

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791118

研究課題名(和文) 新生児脳低温療法のサイトカイン産生・転写因子発現に及ぼす影響の検討

研究課題名(英文) The impact of body hypothermia therapy on serum cytokine and transcription factor level of infant with neonatal asphyxia.

研究代表者

小池 泰敬 (KOIKE, YASUNORI)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：00382903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：低温療法を施行した重症新生児仮死3例(重症群)と、低温療法を必要としなかった軽症新生児仮死15例(軽症群)、比較対照症例13例(対照群)について、日齢0、1、2、3における血清サイトカイン濃度と核内転写因子発現およびシグナル伝達分子を測定した。仮死群では炎症性サイトカインが有意に高値を示した。軽症群と対照群では、炎症性サイトカインは経時的に低下したが、重症群では高値が持続した。IL10は各群において、経時的に低下した。転写因子発現とシグナル伝達分子測定では、Smad2が重症群で有意に低値であった。重症新生児仮死児では炎症が持続し、その炎症は低温療法でも抑制する事ができていなかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed cytokine and transcription factor levels in peripheral blood from 3 full-term infants with neonatal asphyxia who received body hypothermia therapy(severe group) and those from 15 full-term infants with neonatal asphyxia who did not received body hypothermia therapy(mild group) and those from 13 full-term infants without neonatal asphyxia(control group) on 0,1,2,3 day of life. We found that inflammatory cytokines were at higher level in the asphyxiated group. In mild group and control group, serum level of such inflammatory cytokines decreased over time, those are persist at high level in severe group. Serum level of IL10 decreased over time in three groups and serum level of Smad2 is significantly lower in severe group compared to the other groups. Inflammation persists in neonates with severe asphyxia and body hypothermia therapy cannot help reduce inflammation of neonatal asphyxia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：新生児仮死 低温療法 サイトカイン 転写因子 シグナル伝達分子

1. 研究開始当初の背景

1) 現在も、新生児仮死は新生児の神経学的後遺症の最大の原因である。これまでの報告によれば、重症新生児仮死に伴う脳障害発症の機序には、低酸素や虚血だけでなく、児自身が産生するサイトカインが関与するといふ。

2) 2010年の新生児蘇生法ガイドライン改訂に伴い、重症新生児仮死に対して低体温療法が標準治療として行われることになった。低体温療法の効果は多くの RCT により明確となっているが、その機序は必ずしも明らかでない。

3) これまで、検体量の問題から新生児領域におけるサイトカイン解析は容易ではなかった。

我々は、微量検体でも大量の情報解析が可能な suspension-array system である Bio-rad 社の Bio-plex 200 system を自治医科大学総合周産期センターに設置し、血清 30 μ l で 17 項目(最大 27 項目)のサイトカインが測定できるようにし、種々の新生児疾患のサイトカインプロファイルデータを報告してきた。また、本システムではキットを変えることで転写因子発現も測定することが可能である。

4) これらより、新生児仮死時のサイトカイン、転写因子のプロファイリングを行い、新生児仮死の免疫学的病態が明らかになると考えた。

2. 研究の目的

新生児仮死のあった正期産児を対象とし、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、シグナル伝達物質を測定する。

これらの結果と臨床経過、退院前の脳波、聴性脳幹反応(以下 ABR)、頭部 MRI などの検査と合わせ、新生児仮死による脳障害発症の病態を解析する。

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、児からの採血を行うこととした。

2) 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(以下、当院 NICU) および獨協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、検体を採取、測定を行った。さらに、対象群は低体温療法を要した重症群

と、低体温療法を要しなかった軽症群に分けて検討した。

3) 当院における、新生児仮死症例に対する管理方針を表 1 に、低体温療法の適応基準を表 2 に示す。

表 1 新生児仮死症例に対する管理方針

<p>低体温療法施行基準に該当しない場合は、以下の基準に準じて管理を行う。</p> <p>以下の項目に該当する場合は、NICUに入院の上、硫酸マグネシウムを投与する。</p> <p>(1) 在胎35週以上、出生体重1800g以上</p> <p>(2) 10分時の Apgar score < 6点 もしくは、臍帯血液ガス pH < 7.1 and/or BE \leq -10mmol/l</p> <p>(3) 先天異常および重篤な合併症がない。</p> <p>硫酸マグネシウムの投与方法</p> <p>(1) 生後90分以内に投与を開始する</p> <p>(2) 初回250mg/kg、以後24時間ごとに125mg/kgを2回、計3回投与する。</p>
--

表 2 低体温療法の適応基準

<p>以下の5項目をすべて満たす児を対象とする</p> <p>(1) 在胎36週以上、出生体重1800g以上</p> <p>(2) 新生児仮死が存在する 10分時の Apgar score \leq 5点、かつ、生後1時間以内の臍帯血・動脈・静脈・末梢毛細血管での血液ガス pH < 7.0、かつ BE \leq -16mmol/l</p> <p>(3) 新生児脳症の所見がある Modified Sarnat分類2度以上、あるいはThompson score 中等度以上、あるいは、aEEGにおいて中等度以上の異常か痙攣発作波がある</p> <p>(4) 生後6時間以内に低体温療法を開始でき、家族の承諾がある</p> <p>(5) 先天異常および重篤な合併症がない。</p>
--

4) 対象群、および比較対照群、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、比較対照症例はいずれも軽症症例で早期に退院したため日齢 3 までの採取となった。そのため、解析も日齢 0、1、2、3 についてのみ行った。

5) 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。

6) 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、IL2、IL4、IL6、IL8、IL10、IFN、TNF、IL5、IL7、IL12、IL13、IL17、G-CSF、GM-CSF、MCP1、MIP1 の 17 項目を測定した。転写因子は、当初 Panomics 社の Procarta Transcription Factor Plex Kit を用いる予定であったが、製品が製造中止となったため、Bio-rad 社の cell signaling phosphoprotein assay kit を用い、ATF2、ERK1/2、HSP、JNK、MEK1、NF B、p38 MAPK、Smad2 の 8 種類の転写因子およびシグナル伝達分子の発現を測定した。

4. 研究成果

1) 新生児仮死症例 18 例(重症群 3 例、軽症群 15 例)からのべ 88 検体、比較対照 13 例(呼吸障害 10 例、嘔吐 2 例、低体重 1 例)からのべ 43 検体を採取し、測定を行った。獨協医大からの検体提供はなかった。

2) 各群の周産期因子を表3に示す。

在胎週数、出生体重は各群に有意差はなく、その他の周産期因子にも各群間に有意差はなかった。

生後1分および生後5分のApgarスコアが比較対照群に比し対象群が、また、対象群でも軽症群に比し重症群が、いずれも有意に低値であった。

臍帯血での血液ガス分析のpHおよびBEも同様に、対象群および重症群で有意に低値であった。

表3 各群の周産期因子

	対象群(n=18)		比較対照群(n=13)	
	全体	重症群(n=3)	軽症群(n=15)	
在胎週数(週)(平均±SD)	39.2±1.4	38±1	39.5±1.4	38.3±1.6
出生体重(g)(平均±SD)	3128±489	2581±382	3237±441	2799±373
男児(%)	11(61.1)	1(33.3)	10(66.7)	5(38.5)
small for gestational age(%)	0	0	0	1(7.7)
双胎(%)	0	0	0	3(23.1)
胎外出生(%)	6(33.3)	1(33.3)	5(33.3)	0
帝王切開(%)	6(33.3)	1(33.3)	5(33.3)	9(69.2)
1分時Apgar score (平均±SD)	3.7±2.4	1±1	4.2±2.2	8.2±0.6
5分時Apgar score (平均±SD)	6.3±2.2	3±2	7±1.6	9±0.4
10分時Apgar score (平均±SD)	7.2±1.6	5.7±1.5	7.5±1.5	-
前駆破水(%)	5(27.8)	0	5(33.3)	0
臍帯血pH(平均±SD)	7±0.2	6.8±0.1	7.1±0.1	7.3±0.1
臍帯血BE(平均±SD)	-15.6±6.1	-24±7.1	-14±4.5	-3.4±1.6

4) 臨床像

対象群18例において、人工呼吸管理を施行したのは11例(61.1%、重症群3例(100%)、軽症群8例(53.3%))、新生児痙攣を認めたのは4例(22.2%、重症群2例(66.7%)、軽症群2例(13.3%))であった。死亡症例はなかった。

5) 脳波、ABR、頭部MRI

いずれの検査も退院前に施行したものである。

脳波検査を施行した10例(重症群3例、軽症群7例)において、5例(50%、重症群2例(66.7%)、軽症群3例(42.9%))に脳波異常が認められた。

ABRは対象群全例で施行され、18例中2例(11.1%)で閾値の上昇が認められ、2例とも軽症群であった。

頭部MRIを施行した17例(重症群3例、軽症群14例)において、2例(11.8%)で異常所見があり、重症群、軽症群、それぞれ1例ずつであった。

6) サイトカイン測定結果

IL6、IL8、IL10、IL12、GCSFは対象群において出生直後から高値で有意差を認めた。IL6、IL8は軽症群では経時的に低下したのに対し、重症群では横ばいで推移した。IL10、GCSFは重症群、軽症群ともに経時的に低下した。IL12は各群ともに横ばいで推移した。

7) 転写因子発現

各群ともに、Smad2はほぼ一定値で推移したが、重症群が有意に低値であった。

その他の項目には、各群、各日齢で有意差はなかった。

8) 考察

新生児仮死により、多項目の炎症に関わるサイトカインが上昇していた。新生児仮死が軽症の場合はサイトカイン濃度は経時的に低下するが、重症の場合は炎症が持続し、低体温療法にても抑制されていなかった。IL10が重症群でも経時的に低下している事、抗炎症作用を有するTGF-βのシグナル伝達物質であるSmad2が重症群で低値であり、重症群で炎症が抑制されず炎症が持続する事の一因であると考えられた。

退院前に施行された脳波、ABR、頭部MRIについての検討は、異常所見のあった症例が少なく統計学的検討は行っていない。しかし、重症新生児仮死のあった児において、脳波異常は3例中2例に認められたものの、ABR異常はなく、頭部MRI異常は3例中1例のみであった事は特筆すべき所見と考える。今後、症例数を増やして検討する必要がある。

現段階で、対象群で3歳を過ぎた症例はなく、現在もフォローアップ中である。フォローアップを継続し、長期予後も含めた検討を行っていく予定である。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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・講師
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：