

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791114

研究課題名(和文) マウス胎仔の心エコー検査による胎児プログラミングの実証的研究

研究課題名(英文) Experiments for fetal programming by embryonic ultrasound cardiography of mice

研究代表者

青柳 良倫 (Aoyagi, Yoshimichi)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：30509469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円、(間接経費) 540,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠初期のマウスに薬物負荷などのストレスを与え、胎仔のエコー検査を行うことにより胎仔の心行動態の変化を検討した。妊娠マウスにニコチン0.2mg/kgを皮下注射することにより、注射15～30分後の母胎の心拍数、駆出率、心拍出量は増加する傾向を認めた。一方胎仔の臓器血流においては、ニコチン投与後15～30分後には生理食塩水を皮下注射したコントロール群と比較して頸動脈血流が有意に減少し、背側大動脈及び臍帯動脈の血流も減少する傾向を認めた。急性期におけるこの循環調節は血流再分配の概念につながる反応であり、胎仔の発育低下や出生後の発育障害などの胎児プログラミングに影響する可能性が高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：I gave mice in early pregnancy stress such as the drug load and examined an embryonic heart hemodynamic change by performing embryonic ultrasound cardiography. Heart rate, fractional shortening, and cardiac output tended to increase by subcutaneous injecting 0.2 mg/kg of nicotine to a pregnant mice 15-30 minutes after the injection. On the other hand in embryos, carotid artery flow significantly decreased after nicotine injection in comparison with the control group that injected normal saline, and dorsal aorta and umbilical artery flows tended to decrease 15-30 minutes after the injection. This circulation adjustment is a reaction to lead to the blood flow redistribution, and is considered to influence the fetal programming such as an embryonic growth retardation or postnatal developmental disorders.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：胎児プログラミング 血流再分配

1. 研究開始当初の背景

(1) 胎児プログラミングとは、胎児が発達分化の重要な時期にストレスや侵襲に曝され、生理的あるいは代謝的プロセスが永続的に変化することをいう。近年の疫学的研究から低栄養の母胎から出生した児は、成人後に心疾患や高血圧、耐糖能異常などのいわゆる生活習慣病を高率に発症することが判明している。すなわち低栄養などの過酷な子宮内環境に適応する過程で血流再配分などの循環調節、各種臓器の発育抑制、糖・アミノ酸代謝などのエネルギー代謝調節や、コルチゾールやインスリンなどの内分泌調節が起こり、それらを介してエネルギー節約型に適応していくと考えられている。子宮内におけるこの適応は遺伝子発現の調節として行われるため、出生後もこのエネルギー節約型は持続し、出生後の好転した胎外環境にはむしろ過適応となってしまうと考えられている。これに加えて出生後にエネルギー過剰摂取や運動不足などの環境負荷が加わると、肥満や耐糖能異常、心疾患や高血圧などの生活習慣病が発症するものと考えられている。

(2) 胎児プログラミングにおける高感受期は妊娠初期とされ、この時期は原始心筒と呼ばれる1本の管状構造物から心臓が形成されて胎児循環が開始される時期にあっている。すなわち血流再配分を含めた循環調節が胎児プログラミングに重要な影響を及ぼす物と推測されているが、これまでの多くの研究は疫学的な研究や遺伝子発現の研究が主であり、妊娠初期の胎児が起こしている循環調節について検討した研究はない。この時期の胎児循環に関しては、これまで鶏胚や母胎外に摘出した胎仔心臓を用いて調べられてきたが、体内環境のように子宮胎盤循環も含めて考える必要がある際には、母胎内での低侵襲な研究が必須と考えられる。

2. 研究の目的

本研究は妊娠初期のマウスに低栄養や薬物負荷などのストレスを与え、胎仔の心エコー検査を行うことにより胎仔の心臓発生や胎盤循環を含めた心行動態を評価し、胎児プログラミングの初期段階をとらえることにより、出生後の健康に影響を及ぼす胎児管理の重要性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

