

機関番号：34412

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590239

研究課題名(和文) ラット新生仔低酸素虚血脳障害に対する環境温度の効果の容易な行動機能実験による評価

研究課題名(英文) Effects of ambient temperatures on rat neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy assessed using simple behavioral tests.

研究代表者

細野 剛良 (HOSONO TAKAYOSHI)

大阪電気通信大学・医療福祉工学部・教授

研究者番号：60294104

研究成果の概要(和文)：

解決すべき課題であるヒトの出生時の低酸素虚血脳障害に関連して、障害時の環境温度の影響を動物モデルを用いて行動学的に検討した。高環境温でモデルを作成した群では、常環境温群・低環境温群・正常対照群と比較して、成長後に、運動の習得の遅れ、学習の遅れを生じたが、脳の解剖学評価では、有意な差異を認めなかった。新生仔低酸素虚血脳障害モデルでは成長後の運動・記憶能力の遅れは生じるが脳の形態には差異がない。

研究成果の概要(英文)：

Human neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy is one of the most important problems to be solved. Concerning this topic, we produced rat models of hypoxic-ischemic encephalopathy at various ambient temperatures on insult, and assessed motor and learning ability after reaching maturity using simple behavioral tests. The hypoxic-ischemic encephalopathy model rats produced at high ambient temperatures showed retardation of motor and learning abilities compared to those produced at normal ambient temperatures and controls. However, there was no anatomical difference in the brain morphology. These results suggest a discrepancy between the brain anatomy and behavior of rat models of hypoxic-ischemic encephalopathy at various ambient temperatures on insult.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学(含体力医学・栄養生理学)

キーワード：低酸素虚血脳障害、環境温度、新生児、動物モデル、行動学的評価、運動、学習

## 1. 研究開始当初の背景

(1)ヒトにおける新生児低酸素虚血脳障害

①分娩の際に新生児の低酸素虚血脳障害を生じることがある。近年の新生児医療技術の向上によりこれらの新生児が救命される機会も増えたが、逆にこれらは成長後の脳障害などを持つ患児の増加につながっている。

②新生児の脳障害に対する環境温度の影響

が注目されている。胎児にとっての環境温度である母体の核心温が上昇した時に低酸素虚血障害を受けた新生児が出生した場合、低酸素虚血脳障害の発症頻度が増加し、その重篤性が増すことが報告されている。

③新生児脳低温療法も注目される。これは低酸素虚血脳障害を受けた新生児の頭部あるいは全身を一定時間 34～35℃程度に保つも

のである。新生児脳低温療法の有効性の報告はあるが、必ずしも確立されたものではない。(2)動物モデルにおける新生児低酸素虚血脳障害

①新生児低酸素虚血脳障害の研究には、ラットの新生児低酸素虚血脳障害モデルが用いられる。しかし、上記(1)②③を模擬することを目的として、モデルの作成時の環境温度の影響を検討する研究はほとんど行われていなかった。

②新生児低酸素虚血脳障害モデルの評価は、脳の形態を組織学的に検討したものや生理活性物質の定量を行うものが大部分で、成長後の行動機能について、環境温度の観点で検討した研究はほとんどなかった。この理由として、機能障害は行動実験によって評価が可能であるが、行動実験には煩雑な動物の訓練や長い測定時間が必要な場合が多く、実施が困難なことが挙げられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、新生児の低酸素虚血脳障害あるいは脳低温療法を模擬するようなさまざまな環境温度の条件下で作成した新生児低酸素虚血脳障害動物モデルを用い、1回の試行時間が短く、極力訓練を要しない行動機能実験を行って、成熟後の機能評価とそれにつながる要因を明らかにしようとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 新生児低酸素虚血脳障害モデル・ラットの作成

日齢7のWistar新生児ラットの左総頸動脈の剥離・結紮・切断後8%酸素・環境温40°Cを15分負荷し新生児低酸素虚血脳障害モデル群を作成した。その後、ルーム・エアにて高環境温(40°C)、あるいは常環境温(37°C)、低環境温(33°Cまたは30°C)下に一定時間収容した。その後、母獣に哺育させた。正常対照として、総頸動脈を剥離するも結紮切断しない対照群も作成した。

### (2) 行動機能評価

測定は週齢8から週齢11のモデル動物を用いた。

#### ①ロータロッドテスト

9cm径のロータロッドを、1日目5rpm・2日目5rpm・3日目7rpmで回転させ、ロッドへの滞在時間を1分を上限に3日間にわたり測定した。

#### ②ステップダウン型受動回避テスト

30cm立方の金属グリッド床の実験箱に動物を入れた。床面には10cmの絶縁プラットホームを置いた。初日には、ラットをプラットホーム上に載せ、床面に降りた後に電撃を与えた。翌日以降、5日間にわたり絶縁プラットホーム上の動物の滞在時間を測定した。

#### ③Morris水迷路テスト

直径150cm水深22cmの黒色水のプール内に高さ20cmのゴール・プラットホームを設置した。0日目にプールの一端的スタート位置よりラットを泳がせ、ゴールまでの到達時間を測定した。以後4日間、上限120秒1日5試行のゴールまでの到達時間の測定を行った。動物の移動所要時間はビデオ・トラッキング・システムにより測定した。

### (3) 解剖学的検討

測定の完遂後、深麻酔下にモデルをホルマリン灌流し脳を摘出した。形態評価として脳のサイズを種々の部位にて測定した。またスライス標本作製し、HE染色あるいはMAP-2染色の上、大脳皮質、海馬などの神経細胞数を計数した。

### (4) 倫理的配慮

本研究は大阪電気通信大学生体倫理委員会の審査・承認のもと実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究の主な成果

#### ①ロータロッドテスト

低環境温群(n=16, 30°C, 12時間)、常環境温群(n=18, 37°C, 12時間)、対照群(n=8)を用いた。週齢8に検討を行った。2日目に、常環境温群(図1, Normothermic)のロッド上の滞在時間(図1, Retention time)は、低環境温群(図1, Hypothermic)、対照群(図1, Control)に比べて有意に短かった(p<0.05, 以下同)。1日目、3日目にはロッド滞在時間に有意差を認めなかった。健側大脳半球最大幅に対する障害側大脳半球最大幅の比(Brain width index, 以下BWI)の解剖学的な検討では、常環境温群のBWIは低環境温群、対照群に比して有意に小さかった。2日目のロッド滞在時間と常環境温群のBWIの間には有意な相関は認めなかった。

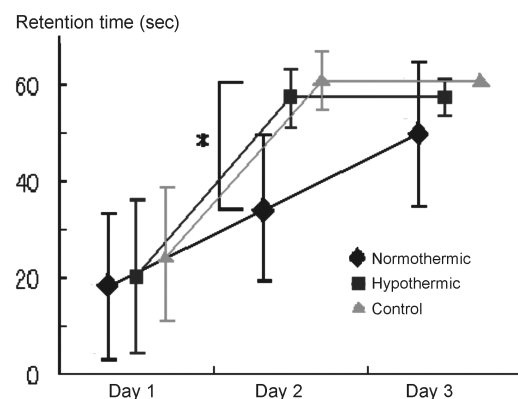


図1

#### ②ステップダウン型受動回避テスト

低環境温群(n=6, 33°C, 80分)、常環境温群(n=7, 37°C, 80分)、高環境温群(n=6, 40°C, 80分)、対照群(n=6)を用いた。週齢9に検討

を行った。0日目(図2, AC)に嫌悪体験学習をさせ、以後1日目から5日目までの絶縁プラットホーム滞在時間(図2, Retention time)を検討した。1日目には常環境温群(図2, Normothermic)・高環境温群(図2, Hyperthermic)は、低環境温群(図2, Hypothermic)・対照群(図2, Control)と比してプラットホーム滞在時間が有意に短かった。同様の有意差は2日目にも認められた。さらに2日目には、常環境温群と高環境温群の間にも有意差が認められた。3日目以降は各群の間に有意差を認めなかった。解剖学的検討では、高環境温群が対照群・低環境温群・常環境温群と比して有意にBWIが小さかった。絶縁プラットホーム滞在時間とBWIの間に有意な相関は認めなかった。海馬・大脳皮質領域における単位面積あたりの神経細胞数には各群の間に有意差を認めなかった。

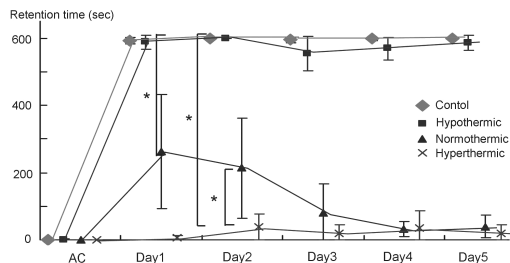


図 2

### ③Morris 水迷路テスト

高環境温短群(n=4, 40°C, 30分)、高環境温長群(n=5, 40°C, 60分)、およびそれぞれの対照として、対照短群(n=5)、対照長群(n=4)を用いた。週齢11に検討を行った。評価指標は0日目のゴール到達平均時間に対する各測定日のゴール到達時間の比(図3, Time length (%))とした。高環境温短群(図3, High Ta short)、高環境温長群(図3, High Ta long)、対照短群(図3, Control short)、対照長群(図3, Control long)ともゴール到達時間は日の経過により減少したが、2日目から4日目において高環境温長群と対照長群の間に有意差を認めた。

