

機関番号：17102

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791038

研究課題名 (和文) 呼気濃縮液を用いた気管支肺異形成の病態解析

研究課題名 (英文) Pathological analysis of Bronchopulmonary Dysplasia using Exhaled Breath Condensates

研究代表者

後藤 貴子 (GOTO TAKAKO)

九州大学・大学病院・その他 (医員)

研究者番号：20467947

研究成果の概要 (和文)：

出生体重 1000g 未満の超低出生体重児を対象に呼気濃縮液 EBC を採取し、気管支肺異形成 BPD との関連を調査した。BPD の重症度 ( $p=0.77$ )、ステロイド投与 ( $p=0.36$ ) には有意差を認めなかった。酸素投与期間 ( $r=-0.277$ ,  $p=0.89$ )、人工換気期間 ( $r=0.21$ ,  $p=0.29$ )、CT スコア ( $r=0.03$ ,  $p=0.88$ ) いずれも有意な相関は認められなかった。サイトカインやケモカインをマイクロビーズ法で測定したが、多くが測定感度以下であった。検体量が微量であるため測定法が限定された。

研究成果の概要 (英文)：

We obtained exhaled breath condensates (EBCs) from extremely low birth weight infants whose birth weights were less than 1000g. And we examined associations EBCs with clinical symptoms of bronchopulmonary dysplasia, which is one of the respiratory complications with those infants. There was not any correlation pH in EBCs to the symptoms, including severity ( $p=0.77$ ), steroid hormone administration ( $p=0.36$ ), oxygenation therapy period ( $r=-0.277$ ,  $p=0.89$ ), mechanical ventilation period ( $r=0.21$ ,  $p=0.29$ ), and CT score ( $r=0.03$ ,  $p=0.88$ ). Most of the cytokines and chemokines in EBCs were not detected in the cytometric beads array. There was limitation of methods of measurement due to little amount of EBCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：未熟児医学

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

気管支肺異形成 (Bronchopulmonary Dysplasia: BPD) とは、呼吸窮迫症候群などの呼吸障害のために人工換気療法をうけた早産児の一群に認められる、慢性的な肺の病変である。2001年に国際的に提唱された定義では、「在胎 32 週未満の早産児では、修正 36 週または退院前までに 21%を越える酸素療法を 28 日以上必要とした児」とあり、その酸素依存度により重症度分類がされている。BPD は退院後も在宅酸素療法を必要とする場合もあり、医療経済を考慮する上でも重要な疾患である。

これまでに、われわれは BPD の新たな画像評価法として、胸部 CT を用いたスコアシステムを開発した。このスコアシステムは BPD の重症度との関連性が強く、在宅酸素療法への移行した児でスコアが有意に高値であった[3]。臨床像の把握や疾患予後を予測するための退院前評価に有用と期待される。

BPD の病因は多因子であり、酸素投与による酸化ストレス、圧損傷、容量損傷、炎症メディエーターによる生物学的損傷などがある。しかしながら、肺局所において、これらの因子と BPD の発症や進展に関わっているかは明らかにされておらず、成人では気管支肺胞洗浄液 (Brochoalveolar Lavege: BAL) が用いられているが、侵襲的な採取方法のため未熟な早産児を対象とした解析は困難であった。呼気濃縮液 (Exhaled Breath Condensate: EBC) とは、呼気中に含まれるエアロゾルや水蒸気を冷却した回路で液化させた物質であり、安静呼吸下で非侵襲的に肺局所での臨床検体が採取することができる。

さらにわれわれは自施設に入院した早産児を対象に出生時と日齢 28 の血液検査データを蓄積し、BPD の発症との関連について調査を行った。その結果、BPD 発症群では、出生時よりむしろ日齢 28 の好中球数が高い傾向にあり、出生時の炎症の持続と BPD 発症との関連が疑われる。

2. 研究の目的

肺局所レベルでの炎症メディエーターや酸化ストレスマーカーを、低侵襲かつ反復して測定できる解析法を確立する。

BPD の発症リスクの高い、在胎 32 週未満の呼吸障害の児を対象に、出生時より定期的に呼気濃縮液や血液を採取して、サイトカイン・ケモカイン等の炎症メディエーターや酸化ストレスマーカーの測定を行う。対象児の呼吸障害等の臨床症状の経過を追跡し、BPD の罹患とその重症度、胸部 CT を用いたスコアシステムで画像評価を行う。肺局所と全身の炎症メディエーターの推移と BPD の臨床像との関連を解析する。

3. 研究の方法

当院 NICU に入院した出生体重 1000g 未満の超低出生体重児を対象とした。出生時より定期的に血清保存を行い、出生予定日前後の全身状態が安定した時期に、EBC 採集装置 (R-tube) を接続したシリコンマスクを用いて、安静呼吸下で 20 分間鼻口腔を密着させて採取した。退院前に胸部 CT にて画像評価を行った。超低出生体重児の診療は保険診療内で行った。研究計画は施設内倫理委員会で承認を受けており(21-67)、養育者より書面による説明の基づき承認を受けた。

採集した EBC は微量 pH モニター計で測定したのち、測定まで-30 度で凍結保存した。サイトカイン・ケモカインの測定はマイクロビーズ法 (BD Cytometric Beads Array) を用いた。

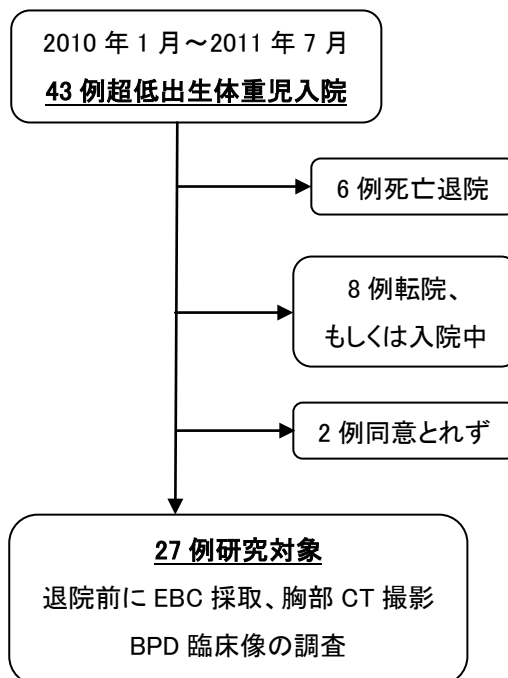
これらの測定結果および診療経過をまとめて、統計学的手法を用いて関連を調査した。

4. 研究成果

(1) 採取症例

平成 21 年 1 月 1 日より平成 22 年 7 月 30 日まで当院 NICU に 43 例の超低出生体重児が入院した。うち 6 例が死亡退院、8 例が転院もしくは入院中、2 例で同意が取れず採取できなかった。27 例で退院前に EBC を採取した。

(図 1)



(図 1) 臨床研究アウトライン

採取症例の臨床像を表1に示す。在胎週数は中央値 26 週 0 日（範囲：22 週 6 日～33 週 3 日）、出生体重の中央値 664g（範囲：502g～664g）であった。男児 12 例、女児 15 例。在胎週数に比較して低体重児 SGA は 9 例であった。絨毛膜羊膜炎は 10 例（37.0%）に合併し、サーファクタントは 22 例（81.4%）に投与された。人工呼吸器装着期間は中央値 27 日間（範囲：0～72 日間）、酸素投与は中央値 18 日（範囲：1～115 日間）であった。BPD の重症度分類では BPD なし 14 例、軽症 11 例、中等症 0 例、重症 2 例であった。退院前に撮影した胸部 CT スコアは中央値 5（範囲：1～15）、EBC 採取時修正週数は中央値 38 週（範囲：35～44 週）であった。

項目	最低値	最高値	中央値
在胎週数	22週6日	33週3日	26週0日
出生体重	502g	996g	664g
性別	男児	12例	
	女児	15例	
SGA	9例		
APGAR値1分	1	9	4
APGAR値5分	3	10	7
絨毛膜羊膜炎	10		37.00%
サーファクタント投与	22		81.48%
敗血症	4		14.81%
消化管穿孔	0		0.00%
頭蓋内出血	5		18.51%
人工呼吸器	0	72	27
酸素投与	1	115	18
ステロイド投与	13		48.15%
BPD	なし	14	
	軽症	11	
	中等症	0	
	重症	2	
胸部CTスコア	1	15	5
EBC採取時週数	35	44	38

（表1）採取症例の臨床背景

### （2）EBC の pH

EBC 採取量は 50～200  $\mu$ l であり、採取時に有害事象は認めなかった。pH 値は中央値が 7.76 で範囲が 5.55 から 8.69 であった。（図表なし）

### （3）EBC のサイトカイン・ケモカイン

採取症例のうち重症 BPD の 3 例を抜粋して予備的にサイトカイン・ケモカインの測定を行った。同時に出生日と日齢 28 に採取した保存血清でも測定を行った。結果は上図の通りである。症例 1、2、3 の全ての EBC でサイトカイン・ケモカインは検出されず、50 倍に乾燥濃縮を行った上清でも同様であった。同時に測定した保存血清では、症例 2 で RANTES を含めて IP-10, MCP-1, MIG, IL-8 が検出された。（表 2）

		IL12p70	TNF- $\alpha$	IL-10	IL-6	IL-1b
症例1	EBC	<=0	<=0	<=0	<=0	<=0
	血清(出生日)	NE	NE	NE	NE	NE
症例2	EBC	NE	NE	NE	NE	NE
	血清(出生日)	NE	NE	NE	NE	NE
症例3	EBC	<=0	<=0	<=0	<=0	<=0
	EBC(50倍濃縮)	<=0	<=0	<=0	<=0	<=0

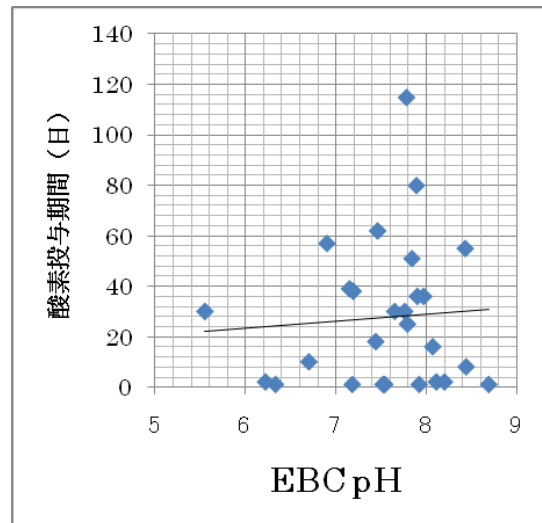
		IP-10	MCP-1	MIG	RANTES	IL-8
症例1	EBC	<=0	<=0	<=0	4.8pg/ml	<=0
	血清(出生日)	<=0	<=0	<=0	>25000	<=0
症例2	EBC	<=0	<=0	<=0	<=0	<=0
	血清(出生日)	98.5pg/ml	154.8pg/ml	<=0	9849pg/ml	<=0
症例3	EBC	<=0	<=0	11.3pg/ml	15815pg/ml	24.5pg/ml
	EBC(50倍濃縮)	NE	NE	NE	NE	<=0

（表2）サイトカイン・ケモカインの検出

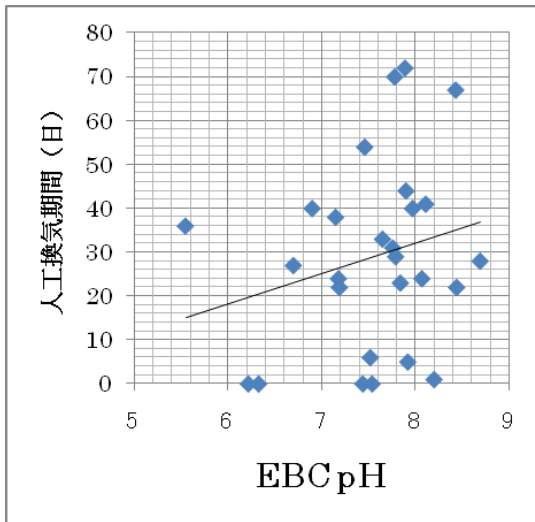
### （4）BPD の臨床背景との関連

EBC の pH 値と臨床背景との関連を調査した。BPD の重症度の指標として BPD 重症度分類、ステロイド投与、酸素投与期間、人工換気期間、胸部 CT スコアを選択して EBC の pH 値との関連を統計学的手法で解析した。

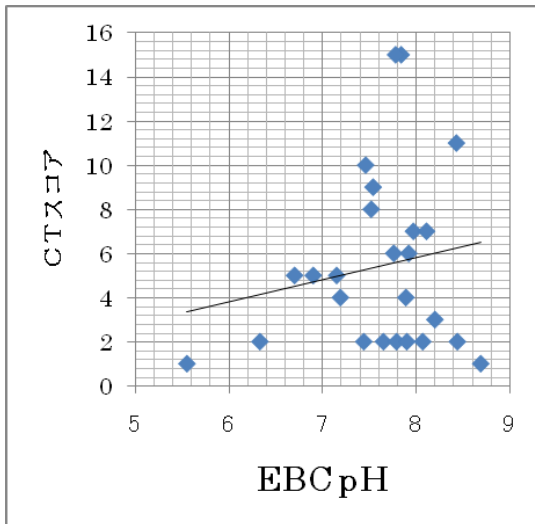
BPD の重症度 ( $p=0.77$ )、ステロイド投与 ( $p=0.36$ ) には有意差を認めなかった。酸素投与期間 ( $r=-0.277$ ,  $p=0.89$ , 図 2)、人工換気期間 ( $r=0.21$ ,  $p=0.29$ , 図 3)、CT スコア ( $r=0.03$ ,  $p=0.88$ , 図 4) いずれも有意な相関は認められなかった。



（図2）EBC の pH 値と酸素投与期間



(図3) EBC の pH 値と人工換気期間



(図4) EBC の pH 値と胸部 CT スコア

(5) 考察と今後の展望

EBC は低侵襲で肺局所の炎症メディエーターを採取できる方法であり、今回の新生児を対象として採取法の開発を行った。安静呼吸時にシリコンマスクを口鼻に圧着させることによりバイタルサインを変動させることなく安全に採集することができた。ただし、採集量は  $50\sim 200\mu\text{l}$  と微量であり、小児・成人を対象とした使用説明書に記載されている  $1\sim 3\text{ml}$  と比較して微量であった。

炎症メディエーターの測定系として微量検体で網羅的に検出可能なマイクロビーズ法を選択したが、原液あるいは乾燥濃縮液を使用しても有意なサイトカイン・ケモカインを検出することができなかった。BPD の病態は出生直後より急性期にかけて炎症メディエーターが作用するため、退院前の慢性期には検出できないと考えられた。今後は人工呼吸回路内のミストを液化して採集する方法

を開発し臨床研究に結び付ける方針である。

EBC の pH 値は気管支喘息の急性増悪と関連すると報告されているが、pH 値を規定する物質については特定されていない。今後は質量分析計を用いて炎症物質の同定と測定を課題としている。

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 貴子 (GOTO TAKAKO)

九州大学・大学病院・その他 (医員)

研究者番号 : 20467947