

## 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：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791697

研究課題名(和文) 周産期脳障害の病態解明と新規治療戦略 ～分子状水素に着目して～

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy for perinatal brain damage using molecular hydrogen

## 研究代表者

眞野 由紀雄 (Mano, Yukio)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30437024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠ラットの子宮動脈を一過性に虚血・再灌流することにより、酸化ストレスに起因する胎児脳障害を引き起こすモデルを使用した。この虚血再灌流モデルにおいて、水素分子を飽和させた水素飽和水を経母獣的に自由飲水させると、新生仔発育が回復し、また新生仔海馬神経細胞の変性も抑制された。また、8週齢まで飼育後に、行動実験を行ったところ、参照記憶の改善を認めた。この機序としては、母獣への水素飽和水投与により、胎児および胎盤中でも水素濃度が上昇することが確認され、胎児脳および胎盤において酸化ストレスマーカーの抑制を認めており、分子状水素の抗酸化作用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of H<sub>2</sub> on oxidative stress-based fetal brain damage. We used an intrauterine ischemia-reperfusion rat model, which fetal brain damage is induced by the transient occlusion of the bilateral utero-ovarian arteries. Neonatal growth retardation was alleviated and the degeneration of fetal hippocampal neuronal cells was ameliorated by maternal H<sub>2</sub> administration. Lastly, 8-week-old rats were subjected to a behavioral test. Maternal H<sub>2</sub> administration improved the reference memory of the offspring. The hydrogen concentration was increased in the placenta and fetus after H<sub>2</sub> administration to the mother, and the markers of oxidative stress were decreased in placenta and fetal brain. These results suggest that H<sub>2</sub> exerts an anti-oxidative effect on the feto-maternal unit.

研究分野：産婦人科学

キーワード：胎児脳障害 酸化ストレス 分子状水素

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 周産期医療の進歩により、周産期死亡率は著明な減少を果たしてきた。それにもかかわらず、残念ながら周産期脳障害の発生頻度はほとんど変化していない。つまり、周産期医療の次の課題は、児の生命予後の改善に続き、機能予後の改善である。脳障害児の介護が家族にもたらす精神的、経済的負担は重大であり、少子化時代である現在において社会的にも早急に解決が求められている。

(2) 近年、分子状水素のラジカル・スカベンジャーとしての有用性が注目されており、脳梗塞モデル動物や新生仔脳障害モデル動物など *in vivo* と *in vitro* の両方で、優れた脳保護効果および抗酸化効果が報告されている。これまでの抗酸化剤との主な相違点は、分子状水素は障害性の強い活性酸素種であるヒドロキシラジカルのみを選択的に除去すること、また低分子であるため、容易に自由拡散し細胞質だけでなく核内へも移行する点である。

(3) これまで、周産期脳障害の機序としては、子宮内感染などに伴う炎症性サイトカインや、虚血・低酸素による酸化ストレス(フリーラジカル、活性酸素種)の関与が報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、未だ有効な予防法も治療法も確立されていない周産期脳障害に対する新たな治療法の確立を目指し、成人脳梗塞動物モデルで画期的な治療効果を認めた分子状水素に着目し、これを経母体的投与することにより新生児の脳障害の発症への予防的、治療的效果を検証していく。本研究の目的は、以下の2点に要約される。

(1) 酸化ストレスに起因する周産期脳障害の動物モデルを作成し、経母体的分子状水素投与の治療効果について検討する。

(2) 周産期脳障害の動物モデルを用い、その病態を分子生物学的に解明する。

### 3. 研究の方法

(1) 虚血後の再灌流が酸化ストレスを引き起こすことは広く知られている。本研究では、妊娠ラットの子宮動脈を鉗子にて遮断し一過性に虚血状態とし、その後遮断を解除し再灌流することにより、酸化ストレスに起因する胎仔脳障害を引き起こす妊娠ラット子宮動脈虚血・再灌流モデルを使用した。分子状水素は、飲用水に水素ガスを溶存させた水素水を用いた。開腹のみの偽手術群(コントロール群)、虚血・再灌流群、および虚血・再灌流前から分娩まで水素水を自由飲水させた水素水投与群の3群で比較検討した。手

術は妊娠16.5日に行い、虚血時間は30分間とした。水素水投与は、妊娠14.5日から分娩まで行った。

(2) 水素水は、その濃度を保つため2重のボール・ペアリング栓の付いたガラス給水瓶にて投与し、24時間毎に交換した。コントロール群および虚血・再灌流群には通常の飲用水を与えた。

### 4. 研究成果

(1) この3群を自然分娩させ日齢7日まで体重を測定したところ、コントロール群と比較し、虚血・再灌流群では新生仔の体重に有意な発育遅延を認めた。水素水投与群では、虚血・再灌流群と比べ新生仔体重増加の有意な改善を認め、コントロール群と同様であった(図1)。流産率および新生仔死亡率は3群間で変化は認めなかった。

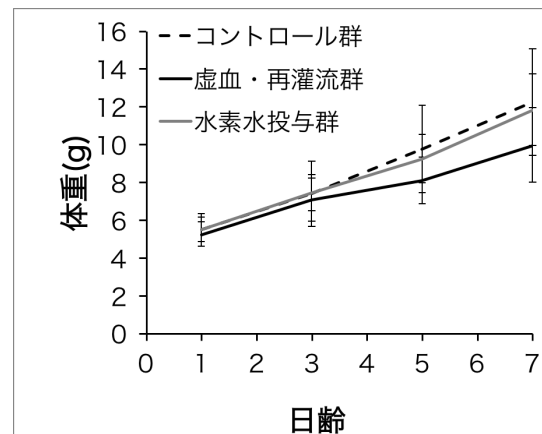


図1. 虚血・再灌流後の新生仔発育

(2) 胎盤及び日齢7日目の新生仔脳についてホルマリン固定切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色にて組織学的、細胞学的に子宮内の虚血・再灌流による変化および水素水投与群の改善の程度を検討した。新生仔脳の評価としては、核濃染(ピクノーシス)を呈した神経細胞の割合を3群間で比較検討した。虚血・再灌流群の新生仔脳において、低酸素に対し脆弱である海馬神経細胞の変性を約34%に認め、コントロール群と比較し、有意な増加を示した。またこの変性は水素水投与群において、コントロール群と同程度まで改善した(図2)。妊娠20.5日での胎仔脳における検討でも、同様の結果であった。水素水投与が神経細胞保護に有用である可能性が示唆された。胎盤切片のヘマトキシリンエオジン染色による組織学的検討では、3群間で有意な変化を認めなかった。

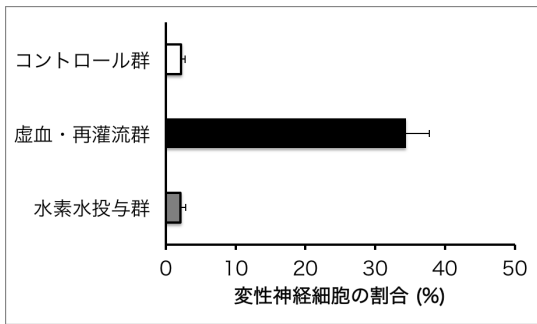


図2. 新生仔脳海馬における変性細胞の割合

(3) 胎盤及び日齢7日目の新生仔脳についてホルマリン固定切片を作成し、核酸の酸化ストレスマーカーである 8-OHdG、脂質の酸化ストレスマーカーである 4-HNE の抗体を用いて免疫組織染色を行い、虚血・再灌流による障害および水素水投与での改善の程度を検討した。また、画像解析ソフトを用いて、各切片の染色強度を定量化し、3群で比較検討した。新生仔脳海馬および胎盤において、虚血・再灌流群で酸化ストレスマーカーの高発現を認め、水素水投与群はコントロール群と同程度であった(図3)。(2)と(3)より、この周産期脳障害における水素水投与の効果は、経母体的に投与された水素が、胎仔脳において抗酸化作用を発揮し、神経細胞への酸化ストレスを軽減したことによると考えられた。

