

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461627

研究課題名(和文) 成育限界期の胎児・早産児におけるコーチゾル分泌不全の病態解析

研究課題名(英文) Pathogenesis of insufficient adrenocortical response in premature sheep fetus

研究代表者

北西 龍太(Kitanishi, Ryuta)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：20436116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒツジ未熟胎仔において子宮内炎症がコーチゾル分泌能とその循環動態に与える影響を解析する計画を立てた。そこで対照群6例と炎症群6例のヒツジ胎仔に合計31回のCRH負荷試験を行った。液体クロマトグラフ質量分析法を用いたプロファイリング解析により、CRH負荷試験におけるACTH、コーチゾル、コルチゾン、アルドステロン、Dehydroepiandrosterone sulfateの経時的な濃度変化を測定した。その結果、対照群と比べて炎症群では、CRH負荷においてコーチゾルの産生が促進された。つまり炎症ストレスにより、3-ヒドロキシステロイド脱水素酵素の活性が上昇する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We made a plan to clarify the effect of intrauterine inflammation on the cortisol secretion and its circulatory response in premature lamb because the fetal endocrine potential to adapt the postnatal environment might have been already deteriorated by the inflammatory stress before birth. In this study, we separated sheep fetuses into two groups: control group (n=6) and inflammation group (n=6), and we could store the plasma samples for 31 times of the corticotrophin releasing hormone (CRH) test. In consequence, we could measure the concentrations of ACTH, cortisol, cortisone, Aldosterone and Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) by the method of steroid profiling analysis using the LC-MS/MS. In the inflammation group than the control, production of cortisol was promoted during the CRH test. These findings suggest the intrauterine inflammation stress might induce the development of transitional zones where 3-hydroxysteroid dehydrogenase is expressed.

研究分野：胎児生理学

キーワード：胎児 早産児 子宮内炎症 副腎皮質ホルモン CRH負荷試験

1. 研究開始当初の背景

超低出生体重児はその副腎皮質容積の 80% 以上を 3 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性のない胎児層が占めるため、エストロゲン合成能は高いが cortisol 分泌能に乏しく、潜在的に相対的副腎不全の状態にある。そのため出生後の急性期を経て 1-2 週間を過ぎた頃に誘因なく、もしくは慢性肺疾患の増悪期と一致して、カテコラミン抵抗性の低血圧と乏尿に陥りやすい。本邦では晩期循環不全と呼ばれるこの病態はその本質が相対的副腎不全であるため、大多数はグルココルチコイド補充によって速やかに症状が改善する。しかし、著しく未熟な成育限界児で低血圧による脳虚血が遷延すれば、深刻な脳白質損傷が誘導されて脳性麻痺を発症するため、その予防法の開発は周産期新生児医療の大きな課題とされている。

一方、胎生期のどのような子宮内環境が胎児早産児の副腎機能の発達を促進もしくは抑制するのか、その病態生理の解析はまだ端緒についたばかりである。子宮内炎症が早産児の副腎機能を抑制する可能性が報告されているが、その具体的な抑制機構は明らかにされていない。

本研究のように早産前後の cortisol 分泌能を経時的に解析した大型動物実験は国内外において未だ認められない。その最大の理由は早産胎子の肺が著しく未熟であるため人工呼吸器では管理できないことにある。ヒツジ胎子も妊娠 120 日 (ヒト妊娠 32 週相当) 以前では人工呼吸で管理できない。これを克服するためにわれわれはポンプレス人工胎盤装置 (図 1) を開発し、これを装着させることによって初めてヒトの妊娠 32 週以前に相当するヒツジ早産仔を用いた実験が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では早産児副腎機能の発達過程と出生への適応過程を明らかにする。まずこれまでわれわれが開発した子宮内炎症モデルを用いて、出生前の炎症性ストレスが cortisol 分泌能とその循環動態に与える影響を明らかにする。さらに、ヒツジ胎子とその生育限界期に出生させ、胎盤から切離されるストレスがこれらに与える影響も合わせて解析する。

本研究期間には、ニプロ社と共同開発した世界最小容量 (血液充填量 9.0 mL) の膜型人工肺を並列回路で用いることによって、成育限界に近い妊娠 90-100 日 (ヒト妊娠 24-27 週相当) のヒツジ胎子を用いて、その cortisol 分泌能の経時的変化を解析する。

本研究は成育限界で出生する早産児の内分泌学的な適応もしくは適応不全についての基礎研究である。こうした成果を踏まえることによって、出生前の子宮内環境に応じた出生後のグルココルチコイド補充療法を、その病態生理に基づいて具体的に提案することを目的とする。

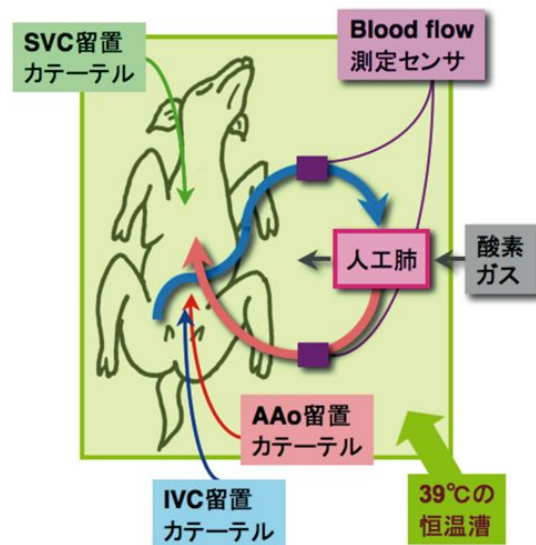


図 1. 人工胎盤システムの概念図

臍帯動脈から脱血した静脈血を膜型人工肺で動脈血化し、胎子心ポンプ駆動で臍帯静脈に返血する。

3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験委員会の承認のもと (2014 医動-219, 2015 医動-209, 2016 医動-235), 2014 年 9 月から 2017 年 3 月に東北大学医学部附属動物実験施設内で実施された。

(1) 慢性実験系の作成

対象として妊娠期間が確定した Suffolk 種ヒツジ胎子を用いた。妊娠 91-95 日 (満期 147 日, ヒトの妊娠 24-25 週に相当) に全身麻酔下に母獣を開腹して子宮を切開し、胎子の頸動脈, 上大静脈, 羊水腔内にカテーテルを留置し、心電図電極を固定した後、胎子を子宮内に戻して閉腹した。以後、胎子動脈圧, 中心静脈圧, 羊水分圧を連続監視してパソコンに記録した。

(2) 出生前の子宮内環境を設定

手術後 48 時間を経て胎子 (n=12) をランダムに 2 群に分けた (対照群, 炎症群; 各 n=6)。炎症群の胎子には手術後 2 日から 5 日間連日で顆粒球コロニー刺激因子 (ノイトロジン®) 50 μ g/日を静注し、手術後 4 日に 1 回だけ羊水腔内にエンドトキシン (*E. coli* 055:B5) 2-20 mg を注入して壊死性の卵膜炎臍帯炎を誘導した。

(3) 人工胎盤による成育限界仔の全身管理

手術後 7 日 (妊娠 98-102 日) に母獣を帝王切開して胎子を娩出させ、胎子の臍帯動静脈に血管カニューレ (8 Fr) を挿入し、ヘパリン化母獣血でプライミングされた膜型人工肺 (膜面積 0.15 m², 充填率 40%, 内空径 220 μ m; ニプロ社と共同開発) に接続した。回路内血液は胎子の心ポンプで駆動させ、ローラー型・遠心型の駆動ポンプは使用しなかった。回路内凝血を予防するため低分子ヘパリンを持続点滴 (活性化凝固時間 >180 秒), 胎児循環を維持させるためにプロスタグランディン E2 製剤を持続点滴

した。

人工胎盤が問題なく作動したことを確認して臍帯を切離した後、胎仔と人工胎盤回路を39℃に加温した恒温槽内の生理食塩水(70 L)に浮遊させた。心拍 140 bpm, 中心静脈圧 5-8 mm Hg, 血圧 60/40 (47) mm Hg, Hb 11 g/dl, Ht 35%を目標に輸血と血管作動薬を用いて循環管理し(回路血流量 100 ml/kg/分を維持), 動脈血で pH 7.40, PaCO₂ 40 torr, PaO₂ 30 torr, glucose 20 mg/dl, lactate <20 mg/dl 前後を維持させた。高カロリー輸液では glucose 20 g/kg/日, アミノ酸 1.0 g/kg/日, 脂肪 1.0 g/kg/日を目安に 150 ml/kg/日の水分量を投与した。血管作動薬による循環サポートは人工胎盤開始 24 時間以内に切り上げた。

(4) 成育限界仔の cortisol 分泌能を評価

CRH 負荷試験による副腎皮質機能の評価
全ての対象胎仔に対して慢性実験系作成手術後3日, 手術後7日(帝王切開前), 人工胎盤開始後 36 時間の計 3 回にわたって CRH 負荷試験を実施した。負荷試験にはヒツジ CRH 静注を妊娠日齢から推測される体重換算で 1.5 μg/kg 量 (=1.5 μg/kg: 臨床投与量) を静注した。負荷前, 15, 30, 60, 120 分後に採血し, ACTH, cortisol, cortisone, Aldosterone, Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-S) の反応性を 2 群間で比較した。

ACTH の測定には, 免疫放射定量測定法(IRMA ACTH Kit; Beckman Coulter, CA, USA)を用いた。またその他のステロイドホルモンの測定には, 液体クロマトグラフ質量分析法(LC-MS/MS; Triple Quad 5500; SCIEX, Massachusetts, USA)を用いた。

成育限界仔の副腎皮質における移行層の成長

人工胎盤開始後 72 時間に胎仔を灌流固定し, 剖検に供して各臓器を摘出した。副腎皮質移行層を抗 3β-ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性抗体で免疫染色陽性の区域と定義し, 胎児層/移行層の容積比を 2 群間で比較する予定である。

4. 研究成果

本研究を開始するにあたり, ACTH 濃度の測定キットが, いずれも入手困難であることが判明した。ヒツジで実績のある血漿 ACTH 測定キット(ACTH-II IRMA kit, Mitsubishi Petrochemical, Tokyo, Japan) は製造中止となった。そのため国内の輸入代理店が取り扱い可能な ACTH 免疫放射定量測定キット(IRMA ACTH Kit; Beckman Coulter, CA, USA) を平成 28 年度から用いて測定を開始した。また液体クロマトグラフ質量分析法(LC-MS/MS; Triple Quad 5500; SCIEX, Massachusetts, USA) を用いた 17 種のステロイドホルモン・プロファイリング解析が平成 28 年度から可能となり測定を開始した。

(1) CRH 負荷試験による副腎皮質機能の評価

子宮内炎症が胎仔「視床下部/下垂体/副腎」軸に与える影響を解析するため, 炎症負荷後に実施した CRH 負荷における血漿 ACTH, cortisol, cortisone, Aldosterone ならびに DHEA-S 濃度の経時変化を, 炎症群(n=6)と対照群(n=6)で比較した。表 1 に両群胎仔の基本データを示した。

表 1. 胎仔の基本データ

	対照群 (n=6)	炎症群 (n=6)
剖検時体重 (kg)	1.09 ± 0.1	1.06 ± 0.1
雄/雌	2/4	3/3
単胎/双胎	6/0	3/3
CRH 負荷日齢	99.5 ± 0.5	99.8 ± 0.7
CRH 量 (μg/kg)	1.5 ± 0.2	1.3 ± 0.2

数値データはいずれも「平均 ± 標準誤差」。

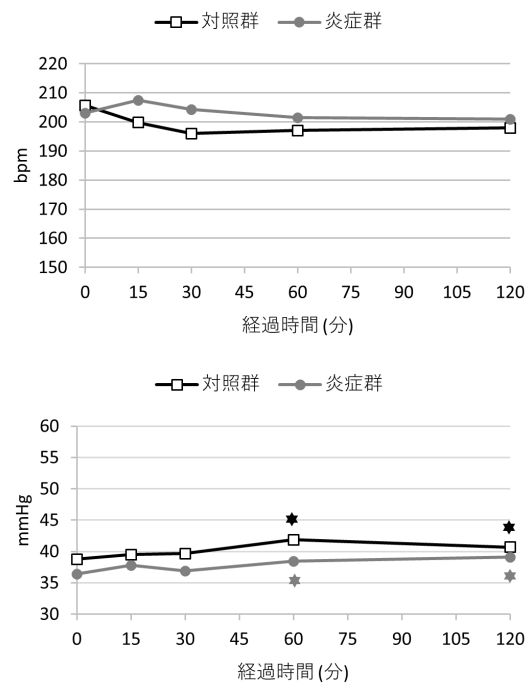


図 2. CRH 負荷後 120 分間の胎仔心拍数と平均動脈圧の経時変化

胎仔心拍数は対照群, 炎症群ともに有意な経時変化は認めなかった。平均動脈圧は両群ともに負荷後 60 分と 120 分で負荷前と比較して有意に上昇した(星印)。両群間の有意差は認めなかった。

図 3 に CRH 負荷後 120 分における対照群 (A, C), 炎症群 (B, D) それぞれの ACTH, cortisol, cortisone, Aldosterone, DHEA-S の経時変化を示す。

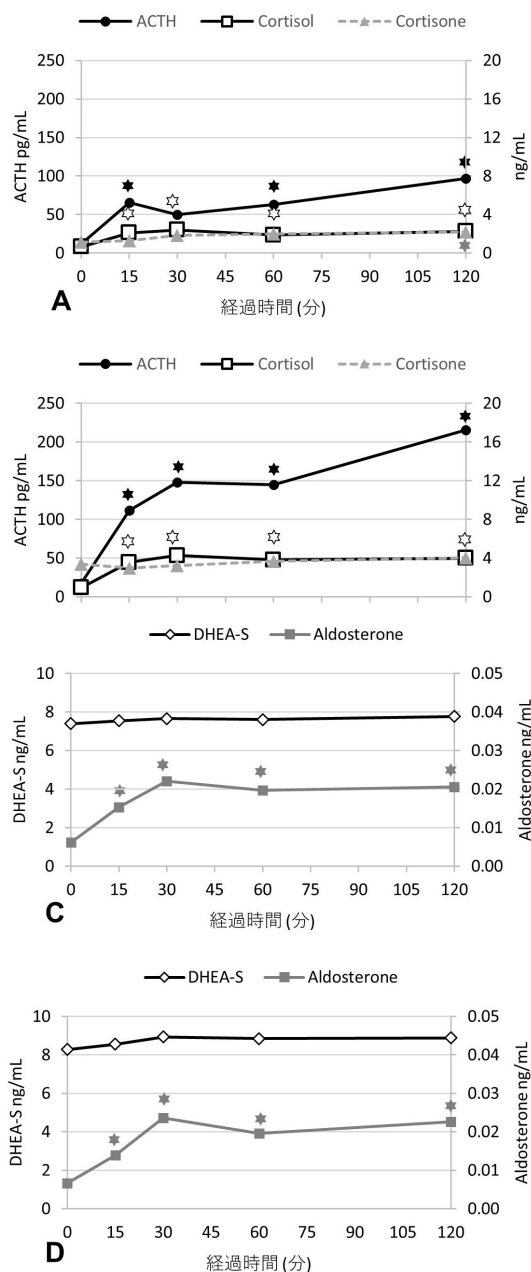


図3. CRH 負荷後 120 分における対照群 (A, C), 炎症群 (B, D) それぞれの ACTH, cortisol, cortisone, Aldosterone, DHEA-S の経時的変化

両群において ACTH, cortisol は CRH 負荷後 15 分から有意に上昇し, 少なくとも 120 分まで高値のまま維持された. 基礎値に差はなかったが, 炎症群の方が ACTH, cortisol は有意に上昇した. 両群において cortisone は有意な経時的変化を認めなかったが, 炎症群において有意に高値であり, 胎盤における 11 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素 型により cortisol が cortisone への変換されたためかもしれない.

Aldosterone は両群ともに CRH 負荷後 15 分から有意に上昇したが, 両群間の経時的変化に差はなく, それぞれの変化は微細であった. 一方で DHEA-S は両群ともに CRH 負荷に対して経時的変化を示さなかった.

以上より対照群と比較して炎症群では, CRH

負荷に対して cortisol を産生するカスケードがより活発となった. これは炎症負荷により, 3 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素の活性が上昇したためかもしれない.

(2) 人工胎盤装着 36 時間後における CRH 負荷試験

表 1 に示した対照群 6 例のうち 3 例, 炎症群 6 例のうち 4 例において人工胎盤装着後に再度 CRH 負荷試験を行い, 検体はすべて凍結保存した. 液体クロマトグラフ質量分析法 を用いたステロイドホルモン・プロファイリング解析が可能となったのが平成 28 年度であり, また測定検体数に限りがあったため, 測定ができたのは炎症群の 1 例のみであった. 今後は残りの検体の解析を進める予定である.

