

## 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 20 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791712

研究課題名（和文）新生児壊死性腸炎に対する神経ペプチド投与による新たな治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new treatment by neuropeptide administration to neonatal necrotizing enterocolitis

研究代表者

坂井 宏平（SAKAI KOHEI）

京都府立医科大学 医学部附属病院 小児外科 専攻医

研究者番号：30515292

研究成果の概要（和文）：Sprague-Dawleyラット胎仔に対し、高濃度の食事、低酸素、LPSの経口投与をそれぞれ行いNECモデルラットの作成をおこなった。NECモデルの作成には成功したもの、発症率のコントロールが困難であり、その生存維持にも難渋した。

研究成果の概要（英文）：Using the Sprague-Dawley rat fetuses, we was carried out to create NEC(necrotizing enterocolitis) model. We gave high concentration meal, hypoxia, oral administration of LPS(lipopolysaccharide). We succeed to creating of NEC model although, control of incidence rate was difficult, and bogged the survival.

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	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：壊死性腸炎・モデルラット・神経ペプチド・ボンベシン・サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

壊死性腸炎（necrotizing enterocolitis：NEC）は、腸管機能の未熟な低出生体重児に多く発症し、腸管粘膜の虚血性壊死を主病変とし、時に致死的な経過をたどる疾患である。確定診断症例における救命率はおよそ 50～70%といわれており、依然として

予後不良な疾患である。その成因としては腸管粘膜に対する直接的損傷と間接的損傷があげられる。直接的損傷としては細菌や食物と腸管粘膜の接触であり、間接的損傷としては無呼吸発作、新生児呼吸窮迫症候群、心疾患などによる低酸素血症や周産期での循環不全等による虚血再灌流障害や新

生児仮死等による粘膜細胞の低酸素を原因とする腸管虚血である。これらの損傷を人為的に発生させることで NEC モデルラットの作成が現在可能になっている。(Zani A, et al. Assessment of a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. Eur J Pediatr Surg. 2008 Dec;18(6):423-426.)

壊死性腸炎発症後の治療としては循環動態の安定や腸管安静、抗生物質投与などが行われている。本症発症後に腸管粘膜が脱落し、炎症細胞浸潤や、病原性菌の増殖を示す事は知られているが、損傷を受けた腸管粘膜に対する特異的な治療法がないのが現状である。この腸管粘膜の破壊により発症する Bacterial Translocation(BT)が敗血症の原因となり、壊死性腸炎発症患児の予後を悪化させていることは明瞭である。

腸管粘膜再生因子としては Growth Hormone(GH) 、 Epidermal Growth Factor(EGF)、Insulin などが挙げられ、これまでに腸管粘膜上皮の増生促進作用があることが報告されているが、粘膜内リンパ球の再生を維持には至らずに逆に Bacterial Translocation を悪化させるといわれている。

## 2. 研究の目的

NEC モデルラット胎仔を作成し、その腸管の肉眼的変化及び粘膜の構造変化を観察し、正常ラット胎仔の腸管に対する腸管損傷の程度を明らかにする。続いて NEC モデルラット胎仔と正常ラット胎仔に対し、ボンベシンを投与した群を作成する。その

腸管粘膜に免疫組織染色を行い各群での腸管径や粘膜構造の変化を比較検討する。これによりボンベシンの投与による虚血再還流障害防止作用による NEC 発症の予防効果があるか、また発症後の腸管粘膜の再生に変化があるかを明らかにしたい。また、腸管粘膜保護作用により腸内細菌叢にどのような変化が出るのかを確認したい

## 3. 研究の方法

実験 1：壊死性腸炎 (NEC) モデルラットの作成

①Sprague-Dawley ラットを雄 1 匹に対し雌 2 ないし 3 匹を 1 つのケージに入れ、2 時間経過観察を行う。2 時間後に、各々の雌ラットを把持し組織用鑷子を膣に挿入し、膣に vaginal plug があるか確認する。Vaginal plug が確認できたラットは mating したと判断し、この時間を妊娠 0 日と定める。その後、妊娠 22 日 (E22) で CO2 ガスにて犠牲死させる。その際、速やかに帝王切開にて胎仔を娩出する。

②娩出した胎仔はコントロールのグループ A とストレスを与えるグループ B に分ける。グループ A はストレスを与えず母乳栄養を行う。

グループ B に対して、食事、低酸素、LPS の経口投与を行う。

食事：胎仔に 2Fr のシリコンカテーテルを用いて高浸透圧のミルクを与える。ミルクの組成は SMA Gold (SMA Nutriton, Berkshire, UK) 15g を蒸留水 75ml に溶解

したものとする。

低酸素： O<sub>2</sub> gas detector(BW O<sub>2</sub> Gas Alert Clip Extreme, Rockall Confined & Safety, Cardiff, UK)でモニタリングを行い、5%O<sub>2</sub>+95%N<sub>2</sub> のガスをケージ内に注入し、食事前の 10 分間低酸素のストレスを与える。

LPS 投与：生後 1 日目及び 2 日目に 4mg/kg/day の LPS (lipopolysaccharide from Escherichia coli 0111: B4, Sigma-Adrich Company Ltd., Dorset, UK) を食事に混入する。

③実験を通してラット胎仔は温度 30℃、湿度 40%に保つ。

④生後 96 時間後に胎仔の臨床状態を以下の点で評価する。

1)外観、2)運動性、3)刺激への反応、4)体表色

⑤胎仔をそれぞれ day1、day2、day3、day4 でグループ A・B 共に犠牲死させる。

その後、開腹し十二指腸から直腸にかけての腸管を周囲組織と共に切除し、PBS を満たしたトレイに浸す。以下の点について肉眼所見を評価する。

腸管の 1)伸展性、2)色調、3)腸管径。

⑥腸管のうち回腸を切除し、ホルマリンにて固定。パラフィン包埋後、連続切片を作

製する。

免疫組織学的染色を行い組織学的評価を行う。

⑦残存小腸をホモジナイズし細菌培養を行い、細菌叢の評価を行う。

実験 2：NEC ラットにボンベシン (BBS) を投与し、その投与方法、投与量により以下のグループに分け、それぞれを比較検討する。

- ・Group1(n=10)：BBS(-) control 群
- ・Group2(n=10)：BBS(+) Day0 より BBS を腹腔内投与 (10µg/kg/day)
- ・Group3(n=10)：BBS(+) Day0 より BBS を腹腔内投与 (20µg/kg/day)
- ・Group4(n=10)：BBS(+) Day4 より BBS を腹腔内投与 (10µg/kg/day)
- ・Group5(n=10)：BBS(+) Day4 より BBS を腹腔内投与 (20µg/kg/day)

生後 10 日目にラットを犠牲死させ静脈血を採取し、パラホルムアルデヒドによる還流固定を施行した後、小腸を採取する。

各グループにおいて採取したサンプルを以下の手法により検索する。

1)組織学的(形態学的)検討評価

凍結標本及び whole mount 標本を作成し、免疫組織染色にて腸管粘膜上皮の cell proliferation 及び apoptosis を評価する。

2)サイトカイン発現の検討評価

採取した血液サンプルを用いて mRNA を抽出し、RT-PCR 法により cDNA を作成増幅し、

TNF- $\alpha$ 、IL-6 を定量する。

### 3) bacterial translocation の検討評価

採取した血液サンプルを用いて血液培養を行ない、腸間膜リンパ節、肝は組織採取後ホモジナイズし、細菌培養を行ないグラム陰性桿菌の存在を検討評価する。

## 4. 研究成果

### 実験 1

ラット胎仔をグループ A は 12 体、グループ B は 20 体とした。

NEC モデルの確保に難渋し、グループ B のうち 5 体が day2 で死亡、8 体が day3 で死亡、4 体が day4 で死亡し day4 の時点で生存していたのはわずかに 3 体であった。

NEC の発症ラットは以下の点を認めた。

- ・肉眼的所見：腸管内出血や虚血による腹壁の黒色変化
- ・組織学的所見：粘膜浮腫、炎症細胞浸潤、粘膜固有層内の出血。

day4 で犠牲死させた 3 体は全例 NEC を発症していた。

途中死亡例の NEC の発症率は約 40%ほどであり、生後の管理に改善点があると考えられた。

### 実験 2 ボンベシン投与

実験 1 での NEC モデルの作成に不安定さがあり、NEC モデルに対しては行えなかった。

正常出産仔ラットに対して腹腔内投与をお行なったが、腸管損傷などを起こしたため皮下投与に変更した。

NEC モデルの作成は可能であるが、BBS 投与モデルをさらに作成するためにも安定した作成方法の検討が必要であると考えられた。

## 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 3 件)

Kohei Sakai, Shigehisa Fumino, et al. :  
Cinical course of obstructive jaundice associated with neonatal meconium peritonitis. Eur J Pediatr Surg. 2010. 222-225 査読あり

坂井宏平、木村修、他：大学病院における障がい児への外科的治療の取り組み 小児外科 43 971-973 査読なし

坂井宏平、木村修、他：周産期医療部を有した大学病院における低出生体重児の外科治療成績 小児外科 44 1050-1053 査読なし

[学会発表] (計 6 件)

- ・ 坂井宏平、木村修、他：大学病院における重症心身障害児の外科的治療の経験 第 26 回日本小児外科学会秋季シンポジウム
- ・ 坂井宏平、木村修、他：当科における極・超低出生体重児に対する治療成績 第 27 回日本小児外科学会秋季シンポジウム
- ・ 坂井宏平、木村修、他：重症心身障害児に対する外科的治療の役割 第 47 回日

本小児外科学会

- ・ 坂井宏平、木村修、他：Dor-Nissen 噴門形成術 24 例の検討 第 48 回日本小児外科学会
- ・ 坂井宏平、木村修、他：重症心身障害児の胃食道逆流症に対する治療成績 第 49 回日本小児外科学会
- ・ 坂井宏平、木村修、他：Dor 噴門形成術 31 例の治療成績 第 43 回日本小児消化管機能研究会

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 宏平 (SAKAI KOHEI)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：30515292

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

