ROP) has been linked to low birth weight and slow postnatal weight gain. To prevent severe ROP, it is considered that postnatal nutrition in preterm infants are very important, and early aggressive nutrition may reduce the risk of ROP. The aim of this study is to investigate prenatal and postnatal nutrient effects on body weight gain, retinal vascularization in oxygen-induced retinopathy (OIR) rat model.

As the results, we had shown that postnatal body weight gain had no correlation to the retinal avascular area or retinal neovascularization in this model. Instead, pups with low birth weight and slow body weight gain had milder retinopathy in this study, which was a different phenomenon from clinical ROP.

研究分野：眼科

キーワード：未熟児網膜症 栄養 血管内皮増殖因子 インスリン様成長因子 網膜血管新生

1. 研究開始当初の背景

未熟児網膜症は未熟な状態で出生した超低出生体重児に発症する眼内血管新生疾患であり、小児の失明原因の1つである。未熟児網膜症発症の機序として、出生直後の網膜正常血管発達が遅延する Phase 1 と、その後に網膜無血管領域が相対的低酸素状態になり血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: **VEGF**) が過剰産生され、眼内血管新生が発症する Phase 2 とに分けられる (Chen J et al. *Angiogenesis* 2007)。そして現在未熟児網膜症に行われているレーザー治療や抗 VEGF 抗体療法、硝子体手術などはすべて Phase 2 に対しての治療であり、将来の周辺視野欠損や全身合併症などが危惧される。よって Phase 1 での未熟児網膜症の発症予防法が切望されている。

蛋白量やエネルギー摂取量と関連して変動する血清 Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) は、低栄養状態では低値をとる (板橋家頭夫、日本未熟児新生児学会雑誌 2008)。重症未熟児網膜症では出生後血清 IGF-1 の低値が遷延することが報告されており (Hellstrom et al. *Pediatrics* 2003)、Phase 1 における血清 IGF-1 値の低下を阻止することで、未熟児網膜症の進展を予防できるのではないかと考えられている (Yeung, *Acta Paediatr* 2006)。特に子宮内発育遅延 (Small for gestational age: SGA) は未熟児網膜症の重症化の危険因子となる (Dhaliwal CA et al. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2009)。近年、欧米では極低出生体重児に対し子宮外発育不全を防ぐため、出生後早期から積極的な栄養管理 (Early Aggressive

Nutrition: EAN) を行う傾向にあり (板橋家頭夫、日本未熟児新生児学会雑誌 2008)、未熟児網膜症の発症予防も期待されているが、未だ明確なエビデンスはない。

2. 研究の目的

生後の十分な栄養が未熟児網膜症の発症・重症化を予防可能であるか検討するため、低出生体重仔ラットを用いて酸素負荷を行い、Oxygen-Induced Retinopathy (OIR) モデルを作製して、生後の栄養摂取量の違いが網膜症の発症や IGF-1・VEGF の発現、体重増加などにどのように影響するか研究した。

3. 研究の方法

妊娠 Sprague-Dawley ラットを購入し、妊娠 13 日目 (出産 9 日前) から妊娠母ラットにカロリーは同等の通常食 (20%蛋白含有: 20%群) もしくは低蛋白食 (10%蛋白含有: 10%群) を与えて飼育し、10%群では胎仔の子宮内発育不全を誘発させ、子宮内発育遅延 (Small for gestational age: SGA) モデルを作製した。出生直後の新生児ラットを屠殺・採血して、出生直後の血中 IGF-1 濃度を ELISA 法で測定した。またそれとは別の出生直後の仔ラットを母乳摂取量に差が出るように母ラット 1 匹に対して 7 匹 (少数群) と 14 匹 (多数群) に分けて飼育した。すなわち 4 群 (20%少数群、20%多数群、10%少数群、10%多数群) に分けて、その後の研究をすすめた。

まず 1 年目にはこれら 4 群を大気中で飼育して母ラットには出産後も同じ飼料を与えた。日齢 8 に仔ラットの体重を測定して屠殺後採血・眼球摘出を行い、右眼は固定して網膜展開標本を作成、左眼は摘出した網膜をホモジ

エネートして上澄み液から網膜内 VEGF、IGF-1 濃度を ELISA 法で測定した。網膜展開標本から網膜の全面積 (TRA)、無血管領域 (AVA) を測定し、TRA に占める AVA の割合を %AVA とし、4 群間で比較した。

2 年目にはこれら 4 群に生直後から 50%O<sub>2</sub>/24h、その後 10%O<sub>2</sub>/24h を 1 クールとして日齢 14 まで酸素負荷を施行し、日齢 14~18 までは大気中で飼育した (図 1)。当初母ラットの食餌は 1 年目同様出産後も同じ飼料を与えたが、実験経過中に 10%群での新生児ラットの死亡率が高く、有効な N 数が得られないため、最終的にはすべての群に 20%蛋白含有試料で飼育した代理母を用いた。日齢 18 に 1 年目と同様に、仔ラットの体重を測定して屠殺後採血・眼球摘出を行い、右眼は固定して網膜展開標本を作成、左眼は摘出した網膜をホモジェネートして上澄み液から網膜内 VEGF、IGF-1 濃度を ELISA 法で測定した。網膜展開標本から %AVA、網膜血管新生スコア (clock hours: CH) を測定して 4 群間で比較した。

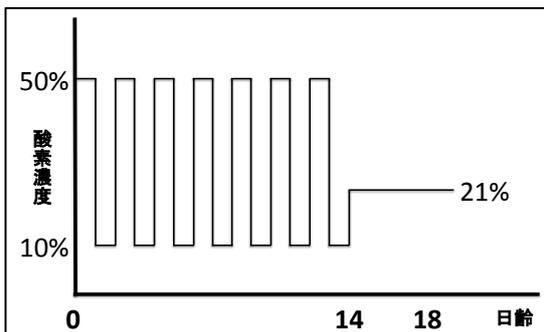


図 1 : 動物モデル

#### 4. 研究成果

- (1) 新生児ラットの出生時体重はコントロール群と比較して SGA 群で有意に低値を示した (図 2)。
- (2) 出生直後での新生児ラットの血中 IGF-1 濃度はコントロール群と比較して SGA ラット群で有意に低値を示した (図 3)。

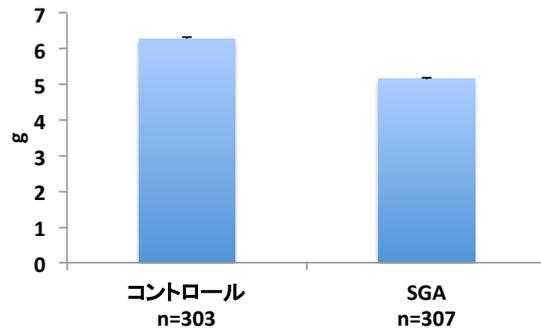


図 2 : 出生時体重

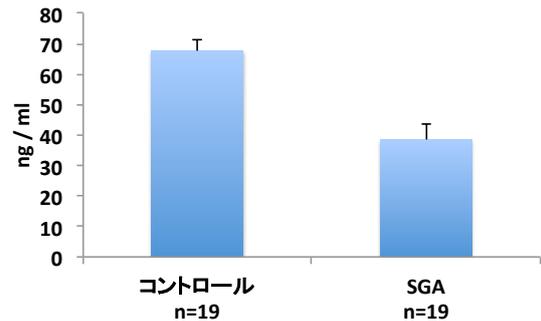


図 3 : 出生直後の血中 IGF-1 濃度

- (3) 大気中で飼育した新生児ラットの日齢 8 の体重は 4 群間で有意差を認めた (図 4)。%AVA では有意差は認めなかった (図 5)。網膜内 IGF-1 濃度・VEGF 濃度、血中 IGF-1 濃度は各群間で有意差を認めた (図 6-8)。

