

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16796

研究課題名（和文）分子状水素の母獣投与による早産児の後遺症低減への取り組み

研究課題名（英文）Effect of maternal molecular hydrogen administration for fetal damage of preterm birth

研究代表者

中野 知子（Nakano-Kobayashi, Tomoko）

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90754953

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）：分子状水素の母獣投与により、炎症性早産仔の脳障害を軽減する可能性を示唆する結果を蓄積してきたが、本研究ではまず分子状水素の胎児への影響として催奇形性や発育を評価したが、明らかな有害事象は認めなかった。また胎内炎症曝露により出生した新生仔脳では、ミクログリアCD11c発現が減弱し、髄鞘形成が低下していることが分かった。さらに臨床検体での検討からも、絨毛膜羊膜炎により粗大な脳構造変化や発達指数への影響は少ない一方、淡蒼球・側坐核における脳容積の減少を認め、早産児の将来的な自閉症スペクトラム障害や統合失調症のリスク上昇との関連が示唆された。今後分子状水素のさらなる有用性を検討することが重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

早産により生まれた児の重篤な後遺症を予防する研究は、児の生命予後を改善する可能性があり、社会的意義があると思われる。本研究の結果をもとに、今後ヒトの胎児脳障害をMRIで評価することを応用し、妊婦に分子状水素を投与することの有用性を検討していくことは、今後の先制医療の開発において重要な点であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have accumulated results suggesting that maternal and veterinary administration of molecular hydrogen may reduce brain damage in pups of inflammatory preterm birth. In this study, we evaluated the fetal teratogenicity and development of molecular hydrogen and found no apparent adverse events. Furthermore, in the neonatal brains after in utero exposure to inflammation, microglial CD11c expression was found to be reduced and myelopoiesis was decreased. Clinical specimens also showed that chorioamnionitis caused a decrease in brain volume in the globus pallidus and nucleus accumbens, although gross brain structural changes and developmental index were minimal, suggesting an association with an increased risk of autism spectrum disorders and schizophrenia in preterm infants in the future.

研究分野：周産期

キーワード：早産 分子状水素 炎症 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

- (1) 先進国において、早産児の生存率が改善した反面、脳性麻痺をはじめとする長期予後不良児が生存児に占める割合は、13%から22%へと増加している[1]。とくに超早産児(妊娠28週未満で出生)の予後改善は社会的要請の高い課題のひとつとなっている。
- (2) 長期予後における神経障害や呼吸障害といった後遺症発症は、生活の質(QOL)を左右する重篤な後遺症であり、その発症リスクは母体感染に起因する胎内炎症曝露により増加することが知られている。さらに、近年その炎症に対する母体免疫活性化(Maternal immune activation; MIA)が、児の自閉症スペクトラムのような神経発達障害に伴う行動異常の一因になっているとの報告もある[2]。
- (3) 我々は、抗酸化作用や抗炎症作用を有し、すでに厚生労働省から食品添加物として認定を受けている分子状水素(H₂)に着目し、分子状水素を母獣投与することで、炎症性早産の仔の脳障害を軽減する可能性を示唆する結果を蓄積してきた[3,4,5]。また分子状水素投与が母獣炎症に起因する胎児肺障害においても軽減効果を有し[6]、妊娠期間延長効果を有する可能性を示してきた[7]。

2. 本研究の目的

本研究では、抗酸化作用と抗炎症作用を持つ分子状水素の胎児への安全性の確認を行い、炎症性早産の胎児脳障害への有用性の証明とメカニズムの解明と、臨床応用を目指すための基礎的データ取得を目的とした。

3. 研究の方法

・動物モデルでの検証

- (1) 妊娠マウス(母獣)から胎仔までの、分子状水素の安全性の確認:

催奇形性を確認する方法として、マウスの器官形成期である胎齢6.5日目から15.5日目の間のみ水素水母獣投与する群(n=41)と、通常水母獣投与群(n=32)にて、出生仔の外表奇形の有無について比較検討した。

新生仔の発育障害を確認する方法として妊娠初期から通常水または水素水長期母獣投与させ、日齢70日目までの新生仔の発育を通常水群と水素水群で比較検討した。

- (2) 母体免疫活性化モデルマウス(MIAモデル)を用いた検討:

妊娠マウスの妊娠17日目にリポポリサッカライド(LPS)を腹腔内投与する母体免疫活性化モデルマウス(MIAモデル)を用いて、胎児・新生仔脳におけるミクログリアの変化について、フローサイトメトリーを用いて検討した。またその母獣から出生した仔の日齢3および日齢8の新生仔脳からミクログリアを分離、CD11cをマーカーに用いて、発達期ミクログリアの活性化について評価した。

- (3) ヒトでの検証:

ヒトの胎盤検体で絨毛膜羊膜炎 (Chorioamnionitis : CAM) の有無で、修正在胎 40 週の新児 MRI を用いて髄鞘化スコア [8] を後方視的に比較検討した。絨毛膜羊膜炎 (Chorioamnionitis : CAM) を認めた母体から生まれた児における脳の評価するため、34 週未満の早産児における修正満期 40 週相当の新児頭部 MRI 画像を用いて、絨毛膜羊膜炎 (Chorioamnionitis : CAM) を認めた母体から生まれた児における脳の髄鞘化および粗大な脳構造変化や脳容積への影響を、Voxel-based morphometry (VBM) および Infant FreeSurfer を用いて評価した。

4. 研究の成果

(1) 妊娠マウスから胎仔までの、分子状水素の安全性の確認 :

通常水群と水素水群の両群とも明らかな外表奇形を伴う仔を認めなかった。(両群ともに奇形率 0.0%)

また出生仔の発育に関しては、出生後から日齢 17 までの通常

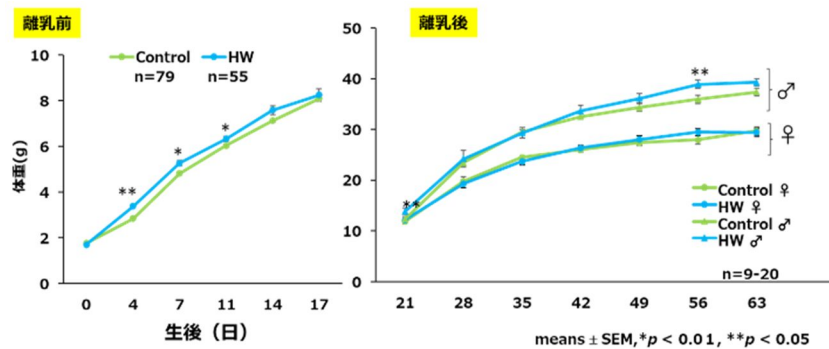


図 1: 出生後の仔の体重の比較

群 (n=79) と水素水群 (n=55) では、日齢 4、7、11 で通常水群より水素水群で有意差を持って重量が大きかった (図 1、離乳前)。また離乳後の日齢 21 からは雄雌に分けて通常水群と水素水群で比較をしたところ、雌では両群に有意な差を認めなかった。雄では日齢 21、56 では水素水群で有意差を持って重量が大きかったが (それぞれ $p = 0.025$ 、 0.033)、日齢 28、35、42、49、63、70 では両群の差を認めなかった (図 1、離乳後)。なお、通常水群と水素水群で母獣の体重変化も比較検討したが、母獣の体重変化に 2 群の間に有意差は認められなかった。以上から、水素水母獣投与において、胎仔への明らかな催奇形性や発育障害を認めないことを証明した。

(2) 母体免疫活性化モデルマウス (MIA モデル) を用いた検討 :

胎児脳障害に関する既報告では、原因の一つにミクログリアが関与していると言われている。しかし、その詳細は未だ議論の余地があり、解明がなされていない。そこで母体免疫活性化モデルマウス (MIA モデル) を用いて、胎児・新生仔脳におけるミクログリアの変化について、フローサイトメトリーを用いて検討した。妊娠 17 日目にリポポリサッカライド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

(LPS)を投与し、日齢3および日齢8の新生仔脳からミクログリアを分離、CD11cをマーカーに用いて、発達期ミクログリアの活性化について評価した。CD11c陽性率は、日齢3においてコントロール群と比較してLPS群で有意に低値であったが(図2、 $p=0.0009$)、日齢8においては有意差を認めなかった。

発達期ミクログリアは髄鞘形成に関与するといわれているため、ミエリンに発現するproteolipid protein (PLP) や myelin basic protein (MBP) を定量し、日齢8において、LPS群でPLPおよびMBPの発現が低下していることを証明した(図3、 $p=0.03, <0.01$)。以上より、出生後に必要なミクログリア活性化がLPS群で減弱し、髄鞘形成が低下していることが証明された。

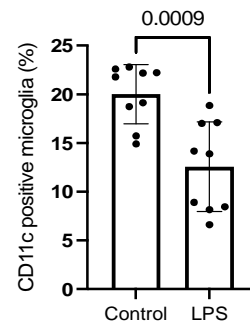


図2: CD11c陽性率

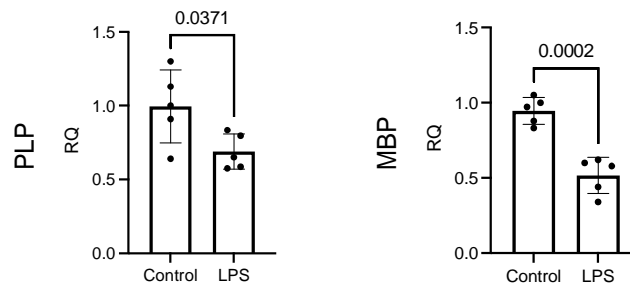


図3: PLPとMBPの発現量の比較

(3) ヒトでの検証:

ヒトの胎盤検体で絨毛膜羊膜炎(Chorioamnionitis: CAM)の有無で、修正在胎40週の新生児MRIを用いて髄鞘化スコアを後方視的に比較検討したところ、CAM(+)群にて髄鞘形成の低下を認めた(図4)。

さらに34週未満で出生した早産児を対象として、胎盤検体で病理学的に絨毛膜羊膜炎

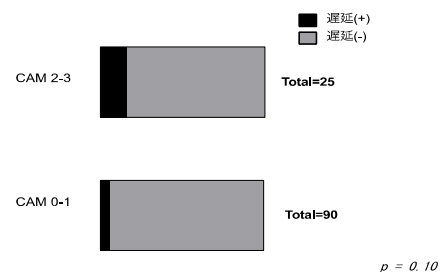


図4: 髄鞘化スコアの比較

(Chorioamnionitis: CAM)を認めた母体から生まれた早産児におけるMRIの髄鞘化スコアを後方視的に比較検討したところ、CAM(+)群にて髄鞘形成の低下を認めた。また、Voxel-based morphometry(VBM)およびInfant FreeSurferを用いてCAMによる局所脳容積の変化を評価したところ、VBMでは白質・灰白質の脳容積は2群間で有意差を認めなかった。Infant FreeSurferでは、両側淡蒼球、両側側坐核においてCAM群で有意な容積の減少を認めた。また、Kidokoro脳障害スコア(CAM:4、非CAM:4)、1.5歳発達指数(92.6 ± 10.7 vs. 90.4 ± 15.1)では2群間に有意差を認めなかった。

以上から、母体への分子状水素投与によって炎症性早産の児の脳障害を予防する可能性があり、今後はヒト脳障害をMRIで評価することと妊婦に分子状水素を投与することの有用性を検討していくことは、今後の先制医療の開発において重要な点であると考えられる。

<引用文献>

- [1] Moore T et al. Neurological and developmental outcome in extremely preterm children born in England in 1995 and 2006: the EPICure studies. *BMJ* 2012;345:e7961 doi: 10.1136/bmj.e7961
- [2] Myka L Estes et al. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders *Science*. 2016 Aug 19;353(6301):772-7. doi: 10.1126/science.aag3194.
- [3] Tomoko Nakano et al. Maternal molecular hydrogen administration on lipopolysaccharide-induced mouse fetal brain injury. *J Clin Biochem Nutr*. 2015 Nov;57(3):178-82. doi: 10.3164/jcbn.15-90. Epub 2015 Oct 21.
- [4] K. Imai et al. Neuroprotective potential of molecular hydrogen against perinatal brain injury via suppression of activated microglia. *Free Radical Biology and Medicine* 91 (2016) 154-163.
- [5] T. Ushida et al. Molecular hydrogen ameliorates several characteristics of preeclampsia in the Reduced Uterine Perfusion Pressure (RUPP) rat model. *Biology and Medicine* 101 (2016) 524-533.
- [6] Y. Hattori, et al. Maternal molecular hydrogen treatment attenuates lipopolysaccharide-induced rat fetal lung injury. *Free Radical Research* 49(8) (2015) 1026-1037.
- [7] T. Nakano, et al. Effect of molecular hydrogen on uterine inflammation during preterm labour. *Biomedical Reports* 8(5) (2018) 454-460.
- [8] H. Kidokoro, et al. New MR imaging assessment tool to define brain abnormalities in very preterm infants at term. *AJNR Am J Neuroradiol*. Nov-Dec 2013;34(11):2208-14. doi: 10.3174/ajnr.A3521. Epub 2013 Apr 25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野 知子
2. 発表標題 LPSによる炎症性早産モデルマウスに対する分子状水素の効果
3. 学会等名 第8回日本分子状水素医学生物学会大会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------