

Review

【日本小児循環器学会功労賞記念寄稿 7】

先天性横隔膜ヘルニアのラット胎仔心臓肺断面像

門間 和夫

東京女子医科大学循環器小児科

Fetal Heart and Lung Cross-Sectional Morphology
of Congenital Diaphragmatic Hernia in the Rat

Kazuo Momma

Department of Pediatric Cardiology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

Bis-diamine was administered at a dose of 200 mg to 40 pregnant rats on the 9th and 10th days of gestation. Following cervical dislocation of these rats on the 21st day of gestation, the fetuses were delivered by cesarean section and then frozen immediately in acetone cooled to -76°C with dry ice. The thorax of each frozen fetus was cut transversely, and the section surface was serially photographed using a stereoscopic microscope (Wild M400 Photomicroscope) at every $500\ \mu\text{m}$. Among 300 fetuses, congenital heart disease (90%), thymic hypoplasia (100%), and diaphragmatic hernia (40%) were identified. In the 120 fetuses with diaphragmatic hernia, pulmonary and cardiac hypoplasias were recorded as follows. The liver and stomach occupied the left thorax; the heart deviated to the right and was hypoplastic. The left lung was hypoplastic as a result of the invasion of the liver and stomach into the left hemithorax. In cases with the most severe hernia, the liver and stomach occupied the total left hemithorax, resulting in minimal residual left lung. The right lung was also hypoplastic due to a rightward shift of the cardiac and mediastinal structures. In mild cases, only a small portion of the liver invaded the left posterior hemithorax, with mild hypoplasia of the left lung, normal right lung, and near-normal heart structures. These pictures clearly show the variability in cardiopulmonary hypoplasia due to the invading abdominal organs into the left hemithorax.

Keywords: congenital diaphragmatic hernia, fetal echocardiography, pulmonary hypoplasia, cardiac hypoplasia, neonatal pulmonary hypertension

Bis-diamine は強力な teratogen で、ラットではほぼ前例に胸腺低形成と先天性心疾患を生じ、その一部に横隔膜ヘルニアを合併する。Bis-diamine 200 mg を妊娠 9 日と 10 日にラット 40 匹に胃内注入し、満期 21 日目の胎仔で全身急速凍結法、凍結ミクローム、実体顕微鏡 (Wild M400) を用いて 0.5 mm 毎の胸部横断面を連続写真で記録した。300 胎仔に胸腺低形成 (100%)、各種先天性心疾患 (90%)、横隔膜ヘルニア (40%) (左側 100 例、右側 20 例) を生じた。左側横隔膜ヘルニアの写真の記録から次の所見が得られた。ヘルニア孔により主に肝臓が左胸郭に入り込み、肺と心臓は圧排されて低形成であった。軽度のヘルニアでは肝臓の左頭側部がわずかに左胸郭背側に入るだけで左肺の低形成は軽度で右肺と心臓の低形成はなかった。中程度ヘルニアでは肝臓が左胸郭中部と後部に入り左肺は半分になり、心臓は正中より右胸郭内に圧排されて小さくなり、右肺も軽度低形成であった。高度なヘルニア例では肝臓と胃が全左胸郭を占め、左肺は肺尖部に痕跡的に存在した。即ち、ヘルニアの程度に応じた肺低形成と心臓低形成が明らかであった。これらのラット胎生期横隔膜ヘルニアの胸郭横断面の天然色写真を提示する。

はじめに

先天性横隔膜ヘルニア（CDH）では発生の比較的初期の横隔膜形成不全により腹部内臓（肝臓、胃、腸）が胸腔内に入り成長するため肺と心臓が低形成になり、手術成績が不良となる¹⁻³⁾。その胎生期肺低形成の臨床診断は超音波とMRIによる^{4,5)}。現在周産期医療において救命困難な本症重症例に対する胎児診断からの治療戦略が模索されている。

ラット胎仔の全身急速凍結法による凍結標本を凍結ミクロトームで切り、その断面の心臓大血管像（写真）から種々の計測を行う方法は50年前に動脈管の研究用にKarolinska研究所で開発され⁶⁾、40年前から私も用いてきた^{7,8)}。催奇形薬bis-diamineは妊娠ラットに大量投与するとその胎仔の40%に横隔膜ヘルニアを生じるので、私は横隔膜ヘルニアの肺と心臓の低形成を論文⁹⁾にした。その研究のカラー写真は未発表なのでここに図譜として提示する。これらの横隔膜ヘルニアの心臓肺断面カラー写真から肺低形成と心臓低形成が明瞭に理解される。

方 法

ラット満期胎仔の全身急速凍結法による実験⁷⁻⁹⁾を次のように行った。ラットの妊娠期間は21.5日なので、妊娠21日目に親ラットを頸椎脱臼法で安楽死させ、ただちに帝王切開で取り出した胎仔を胎盤つきのままドライアイス-アセトン（-76°C）に投入して瞬時に凍結する。凍結した胸部横断面（transverse）を凍結ミクロトームで切り、断面を0.5mm毎に実体顕微鏡（Wild 400）で撮影する。1個体の胸部から約20断面を同じ倍率で撮影する。

Bis-diamineによる先天性心疾患と横隔膜ヘルニア⁸⁻¹⁰⁾は次のように作製した。妊娠9日目と10日目にWistarラット40匹にbis-diamine 200mgを胃内注入し、妊娠21日に合計300匹の胎仔を調べると、90%の胎仔に心疾患^{8,9)}が認められた。更に胸腺の無-低形成（100%）、横隔膜ヘルニア（40%、120例：左100、右20）の合併があった。

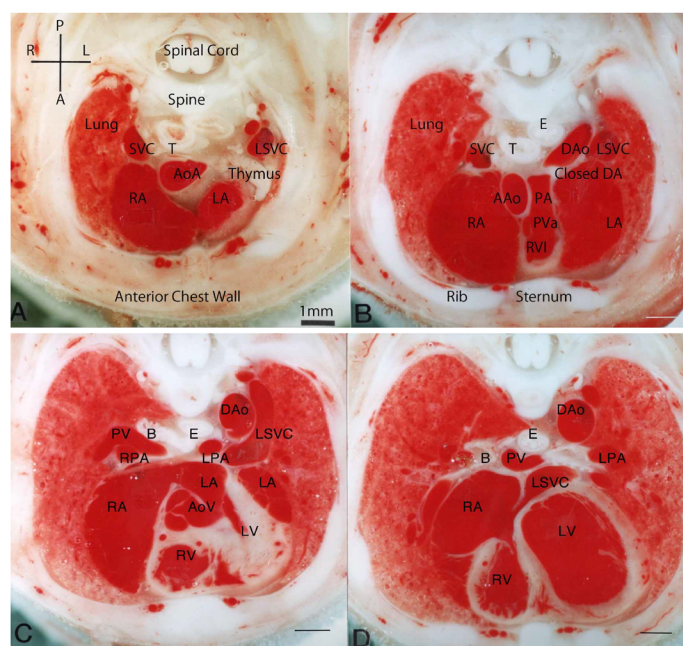


Fig. 1 Normal neonatal rat (2 days-old)

Fresh-red voluminous lungs, closed DA, and large right and left ventricles. Abbreviations in Fig. 1-8. A: anterior. AAo: ascending aorta. Ao: aorta. AoA: aortic arch. AORSA: aberrant origin of right subclavian artery. AV, AoV: aortic valve. B, Br: bronchus. DA: ductus arteriosus. DAo: descending aorta. E: esophagus. L: left. LA: left atrium. LB: left bronchus. LPA: left pulmonary artery. LSVC: left superior vena cava. LV: left ventricle. P: posterior. PA: pulmonary artery. PV: pulmonary vein, PVA: pulmonary valve. R: right. RA: right atrium. RB: right bronchus. RV: right ventricle. RVI: right ventricular infundibulum. SVC: superior vena cava. T: trachea. Tr: truncus arteriosus. TrV: truncal valve. TrA: truncal arch. Scale bar: 1 mm.

