

機関番号：84408

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591311

研究課題名 (和文) レドックス制御系による新生児慢性肺疾患の新規治療方法の開発に向けて
 研究課題名 (英文) Redox regulating system and its application for neonatal chronic lung disease in mice

研究代表者

柳原格 (YANAGIHARA ITARU)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター (研究所)

研究者番号：60314415

研究成果の概要 (和文)：

新生児慢性肺疾患を引起す感染性早産の起因微生物については、病理的な絨毛膜羊膜炎 (CAM) との関連において不明な点が多かった。マイコプラズマ科ウレアプラズマ属細菌に着目した結果、わが国の早産に関連してウレアプラズマが CAM の発生の独立したリスクファクター (OR, 11.27) であること、病的にウレアプラズマ感染胎盤特異的な二層性好中球浸潤を見出した。

さらに LPS 誘導性早産モデルマウスにおいて、ヒトチオレドキシニン 1 の予防的投与が早産率を減少させ、また、母獣の血清サイトカイン値を抑制することを見出した。早産および合併症である新生児慢性肺疾患予防の新たな治療として期待される結果であった。

研究成果の概要 (英文)：

Ureaplasma spp. is detected in the urogenital tract, including the vagina, cervix, chorioamnion, and placenta. Their colonization is associated with histologic chorioamnionitis (CAM). In this study, pathologic examinations of 151 placentas delivered at <32 wk of gestation were performed. Among 151 placentas, 42% (63/151) were culture positive for *Ureaplasma* spp. Colonization by *Ureaplasma* spp. was an independent risk factor for CAM (OR, 11.27; 95% CI, 5.09 -24.98).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：新生児慢性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

本邦の周産期死亡率(4.2人/1000人、2008)は世界で最も低い水準であるが、西暦 2100 年には総人口は現在の 3 分の 1 に減少する。所属する WHO や関連会議の早産率報告では、アフリカ 30%弱、米国 12.5%、日本 5.8%と、

本邦の早産率は低水準にあるものの増加傾向にあり「次世代の疲弊化」が進んでいる。

妊娠中期以降の流早産の約半数は細菌感染や胎盤炎症が原因とされ、早産合併症である慢性肺疾患や神経系障害は生涯に渡るため、その対策は医療経済上も重要である。

研究を始めた当初わが国の多くの周産期医療施設では、新生児慢性肺疾患に関して①早産胎盤の中に好中球浸潤を伴った絨毛膜羊膜炎 (CAM) が存在する、②CAM 起因微生物の多くは不明、B 群溶連菌・大腸菌・TORCH は散見、③臍帯血高 IgM 血症を示す、等の知見が得られていた。すなわち、わが国における慢性肺疾患を合併する感染性早産 (病理的には絨毛膜羊膜炎:CAM) の起因微生物は不明とされることが多く、十分な対策は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目指すところは、早産及び低出生体重児の主な合併症である新生児慢性肺疾患の抑制と感染性早産の制御にある。

そのために本研究では、①本邦における FIRS の起因微生物を把握するため、その同定方法を確立し、結果を公表すること、そして病態解明を行うこと、②临床上問題となる胎内閉鎖空間の炎症制御を目指し、我が国発の新規治療戦略を練り、モデル動物を用いてその効果を検証すること、を目的とした。

3. 研究の方法

①早産起因微生物の同定

一般にマイコプラズマ、ウレアプラズマの培養は困難である。我々はこれまでに改良型ウレアプラズマ分離培地を作成してきた。この改良ウレアプラズマ培養法は、国立感染症研究所において基本的ウレアプラズマ培養同定法として受け入れられた (日本マイコプラズマ学会奨励賞)。検体は、インフォームドコンセントを得た後、膣、尿、あるいはパートナーの精液、及び 32 週未満出生の胎盤児側擦過、新生児気管吸引液、胃液、耳鼻腔内より採取し、最終的には 16S rDNA 配列を決定し同定を行った。一方、ウレアプラズマについては従来から、常在菌であるとする説と、低病原性細菌であるとする相反する説がある。そこで、我々はまず、疫学的にウレアプラズマと CAM の関連性を調べた。次に病理的な解析を行い、ウレアプラズマ特異的な病理像を調べると共に、PCR や免疫組織学的解析により、CAM の病態を引起すメカニズムについて調べた。

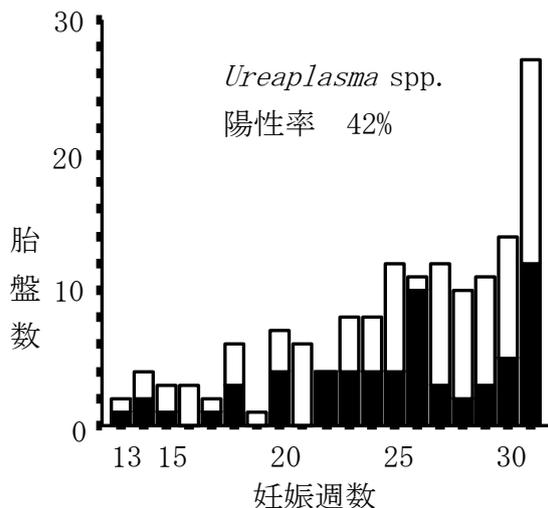
②本研究の特色ある点は、臨床的に重要な課題である胎内炎症サイクルを未然に防ぐ新たな戦略を構築する事にある。このことを可能にするための基本技術としてまず、リポポリサッカライド (LPS) 誘導性早産モデルマウスを作製した。LPS 誘導性早産に対して、わが国発の抗炎症物質で、好中球の遊走能を

阻害するヒトチオレドキシシン 1 (TRX) を用いた。

妊娠 15 日目のマウスに LPS200 μ g/kg を 3 時間毎に 2 回 (0 時、3 時) 投与し、早産モデルを作成する。LPS 初回投与 1 時間前から 3 時間毎に 3 回 (-1 時、2 時、5 時)、リン酸緩衝液 (PBS)、オブアルブミン (OVA)、または TRX2mg/kg/回を投与し、早産率、母獣血清サイトカイン値 (IL-12、TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-10、IL-6)、胎盤病理を比較検討した。サイトカイン測定は Mouse Inflammatory Cytokine CBA kit を用いた。

4. 研究成果

①これまでの我々の臨床検体を用いた解析で、ウレアプラズマは外来受診患者の膣培養の 3-4 割から分離され、すでに国内において常在化していると考えられた。また、9 ペアの解析から、パートナー間でのウレアプラズマ培養陽性率は (8/9) であり、ピンポン感染が極めて高いと考えられた。同一患者の膣内と尿中ウレアプラズマ陽性率は、ほぼ一致していた (一致率 83%、40/48 例) ことから、女性泌尿生殖器内に広汎な同時感染が起きていることが推測された。しかしながら詳細な感染部位の同定には至っていない。一方、妊娠 13 週から 31 週までの流早産胎盤 151 例の解析の結果、ウレアプラズマは週数毎の集計でほぼ一定の陽性率 (総計 63/151, 42%) であった (図 1)。パートナーの精液からもウレアプラズマが分離されることから胎内侵入時期は、比較的妊娠早期からの可能性が示唆された。疫学的な解析からウレアプラズマ陽性は胎盤病理における絨毛膜羊膜炎 (CAM) の独立したリスク因子であった (OR 11.27)。流早産を繰り返したウレアプラズマ陽性の非妊婦、及びそのパートナーに対して行った抗菌薬投与では、投与後の膣内ウレアプラズマ陰性率 (投与後 1 ヶ月での陰性) は 34 例中 5 例と、その有効率は 15%にとどまった。このことには、薬剤の膣内への移行性の問題が関連すると考えられる。抗菌薬有効率の 15%は海外の成績と比べ遜色ない。ただし、妊娠帰結は良好であり、静菌的な効果、あるいは、膣内には常在している、感染が子宮内に波及することに対しては抑制的な効果が見込まれる可能性を示唆した。



(図 1) 早産胎盤におけるウレアプラズマ陽性頻度 (黒：陽性) Ped Res より改変

②LPS 群、LPS+PBS 群、LPS+OVA 群、LPS+TRX 群の早産率はそれぞれ、94%、100%、89%、40%であった。TRX は LPS 誘導早産モデルマウスの早産率を有意に減少させた ($P < 0.01$)。LPS 群、LPS+PBS 群と比較して、LPS+TRX 群の母獣血清 TNF- α 、IFN- γ 、MCP-1、IL-6 は有意に低値を示した ($P < 0.01$)。LPS+TRX 群の胎盤病理では、LPS 群、LPS+PBS 群で認められる胎盤迷路部の血管拡張・鬱血 (HE 染色)、脱落膜内への好中球浸潤 (免疫組織染色) を抑制した。

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 21 件)

- ①Yamashita K, Yanagihara I, Tsutsumi Y, et al. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol.* 6(5):321-8. (2011) 査読有
- ②Yanagihara I*, Nakahira K, Honda T, et al. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin. *J Biol Chem.* 285(21):16267-74. (2010) 査読有
- ③Namba F, Hasegawa T, Yanagihara I*, et al. Placental features of chorioamnionitis colonized with *Ureaplasma* species in preterm delivery. *Pediatr Res.* 67(2):166-72. (2010) 査読有
- ④Nishihara M, Yanagihara I*, Waguri M, et al. Birth length is a predictor of

adiponectin levels in Japanese young children.

J Pediatr Endocrinol Metab. 23:913-920. (2010) 査読有

- ⑤柳原格、下屋浩一郎。「胎内感染と流早産・新生児合併症」. 日本周産期・新生児医学会雑誌. 44(4):1032-3. (2008) 査読無し (依頼原稿)
- ⑥柳原格。「妊婦及び早産児からのウレアプラズマ属細菌の分離培養」. 日本産婦人科感染症研究会誌. 24:41-5. (2008) 査読無し (依頼原稿)

[学会発表] (計 40 件)

- ①Yanagihara I. 「The pathological findings and molecular mechanisms of *Ureaplasma* spp. infection in preterm delivery」 7th European Society for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynaecology (ESIDOG), 2010.10.2-5, Trieste, Italy, Invited
- ②柳原格。「ウレアプラズマ感染—流早産そして次世代への影響—」, 第 37 回日本マイコプラズマ学会 2010.6.10-11、東京、シンポジスト
- ②柳原格。「LPS 誘導性早産モデルマウスに対するチオレドキシンの有効性」、京都大学ウイルス研究所ミニシンポジウムレドックス生命医科学の展望 (ATL Allergy TRX)、2010.3.15、京都、招待講演
- ③柳原格、難波文彦、北島博之、中山雅弘、藤村正哲。「大阪府立母子保健総合医療センターにおける感染性早産制御に向けた試み」、第 112 回日本小児科学会、2009.4.17-19、奈良、オーラル
- ④Yanagihara I, Honda T, et al. 「Analysis of tetrameric structure of TDH」 44th US-Japan Cooperative Medical Science Program. 2009.11.17-19, San Diego, CA, USA, Invited
- ⑤ Yanagihara I. WHO Preterm Birth International Collaborative Meeting. Pathway Group. 2008. 4.21-23, Geneva, Switzerland, Invited

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：母体投与用薬剤

発明者：淀井淳司、三浦美樹子、柳原格、難波文彦、中平久美子

権利者：レドックスバイオサイエンス社、淀井淳司、三浦美樹子、柳原格、難波文彦、中平久美子

種類：特許

番号：特許出願2008-261081
出願年月日：2008年10月7日
国内外の別：国内

〔その他〕

(報道等) (計5件)

①倉橋浩樹、**柳原格**ら、「習慣流産の遺伝子発見」2011/2/2 毎日新聞、中日新聞、朝日新聞、web page、日本経済新聞、47NEWS、東京新聞、大阪日日新聞、京都新聞、大分共同新聞、その他

②**柳原格**、本田武司。「加熱で再び毒性」の謎解明、2010/5/25 朝日新聞科学欄

(ホームページ)

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/inst-mch/IM/mysite2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳原 格 (YANAGIHARA ITARU)

地方独立行政法人大阪府立病院機構

大阪府立母子保健総合医療センター (研究所)

研究者番号：60314415