

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660224

研究課題名(和文)胎児心電図装置を活用した胎児用薬品評価システムの開発

研究課題名(英文)Development of fetal drug evaluation system utilizing fetal electrocardiogram device

研究代表者

佐藤 尚明(SATO, Naoaki)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：70431567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス胎仔心拍数評価システムを構築し、胎齢12.5日目以降18.5日目までの計測を実施した。

MgSO₄製剤およびアトロピンを母獣腹腔に滴下し、90分計測する急性実験系と、母獣尾静脈からMgSO₄製剤を投与し、10分間だけ観察する超急性実験を行った。急性実験系ではMgSO₄製剤およびアトロピンの腹腔投与実験では胎仔に有意な変化を検出できなかった。超急性実験では胎仔心拍変動の変化を伴わない心拍数の低下を認めた。慢性実験としては妊娠7.5日目にビタミンA 7500IUを母獣に投与し胎齢13.5日目に心電図を計測したところQTの延長を確認し、mRNAレベルでの知見と矛盾しないことを確認した。

研究成果の概要(英文)：We constructed fetal mouse heart rate evaluation system, and measured it from day 12.5 to day 18.5 of the gestation.

An acute experimental system in which it was measured for 90 minutes, a MgSO₄ preparation, atropine or saline were dropped into the abdominal cavity of the mother. A super-acute experiment was conducted by observing only for 10 minutes, the MgSO₄ preparation was administered from the mother animal tail vein. In the acute experiment, significant changes in the fetus could not be detected in the MgSO₄ preparation and atropine. In the super-acute experiment, heart rate was decreased without the short-term viability.

As a chronic experiment, 7500 IU of Vitamin A was administered to the maternal mouse at the 7.5 day of pregnancy. The electrocardiogram was measured on the 13.5th day of gestation, confirming the prolongation of QT and confirmed that it is consistent with the findings at the mRNA level.

研究分野：周産期医学

キーワード：胎児心電図装置 胎児治療 胎児用薬物評価システム

1. 研究開始当初の背景

日本では、少子高齢化の進展の中、女性の社会進出や未婚、晩婚化が進み、出生率が長期間にわたり低い水準にとどまっている。晩婚化や労働環境の悪化もあり、一組の夫婦から生まれる子供の数に制約が生じ、結果的に、**産まれてくる生命一人ひとりが健全である事への期待が高まっている。**

出生前検査の是非なども含め、胎児への先天的な病気や奇形等の影響について、社会的に敏感となっている状況であり、妊婦の服薬についても当事者にとって非常にシビアな問題である。約 50 年前に発生した著名な薬害事件である「サリドマイド事件」で奇形児が発生したこともあり、国内では妊娠中の服薬等の胎児に与える危険性について比較的周知がされている。

現在、実際にヒトでの催奇形性が確認されている医薬品は少ないにもかかわらず、**胎児を対象にした治験が困難**であったことから、薬剤の添付文書に記載されている多くの薬剤に、「**使用を避けること・安全性は確立していない**」などと記載されている。医薬品の使用によるリスクを過剰に心配し、医師等が必要な薬物治療を控えてしまったり、患者本人が自己判断により服薬を中止したりすることで、母体の健康状態が悪化し、かえって胎児に悪影響を及ぼすおそれがある。

一方、癌や精神疾患、生活習慣病などの治療薬としてエピジェネティック薬の開発が進められている。エピジェネティック薬は新しい創薬分野だ。

2. 研究の目的

我が国では少子化が進み、**産まれてくる生命一人ひとりが健全である事への期待が高まって**おり、胎児への先天的な病気や奇形等の影響について、社会的に敏感となっている状況である。妊婦の服薬は当事者にとって非常にシビアな問題である。しかし、**多くの薬剤の添付文書には「使用を避けること・安全性は確立していない」**などと記載されている。この一因は、**胎児を対象にした治験の困難**さにある。マウスはヒトと類似した胎盤構造を有し、胎児用の薬品評価に適している。本研究はマウスの胎仔心電図装置と既存の解析ツールを活用した**胎仔を対象にした薬物の安全性・有効性試験システム開発**を通して、**胎児の経母体的な薬物療法開発の基礎となる事**を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔心拍数評価システムの構築。

心臓および自律神経系の発達ステージに沿って薬効を評価できる様、胎齢 12.5 日目以降 18.5 日目まで心拍数が計測出来るシステムを構築した。

(2) 急性投与実験。妊娠 15.5 日目または 18.5 日目に麻酔下で開腹・子宮を露出した。胎仔心電図計測装置による心拍数視下で母獣腹腔に $MgSO_4$ 製剤またはアトロピンを滴下し、母仔の心拍変動を 90 分計測した。

(3) 超急性投与実験。(2)の解析から薬剤の母体への移行時間の検出が困難であったため、母獣尾静脈から $MgSO_4$ 製剤を急速投与し 10 分間母仔の心拍変動を計測する超急性実験を追加した。この実験は 15.5 日目または 17.5 日目に実施した。

(4) 慢性実験。ヒストンのアセチル化を促進するビタミン A を妊娠 7.5 日目、9.5 日目、11.5 日目の 3 点に分けて投与し、心奇形を含む様々な奇形を誘導し、心電図波形の評価で心機能への慢性的な影響の評価を行った。計測終了後直ちに胎仔心臓を採材し、網羅的な RNA 発現解析を行った。

これらの実験を通して**生理学的評価と遺伝子発現評価を可能にし、胎児対象の遺伝子発現や生理学的な安全性・有効性試験に対応した薬品評価システムの開発を行った。**

4. 研究成果

(1) 母獣麻酔下で胎仔から直接誘導にて心電位を誘導するマウス胎仔心拍数評価システムを構築した(図1)。

マウス胎仔心拍数評価システムの構築

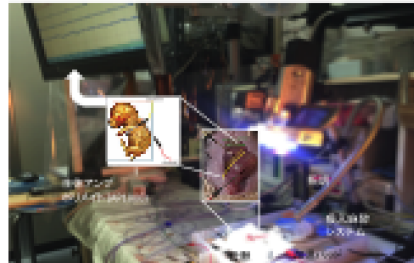


図1：マウス胎仔心拍数評価システム

このシステムを用いて、胎齡 12.5 日目以降 18.5 胎令 12.5 日目以降 18.5 日目までの各胎令の心拍数の算出に成功した(図 2：青丸)。超音波にて計測した過去の文献の数値とほぼ一致し(図 2：赤丸) より幅広い胎令での計測に成功した。

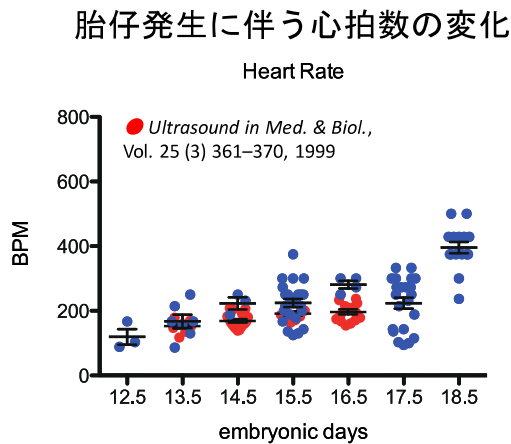


図 2：胎仔発生に伴う心拍数の変化

得られた心電位から胎仔発生に伴う R 波の波高を評価したところ、発生が進むにつれて波高が高くなることが確認された(図 3)。

胎仔発生に伴う R 波の波高の変化

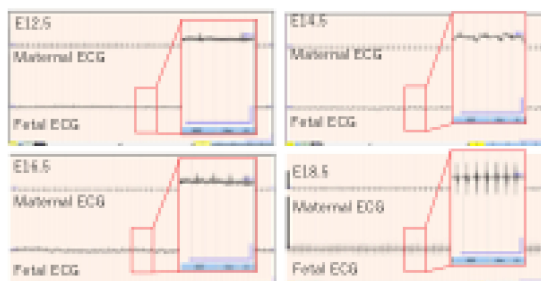


図 3：胎仔発生に伴う胎仔心電位の変化
赤枠で拡大した胎仔心電位から発生に伴い R 波高が高くなることを確認した。

(2) 急性投与実験。何れの胎令および薬剤でも明確な変化を検出できなかった。

(3) 超急性投与実験。胎令 18.5 日目に比べて子宮収縮が生じにくい胎令 17.5 日目の胎仔を計測対象に変更した。投与前における個々の胎仔状態が異なり、統計量としての評価は困難であったが、MgSO₄ 投与群は対照である glucose 投与群と比較して心拍数の変動に瞬時心拍変動の変化を伴わない傾向がみられた(図 4)。

尾静脈投与による心拍数と心拍細変動の関係

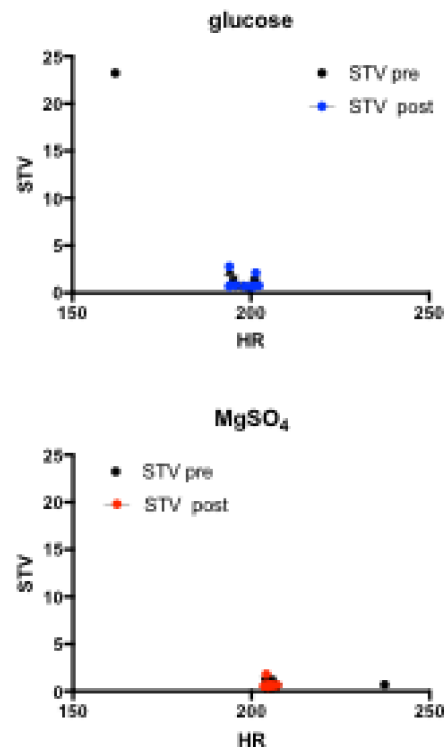


図 4：投与前後の心拍数および瞬時心拍変動

(4) 慢性投与実験。妊娠 7.5 日目、9.5 日目、11.5 日目投与の内、満期まで妊娠が成立し、分娩できたのは 11.5 日目投与の 4000/7500IU のみであった。妊娠 9.5 日目に投与した群では容量依存的に四肢を中心とした骨形成の抑制が認められた。妊娠 7.5 日目にビタミン A 7500IU を母獣に投与し胎齡 13.5 日目に心電図を計測、精査したところ QT の延長を確認し、mRNA レベルでの知見と矛盾しないことを確認した。胎令 7.5 日目は心原基の形成時期であり、胎令 9.5 日目は前肢芽および後肢芽が形成される時期である。これらのことから時期特異的なビタミン A 投与が臓器発生におけるヒストンのアセチル化を修飾し、心臓への影響を胎仔心電計で検出できたと考えられる。

以上の成果から、**胎児を対象にした遺伝子発現と生理学的な安全性・有効性試験を同時に行える薬品評価システムを開発した**と報告する。

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)

[学会発表](計6件)

KIYOE FUNAMOTO, Motoyoshi Kawataki, Kana Nakanishi, Chihiro Yoshida, Kenichi Funamoto, YuPeng Dong, Takuya Ito, Naoaki Sato, Yoshitaka Kimura, The excessive intake of Vitamin A in mice pregnant increases the risk of Long QT syndrome for the fetal heart, Joint Meeting of the German and Japanese Societies of Developmental Biologists, 2017.3. 15-18, Kiel, Germany

Kiyoe Funamoto, Rika Sugibayashi, Kenichi Funamoto, Kana Nakanishi, Takuya Ito, Motoyoshi Kawataki, Toshiyuki Hayase, Yoshitaka Kimura, Analysis of an Autonomic Nervous System of Mouse Fetus with Congenital Heart Defec, IFS Collaborative Research Forum 2016, 2016. 10.11 Sendai, Sendai International Center

伊藤拓哉、堀江佐知子、鈴木康博、佐藤尚明、佐藤康文、木村芳、マウス心臓発生における vasohibine family の時間的制御、第 11 回 Vasohibine 研究会 2016.1.23-24、蔵王、ラフォーレ

Rika Sugibayashi, Takuya Ito, Kenichi Funamoto, Toshiyuki Hayase, Yoshitaka Kimura Cardiac Evaluation of Fetal Mice by ECG and Ultrasound IFS Collaborative Research Forum 2015, 2015. 10.28 Sendai, Sendai International Center

伊藤拓哉、杉林里佳、佐藤尚明、船本聖絵、遠藤美雪、飯田溪太、董宇鵬、木村芳孝、心電計によるマウス胎仔の心機能発達評価、第 62 回日本実験動物学会、2015.5.28-30、京都、京都テルサ

Rika Sugibayashi, Takuya Ito, Kenichi Funamoto, Toshiyuki Hayase, Yoshitaka Kimura Cardiac Evaluation of Fetal Mice by ECG and Ultrasound IFS Collaborative Research Forum 2014, 2014. 10.8-10 Sendai, Sendai International Center

[その他]

ホームページ等

http://www.fetalecg.med.tohoku.ac.jp/kimuralab/kimuralab_top_jn.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 尚明 (SATO, Naoaki)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：70431567

(2)研究分担者

董 宇鵬 (DONG, Yupeng)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：10569320

伊藤 拓哉 (ITO, Takuya)
東北大学・医学系研究科・助教
研究者番号：70396539

船本 聖絵 (FUNAMOTO, Kiyoe)
東北大学・医学系研究科・技術補佐員
研究者番号：30570030