

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16295

研究課題名(和文) ポンプレス人工胎盤システムの開発：人工羊水に対する濾過殺菌法の検討

研究課題名(英文) Search for effective artificial amniotic fluid purification method

研究代表者

佐藤 信一 (Sato, Shinichi)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：30770359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は超低出生体重児の予後の改善を目的とした人工胎盤システムをヒツジ胎仔を用いた動物実験で開発した。そこで未熟で抵抗力の弱い胎仔は、人工羊水内で増殖した微生物による菌血症や敗血症に陥りやすいことが指摘されたため、本研究では羊水の浄化システムの確立を目的とした。人工羊水循環回路内に0.2 μmの物理的フィルターと紫外線照射を導入したが、羊水内での細菌の増殖を防ぐことは容易ではなく、未熟な早産ヒツジは敗血症を発症した。しかし翌年から6時間毎に人工羊水を入れ替えることにより、抵抗力の弱い未熟な胎仔(妊娠103日、平均体重1.20 kg)においても敗血症の発症を予防できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超低出生体重児の予後の改善を目的とした人工胎盤システムにおいて、人工羊水の浄化は必要不可欠である。そこで未熟な胎児においても人工羊水を入れ替えることで敗血症を予防できることが示された意義は大きい。現在胎児の成長や発達に羊水成分の与える影響は全く解明されていない。そのため本システムを採用するのであれば、今後は人工羊水を入れ替えることで生じる成長障害に着目した解析が必要である。一方で本来の子宮内における羊水の主成分は胎児尿であり、人工子宮内においてより生理的な環境を胎児に提供するのであれば、無菌を維持できる閉鎖式人工子宮バッグやより効果的な羊水循環濾過システムの開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We developed an artificial placenta system for improving the prognosis of very low birth weight infants in animal experiments using sheep fetuses. In the study, it was pointed out that immature and weakly resistant fetuses are prone to fall into bacteremia and sepsis due to microorganisms grown in artificial amniotic fluid. Therefore, the purpose of this study was to establish an amniotic fluid purification system. A 0.2 μm filter and ultraviolet irradiation were introduced into the artificial amniotic fluid circulation, but it was not easy to prevent bacterial growth in amniotic fluid, and immature sheep fetuses developed sepsis. However, subsequent experiments showed that the replacement of artificial amniotic fluid every 6 hours could prevent the development of sepsis in immature fetuses (103 days gestation, average body weight 1.20 kg).

研究分野：新生児学

キーワード：人工子宮 ヒツジ 子宮内感染 人工羊水

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

周産期新生児医療の進歩に伴い、出生体重 1,000 g 未満の超低出生体重児の生存率は過去 20 年間で大きく改善してきた。¹⁾ 一方で重篤な合併症なく退院できる児の割合には大きな変化が見られない。また長期追跡することで、これらの児には運動障害だけではなく、認知障害、行動障害、学習障害などの問題も高率にみられることが明らかとなり、^{2, 3)} 早産児の長期予後の改善は周産期新生児医療の喫緊の課題である。

現行の「保育器と人工呼吸器で育てる新生児集中治療」において、早産児は胎児循環から成人循環への転換と未成熟肺での肺呼吸を出生後から強制されるため容易に呼吸循環不全に陥り、脳室内出血、脳白質損傷、壊死性腸炎など重篤な合併症を生じやすい。こうした課題を克服する 1 つの選択肢として、われわれはヒト胎盤循環を模したポンプレス人工胎盤システムをヒツジ胎仔を用いた動物実験で開発し、妊娠 100 日 (ヒト妊娠 27 週相当) で体重 1.0 kg 以下の小さなヒツジ胎仔でも、3 日間以上安全に呼吸循環管理できることを確認した。⁴⁾ 一方で感染への抵抗力が弱い未熟なヒツジ胎仔は人工羊水内で増殖した微生物による菌血症や敗血症に陥りやすいことが指摘され、羊水の浄化システムの確立が課題となった。

2. 研究の目的

本研究期間内には、微生物の増殖による感染症を予防するために人工羊水の濾過殺菌システムを確立する。具体的には、(i) 羊水量を減少させ、(ii) 物理的濾過フィルターおよび紫外線照射を強化し、(iii) 最も効率のよい濾過流量に設定すれば、未熟なヒツジ胎仔であっても、人工羊水内での微生物の増殖や感染症を予防できることを証明する。もし感染症を予防できない場合には、人工羊水の定期的な入れ替えにより敗血症を予防できるかを検証する。

3. 研究の方法

本研究は「東北大学における動物実験等に関する規程」に従って実験を実施した。対象として妊娠期間が確定した Suffolk 種のヒツジ胎仔を用いた。

(1) ポンプレス人工胎盤の装着と全身管理

全身麻酔下に母獣の子宮を切開して、胎仔の頸動脈と上大静脈にカテーテルを留置し、胎仔の動脈圧と中心静脈圧を連続監視した。引き続き、臍帯動脈と臍帯静脈に血管カニューレを挿入して、ポンプレス人工胎盤回路に接続し、回路内血液は胎仔の心ポンプのみで駆動させた。回路接続後には回路内凝血を予防するための低分子ヘパリンと、動脈管を開存させて胎児循環を維持させるためのプロスタグランディン E2 製剤 (5 ng/kg/min) をそれぞれ持続点滴した。臍帯を切離した後、胎仔と人工胎盤回路を人工子宮バッグ内の 39 の人工羊水 (Na 120 mEq/l, Cl 100 mEq/l) に浮遊させた。回路血流量を 150-250 ml/kg/min に保ち、臍帯動脈血で pH 7.40, PCO₂ 40 torr, PO₂ 30 torr, glucose 20 mg/dl 前後を維持させ、乳酸値 < 20 mg/dl を目標とした。また栄養サポートとして、glucose 10 g/kg/日、アミノ酸 2.0 g/kg/日の輸液を行い、総輸液量は 150 ml/kg/日とした。電解質、微量元素、ビタミン類はヒト早産児に対する標準補給量を投与した。

(2) 人工羊水の循環型濾過殺菌システムの導入

平成 29 年度には人工子宮内の人工羊水量を 10 L に減少させ、羊水循環型回路内に物理的濾過フィルターとして 0.2 μm ポリエーテルサルホンメンブレンカプセルカートリッジフィルター (CCS-020-E1H; アドバンテック東洋, 東京) を、さらに紫外線殺菌装置として紫外線殺菌灯 (UV14; MonotaRO, 兵庫) を設置し、流量 100 ml/分で人工羊水を循環濾過した。妊娠 88-103 日 (満期 147 日) のヒツジ胎仔に人工胎盤システムを装着し、5 日間養育する実験を 6 回の実験を実施した。

(3) 定期的な人工羊水の入替えによる羊水感染症の予防効果の検討

平成 30 年度には比較的成熟した妊娠 135-138 日のヒツジ胎仔に人工胎盤を装着した。6 時間毎に人工羊水の入替えを行い、羊水感染症を防ぐことが可能かを検証するために人工羊水中で 9 日間の養育を行った。

令和元年度にはさらに未熟な妊娠 103 日のヒツジ胎仔 5 例に人工胎盤を装着し、6 時間毎の人工羊水の入替えを行い、5 日間の養育を行った。

4. 研究成果

(1) 平成 29 年度

平成 29 年度には妊娠 88-103 日 (満期 147 日) のヒツジ胎仔に人工胎盤システムを装着し、5 日間養育する実験を 8 回予定した。しかし 1 例は受胎が得られず、1 例は臍帯脱出による子宮内胎仔死亡のため、6 回の実験を実施した。手技的な問題により 2 例は早期に十分な胎盤血流を確保できずに死亡した。データを収集できた 4 例 (平均妊娠週数 92.8 週, 平均体重 1.09 kg) において、人工胎盤装着後 24 時間における羊水培養検査と血液培養検査を実施した。

表 1-A. 平成 29 年度における羊水培養検査と抗生物質の感受性

No.	性別	体重 (kg)	AP開始 (日)	検体採取 (時間)	培養同定菌	PIPC	AMK	AZM	CEZ	MEPM
1	雄	1.10	88	24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	I	R	R	S
					<i>Enterococcus faecium</i>	S	R	I	R	S
2	雄	1.40	103	24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	I	R	R	S
					<i>Enterococcus faecium</i>	S	R	I	R	S
3	雄	0.72	90	24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	I	R	R	S
					<i>Enterococcus faecium</i>	S	R	I	R	S
4	雄	1.12	90	24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	I	R	R	S
					<i>Enterococcus faecium</i>	S	R	I	R	S

表 1-B. 平成 29 年度における血液培養検査と抗生物質の感受性

No.	性別	体重 (kg)	AP開始 (日)	検体採取 (時間)	培養同定菌	PIPC	AMK	AZM	CEZ	MEPM
1	雄	1.10	88	24	-					
2	雄	1.40	103	24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	I	R	R	S
3	雄	0.72	90	24	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	I	R	R	S
4	雄	1.12	90	24	-					

AP, 人工胎盤; PIPC, ピペラシリン; AMK, アミカシン; AZM, アジスロマイシン; CEZ, セファゾリン; MEPM, メロペネム; S, 感受性あり; I, 中等度; R, 耐性あり

データを収集できた 4 例において, 人工胎盤装着後 24 時間における羊水培養検査を実施したところ, 全例で *Pseudomonas aeruginosa* と *Enterococcus faecalis* が検出された. また血液培養検査では 2 例から *Pseudomonas aeruginosa* が検出され, その 2 例はのちに敗血症性ショックを発症したため安楽死処置を施した.

以上から循環型濾過殺菌システムを用いても, 羊水内での細菌の増殖を防ぐことは容易ではなく, 未熟な早産ヒツジは敗血症を発症することが指摘された.

(2) 平成 30 年度

平成 30 年度には比較的成熟した妊娠 135-138 日のヒツジ胎仔に人工胎盤を装着した. 6 時間毎に人工羊水の入れ替えを行い, 羊水感染症を防ぐことが可能かを検証した. 人工羊水中で 9 日間の養育が可能であった 3 例 (妊娠週数 136 日, 平均体重 3.32 kg) において, 人工胎盤装着後 144 時間と 216 時間における羊水培養検査と血液培養検査を実施した.

表 2-A. 平成 30 年度における羊水培養検査と抗生物質の感受性

No.	性別	体重 (kg)	AP開始 (日)	検体採取 (時間)	培養同定菌	PIPC	AMK	AZM	CEZ	MEPM
5	雌	3.31	136	144	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	R	R	R
				216	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	I	R	R
					<i>Pseudomonas stutzeri</i>	R	S	R	R	R
6	雌	3.29	136	144	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	I	R	R
				216	<i>Enterococcus faecium</i>	R	R	I	R	R
7	雄	3.35	136	144	-					
				216	<i>Candida albicans</i>					

表 2-B. 平成 30 年度における血液培養検査

No.	性別	体重 (kg)	AP開始 (日)	検体採取 (時間)	培養同定菌
5	雌	3.31	136	144	-
				216	-
6	雌	3.29	136	144	-
				216	-
7	雄	3.35	136	144	-
				216	-

データを収集できた 3 例において, 人工胎盤装着後 144 時間と 216 時間における羊水培養検査を実施したところ, 144 時間では 2 例から *Enterococcus faecium*, 216 時間ではそれに加えて 1 例から *Pseudomonas stutzeri*, 1 例から *Candida albicans* が検出された. しかし羊水培養で検出された菌による敗血症の発症はなかった.

以上から比較的成熟したヒツジ胎仔では, 6 時間毎の人工羊水の入れ替えを行うことにより, 羊水内に細菌は検出されるが, 敗血症の発症を予防できることが示唆された.

(3) 令和元年度

令和元年度にはさらに未熟なヒツジ胎仔 5 例 (妊娠 103 日, 平均体重 1,20 kg) に人工胎盤を装着し, 6 時間毎の人工羊水の入れ替えを行い, 人工胎盤装着後 120 時間における羊水培養検査と血液培養検査を実施した。

表 3-A. 令和元年度における羊水培養検査と抗生物質の感受性

No.	性別	体重 (kg)	AP開始 (日)	検体採取 (時間)	培養同定菌	PIPC	AMK	AZM	CEZ	MEPM
8	雌	1.18	103	120	-					
9	雄	1.30	103	120	Stenotrophomonas maltophilia	R	R	R	R	R
10	雌	1.31	103	120	-					
11	雌	1.10	103	120	Stenotrophomonas maltophilia	R	R	R	R	R
12	雄	1.13	103	120	-					

表 3-B. 令和元年度における血液培養検査

No.	性別	体重 (kg)	AP開始 (日)	検体採取 (時間)	培養同定菌
8	雌	1.18	103	120	-
9	雄	1.30	103	120	-
10	雌	1.31	103	120	-
11	雌	1.10	103	120	-
12	雄	1.13	103	120	-

120 時間における羊水培養検査では, 2 例で *Stenotrophomonas maltophilia* が検出された。しかし血液培養検査では全例で細菌は検出されず, 敗血症の発症もみられなかった。以上から未熟なヒツジ胎仔においても 6 時間毎の人工羊水の入れ替えを行うことにより, 敗血症の発症を予防できることが示唆された。

本研究では, 人工羊水循環回路内に 0.2 μm の物理的フィルターと紫外線照射を用いた人工羊水の循環型濾過殺菌システムを用いたが, 羊水内での細菌の増殖を防ぐことは容易ではなく, 未熟な早産ヒツジは敗血症を発症した。しかしその後 6 時間毎に人工羊水を入れ替えることにより, 抵抗力の弱い未熟な胎仔においても敗血症の発症を予防できることが示された。

現在胎児の成長や発達に羊水成分の与える影響は全く解明されていない。そのため本システムを採用するのであれば, 今後は人工羊水を入れ替えることで生じる成長障害に着目した解析が必要である。一方で本来の子宮内における羊水の主成分は胎児尿であり, 人工子宮内においてより生理的な環境を胎児に提供するのであれば, 無菌を維持できる閉鎖式人工子宮バッグやより効果的な羊水循環濾過システムの開発が望まれる。

<引用文献>

- 1) Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, et al. Trends in care practices, morbidity, and mortality of extremely preterm neonates, 1993-2012. *JAMA*. 2015 Sep 8;314 (10):1039-51.
- 2) Moore T, Hennessy EM, Myles J, et al. Neurological and developmental outcome in extremely preterm children born in England in 1995 and 2006: the EPICure studies. *BMJ*. 2012; 345: e7961.
- 3) Adams-Chapman I, Heyne RJ, Demauro SB, et al. Neurodevelopmental impairment among extremely preterm infants in the Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2018; 141 (5): e20173091.
- 4) Miura Y, Saito M, Usuda H, Woodward E, Rittenschober-Böhm J, Kannan PS, Musk GC, Matsuda T, Newnham JP, Kemp MW. Ex-vivo Uterine Environment (EVE) therapy induced limited fetal inflammation in a premature lamb model. *PLoS One* 2015; 10: e0140701.

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 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Usuda Haruo, Watanabe Shimpei, Saito Masatoshi, Sato Shinichi, Musk Gabrielle C., Fee Erin, Carter Sean, Kumagai Yusaku, Takahashi Tsukasa, Kawamura Shinichi, Hanita Takushi, Kure Shigeo, Yaegashi Nobuo, Newnham John P., Kemp Matthew W.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Successful use of an artificial placenta to support extremely preterm ovine fetuses at the border of viability	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajog.2019.03.001	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 該当する

1. 著者名 Usuda Haruo, Watanabe Shimpei, Miura Yuichiro, Saito Masatoshi, Musk Gabrielle C., Rittenschober-B?hm Judith, Ikeda Hideyuki, Sato Shinichi, Hanita Takushi, Matsuda Tadashi, Jobe Alan H., Newnham John P., Stock Sarah J., Kemp Matthew W.	4. 巻 217
2. 論文標題 Successful maintenance of key physiological parameters in preterm lambs treated with ex?vivo uterine environment therapy for a period of 1 week	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Obstet Gynecol.	6. 最初と最後の頁 457.e1 - 457.e13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajog.2017.05.046	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

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