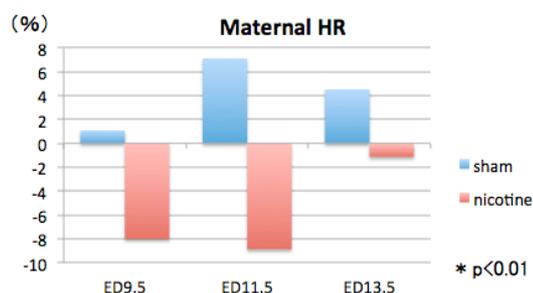
(1) CD-1 マウス雌雄の交配により得られた妊娠マウスに対して薬物負荷などのストレスを与えた群と与えなかった群の2群において、胎仔の心行動態・血流再配分について比較検討した。心行動態を観察する在胎日齢 (embryonic day : ED) は、心ループ形成が開始される ED9.5 と、心構造が完成する ED13.5、およびその中間で、心臓に中隔形成が起こる ED11.5 の3日間とした。今回負荷する薬物と

してニコチンを選択し、ニコチン投与が母胎マウスの心機能及び胎仔の心行動態に及ぼす急性期の反応について検討した。エコー検査は、イソフルレンを用いた全身麻酔下に施行した。

(2) 妊娠マウスにニコチンを皮下注射し、注射前と注射後15分から30分後にかけての母胎の心機能及び胎仔の背側大動脈 (dorsal aorta : DA)、頸動脈 (carotid artery : CA)、臍帯動脈 (umbilical artery : UA) の血流の変化をエコー検査にて計測した。今回、母胎の心機能の指標としては心拍数 (HR : heart rate)、駆出率 (FS : fractional shortening 左室内径短縮率) を用い、心拍出量の指標としては血管径の計測が困難なため、血管径は一定と仮定した上で、 $VTI \times HR$ (VTI : velocity-time integral 速度時間積分値) を心拍出量の指標として用いた。

4. 研究成果

(1) 初めに妊娠マウスにニコチン 0.5mg/kg を皮下注射した場合の血中濃度を HPLC 法で測定したところ、結果は 59.4 ± 18.9 ng/ml (5分後)、 96.7 ± 20.6 ng/ml (15分後)、 61.4 ± 9.9 ng/ml (30分後)、 18.6 ± 12.1 ng/ml (60分後) であった。そこで、CD-1 マウスの交配により得られた ED9.5 と ED11.5、ED13.5 の妊娠マウスに対して、ニコチン 0.5mg/kg を皮下注射し、注射前と注射後15分から30分後にかけての母胎の心機能および仔マウスの背側大動脈、頸動脈、臍帯動脈および子宮動脈の血流の変化をそれぞれエコー検査法により計測した。コントロール群として生食を同様に皮下注射した妊娠マウスに対してエコー検査を施行した。その結果、まず母胎の心機能において、コントロール群では心拍数、駆出率、心拍出量はともに増加する傾向を認めたが、ニコチン投与群では母胎の心拍数は減少する傾向を認め、駆出率や心拍出量には一定の傾向が認められなかった。胎仔の臓器血流においては、コントロール群では背側大動脈、頸動脈、臍帯動脈ともに血流は概ね増加する傾向を認めたが、一方ニコチン投与群では、頸動脈の血流が減少する傾向を認めたが、背側大動脈や臍帯動脈には一定の傾向は認められなかった。



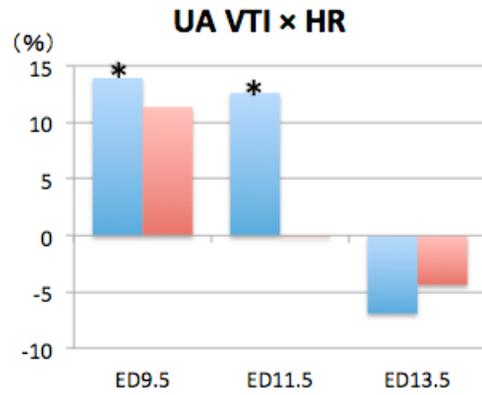
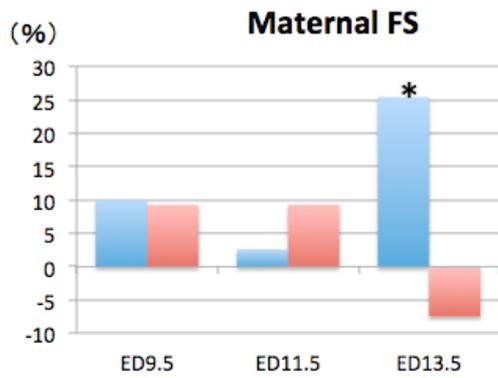


図 100%酸素麻醉下での胎仔の臓器血流

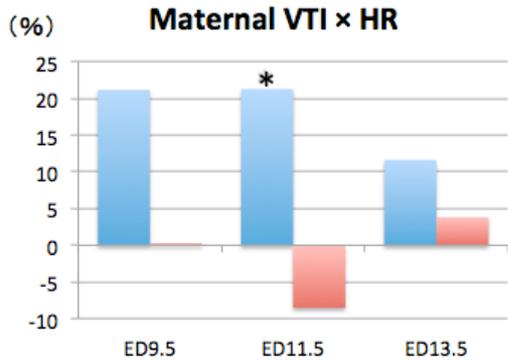
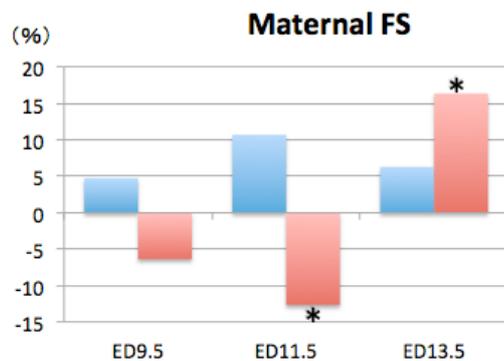
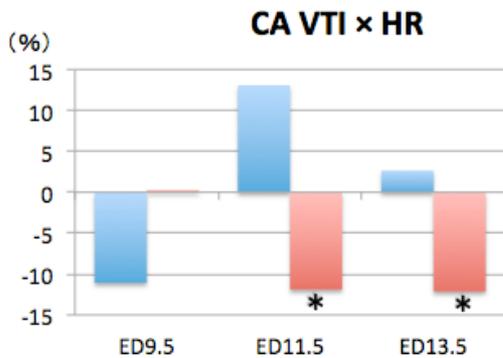
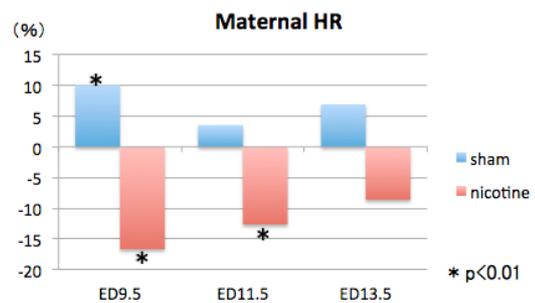
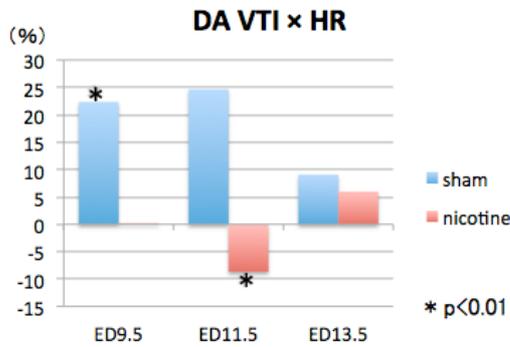


図 100%酸素麻醉下での母胎の心機能

(2) 上記の実験は、100%酸素投与下の全身麻醉下に施行したが、通常の喫煙時には酸素吸入はしないため、インフルレン麻醉器に窒素ガスを接続し、吸入酸素濃度を 21%に調節した上で、同様の実験を行った。その結果、母胎の心機能において、コントロール群では心拍数、駆出率、心拍出量ともに増加する傾向を認めたが、一方ニコチン投与群においては、心拍数は減少する傾向があるが、駆出率や心拍出量には一定の傾向は認められなかった。胎仔の臓器血流においては、コントロール群では背側大動脈の血流が増加する傾向がみられたが、頸動脈や臍帯動脈には一定の傾向は認められなかった。一方ニコチン投与群では頸動脈の血流が有意に減少し、背側大動脈や臍帯動脈の血流も減少する傾向を認めた。



