

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461594

研究課題名(和文)小児危急・難治疾患の生体応答解析と治療的介入

研究課題名(英文)Biological response and therapeutic intervention in pediatric critical and intractable diseases

研究代表者

塚原 宏一 (Hirokazu, Tsukahara)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90207340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：以下の事項について検討を進めた。小児の急速・慢性疾患ではしばしば酸化ストレスが増幅され、生体の構造や機能が酸化劣化を受けて、組織障害が不可逆的に進展する。疾患の治療、管理において酸化ストレスを制御することが重要である。そのためには、特異マーカーを用いて酸化ストレス環境を非～低侵襲的に評価することが必要である。臨床現場では迅速検査キットの開発が必須であるが、その中で、hydroperoxides、8-OHdG、L-FABPに期待が持たれる。今後は“レドックス”に関連してより特異性の高い細胞機能修飾薬が開発され、それらが重症小児疾患への治療の中に組み込まれることが期待される。

研究成果の概要(英文)：It is becoming increasingly apparent that reactive oxygen species (ROS) exert multiple biological effects over a wide spectrum, from physiological regulatory functions to the pathogenesis of diverse diseases. We sought for the clinical application of oxidative stress biomarkers in pediatric medicine. First, we explained important physiological and pathophysiological aspects of ROS and antioxidative defense systems. Second, we presented a list of clinically applicable biomarkers, along with pediatric diseases in which enhanced oxidative stress might be involved. Many good biomarkers are readily measurable using ELISA. Rapid diagnostic tests for measuring oxidative stress status (such as hydroperoxides, 8-OHdG, L-FABP) have been introduced. Third, we have evaluated the efficacy of antioxidative intervention for oxidative-stress related diseases using several animal models. Last, although not comprehensive, we provided a brief perspective of this particular area in pediatric research.

研究分野：小児科

キーワード：小児医療 生体応答 酸化ストレス 一酸化窒素

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、危急・難治の病態・疾患の管理においては基礎病態による障害だけでなく、それにより攪乱された生体応答による有害作用を制御することも重要と考えられるようになった。このような方策により、急速進行性病態では原病の進行抑制・完全治癒、慢性遷延性病態では原病の寛解導入と合併症の抑止の可能性も期待されるようになった。

(2) 小児医療においては、感染疾患、免疫疾患、血液・腫瘍疾患、心臓・血管疾患、新生児疾患のために入院・通院している患者で病状が急性増悪して、あるいは慢性遷延化して多臓器障害を起こし、生命予後・機能予後が不良の事態に至ることが少なくない。早期のうちに、増悪や予後を判定できる特異的生体マーカーが設定され、それらが簡便に計測できるならば、患児の管理もテイラーメイドで侵襲度の低いものになり、その予後も改善し、医療資源の適正配分も可能になる。

(3) なお、本申請者は、2007年に「小児科領域における酸化ストレスとレドックス制御の病態学的意義」にて小児医学川野賞（小児基礎医学研究）、2012年に「小児を対象にした血管内皮の基礎および臨床医学的研究」にて日本小児科学会学術研究賞を受賞している。また、Springer社の新刊 *Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice: Studies on Pediatric Disorders* の Chief Editor である。

2. 研究の目的

(1) 岡山大学医学部小児科は、感染、免疫、血液・腫瘍、心臓・血管、新生児を含めた広い領域をカバーした医療を実践し、中四国の拠点病院の1つとして機能している。

(2) 研究面では、「生体応答」において本質的な酸化・ニトロ化ストレス、レドックス制御機能、血管内皮機能保持・再生に関連する生体マーカーの研究を精力的に行っている（参考論文：塚原宏一．窒素(N)と酸素(O)の化学・生物学．日本臨床高気圧酸素・潜水医学会雑誌 2010; [Tsukahara H](#). Biomarkers for oxidative stress: Clinical application in pediatric medicine. *Curr Med Chem* 2007 など）。

