

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年 ～ 2012 年

課題番号：22591983

研究課題名（和文） ポリグリコール酸フェルトをマトリックスとした生体内自己小腸再生療法の開発

研究課題名（英文） Development of intestinal regeneration in vivo using polyglycolic acid felt as a extracellular matrix.

研究代表者 木村 修 (Kimura Osamu)

京都府立医科大学 医学研究科 助教

研究者番号：10315963

## 研究成果の概要（和文）：

研究成果の概要（和文）：ラットを用いた自己小腸再生モデルを作成し、検討してきたがボンベシン投与群（30  $\mu$ g/kg/day）で自己再生した1.5cmまでの欠損部位は正常の腸管組織構造を有していなかった。そこで、同様の神経ペプチドを呼吸器の再生に応用するべく胎児肺低形成の新たな治療方法の開発に研究目的を変更した。ボンベシンをCDH妊娠ラットに投与することにより、胎仔ラット肺の成熟度について検証したところ、CDHラット肺重量はボンベシン投与量依存性に増加することが判明した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was intestinal regeneration using neuropeptide bombesin in rats. But it was elucidated that administration of bombesin was not enough to regenerate muscle layer properly with normal mucosal structure. Because of the limit of time and cost, we changed the purpose of this project from intestinal regeneration to lung regeneration with the same neuropeptide using CDH rat model.

Using pregnant Sprague-Dawley (SD) rat(term22) which received 100mg of nitrofen into stomach through nasogastric tube on day 9.5, it was found that lung weight to body weight ratio(LW/BW) in CDH rat increases bombesin dose-dependently.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：小腸機能不全・小腸再生・神経ペプチド・ポリグリコール酸フェルト・胎児肺低形成・肺再生治療

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで BBS が小腸粘膜上皮に対し粘膜再生維持作用、粘膜固有層のリンパ組織の維持作用、虚血再還流障害時の腸管粘膜維持作用を持つこと、神経栄養作用を持つことをラット異型異所性小腸移植モデルにおいて証明してきた。今回その作用を用いて生体内で自己小腸を再生できるかについて検討したが、筋層まで正常構造を再生させることはできず、当初の目的は断念せざるを得なかった。しかし、この神経ペプチドは胎児肺の成熟を促進させる作用を持ち、肺の発生段階で最初に気道系で分化する上皮細胞である肺神経内分泌細胞内に高いレベルで発現していることが明らかとなっている。小児外科疾患の中でも重度の肺低形成を有する横隔膜ヘルニア (CDH) の新生児は、今日の新生児外科疾患の中で未だ高い致死率を認めており、その救命にはいかに低形成肺を成熟させた状態で出生させるかという胎児治療が key factor となる。神経ペプチドであるボンベシン (BBS) の胎児肺の成熟を促進作用により胎児肺の成長促進に作用するのであれば、出生前、妊婦に BBS を投与することにより CDH 患児の胎児肺の成長を促進させ、CDH 重症例の極端な肺の低形成を軽減しうることが十分予想されるところを当初の目的をて変更した。

## 2. 研究の目的

線形ペプチドである bombesin の作用として小腸再生作用の研究から肺再生作用の解

析に目的を変更し、先天性横隔膜ヘルニア (CDH) における低形成肺の成熟を BBS 投与により促し、重度の肺低形成を伴う CDH の重症例の発生を予防できうるかを検討することとした。

## 3. 研究の方法

・ BBS 投与による胎児肺の成熟度の評価  
動物モデルとして adult Sprague-Dawley (SD) rats を一晩交配させ、vaginal plug 陽性であった雌ラットを妊娠 0 日とする。妊娠 SD ラット (term 22days) に対し妊娠 9.5 日に 100mg nitrofen(WAKO Chemicals, Osaka, Japan)を olive oil に溶解させ全身麻酔下に経鼻胃管を通して 1 回投与する。

胎仔ラットを BBS 投与量により以下のグループに分け比較検討する。

・ Group1 (control 群) nitrofen 投与なし、olive oil のみ投与

・ Group2 (nitrofen(+),BBS(-))

・ Group3 (nitrofen(+),BBS(+))BBS10  $\mu$ g/kg を day0 から腹腔内投与。

・ Group4 (nitrofen(+),BBS(+))BBS20  $\mu$ g/kg を day0 から腹腔内投与

・ Group5 (nitrofen(+),BBS(+))BBS50  $\mu$ g/kg を day0 から腹腔内投与

全ての妊娠ラットに対し day21.5 に cesarean section を施行する。各グループから胎仔ラットを摘出し cesarean section

時に犠牲死させ、胎仔の体重を測定しその後肺を摘出して肺重量を測定する。

各グループにおいて採取した肺組織を以下の手法により検索した。

1) lung weight to body weight ratio(LW/BW)の比較検討による肺成熟度の評価

2) 組織学的(形態学的)検討評価

4%パラホルムアルデヒドにて肺組織を固定しHE染色による形態学的評価と免疫組織染色にて cell proliferation(PCNA 染色)及び surfactant protein-B positive cell を定量化し評価した。

4. 研究成果

1) lung weight to body weight ratio(LW/BW)の比較検討による肺成熟度の評価

肺/体重比は Group1(n=14):21.46 ± 1.59mg、CDH 群 : Group2(n=37):15.45 ± 2.71mg であり有意差を認めた(p<0.01)。

CDH 群における BBS 投与は妊娠 0 日より腹腔内投与を開始し、BBS 投与量を 10,20,50 μg/kg/day に分けて評価した。その結果、肺/体重比は Group3,BBS10 μg(n=17):16.48 ± 2.62mg、Group4,BBS20 μg(n=4):18.52 ± 6.61mg、Group5,BBS50 μg(n=8):21.34 ± 4.0mg となった。BBS 非投与群と BBS50 μg 投与群では有意差を認めた(p<0.01)。また BBS10 μg と BBS50 μg 投与群でも有意差を認めた(p<0.01)。以上より CDH ラット肺重量は BBS 投与量依存性に増加することがわかった。

2) 組織学的(形態学的)検討評価

HE 染色では CDH ラット肺で肺胞腔の狭小化、肺胞壁の肥厚が認められ、肺低形成の所見に一致した。肺成熟度を検索するために、免疫組織学的検索として PCNA(proliferation cell nuclear antigen)染色にて肺組織の増殖度を比較し、また肺の界面活性物質である surfactant 分泌を比較するために surfactant protein positive cell を検出し定量化する予定であったが、現在データ解析中。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Kimura O, Furukawa T, Higuchi K, Impact of our new protocol on the outcome of the neonates with congenital diaphragmatic hernia Pediatric surgery international, 査読有、29 巻、2013、335-339

[学会発表] (計 1 件)

① Kimura O, Furukawa T Impact of our new protocol on the outcome of the neonates with congenital diaphragmatic hernia 23<sup>rd</sup> Congress of the asian association of pediatric surgeons Oct 9, 2012, Seoul, Korea

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 修 (Kimura Osamu)

京都府立医科大学・医学研究科 准教授

研究者番号：10315963

(2) 研究分担者

古川 泰三 (Furukawa Taizo)

京都府立医科大学・医学研究科 助教

研究者番号：20515291