

令和元年9月3日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10095

研究課題名(和文) ハイドロゲン・ナノバブルを用いた壊死性腸炎に対する画期的治療法の開発

研究課題名(英文) Protective effects of hydrogen-rich nanobubble water on experimental necrotizing enterocolitis model in neonatal rats.

研究代表者

川野 孝文 (KAWANO, Takafumi)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40457651

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)：まず(1)投与経路の検討(2)投与時期の検討を施行した。腹腔内投与と消化管投与では、発生率に優位な差は認めなかったが、投与しない群と比べて優位に発生率の低下を認めた。腹腔内投与を採用。コントロール群として生食を投与した。生後48時間後より投与開始した群ではNECスコアは平均 $1.5 \pm 0.56$ 点、早期投与群では $1.0 \pm 0.62$ 点で傾向はあるものの、優位差は認めなかった。生化学的検討、または、分子生物学的検討を行った。壊死性腸炎の発生率の減少、生存率には改善が得られた。サイトカインや、酸化ストレスの指標の評価も行ったが、傾向は認めるものの優位差は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NECの明らかな原因については追求することができなかったが、酸化ストレスもその一因であることが示唆されるとともに、水素投与することにより、予防できる可能性が示唆された。成人領域では現実に臨床応用されつつあり、新生児でも応用が期待できるとともに、予後改善が期待できる。

研究成果の概要(英文)：(1) Intraperitoneal administration vs. digestive tract administration (2) Early administration vs. late administration. implemented. Although there was no significant difference between the intraperitoneal administration and the gastrointestinal administration in both cases, the administration showed a significant reduction in incidence compared to the group not administered. Therefore, a simple intraperitoneal administration was adopted. The NEC score averaged  $1.5 \pm 0.56$  points in the group starting administration at 48 hours after birth and was  $1.0 \pm 0.62$  in the early administration group. Although there was a trend, it did not recognize superiority. Immunostaining of cytokines was performed as biochemical examination or molecular biological examination. The incidence of necrotizing enterocolitis was reduced and the survival rate improved. We also evaluated the indicators of cytokines and oxidative stress, and we found a trend.

研究分野：小児外科

キーワード：壊死性腸炎 水素ガス ハイドロゲンナノバブル 酸化ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

壊死性腸炎(NEC)は、腸管機能の未熟な低出生体重児に多く発症し、腸粘膜の虚血性壊死を主病変とする疾患で、新生児集中治療室における患児の1~5%に発症する。周産期医療の進歩で低出生体重児の救命率は向上したが、日本小児外科学会における5年毎の新生児外科統計では2013年集計分でNECを中心とする消化管穿孔の死亡率は18.5%であり2008年の15.5%と比較して死亡率が図1 新生児外科統計(死亡率)がむしろ増加している。これは近年、新生児外科疾患において(日本小児外科学会集計データ)死亡率が上昇した疾患群の一つである。症例数自体も増えている疾患群であり、予防、治療法の開発は急務であると思われる。NECの原因としては、腸管未熟性、低酸素エピソード、人工乳投与などの関連が指摘されている一方で、そのメカニズムについては十分解明されていない。しかし最近では、その他の炎症性疾患、虚血疾患と同様にフリーラジカルによる障害の関与も報告されている。一方でOhsawaらが、2007年に水素分子が抗酸化作用を有していることをNature Medicineに報告して以降、心筋、肝、精巣など、様々な虚血モデル動物による実験において、水素ガスおよび過水素水投与が組織障害を防ぐことが報告がされてきた。水素を投与すると、水素そのものがフリーラジカルであるOH<sup>-</sup>と結合し、H<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup>になることで作用すると考えられている。

NECは依然として致死率が高い疾患で、有効な治療法が確立されていない。

水素ガス投与で酸化ストレスを軽減させること、水素ガス投与自体が酸化ストレスを抑える以外に、腸管内細菌叢へも直接影響し、抗酸化作用以外の作用も期待でき、壊死性腸炎を予防と治療する新たな管理方法を開発することが可能であるとの着想に至った。

## 2. 研究の目的

近年、医療分野において水素を新たな抗酸化物質として治療に用いる研究が進んでおり、生体内でのフリーラジカルによる障害を軽減することが知られている。一方、新生児壊死性腸炎は未熟児に発症する腸管の未熟性、感染等による炎症等を原因とする腸管の壊死を伴う腸管不全であり、発症すれば高率な死亡率(約20~40%)を有する疾患である。人工栄養や感染など、複合的な原因で発症すると考えられているが、フリーラジカルによる障害が原因の一つとして報告されている。当研究は、本邦では当教室のみで確立している壊死性腸炎モデルラットを用いて、入手が容易かつ、安価かつ、どの施設でも導入可能な水素ガスを用いたハイドロゲン・ナノバブルを作成することによって、壊死性腸炎に対する新たな画期的な予防・治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

新生仔ラット(Sprague-Dawley rat)5-7gを、出産予定日に帝王切開で出生させ、生後2時間目からヒト用粉ミルク5g+小動物用ミルク75mlを0.1~0.25mlを6時間おきに経管的投与する。NECモデルは、低酸素刺激(100%窒素ガス5分間吸入)を1日4回4日間継続。生後1日目と2日目にE.coli由来リポポリサッカライド(LPS)を4mg/kg経管投与を行う。臨床的にNEC発症時と96時間後に全生存ラットを犠牲せしめ全消化管を摘出する。

ナノバブル水を用いて(1)投与経路の検討 腹腔内投与 vs 消化管内投与(2)投与時期の検討 早期投与 vs 晚期投与 早期投与群(予防的投与群)：生後と6時間毎に投与する 晚期投与群(治療的投与群)：生後48時間後より投与開始し、6時間毎に投与する。

NECモデルに対する治療効果の判定として病理組織学的検討を行う。必要に応じてハイドロゲン・ナノバブルの投与プロトコールを変更しつつもっとも効果の高い投与方法を決定する。

1)全腸管長、生存率 2)組織学的検討:絨毛長、陰窩深を測定。空腸と回腸に Hematoxylin-Eosin 染色を行い組織障害をスコアリング、NEC モデルに対するハイドロゲン・ナノバブルの治療効果や予防効果のメカニズムについての検討を行う。サイトカイン、核内蛋白レベルの検討、その他の酸化ストレスの指標を測定する。

#### 4 . 研究成果

(1)投与経路の検討 腹腔内投与 v s 消化管内投与(2)投与時期の検討 早期投与 v s 晩期投与。また、早期投与群(予防的投与群) : 生後と6時間毎に投与する群と晩期投与群(治療的投与群) : 生後48時間後より投与開始し、6時間毎に投与する群とに分けて、施行した。腹腔内投与と消化管投与では、両方で発生率に優位な差は認めなかったが、投与することにより、投与しない群と比して優位に発生率の低下を認めた。なので簡易的な腹腔内投与を採用した。コントロール群として生食を同量投与した。生後48時間後より投与開始した群では NEC スコアは平均  $1.5 \pm 0.56$  点 早期投与群では  $1.0 \pm 0.62$  点であった。傾向はあるものの、優位さは認めなかった。生化学的検討、または、分子生物学的検討としてサイトカインの免疫染色を行った。壊死性腸炎の発生率の減少、生存率には改善が得られた。サイトカインや、酸化ストレスの指標の評価もあわせて行ったが、傾向は認めた。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 13 件)

1. Kawano T、Idesako T、Eura R、Sugita K、Moriguchi T、Yamada K、Onishi S、Yamada W、Nakame K、Mukai M、Kaji T、Nakagawa M、Ieiri S、Cystoscope-Assisted Laparoscopic Resection of Mullerian Duct Remnant in a Male Presenting with Uterus and Vagina. Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques & Part B:Videoscopy、28(1) 2018 査読有り <https://doi.org/10.1089/vor.2017.0430>
2. Mukai Motoi、Kaji Tatsuru、Masuya Ryuta、Yamada Koji、Sugita Koshiro、Moriguchi Tomoe、Onishi Shun、Yamada Waka、Kawano Takafumi、Machigashira Seiro、Nakame Kazuhiko、Takamatsu Hideo、Ieiri Satoshi、Long-term outcomes of surgery for choledochal cysts: a single-institution study focusing on follow-up and late complications、Surgery Today、48巻、2018、835~840 査読有り DOI:10.1007/s00595-018-1660-9
3. Onishi Shun、Kaji Tatsuru、Machigashira Seiro、Yamada Waka、Masuya Ryuta、Nakame Kazuhiko、Kawano Masato、Yano Keisuke、Yamada Koji、Kawano Takafumi、Mukai Motoi、Yoshioka Takako、Tanimoto Akihideo、Ieiri Satoshi、The effect of intravenous lipid emulsions and mucosal adaptation following massive bowel Resection、Journal of Pediatric Surgery、53巻、2018、2444~2448 査読有り DOI:10.1016/j.jpedsurg.2018.08.019
4. Masuya Ryuta、Kaji Tatsuru、Mukai Motoi、Nakame Kazuhiko、Kawano Takafumi、Machigashira Seiro、Yamada Waka、Yamada Koji、Onishi Shun、Yano Keisuke、Moriguchi Tomoe、Sugita Koshiro、Kawano Masato、Noguchi Hiroyuki、Suzuhigashi Masaya、Muto Mitsuru、Ieiri Satoshi、Predictive factors affecting the prognosis and late complications of 73 consecutive cases of esophageal atresia at 2 centers、Pediatric Surgery International、34巻、2018、1027~1033 査読有り DOI: 10.1007/s00383-018-4326-1
5. Kawano Takafumi、Hosomichi Kazuyoshi、Inoue Ituro、Shimono Ryuichi、Onishi Shun、

