

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591909

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 novel treatment strategy for gastrointestinal development of extremely low birth weight infants: Administration of micelles derived from pulmonary surfactants in a pregnant rabbit model

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

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、超低出生体重児の消化管機能成熟を促す治療法を確立することを目的に立案された。これまでの検討から、肺サーファクタント製剤と胎脂を用いて作成したサーファクテン・ミセル溶液の羊水腔内投与は、ウサギ胎仔小腸を、形態的にも機能的にも成熟させることが明らかとなった。

本研究では、サーファクテン・ミセル溶液が、ウサギ胎仔の小腸上皮に局所的・直接的に作用する可能性があることが示された。また、サーファクテン・ミセル溶液が新生児壊死性腸炎を予防できるか否かを検討するために、壊死性腸炎ラットモデルを作成した。

今日の未熟児医療における最大の問題点の一つは、腸管の未熟性に由来する新生児壊死性腸炎の発症である。本研究を進めることにより、超低出生体重児の未熟な消化管に負荷をかけない経腸栄養剤の開発、さらには早産児の予後改善に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We have shown the presence of micelles derived from pulmonary surfactant in human full-term amniotic fluid. Micellization is also an important step in postnatal lipid absorption because fat is insoluble in the aqueous environment of the small intestinal lumen. Micelles exist in both amniotic fluid swallowed by the fetus and human breast milk ingested by neonates. Our study aimed to develop a new treatment strategy for gastrointestinal development of extremely low birth weight infants with a focus on the presence of micelles in the environment of fetus and neonates. We previously showed that continuous administration of micelles derived from pulmonary surfactants and vernix caseosa enhanced the development of the small intestine of the rabbit fetus.

In our study, we used fluorescently labeled liposomes to show that micelles derived from pulmonary surfactant and vernix caseosa complex might directly and locally contribute to gastrointestinal development of the fetus. In addition, we developed a neonatal rat model to determine the potential beneficial effects of these micelles against necrotizing enterocolitis. Although further studies are required, our findings provide greater understanding of the physiologic interactions between the pulmonary, dermal-epidermal, and gastrointestinal development. One of the most critical issues in the early development of premature infants is the prevention and treatment of necrotizing enterocolitis. We expect that our study may contribute in improving the prognosis of premature infants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1050,000	4,550,000

研究分野：周産期医学

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、消化管成熟、壊死性腸炎、超低出生体重児

1. 研究開始当初の背景

(1) 超低出生体重児の消化管機能成熟は、児の **intact survival** を目指す上で重要な課題であるが、なお未開拓の分野である。本研究は、この問題の解決を目的に立案された。

妊娠後期には、羊水中に急激に濁りが生じる。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指している。

(2) 肺サーファクタント製剤 (サーファクテン®; 田辺三菱製薬株式会社) とヒト胎脂を用いて作成したサーファクテン・ミセル溶液を妊娠 23 日目のウサギ羊水腔内に持続投与した。サーファクテン・ミセル溶液の羊水腔内投与が、ウサギ胎仔小腸を、形態的にも機能的にも成熟させることが明らかとなった。

2. 研究の目的

(1) サーファクテン・ミセル溶液の羊水腔内投与後の体内動態を明らかにすることによって、サーファクテン・ミセル溶液の作用機序を解明する。

(2) サーファクテン・ミセル溶液の新生児壊死性腸炎の予防効果を検討するために、壊死性腸炎ラットモデルを作成する。

3. 研究の方法

(1) サーファクテン・ミセル溶液の体内動態を調べるために、サーファクテン・ミセルを簡略化した構造を持つ 2 種類の蛍光標識モデルを作成した。作成には、① Empty Liposome (日本油脂株式会社)、② リン脂質二重層の外

