

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591283

研究課題名（和文） 新生児慢性肺疾患の重症度の早期診断に関する研究

研究課題名（英文） Early diagnosis about the severity of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants

研究代表者

高畑 靖（TAKAHATA YASUSHI）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40457429

研究成果の概要：

気管支肺異形成 BPD（もしくは新生児慢性肺疾患）とは、呼吸窮迫症候群などの呼吸障害のために人工換気療法をうけた早産児の一群に認められる、慢性的な肺の病変である。2001年に国際的に提唱された定義では、「在胎 32 週未満の早産児では、修正 36 週または退院前までに 21% を越える酸素療法を 28 日以上必要とした児」とあり、その酸素依存度により重症度分類がされている。BPD は退院後も在宅酸素療法を必要とする場合もあり、医療経済を考慮する上でも重要な疾患である。BPD の病因は多因子であり、酸素投与による酸化ストレス、圧損傷、容量損傷、炎症メディエーターによる生物学的損傷などが考えられているが、肺局所での解析やその経時的な変動については解明されていない。

そこで我々は BPD の臨床像の把握や疾患予後の予見に役立てるために、胸部 CT 所見を集積して画像所見の重症度を評価するスコアシステムを開発した。また、気管洗浄液中細胞で TGF- β 1、IL-10、および IFN- γ の遺伝子発現が高い児は、BPD 罹患が多いことを見出した。さらに、出生時より経時的に血液検査所見を追跡し、慢性期の白血球数（とりわけ好中球数）が高い児ほど BPD 罹患が多い傾向を認めた。出生時より続く慢性的な炎症が BPD の発症に関連があることが予測されたが、同時に採取した血清のサイトカイン・ケモカインを網羅的に定量した解析では有意な関連は見いだされなかった。今後も症例の集積を進めると同時に、新たに酸化ストレスマーカー、血球遊走因子、血管内皮障害因子との関連についても解析を行う予定である。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胎児・新生児医学

キーワード：未熟児医学、CLD

新生児慢性肺疾患、極低出生体重児、サイトカイン、flow cytometer

1. 研究開始当初の背景

我が国の新生児医療は、世界のトップレベルにあり、早産児を含めた新生児の生命予後は、年々改善してきている。その一方でこれらの児の長期予後を左右する因子として脳室周囲白質軟化症、未熟児網膜症、新生児慢性肺疾患などの合併症が大きな問題となっている。慢性肺疾患は呼吸器症状が長期間持続するために、入院が長期に及び、退院後も薬物療法や在宅酸素療法、在宅人工換気療法を必要とすることがある。また反復性呼吸器感染、気管支喘息などにより再入院する頻度も高い。このように児のQOLのみならず、医療効率を考える上でも重要な疾患である。

2. 研究の目的

慢性肺疾患は、内因性要素として肺組織の未熟性、抗酸化機構の未熟性、易感染性など、外因性要素としては、酸素投与による酸素毒性、人工換気療法による圧損傷、容量損傷などがある。肺組織の障害に基づく炎症は、様々なサイトカインを誘導し、患児の気管洗浄液には、IL-1、IL-2、IL-6、TNF- α といった proinflammatory cytokine、IL-8 などの chemokine、ICAM-1 などの接着因子が気管洗浄液中に高濃度で存在することが証明されている。低出生体重児（とくに 1500g 未満の低出生体重児）は、一旦発症した慢性肺疾患により呼吸障害が持続するが、成人で一般的に行われる肺機能検査を行うことは困難である。このため、重症度を客観的に評価することが難しく、長期的な予後の予測は不可能な状況である。そこで、本研究の目的は、全身および重症化に特異的にかかわる因子とその機序を明らかにするとともに、胸部 CT による重症度の評価法を確立し、重症化の予測および予後の予測を可能にすることである。

3. 研究の方法

九州大学病院周産母子センターに入院し、人工呼吸管理を受けた早産児を対象とする。但し、先天性心臓病、染色体異常などの先天奇形の児を除くものとする。対象患者の両親に対しインフォームドコンセントをとり研究の承諾を得る。

臨床記録の収集

研究にエントリーされた患者の臨床像を把握するために診療録より臨床dataを収集する。在胎週数、出生体重、性別、Apgar Score、呼吸急迫症候群の合併の有無、人工換気療法の種類および期間、酸素投与日数、慢性肺疾患