3. 研究の方法

(1) 小児医療領域の危急・難治の感染、免疫、血液・腫瘍、心臓・血管、新生児の各領域の患者を対象に、酸化・ニトロ化ストレス、レドックス制御機能、血管内皮機能保持・再生を表わす3群の生体マーカー（それぞれ total hydroperoxides, nitrotyrosine;

redox potential, thioredoxin-1; nitrite/nitrate, nitrosothiol など）を計測し、その動態解析によって、疾患ごとに高精度に臨床経過、治療効果、予後を判定できる組み合わせを設定する。

(2) さらに、橋渡し研究（インフルエンザ肺炎、脳炎の動物（マウス）モデルを対象に、組織・臓器障害の数値表示と抗酸化・抗ニトロ化薬の効果を検証する）を行うことによって、各種疾患の病態をさらに深く追究し、生体応答の制御に基づいた新規の効果的治療法・予防法を開発する。

4. 研究成果

(1) 本研究の遂行の中で得られた生体マーカー計測・評価・応用の独創性・新規性を列挙する。

非侵襲的（尿）・低侵襲的（血液・脳脊髄液）で繰り返し検査できるので、特に小児医学・医療に適している。

In vivo にて「生体応答」の観点より病因・病態を解析できるので、生化学的に危急・難治疾患を再分類し、新しい疾患・病態を発見するのに役立つ。

ヒト患者で長期に継続してモニターできるので、新規の効果的な治療法・予防法を開発するのに役立つ。

動物モデルで同様の生体マーカーを計測して、ヒトでの結果と直接に比較検討できる（マーカーを共用できる）ので、ヒト患者で病因・病態をより深く理解すること、効果的治療法・予防法を開発することが容易である。

患者体液で生体応答レベルを評価できる迅速キットが臨床応用されれば、入院加療・集中管理・ICU 収容の的確な見極めに役立ち、医療経済での費用対効果比を改善できる。

(2) 以下に、その具体的成果（論文・学会発表）を列挙する。

5. 主な発表論文など

【雑誌論文】（計28件）

(1) Yorifuji T, [Tsukahara H](#), Doi H. Breastfeeding and Kawasaki Disease: A Nationwide Longitudinal Survey in Japan. *Pediatrics*. 査読あり, 2016 (in press).

(2) Nosaka N, Yorifuji T, Knaup E, Mugaruma T, Okada A, [Tsukahara H](#), Doi H. Development of a Japanese scale for assessment of paediatric normal weight. *Resuscitation*. 査読あり, 2016 (in press).

(3) Nosaka N, Yashiro M, Yamada M, Fujii Y, [Tsukahara H](#), Liu K, Nishibori M, Matsukawa A, Morishima T. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody

treatment provides protection against influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia in mice. *Crit Care*. 査読あり, 2015;19:249. doi: 10.1186/s13054-015-0983-9

(4) Saito Y, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Nosaka N, Yamashita N, Yamada M, **Tsukahara H**, Morishima T. Inhibitory Effects of Edaravone, a Free Radical Scavenger, on Cytokine-induced Hyperpermeability of Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells: A Comparison with Dexamethasone and Nitric Oxide Synthase Inhibitor. *Acta Med Okayama*. 査読あり, 2015;69(5):279-90.

(5) Takahashi N, Nojima I, Araki T, Takasugi M, Sakane T, Kodera A, Ikeda M, **Tsukahara H**. Evaluation of rapid immunochromatographic tests for norovirus in neonatal and infant faecal specimens. *J Int Med Res*. 査読あり, 2015;43(5):648-52. doi: 10.1177/0300060515592902

(6) Imoto Y, Yamada T, **Tsukahara H**, Kimura Y, Kato Y, Sakashita M, Fujieda S. Nitrite/nitrate in nasal lavage fluid reflects nasal symptoms after a single nasal allergen provocation in patients with seasonal allergic rhinitis. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 査読あり, 2015;25(5): 382-4.

(7) **塚原宏一**, 吉本順子. レドックス UPDATE: ストレス制御の臨床医学・健康科学 - 一酸化窒素, アルギニン代謝と酸化ストレス. *医学のあゆみ*, 査読無, 2015(別冊): 103-111.

(8) **塚原宏一**, 鷲尾洋介. レドックス UPDATE: ストレス制御の臨床医学・健康科学 - 小児疾患におけるレドックス制御破綻. *医学のあゆみ*, 査読無, 2015(別冊): 240-248.

