

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 17 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461638

研究課題名(和文) 成育限界期の早産児におけるコーチゾル・バソプレッシン分泌不全の病態解析

研究課題名(英文) Pathogenesis of insufficient adrenocortical response in premature fetal sheep suffered from intrauterine inflammation

研究代表者

秋山 志津子 (Akiyama, Shizuko)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：80466549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒツジ未熟胎仔において炎症性ストレスなどがコーチゾル分泌能とその循環動態に与える影響を解析する計画を立てた。その結果、炎症群と対照群のヒツジ胎仔に合計45回のCRH負荷試験を実施して血漿検体を採取保存できた。しかし、本研究期間内に、ヒツジ血漿AVP、ACTH、cortisol濃度を免疫抗体法で測定するためのkitが国内では入手できなくなった。その代替えとして、タンデム質量分析法(LC-MS/MS)によるステロイド・プロファイリング解析とヒツジAVPならびにACTH測定を現在開発中である。

研究成果の概要(英文)：We planned to clarify the effect of intrauterine inflammation on the cortisol secretion and its circulatory response in premature lamb because the fetal endocrine potential to adapt the postnatal environment might have been already deteriorated by the inflammatory stress before birth. In consequence, we could store the plasma samples for 45 times of the corticotrophin releasing hormone test. Unfortunately, however, commercial kits for immunoassay of sheep AVP, ACTH and cortisol could not be available domestically during the study period. Instead, we have been developing the method of peptides and steroid profiling analysis using the LC-MS/MS.

研究分野：胎児生理学

キーワード：胎児 早産児 成育限界 子宮内炎症 副腎皮質ホルモン CRH負荷試験 ACTH バソプレッシン

1. 研究開始当初の背景

超低出生体重児はその副腎皮質容積の80%以上を3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性のない胎児層が占めるためコーチゾル分泌能に乏しく、潜在的に相対的副腎不全の状態である。そのため出生後の急性期を経て1-2週間を過ぎた頃に誘因なく、もしくは慢性肺疾患の増悪期と一致して、カテコラミン抵抗性の低血圧と乏尿に陥りやすい^{1,2)}。本邦では晩期循環不全と呼ばれるこの病態の本質は相対的副腎不全であるため、その殆どはグルココルチコイド投与によって速やかに症状が改善する。しかし、診断が遅れて低血圧による脳虚血が遷延すれば、深刻な脳白質損傷が誘導されて脳性麻痺の原因となるため、その予防法の開発は周産期新生児医療の大きな課題とされている。

一方、妊娠24週未満や出生体重500g未満の生育限界で生まれた早産児の相対的副腎不全ではグルココルチコイドに対して抵抗性を示すことが希ではなく、強力な昇圧作用を持つバゾプレッシンの持続点滴によって辛うじて主要臓器(脳、心、副腎など)の血流量が維持される³⁾。したがって、生育限界で生まれた早産児では出生前後の多大なストレスのため、コーチゾルのみならずバゾプレッシン分泌能までもが疲弊している可能性があり、その一方で、外来性のバゾプレッシンが未知の生理活性を示した可能性も否定はできない⁴⁾。

そこで本研究では、ヒツジ胎仔の慢性実験系を用いて生育限界期で出生させ、胎盤から切離されるストレスがコーチゾル・バゾプレッシン分泌能とその循環動態に与える影響を明らかにする。また、われわれがヒツジ胎仔で開発した子宮内炎症モデルを応用して⁵⁾、出生前の炎症が出生後の内分泌機能とその循環動態に与える影響も合わせて解析する。

本研究のように生育限界児の内分泌機能がその循環動態に与える影響を解析した大型動物実験は国内外において未だ認められない。その第一の理由は生育限界仔の肺が著しく未熟であるため人工呼吸器で管理できないことにある。ヒツジ胎仔も妊娠120日(ヒトの妊娠32週に相当、満期147日)以前では人工呼吸で管理できない。これを克服するためにわれわれは人工胎盤装置(図1)を新規に開発し、これを装着させることで妊娠110日(ヒトの妊娠30週相当)のヒツジ生育限界仔を用いた実験が初めて実現可能となった⁶⁾。

