

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）の生理学的及び病理学的研究－アポトーシスの動向

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 戸苅創, 加藤稲子（名古屋市立大学医学部小児科学）
Hazim Kadhim, Jose Grosswasser, Patricia Franco, Martine Sottiaux
（Brussels Free University Pediatric Children Hospital）
小林槇雄（東京女子医科大学医学部第一病理学教室）

研究要旨：アポトーシスを可視化するためのTerminal-deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling (TUNEL)法が、乳幼児突然死症候群(SIDS)を含む33例のsudden unexpected death (SUD)の脳幹について施行された。これらの病理学的解析に先だて、児の死亡前に行われたpolysomnographyによる生理学的解析から無呼吸に関するデータ（閉塞性無呼吸の頻度と長さ、中枢性無呼吸の頻度と長さ）が抽出された。双方のデータは定量化され、各事例毎にマッチングさせて、相関分析を行った。その結果、中枢性無呼吸の長さとの間に、統計的に有意な相関（ $p = 0.006$ ）が見い出された。この相関の有意性は、無呼吸からの覚醒過程になんらかの器質的な変化が関与している可能性を示唆する。

A. 研究目的

乳幼児突然死症候群（SIDS）に関する病因仮説は、幾つか提唱されている。現在では、伝統的な無呼吸説（1）から覚醒反応仮説（2）に議論の争点がうつりつつある。神経病理学的な研究からは中枢神経系における微細な異常が指摘され、これらの病理学的な異常は反復する低酸素性負荷によるものと仮説づけられている（3）。

これまでの神経病理学的研究で、Glial fibrillary acidic protein（GFAP）の免疫組織化学によって、この低酸素性負荷の存在が傍証されてきた（4）。一方、Programmed cell death（apoptosis）は、低酸素性負荷によってもたらされ得る（5）。この為、apoptosisの動向を調べることで、同じ目的を遂行できる。

一方、覚醒反応説を神経病理学的に証明する報告は殆ど無い。中脳背側縫線核から脚橋被蓋核への経路は覚醒反応の過程において重要な役割を果たしている。

上記の二つの事由により、中脳背側縫線核におけるapoptosisの動向を調査し、生理学的な無呼吸のデータとマッチングさせるなら、無呼吸説から覚醒反応仮説を結びデータを提供し得ると推測される。

この研究の目的は、アポトーシスによって可視化された病理学的データと無呼吸に関する生理学的データを事例毎にマッチングさせて相関分析を行い、無

呼吸からの覚醒過程に器質的な変化がおこっているかどうかを検証することにある。

B. 研究方法

33例のSudden Unexpected Deaths（SIDSを含む）について、児の生前prospectiveに、polysomnographyによる生理学的解析がなされ、以下の4種類の定量的データが準備された。

- 1) 閉塞性無呼吸の頻度（per hour）
- 2) 閉塞性無呼吸の長さ（seconds）
- 3) 中枢性無呼吸の頻度（per hour）
- 4) 中枢性無呼吸の長さ（seconds）

各事例について、retrospectiveに病理組織ブロックを収集し、脳幹部のブロックについて、アポトーシスの検出手段であるTUNEL法（6）を施行した。TUNEL法の施行に先がけて、作成切片はmicrowave照射によって前処理された。定量的評価の為、背側縫線核について、40倍視野を5視野選択し、反応陽性神経細胞数をmanual countingした。

生理学的データと病理学的データは各症例毎にマッチングし、相関分析を行い、ピアソンの積率相関係数を算出し、相関係数の検定を行った。

C. 研究結果

背側縫線核におけるTUNEL陽性神経細胞数と中枢性無呼吸の長さとの間に、統計学的に有意な正の相関関係（ $p=0.006$ ）を認めた。

D. 考察

最近、SIDS児の脳幹におけるアポトーシスの増加を報告する論文が発表された(7)。この論文によれば、アポトーシスの増加が認められる部位は薄束、楔状束、三叉神経脊髄路、孤束、網様体等であるとされている。中脳背側縫線核におけるアポトーシスの動向については記載がない。なお、この論文においては、SIDS児におけるアポトーシスの増加は低酸素性負荷の影響によるものとされている。しかし、虚血後の神経細胞の増加をアポトーシスと断定するには緒論があり、特に虚血後の遅発性神経細胞死にアポトーシスの機序が関与しているかどうかについては未知の問題が残されている(8)。

本報告におけるSUD事例における背側縫線核のTUNEL陽性細胞数と中枢性無呼吸の長さとの間の有意な相関関係は、SIDS児における低酸素性のアポトーシスの増加説に寄与するものであるかもしれない。一方で、新生児や胎児の橋核や鉤状回におけるpontosubicular neuron necrosis(PNS)の残存神経細胞は、典型的な虚血神経細胞とは異なっておりアポトーシスに類似するとされ、小児突然死例にもこれらが見られるとされる(9)。このようなことから、SUD事例の背側縫線核におけるアポトーシスとPNSとの類似性等について今後検討される必要があると思われる。

縫線核群は、正中・傍正中網様体を形づくり、背側縫線核・上中心核・大縫線核・橋縫線核・不確縫線核・淡蒼縫線核を含む。これらのうち、背側縫線核と上中心核からは上行性神経線維がおこり、他からは下行性神経線維がおこる。特に背側縫線核から脚橋被蓋核へいたる主たる入力経路があり、この経路は覚醒反応に重要な役割を果たしている。このため、背側縫線核は縫線核群の中でも特に覚醒反応への関与の度合いが大きい。この理由により、本報告では、背側縫線核を測定の対象として選択した。

これまで、SIDS児の死亡前のpolysomnographyによる解析結果では、中枢性無呼吸の長さが長くなり、閉塞性あるいは混合型無呼吸の頻度が増加すると報告され(10)、更に最近の報告で閉塞性無呼吸が多いと報告されている(11)。本報告において、アポトーシス陽性神経細胞数は中枢性無呼吸の長さとの相関関係にあった。更に、今後、閉塞性無呼吸あるいは混合型無呼吸との関係について精査が望まれる。

E. 結論

乳幼児突然死症候群を含むSUD 33事例において、中枢性無呼吸の長さの中脳背側縫線核におけるアポトーシス陽性細胞数との間に有意な相関関係が見いだされた。この相関の有意性は、無呼吸からの覚醒

過程になんらかの器質的な変化が関与している可能性を示唆する。

F. 研究発表

1. 論文発表

Sawaguchi T, Jasani B, Knight B. Identification of apoptotic cell nuclei in postmortem skin biopsies using the TUNEL reaction: effect of post-mortem time interval. Acta Crim Japon. 63:39-43, 1997.

2. 学会発表

Sawaguchi T, Kahn A et al: Apnea and nesral apoptosis in arousal pathway. The 10th ESPID (European Society for the study and Prevention of Infant Death) Conference. Jerusalem 5.30-64., 1999

文献

- 1 Steinschneider A. Prolonged apnea and the sudden infant death syndrome, clinical and laboratory observations. Pediatrics 50:64-62, 1997.
- 2 McCulloch K, Brouillette RT, Guzzetta AJ. Arousal responses in near-miss sudden infant death syndrome and normal infants. J Pediatr 101:911-917, 1982.
- 3 Hunt CE, McCulloch K, Brouillette RT. Diminished hypercapnic arousal responses and prediction of subsequent apnea in apnea of infancy. Pediatrics 75:848-854, 1981.
- 4 Takashima S, Mito T, Yamanouchi H. Developmental brain-stem pathology in sudden infant death syndrome. Acta Paediatrica Japonica 36:317-320, 1994.
- 5 Ferrer I, Tortosa A, Macaya A, Sierra A, Moreno D, Munell F, Blanco R, Squier W. Evidence of nuclear DNA fragmentation following hypoxia-ischemia in the infant rat brain, and transient forebrain ischemia in the adult gerbil. Brain Pathol 4:115-122, 1994.
- 6 Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119:493-501, 1992.
- 7 Waters KA, Meehan B, Huang Roy JQ, Gravel A, Michaud J, Cote A. Neuronal apoptosis in sudden infant death syndrome. Pediatr Res 45:166-172, 1999.
- 8 川合史史. 脳における細胞死と生存. 生体の科学. 47:33-38, 1996.
- 9 水戸敬、高嶋幸男、大浜栄作. 重症心身障害児・者における脳幹機能障害についての研究—突然死症例についての検討. 厚生省精神・神経疾患研究委託費 重症心身障害児の病態・長期予後と機能改善に関する研究 平成7年度報告書 黒川徹編 p.33-37, 1995.

10.Kahn A,Blum D,Rebuffat E. Polysomnographic studies of infants who subsequently died of sudden infant death syndrome. *Pediatrics* 82:721-727,1988.

11.Kahn A, Groswasser J, Rebuffat E.Sleep and cardiorespiratory characteristics of infant death: A prospective case-control study. *Sleep* 15:287-292,1992.