

平成 22 年 6 月 11 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間： 2008 ～ 2009

課題番号：20791143

研究課題名（和文） 新生児脳障害の新しい予防法

研究課題名（英文） New prophylactic strategy for neonatal brain injury

研究代表者 味村 和哉（MIMURA KAZUYA）

地方独立行政法人大阪府立病院機構・大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)免疫部門・
研究員

研究者番号：50437422

研究成果の概要（和文）：新生仔ラットの腹腔内にセフトリアキソンを生後2日目から5日間投与すると、生後7日目にグルタミントランスポーター1（GLT1）蛋白レベルは約40%増加した。また、同じプレコンディショニング後、生後7日目のラットに低酸素虚血を加え、1週間後に脳障害の程度および副作用の有無を確認したところ、約40%の脳梗塞量の減少を認め、明らかな副作用は認めなかった。出生前のセフトリアキソン治療は新生児脳障害に対する新しい予防法になる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：The neonatal rats were pretreated with ceftriaxone intraperitoneally for 5 consecutive days starting from postnatal day 2 (P2), and glutamate transporter 1 (GLT1) protein level in the P7 rat brain was enhanced up to about 40%. After the same preconditioning, the P7 rats underwent hypoxic-ischemic procedure. One week later, neuronal damage and possible neurotoxicity were examined. Repeated ceftriaxone injections reduced infarcted volume up to about 40% without histological neurotoxicity. Antenatal ceftriaxone therapy may become a new prophylactic strategy to reduce neonatal brain injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：未熟脳、新生児低酸素性虚血性脳症、プレコンディショニング、グルタミン酸、GLT1、 β -ラクタム抗生剤、Ceftriaxone

1. 研究開始当初の背景

周産期医療の進歩によって早産児や低出生体重児の救命率や予後は飛躍的に改善されているが、その一方で極小未熟児や新生児仮死などに伴う周産期脳障害は、依然として脳性麻痺、精神発達遅延、知能障害、てんかん発作といった障害の主な原因となっている。しかし、これまでのところ周産期脳障害に対して有効な治療法も予防法も開発されておらず、ここ 50 年間周産期脳障害の発生率が減少していない。

脳障害発生の初期に働く興奮性アミノ酸であるグルタミン酸をプレコンディショニングで減少させることに、脳保護の可能性が期待されている。最近、 β -ラクタム抗生剤（セフトリアキソン）を投与することでラットの神経組織において、脳におけるグルタミン酸再吸収の 95%を担っているグルタミントランスポーター 1（GLT1）蛋白発現を 3 倍にしたと報告された。このことはセフトリアキソンが脳保護効果に可能性があることを示唆している。また、セフトリアキソンを成人ラットに 5 日間投与し、このラットの中大脳動脈閉塞後 24 時間の脳梗塞量を測定したところ、セフトリアキソン治療群では 58%の梗塞量の減少を認めたと報告された。このようにセフトリアキソンは神経保護に大きな期待が寄せられている。

2. 研究の目的

我々は、身近にある β -ラクタム抗生剤（セフトリアキソン）が、周産期脳障害の有効な予防法にならないかと大きな期待を持った。前述のように、成熟脳におけるセフトリア

キシソンの脳保護作用は報告されているが、未熟脳においては *in vitro* においても、*in vivo* においても検討は未だ充分にはなされていない。よって以下について検討し、明らかにした。

（1）*in vivo*における検討：新生児ラットにセフトリアキソンを投与することで実際にGLT1蛋白の発現が増加するかを調べる。

（2）*in vitro*における検討：セフトリアキソンを投与された新生児ラットに低酸素虚血を人為的に加えることで、セフトリアキソンを投与されなかったラットと比べて脳梗塞量が減少するかを調べる。

（3）また、セフトリアキソンがGLT1を増加させること自体に神経毒性がないか副作用に関しても調べる。

3. 研究の方法

（1）セフトリアキソンが新生児ラット脳組織におけるGLT1発現への影響

（実験動物）ヒト正期産児の脳と成熟度が一致するとされている、生後7日前後のラット新生仔を用いた。オスラット、体重100~120gに限った。

（セフトリアキソン投与）生後2日から6日の5日間、ラットの腹腔内にセフトリアキソン200mg/kg/dayを投与し、セフトリアキソンがラットに与える影響をコントロールと比較検討した。

（実験方法）GLT1蛋白の同定は、生後7日において新生仔の脳を摘出した後、摘出脳を超遠心機にて細胞分画別に分離させた後、抗GLT1抗体とhorseradish peroxidaseを接合させた二次抗体を用いてwestern blotting

により行った。

(2) 低酸素虚血性脳症モデルでの脳梗塞量への影響

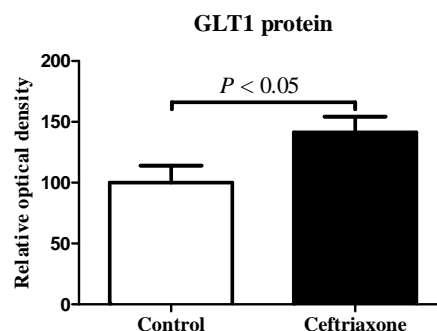
(ラット新生仔低酸素虚血性脳症モデルの作成) 前述のラットを用いて、現在一般的に用いられているラット新生仔低酸素虚血性脳症モデルを用いた。すべての新生仔ラットをハロセンで麻酔下に左総頸動脈を結紮した。手術終了後チャンバーに新生仔を入れ、8%酸素(8%O₂ in N₂)の低酸素に1時間暴露した。その間、水温が37℃になるように調節した恒温水槽にチャンバーを浮かべ正常体温を維持できるようにした。暴露後、母獣のもとに返した。低酸素暴露後、7日に新生仔の脳を摘出した後、固定包埋の上切片を作成し、H-E染色およびインタクトニューロンのマーカーである microtubule-associated protein-2 (MAP-2)の免疫組織染色を行い脳梗塞量を定量化した。

(3) セフトリアキソンが新生児ラット脳組織に与える副作用

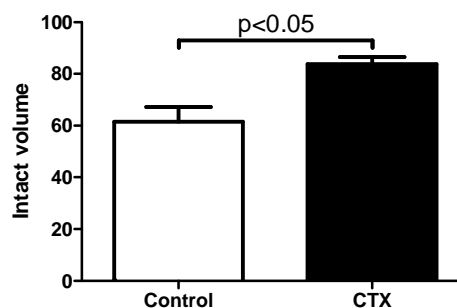
セフトリアキソンを投与後、低酸素虚血を加えず、7日後に脳を摘出し、H-E染色およびMAP-2の免疫組織染色を行い、皮質および歯状回における生細胞数を数えた。

4. 研究成果

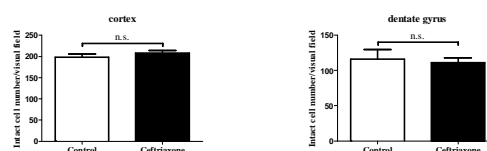
(1) GLT1タンパクレベルをウェスタンブロッティングで確認したところ、セフトリアキソン投与群ではコントロール群に比べて約41%増加していた。



(2) 低酸素虚血を加えてから7日後の脳における脳梗塞量はセフトリアキソン投与群ではコントロール群に比べて約40%改善していた。



(3) セフトリアキソンによる副作用を調べるために皮質や歯状回における生細胞数を数えたがコントロール群に比べて有意な差は認めなかった。



今回、未熟脳においては成熟脳と虚血低酸素に対する反応が異なる為、未熟脳においてセフトリアキソンの効果を調べることは重要であった。

また成人での脳梗塞は発症時期が予測できない為、プレコンディショニングを行う時期を決めにくい、新生児においてはある程度分娩時期が予測される為、プレコンディショニングをあらかじめ行うことができる。例えば、早産時期の破水例では予防的に抗生剤投

与を行うことがあるが、この際に母体にセフトリアキソンを投与することで経胎盤的に速やかに胎児に移行し効果を発揮することができる。本研究では予備的ではあるものの、このような臨床応用の可能性も期待できる結果であった。

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)

[学会発表](計1件)

味村 和哉、-ラクタム抗生剤でのプレコ
ンディショニングによる新生児脳障害予防
の可能性、第45回 日本周産期・新生児医学
会、2009年7月14日、名古屋国際会議場(愛
知県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

味村 和哉 (MIMURA KAZUYA)

地方独立行政法人大阪府立病院機構・

大阪府立母子保健総合医療センター(研究
所)免疫部門・研究員

研究者番号：50437422

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：