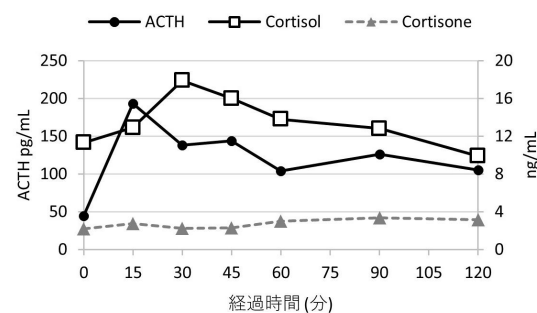


図4. 人工胎盤装着 36 時間後の CRH 負荷における ACTH, cortisol, cortisone の経時的変化 (炎症群, 妊娠 103 日, n=1)

1 例のみであるため検討に値しないが, 子宮内の胎子に行った炎症群と比較して cortisol の基礎値が高値であった. 一方で cortisone は低値であり, これは本来の胎盤における 3 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性がないため, cortisone への代謝が進まないからであると推察された.

(3) 成育限界仔の副腎皮質における移行層の評価

人工胎盤開始後 72 時間に剖検を行い, 還流固定した副腎を全例保存した. 今後は皮質移行層を抗 3 β -ヒドロキシステロイド脱水素酵素活性抗体で免疫染色陽性の区域と定義し, 胎児層/移行層の容積比を 2 群間で比較する予定である. これにより炎症により移行層の成長が促されるかどうかの評価を行う.

(4) 総括

残念ながら平成 26-27 年度には内分泌ホルモン測定ができなかった. しかし液体クロマトグラフ質量分析法 を用いたステロイドホルモン・プロファイリング解析が可能となったため, 今後は本研究期間内に保存した検体の解析を行う予定である. これにより成育限界期の早産児では子宮内でのストレスによって内分泌機能がどのように修飾され, 出生後の適応にどう影響を及ぼすかについて検討が可能となる.

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 3 件)

1. Miura Y, Matsuda T, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Saito M, Hanita T, Kobayashi Y. A parallelized, pumpless artificial placenta system significantly prolonged survival time in a preterm lamb model. *Artif Organs* 2016; 40; E61-8. doi: 10.1111/aor.12656. 査読あり.
2. Hanita T, Matsuda T, Saito M, Kitanishi R, Cho K, Harding R, Kobayashi Y. Potential role of prenatal inflammation in the impairment of lung development following mechanical ventilation of preterm lambs. *Reprod Sci* 2016; 24 (3); 478-87. doi: 10.1177/1933719116660846. 査読あり.
3. Miura Y, Saito M, Usuda H, Woodward E, Rittenschöber-Böhm J, Kannan PS, Musk GC, Matsuda T, Newnham JP, Kemp MW. Ex-Vivo Uterine Environment (EVE) Therapy Induced Limited Fetal Inflammation in a Premature Lamb Model. *PLoS One* 2015; 10: e0140701. doi: 10.1371/journal.pone.0140701. 査読あり.

(学会発表) (計 4 件)

1. Watanabe S, Matsuda T, Usuda H, Kitanishi R, Saito M, Hanita T, Kobayashi Y. The redistribution of cardiac output by vasopressin infusion in the premature fetal sheep. *43rd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2016* (Cambridge, UK); Sep 17-20, 2016.
2. Hanita T, Matsuda T, Usuda H, Kitanishi R, Saito M, Watanabe S, Kobayashi Y. Magnetic resonance imaging is useful for detecting acute phase of cerebral white matter injury in preterm ovine foetus. *43rd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2016* (Cambridge, UK); Sep 17-20, 2016.
3. Hanita T, Matsuda T, Miura Y, Usuda H, Watanabe T, Kitanishi R, Saito M, Kobayashi Y. A parallelized, pumpless artificial placenta system significantly prolonged survival time in preterm ovine fetus. *42nd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2015* (Vancouver, Canada); Aug 9-12, 2015.
4. Saito M, Matsuda T, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Hanita T, Yaegashi N. The reaction of fetal cortisol against intra-uterine inflammation and fetal circulatory insufficiency in fetal sheep. *Society for Reproductive Investigation 62nd Annual Scientific Meeting* (San Francisco, CA, USA); March 25-28, 2015.

(図書) (計 0 件)

(産業財産権)

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

(その他)

<http://www.ped.med.tohoku.ac.jp/newborn/lineup/uwa.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北西 龍太(KITANISHI, RYUTA)
東北大学・病院・助手
研究者番号:20436116

(2) 研究分担者

松田 直(MATSUDA, TADASHI)
東北大学・病院・准教授
研究者番号:50361100

齋藤 昌利(SAITO, MASATOSHI)
東北大学・病院・講師
研究者番号:00451584

埴田 卓志(HANITA, TAKUSHI)
東北大学・病院・助手
研究者番号:30400360