

博士論文

超低出生体重児に発症した腹膜炎に対する腹腔鏡の
安全性に関する発育鶏卵腹膜炎モデルを用いた基礎的研究

畑中 玲

目次

I. 要旨	1
II. 序文	2
未熟児・低出生体重児の定義・日本における実態	2
低出生体重児における腹部疾患	3
小児内視鏡手術の変遷	4
気腹が免疫系に及ぼす影響	6
動物実験モデル	6
本研究の目的	8
III. 方法	9
発育鶏卵の基本構造	9
ニワトリの体腔の基本構造	10
インキュベート日数と発生過程	13
手術操作可能な発育鶏卵標本の作製方法	14
腹膜炎モデル・気腹モデルの作成	17
実験 1：気腹が菌血症に与える影響	24
(a) 穿孔早期モデル	24
(b) 穿孔晚期モデル	25
実験 2：生存曲線解析	26

IV. 結果	28
実験 1：気腹が菌血症に与える影響	28
(a) 穿孔早期モデル	28
(b) 穿孔晚期モデル	33
実験 2：生存曲線解析	38
V. 考察	41
早期モデルにおけるデータの解釈	41
晚期モデルにおけるデータの解釈	42
生存曲線解析	43
超低出生体重児腹膜炎における気腹の安全性への推察	44
成体または若年哺乳類の腹膜炎モデルとの比較	45
モデルの妥当性	46
今後のモデルの展望	50
まとめ	52
VI. 謝辞	53
VII. 引用文献	54

1. 要旨

超低出生体重児に対し腹腔鏡手術の導入を検討するにあたり、これまで超低出生体重児に相当する適切な未熟動物モデルが存在せず、安全性の確認など基礎的データの蓄積が阻害されていた。本研究では発育鶏卵を用いることで哺乳類の実験小動物では不可能だった早産仔の維持、手術介入の問題を克服した超低出生体重児の腹膜炎の動物モデルを開発し、超低出生体重児に発症した腹膜炎に対する腹腔鏡の安全性を検討することを目的とした。

モデルを確立したのち菌血症、生存における気腹操作の影響を検討したところ、腹膜炎モデルにおいて気腹操作は菌血症の程度、生存に有意な影響を及ぼさないことが確認できた。

II. 序文

未熟児・低出生体重児の定義・日本における実態

新生児は出生時の体重、在胎週数によってその生理学的特徴、病理学的特徴が大きく異なり、医学的な介入はそれらに対応して行う必要がある。体重では 2500g 未満を低出生体重児、1500g 未満を極低出生体重児、1000g 未満を超低出生体重児と分類し、在胎週数では 22 週から 36 週までを早期産児、37 週から 41 週までを正期産児、42 週以上を過期産児と分類している。また在胎週数と身長体重を考慮し、身長体重がともに在胎週数に対する標準身長、標準体重の 10 パーセント以下である児を SFD(small for date)児、体重のみ 10 パーセント以下である児を LFD(light for date)児としている。

一般に早期産であるほど、出生体重が軽いほど罹病率、死亡率が高く、超低出生体重児では死亡率が 20%前後から 38%に達する[1, 2]ため、繊細な医学的管理・介入が要求される[3-8]。近年日本において年間出生数は減少を続けているが低出生体重児の割合は増えており、その絶対数は減っておらず[9]、少子化の中、低出生体重児を健康に育てるための医学的知識の発展はその重要性を増している。

低出生体重児における腹部疾患

低出生体重児のなかでも体重によってその生理学・病理学的振る舞いは大きな違いがあり、体重が小さいグループほど、正常体重の児と異なる特徴的な疾患スペクトラムを持っており、超低出生体重児ではその特徴が顕著である。腹部疾患においても壊死性腸炎（NEC）、限局性腸穿孔（FIP）、胎便関連性イレウスなど特有の疾患が知られている[10-13]。

壊死性腸炎は腸管の炎症細胞、細菌の侵入を伴う虚血壊死が特徴で腸管壁内ガスや門脈ガスを引き起こす[14]。臨床像としては腹部の膨満、胃内容の残留、胆汁の逆流（胃管からの逆流）、腸管蠕動の停止、麻痺性イレウス症状や下痢、血便、腹膜刺激症状等があり進行すると腸管穿孔、腹膜炎となる場合がある。全身状態もその病勢の程度に応じて無呼吸を含む呼吸異常、低血圧、菌血症、体温異常などを呈す。罹患率は1990年代の報告で1000人あたり1人から3人で、体重が少ないほど多く、1500g未満1251g以上では4%、750g未満では11.5%である[10, 11]。この傾向は最近も大きく変わっていない[15, 16]。病因は完全には解明されていないが腸管壁の未熟性、免疫系の未熟性、腸管細菌叢の過剰発育・異常形成、腸管の血流の不安定性などが示唆されている[17-23]。診断は主に腹部レントゲン像と臨床像による。レントゲン像では拡張した腸管のループや、小腸壁内ガスなどがある。穿孔を伴えば free air が確認できるが実際の臨床では超低出生

体重児のレントゲン所見で確実にその有無を判断するのは困難であることも多い。

治療は状態に応じて消化管安静・抗菌薬投与・呼吸循環管理などの保存的治療から手術治療が選択される。手術治療としては開腹ドレナージ、壊死腸管切除、人工肛門造設等が選択される。手術治療の適応は汎発性腹膜炎、広範な腸管の壊死、腸管穿孔がある。画像上 free air が明らかであれば手術適応となるが、腸管穿孔でさえも free air が見当たらないことがあるため、高度な臨床判断を要求されることもしばしば起こる[24]。

その他の超低出生体重児に特有の腹部疾患においても、いずれも手術適応の判断が難しい。特に穿孔のような絶対的な手術適応においても画像診断のみではその状態を見逃してしまうことがある。しかし、全身状態の悪い超低出生体重児は手術侵襲に対し非常に脆弱であり、手術判断の閾値を下げてしまうと不要な手術による死亡・合併症発生の確率が非常に高くなってしまう。超低出生体重児に発症した NEC の死亡率は 45%前後に達し[25, 26]、手術を必要とする重症例ではさらに高くなる報告もある[27]。

小児内視鏡手術の変遷

1983 年、Semm らが成人において腹腔鏡による虫垂切除を報告し[28]、その後 1987 年 Philippe Mouret が腹腔鏡下胆嚢摘出術の成功を報告した[29]。それ以降、

内視鏡手術は術式、手術器具、スコープ、気腹装置等の開発、進歩にともなって複雑な術式も安全性を保って施行できるようになり、従来の手術に比べて低侵襲であるという利点も認知され、現在広範に普及するに至った。

小児では 1988 年の虫垂切除[30, 31]、1991 年の肥厚性幽門狭窄症、胆嚢摘出術[32-34]の報告に始まっている。小児では成人と比べ体幹が小さく、術野のスペースが極端に狭いため、デバイスと術式にさらなる工夫が必要であったが、この 20 年の進歩はめざましく、新生児疾患も含めて主要な小児外科疾患に広く適応できるようになってきた。しかし極・超低出生体重児の腹部外科分野では腹腔鏡の使用例は現在まで限られており、ごくわずかな報告例が散見されるのみである[35-37]。

前節で述べたように超低出生体重児の腹部疾患では、従来の方法では手術適応の判断が難しい局面に遭遇することが多々あるが、その際、腹腔鏡を使用し直接腹腔を観察することで、より正確な状態の把握ができ厳密な手術適応判断を行える可能性がある。実際に NEC に対する観察的使用の症例報告[35]、診断的腹腔鏡の 4 例報告[37]、FIP に対する 4 例報告[36]のように、そのような局面に対し腹腔鏡を使用した報告例があるが、いずれも数例の報告例にとどまっている。

気腹が免疫系に及ぼす影響

技術の進歩とともに超低出生体重児以外の分野では、小児外科領域においても腹腔鏡が適応されるようになり、低侵襲性、低い術後合併症率につながるようになった。術後の腸閉塞の発生率低下や、術後疼痛の軽減も報告されている[38-42]。一方で、基礎的な動物実験から、二酸化炭素を用いた気腹により、抗炎症性サイトカインの上昇[43, 44]やマクロファージの superoxide anion 産生の低下[45]など、免疫系への抑制的な作用が指摘されている。これらの知見から腹腔感染症や悪性腫瘍の分野では、腹腔鏡を導入するに当たって病態の悪化の可能性について大きな関心が払われ、動物実験、臨床試験が繰り返し行われており、超低出生体重児以外については腹膜炎における腹腔鏡の使用、悪性腫瘍における腹腔鏡の使用について妥当性があると結論づけられた[43-54]。しかし超低出生体重児では腹腔鏡の使用が従来の開腹手術に比べて低侵襲であるかどうか、超低出生体重児に発生する腹膜炎に対して腹腔鏡の使用が安全であるかについての根拠はなく、ヒトでの実証の前に動物モデルでの予備的・基礎的データの蓄積、解析が倫理的にも求められている。

動物実験モデル

本来、手術的介入を行う動物実験モデルはヒトへの外挿性の観点から哺乳類で行うのが一般的である。しかし典型的な超低出生体重児は早期産児でもあり、哺

乳類でモデルを作成するには、帝王切開により早産仔を得た上に手術前後を通じて安定的に養育するか、母体内で妊娠を維持したまま手術介入する必要がある。ヒトの場合はNICUで手厚いケアをして状態を安定させて生存を可能としているが、実験小動物でこれと同様の介入を行うのは事実上不可能である。また妊娠を維持したままの手術介入も同様に技術的困難があり、特に気腹を伴う内視鏡手術は非現実的である。正期産以前の個体を容易に扱えるモデルを得るという観点で、発育鶏卵は発生学のモデルとして長い歴史があり胚にアクセスしやすい特徴をそなえている。発生学モデルとしてこれまで腸管神経系の解析[55]、キメラ作成や移植関係の実験モデル[56, 57]として使用された報告がある。また卵殻から取り出した上での胚の発育も、生存率は低いながら全抱卵期間の2/3に到達するまで成功したという報告がある[58, 59]。

発育鶏卵を使った疾患モデルとしては腸閉鎖モデル[60-64]、腹壁破裂[65-68]、二分脊椎[69, 70]、尿路閉塞実験モデル[71]などが手術的介入によって作成されている。これらは先天性疾患のモデルで、異常の発生機構と発生した異常によって起こる合併症の解析とその予防法を探ることにその主眼がおかれている。しかし、腹腔鏡などの手術介入の影響を解析するモデルとして発育鶏卵が用いられたことはない。

本研究の目的

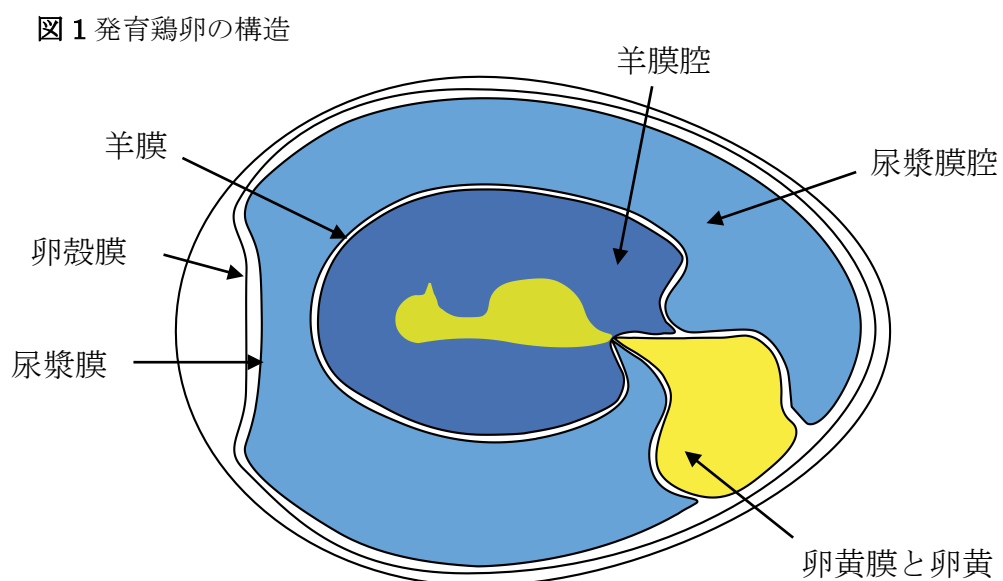
前述した背景から本研究は、超低出生体重児の外科分野において診断的腹腔鏡を導入するうえで必要な安全性を検討するために、動物モデルを作成し、手術介入を行い、基礎的データの解析を行うことを目的とする。具体的には孵化前の発育鶏卵を用いて超低出生体重児に対応する気腹ができる腹膜炎モデルを作成し、超低出生体重児の腹膜炎に対し気腹の安全性を検討する。本研究ではその指標として腹膜炎を呈した腹腔への気腹により菌血症の程度の変化と実験体の生存率に影響が出るかを比較検討する。

III. 方法

本研究は東京大学動物実験委員会の承認を得た上で行われた。(動物実験委員会承認番号:医-P12-38)

発育鶏卵の基本構造

発育鶏卵の構造を図 1 に示す。鳥類では尿膜腔が羊膜腔を覆い、卵殻の内側のスペースを埋めるように発達し、尿膜は卵殻を裏打ちしている漿膜と一体化する。一体化した時点で尿膜は尿漿膜、尿膜腔は尿漿膜腔と呼称が変わる。図 1 は尿膜腔が尿漿膜腔となり卵殻全体に広がった段階のものである。この尿漿膜には血管が発達し胎児のガス交換を担っている。胚にアプローチするには尿漿膜と羊膜を切開する必要がある。また、インキュベート 10 日から 12 日以降は卵殻と尿漿膜が癒着するため、そのまま卵殻を開けると尿漿膜に発達した血管を損傷し大量出血を起こす可能性がある。



ニワトリの体腔の基本構造

脊椎動物の基本的発生は共通しており、鳥類の発生においても体腔は中胚葉由来であり、体腔を覆う膜は中皮からなる[72]。ニワトリ成体の腹腔は右腹側肝腹膜腔、左腹側肝腹膜腔、腸管腹膜腔の3つのコンパートメントに分かれている[73]。発育鶏卵でそのコンパートメントが独立しているかどうかのデータはなかったため、インキュベート19日の個体を17羽解剖し解析した。横隔膜は存在せず薄い隔壁が腹腔と胸腔を隔てている。腹腔の構造は体腔にICGまたは空気を注入し観察した。成体と同様、(1)右腹側肝腹膜腔、(2)左腹側肝腹膜腔、(3)腸管腹膜腔の3つのコンパートメントが互いに独立しており液体の交通はなかった。写真とシェーマを示す。(写真1a-1e、図2)。



写真1a：尿漿膜、羊膜を切開し胚を卵殻外に出したところ

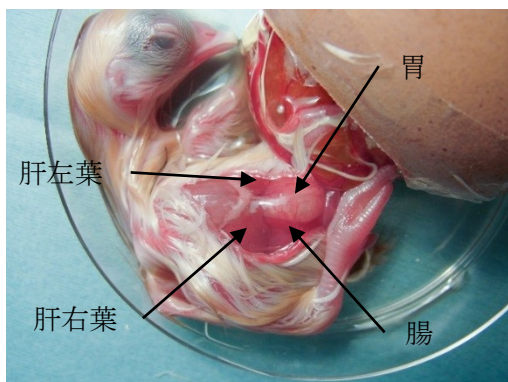


写真1b：腹壁皮膚を正中切開し、腹膜に包まれた肝臓、胃、腸を確認できる



写真 1c : 右腹側肝腹膜腔に ICG を注入

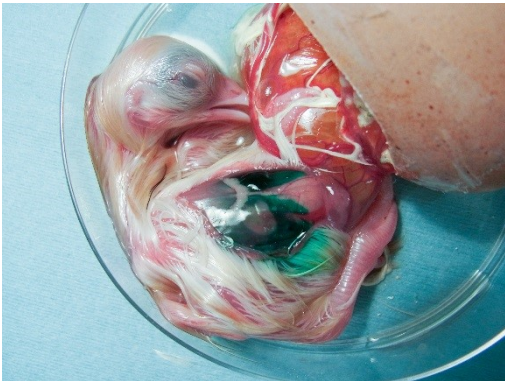


写真 1d : 右腹側肝腹膜腔に加え、左腹側肝腹膜腔にも ICG を注入した

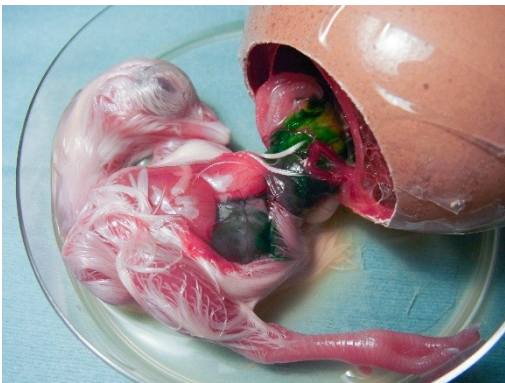
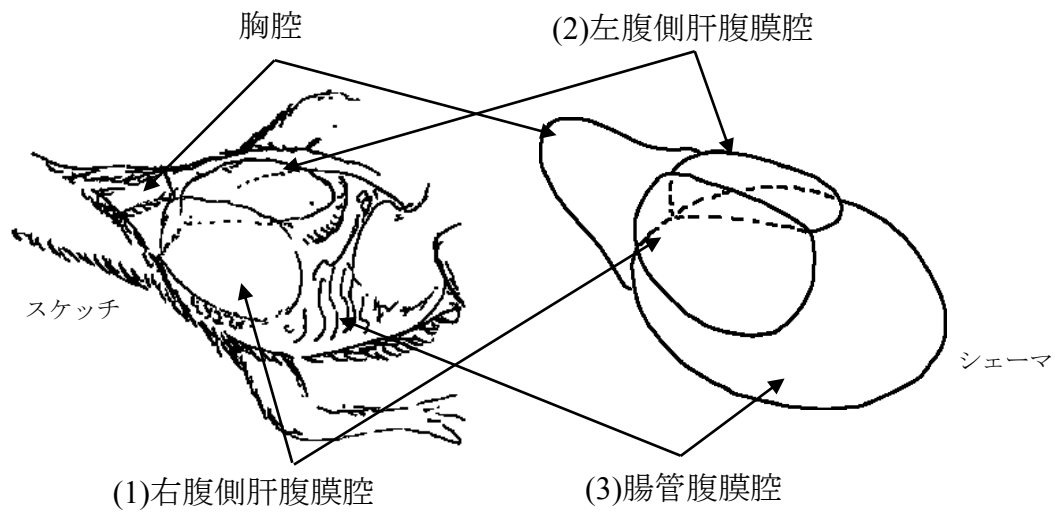


写真 1e : 別の個体で腸管腹膜腔に ICG を注入したところ。
臍帯を超えて腔が広がっているのが確認できる。

図 2 : 体腔構造のシェーマ



インキュベート日数と発生過程

通常のインキュベート条件では 21 日で孵化する。インキュベート前の貯卵期間が 4 日以内であれば孵化までの期間にほとんどばらつきはない。発育鶏卵のインキュベート日数と成長過程については **Hamburger** らが詳しく報告しているが [74]、その他の文献[75]も参考にまとめ、表 1 に示す。ヒトの発生過程と対比すると、典型的な超低出産体重児の出産週数である妊娠 28 週から 34 週程度はニワトリではインキュベート 17 日から 19 日に相当すると考えられる。

表 1：発育鶏卵インキュベート日数と成長過程

インキュベート日数	
11	腸がみえるようになる
12	尿漿膜と内卵膜が完全に融合する
13	骨の石灰化が始まる
14	胚は回転し卵の長軸と平行になる。
15	小腸が腹腔内に入る
16	卵白が吸収され脚鱗と爪が硬くなる
17	胚は卵の内側一杯に成長
18	卵黄嚢が腹腔内に入り始める
19	肺呼吸が始まる。羊水は完全に吸収
20	完全に肺呼吸となる。卵黄嚢は腹腔内に吸い込まれる。
21	ヒナが殻を破って外に出る

手術操作可能な発育鶏卵標本の作製方法

ニワトリ種は Hypeco Nera を使用した。養鶏場で放し飼いとなっている個体の有精卵を使用した。産卵から孵卵器搬入まで約 24 時間である。

孵卵器は Autoelex Co. Ltd.社製 RCOM50 を使用した。インキュベート全期間で温度 37.5°C、湿度 50%の設定を保ち、転卵は行わなかった。

有精卵を横向きに静置してインキュベートを開始。インキュベート 2 日から 3 日で気室の反対側に小孔を開け 18G 針を挿入し卵白を 5ml 吸引する(写真 2a)。小孔を塞ぎ、観察窓を開ける際に殻が割れるのを防ぐ目的でセロテープを貼り、直径 2cm の観察窓を開ける(2b, 2c)。インキュベート前の貯卵が 4 日以内の場合、孵化率、孵化期間にほぼ影響はないと考えてよいが、観察孔を開けた際に胚が日齢相当であるか確認する(2d)。セロテープで開口部を密閉する(2e)。ここまでの操作はニワトリを使った発生学の実験で一般的に用いられている方法を専門家にご指導いただき参考にした。同時期にまた日齢 8 日までの胚へのアプローチ方法が他施設より発表されており、これも参考にした[58]。

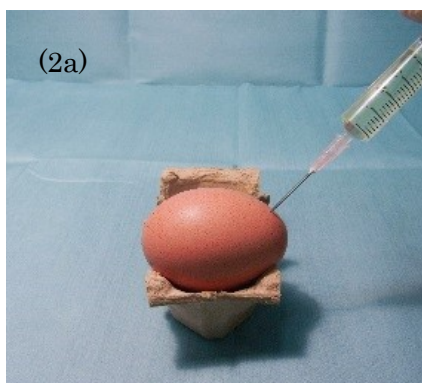


写真 2a : 卵白を吸引しているところ

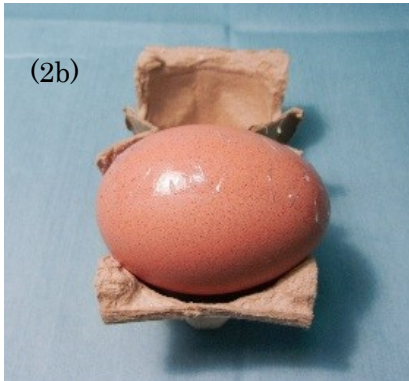


写真 2b : セロテープを貼って孔を塞ぐ。

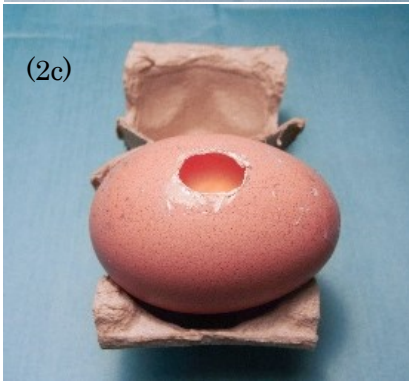


写真 2c : 観察孔を開けたところ



写真 2d : 胚を確認する

心臓が形成されているのが確認でき、これは日齢
3日相当である。

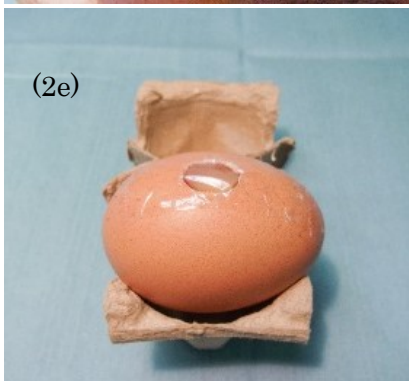


写真 2e : 観察孔をセロテープで塞ぐ

インキュベート 17 日から 19 日で観察窓を広げ、処置用窓とする。この際広げる範囲は卵殻に尿漿膜が裏打ちされていない範囲にとどめる。(写真 3a,b)

この条件でインキュベート開始時の 50%から 90%の有精卵が処置用窓を開窓時まで生存、処置用窓を開けた生存サンプルではほぼ全例が 24 時間以上生存可能であることを確認した。



写真 3a : 処置用窓を開けたところ
写真は 18 日の胚である。黒色の羽毛を持つ個体で写真左側に頭部、右側に体幹を確認できる。

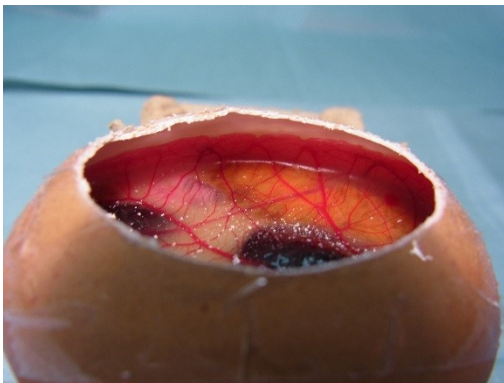


写真 3b : 処置用窓を横から見たところ
卵殻の切除線が血管豊富な尿漿膜が裏打ちしていない部分であることが確認できる。

腹膜炎モデル・気腹モデルの作成

(a) アプローチ経路（腸管腹膜腔内接種・気腹）

処置用窓を開けた後、尿漿膜、羊膜を切開し右脚を確保し卵殻外に牽引する。こうすることで処置用窓から腹部の右側半分へ直視下に操作を加えることができる。腸管腹膜腔へのアプローチは卵黄茎の右側外側とした。この部位からでは腸管腹膜腔に直接注入できる。予備実験 1 回あたり 30 個、2 回のセッションで穿刺し ICG を注入後、腸管腹膜腔に入っているかを確認したところ 2 回目のセッションでは 18 日のものではほぼ確実に注入できることを確認した。穿刺針は 27G を使用した。（写真 4）

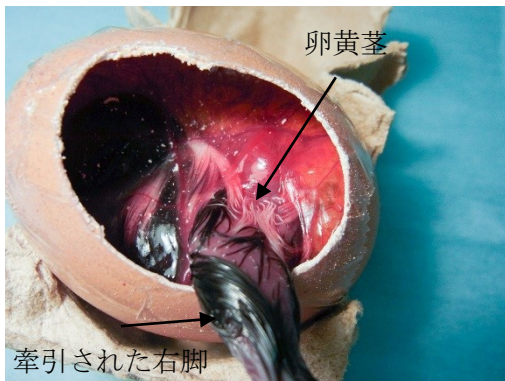


写真 4：

右脚を卵殻外に牽引し腹部右側を露出する。

(b) 鳥類病原性大腸菌

「東京大学農学部食の安全センター」関崎教授より分与されたニワトリに繊維性腹膜炎を起こした avian pathogenic E. coli 株 S-60 を使用。分与後液体 LB 培地で培養、グリセリン添加して凍結保存し必要時に少量ずつ再培養した。腹腔注入用の懸濁液の調整は LB 培地 1ml に株を凍結保存した培地を白金耳 1 かきで添加、37.5°C で 12 時間以上培養したものを使用した。発育鶏卵への接種量は 0.1ml に固定し目的の濃度に希釈して使用した。各実験で大腸菌濃度を確認し 12 時間以上の培養で安定した大腸菌濃度が得られることを確認した。大腸菌濃度の分布を示す。(図 3)

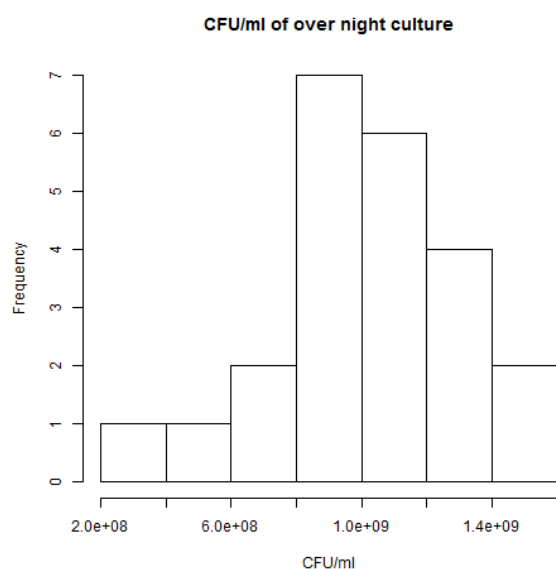


図 3 :

12 時間以上培養した大腸菌培養液の大腸菌濃度の分布

一連の実験を通して作成した培養液の濃度分布を示した。

縦軸はサンプル数、横軸は大腸菌濃度 (colony forming unit / ml) である。

(c) 病原性の確認・大腸菌接種量の決定

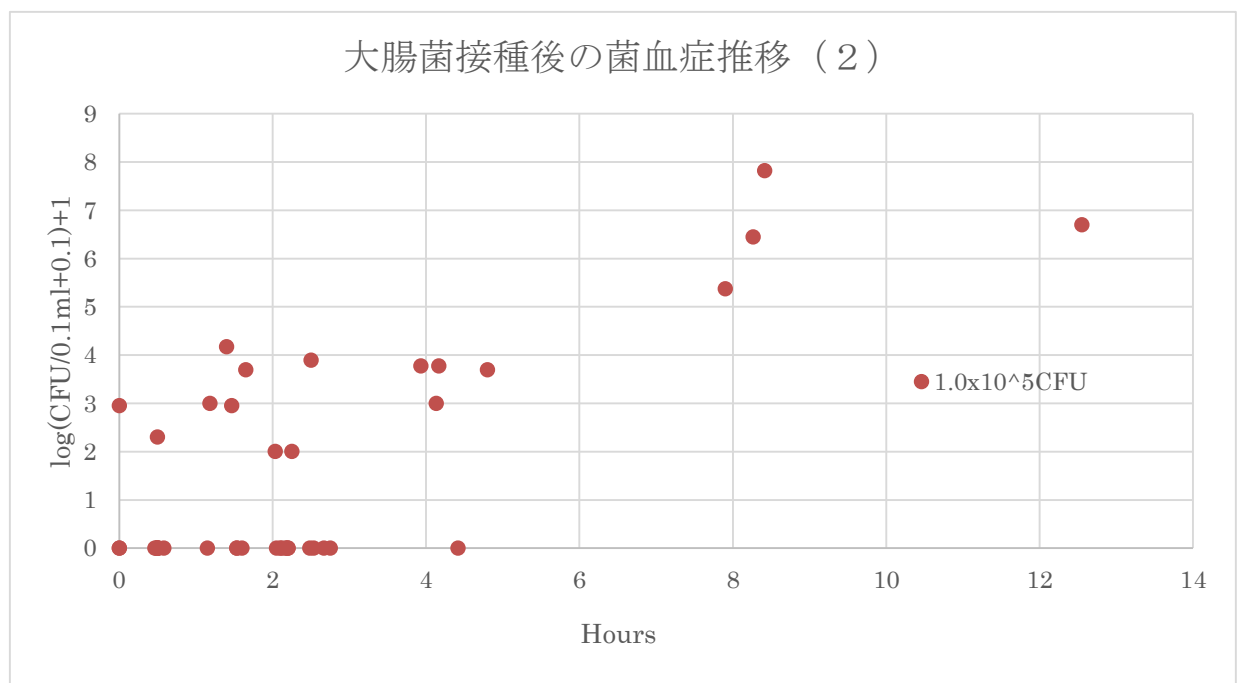
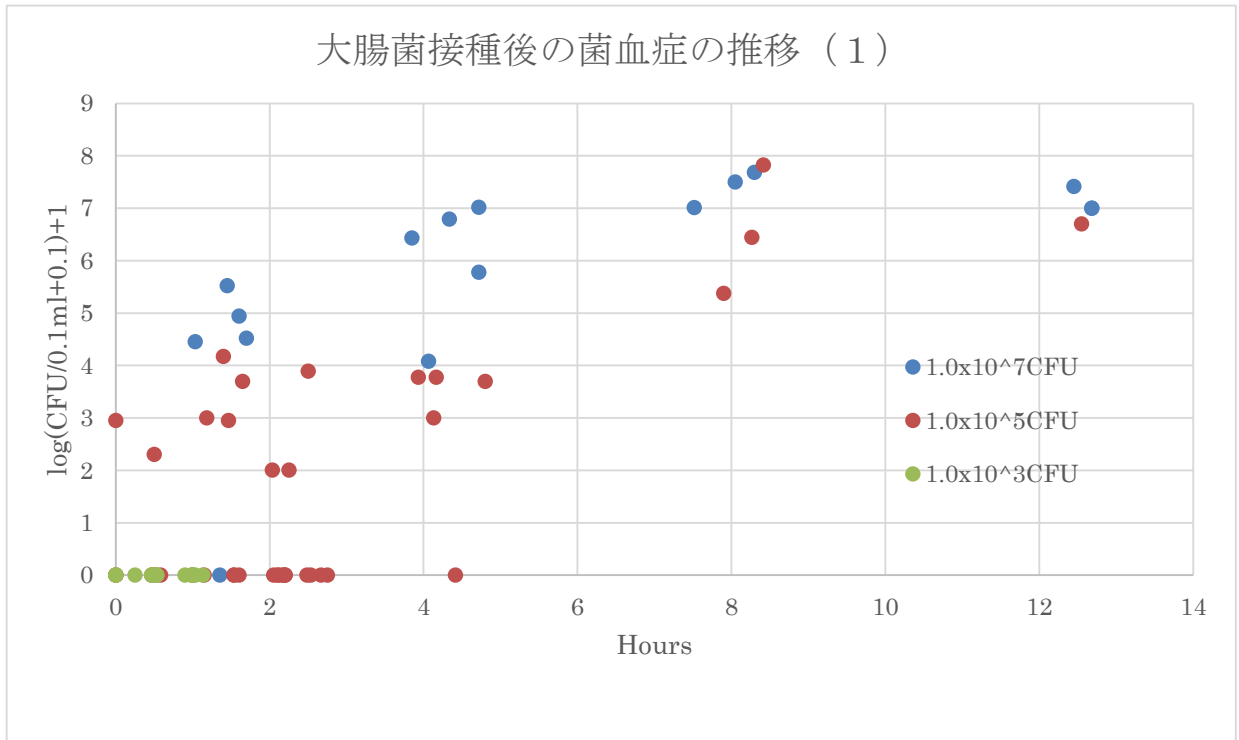
予備実験において腸管腹膜腔投与による病原性の確認と接種量の決定のため、異なる大腸菌量を接種した後に一定時間で採血を行い菌血症の程度を測定した。同時に個体の死亡がどの程度であるかも確認した。

大腸菌接種量別の接種後時間-菌血症程度の散布図を図 4 に示す。

8 時間までは当初の接種細菌量が多いほど血液内の大腸菌量濃度は高く、また時間の経過に伴っても高くなる傾向が見て取れる。8 時間を超えると死亡する個体が増えるようになり 12 時間後の採血を予定していた検体では半数が死亡し採血できなかった。また採血できた個体に関してはコロニー数が 10^7 個を程度で頭打ちとなる傾向があり、この一定量を超えると個体の死亡率が高まることが予想された。以上の結果を踏まえ接種する大腸菌量は 1.0×10^5 CFU とし、菌血症を評価する上で採血のタイミングを大腸菌接種後 2 時間と 6 時間に設定した。

図 4

(1)異なる大腸菌量3群で大腸菌接種後時間-菌血症量の散布図を示す.横軸は大腸菌接種後時間、縦軸はコロニー数を $\log(\text{CFU}/0.1\text{ml blood}+0.1)+1$ と変換し 0 の場合は 0 に 1 以上は対数スケールで表現している。赤丸で示した $1.0 \times 10^5 \text{CFU}$ 接種群は接種後 2 時間以内で多数がコロニー数 0 となっているがプロットが重なり見えない。(2) $1.0 \times 10^5 \text{CFU}$ のデータのみ示す。



(d) 気腹方法の開発・気腹の設定

気腹には二酸化炭素を使用した。卵黄の外側には腸管腹膜腔と連続性のある潜在的なスペースがあり、気腹を行うとこのスペースにも二酸化炭素が流入する。(写真 5、図 5a, 5b) 気腹の設定に関しては、気腹圧を一定にするを目的として予備実験で簡易圧力計を自作し気腹圧の測定を試みた。腸管腹膜腔の圧が 7~10cm 水柱になると潜在スペースに二酸化炭素が流入するようになり、圧が 1cm~5cm 水柱にさがる傾向は見てとれたが(図 6)、測定結果は安定せず、測定に伴い腹壁が損傷するため、圧を一定にする方法は取りやめた。代替案として胚に損傷がない範囲で可及的に圧を高めるよう一定量の二酸化炭素を注入する方針とし、予備実験を行い、注入量を決定した。気腹量は 8ml で卵殻ほぼいっぱいになり、10ml では破損例が増えるため 8ml の注入とした。



写真 5 : 気腹したところ

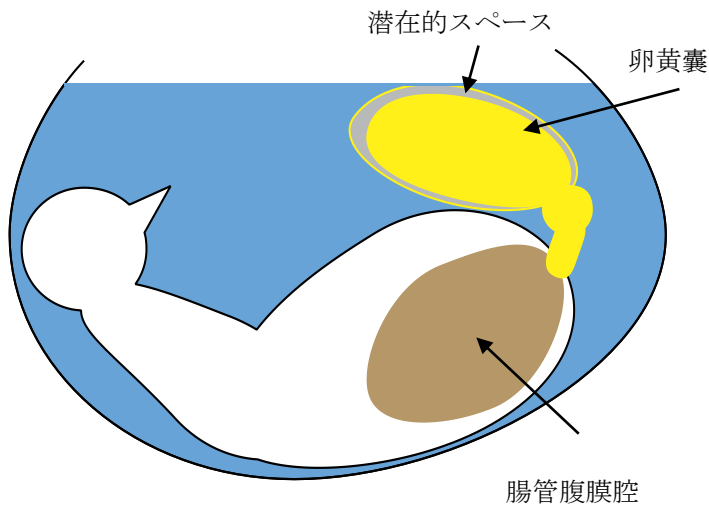


図 5a :
 気腹時に広がる潜在スペース
 のシェーマ
 灰色で示した部分が潜在スペース

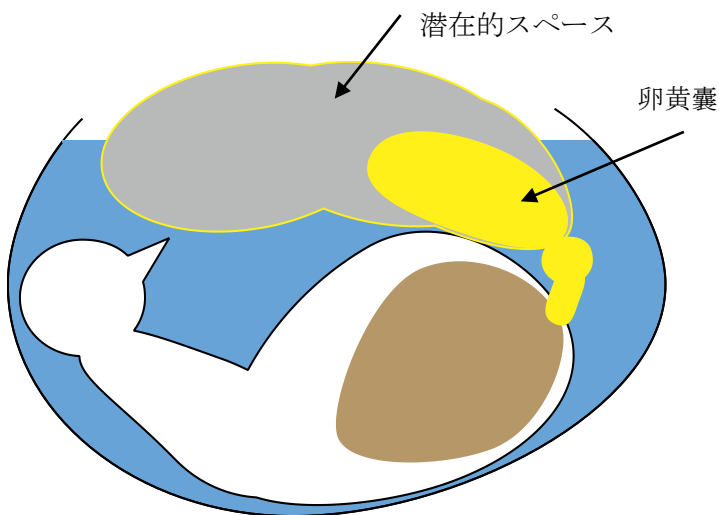


図 5b :
 気腹をしたときにスペース
 が顕在化した様子を示す。

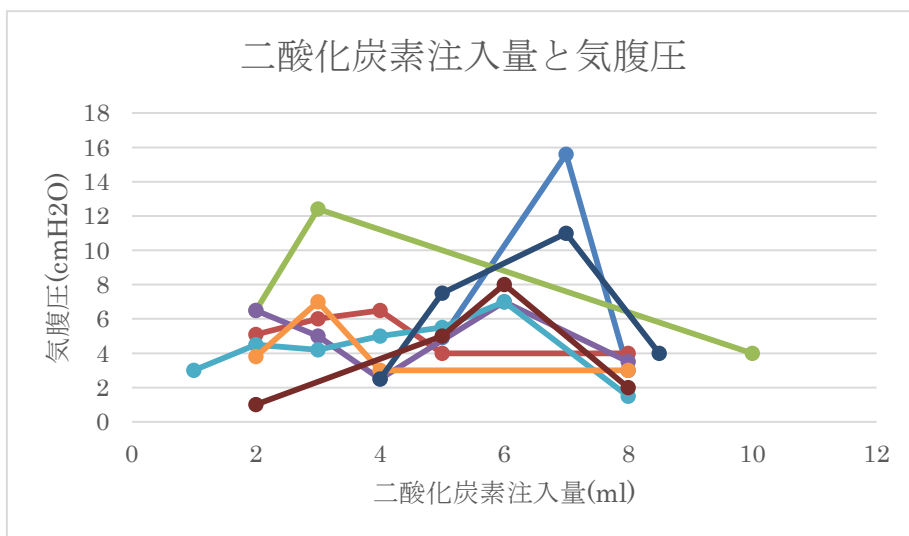


図 6
 腸管腹膜腔に二酸化炭素を注入し、その注入量と腸管腹膜腔の圧の関係をプロットした。計 6 個体でのデータを示す。

(e) 採血

総頸動静脈直上皮膚を切開し動静脈を露出し 27G 針を直接穿刺して採血を行う。

この方法で 1 個体当たり 0.2ml から 1.0ml が採取できる。シリンジよりヒト乳幼児血算用のマイクロ採血管に注入し混盪する。コロニー数を測定するときは、その後採血管よりピペッターで 100 μ l 採取し MacConkey 培地に散布する。安定して 100 μ l 採取、MacConkey 培地に散布できる最低採血量はシリンジの目盛りで 0.15ml 以上の時であり、これ以下しか採血できなかつた場合を採血失敗とした。採血失敗は初期の実験で 1 回の実験（約 30 個体）あたり 1 個体程度で、その後はほぼ失敗なく採血できるようになった。死亡している個体からはこの方法でも心腔内採血でも十分量を採血することはできなかつたため実験途中で死亡した個体は実験から除外した。

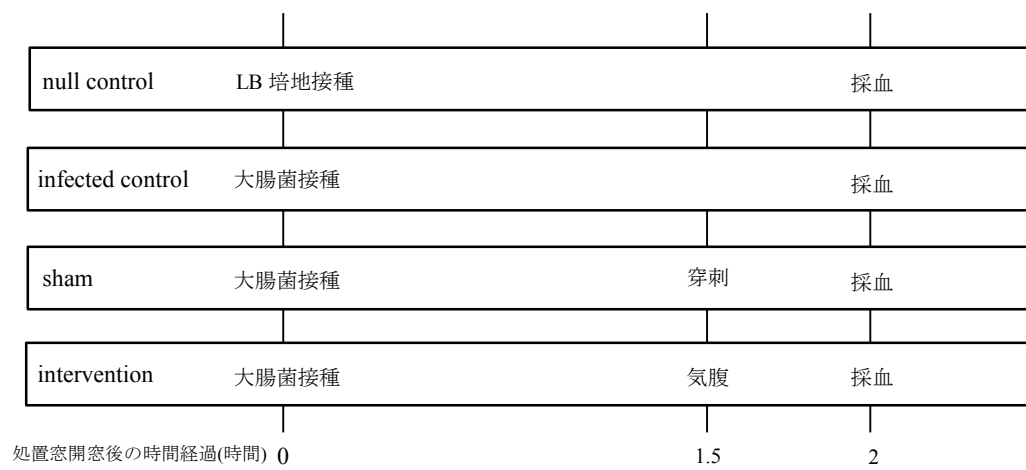
実験 1：気腹が菌血症に与える影響

(a) 穿孔早期モデル

インキュベート 17.8-18.5 日で処置用窓を開け腹膜炎モデルを作成した。大腸菌注入後 1.5 時間後に気腹を行う。さらに 30 分後に採血を行う。

実験群は(1) null control: 処置用窓を開けた後、大腸菌液の代わりに LB 培地 0.1ml を注入。その後処置を加えずに採血する。(2) infected control: 大腸菌液のみ注入し気腹は行わずに採血する。(3) sham: 大腸菌液を注入し、1.5 時間後に気腹のための穿刺のみ行い気腹はしない。さらに 30 分後に採血する。(4) intervention: 大腸菌液注入後 1.5 時間で気腹を行う。さらに 30 分後に採血する。の 4 群とした。プロトコルを図 7 に示す。一回に扱う卵の数は孵卵器の制約から 30 個以下か 60 個以下となり、各回において null control を除く 3 群の検体数はほぼ同数になるように割り付けた。

図 7：穿孔早期モデルプロトコル



血液培養

採取した血液サンプル 100 μ l を MacConkey 培地 (マッコンキーカンテン平板生培地 日局試験用、コージンバイオ製) にスプレッドし 37.5°C で 24 時間培養しコロニー数を確認する。

(b) 穿孔晚期モデル

大腸菌液注入後 5.5 時間で気腹処置を行い、採血を 6 時間後とした。実験群は穿孔早期モデルのうち null control を除いた同様の 3 群とした。一回に扱う卵の数は孵卵器の制約から 30 個以下か 60 個以下となり、各回において 3 群の検体数はほぼ同数になるように割り付けた。早期モデルと同様に血液培養を行い、コロニー数を確認した。(図 8)

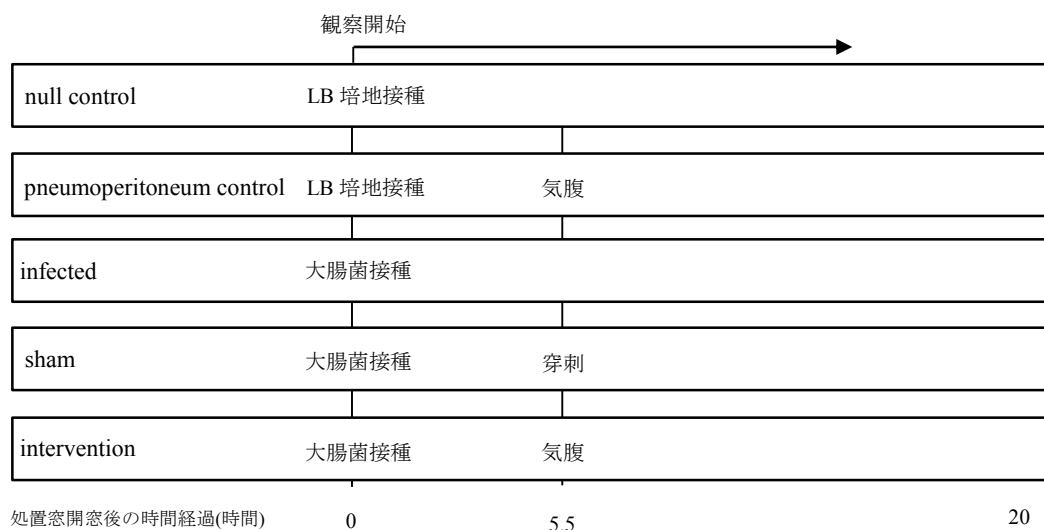
図 8 : 穿孔晚期モデルプロトコール



実験 2 : 生存曲線解析

穿孔晚期モデルにならない、腹膜炎モデル作成後 5.5 時間後に気腹操作を行い、その後の個体の生死を 1 時間ごとに確認した。生死は尿漿膜血管の拍動の有無で判断した。比較群は(1) null control: LB 培地の注入のみ、(2) pneumoperitoneum control: LB 培地注入と気腹、(3) infected control: 大腸菌液注入のみ、(4) sham: 大腸菌液注入と気腹のタイミングで穿刺のみ行う、(5) intervention: 大腸菌液注入と気腹を行う、の 5 群で行った。観察期間は注入から 20 時間とした。一回に扱う卵の数は孵卵器の制約から 30 個以下か 60 個以下となり、各回において 5 群の検体数はほぼ同数になるように割り付けた。プロトコールを図 9 に示す

図 9 : 生存曲線解析プロトコール



データ解析

血液培養コロニー数の解析には Kruskal-Wallis 検定および Exact Wilcoxon Mann-Whitney Rank Sum Test (Mann-Whitney's U 検定)を用いた。生存曲線解析は Log-rank 検定および Cox 比例ハザードモデルによる解析とした。各解析の計算は R でプログラムを作成・実行して行った。

IV. 結果

実験 1：気腹が菌血症に与える影響

(a) 穿孔早期モデル

計 12 回の実験を行った。LB 培地接種後、採血前に死亡したものはなかった。大腸菌接種後から採血までの死亡は 7 例（採血の失敗を含む）、気腹後から採血までの死亡は 4 例、穿刺後から採血までの死亡は 2 例（いずれも採血の失敗を含む）でこの 13 例は解析に組み入れなかった。null control: 25 例、infected control: 67 例、sham: 67 例、intervention: 66 例、計 225 例が解析に組み入れられた。

各群の大腸菌注入から採血までの平均時間は null control: 2.265 時間、infected control: 2.193 時間、sham: 2.179 時間、intervention: 2.163 時間であった。採血時間の分布を図 10 に示す。採血時間にばらつきはあるものの群間で採血時間に有意な差はなかった。（Kruskal-Wallis 検定 $p=0.99$ ）。

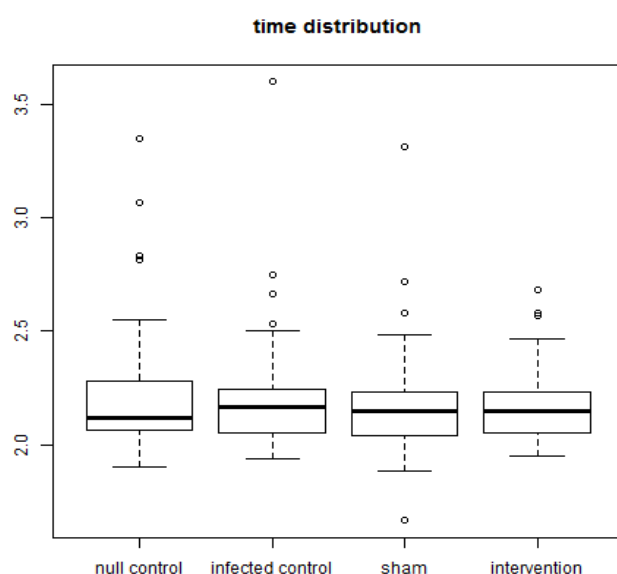


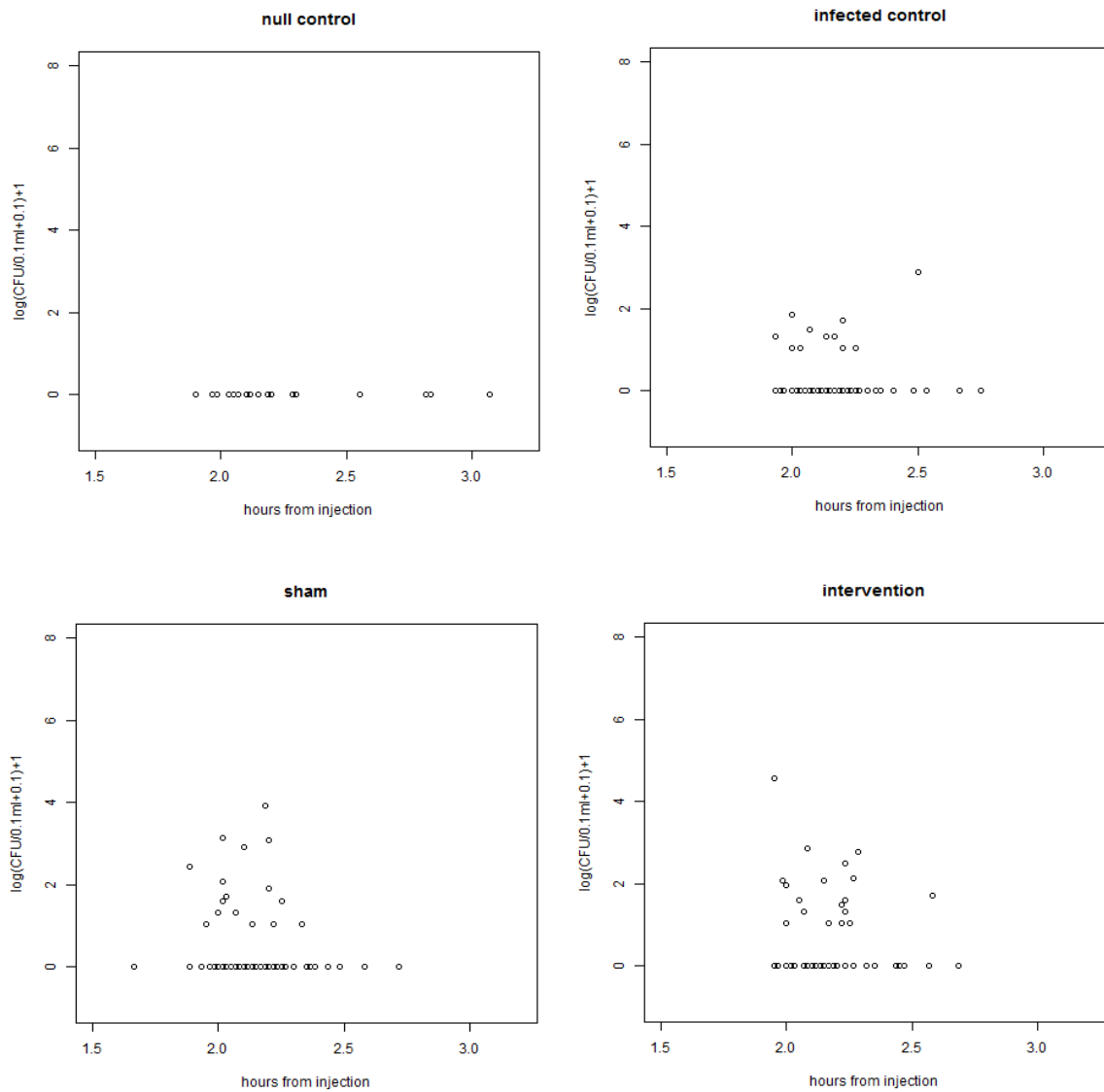
図 10：採血までの時間の分布

縦軸は時間、中央の太線は中央値、箱の上端下端はそれぞれ第 3 四分位値 (Q3)、第 1 四分位値 (Q1) を示す。ひげの長さは Q1, Q3 より 1.5IQR 以内のデータ存在範囲を示す。白丸は外れ値。

群内の採血時間と血液培養コロニー数の散布図を示す。各群とも採血時間とコロニー数に有意な相関はなかった。(infected control: $p=0.26$, sham: $p=0.86$, intervention: $p=0.17$)。(図 11)

図 11 : 各群の採血時間とコロニー数の散布図

群名は各グラフのタイトルに示す。縦軸はコロニー数を表す。colony forming unit を $\log_{10}(\text{CFU}/0.1\text{ml}+0.1)+1$ と変換した。この変換により菌を検出できなかった場合を縦軸で 0 と表現したうえでコロニー数を対数スケールで表している。横軸は接種-採血時間である。各群ともコロニー数と採血時間に明らかな相関は見られない。



群間におけるコロニー数の差の検討

各群の標本数とコロニー数の分布を表 2 と図 12 に示す。

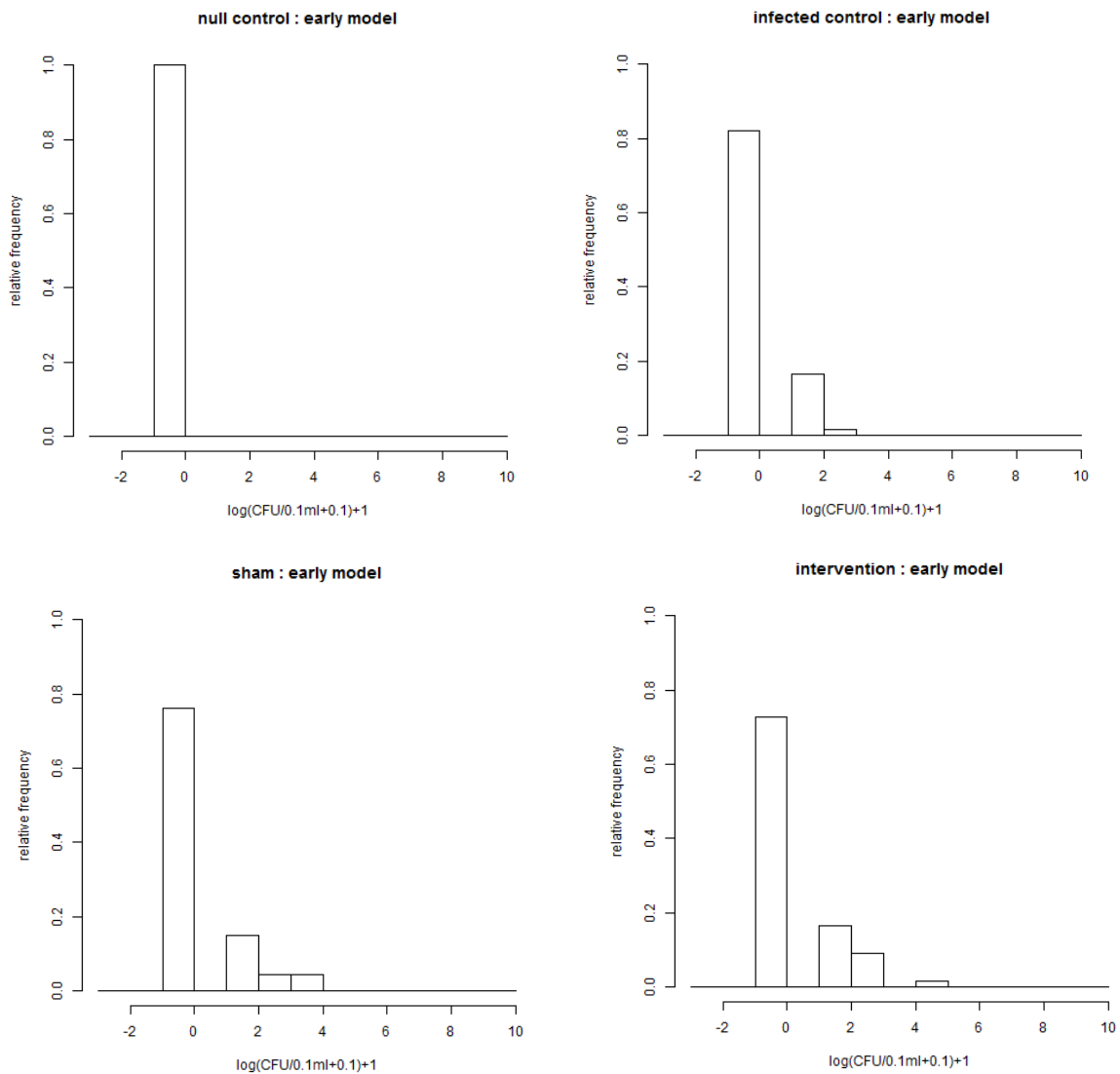
null control は全例で大腸菌を検出しなかった。infected control では 82%、sham では 76%の標本で大腸菌を検出せずコロニー数の第 3 四分位値も 0 となった。intervention では 72%で大腸菌を検出しなかった。各群のコロニー数の平均値は null, infected control, sham, intervention の順で、0、1.6、17.95、64.7 であった。図 12 に見てとれるとおり、各群ともコロニー数の分布は大きく正規分布から外れている。

表 2：各群の標本数とコロニー数分布の代表値

	null control	infected control	sham	intervention	total
標本数	25	67	67	66	225
コロニー数(CFU/0.1ml)					
最小値	0	0	0	0	
第 1 四分位値	0	0	0	0	
中央値	0	0	0	0	
平均	0	1.6	17.95	64.7	
第 3 四分位値	0	0	0	1	
最大値	0	78	864	3840	

図 12 : 各群におけるコロニー数分布のヒストグラム

群名は各グラフタイトルに示す。縦軸は相対頻度、横軸は 0.1ml あたりの colony forming unit 数の対数表示である。対数表示にあたり $\log_{10}(\text{CFU}/0.1\text{ml}+0.1)+1$ の変換を行った。各群ともコロニー数 0 の標本数が 4 分 3 以上を占め、大腸菌の検出数が多い標本は指数関数的に減っていき、分布は正規分布から大きくゆがんでいる。



コロニー数の分布を比較する。(図 13) コロニー数は有意な差が検出 (Kruskal-Wallis 検定 $p=0.02$)されたが、Exact Wilcoxon Mann-Whitney Rank Sum Test で 2 群間の差を検討すると null control と各群に有意な差があったが null control を除く 3 群のうちどの 2 群をとっても有意な差は検出できなかった。(表 3)

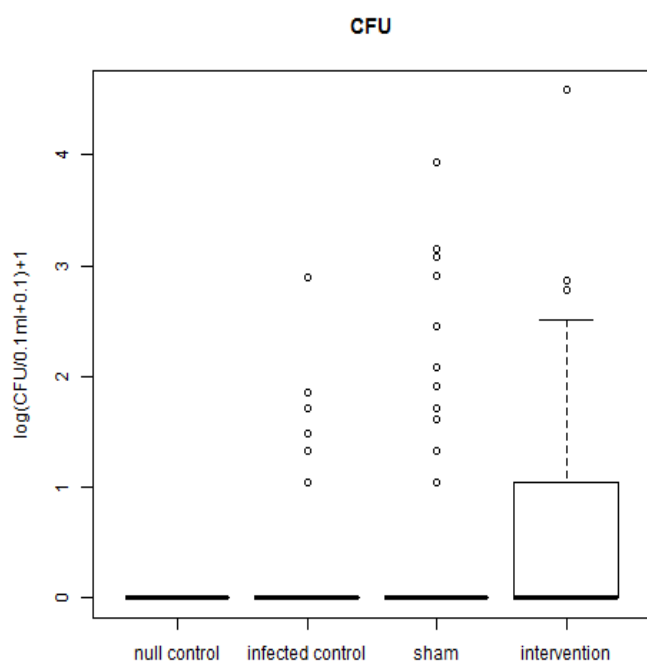


図 13 : 各群の CFU 分布の比較

各群のコロニー数分布を箱ひげ図として比較する。

箱の上端下端はそれぞれ第 3 四分位値(Q3)、第 1 四分位値(Q1)を示す。ひげの長さは Q1,Q3 より 1.5IQR 以内のデータ存在範囲を示す。白丸は外れ値。

Null control, infected control, sham では $Q1=Q3=0$ のため 0 以外の値はすべて外れ値として表現される。

表 3 : Exact Wilcoxon Mann-Whitney Rank Sum Test における各 2 群間の p 値の結果
縦の群名、横の群名の交わった枠にその 2 群間の p 値を示す。

	infected control	sham	intervention
null control	0.037	0.016	0.004
infected control		0.50	0.12
sham			0.39

(b) 穿孔晩期モデル

晩期モデルにおいても早期モデルと同様の解析を行った。計 4 回の実験を行った。大腸菌接種後から採血までの死亡は 2 例、穿刺後から採血までの死亡は 1 例、気腹後から採血までの死亡はなく、この 3 例は解析に組み入れなかった。解析された標本数は infected control: 22 例、sham: 23 例、intervention: 25 例の計 70 例であった。

各群の大腸菌接種から採血までの平均時間は infected control: 6.126 時間、sham: 6.178 時間、intervention: 6.228 時間であった。(図 14) 採血時間の分布をグラフに示す。採血時間にばらつきはあるものの群間で採血時間に有意な差はなかった。(Kruskal-Wallis 検定 $p=0.82$)。

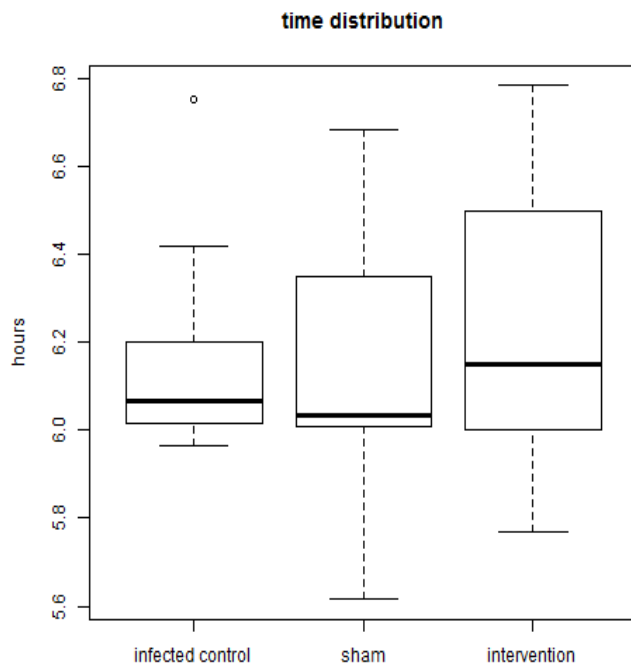


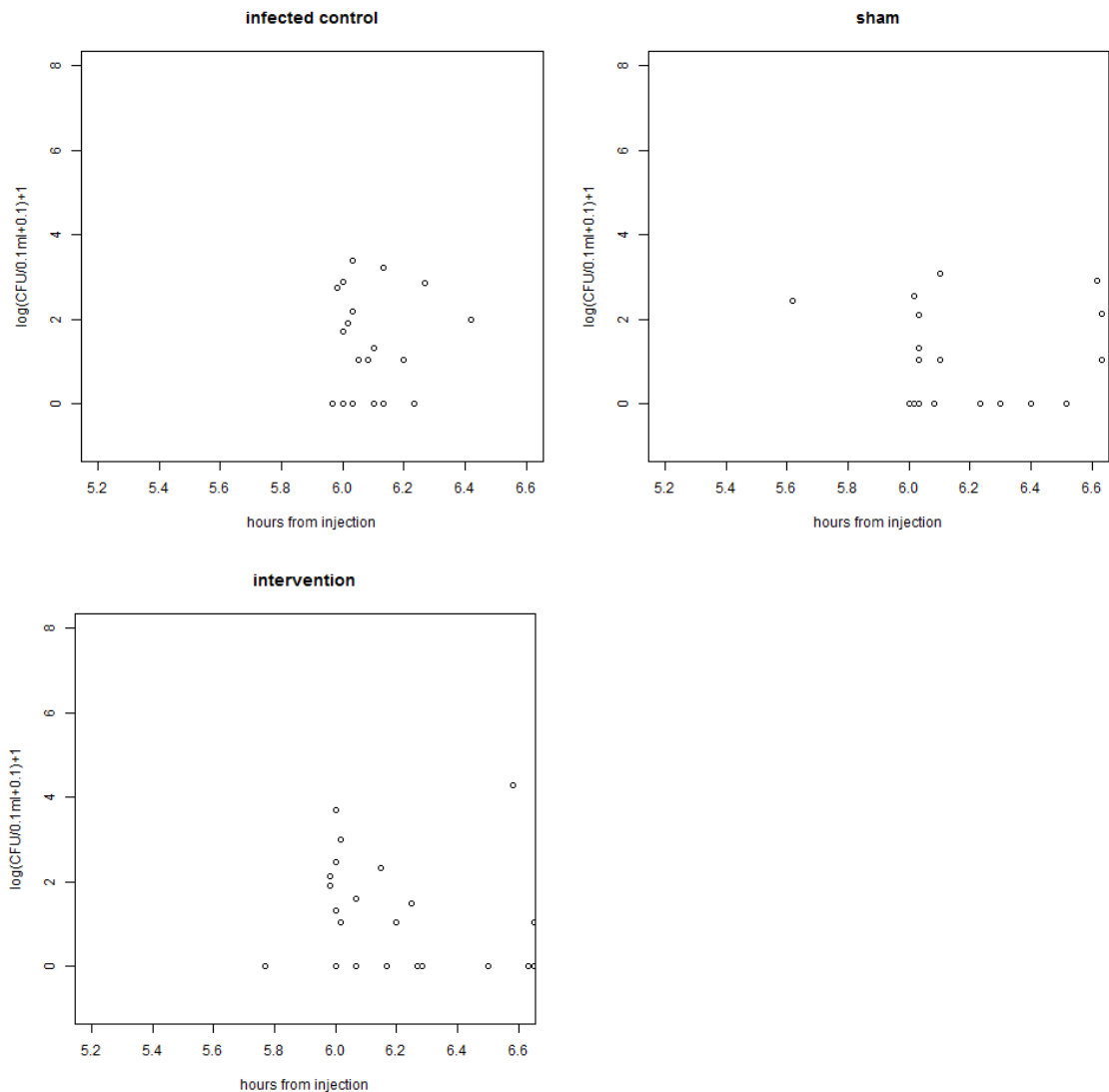
図 14 : 採血までの時間の分布

縦軸は時間、中央の太線は中央値、箱の上端下端はそれぞれ第 3 四分位値(Q3)、第 1 四分位値(Q1)を示す。ひげの長さはQ1,Q3より 1.5IQR以内のデータ存在範囲を示す。白丸は外れ値。

群内における採血時間と血液培養コロニー数を図 15 に示す。各群とも採血時間とコロニー数に有意な相関はなかった (infected control: $p=0.59$, sham: $p=0.80$, intervention: $p=0.34$)。

図 15 : 各群の採血時間とコロニー数の散布図

群名は各グラフのタイトルに示す。縦軸はコロニー数を表す。colony forming unit を $\log_{10}(\text{CFU}/0.1\text{ml}+0.1)+1$ と変換した。この変換により菌を検出できなかった場合を縦軸で 0 と表現したうえでコロニー数を対数スケールで表している。横軸は接種-採血時間である。各群ともコロニー数と採血時間に明らかな相関は見られない。



群間におけるコロニー数の差の検討

各群の標本数とコロニー数の分布を表 4 と図 16 に示す。

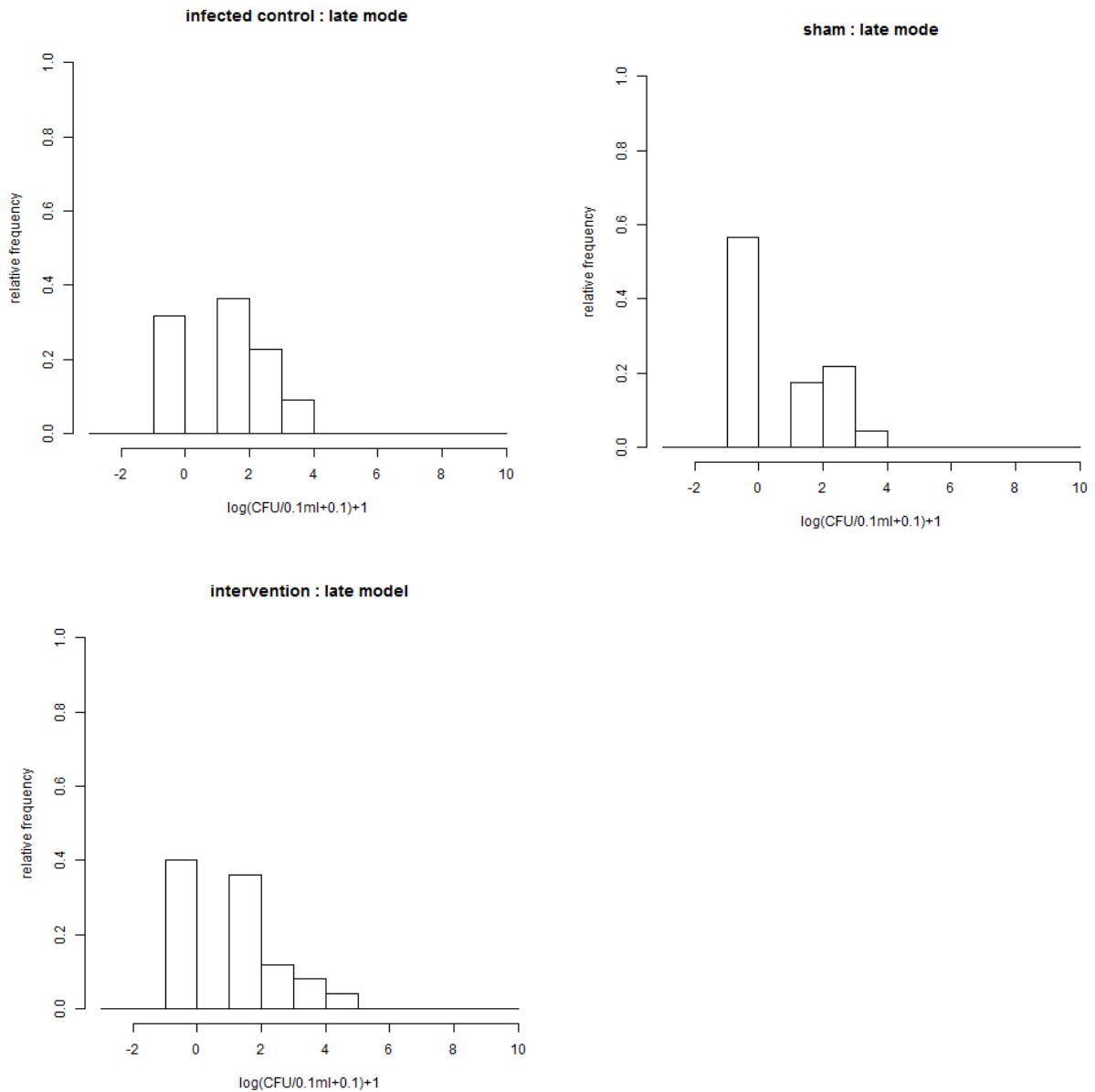
infected control では 68%、sham では 44%、intervention では 60%の検体で大腸菌を検出した。各群のコロニー数の平均値は infected control, sham, intervention の順で、22.8、11.28、36.16 であった。図 14 に見てとれるとおり、やはり各群ともコロニー数の分布は正規分布から外れている。

表 4：各群の標本数とコロニー数分布の代表値

	infected control	sham	intervention	total
標本数	22	23	25	70
コロニー数(CFU/0.1ml)				
最小値	0	0	0	
第 1 四分位値	0	0	0	
中央値	1	0	1	
平均	22.8	11.28	36.16	
第 3 四分位値	6.5	1.75	11	
最大値	252	123	499	

図 16 : 各群におけるコロニー数分布のヒストグラム。

群名は各グラフタイトルに示す。縦軸は相対頻度、横軸は 0.1ml あたりの colony forming unit 数の対数表示である。対数表示にあたり $\log_{10}(\text{CFU}/0.1\text{ml}+0.1)+1$ の変換を行った。各群とも大腸菌を検出しない検体数は半数程度。分布はやはり正規分布からゆがんでいる。



各群におけるコロニー数の分布を図 17 に示す。3 群間でコロニー数に有意な差は検出されなかった(Kruskal-Wallis 検定 $p=0.53$)

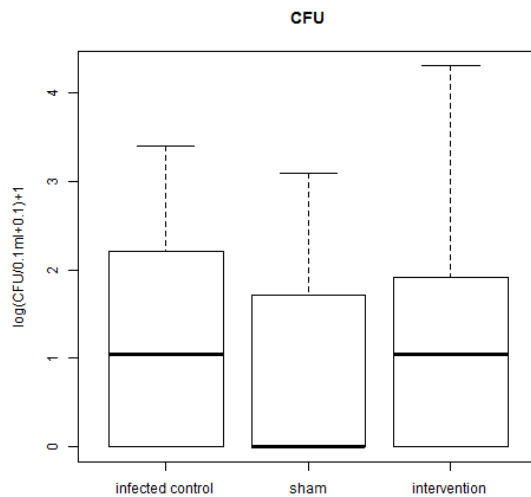


図 17 : 各群の CFU 分布の比較

箱の上端下端はそれぞれ第 3 四分位値 (Q3)、第 1 四分位値(Q1)を示す。ひげの長さはQ1,Q3 より 1.5IQR 以内のデータ存在範囲を示す。白丸は外れ値。

Wilcoxon Mann-Whitney Rank Sum Test において 2 群間の差を検定したがどの 2 群間においても有意な差は検出されなかった。(表 5)

表 5 : Exact Wilcoxon Mann-Whitney Rank Sum Test における各 2 群間の p 値の結果
縦の群名、横の群名の交わった枠にその 2 群間の p 値を示す。

	sham	intervention
infected control	0.50	0.70
sham		0.28

実験 2 : 生存曲線解析

腹膜炎モデル作成後 5.5 時間後に気腹操作を行い、個体の生死を 1 時間ごとに確認した。比較群は(1) null control: LB 培地の注入のみ、(2) pneumoperitoneum control: LB 培地注入と気腹、(3) infected control: 大腸菌液注入のみ、(4) sham: 大腸菌液注入と気腹のタイミングで穿刺のみ行う、(5) intervention: 大腸菌液注入と気腹を行う、の 5 群で行った。穿孔晚期モデルに相当する各群での生存曲線解析を計 7 回行った。LB 培地または大腸菌接種後、5.5 時間後までの死亡は LB 注入で 0 例、大腸菌液注入で 4 例であった。この 4 例は死亡の時点では infected control、sham、intervention のどの群に割り付けられるか決定されていなかったため解析に組み入れなかった。また sham 群で穿刺時の血管損傷が明らかだった 2 例を解析の対象外とした。各群の標本数を表 6 に示す。

表 6 : 生存曲線解析に用いた各群の標本数

null control	pneumoperitoneum control	infected control	sham	intervention
15	16	14	12	14

生存曲線を図 18 に示す。期間中の生存率は null control : 86.6%、pneumoperitoneum control : 70%、infected control : 19.4%、sham : 33.3%、intervention : 14.3%であった。Log-rank 検定では 5 群間に有意な差を検出した($p=0.0024$)。各 2 群間の有意差を検討すると、有意な差があったのは null control と infected control、sham、intervention 間、pneumoperitoneum control と sham、intervention 間であった。気腹の有無のみ違

う null control と pneumoperitoneum control 間や infected control と intervention 間など、
 その他の 2 群間では有意な差を検出できなかった。(表 7)

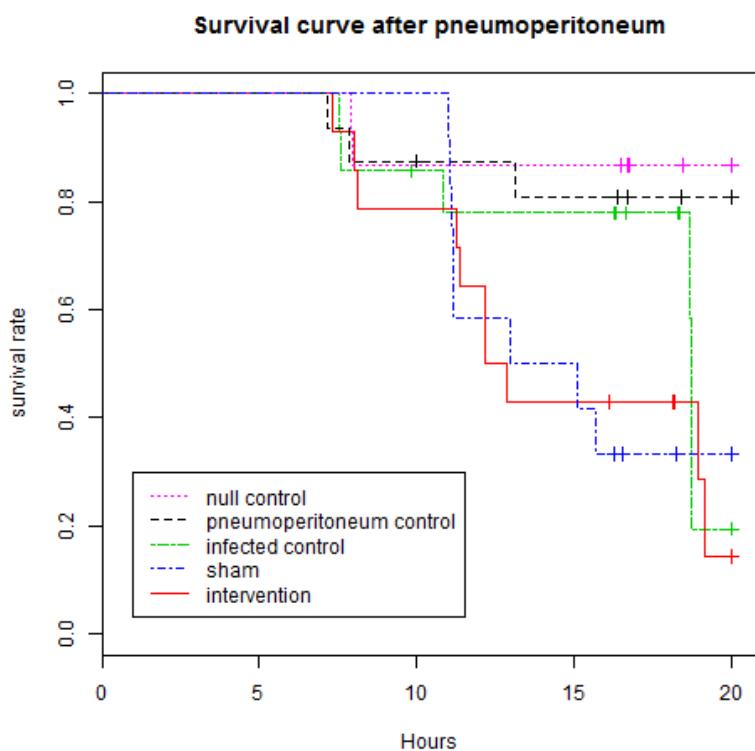


図 18:穿孔晚期モデルにおける生存曲線

縦軸は生存率、横軸は LB 培地または大腸菌液接種からの経過時間

期間中の生存率は null control : 86.6%、pneumoperitoneum control : 70%、infected control : 19.4%、sham : 33.3%、intervention : 14.3%であった

表 7 : Log rank test における 2 群間の p 値の結果

縦の群名、横の群名の交わった枠にその 2 群間の p 値を示す。網掛けは 5%水準で有意であるペア

	pneumoperitoneum control	infected control	sham	intervention
null control	0.654	0.033	0.0095	0.0024
Pneumoperitoneum control		0.090	0.023	0.0055
infected control			0.24	0.39
sham				0.97

コックス比例ハザードモデルによる解析は感染の有無においてハザードの比例性の仮説が棄却されるためそれ以上の解析を行わなかった。Schoenfeld 残差による比例性の解析結果を図 19a-c に示す。

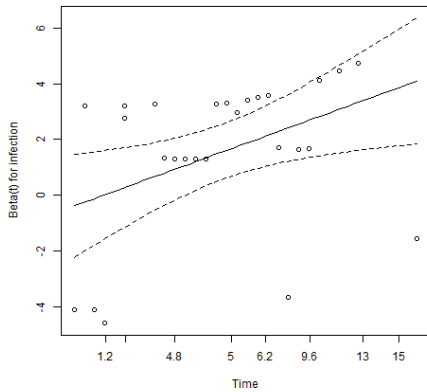


図 19a : Schoenfeld 残渣解析、感染の有無によるハザード比の時間依存性
 $r=0.47$, $p=0.006$ で有意に正の相関があり、ハザード比は時間経過とともに有意に増大する

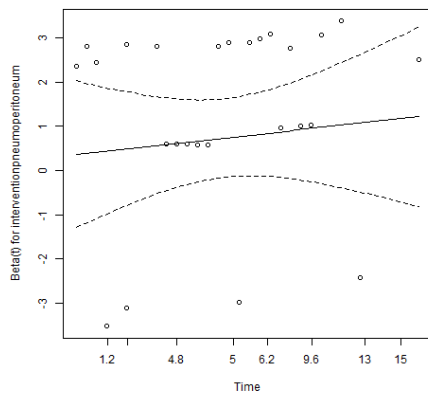


図 19b : Schoenfeld 残渣解析、気腹の有無によるハザード比の時間依存性
 $r=0.069$, $p=0.71$ でハザード比は時間で変化しないという仮説は棄却されない。

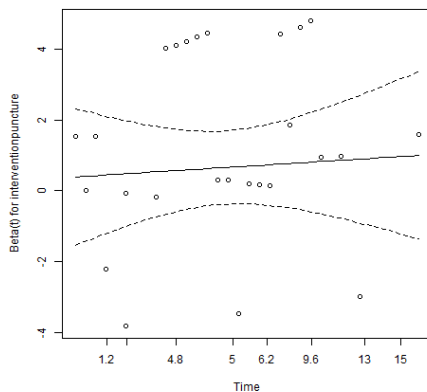


図 19c : Schoenfeld 残渣解析、穿刺の有無によるハザード比の時間依存性
 $r=0.11$, $p=0.57$ でハザード比は時間で変化しないという仮説は棄却されない。

V. 考察

早期モデルにおけるデータの解釈

穿孔早期モデルは腸管腹膜腔感染後、大半の検体で菌血症を起こしていない時期を想定したモデルとした。infected control の 80%の検体で菌血症は検出できず、大腸菌接種-採血の時間設定は適切であったと考える。null control では全例で菌血症は検出されず、操作の際のコンタミネーションが起きている可能性は非常に低く、実験手技に大きな問題は起きていないと考えた。また、接種した大腸菌以外の細菌がコロニーを形成することがないことが示された。infected control、sham、intervention の各群のコロニー数ヒストグラムでは検出なしが 75%前後を占め、分布としては正規分布からは大きく異なるため、解析はノンパラメトリックな解析の検出力が高いと判断した。

実際の実験では大腸菌接種-採血時間を正確にそろえることはできなかった。そのため採血時間のばらつきがコロニー数に影響をおよぼしていないか検討した。Kruskal-Wallis 検定で 4 群間大腸菌接種-採血時間の差を検討したが $p=0.99$ と有意な差はなかった。次に各群内で大腸菌-採血時間とコロニー数に相関がないかを検討したがどの群においても有意な相関はなかった。以上より早期モデル内における大腸菌接種-採血時間のばらつきによるコロニー数への影響はほぼないと考えてよいと判断した。

群間におけるコロニー数の差に関する解析では Kruskal-Wallis 検定を行い 4 群間でコロニー数に有意な違いが検出された($p=0.02$)。しかし各 2 群の組み合わせで 2 群間のコロニー数を Exact Wilcoxon Mann-Whitney Rank Sum Test で解析すると、null control とその他の群間でのみ有意な差が検出された。Kruskal-Wallis 検定で検出された有意差は null control とその他の群との差に由来するものであり、infected control、sham、intervention の 3 群間には有意な差はないと考えてよい。したがって早期モデルでは気腹のための穿刺、穿刺と気腹、どちらも菌血症の発生、悪化に影響を及ぼしていないと判断できる。

晚期モデルにおけるデータの解釈

穿孔晚期モデルでは菌血症がすでに起こっている場合に気腹が菌血症を悪化させるかを検討するために設定した。infected control の菌血症率は 70%であり、予備実験で予想されたよりも低い菌血症率であったがそれでも十分に高いと考えてこの時間設定で実験を遂行した。ヒストグラムは早期モデルと同様、正規分布からは離れた形であり、解析はノンパラメトリックで行った方が適切と判断した。null control に関しては早期モデルで手技によるコンタミネーションはほぼないことがわかったので採用しなかった。大腸菌接種-採血時間は早期モデル同様ばらつきがあったため、コロニー数に対する影響を検討した。Kruskal-Wallis 検定では 3 群間の採血時間に有意な差は検出できなかった。各群内においても採血時

間とコロニー数には有意な相関がなく晩期モデル内において採血時間のばらつきはコロニー数に影響がないと判断した。

群間におけるコロニー数の差は Kruskal-Wallis 検定で解析した。3 群間で有意な差を検出することはできなかった。したがって晩期モデルにおいても、早期モデルと同様に気腹のための穿刺、穿刺と気腹は菌血症に影響を及ぼしていないという結果になった。

生存曲線解析

Log-rank 検定で 5 群間では有意差があり、各 2 群間で詳細に検討すると有意差が認められたのは(null control、pneumoperitoneum control の非感染コントロールの 2 群のいずれか)×(sham、intervention の感染処置の 2 群のいずれか)のペアと null control と infected control のペアであった。一方で sham、intervention では観察期間中コンスタントに死亡が観察され、infected control と生存曲線の形に差違があるように見えるがこちらも統計学的には有意差は検出できなかった。従って少なくとも腸管腹膜腔の感染の存在下において穿刺・気腹の処置が生存に有意な影響を及ぼす統計学的な証拠は認められなかったと言える。しかし null control と pneumoperitoneum control、infected control と sham、intervention で認められなかった有意差が非感染コントロールと感染処置群間で認められることは感染と処置という説明変数に交互作用がある可能性を考える必要がある。そこで Cox の比例

ハザードモデルを用いて説明変数の解析を行う必要があった。しかしハザード比が時間によらず一定であるという前提を満たすかどうか Schoenfeld 残差の分布を用いて検討したところ感染の有無でこの前提を満たさないことがわかった。検討では感染している場合のハザード比は時間経過とともに増大していくことが見て取れる。これは時間経過とともに血液内の大腸菌数が増えることと、敗血症の程度が強い、すなわち血液中の大腸菌濃度が高いほど、単位時間当たりの死亡率が高まるという、可能性の高い予想と一致する観察と考えている。解析の必要な前提を満たしていないため、Cox の比例ハザードモデルでの解析は不能と判断し解析を終了した。

超低出生体重児腹膜炎における気腹の安全性への推察

今回得られたデータからは菌血症の程度からも生存曲線解析からも気腹そのものが明確に悪影響を及ぼすという統計学的な証拠は得られなかった。したがって少なくとも超低出生体重児の腹膜炎疾患に対して明確に腹腔鏡の試行を回避すべき理由はこの研究では見いだせない。しかしながら Cox のハザードモデルで検出できなかったものの Log-rank 検定の結果を総合すると感染と気腹に交互作用があり個体に悪影響を及ぼす可能性は完全に否定できるものではないため、ヒトでの試行はやはり慎重であることが求められる。

また、sham 群と intervention 群での統計学的有意差がないことから、感染の存在下では気腹そのものたとえば二酸化炭素への暴露や気腹圧の影響よりも気腹のための穿刺などの侵襲そのものが悪影響を及ぼしている可能性は否定できない。

成体または若年哺乳類の腹膜炎モデルとの比較

ヒトでは横隔膜腹腔側の中皮下に存在するリンパ管の開口部が腹腔内の細菌の主な排出経路となっている[76]。さらに電子顕微鏡を使った動物実験によると気腹により中皮細胞は球形に変形し細胞間隙が広がり基底膜がむき出しになる[77]。基底膜がむき出しになることは細菌のトランスロケーションを促進すると考えられるが、この変化は腹膜炎単独でも確認されており[78, 79]、実際に腹膜炎に気腹をした場合、菌血症に差が出るかは実験モデルによって結果はことなる。一例を挙げるとウサギ盲腸結紮穿刺（CLP）モデルでは気腹で菌血症、生存率は悪化しないが開腹侵襲を加えると悪化する[80]。成熟ラット CLP モデルでは腹膜炎作成後 3 時間で気腹の方が菌血症発生率は高いが 6 時間では差がない[50]、ヒト便を用いたラット腹膜炎モデルでは菌血症は気腹と開腹で程度は変わらないが感染コントロール群と比べると増える[48] ラットでの一番幼弱な個体での実験、生後 3, 4 週の個体を使い、大腸菌接種による腹膜炎に気腹を行った実験では気腹しても菌血症発生に影響がない[44]というものであった。齧歯類を使った

実験では気腹によって菌血症が悪化するというデータはあるが、開腹操作との比較において菌血症、生存率ともに気腹操作でより有意に悪影響があるとする研究は調べうる限り存在しなかった。本研究では血液培養で検出した菌血症の程度に関しては気腹が悪影響を及ぼしているという証拠は得られていないが生存曲線研究では腹膜炎と気腹の交互作用がある可能性が否定できないデータが得られた。

モデルの妥当性

解剖学・組織学・病理学的側面

ニワトリでのモデルは哺乳類モデルと比較すると体の構造の違い、免疫システムの違いなどで、ヒトとの差異があるため外挿性の面からは制限が大きくなる可能性がある。本研究の問題点としては鳥類の体腔がヒト・齧歯類と比べ異なることがあげられる。特に前述したとおりヒト、齧歯類において横隔膜中皮下のリンパ管開口は腹腔から循環系への細菌のトランスロケーションの入り口として重要であるが、鳥類では横隔膜が存在しないため、リンパ系へのドレナージ機構が異なる可能性がある。一方で体腔を裏打ちする膜はヒトと同様に中胚葉由来の中皮であり発生の過程も大きくは変わらず、膜の組織学的構造は基本的に同じと考えてよい[81]。ニワトリの体腔接種を介したウイルス感染による中皮腫はヒトの

中皮腫と病理学的に似ており中皮腫のモデルとして使用できるという報告があり[82]、中皮細胞、中皮そのものの外挿性は期待できる。

本研究では腸管腹膜腔に大腸菌を接種することで腹膜炎を起こすというモデルを作成したが、一般的なニワトリの大腸菌感染症は colibacillosis と呼ばれ、養鶏場などで発生し卵の産生率低下や個体の死亡をもたらし、経済的な被害も大きいと、よく研究されている[83-87]。感染経路としては呼吸器系からの気嚢炎と総排泄腔から卵管を経由した腹膜炎であり[86, 87]、さらに各体腔への感染の波及と菌血症を呈す疾患である。病型は acute septicemia と subacute serositis の形となり、感染に抵抗力のない若いニワトリでは acute septicemia となり重篤な状態となって死亡する。成体では septicemia の段階を越え気嚢、心嚢、腹膜腔などに漿膜炎を生じる[86]。漿膜炎は中皮の壊死、フィブリンの析出、中皮下組織の浮腫と炎症性細胞の浸潤を呈し、これが腹膜に生じれば線維性腹膜炎となる[86]。今回の実験では実際に colibacillosis を呈し線維性腹膜炎を起こしたニワトリから採取した大腸菌を用いた。孵化 18 日ニワトリの気嚢に鳥類病原性大腸菌を接種した場合の菌血症の推移は、本研究と類似している[84]。また孵化 18 日のニワトリの腹膜腔へ大腸菌を 2.3×10^4 CFU 投与したところ肉眼的に感染を確認できた報告がある[84]。このため本実験でも直接、腸管腹膜腔にこの大腸菌を接種すれば腹膜炎を生じ、その経過で菌血症を起こすことが高い確率で見込まれる。しかし今回、

腹膜の病理組織については直接観察して確認していない。さらに本研究を進展させるために、今後、病理組織を確認することが必要となる。

生化学・免疫学的側面

ニワトリの免疫系は哺乳類と同様に自然免疫システムと適応免疫システムを備えており免疫グロブリン、BCR、TCR、MHC などの分子は共通の働きを持っている。しかし差異もあり、たとえば免疫グロブリンでは哺乳類に存在する IgD、IgE は鳥類では同定されていない。哺乳類の IgG と IgE は進化の過程で両生類の IgY を共通の祖先として分化しており、鳥類には IgY の存在が確認されている。鳥類 IgY は哺乳類 IgG に対応する免疫グロブリンではあるが IgG とは共通抗原性はなく、異なる物理的科学的性質を持つ。また H 鎖遺伝子の組み換えに関しても哺乳類とは若干異なる方法で免疫グロブリンの多様性を実現している[88]。

発育鶏卵には卵白に IgA、IgM が存在し、卵黄に IgY が大量に存在する。IgA、IgM は卵白が経口的に吸収されることで腸管内に移行し、IgY は血液内に移行する。いずれも親鳥からの移行免疫である[89]。血清内の IgA、IgM は低く保たれるが、IgM は孵化後最も早く産生されるようになる[89, 90]。

ヒトでは胎児期には免疫グロブリンの産生は原則的には行われませんが、胎児感染の存在下では IgM が産生される[91]。したがって超低出生体重児でも環境から抗原の暴露があれば IgM は産生されると考えられる。また IgG は母体からの移行免疫として血清中に存在する。

本研究のような腹膜腔への感染の場合、問題となるのは血清中の免疫グロブリンであるが前段落で概説したようにニワトリ、ヒトのどちらも IgY、IgG の違いはあるが親からの移行免疫が存在しており、これは類似点である。ニワトリの IgM に関しては孵化前の病原体暴露によって産生があるのかどうかのデータがない。液性免疫に関してはこの点でヒト超低出生体重児との類似性が不明であり、モデルの外挿性について今後の課題となると考えた。

超低出生体重児の菌血症における各種サイトカイン、CRP などのバイオマーカーの挙動にはいくつかの報告がある[92-96]。しかし、消化管穿孔を起こした超低出生体重児に気腹を行った報告は数例の症例報告しかなく[35-37]、バイオマーカーの挙動についてはデータがない。動物実験においては成体のウサギ、ラットでは CLP モデルにおいて TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 などのサイトカインの挙動が報告されている[97-99]。また動物モデルにおいて、序文で述べたように二酸化炭素の気腹により、抗炎症性サイトカインの上昇[43, 44]やマクロファージの superoxide anion 産生の低下[45]など、免疫系への抑制的な作用が指摘されている。本実験ではバイオマーカーの解析は行っておらず、これら哺乳類の動物モデルとの比較はできていない。また Ovotransferritin はニワトリ特異的な炎症マーカーとして成体でのデータがあるが[100-102]、炎症の導入から値の上昇検出までの時間経過が 16 時間と本研究のプロトコールでマーカーとするには不適である可能性があったため、他の実験を優先したため未実施である。しかし、発育鶏卵では成

体と違う挙動を示す可能性は否定できず、Ovotransferritin の測定も今後の課題としたい。

今後のモデルの展望

本研究のモデルをヒトの疾患・手術モデルとして外挿性が十分な信頼性のあるモデルとするには、前述したとおり検討すべき点があり、発展途上と言わざるを得ない。しかし、未熟な状態で生まれてくる超低出生体重児のモデルとしては孵化前の胚に安定的にアプローチできるという点は齧歯類で未熟な胎仔をモデルとして利用できない現状、また大型哺乳類モデルより遙かに安価で発育期間が短く管理が簡便である点をふまえると、これらの検討事項をさらに解析してモデルとして妥当であるかどうかを確認していく価値は十分にあると考える。

本研究では、気腹そのものが明らかな菌血症、周術期死亡率の悪化を招くことを示唆するデータは得られなかったが、気腹のための穿刺などの操作と感染に交互作用がある可能性が示された。そのため、当初の目的である診断的腹腔鏡を導入するにあたって慎重を期すためには、試験開腹に比べて低侵襲で菌血症、周術期死亡率に影響がないことを確認しておく必要がある。そのために開腹手術モデルを作成しその群と気腹群との比較を行うことが必要と考える。

今回の研究の主目的は診断的腹腔鏡を想定した実験モデル開発であったため、気腹した状態で、手術操作が行えるようにすることは考慮しなかった。現時点の

モデルでは気腹時に腸管腹膜腔から卵黄茎周囲を經由して卵黄周囲のスペースが主体となって膨らんでしまうため、二酸化炭素への暴露、気腹圧への暴露は実現できても、腹腔に手術操作が可能なスペースを確保することはできていない。今後、治療を目的とした腹腔鏡手術の実験モデルと確立するためにはこの点を克服しなければならない。具体的には二酸化炭素の卵黄茎周囲スペースへの流入を防ぐ必要があるが、単に卵黄茎の結紮をおこなうと、同時にその部分を走行している尿漿膜への血管を結紮することになる。尿漿膜は胚のガス交換を担っておりこの血管を結紮すると胚の生存は不可能となる。この血管を卵黄茎より分離することも試みているが、組織が非常に脆弱で容易に損傷するため、技術的には難易度が高く、また長時間の操作は胚の生存率に影響するため、一連の操作はごく短時間に行う必要があり、現時点では解決策を模索中である。しかし、これが克服できれば、超低出生体重児の腹腔鏡手術モデルとして汎用性が出るため是非今後の研究でこの点を解決する価値があると考えられる。

まとめ

発育鶏卵を用いた超低出生体重児の腹膜炎モデルを作成し、気腹による菌血症への影響および生存への影響を観察した。穿孔早期モデルおよび穿孔晚期モデルにおいて気腹のための穿刺、穿刺と気腹は菌血症の発症と重症化には影響を及ぼしていないことを確認した。生存曲線解析では感染と穿刺・気腹には交互作用の可能性があり、個体に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

VI. 謝辞

本論文を書き終えるにあたり、研究の推進に終始適切な御助言および御指導をいただきました東京大学大学院医学系研究科生殖・発達・加齢医学専攻小児医学講座小児外科学教室、岩中 督教授に深謝いたします。研究を遂行していくにあたり必要不可欠であった数々の支えとなるアドバイスをいただきました東京大学医学部附属病院小児外科、石丸 哲也助教に深く感謝申し上げます。本研究に必須であった Avian pathogenic E.coli を無償でご提供いただきました「東京大学農学部食の安全センター」関崎 勉教授に厚く御礼申し上げます。また、研究をスタートするにあたり発育鶏卵の一般的な扱いについて指導をいただきました東京大学大学院医学系研究科分子細胞生物学専攻代謝生理化学教室、浅井理恵子研究員に深く感謝申し上げます。

VII. 引用文献

1. Kaneko M, Sameshima H, Kai K, Urabe H, Kodama Y, Ikenoue T: Mortality rates for extremely low-birthweight infants: a regional, population-based study in Japan during 2005-2009. *J Obstet Gynaecol Res* 38:1145-1151, 2012
2. Sawicka E, Zak K, Boczar M, Ploska-Urbaneck B, Mydlak D, Woynarowska M: [Surgical treatment of neonates with very low (VLBW) or extremely low (ELBW) birth weight.]. *Med Wieku Rozwoj* 15:394-405, 2011
3. Oh W: Fluid and electrolyte management of very low birth weight infants. *Pediatr Neonatol* 53:329-333, 2012
4. Prince A, Groh-Wargo S: Nutrition management for the promotion of growth in very low birth weight premature infants. *Nutr Clin Pract* 28:659-668, 2013
5. Miller NE: Techniques of early respiratory management of very low and extremely low birth weight infants. *Neonatal Netw* 29:153-160, 2010
6. Conway-Orgel M: Management of hypotension in the very low-birth-weight infant during the golden hour. *Adv Neonatal Care* 10:241-245; quiz 246-247, 2010
7. Eichenwald EC, Stark AR: Management and outcomes of very low birth weight. *N Engl J Med* 358:1700-1711, 2008
8. Kinouchi K: Anaesthetic considerations for the management of very low and extremely low birth weight infants. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18:273-290, 2004

9. 厚生労働省：人口動態統計特殊報告
10. Kosloske AM: Epidemiology of necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr Suppl* 396:2-7, 1994
11. Horbar JD, Badger GJ, Carpenter JH, Fanaroff AA, Kilpatrick S, LaCorte M, et al: Trends in mortality and morbidity for very low birth weight infants, 1991-1999. *Pediatrics* 110:143-151, 2002
12. Kubota A, Yamanaka H, Okuyama H, Shiraishi J, Kawahara H, Hasegawa T, et al: Focal intestinal perforation in extremely-low-birth-weight neonates: etiological consideration from histological findings. *Pediatr Surg Int* 23:997-1000, 2007
13. Hatanaka A, Nakahara S, Takeyama E, Iwanaka T, Ishida K: Management of extremely low birth weight neonates with bowel obstruction within 2 weeks after birth. *Surg Today*, 2014
14. Neu J: Necrotizing enterocolitis: the search for a unifying pathogenic theory leading to prevention. *Pediatr Clin North Am* 43:409-432, 1996
15. Yee WH, Soraisham AS, Shah VS, Aziz K, Yoon W, Lee SK: Incidence and timing of presentation of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Pediatrics* 129:e298-304, 2012
16. Rees CM, Eaton S, Pierro A: National prospective surveillance study of necrotizing enterocolitis in neonatal intensive care units. *J Pediatr Surg* 45:1391-1397, 2010
17. Hunter CJ, Upperman JS, Ford HR, Camerini V: Understanding the susceptibility of the premature infant to necrotizing enterocolitis (NEC). *Pediatr Res* 63:117-123, 2008

18. Neu J, Weiss MD: Necrotizing enterocolitis: pathophysiology and prevention. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 23:S13-17, 1999
19. Morriss FH, Jr., Moore M, Gibson T, West MS: Motility of the small intestine in preterm infants who later have necrotizing enterocolitis. *J Pediatr* 117:S20-23, 1990
20. Morowitz MJ, Poroyko V, Caplan M, Alverdy J, Liu DC: Redefining the role of intestinal microbes in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *Pediatrics* 125:777-785, 2010
21. Cotten CM, Taylor S, Stoll B, Goldberg RN, Hansen NI, Sanchez PJ, et al: Prolonged duration of initial empirical antibiotic treatment is associated with increased rates of necrotizing enterocolitis and death for extremely low birth weight infants. *Pediatrics* 123:58-66, 2009
22. Uauy RD, Fanaroff AA, Korones SB, Phillips EA, Phillips JB, Wright LL: Necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants: biodemographic and clinical correlates. National Institute of Child Health and Human Development Neonatal Research Network. *J Pediatr* 119:630-638, 1991
23. Brook I: Microbiology and management of neonatal necrotizing enterocolitis. *Am J Perinatol* 25:111-118, 2008
24. Tepas JJ, 3rd, Sharma R, Leaphart CL, Celso BG, Pieper P, Esquivia-Lee V: Timing of surgical intervention in necrotizing enterocolitis can be determined by trajectory of metabolic derangement. *J Pediatr Surg* 45:310-313; discussion 313-314, 2010

25. Ofek Shlomai N, Deshpande G, Rao S, Patole S: Probiotics for preterm neonates: what will it take to change clinical practice? *Neonatology* 105:64-70, 2014
26. Balanescu RN, Topor L, Dragan GC: Clinical and surgical aspects in necrotizing enterocolitis. *Chirurgia (Bucur)* 108:184-188, 2013
27. Shah TA, Meinzen-Derr J, Gratton T, Steichen J, Donovan EF, Yolton K, et al: Hospital and neurodevelopmental outcomes of extremely low-birth-weight infants with necrotizing enterocolitis and spontaneous intestinal perforation. *J Perinatol* 32:552-558, 2012
28. Semm K: Endoscopic appendectomy. *Endoscopy* 15:59-64, 1983
29. Cuschieri A, Dubois F, Mouiel J, Mouret P, Becker H, Buess G, et al: The European experience with laparoscopic cholecystectomy. *Am J Surg* 161:385-387, 1991
30. Naffis D: Laparoscopic appendectomy in children. *Semin Pediatr Surg* 2:174-177, 1993
31. Valla JS, Limonne B, Valla V, Montupet P, Daoud N, Grinda A, et al: Laparoscopic appendectomy in children: report of 465 cases. *Surg Laparosc Endosc* 1:166-172, 1991
32. Newman KD, Marmon LM, Attorri R, Evans S: Laparoscopic cholecystectomy in pediatric patients. *J Pediatr Surg* 26:1184-1185, 1991
33. Sigman HH, Laberge JM, Croitoru D, Hong A, Sigman K, Nguyen LT, et al: Laparoscopic cholecystectomy: a treatment option for gallbladder disease in children. *J Pediatr Surg* 26:1181-1183, 1991

34. Holcomb GW, 3rd, Olsen DO, Sharp KW: Laparoscopic cholecystectomy in the pediatric patient. *J Pediatr Surg* 26:1186-1190, 1991
35. Clark C, Mackinlay GA: Laparoscopy as an adjunct to peritoneal drainage in perforated necrotizing enterocolitis. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 16:411-413, 2006
36. Nah SA, Tan HL, Tamba RP, Aziz DA, Azzam N: Laparoscopic localization and microlaparotomy for focal isolated perforation in necrotizing enterocolitis: an alternative approach to a challenging problem. *J Pediatr Surg* 46:424-427, 2011
37. Tan HL, Tantoco JG, Ee MZ: The role of diagnostic laparoscopy in micropremies with suspected necrotizing enterocolitis. *Surg Endosc* 21:485-487, 2007
38. Rothenberg SS, Chang JH, Bealer JF: Experience with minimally invasive surgery in infants. *Am J Surg* 176:654-658, 1998
39. Fujimoto T, Segawa O, Lane GJ, Esaki S, Miyano T: Laparoscopic surgery in newborn infants. *Surg Endosc* 13:773-777, 1999
40. Molinaro F, Kaselas C, Lacreuse I, Moog R, Becmeur F: Postoperative intestinal obstruction after laparoscopic versus open surgery in the pediatric population: A 15-year review. *Eur J Pediatr Surg* 19:160-162, 2009
41. Lintula H, Kokki H, Vanamo K: Single-blind randomized clinical trial of laparoscopic versus open appendicectomy in children. *Br J Surg* 88:510-514, 2001

42. Saha N, Saha DK, Rahman MA, Islam MK, Aziz MA: Comparison of post operative morbidity between laparoscopic and open appendectomy in children. *Mymensingh Med J* 19:348-352, 2010
43. Pitombo MB, Lupi OH, Gomes RN, Amancio R, Refinetti RA, Bozza PT, et al: Inflammatory response and bacterial dissemination after laparotomy and abdominal CO₂ insufflation in a murine model of peritonitis. *Surg Endosc* 20:1440-1447, 2006
44. Hsieh CS, Tain YL, Chen YC, Chang K, Jean YH, Huang LT: Carbon dioxide pneumoperitoneum induces anti-inflammatory response and hepatic oxidative stress in young rats with bacterial peritonitis. *Pediatr Surg Int* 27:289-294, 2011
45. Kuebler JF, Kos M, Jesch NK, Metzelder ML, van der Zee DC, Bax KM, et al: Carbon dioxide suppresses macrophage superoxide anion production independent of extracellular pH and mitochondrial activity. *J Pediatr Surg* 42:244-248, 2007
46. Watson RW, Redmond HP, McCarthy J, Burke PE, Bouchier-Hayes D: Exposure of the peritoneal cavity to air regulates early inflammatory responses to surgery in a murine model. *Br J Surg* 82:1060-1065, 1995
47. Evasovich MR, Clark TC, Horattas MC, Holda S, Treen L: Does pneumoperitoneum during laparoscopy increase bacterial translocation? *Surg Endosc* 10:1176-1179, 1996
48. Jacobi CA, Ordemann J, Bohm B, Zieren HU, Volk HD, Lorenz W, et al: Does laparoscopy increase bacteremia and endotoxemia in a peritonitis model? *Surg Endosc* 11:235-238, 1997

49. West MA, Hackam DJ, Baker J, Rodriguez JL, Bellingham J, Rotstein OD: Mechanism of decreased in vitro murine macrophage cytokine release after exposure to carbon dioxide: relevance to laparoscopic surgery. *Ann Surg* 226:179-190, 1997
50. Ipek T, Paksoy M, Colak T, Polat E, Uygun N: Effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on bacteremia and severity of peritonitis in an experimental model. *Surg Endosc* 12:432-435, 1998
51. Horattas MC, Haller N, Ricchiuti D: Increased transperitoneal bacterial translocation in laparoscopic surgery. *Surg Endosc* 17:1464-1467, 2003
52. Iwanaka T, Arya G, Ziegler MM: Mechanism and prevention of port-site tumor recurrence after laparoscopy in a murine model. *J Pediatr Surg* 33:457-461, 1998
53. Metzelder M, Kuebler J, Shimotakahara A, Vieten G, von Wasielewski R, Ure BM: CO₂ pneumoperitoneum increases systemic but not local tumor spread after intraperitoneal murine neuroblastoma spillage in mice. *Surg Endosc* 22:2648-2653, 2008
54. Sauerland S, Lefering R, Neugebauer EA: Laparoscopic versus open surgery for suspected appendicitis. *Cochrane Database Syst Rev*:CD001546, 2004
55. Goldstein AM, Nagy N: A bird's eye view of enteric nervous system development: lessons from the avian embryo. *Pediatr Res* 64:326-333, 2008
56. Rashidi H, Sottile V: The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. *Bioessays* 31:459-465, 2009

57. Carre AL, Larson BJ, Knowles JA, Kawai K, Longaker MT, Lorenz HP: Fetal mouse skin heals scarlessly in a chick chorioallantoic membrane model system. *Ann Plast Surg* 69:85-90, 2012
58. Spurlin J, 3rd, Lwigale P: A technique to increase accessibility to late-stage chick embryos for in ovo manipulations. *Dev Dyn* 242:148-154, 2013
59. Yalcin HC, Shekhar A, Rane AA, Butcher JT: An ex-ovo chicken embryo culture system suitable for imaging and microsurgery applications. *J Vis Exp*, 2010
60. Sunol M, Tovar JA, Aldazabal P, Torrado J: [The chick embryo as a model of fetal surgery: intestinal atresia]. *Cir Pediatr* 2:13-18, 1989
61. Lopez de Torre B, Tovar JA, Uriarte S, Aldazabal P: The nutrition of the fetus with intestinal atresia: studies in the chick embryo model. *J Pediatr Surg* 27:1325-1328, 1992
62. Masumoto K, Suita S, Nada O, Taguchi T, Guo R, Yamanouchi T: Alterations of the intramural nervous distributions in a chick intestinal atresia model. *Pediatr Res* 45:30-37, 1999
63. Schoenberg RA, Kluth D: Experimental small bowel obstruction in chick embryos: Effects on the developing enteric nervous system. *J Pediatr Surg* 37:735-740, 2002
64. Parisi Salvi E, Vaccaro R, Baglaj SM, Renda T: Nervous system development in normal and atresic chick embryo intestine: an immunohistochemical study. *Anat Embryol (Berl)* 209:143-151, 2004

65. Lopez de Torre B, Tovar JA, Uriarte S, Aldazabal P: Transperitoneal exchanges of water and solutes in the fetus with gastroschisis. Experimental study in the chick embryo. *Eur J Pediatr Surg* 1:346-352, 1991
66. Aktug T, Erdag G, Kargi A, Akgur FM, Tibboel D: Amnio-allantoic fluid exchange for the prevention of intestinal damage in gastroschisis: an experimental study on chick embryos. *J Pediatr Surg* 30:384-387, 1995
67. Kanmaz T, Yagmurlu A, Aktug T, Gokcora H: The effect of amnio-allantoic fluid pH on the intestines: an experimental study in the chick embryo gastroschisis model. *J Pediatr Surg* 36:1341-1345, 2001
68. Denli O, Barlas M, Bingol-Kologlu M, Yagmurlu A, Ozdamar S, Hascicek C, et al: The effect on the intestines of continuous release of methylene blue from a drug delivery system: an experimental study in a chick embryo gastroschisis model. *Pediatr Surg Int* 20:609-613, 2004
69. Mominoki K, Kinutani M, Wakisaka H, Saito S, Kobayashi N, Fujiwara T, et al: Leg dysfunctions in a hatched chick model of spina bifida aperta. *Exp Neurol* 197:133-142, 2006
70. Tsujimura R, Mominoki K, Kinutani M, Shimokawa T, Doihara T, Nabeka H, et al: Sensory tract abnormality in the chick model of spina bifida. *Neurosci Res* 71:85-91, 2011
71. Berman DJ, Maizels M: The role of urinary obstruction in the genesis of renal dysplasia. A model in the chick embryo. *J Urol* 128:1091-1096, 1982

72. 赤坂甲治、大隈典子、八杉貞夫監訳：発生生物学，2006; Fred H Wilt, Sarah C Hake: Principles of Developmental Biology, 2004
73. B.H. Coles, 桜井富士朗監訳：バード・クリニック・プラクティス-鳥の治療と看護 p159-160, 2002
74. Hamburger V, Hamilton HL: A series of normal stages in the development of the chick embryo. J Morphol 88:49-92, 1951
75. 平成 17 年度種鶏孵卵衛生管理研修会テキスト, 2005
76. Courtney M Townend, Jr. et al (ed) Sabiston Textbook of Surgery 6th edition p803
77. Volz J, Koster S, Spacek Z, Paweletz N: Characteristic alterations of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum. Surg Endosc 13:611-614, 1999
78. Kaufman O, Rostovshchikov AS, Kranchev AK, Paukov VS: [Reaction of rat peritoneal mesothelial cells in aseptic and bacterial peritonitis]. Biull Eksp Biol Med 94:100-104, 1982
79. Leak LV: Interaction of mesothelium to intraperitoneal stimulation. I. Aggregation of peritoneal cells. Lab Invest 48:479-491, 1983
80. Chatzimavroudis G, Pavlidis TE, Koutelidakis I, Giamarrelou-Bourboulis EJ, Atmatzidis S, Kontopoulou K, et al: CO(2) pneumoperitoneum prolongs survival in an animal model of peritonitis compared to laparotomy. J Surg Res 152:69-75, 2009
81. 赤坂甲治、大隈典子、八杉貞夫監訳：発生生物学，2006; Fred H Wilt, Sarah C Hake: Principles of Developmental Biology, 2004

82. Chabot JF, Beard D, Langlois AJ, Beard JW: Mesotheliomas of peritoneum, epicardium, and pericardium induced by strain MC29 avian leukosis virus. *Cancer Res* 30:1287-1308, 1970
83. Turcott RG, Lopez-Alvarez J, Pettit JR: Studies of *Escherichia coli* infection in chickens. *Can J Comp Med* 38:160-167, 1974
84. Piercy DW, West B: Experimental *Escherichia coli* infection in broiler chickens: course of the disease induced by inoculation via the air sac route. *J Comp Pathol* 86:203-210, 1976
85. Yamaguchi R, Tottori J, Uchida K, Tateyama S, Sugano S: Importance of *Escherichia coli* infection in ascites in broiler chickens shown by experimental production. *Avian Dis* 44:545-548, 2000
86. Nakamura K, Maeda M, Imada Y, Imada T, Sato K: Pathology of spontaneous colibacillosis in a broiler flock. *Vet Pathol* 22:592-597, 1985
87. Jordan FT, Williams NJ, Wattret A, Jones T: Observations on salpingitis, peritonitis and salpingoperitonitis in a layer breeder flock. *Vet Rec* 157:573-577, 2005
88. 小原雄治編: 現代生物化学入門 5 免疫・感染生物学, p165-170, 2011
89. Hamal KR, Burgess SC, Pevzner IY, Erf GF: Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poult Sci* 85:1364-1372, 2006
90. Rao DS, McDuffie FC, Glick B: The regulation of IgM production in the chick: roles of the bursa of fabricius, environmental antigens, and plasma IgG. *J Immunol* 120:783-787, 1978
91. 清野佳紀、小林邦彦、原田研介、桜井真理子編: NEW 小児科学, p18-19, 1999

92. Dritsakou K, Liosis G, Gioni M, Glynou E, Avdeliodi K, Papagaroufalis K: CRP levels in extremely low birth weight (ELBW) septic infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 28:237-239, 2015
93. Maheshwari A, Schelonka RL, Dimmitt RA, Carlo WA, Munoz-Hernandez B, Das A, et al: Cytokines associated with necrotizing enterocolitis in extremely-low-birth-weight infants. *Pediatr Res* 76:100-108, 2014
94. Sood BG, Shankaran S, Schelonka RL, Saha S, Benjamin DK, Jr., Sanchez PJ, et al: Cytokine profiles of preterm neonates with fungal and bacterial sepsis. *Pediatr Res* 72:212-220, 2012
95. Schelonka RL, Maheshwari A, Carlo WA, Taylor S, Hansen NI, Schendel DE, et al: T cell cytokines and the risk of blood stream infection in extremely low birth weight infants. *Cytokine* 53:249-255, 2011
96. Posen R, deLemos RA: C-reactive protein levels in the extremely premature infant: case studies and literature review. *J Perinatol* 18:138-141, 1998
97. Villa P, Sartor G, Angelini M, Sironi M, Conni M, Gnocchi P, et al: Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. *Clin Diagn Lab Immunol* 2:549-553, 1995
98. Otero-Anton E, Gonzalez-Quintela A, Lopez-Soto A, Lopez-Ben S, Llovo J, Perez LF: Cecal ligation and puncture as a model of sepsis in the rat: influence of the puncture size on

mortality, bacteremia, endotoxemia and tumor necrosis factor alpha levels. *Eur Surg Res* 33:77-79,

2001

99. El-Hakim A, Chiu KY, Sherry B, Bhuiya T, Smith AD, Lee BR: Peritoneal and systemic inflammatory mediators of laparoscopic bowel injury in a rabbit model. *J Urol* 172:1515-1519,

2004

100. Xie H, Huff GR, Huff WE, Balog JM, Holt P, Rath NC: Identification of ovotransferrin as an acute phase protein in chickens. *Poult Sci* 81:112-120, 2002

101. Xie H, Huff GR, Huff WE, Balog JM, Rath NC: Effects of ovotransferrin on chicken macrophages and heterophil-granulocytes. *Dev Comp Immunol* 26:805-815, 2002

102. Rath NC, Anthony NB, Kannan L, Huff WE, Huff GR, Chapman HD, et al: Serum ovotransferrin as a biomarker of inflammatory diseases in chickens. *Poult Sci* 88:2069-2074, 2009