

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462719

研究課題名(和文) 超低出生体重児におこる消化管疾患の発症メカニズム解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Discovering the etiology and new therapy for gastrointestinal disorders on extremely low birth weight infants.

研究代表者

大橋 研介 (OHASHI, Kensuke)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10526065

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)：臨床データを蓄積し、解析した結果、これまでの報告に類似し、胎便関連性腹膜炎(MO)は不当体重児(SGA児)に多く発症することが示唆された。特発性限局性腸管穿孔(SLIP)、MOの発症機序が、上腸間膜動脈と腎動脈の血管径の違いによる血流不均等や、インドメタシン投与による上腸間膜動脈と腎動脈の反応の差に伴う血流変化であると証明するには至らなかったが、腸管壁の脆弱性に着目し基礎研究をおこなったところ、疾患を発症した症例の腸管壁と在胎10週台の胎児腸管壁は同程度の発育を示していた。SLIP、MOの発症と胎児環境の関連を示すことができたものと考えている。

研究成果の概要(英文)：We analyzed clinical data of extremely low birth weight infants (ELBWI) who developed gastrointestinal disorders (SIP, MOP) on our NICU. As similar as other reports, our result indicated that MOP occurred more likely on SGA patients. We couldn't prove our hypothesis that the etiology of SIP and MOP were related to blood flow imbalance between renal artery (RA) and superior mesenteric artery (SMA) of ELBWI. Furthermore, vascular reaction against indomethacin administration seemed to have not been significant difference between RA and SMA. We focused on the vulnerability of intestinal wall of ELBWI and compared patients intestinal wall with control (fetal intestine of 10weeks gestation). The result indicated patient's intestinal wall thickness were as thin as 10weeks old fetal intestinal wall. This result implied that the patients who developed SIP or MOP had a potential risk factor while they were in utero.

研究分野：小児外科

キーワード：消化管穿孔 胎便関連性腸閉塞 超低出生体重児 インドメタシン

1. 研究開始当初の背景

近年、出生体重 1500g 未満の極・超低出生体重児の出生数が増加している。周産期医療の進歩により低出生体重児の救命率は劇的に改善しているが、特発性小腸穿孔 (spontaneous intestinal perforation, 以下 SIP) や胎便関連性腸閉塞症 (meconium obstruction of prematurity, 以下 MOP) などの消化管疾患を発症した児の予後が未だ不良である。これら消化管疾患の発症機序を解明し、その予防および早期診断・治療を行う事は周産期医療の喫緊の課題である。SIP や MOP などの低出生体重児に多い疾患は、早産児の出生後早期 (多くは 1 週間以内) に発症することが知られている。異なった疾患として捉えられている 2 疾患であるが、どちらの疾患も子宮内での腸管発育が不十分な状態で出生し、直後に胎児循環が急激に胎外循環に移行するという 2 条件が揃った時に発症することから、この 2 疾患は基本的に同一の疾患概念と考えるに至った。この疾患概念を Intestinal Maladaptation Syndrome of Prematurity (IMAP) と呼称し、その表現型として SIP や MOP といった疾患を捉えている (図 1)。SIP の発症要因に関する臨床研究は、これまでに国内外で多くの報告がある。中でも Attridge らによる米国の新生児データベースを用いた代表的な臨床研究では、出生後早期の indomethacin 投与が SIP 発症のリスク因子と結論付けている (Attridge JT, et al: J Perinatol, 26, 93-99, 2006)。国内においても indomethacin と SIP の関連を示唆する症例は多く報告されており、indomethacin の薬剤添付文書にも合併症として記載がされている。SIP の発症機序に関する基礎研究では、Gordon らが臨床研

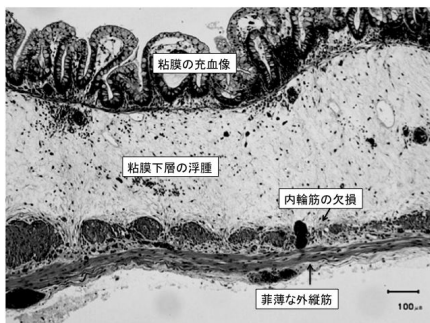
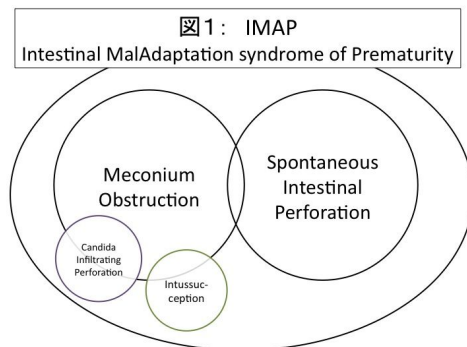


図2: MOPの腸管病理組織像(H-E染色)

究から導かれた結果を元に、新生児マウスに対し indomethacin と glucocorticoid 投与を行い消化管穿孔が発症する事を証明している (Gordon PV, et al: J Pediatr Gastroenterol Nutr, 45, 509, 2007.)。また Tatekawa らは組織学的検討から、先天性腸管筋層欠損が穿孔の原因とも報告している (Tatekawa Y, et al.: Pediatr. Surg. Int. 15, 549-52, 1999)。我々はこれらの報告すべてにおいて IMAP の概念で説明可能と考えている。当院および関連施設で経験した SIP の 30 症例に対して、穿孔部周囲の腸管病理組織を検討したところ、その多くで Tatekawa らの唱える腸管筋層の欠損と同時に、腸管壁内出血、腸管の充血・うっ血・浮腫といった強い循環動態の変化による影響を認めた (図 2)。indomethacin は、血管の収縮を起こす薬剤だが、多くの症例で indomethacin の投与後にも関わらず腸管虚血を示唆する所見はなく、むしろ血流増加所見が強くみられたことから、急激な腸管血流の増加によって脆弱な腸管が出血・穿孔したと考えられる。実際、低出生体重児の生後早期の SMA (上腸間膜動脈) 血流の変化を doppler 超音波で追跡した報告 (Leidig E.: Arc. Dis. Child. 64, 476-480, 1989) では、SMA の血流は動脈管閉鎖状態では非常に少なく、indomethacin の投与を契機に一度減少した後、SMA の血流は増加に転じることを明らかにした。そこで我々は以下のように SIP の発症仮説

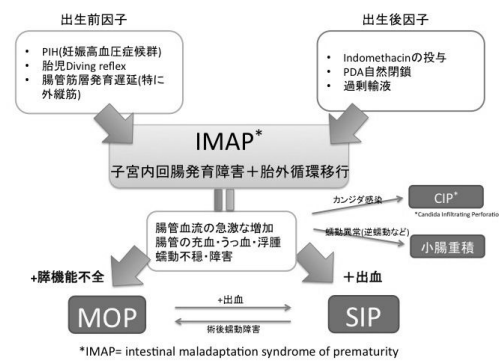


図3: IMAPの概念とSIP&MO

を立てた (図 3)。indomethacin 投与による動脈管閉鎖により胎児循環から胎外循環へ強制的に移行する結果、SMA 領域に多量の血液が流入し、腸管の充血・うっ血が進行する。中でも血管床の少ない回腸において血管が破綻し、腸管壁内で出血する。そして子宮内での発育不良のため筋層が菲薄であった出血部が穿孔に到る。MOP についてもほぼ同様のメカニズムで説明できると考えている。MOP では PIH (妊娠高血圧症候群) などの母体背景のため子宮内での腸管発育が不良 (主に回腸) であり、中でも縦走筋層が極端に薄いため長軸方向の腸管内容の輸送が困難である。また動脈管閉鎖により高度のうっ血・浮腫を来した小腸では蠕動がより困難となり、胎便が排

出できずに MOP を発症する。MOP では出血は来さないため穿孔には至らないが、脾機能が未熟なため胎便がより粘稠となり腸閉塞が増悪すると考えている。実際に臨床の場では、MOP と診断した症例が保存治療中に突然穿孔することがあり、また、SIP の診断で緊急開腹すると穿孔部周囲に胎便が充満し MOP 様であることなど診断の不明確な症例を経験するが、これらも IMAP の概念で説明可能である。

2. 研究の目的

我々は臨床研究と基礎的研究の両面から IMAP の概念を証明しようと考えた。臨床研究では、当院および関連施設で経験した過去の超低出生体重児症例から IMAP と考えられる症例を検討し、具体的な診断基準や適切な治療案を導く。今までの臨床研究から、SIP と MOP の包括的な概念として IMAP を提唱したが、低出生体重児の消化管疾患自体症例数は少なく、臨床研究のみでは IMAP の概念を立証することは困難であった。そこで、この IMAP の主軸となる腸管の脆弱性と胎児循環から胎外循環への移行により SIP と MOP が発症してくることを、既に確立されている PIH (妊娠高血圧) モデルを用いて証明するに至った。

3. 研究の方法

過去 10 年ならびに当該研究期間を通して、超低出生体重児症例の情報を集積し、診断基準ならびに新規治療法を導き出していく。この過程で、IMAP の概念を証明するため基礎実験を併用する。IMAP の主軸となる腸管壁の脆弱性と、出生による胎児循環から胎外循環への移行により SIP, MOP が発症することを妊娠高血圧 (PIH) ラットから生まれた胎児を用いて証明する。また、PGE2 (プロスタグランジン) 受容体の一つである EP4 を欠損させることで、動脈管を開閉した状態にする PIH-EP4 欠損モデルを作製し、胎外循環への移行をなくした影響を SIP, MOP の発症率が低下することで確認し、IMAP の概念を確立する。

(1) **臨床研究**：臨床研究は、当該研究期間を通して行っていく。具体的には当施設並びに関連施設における SIP, MOP 症例に関して、過去 10 年並びに当該研究期間で経験した症例を含め検討を行う。IMAP の臨床研究における症例検討は SIP, MOP と診断された症例に関して以下の項目を中心に統計処理を行う。

出生前母体因子の検討：

胎児・臍帯血流に関連する因子 (妊娠高血圧、胎盤付着異常、感染の有無、薬剤など)

出生後から発症前の検討：

胎児循環から胎外循環への移行に伴う因子 (PDA 自然閉鎖の有無、indomethacin 投与の有無および投与方法、輸液量、早期経腸栄養、腹部レントゲン所見、腹部超音波所

見)

発症時の検討：

SIP もしくは MOP の発症日齢、手術日齢、手術所見 (穿孔部位、穿孔の形状)、術後経過

腸管病理所見：

腸管筋層厚、出血・充血・うっ血・壊死の有無

(2) 出生前母体因子の基礎的検討：

妊娠高血圧症などによる母体胎盤因子により、胎児に供給される血流が不十分な状態であると胎児 diving reflex 等により腸管に血液が十分に供給されず、胎外環境に適応できない未熟な腸管の状態で見が出生する。これを模擬するために、既に妊娠高血圧症等の研究に用いられる PIH (Pregnancy-induced hypertension) ラットを用いて交配を行い、生まれてくる胎児の腸管壁に脆弱性が存在することを確認する。既存の PIH モデル

SHR (Spontaneously Hypertensive) モデル：高塩食を与えることで高血圧を高効率に発症する自然高血圧発症モデル。

DOCA (Deoxycorticosterone acetate) モデル：片腎を摘出し、DOCA 投与の上、高塩食を負荷するモデル。

ENG (endogline) モデル：中等度の高血圧を発症させるために、TGF- β 1 もしくは TGF- β 2 の受容体である ENG をアデノウイルスにてマウスに移入したモデル。

soluble FLT1 (Soluble fms-like tyrosine kinase1) モデル：血管増殖因子とそれに拮抗する因子である soluble FLT1 をレンチウイルスにより受精卵の段階で導入することで母体や胎児に影響を及ぼすことなく、胎盤特異的に遺伝子を発現させ、高血圧や、胎盤機能不全、IUGR (子宮内胎児発育遅延) を引き起こすモデル。当該研究では、最も簡便で、多く使用されている SHR ラットにより検討を始めるが、SIP, MOP の発症が不十分なら、他のモデルを用いて検討を行う。

a. SIP, MOP の発症率の検討：

一匹のメスラットは 5~10 頭の胎児を出産する。3~5 匹の PIH ラットの交配を行い、15~30 頭のうち SIP もしくは MOP を発症する胎児を統計学的に検討する。

b. 組織学的検討：

SIP, MOP、正常胎児の腸管、脾臓を摘出し、腸管壁の脆弱性並びに脾組織の未熟性を HE 染色により検討する。尚、コントロールとして SD ラットの胎児を用いる。

(3) 出生後循環動態の変化に伴う基礎的検討：

胎外循環への移行が起こらないことによる影響を検討する。

IMAP の概念における第二の発症機序は、出生直後の胎外循環への移行である。そこで、出生後胎児循環を維持しているモデルの作製を行う。EP4 は、PGE2 受容体の一つであ

り、Segi らによると EP1~4 欠損マウスの中で、EP4 欠損マウスには PDA(動脈管)開存の存在を報告している (Segi Eri: YAKURIGAKU ZASSHI, 121, 2001)。当該研究では、PIH ラットに対し EP4 Knockout を行い、PIH-EP4 欠損ラットを作製する。この PIH-EP4 欠損ラットより産まれた胎仔は腸管の脆弱性が存在するが、PDA 開存により胎外循環への移行がないため、腸管の浮腫や、うっ血が起こりにくくなり、SIP や MO の発症率が低下すると考えられる。そこで、PIH ラットの胎仔と PIH-EP4 欠損ラットの胎仔を比較し、PIH-EP4 欠損ラットの胎仔のほうが、SIP, MOP の発症率が低いことを確認し、SIP, MOP、正常胎仔の腸管、膵臓を組織学的に検討する。

PDA を人為的に閉鎖し、胎外循環へ強制的に移行した場合の影響を検討する：

SIP, MOP は PDA 自然閉鎖の症例においても発症するが、indomethacin によって PDA を閉鎖した症例に多く発症することは事実である。我々は、indomethacin の投与によって SMA (上腸間膜動脈) の血流が上昇することに焦点をあて、以下の検討をすすめる。

a. 各臓器における indomethacin 感受性の検討：

indomethacin は、血管拡張を起こす PGE2 を阻害することで、表現型として血管収縮を起こす。ラットの SMA と RA (腎動脈) の EP2 受容体の免疫組織化学を行ったところ、EP2 受容体は、SMA より RA に多く見られ、SMA の血管径は RA より 3 倍程大きかった。つまり、indomethacin の感受性は RA の方が強く、indomethacin 投与時は、RA のほうが SMA より収縮することで本来 RA へ流入するはずの血流が SMA に流入している可能性が示唆される。そこで、PGE2 受容体である EP2 以外の EP1~4 に対する免疫組織化学を行い、さらに詳細な indomethacin の感受性を調べる。

b. indomethacin 腹腔内投与による血流の変化：

ラット腹腔内に indomethacin(1ug/g) の投与を行い、SMA と RA の血流変化を測定する。対照として生理食塩水の投与を行い、ドップラー血流計により SMA と RA の血流を測定する。測定後、腸管を摘出し、HE 染色にて腸管粘膜や腸管壁への影響を検討する。

c. PDA を閉鎖する薬剤の検討：

現在 indomethacin に変わる薬剤として提案されているものとして、NO (一酸化窒素) EP4 antagonist、COX2 阻害剤などが知られている。当該研究では、SIP, MOP の発症率低下を目指していることから、これら薬剤を用いて、ラット腹腔内に投与し、ドップラー血流計により SMA, RA の血流変化を測定し、循環動態への影響が少ない薬剤を選択する。ここで得られた情報を、より優れた治療法を導くために、臨床研究にフィードバックしていく。

4. 研究成果

臨床データは順調に蓄積し、研究期間内のデータ解析は終了した。

SLIP は 7 例、MO の症例は 10 例、現存しているデータの解析は終了した。結果はこれまでの報告に類似し、MO は不当体重児 (SGA 児) に多く発症することが証明された。基礎研究に関しては、SLIP, MO の発症機序が、上腸間膜動脈と腎動脈の血管径の違いによる血流不均等や、インドメタシン投与による上腸間膜動脈と腎動脈の反応の差に伴う血流変化であると証明するには至らなかった (図 4)。SLIP, MO は、極低出生体重児に多く、腸管の未熟性が指摘されている。特

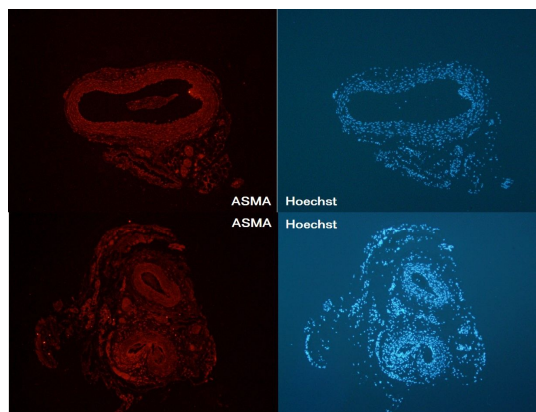


図4: 上段 上腸間膜動脈 下段 腎動脈

に MO は不当体重児 (SGA 児) に有意に多く発症することが知られている。我々は SLIP や MO は胎児の子宮内環境 (血流障害) が発症要因と考えている。子宮内で発育していない非常に脆弱な腸管が、早産児として外界に晒されることで SLIP, MO を発症するという仮説を立てた。そこで腸管壁の脆弱性に着目し基礎研究をおこなった。まず低出生体重児における腸管壁の脆弱性を検討するにあたり、在胎 10 週令から 20 週令の正常胎児腸管と在胎 22 週以降に出生し SLIP, MO を発症した臨床症例の腸管を HE 染色で比較検討した。その結果、疾患を発症した症例の腸管壁と在胎 10 週令の胎児腸管壁は同程度の発育を示していた。SLIP, MO の発症と胎児環境の関連を示すことができたものと考えている (未報告)。また当研究期間内では、腸管への血流不均等と腸管脆弱性が伴うことで病態の発症につながることが直接的に証明できなかったが、今後異なる手法にて腸管への血流不均等を発症させ (再灌流障害モデル等) 実際の臨床病理検体と比較検討し、さらに基礎データを蓄積していくことが病態解明につながると考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

該当せず

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 研介 (OHASHI, Kensuke)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 10526065

(2) 研究分担者

杉藤 公信 (SUGITOU, Kiminobu)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 10328750

小沼 憲祥 (KONUMA, Noriyoshi)

日本大学・医学部・助手

研究者番号: 50553103

越永 従道 (KOSHINAGA, Tsugumichi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 70205376

益子 貴行 (MASUKO, Takayuki)

日本大学・医学部・助手

研究者番号: 30526067

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし