

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22958

研究課題名(和文) 神経学的予後向上を目指したFIP再現モデル作成による予防的治療法開発

研究課題名(英文) Development of preventive treatment method by creating focal intestinal perforation rat model associated with prematurity aiming at improvement of neurological prognosis

研究代表者

杉田 光士郎(SUGITA, Koshiro)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・特任助教

研究者番号：50781514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Diving reflexを引き起こすメカニズムは本研究で行った感染、低酸素の2つの刺激であるという仮説を基に、母体と出生後という2段階ストレス刺激による動物モデル作成を検証した。妊娠ラットを行うことでdiving reflexとFIPモデルを再現することを目的としていたが、結論的にFIPを発症する結果は得られていない。ヒトのストレスホルモンは副腎で合成される内因性ステロイドであるが、出生前の胎児ストレスホルモンはより血管収縮作用の強いバソプレッシンと言われている。今後もFIPモデルを作成するためdiving reflexの再現を目指すため妊娠中ストレスを模索していく必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FIPは超低出生体重児に発症するが、希少疾患であるため臨床情報からだけではエビデンスが得られにくい。2年間の本研究期間中に低酸素刺激とLPS刺激だけではFIPモデルを作成することはできなかった。作成を試みた結果、NECとの病態的な違いにより一層着目していく必要を認識した。FIPはNECと異なり典型的には回盲部領域に発生する。回盲部領域の血流を評価することや血流が低下する原因として胎児ストレスホルモンの関連性などを明らかにしていく着想に至り、今後の研究課題を得られたという意味では有意義であったと思われる。

研究成果の概要(英文)：Based on the hypothesis that the mechanism that causes diving reflex is the two stimulations of "infection" and "hypoxia" conducted in this study, an animal model was created by two-step stress stimulation, "maternal" and "postnatal" was verified. The purpose was to reproduce the diving reflex and FIP model by performing it on pregnant rats, but no results were obtained to develop FIP. Human stress hormones are endogenous steroids that are favored in the adrenal glands, but prenatal fetal stress hormones are said to be vasopressin, which has a stronger vasoconstrictor effect. We will continue to explore the selection of reagents and stimuli for stress during pregnancy in order to reproduce the diving reflex, and we believe that further research is needed to create an FIP model.

研究分野：小児外科

キーワード：限局性腸穿孔 FIP 新生児消化管穿孔 動物モデル

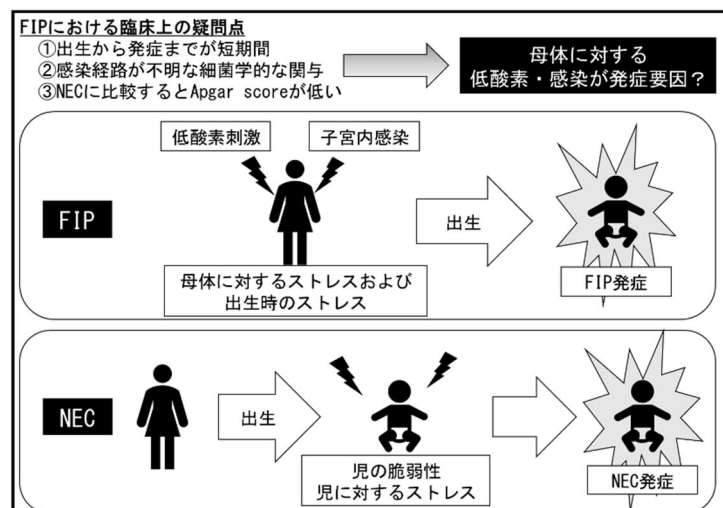
1. 研究開始当初の背景

特発性腸穿孔(FIP)は肉眼的な炎症、壊死などの壊死性腸炎(NEC)にみられる所見を伴わない限局性の腸管穿孔である。1000g未満の超低出生体重児に多く、生後1週間程度で突然発症することが特徴的である。NECの亜型と考えられていたが、症例の蓄積により穿孔部周辺に炎症や壊死の所見はなく、FIPという独立した疾患概念が形成された。GordonらはFIPの組織学的な特徴としての筋層の薄化から腸穿孔に至るメカニズムについて基礎研究における動物モデルを確立し、国際的に発信している。この動物モデルはステロイドとインドメタシンの暴露に伴い、回腸のIGF-1の粘膜への偏在化に伴う粘膜の過形成や筋層の薄化を証明したモデルであるが、実際に穿孔に至るモデルかは不明である。臨床研究においては胎児の低酸素環境や循環障害および絨毛膜羊膜炎や臍帯炎などの子宮内感染がFIPの原因として報告された。その他はいずれも治療成績などに言及した臨床論文が主であり、世界的にも原因究明に関する臨床論文や基礎研究は不足しており、その主たる要因は動物モデルが確立されていないことである。本研究は我々が行った臨床研究から着想した「妊娠経過による児のdiving reflexがFIPの原因である」という仮説を検証するための基礎研究であり、FIPの動物モデルを作成することができる可能性があり、病態解明や予防法の確立に繋がる重要な研究であると位置付けている超低出生体重児のさらなる生存率向上と神経学的予後の改善のためにはFIPの発症メカニズム解明と予防法の確立は最重要課題である。

2. 研究の目的

新生児外科症例は一施設で経験できる症例数が限られており、臨床情報からだけではエビデンスが得られにくい。そのため動物モデルによる検討が極めて重要であるが、FIPモデルラットは世界的にも報告がない。本研究でFIPモデルラットを作成し、発症原因を炎症性サイトカインと凝固線溶反応、腸管粘膜筋層のリモデリングの観点より解明する。また、FIPの臨床的に効果のある予防薬の開発はなされていない。

本研究はこれまでの当科におけるNEC研究を礎とし、世界的にも未だ報告のないFIPモデルラットを新規開発し、その病態を解明することで新規予防法を開発することを目的とする。FIPの根絶による低出生体重児の生存率改善および神経学的予後を含めたintact survivalの実現を目的とする。



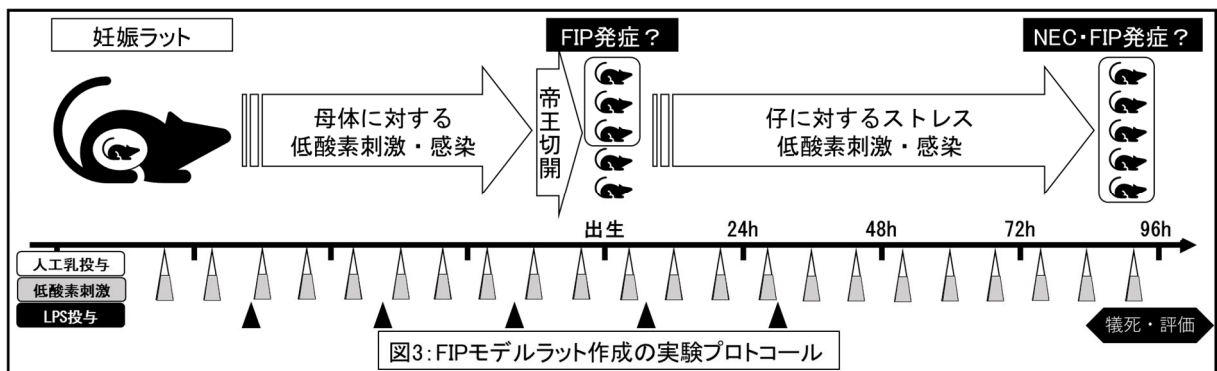
3. 研究の方法

当研究グループで確立された NEC モデルラットを基に、FIP モデルラットを作成する。

NEC モデルラットは以下の方法で作成される。 新生仔ラット (Sprague-Dawley rat) 5-7g を出産予定日に帝王切開にて出生させた後、生後 2 時間目からヒト用粉ミルク 5g + 小動物用ミルク 75ml を 0.1-0.25ml 6 時間おきに経管的に投与 低酸素刺激 (5% 酸素、95% 窒素ガス 10 分間吸入) を 1 日 4 回、4 日間 生後 1 日目と 2 日目に E. coli 由来リポポリサッカライド (LPS) 4mg/kg の経管投与。 ~ の手技によって新生児期にストレスに晒された脆弱な新生仔ラットが病理学的に NEC を発症する。