側表面に付着する性質を持った蛍光色素 PKH26 (Sigma-Aldrich Co.)、③ 胎脂に含まれる代表的な飽和脂肪酸であるパルミチン酸に BODIPY 標識を施した BODIPY FL C₁₆ (Invitrogen Co.) を用いた (Horan, et al. 1989)。蛍光標識モデルをウサギ羊水腔内に持続投与し (図 1)、5 日後に、ウサギ胎仔から小腸、肝臓、肺、脳を摘出した。凍結切片を作成し、各組織標本を蛍光顕微鏡を用いて観察した。対側子宮の羊水腔には Liposome のみを投与し、コントロールとした。

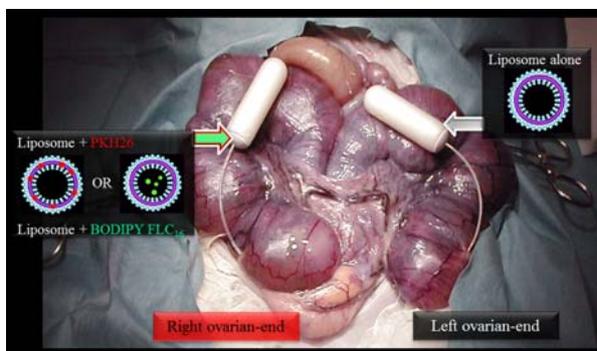


図 1. Right-sided fetuses in ovarian-end position one received the fluorescently labelled liposomes; left-sided fetuses in position one received hydrated empty liposomes for 4 days, starting on gestational day 25, using mini-osmotic pumps (Alzet model 2ML1).

(2) **実験 1. 新生児壊死性腸炎モデルの作成** : 出生直後のラット新生仔を、37°C に保温した新生児用インキュベーターに移動させた。新生仔の状態が安定しているのを確認した後に、明治 LW® (明治乳業株式会社) と PETS OWN® PUPPY MILK (CONNEX UNITED PROCESSORS) を用いて調整した人工乳 0.2 mL を 1 日 3 回経腸投与した。95%CO₂ に 5 分間、4°C の寒冷刺激に 5 分間、97%O₂ に 5 分間暴露させた (1 日 2 回)。実験開始 4 日目に、全ての新生仔を安楽死させた (modified protocol originally described by Guven A et al. *J Pediatr Surg.* 2009)。開腹下に、腸管の壊死、出血、変色、浮腫、拡張、気腫性変化 (pneumotosis intestinalis) 等の壊死性腸炎の所見の有無を観察した。

実験 2. 組織学的検討 : 摘出検体に hematoxylin-eosin (HE) 染色を施し、組織学的に検討した (Nadler EP et al. *J Surg Res.* 2000)。

4. 研究成果

(1) 小腸上皮は、強い励起光を発したが (図 2)、他の臓器には、蛍光モデルは到達しなかった。サーファクテン・ミセル溶液は、ウサギ胎仔の小腸上皮に局所的・直接的に作用する可能性がある。

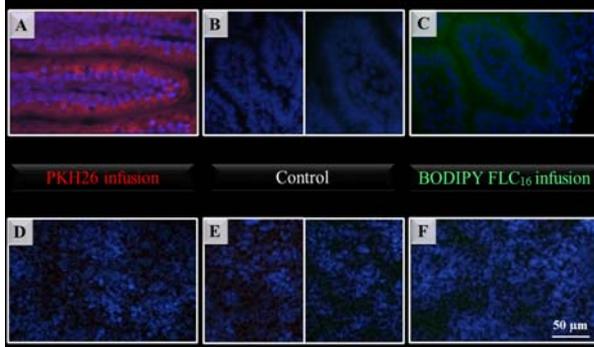


図 2. Fluorescence micrographs of fetal small intestines (top) and livers (bottom). The fetal small intestinal epithelia were strongly stained with PKH26 (A) and Bodipy®-FL C16 (B). The intra-amniotically infused fluorescently labelled liposomes were absorbed into the fetal intestinal epithelium. However, no fluorescently labelled liposomes reached the fetal livers (D-F). Calibration bar: 50 µm. (original magnification: ×400)

