

令和元年6月3日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10084

研究課題名(和文) ヒツジ胎子の長期哺育によるポンプレス人工胎盤システムの安全性評価

研究課題名(英文) Safety assessment of bringing up the sheep fetus with ex vivo uterine environment for a long term

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠満期までの10日間を人工胎盤システムで育成させたヒツジ胎子が、その離脱後に補助人工換気を要さず、自発呼吸が可能であることを検証した。対照群(n=4)は妊娠145.8±0.3日に帝王切開で胎子を娩出し、自発呼吸を促した。人工胎盤群(n=4)は妊娠136-137日に人工胎盤システムを装着し、妊娠146.0±0.4日に人工子宮から娩出し、自発呼吸を促した。人工胎盤装着中の胎子の血中乳酸値は30 mg/dL未満であった。対照群は全例で自発呼吸が可能であった。人工胎盤群4例のうち1例は重症肺炎のため人工呼吸から離脱できなかった。人工羊水の汚染対策は今後の課題である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超早産児の予後を改善するために人工胎盤システムの開発が進められている。しかし安全性の評価は未だ不十分である。本研究では妊娠満期までの10日間を人工子宮内で育成させたヒツジ胎子が補助人工換気を要さずに自発呼吸が可能であることが示された。一方で人工羊水の汚染対策、適切な栄養管理に課題が残った。また人工子宮内での胎児発育には適切な人工胎盤血流量の確保が必要であることが示唆された。本研究は人工胎盤システムを超早産児に応用する臨床研究のための橋渡しの研究となった。

研究成果の概要(英文)：The study was performed to make clear that whether the fetus treated with ex vivo uterine environment for ten days to expected date of birth could breathe itself. Suffolk ewes with timed were surgically delivered at 136-137 days of gestation (term is 147 days) and their fetuses were adapted to ex vivo uterine environment therapy (treatment group; n=4). During the treatment period, blood lactate levels of all fetuses maintained under 30 mg/dL. After the treatment, the fetuses were delivered from artificial amniotic fluid at 146.0±0.4 days. Control group animals (n=4) were surgically delivered at 145.8±0.3 days. All fetuses in control group could breathe itself. One of 4 fetuses in the treatment group suffered from severe pneumonia and could not leave the ventilator. The results could suggest that the fetus treated with ex vivo uterine environment for ten days to expected date of birth could breathe itself. However, the management of amniotic fluid pollution remains a challenge.

研究分野：胎児生理学

キーワード：人工胎盤 胎児 ヒツジ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現行の新生児集中治療は出生直後から人工呼吸管理を開始して、早産児に胎児循環から成人循環への適応を強制している。そのため、妊娠 24 週未満で生まれた成育限界児は左心不全や動脈管開存に陥りやすく、しばしば脳出血、脳白質損傷、壊死性腸炎を併発する。その結果、成育限界児の生存率は未だ 50-80%程度にとどまり、この 20 年は診療成績に有意な改善がない。

この課題を克服する方法として、子宮外でも胎児循環を維持できる人工胎盤システムの開発が 1960 年代から模索されてきた。本邦では海野らが駆動ポンプと膜型人工肺を用いた体外式補助循環回路をヤギ胎仔に装着させ、1990 年代には世界で初めて 3 週間の子宮外保育を成功させた¹⁾。しかしながら、人工胎盤から離脱させると自発呼吸は認められたものの人工換気を余儀なくされ、起立不能な状態であり、その安全性には大きな課題が残された。そのため、これ以降は人工胎盤システムを用いて子宮外保育を試みた新たな研究報告は国内外にみられない。

そこでわれわれはより生理的なシステムを採用し、回路血流の駆動に機械的ポンプを使用せず、心ポンプのみで循環させるポンプレス人工胎盤システムの開発に着手した。この体外式補助循環システムは [脱血カヌラ+膜型人工肺+供血カヌラ] のみで構成されるきわめてコンパクトな補助循環であり、胎盤という最も効率のよい生理的補助循環のコンセプトを応用して、(1) 臍帯動脈から脱血してガス交換後に臍帯静脈に返血し、(2) 回路内を陽圧に保ち、(3) 体血管抵抗の変化で回路血流量を自律調節させて胎児循環を維持するシステムである。

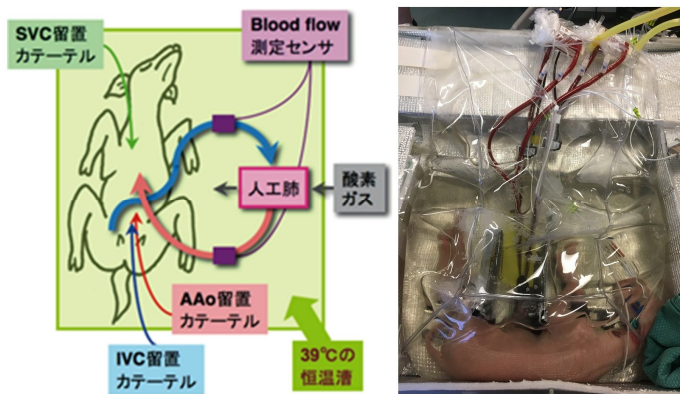


図 1. ポンプレス人工胎盤システム。この体外補助循環は [脱血カヌラ+膜型人工肺+供血カヌラ] のみで構成され、臍帯動脈から脱血して臍帯静脈に返血し、駆動ポンプを用いず心ポンプのみで循環させる

このシステムを臨床応用すれば、現行の保育器で育てる新生児医療から脱却し、人工子宮で育てる新生児医療へと転換させ、成育限界児の後遺症なき生存のみならず、肺低形成や複雑奇形を合併した早産児の救命や成育にも幅広く応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

開発と並行して欠かせないのは安全性の評価である。そこで本研究期間には、妊娠満期までの 10 日間を人工胎盤システムで成育させたヒツジ胎仔が、その離脱後に補助人工換気を要さず、自発呼吸が可能であることを検証する。

3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験センターの承認 (2016 医動-295) のもと東北大学医学部附属動物実験施設において実施された。対象として妊娠期間が確定した Suffolk 種ヒツジの胎仔を用いた (満期 147 日)。ヒツジの発情期が夏季であるため実験は 10-3 月にかけて 3 年間で合計 12 回行った。

(1) ポンプレス人工胎盤システムの装着

妊娠 136-137 日にヒツジ胎仔を対象群と人工胎盤群の 2 群に分け、対照群はそのまま母獣の子宮内で 9-10 日間 (出産予定日は妊娠 147 日) 養育した。一方の人工胎盤群は 9-10 日間を人工胎盤に接続して人工羊水で充たされた人工子宮内で育てた。

人工胎盤群は妊娠 136-137 日に子宮を切開し、胎盤循環を維持させながら、胎仔の頸動脈にカテーテルを留置した。引き続き胎仔の臍帯基部を露出させ、臍帯動脈 (脱血用 2 本) と臍帯静脈 (返血用 1 本) に血管カニューレを挿入し、ヘパリン化母獣血でプライミングされた膜型肺を接続した。回路内血液は胎仔の心ポンプのみで駆動させた (図 1)。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 >180 秒)、さらに胎児循環を維持させるためプロスタグランジン E2 製剤を持続点滴し (5.0 ng/kg/min)、超音波ドップラーで動脈管の右左短絡を確認した臍帯を切離した後、胎仔と膜型肺回路を 39 °C に加温した塩水恒温槽 (人工子宮) に浮遊させた。

(2) 人工子宮内での循環栄養の管理

心拍 140 bpm, 中心静脈圧 5-8 mmHg, 血圧 60/40 (47) mmHg, SvO₂ 70%, Hb 11.0 g/dl, Ht 35.0% 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 40torr, pO₂ 30torr, glucose 20 mg/dl, lactate <20 mg/dl 前後を維持させた。血管作動薬による循環

サポートは人工胎盤システム装着から 24 時間以内に切り上げ、その後は満期まで胎仔心ポンプのみで胎児循環を維持させた。人工胎盤装着中に片肺の換気効率が悪化した場合には速やかに膜型肺の交換を行った。

回路内血流量はドップラー血流計で測定し、総回路血流量は 150 ml/kg/分を目標とした。栄養サポートとして、glucose 20 g/kg/日、アミノ酸 2.0 g/kg/日を目安とした高カロリー輸液を行い、総輸液量は 150 ml/kg/日とした。電解質、微量元素、ビタミンはヒト早産児に対する標準補給量を投与した。また胎仔が内分泌学的サポートを必要とするかは不明であったが、ストレスによる相対的副腎不全が疑われた場合にはグルココルチコイドの補充量で治療した。

(3) 新生児に対する出生時の蘇生と身体的評価

対照群は妊娠 145-146 日に全身麻酔下に母獣を帝王切開した。胎仔はまず上半身を子宮外に露出したところで頸動脈にカテーテルを留置し、気管挿管を行った後に娩出し、人工呼吸器を装着した。そして全身麻酔から覚醒した後に自発呼吸を促し、人工呼吸管理から離脱させた。

人工胎盤群は妊娠 145-147 日に胎仔を人工羊水から取りだし、気管挿管を行った後に人工呼吸器を装着した。その後人工胎盤回路を抜去し、プロスタグランジン E2 製剤の点滴を中止した。出生後の呼吸状態に合わせて、酸素投与と人工換気でサポートしながら保育器内で呼吸の適応を待った。

(4) データ採取と解析

すべての胎仔から、人工胎盤システム装着の開始直後から出生後 24 時間まで以下のデータを持続的に記録した；心拍数、平均動脈圧、人工胎盤回路の血流量。また 6 時間毎に動脈血のガス分析値、乳酸値、血糖値、Hb 濃度、Ht 値、活性化凝固時間を測定した。以上の項目を 2 群間で統計学的に比較することによって、ポンプレス人工胎盤システムによる成育の有効性と安全性について考察する。

4. 研究成果

3 年間で合計 12 例のヒツジ胎仔を本実験のために準備し、結果として 8 例 (対照群 4 例、炎症群 4 例) を解析に用いることができた。除外された 4 例の内訳は、人工胎盤を用いた養育中のカテーテルトラブル 1 例と同じく人工胎盤での養育中の敗血症性ショック 3 例であった。

対象の基礎データを表 1 に示した。

群 (例数)	対照群 (n=4)	人工胎盤群 (n=4)
単胎/多胎	3/1	3/1
雄/雌	3/1	2/2
蘇生時妊娠日齢	145.8 ± 0.3	146.0 ± 0.4

表 1. 対象の基礎データ

数値はいずれも「平均値 ± 標準誤差」で示した。

(1) 人工胎盤装着中の胎仔のバイタルサイン

人工胎盤を装着した胎仔の平均動脈圧 (mmHg)、胎盤血流量 (mL/分)、心拍数 (bpm)、乳酸値 (mg/dL) の代表的な経過を図 2 に示した。

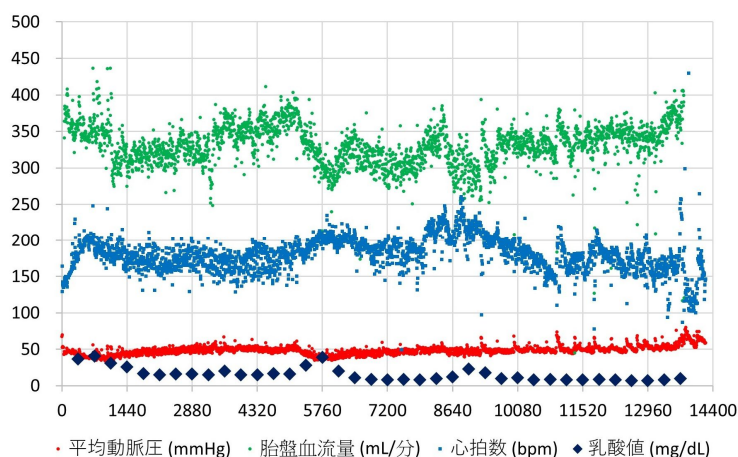


図 2. 人工胎盤装着中の胎仔のバイタルサイン

胎仔の平均動脈圧はいずれの例でも 50-60 mmHg を保っていた。心拍数も概ね 150-200 bpm と安定していた。また 6 時間毎に測定した乳酸値も 30 mg/dL 未満で推移し、安定した循環動態であった。しかし胎盤血流量は 300-350 mL/分であることが多く、母獣の子宮内における推定される胎盤血流量 (150 mL/kg/分) の 60-70 % であった。

(2) 蘇生経過および剖検結果の比較

蘇生時における対照群、人工胎盤群の人工呼吸管理 (MV) からの離脱数と剖検結果を表 2 に示した。

群 (例数)	対照群 (n=4)	人工胎盤群 (n=4)
MVからの離脱	4/4	3/4
剖検時体重 (kg)	4.35 ± 0.39	3.31 ± 0.01
脳重量 (g)	53.7 ± 1.6	44.8 ± 1.9

表 2. 蘇生経過および剖検結果

数値はいずれも「平均値 ± 標準誤差」で示した。

対照群 4 例は母獣の帝王切開に伴う全身麻酔から覚醒すると、全例すみやかに人工呼吸から離脱可能であった。人工胎盤群 4 例のうち 3 例は人工呼吸から離脱可能であったが、1 例は重症肺炎による換気不全のため人工呼吸管理から離脱できずに安楽死とした。肺炎の原因は人工羊水の細菌汚染と考えられた。また敗血症性ショックのため実験を中止した人工胎盤装着中の 3 例においても、血液培養と羊水培養から同種の細菌が検出されたため羊水汚染が原因と考えられた。今回の実験では、6 時間毎の羊水交換、紫外線照射、羊水中への抗生物質注入を実施していたが敗血症を回避できず、人工羊水の汚染対策は今後の課題である。

剖検時体重は対照群と比較して人工胎盤群は小さい傾向にあった。実験モデルの都合で体重増加率は算出できず、また各群 4 例と少ないため統計学的な解析はできていない。同様に脳重量も対照群が重い傾向にあった。体重や脳重量に差を生じた原因の 1 つは栄養不足の可能性がある。動物種の違いがあり、適切な栄養素と栄養量は不明なため、今後は投与熱量を増やした追加実験が必要である。また高い胎盤回路抵抗により胎盤血流が制限されたことが、胎児発育遅延を生じた可能性がある。乳酸値の上昇は認めなかったが、胎盤血流を確保するために胎仔が末梢組織の血管抵抗を高く保ったことは否定できない。そのためより抵抗の低い胎盤回路で追加実験が求められる。

以上より人工胎盤を装着して 10 日間の養育を行っても、人工呼吸管理からは離脱し、自発呼吸で換気可能なことは明らかになった。しかし羊水汚染に伴う敗血症や胎児発育遅延を克服するために追加実験を行う必要がある。また脳 MRI (T1WI と T2WI) により低酸素虚血性脳症、脳白質損傷、および脳溝脳回形成不全の有無、髄鞘化の程度、皮質と白質の容量について確認する予定である。

< 引用文献 >

1) Unno N, 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. *Artificial Organs* 1993; 17: 996-1003.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Usuda H, Watanabe S, Miura Y, Saito M, Musk GC, Rittenschober-Böhm J, Ikeda H, Sato S, Hanita T, Matsuda T, Jobe AH, Newnham JP, Stock SJ, Kemp MW. Successful maintenance of key physiological parameters in preterm lambs treated with ex vivo uterine environment therapy for a period of 1 week. *Am J Obstet Gynecol* 2017; 217(4): 457.e1-457.e13. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.ajog.2017.05.046

Kemp MW, Saito M, Usuda H, Molloy TJ, Miura Y, Sato S, Watanabe S, Clarke M, Fossler M, Schmidt A, Kallapur SG, Kramer BW, Newnham JP, Jobe AH. Maternofetal pharmacokinetics and fetal lung responses in chronically catheterized sheep receiving constant, low-dose infusions of betamethasone phosphate. *Am J Obstet Gynecol* 2016; 215(6): 775.e1-775.e12. (査読あり)

DOI: 10.1016/j.ajog.2016.08.017

Hanita T, Matsuda T, Saito M, Kitanishi R, Cho K, Harding R, Kobayashi Y. Potential role of prenatal inflammation in the impairment of lung development following mechanical ventilation of preterm lambs. *Reprod Sci* 2016; 24(3): 478-87.

DOI: 10.1177/1933719116660846. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

Watanabe S, Matsuda T, Usuda H, Kitanishi R, Saito M, Hanita T, Kobayashi Y. The redistribution of cardiac output by vasopressin infusion in the premature fetal sheep. 43rd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2016 (Cambridge, UK); Sep 17-20, 2016.

Hanita T, Matsuda T, Usuda H, Kitanishi R, Saito M, Watanabe S, Kobayashi Y. Magnetic resonance imaging is useful for detecting acute phase of cerebral white matter

injury in preterm ovine foetus. 43rd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2016 (Cambridge, UK); Sep 17-20, 2016.

〔その他〕

<http://www.ped.med.tohoku.ac.jp/newborn/lineup/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者氏名：渡邊 真平

ローマ字氏名：(WATANABE, shimpei)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助手

研究者番号（8桁）：70509413

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：松田 直

ローマ字氏名：(MATSUDA, tadashi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：非常勤講師

研究者番号（8桁）：50361100

研究分担者氏名：齋藤 昌利

ローマ字氏名：(SAITO, masatoshi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：講師

研究者番号（8桁）：00451584

研究分担者氏名：埴田 卓志

ローマ字氏名：(HANITA, takushi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：30400360

研究分担者氏名：北西 龍太

ローマ字氏名：(KITANISHI, ryuta)

所属研究機関名：東北大学

部局名：医学系研究科

職名：非常勤講師

研究者番号（8桁）：20436116