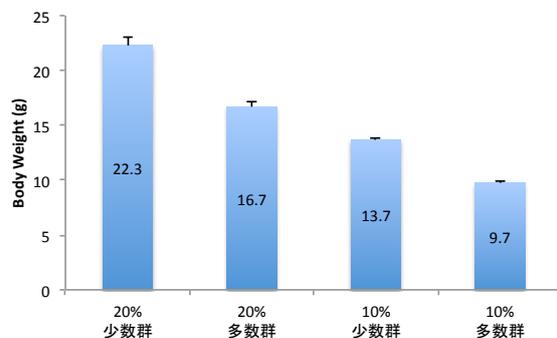


図 4 : 日齢 8 体重

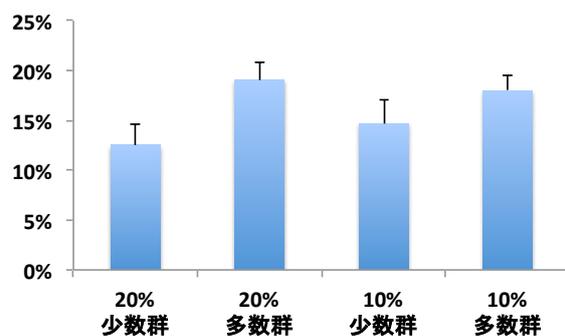


図 5 : 日齢 8 %AVA

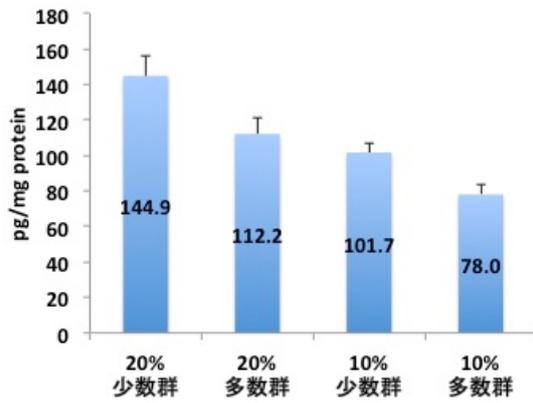


図 6 : 日齢 8 網膜内 IGF-1 濃度

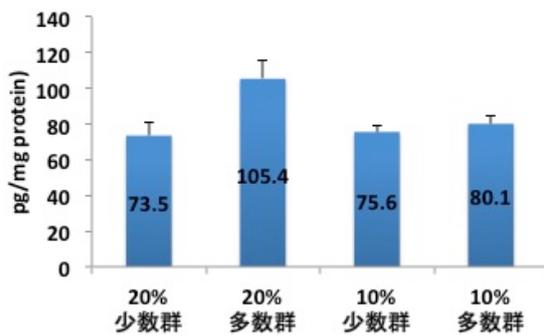


図 7 : 日齢 8 網膜内 VEGF 濃度

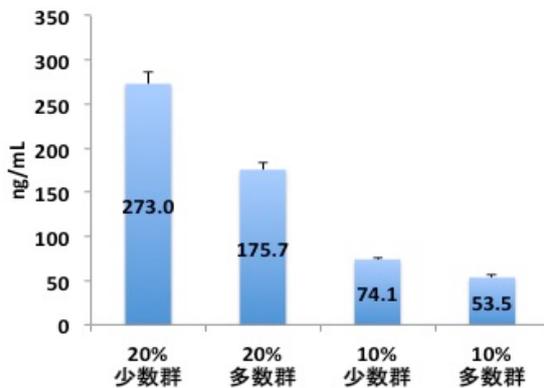


図 8 : 日齢 8 血中 IGF-1 濃度

(4) OIR ラットでの日齢 18 における体重、%AVA、CH、網膜内 IGF-1・VEGF 濃度、血中 IGF-1 濃度に各群間で有意差を認めた (図 9-14)。

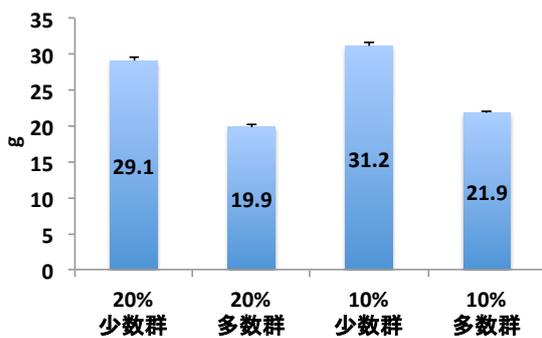


図 9 : 日齢 18 体重

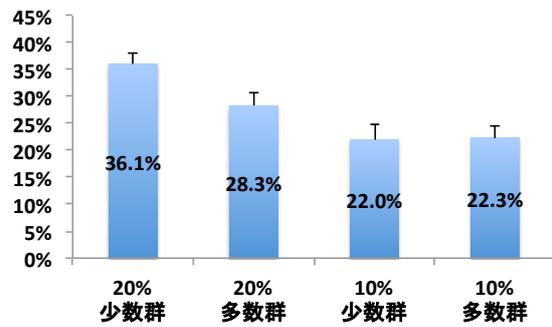


図 10 : 日齢 18 %AVA

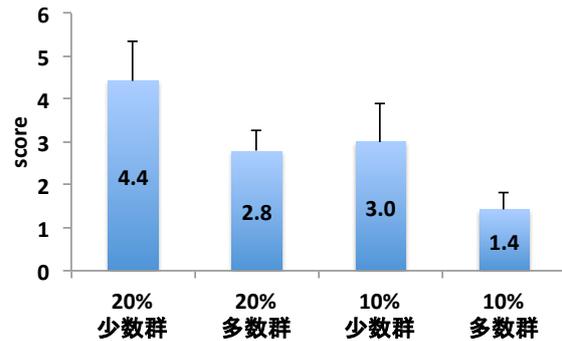


図 11 : 日齢 18 Clock Hours

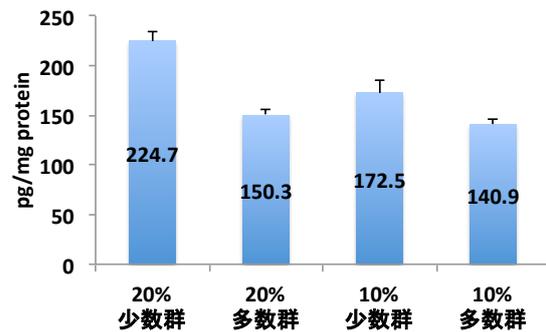


図 12 : 日齢 18 網膜内 IGF-1 濃度

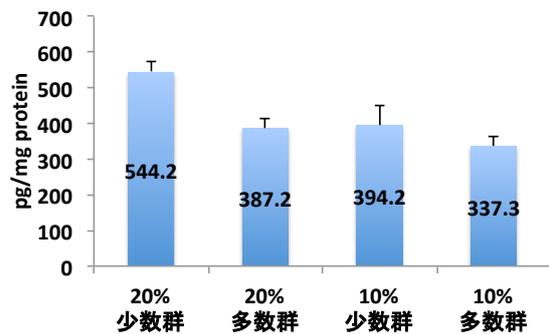


図 13 : 日齢 18 網膜内 VEGF 濃度

以上の結果より、網膜内および血中 IGF-1 濃度は体重と有意な相関関係を示した。また網膜内 VEGF 濃度と %AVA でも有意な相関関係を示した。OIR ラットにおいて、日齢 18 の体重は無血管領域の割合や網膜症に相関性がなく、本モデルにおいては体重増加を促進することが網膜血管発達の促

進や網膜症の抑制になるとはいえなかった。むしろ低出生体重で生後の栄養摂取量が少ないほうが網膜症は軽症で、ヒトでの臨床報告とは異なる結果となった。

臨床ではSGAや子宮外発育不全の他に、感染症や輸血などもROP重症化のリスクとなり (Hellstrom A et al. Lancet 2013)、動物モデルではROPの病態を完全に再現することは出来ない。今回の結果がヒトと動物モデルとの違いによるものか、ヒトでも過剰な栄養が網膜症に悪影響を与えるのか、更に検討する必要がある。

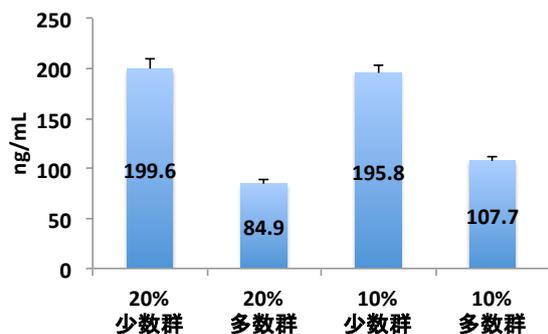


図14：日齢18血中IGF-1濃度

## 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)

- ① M. Matsubara, Y. Saito, T. Nakanishi-Ueda, T. Ueda, T. Hisamitsu, R. Koide, H. Takahashi, Influence of the difference of breastfeeding volume on a rat model of oxygen-induced retinopathy, Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 査読有, vol. 55, 2014, 129-134, DOI: 10.3164/jcbrn.14-57

[学会発表] (計 4 件)

- ① 齋藤雄太、生前・生後の栄養がラット網膜血管発達に与える影響、第118回日本眼科学会総会、2014年4月2日～4月6日、東京国際フォーラム (東京)
- ② Y. Saito, Prenatal and Postnatal Nutrient Effects in Neonatal Rat Growth and Retinal Development, ARVO, 2014年5月4日、オーランド (米国)
- ③ 齋藤雄太、生前・生後の栄養が高酸素負荷網膜症ラットに与える影響、第119回日本眼科学会総会、2015年4月16日～4月19日、ロイトン札幌 (札幌)
- ④ Y. Saito, Prenatal and Postnatal Effects on Oxygen-Induced Retinopathy

Rat Model, ARVO, 2015年5月3日, デンバー (米国)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等  
無

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 雄太 (SAITO, Yuta)  
昭和大学・医学部眼科学講座・講師  
研究者番号：70407477