(2) 新生児壊死性腸炎ラットモデルを確立した。摘出したラットの小腸は、肉眼的にも (図 3) 組織学的にも (図 4) 壊死性腸炎の所見を呈した。本モデルを用いて、今後は、サーファクテン・ミセル溶液の壊死性腸炎予防効果について検討していく。

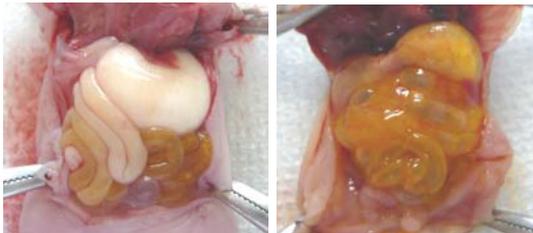


図 3. Photographs of newborn pups: control (left) and the experimental necrotizing enterocolitis group (NEC, right). After the abdomen was opened, the small intestine was visually evaluated and various degrees of signs of NEC such as gross necrotic changes, pneumatosis intestinalis, fragility, weakness of tissue integrity, edema, and discoloration, especially in the ileocecal region, were seen in the NEC group.

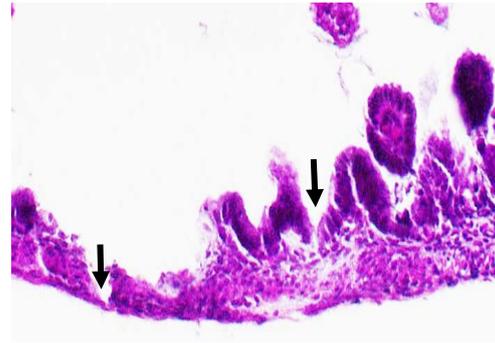


図 4. Representative histopathologic evaluation of the terminal ileum from the experimental necrotizing enterocolitis (NEC) group (HE stain, original magnification: ×400). The NEC group displayed severe injury findings consisting of denudation of epithelium with loss of villi (A), perforation (B), and full thickness necrosis.

少子高齢化社会においては早産児を“完全生存”させることの社会的意義はきわめて大きい。今日の未熟児医療における最大の問題点の一つは、腸管の未熟性に起因する新生児壊死性腸炎の発症である。未熟な消化管に負荷をかけない初期経腸栄養剤の開発により、新生児壊死性腸炎の発症が抑制されるならば、超低出生体重児の予後は大きく改善されるものと期待される。

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 4 件)

- ① 西島浩二、三浦潤一郎、高橋仁、塚原宏一、小辻文和. 新生児壊死性腸炎に対する新たな治療戦略：肺サーファクタントを用いた動物実験. 福井大学重点研究成果集. 2010:126-7. 査読無
- ② 西島浩二、三浦潤一郎、高橋仁、塚原宏一、小辻文和. 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. 福井大学重点研究成果集. 2009:66-67. 査読無
- ③ Tsukahara H, Ohta N, Tokuriki S, Nishijima K, Kotsuji F, Kawakami H, Ohta N, Sekine K, Nagasaka H, Mayumi M. Determination of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthase inhibitor, in umbilical blood. Metabolism. 2008;57:215-20. 査読有
- ④ 西島浩二、宿南憲一、高橋仁、塚原宏一、小辻文和. 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. 日本周産期・新生児医学会雑誌, 2008;44:978-81. 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① 西島浩二、宿南憲一、高橋仁、塚原宏一、小辻文和. 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. 第 44 回日本周産期・新生児医学会学術集会 ワークショップ (2008.07.14、横浜)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 1 件）

名称：腸管機能亢進剤とこれを用いた壊死性腸炎の治療または予防方法

発明者：西島浩二、小辻文和、宿南憲一

権利者：国立大学法人福井大学

種類：特許

番号：特許第 4378531 号

取得年月日：平成 21 年 8 月 19 日

国内外の別：国内

〔その他〕

なし

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

(2) 連携研究者

高橋 仁 (TAKAHASHI JIN)

福井大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20467129