

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17344

研究課題名（和文）血中一酸化炭素濃度とUGT1A1遺伝子変異を用いた早産児遷延性黄疸の増強予測

研究課題名（英文）Prediction of prolonged jaundice for preterm infant persistent using blood carbon monoxide concentration and UGT1A1 gene mutation

研究代表者

加藤 亮太（KATO, Ryota）

日本大学・医学部・助手

研究者番号：60838481

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、ヒト早産児の血中の超微量一酸化炭素（CO）の定量測定法を開発すること、血中CO濃度とUGT1A1遺伝子変異が生後2週間以降に黄疸が増強する早産児を予測するかを明らかにすることであった。早産児血中の超微量COの定量測定法を開発した。しかしながら、その臨床応用には、COの揮発性をコントロールするための工夫が必要と考えられた。また、生後2週間以降に黄疸が増強する早産児の臨床予測因子として、母乳栄養およびUGT1A1遺伝子変異を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児黄疸の原因であるビリルビンは、神経毒性を有し、アトローゼ型脳性麻痺や難聴を引き起こす（ビリルビン脳症）。生後2週間以降に黄疸が増強する早産児を未然に予測できれば、ビリルビン脳症の発症抑制に大きく寄与できるが、その予測方法がなかった。今回、その臨床予測因子として、母乳栄養およびUGT1A1遺伝子変異が明らかになった。出生直後にUGT1A1遺伝子変異の確認を行うというテーラーメイド診断を行い、早期治療を行うことで、早産児のビリルビン脳症の発症を予防できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to develop a quantitative measurement method for carbon monoxide (CO) in the blood of preterm infants, and to examine whether blood CO concentration and/or Uridine diphosphate glucuronosyltransferase1A1 (UGT1A1) gene mutation would develop jaundice after 2 weeks of age. We developed a quantitative measurement method for CO in the blood of preterm infants. However, for its clinical application, it was considered necessary to devise ways to control the volatility of CO. We also identified breastfeeding and UGT1A1 gene mutations (*6) as clinical predictive factors of preterm infants with jaundice after 2 weeks of age.

研究分野：新生児医学

キーワード：黄疸 早産児 UGT1A1遺伝子 一酸化炭素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生児黄疸の原因であるビリルビンは、神経毒性を有し、アテトーゼ型脳性麻痺や難聴を引き起こす(ビリルビン脳症とよぶ)。我々は、ビリルビン脳症を発症した早産児は、生後2週間以降に黄疸が増強するという臨床的特徴を明らかにしてきた(Morioka et al. *Brain Dev.* 2015)。生後2週間以降に黄疸が増強する早産児を未然に予測できれば、ビリルビン脳症の発症抑制に大きく寄与できるが、その予測方法がなかった。そこで、本研究の目的は、生後2週間以降に黄疸が増強する早産児の予測法を開発することであった。

そこで、我々は、ビリルビンの「産生」の増加と「排泄」の低下に着目した。この両者のマーカーを組み合わせれば、生後2週間以降に黄疸が増強する早産児を予測できると考えた。ビリルビンの「産生」の増加を検出するマーカーとして血中一酸化炭素(CO)濃度と「排泄」の低下を予見するマーカーとしてUDP-グルクロン酸転移酵素(UGT1A1)遺伝子変異を用いて検証することであった。そのために、ヒト早産児血中の超微量COの定量測定法を開発すること、血中CO濃度とUGT1A1遺伝子変異が、生後2週間以降に黄疸が増強する早産児を予測するかを明らかにすることを旨とするものであった。

2. 研究の目的

生後2週間以降に黄疸が増強する早産児の予測法を開発するために、

- (1) 生後2週間以降に黄疸が増強する早産児の臨床予測因子を明らかにする
- (2) 早産児血中の超微量COの定量測定法を開発する
- (3) 開発した血中COの定量値と血中ビリルビン値との相関性を検討する
- (4) 生後2週間以降に黄疸が増強する早産児のUGT1A1遺伝子アレルを含めた臨床予測因子を検討する

