

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19591286

研究課題名（和文） 新生児慢性肺疾患治療法の開発：NO 吸入療法による肺線維化の抑制

研究課題名（英文） Strategy for neonatal chronic lung disease: Prevention from lung fibrosis with NO inhalation

研究代表者

奥谷 貴弘（OKUTANI TAKAHIRO）

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60336881

研究成果の概要（和文）：血漿中のアンジオテンシン II 濃度は日齢 21 をピークとする経時的変化を示し、慢性肺疾患を有する児の方が有意に高値を示した。血漿中の VEGF 濃度もアンジオテンシン II と同様の経時的変化を示し、日齢とともに増加する傾向にあった。しかし血漿中 VEGF については慢性肺疾患を有する児の方が高値を示す傾向にあったが、統計学的有意差は認められなかった。

研究成果の概要（英文）：In infants with very low birth weight, the plasma angiotensin II levels gradually increased and reached a peak on day 21 thereafter decreased. Chronic lung disease was confirmed to be the most significant factor associated with the plasma angiotensin II levels on days 21 and 35. The plasma VEGF levels also increased gradually. In infants with chronic lung disease, the plasma VEGF levels tend to be higher than those in infants without chronic lung disease, but the difference was not statistically significant.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

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：新生児慢性肺疾患，一酸化窒素吸入療法，肺線維化

## 1. 研究開始当初の背景

近年の新生児医療技術の発展により出生体重 1500g 未満の極低出生体重児の救命率は飛躍的に改善されてきた。しかし極低出生体重児が子宮外で生きていくためには、本人

の発育途中の肺を無理やり使わざるを得ず、未熟な肺は人工呼吸器の強制換気を受けることにより、肺胞上皮細胞壊死・過形成、肺胞壁の浮腫、肺胞壁の線維化などの病理的変化をきたして「新生児慢性肺疾患」となる。慢性肺疾患は超早産児の 3 大後遺症（慢性肺

疾患、脳室周囲白質軟化症、未熟児網膜症)のひとつであり、現在のところ有効な予防・治療法がなく、新生児医療の残された大きな課題となっている。

我々はこれまで慢性肺疾患の線維化にレニン・アンジオテンシン系が強く関与していると考えて、種々の基礎・臨床研究を行ってきた。

(1) 極低出生体重児では日齢 7 で血清アンジオテンシン II が上昇している (Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 2006; 91; 359-362).

(2) ヒト胎児肺線維芽細胞 (TIG-1) にはレニン・アンジオテンシン系のうち、レニン、アンジオテンシノーゲン、アンジオテンシン変換酵素、アンジオテンシン II type1 レセプターが発現しており、培養 TIG-1 細胞にアンジオテンシン II を加えると増殖が促進され、そこにアンジオテンシン II レセプターブロッカーを加えるとその細胞増殖は抑制される。

これらのデータより、アンジオテンシン II は慢性肺疾患の進行・増悪 (線維化) に明らかに影響しており、その影響はレニン・アンジオテンシン系をコントロールすることで抑制しようと考えた。しかし *in vitro* の細胞実験のようにアンジオテンシン変換酵素インヒビターを早産児に安易に全身投与することは危険である。それらの薬剤は胎児に致命的な腎不全を引き起こすため、早産児にも同様の副作用を起こす危険性があるからである。

また近年慢性肺疾患は肺の血管形成の障害も主因であると考えられている。

血管内皮細胞で産生される一酸化窒素 (NO) は内因性の血管拡張剤であり、血管平滑筋やメサンジウム細胞の増殖を抑制する。内因性の NO はアンジオテンシン II の血管緊張作用や細胞増殖作用を抑制し、アンジオテンシン変換酵素生成やアンジオテンシン II type1 レセプターを *down-regulate* する (Semin Nephrol. 2004; 24; 366-378)。

そこで我々は、実際に新生児医療に臨床応用されている NO ガスを外因性に投与して肺の線維化を抑制出来るのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 慢性肺疾患を起こす危険性の高い極低

出生体重児の、血液中・気管支肺胞洗浄液中のアンジオテンシン II, VEGF など肺線維化と新生児慢性肺疾患に関連する物質濃度を経時的に測定し、極低出生体重児における各種物質の日齢による経時的変化の基礎データを作成する。

(2) 低用量の一酸化窒素 (NO) 吸入療法を行うことにより、それらの物質濃度がどのように変化するかを解析し、一酸化窒素吸入療法が慢性肺疾患・肺線維化の予防法になりうるかどうかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 血液の採取

日齢 0, 7, 21, 35 の 4 ポイントで採血。採取した血液は EDTA 入り試験管に入れ、血漿分離後 -80°C フリーザーで凍結保存。

(2) 気管支肺胞洗浄液の採取

日齢 0, 7, 21, 35 の 4 ポイントで検体採取。Argyle 社サクシオンカテーテル・コレクショントラップ付 (5Fr) を用いて気管内吸引を行う。得られた気管支肺胞洗浄液は穏やかに vortex した後、4°C 1200rpm で 10 分間遠心分離し、上清を集めて直ちに -80°C フリーザーで凍結保存。

(3) アンジオテンシン II, VEGF の測定 (ELISA)

・血漿アンジオテンシン II 濃度の測定には、SPI BIO の ANGIOTENSIN II ENZYME IMMUNOASSAY KIT を用いた。測定前に Phenyl column を用いて検体を濃縮した。

・血漿中・気管支肺胞洗浄液中の VEGF 濃度の測定には、R&D Systems Human VEGF ELISA kit を用いた。気管支肺胞洗浄液中の VEGF 濃度は同じ検体で IgA 濃度を同時に測定し、IgA 濃度による補正を行った (IgA Human ELISA kit)。

(4) NO 吸入療法について

早産児に対する NO 吸入療法については、和歌山県立医科大学倫理委員会の承認 (受付番号: 556) を得た。

## 4. 研究成果

(1) 血漿アンジオテンシン II 濃度の推移

2002年10月から2004年12月の間に当院NICUで出生・入院した極低出生体重児20例の凍結保存してあった分離済み血漿検体を使用し、アンジオテンシンII濃度を測定した。極低出生体重児の血漿中アンジオテンシンII濃度は、日齢21まで上昇し、その後低下する傾向にあった。全てのポイントで過去に報告のある成人の血漿中アンジオテンシンII濃度よりも高値を示した。(表1)

	geometric mean	(interquartiles)
日齢0	51	(23 - 109)
日齢7	86	(35 - 235)
日齢21	132	(53 - 348)
日齢35	50	(14 - 243)

(pg/mL)

表1. 極低出生体重児のアンジオテンシンII濃度の推移

### (2) 血漿アンジオテンシンII濃度と慢性肺疾患

上記20例を、慢性肺疾患を発症した群(CLD群:11例)、発症しなかった群(非CLD群:9例)に分けて比較検討した。

日齢21、35の血漿中アンジオテンシンII濃度は、CLD群の方が非CLD群に比べて有意に高値を示した。(図1)

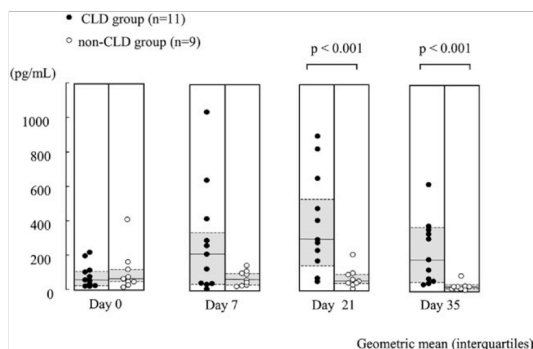


図1 CLD群と非CLD群の血漿アンジオテンシンII濃度

重回帰分析の結果、日齢21の血漿中アンジオテンシンII濃度に関連する因子は慢性肺疾患のみであり、日齢35のアンジオテンシンII濃度に関連する因子は出生体重と慢性肺疾患であった。

### (3) 血漿 VEGF 濃度の推移

2008年7月から2009年7月までに当院NICUで出生・入院した極低出生体重児24例(在胎28週±2.6週, 出生体重1056±278g)

を対象とした。

極低出生体重児における血漿 VEGF 濃度は、日齢0に比べ、日齢7, 21, 35で有意に高く、出生後増加する傾向にあった。(図2)

