

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18026

研究課題名(和文) 早産児腹膜炎への外科侵襲に伴う免疫応答の解明と新たな周術期免疫賦活療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of immunosuppression mechanism by surgical invasion for preterm infant peritonitis and development of new immunostimulation therapy

研究代表者

大片 祐一 (Okata, Yuichi)

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：40597217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では免疫学的に早産児相当である日齢4のマウスに対して糞便懸濁液を腹腔内投与することで早産児腹膜炎モデルマウスを作成し、早産児腹膜炎の外科侵襲に伴う免疫応答の解明を目指した。同モデルマウスに対して開腹手術を行ったところ、開腹手術の侵襲に伴う死亡率の上昇を確認した。原因として術後急性期の抗炎症性サイトカイン(IL-10)に対する炎症性サイトカイン(IL-6、MCP-1)有意の上昇が考えられた。一方で開腹手術の侵襲にも関わらず、IL-12やTNFの炎症性サイトカインは低値のままであり、早産児に特有の免疫抑制状態が関与していることが推測された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児医療の発展にも関わらず早産児における消化管穿孔は細菌性腹膜炎を合併し致死的になることが知られている。抗菌薬投与などの内科的集中治療管理に加えて、標準的な治療として開腹手術が行われるが、早産児における開腹手術の侵襲の影響は明らかにされていなかった。本研究では早産児腹膜炎モデルマウスを使用することで早産児における開腹手術の死亡率に関わる影響が大きいことを動物モデルで初めて確認した。一方で、早産児に特有の免疫抑制状態が死亡率上昇に関与することも明らかになった。早産児特有の抑制された免疫を賦活化させることで早産児腹膜炎の死亡率の改善に寄与する新規治療法に繋がる可能性があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we created a mouse model of preterm peritonitis by intraperitoneal injection of cecal slurry to 4-day-old neonatal mice in order to elucidate the immune response associated with surgical intervention under peritonitis. After performing laparotomy on that model mice, mortality associated with the surgical stress was observed. It was considered to be attributed to the significant increase in pro-inflammatory cytokines:IL-6 and MCP-1, relative to anti-inflammatory cytokine: IL-10, in the acute post-operative phase. On the other hand, despite the surgical stress by laparotomy, pro-inflammatory cytokines such as IL-12 and TNF remained low, suggesting an immunosuppressive state unique to preterm infants.

研究分野：小児外科学

キーワード：早産児 腹膜炎 動物モデル 外科侵襲 免疫抑制

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

早産児腹膜炎は壊死性腸炎や特発性腸穿孔、胎便関連性腸閉塞などに起因した消化管穿孔を原因に発症し、新生児医療が発達した現在においても死亡率が 20%を超える致死的な病態である。したがって、本疾患の病態の解明と新規治療法の開発は世界的な喫緊の課題である。

健全な新生児や早産児では特有の免疫抑制状態が報告されており、早産児腹膜炎がより重症化しやすい原因の一つである可能性が考えられるが、実際には早産児腹膜炎における免疫機能解析は未だ十分になされていない。また、消化管穿孔による早産児腹膜炎に対する世界的な標準治療は開腹手術であるが、開腹手術の外科侵襲に対する早産児の免疫反応は未解明であるだけでなく、早産児腹膜炎に対する至適な治療法を検討するにあたり適切なモデル動物も存在しないことが課題であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、糞便懸濁液 (Cecal Slurry, CS) を用いて早産児消化管穿孔を想定した早産児腹膜炎モデルマウスを作成し、外科侵襲を加えることによる生命予後への影響とその際の免疫応答を解明すること、その結果をもとに新たな周術期免疫賦活化療法の可能性を探索することである。

3. 研究の方法

本研究では、過去に報告されている CS を腹腔内投与することで作成する早産児敗血症モデルマウスを早産児腹膜炎モデルマウスとして使用することで実験を行った。以下の実験を行うにあたり神戸大学動物実験委員会の承認を得た。

(1) 早産児腹膜炎モデルマウスの作成と CS 投与量の決定

成獣マウスの虫垂から採取した糞便を 100mg/ml の濃度で Phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁することで CS を作成した。体重に合わせた様々な用量の CS を生後 4 日目の新生仔マウスの腹腔内に投与し、死亡率 20~30%となる CS 投与量を決定した。以下の実験ではこの CS 投与量を使用した。

(2) 早産児腹膜炎モデルマウスにおける外科侵襲の生命予後の検討

早産児腹膜炎マウスに対してイソフルレン吸入麻酔を行った上で上腹部 5mm 横切開による開腹手術を行った。1 分間の開腹状態の後に閉腹を行い開腹手術 (CS+LAP) 群とした。一方で対照 (CS) 群はイソフルレンの吸入麻酔のみを行った。これら 2 群の術後 7 日目までの生存率を比較した。

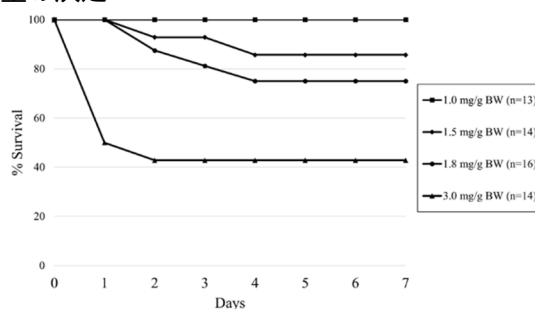
(3) 早産児腹膜炎モデルマウスにおける外科侵襲の免疫応答の検討

上記の 2 群の術前、術後 2, 4, 12, 24 時間後の血漿中の炎症性、抗炎症性サイトカイン (IL-6, MCP-1, IL-10, TNF, IL-12p70, IFN-) 動態を比較した。また、術後 2 時間後の菌血症の程度について上記 2 群で比較した。

4. 研究成果

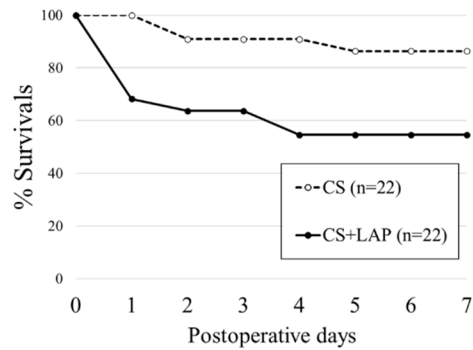
(1) 早産児腹膜炎モデルマウスの作成と CS 投与量の決定

1.0, 1.5, 1.8, 3.0 mg/g Body weight (BW) の各 CS 濃度における投与後 7 日間の生存率を比較したところ、右図の結果を得た。各群における生存率は、100.0%、85.7%、75.0%、42.9% であり、死亡率が 20~30%となる 1.8 mg/g BW を本研究における CS 投与量と設定した。



(2) 早産児腹膜炎モデルマウスにおける外科侵襲の生命予後の検討

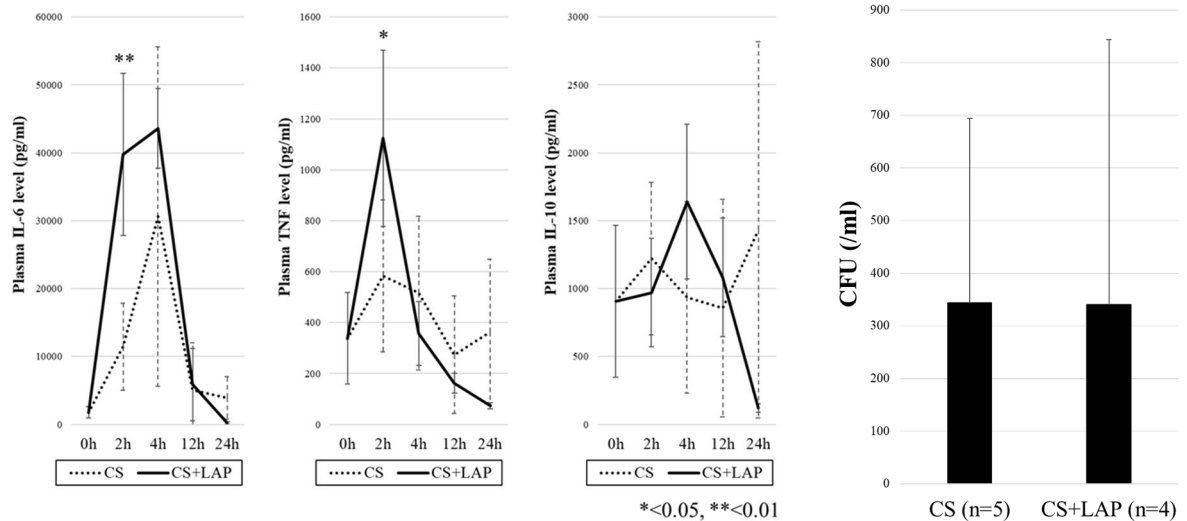
右図の通り，CS 群，CS+LAP 群のそれぞれの 7 日間の生存率は 86.4 %，54.5%であり，CS+LAP 群で有意に死亡率が高いことが示された (Log-rank 検定， $p=0.016$)。