Nakame Kazuhiko, Kaji Tatsuru, Matsufuji Hiroshi, Ieiri Satoshi, Identification of a novel variant of the RET proto-oncogene in a novel family with Hirschsprung's disease, *Pediatric Surgery International*, 33巻、2017、1041 ~ 1046 査読有り

DOI:10.1007/s00383-017-4134-z

6. Kaji Tatsuru, Nakame Kazuhiko, Machigashira Seiro, Kawano Takafumi, Masuya Ryuta, Yamada Waka, Yamada Koji, Onishi Shun, Moriguchi Tomoe, Sugita Koshiro, Mukai Motoi, Ieiri Satoshi, Predictors of a successful outcome for infants with short bowel syndrome: a 30-year single institution Experience, *Surgery Today*, 47巻、2017、1391 ~ 1396 査読有り DOI:10.1007/s00595-017-1534-6
7. Suzuhigashi Masaya, Kaji Tatsuru, Noguchi Hiroyuki, Muto Mitsuru, Goto Michiko, Mukai Motoi, Nakame Kazuhiko, Kawano Takafumi, Yamada Waka, Yamada Koji, Onishi Shun, Ieiri Satoshi, Current characteristics and management of congenital esophageal stenosis: 40 consecutive cases from a multicenter study in the Kyushu area of Japan, *Pediatric Surgery International*, 33 巻、2017、1035 ~ 1040 査読有り  
DOI:10.1007/s00383-017-4133-0
8. Onishi Shun, Nakame Kazuhiko, Kaji Tatsuru, Kawano Masato, Moriguchi Tomoe, Sugita Koshiro, Yano Keisuke, Nomura Mioko, Yamada Koji, Yamada Waka, Masuya Ryuta, Kawano Takafumi, Machigashira Seiro, Mukai Motoi, Ieiri Satoshi, The bowel function and quality of life of Hirschsprung disease patients who have reached 18 years of age or older? the long-term outcomes after undergoing the transabdominal soave procedure, *Journal of Pediatric Surgery*, 52巻、2017、2001 ~ 2005 査読有り  
DOI:10.1016/j.jpedsurg.2017.08.036
9. Machigashira Seiro, Kaji Tatsuru, Onishi Shun, Yamada Waka, Yano Keisuke, Yamada Koji, Masuya Ryuta, Kawano Takafumi, Nakame Kazuhiko, Mukai Motoi, Ieiri Satoshi, The protective effect of fish oil lipid emulsions on intestinal failure-associated liver disease in a rat model of short-bowel syndrome, *Pediatric Surgery International*, 34巻、2017、203 ~ 209 査読有り DOI: 10.1007/s00383-017-4190-4
10. Kawano T, Kaji T, Onishi S, Yamada K, Yamada W, Nakame K, Mukai M, Ieiri S, Efficacy of ethanol locks to reduce the incidence of catheter-related bloodstream infections for home parenteral nutrition pediatric patients: comparison of therapeutic treatment with prophylactic treatment., *Pediatric surgery international*, 32 巻、2016、863-867 査読有り doi: 10.1007/s00383-016-3933-y
11. Yamada W, Kaji T, Onishi S, Nakame K, Yamada K, Kawano T, Mukai M, Souda M, Yoshioka T, Tanimoto A, Ieiri S, Ghrelin improves intestinal mucosal atrophy during parenteral nutrition: An experimental study., *Journal of pediatric surgery*, 51 巻、2016、2039-2043 査読有り doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.035
12. Onishi S, Nakame K, Yamada K, Yamada W, Kawano T, Mukai M, Kaji T, Ieiri S, Long-term outcome of bowel function for 110 consecutive cases of Hirschsprung's disease: Comparison of the abdominal approach with transanal approach more than 30years in a single institution - is the transanal approach truly beneficial for bowel function, *Journal of pediatric surgery*, 51 巻、2016、2010-2014 査読有り doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.029

13. Kaji T, Kawano T, Yamada W, Yamada K, Onishi S, Nakame K, Mukai M, Ieiri S, Takamatsu H, The changing profile of safe techniques for the insertion of a central venous catheter in pediatric patients - improvement in the outcome with the experiences of 500 insertions in a single institution., Journal of pediatric surgery, 51 巻、2016、2044-2047 査読有り doi: 10.1016/j.jpedsurg.2016.09.037

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 川野孝文、宗崎 良太、木下 義晶、菱木 知郎、田尻 達郎、米田 光宏、大植 孝治、黒田 達夫、越永 従道、檜山 英三、仁尾 正記、猪股裕紀洋、田口 智章、家入里志、神経芽腫に対する内視鏡外科手術の適応基準の作成と標準化へ向けた挑戦 全国調査からみた現状と集約化および臨床試験へ向けた可能性、第118回日本外科学会定期学術集会、2018
2. 川野 孝文、井手迫 俊彦、向井 基、山田 和歌、川野 正人、矢野 圭輔、大西 峻、山田 耕嗣、榊屋 隆太、町頭 成郎、中目 和彦、加治 建、家入 里志、膣形成術を行った総排泄腔奇形症例の検討、日本小児泌尿器科学会、2018
3. 川野 孝文、向井 基、矢野 圭輔、大西 峻、山田 和歌、山田 耕嗣、榊屋 隆太、町頭 成郎、中目 和彦、加治 建、家入 里志、巨大後腹膜奇形腫に対する外科的治療戦略 15例の検討からみた摘出方法に関する考察、日本小児外科学会、2018
4. Kawano T, Moriguchi T, Sugita K, Onishi S, Yamada K, Masuya R, Machigashira S, Nakame K, Mukai M, Kaji T, Ieiri S, An optimal operative strategy for huge retroperitoneal teratomas in children based on single institute experiences -No hesitation of split resection for preventing vascular injury and renal dysfunction-, The 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2017
5. Kawano T, Hosomichi K, Inoue I, Onishi S, Nakame K, Kaji T, Ieiri S, Impact of New Mutation Identification in the RET proto-oncogene in a Family, The 49<sup>th</sup> Pacific Association of Pediatric Surgeons, 2016
6. Kawano T, Hosomichi K, Inoue I, Onishi S, Nakame K, Mukai M, Kaji T, Ieiri S, Impact of New Mutation Identification in the RET Proto-oncogene in a Family with Hirschsprung's Disease, The 29<sup>th</sup> International Symposium on Pediatric Surgical Research, 2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：家入 里志

ローマ字氏名：IEIRI, Satoshi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号(8桁): 00363359

研究分担者氏名：加治 建

ローマ字氏名：KAJI, Tatsuru

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：附属病院  
職名：特例教授  
研究者番号(8桁): 50315420

研究分担者氏名：向井 基  
ローマ字氏名：MUKAI, Motoi  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：医歯学域医学系  
職名：准教授  
研究者番号(8桁): 80468024

研究分担者氏名：中目 和彦  
ローマ字氏名：NAKAME, Kazuhiko  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：附属病院  
職名：講師  
研究者番号(8桁): 70448570

研究分担者氏名：山田 和歌  
ローマ字氏名：YAMADA, Waka  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：附属病院  
職名：特任助教  
研究者番号(8桁): 20457659

研究分担者氏名：山田 耕嗣  
ローマ字氏名：YAMADA, Koji  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：附属病院  
職名：特任助教  
研究者番号(8桁): 80528042

研究分担者氏名：大西 峻  
ローマ字氏名：ONISHI, Shun  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：附属病院  
職名：特任助教  
研究者番号(8桁): 10614638

研究分担者氏名：谷本 昭英  
ローマ字氏名：TANIMOTO, Akihide  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：医歯学域医学系  
職名：教授  
研究者番号(8桁): 10217151