

学位論文題名

新生児慢性肺疾患モデルラットに対する
生後ステロイド投与の影響

学位論文内容の要旨

【背景と目的】慢性肺疾患(chronic lung disease, CLD)はその成立機序と臨床的特徴から、気管支肺異形成 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) と new BPD に大別することができる。BPD は未熟な肺組織が、生後に人工換気、酸素投与、感染症などによる損傷を受け、修復の過程で気腫化、線維化などの異形成を生じるものである。一方 new BPD は主に絨毛膜羊膜炎などの子宮内炎症や絨毛膜血腫による血性羊水に起因して肺胞新生や微細血管系の発達が停止した結果生ずるもので、肺胞の数が少なく、個々の肺胞が大きいことが特徴である。new BPD に対する特異的な治療法は確立しておらず、臨床では BPD に準じてステロイド投与が行われている。動物実験では出生前あるいは出生後に投与したステロイドが肺胞の発達を妨げることが報告されている。前回の実験で Ueda らは、妊娠ラットの羊水腔へ Lipopolysaccharide (LPS) を投与した後に出生させた新生仔ラットの肺が、new BPD に相当する大きくて数の少ない肺胞構造を呈し、この変化が成獣に至るまで持続することを報告した。今回は、この慢性肺疾患モデルラットを使用して、出生後のステロイド投与が new BPD 様肺構造変化に与える影響について検討した。

【対象と方法】

1. 動物実験

以下の動物実験は北海道大学動物実験委員会の承認のもと北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内にて行なった。生後 8 週以降の WKAH/hkm 近交系ラットを用い、交配し妊娠 21 日目のラットを吸入麻酔下に開腹し、各胎仔の羊水腔に LPS を注入して閉腹した。LPS 投与 24 時間後の妊娠 22 日に再び開腹して子宮を摘出し、新生仔を出生させ臍帯を切断した後、あらかじめ経膈分娩した里親ラットに哺育させた。日齢 1 から 4 に新生仔ラットにデキサメタゾン(デカドロン注射液, DXM)を皮下投与した。DXM は日齢 1 に 0.1 μ g/g, 日齢 2 に 0.05 μ g/g, 日齢 3 に 0.025 μ g/g, 日齢 4 に 0.01 μ g/g を生理食塩水で希釈調整して投与した。日齢 7 および 14 に肺の摘出を行った。ラット仔を安楽死させた後に気管切開を行い、切開口より 10%緩衝ホルマリン溶液を注入した。肺は 20cm 水柱圧で 20 分間灌流固定した後に摘出し 48 時間以上 10%緩衝ホルマリン溶液で固定した。ラットを 4 群にわけた。1) LPS 群(羊水腔へ LPS を投与, 生後に生理食塩水を投与), 2) LPS+DXM 群(羊水腔へ LPS を投与, 生後に DXM を投与), 3) DXM 群(羊水腔へ生理食塩水を投与, 生後に DXM を投与), 4) コントロール群(羊水腔, 生後に生理食塩水を投与)

2. 標本作製・解析

固定した左前肺を使用してパラフィン包埋後 4 μ m に薄切し Hematoxylin-Eosin 染色を行い、光学顕微鏡にて評価を行った。肺胞構造の定量的評価には Morphometry 法を用い、単位体積あたりの肺胞表面積と肺胞数、および平均肺胞半径を算出した。この操作を日齢 7 および 14 の各群について 5 匹の仔ラットに対して行った。

3. 統計学的方法

肺胞表面積、肺胞数および平均肺胞半径の比較には one-way ANOVA を用い、群間の比

較には Scheffe の方法を用いた。それぞれ $p < 0.05$ を有意とした。

【結果】

1. 光学顕微鏡所見

日齢 7 ではコントロール群に比べ、LPS 群、LPS+DXM 群、DXM 群で肺胞腔の拡大がみられ、さらに DXM 群では肺胞壁の菲薄化がみられた。日齢 14 では、コントロール群で肺胞壁が菲薄化し、肺胞は小さく肺胞数が増加していたが、LPS 群や LPS+DXM 群では肺胞は大きく肺胞数は減少していた。DXM 群では肺胞壁の肥厚がみられた。

2. 単位体積あたりの肺胞表面積 (cm^{-1})

日齢 7 でコントロール群(337.5 ± 28.0)に比べ LPS 群(257.5 ± 16.8)、DXM 群(220.2 ± 15.3)で有意に小さく ($p < 0.001$)、日齢 14 でも有意差を認めた。LPS+DXM 群は日齢 7 (300.0 ± 28.3)、日齢 14 (274.2 ± 20.9) で LPS 群 (日齢 7 (257.5 ± 16.8), 日齢 14 (262.0 ± 20.2)) との間に有意差を認めなかった。

3. 単位体積あたりの肺胞数 ($/\text{mm}^3$)

コントロール群に比べ、いずれの群でも有意に少なかった。LPS+DXM 群の日齢 7 (651.1 ± 214.9)、日齢 14 (398.0 ± 140.7) の肺胞数は、相当する LPS 群の日齢 7 (359.3 ± 91.8)、日齢 14 (375.8 ± 155.3) の肺胞数と有意差を認めなかった。

4. 平均肺胞半径 (μm)

日齢 7 でコントロール群(57.3 ± 5.5)に比べ LPS 群(86.8 ± 8.9)、DXM 群(107.0 ± 4.2)で有意に大きかった ($p < 0.001$)。LPS+DXM 群の平均肺胞半径は、日齢 7 (67.9 ± 11.2)では LPS 群に比べ有意に小さかった ($p = 0.015$)が、日齢 14 (82.4 ± 10.8)では LPS 群(87.3 ± 8.8)との間に有意差を認めなかった。

【考察】新生児の肺構造は、子宮内感染症に伴う高サイトカイン血症や母体へのステロイド投与などの出生前の因子に加え、人工換気、酸素投与、感染症、動脈管開存症による肺浮腫、栄養状態、生後のステロイド投与などの生後の因子により修飾を受ける。子宮内炎症に起因する new BPD の病態を解明し、その予防・治療法を確立するためには、生後の人工換気や酸素投与などによる二次的な影響を排除した動物実験が必要であった。そのため満期で出生したラットの肺構造はヒトの 27 週前後に相当する未熟な肺構造でありながら、生後に人工換気や酸素投与を必要としない点で本研究に適していた。またこの実験では、抗炎症作用が強く、CLD の治療に汎用されている DXM を使用した。DXM の初回投与量はヒトの臨床で使用されている量より少ないが、DXM 群には明らかな肺構造変化を認めており、ヒトとラットの DXM に対する感受性の違いが原因と推定された。

LPS による子宮内炎症の機序としては Toll-like receptor-4 (TLR-4) を介した自然免疫の関与が考えられている。TLR-4 からのシグナルは、最終的に inhibitor kappa B ($\text{I}\kappa\text{B}$) による nuclear factor kappa B ($\text{NF-}\kappa\text{B}$) の抑制を解除する。 $\text{I}\kappa\text{B}$ から解離して活性化した $\text{NF-}\kappa\text{B}$ は核内に入り、サイトカイン遺伝子のプロモーター領域に結合して tumor necrosis factor alpha ($\text{TNF}\alpha$) などの炎症性サイトカインを産生させる。ステロイドは $\text{I}\kappa\text{B}$ の合成を刺激することで $\text{NF-}\kappa\text{B}$ の核内移行を妨げ、その結果として炎症性サイトカインの放出を抑制して抗炎症作用を発揮する。今回の実験では、生後に投与した DXM は胎児期 LPS 暴露による肺構造変化を軽減しなかった。この原因として、LPS 投与後に発生する肺組織変化が炎症によるものではない可能性、あるいは炎症が寄与する過程が胎児期に既に終了している可能性が考えられた。また DXM 群において日齢 7 では肺胞壁の菲薄化と肺胞新生の抑制が認められたが、日齢 14 では肺胞壁は肥厚しており、肺胞数の増加も認められたことより、DXM による肺胞成熟の促進と肺胞新生の抑制は一過性であったと判断した。胎児期あるいは生後早期に投与されたステロイドは、肺胞構造の成熟と肺胞新生の抑制をもたらすが、その効果の持続期間はステロイドの投与時期と投与方法により異なると考えられた。また、出生前に投与された LPS と生後に投与された DXM はともに肺胞壁の成熟促進と肺胞新生の抑制を生ずるが、その機序は異なる可能性があると考えられた。

【結論】今回行った実験で用いた投与量と投与期間のステロイドは、肺胞新生の一過性抑制をきたした一方で、胎児期に曝露された LPS による肺構造の変化に対して有意な変化をもたらさなかった。今後、子宮内炎症に起因する new BPD の予後改善には、new BPD の成立機序解明と、その機序に基づいた新たな予防・治療法の開発が必要であると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 水 上 尚 典

副 査 教 授 有 賀 正

副 査 教 授 西 村 正 治

学 位 論 文 題 名

新生児慢性肺疾患モデルラットに対する 生後ステロイド投与の影響

新生児慢性肺疾患(CLD)は、未熟肺に対する生後の損傷に起因する気管支肺異形成 (BPD) と、子宮内炎症に起因する肺胞新生の停止 (new BPD) に大別される。本研究の目的は、生後のステロイド投与がnew BPDに与える影響を解明することである。妊娠ラットの羊水腔内にlipopolysaccharide (LPS) を投与し帝王切開で出生させたラットをnew BPDのモデルとし、日齢1~4の新生仔にdexamethasone (DXM) を皮下投与した。日齢7、14での左前肺のH-E染色標本に対して光学顕微鏡による観察とMorphometry法にて単位体積あたりの肺胞表面積、肺胞数、肺胞半径を算出した。結果としてLPS群、LPS投与後のDXM群でnew BPDでみられる肺の構造変化 (fewer and larger alveoli) を認め、肺胞表面積、肺胞数、平均肺胞半径においてLPS群とLPS投与後のDXM群で有意差を認めなかった。今回行った実験で用いた投与量と投与期間のステロイドは、胎児期に曝露されたLPSによる肺構造の変化に対して有意な変化をもたらさなかった。

発表後、西村教授より羊水腔内へのLPS投与がnew BPDモデルとなりうるかという質問に対して、発表者は上田らの報告での肺構造変化や胎盤病理所見および他の文献での炎症性サイトカインの発現などよりnew BPDに類似した状況を再現していると説明した。また、ステロイド単独投与の効果に関する質問に対して、発表者はラットへのステロイド単独での効果の報告は他にもあり同様の結果が得られ期待した結果であったことを説明した。またLPSやステロイドの量に関する質問に対し、上田らの報告や他の文献を参考し投与量を決め、また予備実験においてステロイドの量を臨床で使用する量 (デカドロン 0.5mg/kg/dose) でも行ったがそのほとんどが日齢7以内に死亡したと説明した。有賀教授よりLPS投与により炎症を介しnew BPDとなるのであれば、なぜ抗炎症効果をもつステロイドが効かなかったのかという質問に対して、発表者は炎症が寄与する過程が胎児期に既に終了している可能性を説明した。またステロイドによる炎症抑制の判定に関する質問に対して、new BPDでは組織学的に炎症細胞の浸潤はみられないので評価が難しく、炎症性サイトカインを測定しステロイド投与によりどう変化するか評価する必要があると説明

した。ステロイドの肺への影響は持続するののかという質問に対して、発表者は今回の実験結果より効果は一過性でリバーシブルである可能性を説明したが、投与時期によっては肺胞の形成を阻害する可能性もあることを付け加えた。最後に水上教授より、ステロイド投与のタイミングに関する質問に対し、発表者は胎児期でのステロイド単独投与では肺胞の形成を阻害するとの報告もあるが、LPS 投与による炎症が胎内で起こっているのであれば、LPS 投与前あるいは後でステロイド投与することにより炎症によるサイトカインの放出を抑え、肺胞発達の阻害を防げるのではないかと説明した。また今回の研究でステロイドは肺に大きな影響を与えたが、その他体重減少などはどのような理由で起こると考えられるかとの質問に対して、発表者は体重減少の理由としてステロイドによる異化亢進が理由の1つであると説明し、臨床でもステロイドを使用している新生児でも同様に体重が増加しないことを説明した。また最近ではステロイド、特にデキサメサゾンによる中枢神経に対する影響（発達障害など）が問題視されており、その原因として脳内のグルココルチコイドレセプターへの結合による神経細胞の障害や製剤に含まれる成分（亜硫酸塩）の毒性などが報告されていると説明した。

このように申請者はいずれの質問に対しても、研究結果ならびに文献的知識を基に、誠実かつ適切に回答した。

この論文は、new BPD に対する生後ステロイド投与の肺胞への影響を検討したものであり、new BPD 予防効果は示されなかったが、ステロイドの持つ肺胞への影響や体重増加への影響を明らかにしたことで高く評価された。審査員一同は、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。