

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11515

研究課題名(和文)救命困難な超重症NECに対する大建中湯を用いた実験的予防法開発

研究課題名(英文) Development of experimental prevention using Daikenchuto for extremely severe neonatal necrotizing enteritis

研究代表者

榎屋 隆太 (Masuya, Ryuta)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：90448572

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：新生児壊死性腸炎(以下NEC)モデルラットを改良して重症化し、それに対して大建中湯の投与量ごとに分類し投与プロトコルを決定した。その後実際に投与実験を行った。犠死後のラットから摘出した腸管を組織学的に解析し、NECの重症度と大建中湯投与量との関連性を評価した。また組織内の炎症性サイトカイン、核内蛋白を定量し、大建中湯投与量との相関を評価した。その結果、(1)大建中湯の投与は、組織学的評価に基づいてNECのグレードを低下させる傾向があり、(2)大建中湯の高用量(1.0g/kg/日)投与は、NECの発生率を有意に改善し、(3)IL-6陽性細胞の発生率を有意に低下させることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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ある。新生児集中治療室における患児の1～5%に発症し、新生児その他の疾患に比較して高い死亡率を示す原因不明の疾患である。本研究では重症NECモデルラットに大建中湯を投与する実験を行い、大建中湯投与によってNECの重症度を低く抑えられること、大建中湯の高用量投与によってNECの発症率を有意に改善することが明らかになった。

この結果が臨床応用されることにより、低出生体重児の生存率の改善に大いに寄与新生児のintact survivalの改善、少子高齢化時代における貴重児の健全な成長が見込まれる。

研究成果の概要(英文)：Neonatal necrotizing enterocolitis ("NEC") model rats were modified and severely affected, and Daikenchuto's Dosing protocols were determined for each dose. After that, actual dosing experiments were conducted. The intestinal tracts removed from rats after sacrifice death were analyzed histologically to determine the relationship between the severity of NEC and the dose of Daikenchuto. We also quantified the inflammatory cytokines and nuclear proteins in the tissues and assessed their correlation with the dose of Daikenchuto.

The results showed that (1) Daikenchuto administration reduced the grade of NEC based on histological evaluation tendency, and (2) high doses (1.0 g/kg/day) of Daikenchuto significantly reduced the incidence of NEC. improvement and (3) significantly reduced the incidence of IL-6-positive cells.

研究分野：小児外科学

キーワード：新生児壊死性腸炎 モデルラット 大建中湯 IL-6

## 1. 研究開始当初の背景

### ・壊死性腸炎 (Necrotizing Enterocolitis : NEC) について

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ある。新生児集中治療室における患児の 1~5%に発症し、新生児その他の疾患に比較して高い死亡率を示す。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むしろ増加している。理由としては様々な要因が考えられているが、より未熟な早産時の救命率が上がったこと、また、心疾患などの合併患児の救命率が向上したことなどがあるが、詳細は不明である。我々小児外科医が遭遇し、治療を担う可能性が高い門脈内ガスを伴い病変が全腸管に及ぶような超重症 NEC では広範囲腸管切除を行っても救命が極めて困難である。症例数自体も増えている疾患群であり、発症予防方法の開発は急務である。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。

Emani らは、腸管のバリア機構と粘膜免疫システムの未熟性が、未熟児における制御不能な負の炎症反応となり NEC を誘導するとしている。Grave らもホストのディフェンス機能は、炎症反応とアポトーシスの適度なバランスを維持することで成立するとしている。つまり NEC 発症予防には、血流障害とそれに伴う炎症性サイトカインの放出を抑制すること、腸管壁のバリア機構の破綻を防止することが重要となる。

我々の研究ループでは、これまでも NEC を含む腸管不全に対して一貫して基礎的臨床的研究を継続してきた。ラットの NEC モデルを確立し、Glucagon-like Peptide-2(GLP-2)の投与に抗炎症効果を実験的に確認して報告し、また抗真菌薬の投与による細胞レベルでの改善効果に関して実証して報告した。結果として短腸になった場合に対しても、グレリンを用いた腸管順応効果の報告や、2 次的に肝障害をきたした場合のグレリンの改善効果も実験的に確認し報告している。しかしながら、重症 NEC の発症を予防しうる研究に関しては未だ成果を見出せていなかった。

そこで我々は、これまでの GLP-2 やグレリン、抗真菌薬(ミコナゾール)に替わり、前述の発症要因を抑制し、発症を予防する可能性のある薬剤として、大建中湯に着目した。

### ・大建中湯の消化管への効果について

大建中湯は、乾姜、山椒、人参の生薬エキスを主成分とする漢方薬で、一般的にイレウスの治療に用いられている。近年、その下部消化管運動促進作用以外に、血流増加作用と炎症性サイトカインの抑制に働くことが示されつつある。さらに大建中湯は、消化管の血管拡張作用を有する血管作動性腸管ペプチド(VIP)を増加させる。一方 Kono らによると、クローン病ラットモデルに大建中湯を投与すると、腸管上皮細胞から分泌されるアドレノメデュリン(ADM)を介した腸管血流増加作用があることが示唆されている。Bacterial translocation は、炎症性サイトカインの増加により腸管上皮細胞のバリア機構が破綻し進行するものである。これら炎症性サイトカインと bacterial translocation の発現抑制に対しても大建中湯が有効であることが報告されている。

以上から我々は、大建中湯の腸管蠕動促進作用、腸管血流増加作用、抗炎症作用に着目し、NEC の発症予防効果があると考えた。

## 2. 研究の目的

- ( )重症 NEC モデルラットに大建中湯を投与することにより、その作用効果を明らかにする。
  - ( )炎症・凝固反応の観点から NEC のサイトカインシグナル伝達の関連を解明し、大建中湯の投与により発現する炎症性サイトカインの抑制の機序を解明し、さらに大建中湯を用いた NEC の新規予防法を開発する。
- 以上を目的とした。

## 3. 研究の方法

重症 NEC モデルラットを用いて大建中湯による予防効果の検討とそのメカニズムの解析を行った。動物モデルに関してはすでに当研究グループで確立していたが、手法を改良して重症モデルを作成して投与実験を行い、もっとも効果的な投与経路と投与量を決定した。投与実験で擬死したラットの腸管組織における NEC の予防効果の判定を主に組織学的によりスコア化して行った。

重症 NEC モデルに対する大建中湯の予防効果のメカニズムについてサイトカイン、核内蛋白レベルにて検討を加えた。炎症・凝固反応の面から検討するため ELISA 法を用い腸管組織内腸管組織内のサイトカインの網羅的解析を行い、サイトカインシグナル伝達を解明すった。

#### 4 . 研究成果

(1)大建中湯の投与は、組織学的評価に基づいて NEC のグレードを低下させる傾向があり、(2)大建中湯の高用量 ( 1.0g/kg/日 ) 投与は、NEC の発生率を有意に改善し、(3) IL-6 陽性細胞の発生率を有意に低下させることが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 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	4. 巻 34
2. 論文標題 Predictive factors affecting the prognosis and late complications of 73 consecutive cases of esophageal atresia at 2 centers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1027 ~ 1033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s00383-018-4326-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 榎屋 隆太、家入 里志、連 利博、中目 和彦、川野 孝文、春松 敏夫、山田 和歌、町頭 成郎、向井 基、加治 建	4. 巻 54
2. 論文標題 胆道閉鎖症葛西手術後患者における自己肝生存率に対する予後因子の検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1324 ~ 1331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.11164/jjsps.54.7_1324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 連 利博, 榎屋隆太, 向井 基, 家入里志	4. 巻 50
2. 論文標題 GvHD仮説からみた成因と発症時期	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 16 - 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moriguchi Tomoe, Machigashira Seiro, Sugita Koshiro, Kawano Masato, Yano Keisuke, Onishi Shun, Yamada Koji, Yamada Waka, Masuya Ryuta, Kawano Takafumi, Nakame Kazuhiko, Mukai Motoi, Kaji Tatsuru, Ieiri Satoshi	4. 巻 29
2. 論文標題 A Randomized Trial to Compare the Conventional Three-Port Laparoscopic Appendectomy Procedure to Single-Incision and One-Puncture Procedure That Was Safe and Feasible, Even for Surgeons in Training	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques	6. 最初と最後の頁 392 ~ 395
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1089/lap.2018.0195	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 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 Akihide, Ieiri Satoshi	4. 巻 53
2. 論文標題 The effect of intravenous lipid emulsions and mucosal adaptation following massive bowel resection	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 2444 ~ 2448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.08.019">https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2018.08.019</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Onishi Shun, Kaji Tatsuru, Yamada Waka, Nakame Kazuhiko, Machigashira Seiro, Kawano Masato, Yano Keisuke, Harumatsu Toshio, Yamada Koji, Masuya Ryuta, Kawano Takafumi, Mukai Motoi, Hamada Taiji, Souda Masakazu, Yoshioka Takako, Tanimoto Akihide, Ieiri Satoshi	4. 巻 106
2. 論文標題 Ghrelin stimulates intestinal adaptation following massive small bowel resection in parenterally fed rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptides	6. 最初と最後の頁 59 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.06.009">https://doi.org/10.1016/j.peptides.2018.06.009</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 48
2. 論文標題 Long-term outcomes of surgery for choledochal cysts: a single-institution study focusing on follow-up and late complications	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 835 ~ 840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/s00595-018-1660-9">https://doi.org/10.1007/s00595-018-1660-9</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Baba Tokuro, Mukai Motoi, Masuya Ryuta, Kawano Masato, Yano Keisuke, Murakami Masakazu, Onishi Shun, Yamada Koji, Yamada Waka, Kawano Takafumi, Machigashira Seiro, Nakame Kazuhiko, Kaji Tatsuru, Ieiri Satoshi	4. 巻 35
2. 論文標題 The long-term health-related quality of life in patients operated for choledochal cyst	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 539 ~ 546
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="https://doi.org/10.1007/s00383-019-04456-7">https://doi.org/10.1007/s00383-019-04456-7</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaji Tatsuru, Nakame Kazuhiko, Machigashira Seiro, Kawano Takafumi, Masuya Ryuta, Yamada Waka, Yamada Koji, Onishi Shun, Moriguchi Tomoe, Sugita Koshiro, Mukai Motoi, Ieiri Satoshi	4. 巻 47
2. 論文標題 Predictors of a successful outcome for infants with short bowel syndrome: a 30-year single-institution experience	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1391 ~ 1396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-017-1534-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikee Takamasa, Onishi Shun, Mukai Motoi, Kawano Takafumi, Sugita Koshiro, Moriguchi Tomoe, Yamada Koji, Yamada Waka, Masuya Ryuta, Machigashira Seiro, Nakame Kazuhiko, Kaji Tatsuru, Ieiri Satoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 A comparison of the characteristics and precision of needle driving for right-handed pediatric surgeons between right and left driving using a model of infant laparoscopic diaphragmatic hernia repair	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1103 ~ 1108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-017-4144-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 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	4. 巻 52
2. 論文標題 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	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 2001 ~ 2005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpedsurg.2017.08.036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Machigashira Seiro, Kaji Tatsuru, Onishi Shun, Yamada Waka, Yano Keisuke, Yamada Koji, Masuya Ryuta, Kawano Takafumi, Nakame Kazuhiko, Mukai Motoi, Ieiri Satoshi	4. 巻 34
2. 論文標題 The protective effect of fish oil lipid emulsions on intestinal failure-associated liver disease in a rat model of short-bowel syndrome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 203 ~ 209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-017-4190-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 連 利博, 榎屋隆太, 向井 基, 家入里志	4. 巻 48
2. 論文標題 GvHD仮説からみた成因と発症時期	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 16~20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shinyama Shin, Kaji Tatsuru, Mukai Motoi, Nakame Kazuhiko, Matsufuji Hiroshi, Takamatsu Hideo, Ieiri Satoshi	4. 巻 33
2. 論文標題 The novel preventive effect of Daikenchuto (TJ-100), a Japanese herbal drug, against neonatal necrotizing enterocolitis in rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1109~1114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-017-4145-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Masuya R, Muraji T, Ohtani H, Mukai M, Onishi S, Harumatsu T, Yamada K, Yamada W, Kawano T, Machigashira S, Nakame K, Kaji T, Ieiri S
2. 発表標題 Morphometrical analyses on the narrowing of portal veins and thickening of media of hepatic arteries in the liver of biliary atresia.
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masuya R, Kaji T, Murakami M, Yano K, Baba T, Harumatsu T, Onishi S, Yamada K, Yamada W, Kawano T, Machigashira S, Mukai M, Nakame K, Mukai M, Ieiri S
2. 発表標題 The physical growth and social prognosis of esophageal atresia patients who reach 15 years of age or older: The long-term outcomes at a single institution
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎屋隆太, 連 利博, 矢野圭輔, 大西 峻, 山田耕嗣, 山田和歌, 川野孝文, 中目和彦, 向井 基, 加治 建, Sami B Kanaan, J Lee Nelson, 家入里志
2. 発表標題 定量的PCRを用いた母親由来キメラ細胞の定量および母児間混合リンパ球培養との比較検討を行った胆道閉鎖症患児の1例
3. 学会等名 第45回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎屋隆太, 連 利博, 大谷明夫, 矢野圭輔, 大西 峻, 山田耕嗣, 山田和歌, 川野孝文, 中目和彦, 向井 基, 加治 建, 家入里志
2. 発表標題 胆道閉鎖症の葛西手術時肝生検検体における門脈枝および肝動脈枝の形態計測学的検討
3. 学会等名 第45回日本胆道閉鎖症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masuya R, Muraji T, Ohtani H, Mukai M, Yano K, Kawano M, Onishi S, Yamada K, Yamada W, Kawano T, Machigashira S, Nakame K, Kaji T, Ieiri S
2. 発表標題 Morphometrical analyses on narrowing of portal veins and thickening of hepatic arteries in liver of biliary atresia.
3. 学会等名 The 51st Annual Scientific Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎屋隆太, 加治 建, 矢野圭輔, 大西 峻, 山田耕嗣, 山田和歌, 川野孝文, 町頭成郎, 中目和彦, 向井 基, 家入里志
2. 発表標題 15歳以上に到達した先天性食道閉鎖症術後患者に対する身体的・社会的長期予後の解析
3. 学会等名 第55回日本小児外科学会学術集会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 1.Masuya R, Nakame K, Moriguchi T, Sugita K, Onishi S, Yamada K, Yamada W, Kawano T,
2. 発表標題 Predictive factors affecting the prognosis and late complications of 73 consecutive cases of esophageal atresia in 2 centers of Kagoshima Prefecture over 30 years.
3. 学会等名 The 50th Annual Scientific Meeting of the Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	家入 里志 (leiri Satoshi) (00363359)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授  (17701)	
研究分担者	大西 峻 (Onishi Shun) (10614638)	鹿児島大学・附属病院・特任助教  (17701)	
研究分担者	川野 孝文 (Kawano Takafumi) (40457651)	鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員  (17701)	
研究分担者	加治 建 (Kaji Tatsuru) (50315420)	鹿児島大学・附属病院・特任教授  (17701)	
研究分担者	武藤 充 (Muto Mitsuru) (70404522)	鹿児島大学・附属病院・特任助教  (17701)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	中目 和彦  (Nakame Kazuhiko)  (70448570)	宮崎大学・医学部・講師    (17601)	
研究 分担者	町頭 成郎  (Machigashira Seiro)  (80404523)	鹿児島大学・歯学部附属病院・助教    (17701)	
研究 分担者	矢野 圭輔  (Yano Keisuke)  (30757919)	鹿児島大学・附属病院・特任助教    (17701)	