

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860913

研究課題名(和文) 気管支肺異形成での炎症細胞産生NGALとの関連解析

研究課題名(英文) The correlation between Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin and bronchopulmonary dysplasia

研究代表者

市山 正子 (ICHIYAMA, MASAKO)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：00645989

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： Neutrophil gelatinase - associated lipocalin (NGAL)などの炎症性蛋白と気管支肺異形成(BPD)との関連について解析した。在胎31週未満のBPD発症群16名と非発症群20名で比較検討したところ、早産児の出生時血中NGAL値はBPD発症の予測因子となる可能性が示唆された。また胸部CTで評価したBPD重症度と、周産期情報、出生後の炎症サイトカンとの関連についてBPD発症群73名で検討したところ、BPDの重症度には、SGAおよび日齢28までのCRP値や好中球数が関連している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)： Although the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia (BPD) remains unclear, the development of BPD has been reported to be associated with pulmonary inflammation. To search for the correlation between BPD and serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), serum levels of NGAL at birth were measured and assessed in the association of BPD. The median NGAL levels and neutrophil counts at birth in BPD group (n=16) were higher than non-BPD group (n=20) (p=0.012). Higher NGAL levels at birth showed a significant association with BPD (p<0.01). The serum levels of NGAL at birth might be an early predictive marker for BPD in preterm infants. We then evaluated the relationship among the hematological features, clinical course and radiological severity (chest CT scoring) of BPD infants (n=73). SGA and sustained inflammation until 28 day of life were associated with aggravation of BPD.

研究分野： 新生児

キーワード： 気管支肺異形成 NGAL 早産児

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 近年新生児医療の進歩に伴い、早産児の救命率は上昇したが、極低出生体重児の約 15-50% は、気管支肺異形成 (Bronchopulmonary dysplasia: BPD) に罹患し、2-3% は 3 歳時点で在宅酸素療法を必要とする<sup>1</sup>。また BPD の罹患は、小児～青年期の呼吸機能の低下や成長発達に影響する。

(2) BPD は、未熟な肺への人工換気による肺損傷と酸素毒性が要因であると考えられてきたが、近年は絨毛膜羊膜炎などの子宮内炎症が重要な病因の一つと考えられている。子宮内炎症で活性化された肺胞マクロファージ、多核白血球などの細胞の活性化や炎症メディエーターによる炎症性の損傷が、人工換気によって引き起こされる。しかしながら、肺の局所や血液中の炎症細胞である好中球やマクロファージが、肺組織を破壊し病態の進行に関わる分子機序は十分に解明されていない。また、BPD 発症を予測する鋭敏なマーカーは明らかとなっていない。

(3) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) は、好中球から放出され、metalloproteinase - 9 と共有結合し、その分解を抑制したり、細菌感染時の自然免疫応答に関与したりする蛋白である。Interleukin - 1 や lipopolysaccharide により炎症性転写因子 NF- $\kappa$ B が活性化され、腎・消化管・呼吸器などの上皮細胞や肝細胞などで NGAL 発現が誘導される<sup>4</sup>。

(4) 感染症・BPD のリスクの高い早産児における NGAL の生物学的・臨床的役割は明らかではない。これまで、新生児領域での血中 NGAL に関する報告は少なく、尿中 NGAL が新生児敗血症における鋭敏なマーカーであるとする報告はあるのみである。出生後早期の気管洗浄液中 MMP-9 値は BPD で高値との報告が多い<sup>5, 6</sup> が、血中 NGAL 値と BPD を明確に関連づける報告はない。

## 2. 研究の目的

(1) 早産児において、出生後の血中 NGAL 値を測定し、BPD 発症との関連や BPD 発症の予測因子となる可能性について検討する。

(2) BPD 症例において、胸部 CT にて評価した重症度や酸素投与日数、陽圧呼吸換気日数と、周産期情報、血中炎症性サイトカインを含む血液検査データとの関連を検討する。

## 3. 研究の方法

(1) BPD と NGAL の関連についての検討

2005 年 10 月～2009 年 6 月に九州大学病院総合周産期母子医療センターに入院した計 86 名の新生児において、臍帯血または出生時血清の NGAL 値を ELISA 法で測定した。

このうち、BPD 発症群 16 名 (全例在胎 31 週未満) と非発症群 70 名 (在胎 31 週未満: 20 名、31 週～36 週: 35 名、37 週以降: 15 名) において、母児周産期情報、児の出生時

検査データ、および児の出生後の合併症を比較検討した。

前期破水から 72 時間以上経過、羊水混濁、出生時の CRP 上昇 ( $>0.1$  mg/dl)、IgM 上昇 ( $>20$  mg/dl) を出生時感染症リスクと、IVH3 度以上の脳室内出血、脳室周囲白質軟化症、動脈管開存症手術、消化管穿孔を出生後主要合併症とした。非発症群 70 名において、感染症リスクや主要合併症を一項目も有さない症例をコントロール群 (52 名) とし、出生時の血中 NGAL 値と在胎週数、好中球数、単核球数、リンパ球数との関連を検討した。

(2) BPD 重症度と炎症サイトカインとの検討

2005 年～2013 年に同センターに入院した極低出生体重児 331 名のうち、BPD を発症し研究同意が得られた 73 名において、日齢 0、14、28 の保存血清で炎症性サイトカインをマイクロビーズ法で測定した。

胸部 CT スコアリング<sup>2</sup>を用いて BPD の重症度を評価し、中等度/重度 BPD 発症に関連する周産期因子を、単変量解析、多変量解析を用いて検討した。

酸素投与日数、陽圧換気日数と血液検査結果およびサイトカインプロファイルとの関連を検討した。

## 4. 研究成果

(1) BPD と NGAL について

血中 NGAL 値と在胎週数

コントロール群 52 名の内訳は在胎 31 週未満: 10 名、31～36 週: 28 名、37 週以降: 14 名で、在胎週数中央値 34.5 (25.9-41.0) 週、出生体重中央値 1813 (552-3350) g であった。52 名の出生時の血中 NGAL 値は在胎週数 (CC = 0.06962、 $p < 0.0001$ 、図 1)、好中球数 (CC = 0.6594、 $p < 0.0001$ 、図 2)、単核球数 (CC = 0.6100、 $p < 0.0001$ 、図 3) と正の相関関係を認めた。またリンパ球数とは相関は認めなかった。在胎 31 週未満、31-36 週、37 週以降の NGAL 値の 95% 信頼区間はそれぞれ 32.4 (22.1-47.5)、58.6 (47.9-71.8)、126.2 (99.0-168.7) ng/mL であった。出生時に感染リスクがなく、出生後の主要合併症も認めなければ、出生時の血清 NGAL 値は早産児に比べて正常産児が高値であった。

図 1

図 2

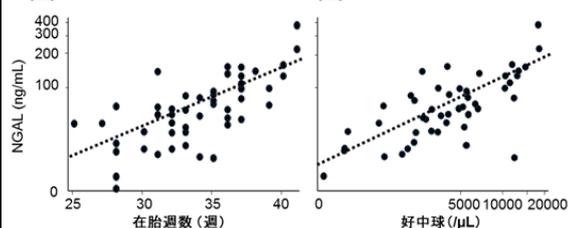
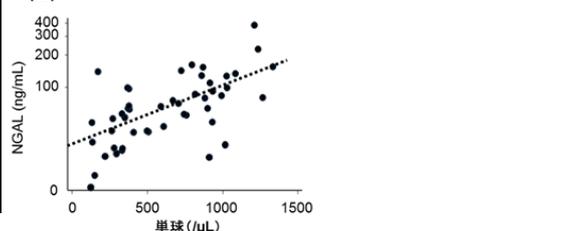


図 3



BPD 発症と周産期情報、出生後合併症

在胎 31 週末満の BPD 発症群 16 名と、在胎 31 週末満の非発症群 20 名において、周産期情報、出生時の血液検査データ、出生時感染リスク、出生後主要合併症について比較検討した。BPD 発症群は、非発症群に比べて在胎週数 (24.8vs28.2, p<0.0001)、Apgar score 5 分値 (5vs8, p<0.004)、サーファクタント投与率 (88%vs55%, p<0.044) で有意差を認めた。また BPD 発症群の方が出生時感染リスクや出生後主要合併症を高率に有していた (表 1)

表 1

	BPD (n=16)	非BPD (n=20)	p値
在胎週数(週)	24.8 (22.9-30.3)	28.2 (25.9-30.9)	<0.0001
出生体重(グラム)	707 (504-1470)	876 (548-1514)	0.171
Small-for-gestational age	0 (0)	8 (40)	0.004
アプガースコア5分値	5 (3-8)	8 (3-10)	0.001
母体高血圧	0 (0)	4 (20)	0.058
出生前ステロイド	9 (56)	15 (75)	0.236
サーファクタント治療	14 (88)	11 (55)	0.035
早発型敗血症	1 (6)	1 (5)	0.658
出生時感染リスク	11 (69)	7 (35)	0.044
72時間以上のPROM	3 (19)	6 (30)	0.439
羊水混濁	7 (44)	0 (0)	0.001
組織学的CAM	5 (31)	1 (5)	0.036
CRP >0.1 mg/dL	6 (38)	0 (0)	0.003
IgM >20 mg/dL	2 (13)	1 (5)	0.419
BPD以外の主要合併症	16 (100)	4 (20)	<0.0001
退院前死亡	0 (0)	1 (5)	0.364
PDA結紮術	6 (38)	1 (5)	0.039
ROPへのレーザー光凝固術	6 (38)	1 (5)	0.039
消化管穿孔	1 (6)	1 (5)	0.658

BPD 発症の血中 NGAL 値

出生時の血液検査データでは NGAL、好中球数、リンパ球数、単球数、pH、base excess、CD3+/HLA-DR+cell、CD3+/CD45RO+cell、CD69+/CD19+cell、CD69+/CD56+cell、CD69+/CD3+cell、CD69+/CD3- cell を測定し、BPD 発症群と非発症群で比較検討した。BPD 発症群は出生時の NGAL 値、好中球数が有意に高値であった (p<0.0001、p = 0.012) (表 2)

表 2

	BPD (n=16)	非BPD (n=20)	p値
NGAL(ng/mL)	307.8 (21.3-581.2)	42.9 (11.9-370.8)	<0.0001
WBC (/μL)	8290 (4700-46,090)	5965 (3440-17,830)	0.075
好中球 (/μL)	4141 (964-21,137)	1357 (422-5790)	0.012
リンパ球 (/μL)	3019 (1076-8723)	3753 (2207-8516)	0.235
単球 (/μL)	422 (109-1150)	205 (49-652)	0.085
pH	7.287 (7.050-7.718)	7.307 (7.044-7.555)	0.524
余剰塩基 (mmol/L)	- 6.2 (- 15.6-0.8)	- 5.0 (- 21.3-3.7)	0.260
CD3+/HLA-DR+細胞 (/μL)	68 (21-387)	119 (4-535)	0.245
CD3+/CD45RO+細胞 (/μL)	168 (29-509)	215 (12-545)	0.727
CD69+/CD19+細胞 (/μL)	28 (7-134)	19 (2-75)	0.161
CD69+/CD56+細胞 (/μL)	45 (0-202)	36 (3-134)	0.743
CD69+/CD3γδ+細胞 (/μL)	1 (0-6)	1 (0-10)	0.747
CD69+/CD3γδ-細胞 (/μL)	37 (7-317)	24 (13-54)	0.302

BPD 発症のリスク因子

在胎 31 週末満 30 名 (BPD 発症群 : 10 名、非発症群 20 名) において、ROC 解析より出生時の血清 NGAL 値 82ng/ml (0.91、感度 94%、特異度 85%)、好中球数 4141/μl (0.83、感度 57.1%、特異度 94.1%) を cut-off 値として、出生時感染リスク、在胎週数、血清 NGAL 値、好中球数で多変量解析を施行した。出生時の血中 NGAL 値>82ng/ml では、BPD 発症のオッズ比は 37.45 で有意に高いことが判明した (p<0.001) (表 3)

表 3

変数	N	粗オッズ比	95%信頼区間		p値	調節済みオッズ比*	95%信頼区間		p値	
			下限	上限			下限	上限		
NGAL (ng/mL)*	<82	18	1.00	基準		1.00	基準			
	≥82	18	85.00	7.97	906.81	<0.01	37.45	3.08	455.49	<0.01
好中球 (μL)*	<4141	19	1.00	基準		1.00	基準			
	≥4141	5	21.33	1.73	263.7	0.017	5.01	0.21	119.39	0.319
出生時感染リスク	なし	18	1.00	基準		1.00	基準			
	あり	18	4.09	1.01	16.58	0.049	4.06	0.63	26.20	0.141
在胎週数(週)	≥27	20	1.00	基準		-	-	-	-	-
	<27	16	24.56	4.24	142.11	<0.01	-	-	-	-

(2) BPD 重症度と炎症性サイトカンについての検討

2005 年 ~ 2013 年に同センターで出生し、BPD を発症した極低出生体重児 73 名のうち、34 名 (46.6%) が胸部 CT スコアリングにて中等度もしくは重度の BPD と判断した。

BPD 発症例の周産期情報、出生後合併症

34 名の酸素投与日数中央値は 55 (24-320) 日、陽圧換気日数中央値は 69 (22-194) 日であった。中等度/重度 BPD 発症と性別、出生体重、SGA、在胎週数、多胎、前期破水、敗血症、3 度以上の脳室内出血、脳室周囲白質軟化症、インドメタシン投与、動脈管結紮術施行、出生後ステロイド投与、肺出血、消化管穿孔、未熟児網膜症治療、輸血歴についての相関関係を検討した。単変量解析では、出生体重 (OR; 4.18、95%CI; 1.57-11.1, p<0.01)、SGA (OR; 4.34、95%CI; 1.44-13.1, p<0.01)、敗血症 (OR; 4.74、95%CI; 1.49-15.2, p<0.01)、3 度以上の脳室内出血 (OR; 4.80、95%CI; 0.92-24.9, p<0.05)、未熟児網膜症治療 (OR; 2.5、95%CI; 1.06-7.15, p = 0.04)、輸血 (OR; 6.46、95%CI; 1.68-24.9, p<0.01) で中等度/重度 BPD との相関関係を認めた。多変量解析では、SGA のみ相関関係を認め、(OR; 6.44、95%CI; 17.7-45.5, p<0.01) SGA の有無が中等度/重度 BPD 発症に影響している可能性が示唆された (表 4)。

酸素投与日数、陽圧換気施行日数と炎症性サイトカン

この 34 名において、日齢 1、14、28 の好中球数、CRP、IL-6、IL-8 を測定し、酸素投与日数、陽圧換気施行日数との関連について検討した。

酸素投与日数については、多変量解析で日齢 14 の CRP 値 (rc : 21.8、95%CI; 4.01-39.7, p = 0.02)、日齢 28 の好中球数 (rc : 0.00、95%CI; 0.00-0.01, p<0.01) で正の相関関係を認めた (表 5)。

陽圧換気施行日数については、同様に多変量解析で、日齢 14 の CRP 値 (rc : 31.6、95%CI; 17.7-45.5, p<0.01)、日齢 28 の好中球数 (rc : 0.00、95%CI; 0.00-0.00, p = 0.01) や CRP 値 (rc : 69.3、95%CI; 22.3-116, p<0.01) と正の相関関係を認めた (表 6)。

以上より、酸素投与日数や陽圧換気日数は日齢 28 までの炎症所見と相関していることが示唆された。

表 4

Clinical factors	"Moderate" and "Severe" state of BPD (n=44)						
	Variables	Univariate			Multivariate		
		OR	95%CI	p	OR	95%CI	p
Gender male	0.56	0.22- 1.41	0.22				
BW <median; 642g	4.18	1.57- 11.1	<0.01	0.93	0.21- 3.92	0.93	
SGA	<b>4.34</b>	<b>1.44 - 13.1</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>6.44</b>	<b>1.55 - 26.8</b>	<b>&lt;0.01</b>	
GA <median; 25.1w	1.05	0.42- 2.64	0.91				
Multiple births	1.79	0.28- 11.4	0.53				
ANS	0.89	0.35- 2.28	0.81				
PPROM	1.39	0.51- 3.74	0.52				
Proven sepsis	4.76	1.49- 15.2	<0.01	2.80	0.72- 12.2	0.14	
IVH>=grade III	4.80	0.92 - 24.9	<0.05	5.63	0.95 - 50.2	0.06	
PVL	1.15	0.07- 19.1	0.92				
IND	0.71	0.19- 2.57	0.60				
Ligation	0.86	0.29- 2.52	0.79				
Postnatal steroid	3.61	1.22- 10.7	<b>0.02</b>	2.42	0.61- 10.7	0.21	
Pulmonary hemorrhage	1.79	0.28 - 11.4	0.53				
Intestinal perforation	2.46	0.42 - 14.4	0.30				
PC	2.75	1.06- 7.15	<b>0.04</b>	1.53	0.41- 5.73	0.52	
Blood transfusion	6.46	1.68- 24.9	<0.01	2.33	0.43- 15.4	0.33	

表 5

Biochemical factors	Variables	Duration of oxygenation					
		Univariate			Multivariate		
		n	cc	p	rc	95%CI	p
<b>Day 0;</b>							
NEUT (/ $\mu$ L)	51	0.19	0.18				
CRP (mg/dL)	73	0.14	0.25				
IL-6 (pg/ml)	48	0.02	0.90				
IL-8 (pg/ml)	48	0.00	0.99				
<b>Day 14;</b>							
NEUT (/ $\mu$ L)	65	0.46	<0.01	-0.00	-0.00- 0.00	0.93	
CRP (mg/dL)	<b>69</b>	<b>0.32</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>21.8</b>	<b>4.01- 39.7</b>	<b>&lt;0.01</b>	
IL-6 (pg/ml)	33	0.23	0.20				
IL-8 (pg/ml)	33	0.33	0.06				
<b>Day 28;</b>							
NEUT (/ $\mu$ L)	<b>63</b>	<b>0.42</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00- 0.01</b>	<b>&lt;0.01</b>	
CRP (mg/dL)	69	0.28	<b>0.02</b>	28.3	-5.13- 61.9	0.09	
IL-6 (pg/ml)	45	0.08	0.62				
IL-8 (pg/ml)	45	0.29	0.05				

表 6

Biochemical factors	Variables	Duration of positive pressure ventilation					
		Univariate			Multivariate		
		n	cc	p	rc	95%CI	p
<b>Day 0;</b>							
NEUT (/ $\mu$ L)	51	0.25	0.08				
CRP (mg/dL)	73	0.08	0.50				
IL-6 (pg/ml)	48	0.15	0.30				
IL-8 (pg/ml)	48	0.25	0.09				
<b>Day 14;</b>							
NEUT (/ $\mu$ L)	65	0.40	<0.01	-0.00	-0.00- 0.00	0.13	
CRP (mg/dL)	<b>69</b>	<b>0.41</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>31.8</b>	<b>17.7- 45.4</b>	<b>&lt;0.01</b>	
IL-6 (pg/ml)	33	0.49	<0.01	0.08	-0.17- 0.32	0.51	
IL-8 (pg/ml)	33	0.40	<b>0.02</b>	-0.03	-0.29- 0.22	0.78	
<b>Day 28;</b>							
NEUT (/ $\mu$ L)	<b>63</b>	<b>0.50</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>0.00</b>	<b>0.00- 0.00</b>	<b>0.01</b>	
CRP (mg/dL)	<b>69</b>	<b>0.26</b>	<b>0.03</b>	<b>69.3</b>	<b>22.2- 116</b>	<b>&lt;0.01</b>	
IL-6 (pg/ml)	45	0.12	0.41				
IL-8 (pg/ml)	45	0.34	0.02	0.03	0.06- 0.13	0.50	

## &lt;引用文献&gt;

- 河野由美. 早産・低出生体重児の生存長期予後. 小児科 21012;53:1015-1022.
- Ochiai Met al. A new scoring system for computed tomography of the chest for assessing the clinical status of bronchopulmonary dysplasia. J Pediatr. 2008 Jan;152(1):90-5
- Hikino S et al. Tracheal aspirate gene expression in preterm newborns and

development of bronchopulmonary dysplasia. Pediatr Int.2012 Apr; 54(2):208-14

- 森 清他. Ngal. Modern Physician. 2011;31:97-89.
- Capoluongo E, et al. Epithelial lining fluid Neutrophil-gelatinase-associated lipocalin levels in premature newborns with bronchopulmonary dysplasia and patency of ductus prteriosus. Int J Immunopathol Pharmacol 2008;21:173-179.
- Wagenaar GT, et al. Gene expression profile and histopathology of experimental bronchopulmonary dysplasia induced by prolonged oxidative stress. Free Radic Biol Med 2004;36:782-801.

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計2件)

Ichiyama M, Ohga S, Ochiai M, Tanaka K, Matsunaga Y, Kusuda T, Inoue H, Ishimura M, Takimoto T, Hotta T, kang D, hara T. Age-specific onset and distribution of the natural anticoagulant deficiency in pediatric thromboembolism. Pediatr Res 2016;79:81-86. 査読有  
DOI:10.1038/pre.2015.180.

Inoue H, Ohga S, Kusuda T, Kitajima J, Kinjo T, Ochiai M, Honjyo S, Hara T. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a predictor of the development of bronchopulmonary dysplasia in preterm infants. Early human Dev 2016;89:425-429. 査読有  
DOI:10.1016/j.earlhdev.2012.12.011

(学会発表)(計3件)

Kurata H, Ochiai M, Inoue H, Kusuda T, Kinjyo T, Wakata Y, kato K, Taguchi T, Takada H. Sustained Inflammation and Small-for-gestational Age were associated with Aggravation of neonatal Bronchopulmonary Dysplasia. The NEONATE, An International Symposium for Asia March 30,2016 Shanghai

倉田浩昭、落合正行、田中幸一、楠田剛、井上普介、藤吉順子、松下悠紀. 気管支肺異型性症の重症化に関連する周産期情報とサイトカインプロファイルの解析. 第59回日本未熟児新生児学会 2014年11月11日、ひめぎんホール(松山市)

落合正行、楠田剛、市山正子、松下悠紀、北島順子、井上普介、高畑靖、佐藤和夫、曳野俊治、山本順子、松本奈緒子、山下博徳、古賀寛史、飯田浩一、寺地真一. 九大ハイリスク新生児臨床研究ネットワーク - 早産児・低出生体重児の出生時の血液検査基準値作成の試み - . 第58回日本未熟児新生児学

会、2013年11月30日、ANAクラウンプラザ  
ホテル金沢（金沢市）

6．研究組織

(1) 研究代表者

市山正子（ICHIYAMA Masako）

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：00645989

(2) 研究協力者

落合正行（OCHIAI Masayuki）

九州大学病院総合周産期センター臨床講師

研究者番号：90507782