

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591913

研究課題名（和文）：CRPは周産期脳障害の病因の一つである
－CRP阻害薬による治療をめざして－研究課題名（英文）：Human C-reactive protein enhances vulnerability of immature rats
to hypoxic-ischemic brain damage

研究代表者

谷口 友基子 (TANIGUCHI YUKIKO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60423175

研究成果の概要（和文）：

C-reactive protein (CRP)は炎症性マーカーとして使用されているが、最近CRP自体が心筋梗塞などの増悪因子であることが報告されてきている。新生児脳性まひにおいての原因が分娩中のアスフィキシアのみではなく、子宮内での感染症など炎症が大きな原因の一つであることが言われてきているが、今回CRP自体が胎児・新生児の低酸素および虚血状態となった時の脳障害の増悪因子であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

In utero exposure to infection or inflammation is a strong and independent predictor of cerebral palsy. Using a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy, we investigated the hypothesis that C-reactive protein (CRP), which is not specific for infection, aggravates vulnerability of the immature brain to HI.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：胎児新生児低酸素性虚血性脳症

科研費の分科・細目：炎症性疾患

キーワード：低酸素性虚血性脳症 CRP 未熟ラット

1. 研究開始当初の背景

(1)周産期医療の改善にもかかわらず脳性まひの出現頻度はこの30年間変わっていない。当初分娩時の胎児アスフィキシアが新生児脳症や脳性まひの主な原因と考えられてきたが、実際には分娩中の低酸素症例は脳性まひ症例の一部分にしかすぎず、他の原因が認識されてきている。その中でも、絨毛膜羊膜炎は正期産、早産においても重要な原因であることがわかってきている。とくに胎児のサ

イトカイン濃度上昇をしめす胎児炎症反応症候群(FIRS)、臍帯炎、胎児血管炎は脳性まひの強力な特異的な予兆である。

(2)CRPは普遍的な急性期炎症のマーカーとして知られているが、FIRSを起こした胎児の臍帯血中でも上昇していることが知られている。最近CRPは急性期炎症マーカーとしてだけでなく、心血管・脳血管疾患の予後マーカーとして有用であることがわかってきた。急性心筋梗塞後のCRPの値が死亡や心不全な

どの予後予知に有用であることが報告されている。CRP の濃度も虚血性心疾患の予後予知として使用できることも報告されている。それ以上に CRP が急性心筋梗塞の進行に関与しているかもしれない。急性心筋梗塞で死亡した症例の心筋細胞には CRP と活性化した補体が同時に存在していた。CRP が補体の活性化という意味で急性心筋梗塞の炎症前から関与しているかもしれない。成獣ラットによるスタディーでは冠動脈の結紮後に CRP を腹腔内投与すると梗塞範囲が増悪したことが報告されている一方で、1,6bisphosphocholine hexane にて CRP を阻害するとその梗塞範囲を減らすことができたとされている。同様に成獣ラットに CRP を腹腔内投与すると中大脳動脈結紮後の脳梗塞範囲は拡大したと報告されている。

2. 研究の目的

CRP の低酸素性虚血性脳症に対する影響は未熟動物の実験では示されておらず、また臨床において胎児・新生児の CRP 上昇はよくみられることである。今回われわれは CRP と低酸素および虚血が未熟脳においてどう影響するかを追跡した。CRP が補体を活性化することが重要なメカニズムの一つであることが考えられるが、ラットの CRP はラットの補体を活性化しない。一方ヒトの CRP はヒトおよびラットの補体を活性化する。ヒト CRP をラットに投与することでヒトの内因性 CRP の活性をしらべるモデルとしていくつかの文献で報告されている。これらの文献をもとに、「ラットにヒトの CRP を投与する」ことでヒトの内因性 CRP 上昇モデルとして使用した。

3. 研究の方法

Sprague Dawley ラットの新生仔を大阪大学の動物倫理委員会のガイドラインにそって飼育した。実験方法は当大学の倫理委員会ですべて承認された。生後7日目のラットをヒト CRP 投与群とコントロール群に分けた。CRP 投与を 3mg/kg と 5mg/kg 腹腔内投与した予備実験をもとに 5mg/kg 投与を選択した。コントロール群には溶液のみを投与した。ハロセンにて全身麻酔を行った後、左頸動脈を 5-0 モノクリルにて結紮切断した。37°C の加温槽にて 20 分間休憩させたのち窒素化合 8% 酸素下に 40 分間暴露した。同様の加温槽にて 6 時間回復させた後、処理するまで生物学的母獣のもので飼育した。これまでの実験にて結紮しなかった側の脳半球は組織学的に変化がないことが報告されている。低酸素暴露後の 0, 1, 3, 5 時間で直腸温を計測した。

