

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861322

研究課題名(和文) ラット横隔膜ヘルニアモデルを用いた胎仔肺低形成に対する治療戦略

研究課題名(英文) The therapeutic strategy for lung hypoplasia in congenital diaphragmatic hernia in a rat model

研究代表者

津田 弘之 (TSUDA, HIROYUKI)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40571328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠9日目の母獣SDラットにニトロフェン100mgを経口投与し、CDHモデルを作成した。このCDHモデルに柴苓湯800mgを妊娠10日目より母獣に連続経口投与した柴苓湯治療群を作成し、妊娠21日目に胎仔を出生させた。胎仔のCDH発症率は柴苓湯投与群で有意に低下した。また、CDH発症の胎仔における肺重量は柴苓湯群で有意な改善を認めた(肺・体重比でS群0.016 vs N群0.014、 $p < 0.01$)。さらに生後5分の新生仔血での血液ガス分析でも柴苓湯群で有意な改善を認めた。肺組織学的評価でも、柴苓湯群では肺胞構造が有意に改善し、肺動脈壁厚の減少を認めた。肺動脈数には有意差を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Congenital diaphragmatic hernia (CDH) can induce lung hypoplasia and pulmonary hypertension, and is associated with high mortality. The purpose of this study is to examine the efficacy and safety of antenatal Saireito (TJ-114), a traditional Japanese herbal medicine, in a rat CDH model. Sprague-Dawley rats were exposed to an herbicide (nitrofen, 100 mg) on embryonic day 9 (E9) to induce CDH, and antenatal Saireito (2000 mg/kg/day) was orally administered from E10 to E20. On E21 fetuses were delivered. Antenatal Saireito significantly decreased the incidence of CDH ($p < 0.01$), and increased lung volume ($p < 0.01$), improved alveolarization and pulmonary artery remodeling using histological analysis, and respiratory function using gasometric analysis (pH; $p < 0.05$, and PCO₂; $p < 0.01$). Taken together, our results demonstrated that antenatal Saireito can improve fetal pulmonary hypoplasia and pulmonary vascular remodeling, as a result, can improve respiratory function in a rat CDH model.

研究分野：周産期学

キーワード：先天性横隔膜ヘルニア 肺高血圧 リモデリング

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。

CDH に対する胎児治療の一つとして、子宮鏡下胎児気管閉塞術の論文報告がある。しかし現時点ではその効果は限定的であり、かつ母体侵襲も伴う点が臨床問題である。一方、ラット CDH モデルにおいて、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はヒト妊婦への投与が困難(特にレチノイン酸は禁忌)であり、臨床応用には至っていない。

以上のことから現在、胎児肺低形成の確立された予防法は存在しない。したがって本研究では、我々はラット胎児 CDH モデル(肺低形成モデル)を作成し、肺低形成に対する予防戦略として、臨床応用を視野に入れた新たな薬剤治療の確立を目的とする。

2. 研究の目的

ラット胎児 CDH モデル(肺低形成モデル)において、母獣に柴苓湯を投与することで、胎児の肺低形成が予防できるかどうかを検討すること。また、柴苓湯の作用機序について、肺血管のリモデリングに重要な役割を持つエンドセリン 1(以下 ET-1)に注目し検討を行うこと。さらに柴苓湯投与による仔への副作用について検討すること。

まとめると、以下の内容につき検討することを目的とした。

- ・ラット CDH モデルに対して柴苓湯を投与することで、CDH の発症率を減らせるか。
- ・ラット CDH モデルに対して柴苓湯を投与することで、肺低形成を予防できるか。
- ・柴苓湯投与群の胎児において、呼吸機能の改善が認められるか。
- ・柴苓湯投与群の胎児肺において、肺胞構造の改善が認められるか。
- ・柴苓湯投与群の胎児肺において、肺動脈数・肺動脈壁の厚みに変化は認められるか。
- ・柴苓湯投与群の胎児肺において、肺成熟に変化は認められるか。
- ・柴苓湯投与群の胎児において、有害事象が生じないか(特に発育、脳障害について)。
- ・柴苓湯投与の肺低形成予防効果に対する分子学的メカニズムの評価(特に ET-1 に注目して)。

柴苓湯は視床下部の CRF 分泌を刺激す

ることで内因性ステロイド分泌を亢進させる作用を持つ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、柴苓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。

