

令和 4 年 5 月 2 7 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17345

研究課題名（和文）ビタミンAとステロイド懸濁羊水注入併用気管支結紮による羊胎仔横隔膜ヘルニア治療

研究課題名（英文）Treatment of fetal diaphragmatic hernia in sheep by tracheobronchial ligation combined with amniotic fluid infusion of vitamin A and steroid suspension.

研究代表者

大林 樹真（Obayashi, Juma）

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：20835409

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：バリウムによる羊胎仔気管支造影を行い、左右主気管支径と気管径を検討したところ病的に細径であった気管支の結紮ではなく、正常群と差のなかった気管結紮と気管内薬剤注入を行う方針とした。

しかし新型コロナウイルスの世界的な蔓延により羊胎仔を用いた実験が困難となったためウサギ胎仔横隔膜ヘルニアモデル作製法の確立をすることとした。ウサギ胎仔は肝臓は両葉ともほぼ左右対称で横隔膜面を覆っており、羊胎仔に比べて作製困難だった。また既報では胎生21-25日で手術していたが、胎生22日では胎児が手術侵襲に耐えられず胎生24日でモデル作製に成功した。横隔膜切開は非常に作製が困難であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性横隔膜ヘルニア（CDH）は年間200例ほどの希少疾患ではあるが、90日死亡率が19.4%と高率である。死因には肺低形成が関与しており、胎児治療が試みられている。今回我々は横隔膜ヘルニアの新規胎児治療を研究することを目的とした。治療を行う前の安全性を確かめる実験を羊胎仔に対して行った。つづいて新規胎児治療の研究を行う予定であったが新型コロナウイルスの世界的な蔓延により羊胎仔を用いた実験が困難となったためウサギ胎仔横隔膜ヘルニアモデルを作製した。既報の方法では作製困難だったが、モデル作製の確立に成功した。今後このモデルを用いて胎児治療研究が発展することを期待する。

研究成果の概要（英文）：We performed bronchogram of fetal sheep and examined the diameters of the left and right main bronchi and trachea. Because the main bronchi were morbidly small in diameter, we decided to ligate the trachea and inject intratracheal drug, which did not differ from the normal group.

However, We decided to create a model of fetal diaphragmatic hernia in rabbits, which is the result of a coronavirus outbreak. In the rabbit fetus, both lobes of the liver are almost symmetrical and cover the diaphragmatic surface, making it more difficult to create a diaphragmatic hernia model than in sheep fetuses. In a previous report, surgery was performed at 21-25 days of gestation, but the fetus could not tolerate the surgical invasion at 22 days of gestation, and the model was successfully created at 24 days of gestation. Although the diaphragmatic incision proved to be extremely difficult to fabricate, we have succeeded in producing a rabbit fetal diaphragmatic hernia model.

研究分野：胎児治療

キーワード：横隔膜ヘルニア 胎児治療

### 1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニア(CDH)は年間 200 例ほどの希少疾患ではあるが、90 日死亡率が 19.4%と高率である。死因には肺低形成が関与しており、胎児治療が試みられている。Harrison や Pringle が羊胎仔 CDH モデルを作製し、胎児治療の研究を始めた。その後、横隔膜修復術、tracheal ligation、tracheal occlusion、fetal endoscopic tracheal occlusion (FETO)が胎児治療として研究された (Kitagawa H, Pringle KC.(2017). Fetal surgery: a critical review. *Pediatric surgery international*.33(4):421-433)。ヒトに対する FETO は最初に Harrison らが報告したが、生存率を改善出来なかった(Harrison MR, Keller RL, Hawgood SB, et al (2003) A randomized trial of fetal endoscopic tracheal occlusion for severe fetal congenital diaphragmatic hernia. *N.Engl.J.Med*.349:1916-1924)。また欧州で The Tracheal Occlusion To Accelerate Lung growth trial (TOTAL trial) (Jan Deprest, Paul Brady, Kypros Nicolaides, et al (2014) Prenatal management of the fetus with isolated congenital diaphragmatic hernia in the era of the TOTAL trial. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*.19:338-348)が行われているが、FETO は CDH 患者の標準的な治療には至っていない。

CDH における未熟肺は Areechon が報告したように(Areechon W, Reid L (1963) Hypoplasia of lung with congenital diaphragmatic hernia. *Br.Med.J.* 1:230-233) 機械的な肺の圧迫であると考えられており、そうした肺の圧迫のために羊水由来の肺胞水が減少し肺低形成を呈していると考えられている。また肺の低形成を改善させる胎児治療の薬剤投与の試みはステロイド、Vitamin A 等であったが、これらの実験は 7 割が Nitrofen rat を用いた実験で、臨床応用は難しいと Systematic Review で述べられていた。

### 2. 研究の目的

今回我々は胎児治療として患側肺の気管支閉塞に追加して、CDH 羊胎仔に対して気管支内に羊水を注入し肺容量を増加させる治療を行いその効果を評価することを目的とした。CDH に関するラットなどの小動物を用いた実験では、対象が小さくまた、妊娠期間が短いため、外科的治療をおこなうことは困難であった。昨今の動物実験に対する倫理の厳格化により大動物での胎児治療は徐々に行えなくなっている。こうした状況のため CDH に対する新規胎児治療の研究は下火となってきているが、依然として高い死亡率を示している CDH の治療、とくに肺低形成の改善は非常に重要であると考えた。羊胎仔 CDH モデルの気管支内にステロイド、Vitamin A の薬剤を羊水とともに注入する胎児治療は前例がない。新しい胎児治療を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

気管支結紮および気管結紮の可否を検討するため、気管支および気管径を検討した。とくに内径を評価するためバリウムによる気管気管支造影を行い、単純レントゲン写真での左右主気管支径と気管径を検討した。

妊娠羊を、手術の 24~48 時間前に牧場から搬送した。母羊は超音波検査で妊娠を確認し、不要な手術を行わないようにした。羊胎仔 10 例を胎生 80 日に左 CDH モデルの作製をした。全身麻酔下に臍帯が付着したまま羊胎仔を上半身のみ子宮外へ露出させた。第 8 から第 11 肋間周辺の左側胸部を切開した。胸腔から左横隔膜へアプローチし、左横隔膜を約 1.5 cm 切開した。ヘルニア門を通して胸腔内に胃を脱出させ、CDH を作製した。胸壁を縫合閉鎖し、羊胎仔を母羊の子宮内に戻した。子宮と母羊の腹壁を閉鎖した。このうち 3 例は胎生 100 日に同様の方法で胎仔手術を行い、5-0 monofilament 非吸収糸で CDH を縫合縫縮して治療した。母羊を牧場へ戻し妊娠継続させた後、満期 (胎生約 145 日) に帝王切開で羊胎仔を娩出し、犠牲死させた。CDH を認めた 5 例を Group A とし、CDH を認めなかった 5 例に加えて CDH 以外の胎児手術をし、胎生満期 (140 日) に犠牲死させた 7 例を含めた計 12 例をコントロールとして Group B とした。

同様に羊胎仔 6 例を胎生 80 日に左 CDH モデルの作製をし、胎生 100 日に犠牲死させた。CDH を認めた 3 例を Group C とした。CDH を認めなかった 3 例に加えて胎児手術を行わず胎生 100 日に犠牲死させた正常羊胎仔 1 例を含めた計 4 例をコントロールとして Group D とした。

体重と頭殿長を計測し、羊の呼吸器官を一括に摘出した。経気管的にバリウムを末梢気管支が造影されるまで注入し、単純レントゲン写真を撮影した。この気管支造影単純レントゲン写真を用いて気管径 (trachea diameter; T-dia) と左右気管支径と測定した。羊右気管支は気管から上葉支が分岐し、中間幹が左主気管支と分岐する。右気管支として右中間幹径 (diameter of right bronchus; R-dia) を、左気管支として左主気管支径 (diameter of left bronchus; L-dia) を測定した。分岐部から末梢 3mm の気管支を測定部位とした。気管径は最大気管径とした。また同様に気管支造影単純レントゲン写真を用いて左主気管支からの第一分枝が分岐する距離 (left distance to first branch; L-dist) 右中間幹からの第一分枝が分岐する距離 (right distance to first branch; R-dist) を測定した。

統計学的解析は JMP® 14 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行った。定量的データ

は Mean  $\pm$  Standard Deviation で記載した。Mann-Whitney U test を行った。統計学的有意差を  $p < 0.05$  とした。

つづいて羊胎仔 CDH モデルの気管支内にステロイド、Vitamin A の薬剤を羊水とともに注入する胎児治療実験を行う予定であったが、新型コロナウイルスの世界的な流行により、海外渡航が困難となったことで羊胎児実験が行えなくなってしまった。そこで日本国内でウサギ胎仔 CDH モデル作製をすることとし、疾患モデルの確立を行うこととした。

妊娠日本白色家兎（以下妊娠ウサギ）を動物実験施設に搬入し、ウサギ飼育ケージ内で飼育をする。各々別のケージで飼育し、術直前まで飲水の制限はしなかった。食餌は前日 9 時までで終了とした。妊娠 22 日妊娠ウサギにミダゾラム 0.3mg (0.1mg/kg) を筋注し麻酔導入した。移動用ケージに移し、飼育室から研究室へウサギを搬送した。鎮静不十分であれば計 3mg (1mg/kg) を極量としてミダゾラム筋注追加した。イソフルラン 3% と純酸素 1L/min を用いて、マスクによる吸入麻酔をした。その後耳介静脈に 25G 翼状針で末梢静脈ルートを取り、ソリタ T3 輸液を 90ml/h (30ml/kg/h) で持続静注した。ブトルファノール 1.0mg (約 0.3mg/kg) 静注し、セファゾリン Na 6mg (2mg/kg) を筋注。ラリンジアルマスクを挿入した。保温マットと処置用おむつを敷いた手術台上に仰臥位とし、下腹部をシェーバーで除毛し消毒した。下腹部正中に 6cm の皮膚切開をおき、開腹した。双角子宮の先端にいる胎仔を 1 頭ずつ胎児手術して DH モデル作製した。子宮を体外に露出し、胎仔の肩部を触診で確認後、左手で頸胸部を固定した。胎仔を子宮壁に押し付けて羊水流出を防止した。また、温生食を絶えず散布して胎仔の保温と乾燥防止に努めた。胎仔左肩部を狙って、子宮壁の筋線維と並行に 15 番メスで 1cm 切開した。胎仔左上肢のみを子宮外へ脱転させて左側胸部を露出した。胎仔左第 6 肋間で開胸し、横隔膜を同定した。剪刀で横隔膜を切開した後、モスキート鉗子を横隔膜切開部から腹腔側へ向かって挿入した。モスキート鉗子を広げて横隔膜ヘルニア門を開大して DH モデルを作製した。胎仔胸壁を 6-0 プロリオンで縫合閉鎖した後、胎仔の腹部を軽く圧迫し、腹腔臓器の胸腔陥入を促した。胎仔を子宮内へ納め、羊水流出分として温生食 2ml を補充し、子宮を 6-0 プロリオンで縫合閉鎖した。続いて反対側子宮角先端の胎仔を同様な手技で DH モデル作製した。残りの胎仔は手術をせず、対照群として使用した。子宮を母ウサギの腹腔内に戻し、3-0 バイクルリで腹膜、筋膜を層別に閉鎖した。2-0 ナイロンで皮膚縫合し手術終了した。最後にメドロキシプロゲステロン 5.0mg およびブトルファノール 0.3mg (0.1mg/kg) を筋注した。

ウサギを動物実験施設に戻し、術前と同様にケージで飼育した。初回手術 1 時間後にケージ内のウサギを観察。背を外側に弓なりに曲げたり、腹部を引っ込めたり、腹部を守ろうとする姿勢がある場合は「痛みあり」と判断し、ブトルファノール 0.3mg (0.1mg/kg) 筋注追加した。飲食は制限せず、ウサギが可能なところから水と通常飼料を与えた。通常ケージ、通常飼料で飼育。sacrifice 手術前に流産する、もしくは歩行が不可能となる場合はエンドポイントとして、この母ウサギおよび胎仔は実験データとして解析には使用せず、安楽死させることとした。

妊娠 29 日に飼育室内で耳介静脈に末梢静脈ルートを確保しベントバルビタールを 300mg (100mg/kg) 静注して安楽死させた。母ウサギ心肺停止 20 分後に帝王切開した。臍帯を離断して胎仔を娩出した。母ウサギは安楽死動物処理に基づいて処理した。胎仔の羊水をふき取り、頭殿長と体重を測定した。胸壁および腹壁を正中切開で開放し、CDH モデルに関しては臓器が腹腔内に嵌入しているかを確認した脱出臓器の内容、ヘルニア門の大きさ、胸腔内に占めるヘルニア内容のおおよその容積を記録した。

これをウサギ胎仔 CDH モデル作製の手順とし、モデル作製のたびに吟味してもっとも適した作製方法を検討した。

#### 4. 研究成果

まず羊胎仔実験について以下に記載する。

胎生満期に犠牲死させた 17 羊胎仔の内、腸管脱出を伴う CDH を認めた 5 胎仔 (CDH 群) と、腸管脱出は認めなかったが CDH を認めなかった 12 例をコントロール群として両群を比較した。気管径は CDH 群  $7.3 \pm 0.6$ mm、コントロール群  $8.0 \pm 1.5$ mm ( $p=0.37$ )。左主気管支径は CDH 群  $4.0 \pm 0.6$ mm、コントロール群  $5.4 \pm 1.3$ mm ( $p < 0.05$ )。右主気管支径は CDH 群  $4.6 \pm 0.9$ mm、コントロール群  $5.1 \pm 0.8$ mm ( $p=0.32$ )。胎生満期では CDH を認める左側のみ主気管支が細かった。

胎生 100 日に犠牲死させた 7 例の内、腸管脱出を伴い CDH を認めた 3 例 (CDH 群) と、腸管脱出を伴い CDH を認めなかったコントロール群 ( $n=4$ ) を比較した。気管径は CDH 群  $4.4 \pm 0.2$ mm、コントロール群  $4.9 \pm 1.0$ mm ( $p=0.85$ )。左主気管支径は CDH 群  $2.8 \pm 0.1$ mm、コントロール群  $3.9 \pm 0.7$ mm ( $p < 0.05$ )。右主気管支径は CDH 群  $3.5 \pm 0.2$ mm、コントロール群  $3.7 \pm 1.0$ mm ( $p=1.00$ )。胎生 100 日では CDH を認める左側のみ主気管支が細かった。

CDH を認める側の主気管支が胎生 100 日、満期ともに細くなっていた。CDH 側の主気管支は満期であっても、胎生 100 日の正常気管支とほぼ径が同じであった。CDH に対して行う胎児治療としての気管支結紮や気管支バルーン閉塞は細径気管支に対して行う必要があり、困難と考えられた。気管径は CDH とコントロール群間に差がなく、気管支と比較して比較的安全に治療が行える可能性があると思われた。

続いてウサギ胎仔実験について以下に記載する。

まず胎生 22 日妊娠ウサギ 2 羽にモデル作製手術を行った。計 5 羽の胎仔に CDH 作製を行ったが、1 羽が術中に子宮内に戻せなくなったため Sacrifice し、2 羽は流産し、2 羽は胎生 29 日の Sacrifice 時に子宮内胎児死亡していた。

手術手技に問題があると考え、胎生 26 日妊娠ウサギ 2 羽にモデル作製手術を行った。計 4 羽の胎仔に CDH 作製を行い、胎生 29 日の Sacrifice 時に全て生存していた。そのため手術手技的に作製不可能なモデルではないことがわかった。しかし胸腔内への臓器脱出を認めたのは 1 羽のみで、3 羽の CDH は自然閉鎖しておりモデル作製のためには大きなヘルニア門を作る必要があることがわかった。

続いて胎生 22 日妊娠ウサギ 4 羽にモデル作製手術を行った。しかし全てが子宮内胎児死亡していた。そのため手術時期が胎児死亡の原因であると考えた。胎生 22 日妊娠ウサギの 2 羽にシャム手術を行ったところ、子宮切開までで終了した胎仔は生存し、胸壁切開まで行った胎仔は死亡していた。そのため胎生 22 日ウサギ胎仔に直接の侵襲を加えることは困難だと判断した。

胎生 24 日妊娠ウサギ 2 羽にモデル作製手術を行ったところ、胎仔 4 羽すべてが生存して CDH を認めた。そのためウサギ胎仔 CDH モデル作製至適時期は胎生 24 日ごろとわかった。

続いて麻酔管理および手術手技などを検討した結果を記載する。麻酔導入として用いたミダゾラム 0.3mg (0.1mg/kg) のみでは十分な鎮静が得られずウサギが不穏となった。そのためミダゾラム (10mg/2ml) +ドミトール (2.5mg/2.5ml) +ブトルファノール (2.5mg/0.5ml : 5ml) の 3 種を混合麻酔薬 とし、飼育室内でこれを 1.5ml 筋注して麻酔導入とした。

術後低体温が危惧されたため、実験室に移動してからはすみやかに携帯用カイロと処置用おむつを敷いて保温に努めた。

追加の麻酔薬を使用しないと静脈ルート確保や気道確保時に安静が保てなかった。しかしミダゾラム単剤では術後の覚醒が不良であったため生食 (2ml) +ドミトール (2.5mg/2.5ml) +ブトルファノール (2.5mg/0.5ml : 5ml) を混合麻酔薬 とし 1ml 皮下注射することとした。

イソフルラン 3% のみでマスク換気し、鎮静されたら仰臥位にして手足を固定した。当初はラリンジアルマスクを挿入し、自発呼吸での管理とする方針だったが、術中低酸素が問題となったため気管挿管をして術中は人工呼吸器管理をすることとした。スニッフingポジションをとって開創器で口を開けて舌を牽引し、4.0 カフなし挿管チューブを気管支鏡に挿入した状態で挿管した。圧縮酸素とイソフルランを 3% で開始し、SAT モニタを前足に装着した。人工呼吸器で強制換気。呼吸回数 15、吸気時間 1.8、TV 150、Triger level -2 を目安に設定した。吸気圧は 20-30 程度であった。術中に子宮収縮して胎仔が子宮外に脱出することが問題となったため、術前にもメドロキシプロゲステロン 5.0mg を筋注した。

下腹部正中皮膚切開は小さいと子宮を強く把持する要因となり、死産を引き起こすと思われた。そのため 10cm の切開とした。母ウサギは膀胱内に多量尿を認めることが多かったため体外に膀胱を露出させて用手圧迫して排尿させた。双角子宮の先端にいる胎仔を 1 頭ずつ胎児手術して CDH モデル作製したが、全子宮を体外に脱出させると乾燥して死産の原因になる可能性が危惧されたため手術を行う子宮のみをその都度露出させることとした。胎仔の頭部および臀部、左肩部は子宮壁越しに透見されたため視診・触診で位置を確認した。子宮壁切開はメスで行うと出血が問題となり、バイポーラで行うと羊膜切開がうまく行えなかったためモノポーラおよびマイクロ剪刀で 2cm 切開することとし、左側胸部を露出させた。子宮は非常に脆弱で術中に裂けていってしまうことや滑って胎児が逸脱しやすかったため羊膜と子宮壁に 6-0 プロリーンで Anchoring suture をかけることとし、さらに胎仔胸壁と子宮壁を 6-0 プロリーンで結紮固定した。一度胎仔が子宮外に完全に脱出してしまうと子宮内への還納は困難だった。胎盤も外反してしまい、死産の原因となったと考えられた。そのため極力胎仔を露出させないように心がけることが必要だった。

胎仔左第 6 肋間での側胸部開胸は胎児が小さく、胎児全体が観察できない状態で手術をしているので位置決めが難しかった。そのため胸腹静脈を横断するように切開することで安定した位置で胸腔内に至ることができた。横隔膜を露出するには肺下葉を頭側に圧迫することが必要であったが、胸腔がかなり狭かったので自作のヘラを作製し視野が得られるようにした。羊胎仔では肝右葉より左葉の方が小さく、肝損傷防止のため左横隔膜を切開してモデル作製していた。しかしウサギの場合は左右対称に肝臓が腫大しており、横隔膜面のほとんどを肝臓が覆っていた。そのため CDH の難易度に左右は関係なかったものの、肝臓が透見されている横隔膜に切開を入れて CDH を作製しなければならなかった。これが最もこの CDH モデルでの問題点であり、困難さの原因だった。6-0 プロリーンで薄く横隔膜に Anchoring suture をかけて横隔膜を牽引し、ここをマイクロ剪刀で切開すると安全に行うことができた。肝左葉は左横隔膜下面すべてを覆っているため、ヘルニア門はかなり大きく確保し肝臓が脱出するようにしなければならなかった。そのためモスキート鉗子を横隔膜切開部から腹腔側へ向かって挿入し、先端が肝臓に当たらないようにモスキート鉗子を広げて横隔膜ヘルニア門を開大した。

その後の手術手技は計画通りで問題なかった。麻酔の覚醒が個体によってさまざまであり、低酸素血症が危惧された。そのため挿管チューブはそのまま留置して観察し、自発呼吸がみられたら強制換気終了した。睫毛反射が出現して覚醒してきたら抜管した。

術後管理および Sacrifice に関しては計画通りで問題なかった

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1 . 発表者名 大林 樹真、関 保二、川口 皓平、田中 邦英、大山 慧、古田 繁行、脇坂 宗親、北川 博昭
2 . 発表標題 羊胎仔横隔膜ヘルニアに対するFetal bronchial occlusionは可能か？-羊胎仔気管支造影での検討-
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 大林 樹真、Kevin C. Pringle、関 保二、脇坂 宗親、古田 繁行、大山 慧、田中 邦英、川口 皓平、川口 拓哉、西谷 友里、工藤 公介、北川 博昭
2 . 発表標題 大動物胎仔国際共同研究の経験と小児外科基礎研究の発展
3 . 学会等名 第59回日本小児外科学会学術集会
4 . 発表年 2022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
---------	---------