

肝細胞への超音波遺伝子導入・培養・保存方法の検討

分担研究者 宮本義孝 名古屋大学医学部 助教

研究要旨

本研究では、母体外からの超音波照射により胎児標的組織（細胞）に目的遺伝子を導入し、遺伝子機能異常の出生前発現を低侵襲性に一定期間は正する安全性の高い胎児期遺伝子治療の確立を目的とする。特に、胎児では、代謝・免疫・造血機能が一つの臓器（肝）に集約され、出生後の免疫学的トレランスを獲得しやすい。そこで、本年度は、プロジェクトの基盤技術である超音波遺伝子導入法を用い、標的組織である肝臓（肝細胞）への遺伝子導入実験を行った。まず、超音波造影剤として利用されているマイクロバブル（ソナゾイド）を用いて、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 への超音波遺伝子導入実験を行い、低い導入効率ではあるが、細胞内への遺伝子の取り込みが確認できた。また、次年度以降、初代ヒト肝細胞を利用するため、分離、培養と凍結保存の基礎検討も行った。

A. 研究目的

本研究では、母体外からの超音波照射により胎児標的組織（細胞）に目的遺伝子を導入し、遺伝子機能異常の出生前発現を低侵襲性に一定期間は正する安全性の高い胎児期遺伝子治療の確立を目的とする。特に、胎児では、代謝・免疫・造血機能が一つの臓器（肝）に集約され、出生後の免疫学的トレランスを獲得しやすい。そこで、本年度は、プロジェクトの基盤技術である超音波遺伝子導入法を用い、標的組織である肝臓（肝細胞）への遺伝子導入を行った。

超音波遺伝子導入法とは、超音波を照射することにより、キャビテーションを生じさせ、細胞膜に一過性の微小孔を空ける。その小孔を介して、細胞内への遺伝子導入が可能となり、マイクロバブルを併用することにより、その効果を増強させることもできる。他にも、遺伝子導入法として、ウイルスベクターを用いた手法があるが、安全性についての問題など多くの課題が残されており、母体-胎児両方へのリスクを考えると、ウイルスを用いない超音波遺伝子導入法は最適であると考えられる。

そこで、本研究では、肝細胞への超音波遺伝子導入の可能性について検証した。肝細胞は、肝臓の約70%を占め、数ある初代細胞の中でも、培養と凍結が難しい細胞の一つとして挙げられる。我々は、まず、ヒト肝癌由来細胞株である HepG2 を用い、検討することにした。また、次年度以降、初代ヒト肝細胞を利用するため、培養と凍結条件について検証したので、あわせて報告する。以下に、本年度の課題項目を示す。

- 1) 超音波照射によるマイクロバブル破碎と肝細胞へのダメージの検証。
- 2) 肝細胞への超音波遺伝子導入法の検証。
- 3) ヒト肝細胞の分離、培養と凍結保存。

B. 研究方法

B-1 超音波照射によるマイクロバブル破碎と肝細胞へのダメージの検証

【材料】本研究では、株化細胞として、ヒト肝癌由来細胞株（HepG2）を用いた。超音波造影剤として、臨床検査で使用されているソナゾイド（第一三共株式会社）を用いた。ソナゾイドは、内部気体が C₄F₁₀ で、シェルが 2.3~2.9 μm の超音波に対して安定なマイクロバブルである。また、持続的な造影効果（血管イメージングならびにクーパーイメージング）が得る特徴を有する。

【方法】96 穴培養皿（Nunc）上に、HepG2 細胞を播種し（ 2×10^4 cells/100μL）、37℃、5%CO₂ 下で 24 時間培養した。以下に、その細胞培養液の組成を示す（Doubecco's modified Eagle's Medium (Invitrogen)、10%FBS (Biowest)、1%Penicillin-Streptomycin (Invitrogen))。細胞培養後、培養皿内の各ウェルに対して、超音波照射条件を設定し、細胞へのダメージを評価した（周波数: 3.122MHz、印加電圧 30-60V、Duty 比 50%、Burst Rate 2.0Hz、Duration 10sec、出力強度 0.61-2.20 W/cm²）。超音波遺伝子導入装置はソノポール 4000 (KTAC-4000, NEPAGENE)、超音波プローブはドーム前方照射型 8mmT を用いた (Fig.1, Fig.2)。細胞生存率の評価方法として、1) 蛍光プローブによるカルセイン AM とエチジウムホモダイマー-1 (EthD-1) を用いた評価法 (LIVE/DEAD Assay

Kit; Invitrogen), 2) 高感度水溶性ホルマザンを生
成する新規テトラゾリウム塩 WST-8 を発色基質と
して用いた評価方法(Cell Counting Kit-8; DOJINDO)
を利用した。



Fig.1 超音波遺伝子導入装置ソノボール 4000
(KTAC-4000, NEPAGENE).



Fig.2 ドーム前方照射型 8mmT 超音波プローブ。

B-2 肝細胞への超音波遺伝子導入法の検証

【材料】 哺乳類細胞レポーターベクターとして、
Lac Z 遺伝子を含むプラスミド DNA (pCMV α Vector
(PT2004-5); Clontech) を用いた。

【方法】 実験操作は、B-1 と同様の方法を用いた。
その中でも、遺伝子導入実験は、プラスミド DNA
とマイクロバブルを混和したのち、直ちに、96 ウェ
ル内の HepG2 細胞の培地を交換し、超音波を照射し
て、マイクロバブルを破碎した。マイクロバブル破
碎後、培地交換を繰り返し、ソナゾイドの被膜 (ホ
スファチジルセリンナトリウム) を除去した。除去
後、ウェル内に細胞培養液を加え、37°C、5%CO₂
下で 48 時間培養した。細胞内への遺伝子導入の評
価方法として、細胞中の α -ガラクトシダーゼ活性を
検出し、Lac Z 遺伝子が発現する細胞を同定した
(X-Gal Staining Assay Kit (A10300K); Genlantis)。
コントロール実験として、非ウイルスベクターであ
るリポフェクタミン 2000 (Invitrogen)、ウイルスベ
クターである Lac Z 遺伝子を含むアデノウイルスベ
クターを用いた。

B-3 ヒト肝細胞の分離と培養

米国から HAB 研究機構に空輸された移植不適合
肝 (冷阻血時間約 40 時間前後; 冷蔵輸送 UW 保存
液を使用) から、直ちに Seglen のコラゲナーゼ灌流
法によりヒト肝細胞を分離した。肝細胞の分離方法

は、Seglen のコラゲナーゼ灌流法 (ディスパーゼ含
有コラゲナーゼ溶液) を用い、ヒト肝組織より分離
精製した。細胞分離後、Type I コラーゲンコート培
養皿 (6 ウェルタイプ; BD Biocoat) 上に肝細胞を播
種し (2×10^5 cells/mL), 37°C、5%CO₂ 下で培養した。
以下に、その培養液の組成を示す (William's Medium
E (Invitrogen), 10%FBS (Bench Mark), 1%Kanamycin
Sulfate (Invitrogen), 1%Penicillin Sereptomycin
(Invitrogen), 1 μ M Insulin (Sigma), 0.1 μ M
Dexamethasone (Sigma)). 培養後、細胞の形態を観察
し、生存率を評価した。

B-4 ヒト肝細胞の凍結保存

米国から HAB 研究機構に空輸された移植不適合
肝 (冷阻血時間約 40 時間前後; 冷蔵輸送 UW 保存
液を使用) から、直ちに Seglen のコラゲナーゼ灌流
法によりヒト肝細胞を分離した。基本凍結保存液と
して、DMEM と 10%DMSO を用い、保護剤として、
セリシン (セーレン (株) 製) やオリゴ糖を添加し
た。凍結は、プログラムフリーザー (KRYO10,
PLANER) を用い、保存は液体窒素内に保管した。

液体窒素中から肝細胞凍結チューブを取り出し、
直ちに 37°C 恒温槽に浸けて急速解凍した。融解後、
肝細胞の生存率を測定し (トリパンプルー色素排除
法による)、24 時間培養後、培養皿への肝細胞の生
着率を評価した。また、示差走査熱量計 (DSC) に
より、保存液組成の結晶化挙動を解析した。

(倫理面への配慮)

名古屋大学

実験動物に関して、「動物の愛護及び管理に関す
る法律」(昭和 48 年法律第 105 号)、「実験動物の飼
養及び管理等に関する基準」(昭和 55 年総理府告
示第 6 号)及び「名古屋大学動物実験指針」に基づき、
適正な使用及び取り扱いを行う。

国立成育医療センター

ヒト臓器・組織供給バンクである NDRI (National
Disease Research Interchange, 米国)を通じて、(NPO)
HAB 研究機構からヒト由来組織・細胞を入手した。
このことより、入手経路が明らかで、品質の保証さ
れたヒト臓器・組織を得ることができるため、研究
者の受ける危険性が最小化される。

ヒト肝組織・細胞を使用するための倫理審査: 国立
成育医療センター・倫理委員会審査より (H16.8.10)
受付番号 98, 「ヒト肝の創薬研究資源化」, 安全対
策: 遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物
の多様性の確保に関する法律 (カルタヘナ法) にお
いて、バイオセーフティーレベル 2 の設備は設置済
み

(謝辞) 肝臓をご提供頂いたドナーの方々及び同機
構スタッフに深く感謝いたします。

C. 研究結果

C-1 超音波照射によるマイクロバブル破碎と肝細胞へのダメージの検証

HepG2 細胞への超音波照射条件を設定し、マイクロバブル (0-10% v/v 細胞培養液) 量を変えながら、細胞へのダメージを検証した。その結果、マイクロバブルと接着細胞 (HepG2) の距離が接近するにつれて、細胞へのダメージが大きくなることが確認できた (LIVE/DEAD Assay, WST-1 Assay)。しかしながら、細胞培養容器内の圧力分布が一様ではないため、容器内の接着細胞の場所により、細胞生存率に差が見られた。

C-2 肝細胞への超音波遺伝子導入法の検証

HepG2 細胞への超音波照射条件を設定し、マイクロバブル (0-10% v/v 培養培地溶液)、プラスミド DNA の量を変えながら、細胞への遺伝子導入率を検証した。C-1 と同様に、マイクロバブルと接着細胞の距離が接近するにつれて、細胞への遺伝子導入率が高くなることが確認できた。さらに、プラスミド DNA の量が大きくなるにつれて、細胞への遺伝子導入率が高いことが確認できた。

対照実験として、アデノウイルスベクターを用いた。その結果、HepG2 細胞で Lac Z 遺伝子が高い発現効率を示すことが確認できた。

C-3 ヒト肝細胞の分離と培養

ヒト肝臓より、肝細胞を分離することに成功した。分離した肝細胞を用いて、1 週間培養を行ったが、細胞の形態も良好で、生存率も非常に高かった。また、ヒト肝臓の状態によって、細胞の生存率、回収率が大きく異なることが確認できた。

C-4 ヒト肝細胞の凍結保存

新鮮ヒト肝細胞に 1% セリシンや 0.1M マルトースを添加して保存した場合、対照群と比べて、解凍後の生存率が約 1.4 倍高く、その生着率も約 2.3 倍高まった (Fig.3)。また、凍結時の保存液組成の結晶化挙動は、高分子量のセリシン添加時と、低分子量のオリゴ糖添加時で、大きな差は見られなかった。

D. 考察

ヒト肝癌由来細胞株 (HepG2) を用いた超音波遺伝子導入の実験では、マイクロバブル、プラスミド DNA の量を変えることにより、細胞内への導入効率に差が見られた。特に、HepG2 細胞への導入効率は、プラスミド DNA 量に大きく依存することが確認できた。また、非ウイルスベクターであるリポフェクタミンと比べて、マイクロバブル-プラスミド DNA 混合溶液中での遺伝子導入率は低いが、今後の遺伝

子導入条件の最適化により改善できる可能性を見出した。特に、培養容器内の細胞に、均一に遺伝子導入されていない点を考えると、今後、超音波照射条件の最適化、培養容器を含めた総合的な検証を行う必要がある。

また、本年度、ヒト肝細胞の分離、培養と凍結保存の基礎検証を行った。入手したヒト肝臓の状態にもよるが、凍結ヒト肝細胞を用いても、長期培養することが可能であった (Fig.3)。

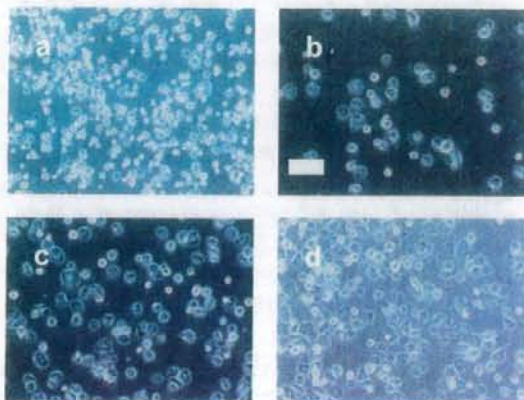


Fig.3 凍結保存・解凍後のヒト肝細胞の培養1日目の位相差顕微鏡像。Scale bar (100um)。凍結保存液の基本組成(DMEM, 10% DMSO); a. 保存前, b. 保存後 (-), c. 保存後 (1%セリシン), d. 保存後 (1%セリシン/0.1M マルトース)。

E. 結論

本研究では、肝細胞に対して、マイクロバブルと超音波照射による遺伝子導入実験の基礎検討を行い、低い導入効率ではあるが、細胞内への遺伝子の取り込みが確認できた。今後、肝細胞での遺伝子導入効率の向上と初代細胞への応用を目指す。

F. 健康危険情報

統括研究報告書に記載

G. 研究発表

1.論文発表

なし

2.学会発表

1. Miyamoto Y, Suzuki S, Takezawa T, Ikeya T, Hayashi S, Enosawa S. Improvement of Cryopreservation of Human and Rat Hepatocytes using Oligosaccharides and 3D Culture Matrix. The 35th Annual Meeting of the

Japan Society for Low Temperature Medicine. Tokyo, Japan 11/21-23, 2008.

2. 宮本義孝, 湯川博, 大石幸一, 野口洋文, 林衆治. 生分解性ポリマーを用いた細胞クラスターの構築. 第8回日本再生医療学会総会, 東京, 2009年3月5-6日.
3. 湯川博, 鏡味幸真, 渡辺将生, 大石幸一, 宮本義孝, 加地範匡, 野口洋文, 馬場嘉信, 林衆治. 量子ドットを用いた幹細胞イメージング. 第35回日本臓器保存生物医学会, 東京, 2008年11月21-23日.
4. 宮本義孝, 鈴木聡, 寺本直純, 佐々木真宏, 林衆治, 絵野沢伸. 肝細胞における凍結保存とその保護剤の有用性. 第35回日本臓器保存生物医学会, 東京, 2008年11月21-23日.
5. 大石幸一, 野口洋文, 齋藤弘明, 湯川博, 宮本義孝, 村瀬勝俊, 林衆治. 膵島移植のための新規磁性ナノ粒子を用いた *in vivo* イメージング法の検討. 第44回日本移植学会総会, 大阪, 2008年9月19-21日.
6. 野口洋文, 齋藤弘明, 大石幸一, 湯川博, 宮本義孝, 村瀬勝俊, 林衆治. 移植細胞イメージングのための新規磁性ナノ粒子の開発. 第44回日本移植学会総会, 大阪, 2008年9月19-21日.
7. 宮本義孝, 池谷武志, 絵野沢伸. 三次元組織構築用培養ツール, 細胞アレイの凍結保存. 第44回日本移植学会総会, 大阪, 2008年9月19-21日.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

別紙5

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
本年度は該当なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
<u>千葉敏雄</u>	特集 小児医療と倫理的緒問題 巻頭言 「小児・胎児医療と生命倫理学」	小児外科	40(10)	1099-1101	2008
中山智理, 石山昭彦, 石井徹子, 山下紘正, <u>宮本義孝</u> , 三好敏喜, 東隆, <u>千葉敏雄</u> , 土岐彰	胎児胸腔内腫瘍性病変に対する新しい治療法 High-intensity focused ultrasound(HIFU)の試み	日本小児外科学会雑誌	44(3)	334	2008
石井徹子, <u>千葉敏雄</u>	胎児先天性心疾患の外科治療	心臓	40(11)	933-937	2008
Nakayama N, Ishiyama A, Ishii T, Yamashita H, <u>Mivamoto Y</u> , Miyoshi T, Azuma T, <u>Chiba T</u> , Toki A	Pulmonary Vessel Occlusion Using High intensity Focused Ultrasound (HIFU): Is It Useful for Minimally Invasive Treatment of Fetal Chest Mass?	15th Congress of the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies (AOPS 2008)	2008	159	2008

Yamashita H, Ishii T, Ishiyama A, Nakayama N, Miyoshi T, Miyamoto Y , Kitazumi G, Katsuike Y, Okazaki M, Azuma T, Fujisaki M, Takamoto S, Chiba T	Computer-aided Delivery of High-Intensity Focused Ultrasound (HIFU) for Creation of an Atrial Septal Defect In vivo	Medical Imaging and Augmented Reality. Springer Berlin/Heidelberg	Lecture Notes in Computer Science 5128	300-310	2008
Zhu W, Shiojima I, Ito Y, Li Z, Ikeda H, Yoshida M, Naito AT, Nishi J, Ueno H, Umezawa A , Minamino T, Nagai T, Kikuchi A, Asashima M, Komuro I	IGFBP-4 is an inhibitor of canonical Wnt signalling required for cardiogenesis	Nature	454 (7202)	345-349	2008
Sullivan S, Ichida JK, Umezawa A , Akutsu H	Elucidating nuclear reprogramming mechanisms: taking a synergistic approach	Reprod Biomed Online	16(1)	41-50	2008
Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa A	The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice	Proc Natl Acad Sci USA	105 (35)	12921-12926	2008

Seko Y, Azuma N, Takahashi Y, Makino H, Morito T, Muneta T, Matsumoto K, Saito H, Sekiya I, <u>Umezawa A</u>	Human sclera maintains common characteristics with cartilage throughout evolution	PLoS ONE	3(11)	e3709	2008
Kawakita A, Sato K, Makino H, Ikegami H, Takayama S, Toyama Y, <u>Umezawa A</u>	Nicotine acts on growth plate chondrocytes to delay skeletal growth through the alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptor	PLoS ONE	3(12)	e3945	2008
Miyagawa Y, Okita H, Nakajima H, Horiuchi Y, Sato B, Taguchi T, Toyoda M, Katagiri YU, Fujimoto J, Hata J, <u>Umezawa A</u> , Kiyokawa N	Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells	Mol Cell Biol	28(7)	2125-21 37	2008
Hida N, Nishiyama N, Miyoshi S, Kira S, Segawa K, Uyama T, Mori T, Miyado K, Ikegami Y, Cui C, Kiyono T, Kyo S, Shimizu T, Okano T, Sakamoto M, Ogawa S, <u>Umezawa A</u>	Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells	Stem Cells	26(7)	1695-17 04	2008

Kami D, Shiojima I, Makino H, Matsumoto K, Takahashi Y, Ishii R, Naito AT, Toyoda M, Saito H, Watanabe M, Komuro I, Umezawa A	Gremlin enhances the determined path to cardiomyogenesis	PLoS ONE	3(6)	e2407	2008
Nakamura Y, Yosh inaka K, Takagi S, Matsumoto Y	Ultrasound gene transfer i nto fibroblast cells under microbubble	8th International Sympo sium on Therapeutic Ul trasound	2008	103	2008
橋理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎	超音波印電子導入の蛍光 顕微鏡による可視化	可視化情報全国講演会 2008	28(2)	155-156	2008
橋理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎	マイクロバブルを援用し た超音波遺伝子導入に関 する研究	第7回日本超音波治療 研究会	2008	CD-RO M	2008
橋理恵, 岡本旭生, 葭仲潔, 高木周, 松本洋一郎	マイクロバブルを援用し た超音波遺伝子導入に関 する研究	第14回キャピテーショ ンに関するシンポジウ ム	2009	CD-RO M	2009
Muramatsu Y, Ued a S, Nakamoto R, Nakayashiki Y, Masuda K , Ishihar a K	Study of effect in active p ath selection of fluid micr ocapsules to the variation of ultrasound emission at t he bifurcation point	Proc. of the 29th Symp osium on Ultrasonic El ectronics	2008	291-292	2008
梶田晃司, 村松悠 佑, 溝部一行, 石 原謙	超音波定在波の印加によ る流路中のマイクロカプ セルの局所的濃度制御と その観測	生体医工学	46(2)	275-282	2008
梶田晃司	マイクロカプセルとドラ ッグデリバリー	日本機械学会誌	111 (1074)	404-407	2008

Muramatsu Y, Ueda S, Nakamoto R, Nakayashiki Y, Masuda K , Ishihara K	Active path selection of fluid microcapsules by acoustic radiation force in the artificial blood vessel	Proc. of 4th European Medical & Biological Engineering Conference	2008	1589-1593	2008
村松悠佑, 上田沢美, 榊田晃司 , 石原謙	血管内を流れるマイクロカプセルに対する音響放射力の影響の検討	日本超音波医学会 第81回学術集会論文集	35 Suppl.	S272	2008
榊田晃司 , 石原謙, 上田沢美, 村松悠佑	マイクロカプセルの血管内局所的濃度変化のための音場形成法の検討	第47回日本生体医工学大会大会プログラム・論文集	2008	CD-ROM	2008
宮本義孝 , 湯川博, 大石幸一, 野口洋文, 林衆治	生分解性ポリマーを用いた細胞クラスターの構築	日本再生医療学会雑誌	8 Suppl.	181	2009
Miyamoto Y , Suzuki S, Takezawa T, Ikeya T, Hayashi S, Enosawa S	Improvement of Cryopreservation of Human and Rat Hepatocytes using Oligosaccharides and 3D Culture Matrix	LOW TEMPERATURE MEDICINE	34(3)	74-75	2008
湯川博, 鏡味幸真, 渡辺将生, 大石幸一, 宮本義孝 , 加地範匡, 野口洋文, 馬場嘉信, 林衆治	量子ドットを用いた幹細胞イメージング	Organ Biology	15(3)	261	2008
宮本義孝 , 鈴木聡, 寺本直純, 佐々木真宏, 林衆治, 絵野沢伸	肝細胞凍結保存における保護剤の有用性	Organ Biology	15(3)	282	2008
大石幸一, 野口洋文, 齋藤弘明, 湯川博, 宮本義孝 , 村瀬勝俊, 林衆治	膵島移植のための磁性ナノ粒子を用いたMRI画像診断法に関する検討	移植	43	388	2008

野口洋文, 齋藤弘明, 大石幸一, 湯川博, 宮本義孝 , 村瀬勝俊, 林衆治	移植細胞イメージングのための新規磁性ナノ粒子の開発	移植	43	427	2008
宮本義孝 , 池谷武志, 絵野沢伸	三次元組織構築用培養ツール, 細胞アレイの凍結保存	移植	43	257	2008

小児外科

2008
October
Vol. 40 No.10

10

Japanese Journal of Pediatric Surgery

www.tokyo-igakusha.co.jp

特集

小児医療と倫理的諸問題

- 巻頭言 小児・胎児医療と生命倫理学 ————— 千葉 敏 雄
胎児治療における倫理的諸問題 ————— 窪田 昭 男
遺伝子治療と倫理的諸問題 ————— 吉田 雅 幸
ES細胞研究と倫理的諸問題 ————— 高木 美也 孝
染色体異常を伴った外科症例の倫理的諸問題 ————— 蕪澤 融 司
13トリソミー, 18トリソミーの予後 ————— 古庄 知 己
重症染色体異常を伴った小児の治療方針 (1) ————— 船 戸 正 久
重症染色体異常を伴った小児の治療方針 (2) ————— 國 方 徹 也
重症染色体異常を伴った小児に対する外科手術 (1) ————— 上 野 滋
重症染色体異常を伴った小児に対する外科手術 (2) ————— 仁 科 孝 子
染色体異常と小児外科疾患における遺伝カウンセリング ————— 四 元 淳 子
臨床研究 (試験) と倫理的諸問題 ————— 内 田 英 二
重症心身障害児医療と倫理的諸問題 ————— 岩 崎 裕 治
小児における脳死判定 ————— 杉 本 健 郎
小児における尊厳死 ————— 傳 野 隆 一
小児院外心肺停止 ————— 吉 本 昭
小児医療現場 (労働環境) における諸問題 ————— 本 田 宏

連載 小児外科医の散歩道91

小児外科を礎に変化した私の徒然なる医師人生 ————— 後 藤 誠

■ 特集 小児医療と倫理的諸問題

巻頭言

小児・胎児医療と生命倫理学

千葉 敏 雄*

生命倫理学 (bioethics) は、医療における倫理問題を扱うというその性格上、現実には医療倫理 (ないし “医の倫理”) 学とも呼ばれてきた。この医療倫理は、少なくとも 20 世紀半ばまでは世界的に、医師の患者への接し方に重点をおくものであった。しかし、この概念は、近年の医療倫理を考えるには狭すぎるものとなっている。それは、チーム医療を基礎とし急速な進歩を遂げた先端の医療技術 (生殖医療、移植医療、遺伝子診療技術など) が、われわれの生命に介入してくる可能性が現実のものとなったこと等に起因する。すなわち、医療倫理は現在、医師個々の倫理的判断枠におさまるものではなく、その意味で生命ないし生物医学倫理 (biomedical ethics) といった名称がよりふさわしいものとなっている。このような生命倫理学は、医療のあり方に対する近年の各方面からの問題提起により、学際的意味あいの強い新学問領域として主にアメリカで発展を遂げてきた。同時に生命倫理学は、個々の地域的・社会的・文化的ないし思想的な背景と課題を包含しつつ、医療の転換・形態変更を広範な視点から促すものともなってきた。したがってわれわれには、生命倫理学を生み育ててきたアメリカでの成果を十分に参考としつつも、われわれ自身でこれを組みなおし提起してゆく努力が今強く求められている。そのために各医療スタッフには、確固たる倫理意識 (義務論) を踏まえつつも、決して原理的考察のみにしぼられることなく、その社会的広がり (功利主義) を個々の具体的場面に調和させてゆく枠組みの構成も求められている。

さて本企画は、生命倫理的諸問題における小児

医療の特異性に主眼をおきつつも、最近注目を浴びている胎児医療についても踏み込んだ検討を行う構成となっている。まず、話の焦点を小児期の患者に絞って考えてみたい。医療行為を受ける側には常に informed decision-making/informed consent に基づく意思決定が前提にある。成人ではこれが、通常患者自身の自己決定権・自律性 (autonomy) に依存するのに対し、小児では両親、胎児では妊娠母体に主に依存するという差異が指摘される。すなわち、患児、両親、医療スタッフの間で意見・方針になんらかの相違 (conflict) が生じた場合、両親が児を保護する責任と権利、医療者の職業的義務・倫理観を尊重しつつも、最終的には “何が患児にとって最大の利益をもたらすのか” という視点から (年長児・思春期以降では、患児本人の自律的意思に基づき) 医学的決定がなされることとなる。ここでは、近年患児自身の assent ないし dissent が十分に尊重 (respect) されるようになったことがとくに注目されるものの、とくに小児期では、提示される治療行為にて児の得られる利益がその dissent に勝る場合のあることも周知の事実である (その際、両親・医療スタッフは患児の意思決定過程を支援する役割を担う)。さて、小児医療の現場にて倫理上の現代的課題を構成する項目としては、1) 重症患児のケアにまつわる諸問題、すなわち CPR (cardiopulmonary resuscitation) や DNR (do not attempt resuscitation)、それに LSMT (life-sustaining medical treatment) を要する患児 (disabled newborn を含む) に対する withholding withdrawing の問題、2) 死と脳死さらに臓器移植を中心とする移植医療の諸問題、3) genetic testing とスクリーニング、4) 臨床研究とそのありかた、5)

* 国立成育医療センター特殊診療部

(〒157-8535 東京都世田谷区大蔵 2-10-1)

healthcare へのアクセスにおける格差 (rationing, distributive justice) などが挙げられる。その個々の詳細については、本企画の各エキスパートにより述べられてゆくことになる。

次に、現代の周産期・小児医療にかかわる challenging な倫理的問題の事例として、小児期医療とは一線を画する胎児治療につき若干の考察を加えてみたい。これは、胎児医療の現場では近年、その倫理的諸問題に対しさまざまな論議と混乱がみられるためである。通常、母体・胎児医療から派生する倫理的問題の大部分は主に次の2点から生じている。すなわち、1) 胎児治療にあつては患者は常に2人(母体および胎児)ということ、また2) 胎児疾患が診断された場合、独自の価値観・思考等に基づく個人固有の権利を有しない胎児を“患者(すなわち医療技術の対象)”といえるのか否か、そして患者とした場合には妊娠期間中のどの時点からそのようにみなしうのかということである。そして、実際の胎児医療の現場でさまざまな倫理的混乱をきたしている原因の少なくとも一部は、胎児が妊娠母体に依存するという意味において独立した人権を有せず(少なくとも有するという証拠は明らかでない: dependent moral status)、したがってその自律性 (autonomy) を発揮することがないにもかかわらず、“将来は独立した人権 (independent moral status) を有する胎児”に対し、近年の医療技術の進歩がその診断と治療を現実のものにしたという点にある。さらに、妊娠母体の意思・自律性 (autonomy) と母児管理にあたる医療スタッフの立場 (obligation) のかわりか、この問題を一層複雑なものにしているといえる。

これに対し近年、実際のかつ有用と思われる見解が提起されている (Chervenak and McCullough, 2001)。すなわち、一般にある個体を“患者”とみなすためには、その個体に“独立した人格 (independent moral status)”の存在することが必須というわけではないという考え方である。その場合、いまだ dependent である胎児 (将来の independent な人格) が“患者”たりうる条件とは、まずその胎児が viable (すなわち現在の医療技術レベルで母体外生存が可能) であり、その胎児が医療

スタッフのケアを受けられる状況にあること、同時に一定以上信頼性が見込める胎児治療技術が存在することと考えるのである (一方 previable な胎児は、妊娠母体が autonomy によりその胎児を患者と同意した場合に、はじめて“患者”とみなされる)。この場合医療スタッフには、妊娠母体の利益に対する義務 (すなわち、その胎児治療行為による母体の生命・QOL や次回妊娠の可能性に対するリスクが、客観的に最小と考えられるものであるべきこと)、および母体 autonomy の尊重が求められる。そしてその前提にたつたうえで、医療スタッフは母体に対して、患者である胎児の利益を守るための (胎児治療を含む) 選択肢を勧めようことになる (directive counseling)。ここで生じうる conflict、すなわち医療スタッフの directive counseling と妊娠母体の autonomy 間に生じうる conflict を未然に防止する手続きとして、voluntary/informed consent の意義が強調されることになる。ただし、ここでもう一点考慮すべきこととして、選択肢のひとつである胎児治療が standard clinical practice でない場合、それが innovative なものか experimental なものかということが挙げられる。そしてここに、医療施設内の活動チェック機構、すなわち IES (institutional ethical committee, 倫理委員会) ないし IRB (institutional review board, 施設内委員会) による科学的な評価・判断の意義を見出すことができる。

繰り返しになるが、現代の生命倫理学ないし医療倫理学は、生命科学を中心とする基礎科学や社会科学・人文科学のみならず、医療制度や医療政策論から医療機関経営論・医療産業をも含めて複合的・横断的に論じられる学問領域として発展しつつあり、この意味で、ますますその学際的な側面を濃くしていくことは間違いないことといえる。そしてこのような発想を系統的に推し進めることは、従来わが国が極めて不得意としてきた分野でもある。今回の特集を構成する各テーマの著者はいずれも、わが国の広範な領域から選ばぬかれたエキスパートばかりである。したがって本企画は、近年、成人期医療以上に複雑さを増し混乱がみられるようになった小児・胎児医療にお

ける倫理的諸問題に対し、一定の論点整理を行うとともに今後のあるべき方向性を示唆するという意味で、真に時宜を得たものといえる。本企画を

大きな契機として、わが国における小児・胎児医療を適切かつ健全に導く生命倫理学がますます発展してゆくことを願ってやまない。

小児内科

第40巻10号(10月号) 定価 2,690円

特集 重症心身障害児(者) 一 小児科医に必要な知識

(総論)

重症心身障害児(者)の概念と実態	……	椎原弘章
重症心身障害児(者)の診察のポイント	……	北住映二
一 臨床症状からの病態の把握	……	北住映二
NICU、一般病棟で重度の心身障害を残した 児にどう対処していくか—在宅医療へ 向けての支援制度を含めて	……	益山龍雄
重症心身障害児(者)の医療の現状と 問題点	……	三浦清邦
学校における医療的ケアの現状と展望	……	村上貴幸
合併障害の病態と診断・治療・管理	……	平元 東
全身管理の全般的な注意点	……	口分田政夫
栄養管理、水電解質管理	……	寺倉安綱
摂食障害と経管栄養	……	佐々木文章
胃食道逆流と逆流食道炎	……	有本 潔
便秘、麻痺性イレウス	……	山田和孝
吸引性肺炎	……	水野勇司
慢性呼吸障害	……	堀口利之
気管切開の管理と注意点	……	宮川哲夫
呼吸理学療法	……	石川悠加
非侵襲的陽圧換気療法	……	岡田賢司
呼吸器感染性と感染予防	……	須貝研司
てんかん発作の管理	……	

過緊張に対する筋弛緩薬治療	……	小西 徹
行動障害、睡眠障害	……	中島洋子
骨脆弱性と骨折の予防	……	中島健一郎
ポジショニング(姿勢運動への援助)の 重要性	……	彦田龍兵
口腔衛生	……	西村美智子
重症心身障害者の思春期と婦人科疾患	……	荒木久美子
高齢化したつづめる重症心身障害者の 医療上の問題点(悪性腫瘍)	……	倉田清子
(主に専門施設で行われる検査・治療)		
ビデオ嚥下造影検査	……	永江彰子
摂食指導および食形態について	……	高見葉津
胃瘻造設	……	田中裕次郎
重症心身障害児(者)の呼吸障害に対する治療		
一 肺内パーカッションベンチレータと インエクスサフレータ	……	金子断行
喉頭気管分離術	……	奥村啓子
ボツリヌス毒素療法	……	根津敦夫
機能的脊髄後根切断術	……	師田信人
補助・代替コミュニケーション手段	……	高泉喜昭
(付録)		
重症心身障害児(者)に対する医療補助、 福祉制度一覧	……	福地哲郎

S-019 胎児胸腔内腫瘍性病変に対する新しい治療法—High-intensity focused ultrasound(HIFU)—の試み

国立成育医療センター特殊診療部¹⁾、昭和大学小児外科診療グループ²⁾、日立製作所中央研究所³⁾、中山智理¹⁾²⁾、石山昭彦¹⁾、石井徹子¹⁾、山下結正¹⁾、宮本義孝¹⁾、三好敏喜¹⁾、東 隆³⁾、千葉敏雄¹⁾、土岐 彰²⁾

【背景と目的】胎児肺の腫瘍性病変の多くは先天性嚢胞性腺腫様奇形、肺分画症により占められる。これまでの胎児外科治療として、前者には超音波ガイド下の嚢胞穿刺術や直視下肺葉切除術が報告されている。一方後者では、支配血管に対する超音波ガイド下のレーザー焼灼にて、病変の縮小や胎児胸水・胎児水腫の改善をみたとする報告がある。しかし、これらの手技は母体・胎児のいずれに対しても侵襲的であり技術的にも容易ではない。従って、母体・胎児に安全かつ効率よく治療を行うためには、新しい治療手技の開発が求められる。High-intensity focused ultrasound (HIFU) は強力超音波の振動エネルギーを1焦点に集束することで細胞・組織を熱凝固させる手技であり、近年その胎児外科治療への応用も検討されるようになってきている。今回我々は、組織内の標的血管のみをHIFUにて低侵襲性に凝固・遮断する動物実験 (in vivo) を行ったので、その結果と今後の展望につき報告する。【方法】白色家兔(体重2.8 kg, 雄)を気管内挿管・全身麻酔下で開胸し、片側の気管支ブロッカー留置にて分離肺換気を行った。気道を閉塞した肺内に生理食塩水を注入し、これを胎児の肺または腫瘍性病変のモデルとした。Doppler imaging で描出した肺内血管に焦点を合わせた後、HIFU照射(3.3 MHz)にて特定の血管に対する熱凝固を試みた。【結果】HIFU照射(各10 sec, 間隔30 sec, 計3回)にて肺内血管の血流途絶をDoppler imaging で確認しえた。動物の犠牲後、切除組織標本を病理学的に観察し、標的血管の熱凝固所見が認められた。【結論】HIFUを用いる動物実験にて、気道を生食にて満たした肺内血管の血流を低侵襲性に遮断しえた。これにより、将来、胎児肺内病変の支配血流をHIFUにて熱凝固・遮断しうること、さらに胎児肺の腫瘍性病変に対する低侵襲性治療にHIFUを導入しうることを示唆された。

心臓 第40巻 第11号(2008年11月15日発行)別刷

胎児先天性心疾患の外科治療

石井徹子 千葉敏雄

日本心臓財団

胎児先天性心疾患の外科治療

石井徹子 千葉敏雄

国立成育医療センター特殊診療部

○ 歴史、背景

左心低形成症候群(hypoplastic left heart syndrome; HLHS)は、1980年代前半までは致死性の疾患であった。Norwoodにより新生児期の治療法が確立された後も、依然として手術成績が安定せず、1990年代にいたっても半数以上が手術死亡にいたる状況であった¹⁾。このような治療成績を背景に、1989年にイギリスのAllanらは大動脈弁狭窄、卵円孔閉鎖の左心低形成症候群の胎児に、在胎28週で超音波ガイド下にバルーンカテーテルによる大動脈弁形成術を行った²⁾。しかしこの試みは、手技的不成功から胎児死亡にいたっている。その後も、出生後治療の難しさもあり、患者選択や手技上の改善を加えつつ同様の出生前治療が試みられてきた。ボン大学のKohlは、1989～1997年の複数施設での12例の治療成績を報告している³⁾が、手技的失敗例も手技的には成功した7例も、全例が術後死亡や出生後死亡となり成功にはいたっていない。しかしそれらの経験をもとに、2000年にはボストン小児病院のグループにより、在胎23週のHLHS胎児に対する胎児治療が行われ、34週で娩出にいたっている。これは本治療の世界で初めての成功例といえる⁴⁾。その後、先天性心疾患に対する胎児期外科治療は、右心系疾患などにも適応を拡大してきている。ただし、いまだ本邦での治療報告はみられない。

○ 治療目的

治療の目的は、疾患の自然歴を出生前に修飾しその子宮内重症化を予防すること、あるいはその出生後の予後を大きく改善することにある。

○ 適応心疾患の選択

胎児治療の適応は以下のものとされている⁵⁾。

1. 出生後には治療法がない、あるいは治療成績が極めて悪くかつ胎児期に治療を行うことで著しく長期的QOLの改善が見込まれる疾患。
2. その手技施行により母体が危険にさらされることのないもの。
3. 治療により、心室容積などの適応や変化が可能な時期にあるもの。

○ 各論

現在まで胎児期外科治療が行われているものにつき、述べてみたい。

1. HLHSに進行し得る大動脈弁狭窄

この治療の目的は、重症な狭窄の認められる大動脈弁のバルーン形成術を行うことで、左心室から上行大動脈への順行性血流の増加、左室圧低下による虚血性心筋障害の軽減、左心室や上行大動脈の発育、出生後の二心室循環を達成することにある。

2004年に、Boston小児病院から24例の大動脈弁に対する胎児治療(在胎21～29週)の報告がなされている。その成績を図1に示す。手技的に不成功となった4例の初期治療経験から、本治療においては子宮内胎児位置がその成否をきめるうえで重要であることが判明した。そこで、その後は図2に示すように、ガイドワイヤの方向が大動脈弁に向かうように左心室尖部から穿刺することで、安定した治療が可能となってきた。当初は本手術は経皮経腹的に行われていたが、術中の胎位安定をはかるため、小開腹後子

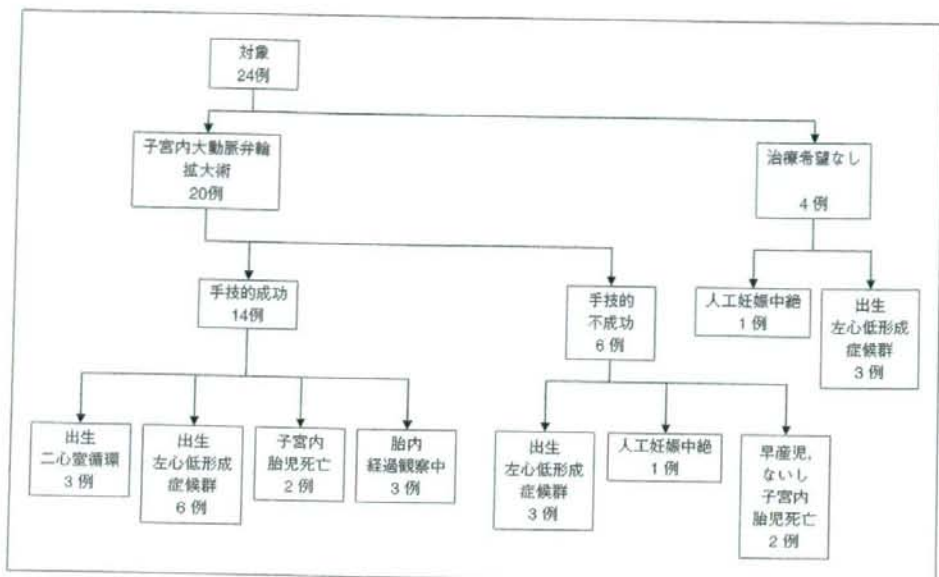


図1 子宮内大動脈弁輪拡大術の適応と診断された24胎児（周産期の経過フローチャート）

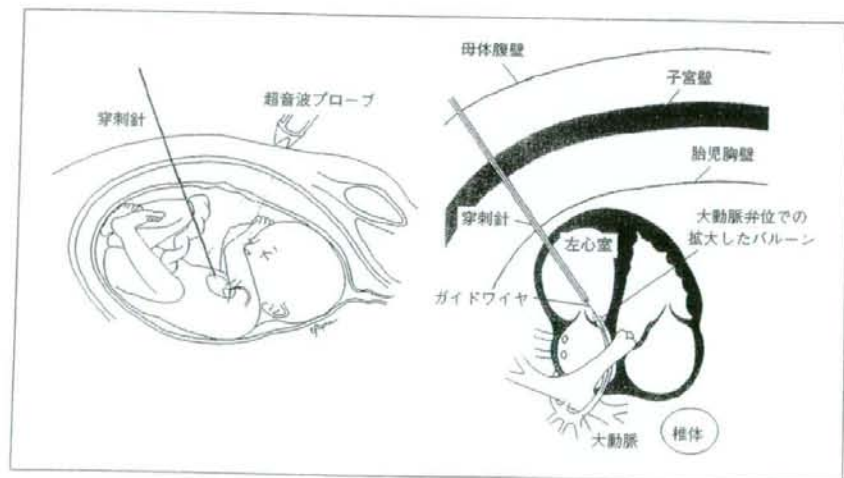


図2 左心低形成に対する胎児外科治療の、理想的な胎児の位置とカテーテルの走行（文献4より改変引用）

宮表面からも治療が行われるようになってきている。子宮を切開して治療する試みは、術後早産のリスクなどを考慮し、行われてはいない。結果として上記報告のなかでは、治療可能であった14例中3例で二心室循環が達成されている。

合併症として、4例の子宮内胎児死亡と頸管無力症による1例の早産があった。胎児死亡にいたった

4例のうち1例は、治療前より胎児水腫を呈していた。またもう1例は、重症僧帽弁逆流を伴っているものであった。また術中に15例が徐脈となり、11例でエピネフリンの胎児投与を行っている。母体への影響として呼吸障害をきたした例があり、それに対し酸素を投与したものが1例みられたが、ほかに重大な合併症は認めていない。

胎児治療において大切なことは患者の選択である。すなわち、治療により左室機能の回復がまだ見込まれる時期にあり、かつ子宮内で左心低形成に進行し出生後治療では二心室修復の見込めない児が適応となる。上述の報告で、患者選択に関しては、妊娠中期までの $-2.0SD$ 以上の左室長径を有する胎児で、大動脈の順行性血流をほとんど認めず、重症な左室機能障害を有するとともに、無治療のままではHLHSに変化していくものと、胎児心臓超音波検査に精通した医師3人により判断された胎児が治療対象とされていた。2006年には同じ施設から、HLHSに進行していくものと重症大動脈弁狭窄症のまま出生にいたるものを鑑別するポイントが提示されており、①大動脈弓の逆行性血流、②僧帽弁の一峰性流入血流、③卵円孔での両方向性血流、④著明な左心室の機能低下の存在がHLHSへの移行予測因子とされている。

このように胎児治療を行った児においても、左室内膜線維弾性症の併発は、左室機能の低下や左室拡張障害を引き起こし予後を悪化させる。そのような例に対し、心内膜線維弾性症に陥った心筋を出生後に手術的に切除することで二心室修復にいたった症例が報告されている⁶⁾。

2. 左心低形成症候群における卵円孔早期閉鎖

左心低形成においては、左室の拡張障害や僧帽弁狭窄による左室流入障害がみられるため、心房レベルにおける左-右短絡は必発である。このため、卵円孔早期閉鎖あるいはその高度狭窄を伴う場合、出生後早期に治療介入を行っても予後は極めて不良となる⁷⁾。しかもその発生頻度はHLHSの6%との報告もあり、決して稀な病態ではない⁸⁾。

そして2002~2003年にはボストン小児病院のグループから、左心低形成に併発した卵円孔閉鎖あるいは高度狭窄に対する胎児期治療7例の報告がなされている。その手技は、右房側からカテーテルを進め心房内に作成した欠損孔をバルーンで拡大するものであるが⁹⁾、治療成績は決して満足できるものではない。結果として本手術は、7例中6例に手技的

に施行可能であった。うち1例が生きてGlenn術にいたっているが、5例は新生児期あるいは胎児期に死亡している。治療成績が不満足に終わった理由としては、胎児治療では十分な大きな欠損孔を作成できないこと、また胎児期からの肺うっ血により肺の組織障害や肺高血圧症が遷延することなどがあげられる。このように、本手術ははまだ治療例数も少なく、したがって治療時期や患者選択に関し一定のものを提示し得る状況にはない。一方、本症に対してはQuinteroらにより、YAGレーザーを用いる心房中隔欠損孔作成術も試みられている¹⁰⁾。

3. 右心低形成症候群(hypoplastic right heart syndrome; HRHS)における肺動脈弁狭窄、閉鎖

本治療の目的も、左心低形成と同様、閉鎖あるいは高度狭窄を認める肺動脈弁をバルーンで拡大することにより、右心室と肺動脈の発達を促し二心室循環を確立することにある。右心室の低形成が進行した場合、類洞交通と呼ばれる冠動脈と右心室の交通が高率に認められるようになる。大きな類洞交通がある場合、それより遠位側の心筋が虚血に陥ることによって出生後の治療成績は不良となる。このため、類洞交通のない早期に右心室圧を低下させることにより、類洞交通の発生を抑えることも治療目的の1つといえる。その手術手技は左心低形成に対する大動脈弁拡大術とはほぼ同様であり、治療完遂には子宮内胎位が非常に重要である。右心低形成症候群に対する治療の報告は見られるものの¹¹⁾¹²⁾、これまでのところその症例数は少ない。この疾患群は、出生後も致死性の疾患ではないこと、胎児期でも右室-冠動脈交通の診断が可能とはいえず¹³⁾、胎児期には右室依存性類洞交通の診断が困難であることを考えあわせると¹⁴⁾、本症に対する胎児治療の適応は慎重に検討されねばならない。妊娠中期の超音波所見における三尖弁輪径や右心室の解剖学的特徴などが、出生後の二心室循環確立の可能性を予測する因子とされているが¹⁵⁾¹⁶⁾、いまだ一定の患者選択基準はみられない。

4. 完全房室ブロック

胎児の房室ブロックには大きく2つの原因がある。1つは心奇形を合併しない房室ブロックであり、その多くは母体の膠原病に関連して発症する。ほかの1つは心奇形(房室結合不一致や左側相同の心房内臓錯位症候群など)を伴う完全房室ブロックである。心奇形を合併しない房室ブロックに対しては、母体に対するステロイドや β 刺激薬投与の有用性に関する報告が見られる¹⁷⁾。しかしながら、胎児水腫を伴った場合、心拍数55以下の場合、それに心奇形を伴う完全房室ブロックである場合の予後は不良とされる¹⁸⁾。これらの疾患に対しては、胎児期にCarpenterらが経胸的なペースメーカー挿入を試みている¹⁹⁾。さらにWalkinshawらは、経静脈的ペースメーカーの挿入を試みている²⁰⁾。いずれも挿入後数時間で胎児死亡にいたっており、その有用性はいまだ確立されていない。一方羊胎仔を用いた実験では²¹⁾、経静脈的に右心室にペースメーカーを挿入し、ペースアップが可能であったと報告されている。しかしヒト胎児での成功例はいまだ見られず、臨床応用にはいたっていない。

いずれの手技においても、胎児治療は胎児のみならず母体をも巻き込む治療となるため、出生後治療との成績を比較検討しながら、その適応については慎重に判断されるべきである²²⁾。日本国内ではいまだこのような論議のあることから、心臓に対する外科的胎児治療は行われていない。今後の研究に大いに期待したい。

文 献

- 1) Gutgesell HP, Gibson J : Management of hypoplastic left heart syndrome in the 1990s. *Am J Cardiol* 2002 ; 89 : 842-846
- 2) Maxwell D, Allan L, Tynan MJ : Balloon dilatation of the aortic valve in the fetus : a report of two cases. *Br Heart J* 1991 ; 65 : 256-258
- 3) Kohl T, Sharland G, Allan LD, et al : World experience of percutaneous ultrasound-guided balloon valvuloplasty in human fetuses with severe aortic valve obstruction. *Am J Cardiol* 2000 ; 85 : 1230-1233
- 4) Tworetzky W, Wilkins-Haug L, Jennings RW, et al : Balloon dilation of severe aortic stenosis in the fetus : potential for prevention of hypoplastic left heart syndrome : candidate selection, technique, and results of successful intervention. *Circulation* 2004 ; 110 : 2125-2131
- 5) Tworetzky W, Marshall AC : Fetal interventions for cardiac defects. *Pediatr Clin North Am* 2004 ; 51 : 1503-1513
- 6) Tworetzky W, del Nido PJ, Powell AJ, et al : Usefulness of magnetic resonance imaging of left ventricular endocardial fibroelastosis in infants after fetal intervention for aortic valve stenosis. *Am J Cardiol* 2005 ; 96 : 1568-1570
- 7) Vlahos AP, Lock JE, McElhinney DB, van der Velde ME : Hypoplastic left heart syndrome with intact or highly restrictive atrial septum : outcome after neonatal transcatheter atrial septostomy. *Circulation* 2004 ; 109 : 2326-2330
- 8) Rychik J, Rome JJ, Collins MH, et al : The hypoplastic left heart syndrome with intact atrial septum : atrial morphology, pulmonary vascular histopathology and outcome. *J Am Coll Cardiol* 1999 ; 34 : 554-560
- 9) Marshall AC, van der Velde ME, Tworetzky W, et al : Creation of an atrial septal defect in utero for fetuses with hypoplastic left heart syndrome and intact or highly restrictive atrial septum. *Circulation* 2004 ; 110 : 253-258
- 10) Quintero RA, Huhta J, Suh E, et al : In utero cardiac fetal surgery : laser atrial septotomy in the treatment of hypoplastic left heart syndrome with intact atrial septum. *Am J Obstet Gynecol* 2005 ; 193 : 1424-1428
- 11) Arzt W, Tulzer G, Aigner M, et al : Invasive intrauterine treatment of pulmonary atresia/intact ventricular septum with heart failure. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003 ; 21 : 186-188
- 12) Galindo A, Gutiérrez-Larraya F, Velasco JM, de la Fuente P : Pulmonary balloon valvuloplasty in a fetus with critical pulmonary stenosis/atresia with intact ventricular septum and heart failure. *Fetal Diagn Ther* 2006 ; 21 : 100-104
- 13) Maeno YV, Boutin C, Hornberger LK, et al : Prenatal diagnosis of right ventricular outflow tract obstruction with intact ventricular septum, and detection of ventriculocoronary connections. *Heart* 1999 ; 81 : 661-668
- 14) Nishibatake M, Matsuda Y, Kamitomo M, et al : Echocardiographic findings of pulmonary atresia or critical pulmonary stenosis and intact ventricular septum in utero. *Pediatr Int* 1999 ; 41 : 716-721
- 15) Gardiner HM, Belmar C, Tulzer G, et al : Morphologic and functional predictors of eventual circulation in the fetus with pulmonary atresia or critical pulmonary stenosis with intact septum. *J Am Coll Cardiol* 2008 ; 51 : 1299-1308
- 16) Salvin JW, McElhinney DB, Colan SD, et al : Fetal tricuspid valve size and growth as predictors of outcome