3. 研究の方法

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り胎仔横隔膜ヘルニアモデルを作成した。胎仔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。薬剤治療群としては、妊娠 15 日目より柴苓湯 0.8g/日/body を連日投与した。この中で、結果的に CDH を認めた群を CDH+S 群と定義した。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た。評価項目は、CDH 発症率、胎仔の肺重量、胎仔の呼吸機能評価(血液ガス分析)、胎仔の肺組織学的評価(肺胞構造、肺動脈数、肺動脈壁の厚み)とした。また、胎仔肺の ET-1 発現を免疫染色と Western blotting(WB)で検討した。さらに仔の副作用評価として、妊娠 10 日目より柴苓湯 800mg/日を母獣に経口投与した群で仔の体重および発達を 6 か月間追跡し、また生後 28 日目の胎仔脳と副腎の重量測定および脳の HE 染色、ニューロンのマーカーである NeuN の免疫染色を行い、Normal 群と比較した。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

胎仔の CDH 発症率は柴苓湯投与群で有意に低下した(ニトロフェン+柴苓湯投与群 25% vs ニトロフェン単独群 45.5%、 $p < 0.001$)。また、CDH 発症の胎児における肺重量は柴苓湯群で有意な改善を認めた(肺・体重比で CDH + 柴苓湯群 0.016 vs CDH 群 0.014、 $p < 0.01$)。

さらに生後 5 分の新生仔血での血液ガス分析でも柴苓湯群で有意な改善を認めた(pH : CDH+柴苓湯投与群 7.14 vs CDH 群 7.06、 $p < 0.05$)。

肺組織学的評価でも、柴苓湯群では肺胞構造が有意に改善し($p < 0.05$)(下図 1)、肺動脈壁厚の減少を認めた($p < 0.01$)(下図 2 ならびに図 3)。

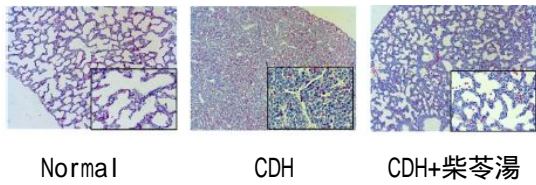
肺動脈数には有意差を認めなかった。

肺成熟に関する検討を行うため中枢側肺胞上皮の肺成熟マーカーである clara cell secretory protein (CCSP)、ならびに末梢側肺胞上皮の肺成熟マーカーである surfactant protein(SP)-C の免疫組織染色を行ったが、3 群間で有意な差は認めなかった。

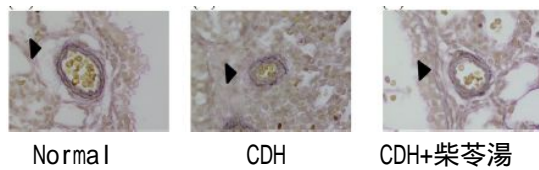
免疫染色および WB において、CDH 群は Normal 群と比較し有意に ET-1 発現の上昇を認め、CDH+S 群で有意に改善を示した($p < 0.05$)(図 4 および図 5)。

また母獣に対する柴苓湯 800mg/日投与は、仔の発達や発育、副腎重量、および脳組織学的変化、NeuN 発現いずれも Normal 群と差を認めなかった (図 6 および図 7)。

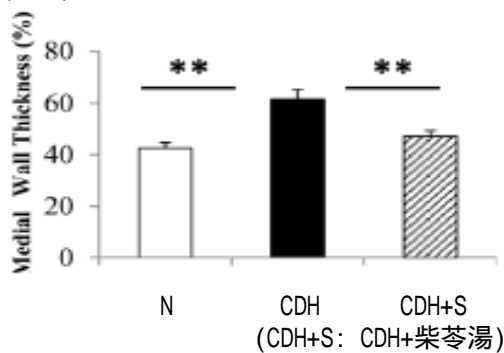
(図 1) 各群における肺胞構造



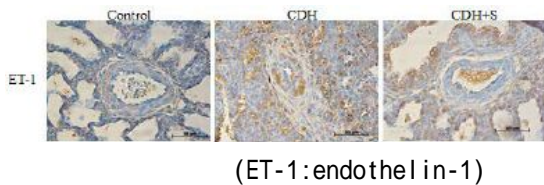
(図 2) 各群における肺血管構造 (肺動脈)