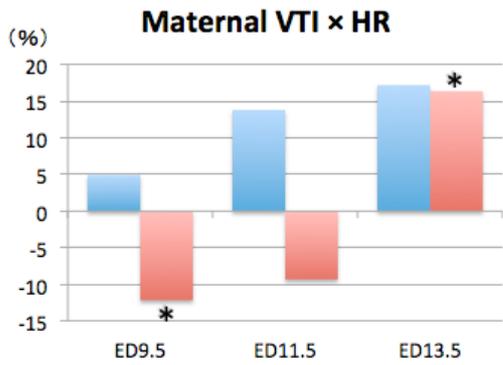


図 酸素濃度 21%麻酔下での母胎の心機能

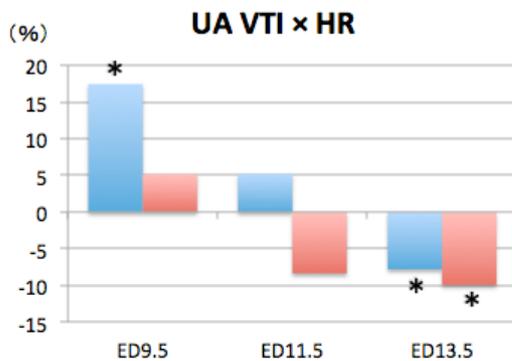
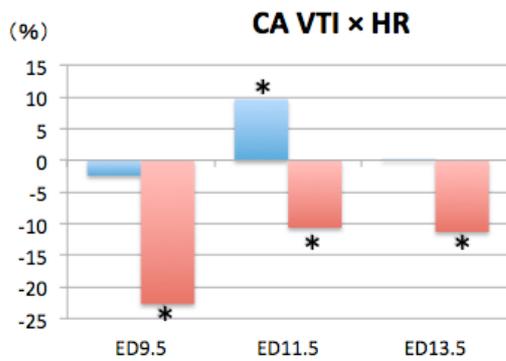
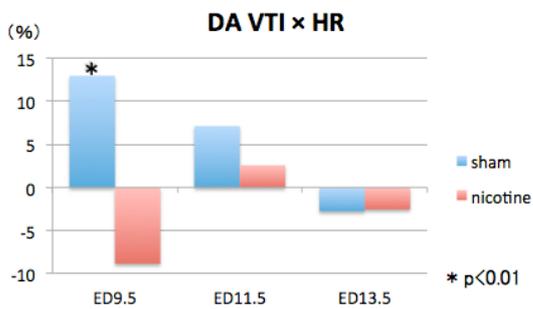
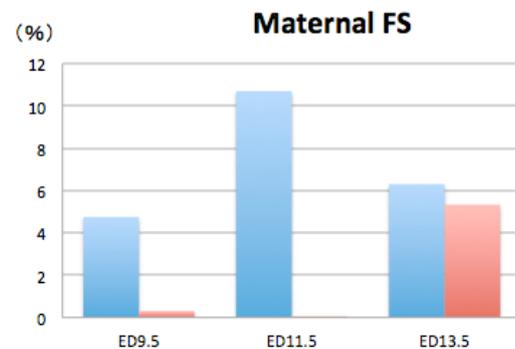
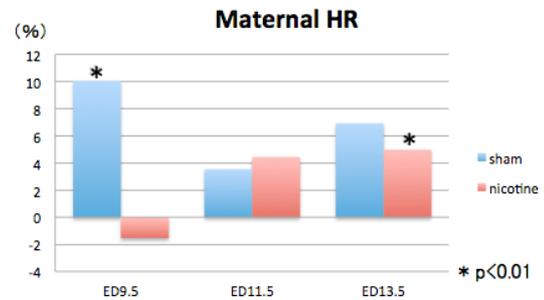


図 酸素濃度 21%麻酔下での胎仔の臓器血流

(3)上記の 2 つの実験の結果、妊娠マウスにニコチンを投与した場合、投与後 15~30 分後において胎仔の背側大動脈や頸動脈、臍帯動脈の各種血流量が減少している可能性が示唆された。しかし、この場合妊娠マウスの心拍数や駆出率、心拍出量も大きく変動していたため、母胎の循環変動そのものが胎仔の臓器血流の変化(血流再分配)に影響を与えた可能性が高いと考えられた。

(4)そのため次に、妊娠マウスへのニコチン投与量を 0.2mg/kg に減量して同様の実験を施行した。この場合の母胎のニコチン血中濃度を同様に HPLC 法で測定したところ、皮下注射後 5~30 分後において、ニコチン血中濃度は 15~30ng/ml であり、これは人間が喫煙した場合の血中ニコチン濃度に近似した値であった。結果としてまず母胎の心機能においてはコントロール群およびニコチン投与群ともに心拍数、駆出率、心拍出量が増加する傾向を認めた。このためこのニコチン投与量は母胎の血行動態には影響を与えない至適なニコチン投与量と考えられた。一方胎仔の臓器血流においては頸動脈の血流が有意に減少し、背側大動脈や臍帯動脈の血流もそれぞれ減少する傾向を認めた。



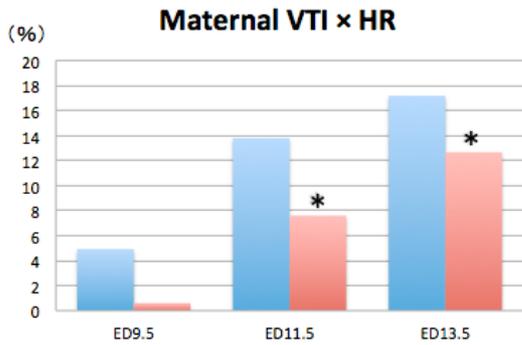


図 酸素濃度 21%麻酔下の母胎の心機能

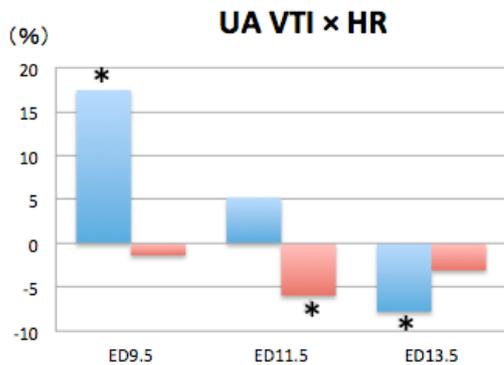
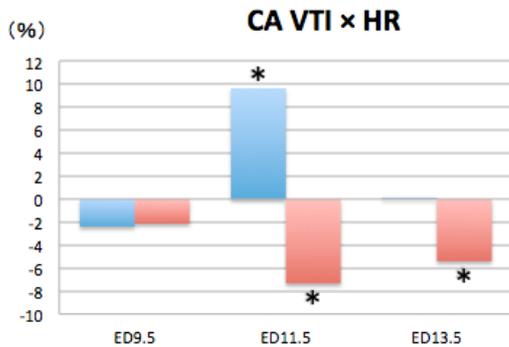
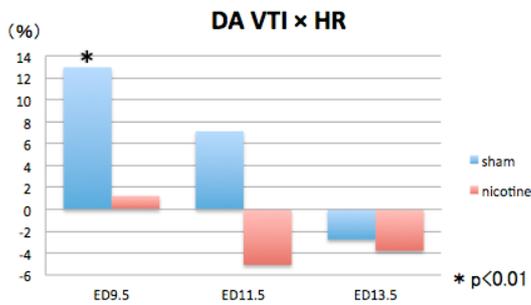


図 酸素濃度 21%麻酔下の胎仔の臓器血流

(5)ニコチンの心血管系への作用としては、交感神経節の興奮によるノルアドレナリンの遊離と、副腎からのアドレナリンの放出による血圧の上昇があり、さらに大動脈体および頸動脈小体の化学受容器活性化にも作用し、血管収縮、頻脈作用をもたらすとされる。一般に人間の場合、妊娠中のニコチン摂取は血管収縮作用により子宮・胎盤血流量の低下、絨毛間血流量の減少を起し、胎児への酸素吸入が減少することにより胎児の発育低下をもたらすとされている。今回の研究により、妊娠マウスに対するニコチン投与が胎仔の各種臓器の血流を低下させる可能性が示唆された。この循環調節は血流再分配につながる生体反応であり、胎仔の発育低下や出生後の発育障害などの胎児プログラミングに影響する可能性が高いと考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青柳 良倫 (Aoyagi, Yoshimichi)

福島県立医科大学 小児科学講座 助手

研究者番号: 30509469

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: