

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15404

研究課題名(和文) 新生児HIEに対する再生医療的アプローチを探索するための霊長類モデル作製

研究課題名(英文) Development of non-human primate models to study neonatal HIE in regenerative medicine approach

研究代表者

山内 秀雄 (Yamanouchi, hideo)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10250226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：周生期に呼吸循環不全などが生じることにより錐体外路症状などを含む神経学的後遺症である脳性麻痺を来す、新生児低酸素性虚血性脳障害について、その病態解明と治療法開発に資する霊長類モデルを開発することが本主題として取り組んだ。

低酸素性環境暴露の試験系を開発し、5頭を低酸素誘導、4頭を同空気流入の対照群として、酸素濃度低下の急性期を対象に、二群比較を行った。血中酸素飽和度が20%程度に低下したところで、補償的な生理基盤が示唆され、身体運動分析から成体に比し低酸素耐性が示唆された。暴露回復直後の抗重力適応機能評価法の開発において、運動徴候を定量的に認め、同評価系と病態モデルの特徴が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neurologic sequelae of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy (HIE) supposedly includes cerebral palsy, which is extrapyramidal symptoms due to occurrence of respiratory and circulatory insufficiency in the perinatal period. To study HIE preclinically, we aimed to develop the non-human primate model of common marmoset.

A test system was designed and evaluated to simulate hypoxic environmentally exposed similarly to supposed situation with suppression of oxygen circulation under the other factors sufficient. Two primate groups were compared about the oxygen regulation to induce hypoxic and normal conditions. The results in the acute phase experiments with five as hypoxic and four as control groups suggested some "compensation-like" physical mechanism at blood oxygen saturation appropriately 20%. The acutely recovered infants from low oxygen exposure tended to view and behave differently in anti-gravity motion tests. This proposed model shows possibility for the furthermore studies.

研究分野：小児神経学

キーワード：神経行動学 抗重力運動発達 補償生理基盤 低酸素暴露病態 霊長類モデル

1. 研究開始当初の背景

周産期医療の向上により重症新生児死亡率は著しく減少したが、神経学的後遺症である脳性麻痺の発症率は未だ減少する傾向がない。新生児低酸素性虚血性脳障害 HIE は脳性麻痺をきたす主たる原因疾患の一つである。本症は在胎週数や仮死の程度により様々な病態を示すが、それは新生児期特有の脳内可塑性に起因している。一方で、この可塑性は、現在盛んに検討されている再生医療的アプローチにとっては有利に展開できる可能性をもたらす。

2. 研究の目的

周産期に呼吸循環不全などが生じることにより錐体外路症状などを含む神経学的後遺症である脳性麻痺を来す、新生児低酸素性虚血性脳障害について、その病態解明と治療法開発に資するモデル動物、および評価システムを開発することが本主題である。そこで、齧歯類モデルの先行研究で確立している参照条件を基盤に、齧歯類では比較生物学的相違性が問題となる脳神経回路形成を標的とし、解剖学的特徴 (= 易障害性) の類似性から、本症に対する霊長類モデルの開発を試みた。新生児低酸素性虚血性脳障害を模倣する病態を作り出し、将来本症に対して再生医療的アプローチに資するモデル、および、その評価系の有効性を検討することが本研究の目的である。

本書では、健常な霊長類新生仔を出生後 24 時間以内に、後の生命維持を阻害しない低酸素環境暴露を 30 分間試行することを病態モデル誘導条件とする仮説を立て、曝露中の生理指標動態、および、曝露前と後の急性期回復時の神経学的運動機能について評価を試みたので、その検証結果を報告する (論文投稿準備中)。同神経学的運動機能評価を開発するに当たり、設定根拠となる基礎知見として、新生児集中治療室に入院する患児の入院中臨床情報と退院後の発達指標に関する網羅的探索を併行した結果、「定頓」や「寝返り」などの抗重力運動と脳神経組織量や血液学・生化学的指標に関わる示唆を得た (成果論文等)。そこで、霊長類モデルにおいての比較神経行動学的な抗重力運動の試験系に焦点を当て、その開発と検証を試みた。

3. 研究の方法

(1) 霊長類コモン・マーモセット:

埼玉医科大学動物実験倫理委員会により審議され承認を受けた内容を遵守した。生得遺伝的、および、生後環境的統制を目的として、繁殖ペアを、新生児期から神経行動学的な全発達統制を行った 1 ペアに限定し、自家繁殖環境を整え、妊娠期約 5 か月の正期産個体、計 9 頭の被験新生仔を得ることに成功した。

(2) 新生児低酸素暴露誘導システムの開発: 低酸素環境誘導チャンバー (幅 16 × 奥行 23

× 高さ 18cm) を用意し、出生後 24 時間以内に暴露試験を行った。チャンバー室内温湿度・気流環境については新生児集中治療室で利用されている保育器の調節値を参照し、室温 30 ± 2 、相対湿度 $40 \pm 30\%$ 、個体近位の気体流量を一定流量 (約 0.1 ml/秒以内程度) に調整した。低酸素暴露群条件は酸素 5%、窒素 95% の混合ガスを、対照群条件には飼育室内空気をポンプで同程度の流速で流入させ、酸素濃度ロガー OXYMAN (泰栄エンジニアリング)、および熱戦式気流計によるモニター下に調節を行った。低酸素暴露群は酸素濃度が調節可能な最低値である約 6% に達した後、30 分間継続を行った。対照群においても 30 分以上の同チャンバー内計測を行い比較した。

(3) 低酸素暴露誘導時の行動・生理計測:

チャンバー天井面にビデオカメラ (Logicool) および、赤外画像センサー TP-L (チノー) を設置し、行動、および体表温度 (頭部・胴体部) の毎秒動態を計測し、画像データから座標、温度の値を得た。被験個体の左手掌に近赤外計測プローブを巻き医療用布テープで固定し、血中酸素飽和度および脈拍 (ネルコア) の記録を行った。各指標の時系列動態トレンドグラフを作成し、低酸素誘導に伴う特長波形を探索・検出した。

(4) 低酸素暴露前・後回復時の神経行動学的分析:

新生児低酸素性虚血性脳障害 HIE の臨床所見である錐体外路徴候などを再現しうるかどうかを評価するために、低酸素暴露後の急性期回復時を対象とする行動試験システムを試作した。試験前に対する試験後応答と推定される行動をビデオカメラで記録を行い、比較神経学的機能の病態を定量的に探索した。ペット用シートを表面に巻いた直径 65 × 長さ 125mm の円柱をクッション上底面 200mm の高さに片側水平支持を施し、底面に被験個体を捕まらせた初期状態 (図 2) から 2 分間の行動を分析対象とした。自家先行研究により、生後 2-3 週間のコモン・マーモセット幼若仔は、四肢を円柱の垂直上半位に移動させる傾向を示すのに対し、より後期の幼若齢では円柱の下位地面方向への離脱・逃避行動への嗜好性を認めたので [成果論文]、出生直後の本新生仔への適用を試みた。

4. 研究成果

(1) 新生児低酸素暴露誘導

低酸素暴露試験直後に、いずれの個体も、生命維持に関する脈拍、血中酸素飽和度、体表温の生理指標における問題や顕著な行動異常は観察されなかった。

低酸素暴露誘導群 5 個体 (図 1 は同群中一個体の例) および、対照群 4 個体に関する、暴露中の室内酸素濃度、血中酸素飽和度

(SpO₂) 脈拍、チャンパー室内温度、体表温度(頭部・胴体部) および、左右足部や上肢・頭・胸部(非表示)の運動に関する時系列同期のトレンドグラフを得た。

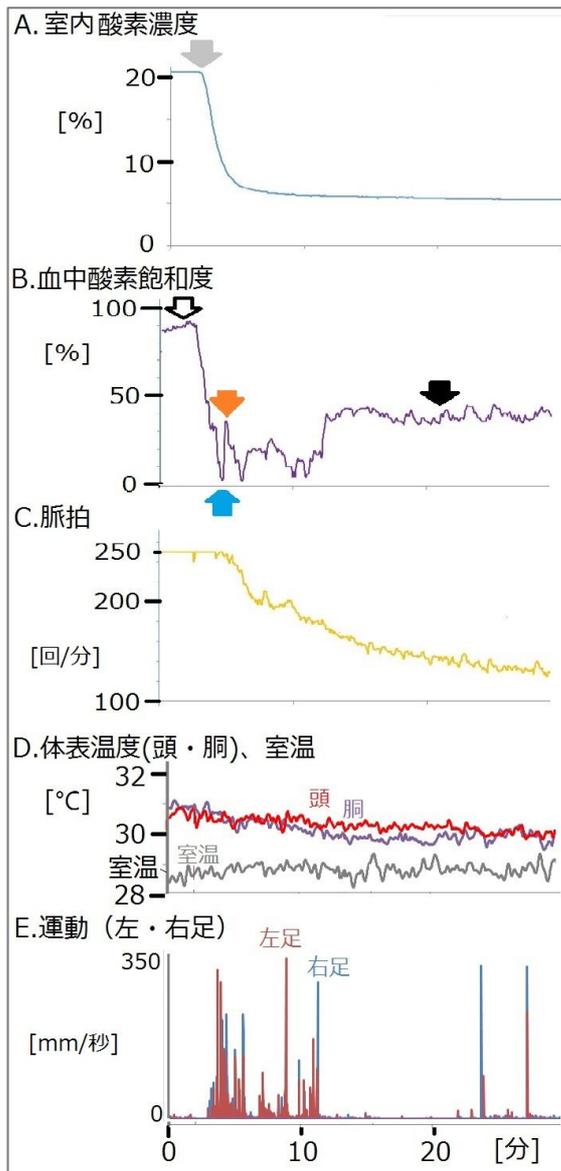


図1：低酸素室内環境暴露誘導時の室内酸素濃度、生理・行動指標のトレンドグラフ(一匹の例)

室内酸素濃度(図1A)を图中的の灰色矢印の時点から低酸素誘導を図り、最低値6%台の低酸素暴露環境を30分間程度与えた。血中酸素飽和度(SpO₂、図1B)は、暴露前の値(白抜き矢印)に対し、暴露後早期に低下が始まり、極少の低値(青矢印、ネガティブピーク)を示した後、上昇し極大(薄オレンジ矢印、リバウンドピーク)となり、再びこれを繰り返すリバウンド様現象がしばらく続いた。暴露後10~20分以内程度になると、振れ幅が少なくほぼ安定する定常状態(黒矢印)となる傾向を認めた。低酸素環境暴露群が示した、各矢印時点のSpO₂値(図2A)は、暴露前より有意に低く(*:一元配置ANOVA、Tukey Kramer法、P<0.05)、一対の標本による平均

の検定により、ネガティブピーク時はリバウンド時より有意に低値を示すことが確認された(†:P<0.05)。

低酸素暴露後の脈拍(図1C)は、SpO₂より数分遅れて低下し始めた後、滑らかに下がり続けるトレンドを示した。SpO₂で識別した各矢印時点間の脈拍を比較した結果(図2B)、曝露中定常状態時が、暴露前やネガティブピーク時より有意に低く(*), また、リバウンド時はネガティブピーク時より有意に低値を示した(†)。

赤外画像センサで非接触に計測した頭および胴の体表温度(図1D)は、低酸素暴露中、概ね僅かに下がる傾向はあるものの、有意差を認めなかった。個体数を増やしたさらなる検証を要す。

身体運動については、新生直後の仔が概ね限定的な低運動様相に留まるのに対し、SpO₂値が平均60~20%程度の範囲に低下する間に顕著に身体運動が亢進し、SpO₂値が定常状態(黒矢印)に至ると、抑制される傾向を認めた(図1E)。標的疾患HIEは脳性麻痺、四肢の運動障害への進行頻度が高い、という特徴から、本周生期低酸素暴露モデルの四肢を中心とする運動を定量追跡した。前述のSpO₂値で識別された各矢印点での比較においては、足部、特にネガティブピーク時の左足の運動が暴露前に比べ概ね亢進した(図2C、一元配置ANOVA、Tukey Kramer法、P=0.056)。

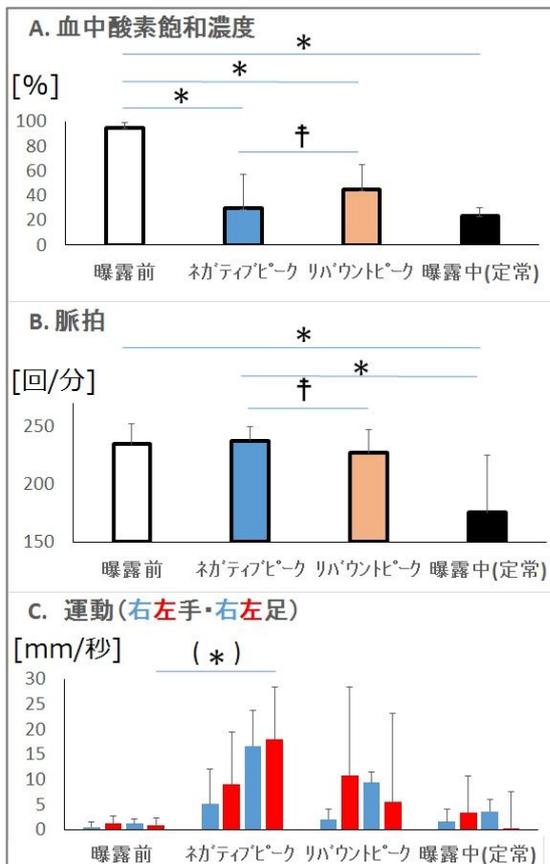


図2：血中酸素飽和度、脈拍、運動のトレンド波形から抽出した特徴点間の比較

この急性期応答の生理動態分析から認め

られたりバウンド様波形について、次の考察を試みる。低酸素暴露時に生じる何らかの酸素代謝活性の障害に対する、徐脈や低体温を伴う「補償」のホメオスタティックな生理基盤が存在する可能性が示唆されたかもしれない。ネガティブピーク時に顕著に表現された、足部運動の亢進は、周生期低酸素暴露が同機能中枢に最も高い負荷を与えたことを示唆した可能性があり、臨床における概論との整合性が認められる。今後、神経障害マーカー分子等イメージングを伴う機能解剖学的検証を進める予定である。

(2) 低酸素暴露後の回復時の神経行動学的分析システムの開発と病態分析：

周生期の30分程度の低酸素環境暴露により病態を誘導することを目指した本モデルが、新生児低酸素性虚血性脳障害の臨床症状条件を満たすかどうかについて、神経障害性に関する行動学的機能評価の方法の探索を行ったので、本章で報告する。対象とする行動試験の方法を開発するに当たり、新生児集中治療室の入院児に対する追跡調査研究により、神経発達の行動学的マイルストーンである「モロー反射」などの不随性行動から随意性への移行と推察されている「定頸」や「寝返り」などの抗重力運動機能の出現と、新生期MR脳イメージングによる脳神経組織量や血中の代謝性分子の定量情報が関わる示唆を得た。そこで、抗重力運動に焦点を当て、コモン・マーマセット仔の生態を参照し、投影することができる行動の探索を行った。

図3は、二頭のマーマセット幼若仔を対象として1週間齢から1か月齢までの変化を追跡した、抗重力運動試験における被験個体の初期状態である円柱底部における「ぶら下がり体位」を説明する(成果論文 - 、)。

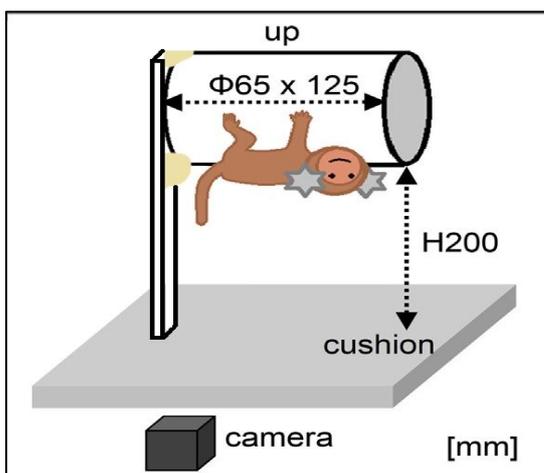


図3： 抗重力運動試験システムと生体初期状態「ぶら下がり体位」

本体位は、親養育時に親の腹部等の体幹に自発的にぶら下がる行動と相似であることが推察される。

予備検討試験における本初期状態にセットされた二頭は共に、1週間齢では、二分間の試験時間内で円柱上半位に四肢を置く「よ

じ登り」行動を画一的に示したことから、初期齢では不随意性の原始反射様の抗重力運動が出現すること、即ち、「よじ登り行動」が原始反射行動モデルの一つかもしれないことが示唆された。この「よじ登り」は出生後直ちに親の体幹に自発的に貼りつき保熱と栄養授受を可能とする目的のために必須の生命維持条件機能であることが推察された。一方、同予備検討研究において、本行動は2-3週間齢へと発達する頃には、「よじ登り」ではなく、積極的に円柱から離れ、地面に飛び降りる、随意的な行動への出現へ移行する傾向として、統計学的に示された。このことから、ヒト新生児が有す、モロー反射などの重力環境刺激依存的に生じる原始反射などの初期齢期における出現から初期環境学習の過程で神経発達依存的に消失と移行、新たに出現する乳児期特異的な比較生物学的行動パターンの存在を仮説し、本研究の周生期型長類モデル個体を対象に探索・検討を試みた。

本分析検討に供すことができた実験統制下の個体は、前章の被験個体のうち、低酸素暴露群3頭、体表群3頭であった。出生後24時間以内の最初期齢において、低酸素暴露30分の直前と、曝露直後の二回、本行動試験の各2分間の記録を行った。周生期の個体においても、その基本的な行動は、予備検討仮説の通り、円柱垂直上半位に四肢が自発的にたどり着く「よじ登り」であることから、これを原始反射様行動と仮説を立てた。よじ登りの実行達成までの時間を測定するため、四肢が円柱上半位に達するまでの時間(最長2分)を図4グラフの縦軸指標とし、対照群(図4)および低酸素暴露群(図4)の曝露前後の比較を行った。

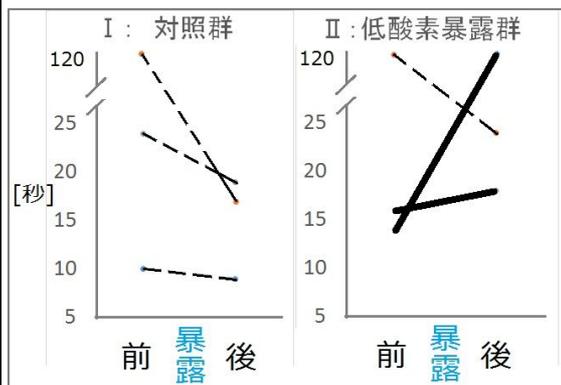


図4： 抗重力運動試験二分間における四肢が円柱中央より上位に達する時間(秒)

対照群(図4)は曝露試験後いずれも、30秒以内に四肢が円柱中央より上位に達したが、低酸素暴露群(図4)は、内、二頭が曝露前よりも曝露後に、よじ登り達成時間の延長が起こった。

対照群はいずれも、曝露前より、曝露後に、よじ登り行動の達成までの時間短縮が生じた。このことは、周生期に触れる環境の感覚

受容と学習が起こり、数時間以内に記憶形成され、適応行動が実行された可能性が示唆される。一方、低酸素暴露群中の二頭に、実行時間の延長が生じたことから、重力下の環境に適応するための学習や、同運動の実行制御そのものに関わる神経の機能低下を示唆する定量的表現を得た可能性がある。低酸素暴露群の一頭は、暴露後によじ登り行動の短縮が生じ、環境適応の学習が行えた可能性がある。この個体において、よじ登り行動達成時間の延長を示した他の二個体に対し、特に差異のあった指標を探索してみると、低酸素暴露中の SpO₂ 値のリバウンド時における、手足の一部の運動量が大きい点があげられるかもしれない。低酸素ストレス負荷時の運動の質、または、量の調節により、神経障害を抑制できる作業療法的な効用の可能性があるのかもしれない。

これらの少ない個体数での仮説は、今後、検証を重ねる必要があり、機能分子の探索と共に、病因を探り、HIE 治療・療育法の開発に資する霊長類モデル開発の発展を予定する。

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 13 件)

Koshiba M, Karino G, Mimura K, Nakamura S, Yui K, Kunikata T, Yamanouchi H. Psycho-Cognitive Intervention for ASD from Cross-Species Behavioral Analyses of Infants, Chicks and Common Marmosets. CNS & Neurol Disorders - Drug Targets, 査読有 15(5): 578-586. 2016, DOI: [10.2174/1871527315666160413121613](https://doi.org/10.2174/1871527315666160413121613)

Homberg JR, Kyzar EJ, Nguyen M, Norton WH, Pittman J, Poudel MK, Gaikwad S, Nakamura S, Koshiba M, Yamanouchi H, Scattoni ML, Ullman JF, Diamond DM, Kaluyeva AA, Parker MO, Klimenko VM, Apryatin SA, Brown RE, Song C, Gainetdinov RR, Gottesman II, Kalueff AV. Understanding autism and other neurodevelopmental disorders through experimental translational neurobehavioral models. Neurosci Biobehav Rev. 査読有、2016 Jun;65:292-312、10.1016/j.neubiorev.2016.03.013

Abe Y, Sakai T, Okumura A, Akaboshi S, Fukuda M, Haginoya K, Hamano SI, Hirano K, Kikuchi K, Kubota M, Lee S, Maegaki Y, Sanefuji M, Shimozato S, Suzuki M, Suzuki Y, Takahashi M, Watanabe K, Mizuguchi M, Yamanouchi H. Manifestations and characteristics of congenital adrenal hyperplasia-associated encephalopathy. Brain Dev. 査読有、2016 Aug;38(7):638-47. doi: 10.1016/j.braindev.2016.01.007.

Homberg JR, Kyzar EJ, Stewart AM, Nguyen M, Poudel MK, Echevarria DJ, Collier AD, Gaikwad S, Klimenko VM, Norton W, Pittman J, Nakamura S, Koshiba M, Yamanouchi H, Apryatin SA, Scattoni ML, Diamond DM, Ullmann JF, Parker MO, Brown RE, Song C, Kalueff AV. Improving treatment of neurodevelopmental disorders: recommendations based on preclinical studies. Expert Opin Drug Discov. 査読有、2016;11(1):11-25、10.1517/17460441.2016.1115834

是松聖悟、山内秀雄。「MRI 検査時の鎮静に関する共同提言」からの発展と課題、脳と発達、査読有、48 卷(1)、2916 年、107-110

森田 佳代, 阿部 裕一, 板野 篤志, 武者 育麻, 古賀 健史, 山崎 太郎, 山内 秀雄. Chloramphenicol が著効した小児難治性細菌性髄膜炎の 4 例. 脳と発達、査読有、48(1) 29-33 (2016.01)

Abe Y, Terashima H, Hoshino H, Sassa K, Sakai T, Ohtake A, Kubota M, Yamanouchi H. Characteristic MRI features of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. Brain Dev. 査読有、2015 Oct;37(9):894-6. doi: 10.1016/j.braindev.2015.01.006.

Norikazu Ikoma, Mamiko Koshiba, Motion Estimation of Deformable Target over Infrared Camera Video in Coarse Resolution with Possible Frame-Out of Target by particle Filter, IEEE, Control Conference (ASCC) 10th Asian, 査読有、pp.1-6, 2015

Genta Karino, Takayuki Murakoshi, Shun Nakamura, Tetsuya Kunikata, Hideo Yamanouchi, Mamiko Koshiba Timing of changes from a primitive reflex to a voluntary behavior in infancy as a potential predictor of socio-psychological and physical development during juvenile stages among common marmosets. Journal of King Saud University - Science, 査読有、pp. 1-8, 2015

Mamiko Koshiba, Aya Senoo, Genta Karino, Shinpei Ozawa, Koki Mmimura, Ikuko Tanaka, Yoshiko Honda, Setsuo Usui, Tohru Kodama, Shun Nakamura, Tetsuya Kunikata, Hideo Yamanouchi, Hironobu Tokuno, Susceptible period of socio-emotional development affected by constant exposure to daylight. Neuroscience Research, 査読有、pp; 9391-9398, 2015, 10.1016/j.neures.2014.09.011

Genta Karino, Wakako Tsugawa, Koji Sode, Takayuki Murakoshiz, Tetsuya Kunikata, Hideo Yamanouchi, Mamiko Koshiba, Common marmosets' developing generation specific peer social experiences might affect their adult

bodyweight adaptation to climate. *Stress, Brain & Behavior*, 査読有、 pp. 1-6, 2015
Suzuki S, Sassa K, Abe Y, Yamanouchi H. Generalized seizure with falling and unresponsive staring provoked by somatosensory stimulation: a video-EEG study. *Epileptic Disord.* 2015 Sep;17(3):336-9. doi: 10.1684/epd.2015.0761. PMID: 26235696

Koki Mimura, Hirohisa Kishino, Genta Karino, Etsuko Nitta, Aya Senoo, Kentaro Ikegami, Tetsuya Kunikata, Hideo Yamanouchi, Shun Nakamura, Kan Sato, Mamiko Koshiba, Potential of a smartphone as a stress-free sensor of daily human behaviour. *Behavioral Brain Research*, 査読有、 276(1), pp.181-189, 2015、 10.1016/j.bbr.2014.06.007

Mamiko Koshiba, Hiroko Kakei, Masakazu Honda, Genta Karino, Mamoru Niitsu, Toru Miyaji, Hirohisa Kishino, Shun Nakamura, Tetsuya Kunikata, Hideo Yamanouchi, Early-infant diagnostic predictors of the neuro-behavioural development after neonatal care. *Behavioral Brain Research*, 査読有、 276(1), pp.143 - 150, 2015, 10.1016/j.bbr.2014.06.007

〔学会発表〕(計5件)

(国際基調講演) Hideo Yamanouchi, International symposium on acute encephalopathy in infancy and its related disorders. The 18th annual meeting of infantile seizure society 2016年07月1日、一橋会館、東京

(国際招待講演) Hideo Yamanouchi, Acute encephalopathy in infancy and its related disorders. The 8th international regional (Asia) ISBS neuroscience and biological psychiatry “stress and behavior” conference, The international stress and behavior society. 2016年07月23日、東京都市大学、横浜

(招待講演) 小柴満美子, 笥 紘子, 櫻井隼人, 本多正和, 森田佳代, 小澤晋平, 西村邦弘, 中村 俊, 新津 守, 國方徹也, 山内秀雄, 衣食住・社会環境と神経系情報を包括視する発達診断および療育への可能性、第58回日本小児神経学会学術集会シンポジウム、2016年6月3日、京王プラザ、東京

(国際招待講演) Hideo Yamanouchi 国際行動ストレス学会、2015年07月26日神戸大学

(招待講演) 山内秀雄, 結節性硬化症の治療 これまでとこれから第57回日本小児神経学会 2015年05月28日、帝国ホテル、大阪

〔図書〕(計1件)

新島新一、山本仁、山内秀雄、医学書院、こどもの神経疾患の診かた、2016、246頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 秀雄 (YAMANOUCHI, Hideo)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号： 10250226

(2) 研究分担者

小柴 満美子 (KOSHIBA, Mamiko)
埼玉医科大学・医学部・客員准教授
研究者番号： 90415571

(3) 連携研究者

菅 理江 (SUGE, Rie)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号： 10342685

加藤 英政 (KATO, Hidemasa)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 50292123

(4) 研究協力者

古村 眞 (KOMURA, Makoto)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号： 10422289

西村邦弘 (NISHIMURA, Kunihiro)
埼玉医科大学・医学部・研究員

小澤慎平 (OZAWA, Shimpei)
埼玉医科大学・医学部・研究員

依田真由子 (YODA, Mayuko)
埼玉医科大学短期大学・助教

狩野源太 (KARINO, Genta)
埼玉医科大学・医学部・特別研究生

國方 徹也 (KOMURA, Makoto)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号： 50195468

笥 紘子 (KAKEI, Hiroko)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号： 20573877

櫻井 隼人 (SAKURAI, Hayato)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号： 40751938

謝辞：

埼玉医科大学実験動物部門の皆様、優れたモデル動物の養育を支援して下さいましたことに、深く感謝を申し上げます。埼玉医科大学大学病院新生児科の皆様、臨床研究へのご協力を心から感謝を申し上げます。