

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893013

研究課題名(和文) 低用量バゾプレシン投与が成育限界児の臓器血流に与える影響の解析

研究課題名(英文) Cardiovascular responses to the low dose infusion of vasopressin in premature fetal sheep

研究代表者

渡邊 真平 (WATANABE, SHIMPEI)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：70509413

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性実験系のもと成育限界期の子宮内のヒツジ胎仔5例に低用量のバゾプレシンを持続点滴し、その主要臓器の組織血流量と血管抵抗値の変化を解析した。脳、心筋、副腎、腎、小腸、その他の臓器において、バゾプレシン投与前後に組織血流量や血管抵抗値に有意な変化は認められなかった。

また主要動脈における血管抵抗と超音波ドップラー波形から得られたresistance indexとの関連性を解析するため、人工胎盤システムを装着させたヒツジ胎仔6例にバゾプレシンを持続点滴して、その投与前後に中大脳動脈と腎動脈それぞれのresistance indexと血管抵抗の関係を調べたが、有意な相関は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the cardiovascular responses to the low dose infusion of vasopressin using chronically instrumented premature fetal sheep (n=5). No significant difference in the tissue blood flow and vascular resistance of adrenal glands, kidneys, gut, heart and brain was found between before and after the vasopressin infusion.

We also succeeded to examine the correlation of the vascular resistance with resistance index detected by the Doppler ultrasonography before and after the vasopressin infusion in the premature fetal sheep (n=6), supported by the pumpless artificial placenta system. There was no significant correlation between the vascular resistance and resistance index in the middle cerebral and renal artery.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胎児 バゾプレシン 人工胎盤

1. 研究開始当初の背景

超低出生体重児はその副腎皮質容積の 80%以上を 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase 活性のない胎児層が占めるため、エストロゲン合成能は高いがコーチゾル分泌能に乏しく、潜在的に相対的副腎不全の状態にある。そのため出生時の急性期を経て1-2週間を過ぎた頃に誘因なく、もしくは慢性肺疾患の増悪期に一致して、カテコラミン抵抗性の低血圧と乏尿に陥りやすい。本邦では晩期循環不全とも呼ばれるこの病態はその本態が相対的副腎不全であるため、大多数の症例はグルココルチコイド補充によって速やかに症状が改善する。しかし、妊娠 22-23 週という成育限界期に出生した早産児ではしばしばグルココルチコイド補充にも抵抗性を示すため、脳循環を維持して脳白質損傷（脳性麻痺）を避けるために、やむなく低容量バゾプレシン投与（1.0 mIU/kg/min）に踏み切らざるを得ない。しかし、たとえ低容量といえども早産児に対するバゾプレシン投与はその安全性と有効性が充分には検討されたとはいえず、消化管虚血の危険性が指摘されるなど、国内外いずれにおいても未だ賛否両論のままである (1)。

そこで、本研究では成育限界期のヒツジ胎仔に低容量のアルギニンバゾプレシンを持続点滴し、その主要臓器の組織血流量ならびに血管抵抗値の変化を解析することによって、低容量バゾプレシン投与の安全性と有効性について考察する。これまでヒツジ胎仔への低容量バゾプレシン投与は血流再配分を誘導して、脳、心、副腎への血流量を増加させると信じられてきた (2)。しかし、われわれが行った予備実験では、妊娠 110 日（ヒト妊娠の 30 週相当）のヒツジ胎仔に低容量バゾプレシンを投与すると、脳血流量は維持もしくは増加したが、心、副腎では血管抵抗の増加によって血流量が減少した。消化管でも血管抵抗は増加したが血圧上昇によって血流量に有意な変化は認められなかった。したがって、低容量バゾプレシン投与が胎児や早産児の血行動態に与える影響はあらためて再評価されなければならないと考えられる。

一方、臨床診療では胎児臓器の血流量を直接測定することが困難であるため、主要動脈の超音波ドップラー波形から得られる resistance index（血管抵抗の指標）に基づいて血流量を推測せざるをえない。さらに、ヒトの成育限界期に相当するヒツジ胎仔はその肺が著しく未熟なため人工呼吸器では管理できない。これらに対して、われわれが開発した人工胎盤（図 1）を応用すれば、成育限界のヒツジ胎仔でも安定した状態で生存させることができ (3)、その体に直接プローベを当てることができるため超音波ドップラー解析も容易になる。すなわち、各臓器の組織血流量・血管抵抗値と主要動脈の resistance index との関連を解析できるよう

になり臨床応用への道筋が開かれる。

こうした本研究の成果は、成育限界児の相対的副腎不全を低用量バゾプレシンで安全に治療するための重要な礎となるとともに、その臨床応用のための橋渡し研究として期待される。

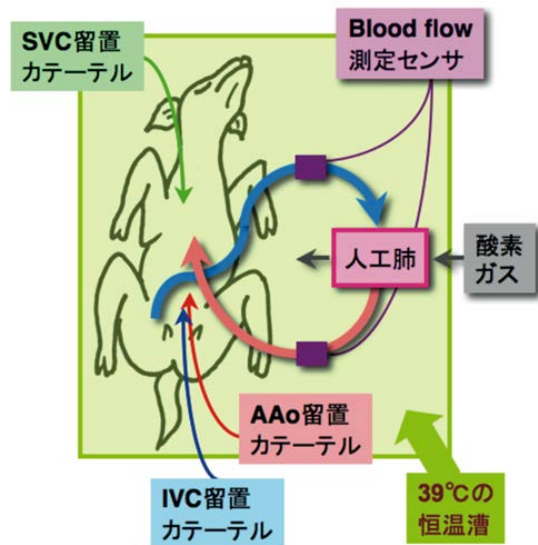


図 1. 人工胎盤システムの概念図

臍帯動脈から脱血した静脈血を膜型人工肺で動脈血化し、胎仔心ポンプ駆動で臍帯静脈に返血する。

2. 研究の目的

本研究では成育限界期のヒツジ胎仔に低用量バゾプレシンを投与し、その主要臓器の組織血流量ならびに血管抵抗値の変化を解析することによって、成育限界児の相対的副腎不全に低用量バゾプレシンを投与した場合の安全性と有効性について考察する。さらに、各臓器の組織血流量・血管抵抗値と主要動脈の超音波ドップラー波形から得られる resistance index（血管抵抗の指標）との関連性を解析することによって、resistance index が臨床で低用量バゾプレシンを安全に使用するための指標となるかどうかを検討する。成育限界期のヒツジ胎仔肺は著しく未熟であるため人工呼吸器では管理できない。そのため本研究ではわれわれが世界に先駆けて開発したポンプレス人工胎盤システムを出生後に装着させてデータを採取する。

3. 研究の方法

(1) 慢性実験系の作成

本研究は東北大学動物実験委員会の承認のもと（2013 医動-008, 2015 医動-209）、2014 年 9 月から 2016 年 3 月に東北大学医学部附属動物実験施設内で実施された。対象として妊娠期間が確定した Suffolk 種ヒツジ胎仔を用いた。

妊娠 91-97 日（満期 147 日、ヒトの妊娠 24-26 週に相当）に全身麻酔下に母獣を開腹して子宮を切開し、胎仔の頸動脈、腹部大動

脈, 上下大静脈, 羊水腔内にカテーテルを留置し, 心電図電極を固定した後, 胎仔を子宮内に戻して閉腹した. 以後, 胎仔動脈圧, 中心静脈圧, 羊水内圧を連続監視してパソコンに記録した.

(2) 子宮内胎仔に対するバゾプレシン負荷

母獣胎仔ともに全身状態が安定するのを待って, 手術後 3 日に慢性実験系のもと子宮内胎仔に低用量バゾプレシンを持続点滴した. バゾプレシン投与量はヒト早産児における治療量 (0.3 mIU/kg/min) を念頭に, 妊娠週数から推定される体重を考慮して決定した. 下記の colored-microsphere 法を用いて, 低用量バゾプレシンの持続点滴の前後において各臓器の組織血流量と血管抵抗値を測定した.

(3) 人工胎盤の装着

手術後 7 日に母獣を帝王切開して胎仔の臍帯基部を露出させ, 胎盤循環を維持させながら, 胎仔の臍帯動脈 (脱血用 2 本) と臍帯静脈 (返血用 1 本) に血管カニューレ (8 Fr) を挿入し, ヘパリン化母獣血でプライムされた並列 2 回路の膜型肺 (膜面積 0.15 m², 充填率 40%, 内空糸径 220 μm; ニプロ社と協同開発) に接続した. 回路内血液は胎仔の心ポンプのみで駆動させた. 回路内凝血を予防するため低分子ヘパリンを持続点滴し (活性化凝固時間 >150 秒), 胎児循環を維持させるためプロスタグランディン E₂ 製剤を持続点滴した (超音波ドップラーで右左短絡を確認). 人工胎盤が問題なく作動したことを確認して臍帯を切離した後, 胎仔と人工胎盤回路を 39°C に加温した恒温槽内の塩水 (70 L, Na 120 mEq/L) に浮遊させた.

心拍 140 bpm, 中心静脈圧 2-6 mmHg, 血圧 60/40 (47) mmHg, SvO₂ 70%, Hb 11 g/dl, Ht 35% を目標に輸血と血管作動薬を用いて循環管理し, 動脈血で pH 7.40, PCO₂ 40 torr, PO₂ 30 torr, glucose 20 mg/dl, lactate <20 mg/dl 前後を維持させた.

(4) 血管抵抗値と resistance index の比較

人工胎盤装着後 3 日にバゾプレシンを持続点滴した. 投与前後に下記の colored-microsphere 法により中大脳動脈と腎動脈の血管抵抗値を測定し, また同時に超音波ドップラー波形から得られる resistance index を算出し, それらを比較した.

(5) colored-microsphere 法による組織血流量測定

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. 頸動脈と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 4.0ml (2.0ml/分で 12

0 秒間かけて) 採取し, その開始 10 秒後から 10 秒間かけて microsphere 150 万個 (2.0ml に希釈) を上大静脈と下大静脈それぞれから同時に注入した.

実験終了後に胎仔の脳皮質, 脳白質, 小脳, 延髄, 心室筋, 腎, 副腎, 肝臓, 小腸, 結腸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 0.3-1.0g の組織を切り取って試料とし, その重量を精密測定した.

対照血液と臓器から切り出した試料中に含まれる microsphere を分光光度計 (SPECTRA Max 190; MolecuLer Device, CA, USA) で定量した. それぞれの試料を 2 mol/l NaOH で溶解し, ポリエステルフィルターで microsphere を回収した後, cellosolve acetate 300 μl 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と血管抵抗値は下記の計算式を用いて算出した.

・組織血流量 (ml*min⁻¹*g⁻¹) = $A_s * V_{ref} * A_{ref}^{-1} * W_s^{-1}$
(A_s: 臓器試料の吸光度, V_{ref}: 対照血液の採取速度, A_{ref}: 対照血液の吸光度, W_s: 臓器試料の重量)

・血管抵抗値 (mmHg*min*g/ml)
= 平均動脈圧/組織血流量

(6) 統計学的解析

バゾプレシン負荷後 120 分間の胎仔心拍数と平均動脈圧の投与開始前から変化の有意性を Dunnett の検定で評価した. バゾプレシン持続点滴の前後における各臓器の組織血流量と血管抵抗の変化は, Wilcoxon の符号付順位検定で評価した. 人工胎盤装着下での各臓器の血管抵抗値と主要動脈の超音波ドップラー波形から得られる resistance index (血管抵抗の指標) との関連性は pearson の相関係数 |r| を指標とし, |r| が 0.70 以上を相関関係があると判定した. 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

(1) 子宮内におけるバゾプレシン負荷

慢性実験系の子宮内胎仔 5 例に対して, 妊娠 96.2 ± 0.4 日 (平均 ± SD) にアルギニンバゾプレシン 0.20 ± 0.05 mIU/kg/min を持続点滴した. 図 2a, b に負荷時の心拍数, 平均動脈圧の推移を示した. 負荷後に心拍数は低下, 平均動脈圧は上昇する傾向にあったが, 有意な変化ではなかった.

次に図 3a に負荷前後において microsphere 法で測定した組織血流量を示した. いずれの主要臓器においても負荷前後で組織血流量の有意な変化を認めなかった.

次にバゾプレシン負荷前後の血管抵抗値を図 3b に示した. いずれの主要臓器においても負荷前後で血管抵抗値の有意な変化を認めなかった.

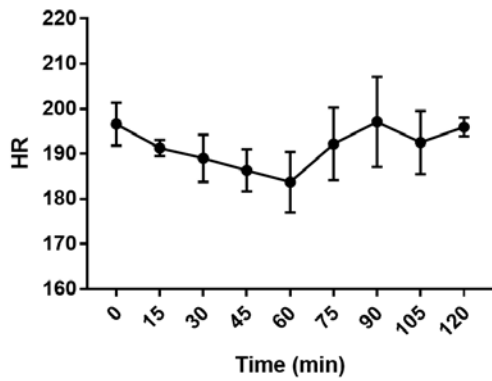


図 2a. バゾプレシン負荷後の胎仔心拍数 (bpm) の変化

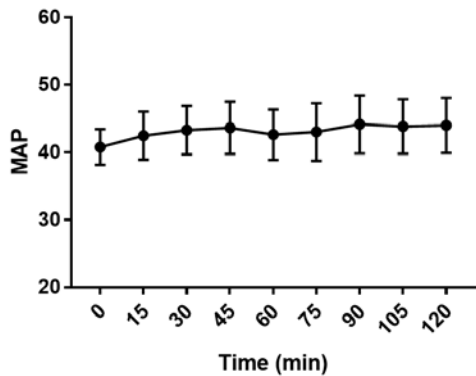


図 2b. バゾプレシン負荷後の胎仔平均動脈圧 (mmHg) の変化

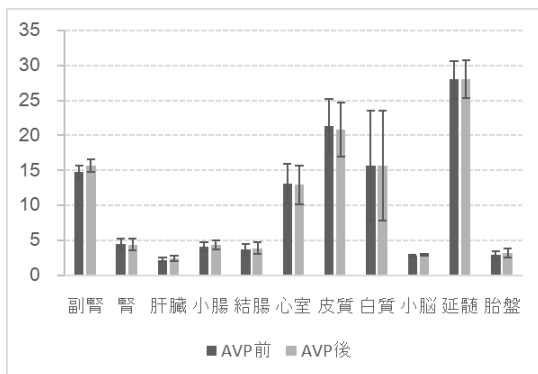


図 3a. バゾプレシン負荷前後の組織血流量 ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) の変化

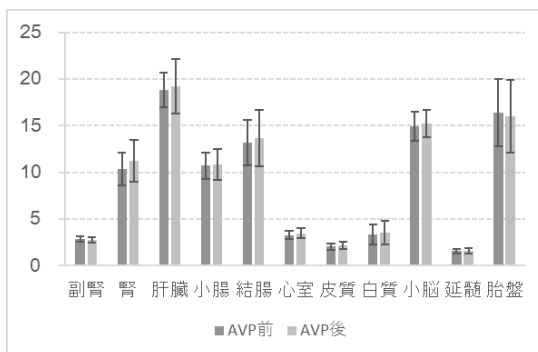


図 3b. バゾプレシン負荷前後の血管抵抗値 ($\text{mmHg} \cdot \text{min} \cdot \text{g} / \text{ml}$) の変化

(2) 中大脳動脈と腎動脈の血管抵抗値と超音波ドップラー波形から得られる resistance index との関連

人工胎盤装着下の胎仔 6 例に対して、妊娠 103.3 ± 2.2 日 (平均 \pm SD) にアルギニンバゾプレシン 0.67 ± 0.37 mIU/kg/min を持続点滴した。図 4 に microsphere 法で測定した中大脳動脈と腎動脈の血管抵抗値と超音波ドップラー波形から得られる RI との pearson の相関係数の結果を示した。

図 4a

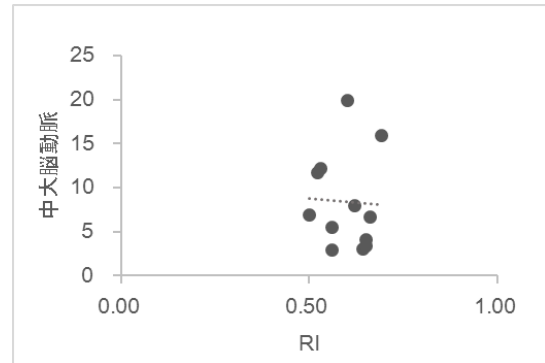
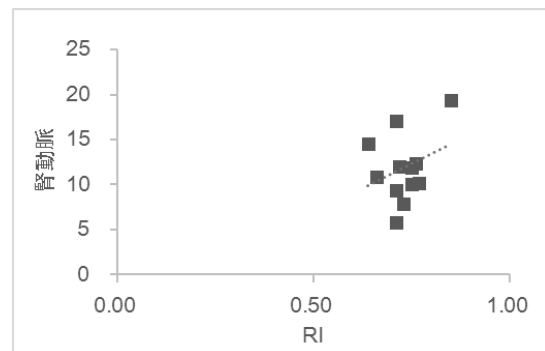


図 4b



中大脳動脈血管抵抗値と RI は相関を認めなかった ($|r|=0.043$, $p=0.89$, 図 4a)。また腎動脈血管抵抗値と RI も相関を認めなかった ($|r|=0.314$, $p=0.32$, 図 4b)。

(3) 考察

本研究において以下の 2 つの成果を得た。まず、本研究ではヒト妊娠 26 週相当のヒツジ胎仔にヒト早産児における治療量に相当するバゾプレシンを投与し、その主要臓器の組織血流量ならびに血管抵抗値の変化を観察したが、有意な変化はみられなかった。ヒトに比べてヒツジ胎仔はバゾプレシンに対する感受性が低い可能性がある。成育限界児の相対的副腎不全に低用量バゾプレシンを投与した場合の安全性と有効性について考察するには、脳血液量を維持しながら心拍出量を再分配するバゾプレシン量を投与し、評価する必要がある。

次に、中大脳動脈と腎動脈の血管抵抗値と超音波ドップラー波形から得られる resistance index との相関は低いことが示

された。この結果からは resistance index だけを指標として臓器血流量を推定することは適していないと考えられた。

<引用文献>

- (1) Kaga M, Matsuda T, Watanabe T, Onodera S, Watanabe S, Usuda H, Ito S. Renal vasodilatory action of arginine vasopressin in extremely low birth weight infants. *Tohoku J Exp Med* 2013; 231: 159-164.
- (2) Iwamoto HS, Rudolph AM, Keil LC, Heymann MA. Hemodynamic responses of the sheep fetus to vasopressin infusion. *Circ Res* 1979; 44: 430-436.
- (3) Miura Y, Matsuda T, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Saito M, Hanita T, Kobayashi Y. A parallelized, pumpless artificial placenta system significantly prolonged survival time in a preterm lamb model. *Artif Organs* 2015 (revised).

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1件)

- (1) Kitanishi R, Matsuda T, Watanabe S, Saito M, Hanita T, Watanabe T, Kobayashi Y. Cerebral ischemia or intrauterine inflammation promotes differentiation of oligodendroglial precursors in preterm ovine fetuses: possible cellular basis for white matter injury. *Tohoku J Exp Med* 2014; 234: 299-307 (査読あり). doi: 10.1620/tjem.234.299

[学会発表] (計3件)

- (1) 渡邊真平, 松田 直, 臼田治夫, 北西龍太, 齋藤昌利, 埴田卓志. 低用量バゾプレシン持続点滴は胎児に臓器血流再分配 (brain-sparing effect) を誘導できるか?. 第26回バゾプレシン研究会, 2016年1月9日, 慶應義塾大学病院 (東京都・新宿区).
- (2) 渡邊真平, 松田 直, 臼田治夫, 北西龍太, 齋藤昌利, 埴田卓志. 低用量バゾプレシン持続点滴は胎児に臓器血流再分配 (brain-sparing effect) を誘導できるか?. 第9回新生児内分泌研究会, 2015年9月27日, 砂防会館 (東京都・千代田区).
- (3) 渡邊真平, 松田 直, 越浪正太, 臼田治夫, 北西龍太, 齋藤昌利, 埴田卓志, 呉 繁夫. ポンプレス人工胎盤システムにおける並列膜型肺回路の有効性. 第66回北日本小児科学会, 2014年9月21日, 旭川トーヨーホテル (北海道・旭川市).

[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

渡邊 真平 (WATANABE, SHIMPEI)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号: 70509413