

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860842

研究課題名(和文) 成育限界児を救命するためのポンプレス人工胎盤システムの開発

研究課題名(英文) Development of an artificial placenta for extremely premature infants: pumpless arteriovenous extracorporeal life support in a premature lamb model

研究代表者

白田 治夫 (Usuda, Haruo)

東北大学・大学病院・助手

研究者番号：60722402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト胎盤循環を模した体外式補助循環(ポンプレス人工胎盤)システムを開発し、妊娠90-100日(ヒト妊娠24-27週相当)のヒツジ胎仔を3日間安全に呼吸循環管理できるかどうかを調べた(n=12)。4例が左心後負荷不整合に対してPDE III阻害剤による治療を必要とし、この4例中2例に脳出血と脳白質損傷が認められた。低炭酸ガス血症に関連した脳白質損傷が2例に認められた。人工羊水の細菌汚染に関連した敗血症性ショックによる脳浮腫が1例に認められた。ポンプレス人工胎盤システムを成育限界児に応用する上では、左心後負荷不整合、低炭酸ガス血症、細菌感染に対する対策が急務と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We examined whether premature fetal sheep, equivalent to 24-27 weeks of human gestation, could safely survive for 3 days, supported by the pumpless artificial placenta (AP) system mimicked the human placental circulation (n=12). 2 fetuses suffered cerebral white matter injury from hypocarbia caused by technical errors to operate the AP system. 4 fetuses needed to infuse the phosphodiesterase III inhibitor for left heart failure with afterload mismatch and the 2 of them resulted in cerebral hemorrhage or white matter injury. 1 fetus showed septic shock associated with bacterial contamination of artificial amniotic fluid and resulted in serious hypoxic ischemic encephalopathy. It might be important for the application of the AP system to prevent the operation error, myocardial afterload mismatch and opportunistic infection.

研究分野：胎児生理学

キーワード：胎児 胎児循環 体外式補助循環 膜型人工肺 人工胎盤 人工羊水 成育限界 ヒツジ

1. 研究開始当初の背景

現行の新生児集中治療は、その出生直後から人工呼吸を開始して、早産児に胎児循環から成人循環への適応を強制する。そのため、妊娠 24 週未満で生まれた成育限界児では左心不全や動脈管閉鎖遅延に陥りやすく、臓器灌流障害にもとづく重篤な発達障害（脳出血、脳虚血、慢性肺疾患など）を避け難い。その結果、成育限界児の生存率は未だ 50-80% に止まり、その約半数が神経学的後遺症や呼吸障害に対する療育支援を必要としている¹⁾。

この課題を克服するために、われわれはヒト胎盤循環を模した体外式補助循環システム（ポンプレス人工胎盤）を開発した。この人工胎盤は「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、(1) 臍帯動脈から脱血して臍帯静脈に供血、(2) 駆動ポンプを使用せず心ポンプのみで回路内を陽圧に保ち、(3) ガス交換能を調節するとともに心血管作動薬による体血管抵抗の変化で回路血流量を調節して胎児循環を維持させる（図 1）。先行研究者の Reoma らはポンプレス人工胎盤を用いてもヒツジ胎仔を 4 時間以上生存させられないと報告したが²⁾、われわれは小型高性能の膜型肺を開発することによって、初めてヒツジ胎仔を平均 18 時間生存させることに成功した³⁾。

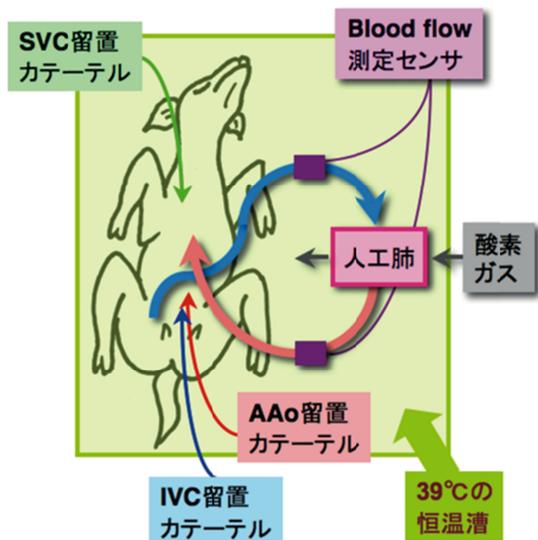


図 1. 人工胎盤システムの概念図。臍帯動脈から脱血された静脈血を膜型人工肺で動脈血化し、胎仔心ポンプ駆動で臍帯静脈に供血する。

さらに、より小さな胎児でもガス交換能を確保しながら体循環を維持できるように、圧力損失が小さい膜型肺を導入して並列回路システム（cotyledon 化）を新たに開発した（図 2）。予備実験において、並列回路は単一路に比較して、より小さなヒツジ胎仔を、より長期間、高い動脈血 pH と低い乳酸値で安全に生存させることができた。

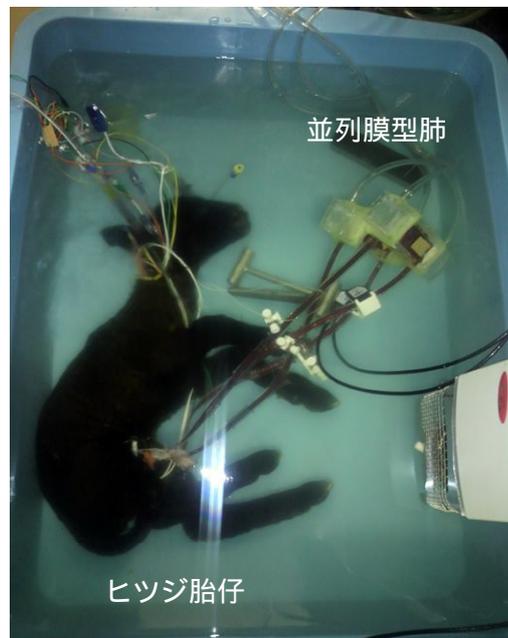


図 2. 妊娠 110 日（満期 147 日）の未熟なヒツジ胎仔に並列膜型肺回路を装着して人工羊水中に浮遊させ 60 時間成育した。

2. 研究の目的

本研究ではニプロ社と共同開発した世界最小容量の膜型人工肺を使用する。この膜型肺は血液充填量が約 20 ml という、これまでの人工胎盤回路で必要とされた回路充填量の半量以下で駆動できるからである。本研究期間には、この超小型膜型肺を用いた並列回路システムによって、妊娠 90-100 日（ヒト妊娠 24-27 週に相当）かつ体重 1.0 kg 以下の小さなヒツジ胎仔でも、3 日間以上安全に呼吸循環管理できることを証明する。

3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験委員会の承認（2013 医動-008, 2015 医動-209）のもと同医学部附属動物実験施設において実施された。

(1) 新規膜型肺の供給体制

われわれが開発した膜型人工肺を改良して、ニプロ総合研究所の人工臓器開発センターから世界最小の膜型肺が供給された（血液充填量約 20 mL、膜面積 0.15 m²、充填率 40%、内空糸径 220 μm）。

(2) 慢性実験系の作成

妊娠 91-94 日（ヒト妊娠 24-25 週相当）に、全身麻酔下に母獣を開腹して子宮を切開し、胎仔の腹部大動脈、上下大静脈、羊水腔内にカテーテルを留置、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、胎仔の心拍数、動脈圧、中心静脈圧を連続監視して記録した。母仔ともに一般状態を安定させ、手術後 7 日に帝王切開を実施した。

(3) 実験プロトコール

妊娠 98-101 日に母獣を帝王切開して胎仔の臍帯基部を露出させ、胎仔の臍帯動脈 2 本と臍帯静脈 1 本に血管カニューレを挿入し、並列 2 回路の膜型肺に接続した。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 >180 秒)、胎児循環を維持させるためプロスタグランジン E₂ 製剤を持続点滴して超音波ドップラーで左右短絡を確認した。臍帯を切離した後、胎仔と人工胎盤回路を 39 に加温した恒温槽の塩水に浮遊させた。

心拍 140 bpm, 中心静脈圧 5-8 mm Hg, 血圧 60/40 (47) mm Hg, 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、回路内血流量を 100 ml/kg/分以下に保って 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。血管作動薬による循環サポートは人工胎盤開始 24 時間以内に切り上げ、人工胎盤装着後 3 日間 胎児循環を維持させた。

高カロリー輸液は glucose 20 g/kg/日, アミノ酸 2.0 g/kg/日 脂肪 1.0 g/kg/日を目安とし、150 ml/kg/日を維持輸液量とした。

(4) データ採取と解析

以下のデータを採取した: 心拍数, 平均動脈圧, 中心静脈圧, 体重, 動脈血ガス分析値, lactate, glucose, Hb の濃度, Ht 値, 活性化凝固時間, 人工胎盤回路の血流量, 酸素添加能, 炭酸ガス排出能。人工胎盤装着前後における脳, 心, 肺, 脾, 腎, 副腎, 腸の組織血流量 (colored- microsphere 法)。

人工胎盤装着後 3 日間を経て胎仔を剖検した。MR による脳の autopsy imaging 撮影の後, 脳を灌流固定してから臓器を切り出して組織診断に供した。

4. 研究成果

本研究期間内 (2 年間) に合計 12 頭のヒツジ胎仔に人工胎盤回路を装着させた。先ず、本研究に供したヒツジ胎仔の基本データを表 1 に示した。

2014 年度は 1 例を除いて妊娠 98 日 (ヒト妊娠 26 週相当) から 72 時間装着させた。ID: 5-08 は装着後の左心後負荷不整合の管理に難渋し, 多臓器不全・DIC のため心原性ショックに陥り, 著しい全身浮腫に陥った。

2015 年度は妊娠 100 日 (ヒト妊娠 27 週相当) から 68 時間装着させた。ID: 6-04/05/08 の 3 例はいずれも装着直後から左心後負荷不整合が顕在化した。装着後 24 時間まで PDE III 阻害剤を持続点滴したことによって、循環不全から立ち直ることができた。ID: 6-11 は人工羊水内で繁殖した緑膿菌に感染して敗血症性ショックに陥り死亡した。

なお、この妊娠時期の胎仔に人工胎盤を装着すると、末梢血管抵抗が上昇して左心後負荷不整合に陥りやすい理由を本研究期間内に解明することはできなかった。

表 1. ヒツジ胎仔の基本データ

胎仔 ID	性	胎数	手術日齢 (日)	装着日齢 (日)	装着期間 (hrs)	剖検時体重 (kg)	全身浮腫
5-04	M	S	94	101	72	1.34	-
5-08	F	S	91	98	60	1.05	+++
5-09	F	S	91	98	72	0.74	-
5-10	F	T	91	98	72	0.78	-
5-11	F	S	91	98	72	0.88	-
6-04	M	S	93	100	68	1.28	++
6-05	M	S	93	100	68	1.38	++
6-06	M	S	93	100	68	1.08	-
6-08	M	S	93	100	68	1.48	+
6-10	F	S	93	100	68	1.12	-
6-11	M	S	93	100	67	1.56	+++
6-12	F	T	93	100	68	0.92	-

次いで、ヒツジ胎仔 12 例の脳 MRI ならびに剖検の結果を表 2 に示した。ショックに陥った ID: 5-08/6-11 ではいずれも脳以外の臓器に虚血性病変が観察された。左心後負荷不整合が顕在化した ID: 6-04 も巣状脳白質損傷のみならず肝/心/肺に虚血性病変が観察された。巣状脳白質損傷のみが観察された ID: 5-10 および 6-12 では、その原因として低 CO₂ 血症による一過性脳虚血が指摘された (図 3)。

表 2. ヒツジ胎仔の脳 MRI ならびに剖検結果

ID	脳 MRI	剖検 (脳以外の臓器)
5-04	異常信号なし	特記すべき病変なし
5-08	脳皮質下血腫	肝壊死/腎皮質内出血
5-09	異常信号なし	特記すべき病変なし
5-10	両側巣状 PVL	特記すべき病変なし
5-11	異常信号なし	特記すべき病変なし
6-04	左巣状 PVL	肝・心筋壊死/肺出血
6-05	異常信号なし	肺小出血壊死巣
6-06	異常信号なし	肺びまん性炎症浸潤
6-08	異常信号なし	肝壊死, 腎梗塞, 肺炎
6-10	異常信号なし	(診断結果未着)
6-11	重度脳浮腫	(診断結果未着)
6-12	左巣状 PVL	(診断結果未着)

PVL, periventricular leukomalacia.

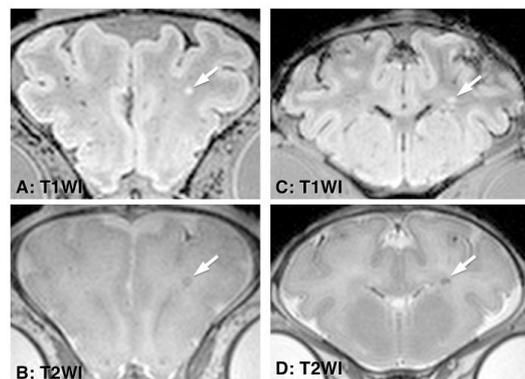


図 3. MRI で観察された代表的な脳白質損傷。ID: 6-04 では前頭葉レベル (A, B), 6-12 では前基底核線条体レベルの冠状断面で (C, D), T1WI 高輝度かつ T2WI 低輝度の巣状病変が観察された (矢印)。

なお、本実験では細菌感染を予防するため人工羊水には PAMP/BP を、胎仔には DRPM を予防投与した。しかし、経羊水の肺炎および敗血症の合併が疑われたため、ID: 6-04 以降は羊水と胎仔動脈血の細菌培養検査を実施した (表 3)。経過から ID: 6-05/06 は緑膿菌肺炎、ID: 6-08/10/11 では緑膿菌性敗血症が濃厚に疑われた (日和見感染)。なお、分離同定された細菌では腸球菌以外はいずれも PAMP/BP および DRPM に対して感受性であった。

そこで、ID: 6-12 では日和見感染を避けるため人工羊水中への PAMP 投与を止め、人工羊水殺菌法を改良した。これまで人工羊水は物理学的フィルターならびに紫外線照射を備えた外部回路を 3-5 L/分で循環させて殺菌していた。これに対して ID: 6-12 では循環フィルター回路に pasteurization unit (高温短時間殺菌, 80℃, 30 秒) を組み込み、紫外線照射を 2 倍に増やして対応した。

その結果、ID: 6-12 では人工羊水から緑膿菌、腸球菌、*Enterobacter cloacae* を消失させることはできなかったが、ヒツジ胎仔の循環動態が十分に安定したことから、肺炎や敗血症を予防できた可能性が高い。現在は組織学的診断の結果を待っているところである。また、本殺菌システムは回路冷却のため流量を 1-3 L/分に減らさなければならず、これが殺菌効率を制限するため、効率的な回路冷却法の開発が今後の課題と考えられる。

表 3. 人工羊水と胎仔動脈血の細菌培養結果

ID	人工羊水	胎仔動脈血
6-05	緑膿菌, 腸球菌	陰性
6-06	緑膿菌, 腸球菌	陰性
6-08	緑膿菌, 腸球菌	緑膿菌, 腸球菌 <i>Enterobacter cloacae</i>
6-10	緑膿菌, 腸球菌	<i>Alcaligenes spp.</i> <i>Enterobacter cloacae</i>
6-11	緑膿菌, 腸球菌	陰性
6-12	緑膿菌, 腸球菌	陰性 <i>Enterobacter cloacae</i>

さらに、colored-microsphere 法で測定した主要臓器 (脳皮質、白質、延髄、心、肺、小腸、腎、副腎) の血流量ならびに血管抵抗を胎生期と人工胎盤装着時で比較した (図 4, n=4)。胎生期に比較して人工胎盤装着時には、脳の皮質、白質、延髄では血管抵抗が増加して血流量が減少する傾向が認められた。

脳血管抵抗が増加してその血流量が減少する理由が、未熟性による左心ポンプ不全なのか、抵抗血管に対する制御不応性なのか、それとも細菌感染の影響なのか、現時点では明らかにできていない。しかし、この課題を克服しなければ、ポンプレス人工胎盤システムを用いて成育限界胎仔を安全に循環管理することは難しいだろう。

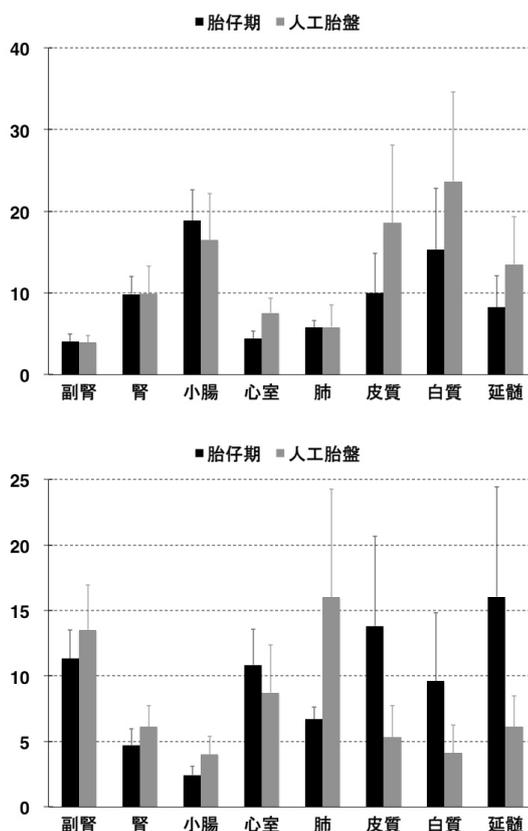


図 4. 主要臓器組織の血流量および血管抵抗をそれぞれ胎生期と人工胎盤装着時の間で比較した (n=4)。上段が血流量 (mL/g·min) で、下段が血管抵抗 (mmHg·min·g/mL) の比較。黒棒が胎生期で、灰棒が人工胎盤装着時。

最後に、ポンプレス人工胎盤システムにおける膜型肺性能の経時的変化を表 4 に示した。装着後 12 時間と 60-72 時間の比較で、酸素添加能ならびに炭酸ガス排出能に有意な差は認められなかった (n=12)。

表 4. 膜型肺性能の経時的変化 (n=12)

	装着後 12 時間	装着後 60-72 時間
酸素添加能 (ml/min)	7.69 ±2.41	7.21 ±2.44
炭酸ガス排出能 (ml/min)	6.23 ±2.68	4.89 ±2.85

以上より、ヒト妊娠 26-27 週に相当する時期のヒツジ胎仔を、ポンプレス人工胎盤システムを用いて安全に循環管理するためには、左心後負荷不整合に関連する脳虚血が脳白質損傷を誘導するため、積極的に PDE III 阻害剤を用いた循環管理を考慮する。

低 CO₂ 血症が脳虚血による脳白質損傷を誘導しやすい発達時期であるため、慎重な呼吸循環管理が求められる。

成育限界期の胎仔は免疫力が弱く日和見感染しやすいため、人工羊水の汚染に関連した細菌感染の予防が重要である。

[参考文献]

- 1) Kono Y, et al. Outcomes of very-low-birthweight infants at 3 years of age born in 2003-2004 in Japan. *Pediatr Int* 2011; 53: 1051-1058.
- 2) Reoma JL, et al. Development of an artificial placenta: pumpless arterio-venous extracorporeal life support in a neonatal sheep model. *J Pediatr Surg* 2009; 44: 53-59.
- 3) Miura Y, et al. Novel modification of an artificial placenta: pumpless arteriovenous extracorporeal life support in a premature lamb model. *Pediatr Res* 2012; 72: 490-494.

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2件)

1. Miura Y, Saito M, Usuda H, Woodward E, Rittenschober-Böhm J, Kannan PS, Musk GC, Matsuda T, Newnham JP, Kemp MW. Ex-Vivo Uterine Environment (EVE) Therapy Induced Limited Fetal Inflammation in a Premature Lamb Model. *PLoS One* 2015; 10: e0140701. doi: 10.1371/journal.pone.0140701 (査読あり).
2. 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 Dec 8. doi: 10.1111/aor.12656 (査読あり).

[学会発表](計1件)

1. Hanita T, Matsuda T, Miura Y, Usuda H, Watanabe T, Kitanishi R, Saito M, Kobayashi Y. A parallelized, pumpless artificial placenta system significantly prolonged survival time in preterm ovine fetus. *42nd Annual Meeting of the Fetal and Neonatal Physiological Society 2015* (Vancouver, Canada); Aug 9-12, 2015.

[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]

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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

臼田 治夫 (USUDA, HARUO)
東北大学・大学病院・助手
研究者番号: 60722402