低酸素虚血暴露後 4 日目に新生仔を処理し、組織学的分析を行った。ペントバルビタール深麻酔(100mg/kg)をかけたのち、経心臓的に 0.9%生理食塩水にて灌流し続いて 4%パラホルムアルデヒドにて固定した。脳を摘出し同様の固定液にて 4°C 24 時間固定した。エタノールとキシレンにて脱水を施し、パラフィンに埋め込み 5 μ m の厚さに海馬のレベルで冠状断面にスライスした。染色前に切片をキシレンにて脱パラフィンをほどこし、エタノールにて再水和した。

切片を神経細胞構築の乱れを見るために免疫染色を行った。免疫賦活のため 10mmol/L のクエン酸緩衝液 (pH6.0) にて 100°C 10 分間、切片を温めた。内因性ペルオキシダーゼ活性を 10 分間 3% 過酸化水素水にて抑え、5% の馬血清にてブロッキングしたのちに MAP-2 (マウスモノクローナル抗体) を 1000 倍希釈したものをかけて 4°C で 1 晩放置した。リンス後ビオチン化抗マウス馬 IgG を加え、avidin-biotin complex method にて抗体を検出、DAB (3,3' diaminobenzidine) にて染色した。DAB 反応後スライドを洗浄し、脱水した。無傷の神経組織は MAP-2 にて染色されたが、一方梗塞部位の神経は染色されなかった。実験助手に実験のプロトコールを知らせずに切片をマイクロソフトコンピューターと ImageJ ソフトウェア、および顕微鏡とイメージスキャナにて分析させた。MAP-2 陽性範囲比は障害側の MAP-2 陽性範囲を対側の Map-2 陽性範囲で除したものとした。

溶液を注入後 30-60 分間に心臓から採血 (~500 μ l) を行い、ヒト CRP 濃度、rat CRP 濃度、IL-6 濃度を測定した。サンプルを遠心してその血清をポリプロピレン容器で -80°C で貯蔵した。血清をヒト CRP 分析のために 500 倍に希釈、商業ベースの ELISA キットにて濃度を測定した。ラット CRP 濃度を測定するために血清を 10 万倍に希釈、ELISA キットにて測定した。また血清を 5 倍に希釈し rat IL-6 を ELISA キットにて測定した。

結果は平均値 \pm standard error of the mean (SEM) にて記載した。また unpaired Student t テストにて比較を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

4. 研究成果

直腸温は 2 グループ間で差がなかった。ヒト CRP 濃度はヒト CRP 投与群で 1823 \pm 520 (365-3964) であり、コントロール群では検出されなかった。ラット CRP および IL-6 濃度を 30-60 分後の血清について調べた。Rat CRP は CRP 投与群で 0.95 \pm 0.36 mg/dL、コントロール群で 3.56 \pm 2.25 mg/dL でどちらも正常範囲であった。Rat IL-6 濃度については CRP 投与群で 465.3 \pm 34.1 pg/ml であり、コントロール群の 534.9

±11.8pg/ml と比較して有意差がなかった。低酸素虚血状態に暴露した4日後にMAP-2陽性範囲比を測定した。CRP投与群のほうが明らかに脳のダメージが大きく、コントロール群ではほとんどダメージがなかった。どちらの群も対側にはダメージがなく、CRPのみでは脳ダメージが起きないことが示唆された。また、海馬および皮質でのMAP-2陽性範囲比はCRP投与群で0.43±0.06, 0.49±0.07であったのに対しコントロール群は0.87±0.04, 0.86±0.06であり、有意差を認めた。海馬や皮質においてCRP投与群はさらに強く影響を受けている傾向が認められた。ヒトCRP自体が子宮内感染下における胎児・新生児の脳ダメージの一つの仲介役であることが示唆された。

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13件)

