

学 位 論 文 題 名

# A Rat Model for Arrest of Alveolarization Induced by Antenatal Endotoxin Administration

(出生前のエンドトキシン投与により惹起された  
ラット肺胞形成停止に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

[目的] 本研究は、出生前羊水感染症などによる羊水中エンドトキシン濃度上昇が、出生後の肺成長に与える影響を、ラットモデルを用いて検討することを目的とした。

[対象] 妊娠ラット(WKAH ラット、妊娠期間 22 日)を用い、北海道大学大学院医学研究科動物実験委員会の許可を得て実験を行った。

[方法] 分娩予定 24hr 前(妊娠 21 日)に、Nembutal(pentobarbital 50mg/ml)0.1ml/100g body weight 腹腔内投与による麻酔の下で妊娠ラットを開腹し、各胎仔の羊水腔内へエンドトキシン(LPS; Escherichia coli 055:B55) 1 $\mu$ g を投与し、各胎仔の腹腔内へ G-CSF(Gran : filgrastin recombinant) 0.25 $\mu$ g を投与した。LPS の投与量は胎仔体重あたり 0.2-0.4mg/kg であり、予備実験にてラット新生仔蘇生率が 50%以上となる量であった。G-CSF の投与量は、予備実験で白血球数が明らかに増加(7,000-10,000/mm<sup>3</sup>から 30,000-50,000/mm<sup>3</sup>)する量であった。妊娠ラットを 4 群に分け、1 群には LPS と G-CSF を投与した。2 群には LPS のみを、3 群には G-CSF のみを投与し、4 群は対照とした。対照としての処置には同容量の生理食塩液を投与した。これらの妊娠ラットは処置後閉腹し、処置後 24hr に頸椎脱臼により安楽死させた直後に胎仔が入った子宮を摘出し、摘出した子宮を切開して胎仔を娩出させた。新生仔ラットは、刺激と羊水除去による簡易的蘇生措置によって蘇生し、体温を十分回復させた後に里親ラットにより保育させた。里親ラットには、2 日以内に出産した 400-600g の WKAH ラットを用いた。栄養量の差による成長の差を除外するため、一親につき新生仔ラット 8 匹を保育させた。また、一親には同一群の新生ラットのみを保育させて群の混合を回避した。

日令 1、3、7、14、21、48、60 に各群より n=5 の検体採取を行った。ラットを Nembutal の過量投与で安楽死させた後に気管切開を行い、切開孔よりカニューレを挿入し、気道内圧 20cmH<sub>2</sub>O の状態で 10%ホルマリンにて 20 分間還流固定した。肺を胸腔内より摘出し、さらに 48hr 以上 10%ホルマリンにて浸漬固定し、左肺を光学顕微鏡検索に使用した。左肺をスライス後、体軸方向に合わせてパラフィン包埋し、4 $\mu$ m に薄切して Hematoxylin-Eosin 染色を行った。また、肺組織内の弾性繊維の量と分布の評価を目的に、代表的な検体に対して Elastica van Gieson 染色を行った。

肺胞構造の定量的評価には Morphometry 法を用いた。標本一切片あたり 10 か所を無作為に選択し、MCID (Microcomputer Imaging Device, Imaging Research Inc., St Catharines, Ontario, Canada) を用いて画像ファイルを作成した。この画像に対して Stereology Toolbox (Morphometrix, Davis, CA, USA) を用いて、単位体積あたりの平均肺胞表面積、平均肺胞数および平均肺胞半径を算出した。これらの数値の各検体採取時点における 4 群間の比較には Scheffe の方法を用い、 $p < 0.05$  を有意とした。

[結果] LPS を用いた 1、2 群では、LPS を用いない 3、4 群に比較して肺胞表面積の縮小、肺胞半径の拡大および肺胞数の減少が認められた。これらの変化は最も早い検体採取ポイントである 1d に既に認められており、その後 7-14d にかけて顕在化し、成獣である 60d まで持続していた (60d の平均肺胞表面積は 1 群 233、2 群 253、3 群 502、4 群 557 (/cm))。対照として用いた 4 群の肺胞発達は既報の正常発達相当であったことから、上記の変化は LPS の羊水腔内投与により惹起されたものと考えられた。

G-CSF 投与による好中球増加が LPS の作用を増強させることを予測したが、結果として G-CSF の投与は有意な影響を及ぼさなかった。

光学顕微鏡での観察では、LPS を用いた 1、2 群で、上記の結果を反映する大きく、まばらな肺胞像 (fewer larger alveoli) が認められ、肺胞 2 次中隔の形成が乏しかった。肺胞壁の浮腫、炎症細胞の肺胞壁への浸潤増加などの肺胞破壊像は認められなかった。また、Elastica van Gieson 染色では 4 群間に弾性繊維の量、分布の差異を認めなかった。

[考察] 本研究において、羊水腔内 LPS 投与が新生仔ラット肺の構造に fewer larger alveoli を惹起させた。肺胞破壊像を伴わないこと、肺胞 2 次中隔の形成が乏しいこと、対照群との差が肺胞形成期 (alveolar phase) に一致して顕在化していることから、fewer larger alveoli を引き起こしている原因としては、肺胞形成の阻害が最も考えられた。さらに、成獣と考えられる 60d の時点でも同様の変化が持続していた。出生後の条件が 4 群とも同様であり、他の負荷の関与 (酸素投与、人工換気、薬剤投与、出生後感染など) がないことから、出生前の負荷が成獣の肺構造にまで影響を残すことが考えられた。

近年、肺胞の成長阻害、特に肺胞化の阻害 (arrest of alveolarization) を引き起こす要因について、いくつかの報告がなされている。しかし、出生前の負荷が生後の肺の成長に与える影響を経時的に観察した研究は少なく、出生前の LPS 投与と生後の肺胞化の関係を成獣まで観察した研究は、現在のところ本研究のみである。

従来、早産児慢性肺疾患の代表は、呼吸窮迫症候群に続発する気管支肺異形成 (BPD, bronchopulmonary dysplasia) であった。BPD は未熟な肺に酸素毒性、圧および容量損傷が作用して肺のリモデリングが生ずることにより成立すると考えられてきた。しかし、近年 arrest of alveolarization が病態の本質である new BPD という概念が提唱され、その原因として子宮内炎症が注目されている。特に、早産児慢性肺疾患の 1 疾患群である Wilson-Mikity 症候群 (WMS) は、新生児医療の進歩した現在でも死亡率の高い疾患である。これは、子宮内炎症に関連し、出生後はサーファクタント欠乏による呼吸窮迫症候群を免れるにも関わらず、1-2 週間で亜急性に呼吸障害が進行し、呼吸不全から肺性心に至る、早産児に特有の重症呼吸器疾患である。WMS は、特徴的経過をとることともに fewer larger alveoli を病理学的特徴とする。

こうした臨床における必要性から arrest of alveolarization の実験系の確立が望まれてきた。本研究で作成された arrest of alveolarization の動物モデルは、WMS を代表とする、new BPD の病因究明および治療法確立に資するものと考えられる。今後、当モデルを用いた肺胞発育停止機序の研究を行っていく予定である。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 正

副 査 教 授 水 上 尚 典

副 査 教 授 西 村 正 治

学位論文題名

## A Rat Model for Arrest of Alveolarization Induced by Antenatal Endotoxin Administration

(出生前のエンドトキシン投与により惹起された  
ラット肺胞形成停止に関する研究)

近年、人工呼吸器の改善、人工サーファクタント治療をはじめとする新生児医療の発展によって、様々な新生児疾患の予後が改善されている。しかし、未熟児慢性肺疾患、特にこの一型である newBPD (new bronchopulmonary dysplasia) は、未だ大きな臨床的問題として残されている。newBPD は、出生前子宮内感染、特に羊膜絨毛膜炎と強く関連し、出生時には新生児呼吸窮迫症候群 (RDS) をはじめとする、呼吸障害が最小限であるにもかかわらず、数日から数週間で呼吸障害が重症化するといった臨床的特徴をもつ。これらは出生時に主に RDS を合併し、人工換気による圧損傷、酸素毒性といった因子が主に病因となる従来までの BPD(classical bronchopulmonary dysplasia) とは、区別され、Wilson-Mikity 症候群として、今まで知られてきた病態に類似する。また出生後の肺胞構造変化 (fewer and larger alveoli) を病理上の特徴とすることが知られている。

本研究では、ラット羊水腔内への LPS(lipopolysaccharide:Escherichia coli 055:B55)投与によって、羊膜絨毛膜炎類似状態を作り出し、その後出生した新生ラット肺の構造変化を morphometry 解析によって評価する事を目的とした。実験動物としては妊娠 WKAH ラット (term 22d14hr) を用いた。これらを 1)LPS を羊水腔内に投与し、G-CSF を同時に胎児腹腔内に投与する群、2)LPS のみを投与する群、3)G-CSF のみを投与する群、4)コントロールとして生食を用いる群に分け、妊娠 21d に各薬物投与実験を、22d 分娩開始前に新生ラット出生のための帝王切開実験を行った。また、1-60d まで観察し、1、3、7、14、21、48、60d にラット肺採取のうえ、morphometry 解析を行った。

実験で得られた結果より、LPS を投与した群においては、出生後の新生ラット肺に、肺胞数の減少、肺胞半径の拡大、肺胞表面積の狭小を認めた (fewer and larger alveoli)。この傾向は、1d の時点 (late cannalicular phase) すでに認められたが、14d、つまりラットの肺胞形成期 (alveolar phase) にかけて著明化し、60d、つまり成獣 (adult lung) まで持続して観察された。経過を通して、有意な肺胞壁への炎症細胞浸潤、無気肺、間質浮腫等の病理像は認められなかった。また LPS 活性増強の目的ために用いた G-CSF は、今回の実験結果に影響しなかった。

公開発表に際し、副査の西村正治教授から、早期肺胞構造変化の原因、長期的に肺胞構造正常化する可能性、また、考える肺胞形成停止のメカニズムに対する質問があった。次いで副査の水上尚典教授からは、G-CSF と結果との関係、また当院での newBPD と出生前感染の実際、母体感染の判断方法と、児娩出決定に関する知見について質問があった。最後に主査の有賀正教授からは、サイトカインと肺胞形成停止の関係、Toll-like receptor ノックアウトマウでの応用について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は今回の研究で得られた結果や、過去に報告された知見を利用し、妥当な回答を行った。

本研究は、羊水腔内 LPS 投与のみで出生後の肺に 60d まで持続する肺胞構造変化 (fewer and larger alveoli) を引き起こし、これらの肺胞構造変化の原因、が未熟肺における肺胞形成停止にある事を考察した。また、本実験系は、その背景と肺病理像が newBPD に類似し、新しい newBPD 動物モデルとして応用される可能性が示唆され、今後の newBPD の病態解析、治療法開発に対して、重要な役割をはたすことが、期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。