3. 研究の方法

(1) 生後2週間以降に黄疸が増強する早産児の臨床予測因子について

当院NICUに入院した出生体重1500g未満の早産児52人を対象とした。遷延性黄疸は、日齢14以降に光線療法を必要としたものと定義した。遷延性黄疸を発症した群と発症しなかった群の2群間で、周産期背景(出生体重、在胎週数、体格)とNICU入院後の臨床因子(日齢14までの総ビリルビン[TB]、アンバウンドビリルビン[UB]の頂値と頂値となった日齢及びその時の血清アルブミン値、初回の光線療法開始日齢、日齢14までの光線療法施行日数、母乳栄養の有無、経腸栄養開始・確立日齢)について後方視的に比較検討した。経腸栄養確立日齢は、100ml/kg/dayに到達した日齢と定義した。統計学的解析にはロジスティック回帰分析を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

(2) 共同研究者が開発したCOと高親和性に結合する分子“hemoCD”(Kitagishi et al. *Inorg Chem.* 2006)を用いて、ヒト早産児血中の超微量なCOを高精度に測定する方法を開発することとした。hemoCDは、非常に高いCO結合能を示すことが最大の特徴で、生体内のあらゆる部分から内在性COを捕捉することが可能である人工タンパク質である。我々は、すでにマウスの血液をhemoCDと混合し限外ろ過膜で分離し、分光法で定量できる血中CO定量測定系の開発に成功している(Kitagishi et al. *J Am Chem Soc.* 2016)ので、それをヒト早産児に応用し、血液中のCOを定量する系の作成を試みた。

(3) COはビリルビンと同時に、1:1モルで産生されるため、開発した血中COの定量値とUnaGで測定した非抱合型(間接)ビリルビンとの相関性を検討した。まず、UnaGを用いて、間接ビリルビンの定量を行った(Iwatani et al. *Sci Rep.* 2016)。濃度が明らかなビリルビン標準溶液を用いて様々な濃度の間接ビリルビン溶液にUnaGを30 μ L加えて、10分おいてから励起波長485nm、測定波長535nmで蛍光強度の測定を行った。横軸に間接ビリルビン濃度、縦軸に蛍光強度として検量線を作成した。血液サンプルの測定は4000rpm、20分遠心して上澄みの血漿を回収したのち、200倍にPBSで希釈し、その溶液200 μ LにUnaGを30 μ L加え、検量線の時と同様に蛍光強度の測定を行い、蛍光強度の値を検量線に当てはめることで間接ビリルビン量を求めた。倫理委員会の承認および研究に対するインフォームドコンセントを得て、早産児の血液21検体および成人血液6検体を解析した。なお、解析は採血1日後(day1)に行われた。

また、残余がある検体では、その後、1日おきにCO量を測定した(最大day3まで)。

(4) 在胎33週未満または1500g未満の院内出生の新生児90例を対象とした。日齢14以降における総ビリルビン(TB)10mg/dL以上の黄疸を晩期黄疸と定義し、対象を晩期黄疸あり群(30例)と晩期黄疸なし群(60例)の2群に分け、背景因子、周産期因子、合併症、母乳栄養、UGT1A1*6アレル頻度について、単変量・多変量解析で比較検討した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 生後2週間以降に黄疸が増強する早産児の臨床予測因子について

遷延性黄疸を発症した症例は、11人(21%)であった。両群共に全例母乳栄養であった。単変量解析で2群間において、日齢14日までのUB頂値(0.76 vs 0.6 μg/dL)及び頂値となった日齢(10 vs 4日)、日齢14までの光線療法施行日数(10 vs 4日)で有意差を認めた(p<0.05)。これらの項目で多重ロジスティック回帰分析を行った結果、遷延性黄疸に関連を認めた項目は、日齢14までのUB頂値となった日齢(オッズ比2.4[95%信頼区間1.21~4.77]、p<0.0001)、日齢14までの光線療法施行日数(オッズ比1.7[95%信頼区間1.11~2.63]、p<0.0017)であった。結論として、日齢14までのUB頂値時の日齢が遅いこと、光線療法施行日数多いことが出生体重1500g未満の早産児が生後2週間以降に黄疸が増強する臨床予測因子であることを明らかにした。

