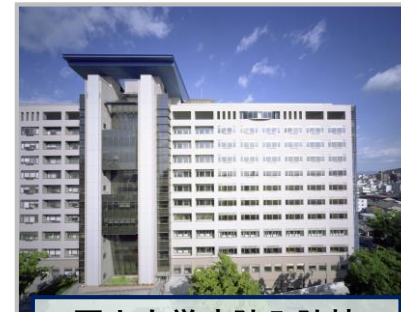


# 専攻医教育プログラム3「周産期」 新生児医療における酸化ストレス制御の意義



岡山大学病院外来診療棟



岡山大学病院入院棟



Junko Fukutake ホール

筆頭発表者のCOI開示: 発表演題に関連し、開示すべきCOI関係にある企業などはありません

# 新型コロナウイルス感染症から命を救う

COVID-19

岡山大学の取り組み

岡山大学では新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の臨床研究を推進し、治療薬・ワクチンの早期開発が期待される中、岡山大学（岡山市北区肥田町）はこれまでの基礎研究から、既存の腎薬「テブレノン」に新型コロナウイルス肺炎の重症化を抑制する効果があると推定し、5月から臨床試験に着手。岡山大学病院（岡）は中国の「最後の砦」として、岡山県内の総合病院と連携体制を構築するなど対策に万全を期している。岡大医歯薬学総合研究科の塚原宏一教授（岡山大学病院副院長・医療安全管理担当）と前田嘉信教授（岡・研究担当）に取り組みを聞いた。



腎薬「テブレノン」の臨床試験

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は完全な終息の見通しが立たず、予断を許さない。治療薬・ワクチンの早期開発が期待される中、岡山大学（岡山市北区肥田町）はこれまでの基礎研究から、既存の腎薬「テブレノン」に新型コロナウイルス肺炎の重症化を抑制する効果があると推定し、5月から臨床試験に着手。岡山大学病院（岡）は中国の「最後の砦」として、岡山県内の総合病院と連携体制を構築するなど対策に万全を期している。岡大医歯薬学総合研究科の塚原宏一教授（岡山大学病院副院長・医療安全管理担当）と前田嘉信教授（岡・研究担当）に取り組みを聞いた。

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は完全な終息の見通しが立たず、予断を許さない。治療薬・ワクチンの早期開発が期待される中、岡山大学（岡山市北区肥田町）はこれまでの基礎研究から、既存の腎薬「テブレノン」に新型コロナウイルス肺炎の重症化を抑制する効果があると推定し、5月から臨床試験に着手。岡山大学病院（岡）は中国の「最後の砦」として、岡山県内の総合病院と連携体制を構築するなど対策に万全を期している。岡大医歯薬学総合研究科の塚原宏一教授（岡山大学病院副院長・医療安全管理担当）と前田嘉信教授（岡・研究担当）に取り組みを聞いた。

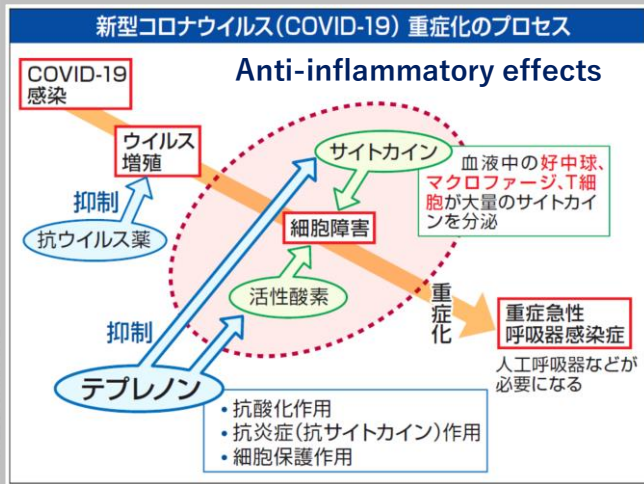
## 県内病院と連携、役割分担



岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 小児慶科学 塚原 宏一 教授

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）は完全な終息の見通しが立たず、予断を許さない。治療薬・ワクチンの早期開発が期待される中、岡山大学（岡山市北区肥田町）はこれまでの基礎研究から、既存の腎薬「テブレノン」に新型コロナウイルス肺炎の重症化を抑制する効果があると推定し、5月から臨床試験に着手。岡山大学病院（岡）は中国の「最後の砦」として、岡山県内の総合病院と連携体制を構築するなど対策に万全を期している。岡大医歯薬学総合研究科の塚原宏一教授（岡山大学病院副院長・医療安全管理担当）と前田嘉信教授（岡・研究担当）に取り組みを聞いた。

## 肺炎の重症化抑制に有効か



オリーブビーチ（小豆島 四国側）



小豆島にて、日本の本格的なオリーブ栽培が開始された

StatinsのPleiotropic effects に期待

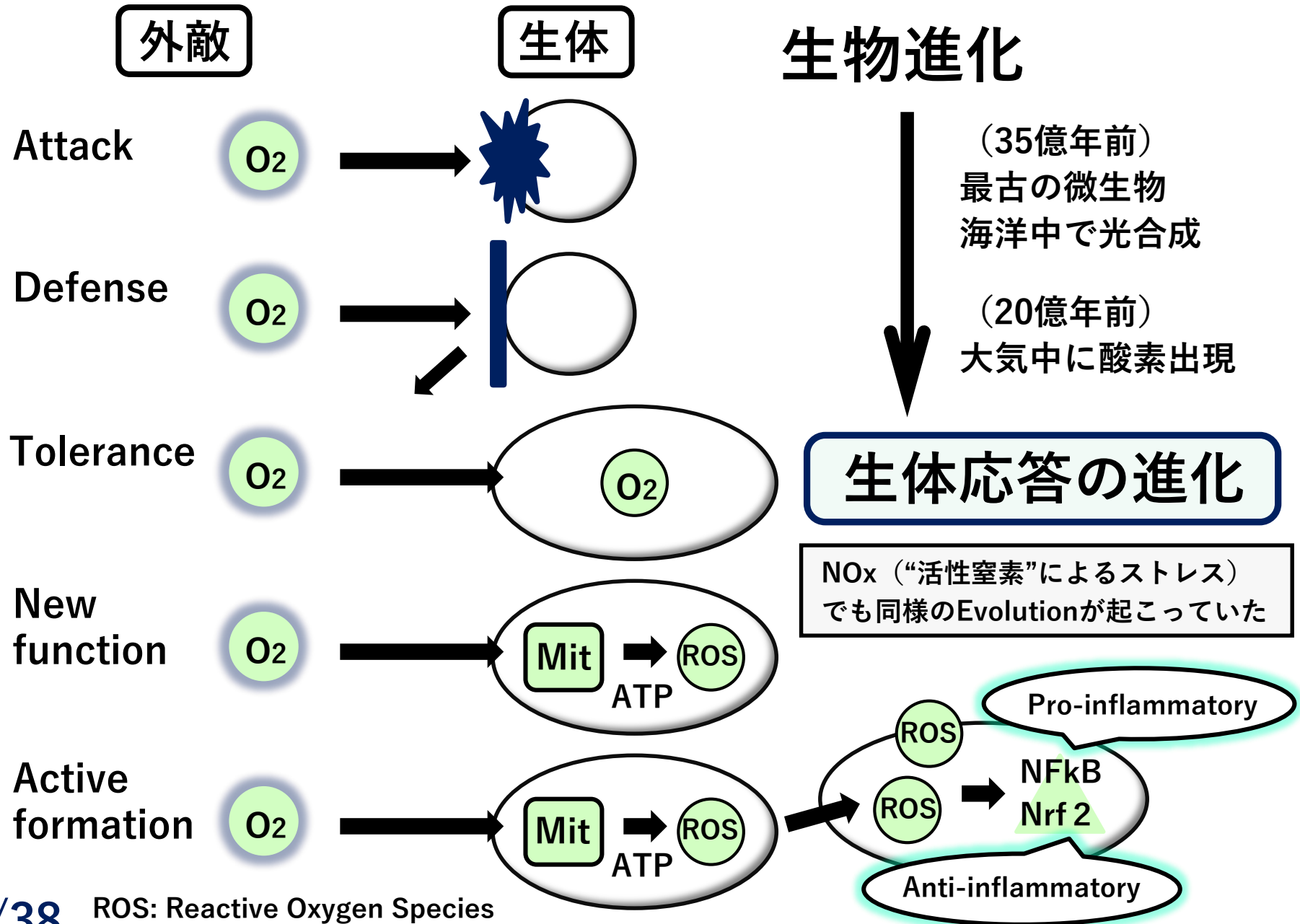


これらにおいても、酸化ストレスマーカーが橋渡しになります

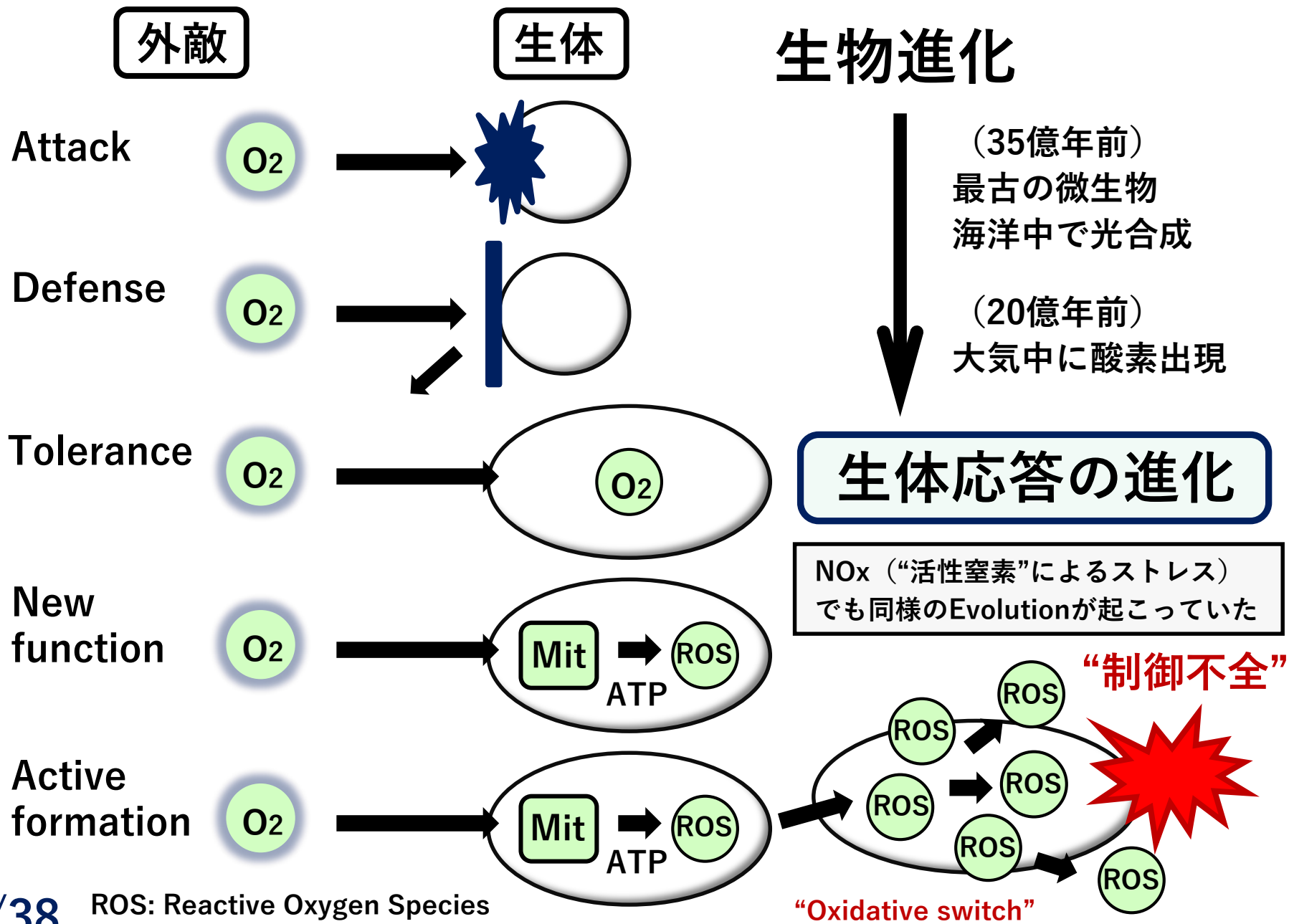
## 新型コロナワクチン・治療薬開発 寄付口座

「新型コロナワクチン・治療薬開発寄付口座」は、新型コロナウイルス感染症拡大防止に向け、ワクチン・治療薬の開発等を行っている大学の支援を目的とした寄付口座です。岡山大学の取り組みにも寄付することができます。

2020年7月 山陽新聞







# 酸化ストレスと細胞内シグナル伝達

- ・ミトコンドリア電子伝達系
- ・NADPHオキシダーゼ
- ・キサンチンオキシダーゼ
- ・リポオキシゲナーゼ
- ・NO合成酵素



ROSシグナル (NOも含む)

“Oxidative switch” “Metabolic shift”

“Oxygen Paradox”

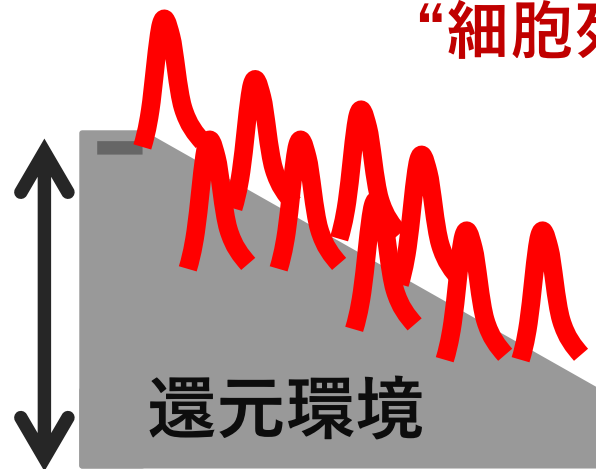
“細胞死”

**生理作用**

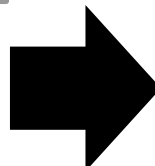
- ◎ 転写制御
- ◎ 酵素・蛋白活性
- ◎ 受容体機能
- ◎ チャネル機能
- ◎ エネルギー産生
- ◎ 細胞周期
- .....



相同



Paradoxも相同



Calciumシグナル

“Calcium Paradox”

“細胞死”



“Oxidative/nitrative switch”

“硝酸”のような強い酸化性を担う

こちらは、酸化・ニトロ化のイメージです

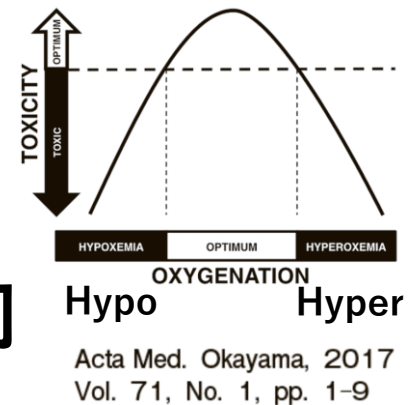
銅

硝酸



# 専攻医教育プログラム3「周産期」 新生児医療における酸化ストレス制御の意義

- ① 活性酸素 (活性窒素を含む)
- ② 酸化ストレスマーカー
- ③ 新生児疾患と酸化ストレス制御
- ④ 母乳の生体作用 (TRX-1) など

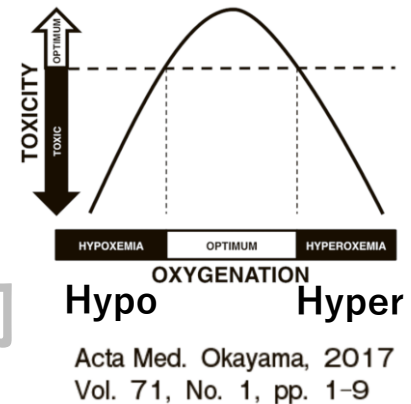


「21世紀出生時縦断調査を利用した様々な環境要因の小児の健康・成長・発達への影響評価」  
(責任研究者: 岡山大学大学院疫学衛生学分野 頼藤貴志教授) より

- ・ 2001年1月10日～17日および7月10日～17日、2010年5月10日～24日に出生した子どもと家族を対象に、厚生労働省によって実施された。約85,000人から回答を得て、2001年出生児は第15回目まで、2010年出生児は第6回目までの追跡が終了している。
- ・ 今回は「食物アレルギー」「川崎病」について紹介する。

