

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20404

研究課題名(和文) マイクロ波照射による脳損傷モデルの研究

研究課題名(英文) Metabolomic dynamics of microwave-induced traumatic brain injury in rat

研究代表者

五十嵐 豊 (Igarashi, Yutaka)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：50771101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：高出力のマイクロ波照射による脳損傷の病態はほとんど知られていないため、定量的にラットの脳にマイクロ波を照射する新しい脳損傷モデルを作製し、メタボローム解析を行った。照射1時間後にATPが照射前の0.3倍へ減少し、解糖系の代謝物の上昇がみられ、また多くのアミノ酸が増加した。照射直後より脳細胞へのエネルギーの供給が滞り、蛋白分解が進んだことから、微小血管の損傷による病態に近いと考えられた。高出力のマイクロ波による新たな脳損傷のモデルは、外傷性脳損傷のモデルより脳虚血に近い病態である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Effect of microwave on brain have been studied because microwave is widely used, but effect of high energy microwave on brain has not been studied yet. We developed animal model in rat to reveal pathophysiology of microwave-induced traumatic brain injury (TBI). This study was to reveal metabolomic dynamics after high energy microwave exposure. Glutamate and aspartate, which were reflected as excitatory damage, decreased 0.8 ($P = 0.005$) and 0.9 ($P = 0.035$) times at an hour after exposure as compared with control. Triphosphate including ATP, CTP, GTP, UTP significantly decreased 0.3 ($P = 0.002$), 0.3 ($P = 0.0005$), 0.4 ($P = 0.001$), and 0.3 ($P = 0.0005$) times at an hour after exposure. Glycerophosphocholine, which was reflected as membrane turnover, at 24 hours after exposure decreased 0.8 times ($P = 0.007$). Microwave-induced TBI has many common metabolic change in comparison with TBI.

研究分野：救急医学

キーワード：頭部外傷 マイクロ波 脳損傷

1. 研究開始当初の背景

マイクロ波は、携帯電話やオープンなどの日常生活から医療や軍事まで幅広い分野で用いられており、もはや人類にとって欠かすことができない。しかしマイクロ波が人体に与える影響は未だ十分に解明されておらず、脆弱な組織である脳に与える影響を明らかにすることは特に重要である。

我々は、マイクロ波の照射強度や照射時間を細かく調整することができる装置を用いて、新しい脳損傷モデルを作成した。本モデルの特徴は、高出力のマイクロ波を定量的に照射することができ、ラットの頭部を固定し照射することで再現性が高く、モデルの作製が簡便なことである。このモデルを用いて、病理学的、生化学的、行動科学的研究手法を用いて多角的に解析をし、マイクロ波照射による脳損傷の病態解明について研究を行っている。病理学的に検討した研究では、H-E染色を行い皮質運動野、海馬、側脳室脈絡膜の形態の変化や神経細胞数の変化を測定し、またアポトーシスを検出するTUNEL法を用いてアポトーシスした神経細胞の割合を測定した。その結果、照射後7日に側脳室脈絡叢に特異的にアポトーシスの増加が生じること、照射後28日に海馬において神経細胞数が減少することを明らかにし報告した。

2. 研究の目的

さらなるマイクロ波照射による脳損傷の病態を明らかにするため、メタボロミクスによる解析を行う。生体内の代謝物質を網羅的に解析することにより、タンパク質の活性を観察することで生体内の情報を包括的にとらえる。

脳虚血や他の頭部外傷のモデルと本モデルを比較し、本モデルの位置づけを検討することが可能である。さらに新たな脳損傷のバイオマーカーとなる候補物質を検討する。

3. 研究の方法

はじめに継時的変化を観察し生化学的変化のピークが現れる時間を明らかにし、個体数を増やして測定および解析を行った。

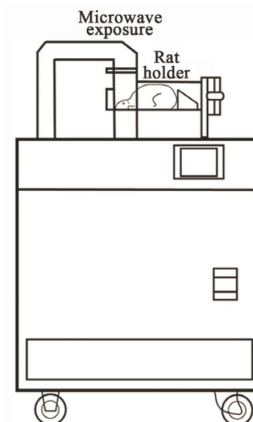
マイクロ波照射後に変化する物質を網羅的に把握するため、マイクロ波照射後の脳組織に対してメタボローム解析を行い約900の代謝物質について測定した。測定には、イオン性低分子の測定に適したキャピラリー電気泳動 (Capillary Electrophoresis, CE) と質量分析計 (Mass Spectrometry, MS) を組み合わせた分析技術である CE-MS 法を用いた。

【予備実験】マイクロ波を脳に照射した後、生化学的変化がピークに達する時間が不明のため、照射後いつ代謝物質がピークに達するかを検討した。ミトコンドリアの機能不全が4時間以内に生じるという過去の研究から、照射前、照射後30分、1時間、3時間、24時間と継時的に測定を行う方針とした。

マイクロ波照射装置 (Model MMW-05, Muromachi microwave fixation system、図参照) を用いて、2.45GHz のマイクロ波を3.0kW、0.10秒間照射を行い、照射後30分、1時間、3時間、24時間にそれぞれ2匹ずつ鎮痛・鎮静下に安楽死を行い脳を摘出した。摘出した脳の検体はドライアイスで冷凍し、メタボローム解析を行った。結果より、最も多くの代謝物質がピーク値を示した時間で本実験を行った。

【本実験】予備実験の結果から、コントロール、マイクロ波照射後1時間、24時間の3群で行う方針とした。

マイクロ波照射装置を用いて、2.45GHz のマイクロ波を3.0kW、0.10秒間照射を行い、照射後1時間、24時間にそれぞれ5匹ずつ鎮痛・鎮静下に安楽死を行い脳を摘出した。摘出した脳の検体をメタボローム解析した。