1. Kinugasa-Taniguchi Y, Ueda Y, Hara-Oyagi C, Enomoto T, Kanagawa T, Kimura T. Impaired delivery outcomes in pregnancies following myomectomy compared to myoma-complicated pregnancies. J Reprod Med 2011;56:142-8. 査読有.
2. Mimura K, Tomimatsu T, Minato K, Taniguchi Y, Kanagawa T, Nozaki M, Yanagihara I, Kimura T. Ceftriaxone preconditioning confers neuroprotection in neonatal rats through glutamate transporter 1 upregulation. Reprod Sci 2011 in press. 査読有.
3. Usui N, Kanagawa T, Kamiyama M, Tani G, Kinugasa-Taniguchi Y, Kimura T, Fukuzawa M. Current status of negative treatment decision-making for fetuses with a prenatal diagnosis of neonatal surgical disease at a single Japanese institution. J Pediatr Surg 2010;45:2328-33. 査読有.
4. Tskitishvili E, Sharentuya N, Tsubouchi H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Shimoya K, Tomimatsu T, Kimura T. Maternal blood serum and plasma human tumor-associated antigen RCAS1 during the course of uncomplicated pregnancies: a prospective study. Am J Reprod Immunol 2010;64:218-24. 査読有.
5. Sharentuya N, Tomimatsu T, Mimura K, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Nicotine suppresses interleukin-6 production from vascular endothelial cells: a possible therapeutic role of nicotine for preeclampsia. Reprod Sci 2010;17:556-63. 査読有.
6. Mimura K, Tomimatsu T, Sharentuya N, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Nicotine restores endothelial dysfunction caused by excess sFlt1 and sEng in in vitro model of preeclamptic vascular endothelium: a possible therapeutic role of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists for preeclampsia. Am J Obstet Gynecol 2010;202:464.e1-6. 査読有.
7. Kinugasa-Taniguchi Y, Tomimatsu T, Mimura K, Kanagawa T, Shimoya K, Murata Y, Kimura T. Human C-reactive protein enhances vulnerability of immature rats to hypoxic-ischemic brain damage: a preliminary study. Reprod Sci 2010;17:419-25. 査読有.
8. 臼井規朗, 金川武司, 上山雅史, 谷岳人, 谷口(衣笠)友基子, 木村正, 福澤正洋. 出生前に消極的治療方針が選択された新生児外科症例の検討. 日本周産期・新生児医学会誌 2010;46:32-8. 査読有.
9. Tskitishvili E, Sharentuya N, Temma-Asano K, Mimura K, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Fukuda H, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K. Oxidative stress-induced S100B protein from placenta and amnion affects soluble Endoglin release from endothelial cells. Mol Hum Reprod 2010;33:188-99. 査読有.
10. Tskitishvili E, Nakamura H, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K. Temporal and spatial expression of tumor-associated antigen RCAS1 in pregnant mouse uterus. Am J Reprod Immunol 2010;63:137-43. 査読有.
11. 荻田和秀, 富松拓治, 澤田健二郎, 上田豊, 金川武司, 衣笠友基子, 坂田正博, 木村正. 本学におけるActive Management of Labor. 産婦人科の進歩 2009;61:

101-3. 査読有.

12. Tskitishvili E, Tomimatsu T, Kanagawa T, Sawada K, Kinugasa Y, Mimura K, Kimura T. Amniotic fluid 'sludge' detected in patients with subchorionic hematoma: a report of two cases. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2009;33: 484-6. 査読有.
13. 谷口 (衣笠) 友基子, 木村正. 乳汁分泌とホルモン. *産婦人科治療*. 2009;99: 325-31. 査読有.

[学会発表] (計18件)

1. 味村和哉, 富松拓治, 谷口友基子, 金川武司, 木村正. β -ラクタム抗生剤でのプレコンディショニングによる新生児脳障害予防の可能性. 第45回日本周産期・新生児医学会. 2009年7月12-14日. 名古屋国際会議場, 愛知.
2. 石井貴子, 澤田健二郎, 衣笠友基子, 香山晋輔, 磯部晶, 金川武司, 富松拓治, 荻田和秀, 木村正. 当科における前置胎盤の手術成績と大量出血に対する止血法の比較検討. 第120回近畿産科婦人科学会. 2009年6月27-28日. 神戸国際会議場, 大阪.
3. 沙仁吐雅, 富松拓治, 味村和哉, 金川武司, 衣笠友基子, ツキティシヴィリ・エカテリネ, 木村正. ニコチンは妊娠高血圧症候群の治療薬となりうるか? -基礎的検討-. 第61回日本産科婦人科学会. 2009年4月3-5日. 国立京都国際会議場, 京都.
4. 香山晋輔, 富松拓治, 澤田健二郎, 金川武司, 磯部晶, 衣笠友基子, 木村正. 分娩第二期遷延後の帝王切開分娩後、次回妊娠時に頸管無力症となった2症例. 第61回日本産科婦人科学会. 2009年4月3-5日. 国立京都国際会議場, 京都.
5. 大八木知史, 若林敦子, 澤田健二郎, 衣笠友基子, 金川武司, 富松拓治, 荻田和秀, 坂田正博, 木村正. 当科で経験した心筋症合併妊娠の治療経験. 第61回日本産科婦人科学会. 2009年4月3-5日. 国立京都国際会議場, 京都.
6. Tskitishvili E, Sharentuya N, Temma-Asano K, Tomimatsu T, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T, Shimoya K. Possible connection between sEndoglin and S100B protein might lead to the development of endothelial dysfunction and preeclampsia. 第3回世界産婦人科研究機構サミット. 2009年11月12-14日. 仙台国際センター, 宮城.
7. Tomimatsu T, Syarentuya N, Mimura K, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T. Nicotine suppresses interleukin-6 production from vascular endothelial cells. 第3回世界産婦人科研究機構サミット. 2009年11月12-14日. 仙台国際センター, 宮城.
8. 三宅達也, 富松拓治, 谷口友基子, 香山晋輔, 磯部晶, 金川武司, 澤田健二郎, 木村正, 中村元, 吉矢和久, 荻田和秀. 妊娠後期に脳出血を発症し初めてもやもや病の診断がついた妊婦が、同一妊娠期間中に再出血をきたし死亡した1例. 第121回近畿産科婦人科学会. 2009年11月1日. 神戸国際会議場, 兵庫.
9. 佐々本尚子, 富松拓治, 香山晋輔, 谷口友基子, 磯部晶, 金川武司, 澤田健二郎, 木村正. 抗Jra抗体陽性の血液型不適合妊娠において新生児貧血を認めた1例. 第121回近畿産科婦人科学会. 2009年11月1日. 神戸国際会議場, 兵庫.
10. 若林敦子, 大八木知史, 澤田健二郎, 衣笠友基子, 香山晋輔, 上田豊, 金川武司, 富松拓治, 坂田正博, 木村正. 当科で経験した周産期心筋症(Peripartum cardiomyopathy:PPM)の2症例. 第119回近畿産科婦人科学会. 2008年11月9日. 千里ライフサイエンスセンター, 大阪.
11. 衣笠友基子, 味村和哉, 香山晋輔, 上田豊, 金川武司, 澤田健二郎, 富松拓治, 木村正. 当院における出生前診断の適応と帰結. 第119回近畿産科婦人科学会. 2008年11月9日. 千里ライフサイエンスセンター, 大阪.
12. 金川武司, 味村和哉, 香山晋輔, 衣笠友基子, 上田豊, 澤田健二郎, 富松拓治, 坂田正博, 木村正. 前置胎盤合併に対して、子宮内胎児死亡誘導後に中期中絶術を施行した2症例. 第119回近畿産科婦人科学会. 2008年11月9日. 千里ライフサイエンスセンター, 大阪.
13. 石井貴子, 澤田健二郎, 衣笠友基子, 香山晋輔, 金川武司, 上田豊, 富松拓治,

荻田和秀, 坂田正博, 木村正. 産褥期大量出血に対する子宮タンポナーデの有効性の検討 Sengtaken-Blakemore tube (SB tube) を用いて. 第 119 回近畿産婦人科学会 2008 年 11 月 9 日. 千里ライフサイエンスセンター, 大阪.

14. 味村和哉, 富松拓治, 沙仁吐雅, 衣笠友基子, 金川武司, 木村正. ニコチンの妊娠高血圧症候群治療薬としての可能性～HUVEC と抗血管新生因子を用いた妊娠高血圧症候群モデルを用いて～. 第 29 回日本妊娠高血圧学会. 2008 年 10 月 11-12 日. 福島ビューホテル, 福島.

15. 金川武司, 富松拓治, 衣笠友基子, 荻田和秀, 荒堀仁美, 小垣滋豊, 和田和子, 木村正. 湿布の大量貼付によって引き起こされたと思われる胎児動脈管早期収縮の一例. 第 44 回日本周産期・新生児医学会. 2008 年 7 月 13-15 日. パシフィコ横浜, 神奈川.

16. 金川武司, 富松拓治, 衣笠友基子, 味村和哉, 木村正. 出生前超音波検査で認められた四肢短縮例における鼻骨長計測の有用性. 第 48 回日本先天異常学会学術会. 2008 年 6 月 29 日, 東京.

17. 荻田和秀, 富松拓治, 澤田健二郎, 上田豊, 金川武司, 衣笠友基子, 坂田正博, 木村正. 本学における Active Management of Labor. 第 118 回近畿産科婦人科学会. 2008 年 6 月 14-15 日. 守口ロイヤルパインズホテル, 大阪.

18. 金川武司, 富松拓治, 衣笠友基子, 荻田和秀, 荒堀仁美, 小垣滋豊, 和田和子, 木村正. 湿布の大量貼付によって引き起こされたと思われる胎児動脈管早期収縮の一例. 第 10 回大阪新生児研究. 2008 年 6 月 7 日. 大阪薬業年金会館, 大阪.

金川 武司 (KANAGAWA TAKESHI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 40346218

味村 和哉 (MIMURA KAZUYA)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 50437422
(H20年度まで研究分担者として参画)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 友基子 (TANIGUCHI YUKIKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 60423175

(2) 研究分担者

富松 拓治 (TOMIMATSU TAKUJI)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 30346209