

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：72611

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16908

研究課題名（和文）妊娠初期の胎児への一過性アルコール暴露が脳発生に与える影響

研究課題名（英文）Effects of transient alcohol exposure to the fetus in early pregnancy on brain development

研究代表者

塚本 晃海（YURIMOTO, Terumi）

公益財団法人実験動物中央研究所・マーモセット医学生物学研究部・主任

研究者番号：80806985

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：研究期間をとおして、胎児の脳血流の観察技術の確立を実現するため、造影CTによる胎児の3次元構造の詳細解析、エコー装置による胎児血流の観察方法の確立と標的血管の血流速の測定、覚醒状態での胎児MRI撮影のための保定器の新規設計と作製を実施した。特にマーモセット妊娠個体のエコー検査による血流計測は毎週実施し、脳底動脈は頸動脈と思われる脳への腫瘍血管の描写と、パルスドプラーモードによる血流速の測定を行った。また、マーモセットを無麻酔でMRIやMR Angiographyの実施は従来の設備では実施できなかったため、本研究期間に新しく3Dプリンターで設計、作成を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非ヒト霊長類であるマーモセットはマウスよりも薬物の催奇形性の影響がヒトと類似していること、脳が大きく、発達していることの2点から胎児発達の研究に有用である。本研究は予防の困難な妊娠発覚前の飲酒に焦点を当て、妊娠初期のアルコール暴露が胎児の発達に与える長期的な影響を血液循環の面から理解することを第一の目標としているが、胎生期の脳血流の測定技術の確立は自閉症や発達障害のような様々な疾患モデルでも使用できる汎用性が高い研究である。そのため、様々な疾病の理解につながる社会的、学術的意義が高い研究である。

研究成果の概要（英文）：During this research period, in order to realize the establishment of a technique for observing fetal cerebral blood flow, we conducted a detailed analysis of fetal three-dimensional structures using contrast-enhanced CT, established a method for observing fetal blood flow using an echo system and measuring blood flow velocity in target blood vessels, and designed a new holding device for fetal MRI imaging in the awake state. In particular, echo blood flow measurements were taken weekly in pregnant marmosets to image the major blood vessels of the brain, thought to be basilar arteries and carotid arteries, and to measure blood flow velocities in pulsed doppler mode. As MRI and MR Angiography of awake marmosets cannot be performed with existing equipment, a new restrainer was designed using a 3D printer during this study period.

研究分野：実験動物学

キーワード：マーモセット 非ヒト霊長類 脳血流 FASD 胎児

1. 研究開始当初の背景

妊娠中の母親の飲酒は胎児発生に強く影響し、特徴的な外貌異常を伴う胎児性アルコール症候群や、より広範な疾患群を総称した胎児性アルコールスペクトラム障害 (Fetal Alcohol Spectrum Disorders: FASD) を引き起こす。FASD は注意欠陥・多動性障害 (ADHD) 等に類似した中枢神経系機能障害を伴うが、その発生メカニズムが明らかでなく、治療法はない。米国では、FASD は新生児の後天的な中枢神経障害としての最多の原因であり、成長後の薬物依存や犯罪との関連性が強く、発症者のうち 60% が犯罪に関与していたと報告された。この疾患の発生メカニズムの解明のため、これまでにヒトの妊娠後期に当たるげっ歯類へのアルコール暴露が脳微小毛細血管の径や密度に影響することが報告されたが、げっ歯類は妊娠期間が短く、特定の発生ステージでの持続的なアルコール暴露の影響を見るのが難しい。妊娠期間の長い非ヒト霊長類でも胎児へのアルコール暴露実験は行われ、一過性の胎児の脳血管の拡張と、血流速度低下を引き起こすことが報告された。しかし、いずれの研究もアルコール暴露を行う時期にばらつきがあり、特に妊娠発覚前に当たる妊娠初期へのアルコール暴露と胎児脳への血行動態に関連した研究は乏しい。妊娠発覚前の女性は日常的に飲酒する割合も高く、妊娠初期の一貫性のアルコール暴露が後の脳発生に与える影響を早急に解明する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、妊娠期間の長い非ヒト霊長類であるマーモセットを使用して、妊娠期間の薬剤暴露の影響を評価可能にするため、胎生期の血管形態と血行動態の評価法を確立する。マーモセットは胎生期のエコーによる頭部直径などの外貌の調査や、麻酔下 MRI による構造の調査は実施されているが、脳の血流や血管の発達についての調査は乏しい。胎児の血流を調べるためには、覚醒状態での調査が必須であるため、そのためのエコーや MRI の実験環境の整備を行う。また、検討のための基礎調査として、ex vivo での胎児の脳の 3 次元的な脳血管走行の調査を実施し、そこから得られたデータを元にした、エコー、MRI による in vivo での胎児の脳の経時的な脳血流の調査を実施する。

3. 研究の方法

(1) 造影 CT 撮影による胎児の脳血管走行の確認

マーモセットの流産胎児を使用し、マーモセットの脳血管走行の調査を行った。妊娠前から血液中、または尿中のプロゲステロン値を計測し、流産胎児の胎齢を推定した。獲得した流産胎児は CT の造影剤であるリンタングステン酸溶液に 1-3 ヶ月間浸漬し、90 kV, 88 uA で CT 撮影を実施した。CT 撮影後、Osirix を使用して、血管走行の確認を行った。

(2) 胎児脳動脈の経時的測定方法の確立

(1) で計測した血管走行画像をもとに、マーモセット胎児の全身と脳の血管走行と血流量をエコーのドップラーモードで計測した。胎児の胎齢は (1) と同様に血中または尿中のプロゲステロン値から推定した。胎齢 3 週目から週 1 回エコー検査を実施した。脳血管のうち、脳底動脈はパルスドップラーモードで、血流速度の測定を行った。

(3) 覚醒下での MRI 撮影を可能にするための実験機器整備

MRI 機器では、脳血流や血管走行を観察することができるが、血圧や血流速度の影響が強い。麻酔の使用は実験結果に強く影響するため、覚醒状態で MRI 撮影を可能にする必要がある。そのための実験機器整備として、覚醒状態で動物の動きを拘束する機器を整備した。機器の設計は CAD ソフトを使用し、機器の作成は 3D プリンターで行った。

4. 研究成果

(1) 造影 CT 撮影による胎児の脳血管走行の確認

推定胎齢 11 週の胎児を用いて、リンタングステン酸溶液による胎児の造影 CT 撮影を行った。染色前の胎児の CT 撮影では、骨のコントラスト以外はコントラスト無い画像だったが、リンタングステン酸造影によって臓器や構造のコントラストが強くなることのできた (図 1)。CT の分解能は 10um であり、一部の血管走行も造影によって視覚化することができた。特に顔面の血管や脳表面の血管は太さや分岐を 3

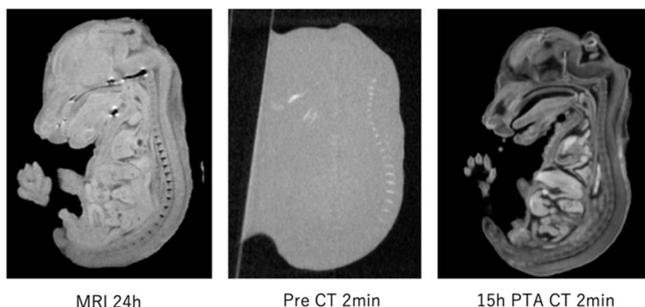


図 1 単純 MRI 撮影、単純 CT 撮影、リンタングステン酸染色による造影 CT 撮影の比較
MRI (左)、単純 CT (真ん中) と比較して造影 CT (右) は臓器、組織間のコントラストが高い画像が得られた。

次元的に確認できた。一方で、脳の内側の血管は脳底動脈を観察することができた(図2)。観察した脳底動脈は非常に細いため、その太さの計測は造影 CT では不可能だったが、脳底動脈の追跡は可能だった。椎骨動脈から脳底動脈への連続性や、内頸動脈の分枝が脳底動脈へ近づく様子は認められたが、ウィルスの動脈輪の明らかな形状は認められなかった。また、ウィルスの動脈輪唐崎の分枝は描出することができなかった。今回、マーモセット胎児の脳底動脈を含む血管走行を ex vivo で観察した例はこれまで報告がないため、初めての観察例である。

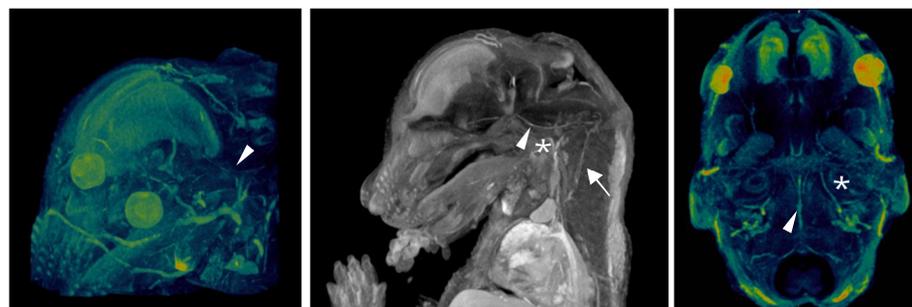


図2 造影 CT 撮影での血管走行の観察

造影 CT 撮影で観察した3次元空間上の顔面の血管の走行(左) 矢状断(真ん中)と水平断(右)での血管走行の観察。脳底動脈と思われる血管(矢頭)と椎骨動脈と思われる血管(矢印) 内頸動脈の分枝(*)

(2) エコー検査による胎児脳動脈の経時的観察

マーモセット胎児の脳血流をエコー検査で経時的に観察した。使用した妊娠動物はのべ3頭であった。エコーでは、毎週の頭部の直径をBモードで、血管走行をドップラーモードで観察した。71日目では全身の血管は観察可能だったが、頭部の血管を観察することはできなかった。



図3 胎児の経時的なエコー観察

胎齢56日目から90日目までの胎児血流の追跡、71日目から胎児の形状が見え始め、78日目には頭部から体の血管が観察可能だった。84、90日目には脳へ行く血管の走行も観察可能だった。

1頭の動物では、78日目以降になると頭部の形状がエコーではっきりと見え始めたため、頭部の血管走行を観察することができた。頸動脈や大動脈、脳底動脈の血流速度をパルスドプラーモードで観察した。頸動脈と大動脈、脳底動脈の血流速度は78日目から測定が可能だった。また、血流速の上下動から心拍数も推測可能だった。経時的に観察することで、心拍数が80日目を目指して一度上昇し、120日目あたりにピークを迎え、その後緩やかに減少していくこと、一方で、脳底動脈の血流速度は80日目に一度上昇し、その後一定値を取るが、120日目付近で更に上昇する段階的な増加をすることがわかった。

(3) 覚醒下でのMRI撮影を可能にするための実験機器整備

マーモセットを無麻酔で、動きを制限するための保定機を作成した。保定機は円筒形でマーモセットの首が抜けられないように首を拘束するカラー部を備える。マーモセットはスフィンクス体制で待機するため、動物への負担は少ないと考えている。また、マーモセットは頭部もヘルメット型のコイルで動きを制限されており、頭部のMRIも無麻酔で実施することができた。この保定器への馴化訓練と、頭部のMRI撮影を実施した。馴化では、マーモセットの動きの制限を段階的に厳しくするために、頭部の拘束なし、頭部のゆるい拘束、頭部のきつい拘束でのトレーニングを行い、それぞれの状態で、抵抗を示さなくなった場合に次のステップへと進んだ。トレーニングした動物の頭部の機能的MRI撮影のときに頭部の動きは0.6 mm以



図4 マーモセット用MRI保定器の設計図面

青色のヘルメットでマーモセットの頭部を固定し、首、体もカラーと円筒形のパーツで動きを制限させる。

下であることが確認された。この保定機は体の体動もほとんど無いため、妊娠個体とこの保定機を使用して、胎児の脳血流をMRIで観察することができると考えている。胎児の脳血流は母体への麻酔により強く影響されてしまうため、このような覚醒下で動物にストレスが少なく拘束できるデバイスは必要であった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 INOUE Takashi, YURIMOTO Terumi, SEKI Fumiko, SATO Kenya, SASAKI Erika	4. 巻 -
2. 論文標題 The common marmoset in biomedical research: experimental disease models and veterinary management	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.22-0107	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yurimoto Terumi, Kumita Wakako, Sato Kenya, Kikuchi Rika, Oka Gohei, Shibuki Yusuke, Hashimoto Rino, Kamioka Michiko, Hayasegawa Yumi, Yamazaki Eiko, Kurotaki Yoko, Goda Norio, Kitakami Junichi, Fujita Tatsuya, Inoue Takashi, Sasaki Erika	4. 巻 7
2. 論文標題 Development of a 3D tracking system for multiple marmosets under free-moving conditions	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-024-05864-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 YURIMOTO Terumi, MINESHIGE Takayuki, SHINOHARA Haruka, INOUE Takashi, SASAKI Erika	4. 巻 -
2. 論文標題 Whole blood transfusion in common marmosets: a clinical evaluation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.21-0134	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yurimoto Terumi, Kumita Wakako, Sato Kenya, Kikuchi Rika, Shibuki Yusuke, Hashimoto Rino, Kamioka Michiko, Hayasegawa Yumi, Yamazaki Eiko, Kurotaki Yoko, Goda Norio, Kitakami Junichi, Fujita Tatsuya, Inoue Takashi, Sasaki Erika	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a new 3D tracking system for multiple marmosets under free-moving conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.03.29.486138	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mineshige Takayuki, Inoue Takashi, Kawai Kenji, Seki Fumiko, Yurimoto Terumi, Hata Jun ichi, Watanabe Kenichi, Kobayashi Yoshiyasu, Sasaki Erika	4. 巻 50
2. 論文標題 Spontaneous pulmonary adenocarcinoma in a common marmoset (<i>Callithrix jacchus</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medical Primatology	6. 最初と最後の頁 335 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jmp.12540	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Takashi, Okahara Norio, Okahashi Nobuyuki, Sato Kenya, Ueda Masahiro, Atarashi Koji, Isayama Jun, Yoshimasa Aoto, Kawashima Yusuke, Lee Chia-Ying, Ueno Masami, Nozu Ryoko, Kurotaki Yoko, Mineshige Takayuki, Yurimoto Terumi, Itaya Kaori, Honda Kenya, Sasaki Erika .et.al	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of germ-free common marmosets	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Reserch Square	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21203/rs.3.rs-428622/v1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Yusuke, Tashiro Ayaka, Kawase Yukino, Isoyama Takashi, Saito Itsuro, Ono Toshiya, Hara Shintaro, Ishii Kohei, Yurimoto Terumi, Shiraishi Yasuyuki, Yamada Akihiro, Yambe Tomoyuki, Abe Yusuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Optimum Sterilization Methods of Biocompatible Hybrid Material for Artificial Organs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Advanced Biomedical Engineering	6. 最初と最後の頁 83 ~ 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14326/abe.9.83	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Seki Fumiko, Yurimoto Terumi, Kamioka Michiko, Inoue Takashi, Komaki Yuji, Iriki Atsushi, Sasaki Erika, Yamazaki Yumiko	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of a non-invasive novel individual marmoset holder for evaluation by awake functional magnetic resonance brain imaging	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.12.21.572749	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 坂本晃海, 佐々木えりか	4. 巻 42
2. 論文標題 AIを用いたマーモセットの行動解析	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 940 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/7431-00002-0001390-00	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 坂本晃海、井上貴史、菊池理加、洪木裕介、早瀬川由美、上岡美智子、橋本りの、山崎栄子、佐藤賢哉、汲田和歌子、佐々木えりか、
2. 発表標題 家族飼育のマーモセットにおける新しい3次元トラッキングシステムの 開発
3. 学会等名 NEUR02022
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 坂本晃海、井上貴史、菊池理加、洪木裕介、早瀬川由美、上岡美智子、橋本りの、山崎栄子、佐藤賢哉、汲田和歌子、佐々木えりか :
2. 発表標題 家族飼育マーモセットを対象とした自由行動下での新しい自動行動分析 システムの開発
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2022年 ~ 2023年

1. 発表者名 T. Yurimoto: None. T. Inoue: None. W. Kumita: None. K. Sato: None. Y. Kurotaki: None. E. Sasaki
2. 発表標題 Development of a novel automated behavior analysis system for multiple freely-moving marmosets
3. 学会等名 Neuroscience 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 坂本晃海, 井上貴史, 菊池理加, 早瀬川由美, 橋本りの, 上岡美智子, 黒滝陽子, 佐々木えりか
2. 発表標題 Deep learningを活用した実験動物マーモセットの自動糞便判定システムの開発
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 坂本 晃海、井上 貴史、菊池 理加、早瀬川 由美、上岡 美智子、橋本 りの、山崎 栄子、佐藤 賢哉、汲田 和歌子、佐々木 えりか
2. 発表標題 家族飼育マーモセットの自由行動を対象とした新しい行動解析システムの開発
3. 学会等名 第11回 日本マーモセット研究会大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 坂本晃海, 佐々木絵美, 井上貴史, 佐々木えりか
2. 発表標題 機械学習を利用したマーモセットの顔画像、音声による個体識別の検討
3. 学会等名 第10回日本マーモセット研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 坂本晃海
2. 発表標題 自由行動下のコモンマーモセット家族を対象とした自動行動解析ケージシステムの開発
3. 学会等名 第70回日本実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 坂本晃海
2. 発表標題 ホームケージで行うマーモセットの家族を対象とした自動行動解析システムの 開発の現在
3. 学会等名 第13回日本マーモセット研究会（招待講演）
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 坂本晃海、向笠圭亮、我妻亮治、井上貴史、佐々木えりか
2. 発表標題 ChatGPTと電子カルテを活用した霊長類の獣医学的管理支援ツールの開発の検討
3. 学会等名 第31回サル疾病ワークショップ
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Terumi Yurimoto, Fumiko Seki, Michiko Kamioka, Yusuke Inoue, Akihiro Yamada, Takashi Inoue, Erika Sasaki
2. 発表標題 Development of a novel olfactory stimulation fMRI system for common marmosets
3. 学会等名 2023 Marmoset Bioscience Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

1. 発表者名 Terumi Yurimoto, Fumiko Seki, Michiko Kamioka, Yusuke Inoue, Akihiro Yamada, Takashi Inoue, Erika Sasaki
2. 発表標題 Development of a novel olfactory stimulation fMRI system for common marmosets
3. 学会等名 Neuroscience 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計5件

産業財産権の名称 機能的MRI用ベッド及びこれを備えた機能的MRI用ベッドシステム	発明者 垾本晃海、関布美子、佐々木えりか、井上貴史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-110184	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 分析支援装置、分析支援方法及びコンピュータープログラム	発明者 垾本晃海、佐々木えりか、井上貴史、入来篤史、山崎由美子	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-008052	出願年 2022年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 機能的MRI撮影用の嗅覚刺激装置及び嗅覚分析方法	発明者 垾本晃海、関布美子、佐々木えりか	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-189994	出願年 2023年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 実験動物用ビニールバック	発明者 井上貴史、岡原則夫、垾本晃海	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2024-043473	出願年 2024年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 排泄物性状推定モデル学習装置、排泄物性状推定装置、排泄物性状推定モデル学習方法、排泄物性状推定方法及びプログラム	発明者 垾本晃海、佐々木えりか、井上貴史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、18/550,210	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------