

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592634

研究課題名(和文) 羊胎仔尿路閉塞後の腎・膀胱両機能温存型膀胱-羊水腔シャントチューブの開発

研究課題名(英文) Valved shunt as a treatment for obstructive uropathy: does pressure make a difference?

研究代表者

北川 博昭 (KITAGAWA, Hiroaki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：80153097

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：胎仔尿路閉塞モデル(n=16)を作成、3週後に低圧シャント(L群)、高圧シャント(H群)二種類のシャントチューブを挿入した。結果：H群は全例に尿膜管の拡張、尿腹水を認め、尿路閉塞同様の肉眼所見を呈した。L群は水腎症様所見は認めたが腎の病理所見はおおむね保たれていた。膀胱壁の厚さは正常対照群で $338 \pm 118$  ( $\mu\text{m}$ )、尿路閉塞群 $1953 \pm 941$  ( $\mu\text{m}$ )、H群 $1479 \pm 505$  ( $\mu\text{m}$ )、L群 $1018 \pm 230$  ( $\mu\text{m}$ )と、尿路閉鎖で最も線維化が著明であったが、H群>L群で減少傾向を認めた。結論：胎児期のV-Aシャントは、チューブの圧が、膀胱の発達や腎の発達に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：A valved ventriculo-peritoneal shunt (V-P shunt) as a vesico-amniotic shunt (V-A shunt) preserves the filling/emptying cycle and normal bladder development in fetal lambs with bladder outlet obstruction. We created obstructive uropathy in 60-day gestation fetal lambs. A V-A shunt was placed 3 weeks later, using a low-pressure (L:15-54 mm H<sub>2</sub>O) or a high-pressure (H:95-150 mm H<sub>2</sub>O) V-P shunt. We included non-shunted (O) and control (C) lambs. All were delivered at 130 days. Bladder volumes, bladder thickness, renal and bladder histology were compared. Five Group L (4 survived), four Group H (3 survived) and 5 Group O survived. Group H lambs had a dilated urachus, urinary ascites and severe ureteral dilatation similar to Group O lambs. There were 4 Group C lambs. Bladder volume was 10, 15 and 1,150 ml in Group H, 115±67.9 ml in Group L, 128±99.8 ml in Group O and 24.5±3.84 ml in Group C. Low-pressure shunts preserved both bladder volume and renal development. High-pressure shunts did neither.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学

キーワード：Obstructive uropathy Fetal surgery Urinoma V-P shunt

1. 研究開始当初の背景

胎児期の尿路閉塞患児に対して、臨床では腎機能を温存する目的に超音波ガイド下に膀胱-羊水腔 (V-A シャント) を挿入する治療が世界各地で施行されている。しかし、これらの患児は出生後、膀胱容量の減少、膀胱壁の肥厚を認め、種々の排尿障害が報告された。研究者は羊を用いて胎児期の尿路閉塞モデルを完成させ、尿路閉塞で多嚢胞性異形成腎 (MCDK) モデルを作成した (Kitagawa H, Pringle KC, Koike J, Zuccollo J, et al.: Different Phenotypes of Dysplastic Kidney in Obstructive Uropathy in Fetal Lambs. J Pediatr. Surg. 36(11):1698-1703, 2001.) また、その 3 週間後に膀胱-羊水腔 (Vesico-amniotic; V-A) シャント術を施行すると腎の 50% は正常に回復した (Kitagawa H, Pringle KC, Koike J, et al: Vesicoamniotic shunt for complete urinary tract obstruction is partially effective. J Pediatr. Surg. 41,394-402, 2006)。しかし、膀胱は全例萎縮膀胱で、その容量はわずか 5ml であった。当初、この機序は尿路閉塞により胎児期に過膨張した膀胱壁に筋断裂が起こり、膀胱壁に線維化が起こると考えた。(Sato Y, Kitagawa H, Pringle KC, et al: Effects of early Vesicostomy in Obstructive Uropathy on Bladder Development. J Pediatr Surg 39(12):1849-1852, 2004)。しかし、その後の実験で、正常膀胱に V-A シャントを挿入しても、萎縮膀胱が形成され、胎児期の排尿サイクルの消失が、萎縮膀胱に関与していることを証明した (Kitagawa H, Pringle KC, Koike J, et al: Is a vesico-amniotic shunt intrinsically bad? Shunting a normal fetal bladder. J Pediatr Surg, 42, 2002-2006, 2007)。その後一定の圧が膀胱にかかるよう valve-shunt を考案し、これを用いることで膀胱容量が確保された。Nagae H, Kitagawa H, Pringle KC, Seki Y: Pressure-limited vesico-amniotic shunt tube for fetal obstructive uropathy J Pediatr Surg 41:2086-2089, 2006。しかし、膀胱内に一定の圧を加えることが排尿時 VUR (膀胱尿管逆流) を惹起し、腎発生に影響する可能性が指摘された。そこで、胎生期に挿入する: Pressure-limited シャントチューブの圧を変更し、排尿サイクルを温存し、膀胱機能が出生後保てるような至適膀胱内圧を検索することで、腎機能に影響のない valve-shunt チューブの作成を検討した。

2. 研究の目的

我々の過去の羊胎仔尿路閉塞実験から、胎生の異なる時期の尿路閉塞は腎にさまざまな変化を生じ、多嚢腎(MCDK)を形成した。その後、早期の膀胱羊水腔シャント術による尿路閉塞解除で腎機能温存が可能となった。反面、シャント後、胎仔膀胱壁の線維性肥厚が生じ、その原因はシャントによる胎生期膀胱収縮運動の遮断が原因と考えた。そこで、膀胱に常時一定の圧が加わる Pressure Valve シャントの使用で膀胱機能を温存できたが、膀胱内圧を保つためには、排尿圧が高まり膀胱尿管逆流 (VUR) を生じ、腎発生に影響を与える可能性が出てきた。そこで、膀胱・腎両機能を温存できる、胎児期膀胱内圧を測定し臨床に応用可能な Valve shunt チューブを作成する事を目的にした。

3. 研究の方法

海外共同研究者 Kevin C. Pringle教授の協力で、New Zealandの契約農場で妊娠時期を指定し羊を交配させる。超音波を用いて妊娠を確認後、過去に行った実験結果から胎生60日尿路閉塞を作成する(生存率85%)。母羊を静脈内麻酔で沈静後、挿管し全身麻酔下に帝王切開をおこない、体重約80gの臍帯をつけたままの胎仔をオスでは尿道と尿膜管、メスでは膀胱頸部と尿膜管をsilastic tubing (Dow Corning, Midland, MI) of 0.025 inch (0.625 mm)で結紮する(図1., 2.)。



図 1. オスでは陰茎部尿道と尿膜管を結紮する。



図 2. メスでは膀胱頸部と尿膜管を結紮する。

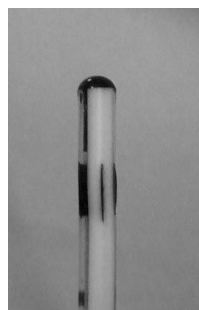


図 3. Pressure valve shunt tube にはスリットが入っており、ここで圧を調整する。

その後妊娠を継続させ、尿路閉塞後3週間で再び帝王切開で子宮から取り出しPudenz catheter (Integra Neuro Sciences™ Pudenz Peritoneal Catheter, REF NL850-1380)、低圧 (15-54 mmH<sub>2</sub>O)、中圧(55-94mmH<sub>2</sub>O)、高圧(95-150 mmH<sub>2</sub>O)の3種類を用意し膀胱内に挿入する(図3)。胎仔を子宮内に返却し、満期まで農場で飼育する。農場からの搬送、胎仔の手術、麻酔、記録、その後の管理など研究協力者は4人必要である。尿路閉塞後5,10,14日、その後145日の満期で帝王切開を行い、胎仔のみを取り出し、バルビタールを用いて安楽死させ病理学的な検索のため組織を取り出す。同時に採尿し、尿中電解質、MMPを測定し、病理の組織所見と腎機能の相関を見る。満期では以下の様な膀胱内圧測定器に接続し、膀胱の内圧曲線を測定し、相対的にコンプライアンスを測定する。

(1)初年度は尿路閉塞後、3週間目に脳外科様 V-P shunt tube 高圧(95-150 mmH<sub>2</sub>O)を挿入し、挿入後 3,5,10 日に安楽死させ、膀胱、腎臓の組織、及び尿中電解質、MMP の測定を試みる。早期の尿路閉塞モデルの実験結果は Kitagawa Hらにより The early effects of urinary tract obstruction on glomerulogenesis. J Pediatr Surg . 39(12):1845-1848, 2004 に掲載されており、同様の手法でおこなう。また、満期では膀胱内圧測定器で膀胱のコンプライアンスを測定する。この方法は以前正常膀胱に施行し、Hiroaki Kitagawaらにより Is a vesico amniotic shunt intrinsically bad? Shunting a normal fetal bladder.J Pediatr Surg ; 42 : 2002-2006, 2007. に掲載されている。

(2)尿路閉塞後早期のモデルをそれぞれ 5 匹作成し、満期モデルを 10 匹作成する。胎仔 25 匹を必要とし双胎の確立が 30-50%に認められることから母羊は対照とするコントロールモデルを含め合計 20 匹必要と考える。モデルの作成に 1 週間、シャント作成と早期の変化を見るのに 10 日間、最終的な満期のモデルの内圧測定に 5 日の年間 3 回の滞在を必要とする。

平成 24 年度

前年度の実験結果をふまえて、同様な方法で今年度は脳外科様 V-P shunt tube の低圧 (15-54 mmH<sub>2</sub>O) を膀胱内に挿入し同様な実験を繰り返しおこなう。すでに低圧

チューブの満期モデルはパイロット study としておこなわれており、これらのシャント後早期の膀胱、腎臓への影響は見えていなかったため低圧モデルは、満期モデルを少なくし、早期変化に重点を置いた。

尿路閉塞後早期のモデルをそれぞれ 3,5,10 日で 7 匹作成し (21 匹)、満期モデルを 5 匹作成する。胎仔 26 匹を必要とし双胎の確立が 30-50%に認められることから母羊は対比するコントロールモデルを作成して合計 20 匹必要と考える。モデルの作成に 1 週間、シャント作成と早期の変化を見るのに 10 日間、最終的な満期のモデルの内圧測定に 5 日の滞在を必要とする。

平成 24 年度以降

同様な方法で V-P shunt tube の中圧 (55-94mmH<sub>2</sub>O)を膀胱内に挿入し 3 年間で 3 種類の圧を比較することで腎の線維化が最も少なく、また膀胱のコンプライアンスが保てる適正圧のシャントチューブを実用化させる。

胎仔手術の術者、第一助手は北川博昭、Kevin Pringle が全て行いモデルの均一化をはかっている。青葉剛史、關保二は麻酔、第二助手を担当する。全ての病理は小池淳樹、青葉剛史が担当し、CD-10、-SMA、myo-fibroblast などを含めた免疫染色をおこなう。

#### 4. 研究成果

羊を用いた尿路閉塞モデルでV-Aシャントにより、膀胱壁の線維化が起こることが証明され、V-Aシャント時に膀胱に一定の圧をかけることが膀胱機能を温存できることがわかった<sup>1,2)</sup>。しかし、その適正圧がどれほどかは臨床応用するには必要となる。脳外科領域で用いるシャントチューブに圧の調整機能がついていることに着目し、今まで用いた低圧用シャントチューブ (Integra Neuro Sciences, Pudenz Peritoneal Catheter, Plainsboro, NJ, REF NL850-1380, low pressure 15-54 mm H<sub>2</sub>O) と高圧用シャントチューブ (Integra Neuro Sciences, Pudenz Peritoneal Catheter, Plainsboro, NJ, REF NL850-1382, high pressure 95-150 mm H<sub>2</sub>O) をそれぞれ異なる羊の膀胱に挿入し、圧の相違による膀胱壁の変化について検討した。まず、胎仔尿路閉塞モデル (n=16) を作成し、2匹は体内死亡が確認され、9匹にシャント術をおこなった。5匹に低圧シャントチューブ (4匹生存) 4匹に高圧シャントチューブ (3匹生存) を挿入した。また、5匹はシャントせず尿路閉塞のま

ま妊娠を継続させた。今回は通常より2週間早い胎生130日に帝王切開で胎子を娩出させ、その時点での剖検所見を正常コントロール（胎生130日）と比較した。その結果、高圧シャントチューブでは全例に尿尿管の拡張、尿腹水を認め、シャントをおこなわなかった尿路閉塞モデルと同様の肉眼所見を呈した。また、低圧群では水腎症様所見は認めたがネフロン数の減少等の尿路閉塞に認められる不可逆的腎の病理所見は認めなかった。

	尿尿管の拡張、尿腹水	水腎症	尿尿管の拡張	ネフロン数の減少
低圧シャント (n=4)	0	3 (75%)	1 (25%)	0
高圧シャント (n=3)	3 (100%)	0	1 (33%)	0
閉塞モデル (n=5)	5 (100%)	0	2 (40%)	2 (40%)

また、膀胱壁の厚さを測定すると、壁の厚さが正常対照群で338±118 (µm)、尿路閉塞群で1953±941 (µm)、高圧シャント群で1479±505 (µm)、低圧シャント群で1018±230 (µm)と、尿路閉塞では最も線維化が著明であったが、高圧シャントモデル、低圧シャントモデルで減少してくる傾向が得られた。これらのことから、胎児期のV-Aシャントは、チューブの圧が、膀胱の発達や腎の発達に影響を与えていることが示唆された。この腎への影響はマクロでは認めしたがこれがミクロレベルの変化に影響を及ぼしているかどうかは今後検討する。

#### 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 4 件)

Hiroaki Kitagawa, Yasuji Seki, Hideki Nagae, et al, Valved shunt as a treatment for obstructive uropathy: does pressure make a difference?, *Pediatr Surg Int*, 査読有、Vol.29、2013、pp.381-386

北川博昭、長江秀樹、真鍋周太郎他、実験的胎児治療：新たな膀胱羊水腔シャントチューブの開発、*小児外科*、査読無、45巻、2013、105-112

K. C. Pringle · H. Kitagawa · Y. Seki ·

J. Koike · J. Zuccollo, Development of an animal model to study congenital urinary obstruction, *Pediatr Surg Int*, 査読有、Vol.29、2013、pp.1083-1089

北川博昭、吉岡まき、藤川あつ子、脇坂宗親、島秀樹、長江秀樹、新生時期の外科治療閉塞性尿路障害、*周産期医学*、査読無、43巻、2013、1607-1612

〔学会発表〕(計 7 件)

Hiroaki Kitagawa, Kevin C. Pringle, Junki Koike, Yasuji Seki, Fetal bladder development and optimal timing of fetal therapy, 15th International Paediatric Surgical Week, 2014/3/8-1, Kühtai (Austria)

Hiroaki Kitagawa, Kevin C. Pringle, Junki Koike, Yasuji Seki, Vesico amniotic shunt for urinary tract obstruction, *Future Advances in Medicine*, 2014/2/11, Lucknow (India)

Hiroaki Kitagawa, Kevin C. Pringle, Junki Koike, Yasuji Seki, Effect of vesico amniotic shunt for urinary tract obstruction in sheep model, XI World Congress of Perinatal Medicine, 2013/6/19-22, Moscow (Russia)

Shutaro Manabe, Hiroaki Kitagawa, Kei Ooyama, Yasuji Seki, Hideki Nagae, Takeshi Aoba, Masayuki Takagi, Junki Koike, Jane Zuccollo, Kevin C Pringle, THE EFFECTS OF ANESTHESIA AND FETAL SURGERY ON THE EARLY OVINE FETUS, The 46th Annual meeting of PAPS & ANZAPS 2013, 2013/4/7-11, Huntervalley (Australia)

Hiroaki Kitagawa, Valved shunt as a treatment for obstructive uropathy: does pressure make a difference?, *アジア小児外科学会*, 2012/10/9, ソウル (韓国)

H.Kitagawa, Antenatal ultrasound diagnosis-uses and abuses, 9<sup>th</sup> Pan African pediatric surgical association, 2012/3/18-21, Cape Town South Africa

長江秀樹、關保二, Kevin C. Pringle, Jane Zuccollo, 青葉剛史, 真鍋周太郎, 小池淳樹, 高木正之, 北川博昭, 新たな膀胱羊水腔シャントチューブの開発、第9回日本胎児治療学会、2011/12/2-3、九州大学医学部百年記念講堂 (福岡)

〔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

北川 博昭 (KITAGAWA, Hiroaki)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80153097

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

關 保二 (SEKI, Yasuji)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20309462

小池 淳樹 (KOIKE, Junki)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授  
研究者番号；40308440

青葉 剛史 (AOBA, Takeshi)  
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90571696