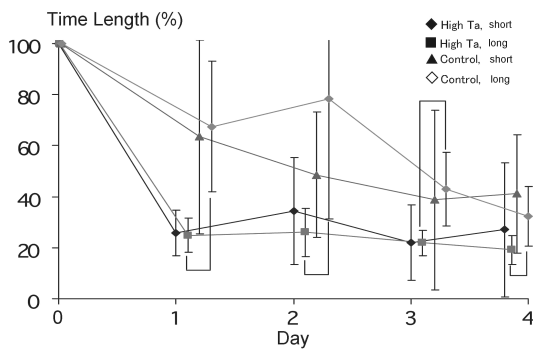


図 3

解剖学的検討では、高環境温長群が高環境温短群・対照長群・対照短群と比してBWIが小さい傾向があったが、ゴール到達時間とBWIの間に有意な相関は認めなかった。

(2)得られた成果の国内外における位置付け  
論文発表あるいは国際学会・国内学会の発表を通じて、本研究によって得られた新たな知見と解決すべき課題の報告を行った。

①「高環境温度下に低酸素虚血脳障害を与えることによって、ヒトの臨床現場における所見をよく模擬する新生仔低酸素虚血脳障害モデルの作成が可能となった。」

従来の新生仔低酸素虚血脳障害モデルの障害時には酸素8%・環境温度37°C・2時間のような長時間の低酸素曝露が行われていた。しかし、現実にはヒトの臨床において2時間もの低酸素環境が続く可能性は低い。本研究のモデル作成条件は、よりヒトの臨床現場の状況に近いモデル作成を可能にした。

②「低酸素虚血障害時に高環境温とした新生仔低酸素虚血脳障害モデルは、対照あるいは低環境温におかれた群と比較して、運動習得能力あるいは学習記憶能力について劣る。」

従来の新生仔低酸素虚血脳障害モデルの機能行動実験は煩雑な動物の習熟トレーニングを要するものが多かった。本研究の評価手法はトレーニングは容易であり、測定は短時間に終了する。今回の検討により上記のような結果が得られ、評価方法の妥当性の証明ができたことにより、新生仔低酸素虚血脳障害モデルの機能評価の容易な実施が可能となった。

③「行動機能実験の結果とマクロな解剖学的な所見には相関を認めない。」

高環境温によって脳のサイズの縮小が見られることは予想されたが、行動機能実験の結果と脳の解剖学的評価結果の間に相関がないことは、研究の実施前には予測されなかった知見である。

### (3)今後の展望

①「運動習得能力や学習記憶能力の減退は、いつの時期から生じているのか？幼若時から存在するのか？また、それらは成長に伴い対照と比して減少するのか。増加するのか。」

今回は成長後の個体を用いて行動機能実験を実施している。しかし、成長のどの段階にて運動習得能力や学習記憶能力の差が生じたかの評価は今回の諸手法では困難である。さらに若い週数にて運動能力や学習能力の評価ができるような研究手法の開発あるいは評価が必要である。

②「新生仔低酸素虚血脳障害モデルの幼若時に存在する脳の組織学的なダメージは成長後に消失しているのか、あるいは、そのまま存在しているのか？」

今回の検討で得られた行動機能評価成績と解剖学的成績の相違について検討する必要がある。脳の検討対象領域として海馬・大脳皮質以外の部位の検討や、神経細胞そのものの分布の評価、線維連絡の解明などの検討が必要である。

今回の検討結果に加えて①②の課題に一定の成果が得られれば、ヒトの臨床現場の現実に近い新生仔低酸素虚血脳障害モデルが確立され、ヒトの新生児の低酸素虚血脳障害の予防法・治療法などの開発に、一定の有用な情報を提供できよう。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

①Hosono T, Kamo A, Hakotani S, Minato K, Akeno H, Taguchi Y, Miyano A, Iseki T. Effect of hypothermia on motor function of adult rats after neonatal hyperthermic hypoxic-ischemic brain insult. *European Journal of Applied Physiology* 109(1), 35-9, 2010. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

①Hosono T, Hakotani S, Iseki T, Akeno H, Taguchi Y, Miyano A, Minato K. Effects of hypothermia on spatial learning and memory in adult rats after neonatal hyperthermic hypoxic ischemic brain insult. *Neuroscience 2010*, 2010/11/13-17, San Diego (Convention Center), USA.

②Hosono T, Kamo A, Hakotani S, Minato K, Akeno H, Taguchi Y, Miyano A. Effect of hypothermia on motor function of adult rats after neonatal hypoxic ischemic brain insult. *The 3rd International Symposium on Physiology and Pharmacology of Temperature Regulation 2009 (PPTR2009)*. 2009/7/23-26/, Matsue (Kunibiki Messe), Japan.

③湊健志、細野剛良. 新生仔低酸素虚血脳症に対する環境温の効果の行動学的及び解剖組織学的評価. 第61回日本産科婦人科学会総会, 2009/4/3-5, 京都市(国立京都国際会館).

④湊健志、細野剛良. 新生仔低酸素虚血脳障害の効果の自発運動による評価. 第47回日本生気象学会大会, 2008/11/23-24, 奈良市(奈良女子大学).

## 6. 研究組織 (1)研究代表者

細野 剛良 (HOSONO TAKAYOSHI)

大阪電気通信大学・医療福祉工学部・教授  
研究者番号: 60294104