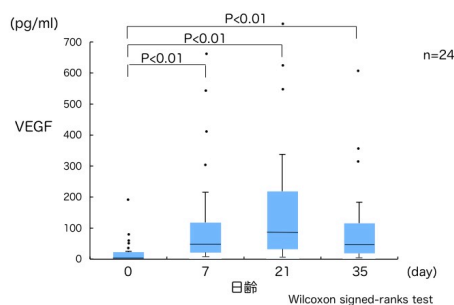


図2 極低出生体重児の血漿VEGFの推移

### (4) 血漿 VEGF 濃度と慢性肺疾患

上記24例を、慢性肺疾患を発症した群(CLD群:7例)、発症しなかった群(非CLD群:17例)に分けて比較検討した。

日齢21、35の血漿 VEGF 濃度は、CLD群の方が非CLD群に比べて統計学的有意差は認められなかったが、高値を示す傾向にあった。(表2, 図3)

	CLD群	非CLD群	p値
日齢0	19.9 (0-74.4)	2.4 (0-17.1)	0.429
日齢7	52.1 (44.2-131.6)	50.0 (16.7-185.7)	0.924
日齢21	<b>228.4</b> (30.7-337.7)	62.0 (25.4-222.1)	0.309
日齢35	<b>114.2</b> (26.9-183.7)	43.0 (12.3-103.1)	0.357

Results are median (interquartile range) (pg/mL)

Mann-Whitney's U test

表2 CLD群と非CLD群の血漿VEGF濃度

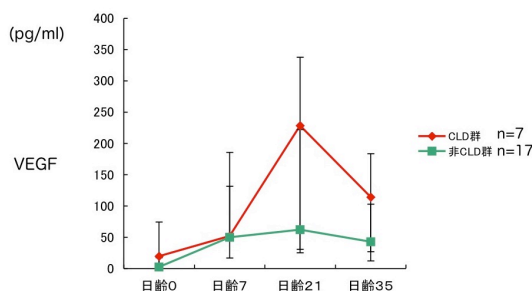


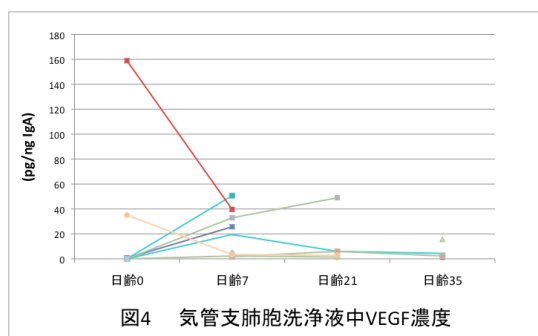
図3 CLD群と非CLD群の血漿VEGFの比較

### (5) 気管支肺胞洗浄液中 VEGF 濃度

上記24例中14例で気管支肺胞洗浄液中 VEGF 濃度を測定した。

日齢0に比べて日齢7の気管支肺胞洗浄液中 VEGF 濃度は増加傾向を示していたが、経過を通じて安定採取できた例が少なかった

ため、統計学的有意差は認められなかった。  
(図 4)



#### (6) NO 吸入療法

当院倫理委員会の承諾も得ていたが、残念ながら予防的 NO 吸入療法について同意を得られた例はなかったため、NO 吸入療法後の物質濃度の変化を測定することはかなわなかった。

アンジオテンシン II, VEGF の生後 1 ヶ月間という長期にわたる経時的変化の報告はこれまでになく、今後の新生児医療・臨床研究に大きな福音をもたらすと考えられる。

#### 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)

① Masakazu Miyawaki, Takahiro Okutani, Ryuzo Higuchi, Norishige Yoshikawa. The plasma angiotensin II level increases in very low-birth weight infants with neonatal chronic lung disease. Early Human Development, 査読有, 2008; 84: 375-9.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

奥谷 貴弘 (OKUTANI TAKAHIRO)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60336881

##### (2) 研究分担者

樋口 隆造 (HIGUCHI RYUZO)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70156579

吉川 徳茂 (YOSHIKAWA NORISHIGE)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10158412