

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 24 年 5 月 7 日現在

機関番号: 11301

研究種目: 若手研究 (B)

研究期間: 2010~2011

課題番号: 22791026

研究課題名(和文) ヒツジ胎仔を用いた人工胎盤に応用できる膜型肺回路の開発

研究課題名(英文) Development of a circuit with a high-performance membranous oxygenator for using an artificial placenta in a premature lamb model

研究代表者

渡邊 真平 (WATANABE SHINPEI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 70509413

研究成果の概要(和文):

現行の新生児集中治療ではたとえ胎児肺に強い未熟性や低形成があっても人工呼吸が強制されるが、胎盤循環を模した人工胎盤装置を開発すればこうした症例を救命できる可能性が開かれる。本研究では心ポンプのみで駆動させて回路内を陽圧に保つ人工胎盤の有用性と安全性について動物実験モデルを用いて検討し、人工胎盤でヒツジ胎仔を 18.2 ± 3.2 時間生存させることができた。脳血流量を減少させない安全な循環管理の必要性が指摘された。

研究成果の概要(英文):

Because previous studies aimed at developing an artificial placenta have had limited success, we hypothesized that the introduction of a high-performance membranous oxygenator to a pumpless artificial placenta could prolong the survival time of premature lambs. Immediately after the delivery of the fetuses, the umbilical vessels were cannulated and connected to the pumpless artificial placenta. Both the fetuses and the circuit were submerged in a warm saline bath. Five fetuses survived for 18.2 ± 3.2 (mean \pm SEM) hours after attachment to the artificial placenta, which maintained the fetal circulation. We prolonged the survival of fetal lambs using a high-performance membranous oxygenator with a small priming volume.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
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: 内科系臨床医学・胎児新生児医学

キーワード: 人工胎盤, 人工羊水, 人工子宮, 胎児循環, 膜型人工肺, 動脈管, マイクロスフェア法

1. 研究開始当初の背景

新生児集中治療の目覚ましい発展にもかかわらず、心肺奇形を合併した低出生体重児に対する有効な治療法は未だ開発されていない。これを解決する方法として、これまで人工胎盤の開発が進められてきたが、回路充填量ならびに回路抵抗が大きすぎるために未だ実用化にはほど遠い現状であった(1-5)。しかし、よりコンパクトな回路を導入することがひとつの解決策として提案され、Reomaらは2009年に体外駆動ポンプを用いないシンプルな回路を用いてヒツジ胎仔を初めて4時間以上生存させることに成功した(6)。その一方で、進行する循環不全を制御することは極めて困難であり、彼らは体外式ローラーポンプがなければ胎仔をこれ以上生存させることは困難であると結論した。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2点を改善することによって胎仔の生存期間を延長させることである。ひとつは膜型人工肺開発における先駆者であるFunakuboとともにより高性能の膜型肺を開発し(7,8)、これを人工胎盤に導入することである。今回の実験に用いた膜型肺はReomaらが使用したものとガス交換面積は同じままでその充填量を約40%減量できた。もうひとつは胎仔の循環管理に血管収縮薬ではなく血管拡張薬を用いたことである。

3. 研究の方法

慢性実験系の作成

東北大学動物実験委員会から承認を得て(20HpA-3, 21MdA-4, 22MdA-18, 23MdA-57)、本研究は2009年9月から2011年12月に医学部附属動物実験施設にて実施された。

実験方法の大部分は以前に報告したものと同様である(9-12)。簡単に述べると、妊娠120-130日(満期147日)に、妊娠期間が確定しているSuffolk種ヒツジ母獣を人工換気下に1.5-2.0% isofluraneにて全身麻酔のもと開腹した。子宮切開して胎仔の上下大静脈、腹部大動脈、羊水腔に血管カテーテルを留置して閉腹した。血管カテーテルは全て母獣の側腹壁から体外に出して器機に接続した。

手術後は母獣を個別ケージに收容し、水と餌を自由に与えた。母胎の全身状態が回復するまで(5日間)、羊水を用いたグラム染色の結果に基づいて適切な抗生剤を母胎に投与した。

実験プロトコール

胎生期における胎盤も含めた胎仔臓器の血流量をあらかじめ測定するために、帝王切開の前日にcolored-microsphere法を実施した。

初回手術から5日間を経て、母獣を全身麻酔(1.5-2.0% isoflurane)のもと開腹し、子宮切開して臍帯基部を露出させた。血管カマラを臍帯動脈と臍帯静脈にそれぞれ1本ずつ挿入し、

人工胎盤回路に接続した。臍帯動脈カマラ(8-10 Fr, Duraflor II; Edwards Lifesciences, Irvine, CA)の先端は臍輪から深さ10 cmとし、腹部大動脈には達しなかった。臍帯静脈カマラ(12-14 Fr, Argyle Trocar catheter; Covidien, Dublin, Ireland)の先端は臍輪から深さ5 cmで、静脈管手前の肝円索内にあった。血管カマラを留置して臍帯を切断した後、速やかに胎仔と人工胎盤回路を生理的食塩水の恒温槽(39°C)に浮遊させた。

人工胎盤で管理中に動脈管の開存を維持するためLipo-prostaglandin E₁ (Lipo-PGE₁)を持続点滴(初期開始量1.0 µg/h)、その血流が右左短絡であることを確認するため、定期的に超音波ドップラー画像を撮影した。血液凝固を予防するため、定期的に活性化凝固時間を確認し(>180秒)、低分子heparinの持続点滴量(初期開始量100単位/h)を調節した。両者の初期開始量は臨床投与量と胎仔の推定体重に基づいて設定した。

人工胎盤回路に接続した2-12時間後に、colored-microsphere法を用いて胎仔臓器の血流量を再度測定した。

人工胎盤回路

人工胎盤回路の概念を図1に示した。

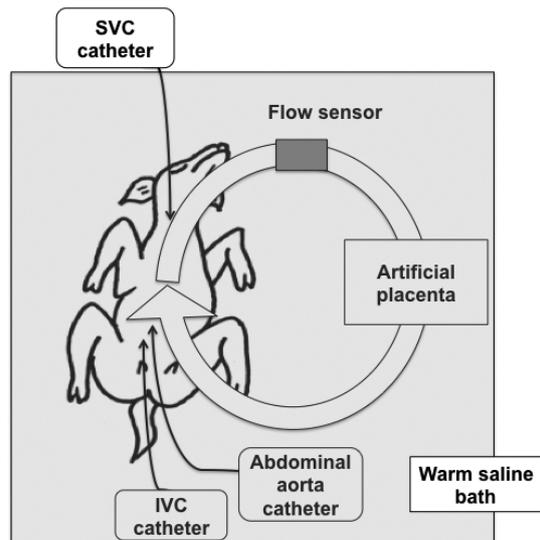


図1. 人工胎盤回路の概念図

脱血回路、膜型肺、供血回路の3つで構成される単純な回路であり、回路チューブは内径1/4 inchで長さ20 cmのpolyvinyl製である。駆動ポンプは用いず、胎仔の心ポンプのみで血液を駆出させた。回路全体のプライミング容量は60 mlで、あらかじめヘパリン化した母獣血液で満たした。膜型肺のガスチャンバーには純酸素を1.0 L/分で流した。

データ採取

胎仔の心拍数、平均動脈圧(MAP)、中心静

脈圧, 羊水内圧をポリグラフで連続監視し, その数値をパソコンに保存して, それぞれ 5 分間の平均値を代表値とした. 血圧はいずれも羊水内圧で補正した. 最低でも 4 時間間隔で腹部大動脈から採血し (0.5 ml), Hb 濃度, pH, base excess, P_{O2}, P_{CO2}, lactate (Blood Gas System 860; Bayer Medical Co, Sudbury, United Kingdom), O₂ content (OSM3 hemoximeter; Radiometer Medical, A/S, Copenhagen, Denmark)を測定した. 血液ガスデータは母獣もしくは胎仔の直腸音で補正した. 活性化凝固時間は Hemochron 401 (ITC Nexus Dx, Edison, NJ)で測定した. 人工胎盤回路内の血流量 (ml/min)は脱血側に取り付けた電磁血流計 (Transonic 400-Series; Transonic Systems Inc., Ithaca, NY) で測定した.

膜型肺の性能 (酸素添加能, 炭酸ガス排出能) は出生後 1-6 時間と 6-24 時間に以下の計算式で算出した.

$$\text{Gas transfer rate [ml/min]} = \Delta C \times W$$

$$\Delta C = \text{concentration change in blood gas [ml (gas)/ml (blood)]}$$

$$W = \text{quantity of blood flow [ml/min]}$$

胎仔臓器における組織血流量の測定

本研究では胎仔臓器の組織血流量を測定するために colored-microsphere (DYE-TRAK[®]; TRITON TECHNOLOGY, San Diego, CA)を用いた. 腹部大動脈から対照血液試料を精密ポンプ (KD Scientific Inc., Holliston, MA) を用いて 4.0 ml (2.0 ml/分で 120 秒間かけて) 採取し, その開始 10 秒後から 20 秒間かけて同時に microsphere 150 万個 (2.0 ml に希釈) を上大静脈と下大静脈それぞれから注入した.

実験終了後に胎仔の脳皮質, 脳白質, 延髄, 左心室, 右心室, 左肺, 右肺, 副腎, 肝, 腎を切り出して結合組織や脂肪組織を取り除き, それぞれから約 0.3-1.0 g の組織を切り取って試料とし, その重量を精密測定した.

対照血液ならびに臓器から切り出した試料中に含まれる microsphere は吸光度計 (U-2810; Hitachi, Tokyo, Japan)で定量した. それぞれの試料を強アルカリ液で溶液化し, ポリエステルフィルターで microsphere を回収した後, cellosolve acetate 300 μ l を加えて発色させ, colored microsphere の吸光度を測定した. 胎仔臓器の組織血流量は下記の計算式を用いて算出した.

$$\text{Tissue blood flow (ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}) = A_s \cdot V_{\text{ref}} \cdot A_{\text{ref}}^{-1} \cdot W_s^{-1}$$

(A_s: 臓器試料の吸光度, V_{ref}: 対照血液の血流量, A_{ref}: 対照血液の吸光度, W_s: 臓器試料の重量)

統計学的解析

数値データはすべて平均値 \pm SEM で表示し, 解析には SPSS for Windows を用いた. Student *t*-test を用いて Reoma の実験(6)と本研究の実験データを比較した. Wilcoxon rank sum test を用いて, 胎仔臓器の組織血液量を出生前後で比較し, 膜型肺の性能を出生後 1-6 時間と 6-24 時間で比較した. Spearman の順位相関係数を用いて回路血流量, MAP, O₂ content, P_{CO2}, lactate それぞれの相関関係を解析した. 相関係数が 0.70 以上を明らかな相関関係があると判定し, 図 3 にグラフで表示した. いずれの検定においても *p* < 0.05 を有意差ありとした.

4. 研究成果

Table 1 に本実験の基本データを Reoma の実験と比較して示した. 本実験では Reoma の実験と比較して有意に, 胎仔の妊娠期間が短く, 出生体重が小さく, 生存期間が長かった. 本実験では胎仔 5 頭を人工胎盤に接続することに成功し, 生存時間は 18.2 \pm 3.2 時間であった (それぞれ 14.0, 29.8, 18.2, 11.3, 17.5 時間). その死亡原因はいずれも感染症や膜型肺の性能低下ではなく, 末梢循環不全で生じた高乳酸血症による心ポンプ不全であった. Lipo-PGE₂ を持続点滴していたため臍帯血管の攣縮による循環不全は観察されなかった.

Table 1: Comparison between the results of Reoma's experiment (6) and the present study

Experimental group	Reoma's experiment (n=7)	Present stud (n=5)
Gestational age at birth (days)	140 \pm 0	130 \pm 1.6 *
Birth weight (g)	5,273 \pm 394	2,924 \pm 354 *
Survival time (h)	3.5 \pm 0.4	18.2 \pm 3.2 *
Priming volume of the circuit (ml)	100	60
Resistance of the membranous oxygenator (mm Hg-min-kg-mi ⁻¹)	0.81 \pm 0.15	0.85 \pm 0.05
Surface area of membranous oxygenator (m ²)	Unknown	0.30
Inner diameter of hollow fiber (μ m)	Unknown	200

All values are expressed as the mean \pm SEM.
**P* < 0.05 for the values in Reoma's experiment vs. the values in the present study.

図 2 に最も長く生存させることができた胎仔の生理学的パラメータの経時的変化を示した. 出生後 4 時間を経て膜型肺の性能が維持されていたにもかかわらず, 回路血流は胎盤の生理的血流量 (14) の 15%程度まで落ち込み, 血中 lactate 濃度が急上昇した. これに対して, 強心作用と血管収縮による回路血流の増加を期待して胎仔に dopamine (DOA) を持続点滴したが, 血中 lactate 濃度がさらに上昇したため 4 時間でその投与を中断せざるを得なかった. そのため今度はあらかじめ濃厚赤血球を輸血して容量負荷を行った後に, 強心作用と血管拡張による末梢循環の改善を期待して milrinone (MLN) を投与した. その結果, 回路血流と MAP が同時に増加するとともに 4 時間にわたって血中 lactate 濃度の減少が観察された. しかし, 最終的には高乳酸血症が進行したため, それ以上生存させることは出来なかった.

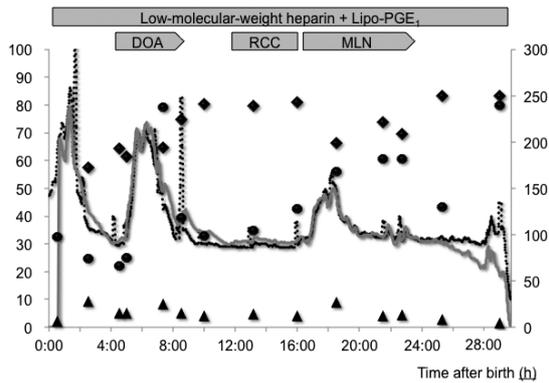


図 2. 最も生存期間が長かった胎仔における生理学的パラメータの経時的変化

図 3 に Spearman の順位相関係数の結果を示した。0.70 以上の相関係数を示したのは「回路血流量と MAP」($r=0.718$, $p<0.01$, 図 3a) と「回路血流量と血中 lactate 濃度」($r=0.717$, $p<0.01$, 図 3b) の二つだけであった。それ以外のパラメータ間 (回路血流量と O_2 content, 回路血流量と P_{CO_2} , MAP と血中 lactate 濃度, MAP と O_2 content, 血中 lactate 濃度と P_{CO_2}) にも統計学的有意差は認められなかったがいずれも $r < 0.70$ であった。

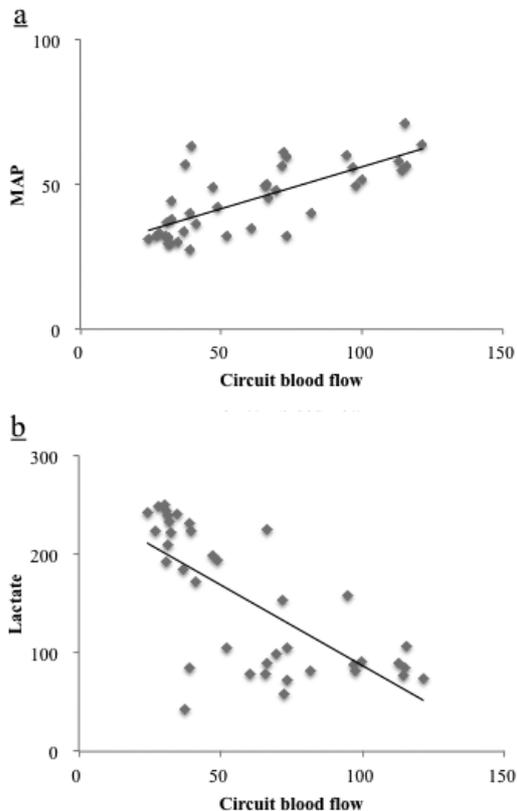


図 3. 明らかな相関関係を示した生理学的パラメータ。(a: 回路血流量と MAP, b: 回路血流量と血中 lactate 濃度)

Table 2 に colored-microsphere 法で測定し

た出生後の胎仔臓器組織の血流量を胎生期の測定値に対する相対値で示した。脳皮質 ($p<0.05$), 脳白質 ($p<0.05$), 延髄 ($p<0.05$) では血流量の有意な減少が認められたが, 肺を含めた他の臓器では有意な変化はなかった。

Table 2: Ratio of blood flow in fetal organs

Cerebral gray matter	0.63 ± 0.04 *
Cerebral white matter	0.70 ± 0.03 *
Medulla oblongata	0.61 ± 0.04 *
Left ventricle	1.38 ± 0.27
Right ventricle	1.34 ± 0.29
Left lung	1.01 ± 0.69
Right lung	0.98 ± 0.58
Adrenal gland	1.29 ± 0.19
Liver	1.08 ± 0.21
Kidney	0.85 ± 0.22

Each numerical value (average ± SEM) represents the relative value that was obtained by dividing the value for the organ blood flow obtained after birth by that obtained before birth. * $p < 0.05$ for the values obtained before birth vs. the values obtained after birth.

Table 3 に膜型肺性能の経時的変化を示した。酸素添加能と炭酸ガス排出能のいずれにおいても両時点の比較において有意な変化は認められなかった。

Table 3: Performance of the membranous oxygenator

	1-6 hours after birth	6-24 hours after birth
O_2 transfer rate (ml/min)	10.5 ± 1.2	12.2 ± 1.0
CO_2 transfer rate (ml/min)	11.6 ± 2.5	13.7 ± 2.0

All values are expressed as the mean ± SEM.

考察

本研究では以下の 3 つの重要な成果が観察された。

まず, 本実験では胎仔の生存期間が Reoma らの 3.5 ± 0.4 時間から 8.2 ± 3.2 時間まで延長され, その最大値は 29.8 時間であった。人工胎盤に接続された 5 頭すべてが 11 時間以上生存し, 胎児循環を維持することができた。出生後に肺血流の増加が認められなかったことは胎児循環を維持できたことの証拠と考えられた。

次いで, より小さな胎仔にはより充填量の少ない人工肺が適していることが示された。本実験で用いた胎仔は Reoma の実験に比較して有意に, 妊娠期間が短く, 出生体重が小さく, 生存期間が長かっただけではなく, 膜型肺の充填量も少なかった (Table 1)。充填量が少なければ胎仔心に対する前負荷が減少するため, これが Reoma らの実験に比較してより長期間にわたって胎児循環を維持することができたとひとつの理由と考えられた。ヒツジ胎仔の胎盤血液量は $3.1-48.1$ ml/kg (15) と報告されており, 本実験の胎仔では 67-140 ml に相当すると推定される。したがって, 本実験で用いた膜型肺の充填量 (60 ml) は十分に少ないと考えられた。

その一方で, ヒツジ胎盤の血管抵抗が

0.1-0.30 mmHg·min·kg·ml⁻¹ (14,16,17)と報告されているのに対し、本実験で用いた膜型肺の血管抵抗 (0.85 mmHg·min·kg·ml⁻¹)はいまだ高値であると言わざるを得ない。したがって、今後さらに血管抵抗の低い膜型肺を開発することができれば、胎仔心に対する後負荷を減少させることによって、胎仔の生存期間をより延長できるかもしれない。

第3に、血管収縮薬よりも血管拡張薬の方が脳を始めとする臓器血流量を維持し、人工胎盤を駆動させる上で有用であった。図3に示したように回路血流量は明らかにMAPと血中 lactate 濃度とよい相関を示した。したがって、血圧を適切に調節することによって回路血流量と血中 lactate 濃度を維持できるはずであった。しかしながらその期待に反して、DOA 投与はMAPと回路血流量を改善させたにもかかわらず、血中 lactate 濃度を著しく上昇させた(Figure 2)。DOAが全身の血管抵抗を上昇させ回路血流量が過剰に増加してしまったため、結果として全身臓器の血流量が不足して循環不全に陥り、脳皮質、脳白質、延髄の血流量が低下した可能性がある(Table 2)。したがって、こうした状況における血管収縮薬の使用は望ましくない可能性がある。

一方、MLN 投与開始後には血中 lactate 濃度に一過性の減少が観察された(Figure 2)。この結果から、全身臓器の血流量を維持する上では血管収縮薬よりも血管拡張薬の方がより有用であることが示唆されたが、本実験ではMLN投与中には colored-microsphere 法で臓器血流量を計測しなかった。したがって、今後の実験では臓器血流量の維持とそれによる生存期間の延長を期待して、出生直後からMLNを投与する予定である。本実験で膜型肺の性能には劣化が認められなかったことから (Table 3)、より適切な循環管理法を開発することによって胎仔の生存期間を延長できると考えられるからである。

以上の考察に基づいて、われわれは、人工胎盤を改良することによって、胎仔の生存期間を Reomaらの3.5 ± 0.4時間から8.2 ± 3.2時間まで延長できると結論した。しかしながら、その運用方法と循環管理法にはまだ改善の余地が残されている。

参考文献:

1. Callaghan JC, Maynes EA, Hug HR. Studies on lambs of the development of an artificial placenta. Review of nine long-term survivors of extracorporeal circulation maintained in a fluid medium. *Can J Surg* 1965;8:208-213.
2. Alexander DP, Britton HG, Nixon DA. Maintenance of sheep fetuses by an extracorporeal circuit for periods up to 24 hours. *Am J ObstetGynecol* 1968;102:969-975.
3. Zapol WM, Kolobow T, Pierce JE, Vurek GG, Bowman RL. Artificial placenta: Two days of

total extrauterine support of the isolated premature lamb fetus. *Science* 1969;166:617-618.

4. Unno M, Kuwabara Y, Okai T, et al. Development of an artificial placenta: Survival of isolated goat fetuses for three weeks with umbilical arteriovenous extracorporeal membrane oxygenation. *Artif Organs* 1993;17:996-1003.
5. Sakata M, Hisano K, Okada M, Yasufuku M. A new artificial placenta with a centrifugal pump: Long-term total extrauterine support of goat fetuses. *J ThoracCardiovascSurg* 1998;115:1023-31.
6. Reoma JL, Rojas A, Kim AC, et al. Development of an artificial placenta I: pumplessarterio-venous extracorporeal life support in a neonatal sheep model. *J PediatrSurg* 2009;44:53-59.
7. Funakubo A, Sakuma I, Fukui Y, Kawamura T. Development of a compact extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) system. *Artif Organs* 1991;15:56-59.
8. Funakubo A, Higami T, Sakuma I, et al. Development of a membrane oxygenator for ECMO using a novel fine silicone hollow fiber. *ASAIO J* 1996;42:M837-M840.
9. Saito M, Matsuda T, Okuyama K, et al. Effect of intrauterine inflammation on fetal cerebral hemodynamics and white-matter injury in chronically instrumented fetal sheep. *Am J ObstetGynecol* 2009;200:663.e1-663.e11.
10. Watanabe T, Matsuda T, Hanita T, et al. Induction of necrotizing funisitis by fetal administration of intravenous granulocyte-colony stimulating factor and intra-amniotic endotoxin in premature fetal sheep. *Pediatr Res* 2007;62:670-673.
11. Kusaka T, Matsuda T, Okuyama K, et al. Analyses of factors contributing to vulnerability to antenatal periventricular leukomalacia induced by hemorrhagic hypotension in chronically instrumented fetal sheep. *Pediatr Res* 2002;51:20-24.
12. Matsuda T, Okuyama K, Cho K, et al. Induction of antenatal periventricular leukomalacia by hemorrhagic hypotension in the chronically instrumented fetal sheep. *Am J ObstetGynecol* 1999;181:725-730.
13. Kowallik P, Schulz R, Guth BD, et al. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation* 1991;83:974-982.
14. Faber JJ, Green TJ. Foetal placental blood flow in the lamb. *J Physiol* 1972;223:375-393.
15. Creasy RK, Drost M, Green MV, Morris JA.

Determination of fetal, placental and neonatal blood volumes in the sheep. Circ Res 1970;27:487-494.

16. Assad RS, Lee FY, Hanley FL. Placental compliance during fetal extracorporeal circulation. J ApplPhysiol 2001;90:1882-1886.
17. Parisi VM, Walsh SW. Fetal vascular responses to prostacyclin. Am J ObstetGynecol 1989;160:871-878.

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0件)

[学会発表](計2件)

- (1) 三浦雄一郎, 松田直, 埴田卓志, 北西龍太, 渡辺真平, 斉藤昌利, 三本木慧介. ヒツジ胎仔を用いた人工胎盤の基礎的検討. 第48回日本人工臓器学会, 2011年11月19日, 仙台.
- (2) Yuichiro Miura, Tadashi Matsuda, Masatoshi Saito, Shinpei Watanabe, Ryuta Kitanishi, Takushi Hanita, Tatsuya Watanabe, Nobuo Yaegashi. Development of an artificial placenta: Pumplessarteriovenous extracorporeal life support in a premature lamb model. 39th Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2011; Jul. 11, 2011(Palm Cove, Cairns, AU).

[図書](計0件)

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡辺 真平(WATANABE SHINPEI)

東北大学・大学院医学系研究科・非常勤講師

研究者番号: 70509413