

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461645

研究課題名(和文) 新生仔豚仮死モデルを使用した新生児低酸素性虚血性脳症の治療戦略の検討

研究課題名(英文) Treatment strategy of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy using by newborn piglets asphyxia model

研究代表者

安田 真之 (Saneyuki, Yasuda)

香川大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：00380155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)モデルとして、新生仔豚を対象に脳循環を指標とする負荷方法を開発し、人工呼吸器から離脱させ負荷後5日まで観察可能とした。蘇生後6時間までの脳波低振幅継続時間と脳血液量増加との間には正の相関を認め、低振幅期間が長く血液量増加が大きい程、予後不良であり、動物実験モデルとして有用であることが確認された。

成人の脳梗塞に有効性が認められているエダラボン(フリーラジカル消去剤)の蘇生後早期投与の効果を検討し、HIEにおける脳神経障害がそのフリーラジカル消去により軽減される可能性が示された。

一方、腎組織において病理組織学的に繊維化が増強され、全身への影響を考慮する必要がある。

研究成果の概要(英文)：In these studies, we found that combining the cerebral blood volume (CBV) with amplitude-integrated EEG (aEEG) is a more effective guide to control hypoxic/ischemic (HI) insult in a newborn piglet model than aEEG alone, to produce a consistent degree of survivable neuropathological damage. Next, we found that an early CBV increase and longer low-amplitude EEG after insult indicates severe brain injury. Finally, we revealed that Edaravone (a free radical scavenger) reduced histologic neuronal damage related to HI loading in our piglet HI model. However, we also found the histopathological damage, especially kidney tissue. We have to consider the systemic impact by Edaravone.

研究分野：医歯薬学

キーワード：低酸素性虚血性脳症 動物モデル 近赤外光 脳血液量 新生仔豚

1. 研究開始当初の背景

新生児仮死に伴う新生児低酸素性虚血性脳症の管理は生命維持、さらに脳保護が最大の目的ではあるが、現在、脳低温療法以外に決定的な治療法は無く、集中治療が中心を占めている。軽度脳低温療法は効果的であるが、予後良好率は依然 50%程であり、更なる改善は重要である。これらの重篤な低酸素虚血は細胞壊死を来たすが、蘇生後には急激な脳内エネルギー代謝の回復が起こる。この一見正常に見えるエネルギー状態は数時間後に遅発性脳内エネルギー代謝障害として観察される。この障害はアポトーシスによる細胞死が主であり、活性酸素種の関与が主な原因の1つと考えられている。本研究は低酸素性虚血性脳症において、産生された活性酸素種の除去を主眼とした、全身的な治療戦略の確立を究極の目的とする。このため中長期予後評価可能な新生仔豚モデルで蘇生後早期から、脳血流量と酸素代謝量を経時的に測定し酸素供給量と酸素代謝量のバランスを評価すると同時に、ヒドロキシラジカルのスカベンジャーであるエダラボンを投与し、その予後改善効果と副作用の検討を脳、心臓、肺、腎臓など全身の臓器で行う。

治療効果の臨床的検討を行う前段階では、人間に生理的条件が類似した中型動物モデルでの基礎的検討は非常に重要である。しかしこれまで中型動物低酸素性虚血モデルでの、脳循環、酸素代謝を評価し、中長期予後検討の報告はない。新生仔豚を用いた核磁気共鳴スペクトロスコピーでの検討は負荷後72時間までであり (Lorek et al. 1994, Thoresen et al. 1996, Kusaka et al. 2009) 長期の麻酔管理が難しいためその後の検討はなされていない。特に動物負荷モデルでは死亡率が低く生存例での中枢神経障害程度が個体ごとに大きく異なることが、治療効果の検討などには必要である。しかし、この条件を踏まえた中型動物モデルは現在ま

で報告がない。本研究では、脳波と脳血液量の両者を指標にしながら投与酸素濃度の変化のみで低酸素負荷、虚血負荷の両方を行う事が特徴であり、中枢神経障害を来し長期生存可能な動物モデルを始めて考案した点が独創的である。従来までの基礎研究で既に5日間以上の飼育に成功し、報告した。(The 6th Congress of Asian Society for Pediatric Research 2010, Yasuda et al.)。本治療法は既に成人での脳梗塞の治療に用いられているが、新生児での低酸素性虚血性脳症における検討はない。そこで、脳の発達ที่人間と類似した新生仔豚を対象とした低酸素性虚血性脳症モデルを用いて、その効果を全身臓器で検討する点は非常に有用な研究であり、臨床応用の可能性が期待される。脳低温療法と併用も可能であり、予後改善に期待が出来る。

さらに今回の検討では脳以外の臓器の低酸素虚血負荷とその治療効果の評価を行う事が特徴である。現在までに低酸素虚血負荷に際して脳虚血のみを目的として頸動脈を結紮したり、頸部を圧迫したりするモデルもあるが、その場合心臓、腎臓、肺への血流は保たれており、全身にダメージがある臨床的な新生児低酸素性虚血性脳症とは異なった病態を示す事が推測され、全身臓器の低酸素虚血負荷による影響も評価不能である。また、ラットなどの小動物を用いた実験系でも負荷強度のばらつきが予想され、評価は困難と考えられる。我々のモデルでは全身に低酸素虚血性変化を生じ、中長期に管理する事により実際に臨床と同様の変化が全身臓器に生じる事が予測され、脳保護以外のフリーラジカルスカベンジャーの全身臓器への効果についても検討が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

研究期間内の検討として、人間と中枢神経系の発達速度が類似している新生仔豚を対象として、低酸素虚血負荷後の中長期予後の観察可能な実験モデルを用いてフリーラジ

カルスカベンジャーの投与を行い、脳血液量と脳内酸素飽和度の増減や神経活動性異常の程度と、負荷後の全身臓器の組織学的障害や運動障害の程度との関係を検討する。

3. 研究の方法

1) 産後24時間以内の新生仔豚を対象にする。
2) 臍動静脈内にポリエチレンカテーテルを挿入し、イソフルレンで麻酔導入を行い、フェンタニル、筋弛緩剤臭化パンクロニウムで麻酔を維持する。気管内挿管の後に人工呼吸管理を酸素と窒素の混合気体を用いて行い、動脈血酸素分圧が60-100 mmHg、PaCO₂が35-45 mmHgとなるように換気回数、換気圧、吸入酸素濃度を調整し、ラディアントウォーマーで体温調節を直腸温で37-39とする。
3) 低酸素虚血負荷は酸素濃度5%で開始する。低酸素虚血負荷前の平均血圧の70%以上を保つように酸素濃度を調整し30分間負荷を行い、その後10分間は血圧低下するよう酸素濃度を5%で固定する(虚血負荷)。低酸素虚血負荷終了後に酸素濃度100%で10分間人工呼吸管理を行い、麻酔から醒め、自発呼吸を確認した後人工呼吸器から離脱させる。ラジカルスカベンジャー(エダラボン)は蘇生後72時間まで12時間毎(3.0 mg/kg/回)投与する。

低酸素虚血負荷中、及び経時的に3波長時間分解分光システムで脳内酸素飽和度と脳血液量を脳波は integrate EEG 測定をその他適宜血液ガス分析、血糖、電解質測定を行う。

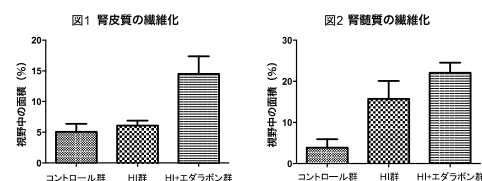
- (1) 低酸素虚血負荷後5日に脳組織を取り出し組織学的検討を行う。
- (2) 腎組織標本を用いて障害の検討を行う。

4. 研究成果

(1) 低酸素虚血負荷群(HI群)7例とエダラボン投与群(HI+エダラボン群)7例で解析を行った。病理組織学的検討は大脳灰白質、白質、海馬、小脳についてHE染色を用いた組織障害スコアを、大脳灰白質、海馬について変性神経細胞染色(Fluoro-Jade B)陽性細胞数を比較検討した。

