

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目：先天性横隔膜ヘルニアラットモデルの
低形成肺における肺表面活性リン脂質の
生化学的および形態学的研究

氏 名：宇津木 忠仁

【研究の背景】

現在、新生児外科疾患の治療成績は飛躍的に向上したが、先天性横隔膜ヘルニア(*congenital diaphragmatic hernia*, CDH と略) は、依然治療に難渋し死亡率の高い疾患である。CDH の予後の向上のためには合併する肺低形成の評価が重要な位置を占める。そこで、胎生期に肺低形成の機能的評価が可能であれば、出生後早期より適切な治療が可能となる。現在、胎児肺の成熟度を評価する方法としてヒト羊水中のレシチン/スフィンゴミエリン比(L/S 比)の測定が広く用いられている。レシチンは肺サーファクタントリン脂質であり、その大部分が *disaturated phosphatidyl choline*(DSPC と略)であることから、羊水中の DSPC 濃度が胎児肺の DSPC 濃度を反映すると考えられる。当研究室では DSPC とスフィンゴミエリン(Sm と略)に特異的に反応するモノクローナル抗体を作製することに成功しており、DSPC と Sm の微量定量を可能にした。

本研究では、1) モノクローナル抗体が飽和脂肪酸含有ホスファチジルコリンと Sm に特異的に反応することを検証し、DSPC と Sm の微量定量への応用を検討した。2) 正常胎仔ラットの肺と羊水中の DSPC と Sm の胎生期の経時的変化をモノクローナル抗体を用いて解析した。3) 除草剤の成分であるニトロフェンを妊娠ラットに経口投与することで、胎仔に著明な肺低形成を伴う CDH が誘導できることを明らかにした。4) CDH 胎仔肺および羊水中の DSPC と Sm をモノクローナル抗体を用いて定量した。また、このモノクローナル抗体を用い

て CDH 胎仔肺を免疫組織染色し、DSPC と Sm の肺組織内の分布を検討した。

【マウス IgM モノクローナル抗体 VJ-41 の反応特性】

材料と方法

飽和脂肪酸あるいは不飽和脂肪酸と結合した各種リン脂質各々1 μ g をシリカゲル薄層ガラスプレートとシリカゲル薄層プラスチックプレートにスポットし、クロロホルム/メタノール/0.5%塩化カルシウムの溶媒系で展開し、前者を酢酸銅+リン酸試薬で発色し、後者をマウス IgM モノクローナル抗体 VJ-41 で免疫染色し、発色させた。

また、Sm と DPPC を各々0.05 μ g, 0.1 μ g, 0.2 μ g, 0.5 μ g, 1.0 μ g を用いて、同抗体で免疫染色し検量線を作製した。

結果

VJ-41 は Sm および DSPC であるジパルミトイルホスファチジルコリン(di-16:0-PC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(di-18:0-PC)と特異的に反応した。そして、1個あるいは2個の不飽和脂肪酸をもつホスファチジルコリン(PC)、およびその他のリン脂質とも全く反応しなかった。

また、VJ-41 は di-16:0-PC, Sm と 0.05 μ g 以上でよく反応し、1.0 μ g までの検量線は直線的に漸増した。

考察

VJ-41 は Sm および飽和脂肪酸含有 PC と特異的に反応し、不飽和脂肪酸含有 PC とは反応しなかった。また、VJ-41 は DSPC, Sm と 0.05 μ g 以上で反応を示し、各々の検量線は1 μ g まで直線的に増加した。これは、従来の酢酸銅-リン酸試薬を用いた薄層クロマトグラフィー(TLC)による定量法に比べ 1/10 のサンプル量で検出可能であった。

VJ-41 は、微量サンプルで DSPC と Sm を特異的かつ高感度に定量が可能であり、胎仔ラット肺および羊水中の DSPC と Sm の測定に応用できると考えられた。

【正常胎仔ラットの子宮内発達に伴う肺と羊水の DSPC と Sm の経時的変化】

材料と方法

妊娠した Sprague-Dawley ラットから、妊娠 12 日、14 日、16 日、18 日、20 日目に羊水と胎仔肺を回収した。羊水は細胞成分を遠心除去した後、クロロホルム/メタノールの溶媒系を用いて、脂質を抽出した。摘出肺は細切した後凍結乾燥し、クロロホルム/メタノール/水の溶媒系を用いて脂質を抽出した。VJ-41 を用いた TLC-イムノステイニング法で DSPC および Sm の定量を行った。

結果

胎齢 12 日目で肺と羊水に DSPC および Sm が検出され、両者とも胎齢 16 日から 18 日目にかけて急激な増加を示した。羊水では DSPC は同胎齢の Sm に比べ著しく減少しており、特に胎齢 20 日目ではその差は顕著であった。

考察

正常胎仔ラット肺の DSPC と Sm は胎齢 12 日目で検出され、この時期に肺でサーファクタ

ント合成が行われていることが判明した。肺の DSPC は胎齢 16 日から 18 日目にかけて急激に増加しており、急速な肺の成熟が示唆されるが、羊水中の DSPC は胎齢 16 日目から漸減し、肺の DSPC の増加を反映しなかった。以上よりヒト胎児と異なり、ラットでは胎仔の肺内の DSPC は羊水には移行されないことが示された。

【ニトロフェン投与による CDH モデルラットの作製】

材料と方法

妊娠 9 日目の Sprague-Dawley ラットに、体重 1kg 当たり 250mg のニトロフェンを胃内に強制経口投与した。妊娠 20 日目に母獣より胎仔を回収した。胎仔の体重測定し、横隔膜欠損の有無を確認した後、肺を摘出し重量を測定し、肺重量/体重比を求めた。

結果

合計 103 匹の胎仔を回収し、44 匹に横隔膜の欠損を認め、左側横隔膜の欠損は 15 匹、右側横隔膜の欠損は 25 匹、両側欠損は 3 匹、胸骨後部の欠損は 1 匹に認めた。ニトロフェン投与群ではヘルニアの有無にかかわらず左右肺のそれぞれの肺重量/体重比は対照群に対して有意に減少していた。CDH 胎仔ラットの左右の肺ともに重量的発育不全が顕著であった。

考察

ニトロフェンの催奇形性には横隔膜ヘルニア、肺低形成、心血管奇形、水腎症などがあることが明かになっている。マウス・ラット胎仔に横隔膜ヘルニアが発生する頻度と、横隔膜の欠損部位の偏在性はニトロフェンの投与時期と投与量に密接に関連している。本研究では、胎仔に左側横隔膜ヘルニアを誘発するため妊娠 9 日目にニトロフェンを投与した。CDH 胎仔の左右各々の肺重量/体重比は、有意に減少しており、横隔膜欠損側の肺のみならず反対側の肺も低形成であることが示唆された。これは重症のヒト CDH において患側肺のみならず反対側の肺にも低形成が認められることと一致する。

【CDH 胎仔ラットの肺と羊水の DSPC と Sm の変化および肺組織中の DSPC と Sm の局在】

材料と方法

胎齢 20 日目のニトロフェン投与群の胎仔肺と羊水から脂質を抽出し、VJ-41 を用いた TLC-イムノステイニング法で DSPC および Sm の定量を行った。また、胎齢 20 日目の胎仔肺の一部はヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) し、一部は凍結包埋した後、VJ-41 と蛍光抗体を用いて免疫組織染色した。

結果

CDH 胎仔肺の DSPC は、対照群の 65.9% に減少しており、CDH 無形成胎仔の肺の DSPC は対照群の 85.1% に減少していた。しかし、いずれも胎齢 18 日目の正常胎仔肺の DSPC より増加していた。ニトロフェン投与群の胎仔肺の Sm はヘルニア形成の有無に関わらず、対照群とほぼ同じ値を示した。ニトロフェン投与群の羊水の Sm は、対照群の約 28.0% まで減少しており、DSPC は検出されなかった。

HE 染色では対照群の肺胞腔は十分に拡張しており肺胞壁は薄く、免疫組織染色では、抗原が主として肺胞表面に均一な層状に分布しているのを認めた。一方、CDH 胎仔ラットでは、

HE 染色で肺胞腔は狭小化し、肺胞壁は肥厚しており、免疫組織染色では、抗原が肺胞表面には分布しておらず肺胞壁の細胞内に凝集しているのが認められた。

考察

本研究では、ニトロフェン投与群の胎仔肺の DSPC は対照群より減少しているが、胎齢 18 日目の正常胎仔肺の DSPC より増加しており、ニトロフェン投与群のサーファクタントは在胎後期に生合成される可能性があることが示唆された。胎仔ラットでは肺内の DSPC は羊水中に分泌されにくいため、羊水中の DSPC は胎仔肺の成熟度の評価には適していないと考えられる。

組織学的には、ニトロフェン投与群の胎仔の両側の肺に肺胞腔の狭小化、肺胞壁の肥厚が認められ、肺低形成の所見に一致した。VJ-41 を用いた免疫組織染色において、対照群ではサーファクタントが肺胞表面に一様に拡散しているのに対し、ニトロフェン投与群では、サーファクタントが肺胞上皮細胞の細胞質内に認められ、細胞外には認められなかった。以上より、ニトロフェンは肺胞上皮細胞内でのサーファクタントの合成系は抑制しないが、サーファクタントの肺胞上皮細胞外への分泌過程を抑制していると結論される。

【結 語】

1. モノクローナル抗体 VJ-41 は飽和脂肪酸含有リン脂質と特異的に反応し、DPPC および Sm の高感度定量への応用が可能であった。
2. 正常胎仔ラットの肺では、胎齢 12 日目で DSPC は合成されており、胎齢 16 日目以降に急増した。しかし、肺内の DSPC は羊水中へほとんど分泌されないことが明らかとなった。
3. ニトロフェンを妊娠ラットに強制経口投与することで、胎仔の両側の肺に肺低形成を伴う CDH を誘導することが可能であった。
4. 胎齢 20 日目のニトロフェン投与群の胎仔ラットの肺の DSPC は対照群より減少していたが、胎齢 18 日目の正常胎仔ラットよりは増加しており、DSPC の合成系は抑制されていないことが示された。
5. DSPC および Sm は、対照群では肺胞表面に一様に広く分布しているが、ニトロフェン投与群では肺胞上皮細胞内に凝集しており、肺胞腔への分泌は認められなかった。
6. 以上より、ニトロフェンはサーファクタントの主成分である DSPC の合成は抑制せず、DSPC の細胞外への分泌を抑制することが明らかとなった。