

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791122

研究課題名(和文) 血中ステロイド一斉測定による超早産児の副腎機能発達の評価

研究課題名(英文) Evaluation of Adrenal Development in Preterm Infants by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry based Serum Steroids Assay

研究代表者

三輪 雅之 (Miwa, Masayuki)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：30383855

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)：早産児では晩期循環不全という突然の低血圧を発症する疾患があり、病因は副腎機能が関与していると考えられている。早産児の副腎ステロイド分泌パターンが生後どの様に変化するかは判明していない。早産児の副腎機能を評価するため最も信頼性の高いLCMSMS法を用い、早産児では晩期循環不全発症群と非発症群では生後のステロイド分泌パターンが異なり、副腎機能の成熟に差があることが判明した。晩期循環不全を発症する早産児では出生早期のコルチゾール分泌量が多いがコルチゾン是非発症群と差を認めない。コルチゾール、コルチゾンおよびアルドステロンの日齢による変化によって晩期循環不全発症児を抽出できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Sometimes, preterm infants fall into hypotension suddunly after the acute period. This is called Late Circulatory Collapse(LCC) and these etiology is considered to adrenal insufficiency. We measured serum steroids profile using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MSMS). That is the most reliable method to evaluate neonatal adrenal function. We have found that preterm infants with and without LCC have a different pattern of steroid secretory development after birth. It is suggested the possibility of predicting LCC by using alteration in secretion of cortisol, cortisone, and aldosterone.

研究分野：新生児学

キーワード：早産児副腎機能 晩期循環不全 超低出生体重児 副腎発達 タンデム質量分析

## 1. 研究開始当初の背景

新生児医学の発展に伴い、現在では 28 週未満の超早産児、出生体重 1000g 未満の超低出生体重児も大半が生存退院する様になった。これらの児では母体へのステロイド投与により、慢性肺疾患や死亡率が減少する一方、脳性麻痺が増加すること、晩期循環不全に対するステロイド投与が遅れることで脳室周囲白質軟化症が発症することが知られている。呼吸循環系の管理とともに内分泌学的な評価として早産児の副腎機能解析が重要となった。

一方で副腎は胎児と成人では形態学的にも内分泌学的にも著しく異なった特徴を持つ。胎児副腎は体重比で見ると成人副腎の約 20 倍の大きさであるが、その大半は成人では退縮し消失している胎児副腎皮質（胎生皮質）である。成人副腎皮質（永久皮質）となる部位は非常に薄く、正期産新生児においても副腎皮質の 4 分の 3 が胎生皮質である。内分泌学的にも永久皮質がコルチゾールやアルドステロンを分泌するのに対し、胎生皮質はプレグネノロンや 17OH プレグネノロン、DHEA を分泌する。胎生皮質ステロイドの影響で通常の免疫学的手法での新生児副腎機能解析は不可能であり、我々は尿ステロイド一斉分析、液体クロマトグラフ質量タンデム分析 (LCMSMS) により新生児副腎機能解析を行ってきた。先行研究では早産児の副腎皮質ステロイド分泌パターンは生後数日では正期産児と同様であり、早産児でもすでに胎外生活に適應するための反応を有しているが、コルチゾール値の上昇は低く、副腎機能も低いと考えられた。しかしながら、早産児の副腎機能が出生後日齢を重ねると、どの様に変化・発達していくかは判明していなかった。

## 2. 研究の目的

超早産児では急性期を脱した後、低血圧に陥る病態が存在し晩期循環不全 (LCC) と言われている。LCC は急性期を脱し、全身状態が安定した生後 3-5 週に発症することが多い。この病態は不明な点が多いが、我々は胎児副腎皮質ステロイド分泌パターンから成人副腎皮質ステロイド分泌パターンへの移行遅延による絶対的または相対的副腎ステロイド分泌不全に起因するという仮説を立て、超早産児の副腎機能に関する研究を行った。早産児では正期産児と比較し、出生早期は同様のステロイド分泌パターンを示す事が判明した。本研究の目的は血中ステロイド一斉分析法を用い、超早産児の副腎ステロイド分泌パターンの経時的（縦断的）解析を行い、晩期循環不全の病態および早産児の副腎機能の日齢による発達を解明することである。

## 3. 研究の方法

血中ステロイド一斉測定は LCMSMS 法により 14 種の血中ステロイドホルモンを同時測定する方法である。新生児の血清に含まれる

胎生皮質ステロイドは代謝物を含めると数十種類におよぶ。免疫化学的測定法では抗原抗体反応の際に多量に存在する胎生皮質ステロイドの交差反応のために測定値が偽高値を示してしまう。また同方法では測定に必要な血清は 2ml 以上である。

LCMSMS 法では偽高値の原因となる胎生皮質ステロイドを前処理および液体クロマトグラフで分離し、さらにタンデム質量分析計で分子量・構造特異的フラグメントイオンにより分別定量されるため極めて特異的な測定が可能である。LCMSMS 法の特徴として血清 100  $\mu$ l で測定可能、複数のステロイドホルモンを一斉分析可能、高感度、他のステロイドホルモンによる干渉を受けないため特異度が高いことが上げられる。

正期産新生児の日齢 4 の血清を用いて、LCMSMS 法測定による正期産新生児の副腎皮質ステロイドホルモン基準値を作成した。先行研究では正期産基準値をもとに出生週数別に日齢 4 のステロイドプロファイル比較を行い、出生後早期のステロイド分泌パターンの解析を行った。

LCMSMS を用いて 28 週未満で出生した早産 AGA 児において、出生後から修正 37 週以降まで経時的に血清を採取し、ステロイド一斉測定を行い、超早産児のステロイド分泌パターンを解析する。超早産児の中でも出生後早期に全身状態の安定のためにステロイド投与を必要とした症例、晩期循環不全のためにステロイド投与を必要とした症例に関して別個に解析を行い、ステロイド投与を要さなかった早産児とのステロイド分泌パターンの違いを比較する。

副腎機能評価の指標としては、日齢 4 の時点での早産児と正期産児での相違を考慮し、永久皮質束状層グルココルチコイドの指標としてコルチゾール (F)、コルチゾン (E)、永久皮質球状層ミネラルコルチコイドの指標としてアルドステロン、胎生皮質の指標として 17OH プレグネノロン、DHEA の測定を行う。これらのホルモン値とステロイドカスケードを考慮し、E/F 比、17OHP/17OH プレグネノロン比 (17OHP 比) を加えて解析を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 修正 37 週での副腎機能評価

28 週未満の早産児が修正 37-38 週の時点でのステロイドプロファイル測定およびステロイド投与を要した晩期循環不全群 (LCC 群) と非発症群の比較を行った。両群ではミネラルコルチコイド、グルココルチコイドに差は認めず、胎生皮質は LCC 群で高値であった。また正期産日齢 4 基準値と比較するとコルチゾールの基礎分泌は早産児でも差は認めなかった。

早産児でも修正 37 週に到達すれば永久層機能は正期産児と差がない可能性が示唆された。また超早産児では晩期循環不全を発症する群としない群では胎生皮質ステロイド

に差があることから副腎の成熟過程に違いがあることが示唆された。

### (2) 早期ステロイド投与の影響

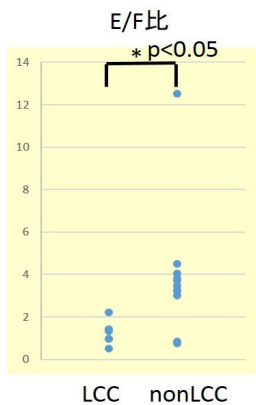
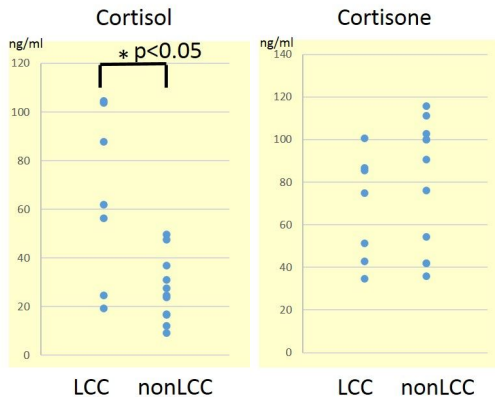
早産児の経時的副腎機能評価を行うに際し、28 週未満の児で生後 3 日までにステロイド投与の有無によりプロファイルに差が生じるかを検討した。LCC 非発症群では日齢 0-3 にステロイド投与を行っても日齢 4 のステロイドプロファイルに差は認めなかった。また、日齢 0-3 のステロイド投与の有無によっても LCC 発症には差を認めなかった。出生後早期のステロイド投与は日齢 4 のステロイドプロファイルには影響を与えず、LCC の発症にも関わっていないことが判明した。

### (3) LCC の有無によるステロイドプロファイルの経時変化の違い

28 週未満の児において、LCC 発症群、非発症群で日齢 4 ならびに生後 2 週でのステロイドプロファイルと比較した。

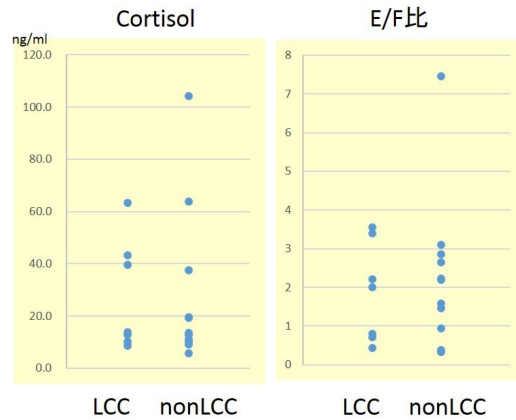
#### 日齢 4

LCC 発症群は非発症群に比べコルチゾールは高値であったが、コルチゾンに差は認めなかった。そのため E/F 比は LCC 群で低値となった。その他のステロイドホルモンには有意差は認めなかった。



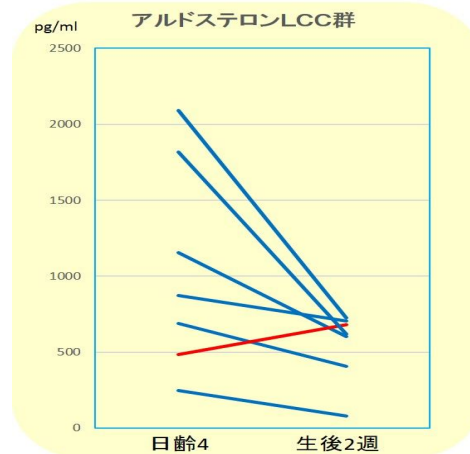
後に LCC 発症をする児は安定している様に見えてもコルチゾール需要が高いことが示唆された。

生後 2 週  
LCC 発症群と非発症群ではステロイドプロファイルに有意な差を認めなかった。



日齢 4 で存在していたコルチゾールの差は消失した。

日齢 4 と生後 2 週にかけてのステロイドプロファイルと比較すると非 LCC 群では特別な傾向は認めなかったが LCC 群では日齢 4 から生後 2 週にかけてアルドステロンが低下する傾向を認めた。



日齢 4 の E/F 2.5 以上、日齢 4 から生後 2 週にかけてアルドステロンが低下する 2 点から LCC を発症する児を抽出できるか検討したところ、感度 85.7%、特異度 100%となった。症例数が十分ではないため交絡因子を除外しきれているとは言えないが、28 週未満の児では LCC のリスク児を抽出できる可能性が考えられた。

28 週未満の早産児で LCC 発症群と非発症群のステロイドプロファイルの経時変化は以下のようになることが判明した。

- ・ LCC 群では日齢 4 のコルチゾールが高値
- ・ LCC 群では生後 2 週にかけてアルドステロンが低下する。
- ・ 日齢 4 のコルチゾールの差は生後 2 週には消失するが、修正 37 週では胎生皮質分泌が LCC 群で非 LCC 群より低値となる。

< 経時的変化 >

	日齢 4	2 週	修正 37 週
Cortisol	LCC > nLCC	差なし	差なし
Cortisone	差なし	差なし	差なし
E/F	LCC < nLCC	差なし	差なし
17OHPreg	差なし	差なし	LCC < nLCC
DHEA	差なし	差なし	LCC < nLCC
17OHP4	差なし	差なし	LCC < nLCC
17OHPreg/4	差なし	差なし	差なし
Aldosterone	差なし	差なし	差なし

ステロイドプロファイルはホルモン分泌状態を示しており、晩期循環不全の病因を示しているわけではない。しかし、LCC 発症群と非発症群でホルモン分泌の経時的変化に差があることは副腎機能そのものや成熟に差があることを示唆しており、LCC の病因としても副腎機能が最も関連していると考えられる。

以上の研究から、生後早期のステロイド投与はその後のステロイドプロファイルや LCC 発症には影響を与えない事も判明した。

また、LCC を発症する児としない児には副腎機能の成熟に違いがあり、発症には副腎機能が強く関与していること。さらに日齢 4 と生後 2 週のステロイドプロファイルを用いて LCC のリスク児を抽出できる可能性があることが判明した。これにより超早産児においてより適切なステロイド投与が行える様になると考えられる。

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 3 件 )

三輪雅之

28 週末満の超早産児における日齢 4 および日齢 14 の血中ステロイドプロファイル 晩期循環不全の有無による比較  
第 59 回日本未熟児新生児学会, 2014.11.12  
愛媛県松山市道後町 2-5-1  
ひめぎんホール

三輪雅之

26 週末満の超早産児の日齢 4 ステロイドプロファイル比較  
HDC 投与・晩期循環不全発症有無に関して  
第 58 回日本未熟児新生児学会, 2013.12.2  
石川県金沢市昭和町 16-3  
ANA クラウンプラザホテル金沢

三輪雅之

晩期循環不全の有無による超早産児の修正 37 週におけるステロイドホルモン基礎分泌の違い  
第 57 回日本未熟児新生児学会, 2012.11.25  
熊本県熊本市中央区上通町 2-1  
ホテル日航熊本

[ 図書 ] ( 計 1 件 )

三輪雅之 ( 河井昌彦編集 ) メディカ出版

新生児内分泌ハンドブック改訂 2 版 2014;  
p33-p39

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]

特になし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

三輪 雅之 ( MIWA MASAYUKI )

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号 : 30383855