

主論文の要約

**Amniotic lamellar body count and congenital
diaphragmatic hernia in humans and in a rat model**

〔 ヒトとラットモデルにおける先天性横隔膜ヘルニアと
羊水中ラメラ体計測 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 健康社会医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

渡部 百合子

【緒言】

先天性横隔膜ヘルニア(congenital diaphragmatic hernia; CDH)は 2500 から 5000 出生に 1 例の割合で発生する疾患である。発生途中で横隔膜の欠損が生じ、腹腔内臓器が胸腔内に陥入することによって、肺の低形成や肺高血圧が生じる。それらが出生後の予後不良因子となる。出生後の治療をより良くするためには、胎児期に CDH の予後を予測するための正確な予測因子が必要となる。現在までのところ、超音波検査や核磁気共鳴画像法(MRI)を使用した予測因子が提案されているが、標準的な方法はまだ確立されていない。

ラメラ体とは、II型肺胞上皮細胞から肺胞腔へ分泌される界面活性物質である。胎児の肺成熟度を予測する因子としての報告がある。ラメラ体の大きさは血小板とほぼ同じであるため、自動血球計測機では血小板の値がラメラ体数(LBC)とみなすことができる。

今回我々は、CDHによって胎児の肺低形成が起こった場合、羊水中のラメラ体数が少なくなると仮説をたて、胎児肺低形成の予測マーカーとして羊水中ラメラ体が有用であるかどうかの検討を行った。また、肺成熟の予測因子でもあるため、CDH症例が正常症例と比較して、肺の成熟が同等であるかどうかを検討した。

【方法】

・臨床症例

2006年10月から2011年10月までの期間に名古屋大学病院で出生した、出生前から診断のついていたCDH 30症例を検討(Figure 1)。11症例を除外し、生存症例(n=16)、死亡症例(n=3)で検討した。羊水は帝王切開中採取し、自動血球計測器で計測した。

・Nitrofen-Induced CDHラットモデル

妊娠9日目のSDラットに、オリーブ油1mlに溶解したニトロフェン(100mg)を経口投与して胎仔のCDHモデルを作成する。妊娠21日目に帝王切開を行い、羊水と胎仔の肺組織を採取して、羊水中LBCと肺重量を計測した。羊水中LBCはBuker-Turk血球計測板を用いて、光学顕微鏡で計測した。胎児肺組織からタンパクを抽出し、ウェスタンブロット法でABCA3蛋白の発現を検討した。

ラット羊水中と肺組織中のラメラ体を、超薄切片を透過型電子顕微鏡で確認した。

・すべての統計処理にはSPSSを使用し、有意水準は5%とした。

【結果】

・ヒト CDH における予後因子

CDH 症例の背景と出生前の所見は Table 1. に示した通り。正常な胎児 MRI から算出した週数に応じた胎児肺体積(fetal lung volume:FLV)と、実際に MRI 上で計測した胎児肺体積の比を%表示したものを%FLV とした。%FLV と LBC は、生存症例の

方が死亡症例よりも有意に高値であった。そこで、生存症例(n=16)において、LBC と %FLV が出生後の一酸化窒素(NO)治療(n=12)や extracorporeal membrane oxygenation (ECMO)治療(n=4)の必要性を予測する因子となりうるかを検討した。LBC は NO や ECMO 治療を必要とした群の方が、必要としなかった群よりも有意に低値であった($1.5 \pm 0.6 \times 10^4/\mu\text{L}$ vs $2.4 \pm 0.4 \times 10^4/\mu\text{L}$ NO 治療; $P=0.010$ 、 $1.2 \pm 0.4 \times 10^4/\mu\text{L}$ vs $1.9 \pm 0.6 \times 10^4/\mu\text{L}$ ECMO 治療; $P=0.049$, 各々)。また、%FLV は NO や ECMO 治療を必要とした群の方が有意に低かった(73.2 ± 28.3 vs 24.4 ± 11.7 NO 治療; $P=0.002$ 、 13.9 ± 7.5 vs 44.2 ± 27.2 ECMO 治療; $P=0.008$, 各々)。次に LBC と %FLV の値を散布図にプロットしたところ(Figure 2)、有意な正の相関を認めた。

・ラット CDH モデル

ラット実験において、我々は羊水と肺組織を胎生(E)21 日目の新生仔から採取し、羊水中(Figure 3a)と肺胞Ⅱ型上皮細胞(Figure 3b)にラメラ体が存在していることと、それらがヒト羊水中のラメラ体とほぼ同じ大きさ(直径 1~2 μm)であることを確認した。ニトロフェンを 100 mg 投与した妊娠ラットから出生した胎仔のうち、CDH の割合は 48.8%(125 胎仔中 61 胎仔)で、過去の報告通りであった。LBC と肺重量は CDH 群の方がコントロール群よりも有意に低値であった (Figure 4a, 4b)。肺重量当たりの LBC はコントロール群と CDH 群ではほぼ同等であった($25.3 \pm 1.591 \times 10^3/\mu\text{L}$ vs $34.6 \pm 15.2 \times 10^3/\mu\text{L}$; $P=0.544$)。

E21 日で採取した胎児肺組織中において、ABCA3 の発現をウェスタンブロット法で確認した(Figure 5a)。ABCA3 の発現はコントロール群と CDH 群では有意な差は認められなかった。

【考察】

肺低形成は CDH を持った新生児の致死率や罹病率の原因となりうる。そのため、胎児肺体積の正確な予測が必要となる。この研究で、LBC と %FLV は CDH の生存症例と死亡症例において、有意な差があることがわかった。超音波検査を使用した LHR(lung-to-head ratio)は生存の予測に有効であるとの報告があるが、今回の結果では有意差はなかった。超音波検査は、胎児の位置や母体の肥満、羊水過多などで制限され、検者間での誤差も存在する。%FLV は FLV よりも有用な、予後予測因子になりうる。

羊水中の LBC は胎児肺成熟の予測因子であり、血球計測機を使って客観的な値が出る。今回、35 週以降に出産した CDH の生存症例は、LBC が有意に高値であり、LBC は %FLV と有意な正の相関がある。この観点から、LBC は 35 週以降の出生児において、生死の予測因子だけでなく、肺低形成の予測因子となりうるかと推測した。ラメラ体は肺胞Ⅱ型上皮細胞から分泌されるサーファクタント貯蔵物質であり、LBC は子宮内でのサーファクタント産生を測定でき、胎児の肺が成熟しているのであれば、胎児

肺体積を予測できる。

ラットモデルで、羊水中と肺胞Ⅱ型上皮細胞にラメラ体が存在し、その大きさがヒトのラメラ体と同程度であることを、電子顕微鏡を用いて確認した。光学顕微鏡で計測した場合と標準的な血球計測機で計測した場合では、ヒト検体のラメラ体数には差がないことが報告されている。そのため、今回、ラット検体のラメラ体は、光学顕微鏡を使って計測した。

我々のラットモデルでは、CDH 群はコントロール群と比べて胎仔の肺重量が有意に軽く、羊水中 LBC も有意に少なかった。また、単位肺重量当たりの LBC は CDH 群とコントロール群ではほぼ同等だった。そのため、ラット CDH モデルでも、ヒト症例と同様に、羊水中 LBC は胎仔の肺重量と相関していると言える。次いで、胎仔の肺成熟度を確認するために、胎仔肺組織中の ABCA3 の発現をウェスタンブロット法で確認した。ABCA3 タンパクは肺胞Ⅱ型上皮細胞中のラメラ体の膜に局限して発現しており、肺サーファクタントの代謝などに重要な役割を果たしている。今回、CDH 群と normal 群の胎仔肺組織中の ABCA3 の発現は同等であった。このことよりヒトでもラット CDH モデルでも、非 CDH 症例と比較して肺の成熟度は変わらないことが示された。

【結論】

LBC は妊娠 35 週以降のヒト CDH 症例において、肺低形成を予測するのに有効である可能性がある。LBC は素早く、安価で計測でき、客観的な値を示すことができる。また、ヒト CDH とラット CDH モデル両方において、胎児の肺成熟は正常群と同等である。羊水中 LBC は CDH 症例の予後を予測するだけでなく、出生後の呼吸管理の必要性について予測するための新たな方法となると考えられる。