HE染色におけるスコアは、投与群で、無治療群と比較し大脳灰白質($p<0.01$)、海馬($p=0.03$)で有意に低く、障害が軽度であった。また変性神経細胞数は投与群が、大脳灰白質($p=0.04$)、海馬($p<0.01$)で共に有意に少なかった。今回の投与方法、投与量によるエダラボン投与によりHI負荷における脳神経障害が、軽減される可能性が病理組織学的に示された。

(2) 負荷を行わないコントロール群4例とHI群5例、HI+エダラボン群7例で比較検討した。染色は膠原繊維の指標となるアザン染色を用い、それぞれ強拡大10視野に対し繊維化している割合はimageJを用いて算出、平均をとった。腎皮質ではKruskal Wallis検定にて3群間で有意差を認めた($p=0.043$ 、図1)腎髄質でもKruskal Wallis検定にて3群間で有意差を認めた($p=0.014$ 、図2)。これらのことより今回の投与方法ではエダラボンの腎障害を認める可能性があり、より臓器障害性の低い投与方法、投与量の検討が必要と考えられた。



5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計9件)

- (1) Nakamura S, Koyano K, Jinnai W, Hamano S, Yasuda S, Konishi Y, Kuboi T, Kanenishi K, Nishida T, Kusaka T. Simultaneous measurement of cerebral hemoglobin oxygen saturation and blood volume in asphyxiated neonates by near-infrared time-resolved spectroscopy. Brain & Development. 査読有 37(10);925-932. 2015. doi: 10.1016/j.braindev.2015.04.002
- (2) Nakamura M, Jinnai W, Hamano S,

- Nakamura S, Koyano K, Chiba Y, Kanenishi K, Yasuda S, Ueno M, Miki T, Hata T, Kusaka T. Cerebral blood volume measurement using near-infrared time-resolved spectroscopy and histopathological evaluation after hypoxic-ischemic insult in newborn piglets. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 査読有 42;1-9. 2015. doi:10.1016/j.ijdevneu.2015.02.009
- (3) Kusaka T, Isobe K, Yasuda S, Koyano K, Nakamura S, Nakamura M, Ueno M, Miki T, Itoh S. Evaluation of cerebral circulation and oxygen metabolism in infants using near-infrared light. *Brain Dev*. 査読有 36(4);277-283. 2014. doi: 10.1016/j.braindev.2013.05.011
- (4) Nakamura S, Kusaka T, Koyano K, Miki T, Ueno M, Jinnai W, Yasuda S, Nakamura M, Okada H, Isobe K, Itoh S. Relationship between early changes in cerebral blood volume and electrocortical activity after hypoxic-ischemic insult in newborn piglets. *Brain Dev*. 査読有 36(7);563-571. 2014. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.braindev.2013.08.005
- (5) 伊藤進, 岡田仁, 安田真之, 岩瀬孝志, 日下隆. 神経症候群(第2版)ーその他の神経疾患を含めてー ビリルビン代謝異常. *日本臨床. 新領域別症候群シリーズ* 査読無 No.28;722-727. 2014.
- (6) 橋本絢, 濱野聡史, 及川薫, 中村信嗣, 小谷野耕佑, 安田真之, 日下隆, 磯部健一, 伊藤進. 繰り返す無呼吸発作を契機に発見された新生児脳梗塞の1例. *日本小児科学会雑誌*. 査読無 118(7);1125. 2014.
- (7) 中村信嗣, 新居広一郎, 富田理絵, 神内済, 小谷野耕佑, 安田真之, 岩瀬孝志, 日下隆, 伊藤進. 当院における低酸素性虚血性脳症(HIE)・低体温療法(HT)施行例に関する検討. *日本小児科学会雑誌*. 査読無 118(7);1131. 2014.
- (8) Nakamura S, Kusaka T, Yasuda S, Ueno M, Miki T, Koyano K, Nakamura M, Okada H, Okazaki K, Isobe K, Itoh S. Cerebral blood volume combined with amplitude-integrated EEG can be a suitable guide to control hypoxic/ischemic insult in a piglet model. *Brain Dev*. 査読有 35(7);614-625. 2013.
- (9) Koyano K, Kusaka T, Nakamura S, Nakamura M, Konishi Y, Miki T, Ueno M, Yasuda S, Okada H, Nishida T, Isobe K, Itoh S. The effect of blood transfusion on cerebral hemodynamics in preterm infants. *Transfusion*. 査読有 53(7);1459-1467. 2013.
- [学会発表](計20件)
- (1) 安田真之. 基礎研究から臨床研究へ「地方大学NICUから発信できること」. 第60回日本新生児成育医学会・学術集会. 2015.10. 岩手.
- (2) 安田真之, 荻田博也, 若林誉幸, 濱野聡史, 神内済, 小谷野耕佑, 中村信, 日下隆. 新生仔豚仮死モデルを用いた脳循環、脳代謝の基礎的検討ー負荷中の脳内ヘモグロビンの変化ー. 第51回日本周産期・新生児医学会学術集会. 2015.07. 福岡.
- (3) 安田真之, 神内済, 中村信嗣, 小谷野耕佑, 中村信, 日下隆. 新生仔豚仮死モデルを用いた脳循環、脳代謝の基礎的検討(第5報). 第118回日本小児科学会学術集会. 2015.04. 大阪.
- (4) Yasuda S, Hamano S, Jinnai W,

- Nakamura M, Nakamura S, Koyano K, Kusaka T, Relationship between cerebral hemodynamics after hypoxic_ischemic insult and cerebral metabolism in newborn piglets. The 11th Congress of Asian Society for Pediatric Research. 2015.04. Osaka, Japan.
- (5) 小谷野耕佑, 有岡誠, 喜多條真穂, 新居広一郎, 若林誉幸, 近藤健夫, 神内済, 中村信嗣, 安田真之, 日下隆. 脳循環指標を用いた早産児貧血における輸血療法基準作成の検討. 第 59 回日本未熟児新生児学会・学術集会. 2014.11. 愛媛.
- (6) 神内済, 中村信嗣, 濱野聡史, 若林誉幸, 小谷野耕佑, 加藤育子, 安田真之, 中村信, 日下隆. 新生仔豚仮死モデルにおける脳循環変化パターンの負荷前後の関連. 第 50 日本周産期・新生児医学会学術集会. 2014.07. 千葉.
- (7) 濱野聡史, 中村信, 神内済, 中村信嗣, 小谷野耕佑, 安田真之, 岩瀬孝志, 岡田仁, 日下隆. 新生仔豚を用いた低酸素虚血負荷後超早期における脳循環変化と病理学的脳障害の関係. 第 50 日本周産期・新生児医学会学術集会. 2014.07. 千葉.
- (8) Yasuda S, Hamano S, Jinnai W, Nakamura M, Nakamura S, Koyano K, Kusaka T, Itoh S. Relationship between Changes in Cerebral Hemodynamics during Hypoxic-ischemic Insult and Cerebral Metabolism in Newborn Piglets. Pediatric Academic Societies and Asian Society For Pediatric Research(PAS/ASPR).2014.05. Vancouver, Canada.
- (9) 小谷野耕佑, 新居広一郎, 富田理絵, 神内済, 中村信嗣, 安田真之, 日下隆, 伊藤進. 新生仔豚を用いた低酸素性虚血性脳症モデルにおけるエダラボンの効果: 病理組織学的検討. 第 40 回日本小児臨床薬理学会学術集会. 2013.11. 神奈川.
- (10) 濱野聡史, 神内済, 國方淳, 小谷野耕佑, 安田真之, 岩瀬孝志, 日下隆, 伊藤進. 新生児における脳低温療法施行・非施行低酸素性虚血性脳症例の脳循環代謝変化 生後 72 時間までの脳血液量、脳内 Hb 酸素飽和度. 第 58 回日本未熟児新生児学会. 2013.11. 石川.
- (11) 安田真之, 神内済, 中村信嗣, 小谷野耕佑, 中村信, 日下隆, 伊藤進. 新生仔豚仮死モデルを用いた遅発性脳エネルギー代謝障害時の脳循環と脳代謝の基礎的検討(第 4 報). 第 58 回日本未熟児新生児学会. 2013.11. 石川.
- (12) 神内済, 中村信嗣, 濱野聡史, 若林誉幸, 國方淳, 小谷野耕佑, 安田真之, 中村信, 日下隆, 伊藤進. 新生仔豚低酸素性虚血性脳症モデルにおける低酸素虚血負荷中の脳血液量の変化パターンと病理組織との関係. 第 58 回日本未熟児新生児学会. 2013.11. 石川.
- (13) 中村信嗣, 神内済, 國方淳, 小谷野耕佑, 安田真之, 岩瀬孝志, 日下隆, 伊藤進. 左中大脳動脈領域の脳梗塞症例における脳循環代謝変化の経時的変化について. 第 58 回日本未熟児新生児学会. 2013.11. 石川.
- (14) Nakamura S, Kusaka T, Koyano K, Miki T, Ueno M, Jinnai W, Yasuda S, Nakamura M, Okada H, Isobe K, Itoh S. Relationship between early changes in cerebral blood volume and electrocortical activity after hypoxic-ischemic insult in newborn piglets. ASPR-PSM 2013 Joint scientific Meeting 9th ASPR Congress

- & 20th PSM Annual Congress.
2013.05. Sarawak, Malaysia.
- (15) Jinnai W, Kusaka T, Wakabayashi T, Sugino M, Kunikata J, Nakamura S, Koyano K, Ueno M, Miki T, Nakamura M, Yasuda S, Isobe K, Itoh S. Relationship between cerebral blood volume and cortical electrical activity during hypothermia in piglet asphyxia model. ASPR-PSM 2013 Joint scientific Meeting 9th ASPR Congress & 20th PSM Annual Congress. 2013.05. Sarawak, Malaysia.
- (16) Kusaka T, Nakamura S, Koyano K, Jinnai W, Nakamura M, Yasuda S, Ueno M, Miki T, Itoh S. Influence of a free radical scavenger on neuronal damage in a newborn piglet hypoxic-ischemic model. ASPR-PSM 2013 Joint scientific Meeting 9th ASPR Congress & 20th PSM Annual Congress. 2013.05. Sarawak, Malaysia.
- (17) Nakamura M, Nakamura S, Koyano K, Jinnai W, Kunikata J, Yasuda S, Miki T, Ueno M, Kusaka T, Isobe K, Itoh S. Evaluation between pathological and aEEG scoring after hypoxic-ischemic insult in newborn piglet model. ASPR-PSM 2013 Joint scientific Meeting 9th ASPR Congress & 20th PSM Annual Congress. 2013.05. Sarawak, Malaysia.
- (18) Kusaka T, Nakamura S, Koyano K, Yasuda S, Okawa Shinpei, T, Yukari, Feng Gao, Sato Chie, Hoshi Y, Yamada Y, Itoh S. Relationship between interoptode distance and optical pathlength factor in infants assessed by near-infrared diffuse optical

tomography. ASPR-PSM 2013 Joint scientific Meeting 9th ASPR Congress & 20th PSM Annual Congress. 2013.05. Sarawak, Malaysia.

- (19) 日下隆, 中村信嗣, 小谷野耕佑, 神内済, 中村信, 安田真之, 伊藤進. 新生仔豚低酸素性虚血モデルでの蘇生後早期の脳循環変化と予後との関係. 第116回日本小児科学会. 2013.04. 広島.
- (20) 安田真之, 鈴木裕美, 瀨野聡史, 若林誉幸, 神内済, 小谷野耕佑, 中村信嗣, 中村信, 日下隆, 伊藤進. 新生仔豚仮死モデルを用いた低酸素性虚血性脳症における脳循環と脳代謝の検討. 第116回日本小児科学会. 2013.04. 広島.

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 真之 (YASUDA, Saneyuki)
香川大学 医学部附属病院・講師
研究者番号: 00380155

(2) 研究分担者

小谷野 耕佑 (KOYANO, Kosuke)
香川大学 医学部附属病院・助教
研究者番号: 20437685

三木 崇範 (MIKI, Takanori)
香川大学 医学部・教授
研究者番号: 30274294

上野 正樹 (UENO, Masaki)
香川大学 医学部・教授
研究者番号: 30322267

中村 信嗣 (NAKAMURA, Shinji)
香川大学 医学部・助教
研究者番号: 30437686

日下 隆 (KUSAKA, Takashi)
香川大学 医学部・教授
研究者番号: 50274288