

学位論文題名

Analyses of factors contrivuting to vulnerability to antenatal periventricular leukomalacia induced by hemorrhagic hypotension in chronically instrumented fetal sheep

(ヒツジ胎仔急性脱血モデルにおける
脳室周囲白質軟化の発症と関連する因子の検討)

学位論文内容の要旨

背景と目的

胎生期に発症する脳室周囲白質軟化(periventricular leukomalacia, PVL)は低出生体重児に認められる脳性麻痺の責任病変として最も重要であるが、その発症機構の詳細は未だ明らかではなく、誘因として胎児低酸素血症の関与が検討されているにすぎない。本研究では、胎仔循環動態の急激な変動がより重要であるとの観点から、ヒツジ胎仔に急性脱血により全身性低血圧を負荷する独自に確立した胎生期 PVL 発症モデルを用いて、全身性低血圧が PVL を誘導した群 (PVL 群) と誘導しなかった群 (非 PVL 群) との比較によって、胎生期 PVL の発症に関連する生理学的因子を明らかにすることを目的とした。

研究材料と方法

本研究は、北海道大学医学部動物実験委員会の認可のもとに、妊娠期間が確定した Suffolk 種ヒツジ胎仔 10 頭を用いて 1998 年 1 月から 2000 年 4 月までの期間に実施した。

1. 慢性実験系の作製：妊娠 110 日に腰椎麻酔下で母獣を開腹して、胎仔の腹部大動脈、上大静脈、下大静脈内にカテーテルを留置し、四肢誘導心電図電極を装置した。羊水腔内に子宮内圧測定用カテーテルを留置して、閉腹した。
2. 胎仔胎盤系循環血液量の算出：手術後 48 時間以降に胎仔に部分交換輸血を施行し、前後の Ht 値から胎仔胎盤系の循環血液量を次の式により算出した。[$V=v/\ln(Ht_0/Ht)$]、V：循環血液量、v：交換血液量、 Ht_0 ：交換前 Ht 値、Ht：交換後 Ht 値]
3. 実験プロトコール：妊娠 113 日 (術後 72 時間以降) に、下大静脈から循環血液量の 35.40% を 20 分間に一定速度で脱血し、胎仔に全身性低血圧を負荷した。その 24 時間後に脱血した血液を 5 時間かけて戻し輸血した。
4. 生理学的因子の測定：胎仔の平均動脈圧は羊水内圧で補正し連続的に記録した。心拍数は心電図から算出した。胎仔腹部大動脈血を経時的に採取して、血液ガス分析(pH, base excess, Pco₂, Po₂), oxygen content (O₂ ct), ヘマトクリット(Ht)値、血漿浸透圧、内分泌ホルモン濃度(ACTH, AVP, cortisol, epinephrine, norepinephrine, dopamine)の測定に供した。
5. 胎仔中枢神経系の病理診断：負荷実験開始 6 日目に帝王切開により胎仔を娩出し、中枢神経系を灌流固定後、摘出し重量を測定した。肉眼的病理検索の後 hematoxylin-eosin で染色し、(i)前頭葉、(ii)線条体を含む前基底核、(iii)視床、海馬を含む乳頭体、および(iv)後頭葉の前額断面を組織病理学的に検討した。脳室周囲白質に限局する(1)散在性の軸索膨化、(2) microglia もしくは泡沫化 macrophage の浸潤をとともなう凝固壊死巣、の少なくともどちらか一方を満たす病変を PVL と診断した。
6. 統計学的解析：各生理学的因子の経時的変動には repeated-measures ANOVA 法を用いた。連続量は Wilcoxon signed-rank test を用いて両側検定した。

結 果

組織病理学的診断により、胎仔は PVL 群 5 例と非 PVL 群 5 例の 2 群に分けられた。両群間の脳重量/体重比に差は認められなかったが、脳重量(平均±SD)は PVL 群(39.6±2.6g)が非 PVL 群(45.5±3.5g)より有意に小さかった($p < 0.05$)。

負荷前値に有意な差を認めた生理学的因子は Ht 値(PVL 群 29.1±1.6% vs 非 PVL 群 33.1±2.8%, $p < 0.05$)、 O_2 ct (2.7±1.0 vs 4.2±0.5mmlo/l, $p < 0.05$)で、いずれも PVL 群で低値であった。両群間で経時的变化に有意な差を認めた生理学因子は平均動脈圧($p < 0.01$)、base excess($p < 0.05$)、Ht 値($p < 0.05$)、 O_2 ct ($p < 0.01$)、および血漿 AVP 濃度($p < 0.01$)であった。

平均動脈圧は、負荷前値に差はなく(41.2±2.3 vs 41.3±2.5mm Hg)、血圧減少幅(16.0±2.1 vs 11.5±2.9mmHg, $p < 0.05$)ならびに血圧低下率(38.8±3.9 vs 28.0±7.6%, $p < 0.05$)が PVL 群で有意に大きかった。Base excess は PVL 群においてのみ脱血直後から 6 時間後まで低下を示した。Ht 値は、PVL 群では脱血直後から、非 PVL 群では 1 時間後から脱血前値に比較して有意に減少した($p < 0.05$)。 O_2 ct は、PVL 群では脱血開始後 12 時間から、非 PVL 群では 4 時間から脱血前値に比較して有意に減少した($p < 0.05$)。また、脱血前値から戻し輸血までの全経過において Ht 値、 O_2 ct は PVL 群が低値を示した($p < 0.05$)。血漿 AVP 濃度は両群とも脱血開始後 20 分に最高値を示し、PVL 群が有意に高値であった($p < 0.01$)。

その他の測定項目においては、実験の全経過において両群間に有意な差異を認めなかった。

考 察

両群の脳重量に差が認められた理由として、ヒツジ胎仔の脳は本負荷実験の直前にあたる妊娠 95.110 日頃から急速な発達(重量の増加、髄鞘化)を示すこと、PVL 発症の初期には脳の発育は妨げられないこと、両群間の脳重量/体重比には差を認めなかったことから、この時期における個体差が考えられた。急速に分化・髄鞘化する時期の乏突起膠細胞には、虚血性変化による易損傷性が報告されている。したがって、PVL 群の胎仔は同じ妊娠 113 日(負荷実験日)のなかでも脳の未熟性が強い群に属し、急速な髄鞘化の途上にあるために全身性低血圧による脳虚血によって白質が傷害されやすい状態にあった可能性が高い。

Ht 値ならびに O_2 ct は実験期間を通じて PVL 群で低値であった。 Po_2 の経時的变化に差がなく、Ht 値と O_2 ct が実験期間中平行に変動したことから、この Ht 値ならびに O_2 ct の低値は、負荷前の Ht 値の差によるものと考えられた。ヒツジ胎仔の Ht 値は発育とともに増加するので、両群間の Ht 値の差は脳重量と同様に胎仔の未熟性の個体差を反映していると推定される。PVL 群の低酸素血症は、base excess を一過性に低下させたのみで酸血症には至らなかった。本研究にあたり、低酸素負荷(O_2 ct の低下)だけでは胎生期 PVL が誘導されないことを確認していることから、 O_2 ct の低値は PVL 発症の本質的な誘因よりはむしろ増悪因子であった可能性が高い。

平均動脈圧の減少幅とその低下率が PVL 群で有意に高値であった。ヒツジ胎仔の脳血流量維持機構は 40mmHg 以下の低血圧では破綻して平均動脈圧の変動に対して一次関数的に減少するといわれていることから、全身性低血圧が PVL 発症に強く関わっていたことが裏付けられる。しかし、胎児心拍数、血漿 catecholamine, cortisol 濃度の経時の変動には差は認められず、血圧減少の程度に差が生じた成因は不明である。胎仔の発達レベルと急性脱血に対する代償反応の関係についての解析が必要であると考えられた。

血漿 AVP 濃度のピーク値は PVL 群の方が高値であったが、血漿浸透圧には有意な差を認めなかったことから、これは平均動脈圧減少の差を反映した結果と考えられた。

以上より、急性脱血で誘導されるヒツジ胎生期 PVL の発症に関与する因子は、負荷時期における脳の発達レベル、誘導される全身性低血圧の程度、 O_2 ct のベースラインの 3 因子に集約され、Ht 値、base excess、血漿 AVP 濃度はこれら 3 因子に付随する因子であると結論した。脳の発達レベルは易損傷性における本質的な因子、全身性低血圧は必須の trigger、低酸素血症は増悪因子と位置づけられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 藤 本 征 一 郎

学 位 論 文 題 名

Analyses of factors contrivuting to vulnerability to antenatal periventricular leukomalacia induced by hemorrhagic hypotension in chronically instrumented fetal sheep

(ヒツジ胎仔急性脱血モデルにおける
脳室周囲白質軟化の発症と関連する因子の検討)

胎生期に発症する脳室周囲白質軟化(PVL)は低出生体重児の脳性麻痺の責任病変として最も重要であるが、その発症機構の詳細は未だ明らかではない。本研究では、全身性低血圧を負荷する独自に確立した胎生期 PVL 発症ヒツジ胎仔モデルを用いて、胎生期 PVL の発症に関連する生理学的因子を解明することを目的とした。

妊娠 110 日に腰椎麻酔下で母獣 (Suffolk 種 10 頭) を開腹して、胎仔の腹部大動脈、上大静脈、下大静脈内にカテーテルを留置し、四肢誘導心電図電極を装置した。手術後 48 時間以降に胎仔に部分交換輸血を施行し、胎仔胎盤系の循環血液量を算出した。妊娠 113 日 (術後 72 時間以降) に、下大静脈から循環血液量の 35~40% を 20 分間に一定速度で脱血し、胎仔 (10 頭) に全身性低血圧を負荷した。その 24 時間後に脱血した血液を 5 時間かけて戻し輸血した。胎仔の平均動脈圧は羊水内圧で補正し連続的に記録した。心拍数は心電図から算出した。胎仔腹部大動脈血を経時的に採取して、血液ガス分析(pH, base excess, Pco₂, Po₂), oxygen content (O₂ ct), ヘマトクリット(Ht)値, 血漿浸透圧, 内分泌ホルモン濃度(ACTH, AVP, cortisol, epinephrine, norepinephrine, dopamine) の測定に供した。負荷実験開始 6 日目に帝王切開により胎仔を娩出し、中枢神経系を灌流固定後、摘出し重量を測定した。肉眼的病理検索の後 hematoxylin-eosin で染色し、(i) 前頭葉, (ii) 線条体を含む前基底核, (iii) 視床, 海馬を含む乳頭体, および(iv) 後頭葉の前額断面を組織病理学的に検討した。脳室周囲白質に限局する(1) 散在性の軸索膨化, (2) microglia もしくは泡沫化 macrophage の浸潤をとともなう凝固壊死巣, の少なくともどちらか一方を満たす病変を PVL と診断した。

組織病理学的診断により、胎仔は PVL 群 5 例と非 PVL 群 5 例の 2 群に分けられた。両群間の脳重量/体重比に差は認められなかったが、脳重量(平均±SD)は PVL 群(39.6±2.6g)が非 PVL 群(45.5±3.5g)より有意に小さかった(p<0.05)。

負荷前値に有意な差を認めた生理学的因子は Ht 値(PVL 群 29.1±1.6% vs 非 PVL 群

33.1±2.8%, $p<0.05$), O_2 ct (2.7±1.0 vs 4.2±0.5mmlo/l, $p<0.05$)で、いずれも PVL 群で低値であった。両群間で経時的変化に有意な差を認めた生理学因子は平均動脈圧 ($p<0.01$), base excess($p<0.05$), Ht 値($p<0.05$), O_2 ct ($p<0.01$), および血漿 AVP 濃度($p<0.01$)であった。

平均動脈圧は、負荷前値に差はなく(41.2±2.3 vs 41.3±2.5mm Hg), 血圧減少幅(16.0±2.1 vs 11.5±2.9mmHg, $p<0.05$)ならびに血圧低下率(38.8±3.9 vs 28.0±7.6%, $p<0.05$)が PVL 群で有意に大きかった。Base excess は PVL 群においてのみ脱血直後から 6 時間後まで低下を示した。Ht 値は、PVL 群では脱血直後から、非 PVL 群では 1 時間後から脱血前値に比較して有意に減少した($p<0.05$)。 O_2 ct は、PVL 群では脱血開始後 12 時間から、非 PVL 群では 4 時間から脱血前値に比較して有意に減少した($p<0.05$)。また、脱血前値から戻し輸血までの全経過において Ht 値, O_2 ct は PVL 群が低値を示した ($p<0.05$)。血漿 AVP 濃度は両群とも脱血開始後 20 分に最高値を示し、PVL 群が有意に高値であった($p<0.01$)。

その他の測定項目においては、実験の全経過において両群間に有意な差異を認めなかった。

急性脱血で誘導されるヒツジ胎生期 PVL の発症に関与する因子は、負荷時期における脳の発達レベル、誘導される全身性低血圧の程度、 O_2 ct のベースラインの 3 因子に集約され、Ht 値, base excess, 血漿 AVP 濃度はこれら 3 因子に付随する因子であると結論した。脳の発達レベルは易損傷性における本質的な因子、全身性低血圧は必須の trigger, 低酸素血症は増悪因子と位置づけられる。

公開発表に際し、副査の小林教授より、ヒツジ妊娠 113 日のヒトでの相当妊娠時期について、ヒツジとヒトとでの胎盤の相違について、母獣に低血圧を負荷した場合の胎仔血圧などへの影響について、脳重量の差と双胎との関係について、両群間での oxygen content の差の大きさについて、使用したヒツジにおける妊娠日数の正確性について、質問があった。また副査の藤本教授からは、双胎のうち慢性実験系を作製していない方の胎仔の検査データについて、PVL 発症予防の観点から、妊娠 30±2 週の妊婦管理のあり方について、さらに、妊娠 28 週以前の妊婦管理の今後のあり方について、ヒトの 1 絨毛膜性双胎と PVL 発症との関係からの PVL 発症予防の別の視点からの対策について、質問があった。次いで、主査の長嶋教授からは、日本と欧米での脳性麻痺の発症率の違いについて、ヒツジ胎仔 PVL 病変の周辺の出血所見について、質問があった。

いずれの質問に対しても、申請者は、対象胎仔のデータの統計学的解析結果、これまでの文献的知見、自身の臨床経験などをもとに概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、本研究の成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。