

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09595

研究課題名(和文) 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 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・教授

研究者番号：80334837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺サーファクタント製剤が形成するミセルとウサギ羊水内に存在するミセル分子の超微細構造解析を行った。クライオ透過型電子顕微鏡により、親水基を外側に、親油基を内側に向けた肺サーファクタントミセルの分子構造を描出することが出来た。次いで、妊娠16週から40週のヒト羊水55検体中のミセル分子の有無を、ネガティブ染色法を用いて検討した。妊娠週数が進むほどミセルの検出率が高くなったことより、ヒト羊水中のミセル分子は胎児の肺成熟度の指標になり得ると思われた。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トミセル溶液(特許第4378531号)は、ウサギ胎仔小腸の成長と保護に関与し、ラット新生児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り、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。本研究を進める事で、新たな視点に立った早産児用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 performed ultrastructural analysis of “micelles derived from surfactant TA” and “pulmonary surfactant micelles present in rabbit amniotic fluid” to investigate the pharmacokinetics of pulmonary surfactant and vernix caseosa in amniotic fluid. Cryo-transmission electron microscopy revealed the micelle structure formed by the pulmonary surfactant with the hydrophilic end facing outward and the hydrophobic end facing inward. We then examined the micelle molecules in 55 human amniotic fluid samples from 16 to 40 weeks gestation using negative staining method. The detection rate of micelles increased with advancing gestational week, suggesting that micelle molecules in human amniotic fluid could be an indicator of fetal lung maturity. Although further studies are needed, our findings elucidate the physiological interactions among pulmonary, dermal-epidermal, and gastrointestinal developmental processes, and develop early enteral nutrition for preterm infants from a new perspective.

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 壊死性腸炎 多光子イオン化飛行時間型質量分析法

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。

報告者はこれまでに、妊娠末期のヒト羊水中に肺サーファクタント由来のミセル分子が存在することを、電子顕微鏡観察(ネガティブ染色法)により明らかにした³⁾。更に、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(特許第4378531号)が、*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を証明した⁵⁾。

2. 研究の目的

羊水中に存在する肺サーファクタントと胎脂の体内動態について更なる検証を行うことを目的に、「肺サーファクタント製剤が形成するミセル」と「ウサギ羊水中に存在する肺サーファクタントミセル」の超微細構造解析を行った。次いで、妊娠16週から40週のヒト羊水55検体中のミセル分子の有無を、ネガティブ染色法を用いて検討した。

3. 研究の方法

(1) 肺サーファクタント製剤が形成するミセルの超微細構造解析: 肺サーファクタント製剤(サーファクテン[®])を生理食塩水に懸濁し濃度を240 µg/mlに調整した後、-175°Cまで急速凍結し、クライオ透過型電子顕微鏡(JEM-2200FS; 日本電子)を用いて観察した。

(2) ウサギ羊水中に存在する肺サーファクタントミセルの超微細構造解析: セコバルビタールナトリウム静脈麻酔下に妊娠30日目の妊娠ウサギ(Japanese white rabbit)から羊水を3ml採取した。採取した羊水を9200g×20分間遠心分離した後、上清を100nm孔径のフィルターを通し検討に供した。サンプルを-175°Cまで急速凍結した後、クライオ透過型電子顕微鏡(JEM-2200FS)を用いて観察した。研究(1)で観察された肺サーファクタント製剤が形成するミセルの形態を参考に、同様の形態を有する粒子がウサギ羊水中に存在するか否かを検討した。

(3) ヒト羊水中に存在するミセル分子の検討: 妊娠16週から40週の羊水55検体中のミセル分子の有無を、電子顕微鏡を用いて検討した(妊娠16~20週: 11検体、妊娠21~25週: 6検体、妊娠26~30週: 6検体、妊娠31~35週: 6検体、妊娠36~40週: 26検体)。ミセル分子の有無は、各標本を風乾させた後にネガティブ染色を施し、透過型電子顕微鏡(H-7650; 日立ハイテクノロジー)を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) 肺サーファクタント製剤が形成するミセルの超微細構造解析: JEM-2200FSは理論上直径0.2nm程度の粒子を検出できる分解能を持つ。本観察では、粒径20ないし40nmの球形のミセル分子が観察された。肺サーファクタント製剤にはリン脂質が含有されているため、無染色でも明瞭に観察することが出来た。粒子の最外層は二層構造を呈しており、層間は3.5ないし4nmであった。この二層構造は、親水基を外側に、親油基を内側に向けたミセル分子の構造を描出したものと思われた(図1)。

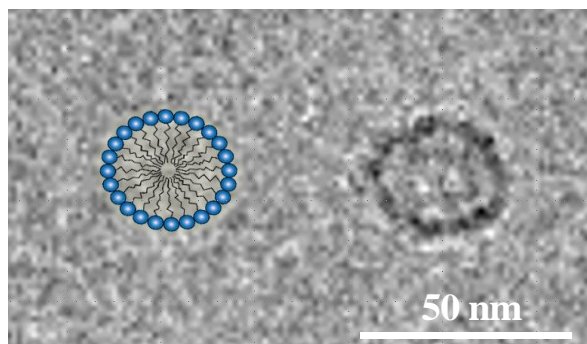


図1. サーファクテンが形成するミセルのクライオ透過型電子顕微鏡像(右)とその模式図(左)

(2) ウサギ羊水中に存在する肺サーファクタントミセルの超微細構造解析: 妊娠30日目のウサギ羊水中にネガティブ染色を施し透過型電子顕微鏡で観察すると、直径30ないし50nmの環状のミセル分子を見ることが出来る。そこで、肺サーファクタント製剤が形成するミセル(サーファクテンミセル)の形態を参考に、ウサギ羊水中に同様の構造物が存在するか否かを検討した。羊水は夾雑物を多く含むため、クライオ透過型電子顕微鏡による探索は難渋したが、1粒子のみサーファクテンミセルと同様の形態を有する粒子を検出することが出来た。しかしながら、現段階では1分子のみの検出に留まっており、再現性も乏しい。結果の解釈には慎重でなければならないと考えている。

(3) ヒト羊水中に存在するミセル分子の検討：妊娠 30 週から 40 週の羊水 35 検体中 26 検体からミセル分子を検出することが出来た（検出率 74.3%，図 2）。妊娠週数が進むほどミセルの検出率が高くなったことから、ヒト羊水中のミセル分子は胎児の肺成熟度の指標になり得ると思われた。また、ミセル分子の存在は多くの症例で胎児の全身の成熟度とも関連していた。一方、妊娠 36 週以降の検体でも検出率が 80.8% に留まっていたが、これは本観察法の限界を表していると思われた。

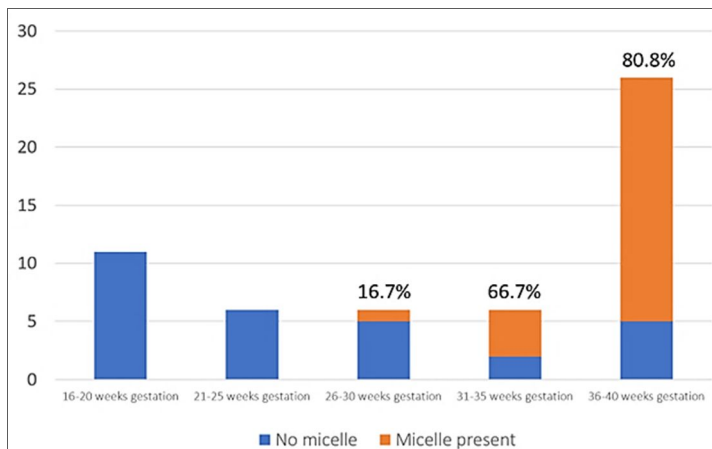


図 2. 電子顕微鏡観察によるミセル分子の検出率 (n = 55) : 妊娠週数が進むほどミセルの検出率は高くなる。

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;117:541-550.
- 2) Nishijima K, Shukunami K, Inoue S, Kotsuji F. Management for neonatal aspiration syndrome caused by vernix caseosa. *Fetal Diagn Ther.* 2005;20:194-196.
- 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;60:196-199.
- 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:L208-214.
- 5) Nishijima K, Yoneda M, Hirai T, Takakuwa K, Enomoto T. Biology of the vernix caseosa: A review. *J Obstet Gynaecol Res.* 2019;45:2145-2149.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 2件）

1. 著者名 西島浩二	4. 巻 73
2. 論文標題 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	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本産科婦人科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 1226-1237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 Mimatsu H, Onoda A, Kazama T, Nishijima K, Shimoyama Y, Go S, Ueda K, Takahashi Y, Matsumoto T, Hayakawa M, Sato Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Dedifferentiated fat cells administration ameliorates abnormal expressions of fatty acids metabolism-related protein expressions and intestinal tissue damage in experimental necrotizing enterocolitis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-34156-1	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 -

1. 著者名 Sugai S, Sekizuka T, Haino K, Nonaka T, Sekine M, Yoshihara K, Nishijima K.	4. 巻 -
2. 論文標題 Obstetrical outcomes of pregnant women 50 years and older compared to those aged 45-49 years: A systematic review and meta analysis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Obstetrics and Gynaecology Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jog.15662	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2件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西島浩二
2. 発表標題 A treatment strategy for the gastrointestinal development of premature infants by administration of micelles derived from pulmonary surfactants and the vernix caseosa
3. 学会等名 第74回日本産科婦人科学会学術講演会 Joint Conference JSOG-DGGG（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西島浩二
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第73回日本産科婦人科学会学術講演会 シンポジウム2（招待講演）
4. 発表年 2021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
研究協力者	内村 智博 (Uchimura Tomohiro) (40346820)	福井大学・学術研究院工学系部門・教授 (13401)	

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