

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：34412

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590305

研究課題名(和文) 高体温新生児虚血脳障害動物モデルの運動能力・知能と脳ダメージの時系列的評価

研究課題名(英文) Serial estimation of behavioral capacity and brain damages of rat models of neonatal hyperthermic hypoxic-ischemic encephalopathy

研究代表者

細野 剛良 (Hosono, Takayoshi)

大阪電気通信大学・医療福祉工学部・教授

研究者番号：60294104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：知能・運動能力の遅滞を来す新生児高体温低酸素虚血脳障害の動物モデルの確立を目的に、モデルの知能・運動能力を時系列的に評価した。麻酔下に日齢7のラットの左総頸動脈結紮後、酸素8%・環境温40℃・15分の負荷を与えた。成長後、ステップダウン型受動回避テストにより嫌悪体験回避時間を、ロータロッドテストにより回転ロッド滞在時間を測定した。行動実験後に解剖学的に障害側大脳半球幅と組織学的に障害側海馬CA1領域面積を測定した。行動実験では、モデル群においては行動試験の成績が有意に悪化し、大脳半球幅や海馬面積の縮小がみられ、ラット・モデルの作成・評価する方法を確立できた。最終成果は国際学術誌に投稿中である。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a rat model of human neonatal hyperthermic hypoxic-ischemic encephalopathy (HIE), a left carotid artery of 7-day-old Wistar rat was ligated under anesthesia. After 1-h recovery, the rat was exposed to 8% oxygen at an ambient temperature of 40 degree for 15 min. After growth, retention time of rats to avoid disgust shocks was measured by employing step-down passive avoidance test. Duration of rats to stay on rotating rod was also estimated by Rotarod test. After the behavioral tests, the rat brains were removed under deep anesthesia and the largest width of cerebrum hemispheres was measured. The area of CA1 hippocampus was also measured using preparation specimen of the brain.

The results of the behavioral tests were significantly worse in the HIE models than in the control. The largest width of cerebrum hemispheres and the CA1 area of the HIE models were smaller than those of the control. The neonatal hyperthermic HIE rat models were successfully established.

研究分野：温熱生理学

キーワード：新生児低酸素虚血脳障害 高体温 ラット 運動能力 知能 時系列

1. 研究開始当初の背景

(1) 新生児低酸素虚血脳障害

新生児に発症し生涯続く知能・運動能力の遅滞を来す低酸素虚血脳障害(HIE)の治療は「罹患者が健常人と同等の社会生活を送る」ことを目的とする。

新生児 HIE の発症時に母体の核心温が高い場合、症状はより重症になることが後方視検討により明らかになっている。母体核心温は胎児にとっての環境温度であるので、高環境温度下の HIE (高体温 HIE) は症状を重症化させる。

(2) HIE の動物モデル

ヒトの新生児 HIE の実験的研究は不可能であるので、新生児 HIE 動物モデルの運動・知能の研究が重要である。その中でも(1) の高体温新生児 HIE モデルの研究は極めて少ない。

HIE モデルの評価について、従来の研究は生化学的・組織学的検討が中心であり行動学的検討は稀であった。特に成長中・成長後の時系列にあわせた行動学的検討は皆無である。

2. 研究の目的

新生児に発症し生涯続く知能・運動能力の遅滞を来す新生児高体温 HIE の動物モデルを用いて、その成長に併せた時系列的な行動実験を行い、ヒト新生児 HIE の治療法の開発に有用なモデルと評価手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新生児 HIE モデルの作成

日齢 7 の Wistar 新生児ラットの左総頸動脈の剥離・結紮・切断後、8%酸素・環境温 40 のもとに 15 分おき、新生児 HIE モデルを作成した。

(2) 行動テスト

以下の行動テストを成長にあわせて時系列に実施した。

傾斜板テスト

幅 20cm 長さ 30cm 厚さ 1cm の木板を 30° の傾斜をつけて固定し、3 週齢ラットを頭部が下になるように置いた。その行動の様子を記録し、体軸方向が頭が上に転回する時間を測定した。

懸垂棒テスト

高さ 60cm の架台上面に直径 4mm の鋼製棒(懸垂棒)を水平に張り出して固定した。HIE モデル・ラットの前肢を掛けて懸垂させ、落下するまでの時間を記録した。

ロータロッドテスト

回転ロータにラットを載せると、ラットは落ちないようにロータ上を歩行する。3 日間にわたって回転するロータ上にラットを置き、ラットがロータから落下するまでの時間を測定した

ステップダウン型受動回避テスト。

30cm 立方の金属格子床の箱の底面中央に

円形の絶縁マットを置いた。獲得期にはマットからラットが床に下りて金属格子に四肢をつけた後に電撃(嫌悪体験学習)を与えた。翌日より、1日1回絶縁マット上にラットを置き、ラットがマットから金属格子に下りるまでの時間を測定した。

(3) 解剖学的検討・組織学的検討

行動実験完了後に深麻酔下に脳を灌流・抽出し、大脳半球の最大径を測定した。ついで、パラフィン包埋組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色、および、クリューバー・バレラ染色を実施し、海馬 CA1 領域の面積を評価した。

(4) 倫理的側面

本研究は、大阪電気通信大学生体倫理委員会の審議・承認の上、実施した。使用する動物数は極力減らすよう努力した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

1) 新生児高体温 HIE モデルの確立

日齢 7・Wistar 新生児ラットの左総頸動脈の結紮切断、8%酸素・環境温 40 の下に 15 分置いて、モデルを確立した。低酸素負荷時間が 20 分を越えるとモデルの生存に困難を生じ、15 分が至適であることを明らかにできた。

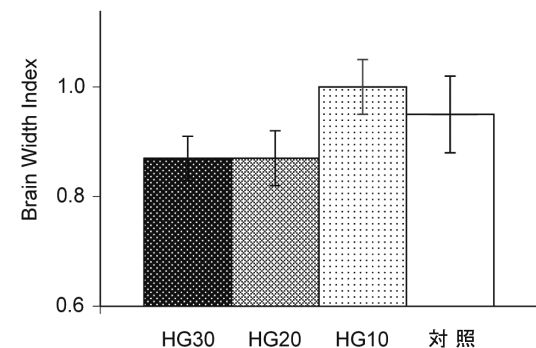


図1 Brain width index

(HG:高体温低酸素虚血脳障害モデル群、HG30:負荷 30 分、HG20:負荷 20 分、HG10:負荷 10 分、HG5:負荷 5 分を対照とした。)

2) 行動テスト(主たる成績を得た順に記載)

ロータロッドテスト

8 週齢の高体温 HIE モデルと対照群について、ロータロッド上の滞在時間は測定初日 (Day1) には有意差はないが、Day3 には HIE 群の滞在時間は対照群よりも有意に短縮した(投稿中)。

ステップダウン型受動回避テスト

6 週齢および 9 週齢にテストを行った。9 週齢では、獲得期翌日の Day1 には、対照群の絶縁マット滞在時間は HIE 群のそれよりも有意に長かった。Day2 には、HIE 群と対照群の間に有意差を認めなかった(投稿中)。6 週齢には HIE 群と対照群の間に有意差はなかった。

その他の行動テスト

)懸垂テスト

3週齢のHIE群の懸垂時間はDay5にて、対照群よりも有意に短かった(図1)。

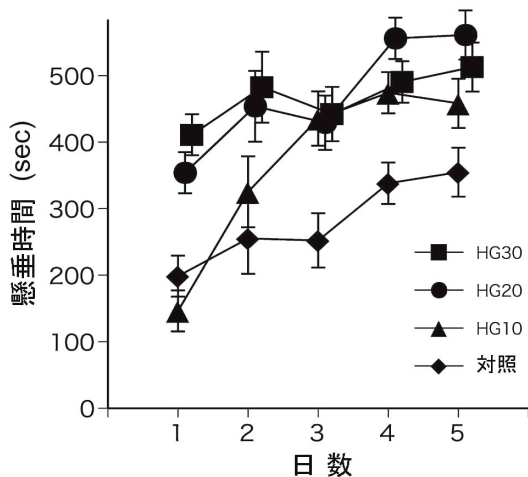


図2 懸垂テスト

(HG:高体温低酸素虚血脳障害モデル群、HG30:負荷30分、HG20:負荷20分、HG10:負荷10分、HG5:負荷5分を対照とした。)

)傾斜板テスト

頭部の転回時間やそのパターンに各群間の差異は認めなかった。

3)解剖学的評価、組織学評価

解剖学的評価

右側(対照側)の大脳半球最大径に対する左側(結紮側)の大脳半球最大径の比(Brain Width Index, BWI)を測定した。HIE群のBWIは対照群のBWIよりも有意に小さかった(投稿中)。

組織学的評価

HIE群の海馬CA1領域の面積は、対照群の海馬CA1領域の面積よりも有意に小さかった(投稿中)。

(2)得られた成果の国内外における位置付け

論文投稿・国際学会・国内学会の発表を通じて、本研究によって得られた知見の報告を行った。

新生仔高体温HIEモデルの作成法の詳細

新生仔高体温HIEモデルを確立し、その作成に要する条件の詳細を明らかにした。それらについて、解剖学および組織学的手法によって、低酸素虚血負荷側の脳の縮小が生じることを示した。

新生仔高体温HIEモデルの機能異常の評価

新生仔高体温HIEモデル動物の運動能力・知能を、実施容易なロータロッドテストおよびステップダウン型受動回避テストによって生存したまま評価できることを示した。幼若時には懸垂テストに有用性のある可能性を示した。

国内外における位置づけ

近年、新生児HIEに対する脳あるいは全身

の低温療法の有用性が知られ、次項に示すように、長期予後も明らかになりつつある。また、世界的にも、新生児蘇生法の国際的な標準としてILCOR 2010 CoSTRに脳低温療法が推奨されている。本研究の成果は、ヒト新生児HIEの病態解明、あるいは、脳低温療法の詳細に関して、ヒトでは実施できない実験的研究や治療法に関する有用な動物モデルの提供につながる。

(3)今後の展望

ヒトの新生児HIEの発症後、核心温33.5(72hr)の脳低温療法を実施した児の長期予後が報告された。18~22ヶ月時の予後について、脳低温療法群の方が対照に比して生命予後は良いが機能的予後には差はなかった(Shankaran, New Engl Med J, 2012)。しかし、同様の脳低温療法の6-7才時点の予後の最近の報告では、生命予後には差はなかったが、脳性麻痺の発症率は脳低温療法群で有意に低下した(Azzopardi, New Engl Med J, 2014)。このように、脳低温療法はヒト新生児HIEの治療法として有用性があるが、成績の報告間で矛盾があるなど、その詳細はいまだ不明である。

ヒトを対象とする検討の場合には、その成績の評価に長い経過時間を必要とする。しかし、成長の早いラット・モデルの場合には短時間で評価が可能である。本研究の成果の展開として、HIEモデルの低酸素負荷の後に、モデルの頭部の冷却を行うことによって、ヒト新生児HIEに用いられる脳低温療法のシミュレーションを行うことが挙げられる。様々なパラメータの検討などを迅速に行い、臨床現場にフィードバックして治療成績を上げることに応用することが期待できる。

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1件)

(投稿中) Nishimura Y, Hosono T. Effects of 3-h hypothermia after neonatal hyperthermic hypoxic-ischemic encephalopathy in rat models on behavioral prognosis, and anatomical and histological features after growth. Journal of Maternal Fetal & Neonatal Medicine. (査読あり)

[学会発表](計8件)

西村友香子, 細野剛良. ラット新生仔高体温低酸素虚血性脳症に対する成長後の学習能力と脳低温療法の効果. 第67回日本産科婦人科学会学術講演会. 2015/4/9-12、横浜市(パシフィコ横浜)。

Hosono T, Nishimura Y, Ishida M, Arakawa M, Nakamoto M, Akasaka K. Motor performance of rat models after neonatal

hypoxic ischemic encephalopathy with different periods of brain insult assessed using Rotarod and traction tests. The 20th World Congress on Controversies in Obstetrics, Gynecology & Infertility. 2014/12/4-7, Paris (Marriott Rive Gauche Hotel & Conference Centre), France.

Nishimura Y, Minato K, Hosono T. Effect of hyperthermia on motor function of adult rats after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. FENS Forum 2014. 2014/7/5-9, Milano (Milano Congressi), Italy.

Hosono T, Nishimura Y, Arakawa M, Nakamoto M, Akasaka K, Minato K. Effects of duration of hyperthermic hypoxia on neonatal rats based on motor function and immunohistochemical staining after growth. FENS Forum 2014. 2014/7/5-9, Milano (Milano Congressi), Italy.

Nishimura Y, Hosono T. Effect of hyperthermia on adult rats after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy on learning ability. 第91回日本生理学会大会. 2014/3/16-18, 鹿児島市(鹿児島大学).

Hosono T, Yamamoto M, Igi C, Akasaka K, Arakawa M, Nakamoto M, Minato K. Effects of duration of hyperthermic hypoxia on neonatal rats assessed after growth by behavior. 37th International Congress of Physiological Sciences. 2013/7/21-26. Birmingham (International Convention Centre), UK.

Hosono T, Iseki T, Hada T, Akasaka K, Yamamoto M, Igi C, Arakawa M, Nakamoto M, Nishimura Y. Effects of ambient temperature on behavioral thermoregulation assessed by a simple experimental apparatus allowing alternating floor temperature changes. 第90回生理学会大会. 2013/3/27-29. 東京都(タワーホール船堀).

Hosono T, Nitta C, Yamamoto M, Igi C, Minato K. Behavioral effects during and after growth of rats administered betamethasone in immaturity. The XX FIGO World Congress of Gynecology & Obstetrics. 2012/10/7-12. Roma (Fiera di Roma), Italy.

〔その他〕

ホームページ等

[https://research.osakac.ac.jp/index.php?細野%
E3%80%80剛良](https://research.osakac.ac.jp/index.php?細野%E3%80%80剛良)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細野 剛良 (HOSONO TAKAYOSHI)

大阪電気通信大学・医療福祉工学部・教授

研究者番号：60294104