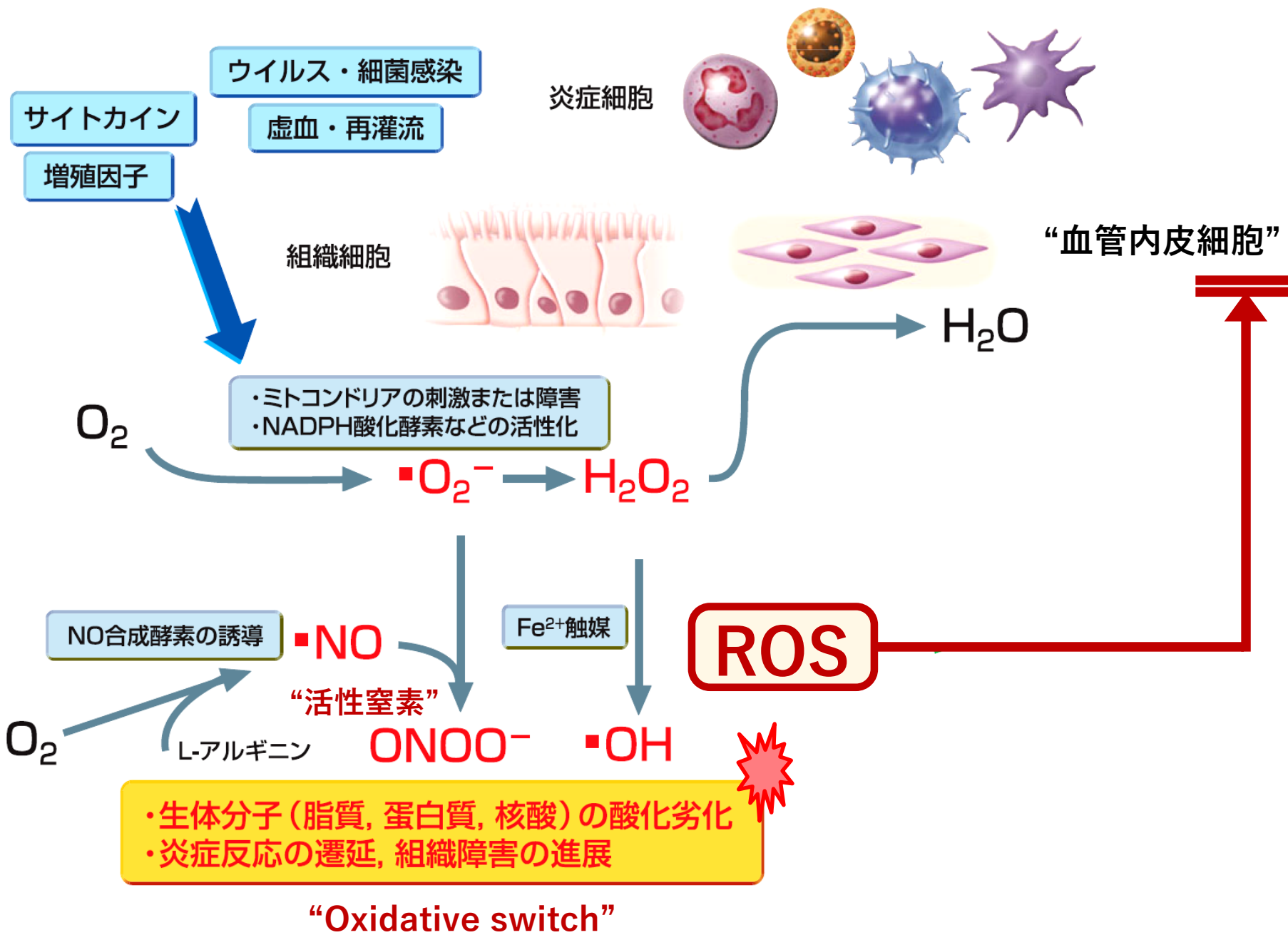
# 専攻医教育プログラム3「周産期」新生児医療における酸化ストレス制御の意義

- ① 活性酸素 (活性窒素を含む)
- ② 酸化ストレスマーカー
- ③ 新生児疾患と酸化ストレス制御
- ④ 母乳の生体作用 (TRX-1) など

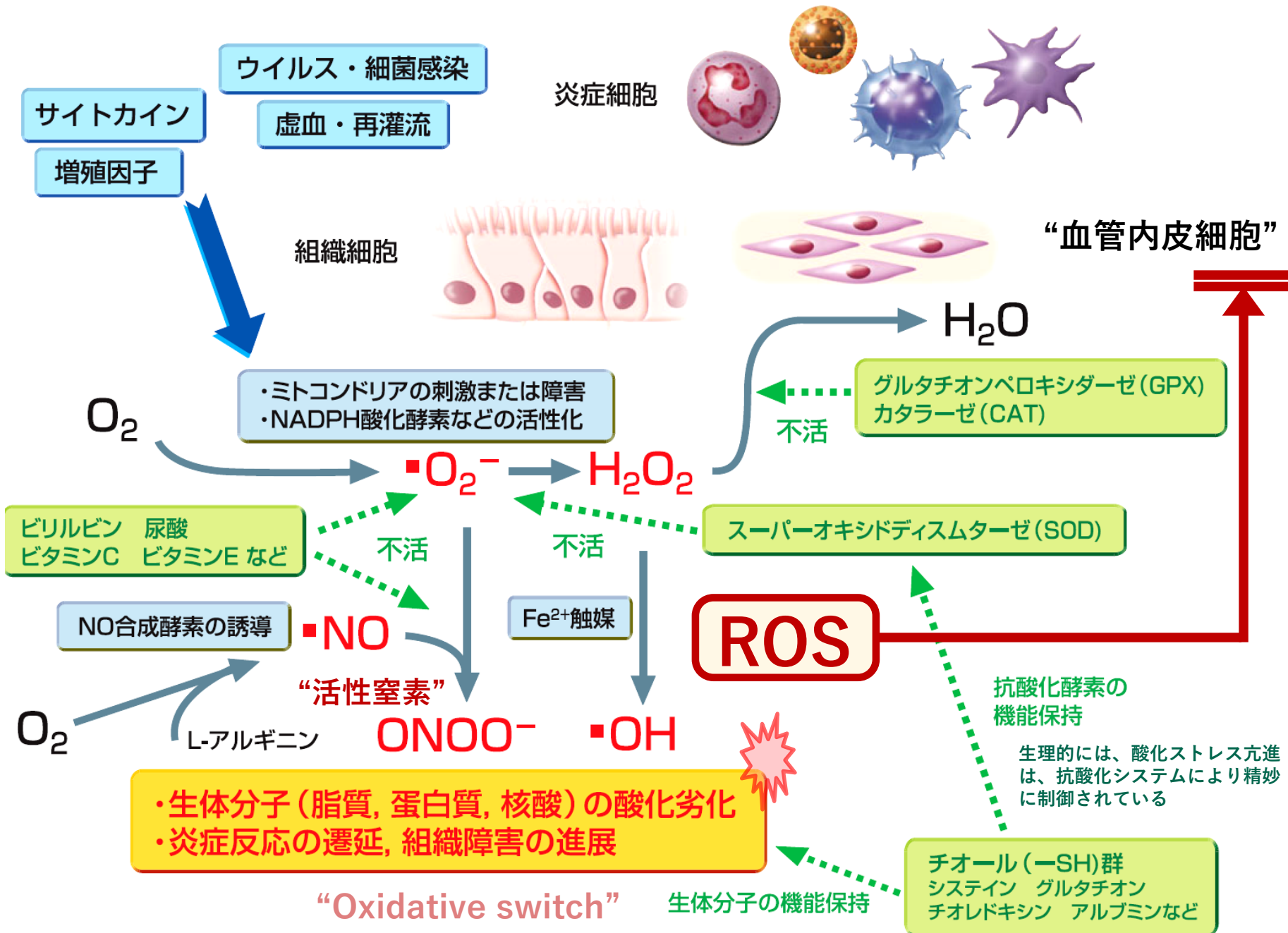


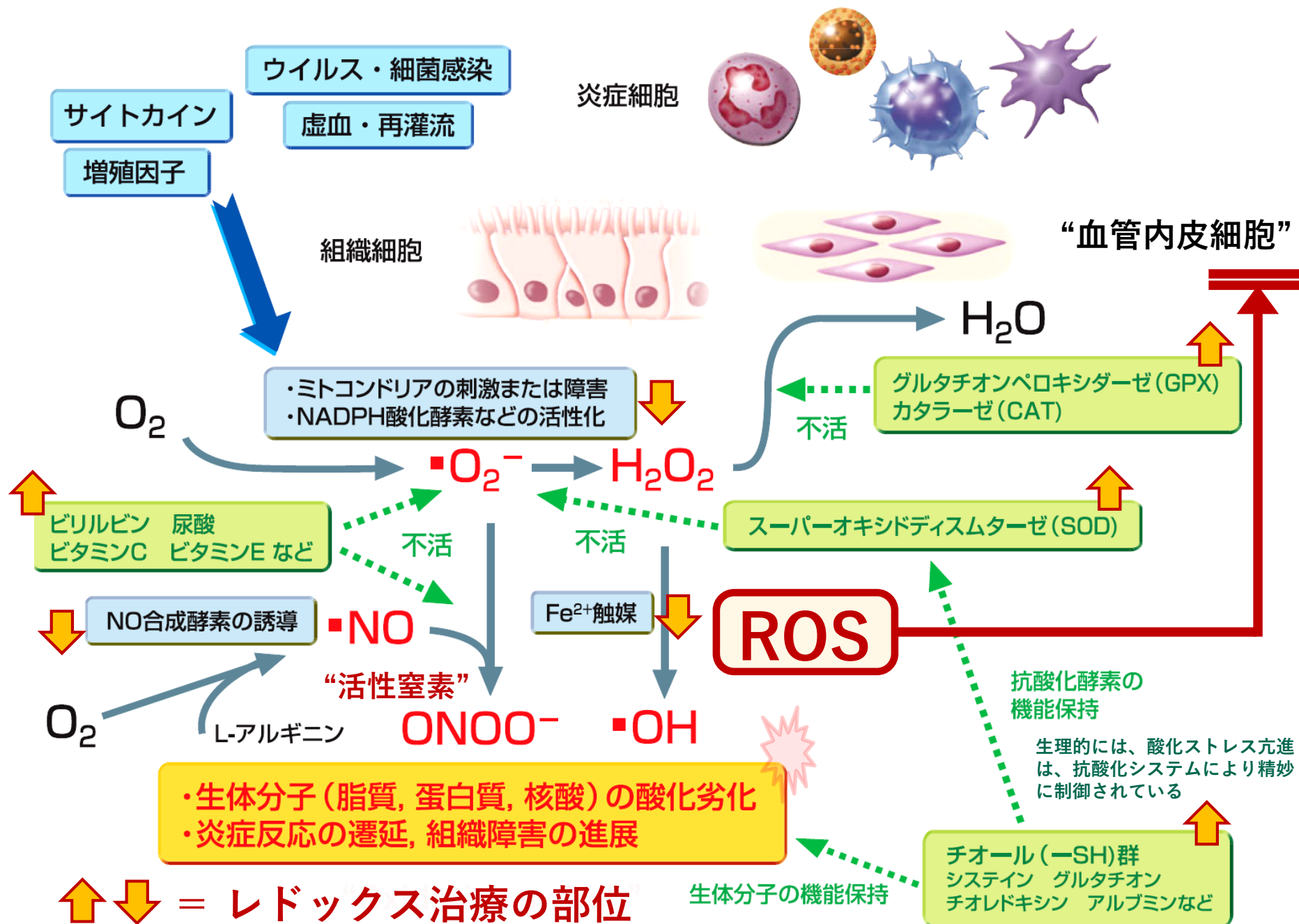
「21世紀出生時縦断調査を利用した様々な環境要因の小児の健康・成長・発達への影響評価」  
(責任研究者: 岡山大学大学院疫学衛生学分野 頼藤貴志教授) より

- ・ 2001年1月10日～17日および7月10日～17日、2010年5月10日～24日に出生した子どもと家族を対象に、厚生労働省によって実施された。約85,000人から回答を得て、2001年出生児は第15回目まで、2010年出生児は第6回目までの追跡が終了している。
- ・ 今回は「食物アレルギー」「川崎病」について紹介する。









テーマ

# 酸化ストレスと酸化ストレスマーカーの知識

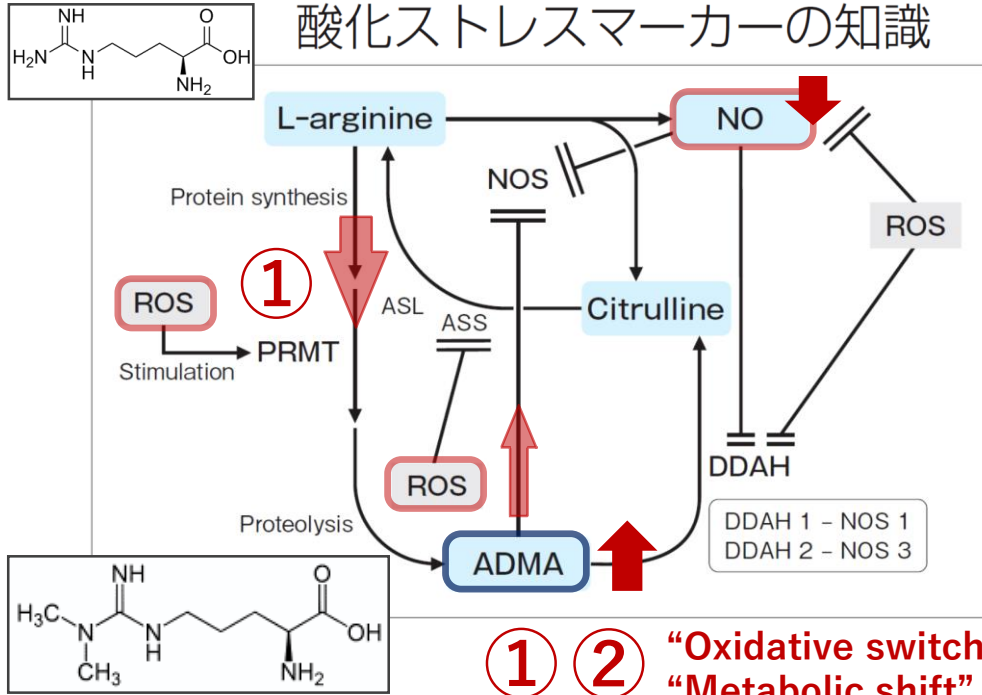


図 6 Arginine-asymmetric dimethylarginine (ADMA)- dimethylaminohydrolase (DDAH) 経路

ASS : argininosuccinate synthetase, ASL : argininosuccinate lyase.

図 7 Arginine を中心とする代謝ネットワーク

a : 生理的狀態では血管、腎臓などでの citrulline-arginine recycling により arginine が citrulline より再生され、血管内皮細胞はこの経路を利用して NO 合成を維持できる。

b : 炎症病態（酸化ストレス亢進状態）では arginase が血管、マクロファージなど多くの細胞で誘導され，“arginine steal phenomenon” により血管内皮由来の NO 合成は低下する。

OTC : ornithine transcarbamylase, ASS : argininosuccinate synthetase, ASL : argininosuccinate lyase.

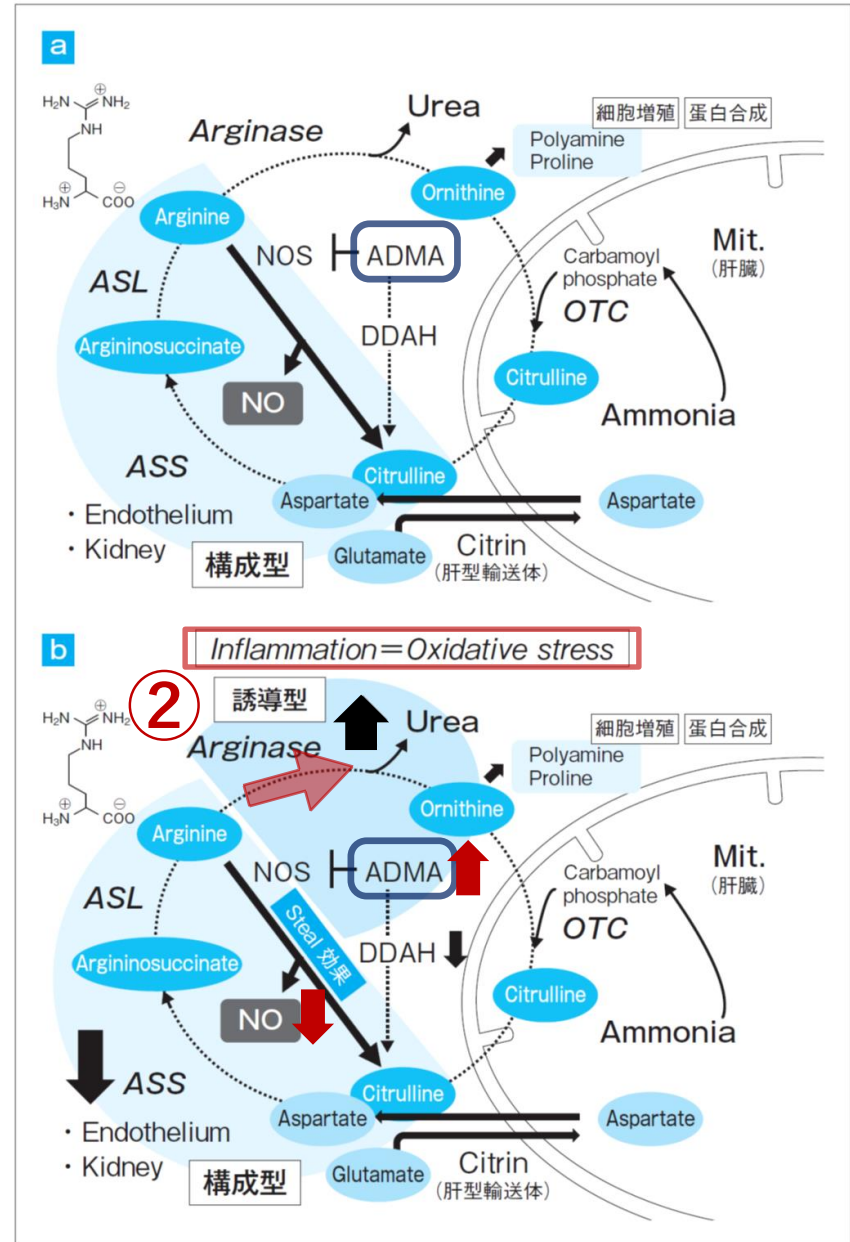




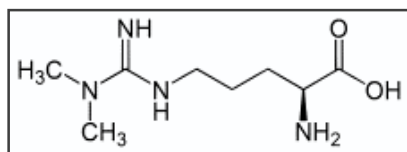
表 1 Asymmetric dimethylarginine (ADMA) 増加が発症と進展に関与するとされる疾患や病態

- Aging/senescence (加齢/老化)
- Salt intake/high blood pressure (塩分摂取/高血圧)
- Hypercholesterolemia (高コレステロール血症)
- Hypertriglyceridemia (高トリグリセリド血症)
- Hyperhomocysteinemia (高ホモシステイン血症)
- Insulin resistance/hyperglycemia (インスリン抵抗性/高血糖)
- Essential hypertension (本態性高血圧)
- Pulmonary hypertension (肺高血圧)
- Coronary heart disease/heart failure (冠状動脈性心疾患/心不全)
- Vascular disease/stroke (血管性疾患/脳卒中)
- Hepatic disease/hepatic failure (肝臓病/肝不全)
- Renal disease/renal failure (腎臓病/腎不全)
- Multiorgan failure (多臓器不全)
- Preeclampsia (妊娠高血圧症)
- Diabetes mellitus (糖尿病)
- Hyperthyroidism (甲状腺機能亢進症)
- Infection (感染症)

酸化ニトロ化・組織変性



ADMA



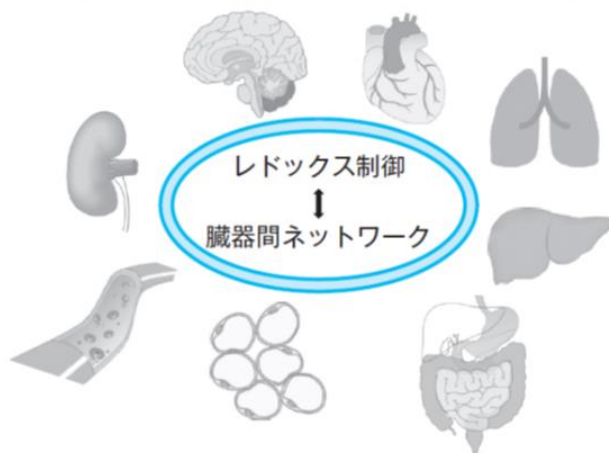
血管障害・血栓塞栓

両者のmediator/marker

ELISAで計測可能

a

臓器間ネットワークによる恒常性維持



b

臓器間ネットワークのゆらぎ~みだれ

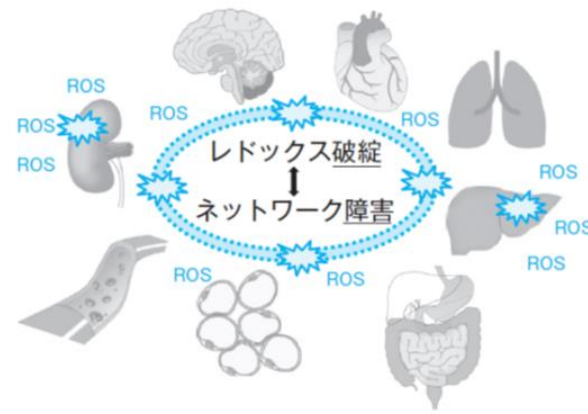


図 1 レドックス制御と臓器ネットワーク

a : 生体は多くの抗酸化酵素、抗酸化物質を有している。抗酸化酵素として superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase が、抗酸化物質として glutathione, thioredoxin などがあげられる。肝臓、腎臓などの臓器ではこれらの抗酸化因子の含量が多い。

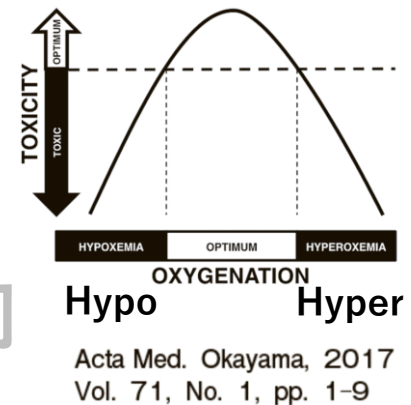
b : 生体は臓器ネットワークを使って酸化ストレス亢進に対処するが、酸化ストレスが過剰か多発的な場合には臓器機能が低下することがある。

ROS=reactive oxygen species.



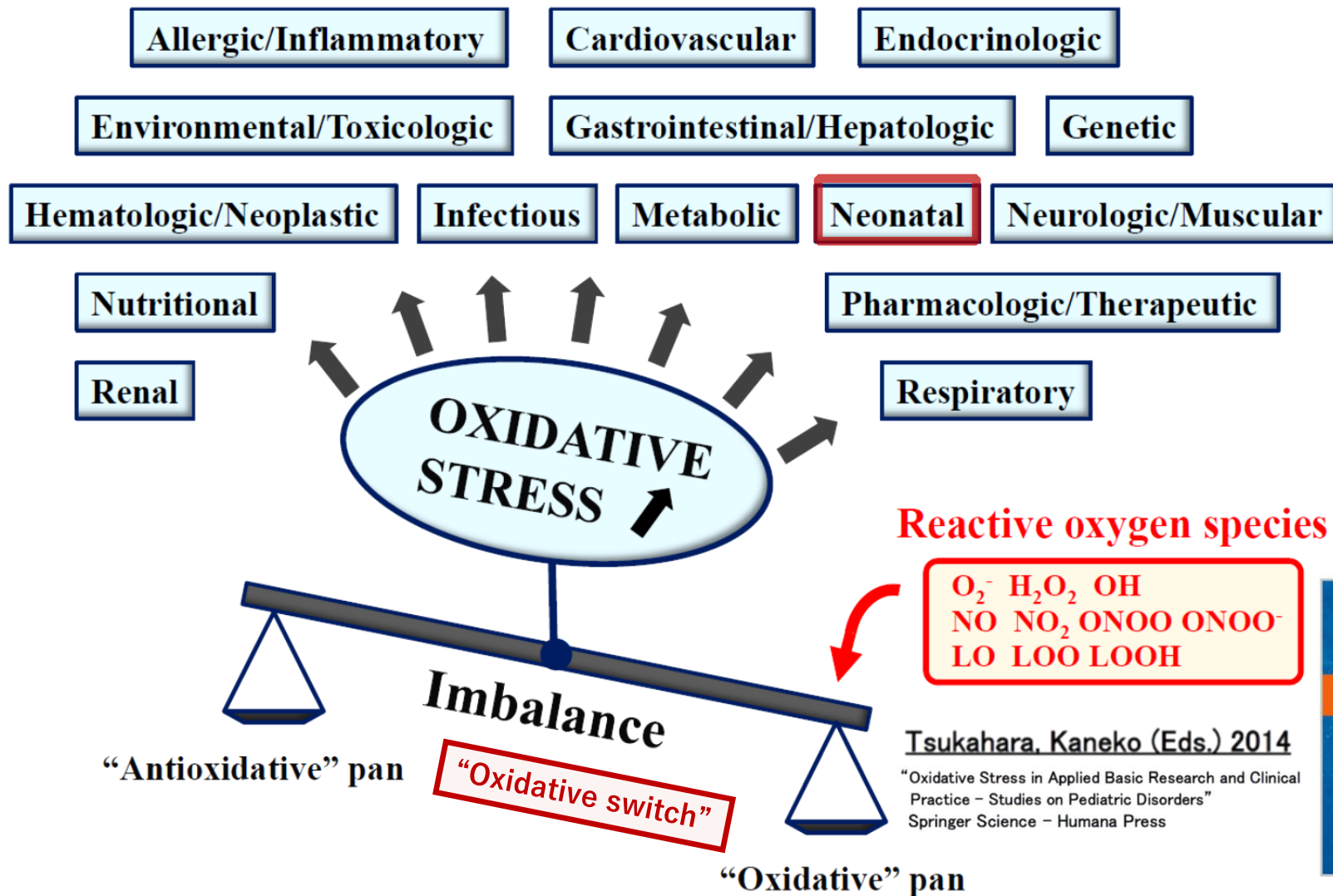
# 専攻医教育プログラム3「周産期」 新生児医療における酸化ストレス制御の意義

- ① 活性酸素 (活性窒素を含む)
- ② 酸化ストレスマーカー
- ③ 新生児疾患と酸化ストレス制御
- ④ 母乳の生体作用 (TRX-1) など



「21世紀出生時縦断調査を利用した様々な環境要因の小児の健康・成長・発達への影響評価」  
(責任研究者: 岡山大学大学院疫学衛生学分野 頼藤貴志教授) より

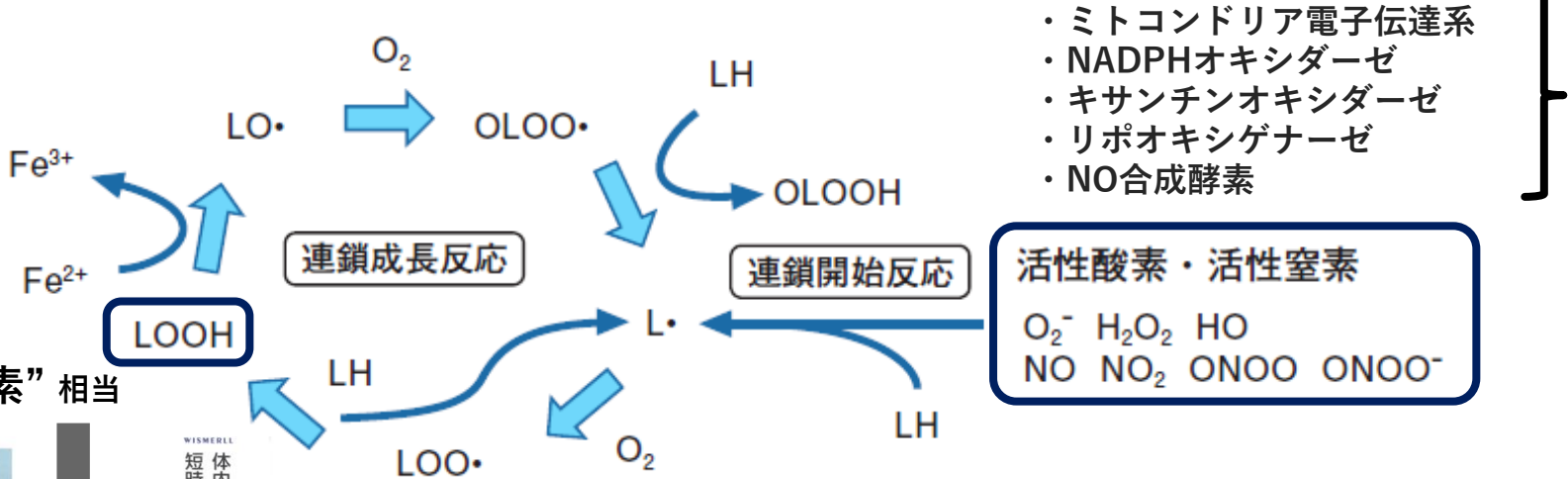
- ・ 2001年1月10日～17日および7月10日～17日、2010年5月10日～24日に出生した子どもと家族を対象に、厚生労働省によって実施された。約85,000人から回答を得て、2001年出生児は第15回目まで、2010年出生児は第6回目までの追跡が終了している。
- ・ 今回は「食物アレルギー」「川崎病」について紹介する。



名称	記号	説明
脂質 (Lipid)	LH	酸化していない脂質
脂質ラジカル (Lipid radical)	L•	脂質より1水素が離れたもの (酸化されたもの)
脂質アルコキシルラジカル (Lipid alkoxyl radical)	LO•	脂質ラジカルに1酸素がついたもの
脂質ペルオキシルラジカル (Lipid peroxy radical)	LOO•	脂質ラジカルに2酸素がついたもの (-O-O-はペルオキシド結合という)
脂質ヒドロペルオキシド (Lipid hydroperoxide)	LOOH	上記の脂質ラジカルより安定で、反応性もあまり高くない

★ 過酸化脂質 (lipid peroxide) とは脂質 (おもに不飽和脂肪酸) が酸化したものである。“活性酸素” の1種である。

L: 脂質の本体; O: 酸素; H: 水素; •: 不対電子 (不対電子が1つあるものをフリーラジカルという)



代表的な過酸化脂質、および、連鎖的脂質過酸化反応

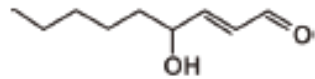
**FRAS 4**  
血清 (血漿) 20  $\mu$ l

“迅速検査”  
“Point of Care対応”



# 代表的な酸化ストレスマーカー

## Lipid oxidation



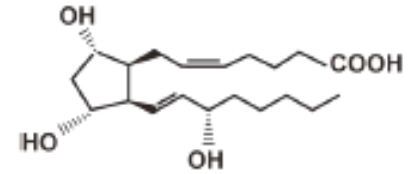
4-Hydroxy-2-nonenal



Malondialdehyde



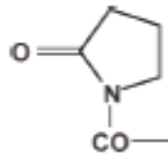
Acrolein



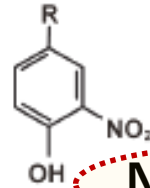
F2-isoprostane

F2-isoP

## Protein oxidation



2-Pyrrolidone

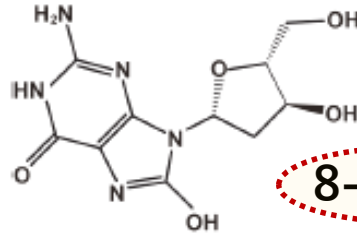


3-Nitrotyrosine

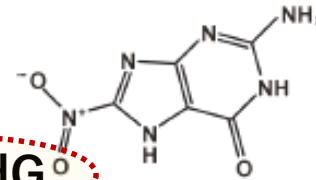
N-tyrosine

○ = 重要なマーカー

## DNA oxidation



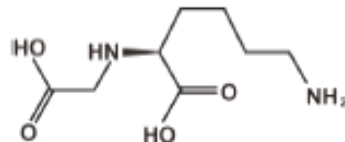
8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine



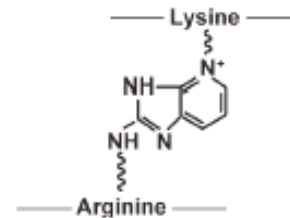
8-Nitroguanine

- LC-MS
- HPLC
- ELISA ⇒ “迅速検査”
- Spectroanalysis ⇒ “迅速検査”

