

主論文の要旨

Antenatal Saireito (TJ-114) Can Improve Pulmonary Hypoplasia and Pulmonary Vascular Remodeling in Nitrofen-Induced Congenital Diaphragmatic Hernia

〔 ニトロフェン誘発先天性横隔膜ヘルニアラットモデルにおいて、
出生前柴苓湯投与が肺低形成と肺血管リモデリングを改善する 〕

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

(指導：吉川 史隆 教授)

平光 志麻

【緒言】

先天性横隔膜ヘルニア(Congenital Diaphragmatic hernia ; 以下CDH)は、横隔膜の形成不全により腹腔内臓器が胸腔内に脱出する疾患である。胎児期からの肺低形成と肺高血圧を病態とし新生児治療に抵抗性を示すことから胎児治療に期待がかかる。

現在CDHに対する胎児治療として子宮鏡下胎児気管閉塞術が試みられており、その効果が期待される。しかし母体への侵襲が大きく早産や破水の危険性もあるため、より低侵襲な予防法が期待される。

ニトロフェン(2,4 - ジクロロフェニル - 4' - ニトロフェニルエーテル)は、器官形成期の妊娠母獣ラットへの投与により50%程度の仔にCDHが発症することが知られている。作用メカニズムは明らかではないが、ニトロフェン誘発CDHラットモデルはヒトCDHに病態が類似した確立された動物モデルである。

この動物モデルを用いた肺低形成に対する胎児治療としてレチノイン酸やステロイドなどの報告がある。しかし副作用の為、妊娠中の投与は難しい。

柴苓湯は、12種類から構成される生薬であり、五苓散(蒼朮3g、茯苓3g、猪苓3g、桂皮2g、沢瀉5g)と小柴胡湯(柴胡7g、黄芩3g、人参3g、半夏5g、大棗3g、生姜1g、甘草2g)の合剤である。作用機序として、副腎皮質刺激ホルモンの分泌を促進し内因性ステロイドである糖質コルチコイドを高める作用がある。柴苓湯は幅広い作用をもち、抗炎症作用や利尿作用、線維化抑制作用、抗酸化作用などがあり妊娠中にも安全に使用できる。

今回我々は、より低侵襲な胎児治療として柴苓湯に着目しニトロフェン誘発ラットCDHモデルの母獣に柴苓湯を投与することで胎仔肺低形成が予防できるかを検討した。

【方法】

妊娠9日目のSprague-Dawley rat(SDラット)にニトロフェン100mgをオリーブオイル1mlに溶解し経口投与しCDHモデルを作成した。

このモデルに柴苓湯800mgを妊娠10日目より母獣に連日経口投与し柴苓湯治療群(CDH+S群)、柴苓湯を投与しないニトロフェン単独群(CDH群)、ニトロフェンも柴苓湯も投与しないコントロール群(N群)の3群に分け、妊娠21日目に帝王切開で娩出しCDHの有無を確認した。CDHを発症した新生仔のみを対象とした。

評価項目は、CDH発症率、CDHを発症した胎仔の肺重量/重量比、胎仔の呼吸機能(血液ガス分析)、HE染色による肺組織学的評価、終末細気管支分岐数、Elastica van Gieson染色による肺血管組織学的評価、肺動脈壁厚評価とした。

血液ガス分析は、出生5分後の新生仔を断頭し全血を100 μ l採取しiSTATカートリッジに注入後、iSTATアナライザーで計測した。終末細気管支分岐数はRadial Saccular count(RSC)で評価し、肺動脈壁厚は、Medial Wall Thickness (%) (壁厚 \times 2/外径 \times 100)で評価した。肺動脈数は、大血管を除き1視野当たり肺血管数を評価した。

また、ホルマリン固定しパラフィン包埋した肺組織におけるエンドセリン-1および

エンドセリン受容体 A,B の免疫組織染色およびのエンドセリン受容体 A,B の Real time quantitative PCR を (Table 1) で検討した。

【結果】

ニトロフェンを投与した胎仔のCDH発症率は、柴苓湯投与群で有意に低下した (Table 2)(S群25% vs N群45.5%、 $p<0.001$)。CDHを発症した胎仔の肺重量は、CDH群で減少し柴苓湯群で有意な改善を認めた (Figure 1A)。

出生後5分の新生仔血液ガス分析では、柴苓湯群でpHとPCO₂において有意な改善を認めた (Figure 1B-E)。

肺HE染色では、CDH群で肺胞化が減少し柴苓湯群でその改善がみられた。RSCは、CDH群で減少し柴苓湯群で増加を認めた (Figure 1F-I)($p<0.01$)。

肺血管のElastica van Gieson染色でCDH群における肺動脈壁の肥厚が確認され、Medial Wall Thickness(%)でCDH群での増加を認めた。また、柴苓湯投与群での改善を認めた ($p<0.01$) (Figure 2A-H)。肺血管数においてはCDH群で減少し柴苓湯群で改善傾向を認めた (Figure 2G)。

肺動脈におけるエンドセリン-1及びエンドセリン受容体Aの免疫組織染色は、CDH群で強く発現し、CDH+S群で減少した。また肺組織におけるエンドセリン受容体AのPCRは、CDH群で有意に増加しCDH+S群で低下した ($p<0.05$)。エンドセリン受容体Bは有意な変化はみられなかった (Figure 2I-S)。

【考察】

ラットCDHモデルにおいて、柴苓湯の出生前投与によりCDH発症率の低下、肺重量の低下、新生仔呼吸機能の改善、肺胞構造の改善、肺血管構造の改善を認めた。肺血管におけるエンドセリン-1の発現は、CDH群で増加し柴苓湯投与により改善した。

柴苓湯は、臨床的に妊婦の浮腫に用いられるなじみある漢方薬である。また、その作用として糖質コルチコイド産生を促進することが知られ、その他抗酸化作用もみられる。

ニトロフェンの作用メカニズムは不明だが、器官形成期に母獣に投与すると胎仔に肺低形成と肺高血圧を伴う横隔膜ヘルニアを高率にきたすことが知られ、確立したモデルとして広く用いられている。ニトロフェン誘発CDHモデルの発生病態は不明だが、病因としてレチノイン酸合成障害の報告が多い。CDHラットモデルにレチノイン酸を胎児期に投与すると、CDH発症率の低下や肺血管構造の改善、肺の成長が促進された報告がある。柴苓湯がニトロフェン活性に対し抑制的に作用し発症率や肺低形成、肺高血圧を軽減させた可能性が考えられた。中でも12種類ある構成生薬のうちステロイド様作用を持つ人參、柴胡、甘草が強く寄与したと考えられた。

エンドセリン-1は、血管収縮作用を有し血管リモデリングに重要な役割を担う。また、活性酸素種や抗アポトーシス効果もみられる。エンドセリン受容体Aは、血管平滑筋細胞に発現し強力な収縮作用を示し、エンドセリン受容体Bは、血管平滑筋や内

皮細胞に発現し血管拡張作用を有する。今回、柴苓湯治療によりエンドセリン受容体A選択的に作用し肺血管リモデリングの軽減に寄与したと考えられた。

【結論】

ニトロフェン投与で誘発したラットCDHモデルにおいて、出生前の柴苓湯投与は、肺低形成及び肺血管リモデリングの改善を認め、結果として呼吸機能が改善した。柴苓湯がCDHに対する有用な胎児治療としての可能性が示唆された。