

機関番号：24402

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591303

研究課題名 (和文) マイクロペットを用いた低酸素性虚血性脳症の病態解明と治療法に関する研究

研究課題名 (英文) Studies on Pathogenesis and Treatment of Hypoxic-Ischemic Encephalopathy using MicroPET Imaging

研究代表者

新宅 治夫 (SHINTAKU HARUO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：00206319

研究成果の概要 (和文)：

新生児ブタの低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルでは、NOが増加し大脳にiNOSの出現が認められたがビオプテリンの増加が認められず、iNOSにより産生されたNOはビオプテリンが少ないためONOO-となり組織障害性に働き、脳細胞のグルコース取り込みが低下したと考えられた。この現象は、microPETの画像でFDGの取り込みの減少として認められた。治療としてビオプテリンが有効である可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：Studies on Pathogenesis and Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy using microPET imaging in hypoxic ischemic encephalopathy in neonatal pigs

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学A

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：新生児医学

1. 研究開始当初の背景

新生児の低酸素性虚血性脳症(HIE)は痙攣対麻痺や他の神経学的後遺症を起こす予後不良な疾患であるため、病態の解明と有効な治療法の開発が望まれていた。我々は新生児ブタを用いたHIEモデルで、急性期中枢神経系に誘導性一酸化窒素合成酵素(iNOS)が発現し、血漿中ビオプテリン濃度が急激に上昇することを発見し、一酸化窒素(NO)はHIEに関与していることを明らかにした。低体温療法は、HIEに対する新しい治療法として最近注目されているが、我々はこの新生児ブタHIEモデルを用いてテトラヒドロビオプテリ

ン(BH4)と低体温療法が脳と他の臓器に及ぼす影響を検討していたが、micro positron emission tomography (micro PET) 装置を用いてHIE発症の経過を脳の糖代謝の変動を通して経時的に観察し、機能低下を定量的に測定する方法は我々の研究が最初であった。

2. 研究の目的

マイクロペットを用いた低酸素性虚血性脳症の病態解明と治療法の開発であるが、まずBH4の不足がHIEの発症に関わる病態を解明し、その治療法としてBH4補充療法の開発を行うこととした。

3. 研究の方法

日齢1-3、体重約2kgの雄新生仔豚を用いた。動物をプロポホル麻酔下に気管内挿管し人工呼吸管理とした。両側頸動脈のクランプと酸素濃度6%の人工換気による低酸素虚血負荷を45分間施行後、両側頸動脈の再開通と30%の酸素濃度にて蘇生し、HIEモデルとした。このHIEモデルを用いてHIE発症の経過をフルデオキシグルコース(18F-FDG)による糖代謝の変動を通して経時的に観察し、microPETによる18F-FDGの取り込み画像から算出した脳内regions of interest(ROI)におけるstandardized uptake value(SUV)に基づき脳機能の低下を定量的に測定した。マイクロベット終了後屠殺し脳を各部位に分け、組織学的、生化学的分析を行った。

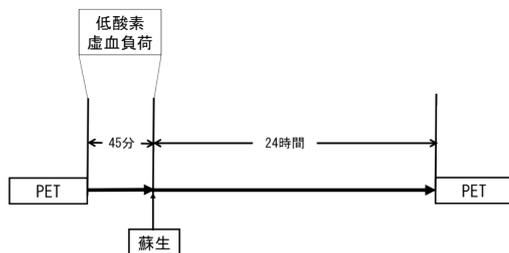
(1) microPETはmicroPET® P4 (Concorde Micro Systems Inc., Knoxville, TN: 図1)

図1. microPETの概要



を用いて、以下の手順で同一個体において低酸素虚血負荷前後の2回施行した。(図2)

図2. 低酸素虚血負荷前後のmicroPETイメージングの手順



- ①. 初回: 約406MBq (11 mCi)の(18)F-FDGを新生仔ブタに静脈注射し、45分後にプロポホル麻酔下にPETスキャンを施行し頭部での取り込みを測定した。
- ②. 初回PETスキャン後45分間の低酸素虚血負荷を施行した。その後、クランプの除去と30%酸素での蘇生を行い、プロポホル麻酔を中止した。

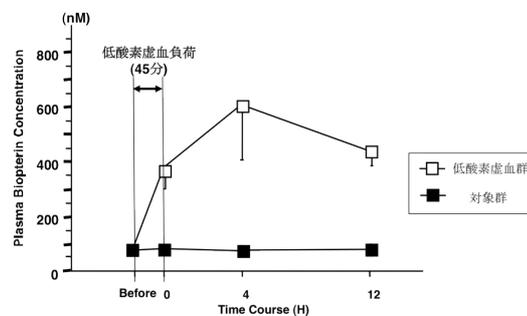
③. 第2回目のPETスキャンは低酸素虚血負荷から24時間後に初回と同様の方法で行った。

(2) 動脈血ガス分析はiSTAT (iSTAT corp. East Windsor, NJ)を、組織NO濃度の測定はCayman Kit (Alexis Corp., San Diego, CA)を用いて行った。血液および組織ビオプテリン濃度は、酸性条件下でヨード酸化を行い高速液体クロマトグラフィーを用いて蛍光検出器で測定した。

4. 研究成果

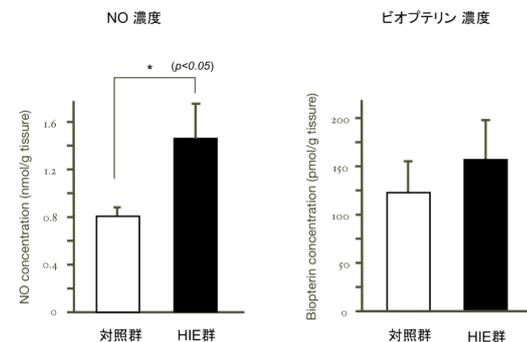
(1) 血清BH4濃度は、重症HIE群では負荷直後より5倍、負荷後4時間で8倍に上昇し、その後漸減した。しかし、脳内のBH4濃度は増加しなかった。(図3)

図3. 低酸素虚血後の血漿中ビオプテリン濃度



(2) 脳内NO濃度はHIE群では対象群と比較して有意に上昇していたが脳内Bipterin濃度は有意な上昇は認められなかった。(図4)

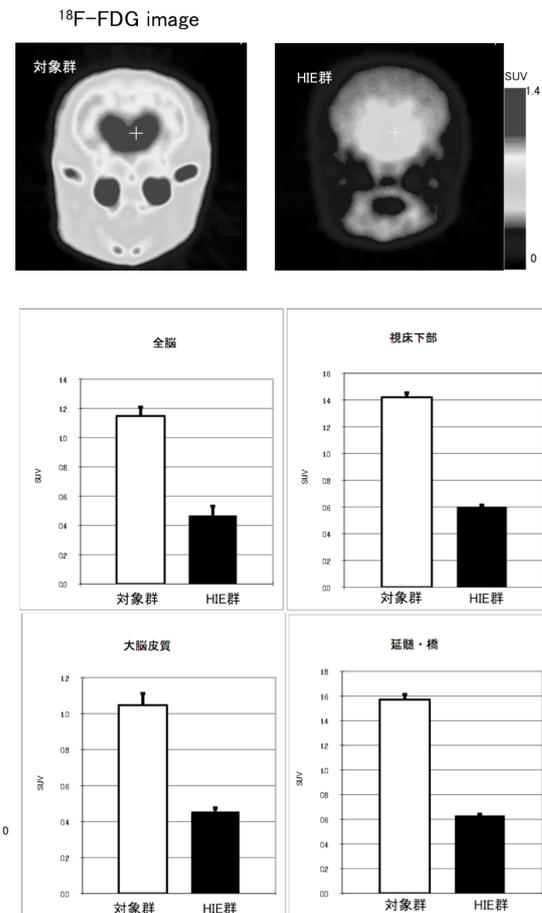
図4. 負荷24時間後の大脳皮質中NO濃度とビオプテリン濃度



(3) microPETによる18F-FDGの取り込み画像から算出した脳内SUVでは、低酸素虚血群はコントロール群に比べて全脳、視床、大脳皮質、延髄・橋の各部位で糖の取り込みが低下していた(図5)。新生仔豚HIEモデルでの受傷後急性期の変化はmicroPETの画像で

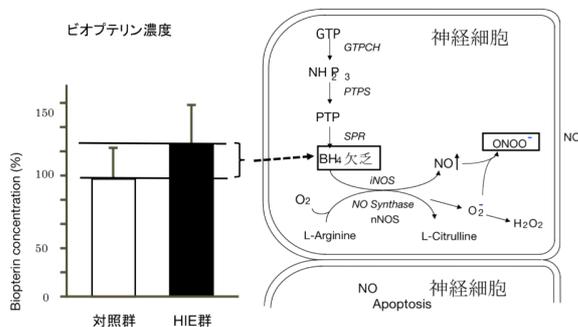
FDG の取り込みの減少として認められた。

図 5. microPET による 18F-FDG の取り込み



(3) 新生仔豚 HIE モデルでの受傷後急性期の変化は microPET の画像で FDG の取り込みの減少として認められた。新生仔豚の脳では低酸素虚血刺激により iNOS の出現が認められたが BH4 の増加が認められず、iNOS により産生された NO が ONOO⁻ となり組織障害性に働いたと考えられた。(図 6)

図6. 負荷24時間後のiNOSの誘導と大脳皮質中ピオプテリン濃度



(4) BH4 を静脈内に 1 時間当たり 1mg/kg の割合でコントロール群と HIE 群に 4 時間投与したところコントロール群では脳内のピオプテリン値に変化はなかったが、HIE 群では脳内のピオプテリン値に有意の上昇を認めた。従来、脳に対する BH4 補充療法は脳血液関門に阻まれ無効と考えられていたが、今回の実験で HIE 群では脳血液関門を通過して BH4 が脳内に移行するため BH4 の補充療法が有効である可能性が示唆された。これまで一般に不可能と考えられていた脳内の BH4 が低下している患者の脳に外部から BH4 を投与し補充する治療法は、今回の研究から HIE の患者では BH4 が容易に脳血液関門を通過するため BH4 の補充療法が可能であることを示したもので非常に重要な成果が得られた。

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 4 件)

- ① 藤岡弘季, 二宮英一, 久恒さえり, 斉藤三佳, 新宅治夫: 新生児の低酸素虚血における NMDA 受容体阻害剤の生化学的影響 新生仔ブタモデルを用いた検討: 日本周産期・新生児医学会雑誌、査読無、46 巻、2 号、2010、537
- ② Fujioka H, Shintaku H, Yamano Y: Plasma phenylalanine level in dopa-responsive dystonia. Movement Disorders. 査読有 vol. 24, No. 15, 2009, 2289-2290
- ③ 新宅治夫, 藤岡弘季, 横井俊明, 斉藤三佳, 山野恒一: 低酸素性虚血性脳症の新生仔ブタモデルにおける FDGmicroPET を用いた画像解析、日本周産期・新生児医学会雑誌、査読有、45 巻、4 号、2009、1192-1195、
- ④ Fujioka H, Shintaku H, Nakanishi H, Kim TJ, Kusuda S, Yamano T: Biopterin in the acute phase of hypoxia-ischemia in a neonatal pig model. Brain Dev. 査読有 vol. 30, No. 1, 2008, 1-6.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Hiroki Fujioka: The effects of excitotoxicity with hypoxic-ischemic encephalopathy. 第 4 回神経学の論争 (CONy), (バルセロナ) 2010. 10. 28-31
- ② 新宅治夫: 低酸素性虚血性脳症新生仔豚モデルを用いた BH4 と FDG microPET 画像の変化、第 3 回 JPC/JCNRA 合同プレリジン研究発表会 2009. 7. 21 (東京)
- ③ Shintaku H: Level of Tetrahydrobiopterin, Expression of Nitric Oxide Synthase and microPET imaging with FDG in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal pigs. 第 14 回国際プレリジン・葉酸学会 2009. 6. 7-12 (チェジュ)

- ④ 新宅治夫：新生児低酸素性虚血性脳症における脳内一酸化窒素合成酵素（NOS）発現と補酵素ビオプテリン濃度の変化-新生仔ブタモデルを用いた検討-、第53回日本未熟児新生児学会、2008.10.30-11.1、(札幌)
- ⑤ Shintaku H: Tetrahydrobiopterin, Nitric Oxide Synthase and FDG microPET in hypoxic ischemia in neonatal pigs、The 2nd World Congress on Controversies in Neurology, 2008.10.23-26, (Athens, Greece)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新宅 治夫 (SHINTAKU HARUO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：00206319

(2) 研究分担者

山野 恒一 (YAMANO TSUNEKAZU)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：20093172
藤岡 弘季 (FUJIOKA HIROKI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医
研究者番号：70382083
塩見 進 (SHIOMI SUSUMU)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30170848
山口 悦子 (YAMAGUCHI ETSUKO)
大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講
師
研究者番号：60369684

(3) 連携研究者

渡辺 恭良 (WATANABE YASUYOSHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40144399
野崎 聡 (NOZAKI SATOSHI)
独立行政法人・理化学研究所・研究員
研究者番号：10419707