

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10168

研究課題名(和文) 出生前母胎グルコルチコイド投与が新生児慢性肺疾患に与える影響の解析

研究課題名(英文) The histopathological changes of fetal lung induced by antenatal betamethasone treatment

研究代表者

渡邊 達也 (Watanabe, Tatsuya)

東北大学・医学系研究科・非常勤講師

研究者番号：70400380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：出生前母胎グルコルチコイド投与が肺の成長に与える影響を検討した。羊水腔内にデキストラン鉄もしくは生理食塩水を投与した妊娠ラットに対して出生前母胎グルコルチコイド投与を行い、日齢14に肺を摘出してモルフォメトリーで肺の形態学的変化を解析した。出生前母胎グルコルチコイドはデキストラン鉄投与の有無にかかわらず平均肺胞半径を増大させ、肺胞数が減少することが確認された。一方、羊水の中へのデキストラン鉄の投与は出生後の肺構造に有意な形態学的な変化を誘導しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年の新生児医療に進展に伴って極低出生体重児の救命率は劇的に改善したが、極低出生体重児における慢性呼吸障害である慢性肺疾患の発症率ほとんど変化がないことが知られている。そのため慢性肺疾患の病態解明と予防法の開発は新生児医療の大きな課題である。本研究では、出生前母胎グルコルチコイド投与が発達中の胎児・新生児の肺組織に対して負の影響を与えている可能性について指摘した。近年の周産期医療では切迫早産に対する出生前母胎ステロイド投与は積極的に推奨されている治療法であるが、本研究の成果に基づけば一律のグルコルチコイドを見直して胎児環境に応じた適応が提案される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to analyze the histopathological changes of fetal lung induced by antenatal betamethasone treatment. Time mated pregnant rats (Sprague-Dawley rat) were administered dextran iron or normal saline into the amniotic sac, and betamethasone or normal saline intramuscularly. The lungs were removed at P14 and morphometric analyses were performed. The mean linear intercept was significantly increased and total alveolar count was significantly decreased following antenatal betamethasone. There were no significant changes in the morphometric parameters following intraamniotic dextran iron infusion.

研究分野：新生児学分野

キーワード：出生前母胎グルコルチコイド びまん性絨毛膜羊膜ヘモジデロシス 慢性肺疾患 デキストラン鉄 肺モルフォメトリー

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生児慢性肺疾患 (chronic lung disease, 以下 CLD) は出生体重 1,500 g 未満の極低出生体重児で非常に罹患率の高い慢性呼吸障害である。近年の新生児医療に進展に伴って極低出生体重児の救命率は劇的に改善する一方で慢性肺疾患の発症率はほとんど改善が認められておらず、また慢性肺疾患は極低出生体重児の成長ならびに神経発達にも大きく影響を及ぼしており、詳細な発症機序の解明と治療ならびに予防法の開発は周産期新生児医療の重要な課題である。慢性肺疾患の発症に関連した出生前因子として絨毛膜羊膜炎や臍帯炎に代表される子宮内炎症やびまん性絨毛膜羊膜ヘモジデロシス (diffuse chorioamniotic hemosiderosis, 以下 DCH) が知られている。また、動物実験では妊娠母獣への glucocorticoid (以下 GC) 投与が慢性肺疾患に類似した肺の組織学的変化を誘導するという報告もある。

一方、出生前母胎 GC 投与は呼吸窮迫症候群、慢性肺疾患、頭蓋内出血、壊死性腸炎など様々な周産期合併症の予防効果が知られており、近年の周産期医療において普遍的に行われている治療の 1 つである。しかしながら、近年救命率の向上している成育限界の早産児 (妊娠 22 - 24 週) おける慢性肺疾患の予防効果に関しては十分な証拠は未だに存在しない。成育限界の早産児の多くが慢性肺疾患の危険因子である子宮内炎症や DCH を合併していることが知られており、前述の動物実験の結果も踏まえると、子宮内炎症や DCH を合併した成育限界の早産児においては出生前母胎 GC 投与が慢性肺疾患の重症化に関連している可能性は否定できない。

2. 研究の目的

本研究では妊娠ラットの胎仔に対して子宮内炎症もしくは DCH を負荷して胎仔新生児に肺胞性肺気腫を誘導し、同時に行う出生前母胎 GC 投与によって気腫性変化の重症化が認められるか検討する。本研究は、胎児新生児の肺成熟の視点から、成育限界期の子宮内環境に応じて出生前母胎 GC 投与療法の適応を検討するための基礎的データを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験委員会の承認を得て実施された (2017 医動-247-1)。動物実験は 2018 年 9 月から 2020 年 11 月にかけて東北大学附属動物実験施設で行われた。対象として妊娠が確定した満期 21 日の Sprague-Dawley ラットを使用した。

(1) 動物実験モデルの作成

・母胎 GC の投与

妊娠 18 日のラットに対して、DE 群には母胎 GC としてベタメタゾンリン酸エステルナトリウム注射液 (Rinderon Injection 0.4%) 0.2 mg/kg を大腿部に 24 時間毎に連日計 2 日間筋注した。対照群には同量の生理食塩水を投与した。

・子宮内への薬剤投与

妊娠 19 日のラットに対して 2% イソフルレン吸入を用いて全身麻酔した。無菌操作にて開腹後、子宮を腹腔外に露出し、個々の羊水腔内にデキストラン鉄 (iron 200[®], Kyoritsu seiyaku Co., Tokyo) 0.05 mL (=10 mg) を投与した群を Fe 群、endotoxin (E.coli 055:B5) 1.0 μG を投与した群を炎症群、生理食塩水 0.05 mL を投与した群を NS 群としてラット母獣を無作為に分類した。羊水腔内への投与し 48 時間後に自然分娩で出生させ、日齢 14 まで生育させた。

(2) 肺組織切片作成

日齢 14 の仔ラットをイソフルレン吸入とペントバルビタール (30 mg/kg; Somnopentyl[®], Kyoritsu seiyaku Co., Tokyo) 腹腔内投与で安楽死させ，体重測定後に肺を採取した．気管から気道内に 10% 中性ホルマリン緩衝液を注入し，20 cm 水柱圧を 20 分間加えて肺組織を固定し組織病理学的検索を行った．肺容積は Scherle's 法を用いて計測した．肺のモルフォメトリーのため，右肺を切り出し，パラフィンカセットに並行に挿入した．その後 5 μ m の厚さで切片を作成し，hematoxylin and eosin (HE)染色を行った．

(3) 肺モルフォメトリー

肺切片はオリンパス製光学顕微鏡 (BX51) と高解像度カメラ (DP74) を用いて画像ファイルを作成した．各肺組織切片からランダムに primary magnification を $\times 20$ (568 \times 422 μ m) で均等になる様に撮影した．デジタルの画像ファイルはフルカラー (RGB, 24 bit) で撮影し TIFF ファイルとして保存した．各肺組織切片からランダムに 10 箇所を撮影して TIFF ファイルとして保存し，1 ファイルあたり 5 箇所を抽出することで，計 50 箇所の Morphometry 解析を行った．

撮影したデジタル画像ファイルをステオロジで評価するため，これまでの論文でも使用されているコンピューターのソフトウェアである stereology tool (STEPanizer ver.1)を用いて解析した．先行研究と同様の方法で計測し，肺全体の平均肺胞半径を反映する L_m や平均肺胞壁肥厚 T_{sep} ，及び全肺胞数を算出した．

(4) 統計学的解析

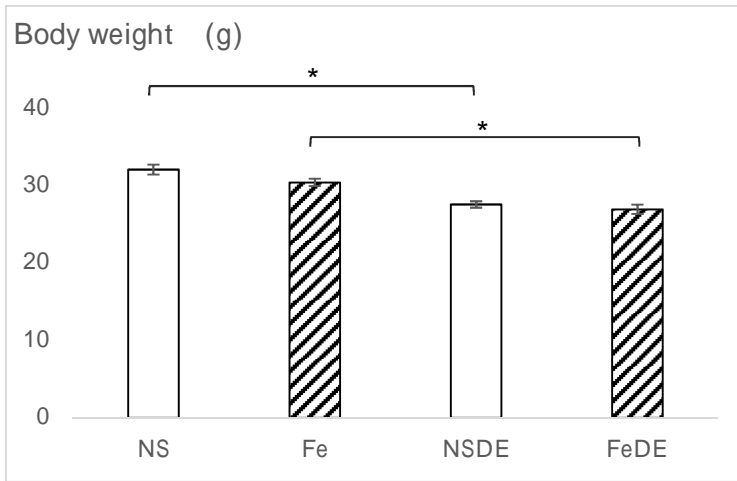
統計学的データは SPSS 統計ソフト (version 25.0; IBM, Armonk, NY)を用いて行われた．今回の研究で得られたデータはすべて平均 \pm 標準誤差で表した．両群間におけるデータの統計学的比較には 2 way ANOVA を用い，有意差が認められた場合には Tukey の多重比較検定を行った． $P < 0.05$ を統計学的に有意差ありとした．

4. 研究成果

(1) 対象の背景

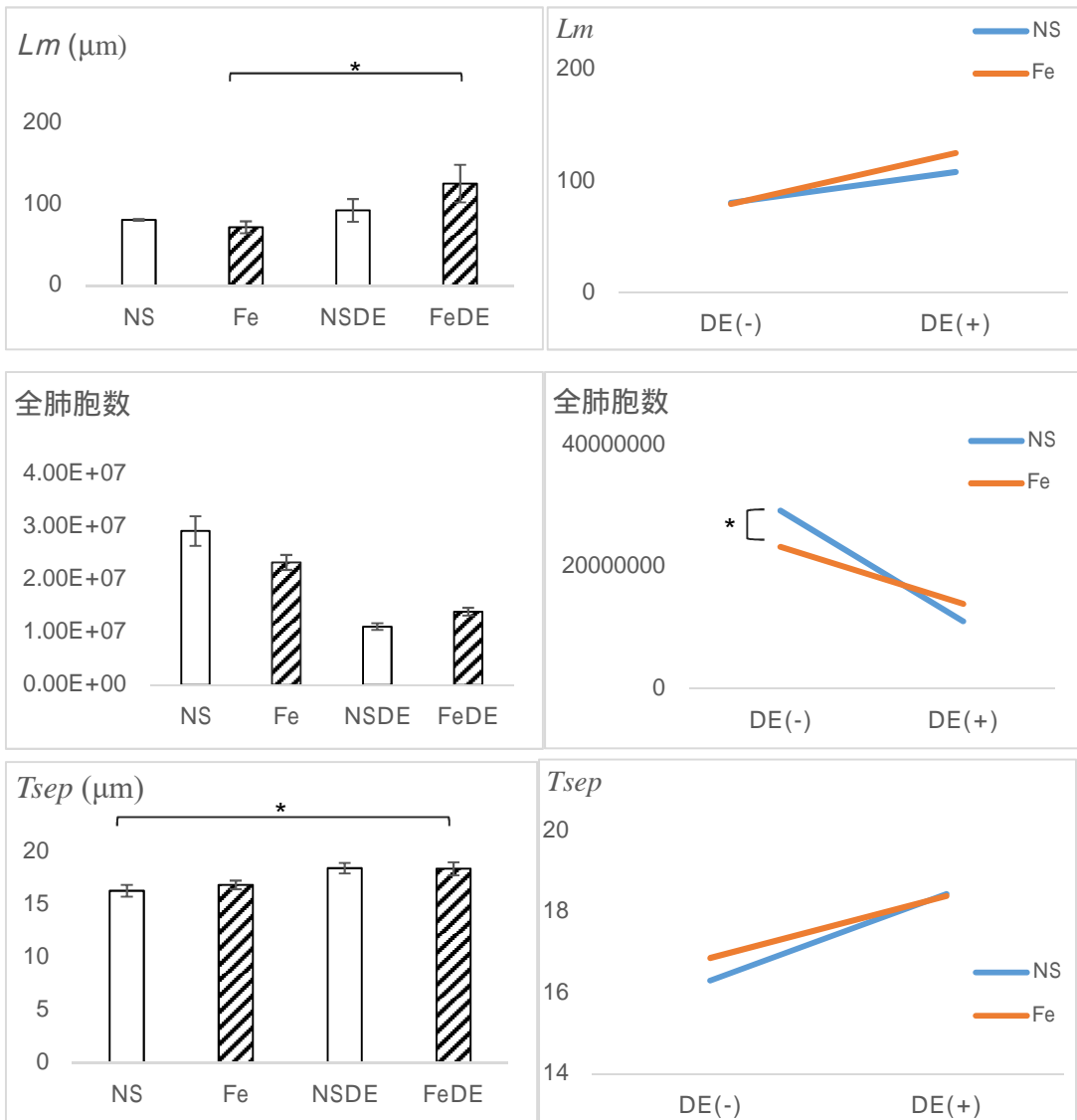
4 年間でラット仔を 37 例 (対照群(NS) 8 例，鉄群(Fe)11 例，ベタメサゾン群(DE)8 例，鉄ベタメサゾン群 (FeDE)11 例)を解析に用いた．対象の基礎データは表 1 に示した．各群における性別や肺容量の有意差は認めなかった．出生後の体重に有意差を認めコントロールや鉄群と比較してベタメサゾン投与群では体重減少が認められた．データはいずれも「平均 \pm 標準誤差」で示した．