結 果

Fig. 1, 2 に正常ラット新生仔と胎仔の横断面を示す。ヒトで左上大静脈は胎生初期にのみ生じるが、げっ歯類、ラットでは生後まで存続する¹¹⁾。Fig. 1 の新生仔では胎仔と異なり、肺は鮮紅色で容積が大きく、食道は扁平であり、動脈管は閉じて索状である。右室と左室は大きい。

Fig. 2 の正常胎仔では新生仔と比べて胸腺が大きく、動脈管が太く、肺動脈と肺静脈が細い。ラット胎仔の食道はヒト胎児と異なり常に太く開いている。房室弁と半月弁は大部分で半ば開いている。

Fig. 3 以下に bis-diamine 投与後ラット胎仔例を示す。Fig. 3 は心臓と横隔膜が正常の例である。胸腺は欠損しているが、肺と心臓の大きさは正常である。

Fig. 4 は軽度の左横隔膜ヘルニア、Fallot 四徴症と胸腺欠損の例である。肝臓の一部が左胸郭後部に入

り、左肺がやや小さいが、心臓と縦隔は偏位なく、右肺と心臓の大きさは正常である。

Fig. 5 は胸腺欠損、右鎖骨下動脈起始異常、中等度左横隔膜ヘルニア、中等度肺低形成、心臓低形成の例である。左胸郭に入り込んだ肝臓により、心臓と縦隔が右に圧排されている。

Fig. 6 は高度の左横隔膜ヘルニア、総動脈幹残遺、胸腺欠損、高度な肺低形成の例である。ヘルニア孔から肝臓と胃が胸腔に入り、肝臓が左胸隔すべてを占拠して左肺は肺尖部に痕跡的に存在する。肝臓は更に縦隔を超えて右胸郭内まで入り、右肺の低形成を生じている。心臓は右に偏位して小さい。

Fig. 7 に心奇形を合併しない左ヘルニア 11 例の体重、肺容積、心房心室容積、心室筋量を対 Control % 値で示す。Control は Fig. 3 の例を含む心臓横隔膜正常の 10 例である。

Fig. 8 に心奇形を合併しない左ヘルニア 11 例の大

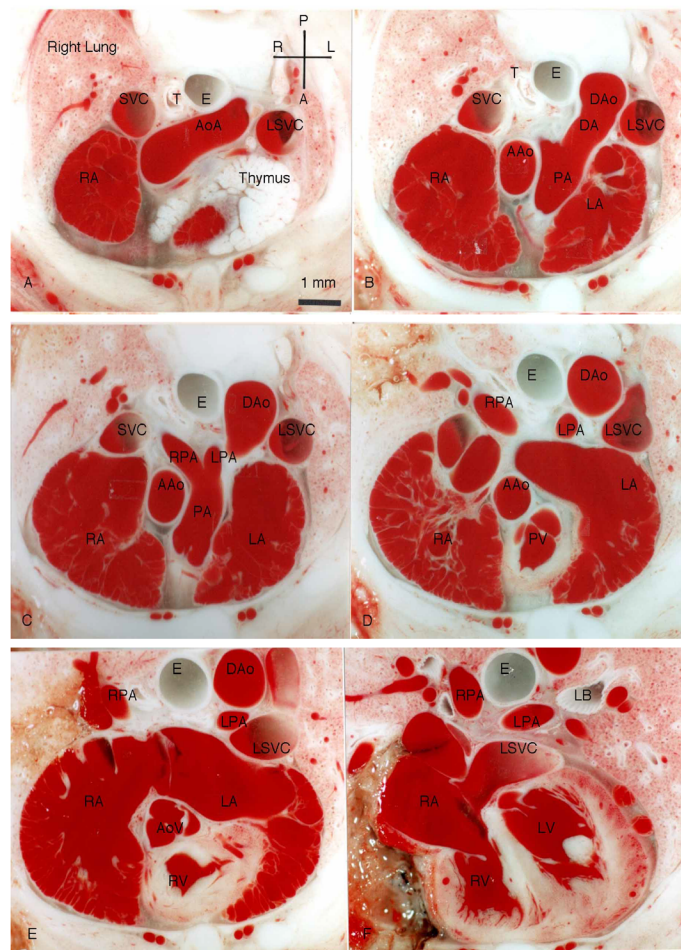


Fig. 2 Normal heart, lungs and thymus in a normal fetus without bis-diamine treatment