母体に対する・出生時のストレスで FIP を発症するという仮説に基づき、妊娠ラットに NEC モデルと同様の低酸素刺激・LPS 投与による感染刺激を、妊娠中や帝王切開中に加えたのちに仔ラットを娩出させる (図 3)。 NEC モデルラットと同様に仔ラットの観察を続け、臨床的に NEC または FIP を発症したと考えられる時と 96 時間後に全生存ラットを犠死せしめ全消化管と血液検体を摘出する。

以下の測定項目により FIP の発症メカニズムを解明する： 1) 腸管組織内サイトカイン測定、 2) 腸管粘膜タイトジャンクション (ZO-1, クローディン、オクルーディン、 3) 線溶凝固系マーカー (Fibrinogen, 13 因子, TAT, D-dimer、敗血症マーカーである Prsepsin)、 4) 病理組織学的所見



4. 研究成果

NEC ラットモデルにおいて、本研究と同様の低酸素刺激と LPS 刺激を行ってきた。Diving reflex を引き起こすメカニズムの大筋は本研究で行った 2 つの刺激であるという仮説と、母体因子だけでなく胎児因子も重要な役割を担っているとの仮説を基に、「母体」と「出生後」という 2 段階ストレス刺激での誘発を検証した。妊娠ラットに行うことで diving reflex と FIP モデルを再現することを目的としていたが、結論的に FIP を発症する結果は得られていない。現在の実験系では妊娠ラットに対するストレスも多く、出生後のストレスと併せて負荷が多く、死亡率が高い。また NEC に近い状態となっているため、FIP とは異なる。FIP は腸管血流が落ちる影響を最も受けやすい回盲部に発生することが多い。ヒトのストレスホルモンは副腎で賛成される内因性ステロイドであるが、出生前の胎児ストレスホルモンはより血管収縮作用の強いバソプレッシンと言われている。今後も diving reflex の再現を目指すため妊娠中ストレスに対する試薬

や刺激の選択を探求していく予定で、FIP モデルを作成するために引き続き研究が必要であると
考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sugita Koshiro, Kaji Tatsuru, Yano Keisuke, Matsukubo Makoto, Nagano Ayaka, Matsui Mayu, Murakami Masakazu, Harumatsu Toshio, Onishi Shun, Yamada Koji, Yamada Waka, Muto Mitsuru, Kumagai Kotaro, Ido Akio, Ieiri Satoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 The protective effects of hepatocyte growth factor on the intestinal mucosal atrophy induced by total parenteral nutrition in a rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 1743 ~ 1753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-021-05002-0	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 Sugita Koshiro, Ibara Satoshi, Harumatsu Toshio, Ishihara Chie, Naito Yoshiki, Murakami Masakazu, Machigashira Seiro, Noguchi Hiroyuki, Muto Mitsuru, Matsukubo Makoto, Ieiri Satoshi	4. 巻 56
2. 論文標題 Potential predictors of the onset of focal intestinal perforation in extremely low birth weight infants based on an analysis of coagulation and fibrinolysis markers at birth: A case-control study based on ten years of experience at a single institution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pediatric Surgery	6. 最初と最後の頁 1121 ~ 1126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpedsurg.2021.03.043	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 Matsukubo Makoto, Yano Keisuke, Kaji Tatsuru, Sugita Koshiro, Onishi Shun, Harumatsu Toshio, Nagano Ayaka, Matsui Mayu, Murakami Masakazu, Yamada Koji, Yamada Waka, Muto Mitsuru, Kumagai Kotaro, Ido Akio, Ieiri Satoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 The administration of hepatocyte growth factor prevents total parenteral nutrition-induced hepatocellular injury in a rat model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 353 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-020-04823-9	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 Muto Mitsuru, Sugita Koshiro, Ibara Satoshi, Masuya Ryuta, Matuskubo Makoto, Kawano Takafumi, Saruwatari Yumiko, Machigashira Seiro, Sakamoto Koichi, Nakame Kazuhiko, Shinyama Shin, Torikai Motofumi, Hayashida Yoshihiro, Mukai Motoi, Ikee Takamasa, Shimono Ryuichi, Noguchi Hiroyuki, Ieiri Satoshi	4. 巻 37
2. 論文標題 Discrepancy between the survival rate and neuropsychological development in postsurgical extremely low-birth-weight infants: a retrospective study over two decades at a single institution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pediatric Surgery International	6. 最初と最後の頁 411 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00383-020-04825-7	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 Torikai Motofumi, Sugita Koshiro, Ibara Satoshi, Ishihara Chie, Kibe Masaya, Murakami Kenichi, Shinyama Shin, Mukai Motoi, Ikee Takamasa, Sueyoshi Kazunobu, Noguchi Hiroyuki, Ieiri Satoshi	4. 巻 51
2. 論文標題 Prophylactic efficacy of enteral antifungal administration of miconazole for intestinal perforation, especially for necrotizing enterocolitis: a historical cohort study at a single institution	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 568 ~ 574
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-020-02125-0	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 矢野 圭輔, 杉田 光太郎, 家入 里志	4. 巻 46(7)
2. 論文標題 IFALDの病態解明に基づくGLP-2を用いた新規治療法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 437 ~ 440
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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 杉田 光士郎, 武藤 充, 指宿 卓也, 瀬戸口 誠, 有馬 順子, 町頭 成郎, 野口 啓幸
2. 発表標題 新生児壊死性腸炎から短腸症候群に陥った超低出生体重児症例の1例-2つの特殊脂肪乳剤による栄養管理の経験
3. 学会等名 第36回日本臨床栄養代謝学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田 光士郎, 加治 建, 矢野 圭輔, 松久保 眞, 祁答院 千寛, 松井 まゆ, 村上 雅一, 春松 敏夫, 大西 峻, 山田 耕嗣, 山田 和歌, 武藤 充, 熊谷 公太郎, 井戸 章雄, 家入 里志
2. 発表標題 肝細胞増殖因子(HGF)による腸粘膜上皮再生への試み 完全静脈栄養ラットモデルを用いた小腸粘膜上皮へ与える効果に関する検討
3. 学会等名 第37回日本小児外科学会秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田 光士郎, 茨 聡, 石原 千詠, 武藤 充, 内藤 喜樹, 山本 将功, 山本 剛土, 木部 匡哉, 大橋 宏史
2. 発表標題 超低出生体重児の限局性腸穿孔に関する凝固線溶系分析に基づいた潜在的な発症予測因子の検討
3. 学会等名 第65回日本新生児成育医学会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田 光士郎, 茨 聡, 鳥飼 源史, 武藤 充, 石原 千詠, 内藤 喜樹, 村上 雅一, 町頭 成郎, 春松 敏夫, 松久 保眞, 家入 里志
2. 発表標題 超低出生体重児における限局性腸穿孔 出生時の凝固線溶系分析により発症を予測することは可能か?
3. 学会等名 第57回日本周産期・新生児医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sugita K, Ibara S, Harumatsu T, Ishihara C, Naito Y, Murakami M, Machigashira S, Noguchi H, Matsukubo M, Muto M, Ieiri S
2. 発表標題 Potential onset predictive factors for focal intestinal perforation in extremely-low-birth-weight infants based on a coagulation and fibrinolysis system analysis at birth: Ten years' experience at a single institution
3. 学会等名 The 53th Pacific Association of Pediatric Surgeons (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sugita K, Torikai M, Ibara S, Harumatsu T, Ishihara C, Naito Y, Murakami M, Matsukubo M, Muto M, Kawano T, Machigashira S, Noguchi H, Ieiri S
2. 発表標題 The Clinical Characteristics of Focal Intestinal Perforation in ELBWIs on Enteral Prophylactic Miconazole: A Historical Cohort Study Based on a 10-Year Experience at a Single Center
3. 学会等名 The 33th 3International Symposium on Pediatric Surgical Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉田光太郎、茨聡、栗本朋典、村上雅一、町頭成郎、武藤充、野口啓幸
2. 発表標題 新生児壊死性腸炎後の短腸症候群の1例
3. 学会等名 第63回鹿児島栄養代謝研究会
4. 発表年 2020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
---------	---------