本研究により、子宮内環境の未熟性や炎症性虚血性ストレスなどによって、成育限界児では体外環境に適応するための内分泌機能が胎生期にすでに損なわれている可能性を指摘できる。したがって、この研究成果を踏まえることによって、出生前の子宮内環境に応じた出生後の内分泌ホルモン補充療法を提案することができるのではないかと考えている。

2. 研究の目的

出生前の子宮内環境に応じた早産児への内分泌ホルモン補充療法を提案するため、成育

限界期の早産児では子宮内環境の未熟性やストレスによって、子宮外環境に適応するための内分泌機能が胎生期にすでに損なわれているという仮説を検証する。そのため、ヒツジ胎仔を生育限界期で出生させ、炎症性ストレスや胎盤から切離されるストレスがコーチゾル・バゾプレッシン分泌能ならびにその循環動態に与える影響を明らかにする。

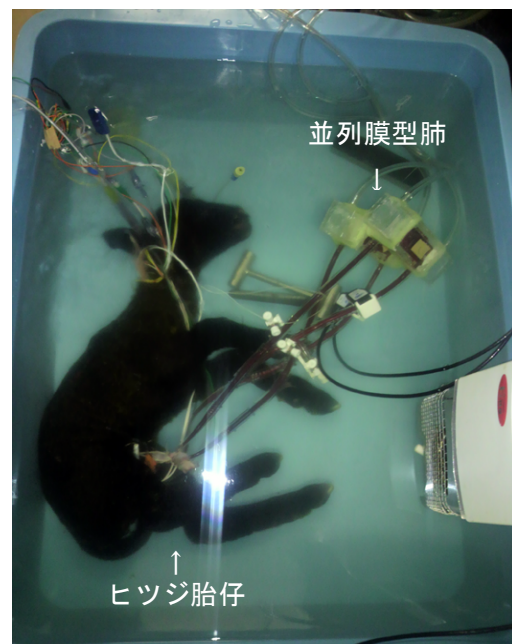
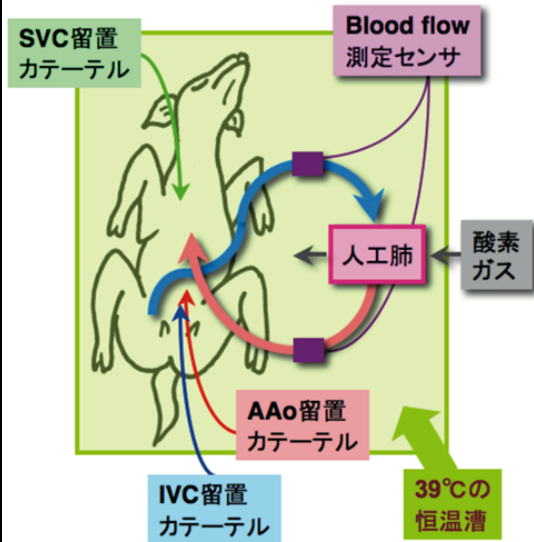


図1。(上段)人工胎盤システムの概念図。臍帯動脈から脱血された静脈血を膜型人工肺で動脈血化し、胎仔心ポンプ駆動で臍帯静脈に供血する。(下段)妊娠110日(満期147日)の未熟なヒツジ胎仔に並列膜型肺回路を装着して人工羊水に浮遊させ60時間成育した。

3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験委員会の承認(2013医動-008, 2015医動-209)のもと同医学部附属動物実験施設において実施された。

(1) 慢性実験系の作成

妊娠91-100日(ヒト妊娠24-27週相当)に、全身麻酔下に母獣を開腹して子宮を切開し、胎仔の腹部大動脈、上下大静脈、羊水腔内にカテーテルを留置、心電図電極を固定した後、胎仔を子宮内に戻して閉腹した。以後、胎仔の心拍数、動脈圧、中心静脈圧を連続監視して記録した。

(2) 出生前の子宮内環境を設定

手術後48時間を経て胎仔を2群に分けた(対照群、炎症群)。炎症群の胎仔には5日間連続してgranulocyte-colony stimulating factor (Neutrogen®) 50 µg/日を静注し、その3日目に1回だけ羊水腔内にendotoxin (*E. coli* 055:B5) 20 mgを注入して壊死性の卵膜炎臍帯炎を誘導した⁵⁾。対照群には薬物の代わりに生理食塩水を投与した。

(3) 人工胎盤によるヒツジ胎仔の全身管理⁶⁾

慢性実験系作成の手術後7日を経て、母獣を帝王切開して胎仔の臍帯基部を露出させ、胎仔の臍帯動脈2本と臍帯静脈1本に血管カニューレを挿入し、並列2回路の膜型肺に接続した。回路内血液は胎仔の心ポンプのみで駆動させた。臍帯を切離した後、胎仔と人工胎盤回路を39°Cに加温した恒温槽の塩水に浮遊させた。

回路内凝血を予防するため低分子ヘパリンを持続点滴し、胎児循環を維持させるためプロスタグランディンE₂製剤を持続点滴して超音波ドップラーで右左短絡を確認した。血管作動薬による循環サポートは人工胎盤開始24時間以内に切り上げ、人工胎盤装着後3日間、胎児循環を維持させた。高カロリー輸液はglucose 20 g/kg/日、アミノ酸2.0 g/kg/日、脂肪1.0 g/kg/日を目安とし、150 ml/kg/日を維持輸液量とした。

(4) 成育限界仔の内分泌機能の評価

① 子宮内炎症に対するACTH、コルチゾール、バゾプレッシンの反応性

羊水endotoxin注入後0, 1, 6, 12, 24, 48時間に採血し、血漿ACTH、コルチゾール、バゾプレッシン濃度の経時変化を2群間で比較した。

② CRH 負荷による副腎皮質機能評価

全ての対象胎仔に対して炎症負荷前、帝王切開前、人工胎盤装着後にCRH負荷試験(CRH 1.5 µg/kg 静注)を実施した。負荷前、30, 60分後に採血し、ACTHとコルチゾールの反応性を2群間で比較した。

③ 低用量バゾプレッシン点滴への反応性

炎症負荷前と人工胎盤装着後にピトレッシンを0.3 mU/kg/分で持続点滴し、脳、心、肺、腎、副腎、腸における臓器血流量と血管抵抗(colored-microspher 法)の経時的変化を2群間で比較した。

④ 副腎皮質移行層の組織学的成長評価

剖検後に切り出した副腎皮質を抗3β-hydroxysteroid dehydrogenase抗体で免疫

染色し、陽性区域を移行層と定義して、胎児層/移行層の容積比を2群間で比較した。

4. 研究成果

本研究を開始するにあたり、血漿バゾプレッシン、コルチゾール、ACTH濃度の測定キットが、いずれも入手困難であることが判明した。国内外で唯一の血漿バゾプレッシン測定キット(AVP-RIA kit, Mitsubishi Petrochemical, Tokyo, Japan)は製造中止となった。国際的にヒツジで汎用されている血漿コルチゾール測定キット(¹²⁵I RIA kit (DiaSorin, Stillwater, MN)は法的規制のため国内の輸入代理店が取り扱いを中止し、その代替えとなりえるEIAキット(Gamma Coat Cortisol kit, Cambridge, Massachusetts)も製造中止となった。ヒツジで実績のある血漿ACTH測定キット(ACTH-II IRMA kit, Mitsubishi Petrochemical, Tokyo, Japan)も製造中止となった。

以上を踏まえて、先ず本研究期間に得られた血漿検体はすべて-80°Cで冷凍保管した。次いで、タンデム質量分析法(mass spectrometry, MS/MS)によるステロイド・プロファイリング解析とヒツジAVPならびにACTH測定を現在開発中である。これによって「視床下部/下垂体/副腎」軸のみならず、cortisol-cortisone shuttleや11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 1/2の影響を解析することが期待出来る。測定の見通しがつき次第、検体測定を依頼してデータ解析を行う予定である。

(1) 子宮内炎症に対するACTH、コルチゾール、バゾプレッシンの反応性

子宮内炎症が胎仔「視床下部/下垂体/副腎」軸に与える影響を解析するため、炎症負荷前後に実施したCRH負荷における血漿ACTHならびにコルチゾール濃度の経時変化を、炎症群(n=7)と対照群(n=8)で比較した。表1に両群胎仔の基本データを示した。

表1. 胎仔の基本データ(子宮内炎症負荷)

	対照群 (n=8)	炎症群 (n=7)
出生体重(kg)	1.27 ± 0.34	1.13 ± 0.23
雄/雌	2/6	3/4
単/双胎	5/3	3/4
手術日齢(日)	93.3 ± 1.7	94.1 ± 3.3
CRH試験の日齢:		
・負荷実験前(日)	96.3 ± 1.7	97.1 ± 3.3
・負荷実験後(日)	100.3 ± 1.7	101.1 ± 3.3

(2) CRH 負荷による副腎皮質機能の評価

胎盤切離が胎仔「視床下部/下垂体/副腎」軸に与える影響を解析するため、人工胎盤接続後に実施したCRH負荷における血漿ACTHならびにコルチゾール濃度の経時変化を、炎症群(n=1)と対照群(n=4)で比較した(表2)。

表 2. 胎仔の基本データ (人工胎盤装着)

	対照群 (n=4)	炎症群 (n=1)
出生体重 (kg)	1.13 ± 0.30	1.08
雄/雌	2/2	1/0
単/双胎	4/0	1/0
手術日齢 (日)	94.3 ± 3.4	93.0
人工胎盤装着 (日)	101.3 ± 3.4	100.0
CRH 試験の日齢:		
・負荷実験前 (日)	97.3 ± 3.4	96.0
・負荷実験後 (日)	101.3 ± 3.4	100.0
・人工胎盤後 (日)	104.3 ± 3.4	103.0

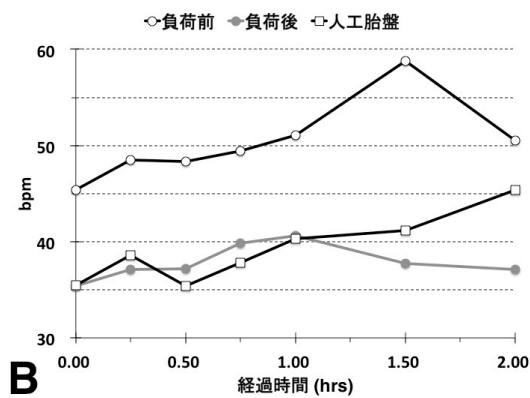
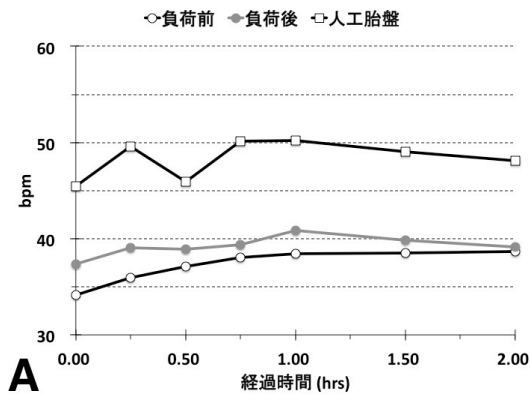


図 2. CRH 負荷試験後2時間の胎仔平均動脈圧の変化 (A, 対照群, n=4; B, 炎症群, n=1). 胎仔心拍数には有意な変化を指摘できなかったが, 胎仔平均動脈圧ではいずれの時期のCRH 負荷試験でも, 負荷後1.0時間まで持続的な血圧増加が観察された. この変化は炎症群と対照群の間で明らかな差はなかった.

(3) 低用量バゾプレッシン点滴への反応性

炎症負荷前と人工胎盤装着後にピトレスシン 0.3 mU/kg/分を持続点滴し, 脳, 心, 肺, 腎, 副腎, 腸の臓器血流量 (mL/g·min) と血管抵抗変化 (mmHg·min·g/mL) を炎症群 (n=1) と対照群 (n=1) で比較した (図 3).

両群とも未だ 1 例ずつであったため一定の傾向を指摘することはできなかった.

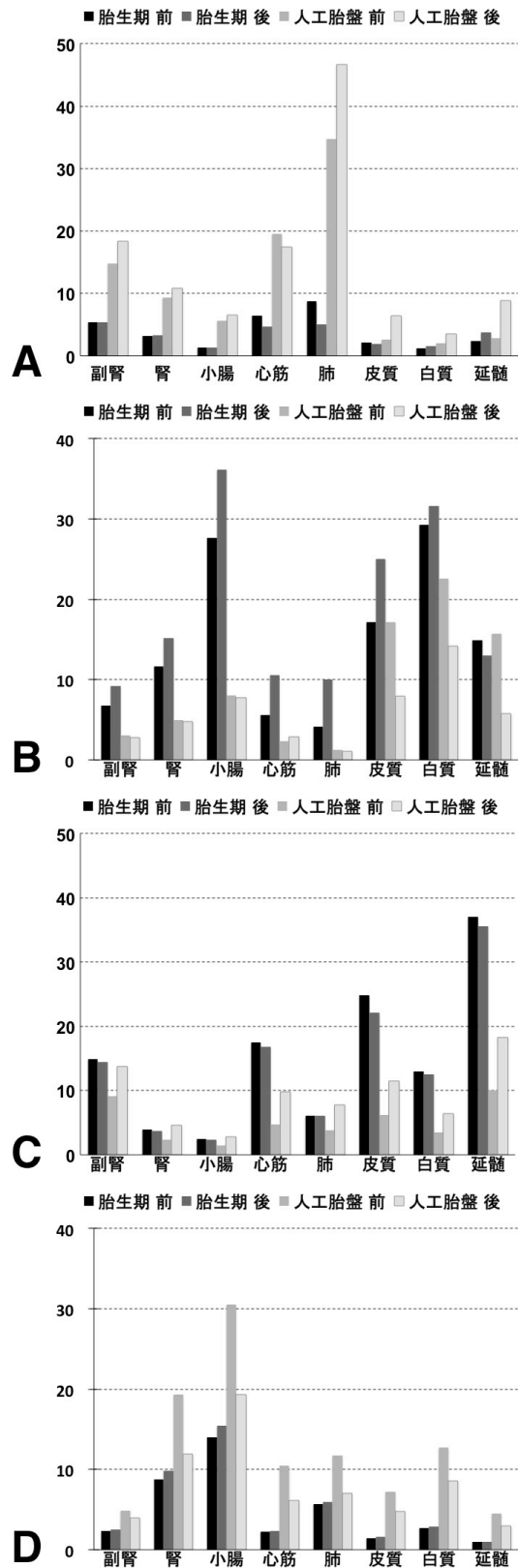


図 3. バゾプレッシン持続点滴に対するヒツジ胎仔臓器の血流量 (mL/g·min) と血管抵抗 (mmHg·min·g/mL) の変化. A, 炎症群の血流量; B, 炎症群の血管抵抗; C, 対照群の血流量; D, 対照群の血管抵抗.

(4) 副腎皮質移行層の組織学的成長評価
炎症群 (n=7) ならびに対照群 (n=8) はず

れも剖検後に切り出した副腎皮質で切片を作成し、H-E 染色上はとくに異常所見がないことを確認した。この後、抗 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 抗体で免疫染色し、陽性区域を移行層と定義して、胎児層/移行層の容積比を2群間で比較する予定である。

(5) 総括

残念ながら本研究期間内には内分泌ホルモン測定ができなかった。しかし、引き続きタンデム質量分析法 (MS/MS) によるステロイド・プロファイリング解析と ACTH 濃度測定を追加すれば、成育限界期の早産児では子宮内環境の未熟性やストレスによって、子宮外環境に適応するための内分泌機能が胎生期にすでに損なわれているという仮説を検証できると考えている。

[引用文献]

- 1) Aucott SW, Watterberg KL, Shaffer ML, Donohue PK; PROPHET study group. Early cortisol values and long-term outcomes in extremely low birth weight infants. *J Perinatol* 2010; 30: 484-488.
- 2) Watterberg KL, Gerdes JS, Cook KL. Impaired glucocorticoid synthesis in premature infants developing chronic lung disease. *Pediatr Res* 2001; 50: 190-195.
- 3) 松田 直. バズプレッシンの循環器系に及ぼす影響. 内分泌機能に大きく依存する新生児の循環調節 (シンポジウム). *日本周産期新生児医学会雑誌* 2012; 48 (in press)
- 4) Iwamoto HS, Rudolph AM, Keil LC, Heymann MA. Hemodynamic responses of the sheep fetus to vasopressin infusion. *Circ Res* 1979; 44: 430-438.
- 5) Saito M, Matsuda T, et al. Effect of intrauterine inflammation on fetal cerebral hemodynamics and white-matter injury in chronically instrumented fetal sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2009; 200:663 e1-11.
- 6) Miura Y, Matsuda T, Funakubo, et al. Novel modification of an artificial placenta: pumpless arteriovenous extracorporeal life support in a premature lamb model. *Pediatr Res* 2012 2012 Aug 10. doi: 10.1038/pr.2012.108.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Miura Y, Saito M, Usuda H, Woodward E, Rittenschöber-Böhm J, Kannan PS, Musk GC, Matsuda T, Newnham JP, Kemp MW. Ex-Vivo Uterine Environment (EVE) Therapy Induced Limited Fetal Inflammation in a Premature Lamb Model. *PLoS One* 2015; 10: e0140701. doi: 10.1371/journal.pone.0140701 (査読あり).
2. Miura Y, Matsuda T, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Saito M, Hanita T, Kobayashi Y. A parallelized, pumpless artificial placenta system significantly prolonged survival time in a preterm lamb model. *Artif Organs*. 2015

Dec 8. doi: 10.1111/aor.12656 (査読あり).

[学会発表] (計 3 件)

1. Saito M, Miura Y, Usuda H, Kitanishi R, Hanita T, Matsuda T, Kobayashi Y, Funakubo A, Yaegashi N. Efficacy of the parallel oxygenator circuit in the pump-less artificial placenta. *60th Annual Conference of the American Society for Artificial Internal Organs* (Washington, DC, USA); June 18-21, 2014.
2. Saito M, Matsuda T, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Hanita T, Yaegashi N. The reaction of fetal cortisol against intra-uterine inflammation and fetal circulatory insufficiency in fetal sheep. *Society for Reproductive Investigation 62nd Annual Scientific Meeting* (San Francisco, CA, USA); March 25-28, 2015.
3. Hanita T, Matsuda T, Miura Y, Usuda H, Watanabe T, Kitanishi R, Saito M, Kobayashi Y. A parallelized, pumpless artificial placenta system significantly prolonged survival time in preterm ovine fetus. *42nd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2015* (Vancouver, Canada); Aug 9-12, 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

<http://www.ped.med.tohoku.ac.jp/newborn/lineup/uwa.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 志津子 (AKIYAMA SHIZUKO)
東北大学・医学系研究科・非常勤講師
研究者番号: 80466549

(2) 研究分担者

松田 直 (MATSUDA TADASHI)
東北大学・病院・准教授
研究者番号: 50361100

齋藤 昌利 (SAITO MASATOSHI)
東北大学・病院・講師
研究者番号: 00451584

渡辺 達也 (WATANABE TATSUYA)
東北大学・病院・非常勤講師
研究者番号: 70400380