

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591594

研究課題名(和文) SGA児に対する生後早期GH療法が中枢神経系に与える影響に関する基礎的研究

研究課題名(英文) The study of the neurological effects of GH therapy for SGA rats

研究代表者

早川 昌弘 (Hayakawa, Masahiro)

名古屋大学・医学部附属病院・病院教授

研究者番号：40343206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：胎児発育不全はsmall-for-gestational age (SGA)の原因であり、神経学的後障害のハイリスク群である。神経学的後障害を防ぐために種々の治療介入が試みられてきているがいずれも著効はしていない。本研究によりSGAラットは対照群に比べて新生児期早期、幼若期の行動評価が劣ることが示されて、身体発育と中枢神経発達に関連がある可能性が明らかになった。適切な生後の成長管理がSGA児の発達に重要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Fetal growth restriction is one of the causes of small-for-gestational age (SGA). SGA is high risk of neurological sequelae in later life. Neonatologists have treated to SGA infants in order to prevent from neurological sequelae. However, those treatments were not always effective. In this study, SGA rats had poorer outcome for neurobehavioral tests during early and late infantile period. These findings indicated that neurological development might be related with somatic growth. It is suggested that optimal postnatal care might be important in SGA infants in order to decrease morbidity.

研究分野：胎児新生児医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 胎児・新生児医学

キーワード：胎児発育不全 中枢神経障害 行動評価

1. 研究開始当初の背景

出生体重が在胎週数の平均体重に比して著しく少ない small-for-gestational age (SGA) は種々の原因で発症するが、特に妊娠中期発症の妊娠高血圧症における胎児発育不全 (FGR) が原因の重症 SGA 児は、胎盤を介した慢性の低酸素血症、循環不全、栄養障害などの要因が複合的に作用し、精神発達遅滞、認知障害などの神経学的後障害の原因となっている。我々は、合成トロンボキサ₂ A₂ を持続的に母獣に投与することで妊娠高血圧症を発症させて SGA モデルを作成する方法を独自に開発し、大脳半球総面積/大脳皮質断面面積の減少、神経細胞の遊走遅延、アポトーシス細胞の増加などの組織学的変化が SGA 児における中枢神経障害の病態の一部であることを明らかにしてきた。しかしながら、未だ神経学的予後改善に関する管理法・治療法についての報告はない。

2. 研究の目的

中期～長期的に SGA 児が抱える問題点としては、神経学的後障害以外に乳児期～幼児期の成長障害があげられる。SGA 性低身長に対する治療として、本邦においては 2008 年に成長ホルモン (GH) 療法が承認されたが、身体発育と中枢神経予後との報告は散見されるのみである。従って、本研究は重症 SGA 児が抱える成長障害と発達障害の双方を回避できる治療方法を確立するための基礎的データを提供することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) FGR モデル動物の作成は合成トロンボキサ₂ A₂ にて作成する方法と子宮動脈結紮法にて作成する方法を用いた。

：我々が独自に開発をした手法 (Hayakawa M, *J Society Gynecol Invest* 2006) を用いた。具体的には、SD 系ラットの母獣の腹腔内に、妊娠 13 日目に浸透圧ポンプを埋め込み、合成トロンボキサ₂ A₂ を 20ng/時で持続投与をして、胎児に子宮内発育不全を誘導した。

子宮動脈結紮法にて作成：SD 系ラットの母獣で、妊娠 17 日目に開腹し子宮動脈 4 カ所を 30 分間クランプした後、クランプを解除して閉腹し、妊娠を継続させる。虚血再灌流により胎児に子宮内発育不全を誘導する。新生仔期、幼仔期における検討を行うため通常経膈分娩にて分娩とし、母獣に哺育させる。コントロール群は、開腹して子宮を体外に出すが子宮動脈はクランプせず、FGR 群と同じ時間経過後に閉腹した。

(2) 各々の方法で作成した FGR モデルに対して下記の方法で行動解析を行った。

新生児期の反射獲得：生後 1 日 (P1) から 19 日 (P19) に行った。

・Surface righting reflex：背臥位から寝返りするまでの時間 (秒) を測定し、0-3 点に点数化した。最大 30 秒。0 = 無反応、1 = 15 秒以