(2) 早産児血中の超微量COの定量測定法の開発

血液100 μlをPBS 200 μlで3倍希釈し、そこにoxy-hemoCDを、1.25 × 10⁻⁸mol加えて5分間静置したのち、限外ろ過膜付き遠沈管に移し、48000 rpmで20分間、遠心分離を行い、30 kDa以上の血液中のヘモグロビンなどのタンパク質成分を除き、30kDa以下のhemoCDのみを回収した。分離された透過液の吸収スペクトルを測定した。422 nmの吸光度と、422 nmのモル吸光係数より、ランベルトベールの法則を用いてCO-hemoCD濃度を算出することで、CO量を求めることができた。結論として、マウスの血液と同様に、ヒト早産児の血液においても、100 μlで血中COの定量測定法を確立できた。

(3) 開発した血中COの定量値と血中ビリルビン値との相関性の検討

結果を図1に示す。想定通り、早産児の血液が成人血液より間接ビリルビン値が高かった。早産児と成人血液ともに、血中COの定量値と血中ビリルビン値で正の相関を得た(早産児: R²=0.7773、成人: R²=0.6159)。その一方、早産児において、間接ビリルビン値に比して、CO量は少なかった。その原因として、体内で産生されたCOが呼吸により速やかに排泄されている可能性と検体採取当日の解析が困難であり、COの測定が翌日のday 1となったことから、検体容器に含有した少量の空気との間でCOの揮発が進んだ可能性が考えられた。そこで、残余がある検体では、同じ検体を用いて、day 2、day 3を調べた。その結果、想定していたが、時間経過とともに、CO量が減少していくことが明らかとなり、の検体採取

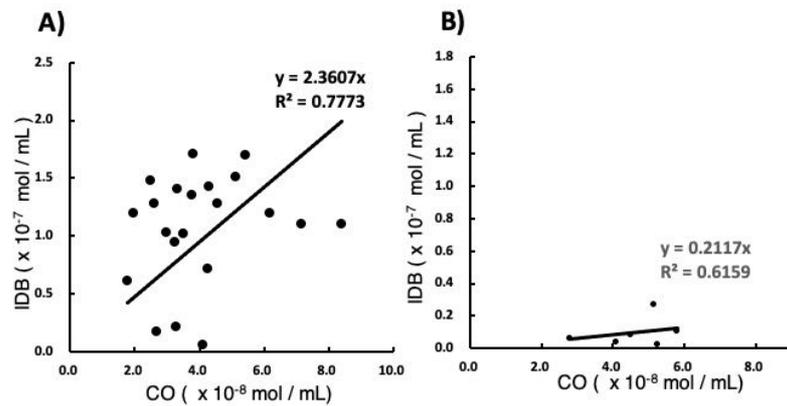


図1. 血中一酸化炭素(CO)濃度と間接ビリルビン(IDB)の相関
A) 早産児、B) 成人

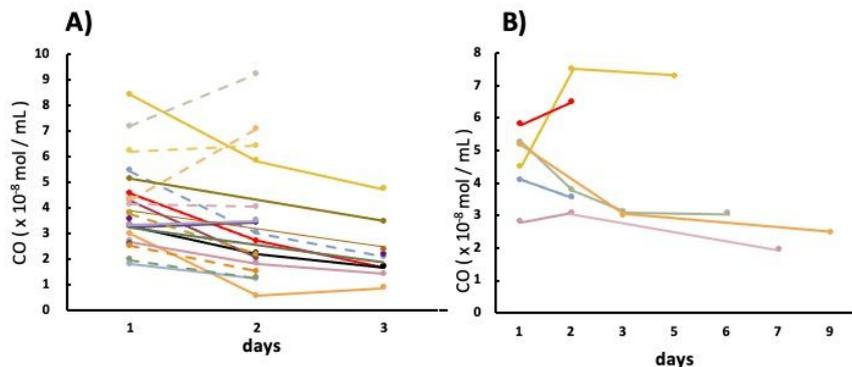


図2. 血中一酸化炭素(CO)濃度の経時的変化
A) 早産児、B) 成人

取当日の解析が困難であり、COの測定が翌日のday 1となったことから、検体容器に含有した少量の空気との間でCOの揮発が進んだことが原因と考えられた(図2)。

(4) 生後2週間以降に黄疸が増強する早産児のUGT1A1遺伝子アレルを含めた臨床予測因子

単変量解析では、晩期黄疸あり群では、晩期黄疸なし群に比して、日齢13までの母乳主体栄養の頻度が有意に高く、体重減少率が有意に少なく、インドメタシン治療を有する動脈管開存症が有意に少なかった。また、UGT1A1*6アレルを有する頻度が有意に高かった(表1)。単変量解析にて、p<0.1の項目(出生週数、インドメタシン治療を有する動脈管開存症、体重減少率、日齢13までの母乳主体栄養、日齢0-13濃厚赤血球輸血、UGT1A1*6アレル)について多項ロジスティック回帰分析を行った。結果、UGT1A1*6アレル(オッズ比7.8、p=0.004)、日齢13までの母

乳主体栄養（オッズ比 17.1、 $p=0.001$ ）が独立した臨床予測因子であった（表 2）

表 1. 単変量解析

	晩期黄疸 あり, N=30	晩期黄疸 なし, N=60	P 値
出生週数 (週)	30.4 ± 1.9	29.1 ± 2.9	0.063
出生体重 (g)	1343 ± 328	1199 ± 431	0.194
出生体重 Z-score	-0.7 ± 1.0	-0.6 ± 1.2	0.357
Small for gestational age	6 (20%)	15 (25%)	0.333
男児	14 (47%)	28 (47%)	0.468
多胎	11 (37%)	13 (22%)	0.960
帝王切開	26 (87%)	56 (75%)	0.170
APGAR スコア 1 分値	6 (2-8)	6 (1-8)	0.584
APGAR スコア 5 分値	8 (3-9)	8 (2-9)	0.524
新生児遷延性肺高血圧 (一酸化窒素吸入あり)	0 (0%)	5 (8.3%)	0.124
動脈管開存 (インドメタシン治療あり)	3 (10%)	17 (28%)	0.040
動脈管開存 (クリッピング術あり)	2 (7%)	1 (2%)	0.257
脳室内出血 (Papile 2 度以上)	0 (0%)	1 (2%)	0.667
壊死性腸炎 (手術あり)	0 (0%)	1 (2%)	0.667
体重減少率* (%)	10.7 ± 3.4	12.5 ± 4.0	0.023
経腸栄養確立日齢 (100 mL/kg/day 到達日齢)	8 (4-15)	9 (4-21)	0.893
出生体重復帰日齢**	16 (5-29)	16 (9-29)	0.646
体重増加 (g/日) (日齢 14-28)	20.5 ± 6.5	21.2 ± 9.2	0.684
母乳主体栄養: 日齢 13 まで	26 (87%)	36 (60%)	0.008
UGT1A1 遺伝子*6/*6	3 (10%)	1 (2%)	0.106
UGT1A1 遺伝子*6/-	13 (43%)	14 (23%)	0.007
UGT1A1 遺伝子*6/*6 or *6/-	16 (53%)	15 (25%)	0.008

データは、平均 ± 標準偏差、中央値 (範囲)、症例数 (パーセント) で示した。

*体重測定が可能であった 70 例 (28 例 vs. 42 例) **78 例 (30 例 vs. 48 例)

表 2. 多変量解析

	オッズ比	95%信頼区間	P 値
母乳主体栄養: 日齢 13 まで	17.087	3.267-89.371	0.001
UGT1A1 遺伝子*6 アレル	7.757	1.891-31.821	0.004
体重減少率	1.101	0.935-1.298	0.249
動脈管開存 INDO 治療あり	0.502	0.062-4.065	0.519
出生週数	0.919	0.614-1.376	0.683
日齢 0-13 濃厚赤血球輸血	1.271	0.042-38.111	0.890

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kato R, Hosono S, Takahashi S	4. 巻 1232
2. 論文標題 Reference value of brain tissue oxygen saturation in newborns immediately after birth.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-3-030-34461-0_3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kishi I, Nagano N, Katayama D, Imaizumi T, Akimoto T, Fuwa K, Aoki R, Hijikata M, Kayama K, Kato R, Okahashi A, Morioka I	4. 巻 67
2. 論文標題 Successful treatment of hyperbilirubinemia by monitoring serum unbound bilirubin in an extremely preterm infant with bacterial infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical Laboratory	6. 最初と最後の頁 183-186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7754/Clin.Lab.2020.200508.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------