

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 28 日現在

機関番号：21601
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2013～2015
 課題番号：25462569
 研究課題名(和文) 高サイトカイン血症下における胎児パラメータの包括的評価法の確立 - 羊胎仔実験モデル

 研究課題名(英文) Fetal heart rate responses to intra-amniotic endotoxin in chronically instrumented fetal sheep

 研究代表者
 藤森 敬也 (FUJIMORI, Keiya)

 福島県立医科大学・医学部・教授

 研究者番号：80285030

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：子宮内炎症モデルを作成し、羊胎仔心拍数および圧受容体反射の感度に与える影響について評価することを目的とする。

子宮内炎症モデルは、術後2日目から4日間胎仔静脈にG-CSFを投与し、さらにLPSを術後4日目から2日間羊水腔内に投与することにより作成した。初回LPS投与から24時間以内の胎仔心拍数、一過性頻脈出現回数、基線細変動(STV, LTV)の変化を評価した。さらにLPS投与前後、圧受容体反射の感度を比較した。胎仔心拍数はLPS投与直後から24時間続けて有意に増加した。一過性頻脈、STV、LTVはLPS投与18時間後から有意に減少した。またLPS投与後、圧受容体反射の感度が有意に低下した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to investigate the effects of intra-amniotic endotoxin on fetal heart rate (FHR) in chronically instrumented fetal sheep. Granulocyte-colony stimulating factor was injected intravenously to the fetuses for 4 days after the postoperative second day. The 40mg of lipopolysaccharide (LPS) was also infused in the amniotic cavity for 2 days after the postoperative 4th day. The number of FHR acceleration, and short term variability (STV) and long term variability (LTV) of FHR, were evaluated for 24 hours after the first injection of LPS. The effect of intra-amniotic LPS on baroreflex sensitivity was also examined during phenylephrine injections to the fetus. The FHR was significantly increased throughout the 24 hours from the beginning of LPS injection. The FHR accelerations, STV, and LTV were significantly decreased after 18 hours of the LPS administrations. The baroreflex sensitivity was significantly decreased after LPS injection.

研究分野：産科学

キーワード：羊胎仔 絨毛膜羊膜炎 高サイトカイン血症 胎児心拍数 心拍数基線細変動 圧受容体反射

1. 研究開始当初の背景

近年、分娩管理における胎児心拍数モニタリングの重要性は再認識され、その評価法は5段階に分けられそれぞれの管理指針が提言されている。その中で、心拍数基線細変動の減少は特に重要視され、同様の徐脈所見であっても心拍数基線細変動が減少する場合、1ランクあげての管理が要求されている。さらに絨毛膜羊膜炎などの子宮内感染症が疑われる場合、早めの分娩介入が求められている。しかしながら、胎児心拍数モニタリングを含め、どのような胎児所見をもって分娩介入すればいいのか明らかな指針は示されていない。分娩介入の遅れはそのまま脳性麻痺児の出生へとつながる可能性が高く、その評価は重要である。しかし、これら絨毛膜羊膜炎に伴う高サイトカイン血症 (Fetal inflammatory response syndrome; FIRS) による胎児生理学的パラメータの変化に対する報告は極めて少なく、胎児の娩出時期を逃さないためにも、胎児心拍数をはじめとした初期の胎児生理学的パラメータの変化を捉えることは非常に重要である。

分娩時の胎児心拍数モニタリングにおいては、胎児機能不全が疑われる所見に、変動一過性徐脈、遅発一過性徐脈がある。子宮収縮の際、臍帯が圧迫されることにより胎児の血圧が一過性に上昇し、圧受容体を介した迷走神経反射により心拍数が一過性に低下する現象が変動一過性徐脈であり、低酸素状態の際、化学受容体反射とともにカテコラミン産生による交感神経受容体刺激の結果、圧受容体を介して迷走神経反射により心拍数が一過性に低下する遅発一過性徐脈である。これらの徐脈反射は、どちらも圧受容体反射が介在するものである。子宮内感染による炎症は子宮収縮を促し早産の原因となるが、その際の子宮収縮により圧受容体反射が惹起される可能

性がある。しかし、この圧受容体反射が子宮内炎症時にどのように変化するのかを調べた報告はない。現在まで、Biophysical profile などの胎児パラメータが絨毛膜羊膜炎や胎児感染の予知に有用であるという報告と、有用でないという報告があるが、胎児心拍数をはじめとした胎児生理学的パラメータを総合的に判断することで、子宮内感染に対する児の予後に反映させる評価を行うことは非常に有用と考えられる。

2. 研究の目的

本実験では羊胎仔慢性実験モデルを作成し、Lipopolysaccharide(LPS)を羊水腔に投与することにより胎児高サイトカイン血症を作成し、子宮内炎症時における心拍数基線細変動 (Short term variability; STV/ Long term variability; LTV)を中心とした胎児心拍数モニタリングの変化と、圧受容体反射の変化を観察することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は福島県立医科大学動物実験委員会の承認のもとにおこなわれた (承認番号: 28042)。

(1) 慢性羊胎仔実験モデルの作成

妊娠 111~120 日 (正常妊娠期間 145 日) のサフォーク種羊 9 頭を使用した。(プロトコール完遂; 5 例)

慢性実験モデルの作成は、麻酔導入薬に xylazine (0.2mg/kg) を筋注し、手術中の麻酔維持には dexmedetomidine hydrochloride (3mg/kg/min) 静注を使用した。母獣を背臥位に置き、無菌的操作下に下腹部正中切開にて母獣を開腹、さらに子宮を切開し胎仔頭のみを子宮外に露出した後、38℃ に加温した生理食塩水を満たした手術用ゴム手袋で仔頭を直ちに覆い、胎仔の呼吸開始を防いだ。胎仔

頸部に約 3cm の切開を加え、総頸動脈と、同側内頸静脈から体幹方向に向けてポリビニルカテーテルを挿入し留置した。さらに胎仔気管内に、ポリビニルカテーテルを挿入した。

総頸動脈内カテーテルは、血液サンプリング、血圧計測に用い、内頸静脈内カテーテルは薬剤注入に用い、気管内カテーテルは気管内圧を測定し胎仔呼吸様運動の同定に用いた。また、頭部皮膚を切開し頭蓋骨を露出し、一側前頭部と頭頂部に電気ドリルにて直径 5mm 程度の穴を開け、そこから硬膜表面へ銀線を埋め込み、脳波電極(脳皮質電図) とした。さらに、胎仔体幹の皮下 3 箇所心電図用電極を装着し、羊水腔には羊水注入用にポリビニルカテーテルを挿入した。ついで児頭を子宮内に戻し、子宮切開創を縫合した。母獣の腹壁の筋膜を縫合した後、母獣・胎仔のカテーテルは母獣の皮下を通し一括して左側腹部より体外に露出した。母獣大腿動脈内にもポリビニルカテーテルを挿入した。手術後、胎仔総頸動脈内カテーテル、胎仔気管内カテーテル、母体大腿動脈内カテーテルは圧トランスデューサに接続し、PowerLab system (AD Instruments 社) を用いて胎仔血圧、気管内圧、母体血圧を連続記録した。手術後の感染予防として LPS の投与を開始する術後 4 日目まで 12 時間毎に母体に留置した大腿静脈内カテーテルより flomoxef sodium1g を投与した。

(2) 実験プロトコル(図 1)

慢性羊胎仔実験モデル作成後 48 時間経過した後、実験を開始した。手術後より胎仔血圧・胎仔心拍数・胎仔心電図・胎仔気管内圧・胎仔脳波、母体血圧を連続測定・記録した。

子宮内感染モデルは、顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF:50 μ g) を術後 2 日、術後 3 日、術後 4 日、術後 5 日にカテーテルから胎児頸静脈に投与した。また術後 4 日、5 日それぞれ

の G-CSF 投与直後に LPS:40mg をカテーテル経由で羊水腔に投与した。胎仔心拍数モニタリングは手術直後から子宮内胎児死亡にいたるまで継続して測定した。また Lipopolysaccharide 初回投与直前、投与直後 2 時間、投与直後 4 時間、投与直後 12 時間、投与直後 24 時間の胎児動脈血液ガス、胎児血算を測定した。

圧受容体反射の観察は、phenylephrine 30 μ g を羊胎仔の内頸静脈より投与し、圧受容体反射が観察された後 10-15 分間隔でそれぞれ心拍数、平均動脈血圧が戻っていることを確認した後、再度同様に phenylephrine を投与した。投与後の平均動脈血圧の変動 (MAP) および心拍数の変動 (FHR) を測定し、FHR/ MAP を算出した。

(3) 測定項目

胎仔心拍数、胎仔一過性頻脈、胎仔心拍数基線変動 (STV/LTV) を測定した。圧受容体反射は、MAP、FHR を計測し FHR/ MAP を算出した。MAP は (収縮期血圧+拡張期血圧 \times 2) / 3 を用いた。

実験中の胎仔心拍数、胎仔心拍数基線細変動は 10 分間の平均値、胎仔一過性頻脈は 20 分間において胎仔心拍数が 15bpm 以上 15 秒以上増加した部位をカウントした。

FHR/ MAP は平均値 \pm 標準誤差で表記し、胎仔心拍数、胎仔一過性頻脈、胎仔心拍数基線変動は 1 時間毎の値を平均値 \pm 標準偏差で表記した。

(4) 測定方法

1) 胎仔心拍数モニタリング

胎仔心拍数モニタリングは、Power Lab System により手術直後から子宮内胎児死亡にいたるまで連続計測し、HRV モジュールソフト (AD Instruments 社、USA) を用いて基線胎児心拍数 (bpm)、20 分間での一過性頻脈の回数 (回/20min) を計測した。ま

た 胎仔心拍数基線変動(bpm/100)の検討は、Power Lab System にて計測保存された羊胎児の直接誘導心電図信号を動物実験データ表示・収録装置 ATM1308 (アトムメディカル株式会社、日本)へ取り込み、胎児心拍数、LTV、STV を評価した。胎仔心拍数基線細変動は、得られた胎仔心拍信号の R-R 間隔を拍/分に変換し、連続する 2 つの心拍間の差を求め、差が同一符号の場合は LTV に蓄積し、符号が異なれば STV に蓄積し同一ポリグラフ上に同時に表現した (図 2)。100R-R 間隔ごとにそれぞれの variability 値をリセットした。またこれらの項目は連続的に記録されたモニタリング項目の、1 時間毎の平均値のトレンドを計測した。

2) 圧受容体反射

) Phenylephrine 投与前 2 分間の血圧が一定していることを確認し、投与後 10 分間における MAP の最高値を測定し、その変動した値 (MAP) とした。

) Phenylephrine 投与前 2 分前の血圧が一定している際の FHR 基線、および投与後 10 分間における FHR の最低値を測定し、その変動した値 (FHR) を測定した。

) 術後 4 日目の LPS 初回投与を基準に炎症前、炎症後と定義し FHR/ MAP を算出し比較した (図 3)。

(5) 統計解析

統計解析には SPSS® Statistics Version 22. (IBM 社、日本)を用いた。連続変数の比較は one-way ANOVA を用い、post-hoc test には Bonferroni を用いた。また Joinpoint 解析 (Joinpoint Version 3.4.3 National Cancer Institute, 2010) を用いて、実測値のトレンドを図示した。そして、Joinpoint のにより分割された segment、および各 segment における Annual Percent Change(APC)を算出した。p 値 0.05 未満をもって有意差ありとし

た。

4 . 研究成果

妊娠 111 ~ 120 日 (正常妊娠期間 145 日) のサフォーク種羊 9 頭を使用し、プロトコール完遂は 5 例、血液検査値比較実験施行は 6 例であった。1 頭は実験開始前に子宮内胎仔死亡、1 頭は実験中に母体死亡、1 頭は実験開始前に母体死亡となった。

プロトコール完遂例はいずれも術後 5 日目の LPS 投与より 15-28 時間以内に子宮内胎仔死亡となった。

(1) 胎仔心拍数モニタリング

胎仔心拍数は投与直前と比較し有意な変化は認めなかった。Joinpoint 解析では変曲点 (Joinpoint) は検出されなかったが APC : 0.29 であり投与後 24 時間をとおして有意な胎仔心拍数の増加を認めた (図 4)。

一過性頻脈は、LPS 投与前により有意に減少した。投与前と投与 2 時間後の間に有意差を認めた。Joinpoint 解析では Joinpoint が 4 箇所検出された。LPS 投与後 18 時間から 24 時間にかけて有意な一過性頻脈の減少を認めた (APC: -6.15) (図 5)。

STV は、LPS 投与により有意に減少した。しかしながら、投与直前と各観測点においては有意差を認めなかった。Joinpoint 解析では Joinpoint が 2 箇所検出された。LPS 投与後 17 時間から 24 時間にかけて STV は有意な減少を示した (APC: -5.5) (図 6)。

LTV は、LPS 投与により有意に減少した。しかしながら、投与直前と各観測点においては有意差を認めなかった。Joinpoint 解析では Joinpoint が 2 箇所検出された。LPS 投与直後から投与後 11 時間 (APC: -6.3) LPS 投与後 17 時間から 24 時間にかけて (APC: -11.2) LTV は有意に減少した (図 6)。

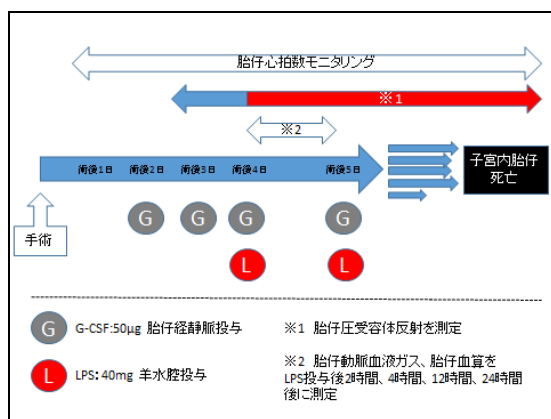
(2) 圧受容体反射

圧受容体反射の程度を示す FHR/ MAP の測定は合計 210 回測定した（1 頭の測定回数 7-118 回）。LPS 投与前の FHR/ MAP は 2.77 ± 0.23 、LPS 投与後の FHR/ MAP は 2.29 ± 0.10 であり、LPS 投与後に FHR/ MAP は有意に低下した。

考察

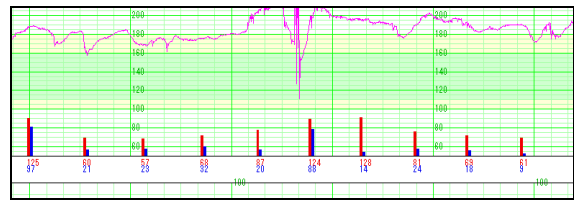
今回得られた現象を実施のヒト臨床に置き換えて考えると、通常我々が胎児心拍数モニタリングで評価する胎児基線心拍数、一過性頻脈、LTV を表す胎児心拍数細変動、さらには STV の変化を捉えることにより、子宮内において胎児の感染を早期に発見できる可能性が示された。また一方で子宮内感染が生じた場合、変動一過性徐脈出現や遅発一過性徐脈が過小評価される可能性に留意した管理が必要であるということができると考えられる。

図 1 実験プロトコール



1. 青矢印の期間に測定した場合を LPS 投与前、赤矢印の期間に測定した場合を LPS 投与後と定義している。

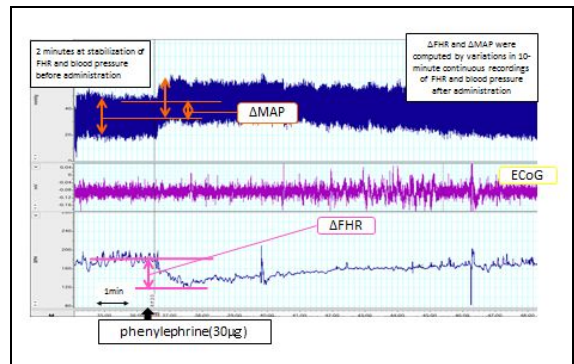
図 2 動物データ表示・収録装置 ATM1308



実際に記録された所見

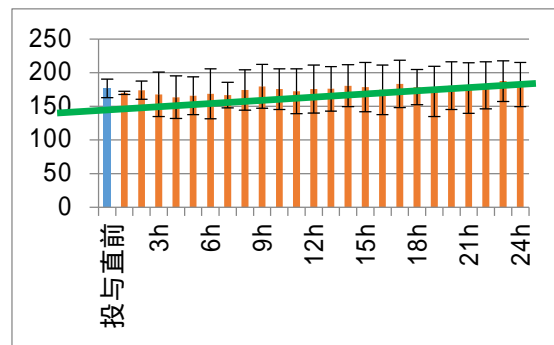
心拍数と Variability (赤: STV, 青: LTV) が同一ポリグラフ上に表現されている。

図 3 圧受容体測定記録の例



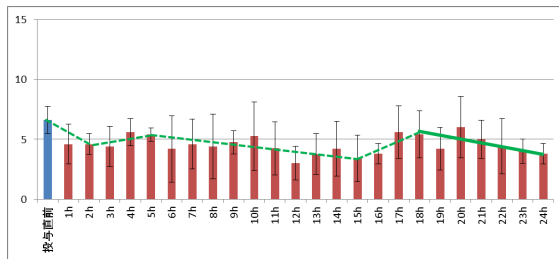
FHR/ MAP により圧受容体反射を数値化する。

図 4 LPS 投与 24 時間以内の胎児心拍数 (bpm) の変化



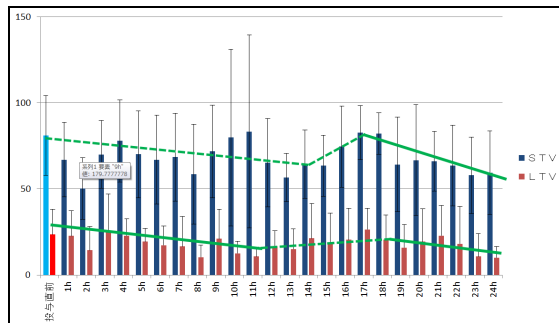
緑実線 APC: 0.29 ($p < 0.05$)

図 5 LPS 投与後 24 時間以内の一過性頻脈 (回/20min)の変化



緑実線 APC:-6.15 (p<0.05)

図 6 LPS 投与後 24 時間以内の STV(beat/100beat)と LTV(beat/100beat)の変化



青棒：STV 赤棒：LTV

緑実線は APC が有意に減少している箇所

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 1 件)(予定)

経塚標、安田俊、平岩幹、藤森敬也. 妊娠羊絨毛膜羊膜炎モデルにおける胎仔心拍数基線細変動の変化. 第 39 回日本母体胎児医学会. 2016 年 8 月 27 日

〔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〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤森敬也 (FUJIMORI, Keiya)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80285030

(2)研究分担者

経塚 標 (KYOZUKA Hyo)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：00644113

安田 俊 (YASUDA Shun)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：50566817

野村泰久 (NOMURA Yasuhisa)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60381381

河村 真 (KAWAMURA Makoto)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：10713133

(3)連携研究者

(4) 研究協力者