の合併の有無、慢性肺疾患の型・重症度、母体の前期破水の有無、絨毛膜羊膜炎の有無などを記録する。

検体の採取

人工呼吸開始後直ちに、気管気管支洗浄を行う。生理食塩水0.5mlを気管内チューブ内に入れ、パギングを行い、吸引チューブにより気管内洗浄液を回収する。抜管まで毎日、気管洗浄液の採取を行う。回収した気管洗浄液は、直ちに室温で遠心分離（3000回転10分間）を行い、上清と細胞に分離する。上清は解析まで、-80℃で保存する。細胞は、cDNA作成まで-80℃にて保存する。入院時、7、14、28生日に、ルーチン検査の際に血清を保存し、測定まで-30℃で保存する。

RNAの抽出およびcDNAの作成

凍結細胞に1mlのIsogenを加え室温に5分間静置し、0.2mlのchloroformを加えた後に12000rpm、15分、4℃で遠心分離する。水層を回収し0.5mlのchloroformを加え、12000rpm、1分で遠心し再び水層のみを回収する。これに0.5mlのisopropanolを加えた後、12000rpm、15分、4℃で遠心する。沈殿に75% ethanolを1mlを加え、遠心後上清を捨て、乾燥後、8 μ lのRNA free Waterにて溶解する。その後、65℃10分間加熱し、急速氷冷し、Reaction Mix 5 μ l、DTT 1 μ l、N⁶primer 1 μ lを加え、37℃で1時間incubateし、cDNAを作成し、測定まで-20℃で保存する。

real time RT-PCR法によりサイトカインのmRNAの発現量の測定

で作成したcDNAをABI PRISM 7700 Sequence Detectorを用い、PCR反応を行う。ControlはPHA刺激したヒトリンパ球より作成したcDNAを用いる。この際、蛍光標識したprimerを用い、目的とするサイトカインのcDNAを増幅する。増幅曲線が立ち上がるcycle数は、mRNAの発現量に比例し、同時に測定するcontrolにより作成した検量線より定量する。

胸部CT、レントゲン検査の読影および重症度評価法の確立

対象患者が、修正週数 36 週～42 週となった時点（退院前）に、慢性肺疾患の評価として、胸部レントゲン検査およびCT検査を行う。胸部レントゲン写真は、仰臥位正面1枚、胸部CTはplainで撮影する。画像は、九州大学病院放射線科医師3名により独立して読影され、所見によりscore化し、その重症度を評価する（評価方法は5項を参照）。3者の所見のscoreを統計解析し、その重症度と関連し、普遍的に重症度を評価できるパラメーターを

抽出し、CTによる重症度の評価法を確立する。

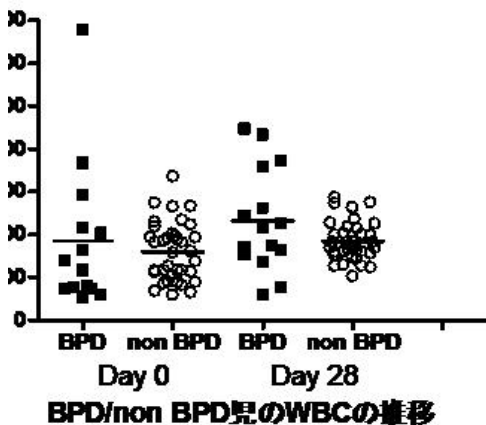
4. 研究成果

胸部 CT 所見を集積して画像所見の重症度を評価するスコアシステムを開発した。また、気管洗浄液中細胞で TGF-β1、IL-10、および IFN-γ の遺伝子発現が高い児は、BPD 罹患が多いことを見出した。さらに、出生時より経時的に血液検査所見を追跡し、慢性期の白血球数（とりわけ好中球数）が高い児ほど BPD 罹患が多い傾向を認めた。出生時より続く慢性的な炎症が BPD の発症に関連があることが予測されたが、同時に採取した血清のサイトカイン・ケモカインを網羅的に定量した解析では有意な関連は見いだされなかった。

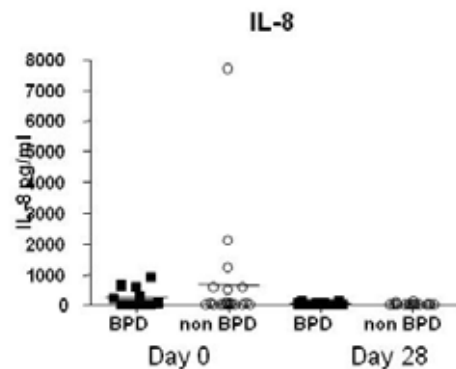
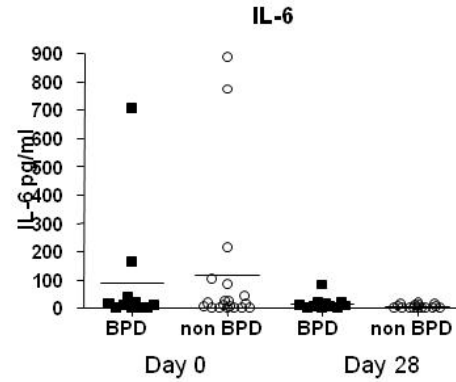
Table IV. Scoring of chest CT scan for BPD

Category	Variable	Score		
		0	1	2
Hyperexpansion	Hyperexpansion	None	Focal	Global
	Flattened pattern of lung expansion	None	Unilateral	Obvious
	Horizontal bulging	None	Unilateral	Obvious
Emphysema	Number of bullae or blebs	None	Single	Multiple
	Size of bullae or blebs	None	<5 mm	>5 mm
Pneumothorax	Triangular subpleural opacities	None	2 to 3 lobes	4 to 8 lobes
	Disruption and thickening of bronchovascular bundle	Mild	Moderate	Severe
	Consolidation	None	Unilateral	Obvious
Mediastinal impression		Mild	Moderate	Severe

極低出生体重児と慢性肺疾患の発症に関して、慢性肺疾患の発症と28生日（生後4週間）の白血球数の関係は、慢性肺疾患群は28生日の白血球数が有意に高いことがわかった。



その他出生時の血清中の IL-8 の高値と慢性肺疾患の発症との関連には明らかな傾向は認められず、28 生日の血清中の IL-8 の高低と慢性肺疾患の発症との関連も明らかな傾向はみとめられなかったが、症例数を増やしてデータ再検討中である。



5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計1件)

Ochiai M, Hikino S, Yabuuchi H, Nakayama H, Sato K, Ohga S, Hara T.

A new scoring system for computed tomography of the chest for assessing the clinical status of bronchopulmonary dysplasia. , J Pediatr.152:90-5,2008

〔学会発表〕(計4件)

第41回日本周産期新生児医学会総会演題 2005.7.10-12 福岡市

「慢性肺疾患の胸部 CT 所見 grading score の作成および臨床像との関連性の検討」

九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 落合正行 原 寿郎

九州大学病院周産母子センター

長友太郎 神田 岳 曳野俊治

福岡市立こども病院新生児科 高畑靖 中山英樹

独立行政法人国立病院機構九州医療センター 小児科 金城唯宗 関 真人 佐藤和夫

第 110 回日本小児科学会学術総会 2007.4.20-22 京都市
「新生児気管支肺異形成 BPD の新しい胸部 CT スコアシステム」
九州大学大学院医学研究院成長発達医学分野 落合正行 大賀正一 原寿郎
九州大学病院周産母子センター 小窪啓之 金城唯宗 曳野俊治
福岡市立こども病院新生児科 高畑靖 中山英樹
国立病院機構九州医療センター小児科 久保鋭治 佐藤和夫

25th International Congress of Pediatrics;
25-30, August 2007. Athes-Greece
A NEW SCORING SYSTEM OF CHEST
CT FOR ASSESSING THE CLINICAL
STATUS OF NEONATAL
BRONCHOPULMONARY DYSPLASIA
Masayuki Ochiai, Shunji Hikino,
Hidetake Yabuuchi, Hideki Nakayama,
Kazuo Sato, Shouichi Ohga, Toshiro
Hara

3rd Congress of Asian Society for Pediatric
Research; 6-8, October 2007. Tokyo
An effective scoring system of chest CT for
assessing the clinical status of neonatal
bronchopulmonary dysplasia
Masayuki Ochiai, Shunji Hikino, Hidetake
Yabuuchi, Hideki Nakayama, Kazuo Sato,
Shouichi Ohga, Toshiro Hara

6 . 研究組織

(1)研究代表者

高畑 靖 (TAKAHATA YASUSHI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 40457429

曳野 俊治 (HIKINO SHUNJI)
研究者番号 : 50346780
(2007 年度)

小窪 啓之 (KOKUBO TAKAYUKI)
研究者番号 : 40419544
(2008 年度)

(2)研究分担者

藪内 英剛 (YABUUCHI HIDETAKE)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号 70380623

福嶋 恒太郎(FUKUSHIMA KOUTAROU)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号 : 40304779

(3)連携研究者

落合 正行 (OCHIAI MASAYUKI)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号 : 90507782