

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6月15日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591417

研究課題名（和文） 未熟児慢性肺疾患への新しい治療としての抗サイトカイン治療導入のための研究

研究課題名（英文） Anti-cytokine therapy for chronic lung disease of prematurity

研究代表者

西巻 滋 (NISHIMAKI SHIGERU)

横浜市立大学・附属病院・教授

研究者番号：20275043

研究成果の概要（和文）：

未熟児慢性肺疾患児の胎児期から新生児期の炎症の全体像を把握する。

早産児を対象に、interleukin(IL)-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、soluble tumor necrosis factor receptor-I、尿中 β 2-microglobulin 値を測定する。絨毛膜羊膜炎や臍帯炎を病理診断する。

その結果、臍帯炎のある早産児の臍帯血 IL-1 β 、IL-6、IL-8、尿中 β 2-microglobulin 値が高かった。その高サイトカイン血症は出生後数日で消失した。

早産児の胎児炎症反応症候群の把握には、生直後の血液データや臍帯炎の診断は有用である。尿中 β 2-microglobulin 値は、サイトカイン測定の代替となりうる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：

Newborn premature babies suffer from chronic lung disease (CLD), due to fetal inflammatory response syndrome (FIRS).

We have measured concentrations of blood interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, soluble tumor necrosis factor receptor-I and urinary β ₂-microglobulin values during four weeks after birth.

We have reported that elevated inflammatory cytokines and urinary β ₂-microglobulin values. It was suggested that hypercytokinemia in the cord blood in premature babies were greatly related with the existence of funisitis. However, hypercytokinemia induced by exposure to inflammation in the uterus disappeared in a few days after birth.

Therefore, data of the blood shortly after birth (i.e., umbilical cord blood) are important for evaluation of FIRS. For evaluation of FIRS, pathological diagnosis of funisitis would be useful. We suggested that urinary β ₂-microglobulin measurements in premature infants are useful to know the FIRS.

交付決定額

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医薬薬学

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：炎症・周産期・胎児炎症反応症候群

1. 研究開始当初の背景

近年の未熟児医療の進歩によって、より未熟性の強い児が救命されるようになった。そのために未熟児慢性肺疾患を発症する未熟児が増え、1,000g未満の出生体重で出生した児の約50%に慢性肺疾患が認められる程に高率である。彼らは長期の呼吸管理や生後数年の在宅酸素療法を要したり、また、肺高血圧症の合併などもみられる。さらには死亡例も少なくない。

この未熟児慢性肺疾患の病態の中心は炎症であり、胎内での高サイトカイン血症による胎児の肺胞の発達の停止であると報告されている。これは未熟児慢性肺疾患に胎児期の胎児炎症反応症候群が関わっている可能性を示唆している。サーファクタント療法や新生児の呼吸管理が洗練された現在、新生児呼吸窮迫症候群の呼吸管理後によって発症するI型の未熟児慢性肺疾患は少なくなり、その代わりに、胎児期の炎症が関与しているIII型、III'型の未熟児慢性肺疾患の割合は増加している。

そのため、新しい未熟児慢性肺疾患への対応、戦略を考えるには、胎児や新生児を取り巻く胎内炎症を知らなければならない。しかし胎児・未熟児の免疫応答全体像の究明は十分ではない。未熟児慢性肺疾患の発症に胎児期からの炎症が「いつから」「どのように」関わっているか不明である。また、今までに胎児期から新生児期にかけての免疫応答に焦点を当てた報告もない。

2. 研究の目的

新しい未熟児慢性肺疾患治療として、現在はステロイドによる抗炎症療法が施行されている。しかし発育途上の早産児ではステロイドによる副反応も懸念される。全身への大量投与は既に控えられ、気道内への少量投与が導入されている。

ここでは新しい抗炎症療法として、抗サイトカイン治療の導入を考えたい。そのために、未熟児慢性肺疾患を発症する未熟児に起こっている胎児期から新生児期の炎症の全体像を把握する。

3. 研究の方法

(1) 対象

慢性肺疾患は主に在胎28週未満の未熟児に認められるので、主なる対象を在胎32週未満の早産児とする。先天性感染症、先天性奇形、重度の頭蓋内出血や低酸素性虚血性脳

症を呈した児は対象から除外した。

出産前にインフォームドコンセントを得た上で、早産で出生した児の臍帯静脈血を入手する。その後は、生後3日、生後1週、2週、3週、4週、修正週数36週時に児の末梢血を入手する。また生後2日以内と生後1週時の児の自然排尿を貼付した尿パックで得て採取した。

(2) 病理診断

絨毛膜羊膜炎や臍帯炎を胎児炎症反応症候群を示す証拠ととらえ、胎盤および臍帯を検体に絨毛膜羊膜炎や臍帯炎の有無を病理診断する。

胎内での炎症である絨毛膜羊膜炎や臍帯炎の関与を明らかにするため、それらのあった児となかった児の臍帯静脈血で出生前を、児末梢血、児尿等で出生後の炎症を示すデータを検討する。

(3) 測定

血中のサイトカインや炎症関連物質を測定する。Interleukin(IL)-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、soluble tumor necrosis factor receptor-Iなどを測定する。方法は、細胞内サイトカインと表面蛋白の動態を検出するFACS解析法、ELISA法サイトカインmRNAとアポトーシス測定法であるRPA(ribonuclease protection assay)法、などを用いる。

また、interferon- γ から誘導される炎症誘導蛋白である尿中 β 2-microglobulin値をラテックス凝集免疫法で測定した。それをアルカリピクリン法で測定したクレアチニンで除して、100倍にした数値を求めた。

4. 研究成果

(1) 【2009年度】

61例の早産児(平均在胎週数29.5週、平均出生体重1,287g)で、臍帯静脈血のinterleukin(IL)-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、soluble tumor necrosis factor receptor-I(sTNFR)を測定した。

その結果、23例の児で測定されたIL-1 β は0~91.2 pg/mL(平均10.3 pg/mL)であった。17例(74%)で値は0 pg/mLであった。

41例で測定されたIL-6は0~4,149 pg/mL(平均194.9 pg/mL)であった。18例(44%)で値は0 pg/mLであり、値の幅も4桁の差があった。

IL-8は41例で測定され、値は7.7~2,391 pg/mL(平均219.0 pg/mL)であった。値の幅も4

桁の差があった。

20例で測定されたIL-10は、値が0~66.9 pg/mL(平均6.8pg/mL)で、12例(60%)で値は0 pg/mLであった。

sTNFR は61例で測定され、値は1,113~10,400pg/mL(平均4,023pg/mL)であった。

IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、sTNFRの値は在胎週数が短い児ほど高かった。また絨毛膜羊膜炎がある例でも、値は高かった。しかし、IL-6とIL-8は値が4桁の違いを認め、幅が極めて大きく、また値が0pg/mLの児の割合も多かった。一方、sTNFRは幅が小さかった。胎児や新生児の炎症の有無やその程度を知るマーカーとして、測定するサイトカインの選択やその解釈には注意が必要だと想われた。

(2) 【2010年度】

早産児を絨毛膜羊膜炎の有無で分け、臍帯静脈血と生後1週時の末梢血の soluble tumor necrosis factor receptor-I (sTNFR) 値と、生後48時間以内と生後1週時に得られた尿中 β 2-microglobulin(β 2-MG) 値を検討した。

生後48時間以内の尿中 β 2-MG 値は、絨毛膜羊膜炎のない児(54例:在胎24~34週、出生体重516~2,182g)に比べ、絨毛膜羊膜炎のあった児(82例:在胎24~33週、出生体重662g~2,492g)で有意に高かった(66,822 vs 99,570 μ g/gCr ; p = 0.0011)。それは特に在胎28週未満の児で著明であった。生後1週間の尿中 β 2-MG 値は、両群で有意に低下し、また両群間に差はなくなった(52,752 vs 52,010 μ g/gCr ; p = 0.7436)。

臍帯静脈血のsTNFR 値は、絨毛膜羊膜炎のない児に比べ絨毛膜羊膜炎のあった児で有意に高かった(2,383 vs 3,586pg/mL ; p = 0.0230)。生後1週時の末梢血のsTNFR 値は、両群で低下し、特に絨毛膜羊膜炎のあった児では有意な低下であった。また絨毛膜羊膜炎のあった児で有意に高かった(1,858 vs 2,104 pg/mL ; p = 0.0096)。

その結果、生後早期の尿中 β 2-MG 値は高く、それは出生前の胎内での炎症の存在によって高くなったと考えられた。また、値が高くなる児は、在胎週数28週未満の超早産児に多かった。実際に、未熟児慢性肺疾患を発症する児はより未熟性の強い在胎28週未満の児に多いことと符号した。

尿中 β 2-MG 値は生後1週時には低下した。胎内の炎症の影響は生後1週で軽減したと考えた。血中sTNFR 値も臍帯静脈血では高かったが、生後1週の末梢血では低下し、同様の変化を示した。以上から、出生前の胎内での炎症を示す値の上昇は生後1週には消失すると考える。

(3) 【2011年度】早産児36例(在胎週数<32週)を対象に、絨毛膜羊膜炎も臍帯炎もなかった15例(C(-)F(-)群)、絨毛膜羊膜炎はあったが臍帯炎はなかった15例(C(+)F(-)群)と絨毛膜羊膜炎も臍帯炎もあった6例(C(+)F(+)群)の3群に分けた。3群で血中のinterleukin (IL)-1 β 、IL-6、IL-8 値を、日齢0(=臍帯静脈血)、3、7、14、21、28に測定した。

その結果、臍帯静脈血のデータを比較すると、C(+)F(+)群のIL-1 β は46.0pg/mL、IL-6 は869.3pg/mL、IL-8 は735.5pg/mL と、いずれもC(+)F(-)群とC(-)F(-)群に比べ、著明に高値であった。しかし、日齢3の末梢血のデータでは、C(+)F(+)群のIL-1 β 、IL-6、IL-8 は低下し、3群間で有意な差がなくなった。特にIL-6 は値に幅が大きく、値の変化も著しかった。一方で、C(+)F(-)群とC(-)F(-)群の値は、日齢3でも低下は乏しかった。さらに、日齢3、7、14、21、28の3群のIL-1 β 、IL-6、IL-8 の各値をみると、生後経過中に大きな変化がなかった。

以上から、絨毛膜羊膜炎があっても臍帯炎がなければ、早産児の臍帯静脈血のサイトカイン値は高くなかった。早産児の臍帯静脈血に認められた高サイトカイン血症には、絨毛膜羊膜炎だけではなく臍帯炎の存在するような胎内の炎症環境が大きく関与していることが示唆された。また、その臍帯静脈血での高サイトカイン血症は、生後数日時には消失した。

【まとめ】

出生した早産児の胎内での炎症環境の評価するために、臍帯静脈血、生後1~4週間の末梢血、尿を検体に、サイトカインや炎症関連物質、炎症誘導蛋白を測定した。

その結果、早産児では臍帯静脈血のinterleukin (IL)-1 β 、IL-6、IL-8 は高値であった。この臍帯静脈血に認められた高サイトカイン血症には、絨毛膜羊膜炎だけではなく臍帯炎の存在が大きく関与していることが示唆された。しかし、胎内で炎症に曝されていたために生じたであろうと考えられる、この高サイトカイン血症は、その影響から離れた出生後の数日で消失した。

また、早産児の生後48時間以内の尿中 β 2-microglobulin 値は高く、それは胎内での炎症曝露を示唆し、胎児炎症反応症候群を管理するために有用であることが示唆された。その影響は生後1週で軽減した。

早産児の胎児炎症反応症候群の把握には生直後の血液、例えば臍帯血などを検体としたデータが重要である。また胎盤や臍帯を検体とした病理診断も重要であり、それによって絨毛膜羊膜炎だけでなく、臍帯炎の有無も確認されるべきであろう。

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 10 件)

- ① Nishimaki S, Shima Y, Sato M, An H, Fujita S, Iwasaki S, Horiguchi H, Seki K, Yokota S, Urinary β 2-microglobulin in very preterm neonates with chorioamnionitis, *Pediatric Nephrology*, 査読有, Vol. 26, 2011, 2185-2191
- ② Shima Y, Nishimaki S, Nakajima M, Kumasaka S, Migita M, Urinary β -2-microglobulin as an alternative marker for fetal inflammatory response and development of bronchopulmonary dysplasia in premature infants, *Journal of Perinatology*, 査読有, Vol. 31, 2011, 330-304
- ③ Sato M, Nishimaki S, Yokota S, Seki K, Horiguchi H, An H, Ishida F, Fujita S, Ao K, Yatake H, Yatake H, Severity of chorioamnionitis and neonatal outcome, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 査読有, Vol. 37, 2011, 1313-1319
- ④ 西巻滋, 島義雄, 佐藤美保, 安ひろみ, 岩崎志穂, 堀口晴子, 関和男, 横田俊平, 早産児の尿中 β 2-microglobulin 値(第1報)、日本小児科学会雑誌、査読有、Vol. 115、2011、1242-1248
- ⑤ Sato M, Mori M, Nishimaki S, An H, Naruto T, Sugai T, Shima Y, Seki K, Yokota S, Soluble tumor necrosis factor receptor-I in preterm infants with chronic lung disease, *Pediatrics International*, 査読有, Vol. 52, 2010, 268-272
- ⑥ Nishimaki S, Sato M, An H, Shima Y, Akaike T, Yokoyama U, Yokota S, Comparison of markers for fetal inflammatory response syndrome: fetal blood interleukin-6 and neonatal urinary β 2-microglobulin, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 査読有, Vol. 35, 2009, 472-476
- ⑦ Sato M, Nishimaki S, Shima Y, Iwasaki S, An H, Seki K, Yokota S, Soluble tumor necrosis factor receptor-I in preterm infants with chorioamnionitis, *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 査読有, Vol. 35, 2009, 252-257
- ⑧ Nakajima S, Naruto T, Miyamae T, Imagawa T, Mori M, Nishimaki S, Yokota

S, Interleukin-6 inhibits early differentiation of ATDC5 chondrogenic progenitor cells, *Cytokine*, 査読有, Vol. 47, 2009, 91-97

- ⑨ 西巻滋, 胎児・新生児の炎症の把握-サイトカインと尿 β 2-microglobulin、日本産婦人科・新生児血液学会誌、査読有、Vol. 118、2009、125-132
- ⑩ 島義雄、中島瑞恵、熊坂栄、矢代健太郎、松村好克、西巻滋、出生前グルココルチコイド療法と子宮内感染/炎症の相互作用、日本周産期・新生児医学会雑誌、査読有、Vol. 145、2009、845-848

[学会発表] (計 8 件)

- ① 西巻滋、島義雄、安ひろみ、佐藤美保、岩崎志穂、堀口晴子、関和男、横田俊平、超早産児の尿中 β 2-ミクログロブリンはなぜ高値なのか、第 115 回日本小児科学会、2012 年 4 月 22 日、国際会議場(博多)
- ② 西巻滋、高橋尚人、早産児の炎症性疾患への対応-CLD と HLH への新たな戦略を求めて-、第 56 回日本未熟児新生児学会、2011 年 11 月 13 日、東京国際フォーラム
- ③ 佐藤美保、津田兼之介、魚住梓、柳瀬健太郎、粟生耕太、安ひろみ、堀口晴子、関和男、西巻滋、横田俊平、新生児における尿中 β 2-microglobulin 値の経時的变化、第 114 回日本小児科学会、2011 年 8 月 16 日、東京国際フォーラム
- ④ Aoki R, Yokoyama U, Iwasaki S, Nishimaki S, Yokota S, Ishikawa Y, Minamisawa S, The Role of Transient Receptor Potential Melastatin-Related Channel M3 (TRPM3) in rat Ductus Arteriosus, The 3rd Congress of Asia-Pacific Pediatric Cardiac Society, 2010 年 7 月 7 日、シェラトン グランデ東京ベイホテル(千葉県浦安市)
- ⑤ 西巻滋、島義雄、安ひろみ、佐藤美保、岩崎志穂、堀口晴子、関和男、横田俊平、超早産児の尿中 β 2-ミクログロブリンはなぜ高値なのか、第 54 回日本未熟児新生児学会、2009 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜
- ⑥ 西巻滋、未熟児の病気は既に胎内で始まっている-胎児炎症反応症候群から考える-、2009 年 9 月 17 日、鎌倉小児科医会研究会
- ⑦ 島義雄、西巻滋、中島瑞恵、矢代健太郎、松村好克、熊坂栄、周産期における侵襲作用様式と早産児の予後、第 45 回日本周産期・新生児医学会、2009 年 7 月 13 日、名古屋国際会議場
- ⑧ 西巻滋、新生児科医からみた胎児炎症反応症候群-未熟児の病気は既に胎内で始まっている-、第 26 回横浜市産婦人科医

会・小児科医会研究会、2009年6月5日、
横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西巻 滋 (NISHIMAKI SHIGERU)

横浜市立大学・附属病院・教授

研究者番号：20275043

(2) 研究分担者

横田 俊平 (YOKOTA SHUMPEI)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：10158363

(3) 連携研究者

()

研究者番号：