

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591314

研究課題名（和文） 早産低出生体重児の生体環境偏移の長期評価とその対策：「成人病胎児期発症説」の検証

研究課題名（英文） Long-term prognosis and management of clinically ill infants: "Fetal origin of adult disease" hypothesis

研究代表者

塚原 宏一 (TSUKAHARA HIROKAZU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90207340

研究成果の概要（和文）：

新生児・乳児・小児を対象に、血中 NOx、ADMA、8-OHdG 濃度などの酸化ストレスマーカーの基準値が設定された。これらの生体マーカーの計測により、小児疾患の NO-ADMA 系、酸化ストレス環境が非侵襲的に経時的に評価できることが例示された。8-OHdG については迅速検査への道が開かれた。今後も疾患対象を増やして検討を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：

We have established several oxidative stress markers such as NOx, ADMA, and 8-OHdG in neonates, infants, and children. Measurement of these parameters enables us to evaluate NO-ADMA system and oxidative environment non-invasively and sequentially in children with various disorders. Rapid test for 8-OHdG measurement is also available. Further studies using these procedures are in progress in the clinical field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：病的新生児、成人病、一酸化窒素、酸化ストレス、生体マーカー

1. 研究開始当初の背景

ヒトの生体制御において、一酸化窒素 (NO) をとりまく L-arginine / NO 合成酵素 / NO 系と protein-arginine methyltransferase (PRMT: タンパク質中の L-arginine 残基をメチル化する酵素) / asymmetric dimethylarginine (ADMA: 内因性の NO 合成阻害因子) / dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH: ADMA を特異的に分解する酵素) 系の相互制御は重要と考えられる。

これらの系を追究することは、複雑な生体ネットワークの生物学的理解をさらに進めるだけでなく、多様な疾患群の予防・治療、身体機能維持、QOL 向上を目指した新規の効果的な管理法の開発につながると期待される。

2. 研究の目的

上記の NO-ADMA 系は、肝臓だけでなく腎臓、血管などの重要臓器において尿素サイクル・アミノ酸代謝系を介しながら、好氣的解糖、酸化的リン酸化、タンパク質合成にも関連す

ると想定される。本研究の目的は、小児の先天代謝疾患においてNO-ADMA系が偏倚し、そのことが病像の多様性と重篤な合併症を導くかどうか、一方、NO-ADMA系に介入することで疾患の予防や治療が可能になるかどうか検討することである。

3. 研究の方法

(1) 血清NO_x、ADMA濃度について健常者検体を用いて基準値を設定した。NO_x、ADMAはNitrate/Nitrite Colorimetric Assay (Cayman Chemical)、ADMA-ELISA (DLD Diagnostics)を用いて計測した。結果は平均±SD (範囲)で表し、統計はt-testを用いてp<0.05をもって有意と判定した。

(2) 血清8-OHdG濃度について健常者検体を用いて基準値を設定した。8-OHdGは高感度8-OHdG check (Institute for the Control of Aging)を用いて計測した。結果は平均±SD (範囲)で表し、統計はt-testを用いてp<0.05をもって有意と判定した。

(3) 血清NO_x、ADMA、8-OHdG濃度の高値基準を対照計測値の(平均+1.5SD)以上として求めた。また、脳脊髄液(CSF)8-OHdG、acrolein-lysine (ACR)濃度の高値基準も同様の方法で求めたが、各々8-OHdG check

(Institute for the Control of Aging)、ACR Lysine-ELISA (NOF Corporation)にて計測した本研究者の過去の研究成果を用いた

(Tsukahara H, et al. Redox Rep 2000; Tsukahara H, et al. Life Sci 2002)。

(4) 血清NO_x、ADMA各濃度を計測することで川崎病患者のNO-ADMA系を評価した。

(5) 尿素サイクル異常に属するシトリン欠損症の患者(乳児期に“肝内胆汁うっ滞性新生児肝炎”を起こした後、現在は軽度の高シトリン血症を呈するのみで見かけ上健常である)を対象に検討を加えた。

(6) 肝障害を伴わない先天性肝内門脈-静脈シャントの患者を対象に検討を加えた。

(7) 酸化ストレスマーカー計測の迅速化(ベッドサイド検査への応用)は実地臨床の上で重要である。8-OHdGについては小型迅速検査機器(Techno Medica)があり、100 μlの検体量で計測できる。その有用性を評価した。

4. 研究成果

(1) 健常者は成人(9名、男性/女性=6/3)、小児(20名、男性/女性=9/11)であった。

血清NO_x (μM)、ADMA (μM)、ADMA/NO_xは成人で33.4±16.2 (18.1~65.3)、0.53±0.13 (0.40~0.75)、0.020±0.012 (0.007~0.041)、小児で38.2±19.8 (18.1~65.3)、0.69±0.10 (0.40~0.75)、0.024±0.012 (0.006~0.060)であり、ADMAでのみ小児が成人よりも有意に高値であった。小児で性別比較したが、男性で38.4±17.3、0.69±0.09、0.021±0.009、女性で38.0±22.5、0.69±0.12、0.026±0.017であり、両群間に差はなかった。

(2) 健常者は成人(10名、男性/女性=5/5)、小児(17名、男性/女性=10/7)であった。血清8-OHdG (ng/ml)は成人で0.15±0.08 (0.03~0.26)、小児で0.19±0.07 (0.09~0.34)であり、両群間に差はなかった。小児で性別比較したが、男性で0.20±0.08、女性で0.18±0.05であり、両群間に差はなかった。

(3) 血清NO_x、ADMA、8-OHdG濃度、CSF 8-OHdG、acrolein-lysine濃度の高値基準は下記の通りであった。血清NO_x ≥ 67.9 μM、血清ADMA ≥ 0.84 μM、血清8-OHdG ≥ 0.30 ng/ml、CSF 8-OHdG ≥ 3.4 ng/ml、CSF Acrolein-lysine ≥ 7.0 μM。

(4) 患者は12名(男/女=9/3)、年齢は2.7±2.9 (0.8~11.1)歳であった。血清中NO_x (μM)、ADMA (μM)はガンマグロブリン投与前で52±23 (21~107)、0.69±0.09 (0.60~0.86) (n=10)、ガンマグロブリン投与直後で79±37 (30~149)、0.98±0.16 (0.76~1.21) (n=10)、その約1週後で82±37 (18~135)、0.98±0.19 (0.68~1.29) (n=10)であった(ガンマグロブリン投与直後、その約1週後の値はそれぞれガンマグロブリン投与前の値よりも有意に高かった)。ADMAとNO_xの比率を見ると、それぞれの時点で0.016±0.008 (0.007~0.034)、0.015±0.007 (0.008~0.031)、0.015±0.009 (0.008~0.038)であり、各時点で差はなかった。

(5) シトリン欠損症の患者では対照と比べて(平均値のみ表示)、血中NO_x、ADMAに差はないが、血中コレステロール(213対169 mg/dL)、酸化型LDL(82対25 U/L)、SOD(1.49対1.06 U/mg protein in RBC)、catalase(3.60対2.96 pmol/mg protein in RBC)、尿中ACR(481対272 nmol/mg Cr)、8-OHdG(67対19 ng/mg Cr)が有意に高かった。

(6) 肝障害を伴わない先天性肝内門脈-静脈シャントの患者では対照と比べて(平均値のみ表示)、血中ADMA(0.82対0.63 μM)、

ADMA/NO_x (0.052 対 0.023)、ET-1 (3.0 対 1.9 pg/ml) が有意に高く、NO_x (22 対 30 μM) が有意に低く、血中 TBARS (5.0 対 3.9 mM)、尿中 ACR (331 対 255 nmol/mg Cr)、8-OHdG (26 対 19 ng/mg Cr) が有意に高かった。シヤント率は血中 ADMA、ADMA/NO_x と有意な正の相関を示した。

(7) 急性白血病患者児では尿中 8-OHdG が異常高値を示し、頸部リンパ節腫脹を呈する良性疾患との鑑別の点でも有用であった (2011 年日本小児科学会学術集会で発表)。また、重症インフルエンザ脳症の脳脊髄液では 5.5 ng/ml と対照 (<0.5 ng/ml) に比較して著しい高値を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 17 件)

1. Tsukahara H, Fujii Y, Hayashi Y, Morishima T. Multiple biomarkers for oxidative stress in patients with brain disorders. *J Neurol Sci* 査読あり 313 (1-2): 196, 2012.
2. Morishita N, Tsukahara H, Chayama K, Ishida T, Washio K, Miyamura T, Yamashita N, Oda M, Morishima T. Activation of Akt is associated with poor prognosis and chemotherapeutic resistance in pediatric B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 査読あり 2012 (in press).
3. Tsukahara H. Oxidative stress biomarkers in pediatric medicine: A 2011 update. *Systems Biology of Free Radicals and Anti-Oxidants* 査読あり 2012 (in press).
4. Tsukahara H. Redox modulatory factors of human breast milk. Dietary and nutritional aspects of human breast milk 査読あり 2012 (in press).
5. Kawatani M, Tsukahara H, Mayumi M. Evaluation of oxidative stress status in children with pervasive developmental disorder and attention deficit hyperactivity disorder using urinary-specific biomarkers. *Redox Rep* 査読あり 16: 45-6, 2011.
6. Nagasaka H, Yorifuji T, Takatani T, Okano Y, Tsukahara H, Yanai H, Hirano K, Hui SP, Hirayama S, Ito T, Chiba H, Miida T. CD36 deficiency predisposing young children to fasting hypoglycemia. *Metabolism* 査読あり 60 (6): 881-887, 2011.
7. Sanayama Y, Nagasaka H, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Ishige-Wada M, Usui H, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Tsukahara H, Hirayama S, Miida T, Fukui M, Okano Y. Experimental evidence that phenylalanine is strongly associated to oxidative stress in adolescents and adults with phenylketonuria. *Mol Genet Metab* 査読あり 103 (3): 220-225, 2011.
8. Nagasaka H, Tsukahara H, Takatani T, Sanayama Y, Takayanagi M, Ohura T, Sakamoto O, Ito T, Wada M, Yoshino M, Ohtake A, Yorifuji T, Hirayama S, Miida T, Fujimoto H, Mochizuki H, Hattori T, Okano Y. Cross-sectional study of bone metabolism along with nutrition in adult classical phenylketonuric patients diagnosed by neonatal screening. *J Bone Miner Metab* 査読あり 29 (6): 737-743, 2011.
9. Nagasaka H, Okano Y, Aizawa M, Miida T, Yorifuji T, Tajima G, Sakura N, Takatani T, Sanayama Y, Sugamoto K, Mayumi M, Kobayashi K, Hirano K, Takayanagi M, Tsukahara H. Altered metabolisms of mediators controlling vascular function and enhanced oxidative stress in asymptomatic children with congenital portosystemic venous shunt. *Metabolism* 査読あり 59 (1): 107-113, 2010.
10. Tsukahara H, Nagasaka H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous NO synthase inhibitor, in human breast milk. *Early Hum Dev* 査読あり 86 (2): 69-70, 2010.
11. Tsukahara H, Nagasaka H, Tokuriki S, Mayumi M. Coupling of the citrulline recycling to endothelial NO production. *Mol Genet Metab* 査読あり 99 (4): 438, 2010.
12. Nishijima K, Takahashi J, Yamamoto M, Orisaka M, Suzuki C, Tsukahara H, Shukunami K, Kurokawa T, Yoshida Y, Kotsuji F. Images in emergency medicine. *Ann Emerg Med* 査読あり 55 (5): 483 & 490, 2010.
13. Nagasaka H, Yorifuji T, Kobayashi K,

Takikawa H, Komatsu H, Inui A, Fujisawa T, Miida T, Tsukahara H, Takatani T, Hayashi H. Favorable effect of 4-phenylacetate on liver functions attributable to enhanced bile salt export pump expression in ornithine transcarbamylase-deficient children. *Mol Genet Metab* 査読あり 100 (2): 123-128, 2010.

