

小児外科の現状と展望：特に新生児外科と小児臓器移植について

田口, 智章
九州大学大学院医学研究院小児外科学分野

<https://doi.org/10.15017/18470>

出版情報：福岡醫學雑誌. 97 (4), pp.109-116, 2006-04-25. 福岡医学会
バージョン：
権利関係：



総 説

小児外科の現状と展望

—特に新生児外科と小児臓器移植について—

九州大学大学院医学研究院 小児外科学分野

田 口 智 章

はじめに

小児外科の近年の進歩はめざましく、特に新生児外科の分野では、以前はその国の医療レベルを反映するとまで言われ、小児外科医がその救命に骨身を削ってきた「食道閉鎖症」の死亡率が著しく低下してきた。小児外科学会の全国集計によると1973年では死亡率が約55%であったのが、1983年では30%、1993年には20%、そして2003年では12.3%まで低下し、生存するのが当たり前の病気になってきた¹⁾。九州大学小児外科では1990年以後の食道閉鎖症は重症染色体異常を合併した1例を除き、全例生存し元気に成育している。九州大学における新生児外科疾患の疾患別死亡率の推移を経時的にみると(図1)、症例全体での死亡率は経年的に低下し、2000年代では新生児外科症例全体での死亡率は10%を切った。しかし、疾患別にみると横隔膜ヘルニアと消化管穿孔の死亡率がまだ高い。これは横隔膜ヘルニアでは出生前に診断される重症例が治療の土俵に上ってきたためである。出生前に超音波検査にて診断される横隔膜ヘルニアは左にあるべき心臓が右に変位していることで発見されることが多く、肝臓や脾臓が胸腔内に脱出している。つまり胸腔内に脱出している臓器のボリュームが大きいため、肺が極端に小さく生存が困難な症例が多い。また消化管穿孔は1000g未満の超低出生体重児が救命できるようになり、このような症例で消化管穿孔をおこす場合が多くなったためである。容易に敗血症によるショック状態となり救命困難な症例も多い。全身的な循環呼吸管理を最優先し手術侵襲は腹腔ドレナージのみの最小限にとどめるのが救命率をあげるポイントと考えられる。新生児外科の症例は出生率の低下にもかかわらず増加傾向にある。九州大学では特に周産母子センター開設を機に症例が増加している(図2)。

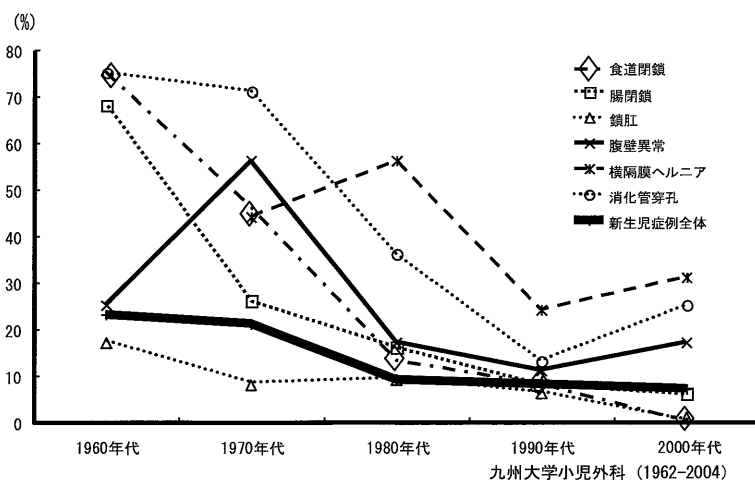


図1 新生児外科主要6疾患の死亡率の推移

Tomoaki TAGUCHI

Department of Pediatric Surgery, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Current Status and Future in Pediatric Surgery—Neonatal Surgery and Pediatric Organ Transplantation—

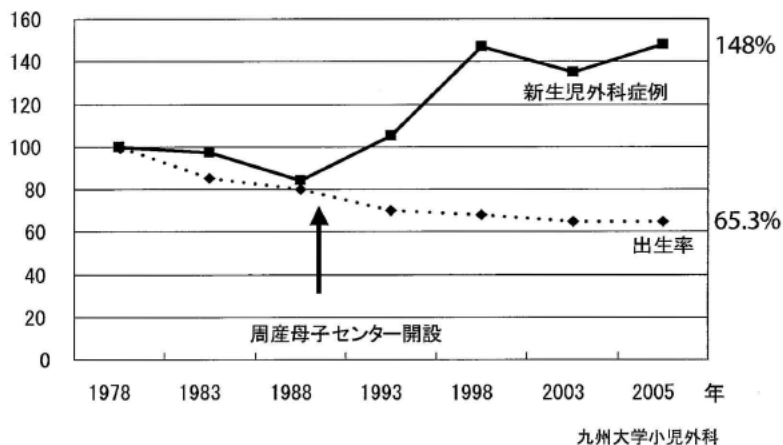


図 2 出生率と新生児外科症例数

小児の臓器移植では、肝臓移植の進歩により救命困難であった胆道閉鎖症の末期の肝硬変の患者が、食道静脈瘤の破裂や腹水でおなかがパンパンに張り肝不全でなくなっていたのが、元気に退院できるようになった。また劇症肝炎で脳症に陥り意識不明になった患児が、以前では血漿交換しか手の打ちようがなく、血漿交換がはじまると「もうだめか」であったのが、移植により普通の生活に戻れるようになった。まさに劇的な治療法である。小腸移植も小児に多い短腸症候群の根治術として欧米では 1000 例以上に行われている。

本稿では、新生児外科疾患のうち、まだ救命率の低い「先天性横隔膜ヘルニア」、さらに「小児の肝臓移植、小腸移植」について、我々の経験を中心に、現状と今後の展望について述べる。

1. 先天性横隔膜ヘルニア

先天性横隔膜ヘルニアは、胎児期から横隔膜に大きな穴があいているために、腹腔内臓器が胸腔内に脱出し、そのために肺が発育できない状況で、肺が小さい状態つまり肺低形成になっている。さらに肺が小さいために肺血管床が少なく、肺の細動脈の易収縮性もあり、新生児遷延性肺高血圧 (PPHN) の状態に陥りやすい。つまり肺低形成に PPHN が重複し、出生後ただちに低酸素血症＋右心不全の状態に陥る。この病態をよく理解して治療にあたらねばならない。

現在のところ肺低形成を治療する方法はないので、PPHN を最小限に抑制することが治療の戦略である。現在まで試みられてきた治療は、過換気によるアルカローシス、肺保護し換気効率をよくする高頻度振動換気法 (High Frequency Oscillation : HFO)、一酸化窒素 (NO) 吸入などの肺血管拡張剤、膜型人工肺 (Extra Corporal Membranous Oxygenation : ECMO) などである (図 3-a, b)。



図 3-a 横隔膜ヘルニアの集中治療システム



図 3-b 膜型人工肺 (ECMO)

V-A 方式：脱血路は右内頸静脈経由右心房から、送血路は右総頸動脈経由 Aortic Arch へ。60-100 ml/kg/min の流量で運転する。Priming volume は 150 ml 程度である。

特に出生前に診断された症例は重症例が多く、生存率は24%~51%と報告されている(表1)。我々は、出生直前に胎児を鎮静化し、胎児に麻酔のかかった状態で帝王切開にて出生させ、自発呼吸なしに直ちに気管内挿管し蘇生を行う fetal stabilization (胎児麻酔) を施行した²⁾。この方法は児を泣かせないことにより気胸のリスクを下げ、消化管へのガスの流入を防ぐことにより心・肺の圧迫を軽減し、ストレスを防止し PPHN の発症を抑えるという効果が期待される(図4)。この方法により胎児麻酔未施行例では、生存率が2/7 (28.6%) であったのが胎児麻酔施行例では21/31 (67.7%) に改善した。さらに最近、人工呼吸法について、従来 Hyperventilation により Alkalosis に保つのが PPHN の治療に有利とされていたのだが、逆に Hyperventilation により胸腔内圧が上昇し静脈還流が減り、心拍出量が減少し、血圧低下をまねく。また肺の細動脈が進展され、肺血管抵抗が上昇する。またアルカローシスにより脳血流が減少するなどの問題点が指摘され、逆に Gentle ventilation (Permissive hypercapnea) で筋弛緩剤を使わずに呼吸管理するほうが成績がいいという報告があった³⁾。これは PaCO₂ は 60 mmHg までは OK で、pH 7.2 以上に維持できれば、Pre-ductal SPO₂ は 90% 以上あれば OK で、呼吸器の条件を下げておくという方法であり(表2)、できるだけ肺に負担をかけずに肺の保護に努めるという考え方でもある。我々の施設では2004年からこの呼吸管理を採用したところ、Fetal stabilization + Hyperventilation で生存率が13/22 (59.1%) であったのが Fetal stabilization + Gentle ventilation では生存率が10/11 (90.9%) と著明に改善してきた。

しかし、極端に肺が小さい、高度な肺低形成の症例が存在するのは事実で(図5)これに対しては PPHN の治療を駆使しても救命が困難であり、肺の発育を促す方法の開発が必要である。横隔膜ヘルニアの低形成肺では IGF2 などの Growth factor の発現が低いことが証明されており、胎児期または出生後に適切な Growth factor を作用させることにより、肺の発育を誘導できる可能性がある。教室では小児歯科との共同研究で、動物の胎仔肺の organ culture を行い、これに対してどの Growth factor が有効に作用するかに関し

表1 横隔膜ヘルニア出生前診断例の生存率

国名	症例数	生存率	報告年
USA (UCSF)	25/83	30%	1994
Meta-analysis	165/676	24%	2000
ベルギー	13/42	31%	2001
USA (Detroit)	35/73	48%	2004
UK+Bel+Spain	23/45	51%	2004

表2 Permissive Hypercapnea (Gentle Ventilation) の概念

- PaCO₂ < 60 mmHg, pH > 7.2 維持できれば OK
- Pre-ductal SpO₂ > 90% を維持できれば OK
- PIP 20-30, PEEP 5, RR 30-40, Ti 0.5 sec
- 過換気療法を行わない
- 筋弛緩剤は使用しない

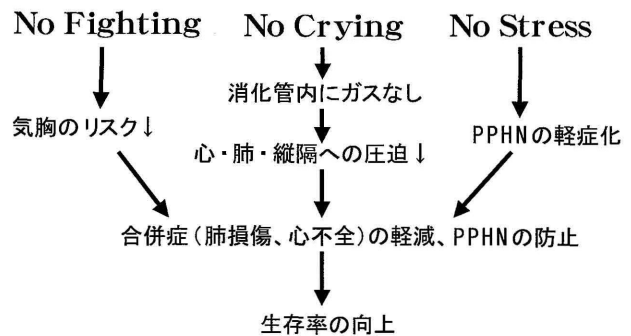


図4 Fetal Stabilization (胎児麻酔) の効果

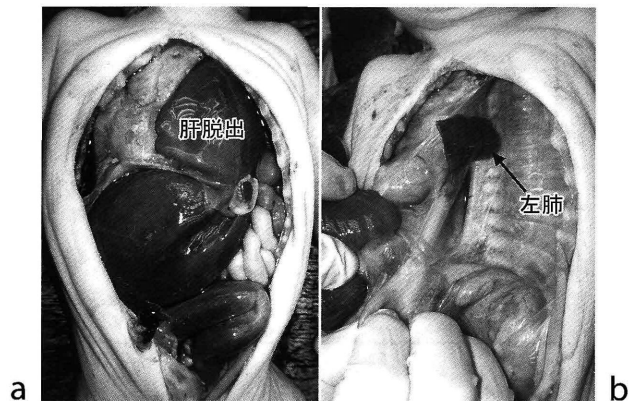


図5 肺低形成高度例の剖検所見
左横隔膜が全欠損し、肝の約半分が胸腔内に脱出(a)。左肺は痕跡程度(b)。

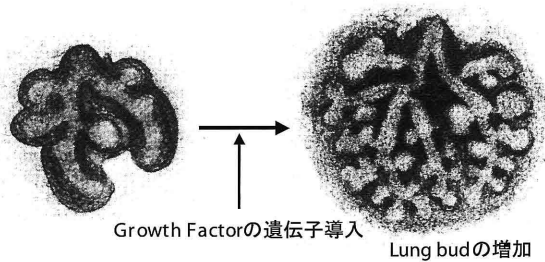


図6 胎児肺の Organ culture
Fetal Intervention により肺の成熟を促す

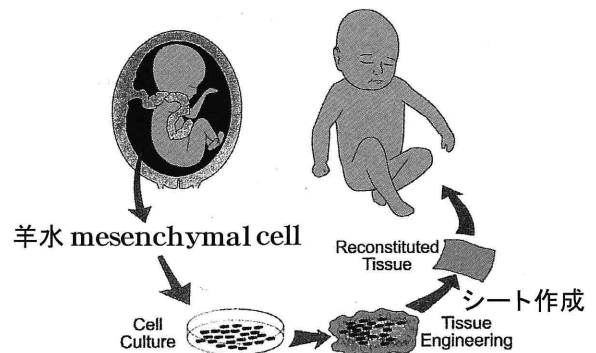


図7 羊水細胞を用いた横隔膜
Tissue Engineering

て研究を開始したところである（日本学術振興会，科学研究費基盤 B，図6）。

また，横隔膜ヘルニアの重症例では，横隔膜の全欠損例が多く，これらの症例では横隔膜の閉鎖が困難なため，ゴアテックスの人工布を用いて patch closure を行っている。しかし再発率が高くまた呼吸機能の問題も懸念されるため，自己の腹壁の内腹斜筋＋腹横筋を外腹斜筋から剝離して筋肉フラップとして横隔膜を再建する術式を開発している。また出生前診断にて大きな欠損が疑われる場合は，出生前に羊水中の胎児細胞を採取しこれを培養して横隔膜を形成する tissue engineering が試みられている（図7）。現時点では fibroblast までは分化できているが，今後 myoblast が誘導できれば，出生時にはすでに本人の横隔膜が培養で完成し，それを手術で使うことが可能になるかもしれない⁴⁾。今後の研究の進展が待たれる。

2. 小児肝臓移植

本邦における肝臓移植は欧米の脳死ドナーからの肝移植と異なり，生体ドナーからの肝臓移植の開発により症例数が増加してきた。小児の肝臓移植の適応は胆道閉鎖症，劇症肝炎，代謝性疾患，先天性門脈閉塞による肺高血圧などである。教室では消化器・総合外科（第二外科）と連携して小児の肝移植のプロジェクトを推進している。2005 年末まで九州大学では 210 例の肝臓移植を行ってきたが，そのうち小児は 31 例である。その内訳は胆道閉鎖症 24 例，劇症肝炎 5 例，Wilson 病 1 例，高ガラクトース血症 1 例である。累積生存率は 90% と良好で，全国平均を上回っている（図8）。

胆道閉鎖症は胆管が肝門部で閉塞しているため，胆汁が排泄できず，閉塞性黄疸から肝硬変になり死に至る病気で，生後 1 ケ月を過ぎても黄疸が遷延する場合は，本症を疑い精査すべきである。特に便の色が

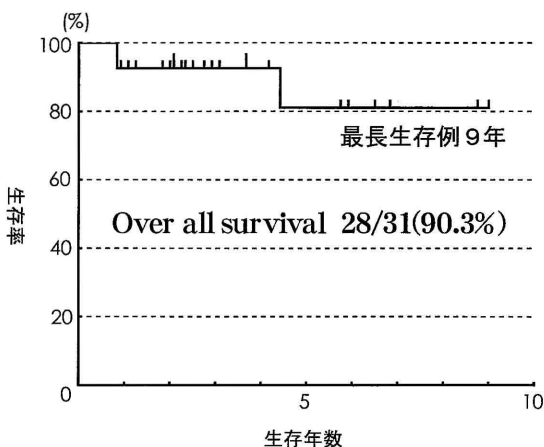


図8 小児肝臓移植の成績
（九州大学病院 1996-2005，31 例）

重要で，乳児の便は正常では山吹色の便が理想的であるが，本症ではクリーム色や灰白色を呈する。従来，生後 60 日までに葛西の手術（肝門部空腸吻合術）を行えば，約 3 分の 2 の症例で胆汁排泄がえられ，その半分くらいは総ビリルビンが 1 mg/dl 以下に下がり通常の生活ができる。しかし，手術しても胆汁が出ない症例は，そのまま黄疸が進行し肝硬変になり 1 歳前後で死亡する。またいったん胆汁が出て，胆管炎をくりかえし徐々に肝硬変が進行してくる症例，黄疸は消失しても肝の線維化が進行し門脈圧亢進症により消化管出血を繰り返す症例，胆汁酸の血中濃度が高く搔痒感が強く日常生活に著しい支障をきたす症例，蛋白合成障害により成長障害が強い症例などがあり，これらが肝臓移植の適応になる。胆道閉鎖症は小児外科医にとって肝門部空腸吻合を適切に

行っても必ずしも結果が期待できない疾病であったが、肝移植により救命できる病気になった(図9)。

小児肝臓移植の今後の問題点は、(a) 乳児の劇症肝炎の移植後の成績が不良であること、(b) 免疫抑制剤をいつまで飲み続けるか、(c) 高齢者のグラフトがいつまでもつか、(d) 肺高血圧を合併した症例の移植のタイミング、などである。

(a) に関しては、乳児の劇症肝炎は移植しても、また徐々に肝不全になっていく症例が多い。これは生検標本では中心静脈周囲のリンパ球浸潤が特徴であるが、これが原疾患の再発なのか拒絶なのかよくわからない。われわれの経験症例でも再移植を行ったものの再び肝機能が悪化し、再々移植の準備中に、アスペルギルス感染で失った。各施設、症例が少ないので、全国規模で症例を持ち寄って治療方針について前方視的なスタディーをする必要がある。

(b) は小児にとって一生の問題であり重要な課題である。拒絶反応はこわいし、一旦おこると慢性拒絶のリスクも出てくるため免疫抑制剤を容易にきめることはできない。しかし免疫抑制剤の副作用として腎障害、中枢神経障害、糖尿病、高血圧、易感染性などがあるため、良好な QOL をめざし天寿を全うするためにはできるだけ早くきりたいものである。現在、われわれは術後5年以上経過例で、拒絶のエピソードが2年以上ない症例に関して徐々にウイニングを試みている。当科における最長生存例は術後9年経過し、現在免疫抑制剤は off になっている。今後、免疫寛容のマーカーを模索し、安全に切れる基準をつくっていく必要がある。候補としては Regulatory T cell (CD4+CD25+) や HLA-G などがある。

(c) は祖父母をドナーとした移植や、胆道閉鎖でもレシピエントが成人に達している場合、父母でも60歳を超える場合がでてくる。たとえば60歳の肝臓を1歳の小児に移植した場合、それがいつまでもつかという問題についてほとんど回答がない。ラットの実験では高齢ドナーの肝臓でも幼若ドナーの肝臓でも、幼若レシピエントに移植すると、生存曲線に差はみられず、高齢ドナーの肝でも幼若ドナーに移植すればレシピエントが生きる限りは生着できている(図10)。ただ差があったのは高齢ドナー肝ではレシピエントの死因の内訳で悪性腫瘍が多かった点であった⁵⁾。ただし大動物のデータやヒトのデータがないため、今後の検討が必要である。

(d) は、胆道閉鎖症の末期の肝硬変のため門脈圧亢進症の状態がながくつづく portosystemic shunt が自然に形成され、肝で代謝されるべき血管収縮物質が肺循環に流れ込むことによって惹起される。平均肺

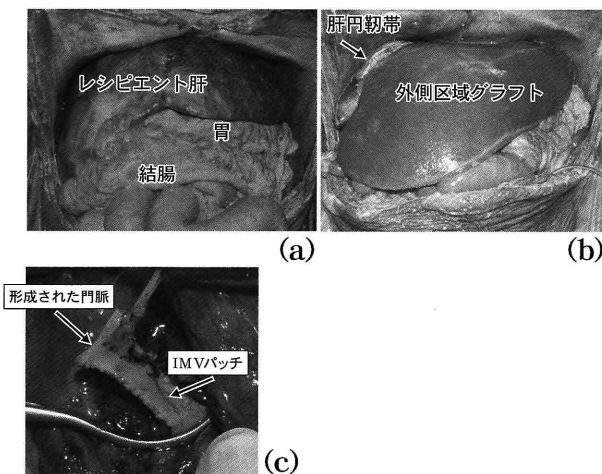


図9 小児生体ドナー肝臓移植

10ヶ月女児胆道閉鎖症に対する父親の外側区域をグラフトとする肝臓移植。(a) レシピエントの肝臓は胆汁性肝硬変を呈している。(b) 父親の外側区域グラフトを移植したところ。サイズがちょうどあっている。(c) 門脈の径が4mm以下の場合にはドナーのIMVを用いて形成し太くする。

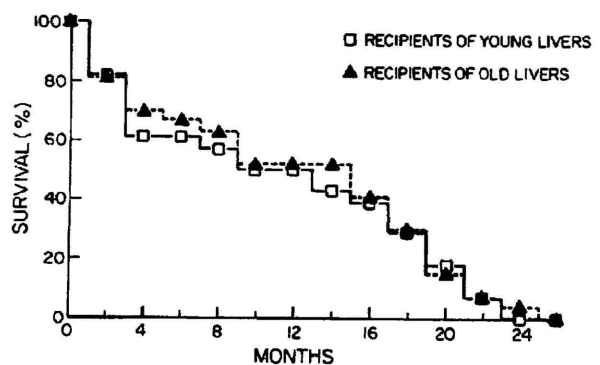


図10 高齢ドナーの肝がいつまでもつか？ ラット肝臓移植の結果

Young liver : Donor5ヶ月→Recipient5ヶ月

Old liver : Donor28ヶ月→Recipient 5ヶ月

高齢ドナー肝でも同じ年齢のドナー肝でも生存曲線、体重、肝機能に差なし

動脈圧が 40 mmHg を超えると、周術期の死亡率が高くなるため、肝臓移植の禁忌とされている。また同様の状態は、先天性門脈欠損症による静脈管開存の症例でも同様に起こってくる。こういう場合、PGI2 の持続投与などにより肺動脈圧を下げてから肝臓移植にもっていく必要がある。ただし肺動脈の器質的変化が進むと肺高血圧が不可逆性であり肺移植しか救命の道はない、肺生検によるチェックが肝要である。

教室で今まで行ってきた研究は、小児の肝移植後の身体発育や骨代謝の改善について⁶⁾、移植後の門脈閉塞に対する診断と手術手技⁷⁾などである。現在、胆道閉鎖の移植の適応に関する肝アジアロシンチの意義、移植術後の免疫寛容と HLA-G の発現と免疫抑制剤の離脱に関して臨床研究を遂行している。

3. 小腸移植

小腸移植の適応疾患は短腸症候群で、静脈アクセスの消失や、肝機能障害や、繰り返すカテーテル感染のため静脈栄養の遂行が困難になった症例である。原因疾患として、小児では、腹壁破裂、中腸軸捻転、腸閉鎖、広域型の Hirschsprung 病にともなう短腸や、MMIHS (megacystis microcolon intestinal hypoperistalsis syndrome) や CIIPS (chronic idiopathic intestinal pseudoobstruction syndrome) や Hypoganglionosis など腸管全域にわたる蠕動障害による機能的腸不全、吸収不全症候群などがあげられる。

臨床小腸移植症例は 1985 年 4 月以後に施行された症例について Intestinal Transplant Registry が行

われており、2 年に 1 回開催される国際小腸移植シンポジウムにて報告される。2005 年 6 月ベルギーのブリュッセルで開催された第 9 回国際シンポジウムでの集計では⁸⁾、世界 14ヶ国、65 施設で、1210 例に対して 1292 回の小腸移植が行われている。2005 年 3 月末の時点での生存症例は 658 例で(生存率 54.4%)、最長生存例は術後 16 年を経過し、グラフトは生着・機能している。移植後 6 ヶ月以上生着した症例では 75% で PN からの離脱が可能で、移植後の QOL は 80% の症例でほぼ満足できるものであった。男女比は 53:47 とほぼ同数、18 歳以下の小児例が 60% をしめている。本邦では 8 例に 9 回の小腸移植が行われ、生存例は 8 例中 4 例である。いずれにしても生存率は約 50% であり、肝臓移植に比べると明らかに成績が不良である。

われわれは小腸移植の臨床応用をめざして動物実験を繰り返してきた。ラットを用いたマイクロサージェリーによる小腸移植の実験では、保存液として UW 液が優れること⁹⁾、保存腸管の viability 判定に関する研究¹⁰⁾、移植腸管の壁内神経および外来神経の再生に関する研究¹¹⁾、生体グラフトとして空腸と回腸の比較¹²⁾、免疫寛容誘導に関する研究¹³⁾などを行ってきた。さらに大動物のブタを用いて、生体小腸移植のモデル作成¹⁴⁾、移植腸管の運動機能と拒絶に関する研究¹⁵⁾などを報告してきた(図 11)。現在、九州大学は本邦における脳死小腸移植実施施設 9ヶ所のうちのひとつとして認定されており、

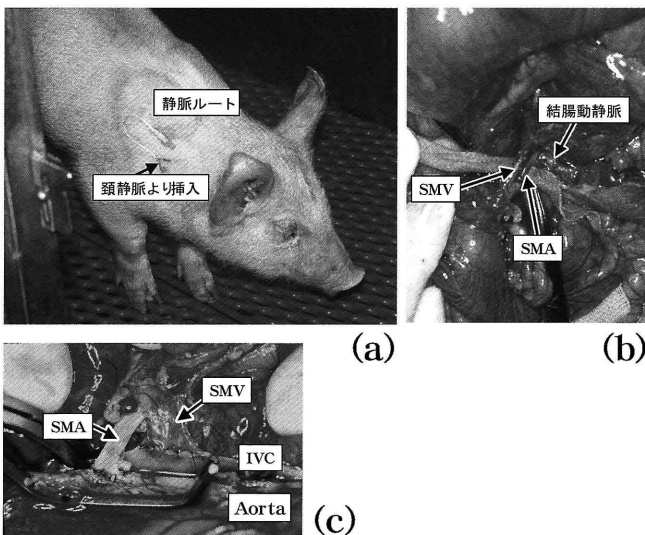


図11 ブタを用いた生体小腸移植の手技 (a) 頸静脈からの血管確保。 (b) ドナーからのグラフト採取。 SMA & SMV の結腸動静脈よりも末梢で血管を処理する。 (c) レシピエントの Aorta と IVC に端側吻合する。

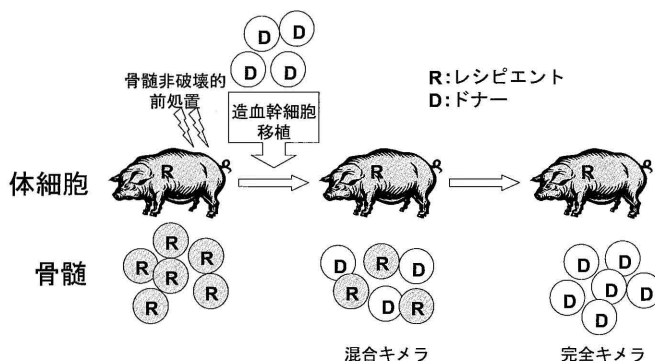


図12 ミニ移植を応用したドナー-特異的免疫寛容の誘導の試み

倫理委員会に承認され、実施に向けたシミュレーションも終了した。あとは適切な適応症例の選択と経済的な問題の克服である。

小腸移植の成績がいまだ肝臓移植に比較して不良なのは、小腸に免疫担当細胞が数多く存在するために、拒絶反応などの免疫反応が強いことである。そのために強い免疫抑制を行うために、免疫抑制剤の血中濃度を高く維持すると感染がおこりやすく、予期せぬ感染症にて失う症例が多くなる。最近は導入療法として IL2receptor のモノクローナル抗体や抗胸腺細胞グロブリンなどを用いて、その後の免疫抑制剤の濃度を低めに保つ試みがなされ、約 10% 程度生存率が上昇している¹⁶⁾。小腸移植の成績をあげるには現在の免疫抑制療法では不十分であり、免疫寛容の誘導が必要である。われわれは生体小腸移植を前提としてまず造血幹細胞をミニ移植により生着させ mixed キメラから full キメラを誘導し、同じドナーから小腸を採取し移植すれば、免疫抑制剤なしに生着するはずである。現在、小児科の腫瘍グループとの共同研究でミニプタを用いた実験を開始したところである(日本学術振興会、科学研究費基盤 B、図 12)。

小腸移植の手技は肝機能が良好であれば小腸単独(図 13)、肝機能が末期であれば肝臓を含む肝+小腸または多臓器ということになるが、脳死からの移植がきわめて限定される本邦では、生体からの小腸単独移植が最も実施可能な方法である。現時点で本邦で小腸単独移植を実施する場合、世界の現在の成績を考慮すると、高い成功率が期待される要素は、マイアミの加藤によれば 1) 学童期以後 2) 体重 20 kg 以上 3) 肝障害なし 4) 入院せずに管理できている状態、といった条件を満たす症例が最適で、手術手技としてレシピエントの腸をできるだけ残しておくこと、ストーマ閉鎖は術後 2 年以後に行うべきとしている(加藤友朗、第 18 回日本小腸移植研究会特別講演 2006 年 3 月 11 日)。ただし静脈アクセスがなくなると術前術後管理ができないため、中心静脈挿入経路 6 本のうち 3 本は残っているほうが望ましい。

おわりに

小児外科の中で最も進歩が著しい新生児外科について解説し、現在、最も注目されている疾患である先天性横隔膜ヘルニアについて、われわれの成績を紹介するとともに今後の研究の方向性について述べた。小児肝臓移植は、いままで救命が困難であった症例に明るい光をともしてくれたが、まだまだ解明しなければならない問題点も多い。小腸移植は現時点では適応を限定して実施すべきであるが、今後、免疫寛容を誘導する方法を開発し、適応が拡大できるようさらなる努力が必要である。

謝 辞

稿を終わるにあたり、長年ご指導いただきました九州大学病院長水田祥代教授に深謝いたします。また現在ともに日常診療、研究、教育にあたっている九州大学大学院小児外科学分野の教室員に敬意を表します。

参 考 文 献

- 1) 日本小児外科学会学術・先進医療検討委員会一わが国の新生児外科の現況 2003 年新生児外科全国集計一日小外会誌 40: 919-934, 2004.
- 2) Suita S, Taguchi T, Yamanouchi T, Masumoto K, Ogita K., Nakamura M, Nakayama H, Hara T, Tsukimori K, Nakano H, Kanna T and Takahashi S: Fetal stabilization for antenatally diagnosed

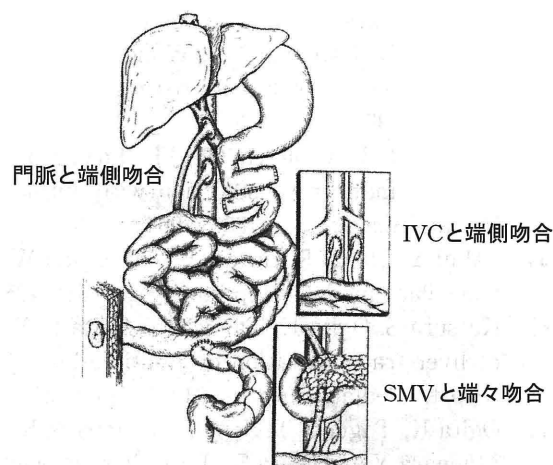


図13 小腸単独移植手技 (Kato T, et al. World J Surg 26: 226-37, 2002 より改変)
静脈吻合は門脈と端側吻合, SMV と端々吻合, IVC と端側吻合などがある。動脈は大動脈に端側吻合。

- diaphragmatic hernia. J Pediatr Surg. 34: 1652-1657, 1999.
- 3] Boloker K, Bateman DA, Wung JT and Stolar CJ: Congenital diaphragmatic hernia in 120 infants treated consecutively with permissive hypercapnea/spontaneous respiration/elective repair. J Pediatr Surg 37: 357-366, 2002.
 - 4] Fuchs JR, Kaviani A, Oh JT, LaVan D, Udagawa T, Jennings RW, Wilson JM and Fauza DO: Diaphragmatic reconstruction with autologous tendon engineering from mesenchymal amniocytes. J Pediatr Surg 39: 834-838, 2004.
 - 5] Sakai Y, Zhong R, Garcia B, Zhu L and Wall WJ: Assessment of the longevity of the liver using a rat transplant model. Hepatology 25: 421-425, 1997.
 - 6] Katsura S, Ogita K, Taguchi T, Suita S, Yoshizumi T, Soejima Y, Shimada M and Maehara Y: Effect of liver transplantation on multiple bone fractures in a infant with end-stage biliary atresia: a case report. Pediatr Surg Int 21: 47-49, 2005.
 - 7] Ogita K, Taguchi T, Soejima Y, Ieiri S, Katsura S, Takada N, Matsuura T, Yoshizumi T, Shimada M, Maehara Y and Suita S: Fatty liver caused by portal vein thrombosis after living donor liver transplantation: a case report. J Pediatr Surg 40: E7-E9, 2005.
 - 8] International Intestinal Transplant Registry. Presented in The 9th International Symposium on Small Bowel Transplantation, ブリュッセル, 2005.
 - 9] Taguchi T, Zorychta E and Guttman FM: Evaluation of UW solution for preservation of small intestinal transplants in the rat. Transplantation 53: 1202-1205, 1992.
 - 10] Taguchi T, Yamada T, Suita S and Ohta M: The significance of cytological examination on reperfusion in rat small intestinal transplantation. Virchows Arch 427: 71-76, 1995.
 - 11] Hirose R, Taguchi T, Hirata Y, Yamada T, Nada O and Suita S: Immunohistochemical demonstration of enteric nervous distribution after syngeneic small bowel transplantation in rat. Surgery 117: 560-569, 1995.
 - 12] Taguchi T and Suita S: Segmental small-intestinal transplantation: A comparison of jejunal and ileal grafts, Surgery 131: S294-S300, 2002.
 - 13] Nakao M, Taguchi T, Ogita K, Nishimoto Y and Suita S: Immune tolerance induced by donor antigen and cyclophosphamide in rat fetal small bowel transplantation. Fukuoka Acta Medica 96: 49-57, 2005.
 - 14] Nakao M, Nakamura M, Nishimoto Y, Ogita K, Shono K, Shima Y, Taguchi S, Taguchi T and Suita S: Technical aspects of pig model in living-related small intestinal transplantation. Asian J Surg 24: 353-356, 2001.
 - 15] Nishimoto Y, Taguchi T, Masumoto K, Ogita K, Nakamura M, Taguchi S, Takada N and Suita S: Efficacy of real-time monitoring to determine motility in porcine small intestinal transplantation. Pediatr Surg Int 20: 9-13, 2004.
 - 16] Kato T, Ruiz P, Thompson JF, Eskind LB, Weppler D, Khan FA, Pinna AD, Nery JR and Tzakis AG: Intestinal and multivisceral transplantation. World J Surg 26: 226-237, 2002.
- (参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です。)

プロフィール

田口 智章 (たぐち ともあき)

九州大学教授 (大学院医学研究院小児外科学専攻)。医博

◆**略歴** 1954 年大分県に生る。1979 年九州大学医学部卒業。1985 年同大学院医学研究科博士課程修了。1987 年九州大学医学部助手。1987 年マックギル大学モントリオール小児病院 fellow。1995 年九州大学医学部講師。1997 年ピッツバーグ大学小児病院 Visiting fellow。1998 年九州大学病院周産母子センター助教授。2006 年より現職。

◆**研究テーマと抱負** 周産期医学に基づいた新生児外科、小児臓器移植 (肝と小腸)、小児悪性腫瘍、小児内視鏡手術が 4 大研究テーマです。少子化社会において我々が果たす役割は intact survival をめざした小児医療の充実により次の世代の生産人口を確保することと、「こどもを安心してまかせられる外科医」の育成です。

◆**趣味** 山歩き、歴史に関する読書、戦略シミュレーション

虚血性脳血管障害に対する遺伝子治療

九州大学大学院医学研究院 病態機能内科学分野
大星 博明, 井林 雪郎, 飯田 三雄

はじめに

脳血管障害は我が国の死因の第3位を占めているが、寝たきりおよび要介護患者の原因疾患としては第1位であり、急速な勢いで高齢化社会を迎えている我が国においては今後さらなる増加が予想され、まさに国民病としての対策が必要な疾患である。一方、重症のクモ膜下出血や脳内出血、内頸動脈・中大脳動脈起始部閉塞などによる広汎な脳梗塞では、発症早期に来院しても現有の治療では救命や重篤な後遺症の防止が出来ないことが多く、脳神経の脆弱性ならびに再生の困難さという点と併せて、重症脳血管障害は難治性疾患の側面を有している。

遺伝子治療は本来先天性疾患に対する根治療法として開発されてきた歴史を有するが、技術的進歩に伴って悪性腫瘍などの難治性疾患へと応用が拡大されてきた。近年では非悪性腫瘍における難治性病態での適応も検討され、さらには虚血性心臓病や重症虚血肢などの循環器疾患においても応用が検討されている¹⁾。

我々は、有効な治療法のない重症脳血管障害の病態生理の解明と新規治療法の開発を行っており、近年では、遺伝子導入技術を応用した研究を進めている。本稿では我々の研究室で進めてきた虚血性脳血管障害を対象とした遺伝子治療の研究を中心に脳血管障害領域における遺伝子治療研究を概説し、将来展望について述べる。

1. 脳血管に対する遺伝子治療

遺伝子治療にまず必要な条件は、標的組織に十分量の遺伝子産物をもたらすことであり、その目的を達するには導入効率の良い遺伝子導入ベクターが必要となる。生体の脳組織に対しては、まず神経に親和性を有するヘルペスウイルスベクターによる導入が報告され、その後導入効率の良いアデノウイルスベクターを用いた報告がなされた。続いてHVJリポゾームやアデノ随伴ウイルスベクターが用いられ、最近ではセンダイウイルスベクターでの導入が報告されている。しかしながら、脳血管障害発症の主座である脳血管自体への遺伝子導入は容易ではない。末梢血管に対してはバルーンカテーテルなどにより血管内からベクターを投与する方法が用いられるが、ベクター導入時の血流遮断などを考慮すると脳血管への適用はなかなか困難である。

我々は脳脊髄液などを介して血管周囲にベクターを導入する方法、すなわち perivascular approach を試みており、クモ膜下腔に存在する頭蓋内主要脳動脈に対して良好な遺伝子導入が得られる²⁾。本法での遺伝子導入は主として血管の外膜側となるが、同部位での発現であっても血管反応性の改善が得られ³⁾、また、動脈硬化などの病的血管においても有効性が認められている⁴⁾。本法の第一の適応としては、クモ膜下出血の重篤な合併症である脳血管攣縮の予防が想定されている。クモ膜下出血発症後の血腫存在下であっても脳血管への導入は可能であり⁵⁾、これまでの基礎検討では、炎症を抑制するNF κ Bに対するデコイオリゴや血管拡張作用を有するCGRPのほか、内皮型一酸化窒素合成酵素、細胞外型SOD、ヘムオキシゲナーゼなどの遺伝子導入によって血管攣縮を抑制することが報告されてきた⁶⁾⁷⁾。今後の臨床応用への発展が最も期待される病態のひとつである。

2. 虚血脳組織への遺伝子導入

脳虚血病態への遺伝子導入の研究では、通常の薬物を用いた成果と比較して著明な脳梗塞縮小効果を認めたり、従来治療困難とされた虚血中心部での細胞保護効果が認められるなど、優れた治療効果が報告されてきた。しかしながら、当初の報告では、脳虚血の発症以前にあらかじめ治療遺伝子を脳内に投与することで効果を認めたものが多く、臨床応用を進めるためには脳虚血発症後の遺伝子導入により有効性を発揮させる必要がある。また、導入遺伝子の発現には多くのベクターが宿主の遺伝子発現装置を利用するが、エネルギーの供給不全状態にある脳虚血組織においてどの程度遺伝子発現を果たしうるかの検討は、脳梗塞急性期の遺伝子治療においては必須の課題である。アデノウイルスベクターを用いて脳虚血レベルと導入遺伝子発現との相関を検討した我々の成績では⁸⁾、虚血中心部における導入遺伝子の発現は少量であるが、脳虚血の治療対象とされる虚血辺縁部、いわゆる penumbra 部分での発現は良好であり(図1)、導入遺伝子発現の脳血流閾値は虚血前値の約40%のレベルであった。

脳組織に直接 bcl2 や hsp72 などの細胞保護的な遺伝子を導入すると虚血に対する抵抗性をもたらすと報告されているが、発現蛋白が細胞内にとどまって効果を発揮する種類の遺伝子導入では、通常の投与方法で遺伝子導入できる細胞数が限定されることから、脳梗塞を縮小するまでの効果を期待することは難しいと考えられる。一方、脳室や脳槽にベクターを投与すると脳室壁に良好な遺伝子導入をもたらすことから、同部位に分泌シグナルを有する遺伝子産物を導入すれば、脳脊髄液を介して広範な脳組織に治療効果を発揮しうる。本法は中枢神経疾患に対する遺伝子治療として重要な治療戦略のひとつであろう。

3. 脳梗塞に対する遺伝子治療

遺伝子導入により脳虚血の治療を試みた研究としては、1995年にインターロイキン1受容体拮抗物質(IL-1ra)を脳内に導入することで最初の有効性が認められている⁹⁾。以後種々の遺伝子の効果が検討されているが、当初の検討では遺伝子導入が脳虚血前に行われたものが多かった。脳虚血後の病態解明に伴い

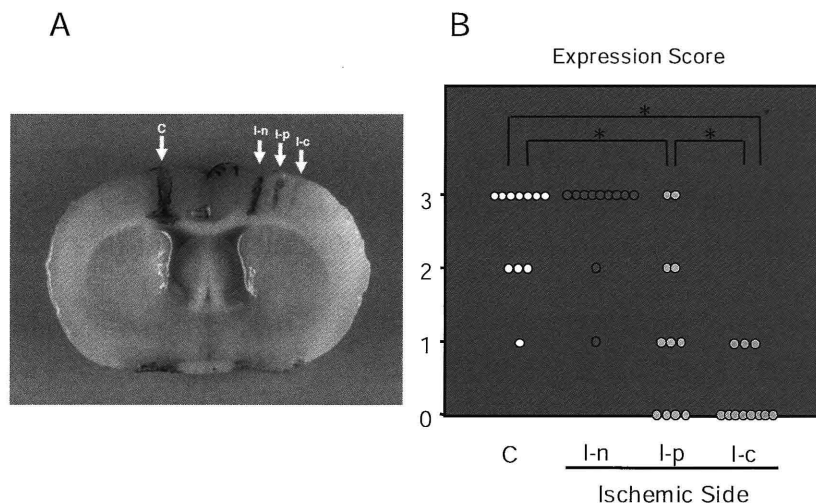


図1 Gene transfer to ischemic brain

Coronal sections of the brain 4 days after brain ischemia and gene transfer (A). Arrows indicate the areas of vector injection. C: contralateral cortex to ischemia. I-n, I-p, I-c: ipsilateral cortices to ischemia (2, 3 and 4 mm lateral from midline, respectively). Transgene (β -galactosidase) expression was evaluated by X-Gal staining.

Scores for transgene expression at the parietal cortices (B). Expression scores at I-p and I-c areas were significantly smaller than that of C. * $p < 0.05$.

脳虚血後においても有効性が認められるようになり、その主要な治療標的は脳虚血後に生じる apoptosis であった。我々は抗 apoptosis 作用を有する新規成長因子 midkine の遺伝子導入の治療効果を検討しており¹⁰⁾、脳虚血発症後の遺伝子導入であっても脳梗塞の縮小と神経細胞の apoptosis の減少を認める成績を得ている(図2)。神経細胞障害軽減に対して遺伝子導入が有効性を認められる therapeutic time window に関しては、脳虚血発症5時間後でも有効であったとの報告もあり、実際に導入遺伝子が十分量発現するまでの time lag を考慮すると、蛋白療法との併用療法を行えばかなり長期間の therapeutic time window を有すると考えられる。

近年脳梗塞の治療標的として炎症性シグナルの重要性が注目されている。インターロイキン-1 (IL-1) などの炎症性サイトカインやケモカインならびに E セレクチン・ICAM-1 などの接着因子の発現は虚血後1日をピークとして亢進し、脳梗塞の進展に寄与することが報告されている。我々は強力な単球・マクロファージの走化因子である monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の dominant negative 遺伝子や広範囲にわたって炎症シグナルを抑制する IL-10 遺伝子を用いて、炎症機転が脳梗塞進展に及ぼす影響を検討しており(図3)、これらの遺伝子導入が脳虚血後であっても炎症細胞浸潤の抑制と著明な脳梗塞縮小効果をもたらすことを報告している¹¹⁾¹²⁾。脳虚血後の炎症機転には種々のシグナルが比較的長い期間に渡って関与することから、脳梗塞に対する有望な治療法として発展する為には、今後個々の炎症シグナルに関して更なる検討が必要であろう。

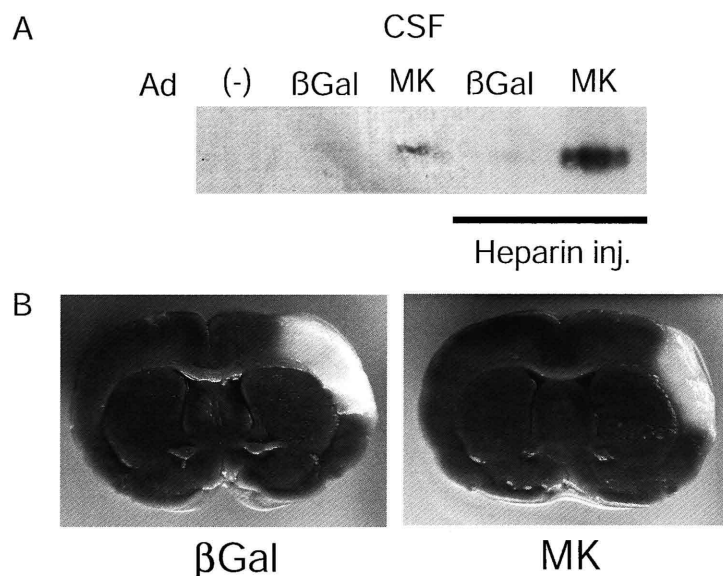


図2 Postischemic gene transfer of midkine

Midkine secreted into CSF 24 hours after gene transfer (A). Midkine detected by Western blotting in each group is shown. βGal: CSF from a rat injected with adenoviral vector encoding β-galactosidase (1×10^9 pfu). MK: CSF from a rat injected with adenoviral vector encoding midkine (1×10^9 pfu). Bar represents CSF after intraventricular injection of heparin (20 U/kg) 30 minutes before sampling.

Brain sections stained with TTC (2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride) 2 days after cerebral ischemia and gene transfer with an adenoviral vector encoding β-galactosidase (βGal) or midkine (MK) (B). Infarct area was significantly reduced by midkine transfection.

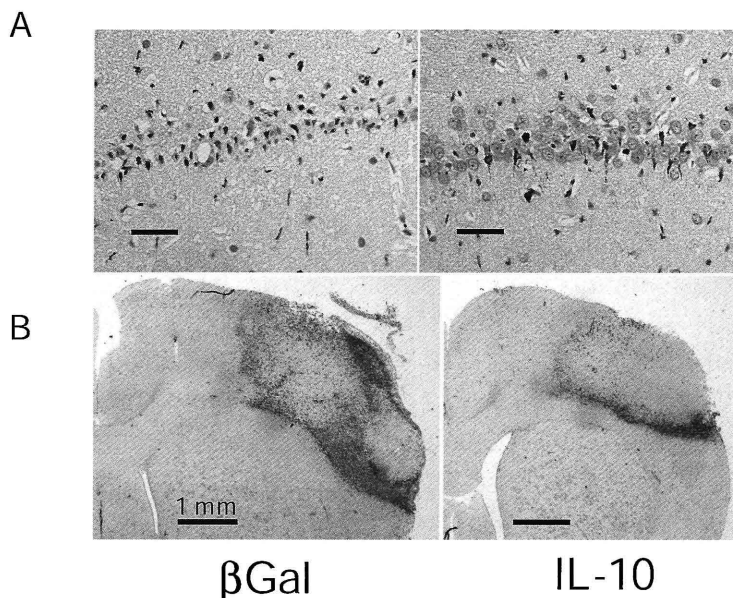


図3 Postischemic gene transfer of interleukin-10
DNA damages in the hippocampal CA1 after gene transfer to global ischemia (A). Photos of hippocampal CA1 area transfected with β -galactosidase (β Gal) and interleukin-10 (IL-10) stained with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin in situ nick end labeling (TUNEL). More survived neurons and less TUNEL positive cells were observed in IL-10 treatment. Macrophage infiltrations after gene transfer to focal ischemia (B). Photos of infarct areas transfected with β Gal and IL-10 stained with an anti-macrophage/monocyte antibody. Infarct area and macrophage/monocyte infiltrations were significantly reduced by IL-10 transfection.

4. 細胞療法・再生療法への応用

脳神経の再生が明らかになって以来、脳血管障害における再生医療が脚光を浴びている。その中核をなすシグナルとして、血管新生因子とともに神経成長因子の重要性が報告されており¹³⁾、しばしば遺伝子導入による成長因子の投与が行われている¹⁴⁾。また、幹細胞を用いた移植・細胞療法が期待されているが、当初宿主における分化・増殖による直接的な治療効果と考えられた脳梗塞の保護効果や神経機能の改善が、主として導入細胞から放出される液性因子、特に成長因子を介した作用であることが示唆されつつある。したがって、最近の報告では、成長因子を過剰発現するように *ex vivo* で遺伝子導入を行った移植細胞を生体へ投与するという方法も試みられてきている¹⁵⁾。文部科学省および厚生労働省による遺伝子治療臨床研究に関する指針では、遺伝子治療を「疾病の治療を目的として遺伝子または遺伝子を導入した細胞を人の体内に投与すること」と定義しているが、かかる方法はまさに遺伝子治療のひとつの形態であり、自家細胞移植による治療として今後の発展が期待される。

5. 臨床試験と将来展望

遺伝子治療は臨床試験としてすでに全世界で 600 を超えるプロトコールで 5,000 例以上の症例を対象と

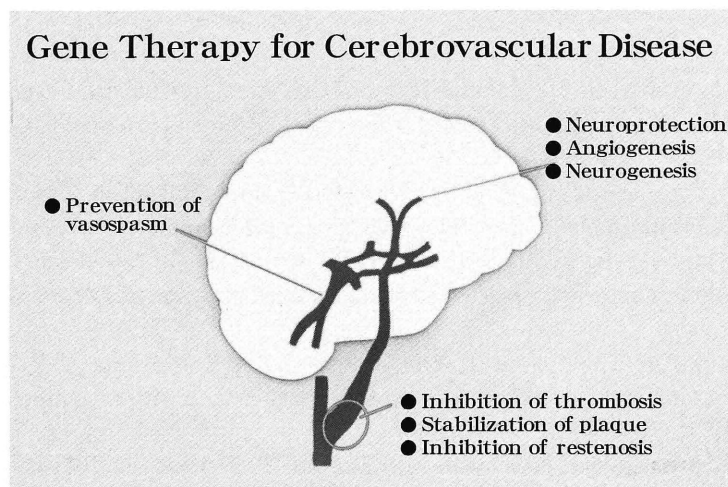


図4 Future targets of gene therapy for cerebrovascular disease

して行われている。臨床試験における最も重要な課題は安全性であるが、レトロウイルスを使用して重症複合免疫不全症 (SCID) に対してフランスで行われた臨床試験において 2002 年ならびに 2005 年に白血病の発症が報告された。従来から同ウイルスでは mutagenesis の危険性が指摘されていたが、同系統のウイルスベクターの使用には一層の対策が必要であろう。遺伝子治療による唯一の死亡事故は米国ペンシルバニア大学で 1999 年に生じたオルニチントランスカルバミラーゼ欠損症に対する治療であったが、その要因として多くのプロトコル違反が判明しており、プロトコル遵守の重要性とともに高用量ベクターの全身投与に対する注意を喚起した事例であった。現在米国を中心に行われている心血管系遺伝子治療の臨床試験では、アデノウイルスベクターやプラスミド単独を遺伝子導入の方法として用いているものが多い。これまで心血管系を対象とした遺伝子治療に関しては重篤な副作用の報告はないが、今後も安全面における十分な検討が必要である。

本邦での遺伝子治療の臨床試験は 21 のプロトコルが厚生労働省より認可されており、大阪大学で始まった重症虚血肢への遺伝子治療はすでに全国レベルでの第三相試験に入っている。九州大学でも同疾患に対しセンダイウイルスベクターを用いた新たな遺伝子治療の臨床試験が本年 1 月に厚生労働省より認可され、今後の成果が待たれるところである。同ベクターは国産ベクターとして開発されたものであり、今後脳血管障害の分野でも応用が期待される。現時点では脳血管障害に対する遺伝子治療の臨床試験は申請されていないが、移植・細胞療法の応用として脳梗塞に対する骨髄幹細胞の投与が札幌医科大学で申請されている。脳血管障害の種々の病態において遺伝子治療や再生療法は応用可能と考えられるが(図 4)、有効性と安全性に対する更なる検討が進み、難治病態に対する新規治療として発展することが期待される¹⁶⁾。

参 考 文 献

- 1) Isner JM: Myocardial gene therapy. *Nature* 415: 234-239, 2002.
- 2) Ooboshi H, Welsh MJ, Rios CD, Davidson BD and Heistad DD: Adenovirus-mediated gene transfer in vivo to cerebral blood vessels and perivascular tissue. *Circ. Res.* 77: 7-13, 1995.
- 3) Ooboshi H, Toyoda K, Faraci FM, Lang MG and Heistad DD: Improvement of relaxation in an atherosclerotic artery by gene transfer of endothelial nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 1752-1758, 1998.
- 4) Ooboshi H, Rios CD, Chu Y, Christenson SD, Faraci FM, Davidson BL and Heistad DD: Augmented adenovirus-mediated gene transfer to atherosclerotic vessels. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 1786-1792, 1997.
- 5) Muhonen MG, Ooboshi H, Welsh MJ, Davidson BL and Heistad DD: Gene transfer to cerebral blood vessels after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 28: 822-828, 1997.
- 6) Toyoda K, Faraci FM, Watanabe Y, Ueda T, Andresen JJ, Chu Y, Otake S and Heistad DD: Gene

- transfer of calcitonin gene-related peptide prevents vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Circ. Res.* 87: 818-824, 2000.
- 7) Watanabe Y, Chu Y, Andresen JJ, Nakane H, Faraci FM and Heistad DD: Gene transfer of extracellular superoxide dismutase reduces cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 34: 434-440, 2003.
 - 8] Ooboshi H, Ibayashi S, Takada J, Yao H, Kitazono T and Fujishima: Adenovirus-mediated gene transfer to ischemic brain. Ischemic flow threshold for transgene expression. *Stroke* 32: 1043-1047, 2001.
 - 9) Betz AL, Yang GY and Davidson BL: Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15: 547-551, 1995
 - 10] Takada J, Ooboshi H, Ago T, Kitazono T, Yao H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Ibayashi S and Iida M: Postischemic gene transfer of midkine, a neurotrophic factor, protects against focal brain ischemia. *Gene Ther.* 12: 487-493, 2005.
 - 11] Kumai Y, Ooboshi H, Takada J, Kamouchi M, Kitazono T, Egashira K, Ibayashi S and Iida M: Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy protects against focal brain ischemia in hypertensive rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24: 1359-1368, 2004
 - 12] Ooboshi H, Ibayashi S, Shichita T, Kumai Y, Takada J, Ago T, Arakawa S, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T and Iida M: Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. *Circulation* 111: 913-919, 2005.
 - 13] Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, Yamamoto S, Hatano O, Kawahara N, Tamura A, Kirino T and Nakafuku M: Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 110: 429-441, 2002.
 - 14) Sugiura S, Kitagawa K, Tanaka S, Todo K, Omura-Matsuoka E, Sasaki T, Mabuchi T, Matsushita K, Yagita Y and Hori M: Adenovirus-mediated gene transfer of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor enhances neurogenesis and angiogenesis after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 36: 859-864, 2005.
 - 15) Ikeda N, Nonoguchi N, Zhao MZ, Watanabe T, Kajimoto Y, Furutama D, Kimura F, Dezawa M, Coffin RS, Otsuki Y, Kuroiwa T and Miyatake S: Bone marrow stromal cells that enhanced fibroblast growth factor-2 secretion by herpes simplex virus vector improve neurological outcome after transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 36: 2725-2730, 2005.
 - 16] Heistad DD and Faraci FM: Gene therapy for cerebral vascular disease. *Stroke* 27: 1688-1693, 1996.

(参考文献のうち、数字がゴシック体で表示されているものについては、著者により重要なものと指定された分です。)