

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461646

研究課題名(和文) 新生児期における腸管の低酸素性虚血障害の病態生理と治療に関する研究

研究課題名(英文) The research for hypoxic-ischemic intestinal injury in neonate

研究代表者

久保 裕之 (Kubo, Hiroyuki)

香川大学・医学部・助教

研究者番号：30564116

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)：新生児期の低酸素性虚血性脳症(HIE)発症時には脳自体の障害だけでなく、同時に肝障害も来しており、この肝障害は、門脈周辺域(Zone1)の肝細胞への微小脂肪滴の蓄積として現れていた。さらに、その微小脂肪滴蓄積は、全身低体温治療により軽減されることが明らかとなった。この結果は、新しい発見であり、周産期新生児医療の発展に繋がるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy(HIE) affects not only brain per se but also liver. The HIE-induced liver injury is expressed by micro-lipid droplet accumulation in the cytoplasm of hepatocytes mainly in the periportal zone, and the accumulation is suppressed by therapeutic hypothermia. We consider that these results contribute to the clarification of pathology of HIE-induced liver injury and the establishment of treatment for neonatal HIE.

研究分野：小児外科

キーワード：新生児 低酸素性虚血性脳症 肝障害 脂肪滴 低体温治療 新生仔豚

## 1. 研究開始当初の背景

研究当初、生後 24 時間以内の新生仔豚に低酸素負荷をかけ、低酸素性虚血性脳症のモデルとし、その際に起こる腸管の虚血性障害を観察する予定であったが、本実験の負荷レベルでは明らかな腸管ダメージは現れていなかった。しかし腸管だけでなくその他の臓器も同時に病理学的評価を行ったところ、肝臓に障害が出現したことが明らかになったため、低酸素性虚血性脳症発症時の新生仔豚の肝臓を対象として実験を継続した。

周産期新生児医療領域で、低酸素性虚血性脳症 (HIE) は最も重大な病態の 1 つであるが、その治療は確立されたとは言いがたい。HIE は出生 1000 人中 1.64 人とされ、その 27% が新生児期に死亡し、生き残った大半も、脳性麻痺や精神遅滞、癲癇などの脳障害を有する。よって、HIE の治療戦略の確立は HIE 児の予後改善のために非常に重要である。

この HIE について様々な研究がなされているが、これまでは脳障害の病態解明、治療戦略の確立に重点を置かれていた。しかし HIE 発症時には脳障害だけでなく、同時に他臓器の障害も生じていることが知られており、特に重症 HIE 時は心障害 (62%)、腎障害 (70%)、肺障害 (86%)、そして肝障害 (85%) を生じることがわかっている。この他臓器障害は直接的な低酸素障害のみならず、Diving reflex、虚血再灌流障害、そして臓器障害の相互作用によるものと考えられている。特に HIE 関連肝障害の死亡率は高いとされるが、病理組織学的には証明されていない。従って、この HIE 関連肝障害を病理組織学的に証明することは HIE の今後の病態、治療の発展に貢献できるものと考えた。

また現在、新生児 HIE の治療として、低体温療法は唯一国際的に効果が認められた治療法であり、HIE の標準的な治療として推奨されている。サイトカイン活性や脳代謝を抑制することで脳保護が期待できる治療法であり、HIE 児の生命・神経学的予後を改善するものとして期待されている。低体温治療の HIE 時の肝障害への影響は分かっていないが、重症の肝炎時や移植時の肝保護には低体温治療が有効とされていることから、脳保護治療として用いられる低体温治療法は、同時に肝細胞の保護にも働いている可能性が考えられ、低酸素負荷によって引き起こされた肝細胞壊死、炎症細胞の浸潤、脂肪蓄積のいずれかによい影響を与えている可能性が考えられた。従って、脳保護に用いられる低体温治療が、HIE 関連肝障害に対してはどのように作用するのか病理組織学的に評価することは、全身治療として本当に標準化されるべきかどうかの重要な判断材料となる。

## 2. 研究の目的

HIE 発症時には肝臓においてこういった

変化が現れているのか、また全身低体温治療がその肝臓の変化にどのように影響するのかを、新生仔豚の HIE モデルを使用し、病理組織学的に証明する。

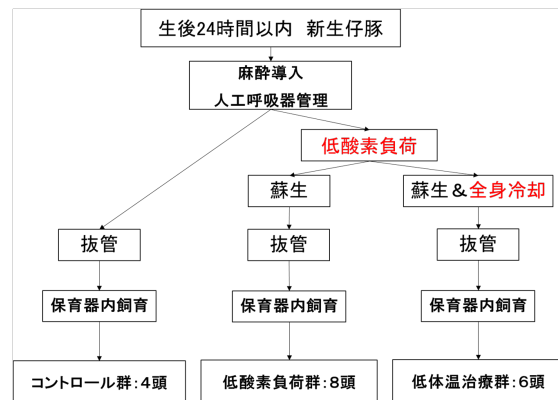
## 3. 研究の方法

生後 24 時間以内の新生仔豚を 18 頭用い、イソフルレンによる吸入麻酔を行い、臍静脈カテーテルを確保した後、フェンタニルの静脈投与を行い鎮静した。気管内挿管を行い、臭化パンクロニウム (筋弛緩剤) 使用下で人工呼吸管理を行った。

続いて以下の 3 群を作成

1. **コントロール群**: 全身麻酔後、24 時間後に抜管した。
2. **低酸素負荷群**: 低濃度酸素を吸入させ低酸素負荷をかけた後蘇生し 24 時間後に抜管した。
3. **低体温治療群**: 低濃度酸素を吸入させ低酸素負荷をかけた。蘇生と同時に 34 の低体温治療を開始し 24 時間継続した。その後抜管した。

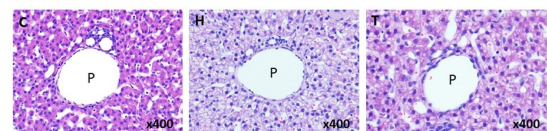
### 3 群の作成



全群において実験開始より 5 日目にイソフルレンの吸入麻酔下に開胸開腹を行い、全身臓器の還流を行った。肝臓を摘出し、ホルマリン固定を行った後、HE 染色と脂肪染色を行った。

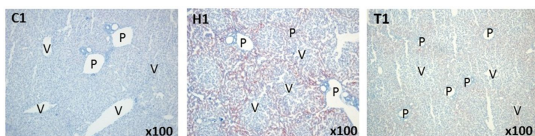
## 4. 研究成果

**HE 染色**: 肝細胞には壊死所見は認めなかったが、コントロール群に比べ、低酸素負荷群では細胞質の染まりが淡く、抜けている部位が目立った。



- C: コントロール群  
H: 低酸素負荷群  
T: 低体温治療群

**脂肪染色**：コントロール群に比べ、低酸素負荷群では、門脈周辺域の肝細胞質内に微小脂肪滴が多く蓄積していた。その微小脂肪滴蓄積は、低体温治療群では減少していた。



C1：コントロール群  
H1：低酸素負荷群  
T1：低体温治療群  
p：門脈  
v：中心静脈

実際の臨床の現場でも新生児仮死などによる重症HIE患児は血液データ上、肝障害を認める例が多く、この肝障害が栄養、感染、凝固系の面から児の予後に大きな影響を与えるため、HIE時の肝臓の病理学的な検討は重要であった。また今後、脳保護のための低体温治療が多く施設で行われていくことが予想される。この低体温治療が、肝臓にはどう影響するのかを病理学的に証明しておくことは、今後の治療確立のために非常に重要である。

これまでマウスやラットなどの小動物を用いてのHIE研究はなされているが、人に生理学的、遺伝学的に近い新生仔豚を用い、低酸素による肝障害を組織学的に評価した実験は世界で初めてである。特に、今回使用した動物モデルは、単に低酸素負荷をかけただけでなく、TRSを用いて脳血流、脳Hb濃度を測定しながら負荷をかけ、脳障害を引き起こす負荷レベルであることが前提であるため、実際のHIEの病態に近い。またそこから蘇生し、経口哺乳まで可能になったモデルであるため、長期生存を見据えた上での肝病態の把握に適している。

H&E染色では、いずれに群においても、肝細胞の壊死、炎症細胞浸潤は認めなかった。今回の実験による低酸素負荷では、明らかな低酸素性の肝細胞壊死、炎症細胞の浸潤は来さないレベルであると考えられた。しかしながら、コントロール群に比べ、肝臓の細胞質の空胞化が目立ったことから、脂肪の蓄積である可能性が推測された。

そこで脂肪部分のみが赤に染色されるOilOred染色を行った。この赤色に染まった脂肪のみをimageJを用いて計測したことで、各群の脂肪蓄積量を客観的に評価することができた。

脂肪染色により、低酸素負荷群ではコントロールに比し、門脈領域に脂肪蓄積が有意に認められた。虚血に弱い中心静脈周囲の細胞に

障害を生じるであろうとする仮説に反して、実験結果は逆であった。このメカニズムとして、肝細胞のZonationが考えられる。代謝にかかわる肝細胞は組織学的に領域により分類があり、特に門脈領域と中心静脈領域では活動する酵素や、構造が異なることが知られている。肝臓における脂質代謝は主に門脈周辺領域の細胞が担っていることから、低酸素ストレスにより、好氣的なエネルギーを取り出せない細胞は、酸化により脂肪の分解を行うことでエネルギーを取り出そうとするため門脈領域細胞に脂肪の取り込みが促進される。さらに低酸素ストレスによるミトコンドリアの障害により、取り込まれた脂肪を代謝できず、結果として門脈領域に小滴性脂肪が蓄積すると考えられた。この脂肪蓄積が本疾患における肝障害の最初の段階と推測され、さらに強い負荷が加わると中心静脈周辺領域に不可逆的な壊死がおきるのかもしれない。

低体温治療群では、低酸素負荷により門脈周辺領域に蓄積した微小脂肪滴が有意に減少していた。低体温治療の脳保護のメカニズムとして、細胞の代謝の抑制、各種サイトカインの抑制が示唆されているが、肝臓においても、同様の効果があると考えられた。つまり肝細胞の必要エネルギーを抑えることで、脂肪の蓄積を抑えることが考えられる。これまでHIEの治療として用いられる低体温治療の肝臓への影響は分かっていたが、今回の実験により、低体温治療はHIE時の肝臓の脂肪蓄積抑制すなわち肝細胞保護効果もあることが明らかとなった。今後は低体温の程度、時間に関する検討が課題と思われる。

本実験における肝障害のその他の可能性として、薬剤によるものが考えられるが、イソフルレンはむしろ肝保護作用があることが知られている。一方、フェンタニル、パンクロリウム、メイロン、フェノバルビタールの肝障害を病理学的に証明した報告は無かった。また臍静脈からの薬剤投与が門脈領域の障害に繋がっている可能性が考えられるが、いずれにしろ低体温療法で脂肪蓄積が減少したことは、これらの薬剤投与が不可欠である実際の臨床現場においても意味のある結果と考えられる。

新生児仮死によるHIE発症時には、特に門脈周辺域を中心に肝細胞障害をもきたしているため、栄養、感染、出血の面から、その管理には留意しなければならない。また低体温治療は脳保護効果があると同時にその肝細胞障害も抑制するため、治療として推奨されるべきと考えられる。この研究は、今後のHIEの治療確立に寄与できるものと考えている。

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)

( )

研究者番号：

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 新生仔豚を用いた新生児低酸素性虚血性脳症モデルにおける肝障害の病理組織学的検討. 2015年07月12日, 第51回日本周産期・新生児医学会(福岡県・福岡市)
2. 新生仔豚を用いた新生児低酸素性虚血性脳症モデルにおける肝障害の病理組織学的検討. 2015年05月20日, 第23回肝病態生理研究会(熊本県・熊本市)

〔図書〕(計0件)

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

久保 裕之(KUBO, Hiroyuki)  
香川大学 医学部 小児外科・助教  
研究者番号：30564116

### (2)研究分担者

下野 隆一(SHIMONO, Ryuichi)  
香川大学 医学部 小児外科・准教授  
研究者番号：60404521

### (3)連携研究者