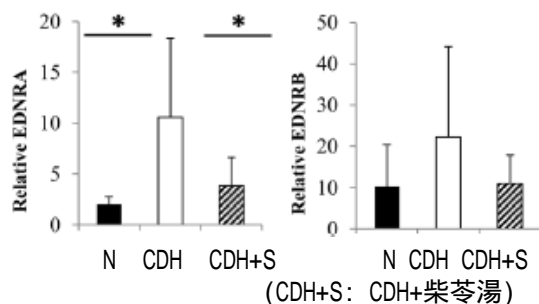
(図 3) 各群における肺動脈の中膜肥厚



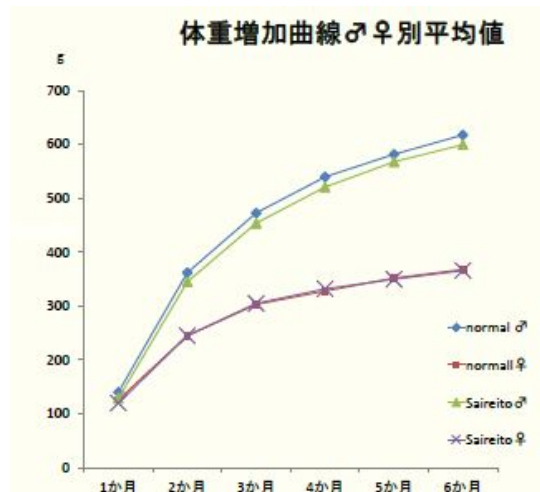
(図 4) 各群における肺動脈中膜の ET-1 発現



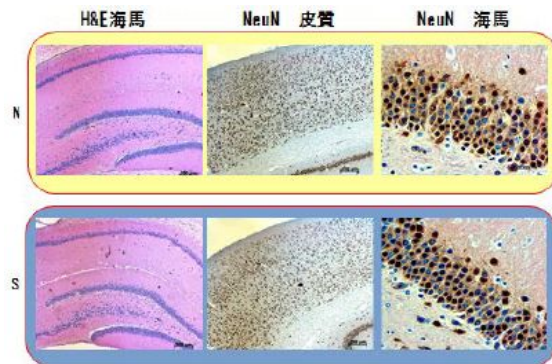
(図 5) 各群におけるエンドセリンレセプター (EDNRA, EDNRB) の発現強度 (RT-PCR 法)



(図 6) 各群における発育増加曲線



(図 7) 各群における脳組織の組織学的所見



以上の結果より、ラット CDH モデルの母獣に柴苓湯を投与することで、胎仔の CDH 発症率低下、肺重量の改善ならびに呼吸機能、肺胞構造などの改善を認めた。

また、柴苓湯出生前投与による肺機能および肺血管リモデリング改善のメカニズムとして ET-1 の関与が示された。

さらに柴苓湯投与による仔への明らかな副作用は認めなかった。

今回の研究の問題点としては、あくまでラットにおける CDH モデルを用いており、CDH の発症時期、そして、実際には診断されてからの治療開始という臨床的な観点からは一線を画しているということ、柴苓湯の投与量が、通常ヒトに投与する投与量と比較すると約 10 倍程度の高用量であること、また薬剤の胎盤移行性の問題などがある。以上は今後の検討課題である。

結論として、今回の結果より柴苓湯が CDH に対する有用かつ低侵襲な胎児治療として、ヒトに応用できる可能性が示唆された。

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 1 件)

- (1) Antenatal Saireito (TJ-114) Can Improve Pulmonary Hypoplasia and Pulmonary Vascular Remodeling in Nitrofen-Induced Congenital Diaphragmatic Hernia. Hirako S, Tsuda H, Kotani T, Sumigama S, Mano Y, Nakano T, Imai K, Li H, Toyokuni S, Kikkawa F. Phytother Res. 2016 Sep.30(9):1474-80. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 先天性横隔膜ヘルニアにおける漢方薬を用いた治療の可能性

平光志麻、津田弘之、伊藤由美子、森山佳則、諸井博明、今井健史、中野知子、炭竈誠二、小谷友美、吉川史隆 第35回産婦人科漢方研究会学術集会 (H27.9.13 ベルサール飯田橋駅前、東京都文京区)

- (2) 柴苓湯を用いた先天性横隔膜ヘルニアに対する胎児治療 エンドセリン-1 に対する作用と副作用評価

平光志麻、津田弘之、森山佳則、牛田貴文、諸井博明、今井健史、中野知子、眞野由紀雄、炭竈誠二、小谷友美、吉川史隆 第67回日本産科婦人科学会 (H27.4.11 パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

- (3) 先天性横隔膜ヘルニアに対する治療戦略 ~ 柴苓湯を用いた新しい胎児治療の可能性 ~

平光志麻、津田弘之、牛田貴文、諸井博明、今井健史、中野知子、服部友香、渡部百合子、眞野由紀雄、炭竈誠二、小谷友美、吉川史隆 第66回日本産科婦人科学会 (H26.4.19 東京国際フォーラム、東京都千代田区)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

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・講師
研究者番号：40571328