炎症群に関しては，endotoxin の投与量の調整に時間を要し，新生仔の出生と日齢 2 までの生存は可能となった．しかし炎症を背景として出生したためか全身状態が悪く日齢 14 までの生存が困難であったため，実験の中止を余儀なくされた．



群 (例数)	NS群 (n=8)	Fe群 (n=11)	NSDE群 (n=8)	FeDE群 (n=10)	P値
雄/雌	4/4	6/5	4/4	6/4	P=0.969
肺容量 (cm ³)	2.23 ± 0.09	2.15 ± 0.06	1.99 ± 0.04	2.13 ± 0.08	P=0.142

(2) 肺モルフォメトリーの結果



Lm に関しては、ベタメサゾン(DE)が存在することで NS, Fe 共に増加することが確認された。しかし Fe と DE に関して交互作用が存在しなかった。全肺胞数では Fe と DEX に関して有意に交互作用が存在することが確認された ($P=0.0083$)。 *Tsep* に関しては NS 群に比し

て DE 投与群では厚くなっていることが確認された。しかし Fe と DE に関して交互作用が存在しなかった。

以上の結果から、出生前母胎ベタメサゾン投与によって、出生後のラット仔の肺組織は肺胞数が減少し、平均肺胞半径が拡大することが確認された。出生前母胎グルココルチコイドは出生早期の肺の成熟には寄与するが、長期的には慢性肺疾患のリスク因子となりうる結果であった。また羊水中内へ鉄を注入しベタメサゾンと共存したことで、ベタメサゾンによる肺胞数の低下が緩和されるという興味深い結果が得られたため、酸化ストレスを中心とした分子学的評価を行う予定である。

本研究は、自然分娩で出生されたのちに、人工呼吸による肺損傷や高濃度酸素暴露などの影響を考慮しない実験である。そのためそれら慢性肺疾患の増悪因子を加えることで鉄共存による酸化ストレスのさらなる増大が肺組織の形態学的変化を起こす可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤 信一
2. 発表標題 羊水腔内へ鉄注入後に出生した新生仔ラット肺の組織学的変化
3. 学会等名 第2回新生児基礎・トランスレーショナルリサーチ研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 信一
2. 発表標題 Histopathological changes of the lung tissue following intra-amniotic iron exposure in premature fetal rats
3. 学会等名 Fetal and Neonatal Physiological Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	埴田 卓志 (Hanita Takushi) (30400360)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	
研究分担者	佐藤 信一 (Shinichi Sato) (30770359)	東北大学・大学病院・助手 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	松田 直 (Matsuda Tadashi) (50361100)	東北大学・医学系研究科・非常勤講師 (11301)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協 力 者	桑名 翔大 (Kuwana Shota)		
研究 協 力 者	越浪 正太 (Kishinami Shota)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関