

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月13日現在

機関番号：	15501
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011~2012
課題番号：	23791603
研究課題名（和文）	マウス低酸素虚血による脳性麻痺モデルにおける低体温療法の効果の検討
研究課題名（英文）	The effect of hypothermia therapy on cortical laminar disruption following ischemic injury in neonatal mice
研究代表者	
	木田 裕之 (KIDA HIROYUKI)
	山口大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：	70432739

### 研究成果の概要（和文）：

本研究では新生児期・低酸素虚血障害マウスモデルを用いて低体温療法の効果について検討した。出生3日後マウスの右総頸動脈を結紮して低酸素環境下（酸素6%、30分間）に置いた後、右半球低酸素虚血性脳障害を起こさせた。手術後、マウスを2群に分け常温又は低体温下に置いた（24時間）。常温群では虚血側半球において、深層部位に皮質層状壊死および髄鞘形成不全が観察された。低体温処置群では組織学的にも行動学的にもこれらの症状を改善した。

### 研究成果の概要（英文）：

Cerebral ischemia was induced in P3 mice with a right common carotid artery ligation followed by hypoxia (6% O<sub>2</sub>, 37 ° C) for 30 min. Immediately after hypoxic ischemia, mice were exposed to hypothermia or normothermia for 24 h. The laminar structure of the cortex was examined with immunohistochemistry (Cux1/Ctip2); the number of neurons was counted; and the expression of myelin basic protein (MBP) was determined.

The hypothermia treatment was associated with improved neurological outcomes in the behavioral test. In the normothermia group, histological analyses indicated reduced numbers of neurons, reduced cortical laminar thickness in the deep, ischemic cortical layers, and significant reduction in MBP expression in the ischemic cortex compared to the contralateral cortex. In the hypothermia group, no reductions were noted in deep cortical layer thickness and in MBP expression in the ischemic cortex compared to the contralateral cortex. Our findings may provide a basis for testing hypothermal therapies in patients with cerebral palsy induced by hypoxic ischemia in the preterm period.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学、脳神経外科学

キーワード：脳性麻痺、低酸素虚血、低体温療法

#### 1. 研究開始当初の背景

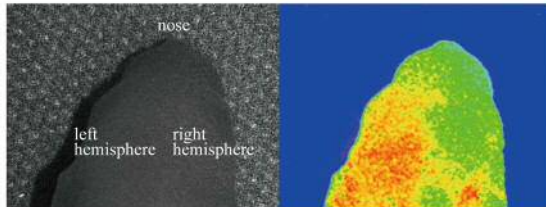
脳性麻痺に罹患した新生児の多くは運動障害をはじめとする後遺症を残す。これまで低体温療法は脳機能の保護に効果があると考えられてきたが、新生児を対象とした基礎研究はあまり知られていない。

#### 2. 研究の目的

我々は新生児期・低酸素虚血障害マウスモデルを用いて低体温療法の効果について検討した。

### 3. 研究の方法

出生2-3日後 ICR マウスの右総頸動脈を結紮して低酸素環境下(酸素6%, 30分間)に置いた後、右半球低酸素虚血性脳障害を起こさせた。手術後にはレーザー脳血流計によって脳血流の減少を確認し、マウスを2群に分け常温(37°C)又は低体温(32°C)下に置いた(24時間)(図1)。

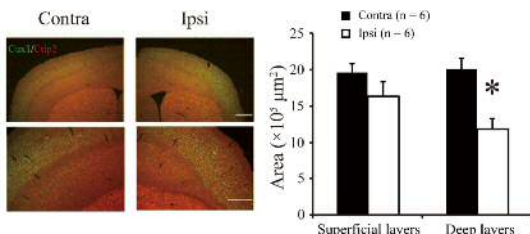


(図1)

P4, P7, 5週齢時において灌流固定後の脳から薄切を作成し1) Cux1/Ctip2 免疫組織染色による大脳皮質の層構造、2) NeuN 陽性細胞数、3) ミエリン塩基性タンパク(Myelin basic protein; MBP) 染色による形態学的観察および4週齢時において運動機能評価実験を実施した。

