

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K11224
研究課題名(和文) 超早産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

研究課題名(英文) A treatment strategy for gastrointestinal development of extremely premature infants: Administration of micelles derived from pulmonary surfactants and vernix caseosa in a pregnant animal model

研究代表者
西島 浩二 (Nishijima, Koji)
新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号：80334837
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：羊水中に存在する肺サーファクタントの体内動態を検討するために、SIB法を用いて125I標識放射性肺サーファクタント(STA)を合成し、妊娠ウサギ羊水腔内に投与した。125I標識STAは、投与後30分で母体血中に移行した。また、125I標識STAは投与胎仔とそれ以外の胎仔の全臓器に分布し、特に、胃、胃液、腸管への集積が高値であった。出生直後の新生児の消化管に高濃度の肺サーファクタントが存在することは胎児の成長過程を考える上で興味深い。本研究を進めることで、ヒト発生段階における肺-皮膚-消化器間の相互作用を解明し、新たな視点に立った早産児用初期経腸栄養剤の開発を目指している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

妊娠後期の羊水構成成分の変化と消化管成熟との関連に着目した研究は、国内外を通じて存在しない。報告者の作成したサーファクタンミセル溶液(特許第4378531号)は、ウサギ胎仔小腸の成長と保護に関与し、ラット新生仔の壊死性腸炎発症を抑制した。今日の未熟児医療における最大の問題点の一つは、消化管の未熟性に起因する壊死性腸炎の発症である。少子高齢化社会においては、早産児を“後遺症なく生存”させることの意義はきわめて大きい。本研究を進めることで、新たな視点に立った初期経腸栄養剤の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：We prepared 125I-labeled bovine pulmonary surfactant TA (STA; Mitsubishi Tanabe Pharma Corp., Osaka, Japan) using 125I-Succinimidyl-3-iodobenzoate. We then infused the 125I-labeled STA into the amniotic fluid space of pregnant Japanese white rabbits on gestational day 27 (right-ovarian-end fetuses). The 125I-labeled STA were transferred to maternal blood at 30 minutes post-dose, and most were excreted in the urine. The 125I-labeled STA were also transferred to all internal organs of all fetuses, and especially, highly accumulated at fetal stomach, gastric juices, and intestine. We speculate that the existence of highly-concentrated pulmonary surfactants in the neonatal gastrointestinal tracts just after the birth is important for neonatal immunocompetence acquisition processes. Although further studies are needed, our findings elucidate the physiological interactions among pulmonary, dermal-epidermal, and gastrointestinal developmental processes.

研究分野：周産期医学

キーワード：肺サーファクタント 胎脂 ミセル 早産児 低出生体重児 壊死性腸炎 体内分布評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

妊娠後期には、羊水に急激に濁りが生じる¹⁾。報告者は、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^{2),3)}。出生時に胎児の保護フィルムとして働くはずの胎脂が、出生前に皮膚から剥がれ落ちるという事実は、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、早産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、*in vivo* の実験系において、ウサギ胎仔小腸を手術侵襲から保護し⁴⁾、ラット新生仔の壊死性腸炎発症を抑制することが示された⁵⁾。

2. 研究の目的

以前 STA ミセルに類似した構造を持つ 2 種類の蛍光標識リポソームを作成し、STA ミセルの体内動態を検証する実験を行った。ウサギ羊水腔内に投与された蛍光リポソームは、胎仔に嚥下され、小腸上皮に取り込まれて強い励起光を発したが、それ以外の臓器には到達しなかった⁴⁾。ところが、その後に行った追加実験において 50 倍量の蛍光リポソームを投与したところ、ウサギ胎仔の肝臓にまで到達する事が確認された。

本研究の目的は、¹²⁵I で標識された放射性 STA を用いて、羊水中に存在する肺サーファクタントの体内動態を詳細に評価することである。

3. 研究の方法

- (1) ¹²⁵I-Succinimidyl-3-iodobenzoate による SIB 法を用いて ¹²⁵I 標識サーファクテン® (STA) を合成した。
- (2) *in vitro* と *in vivo* での ¹²⁵I 標識 STA の安定性を、高速液体クロマトグラフィを用いて評価した。
- (3) 塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルファノールによる 3 種混合麻酔下に、妊娠ウサギの羊水腔内に ¹²⁵I 標識サーファクテン® を投与した(右子宮卵巣端第 1 位)。60 分後(n=1)、12 時間後(n=3)、24 時間後(n=5)、48 時間後(n=3)に帝王切開を行い、母体と胎仔の ¹²⁵I 標識 STA の体内分布を検討した。全ての実験は、福井大学動物実験委員会の承認の下、福井大学松岡キャンパス共同利用施設放射線障害予防規程に則って行われた。

4. 研究成果

- (1) STA には、5 ないし 10% の Dipalmitoylphosphatidylethanolamine (DPPE) が含まれている。SIB 法により、¹²⁵I-Succinimidyl-3-iodobenzoate を用いて DPPE を標識し、STA を懸濁調整する際に ¹²⁵I-DPPE を混入することにより、¹²⁵I 標識 STA を合成した。
- (2) *in vitro* での安定性評価：¹²⁵I 標識 STA は、ウサギ羊水・ウサギ血清中において、24 時間後に 95% が安定を保ち、48 時間後には 75% が安定を保った。
in vivo での安定性評価：投与 24 時間後に胎盤と母体血液から抽出された ¹²⁵I 標識 STA は、相当量の分解を受けていたが、ウサギ羊水、胎仔胃、胃液、腸管、胎仔血液から抽出された ¹²⁵I 標識 STA は安定を保っていた。¹²⁵I 標識 STA は、ウサギ羊水腔内への投与実験(実験 3)の使用条件を満たすと判断した。
- (3) 羊水腔に投与された ¹²⁵I 標識 STA は、投与 30 分で速やかに母体血中に移行した。その後、母体の各臓器に移行し、大部分は尿から排出された。また、¹²⁵I 標識 STA は、投与胎仔(図 1 の)とそれ以外の胎仔群(図 1 の , , , ,)の全ての臓器に分布した。胎仔臓器別の検討では、胃、胃液、腸管への放射線集積率が特に高値となった(図 1)。
- (4) 48 時間後にも、同様の傾向を認めた(図 2)。

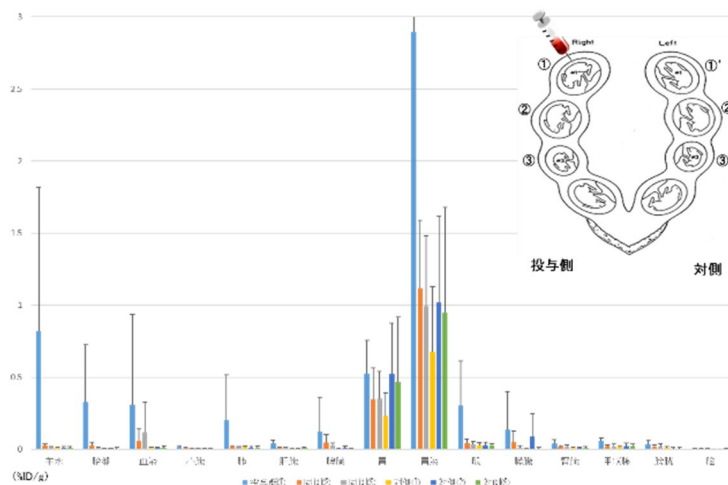


図 1. ¹²⁵I 標識 STA 投与 24 時間後の臓器分布 (n = 5)

報告者はこれまで、STA ミセル溶液の持つ未熟腸管の保護作用に着目し、研究を進めてきた。本研究で示された胃、胃液、腸管における ^{125}I 標識 STA (あるいは STA 由来の DPPE) の高い集積率は、これまでの研究成果に矛盾しない。

近年、肺サーファクタント特異蛋白である SP-A や SP-D の生体防御機能が注目されている。出生直後の新生児の腸管に高濃度の肺サーファクタントが存在することは、新生児の成長過程を考える上で非常に興味深い。今後は動物実験と並行して培養細胞 (Caco-2 細胞) を用いた実験にも取り組みながら、早産児の初期管理に有用な経腸栄養剤の開発を目指したいと考えている。本研究をさらに発展させることにより、羊水中に存在する肺サーファクタントと胎脂の生物学的役割が明らかとなり、ヒトの発生段階における肺-皮膚-消化器間の interaction の解明がなされることを期待する。

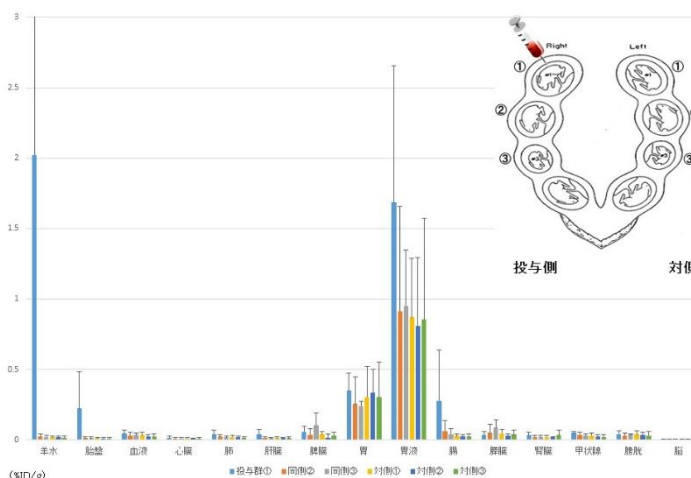


図 2. ^{125}I 標識 STA 投与 48 時間後の臓器分布 (n = 3)

引用文献

- 1) Hook GE, Gilmore LB, Tombropoulos EG, Fabro SE. Fetal lung lamellar bodies in human amniotic fluid. *Am Rev Respir Dis.* 1978;117:541-50.
- 2) Nishijima K, Shukunami K, Inoue S, Kotsuji F. Management for neonatal aspiration syndrome caused by vernix caseosa. *Fetal Diagn Ther.* 2005;20:194-6.
- 3) Nishijima K, Shukunami K, Tsukahara H, Orisaka M, Miura J, Kotsuji F. Micelles of pulmonary surfactant in human amniotic fluid at term. *Pediatr Res.* 2006;60:196-9.
- 4) 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 rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2012;303:L208-14.
- 5) Nishijima K, Yoshida Y. *Micelles: Structural Biochemistry, Formation and Functions & Usage.* Nova Science Publishers, Inc. NY, 2103, pp.321

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 Nishijima Koji, Yoneda Makoto, Hirai Takayoshi, Takakuwa Koichi, Enomoto Takayuki	4. 巻 45
2. 論文標題 Biology of the vernix caseosa: A review	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 2145 ~ 2149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.14103	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 見松はるか, 佐藤義朗, 上田一仁, 三浦良介, 呉尚治, 北瀬悠磨, 鈴木俊彦, 西島浩二, 早川昌弘
2. 発表標題 新生児壊死性腸炎における幹細胞療法の開発.
3. 学会等名 第63回日本新生児・成育医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 見松はるか, 佐藤義朗, 松本太郎, 風間智彦, 西島浩二, 下山芳江, 上田一仁, 三浦良介, 呉尚治, 北瀬悠磨, 鈴木俊彦, 早川昌弘
2. 発表標題 新生児壊死性腸炎モデルにおける脱分化脂肪細胞の治療効果についての検討.
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Haruka Mimatsu, Yoshiaki Sato, Tomohiko Kazama, Koji Nishijima, Yoshie Shimoyama, Kazuto Ueda, Ryosuke Miura, Shoji Go, Yuma Kitase, Toshihiko Suzuki, Yoshiyuki Takahashi, Taro Matsumoto, Masahiro Hayakawa.
2. 発表標題 Development of a novel therapy using dedifferentiated fat cells for necrotizing enterocolitis in neonates.
3. 学会等名 Pediatric Academic Societies 2019 Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西島浩二
2. 発表標題 早産児の消化管保護に向けた治療戦略：肺サーファクタントと胎脂を用いた動物実験
3. 学会等名 第53回日本周産期・新生児医学会学術集会ミニシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 西島浩二
2. 発表標題 早産期の消化管保護に向けた治療戦略～肺サーファクタントと胎脂に着目して～
3. 学会等名 第7回新潟ペリネイタル研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>受験生のためのFUKUDAI LIFE 産婦人科医の視点から新生児を治療する https://www.u-fukui.ac.jp/voice/9687/ 超低出生体重児の消化管保護に向けた治療戦略：肺サーファクタントと胎脂を用いた動物実験 http://sankafujinka.com/intro/reserch2.html</p>

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