上 30 秒以内で達成、2 = 5 秒以上 15 秒未満で達成、3 = 5 秒未満で達成。軸足の引き抜きが不十分な場合、ペナルティーで 1 点減点とした。

・Postural reflex：箱に入れられ上下左右前後に振られた際、四肢を踏ん張って姿勢を維持できるか評価。最大 5 回施行。

・Negative geotaxis：30 度の傾斜板に頭を下に向けておかれたラットが、反転して昇り出すまでの時間 (秒) を測定し、0-5 点に点数化。0 = 無反応、1 = 60 秒以内に達成できない、または中途落下、2 = 60 秒未満で達成、3 = 45 秒未満で達成、4 = 30 秒未満で達成、5 = 15 秒未満で達成。

幼若齢での行動：離乳後のオスラットにつき、生後 3-6 週齢で行動実験を行った。

・Open-field behavior：90cm 四方の箱 (30cm ごとに線で区切られている) にラットを入れ、180 秒間の行動をビデオに記録。1 日 1 回×連続 3 日間施行し、Total movement (通過した四角の数)、center entries (中心の正方形への侵入回数)、rearing (後ろ肢で立ち見上げた回数)、defecation (排泄数)、movement time (動いている時間の累計、3 秒以上の運動停止は静止とみなす) につき評価した。

・Elevated-plus maze：高架式十字迷路 (Med Associates Inc., St. Albans, VT) の中央にラットを置き、300 秒間の行動をビデオに記録。1 日 1 回×連続 3 日間施行し、closed arm および open arm への進入回数を評価した。

・Rotarod treadmill：4 rpm から 40 rpm へと加速する回転棒 (Med Associates Inc.) にラットを乗せ、落ちるまでの時間を測定。最大 300 秒間。3 時間空けて、1 日 2 回×連続 2 日間施行した。

・Shuttle avoidance：Shuttle box (Med Associates Inc.) にて能動的回避学習反応を評価した。Shuttle box 内は二つの部屋に仕切られ、左右の部屋は自由に行き来できる。1 回の施行では、5 秒間の音の光の条件刺激の後、電気刺激 (0.5mA) がラットの滞在する部屋にのみ与えられる。20 回の施行の内、条件刺激の段階で隣の部屋に逃避して電気刺激を回避できた割合 (avoidance rate) を評価した。1 日 1 回×連続 4 日間施行。その他、回避および逃避の潜時等のパラメーターを MED-PC IV program により算出した。

4. 研究成果

(1) 出生体重：

合成トロンボキサ₂ A₂ にて作成した FGR：一母獣当たりの出生数に差はなかった。FGR 群では出生後から P18 まで有意に体重が小さかった (図 1)。P1 と P7 において、FGR の脳重量はいずれも

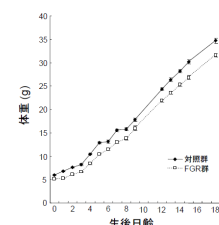


図 1. 合成トロンボキサ₂ にて作成した FGR ラットの体重

対照群より小さかったが、脳重量（前脳、小脳、脳幹）の体重に占める割合は有意に大きかった（図2）。

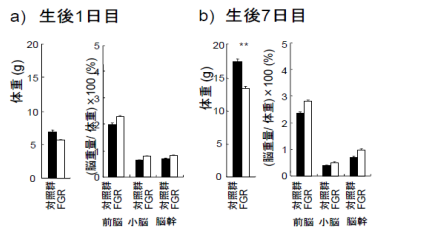


図2. FGRラットの脳重量

子宮動脈結紮法で作成した FGR: 子宮動脈結紮法で作成した FGR の体重推移は次に示す結果であった（図2）。出生体重：FGR 群 $4.78 \pm 0.18\text{g}$ 、コントロール群 $5.30 \pm 0.11\text{g}$ ($p < 0.05$) 出生後の体重推移：日齢1：FGR 群 $5.25 \pm 0.18\text{g}$ 、コントロール群 $5.90 \pm 0.15\text{g}$ ($p < 0.05$) 日齢2：FGR 群 $5.77 \pm 0.27\text{g}$ 、コントロール群 $6.75 \pm 0.21\text{g}$ ($p < 0.01$) 日齢3：FGR 群 $6.44 \pm 0.35\text{g}$ 、コントロール群 $7.46 \pm 0.27\text{g}$ ($p < 0.05$) 日齢4：FGR 群 $7.51 \pm 0.42\text{g}$ 、コントロール群 $8.14 \pm 0.35\text{g}$ (有意差なし)

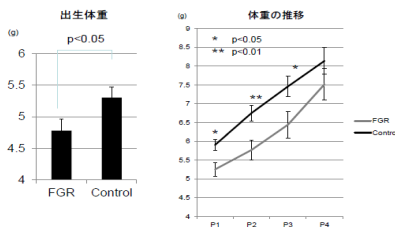


図3. 子宮動脈結紮法にて作成したFGRラットの体重

(2) 行動評価

各々の FGR モデルを用いて行動評価を行った。合成トロンボキサンで作成した FGR モデルについては幼若期の評価に加えて新生児期の評価を行った。

合成トロンボキサンで作成した FGR モデルの行動評価 -新生児期の反射の獲得-

- ・Surface righting reflex および negative geotaxis の獲得は、FGR で有意に遅れていた（図4a, c）。
- ・Postural reflex では、有意ではないが FGR で反射獲得が遅れる傾向を認めた（図4b）。

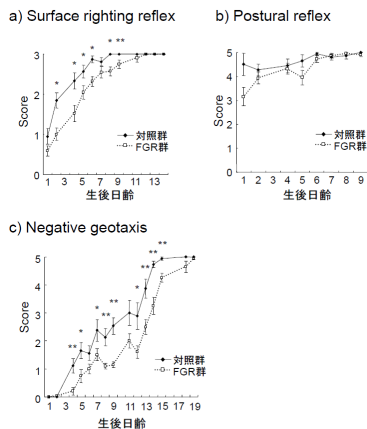


図4. 新生児期の反射

合成トロンボキサンで作成した FGR モデルの行動評価 -幼若期での行動実験-

- ・Open-field（図5）および elevated plus maze（図6）では、両群で差を認めなかった。

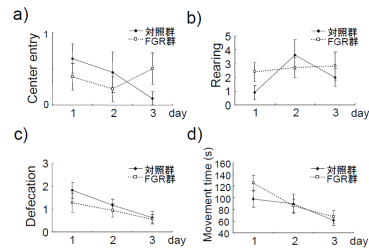


図5. 幼若期の行動実験（オープンフィールド）

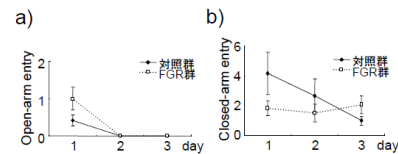


図6. 幼若期の行動実験（エレベイトプラスメイズ）

・Rotarod（図7）では、1日目1回目の施行では両群に差を認めなかったが、その後の試行で対照群では落下時間の遅延を認めたのに対し、FGR 群では有意に早く落下した。

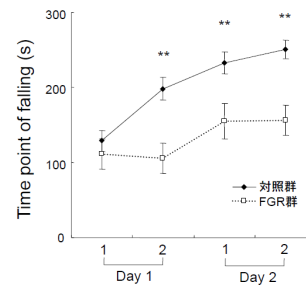


図7. 幼若期の行動実験（ロータロッド）

Shuttle avoidance では、total activity, 平均逃避潜時、平均回避潜時では差を認めなかったが、FGR 群で avoidance rate が有意に低かった（図8）。

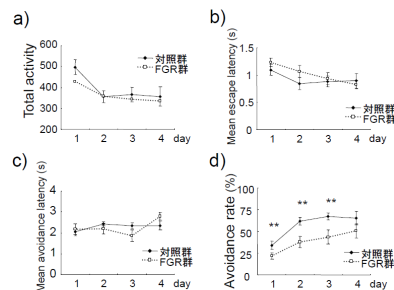


図8. 幼若期の行動実験（シャトルアポイダンス）

子宮動脈結紮法で作成した FGR モデルの行動学的評価

ロータロッド（2回/日 2日連続試行）およびシャトル・アポイダンス（20session/日 4日連続試行）を行った。ロータロッドの結果（落下までの時間（秒））は、FGR 群で1回

目 133.6±29.5 秒、2 回目 188.0±24.0 秒、3 回目 203.4±23.9 秒、4 回目 233.1±21.7 秒、対照群で 1 回目 169.1±18.2 秒、2 回目 194.0±19.5 秒、3 回目 193.8±23.8 秒、4 回目 210.8±20.7 秒であり、有意差を認めなかった。シャトル・アボイダンスの結果（回避率（%））では、FGR 群で日齢 1；22.5±5.5%、日齢 2；62.5±10.5%、日齢 3；64.4±8.8%、日齢 4；68.1±8.2%、対照群で日齢 1；31.8±3.9%、日齢 2；70.5±4.3%、日齢 3；79.5±3.4%、日齢 4；83.2±3.5%であり、有意差を認めなかった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)

Usui N, Nagata K, Hayakawa M, Okuyama H, et al. (8人中3番目). Pneumothoraces as a fatal complication of congenital diaphragmatic hernia in the era of gentle ventilation. *Eur J Pediatr Surg*. 2014;24(1):31-8. (査読有)
DOI: 10.1055/s-0033-1357753.

Tsuda H, Kotani T, Sumigama S, Mano Y, Hua L, Hayakawa H, Hayakawa M, et al. (9人中7番目). Effect of placenta previa on neonatal respiratory disorders and amniotic lamellar body counts at 36-38weeks of gestation. *Early Hum Dev*. 2014;90(1):51-4. (査読有)

DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2013.10.005.
Hayakawa M, Ito Y, Saito S, Mitsuda N, et al. (15人中1番目) Neonatal M. Incidence and prediction of outcome in hypoxic-ischemic encephalopathy in Japan. *Pediatr Int*. 2014;56(2):215-21. (査読有)
DOI: 10.1111/ped.12233.

早川 昌弘. 新生児における再生医療/幹細胞療法. 日本未熟児新生児学会雑誌 26 巻 1 号 44-46 頁 2014 (査読なし)

Watanabe Y, Tsuda H, Kotani T, Sumigama S, Mano Y, Hayakawa M, et al. (8人中6番目) Amniotic lamellar body count and congenital diaphragmatic hernia in humans and in a rat model. *Pediatr Res*. 2013;73(3):344-8. (査読有)
DOI: 10.1038/pr.2012.187.

Torii Y, Kimura H, Ito Y, Hayakawa M, et al. (16人中4番目). Clinicoepidemiologic status of mother-to-child infections: a nationwide survey in Japan. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32(6):699-701. (査読有)
DOI: 10.1097/INF.0b013e3182897c36.

Takahashi S, Sago H, Kanamori Y, Hayakawa M, Okuyama H, Inamura N, Fujino Y, Usui N, Taguchi T, et al. (9人中4番目) Prognostic factors of congenital diaphragmatic hernia accompanied by cardiovascular malformation. *Pediatr Int*. 2013;55(4):492-7. (査読有) DOI: 10.1111/ped.12104.

Sato Y, Kawataki M, Hirakawa A,

Toyoshima K, Kato T, Itani Y, Hayakawa M. (7人中7番目) The diameter of the inferior vena cava provides a noninvasive way of calculating central venous pressure in neonates. *Acta Paediatr*.

2013;102(6):e241-6. (査読有)

DOI: 10.1111/apa.12247.

Nagata K, Usui N, Kanamori Y, Takahashi S, Hayakawa M, et al. (9人中5番目) The current profile and outcome of congenital diaphragmatic hernia: a nationwide survey in Japan. *J Pediatr Surg*. 2013;48(4):738-44. (査読有)

DOI: 10.1016/j.jpedsurg.2012.12.017.

Ito Y, Kimura H, Torii Y, Hayakawa M, et al. (16人中4番目) Risk factors for poor outcome in congenital cytomegalovirus infection and neonatal herpes on the basis of a nationwide survey in Japan. *Pediatr Int*. 2013;55(5):566-71. (査読有)

DOI: 10.1111/ped.12122.

Ichinohashi Y, Sato Y, Saito A, Ito M, Watanabe K, Hayakawa M, et al. (9人中6番目) 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. (査読有)

DOI: 10.1016/j.earlhumdev.2012.10.007.

Ibi D, Nagai T, Nakajima A, Mizoguchi H, Kawase T, Tsuboi D, Kano S, Sato Y, Hayakawa M, et al. (17人中9番目) Astroglial IFITM3 mediates neuronal impairments following neonatal immune challenge in mice. *Glia*. 2013;61(5):679-93. (査読有)

DOI: 10.1002/glia.22461.

Hayakawa M, Ito M, Hattori T, et al. (10人中1番目) Effect of hospital volume on the mortality of congenital diaphragmatic hernia in Japan. *Pediatr Int*.

2013;55(2):190-6. (査読有)

DOI: 10.1111/ped.12059.

林 誠司、松沢 要、山本 ひかる、藤巻 英彦、伊東 真隆、加藤 英子、安田 彩子、加藤 徹、早川 昌弘. 成熟児の asphyxia と cerebral palsy その疫学と治療/予後 低酸素性虚血性脳症の神経学的予後予測における慢性期 MRI と経時的脳波所見の有用性について. 周産期学シンポジウム 31 号 87-91 頁. 2013 (査読なし)
佐藤 義朗、岩田 欧介、加藤 徹、早川 文雄、久保田 哲夫、丸山 幸一、長谷川 正幸、大城 誠、鬼頭 修、奥村 彰久、早川 昌弘. 成熟児の asphyxia と cerebral palsy その疫学と治療/予後 出生前・出生時は軽微な異常だが、遅発性・進行性の症状を呈する周産期脳障害. 周産期学シンポジウム 31 号 83-86 頁 2013 (査読なし)

早川 昌弘 . 周産期学シンポジウム アンケート調査報告 本邦における新生児低酸素性虚血性脳症の現状と病態に関する研究 . 周産期学シンポジウム 31号 23-27頁 2013 (査読なし)

(3) 連携研究者
服部 哲夫 (HATTORI Tetsuo)
名古屋大学・医学部附属病院・医員
研究者番号 : 0 0 5 7 1 3 2 4

[学会発表] (計 6 件)

早川 昌弘 . Preterm 児の CP ~ Late preterm 児 (34 ~ 36 週) の低酸素性虚血性脳症 ~ 第 32 回周産期学シンポジウム (招待講演) 2014 年 2 月 9 日 ~ 10 日 . 九州大学百年講堂 (福岡市)

Hayakawa M, Ito Y, Saito S, Mitsuda N, Hosono S, Yoda H, et al. Incidence and prediction of outcome in hypoxic-ischemic encephalopathy in Japan. Hot topics in Neonatology 2013. Dec 8-11, 2013. Washington DC, USA

早川 昌弘 . 新生児における再生医療/幹細胞療法 . 第 58 回日本未熟児新生児学会 (招待講演) 2013 年 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日 . 石川県立音楽堂 (金沢市)

早川 昌弘 . 本邦における新生児低酸素性虚血性脳症の現状と病態に関する研究 第 31 回周産期学シンポジウム (招待講演) 2013 年 2 月 2 日 ~ 3 日 . 大阪国際会議場 (大阪市)

早川 昌弘 . 新生児の診断・治療 up to date 新生児医療における脳機能モニタリングの活用 . 第 116 回日本小児科学会学術集会 (招待講演) . 福岡国際会議場 (福岡市) . 2012.4.20-22

Hayakawa M, Usui N, Kanamori Y, Okuyama H, Inamura N, Takahashi S, Fujino Y, Taguchi T. Nationwide Survey on the Current State of Congenital Diaphragmatic Hernias in Japan. Hot topic in Neonatology 2011. Dec 4-6, 2011. Washington DC, USA

[その他]

ホームページ

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical/6391/6444/shuusanboshiigaku.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

早川 昌弘 (HAYAKAWA Masahiro)
名古屋大学・医学部附属病院・病院教授
研究者番号 : 4 0 3 4 3 2 0 6

(2) 研究分担者

奥村 彰久 (OKUMURA Akihisa)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号 : 6 0 3 0 3 6 2 4

佐藤 義朗 (SATO Yoshiaki)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号 : 3 0 4 3 5 8 6 2