## Glycooxidation



Carboxymethyllysine

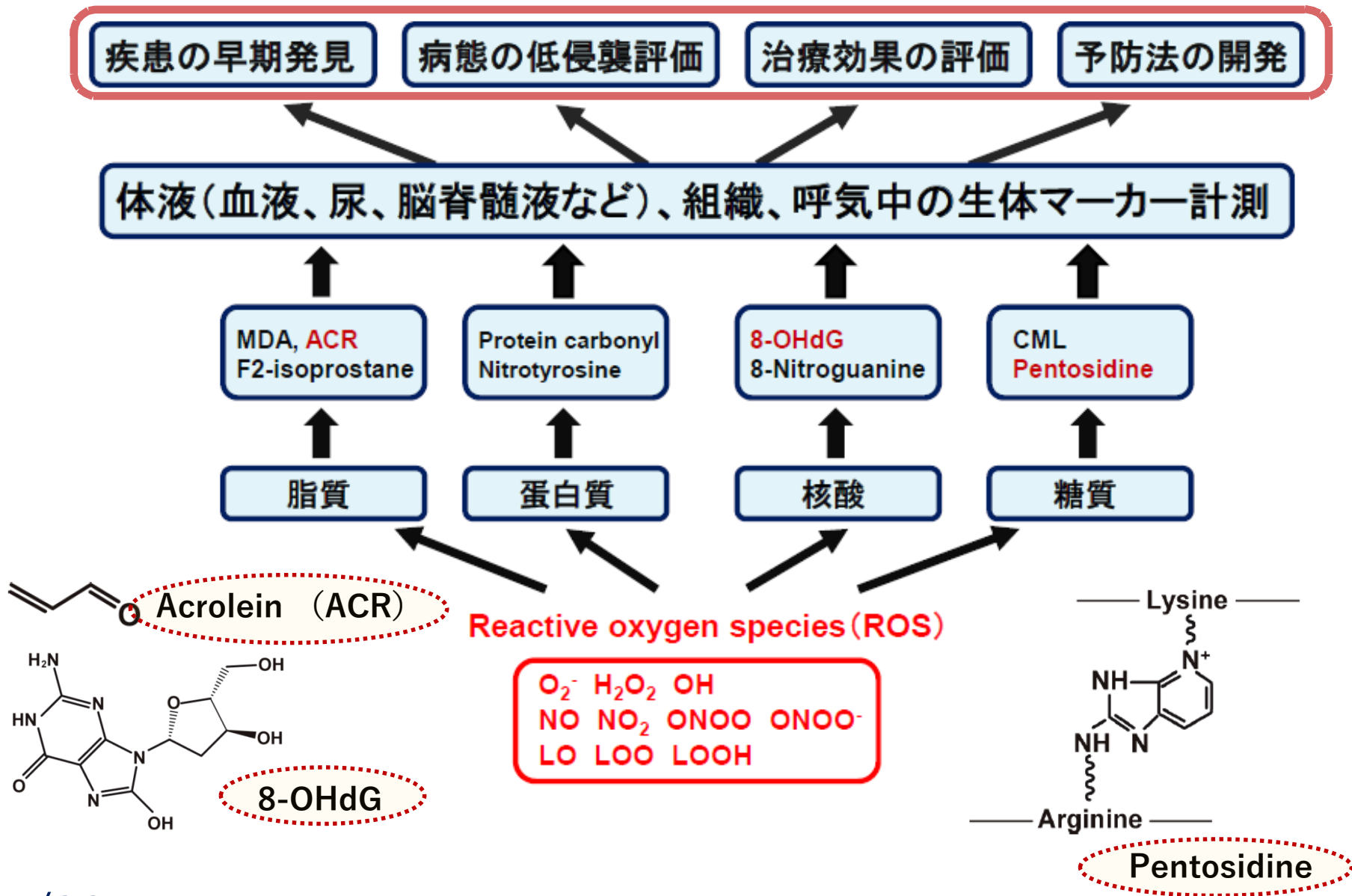


Pentosidine

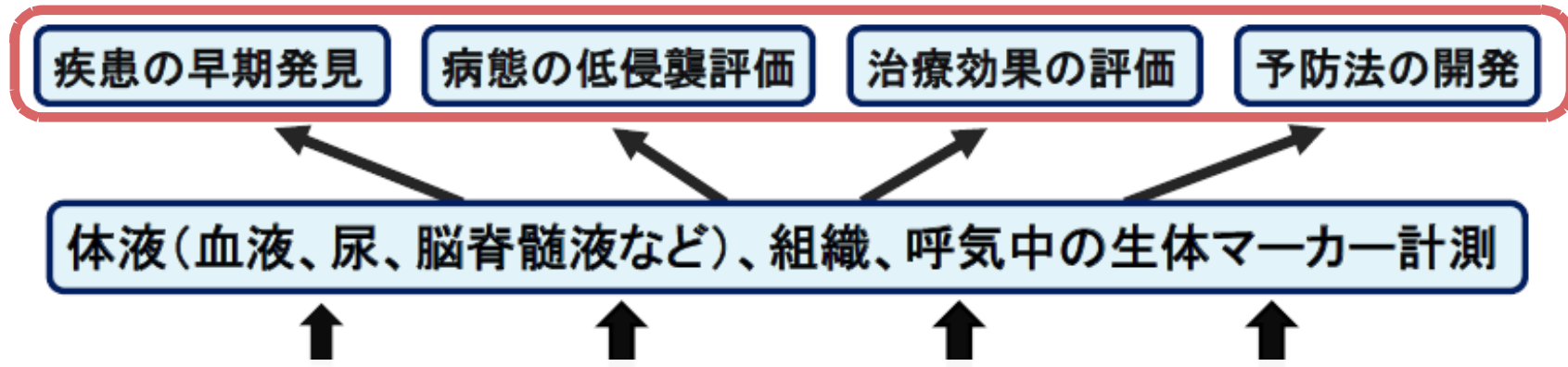
Pentosidine



# 酸化ストレスマーカーの臨床医学的意義



# 酸化ストレスマーカーの臨床医学的意義



## 「抗酸化薬」臨床応用のための5つの必要条件

1. 細胞・組織・臓器で抗酸化性
2. 疾患（ヒト）で酸化ストレス関与
3. 疾患（動物モデル）で有効性
4. ヒトで使用実績
5. ヒトで臨床試験

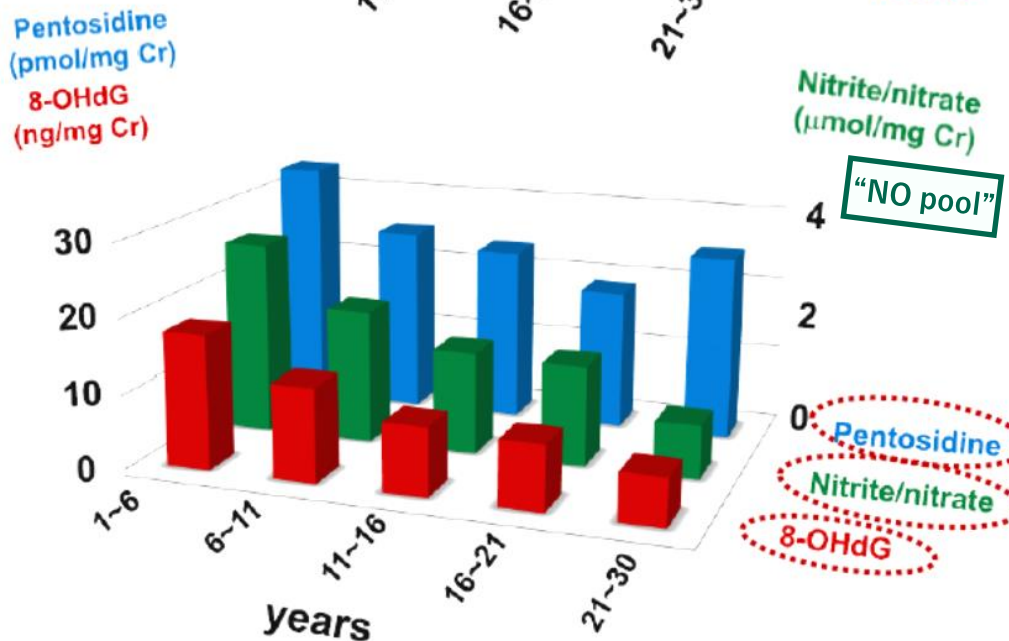
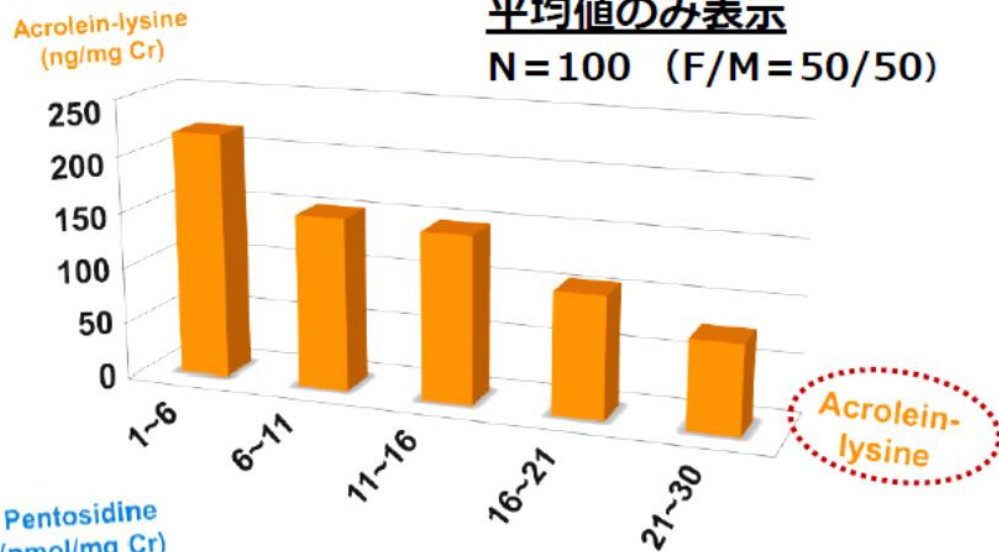
酸化ストレスマーカーが橋渡しになります

・ Medical Technology 2020. 酸化ストレスと酸化ストレスマーカーの知識.  
・ 日本小児科学会雑誌 2017. 酸化ストレス制御と小児疾患治療.

# 尿中マーカーの基準値の設定

平均値のみ表示

N=100 (F/M=50/50)



Ref. Tamura S, Tsukahara H, et al.  
Evaluation of a urinary multi-parameter biomarker set for oxidative stress in children. (Free Radic Res 2006)

早産呼吸障害児 (急性期 & 慢性期)

Biol Neonate 1997; Early Hum Dev 1997;  
Life Sci 2004

川崎病

Scand J Clin Lab Invest 1997

アトピー性皮膚炎 (急性期 & 慢性期)

Life Sci 2001; Life Sci 2003; Metabolism 2003

1型糖尿病

Pediatr Res 2003; Pediatr Int 2006

シトリン欠損症

Mol Genet Metab 2009

門脈体循環シャント

Metabolism 2010

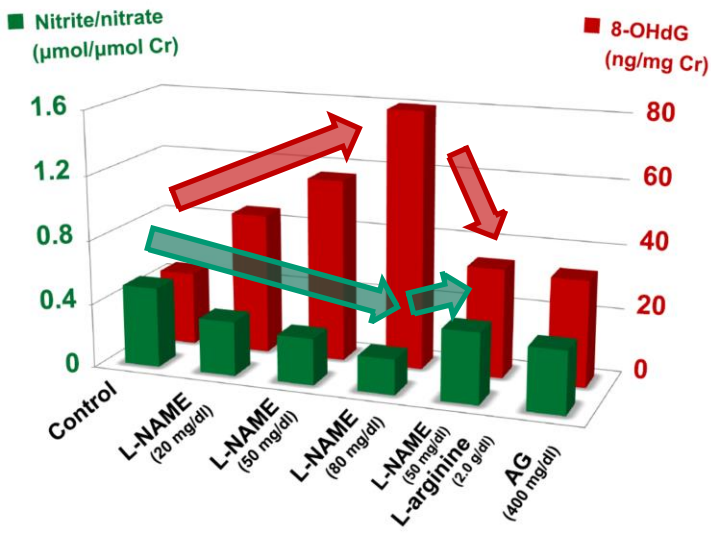
フェニルケトン尿症

Mol Genet Metab 2011

広汎性発達障害

Redox Report 2011

“Oxidative switch”



ラットへのL-NAME (4週間) 投与は、8-OHdG排泄を増加させる

Effects of chronic NO blockade on oxidative stress status in young rats

Oral administration of L-NAME (20, 50 and 80 mg/dl of drinking water), but not AG (400 mg/dl), for 4 weeks induced systemic hypertension and a significant reduction in urinary excretion of nitrite/nitrate. Rats treated with L-NAME also showed a significant increase in urinary 8-OHdG excretion compared with the control animals. The above effects were dependent on the dosage of L-NAME. The effects of L-NAME (50 mg/dl) on blood pressure and urinary nitrite/nitrate and 8-OHdG were restored by a large dose of L-arginine (2.0 g/dl), a precursor for nitric oxide synthesis. (Tsukahara H, et al. Redox Report 2000)

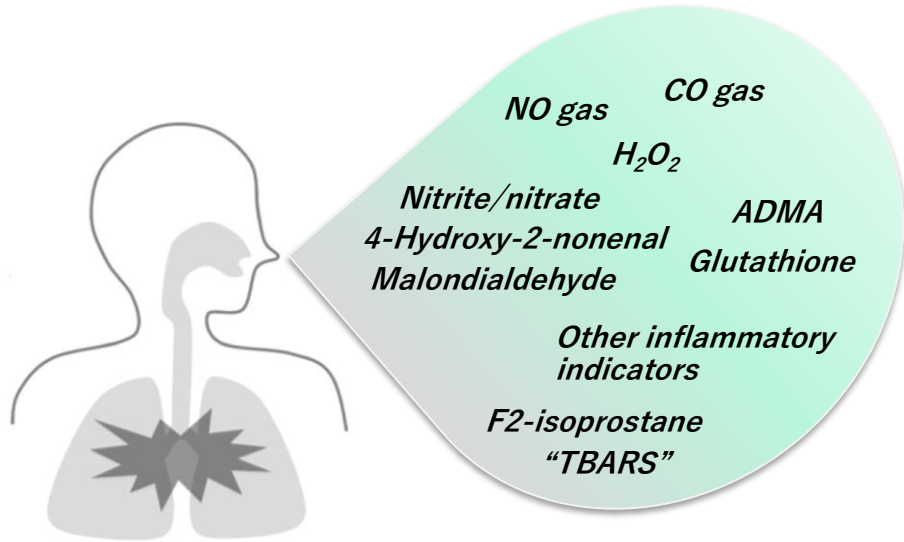


Table 1. Oxidative stress biomarkers of two categories

(a) Formation of modified molecules by reactive oxygen species

Lipid peroxidation:

- 4-Hydroxy-2-nonenal-lysine
- Malondialdehyde-lysine
- Acrolein-lysine
- Hexanoyl-lysine
- 1,4-Dihydroxynonane-mercapturic acid
- F2-isoprostane
- Lipid peroxide

Oxidative DNA damage:

- 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine
- 8-Nitroguanine

Glycoxidation:

- Carboxymethyl-lysine
- Pentosidine
- Argpyrimidine
- Methylglyoxal
- Advanced glycation endproducts

Nitro-oxidation:

- 3-Nitrotyrosine
- Nitrite/nitrate

Others:

- Hydrogen peroxide
- o,o'*-Dityrosine
- ortho*-Tyrosine
- 2-Pyrolidone
- Ischemia-modified albumin
- Protein carbonyls
- Advanced oxidation protein products
- Bilirubin oxidative metabolites
- Dehydroascorbate
- Oxidized glutathione
- Oxidized low-density lipoprotein
- Conjugated diene
- "Thiobarbituric acid reactive substances"

(b) Antioxidative enzymes and molecules

Enzymes:

- Superoxide dismutase
- Catalase
- Glutathione peroxidase
- Glutathione reductase
- Glutathione-S-transferase
- Thioredoxin reductase
- Heme oxygenase
- Arylesterase
- Paraoxonase

Proteins:

- Albumin
- Ferritin
- Transferrin
- Lactoferrin
- Ceruloplasmin
- Thioredoxin
- Peroxidoxin
- L-type fatty acid binding protein

Low-molecular-weight molecules:

- Bilirubin
- Ascorbate
- Tocopherols
- Carotenoids
- Ubiquinol/ubiquinone (coenzyme Q<sub>10</sub>)
- Retinol
- Folate
- Cysteine
- Glutathione
- Polyphenols
- Nitrite/nitrate
- Urate
- Selenium
- Zinc
- Carbon monoxide

Others:

- "Total antioxidative capacity"
- "Total radical trapping antioxidative potential"
- "Biological antioxidative potential"



Total hydroperoxides

Nitric oxide behaves either as a prooxidant or as an antioxidant according to its environment. Therefore, its stable metabolites, nitrite/nitrate, is listed in both categories (A) and (B).

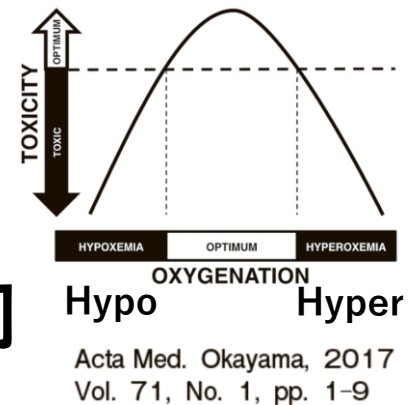
酸化・ニトロ化変性      抗酸化酵素・分子

すべてが「酸化ストレスマーカー」



# 専攻医教育プログラム3「周産期」新生児医療における酸化ストレス制御の意義

- ① 活性酸素（活性窒素を含む）
- ② 酸化ストレスマーカー
- ③ 新生児疾患と酸化ストレス制御
- ④ 母乳の生体作用（TRX-1）など



「21世紀出生時縦断調査を利用した様々な環境要因の小児の健康・成長・発達への影響評価」  
（責任研究者：岡山大学大学院疫学衛生学分野 頼藤貴志教授）より

- ・ 2001年1月10日～17日および7月10日～17日、2010年5月10日～24日に出生した子どもと家族を対象に、厚生労働省によって実施された。約85,000人から回答を得て、2001年出生児は第15回目まで、2010年出生児は第6回目までの追跡が終了している。
- ・ 今回は「食物アレルギー」「川崎病」について紹介する。

# 酸化ストレスと 酸化ストレスマーカーの知識

## これまでのまとめです

### 要 点

- 酸化ストレスは、内部・外部刺激により生体内で活性酸素群（活性窒素も含む）が抗酸化システムで捕捉しきれないほど過剰に生じる状況である。
- 酸化ストレス亢進は血管内皮障害と深く関連する。とりわけ、血管内皮での一酸化窒素（nitric oxide；NO）生成は生体のレドックス環境を保持するうえで必須である。酸化ストレス亢進は arginine を基質とする NO 合成を抑制し、内因性 NO 合成酵素阻害因子である asymmetric dimethylarginine の生成を刺激する。
- 小児の急速進行性疾患，慢性遷延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。これらの疾患の治療，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。そのためには酸化ストレスの病態生理，それへの防御機制を把握し，特異的マーカーを用いて患者の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。
- 小児医療の現場で実施される種々の治療は酸化ストレス制御を目指すものでもあるが，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，それらが重症疾患への集学治療のなかに組み込まれていくことが期待される。

表 3 酸化ストレス亢進あるいはレドックス制御破綻が病態に関与するとされる小児疾患<sup>6,7)</sup>

1. **Allergic/Inflammatory**  
Allergic rhinitis, Atopic dermatitis, Bronchial asthma, Burn, Kawasaki disease, Systemic lupus erythematosus
2. **Cardiovascular**  
Cardiac transplantation, Cardiopulmonary bypass, Congenital cardiac defects, Primary hypertension
3. **Endocrinologic**  
Hyperthyroidism, Iodine-deficient goiter, Thyroiditis
4. **Environmental/Toxicologic**  
Air pollution, Carcinogenic metal exposure, Exercise, Ozone exposure, Passive smoking
5. **Gastrointestinal/Hepatologic**  
Autoimmune hepatitis, Inflammatory bowel disease, Live failure, Nonalcoholic fatty liver disease, Viral hepatitis
6. **Genetic**  
Alagille syndrome, Down syndrome
7. **Hematologic/Neoplastic**  
Acute leukemia, Bone marrow transplantation, Sickle cell anemia, Solid tumors, Thalassemia major
8. **Infectious**  
Acute bronchiolitis, Acute otitis media/tonsillitis, Chronic otitis media/tonsillitis, Encephalitis, HIV infection, Malaria, Meningitis, Pandemic influenza (H1N1), Sepsis
9. **Metabolic**  
Citrin deficiency, Diabetes mellitus, Glycogen storage disease, Phenylketonuria, Urea cycle enzyme defects, Wilson disease
10. **Neonatal**  
Asphyxia, Hypoxic ischemic encephalopathy, Maternal chorioamnionitis, Maternal preeclampsia, Neonatal sepsis, Premature birth, Respiratory distress syndrome, Retinopathy
11. **Neurologic/Muscular**  
Autism spectrum disorders, Cerebral palsy, Congenital muscular dystrophy, Developmental brain disorders, Epilepsy, Mitochondrial encephalopathy, Psychosis, Traumatic brain injury
12. **Nutritional**  
Hypercholesterolemia, Hyperlipidemia, Kwashiorkor, Multimetabolic syndrome, Obesity
13. **Pharmacologic/Therapeutic**  
Analgesics, Anticancer drugs, Immunosuppressive drugs, Total body irradiation
14. **Renal**  
Glomerulonephritis, Hemolytic uremic syndrome, Nephrotic syndrome, Renal insufficiency/failure, Urinary tract infection
15. **Respiratory**  
Chronic pulmonary disease, Cystic fibrosis, Obstructive sleep apnea



●教育講演● 新生児疾患と酸化ストレス 塚原宏一

(Tsukahara, et al. Life Sci 2004)

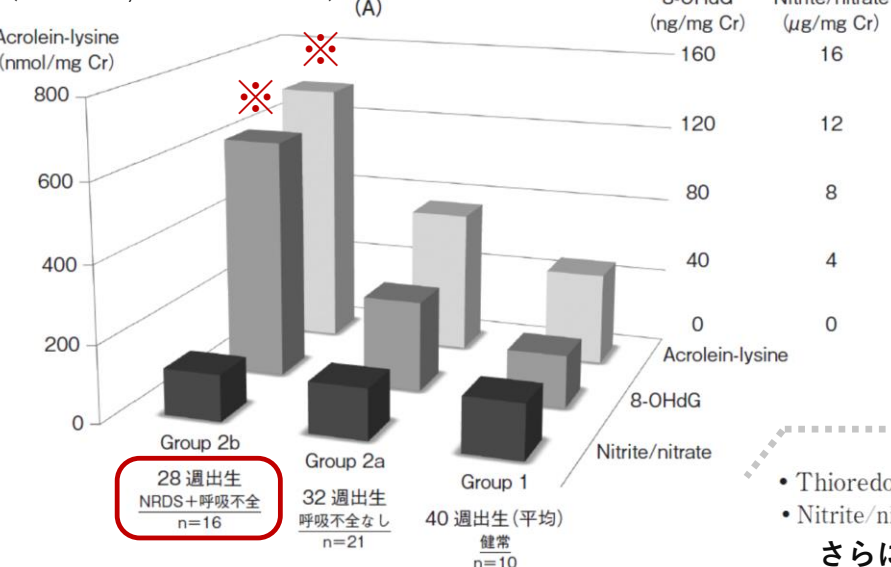


図7 生後1か月における酸化ストレス環境の評価

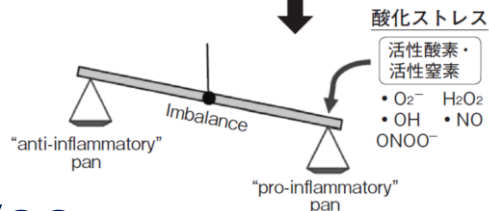
表4 レドックス治療のデザイン (実地レベル)

- ①出生前-母体炎症制御
  - ・感染対策：抗微生物薬, 早期娩出 (帝王切開)
  - ・抗酸化：ビタミンC・E, システイン, 微量栄養素, 糖質ステロイド
  - ・血管保護：葉酸, アルギニン
- ②新生児期-急性炎症制御
  - ・感染対策：抗微生物薬, γグロブリン
  - ・呼吸障害：サーファクタント, 糖質ステロイド, “酸素・圧削減”
  - ・抗酸化：ビタミンC・E, システイン, 微量栄養素, “母乳投与”
- ③それ以降-慢性炎症制御
  - ・抗酸化：ビタミンC・E, システイン, 微量栄養素, “母乳投与”
  - ・血管保護：葉酸, アルギニン

・Thioredoxin-1：平均 268ng/mL, 範囲 48 ~ 602ng/mL, SD 49ng/mL (母体血中濃度の約10倍)  
 ・Nitrite/nitrate：平均 479μmol/L, 範囲 166 ~ 1460μmol/L, SD 274μmol/L (母体血中濃度の約10倍)  
 さらに、母体血中濃度に比べて、VEGF 約100倍、HGF 約10倍、EGF 約100倍

Hans Selye の「汎適応症候群」(1950)  
 general adaptation syndrome (GAS)

- ①第1相 警告反応期 or 「闘争か逃走か」  
alarm or “fight or flight” response
  - ②第2相 慢性適応期  
chronic adaptation
  - ③第3相 疲弊期  
fatigue
- ・ストレスの蓄積が適応を破綻させ、枯渇させる  
 ・疾病は非特異的になる (“just being sick”)



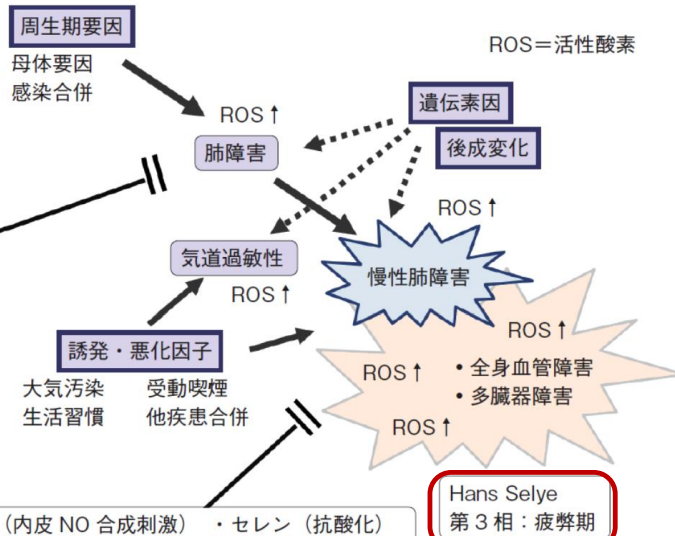
CLDを有する重症新生児

急性期制御 (抗炎症)

- ・グルタチオン (-SH 供与)
- ・エダラボン (ラジカル捕捉)
- ・チオレドキシン (-SH 供与)
- ・SOD/CAT (ラジカル捕捉)
- ・DHMEQ (NF-κB 阻害)

慢性期制御 (血管保護)

- ・シトルリン, BH4, エリスロポエチン (内皮 NO 合成刺激) ・セレン (抗酸化)
- ・ロサルタン (AT1 受容体阻害) ・フルバスタチン (HMG-CoA 還元酵素阻害)
- ・レスベラトール, バルドキソロン (Nrf 2 刺激) ・増殖因子・自己臍帯血幹細胞輸注



Hans Selye 第3相：疲弊期

図8 レドックス治療のデザイン (研究レベル)



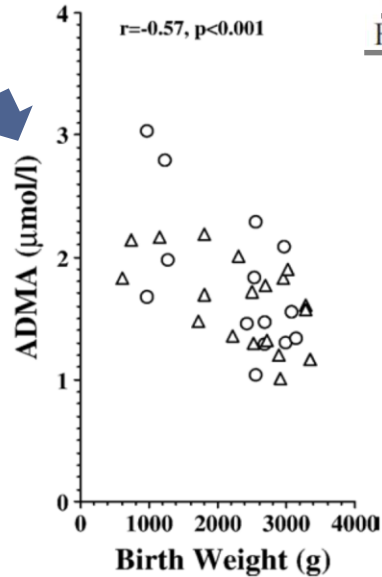
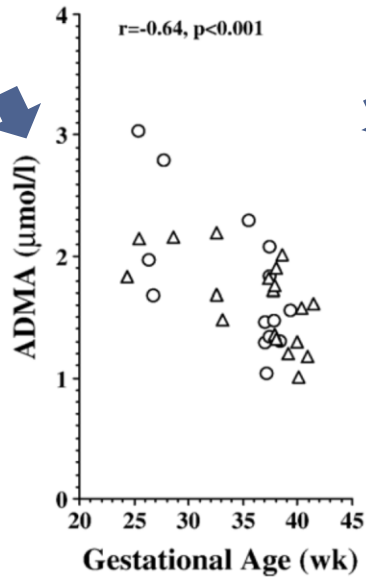
# Determination of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in umbilical blood

Hirokazu Tsukahara<sup>a,\*</sup>, Naoko Ohta<sup>a</sup>, Shuko Tokuriki<sup>a</sup>, Koji Nishijima<sup>b</sup>,  
Fumikazu Kotsuji<sup>b</sup>, Hisako Kawakami<sup>c</sup>, Norihito Ohta<sup>c</sup>, Kyouichi Sekine<sup>c</sup>,  
 Hironori Nagasaka<sup>d</sup>, Mitsufumi Mayumi<sup>a</sup>

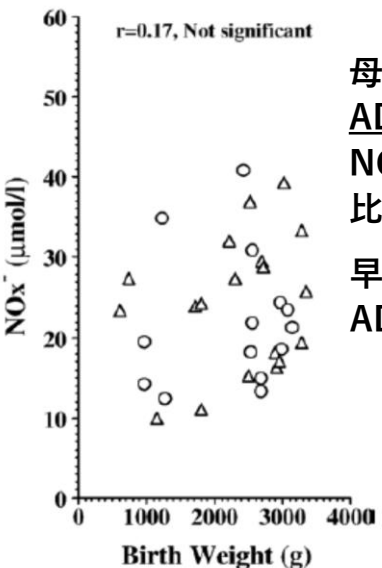
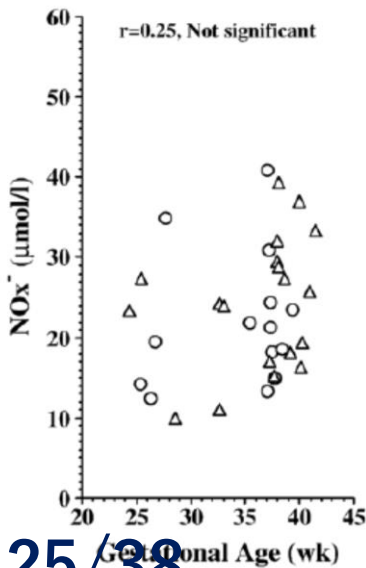
<sup>a</sup>Department of Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui 910-1193, Japan  
<sup>b</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medical Sciences, University of Fukui, Fukui 910-1193, Japan  
<sup>c</sup>Department of Research and Development, Mitsubishi Kagaku Bio-Clinical Laboratories Inc, Tokyo 174-8555, Japan  
<sup>d</sup>Department of Metabolism, Chiba Children's Hospital, Chiba 266-0007, Japan

Received 21 June 2007; accepted 20 September 2007

臍帯血での計測



Control newborns (n = 33, M/F = 14/19)	
Gestational age	35.3 ± 5.2 (24.4-41.4) wk
Birth weight	2316 ± 810 (614-3350) g
ADMA	1.71 ± 0.47 (1.01-3.04) μmol/L
NOx <sup>-</sup>	23.3 ± 8.3 (10.0-40.9) μmol/L
ADMA/NOx <sup>-</sup>	0.085 ± 0.045 (0.034-0.216)



母親や小児に比べて、  
**ADMAは約2倍**  
 NOxは約½倍  
 比としては約4倍  
 早産児や低体重児で、  
 ADMAは高くなる

出生前後の移行に  
 て、血管緊張・血  
 流調節に関与して  
 いるのではないか

Lactating women (n = 7)

ADMA	0.71 ± 0.06 (0.63-0.82) μmol/L
NOx <sup>-</sup>	42.3 ± 19.2 (23.1-77.7) μmol/L
ADMA/NOx <sup>-</sup>	0.020 ± 0.007 (0.010-0.029)

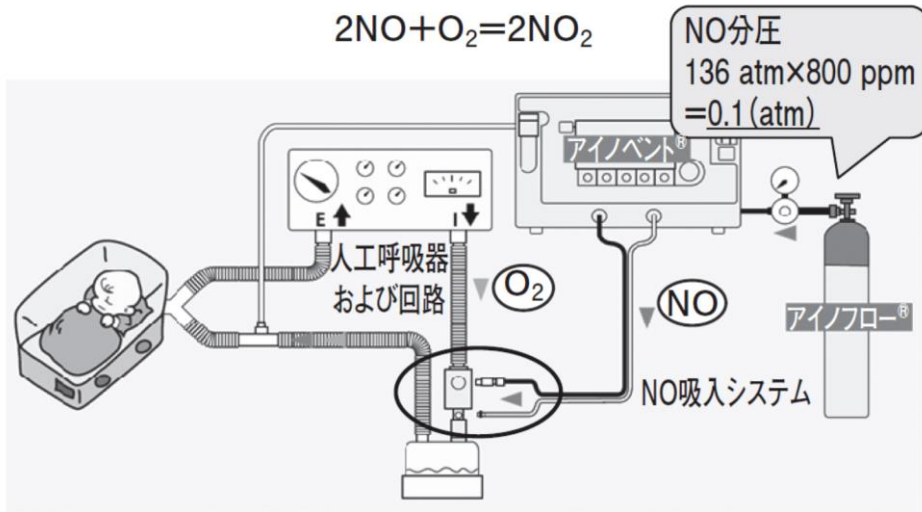
Healthy children (n = 19, M/F = 10/9)

ADMA	0.71 ± 0.11 (0.54-0.90) μmol/L
NOx <sup>-</sup>	43.4 ± 22.9 (21.9-100.0) μmol/L
ADMA/NOx <sup>-</sup>	0.020 ± 0.009 (0.006-0.039)

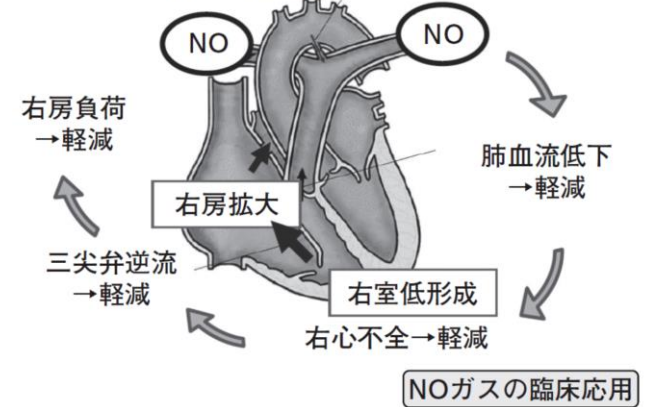
Healthy adults (n = 10, M/F = 6/4)

ADMA	0.52 ± 0.12 (0.40-0.75) μmol/L
NOx <sup>-</sup>	40.8 ± 27.8 (18.1-107.0) μmol/L
ADMA/NOx <sup>-</sup>	0.019 ± 0.012 (0.004-0.041)

# a 一酸化窒素 (NO) 吸入療法



b ● 在胎39週で出生したEbstein奇形の男性。  
SpO<sub>2</sub> 48%と著明に低く、持続陽圧呼吸+酸素投与+  
NO吸入 (20 ppm)を開始された。



NO吸入療法は、酸化  
ストレス増強により  
減弱する

## ADMA

両者のmediator/marker

NO吸入療法は、生体  
の酸化ストレス増強  
を減弱させる

### Systems biologyにおける窒素酸化物

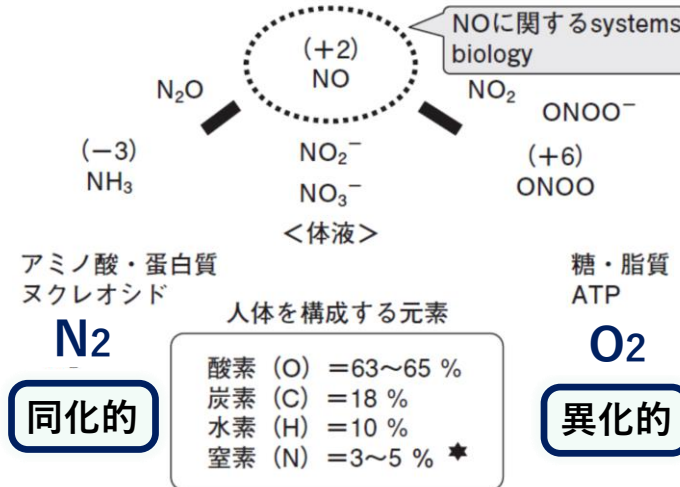


図 7 一酸化窒素 (NO) の生体作用

窒素と酸素の結合の多面性 (あるいは窒素原子の酸化数) が、生体作用の多面性につながることを示した。(文献 2, 3) より引用)

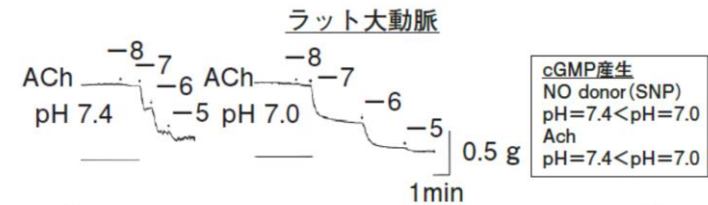
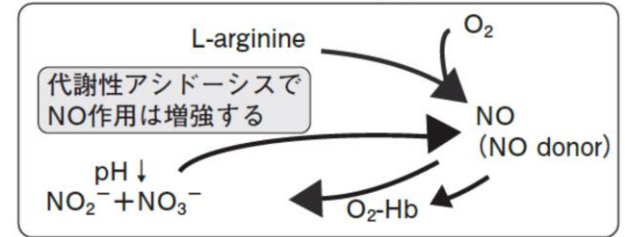


図 10 代謝性アシドーシスにおける NO の血管拡張作用の増強

組織の血流障害、低酸素障害などに対する防御機転とも考えられる。ACh はアセチルコリンであり、cGMP は NO の平滑筋弛緩作用におけるセカンドメッセンジャーである。(文献 12) より引用)

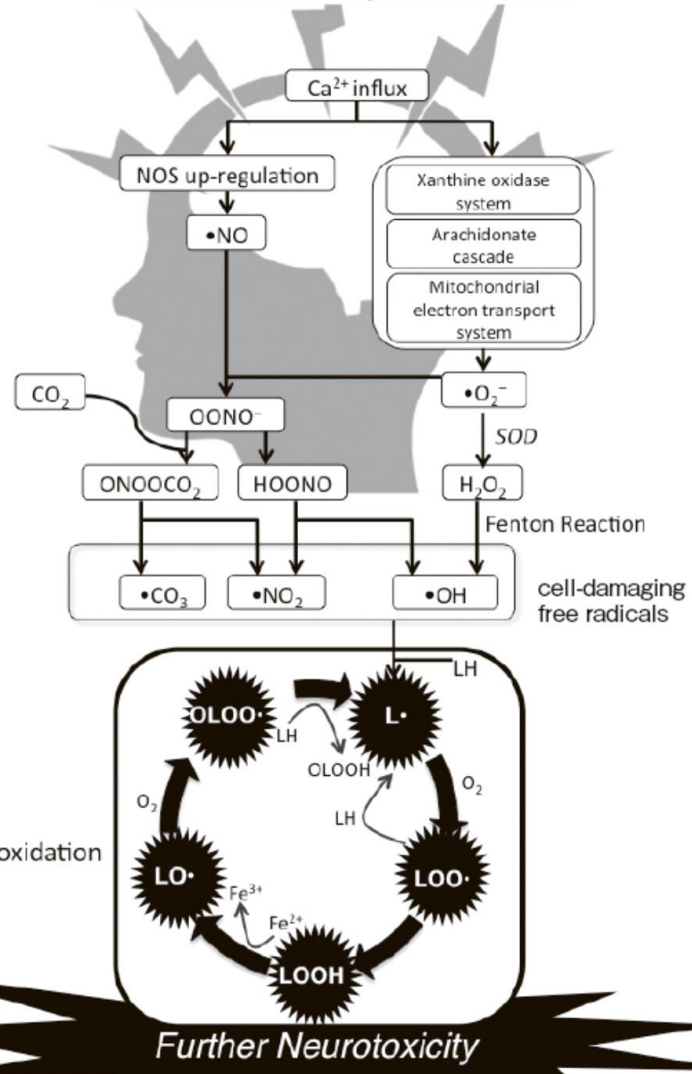


# Effects of Therapeutic Hypothermia for Neuroprotection from the Viewpoint of Redox Regulation

Nobuyuki Nosaka\*§, Ayumi Okada, and Hirokazu Tsukahara

Acta Med. Okayama, 2017  
Vol. 71, No. 1, pp. 1-9  
フリーダウンロード

## Ischemia/Reperfusion



Techniques	Advantages	Disadvantages
External cooling system Cold water Blanket	Tight thermoregulatory capacity Reducing the risk of over-cooling in induction	Skin reactions
Endovascular cooling system Cold water Balloon	Rapid and accurate establishment of the target temperature Stable maintenance	Need special catheter Central venous cannulation with the risk of venous thrombosis and infection
Cold infusion Ice-cold lactated/acetated Finger's solution	Easy and rapid induction Applicable regardless of location	Difficult temperature maintenance
Extracorporeal circulation system (e.g. ECMO, dialysis) Pump	Rapid induction	Highly invasive Need anticoagulant
Others	<ul style="list-style-type: none"> <li>Iced saline gastric lavage</li> <li>Cooling helmets</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Water immersion system</li> <li>Trans-nasal cooling devise</li> </ul>

Fig. 3 The oxidative stress cascade in diseases with ischemia/reperfusion. The up-regulation of NOS and the formation of superoxide anion result in increased production of ROS and RNS, which further leads to oxidative stress and enhanced lipid peroxidation. These oxidative molecules further promote oxidative stress through a positive feedback loop, resulting in exacerbation of neuronal damage.

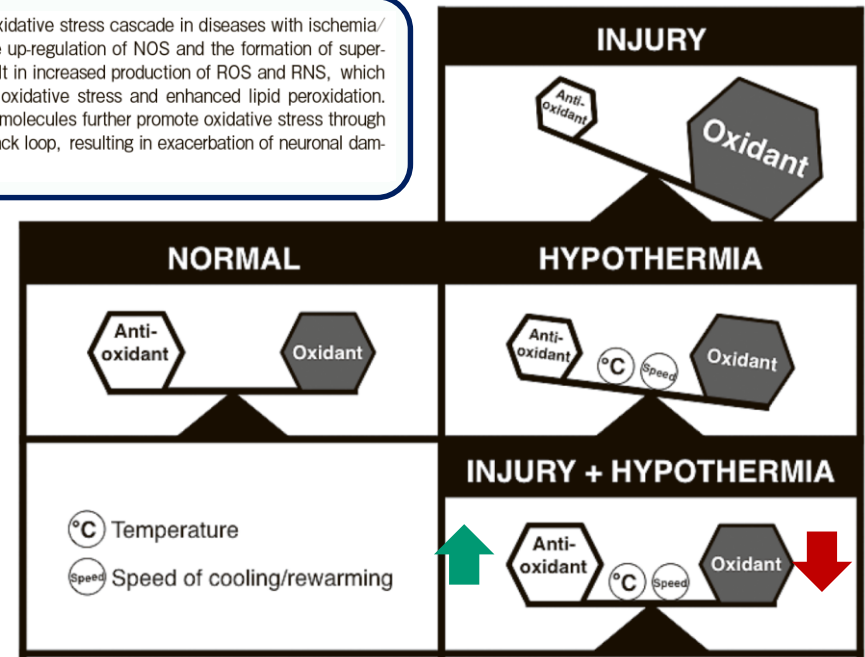
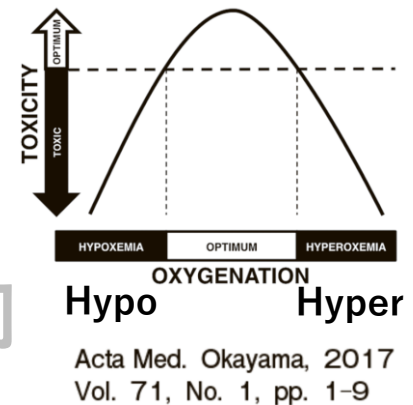


Fig. 4 Therapeutic hypothermia and redox regulation.



# 専攻医教育プログラム3「周産期」新生児医療における酸化ストレス制御の意義

- ① 活性酸素 (活性窒素を含む)
- ② 酸化ストレスマーカー
- ③ 新生児疾患と酸化ストレス制御
- ④ 母乳の生体作用 (TRX-1) など



「21世紀出生時縦断調査を利用した様々な環境要因の小児の健康・成長・発達への影響評価」  
(責任研究者: 岡山大学大学院疫学衛生学分野 頼藤貴志教授) より

- ・2001年1月10日～17日および7月10日～17日、2010年5月10日～24日に出生した子どもと家族を対象に、厚生労働省によって実施された。約85,000人から回答を得て、2001年出生児は第15回目まで、2010年出生児は第6回目までの追跡が終了している。
- ・今回は「食物アレルギー」「川崎病」について紹介する。



# Thioredoxin-1 内因性に生成されている強力な「抗酸化因子」

- **Antioxidant**
- **Growth promoting**
- **Anti-apoptotic**
- **Inflammation modulating**

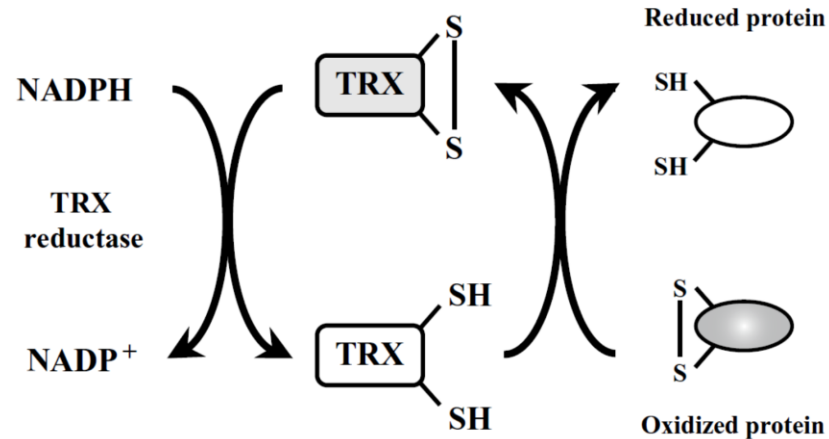


Fig. 14.1 Redox cycling of thioredoxin and thioredoxin reductase. Thioredoxin (TRX) is oxidized as it transfers reducing equivalents to disulfide groups in target proteins. TRX is then reduced back to the dithiol form by NADPH-dependent flavoprotein, TRX reductase

Data are expressed as mean±SD. The results are derived primarily from our earlier report [53]. Note the remarkably high concentrations of TRX-1 in early breast milk and amniotic fluid

**Table 14.2** Concentrations of thioredoxin-1 in body fluid samples

Serum from healthy adults:  $20 \pm 17$  ng/mL

Umbilical cord blood:  $127 \pm 81$  ng/mL ↑

Early breast milk:  $268 \pm 149$  ng/mL ↑↑

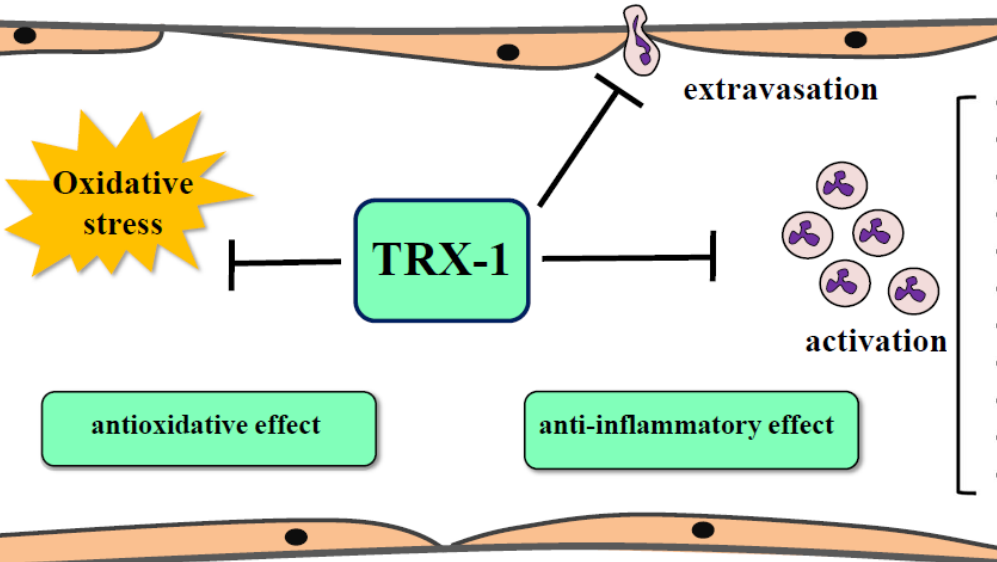
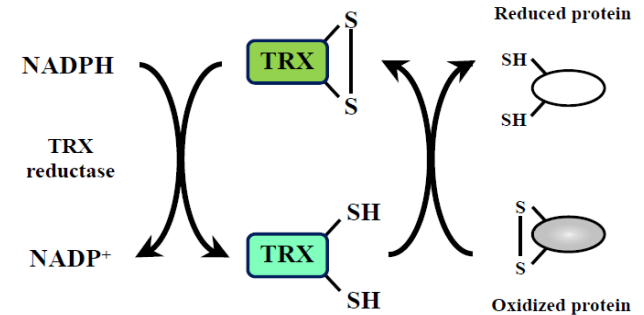
Serum from lactating women:  $35 \pm 19$  ng/mL

Amniotic fluid:  $346 \pm 221$  ng/mL (unpublished results) ↑↑

妊娠・出産・授乳に必要な因子ではないか？

## Thioredoxin-1 (TRX-1)

内因性に生成されている強力な「抗酸化因子」



- Cerulein/lipopolysaccharide-induced pancreatitis in mice 膵炎
- Dextran sulfate sodium induced-colitis in mice 大腸炎
- Proinflammatory cytokine- or bleomycin-induced lung injury in mice 肺障害
- Cigarette smoke induced-lung injury in mice 肺障害
- Retinal ischemia-reperfusion injury in rats 網膜障害
- Cerebral ischemia/reperfusion injury in mice 脳障害
- Myosin-induced autoimmune myocarditis in mice 心筋炎
- Ovalbumin-induced airway hyperresponsiveness and inflammation in mice 気道障害
- Lipopolysaccharide-induced lung injury in rats 肺障害
- Ethanol-induced liver injury 肝障害
- Type 1 diabetes mellitus in nonobese mice 1型糖尿病

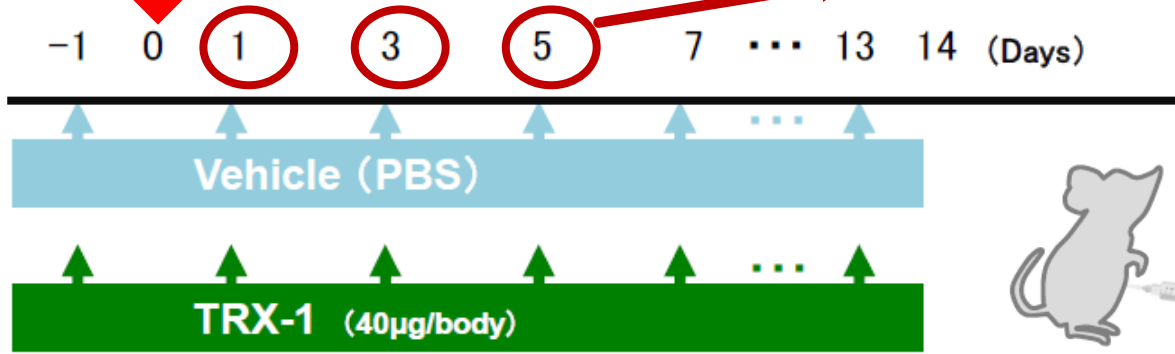
## Thioredoxin-1 (TRX-1)

- Antioxidant
- Growth promoting
- Anti-apoptotic
- Inflammation modulating

経鼻接種

インフルエンザウイルス (H1N1)

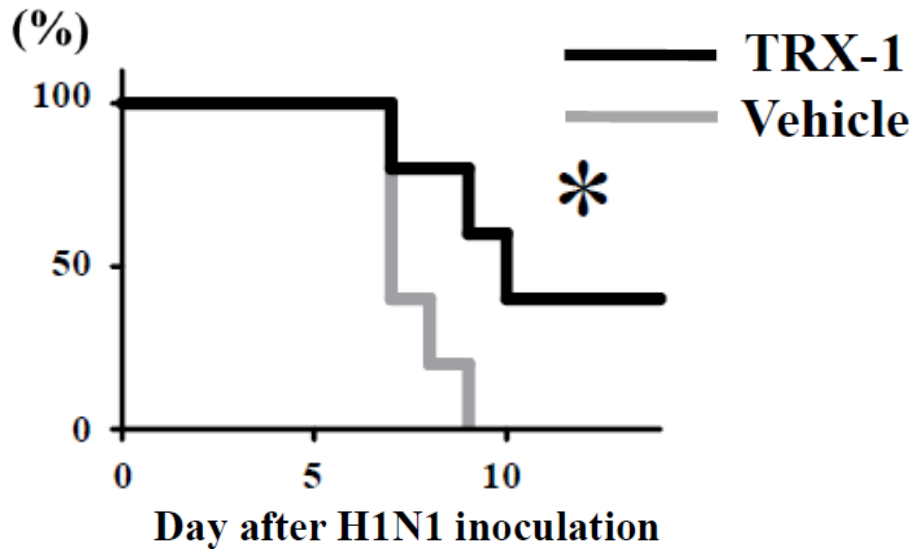
肺組織・血液・肺洗浄液を解析



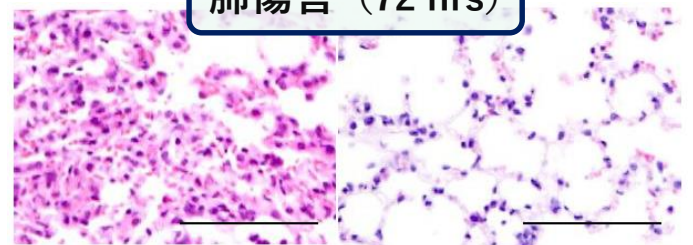
腹腔内投与

マウス生存率

抗ウイルス薬なし

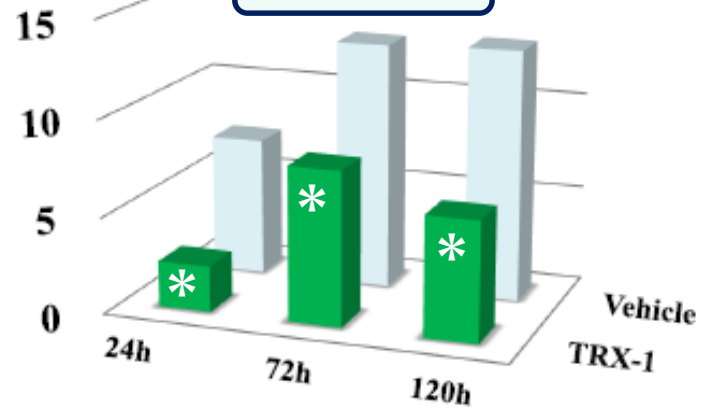


肺傷害 (72 hrs)



Vehicle TRX-1

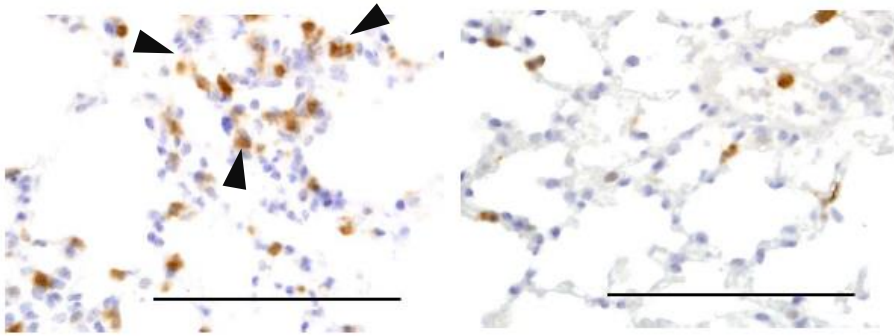
肺傷害指数



Redox-Active Protein Thioredoxin-1 Administration Ameliorates Influenza A Virus (H1N1)-Induced Acute Lung Injury in Mice

Yashiro M, Tsukahara H, et al. (Crit Care Med 2013; 41: 171-181)

## 好中球浸潤 (72 hrs)

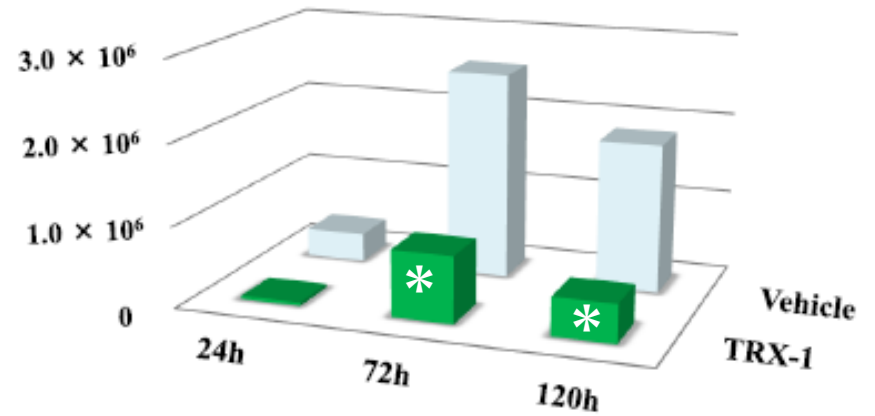


Vehicle

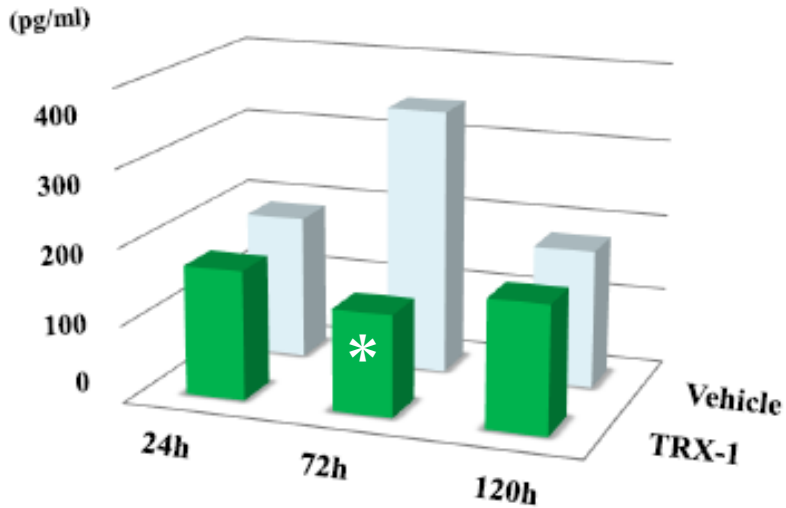
TRX-1

Scale bars = 100  $\mu$ m

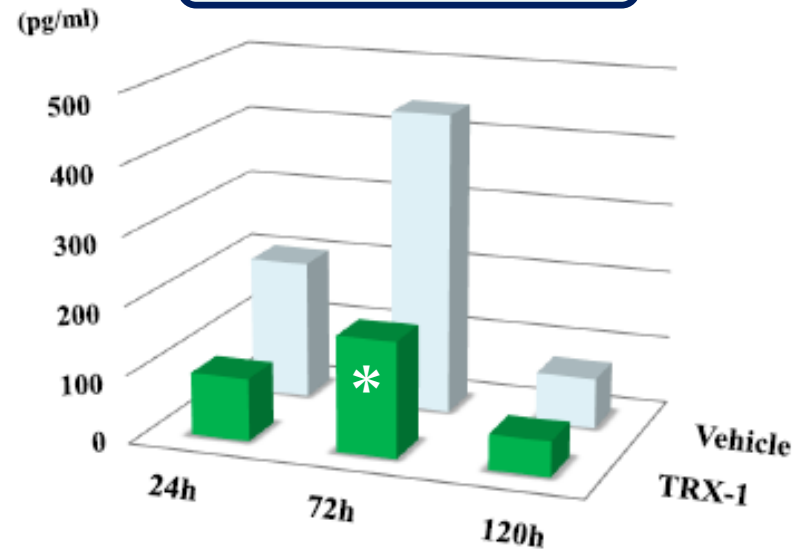
## 肺洗淨液好中球数



## 肺洗淨液 TNF- $\alpha$



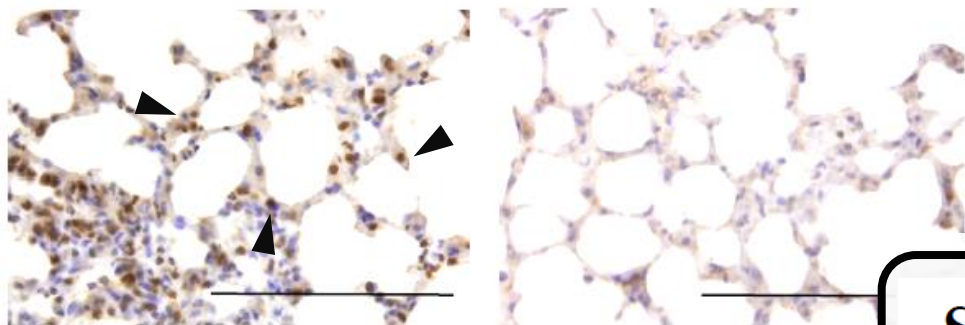
## 肺洗淨液 CXCL1





“Oxidative switch”

8-OHdG 生成 (72 hrs)



Vehicle

TRX-1

- ① 細胞・組織・臓器で抗酸化性
- ② 疾患（ヒト）で酸化ストレス関与
- ③ 疾患（動物モデル）で有効性
- ④ ヒトで使用実績
- ⑤ ヒトで臨床試験

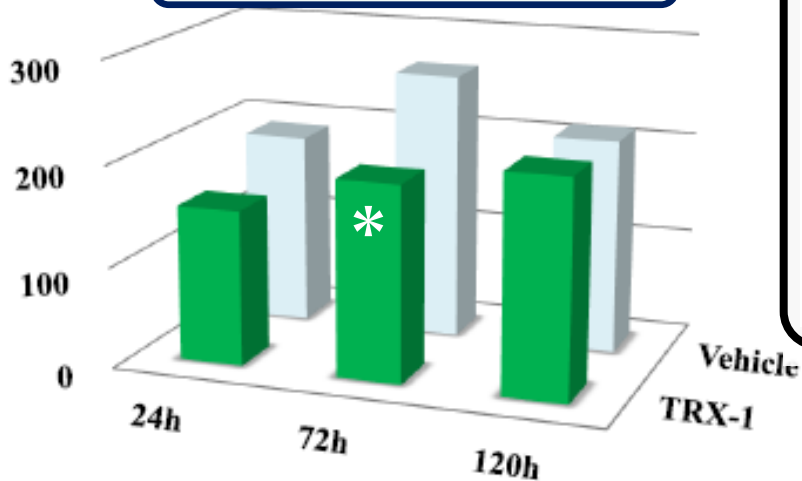
酸化ストレス  
マーカーが橋渡し

TRX-1は酸化ストレス亢進を抑制する

“Oxidative switch”

血中 Hydroperoxides

(CARR U)



Survival rate (%)

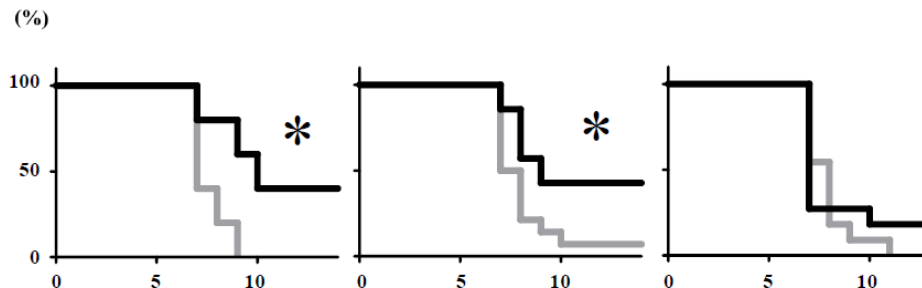
— TRX-1  
— Vehicle

TRX-1開始:

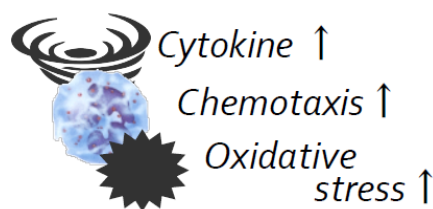
24時間前

30分後

4時間後



Day after H1N1 inoculation

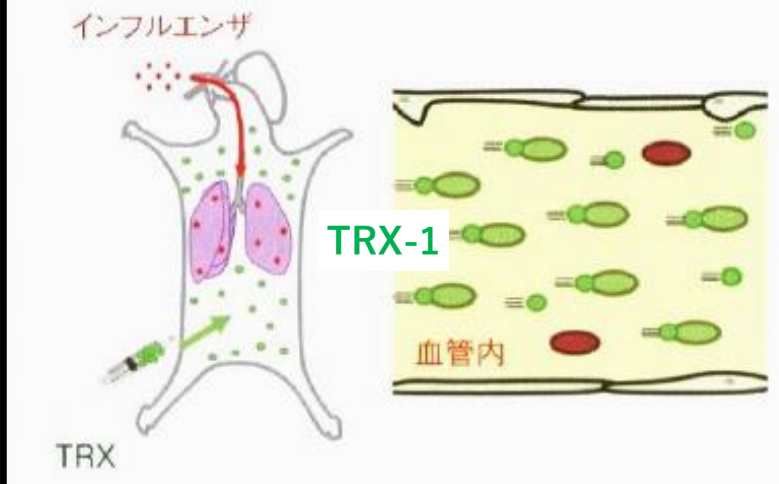
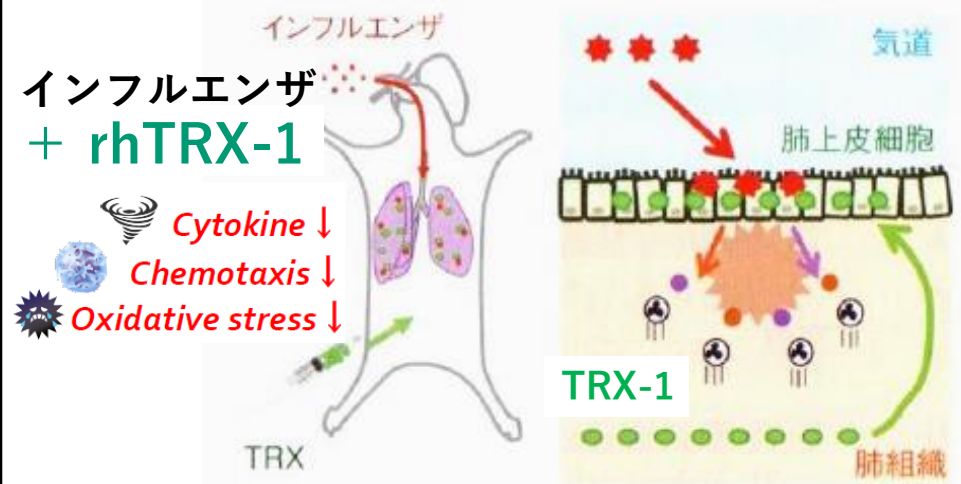
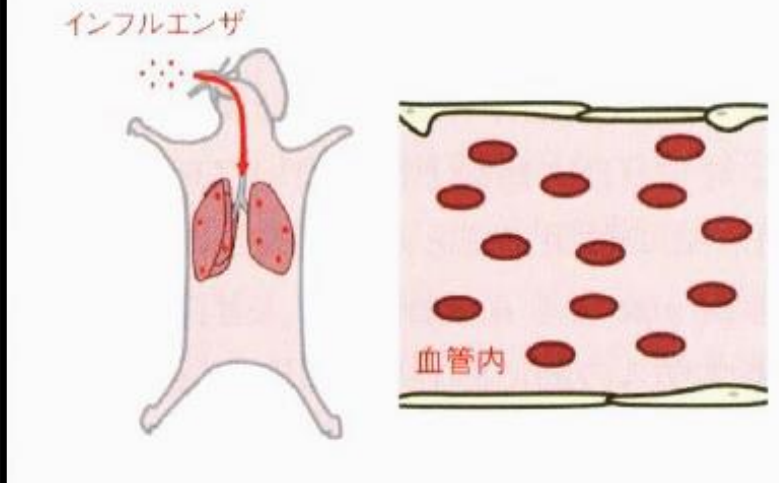
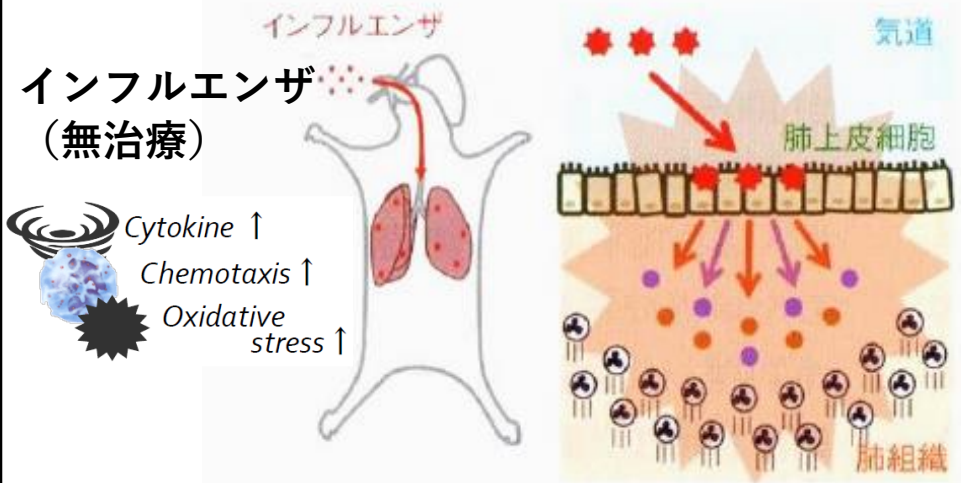


(A) 抗炎症作用

● : TNF- $\alpha$    ● : CXCL1   ⊕ : 好中球

(B) 抗酸化作用

● : 酸化物質   ● : 還元物質



好中球浸潤の抑制

活性酸素種の抑制

# 「21世紀出生児縦断調査を利用した研究」

岡山大学大学院疫学衛生学 頼藤貴志 教授

(岡山大学小児科 (友周会) 同門会員)



- ・ 病気の分布を捉え、曝露と結果の因果関係を人のデータで直接検証する方法論
- ・ 臨床の場で感じることを数値化

曝露 (原因)

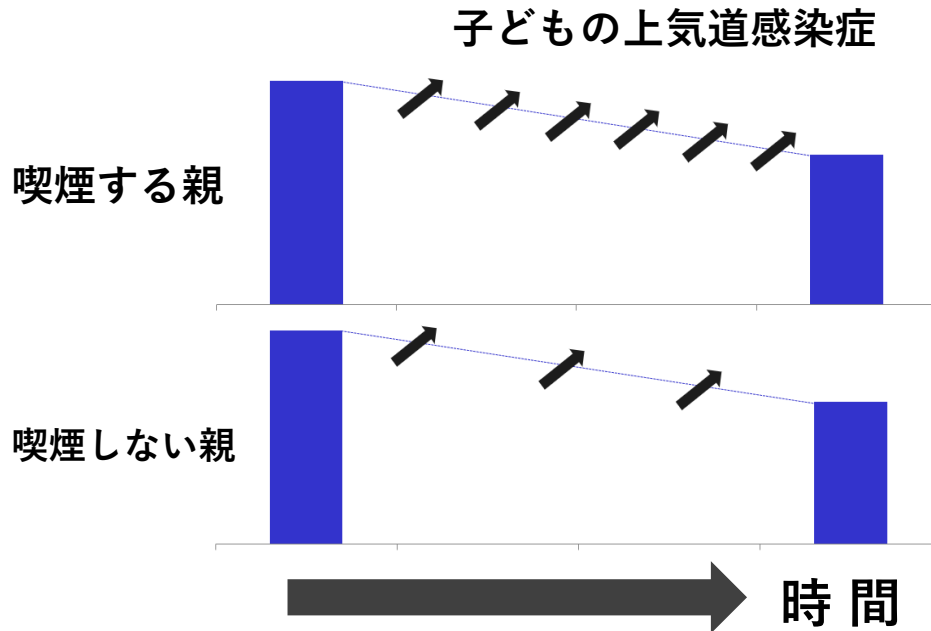


こちらの関係を数値化  
(リスク比・オッズ比など)

結果 (病気)

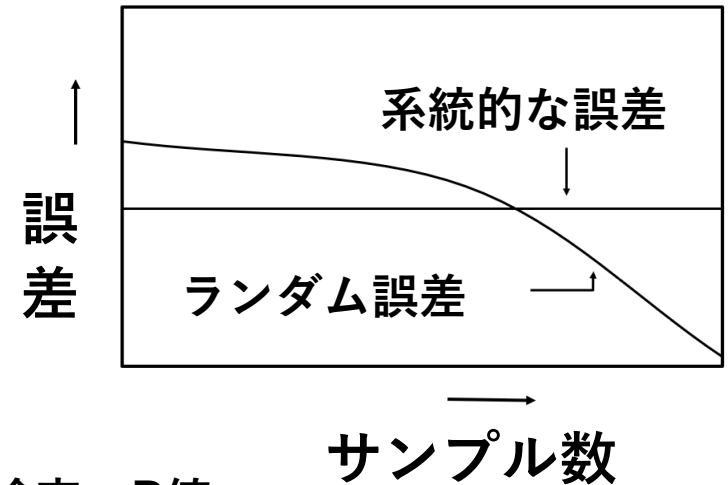


# コホート研究例



- ◆ リスク比 = 1 の場合  
曝露した人と曝露していない人の発症割合は同じ  
→ 両群に差はない
- ◆ リスク比 > 1 の場合  
曝露した人の発症割合の方が大きい  
→ 曝露した人の方がより発症している
- ◆ リスク比 < 1 の場合  
曝露していない人の発症割合の方が大きい  
→ 曝露していない人の方がより発症している

# ランダム誤差と系統的誤差



検定：P値

- 有意水準（通常5% or 1%）と比較してP値がより小さければ小さいほど、まれなことが起きたとして、帰無仮説が棄却される
- 推定（点推定や区間推定）と比較して伝えられる情報が少ない（有意かどうか）

区間推定（信頼区間）

- ばらつきの指標
  - 研究集団小さい → 広い → 精度が低い
  - 研究集団大きい → 狭い → 精度が高い
- 95%信頼区間
  - バイアスがない状態で研究集団の抽出と解析が繰り返される場合、その95%以上は区間の中に真の測定値を含む



疫学方法論とその応用

—小児における環境保健学的研究—

頼 藤 貴 志<sup>1)</sup>

フリーダウンロード

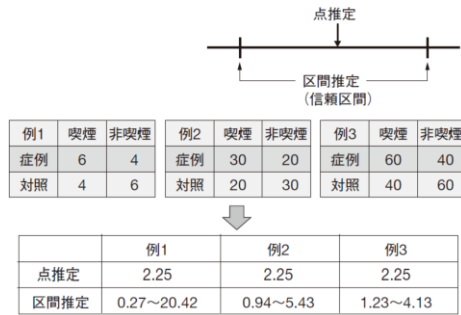


図 3 点推定と区間推定

- 背景
  - 臨床での気づきや現在までの知見を基に
- 仮説
  - 何が曝露で何が結果か、矢印で描く
- 研究デザイン
  - 実行可能なデザイン、因果の逆転を防ぐ、交絡バイアスを減らす
- 研究対象者
  - サンプル数の計算(ランダムな誤差へ対処), 選択バイアスを減らす
- データ収集
  - 情報バイアスを減らす, 交絡バイアスを調整するための変数を集める
- 解析
  - 記述統計, 交絡バイアスへの対応(層別解析, 多変量解析)と点推定値の推定, 信頼区間の推定(ランダムな誤差へ対処)
- 評価・考察
  - バイアスやランダムな誤差の検討など

\* 解析データを見るだけではない。

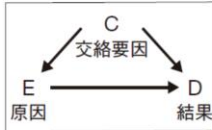


図 8 研究計画・考察の中で気をつけること

Breastfeeding and risk of food allergy: A nationwide birth cohort in Japan

Naomi Matsumoto<sup>a,\*</sup>, Takashi Yorifuji<sup>a</sup>, Kazue Nakamura<sup>a</sup>, Masanori Ikeda<sup>b</sup>, Hirokazu Tsukahara<sup>c</sup>, Hiroyuki Doi<sup>a</sup>

Fig. 1. Risk ratios for the association between dichotomized breastfeeding status (formula feeding only vs. any breastfeeding including only colostrum) and outpatient visits for food allergy stratified by eczema status during ages 6–18 months (a) and ages 6–66 months (b). The category of “formula feeding only” was used as reference. The p-values from a test of multiplicative interaction are provided.

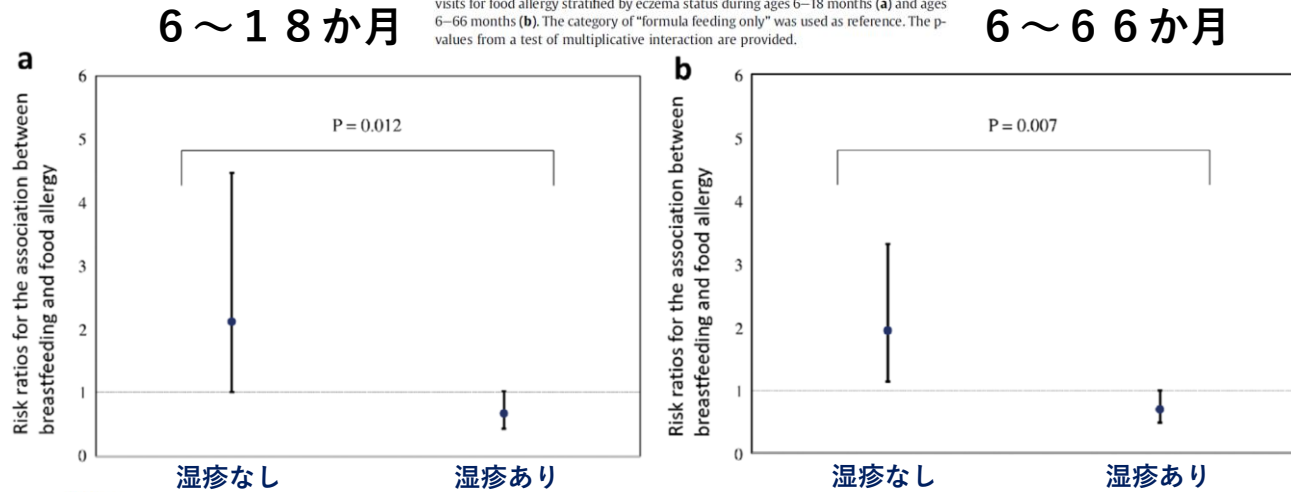


Table 4 Breastfeeding duration and outpatient visits for food allergy from age 6–18 months and 6–66 months.

	Total			without Eczema			with Eczema		
	case/N (%)	RR (95%CI)	P value	case/N (%)	RR (95%CI)	P value	case/N (%)	RR (95%CI)	P value
<b>6 ~ 18 か月</b>									
Between 6 and 18 months									
Formula feeding without colostrum	25/698 (3.6)	1		7/599 (1.2)	1		18/99 (18.2)	1	
Partial breastfeeding (duration, mo)									
Only colostrum	59/1946 (3.0)	0.78 (0.49–1.24)	0.3	34/1657 (2.0)	1.63 (0.73–3.67)	0.24	25/289 (8.7)	0.44 (0.25–0.78)	0.01*
1–2	254/8486 (3.0)	0.78 (0.52–1.17)	0.23	133/7237 (1.8)	1.48 (0.69–3.14)	0.31	121/1249 (9.7)	0.50 (0.32–0.79)	<0.001*
3–5	364/8545 (4.3)	1.06 (0.71–1.58)	0.77	189/7204 (2.6)	2.05 (0.97–4.34)	0.06	175/1341 (13.1)	0.64 (0.41–1.00)	0.048*
6–7	732/14,199 (5.2)	1.23 (0.83–1.82)	0.3	355/11,661 (3.0)	2.31 (1.10–4.86)	0.03*	377/2538 (14.9)	0.71 (0.47–1.10)	0.12
Exclusive breastfeeding to 6–7mo of age	588/9376 (6.3)	1.55 (1.05–2.30)	0.03*	279/7665 (3.6)	2.95 (1.40–6.22)	<0.001*	309/1711 (18.1)	0.87 (0.56–1.33)	0.51
P for trend		<0.001*			<0.001*			<0.001*	
<b>6 ~ 66 か月</b>									
Between 6 and 66 months									
Formula feeding without colostrum	37/522 (7.1)	1		13/442 (2.9)	1		21/77 (27.3)	1	
Partial breastfeeding (duration, mo)									
Only colostrum	106/1513 (7.0)	0.94 (0.65–1.38)	0.77	62/1276 (4.9)	1.54 (0.85–2.77)	0.15	39/232 (16.8)	0.57 (0.36–0.91)	0.02*
1–2	456/6618 (6.9)	0.97 (0.69–1.35)	0.85	272/5589 (4.9)	1.55 (0.90–2.69)	0.11	174/1019 (17.1)	0.59 (0.40–0.86)	0.01*
3–5	596/7006 (8.5)	1.19 (0.85–1.66)	0.3	351/5851 (6.0)	1.97 (1.14–3.40)	0.02*	229/1139 (20.1)	0.67 (0.46–0.98)	0.04*
6–7	1070/12,155 (8.8)	1.26 (0.90–1.75)	0.18	588/9907 (5.9)	1.99 (1.16–3.42)	0.01*	479/2245 (21.3)	0.71 (0.49–1.02)	0.07
Exclusive breastfeeding to 6–7mo of age	832/8019 (10.4)	1.53 (1.10–2.13)	0.01*	446/6500 (6.9)	2.45 (1.42–4.22)	<0.001*	375/1508 (24.9)	0.82 (0.57–1.20)	0.31
P for trend		<0.001*			<0.001*			<0.001*	

「母乳栄養（特に初乳）は湿疹を伴う食物アレルギーを抑制するが、長期完全母乳は湿疹を伴わない食物アレルギーを促進する」

# Breastfeeding and Risk of Kawasaki Disease: A Nationwide Longitudinal Survey in Japan

Takashi Yorifuji, MD, PhD,<sup>a</sup> Hirokazu Tsukahara, MD, PhD,<sup>b</sup> Hiroyuki Doi, MD, PhD<sup>c</sup>

“Anti-oxidative switch” ?

TABLE 3 Breastfeeding and KD Hospital Admission From 6 to 30 Month of Age

	KD Hospital Admission/Total Number	% of Hospital Admission	OR (95% CI)		
			Model 1: Crude	Model 2 <sup>a</sup>	Model 3 <sup>b</sup>
<b>Breastfeeding status</b>					
Formula feeding without colostrum	8/262	3.1	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)
Formula feeding with colostrum	7/583	1.2	0.39 (0.14-1.08)	0.39 (0.14-1.09)	0.39 (0.14-1.09)
Partial breastfeeding	139/17 097	0.8	0.26 (0.13-0.54)	0.27 (0.13-0.56)	0.27 (0.13-0.55)
Exclusive breastfeeding to 6-7 mo of age	78/9793	0.8	0.25 (0.12-0.53)	0.26 (0.12-0.54)	0.26 (0.12-0.55)
<b>Breastfeeding duration</b>					
Formula feeding without colostrum	8/262	3.1	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)
Formula feeding with colostrum	7/583	1.2	0.39 (0.14-1.08)	0.39 (0.14-1.09)	0.39 (0.14-1.09)
Partial breastfeeding, breastfeeding duration, mo					
1-2	20/2209	0.9	0.29 (0.13-0.67)	0.29 (0.13-0.67)	0.30 (0.13-0.68)
3-5	21/2689	0.8	0.25 (0.11-0.57)	0.25 (0.11-0.58)	0.26 (0.11-0.59)
6-7	98/12 199	0.8	0.26 (0.12-0.53)	0.27 (0.13-0.56)	0.26 (0.12-0.55)
Exclusive breastfeeding to 6-7 mo of age	78/9793	0.8	0.25 (0.12-0.53)	0.26 (0.12-0.54)	0.26 (0.12-0.55)

<sup>a</sup> Adjusted for children's factors (gender, preterm birth, parity, singleton or multiple birth).

<sup>b</sup> Adjusted for children's factors (gender, preterm birth, parity, singleton or multiple birth), maternal factors (maternal smoking status, maternal education, and maternal age category), and residential area.

**WHAT THIS STUDY ADDS:** We observed protective effects of breastfeeding on the development of KD during the period from 6 to 30 months of age in Japan, the country in which KD is most common.

「母乳（特に初乳）は川崎病の発症を抑制する」

◎ ご清聴ありがとうございました

以下が私の総説です（必要でしたら私のメルアドにお願いします）

- Medical Technology 2020. 酸化ストレスと酸化ストレスマーカーの知識.
- 日本小児科学会雑誌 2017. 酸化ストレス制御と小児疾患治療.
- 医学のあゆみ 2015. レドックス UPDATE: 小児疾患におけるレドックス制御破綻.
- 医学のあゆみ 2015. レドックス UPDATE: 一酸化窒素、アルギニン代謝と酸化ストレス.
- 日本未熟児新生児学会雑誌 2014. 新生児疾患と酸化ストレス. ....

# Intrauterine and Early Postnatal Exposure to Particulate Air Pollution and Kawasaki Disease: A Nationwide Longitudinal Survey in Japan

Takashi Yorifuji, MD, PhD<sup>1</sup>, Hirokazu Tsukahara, MD, PhD<sup>2</sup>, Saori Kashima, PhD<sup>3</sup>, and Hiroyuki Doi, MD, PhD<sup>4</sup>

Table IV. Prenatal and postnatal SPM exposure and KD hospital admission from 6 to 30 months of age

	KD hospital admission /total number	% of hospital admission	OR (95% CI)		
			Model 1: crude	Model 2 <sup>a</sup>	Model 3 <sup>b</sup>
<b>Prenatal SPM exposure (µg/m<sup>3</sup>)</b>					
Following 10 µg/m <sup>3</sup> increase in exposures			1.18 (0.84-1.66)	1.17 (0.83-1.65)	1.13 (0.79-1.61)
Exposure category					
<20	84 / 10 666	0.79	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)
20-25	71 / 8700	0.82	1.04 (0.75-1.42)	1.03 (0.75-1.42)	1.00 (0.72-1.38)
≥25	34 / 2656	1.28	1.63 (1.09-2.44)	1.62 (1.09-2.43)	1.59 (1.06-2.38)
<b>Postnatal SPM exposure (µg/m<sup>3</sup>)</b>					
Following 10 µg/m <sup>3</sup> increase in exposures			1.15 (0.77-1.72)	1.15 (0.77-1.73)	1.11 (0.73-1.68)
Exposure category					
<20	90 / 10 612	0.85	1 (reference)	1 (reference)	1 (reference)
20-25	81 / 9523	0.85	1.00 (0.74-1.36)	1.01 (0.74-1.36)	0.98 (0.72-1.34)
≥25	16 / 1346	1.19	1.41 (0.82-2.40)	1.44 (0.84-2.46)	1.41 (0.82-2.41)

<sup>a</sup> Adjusted for children's (sex, singleton birth, parity, breastfeeding status, and daycare attendance) and maternal (maternal age, maternal smoking status, and maternal education) characteristics.  
<sup>b</sup> Adjusted for children's and maternal characteristics, as well as area-level characteristics (residential area and per capita taxable income).

**Conclusions** Early life exposure to particulate air pollution, in particular during pregnancy and early childhood, is associated with an increased risk of KD hospital admission in early childhood in a nationally representative birth cohort in Japan. (*J Pediatr* 2018;193:147-54).

“Oxidative switch” ?

「出生前や出生後の大気汚染曝露は川崎病の発症を促進する」

Science of the Total Environment 655 (2019) 141-146

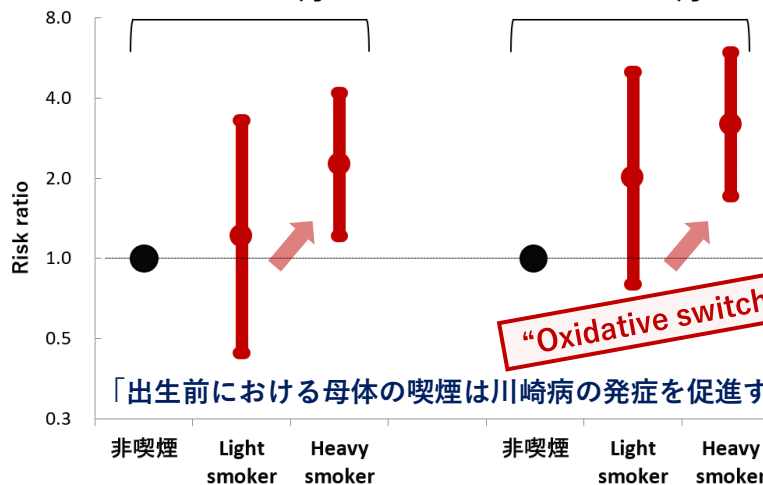
Early childhood exposure to maternal smoking and Kawasaki Disease: A longitudinal survey in Japan

Takashi Yorifuji<sup>a,\*</sup>, Hirokazu Tsukahara<sup>b</sup>, Hiroyuki Doi<sup>c</sup>

## 母親の喫煙と川崎病入院

6～30か月

6～18か月



「出生前における母体の喫煙は川崎病の発症を促進する」