様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 ２３ 日現在

機関番号：１４１０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ０８７３２

研究課題名（和文）新生児腸管切除後のDysbiosisと腸管神経叢・腸上皮形成との関連性と治療戦略

研究課題名（英文）Association of Dysbiosis with enteric plexus and intestinal epithelial formation after neonatal intestinal resection and therapeutic strategies

研究代表者
内田　恵一（Uchida, Keiichi）

三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号：３０２９３７８１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,700,000円

研究成果の概要（和文）：近年、腸内細菌叢のdysbiosisは、炎症性腸疾患や喘息などの免疫・アレルギー疾患の原因となるだけでなく、肥満や消化器癌との関連性も強く示唆されている。この研究は、新生児期に消化管手術を余儀なくされた患児における腸内細菌叢のdysbiosisを検討するだけでなく、dysbiosisの程度と腸管神経叢の形成不全や腸上皮の成長不全などとの関連を確認し、さらに酪酸菌や乳酸菌などの投与により、それらの腸管機能不全からの回復が得られるかを検討するという独創的かつ臨床現場においてもすぐに実践可能な研究となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義
この研究成果により，新生児期の消化管手術や抗生剤投与による腸内細菌叢のDysbiosisや腸管神経叢の形成異常などが明らかになれば，それを予防するための整腸剤（butyric acidやLactic acid系など）投与の重要性だけでなく，抗生剤投与をできる限り控えるべきエビデンスが構築される可能性がある．これにより新生児期の消化管手術時における周術期管理法を，患児の腸内細菌叢や腸管神経叢の側面から新たに見直すきっかけとなり，患児にとってより良い周術期管理が開発される可能性がある．

研究成果の概要（英文）：In recent years, dysbiosis of the intestinal microflora has been strongly suggested to be not only a cause of immune and allergic diseases such as inflammatory bowel disease and asthma, but also associated with obesity and digestive cancers. This study not only examined dysbiosis of the intestinal microbiota in children who had to undergo gastrointestinal surgery in the neonatal period, but also confirmed the relationship between the degree of dysbiosis and dysplasia of the enteric nervous system and intestinal epithelial growth, and further examined whether administration of butyric acid bacteria or lactic acid bacteria can restore the intestinal dysfunction. This is an original and practical research that can be immediately applied to clinical practice.

研究分野：小児外科

キーワード：先天性消化管疾患　新生児　腸管神経叢　腸内細菌叢

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

近年、腸内細菌叢に関する研究が活発に行われており、腸内細菌叢の dysbiosis（腸内細菌の構成や数のバランスが崩れ、多様性が低下した状態）は、炎症性腸疾患や喘息などの免疫・アレルギー疾患の発症要因となるだけでなく、肥満や消化器癌との関連も強く示唆されている。さらに、2020 年の Science 誌の報告では、腸管神経叢の維持に必要な腸内細菌叢を抗生物質で除去すると、腸管神経細胞が減少することが明らかとなった[1] (Science, 2020 Oct 16;370(6514):314-321.)。

新生児期の腸内細菌叢の形成に関しては、出生後、腸内の嫌気環境が徐々に高まることで Bifidobacterium, Bacteroides, Clostridium などの偏性嫌気性菌が定着し、健康な新生児では生後約 2 週間で最優勢菌群となることが報告されている。一方で、Clostridium などが産生する酪酸や、Lactobacillus などが産生する乳酸は腸上皮細胞の増殖基質となり、細胞周期の活性化に寄与し、腸管の生理機能維持に重要な役割を果たしている。

しかしながら、先天性消化管疾患（先天性腸閉鎖症、Hirschsprung 病 など）や新生児期に発症しやすい 壊死性腸炎 に罹患した新生児では、出生後早期に腸管切除や人工肛門造設を余儀なくされ、術後長期の絶食を要するケースが少なくない。その結果、Science 誌で報告された腸内細菌叢と腸管神経叢の低形成のリスクが高まるだけでなく、長期絶食による腸内細菌叢の dysbiosis をきたし、その後の腸管蠕動不全や腸上皮の低形成などが患児の成長・発達に大きな悪影響を及ぼす可能性がある。

２．研究の目的

本研究では、新生児期に消化管手術を受けた患児における腸内細菌叢の dysbiosis を検討し、その程度と腸管神経叢の形成不全、腸上皮の成長不全との関連性を明らかにすることを目的とする。さらに、腸内細菌叢の調整を目的とした 酪酸菌や乳酸菌の投与 によって、腸管機能不全からの回復が促進されるかを検証する。

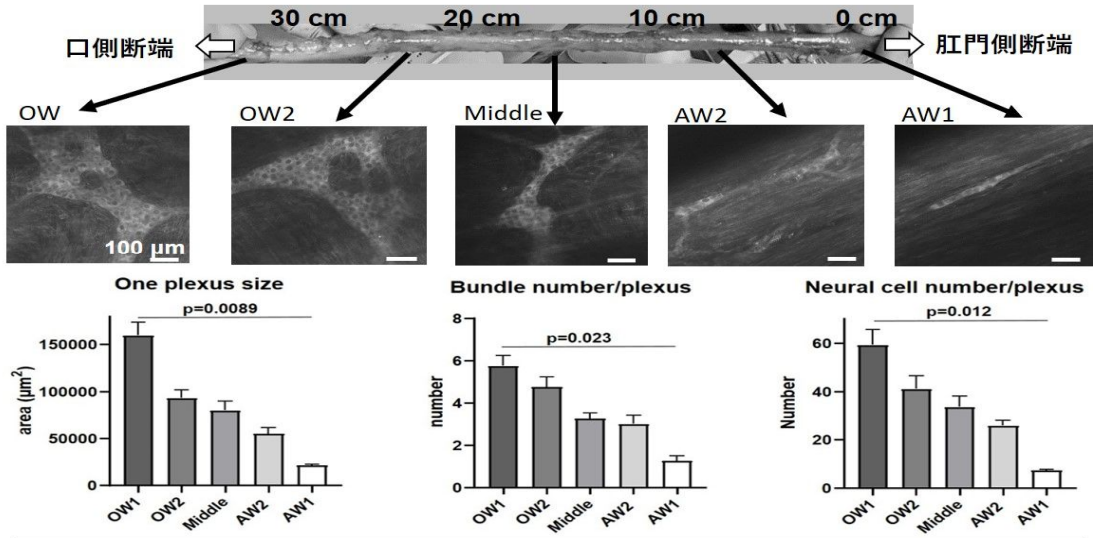
腸内細菌叢の乱れが腸管神経叢や腸上皮細胞の成熟に与える影響を明らかにすることで、新生児期に消化管手術を受けた患児の長期的な腸管機能改善のための介入戦略を構築することが本研究の最終目標である。

３．研究の方法

この研究では、我々が独自に開発した新規生体観察手法すなわちクルクミン蛍光染色法と多光子レーザー顕微鏡を組み合わせることで、これまで不可能であった腸管神経叢や腸上皮の詳細な観察と解析を、腸管連続性に Mapping を行うことで実現し、それを腸内細菌叢の解析所見や、患児の臨床所見と併せて比較検討することで、腸管神経叢の発達レベルや腸上皮の成長レベルと腸内細菌叢の状態との関係を把握することを目的とする。二光子レーザー顕微鏡は、他の顕微鏡と比較して、生体深部のイメージを観察できるという絶対的な有利性があるが、その一方で蛍光発色のある組織でのみ観察が可能という制限がある[2]。そのため、生体観察を実施するには、Green fluorescent protein mouse のように全身が蛍光発色する実験動物を用いる必要性があった。近年、自施設において、「クルクミンを蛍光発色のない生体組織に局所散布するだけで、多光子レーザー顕微鏡による詳細な生体観察が可能」であることを発見し特許を取得した（PCT/JP2018/43636, PCT/JP2017/006962)[3]。

この発見を元に、蛍光発色のない通常のマウス（C57BL6）において、腸管神経節細胞の詳細な観察が可能であることを世界で初めて確認している。さらに、この新規生体観察手法を用いて、当施設の倫理審査承認の上で、Hirschsprung 病患児における切除標本の観察で、これまでの術中迅速病理診断や永久標本からの病理診断では不可能であった腸管神経叢の 3D 構築が可能となり、腸管神経叢のサイズや神経叢からの神経束の分岐数、神経細胞の数などまで詳細に同定かつ解析可能であることを、すでに Human sample を用いて、世界で初めて実証している。 (Figure 1)。

Figure 1　新規生体観察手法を用いたHirschsprung病類縁疾患における腸管神経叢に対する部位依存性形成不全の可視化と画像解析



口側断端から肛門側断端に向かって、部位依存性に腸管神経叢が形成不全に陥っていることが、高解像度のイメージで観察可能となり、神経叢のサイズや分岐の数などまで解析可能（**世界初**）.

このように当研究は、独自に発見・開発した新規生体観察法を用いて、これまで不可能であった腸管神経叢や腸上皮の連続した 3D イメージングの獲得をもとに腸管神経叢との関連を検討するという独創的かつ新知見の得られる可能性の高い研究である。

４．研究成果

まずこの研究期間中に本来正常な腸管神経叢を持つはずである新生児消化管疾患における手術時腸管検体の観察が行えたのは 7 例であった．これら 7 例においては，クルクミンによる生体蛍光染色法と多光子レーザー顕微鏡による生体観察手法を組み合わせた新規生体蛍光観察手法（CVS-IFOM：Curcumin Vital Staining - Intravital Fluorescent Observation Method）による観察が施行できた．また，これまでに Hirschsprung 病患児における切除腸管の CVS-IFOM による腸管神経叢の観察と解析は計 10 例に施行できていたため，本来正常な腸管神経叢を持つはずの 7 例（正常腸管群）と Hirschsprung 病 10 例（ヒルシュ群）における腸管神経叢における比較検討を行った.

Figure2 に腸管神経叢のサイズについて，ヒルシュ群と正常腸管群における比較を大腸と小腸において，それぞれ解析した結果を示す. 腸管神経叢のサイズにおける比較では，大腸・小腸ともにヒルシュ群の方が神経叢のサイズが小さいという傾向が認められた．ヒルシュ群における観察部位は，切除腸管における口側断端であり，術中迅速病理診断において「腸管神経叢が認められる」ないし「腸管神経節細胞が認められる」という基準により，その切離断端の口側を肛門に吻合（Transitional zone より約３～５㎝口側のレベル）しているに

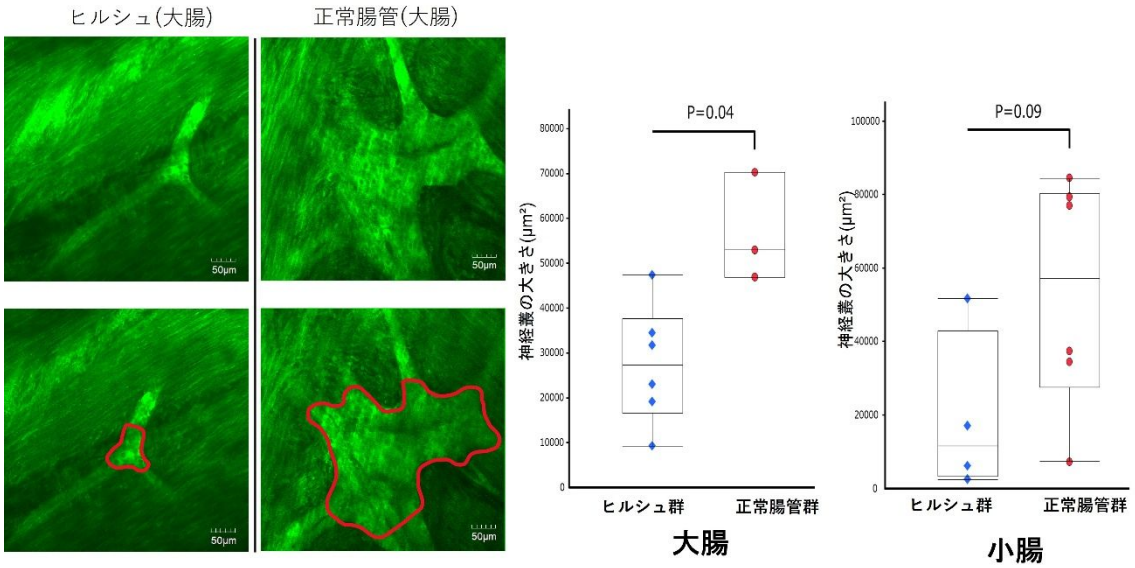


Figure 2. ヒルシュスプルング病患児の切除腸管口側断端とその他の新生児消化管疾患における腸管神経叢サイズの比較

もかかわらず，同部位では正常腸管の腸管神経叢のサイズより小さいという結果は，臨床的にも重要な所見と考えられた．

Figure3 には，腸管神経叢から分岐する神経束の数について，ヒルシュ群と正常腸管群における比較を大腸と小腸において解析した結果をまとめた．腸管神経叢から分岐する神経束の数における比較では，大腸・小腸ともにヒルシュ群の方が神経束の数が少ないという傾向が認められた．

今回の研究期間中においては，抗生剤の有無における腸管神経叢の変化についての検討はできなかった．ヒルシュスプルング病以外で，CVS-IFOM による観察対象となったのは，ほとんどの症例が人工肛門閉鎖時にわずかにトリミングを行うために切除された小腸や大腸であったため，全例において予防的抗生剤投与がなされていたからである．

一方で，この研究のもう一つのメインとなる腸内細菌叢の解析については，現在便検体を採取して蓄積しているところであり，症例数が増えたタイミングで，手術前後の腸内細菌叢の比較なども併せて行っていく予定である．

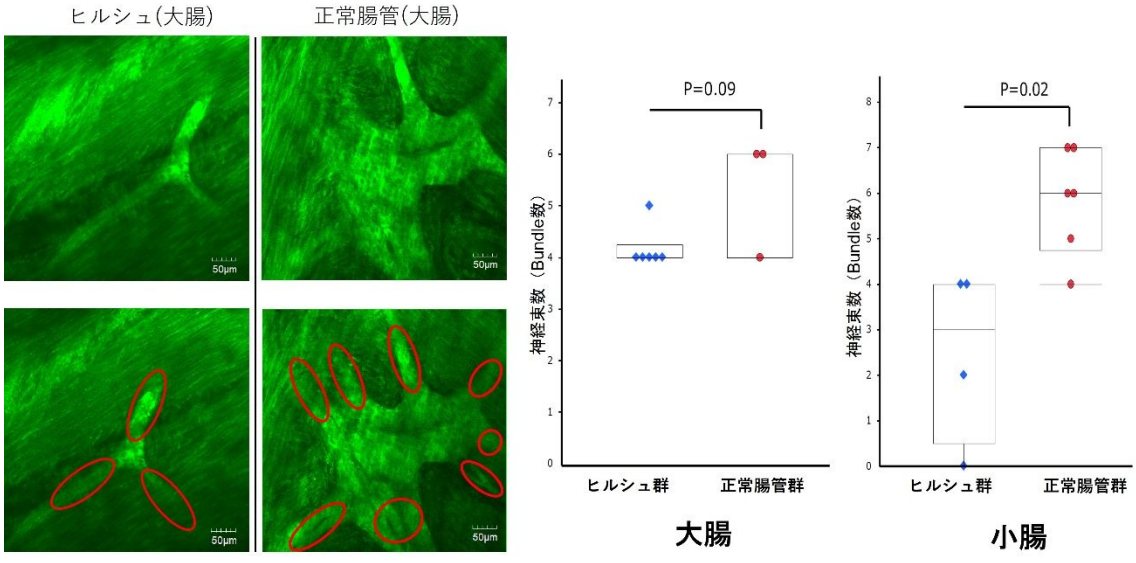


Figure 3. ヒルシュスプルング病患児の切除腸管口側断端とその他の新生児消化管疾患における腸管神経叢からの神経束分枝数（神経束数）の比較

参考文献

1 Muller P, Matheis F, Schneeberger M, et al. Microbiota-modulated CART+ enteric neurons autonomously regulate blood glucose. Science, 2020 Oct 16;370(6514):314-321.
2 Koike Y, Li B, Ganji N, et al. Remote ischemic conditioning counteracts the intestinal damage of necrotizing enterocolitis by improving intestinal microcirculation. Nat Commun. 2020 Oct 2;11(1):4950.
3 Koike Y, Mizoguchi A, Uchida K, et al. Dynamic Pathology of Enteric Neural Network using Curcumin-assisted Multiphoton Laser Imaging in Hirschsprung Disease. Ann Surg (IF: 12.97; Q1). 2024 Sep 12.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　1件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　1件）

１．著者名 Koike Y、Mizoguchi A、Uchida K、Sato Y、Higashi K、Nagano Y、Matsushita K、Sai K、Kaito A, Wang S、Kayahara T、Okugawa Y、Tanaka K、Inoue M、Funabiki K、Kimura K、Goto H、Yuge M、Nishimura Y、Yuasa H、Toiyama Y	４．巻 9
２．論文標題 Dynamic Pathology of Enteric Neural Network using Curcumin-assisted Multiphoton Laser Imaging in Hirschsprung Disease	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Annals of Surgery	６．最初と最後の頁 1097
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/SLA.0000000000006528	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 －

〔学会発表〕　計0件

〔図書〕　計1件

１．著者名 小池 勇樹，内田 恵一，井上 幹大，佐藤 友紀，長野 由佳，松下 航平，溝口 明，問山 裕二　（ 担当執筆：消化管神経叢の生体蛍光観察 ）	４．発行年 2022年
２．出版社 東京医学社	５．総ページ数 108
３．書名 小児外科 【小児外科を取り巻く最新テクノロジー】消化管神経叢の生体蛍光観察	

〔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	小池　勇樹 (Koike Yuhki) (10555551)	三重大学・医学部附属病院・講師 (14101)	
研究分担者	長野　由佳 (Nagano Yuka) (60892479)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	

６．研究組織（つづき）

	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	松下　航平 (Matsushita Kohei) (70750777)	三重大学・医学部附属病院・助教 (14101)	

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関