

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 25 年 2 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：平成 22 年度～平成 23 年度

課題番号：22791036

研究課題名（和文）

サイトカイン、転写因子測定による新生児仮死と脳室内出血の免疫学的病態解析

研究課題名（英文） The analysis of serum cytokine and transcription factor level on the pathophysiology of neonatal asphyxia and intraventricular hemorrhage of extremely low birth weight infant.

研究代表者 小池 泰敬(KOIKE YASUNORI)

(自治医科大学・医学部・助教)

研究者番号：00382903

研究成果の概要（和文）：

新生児仮死のあった正期産児 5 例、および早産児 3 例、新生児仮死の無かった正期産児 5 例および早産児 4 例の出生時、日齢 1、2、3 における 17 種類の末梢血サイトカイン濃度の測定を行った。正期産児、早産児、いずれにおいても、炎症性サイトカインは生後早期には高値を示し、経時的に低下した。

インドメタシン投与による脳室内出血予防をうけた超低出生体重児 15 例と、インドメタシン投与を行わなかった超低出生体重児 11 例の、末梢血サイトカイン濃度の測定を、出生時、日齢 1、2、3、7、14 に行った。炎症性サイトカインは対象群で生後低下傾向を示したのに対し、比較対照群では増加ないしは横ばいで経過し、両群間で有意差を認めた。炎症性サイトカイン上昇と脳室内出血発症が示唆され、これら炎症性サイトカイン産生を抑制することが、インドメタシン投与による脳室内出血予防の機序であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed cytokine levels in peripheral blood from 5 full-term and 3 preterm infants with neonatal asphyxia and those from 5 full-term and 4 preterm infants without neonatal asphyxia on 0,1,2,3 day of life. We found that inflammatory cytokines were at higher level in the former group and decreased over time.

In peripheral blood from 15 extremely low birth weight (ELBW) infants who received indomethacin for preventing intraventricular hemorrhage and 11 ELBW who did not receive indomethacin, we analyzed cytokine profiles on 0,1,2,3,7,14 day of life. Inflammatory cytokines are at lower levels and decreased over time in the former group than the later group. It suggests that indomethacin inhibits production of these inflammatory cytokines, and preventing a intraventricular hemorrhage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 23 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、胎児・新生児医学

キーワード：新生児、新生児仮死、脳室内出血、サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

1)これまで、新生児の各種疾患の病態形成は、未熟性によるものと考えられてきたが、児の免疫応答が深く関与している事が多く報告されている。

2)新生児仮死は、後の神経学的後遺症の最大の原因であるが、その脳障害発症には、単純な低酸素、虚血のみならず、児自身が産生するサイトカインが関与しているという報告がなされている。

3)また、早産児は脳室内出血を合併しやすく、後の神経学的後遺症の一因となる。脳室内出血発症例において、臍帯血、あるいは末梢血での IL6 高値の報告もあり、脳室内出血発症にも、児の免疫応答が深く関わっていると考えられる。また、1994年、Ment らが生後早期のインドメタシン投与による脳室内出血予防の有用性を報告し、本邦でも新生児臨床研究ネットワークが行った多施設共同ランダム化二重盲検比較試験でその有用性が確認された。しかし、なぜ、インドメタシンが脳室内出血予防に効くのか、その機序は明らかでない。

4)これまで検体量の問題から、新生児のサイトカイン解析は容易ではなかった。近年、種々の array 法を用い、微量の検体でも多くの情報解析が可能となり、我々も、自治医科大学周産期センターに設置されている suspension-array system である Bio-rad 社の Bio-Plex system を用いて、わずか 30 μ l の血清で、17 項目のサイトカインと最大 16 種類の転写因子が測定できるようになった。

5)これらより、新生児仮死および脳室内出血発症時のサイトカイン、転写因子のプロファイリングを行い、新生児仮死および脳室内出血の免疫学的病態を明らかにするとともに、インドメタシンの作用機序が明らかになると考えた。

2. 研究の目的

1)新生児仮死による脳障害発症の病態解析

新生児仮死のあった正期産児および早産児を対象とし、また、新生児仮死以外の理由で入院した正期産児および早産児を比較対照とし、17 種類のサイトカインおよび 8 種類の転写因子を測定する。

これらの結果と臨床経過や、超音波検査、頭部 MRI などの画像検査と合わせ、新生

児仮死による脳障害発症の病態を解析する。

2)超低出生体重児の脳室内出血発症の病態解析、およびインドメタシンによる脳室内出血予防の作用機序の解明

自治医科大学ではインドメタシン投与による脳室内出血予防を行っているため、当院新生児集中治療部に入院した超低出生体重児を対象とし、インドメタシンによる脳室内出血予防を採用していない獨協医大新生児集中治療部に入院した超低出生体重児を比較対照として、17 種類のサイトカインを測定し、その結果と臨床データなどを合わせ、脳室内出血発症の病態解析、およびインドメタシンによる脳室内出血予防の作用機序を解明する。

3. 研究の方法

1)自治医科大学倫理委員会の承認を得て、いずれも患児の保護者に説明書を提示し同意書を取得し、その下で児からの採血を行い解析を行った。また、獨協医大でも同様の手続きを行い、児からの採血を行った。

2)新生児仮死の病態解析

自治医科大学総合周産期母子医療センター新生児集中治療部に入院した正期産児、早産児の中から、新生児仮死のあった症例（対象群）および新生児仮死の無かった症例（比較対照群）を抽出し、新生児仮死症例 8 例（正期産 5 例、早産 3 例）、53 検体、比較対照 9 例（正期産 5 例、早産 4 例）、38 検体を採取・測定した。正期産児比較対照群の入院理由は、呼吸障害 2 例、嘔吐 2 例、低体重 1 例であった。

それぞれ、出生時、日齢 1、2、3、7、14 に血液を採取することとしたが、重症仮死症例は研究期間内には該当症例がなく、また、正期産の比較対照症例も軽症症例であり、対象、比較対照いずれも早期に退院したため、正期産症例では、対象、比較対照いずれにおいても全例で日齢 3 までの採取となった。

3)超低出生体重児の脳室内出血の病態解析およびインドメタシンによる脳室内出血予防の作用機序の解明

自治医科大学総合周産期母子医療センター新生児集中治療部に入院した超低出生体重児を対象とし、15 例から 90 検体を採取・測定した。また、インドメタシンによる脳室内出血予防を採用していない獨協医大新生児集中治療部に入院した超低出生体重児を

比較対照として、11例、57検体を採取・測定した。

血液検体採取は出生時、日齢1、2、3、7、14に行った。

2) 血液検体は血清分離を行い、血球、血清ともに凍結保存した。

3) 多項目同時測定には、自治医科大学周産期センター設置のBio-rad社のBio-plex multiple suspension array systemにて行った。サイトカインは、Bio-rad社の、human 17-plex キットを用いて測定した。測定項目は、IL1 β 、IL2、IL4、IL6、IL8、IL10、IFN- γ 、TNF- α 、IL5、IL7、IL12、IL13、IL17、GM-CSF、G-CSF、MCP-1、MIP-1 β の17項目を測定した。転写因子は、Panomics社のProcarta Transcription Factor Plex Kitを用い、8種類の転写因子発現を測定した。測定項目は、NF κ B、STAT、c-myc、GATA、NeuroD1を測定した。

4. 研究成果

1) 新生児仮死の病態解析

① 正期産児での在胎週数は、対象群 40.4 \pm 0.5週、比較対照群 37.2 \pm 0.4週、出生体重は対象群 3324 \pm 444g、比較対照群 2576 \pm 441gと、比較対照群で在胎週数が短く、出生体重が小さかった。これは、比較対照群全例が帝王切開出生児であるのに対し、対象群では2例のみとなっているためと考えられる。

早産児では、在胎週数は対象群 34 \pm 1週、比較対照群 33.8 \pm 0.5週、出生体重は対象群 2543 \pm 306g、比較対照群 1898 \pm 199gであった。

② 正期産産例において、生後1分および5分のApgarスコア(4.2 \pm 2.7 vs 8 \pm 0.0 (p=0.013)、5.8 \pm 2.1 vs 9 \pm 0.0 (p=0.009))、臍帯血での血ガス分析のpHおよびBE(7.01 \pm 0.2 vs 7.27 \pm 0.02 (p=0.02)、-15.4 \pm 7 vs -3.7 \pm 1.4 (p=0.006))が、いずれも対象群で有意に低値であった。

早産新生児仮死症例では、生後1分および5分のApgarスコアは対象群で有意に低値であったが(1.7 \pm 1.2 vs 7.3 \pm 0.9 (p<0.001)、4 \pm 1 vs 8.5 \pm 0.6 (p<0.001))、臍帯血での血液ガスのpH、BEには差がなかった。

③ 退院時の頭部MRI、ABR、EEGは正期産児では全例正常範囲内であった。

早産児では、頭部MRIは3例中2例で白質の凝固壊死があったが、ABR、EEGではいずれの症例でも異常がなかった。

④ サイトカイン測定結果

対象群において、出生直後にはTNF- α 、IL1 β 、IL6、IL8、IL10は高値を示し、経時的に低下したのに対し、比較対照群では横ばいで経過した。これは、正期産児、早産児ともに

同様の傾向であった。

新生児仮死により生後早期より炎症性サイトカインが産生され、新生児仮死による脳障害発症との関連が考えられた。

⑤ 対象群における正期産産例と早産産例の比較

生後1分および5分のApgarスコアに有意差はなかったが、臍帯血での血液ガスpHおよびBEは早産産例で1分、5分ともに低い傾向があった。

TNF- α 、IFN- γ 、IL1 β 、IL6、IL8、IL10は正期産産例、早産産例ともほぼ同値で、生後低下したが、IL17は早産産例で高値を示し、むしろ生後に上昇していた。

退院時の頭部MRIにおいて、正期産産例では全例異常所見がなかったのに対し、早産産例では3例中2例で白質の凝固壊死があった。

IL17は、線維芽細胞や上皮細胞、血管内皮細胞、マクロファージなど、広範囲にわたる細胞に作用して、IL6やTNF- α といった炎症性サイトカインやケモカインの誘導、好中球の遊走を強力に行うことにより炎症を誘導すると考えられており、新生児仮死による脳障害発症との関連が示唆された。

⑥ 転写因子発現

ほとんどの項目では、両群において、日齢0から日齢3までほぼ一定の値で推移したが、NF κ B、STAT1、STAT4、NeuroD1では、日齢3に上昇する傾向があった。統計的に有意差はなかった。症例数が少なく、また、仮死症例も軽症症例のみであったため、今後、重症仮死例も含め、症例数を増やし、検討していく必要がある。

2) 超低出生体重児の脳室内出血の病態解析およびインドメタシンによる脳室内出血予防の作用機序の解明

① 在胎週数は、対象群 26.3 \pm 2.2週、比較対照群 25.2 \pm 2.1週、出生体重は、対象群 709 \pm 160g、比較対照群 746 \pm 152gで、いずれも有意差はなかった。両群で、入院中に脳室内出血を発症した症例はなかった。

② サイトカインの測定結果

TNF- α 、IL1 β 、IFN- γ 、IL10など炎症に関わるサイトカインは対象群で生後低下傾向を示したのに対し、比較対照群では増加ないしは横ばいで経過し、両群間で有意差を認めなかった。IL6、IL8、MCP-1は両群で有意差はなかった。

③ 両群とも、脳室内出血を発症した症例はなかったが、すでに大規模研究により、インドメタシンによる脳室内出血発症抑制は証明されていることから、生後のサイトカイン産生を抑制することが、インドメタシン投与による脳室内出血発症抑制の機序であることが示唆された。

④ 近年、数種類のプロスタグランジンレセ

プターが同定され、それぞれ異なる機能を有することが報告され、プロスタグランジンとサイトカイン産生との関連が示唆されてきている。

インドメタシンは、シクロオキシゲナーゼ II を阻害することにより、プロスタグランジン産生を抑制する。その結果、いくつかの炎症性サイトカイン産生が抑制され、脳室内出血発症を抑制すると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

小池泰敬、高橋尚人、河野由美、矢田ゆかり、鈴木由芽、西村仁、俣野美雪、桃井真里子
CAM 群と PIH 群における超低出生体重児の生後 2 週間のサイトカインプロファイルの経時的推移
第 115 回 日本小児科学会 2012 年 4 月 20 日 福岡

小池泰敬、高橋尚人、河野由美、矢田ゆかり、鈴木由芽、西村仁、俣野美雪、渡部功之、鈴木宏、桃井真里子
脳室内出血予防インドメタシン投与が超低出生体重児の生後 1 週間の血中サイトカイン濃度に及ぼす影響の検討
第 48 回 日本周産期新生児学会 埼玉

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小池 泰敬 (KOIKE YASUNORI)
自治医科大学・医学部・助教
研究者番号：00382903

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：