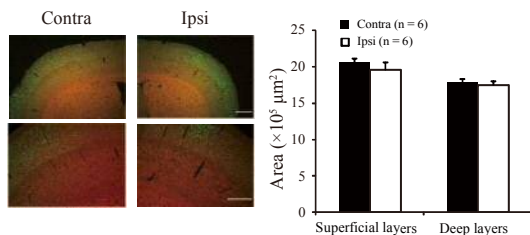
### 4. 研究成果

常温群において、障害マウスの虚血側深層(Ctip2 陽性)の面積は健常側に比べて有意に減少していた(健常側、 $1.90 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ; 虚血側、 $1.13 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 、Wilcoxon test、 $P < 0.05$ )(図2)。



(図2)

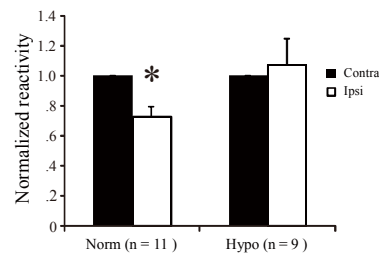
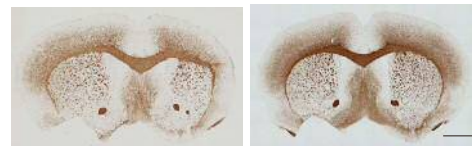
一方で低体温群では、このような深層部位の皮質層状壊死は改善された(健常側、 $1.80 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ ; 虚血側、 $1.75 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ 、Wilcoxon test、 $P < 0.05$ )(図3)。



(図3)

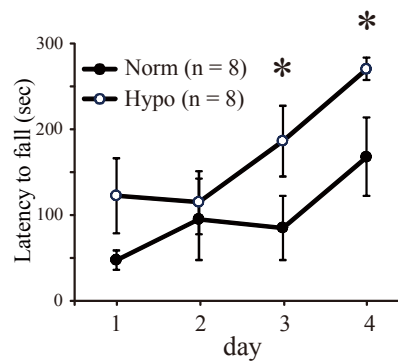
また常温群では、大脳皮質におけるMBP陽性部位は健常側半球よりも27%減少していたが(図4左)、低体温群はそれを改善し、髄鞘形成を保護した(図4右)。

<常温群> <低体温群>



(図4)

さらに低体温処置群はローターロッド試験においても有意な改善を示した(図5)。



(図5)

生後2-3日目のげっ歯類はヒトにおいては妊娠中期胎児(36週以前)に相当するため、脳低温療法は早期新生児への脳性麻痺治療につながると考えられる。

### 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5件)

① Kida H, Nomura S, Shinoyama M, Ideguchi M, Owada Y and Suzuki M.

The effect of hypothermia therapy on cortical laminar disruption following ischemic injury in neonatal mice. PLOS ONE. 2013 (In press). 査読有

②Tokiwa T, Inoue T, Fujii M, Ishizuka S, Aou S, Kida H, Maruta Y, Yamakawa T, Nomura S, Suzuki M, Yamakawa T.

Penicillin-induced epileptiform activity elevates focal brain temperature in anesthetized rats. *Neurosci Res.* 2013 (In press). 査読有  
doi:10.1016/j.neures.2013.05.001. [Epub ahead of print]

③He Y, Fujii M, Inoue T, Nomura S, Maruta Y, Oka F, Shirao S, Owada Y, Kida H, Kunitsugu I, Yamakawa T, Tokiwa T, Yamakawa T, Suzuki M.

Neuroprotective effects of focal brain cooling on photochemically-induced cerebral infarction in rats: analysis from a neurophysiological perspective. *Brain Res.* 2013. 25:1553-60. 査読有  
doi:10.1016/j.brainres.2012.11.041. Epub 2012 Dec 23.

④Kida H, Fujii M, Inoue T, He Y, Maruta Y, Nomura S, Taniguchi K, Ichikawa T, Saito T, Yamakawa T, Suzuki M. *Clin.*

Focal brain cooling terminates the faster frequency components of epileptic discharges induced by penicillin G in anesthetized rats. *Clinical Neurophysiol.* 2012. Sep;123(9):1708-13. 査読有  
doi:10.1016/j.clinph.2012.02.074. Epub 2012 Mar 27.

⑤Nomura S, Kagawa Y, Kida H, Maruta Y, Imoto H, Fujii M, Suzuki M. Effects of intrathecal baclofen therapy on motor and cognitive functions in a rat model of cerebral palsy. *J Neurosurg Pediatr.* 2012. Feb;9(2):209-15. 査読有  
doi:10.3171/2011.10.PEDS11209.

[学会発表] (計9件)

①Hiroyuki Kida, Sadahiro Nomura, Mizuya Shinoyama, Makoto Ideguchi, Yuji Owada and Michiyasu Suzuki.

The effect of hypothermia on the laminar disruption and neural injury in neonatal mice following ischemic injury. 42th. *Soc Neurosci*, 2012. 10.13-17, New Orleans, USA

②賀業靈、藤井正美、井上貴雄、野村貞宏、木田裕之、丸田雄一、国次一郎、山川烈、鈴木倫保

Focal brain cooling suppresses periodic epileptiform discharges and lessens brain injury after focal cerebral ischemia in rats, 第46回日本てんかん学会(JES2012),

2012. 10. 11-12, 都市センターホテル (東京)

③木田裕之、野村貞宏、篠山瑞也、出口誠、大和田祐二、鈴木倫保

新生児低酸素虚血障害による低体温療法の効果の検討, 第35回日本神経科学会, 2012. 9. 18-20, 名古屋国際会議場 (名古屋)

④松井智浩、伊波琢也、小原旅人、木田裕之、野村貞宏、鈴木倫保

低酸素性虚血脳障害由来マイクログリアの炎症性および抗炎症性サイトカイン産生に及ぼす軽度低温の影響, 第15回日本脳低温療法学会, 2012. 7. 6-7, 横浜シンポジア (横浜)

⑤Takao Inoue, Masami Fujii, Tatsuji Tokiwa, Yuichi Maruta, Hiroyuki Kida, Yeting He, Toshitaka Yamakawa, Hirochika Imoto, Sadahiro Nomura, Kenichi Hirano, Masanori Niiyama, Hiromi Yamazaki, Yuji Owada, Takeshi Yamakawa, and Michiyasu Suzuki

Challenges and Opportunities for development of a focal cooling device for intractable epilepsy. Korean Epilepsy Congress (KEC2012), 2012. 6. 7-9, Songdo Convensia, Incheon, Korea

⑥木田裕之、藤井正美、井上貴雄、賀業靈、丸田雄一、野村貞宏、谷口和博、市川琢也、斉藤俊、山川烈、鈴木倫保

てんかんモデルラットにおける局所脳冷却の脳波周波数解析, 第6回日本てんかん学会中国・四国地方大会, 2012. 2. 11, 高知市文化プラザかるぽーと (高知)

⑦Kazuhiro Taniguchi, Takuya Ichikawa, Hiroyuki Kida, Masami Fujii, Takao Inoue, Yeting He, Yuichi Maruta, Sadahiro Nomura, Michiyasu Suzuki, Takeshi Yamakawa, Takashi Saito

Frequency spectrum analysis of electroencephalograms during focal brain cooling in experimental neocortical seizures. 65th American Epilepsy Society Annual Meeting, 2011. 12. 3, Baltimore, USA

⑧Hiroyuki Kida, Masami Fujii, Takao Inoue, Yeting He, Yuichi Maruta, Sadahiro Nomura, Kazuhiro Taniguchi, Takuya Ichikawa, Takashi Saito, Takeshi Yamakawa, and Michiyasu Suzuki

The effect of focal brain cooling on epileptic discharges in rats: Frequency analysis of electroencephalography. The 2011 IEEE International Conference on

Systems, Man, and Cybernetics,  
2011.10.9-12, Alaska, USA

⑨Takao Inoue, Masami Fujii, Yeting He,  
Yuichi Maruta, Hiroyuki Kida, Sadahiro  
Nomura, Tatsuji Tokiwa, Toshitaka  
Yamakawa, Kenichi hirano, Masanori  
Niiyama, Hiromi Yamazaki, Takeshi  
Yamakawa, and Michiyasu Suzuki  
Development of a focal cerebral cooling  
system for the treatment of intractable  
epilepsy: An experimental study in cats  
and non-human primates. The 2011 IEEE  
International Conference on Systems, Man,  
and Cybernetics, 2011.10.9-12, Alaska,  
USA

[その他]

ホームページ

[http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seiri2/  
index.html](http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~seiri2/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

木田 裕之 (KIDA HIROYUKI)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70432739