

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：17501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659734

研究課題名(和文)電子スピン共鳴法による胎児酸化ストレスの新しい評価法の開発

研究課題名(英文) New evaluation of fetal oxidative stress: measurement of the umbilical cord blood dimethyl sulfate-induced ascorbyl free radical by an electron spin resonance method

研究代表者

西田 欣広 (Nishida, Yoshihiro)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10336274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は分娩時の子宮収縮に伴う子宮動脈および胎盤内血流の虚血再還流の評価にラジカルを測定することにより、胎児血にacidosisがみられるより前に酸化ストレスの検出が可能であることを発見した。これまでラジカルは発生後速やかに消失するため通常は実験室レベルでの測定に限られ、リアルタイムの評価が求められる臨床での応用はこれまで困難であった。しかし、ビタミンCラジカルをDMSO存在下に瞬時にESR装置で検出し、臍帯血中のビタミンCを推測する方法論を確立した。さらに、胎児ストレス評価に臍帯血の動脈、静脈を同時にそれぞれ評価するアイデアにより、より詳細な胎内環境のストレス状態を評価できる可能性を報告した。

研究成果の概要(英文)：Objective. The aim is to evaluate intrapartum fetal oxidative stress in real-time by umbilical cord blood dimethyl sulfate (DMSO)-induced ascorbyl free radical (AFR) measured by an electron spin resonance (ESR) method. Methods. 75 mothers delivering at gestational age after 37 weeks were recruited. Umbilical artery (UA) and venous (UV) cord blood gas analysis was performed. Serum levels of DMSO-induced AFR (AFR/DMSO) that reflect vitamin C concentrations, was measured by ESR spectroscopy. Results. Blood gas analysis showed no significant differences among the groups. UA-AFR/DMSO level of elective cesarean section (CS) group was significantly lower compared with spontaneous delivery group. Emergency CS group showed significantly lower levels of UA-AFR/DMSO compared with elective CS group. UV-AFR/DMSO levels had no significant difference among the groups. Conclusions. It is suggested that fetal cord blood AFR/DMSO is a sensitive marker to assess fetal oxidative stress during delivery.

研究分野：周産期医学

キーワード：酸化ストレス 胎児機能不全 臍帯 Vitamin C ESR 分娩

1. 研究開始当初の背景

周産期医学の1つの目標として胎児の状態を非侵襲的かつ安全にどのように把握できるかということが重要な課題である。分娩時は子宮の持続的、間歇的な収縮に伴い子宮筋層内を走行するラセン動脈などの動脈が圧迫され、絨毛間腔の血流が減少し胎児は低酸素状態になる。予備能力が十分にある胎児(reassuring fetal status)であれば、通常の子宮収縮に伴う血中酸素分圧が低下しても胎児心拍モニタリングには影響を及ぼさない。しかし、胎盤機能不全などにより予備能力が低下し、慢性的な低酸素状態になっている胎児では、化学受容体を介して、また直接的な胎児心筋に対する抑制作用のために胎児徐脈が出現し、危険な状態に移行していく。ここまで進行すると現在の胎児評価である胎児心拍モニタリングの異常、出生後の胎児臍帯動脈 pH 値の低下、低 Apgar score などが観察される。このような陣痛に伴う子宮筋の虚血再灌流状態では大量の活性酸素種(ROS)が産生され、過剰な酸化ストレスが生じていることが推測される。これまでの我々の研究で酸化ストレス時の評価として、血中の抗酸化物質の中で、最も酸化ストレスに速やかに反応するビタミン C(VC:増加した ROS を中和する)に着目して、その有用性を報告している(Matsumoto S et al. J Neurochem Res. 2010)。電子スピン共鳴法によりビタミン C ラジカルを測定し、間接的にビタミン C をリアルタイムに測定する手法を用いて、分娩時の酸化ストレスをより早い段階で評価(これまでの胎児評価法で観察される状態より前の段階)を可能とする本研究は、reassuring fetal status から non-reassuring fetal status に至る過程の解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

分娩中の胎児の酸化ストレスの評価として

電子スピン共鳴法(ESR)による臍帯血ビタミン C ラジカル(VCR)測定系(リアルタイムに VC を評価可能)を確立する。さらに、分娩様式の違いによる酸化ストレスの変化、異常妊娠(妊娠高血圧症候群、糖尿病合併妊娠など)時のラジカルの変動を解析する。また、二次元電気泳動によるストレス蛋白のプロテオミクス解析により酸化ストレスに着目した臍帯血中蛋白の候補蛋白およびその解析を行う。最終的に、VCR 欠乏(過剰な酸化ストレス状態)時の VC 投与による抗酸化療法により、出産に伴う胎児酸化ストレス回避と出生児の Apgar 値、臍帯血ガス解析から児の予後を改善させうるかを検討する。

