

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592397

研究課題名(和文) 超低出生体重児の消化管成熟に向けた治療戦略：肺サーファクタントを用いた動物実験

研究課題名(英文) A treatment strategy for the gastrointestinal development of extremely premature infants by administration of micelles derived from pulmonary surfactants and the vernix caseosa

研究代表者

西島 浩二 (NISHIJIMA, Koji)

福井大学・医学部・助教

研究者番号：80334837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、胎児が嚥下する羊水と、新生児が摂取する母乳の両者に、分子集合体ミセルが存在するという共通点に着目し、超低出生体重児の初期管理に有用な経腸栄養剤の開発を目的に立案された。肺サーファクタントとヒト胎脂を用いて作成したSTAミセル溶液(特許第4378531号)と肺サーファクタントが形成するミセルに類似した構造を持つ金コロイドリポソームを用いて、動物実験を行った。STAミセル溶液は、ウサギ胎仔小腸に対して局所的に作用し、胎仔小腸を動物実験による手術侵襲から保護した。また、ラット新生仔の壊死性腸炎の発症を抑制した。本研究を進めることで、新たな視点に立った消化管の成熟促進法の確立が期待される。

研究成果の概要(英文)：We prepared bovine pulmonary surfactant and vernix caseosa complexes (STA micelle solution), and fluorescently gold colloid liposomes with morphology similar to that of pulmonary surfactant micelles. STA micelle solution and fluorescently gold colloid liposomes were then continuously infused into the amniotic fluid of pregnant rabbits. The continuous administration of STA micelle solution might locally influence the intestinal morphology and lipid absorption of the rabbit fetus, thus protecting the enterocytes from damage due to surgical intervention. We also focused on a necrotizing enterocolitis (NEC) newborn rat model. STA micelle solution reduced the severity of NEC by intervening in the apoptotic pathway. Our study is aiming to establish a treatment strategy to ensure the gastrointestinal development of extremely premature infants, by focusing on the presence of micelles in the environment of fetuses and neonates.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：肺サーファクタント 胎脂 ミセル 壊死性腸炎 超低出生体重児

1. 研究開始当初の背景

超低出生体重児の intact survival を目指す上で、肺成熟と並び重要な課題は消化管機能の成熟であるが、なお未解決の分野である。

妊娠後期には、羊水中に急激に濁りが生じる (Hook GE et al. Am Rev Respir Dis. 1978)。申請者は、この羊水の濁りは、肺サーファクタントが胎脂を取り囲んで“分子集合体ミセル”を形成し、羊水中に分散するための現象であることを明らかにした (Nishijima K, et al. Fetal Diag Thera. 2005, Nishijima K, et al. Pediatr Res. 2006)。本来、生体の保護フィルムとして働くはずの胎脂が妊娠後期に皮膚から剥がれ落ちる事実は、胎脂がそれ以外の役割を担う可能性を示唆する。一方、乳汁中の主要なエネルギー源である長鎖脂肪酸は腸管内で胆汁酸と反応し、ミセル構造をとることで消化管から吸収される。

本研究は、胎児が嚥下する羊水と、新生児が摂取する母乳の両者に、“分子集合体ミセル”が存在するという共通点に着目し、超低出生体重児の初期管理に有用な経腸栄養剤の開発を目的に立案された。

これまでの研究により、肺サーファクタント製剤 (サーファクテン[®]: STA, 田辺三菱製薬株式会社) とヒト胎脂を用いて作成した STA ミセル溶液 (特許第 4378531 号) は、ウサギ胎児小腸に対して、形態的、機能的変化をもたらした。STA ミセル溶液が、ウサギ胎児小腸を、動物実験による手術侵襲から保護したと考えている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの研究成果を踏まえた上で、動物実験により以下の点を明らかにすることである。

(1) STA ミセル溶液の羊水腔内投与後の体内動態。

(2) STA ミセル溶液には、新生児壊死性腸炎の予防効果があるのか。

3. 研究の方法

(1) これまでの研究成果からは、STA ミセル溶液のもつ消化管の保護作用は、小腸上皮を覆うことによってもたらされると推測された。STA ミセル溶液の体内動態をさらに詳細に観察するために、肺サーファクタントが形成するミセルに類似した構造を持つ PKH26 (Sigma-Aldrich Co.) 標識リポソームに、粒子径 5 nm の金コロイド粒子 (EMGC5, British BioCell International, Ltd.) を結合させた金コロイドリポソームを作成し、妊娠ウサギへの投与と実験を行った。妊娠 25 日目のウサギ羊水腔内にミニ浸透圧ポンプを留置し、一定流速で金コロイドリポソームを投与し

た。投与開始後 3 日目に、羊水および、胎児胃、小腸、肝臓を摘出し、検討に供した。

羊水、胃内容液、腸管洗浄液から作成した各標本にネガティブ染色を施し、透過型電子顕微鏡を用いて観察した。また、ウサギ胎児小腸と肝臓から作成した組織標本から超薄切片を作成し、金コロイド粒子の臓器分布を観察した。

(2) 肺サーファクタントと胎脂のもつ消化管の保護作用に着目した。Güven らの方法 (J Pediatr Surg. 2009) により新生仔ラットの壊死性腸炎モデルを確立した後、STA ミセル溶液による壊死性腸炎予防効果を検討した。壊死性腸炎の肉眼的ならびに組織学的重症度の評価は、Caplan のスコア (Gastroenterology. 1999) を用いて行った。また、摘出検体に TUNEL 染色を施し、アポトーシスインデックスを算出した。

4. 研究成果

(1) 採取した羊水、胃内容液、腸管洗浄液からは、金コロイドリポソームが検出された。次いで、小腸に強い取り込みを示した個体の小腸と肝臓の標本を、透過型電子顕微鏡で観察した。羊水中に投与された金コロイドリポソームは、ウサギ胎児に嚥下されて、小腸に到達した。その後、ファゴサイトーシスによって小腸上皮細胞内に取り込まれた (図 1)。しかしながら、胎児肝臓組織内で金コロイドリポソームを検出することは出来なかった。

金コロイドリポソームとミセルが同じ動態を示すとは限らないが、羊水腔内に投与された STA ミセル溶液もまた、胎児に嚥下されて、胎児小腸に到達すると推察する。STA ミセル溶液のもつ消化管の保護作用は、小腸上皮を覆うことによってのみもたらされるのではなく、小腸上皮に吸収された肺サーファクタントと胎脂が、小腸に対して、何らかの局所作用を及ぼしている可能性がある。

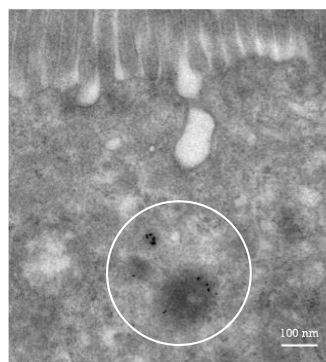


図 1. 胎児小腸上皮細胞内に取り込まれた金コロイドリポソーム (円内)

(2) 新生仔ラットが壊死性腸炎を発症すると、体重は、出生時よりも平均で 0.64 g 減少

した。しかしながら、STA ミセル溶液を予防的に投与することにより、わずかではあるが、体重が増える個体も現れた（平均 0.03 g の増加）。表 1 に、各群の生存率、肉眼的ならびに組織学的重症度スコア、アポトーシスインデックスの変化を示した。STA ミセル溶液を投与する事により、壊死性腸炎によるラット新生仔の死亡率が、66.7%から 31.0%へと改善した。また、STA ミセル溶液投与群は NEC 群に比べて、肉眼的重症度スコア、組織学的重症度スコア、アポトーシスインデックスの全ての項目において有意な改善を認めた（表 1）。

	Control (n = 27)	NEC (n = 27)	NEC + STA (n = 29)	P Value
Survival Rates (%)	92.6	33.3	69.0	-
Gross Score	0.32 ± 0.48	2.78 ± 0.44	1.42 ± 0.90	.0003
Histopathologic Score	0.44 ± 0.71	3.22 ± 0.83	2.26 ± 1.05	.0266
Apoptotic Indices	17.4 ± 7.5	68.6 ± 24.5	42.2 ± 25.7	.0148