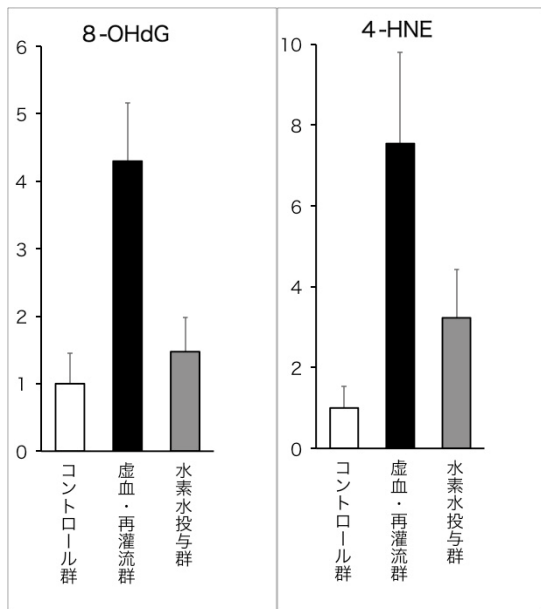


図3. 酸化ストレスマーカーの発現強度

(4) 空間認識記憶を司る海馬機能の障害程度を検討するため、行動実験として Morris 水迷路実験を行った。これは、水を張った円形のプールの水面直下にゴールとなるプラットフォームを設置し、プールの端にラットを入れてから、ゴールに到達するまでの時間を測定するものである。正常なラットでは、

プールが設置してある部屋の壁面にある目印を頼りに、回数を重ねるにつれ、ゴールに到達するまでの時間が短縮する。3群を自然分娩後、8週齢まで飼育し、本実験を行った。参照記憶テストにおいて、虚血・再灌流群はコントロール群と比べ、学習能力の遅延を認めたが、水素水投与群はコントロール群と同程度に学習能力の改善を認めた(図4)。水素水投与は、組織学的だけでなく、機能的にも海馬障害の改善に有効であることが示された。一方で、プラットフォームを撤去し、同じようにラットをプールに入れ、以前プラットフォームがあった分画に留まる時間を測定するプロベテストでは、3群間で差を認めなかった。この理由としては、本モデルでは海馬の障害が比較的軽微であることが考えられた。

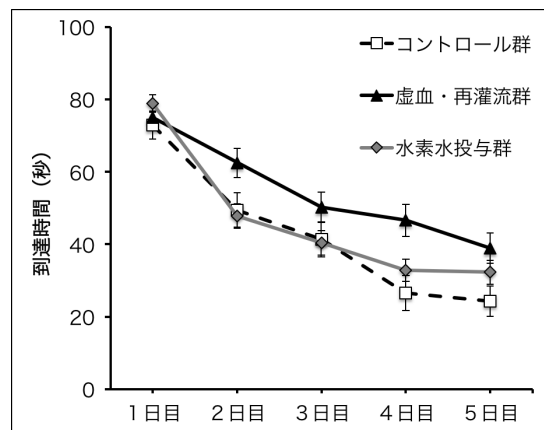


図4. 参照記憶

(5) 経母体的に投与した水素が胎仔へ移行していることを確認するため、ガス・クロマトグラフィーを用いて、胎盤、胎仔における各組織中水素濃度を測定した。水素水は服用後5分で組織中濃度がピークに達すると報告されており(引用文献)、水素水および通常水(コントロール)投与5分後に帝王切開にて羊水採取、胎仔および胎盤をそれぞれ娩出し、胎盤、胎仔頭部、胎仔体および羊水中の水素濃度を測定したところ、水素水投与により胎盤および胎仔頭部、胎仔体において、有意な水素濃度の上昇を認めた(図5)。飲水により経母体的に投与された水素は、低分子であるため、胎盤および血液脳関門においても自由拡散により容易に通過し、組織中水素濃度の上昇に寄与すると考えられた。羊水において有意な水素濃度上昇は認められなかったが、羊水の主成分は胎仔尿であり、母仔間における循環とは直接関わらないことが一因であると考えられた。

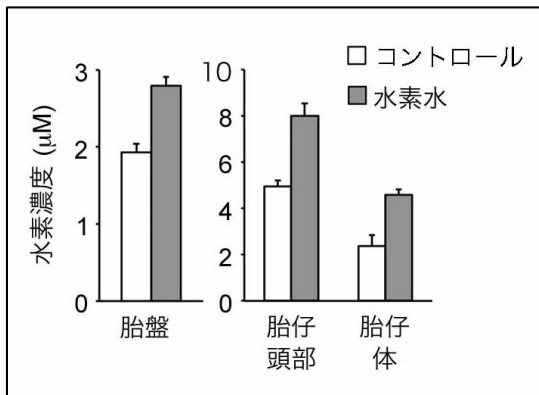


図5. 組織中水素濃度

本研究において、妊娠母体が水素水を飲むことで、水素が胎児脳に移行し、同部位にて抗酸化作用を発揮することにより、妊娠子宮の虚血・再灌流により引き起こされた酸化ストレスによる周産期脳障害を軽減することを証明した。また、この水素水投与は組織学的な脳障害だけでなく、脳機能の改善にも効果を認めた。

周産期脳障害を防ぐ目的での、本治療の対象として、一つには破水や羊水過少等により、分娩中の臍帯圧迫を反復して来している症例や度重なる胎児一過性徐脈を認める例は、正に今回使用した虚血・再灌流モデルに近い現象が胎内で起きていると考えられ、対象となりうる。また、切迫早産、胎児発育制限や妊娠高血圧症候群など、周産期脳障害のハイリスクと考えられる症例に関しては、より早期より予防的に水素水を飲むことでリスクの低減につながる可能性があるかもしれない。

本研究の特色は、世界で初めて妊娠母体へ分子状水素を投与する点であり、これまで治療法がなかった子宮内での酸化ストレスによる周産期脳障害に対し、新たな予防・治療法となりうる。分子状水素は既存添加物として認められており催奇形性もないため、実用化の点において他の抗酸化剤と比べても非常に有利であると考えられる。今後の臨床応用に向けたさらなる研究の発展が望まれる。

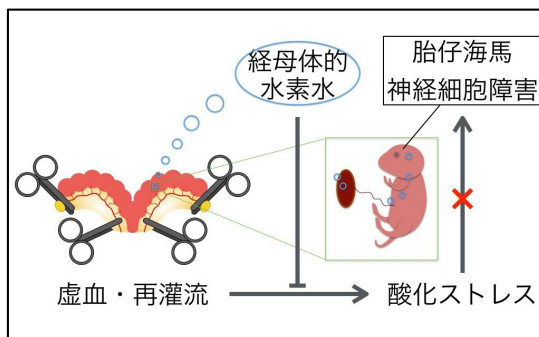


図6. 研究概要シエマ

<引用文献>

Naomi Kamimura, Kiyomi Nishimaki,

Ikuroh Ohsawa, Shigeo Ohta, Molecular hydrogen improves obesity and diabetes by inducing hepatic FGF21 and stimulating energy metabolism in db/db mice, Obesity, 2011,19:1396-1403.

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)

Yukio Mano, Tomomi Kotani, Mikako Ito, Taku Nagai, Yuko Ichinohashi, Kiyofumi Yamada, Kinji Ohno, Fumitaka Kikkawa, Shinya Toyokuni, Maternal molecular hydrogen administration ameliorates rat fetal hippocampal damage by in utero ischemia-reperfusion, Free Radical Biology and Medicine, 査読有, 2014 Apr;69:324-30. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2014.01.037

〔学会発表〕(計3件)

眞野 由紀雄、ラット胎児脳障害モデルにおける経母体的分子状水素投与の効果、第65回日本産科婦人科学会学術講演、2013年5月10日、札幌プリンスホテル(北海道・札幌市)

Yukio Mano, Maternal Molecular Hydrogen Administration Ameliorates Rat Fetal Hippocampal Damage By In Utero Ischemia-reperfusion, The 17th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility (COGI), 2012年11月10日、リスボン(ポルトガル)

Yukio Mano, Therapeutic effect of maternal hydrogen water administration in a rat model of fetal brain damage, International Federation of Placenta Associations Meeting 2012, 2012年9月19日、広島国際会議場(広島県・広島市)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/dbps\\_data/material/nu\\_medical/\\_res/topix/2013/FRBM\\_20140221.jp.pdf](http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/dbps_data/material/nu_medical/_res/topix/2013/FRBM_20140221.jp.pdf)

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/obgy/research/obstetrics/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

眞野 由紀雄 (YUKIO, Mano)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 30437024

(2)研究分担者

なし