

主論文の要旨

**Hydrogen-rich water ameliorates
bronchopulmonary dysplasia (BPD) in newborn rats**

高濃度水素水は新生児ラットにおける
bronchopulmonary dysplasia (BPD)を改善する

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 小児科学分野

(指導：小島 勢二 教授)

村松 友佳子

【緒言】

bronchopulmonary dysplasia (BPD)は、早産児の慢性肺疾患で、未熟さ、炎症、酸素毒性、人工呼吸器による容量負荷といった新生児特有の様々な要因や、絨毛膜羊膜炎や酸化ストレスといった胎児期の要因により、肺の成長が障害された状態で、長期的な精神運動発達への影響も懸念される疾患である。肺の発生は、embryonic stage、pseudoglandular stage、canalicular stage、saccular stage、alveolar stage に分かれる。saccular stage の最後に始まる肺胞中隔の形成が最も重要であり、saccular stage から alveolar stage にかけて二次中隔が形成される事で一つ一つの肺胞のサイズが小さくなり、数が増えていく。在胎 24 週から 28 週の胎児の肺はちょうど canalicular stage から saccular stage に移行するため、この時期に絨毛膜羊膜炎などの要因が加わると、肺胞組織の成長が停止し、出生する早産児は BPD になるリスクが高くなる。

一方、分子状水素がラット脳梗塞モデルに有効であることが 2004 年に報告されて以来、酸化ストレス病態や炎症病態を中心に 60 種類のモデル動物ならびに 10 種類のヒト疾患において分子状水素の有効性が報告されてきた。肺疾患に関しては、虚血再還流や酸素、換気、LPS、パラコート、喫煙等による肺損傷に対して、分子状水素の有効性が示されている。周産期疾患においては、モデル動物において低酸素脳症や LPS による胎児肺障害、子癇前症への効果が示されている。高濃度水素水の副作用はこれまでに報告されていない。

本研究では、lipopolysaccharide (LPS)を妊娠ラットに投与することにより絨毛膜羊膜炎を起こした BPD モデルを作成し、高濃度水素水を母獣に経口摂取させ、分子状水素による BPD の治療効果を検討した。

【方法】

本研究におけるすべての動物実験は、本学の動物実験委員会の許可を得て行った。妊娠 Sprague-Dawley rat を生理食塩水投与+コントロール水飲水（コントロール群）、LPS 投与+コントロール水飲水（LPS 群）、LPS 投与+高濃度水素水飲水（LPS+H₂群）の 3 群に分けた。母獣には妊娠 9.5 日（E9.5）から高濃度水素水を自由飲水させた。E16.5 の母獣を麻酔下で開腹し、LPS 1 μg または生理食塩水を各羊水腔内に投与し、閉腹した後、満期で自然分娩させ、仔を BPD モデルとした。子宮内胎児死亡（IUFD）率、日齢 14（P14）までの仔の生存率、P7 と P14 の体重を調べた。

P1、P7、P14 の仔ラットを安楽死後、P7 と P14 では肺組織標本を作製し、HE 染色、nitrotyrosine 染色、8-OHdG 染色を行った。HE 染色では、肺の形態評価として Mean Linear Intercept (Lm)を計測した。P1 の肺組織をホモジェナイズし、RT-PCR 法により FGFR4、VEGFR2、HO-1、SOD1 の遺伝子発現量を測定した。また、LPS 投与 24 時間後の E17.5 の胎盤を摘出し、タンパクを抽出し、ELISA により TNF α、IL-6 の発現量を調べた。

また培養細胞においても、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞である A549 細胞を LPS 処理し、10%水素もしくは 10%窒素コントロール環境下で培養し、ROS 産生に対する分子

状水素の効果を検討した。

【結果】

IUFD 率はコントロール群 3/43 (7%)、LPS 群 31/60 (52%)、LPS+H₂ 群 27/61 (44%) であり、群間で有意差を認めなかった。同様に P14 までの仔の生存率や、P7 と P14 の体重も、群間で差を認めなかった (Fig. 1)。

肺組織標本の HE 染色では、LPS は Lm を増大させたが、高濃度水素水投与により改善がみられた (Fig. 2AC)。酸化ストレスマーカーである nitrotyrosine、8-OHdG についても同様に水素水投与により減少が認められた (Fig. 2DI)。

肺組織の RT-PCR では、LPS は FGFR4、VEGFR2、HO-1 の発現を低下させたが、高濃度水素水投与により改善がみられた (Fig. 3A)。SOD1 については明らかな影響が見られなかった (Fig. 3A)。ELISA では LPS により若干の TNF α の上昇と、有意な IL-6 上昇を認め、高濃度水素水投与により改善がみられた (Fig. 3B)。

培養細胞においても、LPS 添加は A549 細胞の ROS 産生を上昇させたが、10%水素環境で培養した細胞では、LPS 投与、非投与の双方において細胞内 ROS の産生を低下させた (Fig. 4)。

【考察】

E16.5 ラットにおける LPS の羊水腔内投与は、仔の肺に BPD をもたらした。さらに、肺組織において nitrotyrosine や 8-OHdG といった酸化ストレスマーカーを上昇させた。E9.5 からの母獣の高濃度水素水経口投与は、これらの肺組織の形態異常や酸化ストレスを軽減した。しかしながら IUFD 率は改善させなかった理由としては、LPS により重度の障害を受けた個体については水素の効果は認めないためかもしれない。

VEGFR2 は肺胞構造の維持に重要な役割を果たしており、この現象は肺の成長停止、内皮細胞や間葉細胞のアポトーシスと関連しているとの報告がある。FGFR4 は肺胞の二次中隔形成に重要である。LPS の羊水腔内投与は P1 の肺におけるこれらの遺伝子の発現を抑制し、P7 や P14 における肺胞サイズを増大させたが、高濃度水素水は抑制された VEGFR2 や FGFR4 の遺伝子発現を改善し、それにより肺組織像も改善した。

分子状水素の効果は、当初 radical scavenger として報告されてきたが、水素分子は非常に小さく、飲水 15 分後には体や細胞から抜け出してしまうため、signal modulator としての効果を我々は考えている。BPD においても酸化ストレスの関与が言われているが、A549 を用いた培養細胞の実験においては水素により ROS 減少効果が認められ、同様に高濃度水素水は仔の肺組織の HO-1 や SOD1 の抗酸化遺伝子発現を上昇させた。BPD における水素の効果は radical scavenger と signal modulator の両方が関わっていると考えられる。

【結論】

妊娠ラットの経口高濃度水素水は、出生した新生児ラットにおける BPD を改善する。