表 1. 新生仔ラットの生存率、肉眼的ならびに組織学的重症度スコア、アポトーシスインデックスの変化

胎児は出生を境に、胎盤を通して母体から栄養が供給される“胎内環境”から、母乳を自立的に摂取する必要がある“胎外環境”に生活の場を移す。このような急激な変化から児の消化管を局所的に保護しているのが、羊水に含まれる肺サーファクタントと胎脂の成分であるのかもしれない。本研究は、新たな視点に立った経腸栄養剤の開発を目指している。また、本研究を進めることにより、肺サーファクタントの持つ胎児期の新たな役割が明らかになり、ヒト発生段階における肺-皮膚-消化器間の相互作用が解明されることを期待している。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計 2 件)

西島浩二. 超低出生体重児の消化管成熟に向けた治療戦略：肺サーファクタントと胎脂を用いた動物実験. 日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌. 査読有, 2013;44:20-22.

Nishijima K, Shukunami K, Yoshinari H, Takahashi J, Maeda H, Takagi H, Kotsuji F. Interactions among pulmonary surfactant, vernix caseosa, and intestinal enterocytes: Intra-amniotic administration of fluorescently liposomes to pregnant rabbit. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 査読有, 2012;303:L208-L214. doi:10.1152/ajplung.00081.2011

〔学会発表〕(計 7 件)

西島浩二, 第 1 回福井県周産期検討会において招請講演を行った。タイトル「超低出生体重児の消化管成熟に向けた治療戦略：肺サーファクタントと胎脂を用いた動物実験」(2013 年 10 月 31 日、福井)

西島浩二, 第 35 回社会医療法人愛仁会高槻病院総合周産期母子医療センター周産期公開カンファレンスにおいて特別講演を行った。タイトル「超低出生体重児の消化管成熟に向けた治療戦略：肺サーファクタントと胎脂を用いた動物実験」(2013 年 7 月 27 日、大阪)

西島浩二, XI World Congress of Perinatal Medicine においてポスター発表を行った。タイトル「A new treatment strategy for the gastrointestinal development of extremely premature infants: Administration of micelles derived from pulmonary surfactants and the vernix caseosa in pregnant rabbits.」(2013 年 6 月 19 日、Moscow, Russia)

西島浩二, 第 23 回鶴の会学術講演会において招請講演を行った。タイトル「超低出生体重児の消化管成熟に向けた治療戦略：肺サーファクタントと胎脂を用いた動物実験」(2013 年 3 月 10 日、福井)

西島浩二, 第 48 回日本肺サーファクタント・界面医学会学術研究会学術研究会シンポジウム「肺サーファクタント研究の新潮流」において講演を行った。タイトル「超低出生体重児の消化管成熟に向けた治療戦略：肺サーファクタントと胎脂を用いた動物実験」(2012 年 10 月 27 日、熊本)

西島浩二, 第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会において口演発表を行った。タイトル「超低出生体重児の消化管成熟に向けた治療戦略：肺サーファクタントと胎脂を用いた動物実験」(2012 年 4 月 13 日、神戸)

西島浩二, 第 47 回日本周産期・新生児医学学会学術集会において口演発表を行った。タイトル「超低出生体重児の消化管成熟に向けた治療戦略：肺サーファクタントと胎脂を用いた動物実験」(2011 年 7 月 12 日、札幌)

〔図書〕(計 1 件)

Nishijima K, Yoshida Y. Micelles: Structural Biochemistry, Formation and Functions & Usage. Nova Science Publishers, Inc. NY, 2103, pp.321

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

福井大学医学部産科婦人科学教室，周産期
医学研究，研究実績

<http://sankafujinka.com/intro/reserch2.html>

第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会に
於いて優秀演題賞を受賞した。

第 23 回鶴の会総会学術講演会に於いて鶴
の会学術奨励賞を受賞した。

6．研究組織

(1)研究代表者

西島 浩二（NISHIJIMA, Koji）

福井大学・医学部・助教

研究者番号：80334837