

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22659318

研究課題名（和文） 先天性横隔膜ヘルニアの重度肺低形成に対する胎児治療法の開発

研究課題名（英文） Development of fetal treatment for severe hypoplastic lung with congenital diaphragmatic hernia

研究代表者 古川 泰三

(Furukawa Taizo)

京都府立医科大学 医学研究科 助教

研究者番号：20515291

研究成果の概要（和文）：

神経ペプチドであるボンベシン(BBS)が CDH 胎仔ラット肺の成熟に効果があるかについて検証した。妊娠 Sprague-Dawley (SD)ラット(term22)に対し妊娠 9.5 日に nitrofen100mg を経鼻胃管を用いて胃内に投与した。HE 染色では CDH ラット肺で肺胞腔の狭小化、肺胞壁の肥厚が認められ、肺低形成の所見に一致した。また、肺/体重比は normal 群と CDH 群で有意差を認めた(p<0.01)。CDH 群における BBS 非投与群と BBS10 μ g 投与群では有意差を認めた(p<0.01)。また BBS10 μ g と BBS50 μ g 投与群でも有意差を認めた(p<0.01)。以上より CDH ラット肺/体重比は BBS 投与量依存性に増加することがわかった。肺成熟度を検索するために、免疫組織学的検索として PCNA(proliferation cell nuclear antigen)染色にて肺組織の増殖度を比較し、また肺の界面活性物質である surfactant 分泌を比較するために surfactant protein positive cell を検出し定量化する予定であったが、現在進行中であり、データ解析には至っていない。

研究成果の概要（英文）：

We investigated whether bombesin, which is neuropeptide, has an effect on pulmonary maturity of CDH rat. Pregnant Sprague-Dawley (SD) rat(term22) received 100mg of nitrofen into stomach through nasogastric tube on day 9.5. Lung tissues of CDH rat represented narrowing of alveolar space, hypertrophy of alveolar wall consistent with hypoplastic lung. Lung weight to body weight ratio(LW/BW) was significantly higher in normal group than in CDH group(p<0.01). LW/BW was significantly higher in CDH+BBS(10 μ g)group than CDH+BBS(-)group(p<0.01). In addition, LW/BW was significantly higher in CDH+BBS(50 μ g)group than CDH+BBS(10 μ g)group(p<0.01). Therefore, we suggested that LW/BW in CDH rat increases BBS dose-dependently. To investigate pulmonary maturity, we were going to perform PCNA staining to compare proliferation of alveolar epithelial cell and quantify surfactant protein positive cell to compare surfactant secretion which is surface-active substance of lung. However, these study is currently in progress.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	0	1,200,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：先天性横隔膜ヘルニア・ニトロフェン・ボンベシン・肺低形成

1. 研究開始当初の背景

CDH は今日の新生児外科疾患の中で未だ高い致死率を認める。近年、高頻度振動換気 (HFV) を含む新しい人工呼吸器、体外膜型人工肺 (ECMO)、サーファクタント治療、一酸化窒素 (NO) 吸入療法が CDH の治療に試みられてきたが、致死率の改善には至っていないのが現状である。故に CDH の救命にはいかに低形成肺を成熟させた状態で出生させるかという胎児治療が key factor となる。神経ペプチドであるボンベシン (BBS) は胎児肺の成熟を促進させる作用を持ち、肺の発生段階で最初に気道系で分化する上皮細胞である肺神経内分泌細胞内に高いレベルで発現していることが明らかとなっている。申請者らはこれまで BBS が小腸粘膜上皮に対し粘膜再生維持作用、粘膜固有層のリンパ組織の維持作用、虚血再還流障害時の腸管粘膜維持作用を持つことをラット異型異所性小腸移植モデルにおいて証明してきた (Furukawa T, et al; J Pediatr Surg. 2003)。BBS が胎児肺の成長促進に作用するのであれば、出生前、妊婦に BBS を投与することにより CDH 患児の胎児肺の成長を促進させ、CDH 重症例の極端な肺の低形成を軽減しうる事が十分予想される。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでラット小腸移植モデルを用いて神経ペプチドであるボンベシン (BBS) が腸管粘膜再生及び腸管粘膜免疫維持作用を持つことを証明してきた (Furukawa T, et al; J Pediatr Surg. 2003)。また BBS は腸管だけではなく胎仔肺の成長、成熟に重要な役割をすることが報告されている (Emanuel RL, et al; Am J Physiol. 1999)。BBS のこの作用に着目し、先天性横隔膜ヘルニア (CDH) における低形成肺に BBS を投与することにより肺の成熟を促し CDH の重症例の発生を予防できうるかを検討する。

3. 研究の方法

実験 1 BBS 投与における胎仔肺の成熟度の評価

動物モデルとして adult Sprague-Dawley (SD) rats を一晩交配させ、vaginal plug 陽性であった雌ラットを妊娠 0 日とする。妊娠 SD ラット (term 22days) に対し妊娠 9.5 日に 100mg nitrofen (WAKO Chemicals, Osaka, Japan) を olive oil に溶解させ全身麻酔下に

経鼻胃管を通して 1 回投与する。胎仔ラットを BBS 投与量により以下のグループに分け比較検討する。

- Group1 (control 群) nitrofen 投与なし、olive oil のみ投与
- Group2 (nitrofen(+), BBS(-))
- Group3 (nitrofen(+), BBS(+)) BBS10 μ g/kg を day0 から腹腔内投与。
- Group4 (nitrofen(+), BBS(+)) BBS20 μ g/kg を day0 から腹腔内投与
- Group5 (nitrofen(+), BBS(+)) BBS50 μ g/kg を day0 から腹腔内投与

全ての妊娠ラットに対し day21.5 に cesarean section を施行する。各グループから胎仔ラットを摘出し cesarean section 時に犠牲死させ、胎仔の体重を測定しその後肺を摘出して肺重量を測定する。

各グループにおいて採取した肺組織を以下の手法により検索する。

1) lung weight to body weight ratio (LW/BW) の比較検討による肺成熟度の評価

2) 組織学的 (形態学的) 検討評価

4%パラホルムアルデヒドにて肺組織を固定し HE 染色による形態学的評価と免疫組織染色にて cell proliferation (PCNA 染色) 及び surfactant protein-B positive cell を定量化し評価する。

3) 生化学的検討評価

肺低形成の評価するために肺組織内の DNA-to-protein ratio を測定し評価する。

DNA 定量は diphenylamine 法、protein 定量は Bradford 法によって評価する。

実験 2 BBS 投与による CDH ラット発生予防の程度及び重症度の評価

実験 1 と同様の方法で CDH 妊娠ラットを作成する。

妊娠ラットを満期 (day22) で出産させ、出生後 72 時間までの生存率を観察する。胎仔は各グループとも n=10 とする。生後 72 時間

経過した時点で newborn rat を犠牲死させる。72 時間まで生存したラットを生存例と定義する。体重測定後に開胸し CDH の発生率を検証する。その後実験 1 と同様に newborn rat の組織学的検索、生化学的検索を行い比較検討する。

1) LW/BW の比較検討による肺成熟度の評価

2) 組織学的 (形態学的) 検討評価

3) 生化学的検討評価

肺組織内の DNA-to-protein ratio の測定。DNA 定量、protein 定量。

4. 研究成果

本研究における CDH ラット発症は胎仔 136 例中、73 例であり CDH 発症率は 53.6%であった。

実験 1 BBS 投与における胎仔肺の成熟度の評価

1) lung weight to body weight ratio (LW/BW) の比較検討による肺成熟度の評価

肺/体重比は Group1 (n=14): 21.46 ± 1.59 mg、CDH 群: Group2 (n=37): 15.45 ± 2.71 mg であり有意差を認めた ($p < 0.01$) (図 1)。CDH 群における BBS 投与は妊娠 0 日より腹腔内投与を開始し、BBS 投与量を 10, 20, 50 μ g/kg/day に分けて評価した。その結果、肺/体重比は Group3, BBS10 μ g (n=17): 16.48 ± 2.62 mg Group4, BBS20 μ g (n=4): 18.52 ± 6.61 mg Group5, BBS50 μ g (n=8): 21.34 ± 4.0 mg

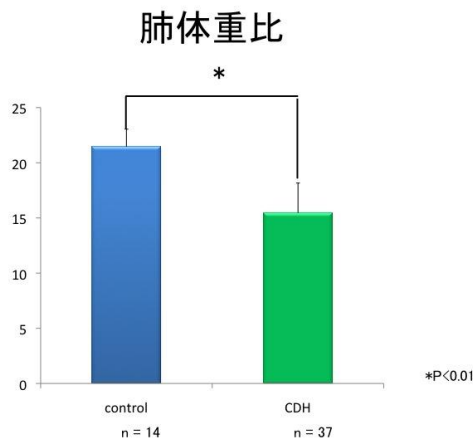


図 1

肺体重比

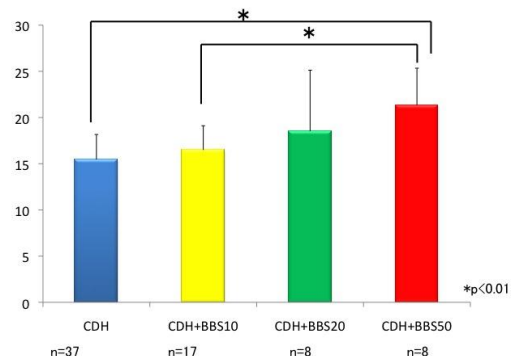


図 2

となった。BBS 非投与群と BBS50 μ g 投与群では有意差を認めた ($p < 0.01$)。また BBS10 μ g と BBS50 μ g 投与群でも有意差を認めた ($p < 0.01$) (図 2)。

以上より CDH ラット肺重量は BBS 投与量依存性に増加することがわかった。

2) 組織学的 (形態学的) 検討評価

HE 染色では CDH ラット肺で肺胞腔の狭小化、肺胞壁の肥厚が認められ、肺低形成の所見に一致した。肺成熟度を検索するために、免疫組織学的検索として PCNA (proliferation cell nuclear antigen) 染色にて肺組織の増殖度を比較し、また肺の界面活性物質である surfactant 分泌を比較するために surfactant protein positive cell を検出し定量化する予定であったが、現在進行中であり、データ解析には至っていない。

実験 2 BBS 投与による CDH ラット発生予防の程度及び重症度の評価

実験 1 と同様の方法で CDH ラットを作成したが、出生後 72 時間まで生存したことはなく、生直後に死亡した。したがって、実験 2 はデータ解析に至っていないが、今後の課題として、生存例を出産後 24 時間と短縮させるか、出産してからの生存時間を比較検討するべきであると考えられた。

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 Kimura O, Furukawa T, Higuchi K, Impact of our new protocol on the outcome of the neonates with congenital

diaphragmatic hernia
Pediatric surgery international, 査読
有、29 卷、2013、335-339

[学会発表] (計 1 件)

① Kimura O, Furukawa T

Impact of our new protocol on the outcome
of the neonates with congenital
diaphragmatic hernia
23rd Congress of the asian association of
pediatric surgeons
Oct 9, 2012, Seoul, Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 泰三 (Furukawa Taizo)
京都府立医科大学・医学研究科 助教
研究者番号：20515291

(2) 研究分担者

木村 修 (Kimura Osamu)
京都府立医科大学・医学研究科 准教授
研究者番号：10315963