(9) **塚原宏一**, 渡邊宏和, 木村紀子. 正期産児の機能を知って早産児の観察ポイントを押さえよう! - 早産児の腎機能の観察ポイント. *Neonatal Care*, 査読無, 2015; 28(11): 20-28.

(10) **塚原宏一**. 血管内皮機能を対象にした基礎および臨床医学研究. *岡山医学会雑誌*, 査読無, 2015; 127(3): 187-195.

(11) **Tsukahara H**. Oxidative stress biomarkers in pediatric medicine: A 2013 update. In "Systems Biology of Free Radicals and Anti-oxidants", ed. Laher I. 査読あり, pp. 689-715, Springer, vol. 1, Berlin, Germany, 2014.

(12) **Tsukahara H**. Oxidative stress biomarkers: Current status and future

perspective. In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K. 査読あり, pp. 87-113, Springer, Berlin, Germany, 2014.

(13) Yashiro M, **Tsukahara H**, Morishima T. Thioredoxin therapy: Challenges in translational research. In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K. 査読あり, pp. 233-252, Springer, Berlin, Germany, 2014.

(14) **Tsukahara H**, Yashiro M, Nagaoka Y, Morishima T. Infectious and inflammatory disorders. In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K. 査読あり, pp. 371-386, Springer, Berlin, Germany, 2014.

(15) Nagasaka H, **Tsukahara H**, Miida T. Oxidative stress in inherited metabolic diseases. In "Oxidative Stress in Applied Basic Research and Clinical Practice - Pediatric Disorders", ed. Tsukahara H, Kaneko K. 査読あり, pp. 387-404, Springer, Berlin, Germany, 2014.

(16) Tsuge M, Oka T, Yamashita N, Saito Y, Fujii Y, Nagaoka Y, Yashiro M, **Tsukahara H**, Morishima T. Gene expression analysis in children with complex seizures due to influenza A(H1N1)pdm09 or rotavirus gastroenteritis. *J Neurovirol*. 査読あり, 2014;20(1):73-84. doi: 10.1007/s13365-013-0231-5

(17) Nagasaka H, **Tsukahara H**, Okano Y, Hirano K, Sakurai T, Hui SP, Ohura T, Usui H, Yorifuji T, Hirayama S, Ohtake A, Miida T. Changes of lipoproteins in phenylalanine hydroxylase-deficient children during the first year of life. *Clin Chim Acta*. 査読あり, 2014;433:1-4. doi: 10.1016/j.cca.2014.02.020

(18) **塚原宏一**. 新生児疾患と酸化ストレス. *日本未熟児新生児学会雑誌*, 査読無, 2014; 26(1): 27-35.

(19) **Tsukahara H**. Redox modulatory factors of human breast milk. In "Handbook of Dietary and Nutritional Aspects of Human Breast Milk", ed. Zibadi S, Watson RR, Preedy VR. 査読あり, pp. 599-614, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Netherlands, 2013.

(20) Yashiro M, **Tsukahara H**, Matsukawa A,

Yamada M, Fujii Y, Nagaoka Y, Tsuge M, Yamashita N, Ito T, Yamada M, Masutani H, Yodoi J, Morishima T. Redox-active protein thioredoxin-1 administration ameliorates influenza A virus (H1N1)-induced acute lung injury in mice. Crit Care Med. 査読あり, 2013;41(1):171-81. doi:10.1097/CCM.0b013e3182676352

(21) Nakatsukasa Y, **Tsukahara H**, Tabuchi K, Tabuchi M, Magami T, Yamada M, Fujii Y, Yashiro M, Tsuge M, Morishima T. Thioredoxin-1 and oxidative stress status in pregnant women at early third trimester of pregnancy: relation to maternal and neonatal characteristics. J Clin Biochem Nutr. 査読あり, 2013;52(1):27-31. doi:10.3164/jcfn.12-71

(22) Nagasaka H, Miida T, Yorifuji T, Hirano K, Inui A, Fujisawa T, **Tsukahara H**, Hayashi H, Inomata Y. Metabolic improvements in intrahepatic porto-systemic venous shunt presenting various metabolic abnormalities by 4-phenylacetate. Clin Chim Acta. 査読あり, 2013;419:52-6. doi: 10.1016/j.cca.2013.01.016

(23) Nagasaka H, Yorifuji T, Egawa H, Inui A, Fujisawa T, Komatsu H, **Tsukahara H**, Uemoto S, Inomata Y. Characteristics of NO cycle coupling with urea cycle in non-hyperammonemic carriers of ornithine transcarbamylase deficiency. Mol Genet Metab. 査読あり, 2013;109(3):251-4. doi: 10.1016/j.ymgme.2013.04.013

(24) **Tsukahara H**, Fujii Y, Matsubara K, Yamada M, Nagaoka Y, Saito Y, Yashiro M, Tsuge M, Goto S, Kitamura T, Hata A, Ichiyama T, Morishima T. Prognostic value of brain injury biomarkers in acute encephalitis/encephalopathy. Pediatr Int. 査読あり, 2013;55(4):461-4. doi: 10.1111/ped.12094

(25) Yamashita N, **Tsukahara H**, Tsuge M, Nagaoka Y, Yashiro M, Saito Y, Fujii Y, Oka T, Morishima T. Pathogenic mechanisms of influenza A(H1N1)pdm09 infection elucidated on gene expression profiling. Pediatr Int. 査読あり, 2013;55(5):572-7. doi: 10.1111/ped.12139

(26) 藤井洋輔, **塚原宏一**, 森島恒雄. 脳炎・脳症・髄膜炎の病態 - 脳炎・脳症とバイオマーカー. 小児内科, 査読無, 2013; 45(2): 187-190, 2013.

(27) **塚原宏一**, 中務陽子, 山田睦子, 重安良恵, 吉本順子, 喜多村哲朗, 長坂博範, 森島恒雄. Early third trimester の妊婦における血清中 NOx, ADMA (内因性 NO 合成酵素阻害因子) および酸化ストレスマーカー. 日本小児高血圧研究会誌, 査読無, 2013; 10(1): 8-15.

(28) **塚原宏一**. 気道炎症と酸化ストレス. Respiratory Trends, 査読無, 2013; 3(2): 14-19.

【学会発表】(計8件)

(1) **塚原宏一**. 周産期新生児医療とレドックス. 第22回未熟児新生児医療研究会, 京都, 2015年(3月).

(2) **塚原宏一**. 小児における一酸化窒素(NO)と病態. 第17回京阪こどもカンファレンス, 大阪, 2015年(7月).

(3) **塚原宏一**. 小児疾患における活性酸素の関与. 第27回腎とフリーラジカル研究会, 大阪, 2015年(10月).

(4) **塚原宏一**. 一酸化窒素(NO)の生理と病態 - ガンマグロブリン投与の意義. 第67回中国四国小児科学会, 山口, 2015年(11月).

(5) **塚原宏一**. 一酸化窒素(NO)と腎疾患. 第49回日本小児腎臓病学会学術集会, 秋田, 2014年(6月).

(6) **塚原宏一**. The Kidney in Multi-Organ Systemic Disease in Japanese Children - 新生児AKIの特徴・評価・管理. 第56回日本腎臓学会学術集会, 東京, 2013年(5月).

(7) **塚原宏一**. 小児CKDとバイオマーカー: 最近の進歩 - 総論: CKDとバイオマーカー. 第48回日本小児腎臓病学会学術集会, 徳島, 2013年(6月).

(8) **塚原宏一**. 酸化ストレスと新生児疾患. 第58回日本未熟児新生児学会・学術集会, 金沢, 2013年(12月).

6. 研究組織

(1) 研究代表者
塚原 宏一 (TSUKAHARA, Hirokazu)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 90207340

(2) 研究協力者
岡田 あゆみ (OKADA, Ayumi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 70325108

馬場 健児 (BABA, Kenji)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号: 40721767
八代 将登 (YASHIRO, Masato)
岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80585943

宮井 貴之 (MIYAI, Takayuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：50423330

吉本 順子 (YOSHIMOTO, Junko)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20570526

鷲尾 洋介 (WASHIO, Yosuke)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20569066

藤井 洋輔 (FUJII, Yosuke)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80549775