

学位論文

羊胎仔子宮内感染モデルにおける
胎仔心拍数細変動への影響

福島県立医科大学大学院医学研究科
高度医学研究者コース 産科婦人科学
経塚 標

要旨

目的

羊胎仔慢性実験モデルを用いて、Lipopolysaccharide(LPS) 子宮内投与による子宮内感染モデルを作成し、胎仔心拍数細変動(Variability)に与える影響を調べる事を目的とする。

材料および方法

慢性羊胎仔実験モデル 5 頭を用いた。顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)を術後 2 日、術後 3 日、術後 4 日、術後 5 日に胎児頸静脈に投与し、また術後 4 日、5 日それぞれの G-CSF 投与直後に、LPS を羊水腔に投与し子宮内感染モデルを作成した。Variability は Short term variability(STV)と Long term variability(LTV)に分類し、定量化し評価した。Variability の評価は、LPS 初回投与から 24 時間以内の経時的変化を解析した。また LPS2 回目投与後に子宮内胎仔死亡となった場合、子宮内胎仔死亡に至る 30 時間前からの variability の経時的変化を解析した。経時的評価の解析は Joinpoint regression を用いた。子宮内胎仔死亡後の絨毛羊膜、臍帯の病理学的評価を行い 6 段階 (0-5 点) にスコアリングした。

結果

全て 2 回目の LPS 投与後 15-28 時間以内に子宮内胎仔死亡となった。またすべての症例において重度の絨毛羊膜炎と臍帯炎を認めた(絨毛羊膜炎: 4.1 ± 0.4 、臍帯炎: 4.8 ± 0.2)。STV は LPS 初回投与の 17 時間から 24 時間にかけて減少傾向を示したが (APC:-5.5、 $p < 0.05$)、子宮内胎仔死亡となる 30 時間前からは直線的な増加傾向を示した (APC:2.79、 $p < 0.05$)。LTV は LPS 初回投与直後から投与後 11 時間 (APC:-6.3、 $p < 0.05$)、LPS 初回投与後 17 時間から 24 時間 (APC:-11.2、 $p < 0.05$) の 2 回減少傾向を示した。また子宮内胎仔死亡となる 11 時間前から 3 時間前にかけて一時的な増加傾向を示した (APC:12.39、 $p < 0.05$)。

結語

LPS 投与後の児の胎仔の状態悪化を伴わない急性期では STV、LTV とも減少傾向を示した。一方胎仔の状態悪化に伴い STV、LTV とも増加傾向を示した。特に STV は子宮内胎仔死亡となる 30 時間前より、直線的な増加傾向が見られた。

I. 緒言

周産期医療の大きな問題点の 1 つに、早産とそれに引き続く児の未熟性から出現する新生児合併症がある。早産は近年増加傾向となっており(1)、中でも絨毛膜羊膜炎(chorioamnionitis: CAM)に代表される子宮内感染は、早産や前期破水のリスク因子であり、特に CAM により出生した児は脳室周囲白質軟化症(periventricular leukomalacia: PVL)、慢性肺疾患(Chronic Lung Disease: CLD)、脳性麻痺(cerebral palsy: CP)と関連する(2, 3, 4)ため、子宮内感染を早期に発見し、分娩介入につなげる事は非常に重要と考えられる。しかし、現状ではどのような臨床所見をもって子宮内感染と判断し、分娩時期を決定すべきかのコンセンサスは得られていない。

一方、子宮内における胎児 well-being を評価する方法として胎児心拍数モニタリングがある。胎児心拍数モニタリングは 1960 年代に胎児の低酸素状態、胎児アシドーシスを評価し、またそれにより生じる新生児合併症を減少させる目的に用いられ(5)、現在は国内外の分娩取扱い施設において胎児 well-being を評価できる数少ない方法として広く普及している。

近年、分娩管理におけるこの胎児心拍数モニタリングの重要性は再認識され、本邦ではその評価法と管理指針が提言されている(6, 7)。一般的に胎児心拍数モニタリングでは①正常心拍数基線②一過性頻脈を認める③心拍数基線細変動(variability)が中等度④一過性徐脈を認めない、という所見がそろった場合「reassuring fetal heart rate pattern」と診断され、胎児アシドーシスが否定され、その信頼度は極めて高い(8)。一方、胎児心拍数モニタリングにおいて、胎児機能不全と判断され得る代表的な所見に、胎児 variability の減少がある。Variability の変化は特に重要視され、同様の徐脈所見であっても variability が減少する場合、1 ランクあげての嚴重な管理が要求されている(7)。胎児 variability は 1 分間に 2 サイクル以上の心拍数の変動であり(9, 10)、記録用紙上の所見をもとに肉眼的に判読される。胎児の心拍数の変化は星状神経節を介した交感神経作用による心拍数増加効果と迷走神経を介した副交感神経による心拍数減少効果の綱引きによりによって規定される(11, 12)。従って、心拍数の変化を示す variability は、生理的必要性に対して変化する自律神経系のバランスを反映しているため、胎児の状態を示す一指標と考えられる。しかし臨床上的 variability は、記録用紙上描出された心拍数の揺らぎの程度を、肉眼的に判断するため、その評価にあたっては客観性に課題がある。

現在まで、胎児心拍数モニタリング、胎児超音波による Biophysical profile などの胎児パラメータと子宮内感染の予知の関連については不明な点が多く

(13)、特に日常診療で広く用いられる胎児心拍数モニタリングにおいて、臨床上重要所見とされる variability が子宮内感染によりどのような経時的変化を呈するか調べた報告はほとんどない。これを調べるにあたり、ヒトにおいては倫理的問題、variability の客観性という方法論的な限界があるため、その解明には実験動物モデルを用いる必要がある。

本研究では羊胎仔慢性実験モデルを用いて、Lipopolysaccharide (LPS) を羊水腔に投与することにより人工的胎仔子宮内感染モデルを作成し(14)、variability を short term variability (STV) と long term variability (LTV) に分類し(15)、かつこれらを定量化し、LPS 投与から胎仔死亡に至るまでの胎仔 variability の経時的変化を調べることを目的とした。

2. 材料と方法

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 26036)

II-1 慢性羊胎仔実験モデルの作成 (図 1)

妊娠 111~120 日 (正常妊娠期間 145 日) のサフォーク種羊 (ジャパンラム北海道牧場、有限会社ジャパン・ラム、福山市) を使用した。

慢性実験モデルの作成は、麻酔前投薬に atropine sulfate (1mg/body)、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 (Precedex®) (Maruishi 社製) (3mg/kg/min) 静注を使用した (16)。

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し、さらに子宮を切開し胎仔頭のみを子宮外に露出し、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 程度の切開を加え、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 (Imamura 社：外径；1.8mm、内径；1.2mm) 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 (Imamura 社：外径；1.8mm、内径；1.2mm) 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。さらに、胎仔体幹の皮下 3 箇所心電図用電極 (先端ターミナル：Steel 製；5×5mm、リード線：Cooner 社製 Chatsworth, CA, USA) 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 (Imamura 社：外径；1.8mm、内径；1.2mm) 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。

母獣大腿動静脈内にもポリビニルカテーテル (Imamura 社：外径；1.8mm、内

径;1.2mm)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は圧トランスデューサ(DisposableTransducerKit, ModelDT-NN;Spectramed Medical Products Pre. 社製、Singapore)に接続し、PowerLab system (AD Instruments 社、USA)を用いて胎仔血圧、気管内圧を連続記録した。

手術後の感染予防として、LPSの投与を開始する前日の術後3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 sodium(Flumarin®) (Shionogi 社製) 1gを投与した。

II-2 実験手順

はじめに実験手順を図2に示す。手術後より子宮内胎仔死亡に至るまで、胎仔血圧・胎仔心拍数・胎仔心電図・胎仔気管内圧を連続測定・記録した。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。

子宮内感染モデルは、Watanabe(14)らの報告した実験モデルを一部参照した。顆粒球コロニー刺激因子:G-CSF(Neutrogin®)(中外製薬)50 μ gを生食2mlに溶解し術後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(*Escherichia coli* 055:B5; Sigma Chemical Co)40mgを生食10mlに溶解し、カテーテル経由で羊水腔に投与した。LPS初回投与直前、投与後2時間、投与後4時間、投与後12時間、投与後24時間、子宮内胎仔死亡となる15時間以内の計6時点の胎仔動脈血液ガス、胎仔血算、胎仔収縮期血圧を測定した。

胎仔子宮内胎児死亡後、胎仔の絨毛羊膜また臍帯を採取し、病理学的所見のスコアリング化により炎症の程度を評価した(14)。

II-3. 測定項目

(1) 測定項目

胎仔動脈血液ガス分析(pH, pO₂, pCO₂, BE:BaseExcess)、胎仔血算(WBC:白血球数、Hb:ヘモグロビン値、Plt:血小板数)、胎仔収縮期血圧:SBp、胎仔心拍数モニタリング(胎仔基線心拍数、胎仔一過性頻脈の出現回数、胎仔variability(STV/LTV))を測定した。胎仔心拍数モニタリングの項目である胎仔基線心拍数、胎仔一過性頻脈の出現回数、胎仔STV/LTVは1時間毎の値を算出した。

(2) 測定方法

1) 胎仔動脈血液ガス

胎仔動脈血液ガス分析値は、胎仔頸動脈からヘパリン加注射器で0.4ml採血し、Radiometer 社製 ALB 555 Blood Gas Analyzer System(Copenhagen, Denmark)を使用し、測定温度を子宮内胎仔温度と同じ38度に補正して測定した。測定はLPS

初回投与直前、投与後 2 時間、投与後 4 時間、投与後 12 時間、投与後 24 時間、また状態悪化時の所見として、子宮内胎仔死亡となる 15 時間以内の計 6 時点に行った。

2) 胎仔血算

胎仔の血算は株式会社 LSI メディエンスに依頼し測定した。WBC、Hb、Plt の測定はそれぞれフローサイトメトリー法、SLS ヘモグロビン法、シースフロー DC 検出法を用いた (Sysmex XT-2000iV、シスメックス®)。

測定は 1) と同時期に行った。

3) 胎仔収縮期血圧

胎仔収縮期血圧は各採血時点の直前の収縮期血圧 (mmHg) を代表値とした。動脈圧測定時は母獣が立位であることを確認し、血圧ラインの大気開放点と母獣の腹部の位置を同じ高さに調整しゼロ校正を行った。

4) 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仔死亡にいたるまで連続計測した。

① 胎仔基線心拍数 (bpm)

胎仔基線心拍数は HRV モジュールソフト (AD Instruments 社、USA) を用いて測定した。胎仔基線心拍数は、胎仔心拍数基線が 10 分以上安定している範囲内の心拍数を胎仔基線心拍数とした。

② 一過性頻脈の出現回数 (回/20min)

一過性頻脈の出現回数は①の方法で胎仔基線心拍数を得た範囲 20 分間において、胎仔心拍数が 15bpm 以上 15 秒以上持続した部位をカウントし (17)、その時間における一過性頻脈出現回数値とした。

③ STV、LTV (beat/100beat) の定量化

Variability の計測は、Power Lab System にて計測保存された羊胎仔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) へ取り込み定量化した。図 3 に variability 定量化の計算概念をしめす。得られた胎仔心拍信号の R-R 間隔を拍/分に変換し ($E_1, E_2, E_3 \dots, E_{20}$)、連続する 2 つの心拍間の差 ($E_n - E_{n-1}$) を求め、その差 (Sing of interval difference: d_{n-1}) が同一符号の場合は LTV に蓄積し、符号が異なれば STV に蓄積した (18)。得られた定量値は図 4 に示すように胎仔心拍数モニタリング、STV、LTV を同一ポリグラフ上に同時に表現した。100R-R 間隔ごとにそれぞれの variability 値をリセットした。図 5 に STV、LTV 算出のアルゴリズムを示す。1 心拍間の差が 25 拍/分以上であったときは、ノイズとして判断し自動的に LTV、STV の両チャンネルからキャンセルされ蓄積されないようにした。

STV/LTV の値は①の方法で胎児基線心拍数を得た範囲 20 分間において、10 回連続測定した STV、LTV の平均値をその時間における STV、LTV 値とした。

これらの方法により得られた胎児心拍数モニタリングの項目に対し、1 時間毎の推移を見る経時的評価を行った。LPS 投与による variability の変化は、初回 LPS 投与直前 24 時間内における 1 時間毎の STV、LTV の継時的変化パターンをコントロールとし、初回 LPS 投与による 24 時間の変化と、子宮内胎児死亡に至る過程の変化に分けて評価した。

a) 初回 LPS 投与による変化

胎児基線心拍数、一過性頻脈出現回数、STV、LTV は LPS 初回投与から 2 回目の LPS 投与直前までの 24 時間内の 1 時間毎の平均値のトレンドを評価した。

b) 子宮内胎児死亡に至るまでの変化

後述の結果に示すように子宮内胎児死亡は 2 回目の LPS 投与より 15-28 時間後に起こった。Variability の子宮内胎児死亡に至る直前の胎児心拍数モニタリングの変化をみるため、STV、LTV 値を子宮内胎児死亡時間から逆算した 30 時間前からの 1 時間毎の平均値のトレンドを評価した。

4) 病理学的評価による炎症のスコア化

子宮内胎児死亡を確認後、臍帯並びに絨毛羊膜を摘出し、10%ホルマリンに固定、ヘマトキシリン-エオジン染色により評価した。表 1 に示す如く、臍帯もしくは絨毛羊膜の炎症の程度は Salafia ら (19) の提唱した評価方法に Navaro (20) らの臍帯の壊死性臍帯炎を加味した 6 段階の評価方法により行った。

II-4. 統計解析

得られた成績の統計解析には統計解析ソフト SPSS®Statistics Version 22. (IBM 社、日本)を用いた。多群の比較は One way repeated measures ANOVA を用いた分散分析を行い、有意差の得られた場合に post-hoc test として Bonferoni 検定を行った。また縦断的評価のトレンドの解析は Joinpoint 解析 (Joinpoint Version 3.4.3 National Cancer Institute, 2010) を用いた。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、有意に変化した区間を検出した (21)。胎児動脈血液ガス、胎児血算、胎児血圧、病理学的スコアは平均値±標準誤差で表記し、胎児基線心拍数、胎児一過性頻脈、STV、LTV は 1 時間毎の値を平均値±標準偏差で標記した。p 値 0.05 未満をもって有意差ありとした。

Ⅲ 結果

妊娠 111～120 日（正常妊娠期間 145 日）のサフォーク種羊 5 頭を用いて研究を行った。

5 頭の実験羊はいずれも術後 5 日目の 2 回目の LPS 投与より 15-28 時間（平均 21.2 時間）以内に子宮内胎仔死亡となった。実験期間中に母獣の死亡は認めなかった。

胎仔状態悪化時として子宮内胎仔死亡 15 時間以内に行った採血は、各羊において子宮内胎仔死亡より 2-15 時間（平均 6.4 時間）前に行われた血液結果を用いた。

分娩後の胎仔の体重は 2390-3210g（平均 2862g）であった。

Ⅲ—1. 胎仔動脈血液ガス（表 2）

1) 胎仔動脈 pH

胎仔動脈 pH は、LPS 投与直前の Baseline-Control (7.34 ± 0.01)、投与 2 時間後 (7.35 ± 0.01)、4 時間後 (7.34 ± 0.01)、12 時間後 (7.32 ± 0.02)、24 時間後 (7.31 ± 0.03)、子宮内胎仔死亡 15 時間以内 (7.08 ± 0.08) であり、分散分析において有意差を認めたが、Bonferoni 検定において有意な点は検出されなかった。

2) 胎仔動脈 pCO_2 (mmHg)

胎仔動脈 pCO_2 は、LPS 投与直前の Baseline-Control (33.5 ± 2.6)、投与 2 時間後 (30.6 ± 3.5)、4 時間後 (30.8 ± 4.1)、12 時間後 (30.3 ± 5.0)、24 時間後 (30.0 ± 3.3)、子宮内胎仔死亡 15 時間以内 (35.5 ± 3.3) であり、分散分析において有意差は認めなかった。

3) 胎仔動脈 pO_2 (mmHg)

胎仔動脈 pO_2 は、LPS 投与直前の Baseline-Control (16.8 ± 1.3)、投与 2 時間後 (19.8 ± 3.8)、4 時間後 (19.3 ± 3.7)、12 時間後 (18.4 ± 2.8)、24 時間後 (17.6 ± 3.1)、子宮内胎仔死亡 15 時間以内 (16.1 ± 0.7) であり、分散分析において有意差は認めなかった。

4) 胎仔動脈 BE (mmol/L)

胎仔動脈 BE は、LPS 投与直前の Baseline-Control (-7.1 ± 1.4)、投与 2 時間後 (-6.7 ± 1.1)、4 時間後 (-8.4 ± 2.2)、12 時間後 (-9.0 ± 3.6)、24 時間後 (-13.2 ± 4.2)、子宮内胎仔死亡 15 時間以内 (-17.9 ± 2.8) であり、分散分析において有意差を認めたが、Bonferoni 検定において有意な点は検出されなかった。

Ⅲ—2. 胎仔血算（表 2）

1) 白血球数 (μl)

胎仔白血球数は、LPS 投与直前 (13800 ± 4963)、投与後 2 時間 (10620 ± 4614)、投与後 4 時間 (9040 ± 4607)、投与後 12 時間 (12040 ± 5447)、投与後 24 時間 (13580 ± 3501)、子宮内胎仔死亡 15 時間以内 (17220 ± 7777) であり、分散分析において有意差は認めなかった。

2) ヘモグロビン値 (g/dl)

胎仔ヘモグロビン値は、LPS 投与直前 (10.6 ± 0.7)、投与後 2 時間 (10.6 ± 0.8)、投与後 4 時間 (10.5 ± 0.9)、投与後 12 時間 (10.2 ± 0.7)、投与後 24 時間 (10.2 ± 0.9)、子宮内胎仔死亡 15 時間以内 (10.7 ± 0.9) であり、分散分析において有意差は認めなかった。

3) 血小板数 ($\times 10^4 / \mu\text{l}$)

胎仔血小板数は、LPS 投与直前 (29.6 ± 4.6)、投与後 2 時間 (30.0 ± 3.3)、投与後 4 時間 (28.2 ± 3.3)、投与後 12 時間 (31.1 ± 5.0)、投与後 24 時間 (32.8 ± 6.7)、子宮内胎仔死亡 15 時間以内 (21.9 ± 9.0) であり、分散分析にて有意差は認めなかった。

Ⅲ—3. 胎仔収縮期血圧 (mmHg)

胎仔収縮期血圧は、LPS 投与直前 (66.8 ± 6.9)、投与後 2 時間 (66.0 ± 7.4)、投与後 4 時間 (64.4 ± 5.8)、投与後 12 時間 (72.6 ± 7.2)、投与後 24 時間 (61.6 ± 6.9)、子宮内胎仔死亡 15 時間以内 (68.8 ± 7.7) であり、分散分析において有意差は認めなかった。

Ⅲ—4. 胎仔心拍数モニタリング

1) 胎仔基線心拍数 (beat/min)

LPS 初回投与後の 24 時間の胎仔基線心拍数の 1 時間毎の変化を図 6 に示す。Joinpoint 解析では変曲点 (Joinpoint) は検出されなかったが $\text{APC} : 0.29 (p < 0.05)$ であった。この事は LPS 投与開始から 24 時間まで、有意な胎仔心拍数の直線的な増加傾向を認めた事を意味する。

2) 一過性頻脈 (回/20min)

LPS 初回投与後の 24 時間の一過性頻脈の出現回数の、1 時間毎の変化を図 7 に示す。Joinpoint 解析では Joinpoint が 4 箇所検出された (LPS 投与 2 時間後、5 時間後、15 時間後、18 時間後)。そのうち LPS 投与後 18 時間から 24 時間にかけて APC が $-6.15 (p < 0.05)$ であり、この区間において有意な減少傾向を認めた。

3) STV (beat/100beat)

a) コントロール時期における変化

LPS 初回投与前 24 時間における STV の変化に Joinpoint は検出され

なかった(図 8)。また APC:0.15 であったが有意差は認めなかった($p>0.05$)。

b) 初回 LPS 投与による変化

STV におけるトレンド評価として Joinpoint 解析では Joinpoint が 2 箇所検出された(LPS 投与 14 時間後、17 時間後)。そのうち LPS 投与後 17 時間から 24 時間にかけて STV は有意な減少傾向を示した (APC:-5.5、 $p<0.05$) (図 9)

c) 子宮内胎仔死亡に至るまでの変化

子宮内胎仔死亡となる 30 時間前からの STV の変化における Joinpoint は検出されなかったが、APC : 2.79 ($p<0.05$) であった。この事は STV が子宮内胎仔死亡 30 時間前から、有意な直線的な増加傾向を認めた事を示唆する (図 10)。

4) LTV (beat/100beat)

a) コントロール時期における変化

LPS 初回投与前 24 時間における LTV の変化において Joinpoint が 1 箇所検出されたが、いずれの直線の APC に有意差は認めなかった(図 11)。

b) 初回 LPS 投与による変化

LTV におけるトレンドの評価として Joinpoint が 2 箇所検出された (LPS 投与 11 時間後、17 時間後)。そのうち LPS 投与直後から投与後 11 時間 (APC:-6.3、 $p<0.05$)、LPS 投与後 17 時間から 24 時間にかけて (APC : -11.2、 $p<0.05$) LTV は有意な減少傾向を示した (図 12)。

c) 子宮内胎仔死亡に至るまでの変化

LTV におけるトレンド評価として Joinpoint 解析では Joinpoint が 2 箇所検出された (子宮内胎仔死亡 11 時間前、3 時間前)。子宮内胎仔死亡となる 11 時間前から 3 時間前にかけて LTV は増加傾向を示した (APC:12.39, $p<0.05$) (図 13)。

III—5. 臍帯・絨毛羊膜病理結果

臍帯の炎症スコアは 4.1 ± 0.4 、絨毛羊膜の炎症スコアは 4.8 ± 0.2 といずれも高度な炎症所見を認めた(図 14)。

IV 考察

慢性羊胎仔実験モデルを用いて、LPS を羊水腔に投与することにより人工的子宮内感染モデルを作成し、胎仔心拍数モニタリングの変化を観察した。LPS 初回投与から子宮内胎仔死亡に至るまでに胎仔血算、胎仔血圧では有意な変化は認めなかったが、胎仔血液ガスにおいては、 pO_2 、 pCO_2 の有意な変化を伴わずに pH、BE の有意な変化を認めた。Joinpoint 解析を用いて LPS 投与後の胎仔心拍

数モニタリングの継時的な評価を行った場合、胎仔心拍数はLPS 初回投与後 24 時間通して有意な増加傾向を認め、一過性頻脈は初回 LPS 投与後 18-24 時間の間に有意な減少傾向を示した。Variability に着目すると、コントロールとした LPS 投与直前の 24 時間では STV、LTV とも有意な変動パターンを示さなかったが、STV、LTV ともに初回 LPS を投与した 24 時間以内では減少傾向を示す期間を認めた。しかし、ともに減少傾向を示した STV、LTV は子宮内胎仔死亡に向かうに伴い、増加傾向を示す箇所を認め、特に STV においては子宮内胎仔死亡となる 30 時間前より直線的な増加傾向を示した。

今回我々の研究を遂行するには、胎仔を子宮内で生理的状态を保つことのできる実験モデルが必要であり、そのため妊娠動物を麻酔・手術後に十分な回復を待ち、それらの影響が取れた状態で連続観察でき、かつ、目的とした実験が可能であるのが慢性動物実験モデルを用いた。羊胎子慢性実験モデルは母獣、胎仔・子宮の大きさ、手術や感染などのストレスに対する強さ、扱いやすさ、価格などの観点から、1970 年代より広く慢性動物実験に用いられてきた方法である(22)。当実験は LPS の初回投与まで 4 日の術後期間をおいており、胎仔が生理的状态に回復するまで十分な期間が設けられていると考える(23)。

今回子宮内感染モデルを作成するにあたり一部 Watanabe(14)の子宮内感染モデルを参照した。当実験では LPS 投与量、投与回数で異なる点はあるが、一回あたり LPS を 2 倍の投与量としたこと、投与回数も 2 回投与している。また病理学的に、臍帯また絨毛膜羊膜ともに高度の炎症所見を伴っていたことから、今回の実験モデルは、子宮内感染モデルと考えることができる。また今回の実験モデルにおいて、子宮内胎仔死亡に至る経過の中で、有意な pO_2 、 pCO_2 の変化を伴わない、有意な pH、BE の変化を認めた。このことは今回の実験モデルによる胎仔の状態悪化は、胎仔の低酸素状態を介さず、子宮内感染状態による直接的影響を示唆したものとする。

臨床的に variability は胎児の健康状態を示す重要な指標となっている(24)。現在ヒトにおける胎児心拍数の variability を分類する方法としては、日本産婦人科学会は細変動を振幅の大きさによって、1. 細変動消失 (absence: 肉眼的に認めない)、2. 細変動減少 (minimal: 5bpm 以下)、3. 細変動中等度 (moderate: 6~25bpm)、4. 細変動増加 (marked: 26bpm 以上) の 4 段階に分類している(25)が、これは臨床上記録された心拍数の曲線の振幅に注目し分類したものであり、臨床的な判断の根拠としては有益なものであるが、客観性という点では課題があった。これらを解決するために今回 variability の定量化することを得られたデータに客観性と再現性を持たせている。

Variability は胎児心電図から得られた R-R 間隔から得られた 1 拍ごとの心拍数の変化を表す STV と、STV より変化が遅く 1 分間に 2-6 回の比較的穏やか

な胎児心拍数の変動を表す LTV に分類される (26)。STV は QRS 波を抽出する電気生理学的方法によりのみ求められるため、現在広く用いられている母体腹壁からの超音波ドップラー法による自己相関法を用いて記述される胎児心拍数モニタリングでは不可能な評価項目とされている。今回の方法で得られた STV は 1 拍ごとのわずかな心拍数の変化を半定量的に表現していることとなる (26)。一方、今回の方法で得られた LTV は 1 分間 3-6 サイクルで生じる心拍数パターン上の揺れを表現するため、通常ヒト胎児分娩モニタリング上で評価する肉眼的な variability に相当する (27)。

Variability の定量化に関しては様々な数学的手法を用いた試みがされてきたが、今回の方法で得られた STV、LTV の定量値は、臨床的な胎児 well-being 判定に有用である事が統計的に示されている (28)。それゆえ今回実験動物を用いて、電気生理学的により得られた STV の定量値、もしくはヒトにおいてドップラー法で得られた variability と同等の意味をもつ LTV の定量値を用いて、その変化を評価した今回の研究結果は、今後新たなヒト胎児の子宮内評価方法となりうるため貴重な報告と考える。

胎児における variability は、中枢神経、特に迷走神経の機能的な表現と考えられており (12)、低酸素状態および acidosis によって胎児中枢神経が抑制された状態で variability は減少すると言われている (29, 30)。それゆえ、児の予後不良例をいかに減少させる事を目的とする通常の出産管理では、variability に関しては「減少」もしくは「消失」という事象に目が向けられてきた。しかし近年、分娩時の児頭血液ガスと power spectrum で観察された variability の関連を調べた臨床研究において、pH 低値群 (pH: 7.10-7.20) では variability は一過性に増加し、さらに pH < 7.10 に低下すると variability が減少するという報告 (31) や、早産により PVL となった児の出産前 1-3 時間前の周波数分析により得られた variability に増加を認めた (32) という、variability の「増加」に着目した報告がされている。これらの報告は児の状態が悪化する過程で、減少のみに着目されていた variability が、一過性に増加する時期があることを推察させるものである。今回の我々の研究において、胎児死亡前に観察された variability の増加現象は、ヒト臨床上報告された、児の状態の悪化に伴う variability の増加現象を、動物実験モデルを用いて観察していた可能性がある。

生体が高度な炎症状態のストレスにさらされた場合、副交感神経物質によるサイトカイン産生抑制により、臓器保護作用が働く (33)。それゆえ、今回、胎児死亡に至るまでにみとめた STV、LTV の増加現象は、胎児の状態悪化に伴う副交感神経作用による、胎児の臓器保護作用を観察していた可能性がある。

一方、初回 LPS 投与 24 時間以内では STV、LTV とも減少傾向を示す期間を認め

た。Variability の調節において交感神経が優位に作用した場合、variability が減少する(12)。LPS 投与による急性期中枢神経系の反応に関して、交感神経作用を介したサイトカイン産生の報告がある(34)。当実験で得られた初回 LPS 投与後の STV、LTV の減少は、胎児基線心拍数の増加傾向を伴っており、LPS 投与直後は子宮内胎児死亡となる直前とは逆に、交感神経が優位に機能していた可能性がある。

これらの結果により、今回子宮内感染モデルを用いた STV、LTV の減少傾向、またその後の増加傾向という変化は、いずれも胎児の、急性期においては交感神経作用、児の状態悪化時期においては副交感神経作用という、中枢神経系を介した生体防御反応を観察した可能性がある。従来、低酸素状態やアシドーシス時に出現する variability の‘減少’に臨床的な重きが置かれていたが、今回の結果より、variability の‘増加’にも臨床的意義がある可能性が示唆された。今後はこれらの現象を証明するために、胎児の生化学的評価や、副交感神経遮断薬を用いた変化を観察する、追加研究が必要と思われる。

今回得られた現象を実地の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、LTV と同等の意味をなす、ヒト胎児心拍数細変動の変化を捉えることで子宮内における胎児感染を早期に指摘できる可能性が示唆された。さらに、電気的生理学的に得られる STV を併用する事により、子宮内感染によるそれら児の状態悪化傾向を早期に指摘できる可能性が示唆された。

V 結語

子宮内感染モデルを用いた動物実験において、LPS 初回投与による急性期では STV、LTV は減少傾向を示した。一方、LPS2 回目投与による、児の状態悪化に伴い STV、LTV は増加傾向を示した。

VI 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導いただいた福島県立医科大学産科婦人科学講座 藤森敬也教授に深く感謝いたします。

本研究審査にあたり、多くのご助言とご指導を賜りました小児科学講座 細矢光亮教授、細胞統合生理学講座 勝田新一郎先生、心臓血管外科学講座 若松大樹先生に深謝申し上げます。

また、多岐にわたりご援助・ご協力を頂いた福島県立医科大学産科婦人科学講座 野村泰久先生、安田俊先生、平岩幹先生、福島県立医科大学病理学講座千葉英樹教授に厚く御礼申し上げます。

図 1 手術後胎仔の模式図

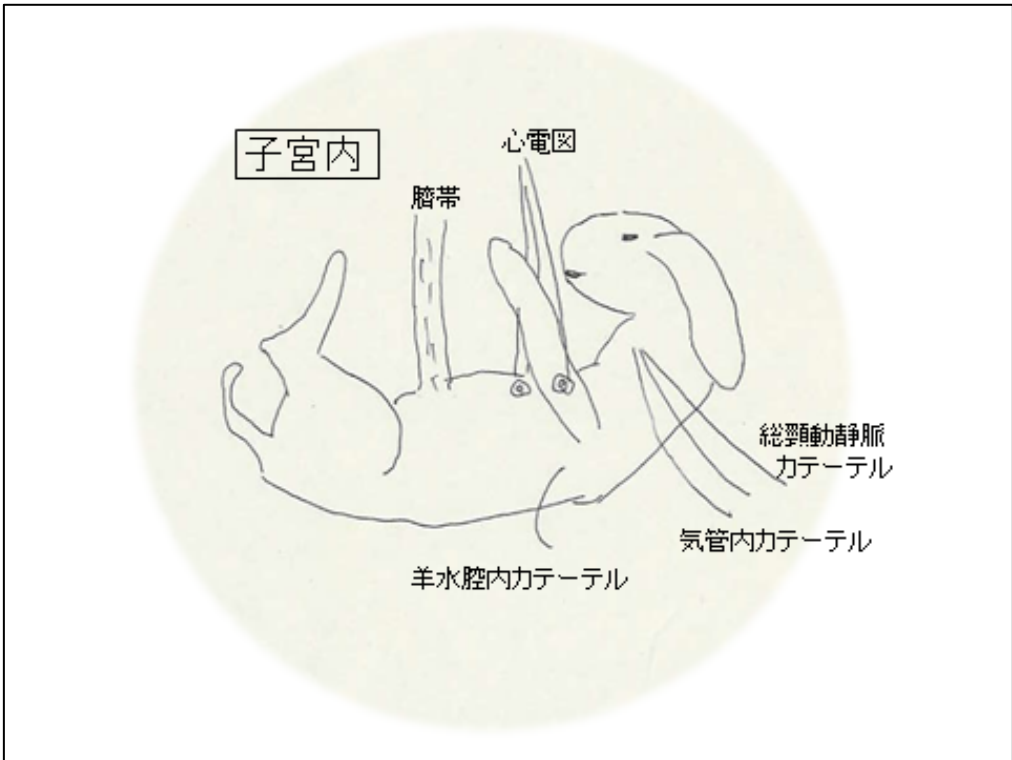


図 2 実験プロトコール

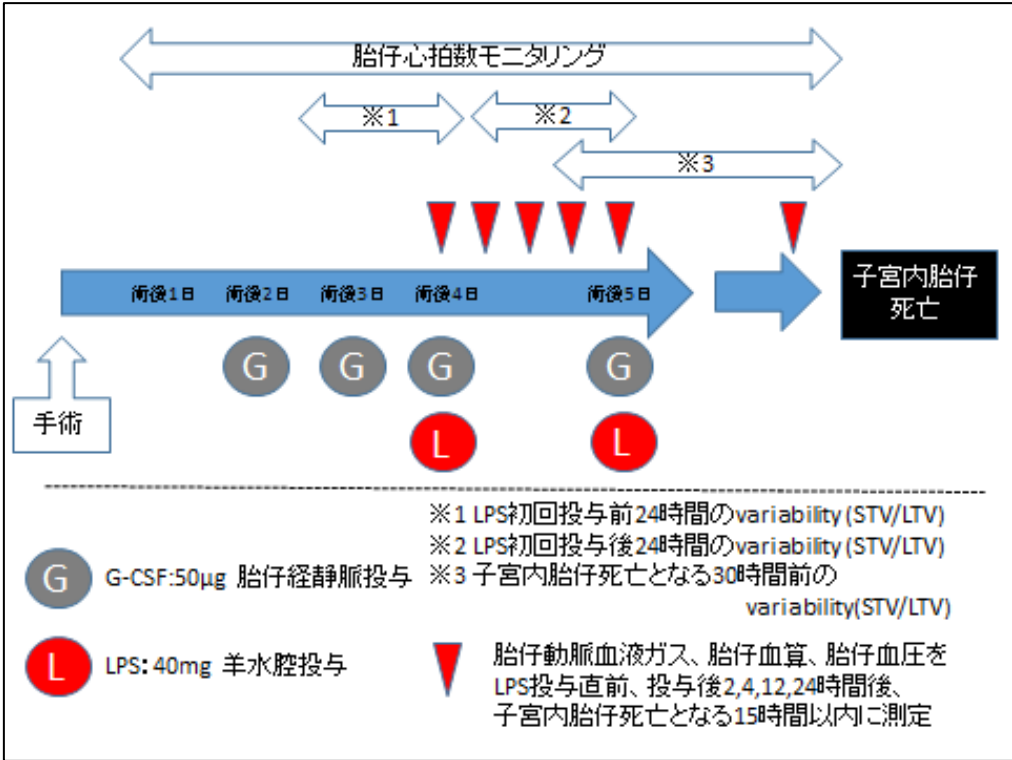


図 3 Variability 演算器による計算方法

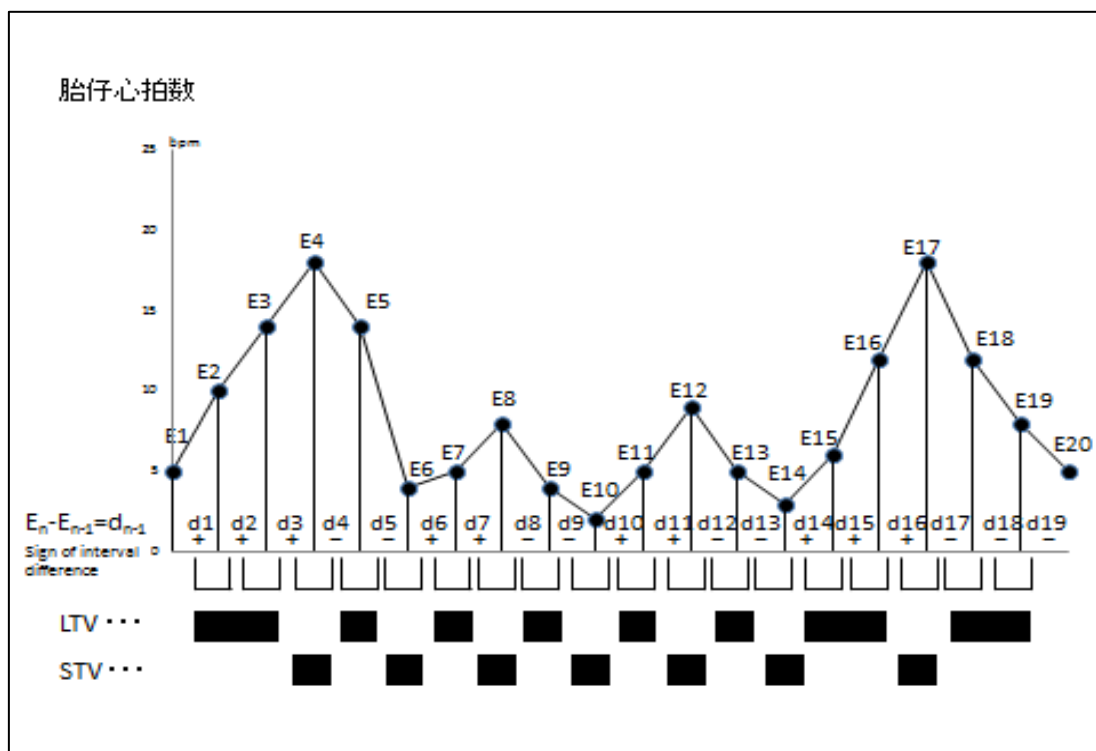
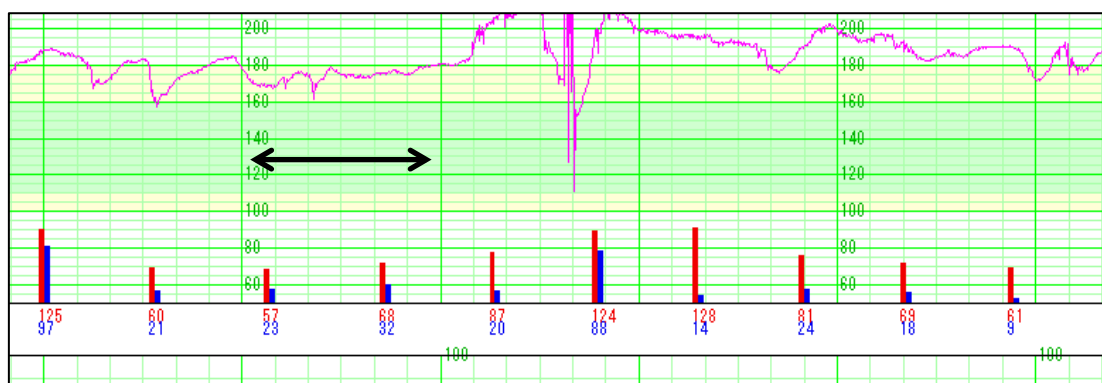


図 4 動物データ表示・収録装置 ATM1308 に記録された所見



心拍数(紫線, beat/min)と Variability(赤: STV, 青: LTV, beat/100beat)が同一ポリグラフ上に表現されている。

矢印で示した区間は 1 分間

図 5 STV/LTV の算出のアルゴリズム

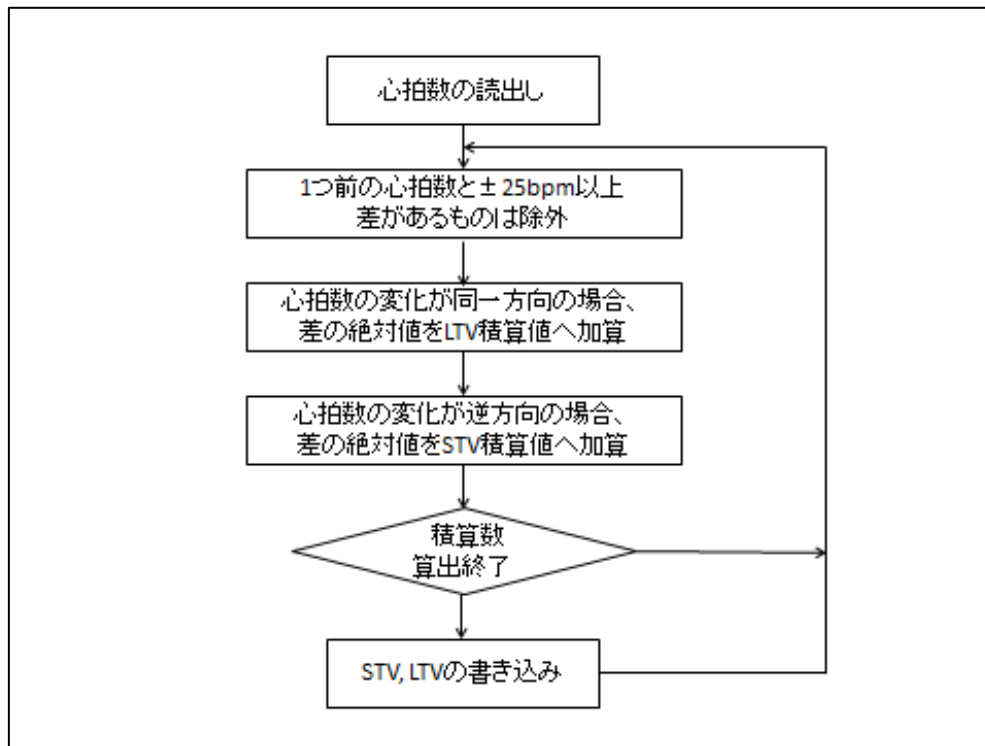
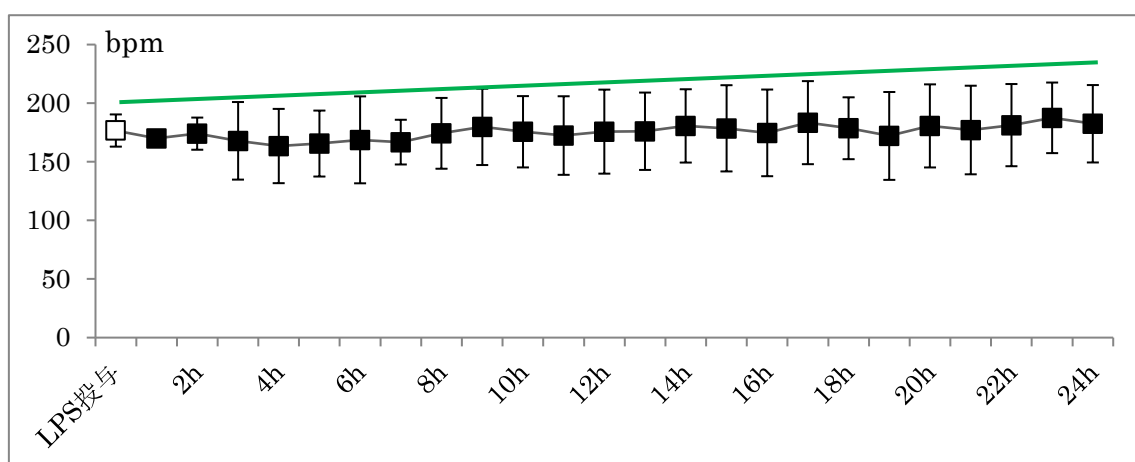
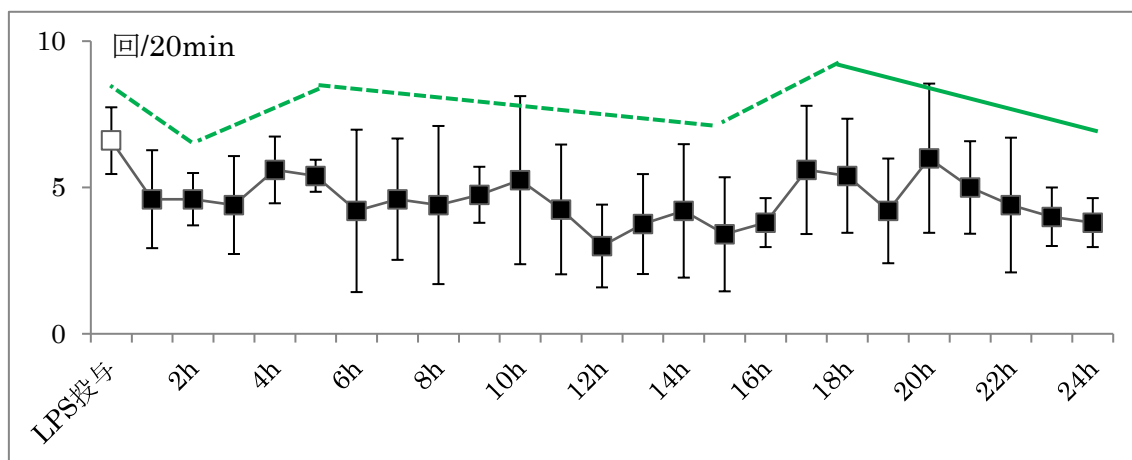


図 6 LPS 投与 24 時間以内の胎児心拍数(bpm)の経時的変化



緑実線 APC:0.29 (p<0.05)

図 7 LPS 投与後 24 時間以内の一過性頻脈(回/20min)の経時的変化



緑点線 APC(投与直前-2 時間後):-16.3 ($p>0.05$)

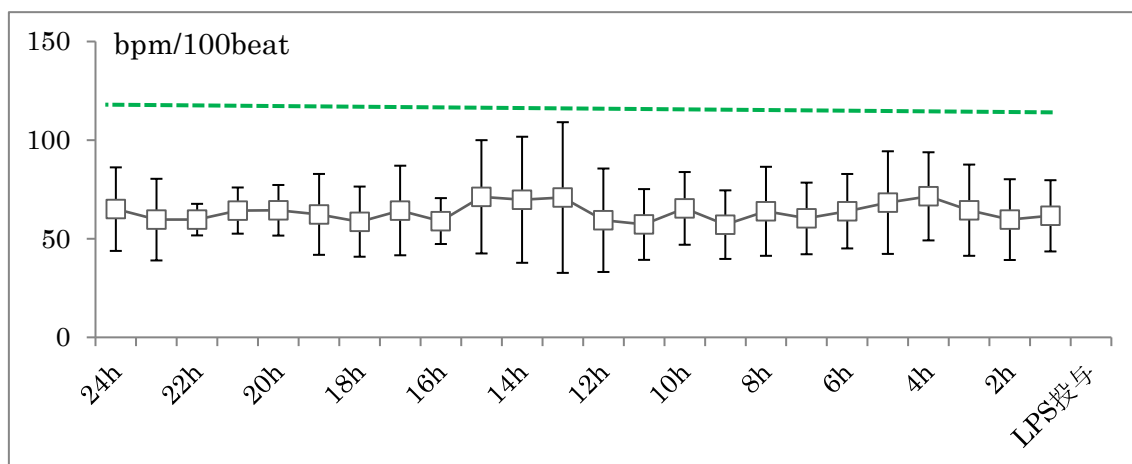
緑点線 APC(2 時間後-5 時間後):6.37 ($p>0.05$)

緑点線 APC(5 時間後-15 時間後):-4.64 ($p>0.05$)

緑点線 APC(15 時間後-18 時間後):18.3 ($p>0.05$)

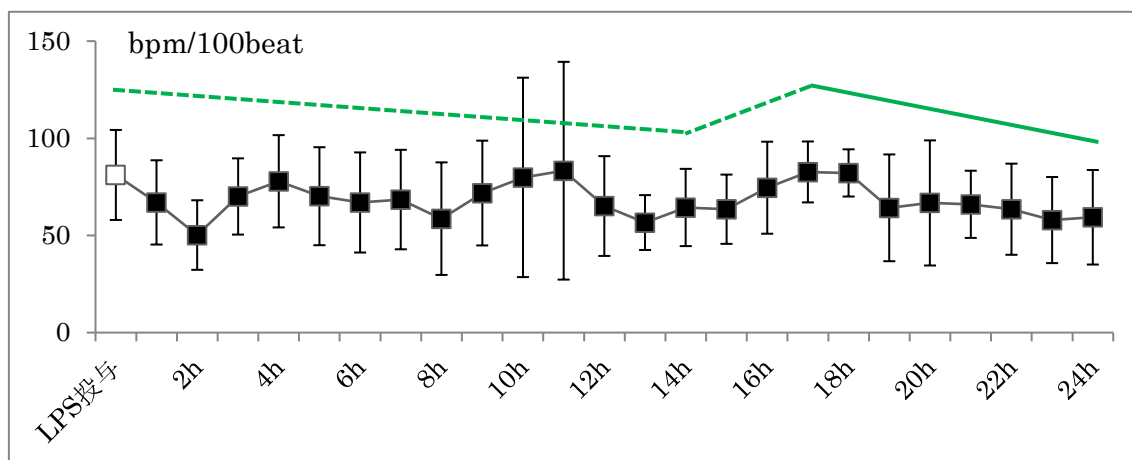
緑実線 APC(18 時間後-24 時間後):-6.15 ($p<0.05$)

図 8 LPS 初回投与前 24 時間における STV(beat/100beat)の経時的変化



緑点線 APC:0.15 ($p>0.05$)

図 9 LPS 投与後 24 時間以内の STV(beat/100beat)の経時的変化

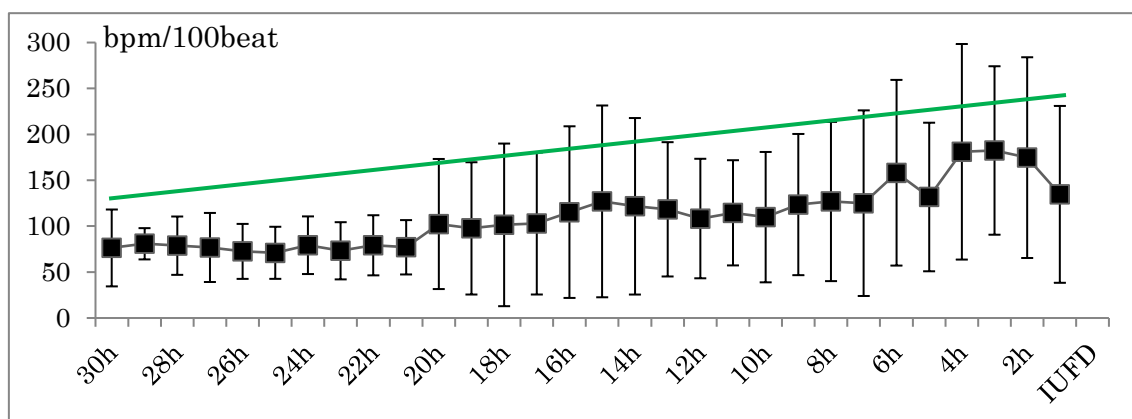


緑点線 APC(投与直前-14 時間後):-1.19($p>0.05$)

緑点線 APC(14 時間後-17 時間後):11.0 ($p>0.05$)

緑実線 APC(17 時間後-24 時間後):-5.5 ($p<0.05$)

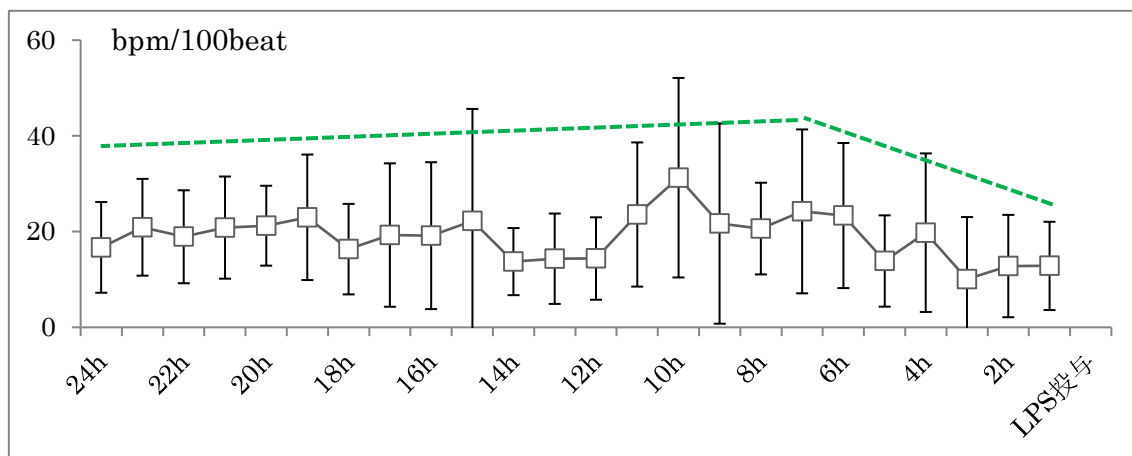
図 10 子宮内胎仔死亡となる 30 時間前からの STV(beat/100beat)の経時的変化



緑実線 APC:2.79 ($p<0.05$)

IUFD: Intra Uterine Fetal Death

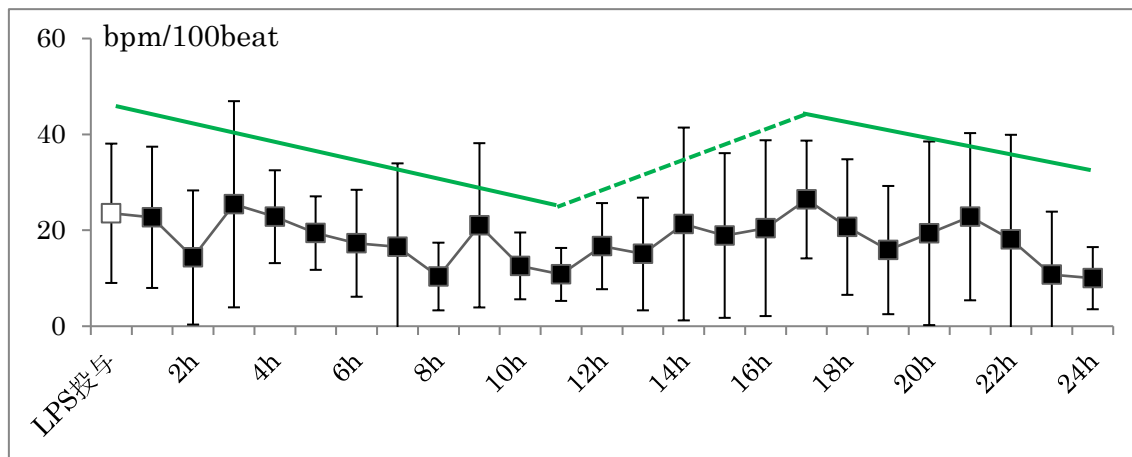
図 11 LPS 初回投与前 24 時間における LTV(beat/100beat)の経時的変化



緑点線 APC(LPS 投与 24 時間前-7 時間前):0.92 ($p>0.05$)

緑点線 APC(LPS 投与 7 時間前-1 時間前):-11.17($p>0.05$)

図 12 LPS 投与後 24 時間以内の LTV(beat/100beat)の経時的変化

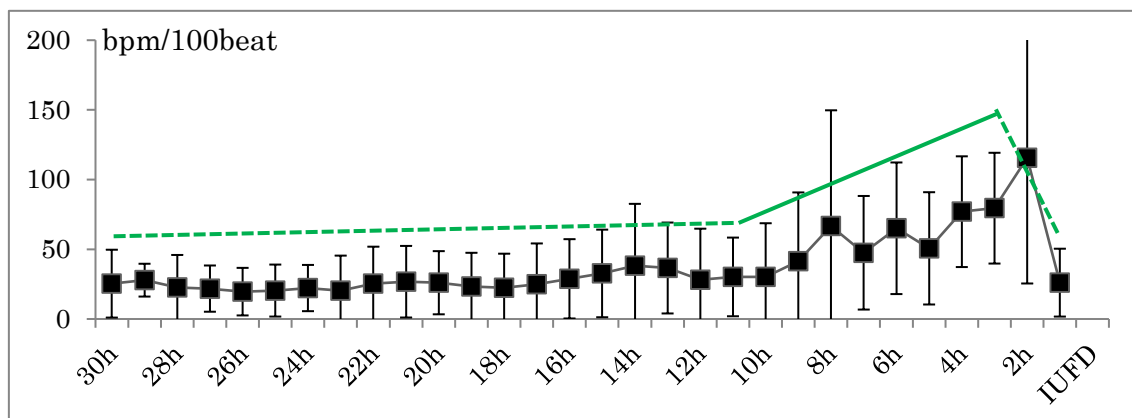


緑実線 APC(投与直前-11 時間後):-6.3 ($p<0.05$)

緑点線 APC(11 時間後-17 時間後):12.8 ($p>0.05$)

緑実線 APC(17 時間後-24 時間後):-11.2 ($p<0.05$)

図 13 子宮内胎児死亡となる 30 時間前からの LTV(beat/100beat)の経時的変化



緑点線 APC(死亡直前 30 時間前-11 時間前):1.38 ($p>0.05$)

緑実線 APC(死亡直前 11 時間前-3 時間前):12.4 ($p<0.05$)

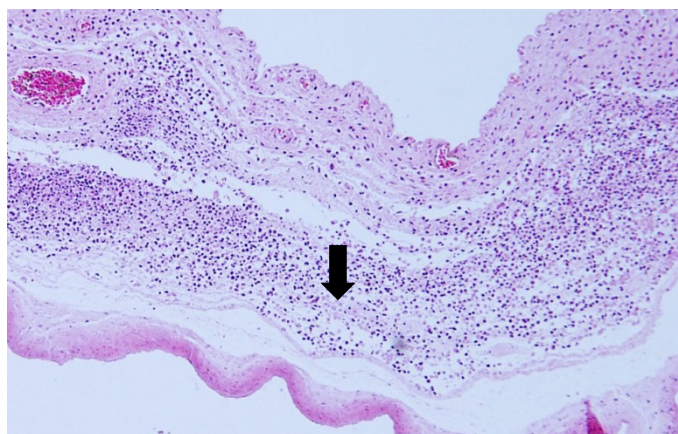
緑点線 APC(死亡直前 3 時間前-子宮内胎児死亡):-45.0 ($p>0.05$)

IUD: Intra Uterine Fetal Death

図 14 絨毛羊膜と臍帯の炎症スコア

Score for umbilical cord	4.1 ± 0.4
Score for fetal membranes	4.8 ± 0.2

A. 臍帯の炎症スコアと絨毛羊膜の炎症スコア



B. 絨毛羊膜の病理所見 矢印の部位に炎症細胞の浸潤を認める

表 1

Inflammatory scoring system for umbilical cord and fetal membrane

Score for umbilical cord

- 0= No focus of PMNL(Polymorphonuclear leukocyte) in the umbilical cord
- 1= PMNL within the inner third of the umbilical vein wall
- 2= PMNL within the inner third of at least two umbilical vessel walls
- 3= PMNL in the perivascular Wharton's Jelly
- 4= Panvasculitis and funisitis extending deep into the Wharton's jelly
- 5= Necrotizing funisitis

Score for fetal membranes (amnion and chorion-decidua)

- 0= No focus of PMNL in the amnion and chorion-decidua
- 1= One focus of at least five PMNLs
- 2= More than one focus of score1 inflammation or one focus of five to 20 PMNLs
- 3= Multiple and/or confluent foci of score 2
- 4= Diffuse and dense acute inflammation
- 5= Subacute or chronic inflammation with necrotic chang

表 2 LPS 投与による胎仔動脈血液ガスと胎仔血算の変化

	Lipopolysaccharide					
	投与直前	投与後 2 時間	投与後 4 時間	投与後 12 時間	投与後 24 時間	IUFD15 時間以内
pH [※]	7.34±0.01	7.35±0.01	7.34±0.01	7.32±0.02	7.31±0.03	7.08±0.08
pCO ₂ (mmHg)	33.5±2.6	30.6±3.5	30.8±4.1	30.3±5.0	30.0±3.3	35.5±3.3
pO ₂ (mmHg)	16.8±1.3	19.8±3.8	19.3±3.7	18.4±2.8	17.6±3.1	16.1±0.7
BE [※] (mmol/L)	-7.1±1.4	-6.7±1.1	-8.4±2.2	-9.0±3.6	-13.2±4.2	-17.9±2.8
WBC (/μl)	13800±4963	10620±4614	9040±4607	12040±5447	13580±3501	17220±7777
Hb (g/dl)	10.6±0.7	10.6±0.8	10.5±0.9	10.2±0.7	10.2±0.9	10.7±0.9
Plt (×10 ⁴ /μl)	29.6±4.6	30.0±3.3	28.2±3.3	31.1±5.0	32.8±6.7	21.9±9.0
SBp (mmHg)	66.8±6.9	66.0±7.4	64.4±5.8	72.6±7.2	61.6±6.9	68.8±7.7

※ P<0.05

IUFD: Intra Uterine Fetal Death

参考文献

- 1) Shennan AH, Bewlwey S. Why should preterm birth be rising? *BMJ*. 332:924-5, 2006.
- 2) Wu YW, Colford JM Jr. Chorioamnionitis as a risk factor for cerebral palsy. A meta-analysis. *JAMA*. 284: 1417-24, 2000.
- 3) Willoughby RE Jr, Nelson KB. Chorioamnionitis and brain injury. *Clin Perinatol*. 29: 603-21, 2002.
- 4) Jobe AH. Antenatal factors and the development of bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatal*. 8:9-17, 2003.
- 5) Hon EH. The electronic evaluation of the fetal heart rate: preliminary report. *Am J Obstet Gynecol*. 75:1215-30, 1958.
- 6) 周産期委員会提言 日本産婦人科雑誌 2010 ; 62 : 2068
- 7) 産科ガイドライン 2014 日本産婦人科学会 CQ411「胎児心拍数陣痛図の評価法とその対応は？」
- 8) Freeman RK. Problems with intrapartum fetal heart rate monitoring interpretation and patient management. *Obstet Gynecol*. 100: 813-826, 2002.
- 9) 胎児心拍数図の用語及び定義検討小委員会報告(日本産科婦人科学会周産期委員会報告：委員長：佐藤章). *日本産科婦人科学会雑誌*. 55: 1205-16, 2003.

- 10) NICHD Research Planning Workshop. Electronic fetal heart rate monitoring: Research guidelines for interpretation. *Am J Obstet Gynecol.* 177: 1385-90, 1997.
- 11) Papaioannou VE, Verkerk AO, Amin AS, de Bakker JM. Intracardiac origin of heart rate variability, pacemaker funny current and their possible association with critical illness. *Curr Cardiol Rev* 9: 82–96, 2013.
- 12) Dalton KJ, Dawes GS, Patrick JE. The autonomic nervous system and fetal heart rate variability. *Am J Obstet Gynecol.* 146: 456-62, 1983.
- 13) Salafia,CM, Mangam HE, Weigl CA, Foye GJ, Silberman L. Abnormal fetal heart rate patterns and placental inflammation. *Am J Obstet Gynecol.* 160: 140-7, 1989.
- 14) Watanabe T, Matusda T, Hanita T, Okuyama K, Cho K, Kobayashi K, et al. Induction of necrotizing funisitis by fetal administration of intravenous granulocyte-colony stimulating factor and intra-amniotic endotoxin in premature fetal sheep. *Pediatr Res.* 62:670-3, 2007.
- 15) Ikenoue T, Martin CB Jr, Murata Y, Ettinger BB, Lu PS. Effect of acute hypoxemia and respiratory acidosis on the fetal heart rate in monkeys. *Am J Obstet Gynecol.* 141:797-806, 1981.

- 16) Uemura K, Shimazutsu K, McClaine RJ, McClaine DJ, Manson RJ, White WD, et al. Maternal and preterm fetal sheep responses to dexmedetomidine. *Int J Obstet Anesth.* 21:339-47, 2012.
- 17) Macones GA, Hankins GD, Spong CY, Hauth J, Moore T. The 2008 National Institute of Child Health and Human Development workshop report on electronic fetal monitoring: update on definitions, interpretation, and research guidelines. *J Obstet, Gynecol Neonatal Nur* 37:510-5, 2008.
- 18) Huey JR, Paul RH, Hadjiev AA, Jilek J, Hon EH. Fetal heart rate variability: an approach to automated assessment. *Am J Obstet Gynecol.* 134: 691-4, 1979.
- 19) Salafia CM, Weigl C, Silberman L. The prevalence and distribution of acute placental inflammation in uncomplicated term pregnancies. *Obstet Gynecol.* 73:383-9, 1989.
- 20) Navarro C, Blanc WA. Subacute necrotizing funisitis. *J Pediatr.* 85:689-97, 1974.
- 21) Kim HJ, Fay MP, Feuer EJ, Midthune DN. Permutation tests for joinpoint regression with applications to cancer rates. *Statist Medicine.* 19:335-51, 2000.

- 22) Dawes GS, Fox HE, Leduc BM, Liggins GC, Richards RT. Respiratory movements and rapid eye movement sleep in the foetal lamb. *J Physiol.* 220:119-43, 1972.
- 23) Rose JC, Macdonald AA, Heymann MA, Rudolph AM: Developmental aspects of the pituitary-adrenal axis response to hemorrhagic stress in lamb fetuses. *J Clin Invest* 61: 424-32, 1978.
- 24) Parer JT, Ikeda T. A framework for standardized management of intrapartum fetal heart rate patterns. *Am J Obstet Gynecol* 197: 26 e1–e6, 2007.
- 25) 日本産婦人科学会:胎児心拍数図に関する用語・定義(改訂案).日産婦誌 54:4(Ⅲ)(Guideline),2002
- 26) Zanini B, Paul RH, Huey JR. Intrapartum fetal heart rate: correlation with scalp pH in the preterm fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 136: 43-7, 1980.
- 27) Freeman RK, Garite TH, Nageotte MP. Fetal Heart Rate Monitoring, 3rd ed. Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins, 2003.
- 28) Parer WJ, Parer JT, Holbrook RH, Block BS. Validity of mathematical methods of quantitating fetal heart rate variability. *Am J Obstet Gynecol.* 153:402-9, 1985.

- 29) Paul RH, Suidan AK, Yeh S, Schifrin BS, Hon EH. Clinical fetal monitoring VII, The evaluation and significance of intrapartum baseline FHR variability. *Am J Obstet Gynecol.* 123:206-10, 1975.
- 30) Modanlou HD, Murata Y. Sinusoidal heart rate pattern: Reappraisal of its definition and clinical significance. *J Obstet Gynaecol Res.*30:169-80, 2004.
- 31) Siira SM, Ojala TH, Vahiberg TJ, Rosen KG, Ekholm EM. Do spectral bands of fetal heart rate variability associate with concomitant fetal scalp pH? *Early Hum Dev.* 89:739-42, 2013.
- 32) Kurahashi H, Okumura A, Kubota T, Kidokoro H, Maruyama K, Hayakawa M, et al. Increased fetal heart rate variability in periventricular leukomalacia. *Brain dev.* 92:51-5, 2016.
- 33) Tracey KJ. Physiology and immunology of the cholinergic anti-inflammatory pathway. *J clinical invest.* 117: 289-96, 2007.
- 34) Martelli D, Yao ST, McKinley MJ, McAllen RM. Reflex control of inflammation by sympathetic nerves, not the vagus. *J Physiol.* 592: 1677-86, 2014.