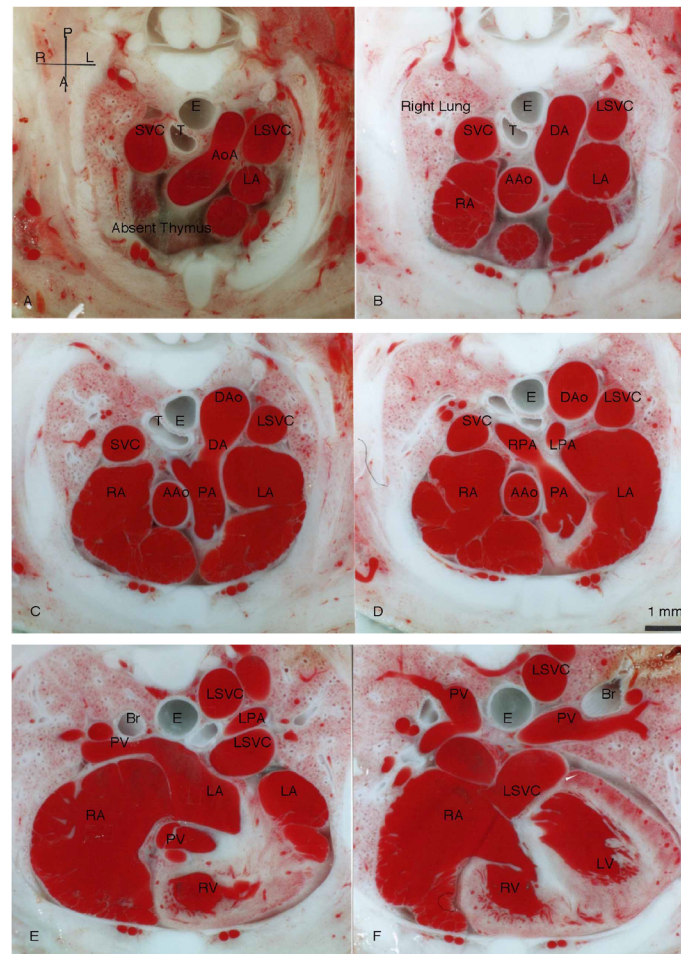


Fig. 3 Normal heart, lungs and absent thymus in a bis-diamine-treated rat fetus without diaphragmatic hernia

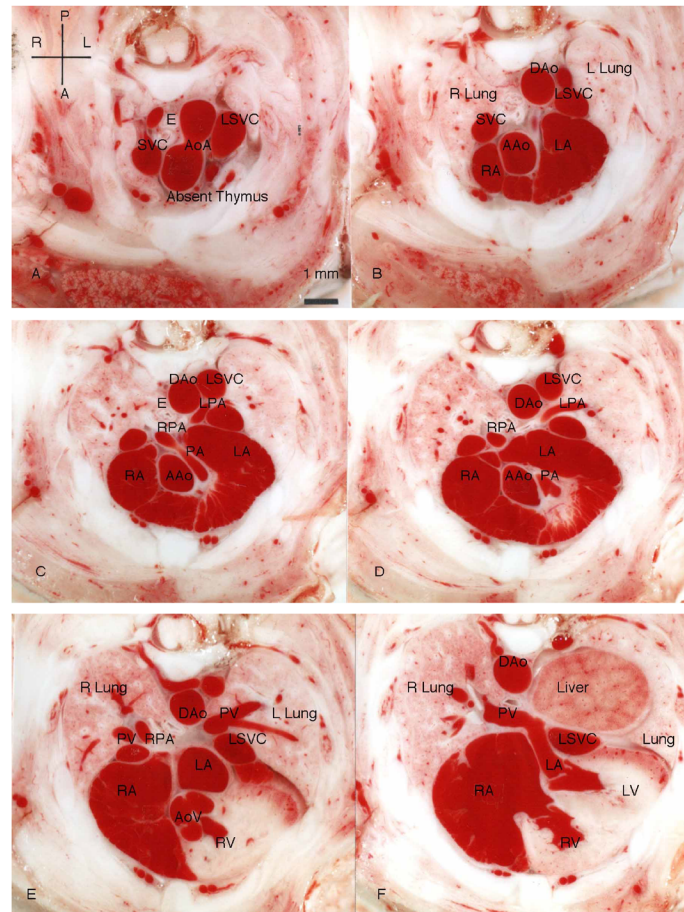


Fig. 4 Mild left diaphragmatic hernia (small-portion of liver in the left posterior hemi-thorax), tetralogy of Fallot, and mild pulmonary hypoplasia and mildly hypoplastic heart

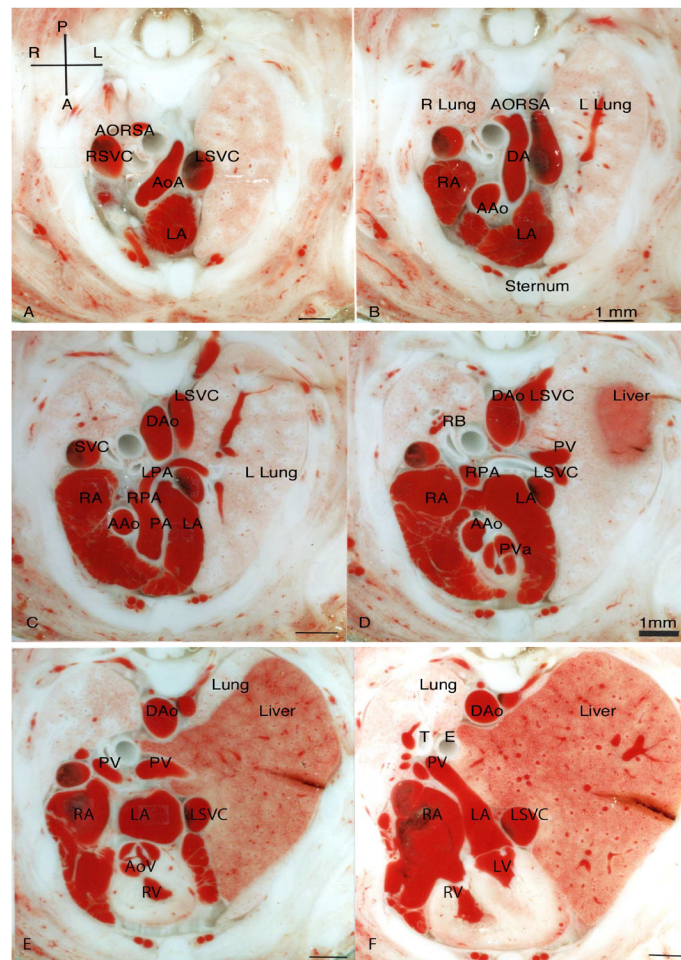


Fig. 5 Moderate left DH (liver in the middle and posterior left hemithorax), aberrant origin of RSA, moderately hypoplastic lungs and heart

Figures A, B, D, and F were reproduced with modification from Kazuo Momma et al: *Fetal Diagn Ther* 1992; 7: 46–52 ©1992 S. Karger AG. Basel.

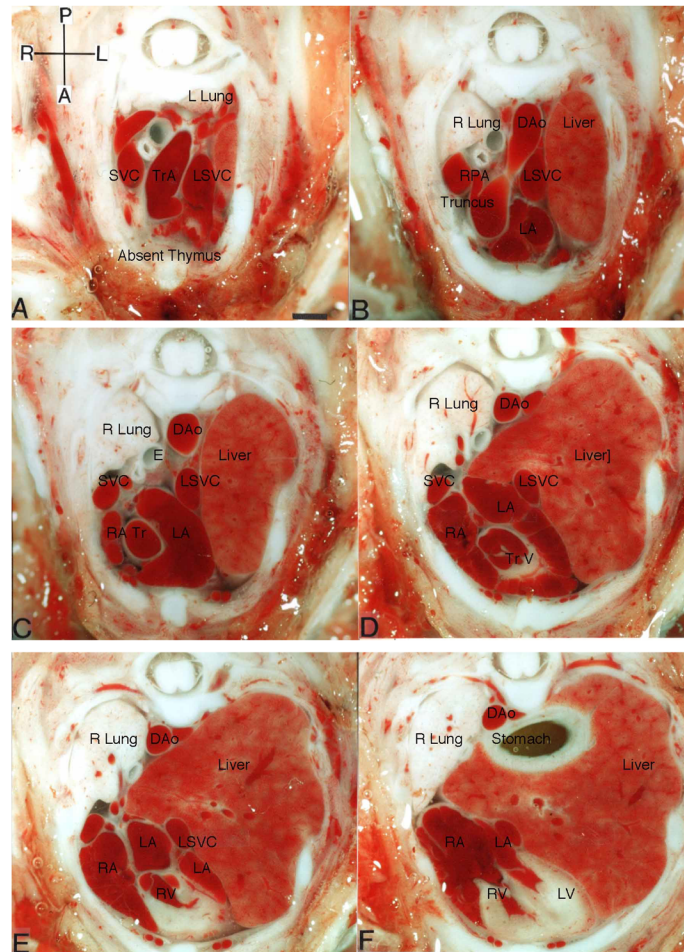


Fig. 6 Severe left DH. Liver and stomach in total left hemi-thorax. Persistent truncus arteriosus. Severely hypoplastic lungs and heart

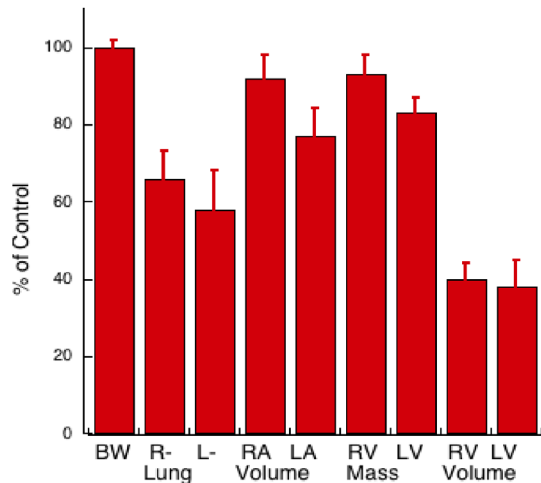


Fig. 7 Body weight and cardiac morphometry of 11 fetal rats with left congenital diaphragmatic hernia and no congenital cardiac anomaly

Mean±SEM. Controls were 10 fetal rats with no heart disease nor hernia following bis-diamine treatment.

動脈, 肺動脈, 大静脈の内径を対Control %値で示す。

Fig. 9は右横隔膜ヘルニア, 右鎖骨下動脈起始異常, 肺と心臓の低形成の例である。肝臓の一部が右胸郭後部に入り, 心臓が左に圧排されて内腔が小さくなり, 左右肺も小さい。

考 察

ここに示したラット横隔膜ヘルニアではヒトの小腸と結腸がまず胸郭内に脱出する臨床例と異なり肝臓が主に脱出していた。その理由はラットでは肝臓が横隔膜の腹腔面全面で厚い円盤状で張り付いているため, ヘルニア孔からまず肝臓だけが胸郭内に脱出するためである。正常ラットの食道は横隔膜と厚い肝臓を通過して腹腔に入って胃に移行する。ヘルニアでは胎生期に胸腔を占拠した腹部臓器は肺と心臓を圧迫してその成長を抑えて低形成を生じるが, その作用は内腔臓器である小腸や大腸よりも実質臓器である肝臓のほうが強いと推定される。bis-diamine投与後のラット胎仔横隔膜ヘルニアではヘルニアの大小にかかわらず胸郭の大きさは同じなので, 胸腔内を占拠した肝臓と胃の量に比例して肺と心臓(両心室)の低形成が生じている。心室の低形成はFig. 7に示す如く心筋量の軽度減少, 容積の高度減少であり, 拡張障害を示し, 胸腔内

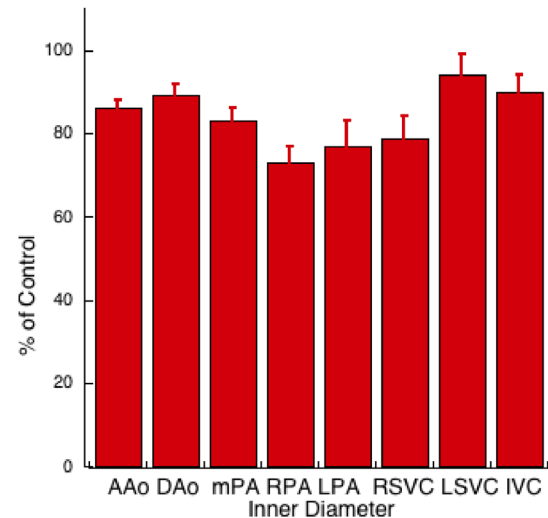


Fig. 8 Vascular size of 11 fetal rats shown in Fig. 7

腹部臓器による圧迫によると考えられるが, 組織学的検索では bis-diamine でラット胎仔心筋構造異常¹⁰⁾も報告されているので, 病的肥大の関与の可能性もある。

ヒト横隔膜ヘルニアでは通常右室は正常で左室が低形成になるのと異なり, ラットではここに示したように左右両心室の低形成を生じていた。ヒトのヘルニアでは左室低形成の機序として, 1. 肺低形成による肺-左房左室への血流低下, 2. 胸腔を占拠した腹部臓器による圧迫, 3. 心臓の右への偏位による下大静脈血の卵円孔経由の左房流入減少の3機序¹²⁾が推定されているが, ラットでは2が主に作用したことになる。

臨床上ヘルニア手術後の致死因子としては肺低形成による肺血管床減少, 肺高血圧が主であるが, 心臓低形成の関与も推定される。先天性横隔膜ヘルニア重症例の胎児治療には気管閉塞術¹³⁾が始まり, 薬物治療^{14,15)}が模索されている。Inamura¹⁶⁾は胎児診断例の重症度に関連した出生後薬物療法を論じている。本症の肺高血圧の成因は従来肺低形成によると考えられてきたが, 最近先天性横隔膜ヘルニア形成因子であるPBX¹⁷⁾が出生時肺血管拡張因子¹⁸⁾と判明し, この因子の欠如も肺高血圧に関与すると推定される。

横隔膜ヘルニアの12%に先天性心疾患が合併¹⁹⁾し, ファロー四徴症の合併²⁾も報告されている。最近22q11.2欠失症候群の0.8%に横隔膜ヘルニアが合併することが報告²⁰⁾された。したがってこの図譜のFigs. 4~6の如く, 臨床胎児エコーで先天性心疾患, conotruncal anomalyと横隔膜ヘルニアの合併する例は22q11.2欠失症候群の可能性が高い。

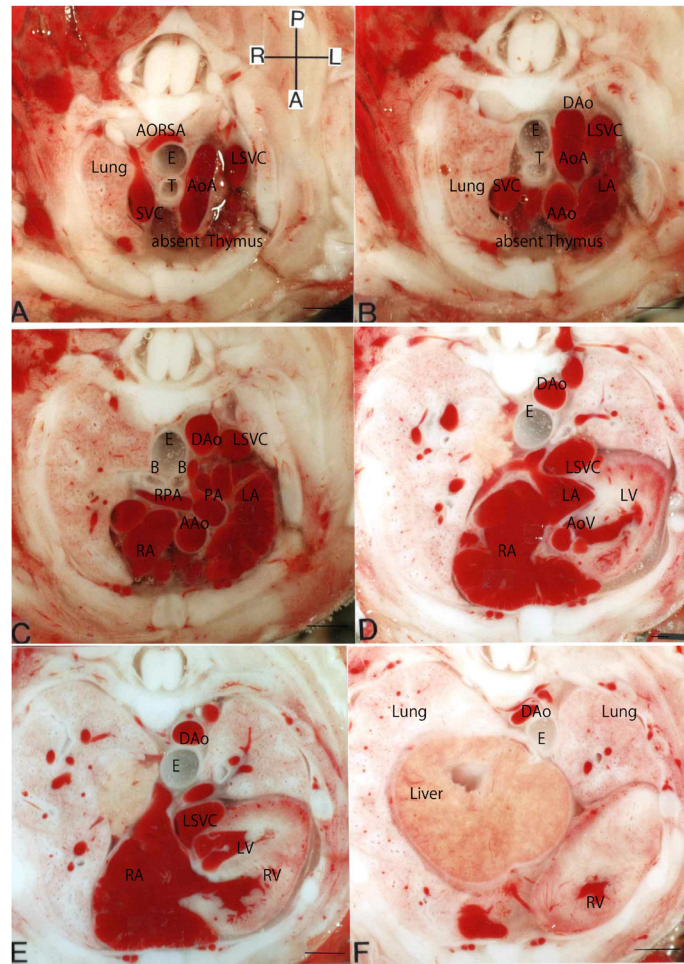


Fig. 9 Mild to moderate right DH (small portion of liver in the right posterior hemithorax), AORSA, absent thymus, mildly hypoplastic lungs and heart

おわりに

この図譜が先天性横隔膜ヘルニアの肺低形成と心臓低形成の理解に役立つことを期待している。

利益相反

本稿について開示すべき利益相反 (COI) はありません。

引用文献

- 1) Yamoto M, Inamura N, Terui K, et al: Echocardiographic predictors of poor prognosis in congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2016; **51**: 1926–1930
- 2) Kotecha S, Barbato A, Bush A, et al: Congenital diaphragmatic hernia. *Eur Respir J* 2012; **39**: 820–829
- 3) Chandrasekharan PK, Rawat M, Madappa R, et al: Congenital diaphragmatic hernia: A review. *Matern Health Neonatol Perinatol* 2017; **3**: 6
- 4) Victoria T, Danzer E, Adzick NS: Use of ultrasound and MRI for evaluation of lung volumes in fetuses with isolated congenital diaphragmatic hernia. *Semin Pediatr Surg* 2013; **22**: 30–36
- 5) Claus F, Sandaite I, Dekoninck P, et al: Prenatal anatomical imaging in fetuses with congenital diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther* 2011; **29**: 88–100
- 6) Hörnblad PY, Larsson KS: Studies on closure of the ductus arteriosus 1: Whole-body freezing as improvement of fixation procedures. *Cardiologia* 1967; **51**: 231–241
- 7) 門間和夫: 動脈管薬の実験 40 年. *日小児循環器会誌* 2016; **32**: 261–269
- 8) Momma K, Ando M, Takao A: Fetal cardiac morphology of tetralogy of Fallot with absent pulmonary valve in the rat. *Circulation* 1990; **82**: 1343–1351
- 9) Momma K, Ando M, Mori Y, et al: Hypoplasia of the lung and heart in the fetal rat with diaphragmatic hernia. *Fetal Diagn Ther* 1992; **7**: 46–52
- 10) Kuribayashi T, Roberts WC: Tetralogy of Fallot, truncus arteriosus, abnormal myocardial architecture and anomalies of the aortic arch system induced by bis-diamine in rat fetuses. *J Am Coll Cardiol* 1993; **21**: 768–776
- 11) Hebel R, Stromberg MW: *Anatomy and Embryology of the Laboratory Rat*. Wörthsee, BioMed Verlag, 1986, pp112–113
- 12) 矢本真也, 福本弘二, 宮野 剛, ほか: 胎児心臓超音波検査による先天性横隔膜ヘルニアの新しい重症度指標. *日小外会誌* 2015; **51**: 205–2120
- 13) Mous DS, Kool HM, Wijnen R, et al: Pulmonary vascular development in congenital diaphragmatic hernia. *Eur Respir Rev* 2018; **27**: 170104
- 14) Luong C, Rey-Perra J, Vadivel A, et al: Antenatal sildenafil treatment attenuates pulmonary hypertension in experimental congenital diaphragmatic hernia. *Circulation* 2011; **123**: 2120–2131
- 15) Umeda S, Miyagawa S, Hukushima S, et al: Enhanced pulmonary vascular and alveolar development via prenatal administration of a slow-release synthetic prostacyclin agonist in rat fetal lung hypoplasia. *Pros One* 2016; DOI: 10.1371/journal.pone.01611334
- 16) Inamura N, Kubota A, Nakajima T, et al: A proposal of new therapeutic strategy for antenatally diagnosed congenital diaphragmatic hernia. *J Pediatr Surg* 2005; **40**: 1315–1319
- 17) Russell MK, Longoni M, Wells J, et al: Congenital diaphragmatic hernia candidate genes derived from embryonic transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; **109**: 2978–2983
- 18) McCulley DJ, Wienhold MD, Hines EA, et al: PBX transcription factors drive pulmonary vascular adaptation to birth. *J Clin Invest* 2018; **128**: 655–667
- 19) Takahashi S, Sago H, Kanamori Y, et al: Prognostic factors of congenital diaphragmatic hernia accompanied by cardiovascular malformation. *Pediatr Int* 2013; **55**: 492–497
- 20) Unolt M, DiCairano L, Schlechtweg K, et al: Congenital diaphragmatic hernia in 22q11.2 deletion syndrome. *Am J Med Genet* 2017; **17**: 135–142