

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861489

研究課題名(和文) 羊を用いた胎児尿路閉塞モデルの萎縮膀胱に胎児期ボツリヌス注射を用いた効果

研究課題名(英文) Botox injection to improve compliance in the compromised fetal bladder.

研究代表者

長江 秀樹 (Nagae, Hideki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：90468942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ボツリヌス毒素は筋収縮を抑制する働きを持ち、臨床では筋硬直や泌尿器科領域では過活動性膀胱などに応用されている。我々の実験において羊胎仔を用い尿路閉塞モデルを作成し解除すると膀胱壁は肥厚し出生後の排尿障害を引き起こす。臨床的に後部尿道弁に相当し、出生後の排尿障害が問題となる。これまでの実験で収縮した膀胱にボツリヌスを打つことで正常膀胱に近い病理組織結果を得られることに成功したが、問題点として生存率が低かった。そこでボツリヌスの注入する時期を変えることにより生存率や膀胱変化などの影響を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：A recent development has been the use Botulin Toxin(BTX) to treat bladder dysfunction. In our experiment, a vesico-amniotic (VAS) shunt in a normal fetal lamb bladder produces a thick-walled, poorly-compliant bladder. BTX improves compliance in neurogenic bladders. We tried BTX in our VAS model. We placed non-valved VAS in 80-day gestation fetal lambs, injecting BTX (10units/kg) at 100 days at 4 sites around the shunt (Group A). They were delivered at term (145 days) and bladder volume, histology were measured. BTX injected into a compromised bladder at 100 days were able to improve a survival rate, but doesn't improve compliance at term.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Botulin Fetal Surgery Toxin

1. 研究開始当初の背景

胎仔期尿路閉塞によるシャント後の膀胱壁肥厚は出生後の排尿障害を起こす。我々の過去の動物実験から、胎仔治療では一定の圧を膀胱にかけることで膀胱容量が維持できたが、圧調整シャントチューブの臨床応用はまだ開発されていない。

近年成人領域で収縮した筋肉にボツリヌス毒素を用いた治療が各分野で行われ、泌尿器科領域では難治性の過活動性膀胱に応用されている(藤村哲也, 過活動膀胱治療薬の特徴と使い方・使い分け. Prog Med 2012, 32, 841-845) そこで胎仔期に膀胱壁の肥厚した羊モデルを作成し、胎仔期にボツリヌス毒素を膀胱壁に注入することにより膀胱収縮を和らげる事が出来、出生後良好な排尿サイクルを得る事が出来るのではないかと考えた。挑戦的萌芽研究(課題番号 24659774)においてボツリヌス毒素を膀胱壁に注入することは可能であり、正常膀胱に類似する病理検査結果を出すことが可能であった。しかし、在胎 60 日モデルでは生存率が低いという問題点が浮き彫りとなった。

2. 研究の目的

在胎 60 日モデルにおいてボツリヌス毒素を使用することにより正常膀胱に類似する病理検査結果を得られる事が可能であったが、生存率が低いという実験結果になってしまった。その原因はボツリヌスの毒性がその時期の胎仔においては強く出たと推測する。

そこで我々は注入する時期を遅くすることにより生存率を上げることができると考え、在胎 80 日に膀胱羊水腔シャントをおく在胎 80 日モデルを作成し、膀胱壁を萎縮・肥厚させ、胎児 100 日目にボトックスを注入するモデルを作成しその効果を検討した。

3. 研究の方法

研究方法は妊娠羊を用いて在胎 80 日で胎盤血流を保ったまま子宮を切開して胎仔を視野に出し、膀胱に膀胱-羊水腔シャントを施行する(図 1)(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)。その後、再び胎仔を子宮内に戻し妊娠を継続する。十分な膀胱壁の肥厚を認めるシャント後 3 週間の在胎 100 日にボツリヌス毒素(Botox[®]) (1ml, 25U/ml)をシャントチューブ挿入周囲の肥厚した膀胱壁内 4 カ所に注入した(図 2)。これを Group A とした。シャントのみを行った群を Group B, control を Group C としそれぞれ比較した。

注入量はラットにて安全とされている量 10 単位/kg を注入し、その後は妊娠を継続させ胎生満期 145 日まで妊娠を継続し、再度全身麻酔下に帝王切開し、推定体重 3kg の胎仔を

娩出させる。出生後、膀胱容量を測定し、その後、臍帯よりバルビタールを投与し胎仔を安楽死させ、腎臓、膀胱を一塊に摘出する。組織は日本で、H&E (Hematoxylin & Eosin)、Masson's Trichrome、 α -SMA (alpha-smooth-muscle actin) などの免疫染色をおこない、膀胱壁の変化、腎への影響を確認する。

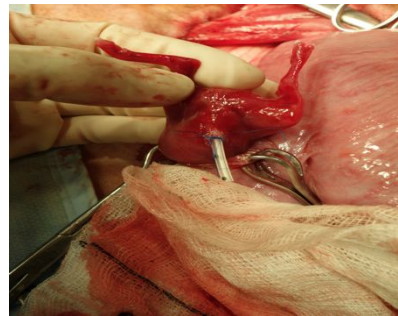


図 1 膀胱-羊水腔シャント手術

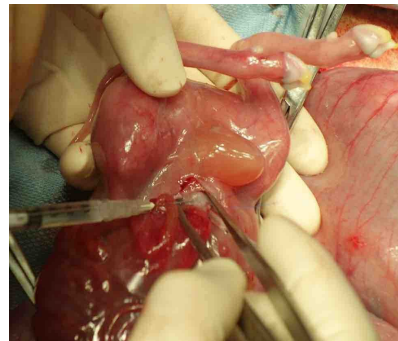


図 2 ボトックスを注入している様子

4. 研究成果

A 群は 12 例中 9 例が生存し、B 群は 14 例中 11 例が生存した。体重(g)は A 群 4681.6 ± 531.3 vs B 群 3465.5 ± 697.4 ($P < 0.05$)。膀胱容量(ml)は A 群 8.63 ± 6.08 vs B 群 1.81 ± 1.24 で有意差を認めた ($P < 0.01$)。しかし、C 群の正常胎仔膀胱容量は 57.17 ± 12.16 で約 1/8 であった。頭殿長(cm)は A 群 47.89 ± 3.55 vs B 群 44.18 ± 2.95 で有意差を認めなかった。病理組織学的には両群ともに粘膜下層の肥厚および著明な繊維化を認めたが、筋層や粘膜上皮は正常であり差は認めなかった(図 3)。膀胱壁全層の厚さ(μm)は A 群 1411.1 ± 279.2 vs B 群 1177.3 ± 565.8 、膀胱壁粘膜下層の厚さ(μm)は A 群 283.3 ± 70.7 vs B 群 290.9 ± 156.2 でありともに差を認めなかった。膀胱容量(ml)は A 群 8.63 ± 6.08 vs B 群 1.81 ± 1.24 で有意差を認めた ($P < 0.01$) (表 1)腎の影響は各群で差は認めなかった。

病理学的には Group A と Group B では筋層内に線維芽細胞が入り込み、肥厚している所見を得られた。しかしボツリヌスを注入したことによる差は認められなかった。また体

重と膀胱容量に差を認めたが正常膀胱容量と比較すると膀胱容量を十分に得るだけの効果は認めなかった。過去4年間に膀胱壁の肥厚したモデルを作成し、胎生80日でポトックス注入をおこない安全な投与量を決定する事ができた。しかし、膀胱羊水腔シャント手術を行ったコントロール群と比較し、膀胱容量に有意に差はあったものの病理学的には変化を認めず、正常膀胱容量と比較すると膀胱容量を十分に得るだけの効果は認めなかった。

Group A Group B Group C

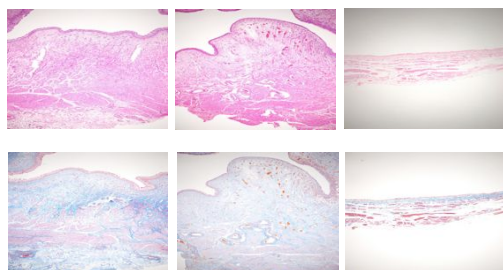


図3) 上段はH-E染色、2段目はMasson染色

	Group A	Group B	Group C
n	9/12	12/14	10
体長(cm)	47.9 ± 3.6	44.2 ± 3.0	48.9 ± 3.6
膀胱容量(ml)	8.6 ± 6.1	1.8 ± 1.2	57.2 ± 12.2
膀胱壁厚さ(μm)	1411.1 ± 279.3	1177.3 ± 565.8	372.7 ± 120

表1 各群の結果

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)

Juma Obayashi, Kunihide Tanaka, Junki Koike, Yasuji Seki, Hideki Nagae 他, Does a large abdominal wall defect affect lung growth? Journal of Pediatric Surgery, 査読あり, 51, 2016, 1972-1975.

DOI:10.1016/j.jpedsurg.2016.09.022.

Juma Obayashi, Kunihide Tanaka, Kei Ohyama, Shutaro Manabe, Hideki Nagae 他, Relational between amount of bile ducts in portal canal outcomes in biliary atresia. Pediatric Surgery International, 査読あり, 32, 2016, 833-838.

DOI:10.1007/s00383-016-3941-y.

Kunihide Tanaka, Junki Koike, Juma Obayashi, Yasuji Seki, Hideki Nagae 他, Pressure limited vesico-amniotic

shunt allows normal lung growth in a fetal lamb model of obstructive uropathy. Journal of Pediatric Surgery, 査読あり, 50, 2015, 2063-2067.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022346815005436>

Kunihide Tanaka, Shutaro Manabe, Kei Ohyama, Yasuji Seki, Hideki Nagae 他, Can a pressure-limited V-A shunt for obstructive uropathy really protect the kidney? Journal of Pediatric Surgery, 査読あり, 49, 2014, 1831-1834.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022346814005636>

〔学会発表〕(計 3件)

長江秀樹, 大林樹真, 田中邦英, 関保二他, 羊胎仔萎縮膀胱に対する胎児期ポトックスの使用は有効か? 第53回日本小児外科学会学術集会 2016年5月24日~26日, ヒルトン福岡シーホーク(福岡県福岡市)

長江秀樹, 眞鍋周太郎, 大山慧, 田中邦英他, 胎仔羊を用いた膀胱羊水腔シャント手術後ポトックス注入時期の検討. 第52回日本小児外科学会学術集会, 2015年5月28日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

長江秀樹, 脇坂宗親, 島秀樹他, 羊を用いた胎児尿路閉塞モデルの萎縮膀胱に胎児期ポツリヌス注射を用いた効果, 第51回日本小児外科学会学術集会, 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

〔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

長江秀樹 (NAGAE, Hideki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：90468942