

Fig. 3. Quantitative RT-PCR analysis of extracellular matrix, inflammatory-, and angiogenesis-related genes in the kidney of rats with anti-Thy1 nephritis and FM-MSC administration. Expression of mRNA for type I collagen (A), transforming growth factor (TGF)- β (B), type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1; C), TNF- α (G), and monocyte chemoattractant protein (MCP-1; H) in glomeruli was markedly increased in anti-Thy1 nephritic rats on day 7, which was significantly attenuated in FM-MSC-transplanted rats. No significant difference in mRNA expression of membrane-type matrix metalloproteinase 2 (MMP-2; D), MMP-9 (E), tissue inhibitor of MMP-1 (TIMP-1; F), VEGF (I), and HGF (J) was seen between the PBS and FM-MSC groups. ($n = 8/\text{group}$). * $P < 0.05$ vs. Sham group. † $P < 0.05$ vs. PBS group.

Engraftment of intravenously injected FM-MSC in rats with anti-Thy1 nephritis. To investigate the behavior of intravenously administered FM-MSC in anti-Thy1 nephritic rats, FM-MSC derived from GFP transgenic Lewis rats were intravenously administered into allogeneic ACI rats on day 2 after mAb injection ($n = 4$). Twenty-four hours after FM-MSC

transplantation, several GFP-positive cells were detected in the kidney sections (12.7 ± 0.3 cells/cm²) including glomeruli (Fig. 5A), proximal tubule (Fig. 5B), and interstitial area (Fig. 5C). We also detected GFP-positive FM-MSC in sections of lung (Fig. 5D), liver (Fig. 5E), and spleen (Fig. 5F). A significant number of GFP-positive FM-MSC were seen in the

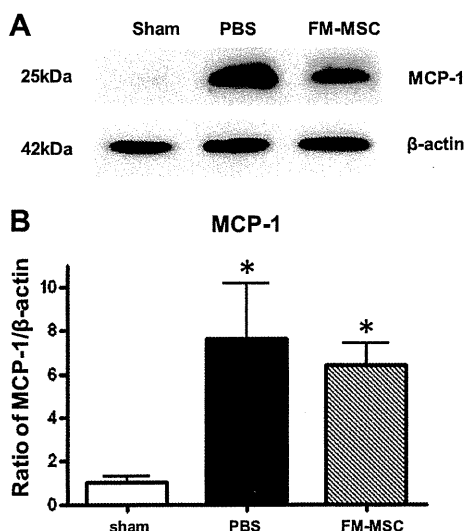


Fig. 4. Decreased MCP-1 protein expression in the renal tissue of nephritic rats after FM-MSC administration. *A*: representative Western blot analysis of MCP-1 in the Sham, PBS, and FM-MSC groups. *B*: quantitative analysis of immunoreactive bands for MCP-1 demonstrated that MCP-1 protein expression in the PBS group was significantly upregulated compared with the Sham group ($P < 0.05$, $n = 8$), and FM-MSC administration showed a tendency toward decreased expression.

lung (119.2 ± 5.1 cells/cm²), and a similar distribution of GFP-positive cells were observed in the liver and spleen (38.4 ± 1.5 and 32.1 ± 2.9 cells/cm², respectively). Although no GFP-positive cell was found in the kidney at 7 days after systemic injection of GFP-positive FM-MSC, several GFP-expressing cells were detected in sections of lung, liver, and spleen (37.6 ± 3.1 , 26.1 ± 2.7 , and 4.8 ± 0.3 cells/cm², respectively).

Anti-inflammatory effect of FM-MSC-conditioned medium on cultured MC. Next, we examined whether FM-MSC possess direct anti-inflammatory effects on MC. When MC were cultured in standard medium, gene expression of TNF- α showed a peak at 8 h and then decreased ($n = 3$ – 12 , Table 2). FM-MSC-conditioned medium induced a significant (>50%) decrease in TNF- α expression after incubation for 8 h ($P < 0.05$ vs. standard medium) (Table 2). MCP-1 expression in cultured MC showed a peak at 4 h and then decreased (Table 2). Between FM-MSC-conditioned and standard medium, a significant reduction in MCP-1 expression was seen at 4 (>20%) and 8 (>70%) h ($P < 0.05$ vs. standard medium).

Because recent reports have shown that PGE₂ is one of the key modulators for the MSC-induced anti-inflammatory response, PGE₂-depleted conditioned medium of FM-MSC was prepared by treatment with NS-398, a selective inhibitor of COX2 activity (38). ELISA revealed that a significant amount of PGE₂ was detected in FM-MSC-conditioned medium (888.1 ± 123.3 pg/ml), and NS-398 treatment significantly suppressed its production (23.2 ± 2.4 pg/ml, $P < 0.01$). After incubation for 8 h, conditioned medium of NS-389-treated FM-MSC markedly abolished the decreased expression of TNF- α and MCP-1 in rat MC (1.19 ± 0.12 - and 0.82 ± 0.06 -fold, respectively) (Fig. 6).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that 1) intravenous injection of allogenic FM-MSC improved disease manifestations in rats with anti-Thy1 glomerulonephritis; 2) allogenic FM-MSC administration suppressed MC proliferation, glomerular monocyte/macrophage infiltration, mesangial matrix accumulation, and the glomerular expression of inflammatory and extracellular matrix-related molecules in anti-Thy1 nephritis; and 3) FM-MSC-conditioned medium attenuated the expression of these inflammatory cytokines/chemokines in cultured MC through a PGE₂-dependent mechanism. Therefore, our data indicate that allogenic FM-MSC transplantation would be a potent therapeutic strategy for the treatment of acute glomerulonephritis.

MSC are considered to be an attractive cell source for application in regenerative medicine because of their excellent capacities in proliferation and differentiation (8, 33, 35, 62). MSC are present in various tissues, but the most characterized population is BM-MSC (9, 11, 42). Therefore, the potential of MSC for renal repair has been investigated using BM-MSC (17, 30–32, 54, 56). To consider the clinical setting, donor BM is a suitable source of MSC, because MSC are relatively easy to obtain from BM aspirates and autologous donor MSC are unlikely to be immunologically rejected. However, autologous MSC transplantation is difficult to attempt on acute glomerulonephritis patients, because of a cell-preparatory period and cell transplantation timing. Therefore, allogenic MSC transplantation has more practical therapeutic value in clinical medicine. We have previously characterized a population of MSC from FM tissue, which possesses great advantages due to its abundance, easy accessibility, and angiogenic activity (20). In this study, we demonstrated that intravenous injection of allogenic FM-MSC, similar to reported autologous BM-MSC (31, 58), provided significant improvement in rats with anti-Thy1 nephritis, indicating that allogenic FM-MSC have potential as a source for regenerative-based therapy for glomerulonephritis.

In this study, we demonstrated that allogenic ACI-derived FM-MSC have a therapeutic effect in MHC-mismatched Lewis rats with anti-Thy1 nephritis. FM is known to play a role in preventing rejection of the fetus and is thought to have low immunogenicity (2, 3, 59). MSC have been reported to fail to trigger allogenic T cell proliferation and induce immune tolerance (1, 6). Indeed, we previously demonstrated that FM-MSC expressed surface antigens similar to those of BM-MSC. For example, both types of MSC are negative for MHC II (19). We also confirmed that FM-MSC did not provoke alloreactive lymphocyte proliferation in mixed lymphocyte culture (20). A recent report described that intravenous injection of BM-MSC induced recovery from anti-Thy1 nephritis in outbred allogenic as well as inbred autologous settings (31). These results suggest that FM-MSC as well as BM-MSC could evade T lymphocyte alloreactivity and would be successfully transplantable across MHC barriers.

Several studies have shown beneficial effects of BM-MSC transplantation in renal diseases (17, 30–32, 54, 56). However, the mechanisms underlying the benefit of MSC transplantation remain controversial. One possible mechanism is the differentiation into renal cells of injected MSC. Intravenously administered MSC have been shown to con-

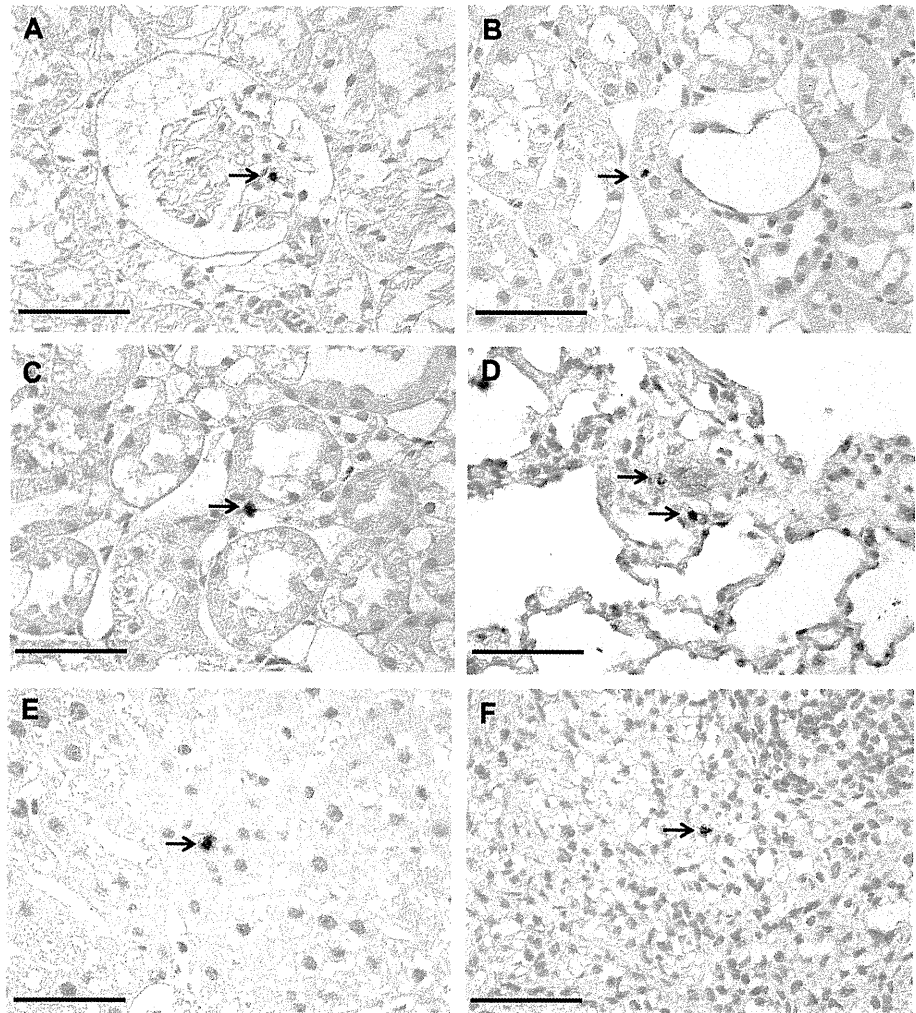


Fig. 5. Engraftment of intravenously injected FM-MSC in rats with anti-Thy1 nephritis. The presence of intravenously injected green fluorescent protein (GFP)-positive FM-MSC was observed 24 h after cell injection ($n = 4$). A–F: representative GFP immunohistochemical staining shows GFP-positive transplanted FM-MSC were found in glomeruli (A), proximal tubule (B), and renal interstitial tissue (C) as well as the lung (D), liver (E), and spleen (F; black arrows). Scale bars = 50 μm .

tribute, via differentiation and engraftment, to the cells of many organs, including the kidney (17, 23, 45, 47). In this study, however, we confirmed that these engraftments were low-frequency events that cannot explain the prompt regenerative responses MSC elicit in damaged kidneys. Using the same anti-Thy1 nephritis model, Kunter et al. (31) reported that they failed to detect any evidence of transdifferentiation of MSC into renal cells. This evidence suggests that the direct contribution of transplanted MSC to tissue regeneration is minimal.

Another possibility explaining how transplanted MSC mediate the protective and regenerative effects in damaged kidney tissue is paracrine action (31, 56, 58). Our previous

studies found that FM- and BM-MSC secreted VEGF and HGF, which are well-known potent angiogenic and anti-apoptotic factors that elicited angiogenesis in a hindlimb ischemia model (20). In experimental ischemic acute kidney injury or glomerulonephritis, VEGF or HGF secreted from MSC exerted beneficial effects (31, 46, 56, 58). Based on these results, we examined the glomerular expression of these regenerative factors in anti-Thy1 nephritic rats. Contrary to our expectation, however, no significant induction of VEGF or HGF expression in the kidney was seen after FM-MSC transplantation. Therefore, contribution of these FM-MSC-derived growth factors might be minimal in the repair process of anti-Thy1 nephritis.

Table 2. Time course of *TNF- α* and *MCP-1* mRNA levels in MC after incubation with standard or FM-MSC-conditioned medium

	TNF- α			MCP-1		
	4 h	8 h	12 h	4 h	8 h	12 h
Standard medium	100.0 \pm 22.4%	155.5 \pm 28.5%	154.3 \pm 23.2%	100.0 \pm 14.7%	20.2 \pm 1.7%	26.9 \pm 2.9%
FM-MSC-conditioned medium	64.6 \pm 19.7%*	83.4 \pm 10.6%*	154.4 \pm 61.6%	19.9 \pm 11.5%*	14.4 \pm 1.9%*	31.9 \pm 6.7%

MC, mesangial cells; FM-MSC, fetal membrane-derived mesangial stem cells. * $P < 0.05$ vs. standard medium.

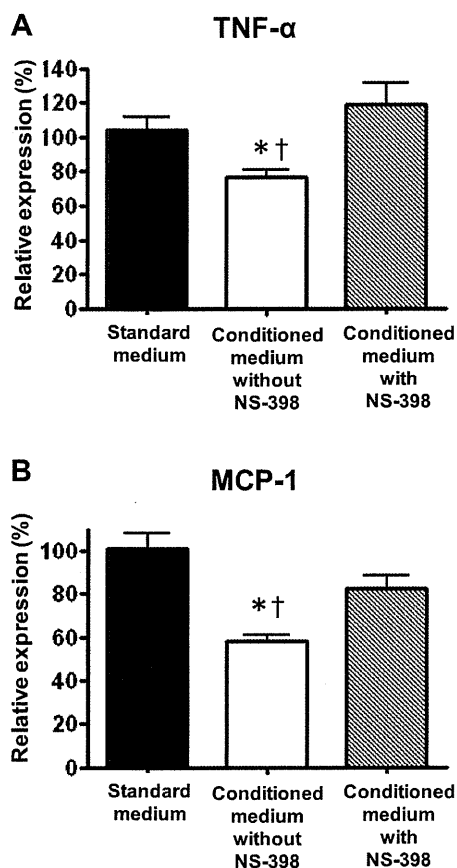


Fig. 6. Effect of FM-MSC-conditioned medium on TNF- α and MCP-1 gene expression in cultured MC. Quantitative RT-PCR analysis in MC after 8 h in culture revealed that TNF- α (A) and MCP-1 (B) expression was significantly reduced when MC were cultured in FM-MSC-conditioned medium, and this decrease was significantly abolished by the treatment with NS-398 (0.1 μ M; $n = 6-12$). * $P < 0.05$ vs. standard medium.

Recently, MSC have been demonstrated to possess immunomodulatory properties (12–14, 22, 27, 28, 37, 49, 51, 52). They are able to modulate the function of lymphocytes (12–14, 22, 28), dendritic cells (37, 49), natural killers (27, 51, 52), and macrophages (26, 38). Several *in vivo* studies have shown that MSC administration could downregulate the systemic and local inflammatory responses and prevent tissue damage in inflammatory models (4, 15, 63). Therefore, FM-MSC injection might act by modulating the inflammatory responses after the induction of anti-Thy1 nephritis. We previously demonstrated that MSC transplantation attenuated myocardial inflammation in an acute myocarditis model associated with an increase in MCP-1 as well as infiltration of macrophages (40). In the present study, we confirmed that glomerular expression of TNF- α and MCP-1 and macrophage infiltration was significantly suppressed by the administration of FM-MSC. In glomerulonephritis, these inflammatory cytokines/chemokines participate in the activation and accumulation of macrophages, and their infiltration is strongly associated with proteinuria and declining renal function (10, 44, 48, 60).

Recent reports demonstrate that MSC-mediated immunosuppression is mediated by direct contact with immunomodulatory cells including T cells, NK cells, and macrophages, followed by paracrine action of secreted PGE₂ and TGF- β (13, 27, 38). Because intravenously administered FM-MSC survived in kidney, lung, and reticuloendothelial organs including the spleen and liver, these transplanted FM-MSC might change the activity of immunomodulatory cells in nephritic rats by direct contact and paracrine action, which would reduce the inflammatory state of anti-Thy1 nephritis. Previous studies demonstrate that PGE₂ is one of the leading candidates for MSC-induced immune suppression (38). In this study, we confirmed that FM-MSC-conditioned medium contained a significant amount of PGE₂, which was completely depleted by treatment with the COX2 inhibitor NS-398. Gene expression of MCP-1 and TNF- α in MC was decreased by FM-MSC-conditioned media, and this decrease was significantly restored by the treatment with NS-398. A previous report demonstrated that PGE₂ suppressed cytokine/chemokine expression including TNF- α and MCP-1 in MC, which would relate to its anti-inflammatory activity (50). Therefore, PGE₂ would be one of the candidate factors to cause the downregulation of TNF- α and MCP-1 in FM-MSC-treated rats with anti-Thy1 nephritis. Together, previous studies including our own support the hypothesis that paracrine/endocrine actions are of major importance in mediating the protective and regenerative effect of administered MSC after tissue damage.

We have recently reported that MSC transplantation improved cardiac function through an antifibrotic effect in a rat model of dilated cardiomyopathy and acute myocarditis (36, 40) and also demonstrated that the highly expressed genes in cultured MSC included a number of molecules involved in the biogenesis of extracellular matrix (39). These results suggest that transplanted MSC inhibit the fibrogenic process through paracrine actions. In this study, we confirmed that FM-MSC transplantation in anti-Thy1 nephritic rats resulted in reduced mesangial matrix accumulation. In addition, the glomerular expression of several genes involved in fibrogenesis including type I collagen, TGF- β , and PAI-1 was significantly decreased in the FM-MSC group compared with the PBS group. These results support our hypothesis that transplanted MSC possesses antifibrotic activity. However, because the expression of type I collagen, TGF- β , and PAI-1 is associated with renal disease severity (5, 7, 57), decreased expression of these fibrogenic genes in the FM-MSC group might only reflect the degree of renal damage; the precise mechanism by which transplanted FM-MSC prevent renal fibrosis in anti-Thy1 nephritis remains to be elucidated.

In conclusion, our observation that FM-MSC transplantation helped recovery from anti-Thy1 nephritis demonstrates the renoprotective effect of FM-MSC. Because FM-MSC is available non-invasively in large amounts, we suggest that cultured, banked FM-MSC could provide a new therapeutic strategy for the treatment of kidney injury.

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

REFERENCES

1. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105: 1815–1822, 2005.
2. Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI, Leibowitz S, McColl I. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 2: 1003–1005, 1981.
3. Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP. Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells in vitro. *BMC Dev Biol* 7: 11, 2007.
4. Augello A, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56: 1175–1186, 2007.
5. Barnes JL, Mitchell RJ, Torres ES. Expression of plasminogen activator-inhibitor-1 (PAI-1) during cellular remodeling in proliferative glomerulonephritis in the rat. *J Histochem Cytochem* 43: 895–905, 1995.
6. Beyth S, Borovsky S, Mevorach D, Liebergall M, Gazit Z, Aslan H, Galun E, Rachmilewitz J. Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105: 2214–2219, 2005.
7. Border WA, Ruoslahti E. Transforming growth factor-beta 1 induces extracellular matrix formation in glomerulonephritis. *Cell Differ Dev* 32: 425–431, 1990.
8. Bussolati B, Tetta C, Camussi G. Contribution of stem cells to kidney repair. *Am J Nephrol* 28: 813–822, 2008.
9. Catterson EJ, Nesti LJ, Danielson KG, Tuan RS. Human marrow-derived mesenchymal progenitor cells: isolation, culture expansion, and analysis of differentiation. *Mol Biotechnol* 20: 245–256, 2002.
10. Cattell V. Macrophages in acute glomerular inflammation. *Kidney Int* 45: 945–952, 1994.
11. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25: 2739–2749, 2007.
12. Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Riso M, Gualandri F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107: 367–372, 2006.
13. Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99: 3838–3843, 2002.
14. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105: 2821–2827, 2005.
15. Gonzalez-Rey E, Anderson P, Gonzalez MA, Rico L, Buscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58: 929–939, 2009.
16. Grimm PC, Nickerson P, Jeffery J, Savani RC, Gough J, McKenna RM, Stern E, Rush DN. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med* 345: 93–97, 2001.
17. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med* 14: 1035–1041, 2004.
18. In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, de Groot-Swings GM, Claas FH, Fibbe WE, Kanhai HH. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells* 22: 1338–1345, 2004.
19. Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 2: 418–423, 1996.
20. Ishikane S, Ohnishi S, Yamahara K, Sada M, Harada K, Mishima K, Iwasaki K, Fujiwara M, Kitamura S, Nagaya N, Ikeda T. Allogeneic injection of fetal membrane-derived mesenchymal stem cells induces therapeutic angiogenesis in a rat model of hind limb ischemia. *Stem Cells* 26: 2625–2633, 2008.
21. Ito T, Suzuki A, Imai E, Okabe M, Hori M. Bone marrow is a reservoir of repopulating mesangial cells during glomerular remodeling. *J Am Soc Nephrol* 12: 2625–2635, 2001.
22. Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol* 179: 2824–2831, 2007.
23. Kale S, Karihaloo A, Clark PR, Kashgarian M, Krause DS, Cantley LG. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule. *J Clin Invest* 112: 42–49, 2003.
24. Kawachi H, Oite T, Shimizu F. Quantitative study of mesangial injury with proteinuria induced by monoclonal antibody 1-22-3. *Clin Exp Immunol* 92: 342–346, 1993.
25. Kawachi H, Orikasa M, Matsui K, Iwanaga T, Toyabe S, Oite T, Shimizu F. Epitope-specific induction of mesangial lesions with proteinuria by a MoAb against mesangial cell surface antigen. *Clin Exp Immunol* 88: 399–404, 1992.
26. Kim J, Hematti P. Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Exp Hematol* 37: 1445–1453, 2009.
27. Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24: 386–398, 2006.
28. Krampera M, Glennie S, Dyson J, Scott D, Laylor R, Simpson E, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101: 3722–3729, 2003.
29. Kreisberg JJ, Karnovsky MJ. Glomerular cells in culture. *Kidney Int* 23: 439–447, 1983.
30. Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Muller-Newen G, Djuric Z, van Roeyen CR, Konieczny A, Ostendorf T, Villa L, Milovanecva-Popovska M, Kerjaschki D, Floege J. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J Am Soc Nephrol* 18: 1754–1764, 2007.
31. Kunter U, Rong S, Djuric Z, Boor P, Muller-Newen G, Yu D, Floege J. Transplanted mesenchymal stem cells accelerate glomerular healing in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 17: 2202–2212, 2006.
32. Magnasco A, Corselli M, Bertelli R, Ibatci A, Peresi M, Gaggero G, Cappiello V, Chiavarina B, Mattioli G, Gusmano R, Ravetti JL, Frassoni F, Ghiggeri GM. Mesenchymal stem cells protective effect in adriamycin model of nephropathy. *Cell Transplant* 17: 1157–1167, 2008.
33. McTaggart SJ, Atkinson K. Mesenchymal stem cells: immunobiology and therapeutic potential in kidney disease. *Nephrology* 12: 44–52, 2007.
34. Mori T, Shimizu A, Masuda Y, Fukuda Y, Yamanaka N. Hepatocyte growth factor-stimulating endothelial cell growth and accelerating glomerular capillary repair in experimental progressive glomerulonephritis. *Nephron* 94: e44–e54, 2003.
35. Morigi M, Benigni A, Remuzzi G, Imberti B. The regenerative potential of stem cells in acute renal failure. *Cell Transplant* 15, Suppl 1: S111–S117, 2006.
36. Nagaya N, Kangawa K, Itoh T, Iwase T, Murakami S, Miyahara Y, Fujii T, Uematsu M, Ohgushi H, Yamagishi M, Tokudome T, Mori H, Miyatake K, Kitamura S. Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* 112: 1128–1135, 2005.
37. Nauta AJ, Kruisselbrink AB, Lurvink E, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+ derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 177: 2080–2087, 2006.
38. Nemeth K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E₂-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15: 42–49, 2009.
39. Ohnishi S, Sumiyoshi H, Kitamura S, Nagaya N. Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions. *FEBS Lett* 581: 3961–3966, 2007.
40. Ohnishi S, Yanagawa B, Tanaka K, Miyahara Y, Obata H, Kataoka M, Kodama M, Ishibashi-Ueda H, Kangawa K, Kitamura S, Nagaya N. Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J Mol Cell Cardiol* 42: 88–97, 2007.
41. Ostendorf T, Kunter U, Eitner F, Loos A, Regele H, Kerjaschki D, Henninger DD, Janjic N, Floege J. VEGF(165) mediates glomerular endothelial repair. *J Clin Invest* 104: 913–923, 1999.

42. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284: 143–147, 1999.
43. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. *Am J Obstet Gynecol* 194: 664–673, 2006.
44. Prodjosudjadi W, Gerritsma JS, van Es LA, Daha MR, Bruijn JA. Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis. *Clin Nephrol* 44: 148–155, 1995.
45. Qian H, Yang H, Xu W, Yan Y, Chen Q, Zhu W, Cao H, Yin Q, Zhou H, Mao F, Chen Y. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorate rat acute renal failure by differentiation into renal tubular epithelial-like cells. *Int J Mol Med* 22: 325–332, 2008.
46. Rampino T, Gregorini M, Bedino G, Piotti G, Gabanti E, Ibatci A, Sessarego N, Piacenza C, Balenzano CT, Esposito P, Bosio F, Soccio G, Frassoni F, Dal Canton A. Mesenchymal stromal cells improve renal injury in anti-Thy 1 nephritis by modulating inflammatory cytokines and scatter factors. *Clin Sci (Lond)*. Epub ahead of print.
47. Rookmaaker MB, Smits AM, Tolboom H, Van't Wout K, Martens AC, Goldschmeding R, Joles JA, Van Zonneveld AJ, Grone HJ, Rabelink TJ, Verhaar MC. Bone-marrow-derived cells contribute to glomerular endothelial repair in experimental glomerulonephritis. *Am J Pathol* 163: 553–562, 2003.
48. Rovin BH, Rumancik M, Tan L, Dickerson J. Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. *Lab Invest* 71: 536–542, 1994.
49. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)* 2: 8, 2005.
50. Satriano JA, Hora K, Shan Z, Stanley ER, Mori T, Schlondorff D. Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol* 150: 1971–1978, 1993.
51. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevasis CN, Pappamichail M. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells* 24: 74–85, 2006.
52. Spaggiari GM, Capobianco A, Abdelrazik H, Becchetti F, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* 111: 1327–1333, 2008.
53. Suga S, Kim YG, Joly A, Puchacz E, Kang DH, Jefferson JA, Abraham JA, Hughes J, Johnson RJ, Schreiner GF. Vascular endothelial growth factor (VEGF121) protects rats from renal infarction in thrombotic microangiopathy. *Kidney Int* 60: 1297–1308, 2001.
54. Sun L, Akiyama K, Zhang H, Yamaza T, Hou Y, Zhao S, Xu T, Le A, Shi S. Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem Cells* 27: 1421–1432, 2009.
55. Tanaka T, Ichimaru N, Takahara S, Yazawa K, Hatori M, Suzuki K, Isaka Y, Moriyama T, Imai E, Azuma H, Nakamura T, Okuyama A, Yamanaka H. In vivo gene transfer of hepatocyte growth factor to skeletal muscle prevents changes in rat kidneys after 5/6 nephrectomy. *Am J Transplant* 2: 828–836, 2002.
56. Togel F, Cohen A, Zhang P, Yang Y, Hu Z, Westenfelder C. Autologous and allogeneic marrow stromal cells are safe and effective for the treatment of acute kidney injury. *Stem Cells Dev* 18: 475–485, 2009.
57. Uchida K, Nitta K, Kobayashi H, Kawachi H, Shimizu F, Yumura W, Nihei H. Localization of Smad6 and Smad7 in the rat kidney and their regulated expression in the anti-Thy-1 nephritis. *Mol Cell Biol Res Commun* 4: 98–105, 2000.
58. Uchimura H, Marumo T, Takase O, Kawachi H, Shimizu F, Hayashi M, Saruta T, Hishikawa K, Fujita T. Intrarenal injection of bone marrow-derived angiogenic cells reduces endothelial injury and mesangial cell activation in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 16: 997–1004, 2005.
59. Wang M, Yoshida A, Kawashima H, Ishizaki M, Takahashi H, Hori J. Immunogenicity and antigenicity of allogeneic amniotic epithelial transplants grafted to the cornea, conjunctiva, and anterior chamber. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47: 1522–1532, 2006.
60. Wenzel U, Schneider A, Valente AJ, Abboud HE, Thaiss F, Helmchen UM, Stahl RA. Monocyte chemoattractant protein-1 mediates monocyte/macrophage influx in anti-thymocyte antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int* 51: 770–776, 1997.
61. Wong RK, Hagg EU, Rabie AB, Lau DW. Bone induction in clinical orthodontics: a review. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 17: 140–149, 2002.
62. Yokoo T, Kawamura T, Kobayashi E. Stem cells for kidney repair: useful tool for acute renal failure? *Kidney Int* 74: 847–849, 2008.
63. Zappia E, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106: 1755–1761, 2005.

Intrapartum management guidelines based on fetal heart rate pattern classification

Takashi Okai¹, Tomoaki Ikeda², Tatsuhiko Kawarabayashi³, Shiro Kozuma⁴, Junichi Sugawara⁵, Hiroshi Chisaka⁵, Satoshi Yoneda⁶, Ryu Matsuoka¹, Hitoo Nakano⁷, Kunihiro Okamura⁵, Shigeru Saito⁶ and The Perinatology Committee of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology

¹Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine, ⁴Department of Obstetrics and Gynecology, Faculty of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, ²Department of Obstetrics and Gynecology, National Cerebral and Cardiovascular Center Hospital, Osaka, ³Department of Obstetrics and Gynecology, Fukuoka University Faculty of Medicine School of Medicine, ⁷Department of Gynecology and Obstetrics, Faculty of Medicine, Kyushu University, Fukuoka, ⁵Center for Perinatal Medicine, Tohoku University Hospital, Sendai, ⁶Department of Obstetrics and Gynecology, University of Toyama, Toyama, Japan

Key words: fetal heart rate, guideline, intrapartum, management, monitoring.

Background

The guidelines for determining whether or not to perform management based on intrapartum fetal heart rate (FHR) patterns have so far been proposed in the UK (2001),¹ Canada (2007),² and the USA (2008),³ although their usefulness has not yet been validated. According to these guidelines, a three-tier system is used to classify the FHR patterns, including a normal-suspicious pathology in the UK, a normal-atypical-abnormal pathology in Canada, and Categories I-II-III in the USA. The view of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology is that the intermediate category of these three-tier classifications comprises highly heterogeneous patterns in terms of the risk of acidemia and of the evolutionary risk to more severe FHR patterns.⁴ Therefore, we adopted a five-tier system and modified the color-coded classification of Parer *et al.* (2007).⁵ We also propose a standardized management protocol according to each FHR pattern level for both medical doctors and midwives, and suggest that further research be conducted with the aim of validating the effectiveness of these guidelines.

Intrapartum Management Guidelines Based on Fetal Heart Rate Pattern Classification

These guidelines provide the recommended response and treatment for intrapartum fetal management based on the classification of FHR patterns, as determined by the Perinatology Committee of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology.

I. FHR pattern classification

The combination of the various components of the FHR patterns (baseline variability, heart rate baseline, decelerations) serves to estimate the degree of risk for such conditions as fetal hypoxemia, acidemia, and possible evolutionary patterns to higher risk conditions. This degree of risk has been classified into five levels as shown in Table I.

II. Determination of FHR pattern classification

The FHR pattern classification level is determined in accordance with Tables II-1–II-5 and the corresponding notes. All determinations are made from FHR tracing findings obtained at 10-min intervals. In the case of the

Reprint request to: Dr Ryu Matsuoka, 1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8666, Japan. Email: ryu@med.showa-u.ac.jp
This is a translated article originally published in *Acta Obstetrica et Gynaecologica Japonica*, Vol. 62, No. 10, 2068–2073 pp, 2010 by Japan Society of Obstetrics and Gynecology.

Table I Fetal heart rate (FHR) pattern classification levels

FHR pattern levels	Designation
Level 1	Normal pattern
Level 2	Benign variant pattern
Level 3	Mild variant pattern
Level 4	Moderate variant pattern
Level 5	Severe variant pattern

appearance of multiple patterns, the highest level should be selected. For diagnosing the non-reassuring fetal status, namely, the risk of fetal acidemia, and the evolutionary risk of the patterns to a higher risk, based on this classification, levels 3–5 are thus considered to be applicable.

Table II-1 Normal baseline variability cases

Deceleration Heart rate baseline	None	Early	Variable		Mild	Late		Prolonged	
			Mild	Severe		Severe	Mild	Severe	
Normocardia	1	2	2	3	3	3	3	3	4
Tachycardia	2	2	3	3	3	4	4	3	4
Mild bradycardia	3	3	3	4	4	4	4	4	4
Severe bradycardia	4	4		4	4	4	4		

Table II-2 Decreased baseline variability cases

Deceleration Heart rate baseline	None	Early	Variable		Mild	Late		Prolonged	
			Mild	Severe		Severe	Mild	Severe	
Normocardia	2	3	3	4	3†	4	4	4	
Tachycardia	3	3	4	4	4			4	
Mild bradycardia	4	4	4						
Severe bradycardia									

†Normocardia and mild late deceleration are relatively frequently observed in healthy fetuses, so a level 3 is assigned. However, when there are background complications, such as placenta abnormalities or intrauterine growth restriction, then level 4 should be assigned.

Table II-3 Undetectable baseline variability cases†

Deceleration	None	Early	Variable		Mild	Late		Prolonged	
			Mild	Severe		Severe	Mild	Severe	
Regardless of heart rate baseline	4								

†To be determined separately in cases with particular factors, such as cases presently receiving medication and cases with fetal abnormalities.

Table II-4 Marked baseline variability cases

Deceleration	None	Early	Variable		Mild	Late		Prolonged	
			Mild	Severe		Severe	Mild	Severe	
Regardless of heart rate baseline	2	2	3	3	3	4	3	4	

Table II-5 Sinusoidal pattern

Deceleration	None	Early	Variable		Mild	Late		Prolonged	
			Mild	Severe		Severe	Mild	Severe	
Regardless of heart rate baseline	4	4	4	4					

Notes:

The definitions of all terminology are based on those included in the Perinatology Committee report in the volume 55, August issue of the Journal of the Japan Society of Obstetrics and Gynecology, which is based on the research guidelines of interpretation established by the National Institute of Child Health and Human Development Research Planning Workshop in 1997.⁶

- i. In addition to the definitions provided in i., the sinusoidal pattern waveform defined here should meet the following criteria:
 1. Continue for more than 10 min.
 2. Baseline tracing shows a smooth sine curve with short-term variability lost, or is significantly reduced.
 3. Not accompanied by acceleration.
- ii. Decelerations are classified either as mild or severe, and the following shall be determined as severe deceleration. Otherwise, the deceleration is determined as a mild deceleration.
 - Late deceleration is a decline in heart rate of more than 15 b.p.m. from the baseline to the lowest point.
 - Variable deceleration is when the lowest point is less than 70 b.p.m. and continues for more than 30 s, or when the lowest point is more than 70 b.p.m. and less than 80 b.p.m. and continues for more than 60 s.

- Prolonged deceleration is when the lowest point is less than 80 b.p.m.
- iii. The starting point of deceleration is measured as the point where the decline in heart rate can be distinctly recognized by visual observation, and the ending point is measured when the heart rate returns to a continued stable rate at the baseline. The lowest point of the heart rate is determined as the lowest heart rate among a series of connected decelerations, such as a w-shaped one; however, when we determine whether a gradual or abrupt type of deceleration existed, then the first nadir point should be measured as the lowest point.

III. Response and management

When a level of FHR patterns from 1–5 has been determined, then the appropriate response and management should be performed as shown in Table III.

For levels 3 and 4, review waveform classification at 10-min intervals.

When both the response and management are performed, then the following background factors, consecutive and evolutionary changes of FHR patterns, as well as institutional conditions (such as emergency cesarean preparation time) should be considered.

Table III Medical facility response and management based on fetal heart rate (FHR) pattern classification

	Doctor	Midwife†
1	A: No intervention required	A: No intervention required
2	A: No intervention required FHR pattern levels B: Increase monitoring level, implement amelioration techniques, as well as assessment of causes	B: Continuous monitoring, notify medical doctor of FHR pattern and pattern evolution
3	B: Increase monitoring level, implement amelioration techniques, as well as assessment of causes or C: Implement amelioration techniques, assessment of causes, preparation for cesarean section and/or operative vaginal delivery	B: Continuous monitoring, notify medical doctor of FHR pattern and pattern evolution or C: Continuous monitoring, request medical doctor for bedside evaluation
4	C: Implement amelioration techniques, assessment of causes, preparation for cesarean section and/or operative vaginal delivery or D: Conduct cesarean section or operative vaginal delivery, prepare for resuscitation of newborn	C: Continuous monitoring, request medical doctor for bedside evaluation or D: Continuous monitoring, urgent request for bedside evaluation by a medical doctor, preparation for resuscitation of the newborn
5	D: Conduct cesarean section or operative vaginal delivery, prepare for resuscitation of newborn	D: Continuous monitoring, urgent request for bedside evaluation by medical doctor, preparation for resuscitation of newborn

†This does not include birth centers run exclusively by a midwife (midwives).

Background factors include: gestational ages; maternal complications; fetal abnormalities; placental, umbilical cord, or amniotic fluid abnormalities; and delivery progress.

Amelioration techniques

General measures include position change, the administration of oxygen, increasing the amount of intravenous fluid, and the adjustment/stoppage of the administration of labor induction medication.

Discretionary treatments include amnioinfusion (if indicated), stimulation for FHR acceleration, and the administration of a tocolytic agent.

References

1. Royal College of Obstetricians and Gynecologists. Clinical Effectiveness Support Unit. *The Use of Electronic Fetal Monitoring: The Use and Interpretation of Cardiotocography in Intrapartum Fetal Surveillance*. Evidence-based clinical guideline No. 8. London, UK: RCOG Press, 2001.
2. Liston R, Sawchuk D, Young D. Society of Obstetrics and Gynecologists of Canada, British Columbia Perinatal Health Program. Fetal health surveillance: Antepartum and intrapartum consensus guideline. [Published erratum appears in *J Obstet Gynaecol Can* 2007; 29:909]. *J Obstet Gynaecol Can* 2007; 29 (Suppl): S3–S56.
3. Macones GA, Hankins GD, Spong CY, Hauth J, Moore T. The 2008 National Institute of Child Health and Human Development workshop report on electronic fetal monitoring. Update on definition, interpretation, and research guideline. *Obstet Gynecol* 2008; 112: 661–666.
4. Parer JT, Ikeda T, King TL. The 2008 National Institute of Child Health and Human Development Report on Fetal Heart Rate Monitoring. *Obstet Gynecol* 2009; 114: 136–138.
5. Parer JT, Ikeda T. A framework for standardized management of intrapartum fetal heart rate patterns. *Am J Obstet Gynecol* 2007; 197: 26.e1–26.e6.
6. The National Institute of Child Health and Human Development Research Planning Workshop. Electronic fetal heart rate monitoring: Research guidelines for interpretation. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1385–1390.

周産期脳障害を防ぐ

池田智明

胎児期と新生児期に発生した異常によって、脳性麻痺、精神発達遅滞、てんかん、および知覚障害などの脳障害が起こることを「周産期脳障害」と呼ぶ。周産期脳障害を防止するためには、その発生原因、病態などを知ることが重要であるが、多くは明らかになっていない。最近、わが国では日本周産期・新生児医学会の新生児蘇生法普及事業（2007年から）、日本産科婦人科学会の胎児心拍数波形の分類に基づく分娩時胎児管理の指針（2010年から）、および日本医療機能評価機構の産科補償制度原因分析委員会による分娩時アスフィキシアの再発予防（2009年から）が動き出した。本稿では、これら3事業が必要となった歴史的背景を中心として概説し、今後の方向性を探ることを試みる。

1. Littleと分娩時低酸素症

胎児アスフィキシアと小児脳障害について、最初に記載したのは、英国の整形外科医W John Little (1810～1894)である。彼は1861年、「異常分娩の影響」と題し、脳性麻痺に関する論文を産科学会で発表した。新生児仮死の他に、難産、早産が脳性麻痺の発生に関与することを63例の具体的な病歴と、新生児死亡例の剖検所見から示している⁽¹⁾。異常分娩と新生児期からの異常所見を、数年後の異常神経症状と関連づけ、その予防、治療法を示したことは、画期的なことであった。しかし、障害児の発生時

期が「分娩時」であるという彼の意見は、その後、医療のみでなく、一般的な通念として長年にわたって、信じられることとなる。

周産期医学は、胎児の低酸素症をめぐる研究を中心として歩んできたといっても過言でないほど、「低酸素」を障害因子として重要視してきた。低酸素症が進行すると、胎児は様々な代償反応を示し、更に進行すると、代償不全に陥り脳をはじめとする臓器障害が発生し、更に進行すると、死に至るという考えがある。LillienfeldとParkhurstは“continuum of reproductive casualty”と呼び、周産期医学の大前提とした⁽²⁾。プエルトリコにおける、Myersらのアカゲザルを使った一連の実験結果も、この説を支持するものであった⁽³⁾。

したがって、分娩時における低酸素症を防ぐことができれば、脳性麻痺を始めとする周産期脳障害のほとんどが予防できると考えられたのも、自然なことである。

2. 胎児健康度モニタリングの始まりと期待感

1960年代に、米国のEdward Hon (1966)⁽⁴⁾、ウルグアイのRoberto Caldeyro-Barcia (1966)⁽⁵⁾、ドイツのKonrad Hammacher⁽⁶⁾がそれぞれ独自に、瞬時胎児心拍数を経時的に表す方法、胎児心拍数(FHR)モニタリングを開発した。FHRモニタリングによる胎児健康度の評価法

は、その簡便性と非侵襲性によって、瞬く間に臨床の場に広がった。最初は分娩時のみの適応であったが、分娩前の胎児評価法として、陣痛を負荷する contraction stress test、続いて陣痛負荷なしで観察する non-stress test へと応用は広がった。また、FHR モニタリングの欠点である、高い疑陽性率（異常パターンが出現しても、実際には胎児が正常である率）は、ドイツの Erch Saling が開発した、分娩時に胎児の頭皮から採血し、アシドーシスの有無を検索する fetal blood sampling を併用することで低くできることも判明した⁽⁷⁾。

時期を同じくして、麻酔法が発達し、帝王切開術が安全に行われるようになった。分娩時に、FHR モニタリングで低酸素症を早期に発見し、異常があれば帝王切開術によって娩出することで、新生児仮死はほとんど防ぐことができるようになり、脳性麻痺をはじめとする障害が激減すると信じられた⁽⁸⁾。1971年、米国の Nixon 大統領が、President's committee on mental retardation の中で、精神発達遅滞の発生を2000年までに半減することを国家的目標と設定したときには、だれしも実現可能と考えたのである。

3. 減少しない脳性麻痺の発生率

しかし、FHR モニタリングが普及すると周産期死亡率は確かに低下したが、脳性麻痺や精



PROFILE

池田 智明
(いけだ ともあき)
国立循環器病センター周産期・婦人科部長
専門：周産期学

神発達遅滞は減少しなかった。当初の期待に反した結果であったことから、1970年代後半から80年代にかけて、2つのタイプの研究がさかんに行われた。一つは、分娩時にFHRモニタリングを連続的に行った群と、聴診法として間欠的に行った群との比較である。（すでに、胎児心拍数を聴取しない分娩を行うことは、倫理的に不可能な状況となっていたのである。）この結果、FHRモニタリング群は、間欠的聴診群に比べて、児の死亡率、罹患率、長期予後とも減少させるというものではなかった。反対に、どの研究においても、聴診群よりも優位に、帝王切開率と鉗子・吸引分娩率が増加するという悪影響まで明らかになった。

もう一つのタイプの研究は、脳性麻痺など神経予後不良例を登録し、正常児と周産期因子を比較するものである。全米の50,000例以上の出生を詳細に検討した Collaborative Perinatal Project of National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NCPP) では、脳性麻痺児のうちで、**出生時の低酸素症が脳性麻痺の原因とされた症例は、全体の12%と非常に少なく、精神発達遅滞と**

はほとんど関係しないと結論された⁽⁹⁾。西オーストラリア、パース周辺の脳性麻痺登録制度は、全世界で最も完備された統計とみられているが、そのデータからも、たかだか15%の症例が、分娩時の因子が脳性麻痺の原因であると推定されるにすぎなかった⁽¹⁰⁾。

以上の結果から、周産期脳障害の発生時期としての分娩時と、発生原因としての低酸素症は、いずれもマイナーなものであると考えられるようになった。また、分娩時FHRモニタリングに対しても過度の期待であったことが認識された。

4. 医療訴訟とFHRモニタリング

これら、脳障害予防を目的としたFHRモニタリングの医学的有効性が失われたにもかかわらず、現場の臨床医はFHRモニタリングの使用を止めることはなかった。胎児の健康を管理する医師として、擬陰性率（正常パターンにもかかわらず、実際には胎児健康状態が障害されている率）が極めて少ないという長所をもつこの検査は、少しでも異常分娩を作らないようにするという現場の感覚にマッチしていたものと思われる。

もう一つの理由は、増加する医療訴訟に対応するためであろう。米国では、既に1970年代から件数、訴訟額とも増加している。このため、分娩時、正常なFHR図や、胎児血（分娩時の臍帯血も含まれる）を証拠として残しておくこ

とが、医療訴訟に備えるためにも重要なことであるという認識である。近年のわが国の状況も同様である。日本医師会医師賠償責任保険への届出件数は、産婦人科事故が常にトップを占め、約30%であり、また、その約30%が脳性麻痺に関するものである。小児の脳神経障害は、産婦人科医にとって、医療訴訟と隣り合わせの、センシティブな問題である。

5. 分娩時FHRモニタリングの用語統一

1990年代になってFHRモニタリングの再評価が始まる。まず、聴診法との比較で、周産期予後の改善がみられなかったのは、FHRパターンの分類、解釈の仕方のみならず、対応法も、極めてマチマチで、統一されていないことが原因ではないかという批判である。

FHRパターンの用語の統一に乗り出したのは、カルフォルニア大学サンフランシスコ校産婦人科教授 Julian Parer である。Parer は、先述した Quilligan とともに、米国国立小児健康成育研究所 (NICHD) に働きかけ、用語ガイドラインのコンセンサス会議を開催した。北米の専門家を中心とした18人からなる委員会は、1995年から数回開催された。その結果、1997年に、委員が合意した最低限の項目をNICHDリサーチガイドラインとして、発表するまでにこぎつけた⁽¹¹⁾。わが国は、2000年から日本産科婦人科学会周産期委員会（佐藤章委員長、岡

村州博小委員会委員長)が、胎児心拍数図の用語と定義の標準化問題に取り組み、NICHDガイドラインを基にした、「胎児心拍数陣痛図の用語と定義」が作成された⁽¹²⁾。しかし、NICHDガイドラインと同様に、専門家が合意した最大公約数的な用語のみを示しているために、実際の分娩管理となかにおける対応は含まれていない。

6. 分娩時の対応まで含んだガイドラインを求めて

FHRパターンの用語の標準化はなされた感があるが、胎児状態の推定や臨床的対応に関して、標準的なガイドラインの必要性が2000年代に求められるようになった。英国産婦人科学会ガイドライン(RCOG)が2001年に、カナダ産婦人科学会は2007年に、FHRパターン評価に加えて、臨床的対応まで踏み込んだガイドラインを発刊していた。これは、FHRパターンを正常(normal)、疑い(suspicious)または異型(atypical)、異常(pathologicalまたはabnormal)の3段階に分けるものである(3 tier system)。2007年に、Parerと著者は、FHRパターンを5段階(green, blue, yellow, orange, red)に分類し、それぞれに対して臨床的対応のサンプルを提唱した(5 tier system)⁽¹³⁾。これらを受けて、米国産婦人科学会(ACOG)も、米国周産期学会(SMFM)、およびNICHDの3団体合同の再評価ワークショップを2008年4

月に、胎児心拍数モニタリングワークショップ(Electric fetal heart rate monitoring: A reevaluation workshop)会議で、FHRパターンが、カテゴリーI(正常:normal)、カテゴリーII(未決定:indeterminate)、およびカテゴリーIII(異常:abnormal)と3つに分類することが決まった。

日本産科婦人科学会周産期委員会(岡井崇委員長)も、2008年に、「胎児心拍数波形の判読に基づく分娩時胎児管理の指針」を発表した⁽¹⁴⁾。この指針は、分娩中のFHRパターンに基づき、胎児警戒レベルを5つに分類し(表)、現在の医学的知識から妥当とみなされる4段階の対応と処置を指示した。しかし、いずれのガイドラインも、帝王切開などの器械分娩率を増加させることなく新生児アシドーシスの減少につながるという有効性を示すことができていない。したがって、今後はこの有効性の検証がガイドラインの最大の課題である。

表 2008年、日本産科婦人科学会周産期委員会編、「胎児心拍数波形の判読に基づく分娩時胎児管理の指針」による、心拍数波形の5分類

1. 正常波形	normal pattern
2. 亜正常波形	subnormal pattern
3. 異常波形 軽度	abnormal pattern mild
4. 異常波形 中等度	abnormal pattern moderate
5. 異常波形 高度	abnormal pattern severe

異常波形レベル軽度、中等度、高度を「胎児機能不全」と呼ぶこととする。

7. わが国の新生児蘇生法普及事業 (NCPR)

分娩時の胎児健康度リスクによって、子宮内治療や娩出が適切に行われたとしても、出生直後からの新生児への治療が適切でなければ、良い予後は見込めない。胎児から新生児へ移行する出生時に、約1%の児が心肺蘇生術を受けなければ、死亡または重篤な脳障害を受けるといふ。日本周産期新生児学会は、2007年から、新生児心肺蘇生法普及事業として、講習会を全国的に展開している。これは、5年ごとに各国の専門医が集まり、新生児も含めた全ての蘇生法に対して医学的エビデンスを基に協議している国際的ガイドラインに基づき、わが国の現状に即して改定したものである。専門コース(講義と実習あわせて4～5時間)と一次コース(2～3時間)および、インストラクター養成講習会がある。この講習会事業によって、蘇生に関する技術と知識が一般的に広がった一方、新生児予後が実際に改善した報告が待たれる。

8. 「分娩時に」かつ「アスフィキシア(低酸素・虚血)」と脳障害の因果関係を示すには?

MacLennanによって、分娩時のアスフィキシアが脳性麻痺の原因であることを支持する基準が、1998年にオーストラリア・ニュージーランド周産期学会による、A template

for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy: international consensus statementとして発表された⁽¹⁵⁾。分娩中に急性低酸素症が発生したことを示す必須3基準項目、補助5基準項目、計8基準項目に分けて示している。さらに、この別項として、分娩中の急性低酸素以外の原因を示唆する13項目を設けていることが特筆すべき点である。子宮内感染症や先天異常などの非アスフィキシア性脳障害の原因を、出生前に積極的に診断することの重要性を謳ったものである。

アスフィキシア以外の、新生児脳症や脳性麻痺などの中枢神経障害の原因はどのようなものがあるのだろうか?われわれは、年間約1万例の出生のある宮崎県において、1998～2002年にわたる5年間に、109例を神経予後不良例として登録し、検討した。1,000出生当たり2.0例の発生率であった。その原因別の内訳として、①低酸素・虚血が主な原因であると考えられた例(19.3%)、②未熟性(17.4%)、③先天異常(24.8%)、④胎児発育不全IUGR(ただし低酸素・虚血や先天異常を伴わない例)(11.0%)、⑤先天性感染症(すべて先天性サイトメガロ感染症)(4.6%)、⑥脳室周囲白質軟化症(ただし妊娠26週以上に限る)(15.6%)、および⑦その他または不明8例(7.3%)であった。

9. 産科医療保障制度と分娩時アスフィキシアの原因分析・再発防止対策

2009年から、日本医療機能評価機構による産科医療保障制度がスタートしたが、その目的は、①分娩に関連して発症した脳性麻痺児およびその家族の経済負担補償、②脳性麻痺発症の原因分析と予防に資する情報提供、③脳性麻痺発症をめぐる紛争の防止・早期解決である。②の原因分析に関しては、2010年から開始され、わが国における妊娠33週以上で、6ヶ月以上生存した重症身体障害者の実態が明らかとなつてこよう。しかし、先天性要因、新生児期要因のほか、在胎28週未満の低出生体重児は、補償対象外のため、これら周産期脳障害の重要なサブグループが検討されない。しかし、わが国全体をカバーする、周産期脳障害に関する、調査機構が設立されたことは価値があると考えられる。

おわりに

わが国では、新生児蘇生法普及事業、胎児心拍数波形の分類に基づく分娩時胎児管理の指針、および産科補償制度原因分析委員会による分娩時アスフィキシアの再発予防の3つの事業が開始された。これを機会に、医療者のみでなく、社会的にも周産期脳障害に関して関心もたれるものと期待される。その折に、我々は、

これまで解明されたことと、また不明な部分を、社会に分かりやすく情報発信することが必要であると考えている。

文献

- (1) Little W: On the influence of abnormal parturition, difficult labours, premature birth, and asphyxia neonatorum on the mental and physical condition of the child, especially in relation to deformities. *Trans Obstet Soc London* 3: 293, 1861.
- (2) Lillienfeld AM, Parkhurst EA: A study of the association of factors of pregnancy and parturition with the development of cerebral palsy. *Am J Hyg* 53: 262-282, 1951.
- (3) Myers RE: Experimental brain damage in the newborn monkey. *J Neuropathol Exp Neurol* 26: 172, 1967.
- (4) Hon EH: A fetal electrocardiographic electrode. *Yale J Biol Med* 39: 54-58, 1966.
- (5) Caldeyro-Barcia R, Mendez-Bauer C, et al: Control of human fetal heart rate during labor. In Cassels DE (eds): *The heart and circulation of the newborn and infant*. New York, Grune and Stratton, 1966, pp7-36.
- (6) Hammacher K: The diagnosis of fetal distress with an electronic fetal heart monitor. In Horsky J, Stembera ZK (eds): *Intrauterine dangers to the fetus*. Amsterdam, Excerpta Medic, 1967.
- (7) Saling EA: A new method for examination of the infant during labour; introduction, technique, and principles. *Archives of Gynaecology* 197: 102-122, 1962.
- (8) Quilligan EJ, Paul RH: Fetal monitoring: Is it worth it? *Obstet Gynecol* 45: 96-100, 1975.
- (9) Nelson KB, Ellenberg JH: Antecedents of cerebral palsy. Multivariate analysis of risk. *N Engl J Med* 315: 81-86, 1986.
- (10) Blair E, Stanley FJ: Intrapartum asphyxia: a rare cause of cerebral palsy. *J Pediatr* 112: 515-519, 1988.
- (11) National Institute of Child Health and Human Development Research Planning Workshop. *Electronic fetal heart rate monitoring: research guidelines for interpretation*. *Am J Obstet Gynecol* 177, 1385-1390, 1997.

- (12) 日本産科婦人科学会周産期委員会 胎児心拍数図の用語及び定義検討小委員会報告 (委員長: 岡村州博). 日本産科婦人科学会雑誌. 55, 1205-1207, 2003.
- (13) Parer JT, Ikeda T: A framework for standardized management of intrapartum fetal heart rate patterns. *Am J Obstet Gynecol* 197; 26. e1-e26. e6, 2007.
- (14) 日本産科婦人科学会周産期委員会 (委員長 岡井崇). 胎児機能不全の診断基準の作成と妥当性の検証に関する小委員会報告. 胎児心拍数波形の判読に基づく分娩時胎児管理の指針. 日本産科婦人科学会雑誌. 60, 1220-1221, 2008.
- (15) MacLennan A: A template for defining a causal relation between acute intrapartum events and cerebral palsy; International consensus statement. *BMJ* 319: 1054-1059, 1999.

B：治療の進歩

母体死亡の更なる減少を目指して(3)脳出血への対応

大分大学地域医療・産婦人科教授
 国立循環器病センター周産期治療部客員部長
 国立循環器病センター周産期治療部部长

よし まつ じゅん
 吉 松 淳
 いけ だ あき
 池 田 智 明

キーワード 脳血管障害、脳出血、妊娠高血圧症候群、妊産婦死亡、HELLP 症候群

はじめに

妊娠に関連した脳血管障害は、わが国における間接母体死亡の原因として頻度が高く、重要な疾患である。厚生省心身障害研究「妊産婦死亡の防止に関する研究」平成9年度研究報告書（主任研究者：武田佳彦）によると、平成3、4年に日本国内で死亡した197例の妊産婦の内、脳血管障害による死亡は27例で、全体の14%を占め、産科出血の38%に続いて2番目に多い死亡原因であったことを報告している¹⁾。脳血管障害による死亡の場合、妊娠に関連した死亡として死亡診断書に明記されていない症例も多く存在することが予測され、この数値以上に発生している可能性がある。本稿では、わが国の妊娠に関連した脳血管障害について、全国の総合病院、周産期母子医療センター、大学病院にアンケート調査を行い、わが国における妊娠関連脳血管障害の詳細を調査し検討した厚生労働科学研究費補助金子ども家庭総合研究「乳幼児死亡と妊産婦死亡の分析と提言に関する研究」平成18年度総括・分担研究報告書（主任研究者：池田智明）の結果をもとに発生頻度、リスクファクター、予後などの臨床像を述べる。この研究では全国の1,582施設、3,238診療科（産科：912、内科：1,020、脳神経外科：1,306）へのアンケート調査を行い、1,107施設から有効回答が得られた（回答率70.0%）。対象症例は平成18年1月から12月に発症した妊娠関連脳血管障害

である。

1. わが国の妊娠関連脳血管障害の概要

平成18年に登録された症例は脳出血39例、くも膜下出血18例、脳梗塞25例、脳静脈洞血栓症5例、子癇・高血圧性脳症82例、その他15例であった。最も多かったのは子癇・高血圧性脳症で全体の44.6%を占めた。出血性（hemorrhagic stroke、脳出血、くも膜下出血）と梗塞性（ischemic stroke、脳梗塞、脳静脈洞血栓症）に分類すると出血性は57例、梗塞性は30例で1.9：1の比率で出血性が多くみられた。これまでの欧米の報告からでは梗塞性出血性より多いとされている^{2,3)}。台湾からの2006年の報告⁴⁾では梗塞性より出血性のほうが多かったとしており、人種や生活様式の違いなどによって出血性、梗塞性の発生頻度に差がある可能性が示唆された。

発症時の年齢は30.5±5.3歳（mean±SD）であった。発症年齢のピークは30～34歳にあり、この発症のピークは厚生労働省発表の母体年齢のピークと一致していた。脳出血では初産婦が多く（1：0.5、初産：経産、0.44±0.73回）、脳梗塞（1：1.27、0.84±0.90回）、脳静脈洞血栓症（1：1.5、0.60±0.55回）では経産婦で多く発症していた。出血性と梗塞性では出血性で初産：経産は1：0.63、梗塞性では1：1.31と出血性で初産、梗塞性で経産が多い傾向が見られる。

妊娠中の発症が最も多く、産褥期の発症が続き、分娩時発症は最も少ない。欧米の報告ではこの比率は逆転しており、妊娠中の脳血管障害は妊娠中発症が産褥発症に比較して少ないとされている。妊娠中発症が多くみられたという今回の結果はわが国における妊娠関連脳血管障害の一つの特徴であると考えられる。出血性と梗塞性を比較すると、出血性に比して梗塞性では産褥期発症の比率が高い(出血性28.1%、梗塞性40.0%)。出血性、梗塞性、ともに妊娠中の発症が最も多いが、産褥期では特に梗塞性を念頭に置く必要がある。

児の生存率は93.8%であった。死産は4例でみられた(流産症例を除く)。脳出血で死産となった症例は妊娠40週で分娩前に発症、CTで被殻出血と診断され、母体はHELLP症候群、DICで死亡、死産となっている。

流産は8例で認めているが人工流産であったか自然流産であったかは今回の検討では明らかにできなかった。また、早産は49例で認めた。満期産児も含めて、児の機能予後についての詳細な検討はできていないが長期的な経過観察が求められる。

母体の予後は、死亡は10例(脳出血7例、脳静脈洞血栓症1例、子癇・高血圧性脳症2例)であった。疾患別では脳出血では23例(60.5%)が予後不良で最も悪かった。くも膜下出血と合わせると出血性脳血管障害では43.6%が予後不良であった。一方、梗塞性脳血管障害である脳梗塞では11例(44.0%)で予後不良であった。梗塞性全体では40.0%で予後不良であった。

2. 妊娠関連脳出血

1) 妊娠関連脳出血の概要

妊娠関連脳血管障害の中で脳出血は頻度が高く、予後が悪い。発症年齢の平均は31.5歳であ

るが、5歳ごとの年齢群で見ると25～39歳では発症率は3.1から4.1(対100,000妊婦)であるが、40～44歳では18.5と急増する。40歳以上の妊婦は脳出血のハイリスクといえる(表1)。

死亡率は0.76(対100,000妊婦)で同年代の非妊娠女性の0.56(対100,000人、2006年の人口動態調査)に比して高い。もともと妊婦は死亡率が低い(healthy pregnant effect)が、脳出血を発症した場合には非妊娠女性より重篤度が高いことが分かる。日本における年代別の脳出血の発症率の統計がないため妊婦の脳出血の発症率が高いのか低いのか判断することができないが、少なくともひとたび発症すれば非妊婦より死亡する確率が高いと言える。

2) 妊娠関連脳出血の発症時期と分娩様式

発症の時期では53.8%が妊娠中に発症している。妊娠中に発症した症例の妊娠週数は 29.9 ± 8.4 週で、くも膜下出血(22.5 ± 9.6 週)、脳梗塞(21.3 ± 10.5 週)に比較して妊娠後期に発症している。

分娩方法は妊娠中発症の21例中20例で帝王切開がなされていた。分娩中発症の症例では7例中4例で帝王切開が行われている。妊娠中発症の場合、まず、母体救命のための処置がなされ、症状や出血の程度により分娩の時期が決定される。すなわち、軽症で症状が安定すれば妊娠を継続させ、児の予後を考慮したタイミングで分娩となる。その様式としては、今回の調査からは再出血の予防のため経膈分娩が回避されたためと考えられる。この発症から分娩へのプロセスに関する文献的なコンセンサスやガイドラインはない。現状では個別に対応することになるが、まず、母体救命が優先されるという基本方針で対応する。

3) 妊娠関連脳出血の予後因子

今回の調査から、診断時期が早ければ生命予後

表1. 年齢別脳出血の発症

年齢	15～19	20～24	25～29	30～34	35～39	40～45
妊婦数 (n)	15,933	130,230	335,771	417,776	170,775	21,608
脳出血 (n)	1	1	12	13	7	4
発症率 (対100,000妊婦)	6.3	0.8	3.6	3.1	4.1	18.5

が保たれやすいことが示唆された。診断までが3時間以内の場合、25例中7例で予後が良好、17例は予後不良のうち2例は死亡した。診断まで3～24時間であったのは10例で、うち5例が死亡している。死亡率はそれぞれ8%と50%で、早期診断が救命の重要な要因であることが示唆される。ただし、診断が3時間以内であっても後遺症なし、もしくは軽度で生存する率は28%と決して高くない。一方、診断までの時間が3時間を超えると後遺症なし、もしくは軽度で生存する率は50%であった。診断までの時間が早ければ早いほど機能予後が保たれるというわけではない。

妊娠関連脳出血では、受診時のJCS (Japan Coma Scale) と予後に強い関連を認める。JCSが0もしくはIの場合、重篤な後遺症、もしくは死亡例は19例中5例で26.3%であったが(死亡2例)、JCSがIIになると4例中3例、JCSがIIIでは15例全例が重篤な後遺症、もしくは死亡例で(死亡5例)、初診時のJCSが重篤であればあるほど機能予後を保つことができず、死亡例も増加する。

では、手術は予後を改善するのであろうか。意識障害が軽症な例(JCS 0、I)では手術を行う

ことで死亡例が0となった。一方、重度意識障害例(JCS II、III)では手術しても25%が死亡していた。重度意識障害例で手術されていない症例は2例しかないため比較できないが、重症例では手術を行っても予後を改善できない傾向が見られた(表2)。発症から診断までの時間別に手術の予後への影響を検討すると3時間以内では手術の効果を認めるが3時間以上では手術を行っても予後の改善は見られなかった。早い診断と軽症例では手術は効果があると考えられる(表3)。

脳出血の背景因子・疾患とそれぞれの予後を表4に示す。脳動静脈奇形単独では死亡例はないが比較的軽篤な後遺症を残す症例が多くみられた(57.1%)。もやもや病では4例中1例が軽度の後遺症であった以外、全て重篤な後遺症を残した。特別な背景因子を認めない場合の予後は相対的には良好であると言えるが2例の死亡例が認められている。背景因子なしとされる場合でも全例で剖検されているわけではなく、脳動静脈奇形やもやもや病が隠れていることは十分予想できる。診断がついていないこのような脳血管異常の症例を事前に診断することで脳出血の発症を回避できる可能性があると思われる。

表2. 発症時意識障害と手術による予後

意識障害	手術	意識障害		
		軽症	重症	死亡
なし、軽度	なし	9 (75.0)	1 (8.3)	2 (16.7)
	あり	5 (71.4)	2 (28.5)	0 (0)
中等度、重度	なし	1 (50.0)	0 (0)	1 (50.0)
	あり	2 (11.8)	11 (64.7)	4 (23.5)

n (%)

表3. 診断までの時間と手術による予後

発症から診断までの時間	手術	意識障害		
		軽症	重症	死亡
< 3 hours	なし	4 (57.1)	1 (14.3)	2 (28.6)
	あり	3 (17.6)	14 (82.4)	0 (0)
> or = 3 hours	なし	4 (80)	0 (0)	1 (20)
	あり	2 (28.6)	1 (14.3)	4 (57.1)

n (%)