

「乳幼児突然死症候群 (SIDS) および乳幼児突発性危急事態 (ALTE) の
病態解明等と死亡数減少のための研究」

平成 26 年度～28 年度 分担研究報告書

研究課題 : SIDS 発症の遺伝的因子、先天的因子について

研究分担者 : 成田正明 (三重大学大学院医学系研究科 教授)

研究協力者 : 大河原剛 (三重大学大学院医学系研究科 講師)

研究要旨

乳幼児突然死症候群(SIDS)は、乳幼児が何の予兆、既往歴もないまま睡眠中に突然死亡する疾患である。その原因は不明であるが、うつぶせ寝や父母などの喫煙など危険因子が明らかにされており、これに基づいての啓発活動で発症数は徐々に減少しているが、本症の根絶のための直接的な近道は基礎研究によるといっても過言ではない。研究分担者の成田は基礎医学の立場から本研究班に参画し、これまで SIDS の遺伝的危険因子としてセロトニントランスポーター(5HTT) 遺伝子多型を発見した(Narita, et al., Pediatrics, 2001)。すなわち SIDS 発症には胎生期に起因する危険因子も存在することを明らかにした。

さらに研究分担者は最近、妊娠中のウイルス感染は、生後のセロトニン神経の正常な発達に影響を与えることを妊娠ラットを用いて発見、論文報告した (Maternal viral infection during pregnancy impairs development of fetal serotonergic neurons, Brain and Development, 37:88-93;2015)。このことは生後のセロトニン神経の正常な発達は、妊娠中からも影響を受けていることを示唆する。

平成 26 年度は本研究班において、動物実験において妊娠中のウイルス感染は、情動に影響を与える脳内神経伝達物質の生後の仔ラットの脳中の濃度は、妊娠中のウイルス感染時期に大きな影響を受けることを報告した。平成 27-28 年度は妊娠中のウイルス感染が、生後の仔ラットのセロトニンの働きに関係するセロトニン受容体の発現にどう影響するか調べた。

A. 研究目的

乳幼児突然死症候群(SIDS)は、乳幼児がそれまでの健康状態及び既往歴からその脂肪が予測できず、しかも死亡状況調査および解剖検査によってもその原因が同定されない、原則として1歳未満の児に突然の死をもたらした症候群と定義される(厚生労働省 SIDS 研究班、2012 年 10 月)。その原因は不明であるが、SIDS 発症にはうつぶせ寝や父母などの喫煙など、発症危険因子が明らかにされており、医療従事者や保育関

係者はもとより広く一般に対する知識の普及・啓発により、我が国における SIDS による年間死亡数は、平成 9 年には 538 人であったが徐々に減少し平成 26 年には 146 人となっている¹⁾。しかしながら本症の根絶のためには、基礎研究を推進させることで SIDS の病因を明らかにし病態の全貌を解明する以外にない。

研究分担者の成田らは SIDS の遺伝的危険因子(セロトニントランスポーター遺伝子多型)を、世界に先駆けて報告した²⁾³⁾。

即ち、セロトニントランスポーター遺伝子多型の長いアリルは SIDS の遺伝的危険因子であることを発見した。

この発見は、

①SIDS の発症には遺伝的因子も関与すること、

②発症前の生後早期にこの多型を予め検索しておくことで発症危険因子群を見つけることができる点、

など意義が大きく、本論文の引用回数は 109 と、世界でも研究者間で最も頻りに引用されている論文の一つである。

SIDS 発症の危険因子としてうつぶせ寝、父母の喫煙、非母乳保育などが危険因子として明らかになっているが⁴⁾、これらは主に“生後の”危険因子であった。一方、上述の遺伝的危険因子、妊娠中の喫煙などの因子は、“生前の”危険因子といえる。これらのことは SIDS 発症には胎生期に由来する原因も存在することを強く示唆する。

SIDS 発症には、呼吸を調節する神経伝達物質セロトニンの異常の関与が知られてきた。神経伝達物質セロトニンは他の神経系よりも早くから発生を開始するが、これらのことは胎生期の様々なイベント（遺伝的因子、妊娠中の喫煙）がセロトニン神経の初期発生を乱してしまう可能性がある。

研究分担者は最近、妊娠中のウイルス感染は、生後のセロトニン神経の正常な発達に影響を与える、という論文を発表した⁵⁾。動物実験においてでのデータではあるが、このことは生後のセロトニン神経の正常な発達は妊娠中からも影響を受けていることを示唆する。

研究期間の 3 年間で、初年度の平成 26 年度は、妊娠中のウイルス感染が、妊娠中の

どの時期に感染すると脳セロトニンに影響を与えるかの、時期特異性について解析を行った。

一方、妊娠ラットを用いた妊娠中のウイルス感染での生後の仔ラットの脳内セロトニン系の変動は、セロトニンの受容体を介しての可能性はある。事実 Machaalani らは、ヒトでの SIDS 患者でセロトニン 1A 受容体や 2A 受容体などが脳幹で低下していることを報告している⁶⁾。そこで平成 27 年度に続き平成 28 年度は、妊娠中のウイルス感染が仔ラットのセロトニンの働きに関係するセロトニン受容体の発現にどう影響するか、調べた。

B. 研究方法

(1 年目)

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いた成体ラット脳のモノアミンとその代謝物の測定した。

妊娠中の polyriboinosinic:polyribocytidylic acid (poly I:C) の投与による成体ラット海馬セロトニンへの影響を調べた。投与時期の影響を調べるため、様々な妊娠時期及び生後の幼若期、即ち胎仔期や幼若期の Wistar 系ラットに、phosphate buffered saline (PBS) に溶解した 10 mg/kg の poly I:C を注射器で腹腔内に投与した。対照群としては、溶媒である PBS を同量、腹腔内に投与した。妊娠中に poly I:C を投与されたラットは、そのまま妊娠を継続させ生まれた仔ラットが 8 週齢になった時点で実験に用いた。生後に poly I:C を投与されたラットは、8 週齢になった時点で実験に用いた。週齢の雄 Wistar 系ラットから海馬を取り出し、HPLC (エイコム HTEC-500)

により海馬のセロトニン含量の測定を行った。雌のラットのセロトニン含量は性周期により増減することが知られているため、今回の実験では雄ラットのみを用いた。

(2年目、3年目)

2年目の平成27年度は、セロトニン 1a 受容体 (Htr1a) , セロトニン 2a 受容体 (Htr2a) , セロトニントランスポーター (Slc6a4) の発現量について検討、対照群に比べた。3年目の平成28年度は、セロトニン 2b 受容体 (Htr2b)、セロトニン 3a 受容体 (Htr3a) の発現量について検討した。

ウイルス感染モデル動物は、polyriboinosinic:polyribocytidylic acid (poly I:C) の投与で行った。今回も妊娠19日目の妊娠ラットを用いた。妊娠19日目の妊娠ラットに、phosphate buffered saline (PBS) に溶解した 10 mg/kg の poly I:C を注射器で腹腔内に投与した。対照群としては、溶媒である PBS を同量、腹腔内に投与し、そのまま妊娠を継続させ生まれた仔ラットが生後12または13日の時点で実験に用いた。生後12または13日目の時点で脳幹を取り出し (対照群 $n = 8$, poly I:C 投与群 $n = 13$)、TRIzol Reagent を用いて、total RNA を回収した。Nanodrop を用いて RNA を定量した後、キアゲン社の QuantiTect Reverse Transcription Kit を用いて cDNA の合成を行った。Applied Biosystems 社製 Step One Real-Time PCR Systems を用い、タカラバイオ社の SYBR Premix EX Taq II を使用したインターカレーター法により定量的 PCR を行った。PCR の反応条件は、反応液を 95°C 30 秒で酵素の活性化を行っ

た後に、95°C 5 秒の熱変性、60°C 30 秒のアニーリングと伸長反応を 40 サイクル行った。結果の解析は、比較 Ct 法を用いて行った。統計解析は t 検定で行った。プライマー配列は表 2、表 3 である。

C. 研究結果

(1年目)

これまでの研究で妊娠5日目、10日目、19日目、生後5日目、生後10日目に感染、即ち poly I:C を投与時期した場合の成体ラット海馬セロトニンへの影響は、妊娠5日目、10日目では成体海馬セロトニン濃度は低下、妊娠19日目では不変、生後5日目では低下、生後10日目では、不変、であった⁷⁾。

そこで今回妊娠17日目、妊娠18日目、妊娠21日目、生後4日目、でも同様に実験を行ったところ、妊娠17日目では成体海馬セロトニン濃度は低下、妊娠18日目では不変、妊娠21日目では低下、生後4日目では低下、であった (表1)。

複雑であるが、いずれにしてもこのことはこのことは情動に影響を与える脳内神経伝達物質濃度はウイルス感染時期に大きな影響を受けることを示唆する。

(2年目、3年目)

2年目 (平成27年度) 3年目 (平成28年度) は妊娠中のウイルス感染が、生後の仔ラットのセロトニンの働きに関係するセロトニン受容体の発現にどう影響するか、調べた。

セロトニン 1a 受容体 (Htr1a) , セロトニン 2a 受容体 (Htr2a) , セロトニントランスポーター (Slc6a4) の発現量について

コントロールと比較検討、その結果、対照群に比べ、poly I:C 投与群において、それぞれ、0.89, 0.98, 1.03 倍で、統計的な有意差は見られなかった (図 1)。

一方、セロトニン 2b 受容体 (Htr2b)、セロトニン 3a 受容体 (Htr3a) の発現量について検討したところ、セロトニン 2b 受容体 (Htr2b) の発現量は対照群と比べ 0.67 倍と有意な減少を、セロトニン 3a 受容体 (Htr3a) は対照群に比べ 1.71 倍と有意な増加を示した (図 2)。

D. 考察

研究分担者の成田らは SIDS の遺伝的因子を報告してきた²⁾。

妊娠時期のウイルス感染時期特異的影響については、ウイルス感染モデルとして用いられている polyI:C

(polyriboinosinic:polyribocytidylic acid=合成二本鎖 RNA) を用い、これまでの研究でセロトニン神経の初期発生において、ラットでは胎生 9-10 日目が最も critical であることを明らかにしてきた。

今回妊娠 18 日、19 日では対照群と有意な差は見られなかった。感染時期特異性について詳細な検討が必要である。

一方、遺伝子発現解析では、妊娠 19 日目のラットで、ウイルス感染モデルラット (poly I:C 腹腔内投与) とコントロールラットで、生後 12 日目、または 13 日目の仔の脳幹のセロトニン関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR により調べたところ、セロトニン 1a 受容体 (Htr1a)、セロトニン 2a 受容体 (Htr2a)、セロトニントランスポーター (Slc6a4) の発現量は、対照群に比べ、両者間で統計的な有意差は見られなかった。

しかし、セロトニン 2b 受容体 (Htr2b) の発現量は対照群と比べ 0.67 倍と有意な減少を、セロトニン 3a 受容体 (Htr3a) は対照群に比べ 1.71 倍と有意な増加を示した。

今回は妊娠 19 日目のラットを用いたが、私たちはこれまでの研究でセロトニン神経の初期発生において、ラットでは胎生 9-10 日目が最も critical であることを明らかにしてきている。また Machaalani らは、ヒトでの SIDS 患者でセロトニン 1A 受容体や 2A 受容体などが脳幹で低下していることを報告している⁶⁾。今回、セロトニン 2b 受容体 (Htr2b) の発現量は対照群と比べ 0.67 倍と有意な減少を、セロトニン 3a 受容体 (Htr3a) は対照群に比べ 1.71 倍と有意な増加を示したことは、妊娠中のウイルス感染で脳内のセロトニン動態が変化することを示唆する。セロトニン 2b 受容体 (Htr2b)、セロトニン 3a 受容体 (Htr3a) の変化がどのような生理的意義があるのか、SIDS 病態とどのような関係があるのかは今後の検討していかねばならないが、他の妊娠時期のラットを用いての検討や、調べた以外のセロトニン関連遺伝子にも着目しての検討が必要となる。

胎内感染、あるいは妊婦へのワクチン接種は現状では SIDS 発症危険因子と明確には規定されていないが、今後その可能性についても検討したい。

研究分担者は、研究分担者が研究代表者として研究を率いてきた厚生労働科学研究「妊娠中の化学物質による、子どもの行動・情動への影響評価に関する臨床的・基礎的・疫学的研究」で、妊娠中の化学物質ばく露が、生後のセロトニン神経系・情動系へ与える影響を調べてきた⁷⁾。今後はこ

の結果も有機的に応用し有用な結論を導きたい。

E. 結論

SIDS 発症には遺伝的危険因子など、胎生期の因子も関与する。ラットにおける胎内感染モデルを用いた解析では、胎生期のウイルス感染では胎生期のセロトニン初期発生の異常を引き起こすが、それにはウイルス感染時期特異性があり、生後の脳セロトニン値、セロトニン受容体の発現にも影響を引き起こすことが示唆された。

参考文献

- 1) 厚生統計協会編：国民衛生の動向（厚生
の指標・増刊）vol. 63(9). 2016/2017
- 2) Naoko Narita, Masaaki Narita, Sachio
Takashima, Masahiro Nakayama,
Toshiro Nagai, Nobuo Okado. Serotonin
transporter gene variation is a risk
factor for sudden infant death
syndrome in Japanese population.
Pediatrics 2001; 107: 690-692.
- 3) 成田正明 遺伝的危険因子から見た
SIDS. 日本 SIDS・乳幼児突然死予防学
会雑誌 11(1)8-12, 2011
- 4) 厚生労働省ホームページ. 乳幼児突然
死症候群 (SIDS) をなくすために.
[http://www.mhlw.go.jp/bunya/kodomo/
sids.html](http://www.mhlw.go.jp/bunya/kodomo/sids.html)
- 5) Maternal viral infection during
pregnancy impairs development of
fetal serotonergic neurons
Takeshi Ohkawara, Takashi Katsuyama,
Michiru Ida-Eto, Naoko Narita,
Masaaki Narita

Brain and Development, 37:88-93;2015

- 6) Neurochemical abnormalities in the
brainstem of the Sudden Infant Death
Syndrome (SIDS)
Rita Machaalani, Karen A. Waters
Pediatric Respiratory Reviews,
15:293-300:2014
- 7) 「妊娠中の化学物質による、子どもの
行動・情動への影響評価に関する臨床
的・基礎的・疫学的研究」
厚生労働科学研究費補助金
平成 24-26 年度 総合研究報告書
主任研究者 成田正明

F. 研究発表

論文発表

- 1) 成田正明
「SIDS とセロトニン」
日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会誌
14(1);3-5: 2014
- 2) Takeshi Ohkawara, Michiru Ida-Eto, and
Masaaki Narita. Analysis of brain serotonin
content following viral infection in
timed-pregnant and developing rat-
Implications for maternal viral infection in the
cause of SIDS. The Journal of Japan SIDS
Research Society 16(1) 3-7, 2016
- 3) 遺伝と乳幼児突然死症候群遺伝
-ALTE の新概念 BRUE も含め
成田正明、江藤みちる、大河原剛、
中川聡、成田奈緒子 小児科臨床
70(2) 2017 *in press*

学会発表

成田正明

「基礎研究から見た小児神経疾患の病態—
臨床への応用を目指して」

第 40 回日本小児神経学会東海地方会 特
別講演

平成 26 年 1 月 25 日名古屋

成田正明

「SIDS とセロトニン」

第 20 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会教
育講演

平成 26 年 3 月 7, 8 日大宮

大河原剛、江藤みちる、成田正明

「妊娠中のウイルス感染による児の生後の
脳セロトニン異常は、妊婦のウイルス感染
時期が大きく影響する—ウイルス感染モデ
ル動物を用いた実験」

第 21 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会
平成 27 年 3 月 松本

江藤みちる、大河原剛、成田正明

「呼吸の化学受容体『頸動脈小体』におけ
る神経伝達物質の発現」

第 21 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会
平成 27 年 3 月 松本

大河原剛、江藤 みちる、成田 正明

妊娠中のウイルス感染とセロトニン受容
体の発現

—妊娠動物を用いた実験

第 22 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会
平成 28 年 3 月 4, 5 日横浜

成田 正明

SIDS 研究の現状と課題

第 23 回日本 SIDS・乳幼児突然死予防学会
会長講演

平成 28 年 3 月 17, 18 日津

表1 様々な妊娠時期及び、生後の幼若期に poly I:C を投与した場合 (=ウイルス感染モデル群) の、生後 8 週齢における海馬セロトニン濃度

poly I:C 投与 時期	正常対照群	ウイルス感染モデル群 (poly I:C 投与群)
妊娠 5 日目	243.6 ± 23.7 (n = 14)	185.2 ± 27.4 (n = 14) **
妊娠 10 日目	278.3 ± 43.8 (n = 8)	223.2 ± 36.8 (n = 16) **
妊娠 17 日目	153.0 ± 25.7 (n = 15)	115.4 ± 36.2 (n = 10) **
妊娠 18 日目	273.9 ± 54.6 (n = 6)	302.4 ± 70.3 (n = 11)
妊娠 19 日目	253.7 ± 35.3 (n = 15)	256.0 ± 34.7 (n = 15)
妊娠 21 日目	372.5 ± 55.8 (n = 7)	298.0 ± 49.6 (n = 9) *
生後 4 日目	374.5 ± 97.0 (n = 11)	240.0 ± 48.7 (n = 14) **
生後 5 日目	276.8 ± 48.0 (n = 14)	236.6 ± 37.9 (n = 13) *
生後 10 日目	238.8 ± 33.2 (n = 13)	256.4 ± 29.7 (n = 14)

単位 ng/g weight,

** p<0.01, * p<0.05 vs 正常対照

遺伝子		配列
<i>Htr1a</i>	Forward	5'- gaccacggctacaccatctactc -3'
	Reverse	5'- ctcccttcttttccaccttctc -3'
<i>Htr2a</i>	Forward	5'- tccttgatcgcctgtgtcc -3'
	Reverse	5'- aagagcacatccaggtaaatacca -3'
<i>Slc6a4</i>	Forward	5'- ggcggagatgaggaatgaag -3'
	Reverse	5'- aggaagaagatgatggcaagaac -3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5'- caagttcaacggcacagtcaag -3'
	Reverse	5'- acatactcagcaccagcatcac -3'

表2 リアルタイム PCR に用いた primer の配列

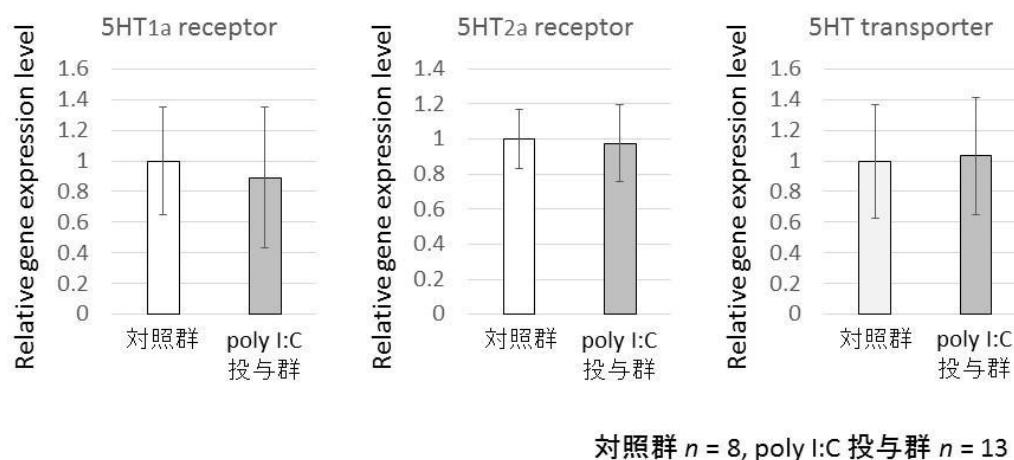


図1 妊娠19日目のラットに poly I:C を投与し、生後12日目の仔ラットの脳幹におけるセロトニン関連遺伝子の相対的な発現量 (対照群を1とする)

遺伝子		配列
<i>Htr2b</i>	Forward	5'- tgactgagggaggggatgag -3'
	Reverse	5'- cccgtgcgttgagtttgtt -3'
<i>Htr3a</i>	Forward	5'- tcagacacactgcctgcaac -3'
	Reverse	5'- cgaggcttatcaccagcagag -3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5'- caagttcaacggcacagtcaag -3'
	Reverse	5'- acatactcagcaccagcatcac -3'

表3 リアルタイム PCR に用いた primer の配列

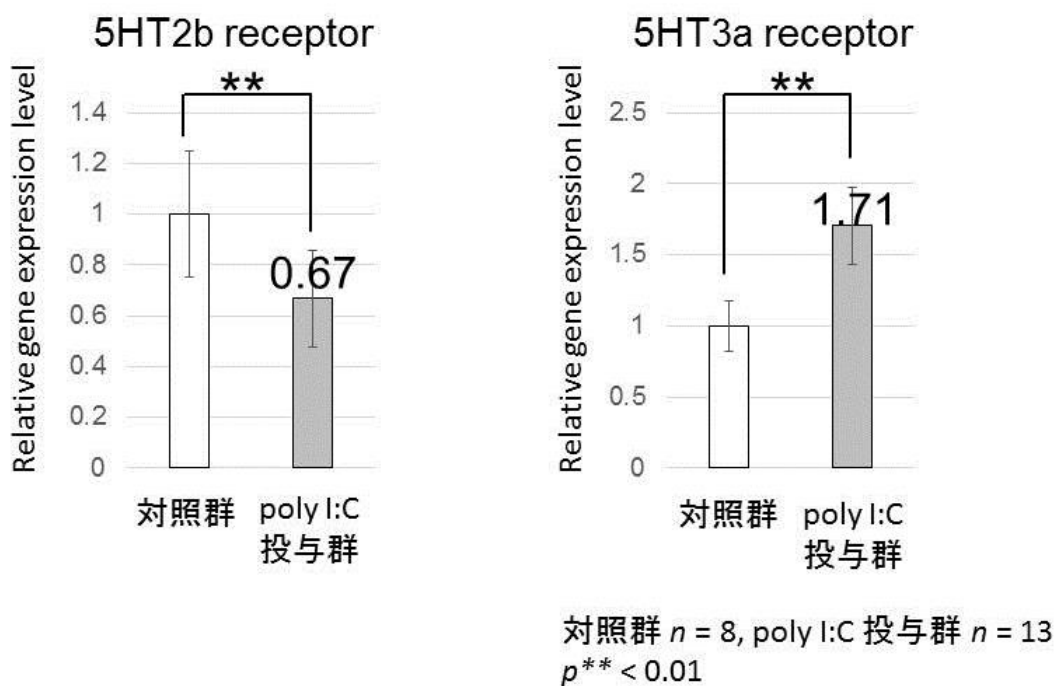


図2 妊娠19日目のラットに poly I:C を投与し、生後13日目の仔ラットの脳幹におけるセロトニン関連遺伝子の相対的な発現量（対照群を1とする）