3. 研究の方法

本研究者はすでに平成 23 年度本学倫理員会に本研究計画の正当性・妥当性について評価を受け、承認されている(承認番号 441)。平成 24 年度は臍帯血の VCR 測定法の確立と同じサンプルで測定した血液ガス分析と母体・胎児条件での解析・評価を行う。VCR そのものの測定技術は研究協力者とともにすでに測定法そのものは確立しており、すでにパイロット研究での測定も終了している。平成 25 年度は前年のデータ解析を行うと同時に、酸化ストレス時の臍帯血プロテオミクス解析(PDQuest Advanced:本学共同実験施設)を行い、臍帯血中のストレス蛋白を網羅的に評価し、その主要蛋白の蛋白解析を行う。先行研究でストレス時の蛋白の変動が我々の 2 次元電気泳動による蛋白分離法により解析可能なことを確認している

4. 研究成果

我々は分娩時の子宮収縮に伴う子宮動脈および胎盤内血流の虚血再灌流の評価にラジカルを測定することにより、胎児血に acidosis がみられる前の段階での酸化スト

レスの検出が可能であることを発見した。ラジカルは発生後速やかに消失するため通常は実験室レベルでの測定に限られ、リアルタイムの胎児評価が求められる臨床での応用はこれまで困難であり、臨床データでの論文はほとんど存在しない。また VC 自身は HPLC で測定可能であるが、結果も 1 週間程度かかり、臨床にはそぐわない。われわれは酸化ストレスで減少した VC レベルを DMSO により間接的にラジカルを発生させ、瞬時に ESR 装置で検出し、臍帯血中の VC レベルを推測する方法論をすでに確立している。さらに、胎児ストレス評価に臍帯血の動脈、静脈を同時にそれぞれ評価するアイデアにより、より詳細な胎内環境のストレス状態を評価できるようになっている。本研究で胎児心拍モニタリングで severe NRFS と診断されても臍帯動脈 pH 値は正常範囲の血液もわれわれの研究でラジカルレベルでは変化が起きていることを見出している。

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 2 件)

1. Yoshihiro Nishida et al. New evaluation of fetal oxidative stress: measurement of the umbilical cord blood dimethyl sulfate-induced ascorbyl free radical by an electron spin resonance method. J Maternal-Fetal Neo Med, 25(1):2499-2502,2012.査読有り
2. Naoko Koyama, Yoshihiro Nishida et al. Telmisartan induces growth inhibition, DNA double-strand breaks and apoptosis in human endometrial cancer cells. PLoS ONE 9(3): e93050, 2014.査読有り

[学会発表](計 8 件)

1. 西田欣広、他. 胎児酸化ストレスにおけ

る malondialdehyde とフリーラジカルとの関連および候補蛋白の抽出. 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会. 神戸市・大阪国際会議場. 平成 24 年 4 月 13-15 日.

2. 西田欣広. 臍帯血からみた胎児酸化ストレスについて. 第 29 回医大ヶ丘研究会. 由布市・大分大学. 平成 24 年 6 月 19 日.

3. 西田欣広、他. Non-reassuring fetal status における酸化ストレスの解析. 第 12 回日本抗加齢医学会総会. 横浜市・パシフィコ横浜. 平成 24 年 6 月 22-24 日.

4. 西田欣広、他. Non-reassuring fetal status と診断された胎児の酸化ストレスマーカーの解析. 第 48 回日本周産期・新生児学会総会. 大宮市・大宮ソニックシティ. 平成 24 年 7 月 8-10 日.

5. 井上尚美、西田欣広、他. 電子スピン共鳴法による精漿中ビタミン C ラジカルの測定とその有用性. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会. 札幌市・ロイトン札幌. 平成 25 年 5 月 10-12 日.

6. 西田欣広. 精漿中ビタミン C ラジカルの測定による新しい精子酸化ストレス評価. 第 13 回日本抗加齢医学会総会. 横浜市・パシフィコ横浜. 平成 25 年 6 月 28-29 日.

7. 西田欣広、松本重清、他. ESR によるビタミン C ラジカル値からみた精子機能. 第 67 回日本酸化ストレス学会, 京都市・同志社大学, 平成 26 年 9 月 4 - 5 日.

8. 松本重清、西田欣広、他. 緊急帝王切開術における妊婦へのビタミン C 投与が胎児酸化ストレスと Apgar score に与える影響. 第 67 回日本酸化ストレス学会, 京都市・同志社大学, 平成 26 年 9 月 4 - 5 日.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西田 欣広 (NISHIDA Yoshihiro)
大分大学・医学部産婦人科・准教授
研究者番号：10336274

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし