

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860906

研究課題名(和文) 胎児脳における虚血脆弱細胞種の同定とその生存因子を用いた脳障害治療法開発

研究課題名(英文) Identification of the most vulnerable cell type in fetal brain, and development of a new treatment for fetal brain injury with growth factors

研究代表者

伊藤 美春 (Ito, Miharuru)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教

研究者番号：60570083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：胎児発育不全(fetal growth restriction, FGR)児において協調運動障害・学習障害・うつ状態・注意欠陥多動障害といった学習や行動の問題を合併しやすいことが注目されている。FGRの発症原因はさまざまであるが、なかでも胎内での血流障害は、脳室周囲白質損傷のリスクファクターでもある。本研究の最終目標は、FGR児に見られる中枢障害軽減の糸口を見出すことである。本研究では、二つのFGRモデルを製作し、組織学的、行動学的に評価した。

研究成果の概要(英文)：Recently, it was shown that fetal growth restriction (FGR) is high risk for learning and/or behavioral problems, such as impaired motor coordination, learning disability, depression, and/or attention-deficit hyperactivity disorder. Impaired vascular perfusion in fetal period, which is one of the etiology of FGR, can cause to white matter injury.

In this project, we developed two FGR models with impaired vascular perfusion in fetal period, and evaluated them histologically and behaviorally.

研究分野：新生児学

キーワード：胎児発育不全

1. 研究開始当初の背景

新生児医療の進歩に伴い、新生児救命率は飛躍的に向上しているものの、より重症な児に対する救命が可能になったことに伴い、脳障害や発達障害に関しては改善の兆しが見られない。なかでも胎児発育不全 (fetal growth restriction, FGR) 児においては、出生後の短期生命予後が良好なことが多いため軽視されがちであったが、今日では FGR 児において協調運動障害・学習障害・うつ状態・注意欠陥多動障害といった学習や行動の問題を合併しやすいことが注目されている (Veelken N et al., 1992)。

FGR の発症原因はさまざまであるが、なかでも胎内での血流障害は、脳室周囲白質損傷 (periventricular white matter injury : PWMI) のリスクファクターでもある (Bauer et al., 2008)。

FGR に対する確立された治療法がなく、周産期医療における重大な問題のひとつである。FGR の一要因である胎児血流障害が、活発な増殖と分化の過程にある種々の脳細胞に与える影響は多大であり、胎児期脳損傷の主要因子と考えられる。

また、満期産児における脳障害では神経細胞死が主因であり、早期産児ではオリゴデンドロサイト前駆細胞の変性脱落が主要な原因である (Volpe, 2001)。しかし、FGR ではどの領域のどの細胞種が最も変性しやすいのか、といった報告がみられない。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、FGR の主要な要因と考えられる胎児血流障害が、胎児脳のどの領域のどの細胞種 (神経幹細胞、神経細胞、アストロサイト、オリゴデンドロサイトなど) に最も損傷を与えるのか、行動学的にどのような異常を来すかを解明し、FGR 児に見られる中枢障害軽減の糸口を見出すことである。

3. 研究の方法

胎児虚血再灌流モデルの作製

妊娠 17 日齢 (ヒト妊娠~25 週相当) の SD

ラットにおいて、子宮動脈を一時的にクランプし虚血した後、クランプを解除し再灌流して作製する。様々な妊娠日数、虚血時間で確認した。コントロールは開腹して子宮を腹腔外に出し、同時間おいた後に閉腹した。

胎児虚血再灌流モデルの組織学的検討

前述の方法でモデルを作製した。その後、日齢 48 で灌流固定した後、5 μ m の組織切片を作製した。神経細胞のマーカーである NeuN の抗体にて免疫組織学的に染色した後、皮質、海馬の体積、総神経細胞数、細胞密度を求めた。なお、総神経細胞数は stereologic methods (Stereo Investigator version 10, MicroBrightField Europe EK) を用いて推定値を出した。

胎児虚血再灌流モデルの行動学的検討

ロータロッド

運動機能の協調性と平衡感覚を測定する検討である。繰り返しテストすることで、運動学習機能についても検査することが可能である。本研究では日齢 36~37 に 2 回/日、計 4 回施行した。

オープンフィールド

自発運動量や情動行動・探索行動などを調べる試験である。本研究では、180 秒/回、1 回/日、3 日連続で施行した。総移動量と中心エリアに入った回数を評価した。

シャトルアボイダンス

音・光に対する条件反応行動を観察する試験で学習障害を評価できる。本研究では、日齢 50~54 日で 20 session/日、4 日連続試行した。回避率と回避潜時を評価した。

胎児慢性虚血モデルの作製

妊娠 17 日齢の SD ラットにおいて子宮動脈 4 カ所にアメロイドコンストリクター装着し、緩やかな慢性低灌流負荷を胎児にかけるとする。アメロイドコンストリクターは、0.35mm、0.4mm の 2 種類用い、負荷の程度を 2 段階とする。

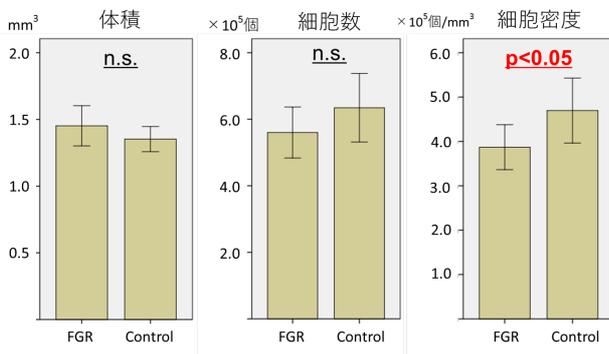
4. 研究成果

胎児虚血再灌流モデルの作製

上記方法でモデル作製を様々な妊娠日数、虚血時間で試した。コントロールは開腹して子宮を腹腔外に出し、同時間おいた後に閉腹した。妊娠 17 日目に開腹し子宮動脈を 30 分間クランプした後、クランプを解除して閉腹し妊娠を継続させたところ、妊娠 22 日目に通常経膈分娩に至った。出生体重は FGR 群 $4.78 \pm 0.18\text{g}$ 、コントロール群 $5.30 \pm 0.11\text{g}$ で有意差を認め ($p < 0.05$) FGR モデルラットが作製できることがわかった。

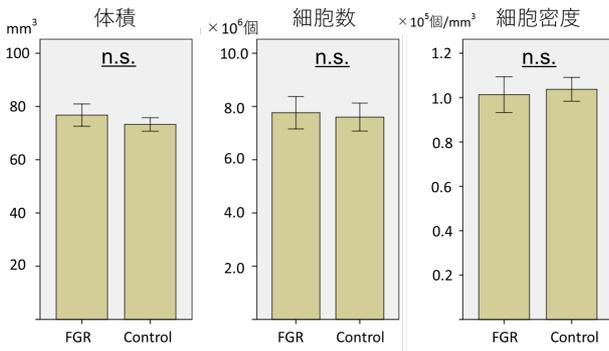
胎児虚血再灌流モデルの組織学的検討

海馬



海馬体積、細胞数は両群間で差を認めなかったが、神経細胞密度は FGR 群で有意に低かった。

皮質



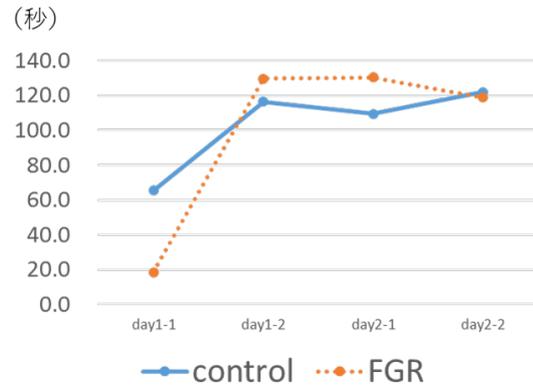
海馬体積、細胞数、神経細胞密度とも両群間で差を認めなかった。

胎児虚血再灌流モデルの行動学的検討

ロータロッド

1 日目 FGR 群が平均 18.7 秒に対しコントロ

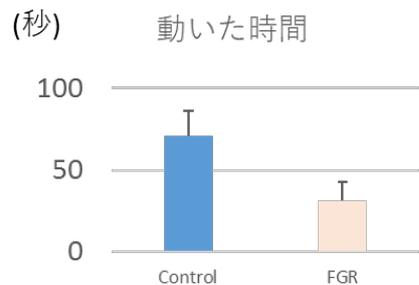
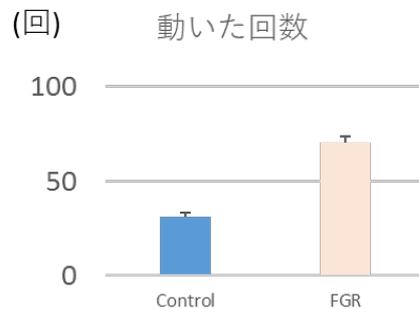
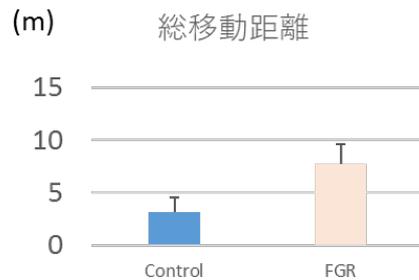
ール群が 65.3 秒 ($p = 0.024$) であり、有意差は認められないものの初回については FGR の平均値がコントロールを有意に下回る結果であった。



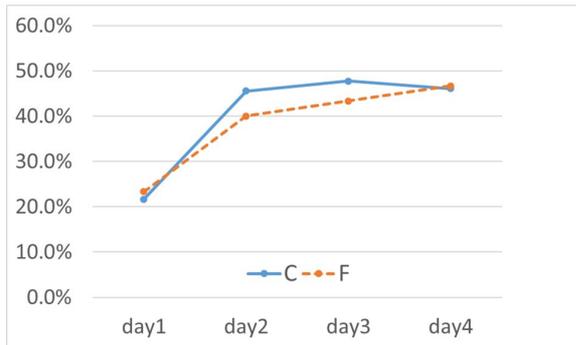
オープンフィールド

一定時間内での総移動距離は FGR 群で $7.7 \pm 1.9\text{m}$ 、コントロール群は $3.2 \pm 1.4\text{m}$ ($p = 0.03$) 動いた回数の平均値は 14.4 ± 3.0 回、 7.5 ± 2.2 回 ($p = 0.02$) 動いた時間については 70.6 ± 11.4 秒と 31.1 ± 15.7 秒 ($p = 0.018$) であった。

以上から、FGR 群は、コントロール群に比べ、より移動距離、移動時間が長く多動である可能性が示唆された。



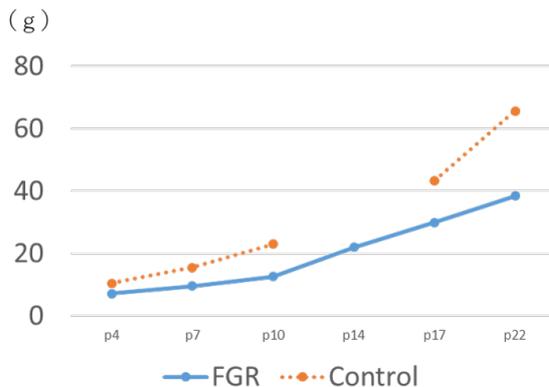
シャトルアポイダンス



いずれも有意差は認められず、危険回避とその長期記憶については特に有意差を認めなかった。

胎児慢性虚血モデルの作製

今回、中心孔内径が 0.35mm と 0.4mm の 2 サイズで行ったところ、0.35mm では、胎児死亡率が高く、虚血が強すぎると考えられた。0.4mm のアメロイドコンストリクターでは、死亡率が低く、従来モデルよりも低い体重を実現できた。



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)

[雑誌論文](計4件)

Terui K, Nagata K, Ito M, Yamoto M, Shiraishi M, Taguchi T, Hayakawa M, Okuyama H, Yoshida H, Masumoto K, Kanamori Y, Goishi K, Urushihara N, Kawataki M, Inamura N, Kimura O, Okazaki T, Toyoshima K, Usui N. Surgical approaches for neonatal congenital

diaphragmatic hernia: a systematic review and metaanalysis. *Pediatr Surg Int.* 2016 in press. (査読あり)

伊藤美春, 早川昌弘 NO 吸入療法離脱時に肺血管拡張薬の併用をどうするか? 周産期医学 2015.3.340-2 (査読なし)

Ito M, Kidokoro H, Sugiyama Y, Sato Y, Natsume J, Watanabe K, Hayakawa M. Paradoxical downward seizure pattern on amplitude-integrated electroencephalogram. *J Perinatol.* 2014;34(8):642-4. (査読あり)

Ichinohashi Y, Sato Y, Saito A, Ito M, Watanabe K, Hayakawa M, Nakanishi K, Wakatsuki A, Oohira A. Dexamethasone administration to the neonatal rat results in neurological dysfunction at the juvenile stage even at low doses. *Early Hum Dev.* 2013;89(5):283-8. (査読あり)

[学会発表](計4件)

伊藤美春, 照井慶太, 永田公二, 矢本真也, 白石真之, 豊島勝昭, 早川昌弘, 田口智章, 臼井規朗, 新生児先天性横隔膜ヘルニアの肺高血圧に対する NO 吸入療法の検討: システマティックレビューとメタ解析, 第 51 回周産期新生児医学会, 2015 年 07 月 10 日 ~ 2015 年 07 月 12 日, ヒルトン福岡シーホーク (福岡県福岡市)

伊藤美春, CDH の予後 (CDH 研究班のデータから), 第 118 回日本小児科学会学術集会, 2015 年 04 月 17 日 ~ 2015 年 04 月 19 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

伊藤美春, 杉山裕一郎, 鈴木俊彦, 近藤大貴, 齊藤明子, 服部哲夫, 中村祐子, 藤巻英彦, 佐藤義朗, 早川昌弘, 津田弘之, 先天性横隔膜ヘルニアにおける生後早期の胸部レントゲン所見と予後との関連, 第 58 回日本未熟児新生児学会・学術集会, 2013 年 11 月 30 日 ~ 2013 年 12 月 02 日, 石川県立音楽堂, ANA クラウンプラザホテル金沢, ホテル金沢 (石川県金沢市)

伊藤美春, 早川昌弘 先天性横隔膜ヘルニアにおける出生前の重症度評価, 第 11 回日

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 (共通)

本胎児治療学会学術集会、2013 年 11 月 16
日～2013 年 11 月 17 日、東京慈恵会医科大学
1 号館 3 階講堂 (東京都港区)

〔図書〕(計 1 件)

新生児先天性横隔膜ヘルニア研究グルー
プ (伊藤美春、他) 新生児先天性横隔膜ヘル
ニア (CDH) 診療ガイドライン、メジカル
ビュー社 2016 総ページ数 114

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 美春 (Ito Miharu)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号 : 60570083

(1)研究分担者

なし