

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2008～2011
課題番号：20790772
研究課題名（和文）血中ステロイド一斉測定および病理組織検体を用いた超早産児の副腎機能の検討
研究課題名（英文）Evaluation of Adrenal Function 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・助教
研究者番号：30383855

研究成果の概要（和文）：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もつ。そのため新生児、殊に早産児では正確な副腎機能評価が困難であった。新生児の副腎機能を評価するにあたり最も信頼性の高い LC/MSMS 法により血中ステロイド一斉測定を行い、早産児と正期産児では出生後のステロイド分泌パターンは同様である事、在胎週数が若いほど胎生皮質である 17OH プレグネノロンが高値になるだけでなく、17OHP も高値となる事が示された。また、これらの状態にも関わらずコルチゾール値は大きく変わらないことから早産児の副腎機能が低いことが判明した。

研究成果の概要（英文）：Fetal and adult adrenal glands markedly different to morphological and endocrinological. Therefore, accurate evaluation of adrenal function in neonate especially preterm infants is difficult. We measured serum steroids profile using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MSMS). That is the most reliable method to evaluate neonatal adrenal function. Result showed pattern of steroid secretory after birth was the same for term and preterm infants. Additionally 17OHpregnenolone and 17OHP increased with younger gestational age, whereas cortisol was a small difference. To conclude, adrenal function is low in preterm infants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
総 計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：副腎機能・胎児副腎・早産児・超低出生体重児・タンデム質量分析

1. 研究開始当初の背景

副腎は生命維持のため重要な役割を担っている臓器である。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。

早産児、特に 28 週未満で出生する様な超低出生体重児ではステロイド投与が児に与える影響は非常に大きい。母体へのデキサメサゾン投与により早産児の慢性肺疾患や死亡率を減少する一方、脳性麻痺の頻度が増加するといった現象が認められている。超早産児では急性期を脱した後に突然の低血圧に陥る原因不明の晩期循環不全を発症し、治療としてステロイド投与が行われることも多々ある。しかしながら、新生児の胎児期から新生児期にかけての副腎ステロイド分泌パターンに関する報告はほとんどなく、早産児の副腎機能についても単一のステロイドホルモンを測定し、機能を推測された報告のみしかなかった。免疫化学測定法では新生児の副腎皮質ステロイド測定は胎生皮質のため正確に測定ができないという問題があった。

新生児・早産児の副腎機能解析を尿ステロイド一斉分析により行ってきたが、正確な機能解析には血中データが不可欠であった。超低出生体重児は循環血液量が少ないことから頻回の検査や負荷試験は不可能であったが、タンデム質量分析を用いることで、極少量の血液量で血中ステロイドを同時測定することが可能となった。

2. 研究の目的

早産児・超低出生体重児の副腎機能ならびに出生後の副腎ステロイド分泌パターンがどのようなものかは判明していない。さらに超低出生体重児では急性期を脱した後に、低血圧、尿量低下、低ナトリウム血症を引き起こす晩期循環不全という病態が存在し、ステロイド治療を必要とする場合が多い。晩期循環不全においては超低出生体重児へのステロイド投与は単回から継続的に必要となるものまで様々である。この病態は不明な点が多いが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た。そして、液体クロマトグラフ質量タンデム分析 (LCMSMS) を用いて血中ステロイド一斉分析を行い、早産児・超低出生体重児の副腎ステロイド分泌パターンの解析を行い、晩期循環不全の病態の解明を行うとともに、早産児の副腎機能評価を正確に行うことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 研究代表者の所属する NICU では、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。

早産児を出生週数・出生体重・母体へのス

テロイド投与などからグループ分けを行う。血中ステロイド一斉分析を行い、各グループ間および正期産新生児基準値と比較をすることで早産児の副腎皮質ステロイド分泌パターンおよび副腎機能を評価する。

(2) 血中ステロイド一斉測定は LCMSMS 法により 14 種 (研究開始時は 10 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 2 ml 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①血清 100 μ l で測定可能、②複数のステロイドホルモンを一斉分析可能、③高感度、④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。

4. 研究成果

(1) 今までに信頼度の高い方法による新生児の副腎機能評価は行われておらず、先に作成した正期産新生児の日齢 4 のステロイドホルモン基準値を用いて、正期産 AGA 児・SGA 児と 34-36 週出生の早産 AGA 児・SGA 児の比較を行った。AGA 児と SGA 児では同週数でもステロイド分泌能が異なっており、そのため、新生児の副腎機能評価を行うにあたり、AGA 児のみで解析を行うこととした。

(2) 出生後のステロイドホルモン分泌パターンがどのように変化するかは判明しておらず、これを明らかにするために臍帯血および出生後の経時的変化の比較を行った。コルチゾールの分泌パターンは在胎週数による違いは認めず、一定の傾向を認めなかったが、胎生皮質ステロイド分泌 (17OH プレグネノロン:17HP5) は正期産児・早産児ともに出生後数時間で血中濃度上昇が起こり、その後、徐々に低下した (図 1)。

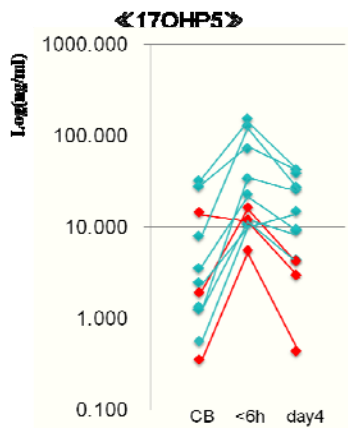


図1
赤：正期産
青：早産

これにより出生によるステロイド分泌パターンそのものは正期産児も早産児も同様であり、血中濃度に違いがあることが判明した。

(3) 正期産児・早産児ともに出生後のステロイド分泌パターンが同様であるため、出生後、日齢4での在胎週数別ステロイドホルモン分泌濃度の比較を行ったところ、副腎皮質の層別に以下の結果を得た。

①束状層分泌としてコルチゾールは在胎週数による大きな差は認めなかった(図2)。

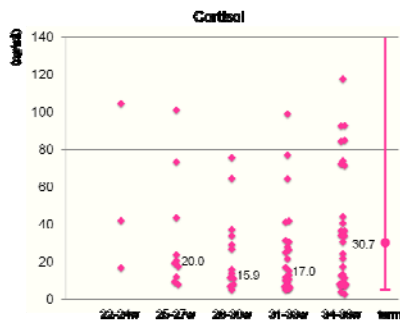


図2

早産児でも安定した状態ではコルチゾール必要量は正期産児と比較しても大きく変わらない可能性が高い。

②胎生皮質分泌として17OHP5は在胎週数が若い程、高値をとる(図3)。

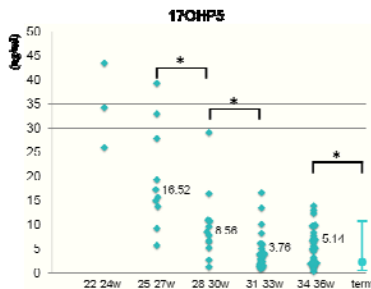


図3

17OH プレグネノロンを17OHPに変換する酵素である3βHSDは永久皮質にしか存在せず、

胎生皮質には存在しない。早産児では永久皮質が非常に薄く、3βHSD活性が低い。そのため前駆物質である17OH プレグネノロンは在胎週数が若いほど高値をとったと考えられた。

④③の結果から早産児では17OHP 前駆物質である17OH プレグネノロンが高値をとり、17OHP が低値をとることが予想された。しかし、実際には17OHP も在胎週数が若いほど高値をとることが判明した(図4)。さらに変換率である17OHP/17OH プレグネノロン比も在胎週数が若い程高値をとることが判明した(図5)。

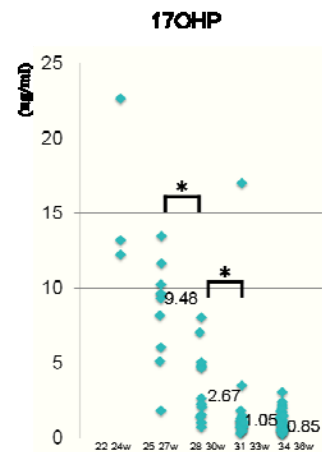


図4

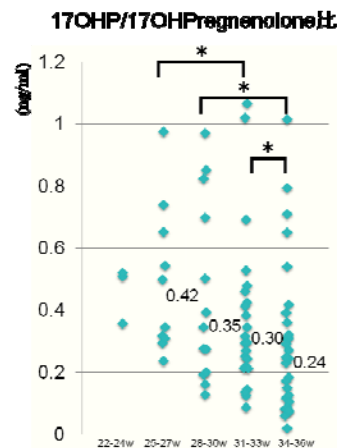


図5

今までは早産児における17OHP 高値は大量の胎生皮質ステロイドによる交差反応のために偽高値を示すと考えられていた。しかし、実際に17OHPは早産児ほど高値であることが判明した。さらに17OHP/17OH プレグネノロン比が高値をとるということは、早産児ほど、大量の17OH プレグネノロンを分泌し、さらに17OHP への変換が亢進しているということである。17OHPが高値にはなるものの、コルチゾールの上昇が認められていないということは、この17OH プレグネノロンは早産児

では副腎外で代謝されている可能性が高い。肝臓の 3β HSDにより17OH プレグネロンが代謝されている可能性が高い。早産児において、17OHP が高値になり、その代謝によってどの様な臨床的意義があるかは現時点では不明である。

④球状層分泌としてアルドステロンは在胎週数が若い程、高値をとる（図6）。

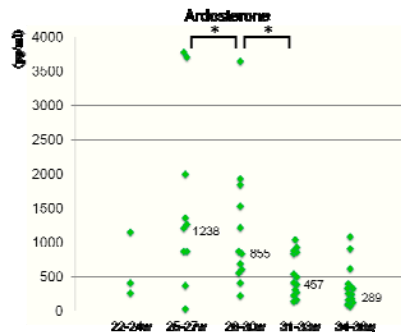


図6

早産児では尿細管機能が未熟なため、尿中へのナトリウム喪失が起こりやすく、また循環動態も不安定である。アルドステロン分泌が高値になるのは胎外での恒常性を維持するための反応と考えられ、早産児ほどその必要性が上昇し、早産児であつてもある程度の分泌能を有していることが確認された。

以上の研究から、早産児の副腎皮質ステロイド分泌パターン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応するための反応を有していることが判明した。

また、恒常性維持のための副腎皮質ステロイド分泌能も備わっているものの、17OHPが高値にもかかわらずコルチゾール値が上昇しないことから、副腎皮質機能は低いことが判明した。

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1件）

① Late-onset Circulatory Collapse in Very Low-birthweight Infants: A Japanese Perspective

Masayuki Miwa, Satoshi Kusuda, Kazushige Ikeda, NeoReviews 2009; 10; e381-e386, 査読有

〔学会発表〕（計6件）

①三輪雅之

副腎の発達 正期産児と早産児

第2回名古屋新生児成長発達研究会, 2012. 1. 28

愛知県・名古屋国際センタービル

②三輪雅之

早産児の血中アルドステロン濃度比較

第56回日本未熟児新生児学会, 2011. 11. 14

東京都・東京国際フォーラム

③三輪雅之

新生児血中ステロイドー斉測定による週数別・AGA 新生児副腎機能比較

第47回周産期・新生児学会, 2011. 7. 12

北海道・札幌コンベンションセンター

④三輪雅之

正期産児および早産児における出生後血中ステロイドホルモン変化の比較

第46回周産期・新生児学会, 2010. 7. 13

兵庫県・神戸国際会議場

⑤三輪雅之

30週以下の早産児における出生後早期の血中ステロイドホルモン変化

第45回周産期・新生児学会, 2009. 7. 14

愛知県・名古屋国際会議場

⑥Masayuki Miwa

Serum Steroid Profile in Newborn: Comparison between Term and Preterm Infant by Using Liquid Chromatography/Mass Spectrometry/Mass Spectrometry

49th European Society for Paediatric Research, 2008. 10. 25

France, Nice

〔図書〕（計1件）

①三輪雅之（河井昌彦編集）メディカ出版
新生児内分泌ハンドブック 2008; p32-p38

〔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・助教

研究者番号: 30383855