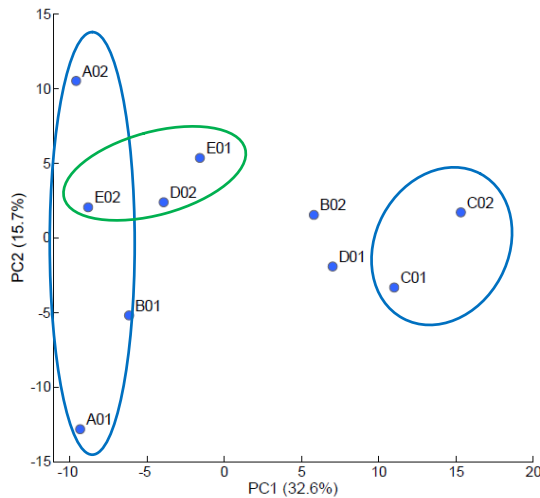


【解析】メタボローム解析により約900の代謝物質を網羅的に解析した。具体的には、糖リン酸、アミノ酸、核酸、有機酸などの一次代謝を構成する内因性の代謝物質である。

4. 研究成果

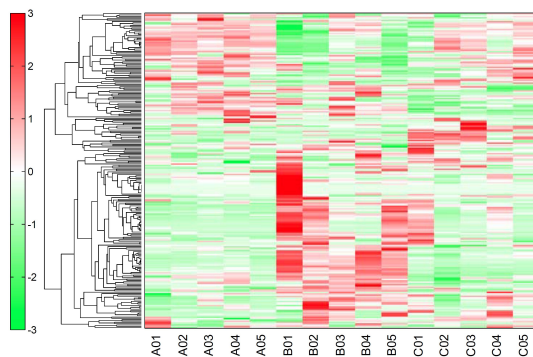
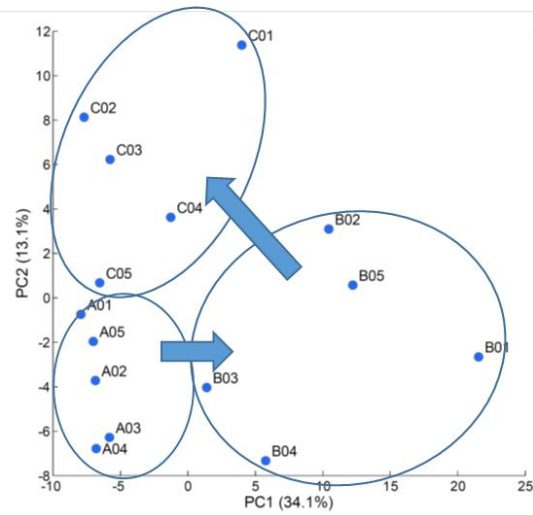
【予備実験】

予備実験の主因子分析で、control (A群) と比較して最も変化が現れたのはC群 (照射1h後) であり、E群 (照射24h後) はほぼcontrolレベルとなることが分かった。したがって、本実験は、control、照射1h、24h後で行うこととした。



【本実験】

主因子分析およびヒートマップ分析では、control、1h 群、24h 群は以下のようになった。予備実験と同様に、照射1時間後にピークに達し、24時間後に control レベルとなった。



興奮性アミノ酸であるグルタミン酸 (0.8, $p=0.005$) とアスパラギン酸 (0.9, $p=0.035$) は、照射 1 時間後に有意に減少した。-アミノ酪酸 (GABA) は、1 時間後は 0.9 倍に減少し ($p=0.330$)、24 時間後に 0.8 倍に有意に減少した ($p=0.00099$)。バリン、ロイシン、イソロイシンは、それぞれ 1 時間後に増加した (Val 2.5 ($p=0.005$), Ile 2.7 ($p=0.009$), Leu 2.5 ($p=0.005$))。トリリン酸は 1 時間後に減少した (ATP 0.3 ($p=0.002$), CTP 0.3 ($p=0.0005$), GTP 0.4 ($p=0.001$), UTP 0.3 ($p=0.0005$))。細胞膜の turnover を示す glycerophosphocholine は、24 時間後に 0.8 倍へ有意に減少した ($p=0.007$)。1 時間後に解糖系の代謝物の上昇がみられ、また多くのアミノ酸が増加した。照射直後より脳細胞へのエネルギーの供給が滞り、蛋白分解が進んだことから、微小血管の損傷による病態に近い可能性がある。マイクロ波による新たな脳損傷のモデルは、外傷性脳損傷のモデルより脳虚血に近い病態である可能性が示唆され、今後は病理学的な血管の評価など、さらなる研究が必要である。

因子負荷量		
	PC1	PC2
1	Nicotinamide	XA0035
2	Thiaproline	Putrescine
3	CMP- <i>N</i> -acetylneuraminate	5-Hydroxyindoleacetic acid
4	Inosine	Ascorbate 2-sulfate
5	IMP	SDMA
6	Ribulose 5-phosphate	Octanoylcarnitine
7	Guanosine	Carnosine
8	Cysteine glutathione disulfide	Ascorbic acid
9	Adenosine	Thiamine phosphate
10	Gly	N8-Acetylspermidine
11	Leu	3-Hydroxy-3-methylglutaric acid
12	Xanthine	Ser-Glu
13	Trimethylamine <i>N</i> -oxide	Pantothenic acid
14	Pro	XA0012
15	5-Methyl-2'-deoxycytidine	Octanoic acid
16	ADP-glucose GDP-fucose	Pyridoxal
17	Adenine	Ophthalmic acid
18	Phe	XA0027
19	Uridine	Hypotaurine
20	His	Glyceric acid

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6．研究組織

(1)研究代表者

五十嵐 豊 (Yutaka Igarashi)

日本医科大学 医学部 助教

研究者番号：50771101

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし