

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791299

研究課題名(和文) 生体イメージングによる胎生期放射線曝露モデル動物の中樞神経発達障害評価

研究課題名(英文) In-vivo Imaging of Brain Abnormalities Induced by Prenatal Exposure to Radiation in Rodents

研究代表者

齋藤 茂芳 (Saito, Shigeyoshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：40583068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期放射線曝露モデルの作成として、妊娠期のラット、マウスの全身放射線曝露実験の確立を行い、胎生期放射線曝露ラット、マウスモデルの作成を行った。胎生期放射線曝露ラットにおいて、白質体積の減少、脳容積の減少が確認された。テンソル画像において、FA値から線維組織の異方性の低下、カラーマップで白質神経線維密度の低下が観察された。Micro-CTを用いたCT画像では頭蓋骨形成の異常、三次元CT画像を用いて小頭症、水頭症における脳体積、脳室体積低下が観察された。小動物MRI、Micro-CTの両手法とも胎生期放射線曝露モデルの中樞神経評価に用いることができた。

研究成果の概要(英文)：We assessed brain abnormalities in mice and rats exposed prenatally to radiation (X-rays) using magnetic resonance imaging (MRI), Micro-CT and histological experiments. These animals were exposed to different radiation doses (0.5, 1.0, and 1.5 Gy). Brain abnormalities were assessed in neonatal male mice and rats. In vivo/Ex vivo T2-weighted imaging and diffusion tensor imaging (DTI) were performed using 11.7 T MRI. Decreased brain volume, increased ventricle volume, and thinner cortices were observed in irradiated rats and mice using MRI. However, no abnormalities in the cortical 6-layered structure were observed in radiation-exposed mice and rats. T2W and DTI and histological experiments are useful tools for assessing cortical and hippocampal abnormalities after prenatal exposure to radiation in mice and rats.

研究分野：放射線科学

科研費の分科・細目：若手B

キーワード：胎生期被ばく 放射線 生体イメージング マイクロCT 小動物MRI 組織染色

1. 研究開始当初の背景

ヒトを含め動物の胎仔は放射線に高い感受性を示す事もよく知られており、ヒトの受精卵は 0.1Gy の放射線照射線量が致死線量である (Blot WJ, J Radiat Res, 1975)。一方、胎生期の放射線曝露は、小頭症や水頭症などの様々な疾患を引き起こすとされ (Otake, Int J Radiat Biol, 1998)、胎生期放射線曝露ラットでは妊娠 15 日目、マウスでは妊娠 13 日目で中枢神経の奇形や障害が観察される (Hoshino, Teratology, 1988)。また、放射線照射後の胎仔では、海馬の萎縮や脳室の拡大も観察されている (Takai, J Radiat Res, 2004)。成体の齧歯類において、放射線照射後の中枢神経の障害はいくつか報告されているが (Munter, Radiology, 1999) (Chan, JMIRI, 2009)、胎生期の放射線曝露による中枢神経の血管系および微小血管の障害に関する研究は少ない (Saito, Radiat Res, 2011)。さらに、白質線維走行の異常、頭蓋骨の形成不全などを非侵襲的に評価した報告はなく、生体イメージング技術を用いた評価は申請者による高磁場 MRI を用いた研究があるのみである (Saito, Radiat Res, 2011) (Saito, NMR in Biomed, 2011)。先行研究での報告は、病理組織学による障害モデルの形態の変化を観察したもので主であり、胎生期の放射線曝露による中枢神経の障害をより詳細に検討すること、ならびに非侵襲的に評価することは、放射線照射による発生生物学的な疑問を理解することだけではなく、放射線関連事故後などの緊急の治療や診断に重要であると考えられる。また、2011 年 3 月に起きた東日本大震災後の福島原発の事故により、放射線に対する生体への影響に関して国民からの関心も大変高く、特に妊娠中の母体への影響を調べることは大変重要な課題であると思われる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、齧歯類において胎生期放射線曝露により出生後の胎仔脳に引き起こされる、脳血管、脳血管閉門、血液脳脊髄液閉門などの血管系の形態や機能異常、中枢神経系における脳梁や大脳白質線維などの中枢神経細胞障害、頭蓋骨などの骨の形成異常を動物用高磁場 MRI およびマイクロ CT を用いた複合的な生体イメージング技術により非侵襲的に評価し、胎生期の放射線曝露線量との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

胎生期放射線曝露モデルの作成

本研究では、胎生期の放射線曝露線量に依存し中枢神経の障害がどのように変わるかを評価することが一つの目的である。したがって、妊娠期のラット、マウスの全身放射線曝露実験の確立を行い、胎生期放射線曝露ラット、マウスモデルの安定した作成を行うことを第一の目的とした。まず、妊娠 15 日の

