

厚生科学研究費補助金（子ども家庭総合研究事業）
分担研究報告書

乳幼児突然死症候群（SIDS）の生理学および病理学的研究—Glial Fibrillary Acidic Protein（GFAP）の免疫組織化学により推測される低酸素性負荷と無呼吸との相関性

分担研究者 澤口聡子 東京女子医科大学医学部法医学教室助教授・Brussels Free University
Pediatric Children Hospital 客員教授
Andre Kahn Brussels Free University Pediatric Children Hospital 教授
研究協力者 高嶋幸男（国立精神・神経センター疾病研究第二部）
戸苅創・加藤稲子（名古屋市立大学医学部小児科学）
Hazim Kadhim・Patricia Franco・Martine Sottiaux・Jose Groswasser
（Brussels Free University Pediatric Children Hospital）
小林慎雄（東京女子医科大学医学部第一病理学教室）
清水悟（東京女子医科大学医学部公衆衛生学教室）

研究要旨：乳幼児突然死症候群（SIDS）を含むsudden unexpected death in infancy（SUD）33例において、児の死亡前にprospectiveにpolysomnographyを用いた生理学的分析がなされた。これらの症例について、児の死亡後に病理解剖ブロックをretrospectiveに収集し、病理学的に解析した。生理学的分析データから無呼吸の種類・頻度・長さを、病理学的データからanti glial fibrillary acidic protein(GFAP) antibodyによって免疫組織化学的に脳幹のreactive astrocyteを解析定量化したデータを抽出した。生理学的数据と病理学的データを症例毎にリンケージさせ、抽出されたデータ各々について相関分析を行った。その結果、Obstructive Apneaの長さ、延髄の網様体におけるGFAP陽性reactive astrocyteの数が統計的に有意な相関関係（ $p=0.043$ ）にあり、橋の縫線核および中脳中心灰白質におけるGFAP陽性reactive astrocyteの数との間に相関性（ $p=0.089$ ）を示唆された。網様体および縫線核は睡眠覚醒機構に重要な役割をもつ。また、中脳中心灰白質は、網様体から直接投射を受け、内臓性覚醒反射の遂行に重要な役割をはたすことが知られている。これらの部位のGFAP陽性のreactive astrocyte数とapneaの長さとの相関は、無呼吸という機能的変化が、覚醒反応を仲介として、乳幼児脳幹の器質的変化と相互に関連していることを示唆する。

A．研究目的

Sudden Infant Death Syndrome(SIDS)を含むSudden Unexpected Death(SUD)については、疫学的・生理学的・病理学的な各々の視点から別個に研究されてきた。が、特にSIDSについてはその病因は確証されておらず、各分野を統合した研究が必要な時期にある。今回の報告は、SIDSを含むSUD事例を対象とし、生理学的分析結果と病理学的解析結果とを症例毎にlinkageした、統合研究である。

既に、SIDS事例30例を対象としpolysomnographyにより記録されたprospective case-control studyの結果が報告されている(1)。現在では、この30事例に更に追加事例が加えられている。これらの生理学的にprospectiveに解析されたSIDS事例およびそのコントロールであるSUD事例について、その病理ブ

ロックをretrospectiveに収集し、免疫組織化学的に解析した。双方の解析結果は各々定量化され、症例毎にlinkageした。今回の報告における生理学的分析結果と病理学的解析結果との直接的な統合は、このようにして可能となった。

現在、SIDSの病因論として、無呼吸説(2)がみなおされ、覚醒反応説(3)が提唱されている。しかし、無呼吸説も覚醒反応説も確立されたものでなく、仮説の域をこえない。また、“無呼吸”という現象と“覚醒”という現象とは無関係ではありえず、相互に関連する。そこで、今回の研究では、無呼吸説と覚醒反応低下説との接点を見出すことを副次的目的とした。生理学的分析結果として無呼吸に関連する情報を抽出し、病理学的解析結果として覚醒反応に密接に関わる部位において低酸素負荷

を可視化した情報を抽出した。双方の定量化された結果について相関関係の有無を探ることで、この目的を満たすことが可能となる。

今回ここに、SIDS例27例を含むSUD例に対する基礎的情報として、以上の解析結果を報告する。

B. 研究方法

SIDS例27例を含むSUD33例において、prospectiveにPolysomnographyが施行され、以下の項目が測定された。

1) obstructive apneaの頻度 (frequency per hour) と長さ (second)

2) central apneaの頻度 (frequency per hour) と長さ (second)

これらと同一の症例について、retrospectiveに脳幹の病理ブロックが収集され、anti Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) antibody (DACO)を用いた免疫組織化学が施行された。

定量化は、顕微鏡の40倍視野において、各測定部位から各5視野を選択し、GFAP染色陽性の反応性アストロサイト数をmanual countingして、行った。

測定は、以下の部位について行った。即ち、中脳における中心灰白質・背側縫線核、橋における網様体・上中心核・大縫線核、延髄における迷走神経背側核・弧束核・網様体・不確縫線核・大縫線核・中心延髄核・疑核である。定量化にあたり、橋における上中心核・大縫線核、延髄における不確縫線核・大縫線核は各々一つの群として取り扱った。

生理学的解析による定量値と病理学的解析による定量値は、事例ごとにマッチングさせ相関分析を行い、Pearsonの積率相関係数を求め相関係数の検定を行った。

C. 研究結果

生理学的解析結果および病理学的解析結果について、各々の項目の平均値、標準偏差、合計値、最小値、最大値を表1に示した。病理学的解析結果と生理学的解析結果の相関係数およびその検定結果 (p-value)は、表2に示した。

Obstructive Apneaの長さ、延髄の網様体におけるGFAP陽性reactive astrocyteの数が統計的に有意な相関関係 ($p=0.043$)にあり、橋の縫線核 ($p=0.089$)・中脳中心灰白質 ($p=0.089$)におけるGFAP陽性reactive astrocyteの数との間に相関性が示唆された。

D. 考察

最終的にSIDSでなくなった乳児の死亡前に記録

したデータを解析し、SIDS児の生存中には、正常の乳児と比較して、central apneaの時間が長いこと、obstructive apneaやmixed apneaの頻度が多いことが報告されている(4)。更に最近、SIDS児において、obstructive apneaの頻度が高かったことがもう一度報告されている(1)。この理由として、obstructive apneaはcentral apneaに比較して徐脈や酸素飽和度の低下を伴うことが多く、これが循環中枢や末梢循環系の異常をもたらし、最終的に突然死の原因となる可能性が指摘されている。

今回、解析されたデータでは、obstructive apneaの頻度の平均値は0.640/hour・長さの平均値は6.800second、central apneaの頻度の平均値は23.758/hour・長さの平均値は13.590secondとなっており、頻度および長さ双方の平均値ともcentral apneaに関する値がobstructive apneaに関する値より大きい。

今回の解析結果において、延髄網様体におけるGFAP陽性reactive astrocyteの数はapneaの長さ、統計的に有意な相関性を認め、橋の縫線核群および中脳中心灰白質におけるGFAP陽性reactive astrocyteの数はapneaの長さ、相関性を示唆されているが、いずれもobstructive apneaの長さとの相関関係であった。これら今回の解析結果はSIDS児を含むSUD児に対するものであるが、Kahn et alによる上記の報告内容と矛盾しない。

reactive astrocyteの増加は、一般に様々な原因によりもたらされ、非特異的所見と解釈されるが、低酸素性虚血性変化の指標としても有効である。この為、apneaによる低酸素性の負荷の指標としてreactive astrocyte数を利用することが可能である。GFAPはastrocyte全般の指標であり、GFAP陽性reactive astrocyteを判定することで、低酸素性負荷の間接的定量化が容易となる。幾つかの部位においてObstructive Apneaの長さ、GFAP陽性reactive astrocyte数が相関したということは、生理的な変化が器質的な変化をもたらしたことを推測させる。同時に、生理的な変化がある程度慢性のものであったことをも推測させる。SIDS児における慢性低酸素状態の存在は幾つかの神経病理学的所見から既に推測されてきた(5,6)。今回の結果はSIDS児を含むSUD児に対するものであるが、Takashima et alによる報告内容と矛盾しない。

今回の病理学的測定部位は、二つの観点から選択された。即ち、覚醒反応と関連する部位であること、あるいは、既報告によりSIDS児においてreactive astrocyteが有意に高く認められると判定されている

ことの2点である。前者としては、中脳における中心灰色質・背側縫線核、橋における網様体・上中心核・大縫線核、延髄における網様体・不確縫線核・大縫線核・中心延髄核があげられる。後者としては、中脳中心灰白質・橋網様体・延髄網様体・延髄迷走神経背側核・延髄弧束核・背側縫線核があげられる(7、8、9、10、11)。前者と後者とが重なりあっていることから、小児突然死例における覚醒反応の関与が推測される。今回、obstructive apneaの長さとその部位におけるGFAP陽性astrocyte数に相関の見られた部位は3か所であり、網様体特に縫線核は睡眠覚醒機構に重要な役割をもつ。

今回obstructive apneaと統計学的に有意な相関のみられたのは延髄網様体におけるreactive astrocyte数であるが、文献上は橋網様体においてもSIDS例における有意差が報告されている。

縫線核群においては、特に中脳から橋上部に存在する背側縫線核から脚橋被蓋部に主な入力があり、この経路は覚醒過程において重要である。今回の解析において相関性が示唆されたのは橋における縫線核群であり、中脳における背側縫線核群ではない。橋における縫線核群の主体は、上中心核・大縫線核であり、前者は背側縫線核とともに上行性投射を送り、後者は下行性投射を送る。橋の縫線核群は上行性・下行性双方の投射を送り、このような意味で多彩であり、中脳における背側縫線核と異なっている。また、中脳中心灰白質は、網様体から直接投射を受け、内臓性覚醒反射の遂行に重要な役割をはたすことが知られている。また、中脳中心灰白質からも脚橋被蓋部に主な入力があり、背側縫線核からの経路と同様、この経路は覚醒過程において重要である。

いずれにしても、これらの部位のGFAP陽性のreactive astrocyte数とapneaの長さとの相関は、無呼吸という機能的変化が、覚醒反応を仲介として、乳幼児脳幹の器質的変化と相互に関連していることを示唆する。同時に、今回行われたようなリンクージュ研究は、生理学的定義も病理学的定義も困難な“覚醒反応”のような現象の理解にあたって有用であることが推測される。

又、今回、迷走神経背側核・弧束核のような自律神経系に関与する核には有意な変化がみられなかったが、これらの部位については、異なる病理学的マーカーを用いて更に検索すべきであると考えている。

E . 結論

SIDSを含むSUD33例において、

prospectiveにpolysomnographyを用いた生理学的解析がなされ、これらの症例について、病理解剖ブロックをretrospectiveに収集し、病理学的に解析した。生理学的解析データから無呼吸の種類・頻度・長さを、病理学的データからanti glial fibrillary acidic protein(GFAP) antibodyによって免疫組織化学的に脳幹のreactive astrocyteを解析定量化したデータを抽出した。生理学的データと病理学的データを症例毎にリンクージュさせ、抽出されたデータ各々について相関分析を行った。その結果、Obstructive Apneaの長さ、延髄の網様体におけるGFAP陽性reactive astrocyteの数が統計的に有意な相関関係($p=0.043$)にあり、橋の縫線核および中脳中心灰白質におけるGFAP陽性reactive astrocyteの数との間に相関性($p=0.089$)を示唆された。これらの部位のGFAP陽性のreactive astrocyte数とapneaの長さとの相関は、無呼吸という機能的変化が、網様体・縫線核・中脳中心灰白質という覚醒反応の場において、乳幼児脳幹の器質的変化と相互に関連していることを示唆する。

文献

- 1.Kahn A, Groswasser J,Rebuffat E.Sleep and cardiorespiratory characteristics of infant death: A prospective case-control study. Sleep 15:287-292,1992.
- 2.Steinschneider A.Prolonged apnea and the sudden infant death syndrome, clinical and laboratory observations. Pediatrics 50:646-654,1972.
- 3.Mcculloch K, Brouillette RT, Guzzetta AJ.Arousal responses in near-miss sudden infant death: A prospective case-control study.Sleep 15:287-292,1982.
- 4.Kahn A,Blum D,Rebuffat E.Polysomnographic studies of infants who subsequently died of sudden infant death syndrome. Pediatrics 82:721-727,1988.
- 5.Takashima S et al.Cerebral white matter lesions in sudden infant death syndrome. Pediatrics 62:155-159,1978.
- 6.Takashima S et al.Cerebral hypoperfusion in SIDS; Brainstem gliosis and vascular architecture. Ann Neurol 4:257-262,1978.
- 7.Takashima S et al.Developmental abnormalities of medullary "Respiratory Centers" in sudden infant death syndrome. Experimental Neurology 90:580-587,1985.
- 8.Yamanouchi H, Takashima S, Becker LE. Correlation of astrogliosis and substance P immunoreactivity in the brainstem of victims of sudden infant death syndrome.Neuropediatrics 24:200-203,1993.
- 9.Takashima S, Mito T, Yamanouchi

H. Developmental brain-stem pathology in sudden infant death syndrome. *Acta Paediatrica Japonica* 36:317-320, 1994.

10. Obonai T, Takashima S, Becker LE, Asanuma M, Mizuta R, Horie H, Tanaka J. Relationship of substance P and gliosis in medulla oblongata in neonatal sudden infant death syndrome. *Pediatric Neurology*. 15:189-192, 1996.

11. Obonai T, Yasuhara M, Nakanuma T, Takashima S. Catecholaminergic neurons alteration in brainstem of sudden infant death syndrome victims. *Pediatrics* 101:285-288, 1998.

Table 1. Basic characteristics of pathological & physiological data

Variable	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
(pathological)					
MBPG	12.500	5.793	125.000	5.600	22.600
MBDR	13.000	6.213	130.000	6.600	26.600
PAR	4.346	4.735	95.600	0	15.600
PMR	10.000	7.471	220.000	0	25.800
MOAR	5.075	3.822	81.200	0	13.400
MODNV	5.867	4.747	52.800	0	12.000
MOSN	7.018	6.717	77.200	0	18.400
MOMR	9.050	6.632	108.600	0	24.200
MOLR	7.280	5.253	36.400	1.000	14.000
MOAN	5.138	6.290	82.200	0	24.800
(physiological)					
OAPF(no. per hour)	0.640	0.613	24.310	0.010	2.010
OAPD(second)	6.800	2.240	258.400	2.500	12.500
CAPF(no. per hour)	23.758	9.467	902.800	10.000	40.500
CAPD(second)	13.590	3.966	516.400	6.600	21.000
Period BR	5.566	4.846	211.490	0.020	16.200

MBPG:periaqueductal gray in midbrain MBDR:dorsal raphe nucleus in midbrain
 PAR: reticular formation in pons PMR:superior central nucleus and nucleus raphe magnus in pons
 MOAR: reticular formation in medulla oblongata MODNV:dorsal raphe nucleus in medulla oblongata
 MOSN: solitary nucleus in medulla oblongata MOMR: nucleus raphe obscurus, nucleus raphe magnus in medulla
 oblongata MOLR: nucleus medulla oblongata centralis MOAN::nucleus ambiguus in medulla oblongata
 OAPF: frequency of obstructive apnea (no per hour) OAPD: duration of obstructive apnea (second)
 CAPF: frequency of central apnea (no oper hour) CAPD: duration of obstructive apnea(second)
 Period BR: periodic breathing

Table 2. Correlation coefficients between pathological data and physiological data

Variables	OAPF	OAPD	CAPF	CAPD	Period BR
MBPG	-0.543 p=0.131	-0.597 p=0.090	-0.286 p=0.456	0.054 p=0.890	-0.396 p=0.291
MBDR	-0.146 p=0.707	-0.160 p=0.681	-0.198 p=0.610	-0.097 p=0.804	-0.207 p=0.594
PAR	0.130 p=0.575	-0.323 p=0.154	0.110 p=0.635	0.122 p=0.597	0.365 p=0.104
PMR	0.173 p=0.454	-0.381 p=0.089	-0.331 p=0.143	0.115 p=0.621	-0.064 p=0.782
MOAR	0.243 p=0.643	0.813 p=0.049	-0.459 p=0.360	-0.098 p=0.854	-0.180 p=0.733
MODNV	-0.863 p=0.337	-0.192 p=0.877	-0.322 p=0.791	0.249 p=0.840	-0.200 p=0.872
MOSN	-0.595 p=0.290	-0.193 p=0.755	-0.202 p=0.745	-0.652 p=0.233	0.076 p=0.903
MOMR	0.262 p=0.617	0.671 p=0.145	-0.653 p=0.160	-0.582 p=0.226	-0.266 p=0.611
MOAN	-0.383 p=0.454	0.017 p=0.975	-0.286 p=0.582	-0.652 p=0.161	-0.597 p=0.211

MBPG:periaqueductal gray in midbrain MBDR:dorsal raphe nucleus in midbrain

PAR: reticular formation in pons PMR:superior central nucleus and nucleus raphe magnus in pons

MOAR: reticular formation in medulla oblongata MODNV:dorsal raphe nucleus in medulla oblongata

MOSN: solitary nucleus in medulla oblongata MOMR: nucleus raphe obscuus, nucleus raphe magnus in medulla oblongata MOAN::nucleus ambiguus in medulla oblongata OAPF: frequency of obstructive apnea (no per hour)

OAPD: duration of obstructive apnea (second) CAPF: frequency of central apnea (no oper hour)

CAPD: duration of obstructive apnea(second) Period BR: periodic breathing