14. Nagasaka H, Yorifuji T, Hirano K, Ota A, Toyama-Nakagawa Y, Takatani T, Tsukahara H, Kobayashi K, Takayanagi M, Inomata Y, Uemoto S, Miida T. Effects of bezafibrate on dyslipidemia with cholestasis in children with familial intrahepatic cholestasis-1 deficiency manifesting progressive familial intrahepatic cholestasis. *Metabolism* 査読あり 58 (1): 48-54, 2009.

15. Nagasaka H, Tsukahara H, Yorifuji T, Miida T, Murayama K, Tsuruoka T, Takatani T, Kanazawa M, Kobayashi K, Okano Y, Takayanagi M. Evaluation of endogenous nitric oxide synthesis in congenital urea cycle enzyme defects. *Metabolism* 査読あり 58 (3): 278-282, 2009.

16. Nagasaka H, Okano Y, Tsukahara H, Shigematsu Y, Momoi T, Yorifuji J, Miida T, Ohura T, Kobayashi K, Saheki T, Hirano K, Takayanagi M, Yorifuji T. Sustaining hypercitrullinemia, hypercholesterolemia and augmented oxidative stress in Japanese children with aspartate/glutamate carrier isoform 2-citrin- deficiency even during the silent period. *Mol Genet Metab* 査読あり 97 (1): 21-26, 2009.

17. Nagasaka H, Yorifuji T, Momoi T, Yorifuji J, Hirano K, Ota A, Takatani T, Tsukahara H, Takayanagi M, Kobayashi K, Chiba H, Sato Y, Miida T. Lipoprotein profiles in children with two common cholesteryl ester transfer protein gene mutations, D442G and I14A, during the first year of life. *Clin Chim Acta* 査読あり 406 (1-2): 52-56, 2009.

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 塚原宏一. 小児科領域におけるレドックスマーカー検査の現況. 第 58 回日本臨床検査医学会学術集会, 岡山, 2011 年 (11/18) .
2. 塚原宏一. 酸化ストレスの生体マーカー - 最近の進歩. 第 43 回小児感染症学会学術集会, 岡山, 2011 年(10/29).
3. 塚原宏一. 腎臓関連の臨床検査の読み方・考え方. 第 8 回南大阪小児腎疾患カンファレンス, 大阪, 2011 年 (7/23) .
4. 塚原宏一. 血管生物学の基礎と臨床. 平成 23 年岡山大学小児科同門会 (「友周会」), 岡山, 2011 年 (3/13) .
5. 塚原宏一. 血管生物学の基礎と臨床. 平成 23 年福井県小児科医会学術講演会, 福井, 2011 年 (3/12) .
6. 塚原宏一. 新生児における循環の適応生理とそれに基づいた輸液戦略. 第 25 回岡山新生児研究会, 岡山, 2011 年 (2/12) .
7. 塚原宏一. 酸化ストレスマーカーの臨床と研究: 小児科領域における臨床的意義. 島根大学医学部附属病院小児科セミナー, 島根, 2010 年 (12/7) .
8. 塚原宏一. ありふれた臨床検査から読めること・考えられること. 第 10 回山陽小児臨床懇話会(鯉操会), 広島, 2010 年 (11/20) .
9. 塚原宏一. 川崎病の血管障害マーカー. 第 6 回岡山川崎病研究会, 岡山, 2010 年 (10/30) .
10. 塚原宏一. 小児における諸臓器の成熟 - 小児は小さな大人ではない! 第 16 回日本小児麻酔学会学術集会, 岡山, 2010 年 (9/18) .
11. 塚原宏一. 小児の骨代謝: 新生児・未熟児を中心に. 第 9 回山口県こどもの成長を考える会, 山口, 2010 年 (7/16) .

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原 宏一 (TSUKAHARA HIROKAZU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 90207340

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者