

論文の内容の要旨

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

序文

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。本研究では孵化前の発育鶏卵を用いて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、超低出生体重児相当の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が安全かどうかを検討する。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。

方法

Hypeco nera 種の有精卵を養鶏場より入手した。温度 37.5°C、湿度 50%でインキュベーターし、日齢 2 日または 3 日と、日齢 17-19 日の 2 段階に分けた処置を行うことによって、安定的に気腹可能なモデルを確立することができた。

1. 穿孔早期モデルにおける気腹の菌血症に対する影響

日齢 18 日の発育鶏卵 225 個を 4 群に分けた。3 群については avian pathogenic E.coli(1.0x10⁶ CFU/ml, 0.1ml)を腸管腹膜腔に注入し腹膜炎を惹起した。1.5 時間後、3 群のうち 1 群の腸管腹膜腔に 8ml の CO₂ を注入(intervention group)、別の 1 群は気腹に用いる針で腸管腹膜腔の穿刺のみ施行(sham group)、残りの 1 群には処置を加えなかった(infected control)。第 4 の群には LB 培地 0.1ml を注入しそれ以降の処置も加えなかった(null control)。大腸菌または LB 培地注入後 2 時間で採血を行い 100 μ l を MacConkey 平板寒天培地にまき、24 時間後にコロニーの数を計測した。

2. 穿孔晚期モデルにおける気腹の菌血症に対する影響

日齢 18 日の発育鶏卵 70 個を早期モデルの腹膜炎惹起群と同様に 3 群に分けた。処置の

タイミングは気腹・穿刺を大腸菌注入から 5.5 時間後、採血を 6 時間後とした。早期モデルと同様にコロニー数を計測した。

3. 生存曲線解析

日齢 18 日の発育鶏卵 72 個を 5 群に分けた。腹膜炎惹起群の 3 群は穿孔晚期モデルと同様の処置を行った。残り 2 群に関しては LB 培地 0.1ml を注入し、5.5 時間後に 8ml の CO₂ で気腹を行った群(pneumoperitoneum control)と培地注入後何も処置を行わない群(null control)に分けた。腹膜炎モデル作成 20 時間にわたって生存を観察した。

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)を行った。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を行った。

結果

1. 穿孔早期モデルにおける気腹の菌血症に対する影響

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。

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。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。

2. 穿孔晚期モデルにおける気腹の菌血症に対する影響

晚期モデルにおいても早期モデルと同様の解析を行った。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。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。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 $p=0.53$)。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。

3. 生存曲線解析

解析には null control 群 15 例、pneumoperitoneum control 群 16 例、infected control 群 14 例、sham 群 12 例、intervention 群 14 例の計 72 例が組み入れられた。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=0.0016)。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 sham、intervention 間、pneumoperitoneum control と sham、intervention 間、null control と infected control 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。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。

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。