(3) 早産児腹膜炎モデルマウスにおける外科侵襲の免疫応答の検討

2 群の血漿中の炎症性，抗炎症性サイトカインを経時的に測定したところ，CS+LAP 群において炎症性サイトカインである IL-6 と MCP-1 が術後 2 時間後に有意な上昇を認めただけで抗炎症性サイトカインである IL-10 は有意な上昇を認めなかった (下左図)。また，IL-12p70 と IFN- γ の炎症性サイトカインは 2 群とも CS 投与や開腹手術にも関わらず低値を維持していた。

2 群における術後 2 時間後の菌血症の程度は両群とも同等だった (下右図，Student t-test， $p=0.989$)。



以上の結果から，術後急性期の IL-6 と MCP-1 の炎症性サイトカイン優位の状態が開腹手術による外科侵襲に伴う死亡率の上昇に影響している可能性が示唆された。一方で CS 投与や開腹手術による外科侵襲にも関わらず IL-12p70 と IFN- γ の炎症性サイトカインは低値が維持される結果も得た。成人領域では感染症や手術侵襲に伴いこれらの炎症性サイトカインが上昇することは知られており，IL-12p70 と IFN- γ の免疫抑制状態は早産児特有の免疫応答と考えられた。今後は早産児で抑制されている IL-12 や IFN- γ をターゲットとした新規免疫賦活化療法の開発を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Miyuchi Harunori, Fujioka Kazumichi, Okubo Saki, Nishida Kosuke, Ashina Mariko, Ikuta Toshihiko, Okata Yuichi, Maeda Kosaku, Iijima Kazumoto, Bitoh Yuko	4. 巻 62
2. 論文標題 Insulin therapy for hyperglycemia in neonatal sepsis using a preterm mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 581 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14126	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakasone Ruka, Ashina Mariko, Kido Takumi, Miyuchi Harunori, Saito Masafumi, Inoue Shigeaki, Shinohara Masakazu, Nozu Kandai, Fujioka Kazumichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Protective Role of an Initial Low-Dose Septic Challenge against Lethal Sepsis in Neonatal Mice: A Pilot Study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 5823 ~ 5823
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10245823	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 宮内玄徳
2. 発表標題 早産児腹膜炎における外科侵襲が生存率と免疫応答に及ぼす影響についての実験的検討
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村翔平
2. 発表標題 新生児腹膜炎外科侵襲モデルマウスにおける炎症性/抗炎症性サイトカイン比に関する検討
3. 学会等名 第57回周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉村翔平
2. 発表標題 新生児腹膜炎モデルマウスを用いた新生児外科領域における基礎研究の取り組み
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鮫島由友
2. 発表標題 新生児腹膜炎に対する穿刺ドレナージ モデルマウス作成の試みと課題
3. 学会等名 第58回日本小児外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鮫島由友
2. 発表標題 新生児腹膜炎モデルマウスを用いた開腹腹腔内洗浄および穿刺ドレナージの有用性の検討
3. 学会等名 第58回周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shohei Yoshimura
2. 発表標題 Effectiveness of peritoneal lavage during laparotomy for neonatal bacterial peritonitis: experimental investigation based on the cecal slurry mouse model
3. 学会等名 23rd European Paediatric Surgeons' Association Congress (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------