妊娠 SD ラット合計 9 匹に 0.5Gy (3 匹)、1.0Gy (3 匹)、1.5Gy (3 匹) の X 線 (本学動物実験施設所有、Rigaku 社製放射線照射装置、180Kvp、15mA、1.0mmAl filter、0.88Gy/min) を単回、全身照射した。また同様に、妊娠 13 日目の妊娠 C57/B6-j マウスに 0.5Gy、1.0Gy、1.5Gy の X 線を単回全身照射した。正常群には無処置の動物を用い、それぞれの妊娠ラット、妊娠マウスから生まれる新生仔を 3 週齢において 4 群各 9 匹合計ラット 36 匹 (正常群 9 匹、0.5Gy 群 9 匹、1.0Gy 群 9 匹、1.5Gy 群 9 匹)、マウス 36 匹 (正常群 9 匹、0.5Gy 群 9 匹、1.0Gy 群 9 匹、1.5Gy 群 9 匹) に分けた。

次に放射線曝露モデル動物に対して生体イメージングを用い、モデル動物の中枢神経障害の再現性を評価した。ラットやマウスなどの齧歯類が、生後 3 週齢前後で母親から離乳し生殖が可能であり、3 週齢で成体とみなされる (Krinke GJ. The laboratory rat. 2000)。生体イメージング技術での胎生期放射線曝露による脳への影響は、新生仔の齧歯類に対する麻酔管理の難しさや、体温管理の問題から、成体になる 3 週齢以降の齧歯類を用いて行った。

胎生期放射線曝露モデルの MRI 撮影

モデル動物の作成が確立した後、複合的な生体イメージング技術を用いて、中枢神経発達障害の評価を行った。MRI および CT 撮像は、3 週齢以降、8 週齢まで 11.7T 垂直型高磁場 MRI 装置 (本学生命機能研究科所有)、Micro-CT (本学医学科動物実験施設所有) を使用し撮影を行った。MRI 画像解析では、テンソル画像により白質神経線維の発達異常の評価を行った。そのほか、T2 強調画像で形態的な変化、血管系の評価として、脳の血管構築を評価するために MRA を用いて評価を行った。テンソル画像において、FA 値から線維組織の異方性を評価し、カラーマップでは視覚的に神経走行の異常を評価した。

胎生期放射線曝露モデルの CT 撮影

CT 画像解析では、骨画像を用いて頭蓋骨形成の異常、三次元 CT 画像を用いて小頭症、水頭症における脳体積、脳室体積変化の評価を行った。

胎生期放射線曝露モデルの組織染色による評価

撮影後のすべての個体に対し脳組織切片を作製し、HE 染色および免疫組織染色 (GFAP、IBA1、NCAM、LFB、SMI-32、GAP-43、Laminin) を行った。撮影後の組織染色により、HE 染色では脳神経細胞の密度評価、GFAP、IBA1 では脳内のグリア細胞の活性、NCAM 染色では海馬の帯状線維の評価、LFB、SMI-32、GAP-43 を用いて白質神経線維の走行、脳梁の異常を検出した。Laminin 免疫染色法を用いて、大脳皮質における血管内皮細胞密度の比較から

血管の障害評価を行った。組織染色は、出生後3週齢から8週齢までの固体をランダムに選び、週齢ごとの障害の変化を観察した。

4. 研究成果

胎生期の放射線曝露線量に依存した中枢神経障害の評価することが本研究の目的である。胎生期放射線曝露モデルの作成として、妊娠期のラット、マウスの全身放射線曝露実験の確立を行い、胎生期放射線曝露ラット、マウスモデルの作成を行った。妊娠15日の妊娠SDラット合計9匹に0.5Gy(3匹)、1.0Gy(3匹)、1.5Gy(3匹)のX線を単回、全身照射した。同様に、妊娠13日目の妊娠C57/B6-jマウスに0.5Gy、1.0Gy、1.5GyのX線を単回全身照射した。すべての放射線曝露動物から胎子が産まれることが確認された。したがって、胎生期放射線曝露モデルの作成において、1.5Gy以下での被ばく線量が適切だと思われる。その後、胎生期の放射線曝露モデル動物に対して生体イメージングを用い、モデル動物の中枢神経障害の再現性を評価した。MRIおよびCT撮像は、3週齢以降、8週齢まで11.7T垂直型高磁場MRI装置、Micro-CTを使用し撮影を行った。MRI画像解析では、テンソル画像により白質神経線維の発達異常の評価を行った。そのほか、T2強調画像で形態的な変化を評価をした。胎生期放射線曝露ラットにおいて、白質体積の減少、脳容積の減少が確認された。また、テンソル画像において、FA値から線維組織の異方性の低下、カラーマップで白質神経線維密度の低下が観察された。Micro-CTを用いたCT画像では頭蓋骨形成の異常、三次元CT画像を用いて小頭症、水頭症における脳体積、脳室体積低下が観察された。小動物MRI、Micro-CTの両手法とも胎生期放射線曝露モデルの中枢神経評価に用いることができた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10件)

1. Miwa Horiuchi-Hirose, Shigeyoshi Saito, Chika Sato, Junya Aoyama, Tetsuya Kobayashi and Kazuhiko Sawada. "Cerebral cortical hypoplasia with abnormal morphology of pyramidal neuron in growth-retarded mouse (grt/grt)", *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 2014, in press.
2. Jun-ichi Takanashi, Nobuhiro Nitta, Nobuaki Iwasaki, Shigeyoshi Saito, Ryuta Tanaka, A. James Barkovich, Ichio Aoki. "Neurochemistry in Shiverer Mouse Depicted on MR Spectroscopy", *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 2013 Nov 14. doi: 10.1002/jmri.24306.
3. Kazuhiko Sawada, Shigeyoshi Saito, Miwa Horiuchi-Hirose, Kenya Murase.

"Enhanced heat shock protein 25 immunoreactivity in cranial nerve motoneurons and their related fiber tracts in rats prenatally-exposed to X-irradiation", *Congenital Anomalies*, 2013, 2014 May;54(2):87-93. doi: 10.1111/cga.12028.

4. Kazuhiko Sawada, Miwa Horiuchi-Hirose, Shigeyoshi Saito and Ichio Aoki. "MRI-based morphometric characterizations of sexual dimorphism of the cerebrum of ferrets". *Neuroimage*, 2013, Jun 14;83C:294-306.

5. Kazuhiko Sawada, Shigeyoshi Saito, Miwa Horiuchi-Hirose, Yuki Mori, Yoshichika Yoshioka, Kenya Murase. "Dose-related cerebellar abnormality in rats with prenatal exposure to X-irradiation by MRI volumetric analysis", *Congenital Anomalies*, 2013; 53, 127-130.

6. Shigeyoshi Saito and Kenya Murase. "Detection and early phase assessment of radiation-induced lung injury in mice using micro-CT", *PLoS ONE*, 2012 Sep 24.

7. Shigeyoshi Saito and Kenya Murase. "Visualization of mouse spinal cord microscopic structures by use of ex-vivo quantitative micro-CT images", *Radiological Physics and Technology*, 2012 Jun 24.

8. Shigeyoshi Saito Yuki Mori, Yoshichika Yoshioka and Kenya Murase. "High resolution ex-vivo imaging in mouse spinal cord using micro-CT with 11.7T-MRI and myelin staining validation", *Neuroscience Research*, Volume 73, Issue 4, August 2012, Pages 337-340.

9. Kazuhiko Sawada, Katsuhiko Fukunishi, Masatoshi Kashima, Shigeyoshi Saito, Hiromi Sakata-Haga, Ichio Aoki and Yoshihiro Fukui. "Fetal Gyrification in Cynomolgus Monkeys: A Concept of Developmental Stages of Gyrification." *The Anatomical Record*, 2012 Jul;295(7):1065-74.

10. Shigeyoshi Saito and Kenya Murase. "Ex-vivo imaging of mice brain using Micro-CT with nonionic iodinated contrast agent: a comparison with myelin staining", *The British Journal of Radiology*, 2012 Jun 6.

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 高梨 潤一、岩崎 信明、齋藤 茂芳、新田 展大、寺田 一志、青木 伊知, MR spectroscopy による Shiverer マウス脳代謝解析, 第 25 回臨床 MR 脳機能研究会 (東京), 2013 年 3 月 16 日
2. 齋藤 茂芳、森 勇樹、吉岡 芳親、村瀬 研也. 11.7T-MRI と Micro-CT による高分解能マウス固定脳脊髄イメージング. 第 40 回日本磁気共鳴医学会大会(京都)、2012 年 9 月 6 日~8 日.
3. 澤田 和彦、齋藤 茂芳、廣瀬 美和、森 勇樹、吉岡 芳親、村瀬 研也. ラット小脳に及ぼす胎生期放射線曝露の影響の定量解析. 日本放射線影響学会・第 55 回大会 (仙台)、2012 年 9 月 6 日~8 日.
4. 澤田 和彦、廣瀬 美和、齋藤 茂芳、新田 展大、青木 伊知男. 生後の発達に伴うフェレット大脳外套の形態変化. 第 52 回大会日本先天異常学会(東京)、2012 年 7 月 6 - 8 日.
5. 齋藤 茂芳、村瀬 研也. 小動物用マイクロ CT による急性期放射線誘発肺組織障害の検出. 第 68 回日本放射線技術学会総会学術大会、横浜、2012 年 4 月 12 - 15 日.

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤茂芳 (SAITO SHIGEYOSHI)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40583068

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし