

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591593

研究課題名(和文)びまん性絨毛膜羊膜へモジデロシスが胎児肺の成長発達に与える影響の解明

研究課題名(英文)The effect of diffuse chorioamniotic hemosiderosis on fetal lung development

研究代表者

渡邊 達也 (Watanabe, Tatsuya)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠中期に合併するびまん性絨毛膜羊膜へモジデロシス(DCH)が胎児肺の成長発達に与える影響をその実験モデルラットを用いて解析した。先ず、妊娠ラットの羊水に鉄を溶解させることによってDCHの実験モデルを確立することができた。次いで、羊水腔内で鉄に暴露させられたラット胎児肺に肺胞化の停滞、すなわちびまん性気腫性変化が誘導され、この変化が成獣期まで持続することを確認した。以上より、DCHは早産児に最重症の慢性肺疾患を誘導する危険性があり、その病態解明と予防法の開発が待たれる。

研究成果の概要(英文)：We studied the effect of diffuse chorioamniotic hemosiderosis (DCH) on fetal lung development using an experimental DCH model in the second trimester of pregnant rats. At first, we established the animal experimental model of DCH, infused iron dextran into the amniotic cavity of pregnant rats. Next, we confirmed that intra-amniotic iron exposure could induce emphysematous injuries in fetal lung, i.e., arrest of alveolarization, which changes had remain until the adult period. Based on the above results, DCH would be important as a risk factor for serious chronic lung disease and expected further researches for clarifying its pathophysiology and preventive measures.

研究分野：周産期医学

キーワード：びまん性絨毛膜羊膜へモジデロシス 新生児慢性肺疾患 胎児肺発育 鉄

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、極低出生体重児の救命率上昇にともないその発生率が増加している。幼児学童期の呼吸器合併症や発達障害と関連することや、最重症例では肺性心による乳児期死亡を来すため、その発症機構の解明と予防法の開発は重要な課題となっている。

CLD の出生前リスク因子として子宮内炎症や子宮内発育遅延などが知られているが、近年胎盤胎児面のヘモジデリン沈着と貪食細胞浸潤を特徴とするびまん性絨毛膜羊膜ヘモジデロシス (diffuse chorioamniotic hemosiderosis, 以下 DCH) が新たな出生前リスク因子として注目されている。DCH を合併した早産児の CLD (以下 CLD/DCH) は重症の経過をとることが多く、蘇生時にしばしば気管内から血性分泌液が吸引されることから、CLD/DCH の発症メカニズムとして羊水腔内に滲出した母体の赤血球成分が胎児肺損傷を起こす可能性が指摘されている。我々は肺損傷の原因として赤血球中の鉄に注目した。褐色の血性羊水には鉄が含まれており、これが胎児絨毛膜板に沈着するとともに、羊水から胎児気道の肺液に拡散して肺胞腔に到達し肺損傷を起こす可能性があり、また鉄は末梢気道において酸化ストレスを増大させ炎症を惹起するため、急性肺損傷の重大な増悪因子であることが明らかにされているからである。

我々は本研究前に以下の予備実験を行った。妊娠21日 WKAH/Hkm ラット羊水腔内に鉄を投与後24時間で胎盤胎児面に鉄染色陽性顆粒を観察し、モルフォメトリー解析により胎児肺損傷を確認した。一方、胎児末梢気道肺組織に好中球集積像は観察されなかった。また、母獣を開腹し羊水腔内に鉄を注入、閉腹した後自然分娩させたところ、カニバリズムが観察された。

2. 研究の目的

- (1) 羊水腔内鉄投与による胎児期肺損傷の出生後変化を解析するための実験系を確立すること。
- (2) 胎児肺損傷と局所急性炎症について再検討すること。
- (3) 羊水腔内鉄投与による胎児期肺損傷の出生後変化について組織学的に解析すること。

3. 研究の方法

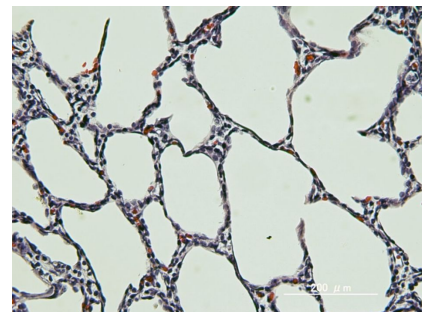
- (1) 妊娠 21 日 (満期 22.5 日) の WKAH/Hkm ラットと SD ラットを開腹し、胎児羊水腔内にデキストラン鉄 0.05mL (10 mg) を注入したのちに閉腹した。その後自然分娩させ、母ラットが新生仔を哺育可能か観察した。
- (2) 妊娠 21 日 (満期 22.5 日) の WKAH/Hkm ラットを開腹し、胎児羊水腔内にデキストラン鉄 0.05mL (10 mg) ないし同量の生理食塩水を注入したのちに閉腹した。12 時間後に胎児胎盤ならびに肺を取り出し病理学的検索 (ヘマトキシリンエオジン染色、ベルリンブルー染色) に供した。また、あわせてモルフォメトリー解析も行った。
- (3) 妊娠 21 日 (満期 22.5 日) の SD ラットを開腹し、胎児羊水腔内にデキストラン鉄 0.05mL (10mg) ないし同量の生理食塩水を注入したのちに閉腹した。自然分娩後母ラットに哺育させ、生後 3 週齢で離乳した。生後 10 日、2 カ月のラット肺を取り出し病理学的検索 (ヘマトキシリンエオジン染色) に供した。また、あわせてモルフォメトリー解析を行った。
- (4) 2 群間の統計学的比較には、連続量では Mann-Whitney U 検定を、離散量ではフィッシャーの正確確率検定を用いた。p<0.05 を統計学的に有意差ありとした。また、すべてのデータは平均±標準誤差で示した。

4. 研究成果

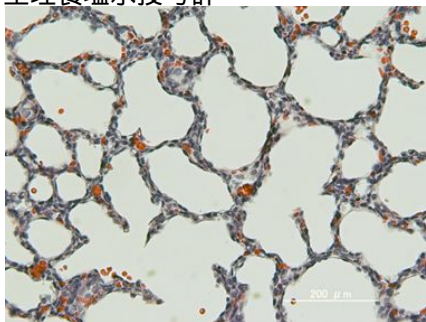
- (1) 母獣ラットの分娩育仔成功率は、WKAH/Hkm ラットで 13% (8 例中 1 例)、SD ラットで 75% (8 例中 6 例) であったため、新生仔ラット肺の解析には SD ラットが適していると判断した。以上から、妊娠 SD ラットを用いた実験系を用いて、羊水腔内鉄投与後新生仔ラット肺の病理学的解析を行った。

- (2) 羊水腔内鉄、生理食塩水投与 12 時間後胎児肺組織

胎児肺病理組織像
鉄投与群



生理食塩水投与群



いずれも胎仔末梢気道に好中球の集積は観察されなかった。また、鉄投与群の5例中4例で末梢気道細胞内ないし間質に鉄染色陽性顆粒が観察されたが、生理食塩水投与群では観察されなかった (p=0.048)。

モルフォメトリー解析

	Fe 群 (n=5)	NS 群 (n=5)	p 値
Sv (/cm)	221 ± 11	251 ± 6	0.016
Nv (/mm ³)	230 ± 33	408 ± 43	0.008
r (μm)	90.5 ± 6.1	70.9 ± 2.7	0.008

- ・単位容積あたりの肺胞壁面積を以下 Sv と略す。
- ・単位容積あたりの肺胞数を以下 Nv と略す。
- ・平均肺胞半径を以下 r と略す。

羊水腔内鉄投与により、胎仔肺において Sv が小さく、Nv が少なく、r が大きい「fewer and larger alveoli」の組織学的変化が出生前に起こりうることを示された。一方で、投与12時間後の胎仔肺においても好中球の集積が観察されなかったことから、今回示された胎仔肺損傷の原因が急性炎症以外のメカニズムである可能性も示唆された。今回の結果は、CLD/DCH における CLD リスク因子の原因が胎仔肺への血性羊水中の鉄である可能性があること、また CLD の病態である肺の発育障害が出生前から起こっていることを示したはじめての報告である。

胎仔胎盤病理

胎盤胎児面で鉄染色陽性顆粒は、鉄投与群の4/4例、生理食塩水投与群の1/5例で観察された (p=0.048)。今回の実験系は DCH モデルであるといえる。

(3) 胎仔期肺損傷の出生後変化の解析 生後10日

	Fe 群 (n=6)	NS 群 (n=7)	p 値
Sv (/cm)	329 ± 7	374 ± 8	0.005
Nv (/mm ³)	652 ± 51	1341 ± 99	0.001
r (μm)	64.2 ± 2.3	47.5 ± 1.2	0.001

生後10日では、出生前の肺組織変化「fewer and larger alveoli」は、成長とともに改善しなかった。

生後2ヵ月

	Fe 群 (n=4)	NS 群 (n=4)	p 値
Sv (/cm)	289 ± 26	400 ± 19	0.029
Nv (/mm ³)	358 ± 113	1150 ± 214	0.029
r (μm)	87.0 ± 9.2	54.0 ± 3.2	0.029

生後2ヵ月では、出生前の肺組織変化「fewer and larger alveoli」は、成長とともに改善しなかった。

今回の実験系は、出生前に誘導された羊水腔内鉄暴露による胎仔肺損傷が、出生後の成長とともにキャッチアップしないことを示した CLD/DCH モデルであるといえる。今後は CLD/DCH モデルを使用して出生前後のストロイド投与をはじめとする薬剤投与や酸素投与などが、胎仔期肺損傷やその後の新生仔肺成長に与える影響を解析することが可能となる。また、胎仔肺損傷の発症機構の解明と予防法の開発をすすめることも可能となる。

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 6 件)

Kitanishi R, Matsuda T, Watanabe S, Saito M, Hanita T, Watanabe T, Kobayashi Y, Cerebral ischemia or intrauterine inflammation promotes differential of oligodendroglial precursors in preterm ovine fetuses: possible cellular basis for white matter injury, Tohoku J Exp Med, 査読有, vol.234, 2014, pp299-307, <http://dx.doi.org/10.1620/tjem.234.999>

松田直, 加賀麻衣子, 臼田治夫, 伊藤智子, 渡邊真平, 小野寺幸子, 新関昌枝, 秋山志津子, 北西龍太, 渡邊達也, 内分泌機能に大きく依存する新生児の循環調節 バゾプレッシンの循環器系に及ぼす影響, 日本周産期新生児医学会雑誌, 査読無, 49 巻, 2013 年, pp165-67

Kaga M, Matsuda T, Watanabe T, Onodera S, Watanabe S, Usuda H, Ito S, Renal vasodilatory action of arginine vasopressin in extremely low birth weight infants, Tohoku J Exp Med, 査読有, vol. 231, 2013, pp159-64,

<http://dx.doi.org/10.1620/tjem.231.159>

渡邊達也, 臍動・静脈カテーテル留置, 周産期医学, 査読無, 42 巻, 2012 年, pp1549-52

新田恩, 松田直, 井上若葉, 荒井那津子, 渡邊真平, 秋山志津子, 北西龍太, 渡邊達也, 田澤星一, 柿崎周平, 胎児期に心房粗動と診断され早期娩出した低出生体重児の 1 例, 周産期医学, 査読有, 41 巻, 2011 年, pp1222-25

加賀麻衣子, 松田直, 渡邊達也, 小野寺幸子, 渡邊真平, 臼田治夫, 八重樫伸生, 臍帯炎, 産科と婦人科, 査読無, 78 巻, 2011 年, pp720-726

〔学会発表〕(計 4 件)

渡邊達也, 松田直, 高橋立子, 山田雅明, 齊藤潤子, 奈良千恵子, 上埜高志 生育限界児の就学前における発達予後の特徴, 第 59 回日本未熟児新生児学会, 2014 年 11 月 10-12 日, ひめぎんホール (愛媛県松山市)

渡邊達也, 松田直, 名和達郎, 小野寿和, 臼田治夫, 新関昌枝, 秋山志津子, 北西龍太, 埴田卓志, ラット羊水内に鉄を投与することにより胎仔肺発育が遅延する, 第 58 回日本未熟児新生児学会, 2013 年 11 月 30 日-12 月 2 日, 石川県立音楽堂 (石川県金沢市)

Watanabe T, Matsuda T, Hanita T, Miura Y, Kitanishi R, Kure S. Induction of an arrest of alveolarization by intra-amniotic iron exposure in fetal rat, FAOPS and PSANZ Sydney 2012, 18-21 March 2012, Sydney (Australia)

渡邊達也, モバイルアンサーシンポジウム 2 「超低出生体重児の治療選択」新生児慢性肺疾患, 第 47 回日本周産期・新生児医学会, 2011 年 7 月 10-12 日, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

〔図書〕(計 1 件)

渡邊達也 他, 医学書院, 今日の治療指針 2011 版, 新生児の慢性肺疾患, 2011 年, pp1146-1147

〔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:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 達也 (WATANABE, Tatsuya)
東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師
研究者番号: 70400380

(2) 研究分担者

松田 直 (MATSUDA, Tadashi)
東北大学・大学病院・准教授
研究者番号: 50361100

(3) 連携研究者

なし