

機関番号：32713

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592093

研究課題名 (和文) 羊胎仔尿路閉塞による胎児治療は多嚢胞性異形成腎の発生分子に影響をあたえるか？

研究課題名 (英文) Optimal timing of fetal therapy for lower urinary tract obstruction in fetal lambs.

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

研究成果の概要 (和文)：

【目的】ヒツジ胎仔尿路閉塞モデルを用いて、尿路閉塞後 14 日までの腎・膀胱組織を詳細に観察することで、胎児治療の至適時期を検討した。

【対象および方法】妊娠 60 日の胎仔を尿路閉塞後 2 から 14 日の早期の腎・膀胱の変化 (n=28) と胎生同時期の正常対照群 (n=20) の腎膀胱組織に免疫組織化学を加えて比較した。

【結果】尿路閉塞モデルの閉塞後 2 日ではすでに CD10 免疫組織化学で同定される近位尿細管の選択的拡張がみられ、14 日には α -SMA 陽性細胞による間質増生が始まっていた。また、膀胱の壁厚 (μm) は尿路閉塞後 2 日で $127.9 \pm 9.7 \mu\text{m}$, 3 日で $97.8 \pm 67.5 \mu\text{m}$, 4 日で $56.5 \pm 19.8 \mu\text{m}$ と一旦伸展した膀胱壁が閉塞後 5 日になると $206.1 \pm 28.2 \mu\text{m}$, 7 日で $329.3 \pm 6.9 \mu\text{m}$, 14 日で $345.6 \pm 144.9 \mu\text{m}$ と肥厚し始め、満期で $1056 \pm 398.6 \mu\text{m}$ となった。閉塞後 7 日と満期で正常膀胱よりも肥厚した膀胱壁となった ($p < 0.01$)。や α -SMA 陽性細胞の増生、コロイド鉄染色による粘液多糖体の増加によるものであった。

【結語】ヒツジ胎仔尿路閉塞モデルの腎膀胱形態変化は 2 週間で急速に進行する。胎児手術によって腎膀胱形態の温存が期待できる臨界点は閉塞後 14 日よりさらに早いタイミングにあると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Introduction: Lower urinary tract obstruction causes renal failure bladder dysfunction after birth. We examined the morphological changes of the early obstructive kidney and bladder to determine the optimal timing for fetal therapy.

Materials and Methods: We created obstructive uropathy in fetal lambs at 60 days' gestation by ligating the urethra and urachus. The fetuses were delivered at 2, 3, 4, 5, 7, 14 days after obstruction and at term (145 days gestation). We focused on the early structure of the kidney and bladder wall thickness & structure, comparing obstructive and control lambs.

Results: Dilation of Bowman's capsule and the proximal tubules started from day two. Acute tubular necrosis (ATN) was also observed up to day 7. Numerous cysts were present throughout the kidney at term. The bladder wall was initially expanded and stretched out but by the 4th day the bladder wall became thicker.

Conclusion: Shunting operations to preserve bladder function may be needed earlier than we had expected.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：胎児手術学

1. 研究開始当初の背景

胎児期の尿路閉塞患児に対して、腎臓の機能を温存する目的に膀胱-羊水腔シャント術が施行されている。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、排尿障害、腎機能低下等種々の障害が報告されている。そのため現状の胎児治療の時期や方法を見直す必要がある。

2. 研究の目的

過去10年間、羊胎仔治療の実験から、尿路閉塞後3週間で膀胱-羊水腔シャント(V-Aシャント)を行い50%に正常腎構造が認められた。また尿路閉塞後2週間のV-Aシャントでは多嚢腎は形成されず全例組織学的に正常腎構造を呈した。この結果、閉塞性尿路障害における嚢胞形成が胎児治療により可逆性か、非可逆性かの分岐時期があきらかになってきた。そこで、どのようなメカニズムで嚢胞が消失するかを腎の発生分子を染色し、その責任遺伝子を明らかにしたい。またMCDKが腎発生のどの部分の障害によるものかをつきとめたい。これらの目的を達成する目的に尿路閉塞後早期の膀胱壁や腎臓の変化をとらえ、尿路閉塞による腎、膀胱への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

手術前に母羊の腹部超音波検査を行い妊娠の有無を確認し、胎仔の存在を確認後、気管内挿管し全身麻酔下に帝王切開を行った。尿路閉塞を胎生60日胎仔陰茎尿道と尿膜管を結紮した。雌では恥骨に近い下腹部に約1cmの縦切開を置いて膀胱頸部に到達し膀胱頸部尿道を結紮した。尿膜管は雄同様に臍部で結紮した。手術後は羊が十分な自発呼吸が認められた時点で気管内チューブを抜管し、農場で満期(妊娠145日)まで飼育管理した。

60日胎仔尿路閉塞モデルに対し、術後2-

3週間で再度帝王切開を行い、拡張した膀胱を小切開して膀胱瘻を造設し膀胱-羊水腔シャント(vesico-amniotic shunt; V-Aシャント)を作成した。また膀胱の急激な減圧を防ぐ目的に、膀胱内に一定の圧が常にかかるようにPudenz catheter シャントチューブ(Integra Neuro Sciences, Pudenz Peritoneal Catheter, Plainsboro, NJ, REF NL 850-1380)を挿入したバルブシャントモデルも作成した。シャント作成後胎仔を子宮内に還納し再び満期まで飼育した。妊娠早期の膀胱、腎臓の変化は尿路閉塞後3、5、7、10、14日で安楽死させ、病理学的な検討をおこなった。

4. 研究成果

尿路閉塞による腎臓や膀胱への影響は当初考えられているよりかなり早期におこる事がわかった。腎臓では閉塞後7日目にはAcute tubular necrosis (ATN)の所見が認められ、その所見は自然に改善していた。また膀胱壁の変化では生後4日で一度進展拡張し、その後線維性に肥厚する事がわかった。これらの事から胎児治療の最適な時期は今まで考えているよりかなり早期に行わなければならないと思われる。

また、胎生期尿路閉塞により形成された嚢胞においてp38, ERK, p-ERKの発現増加とJNKの発現減弱はヒトMCDKにおけるMAPキナーゼ発現と同様のパターンであり、MAPキナーゼの発現異常が嚢胞形成に関与する可能性が示唆された。尿路閉塞後の圧調節付きバルブシャントチューブが膀胱に与える効果では明らかにバルブシャントチューブの方が膀胱容量の確保に有利であった。また組織学的にも膀胱壁の肥厚、線維化が少ないことが証明された。

羊胎仔の正常および尿路閉塞モデルにおけ

る尿細管上皮細胞のCD10発現に関する検討では、羊胎仔におけるCD10発現パターンはヒト腎組織と概ね一致し、胎生60日にはすでに同様のパターンでCD10の発現がみられた。尿路閉塞モデルにおけるMCDK様の嚢胞性病変は、CD10陽性、PAS陰性の立方上皮で被覆されており、近位尿細管上皮に由来すると考えられた。

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5件)

1. Kitajima K, Kitagawa et al Bladder development following bladder outletr obstruction in fetal lambs:optimal timing of fetal therapy. J Pediatr Surg 2010 ; 45 : 2423-2430
 2. 北川博昭、他 羊胎仔尿路閉塞モデルをもちいた尿路閉塞に対する胎児治療の有効性について 日本小児泌尿器科学会雑誌 2009 ; 18 : 9-15
 3. 青葉剛史、小池淳樹、北川博昭、Pringle KC、長江秀樹 ヒツジ胎仔の正常および尿路閉塞モデルにおける尿細管上皮 CD10 発現に関する検討 2008 ; 16 : 発達腎研究会誌 16 36-38
 4. Omori S, Kitagawa H, Koike J, Fujita H, Hida M, Pringle KC, Awazu M Activated extracellular signaling-regulated kinase correlated with cyst formation and transforming growth factor- β expression in fetal obstructive uropathy Kidney International 2008 ; 73 : 1031-1037
 5. Aoba T, Kitagawa H, Pringle KC, Koike J, Nagae H, Zuccollo J, Shimada J, Seki Y Can a pressure-limited vesico-amniotic shunt tube preserve normal bladder function? Journal of Pediatric Surgery 2008 ; 43 : 2250-2255
- [学会発表] (計12件)
1. 青葉剛史 他 ヒツジ胎仔尿路閉塞モデルにおける胎児手術の至適時期 ～閉塞早期の腎・膀胱の組織学的変化から～ 第8回日本胎児治療学会学術集会 2010.11.12 川越
 2. Kazuki Kitajima et al Optimal timing of feal therapy for lower uninary tract obstruction in fetal lambs,from the aspect of bladder development Pacific association of pediatric surgery 2010.5.27 Kobe

3. Takeshi Aoba et al Optimal timing of fetal therapy for lower uninary tract obstruction in fetal lambs,from the aspect of renal development Pacific association of pediatric surgery 2010.5.27 Kobe
4. H.Kitagawa Effect of vesico-amniotic shunt for fetal obstructive uropathy in lambs IV Congreso Iberoamericano de Cirugia Pediatrica 2010.3. Habana
5. 青葉剛史、他 胎児診断された両側多嚢腎の1例 第7回日本胎児治療学会 2009.11.13 岐阜
6. 青葉剛史、他 Preliminary report: 羊胎仔尿路閉塞モデルと急性尿細管壊死(ATN)の関連性 第7回日本胎児治療学会 2009.11.13 岐阜
7. 吉岡まき、他 出生前診断診断による泌尿器疾患の検討 第18回日本小児泌尿器科学会 2009.10.1 淡路
8. 青葉剛史、他 胎児尿路閉塞に対する胎児治療後の排尿障害の原因解明 What is tha reason of bladder dysfunction after fetal obstructive uropathy? 日本外科学会定期学術集会 2009.4.4 福岡
9. 青葉剛史、他 膀胱-羊水腔シャントが発生過程のヒツジ胎仔膀胱に与える影響～新たなシャントチューブの可能性と有用性～ 2008.10.
10. 北川博昭 羊胎仔モデルをもちいた尿路閉塞に対する胎児治療の有効性について 第17回 日本小児泌尿器学会総会 2008.7.18 高松
11. Kitagawa H, Pringle KC, Aoba T, Koike J, Zuccollo J, Nagae H, Tsuchiya K, Seki Y Ontogeny of imunohistochemical staining of normal embryonic ampullary activity in fetal lambs Pacific Association of Pediatric Surgeons 41st Annual Meeting 2008.6.3 Wyoming
12. Aoba T, Kitagawa H, Pringle KC, Koike J, Nagae H, Zuccollo J, Shimada J, Seki Y Can a pressure-limited vesico-amniotic shunt tube preserve normal bladder function? Pacific Association of Pediatric Surgeons 41st Annual Meeting 2008.7.3 Wyoming

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
なし

(3)連携研究者

關 保二 (SEKI YASUJI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・非常勤講師
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

脇坂 宗親 (WAKISAKA MUNETSIKA)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30267596

長江 秀樹 (NAGAE HIDEKI)
聖マリアンナ医科大学・医学部・助教