

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月25日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009年度～2011年度

課題番号：21591339

研究課題名（和文） 新生児痙攣様発作への集学的アプローチは脳障害を軽減するか？

研究課題名（英文） Establishing strategy to control neonatal seizure following asphyxia

研究代表者

岩田 欧介 (IWATA OSUKE)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：30465710

研究成果の概要（和文）：

新生児はけいれん発作を発症しやすい上に、薬物治療に難治性であることが多い。新生児の脳では、成人で有効な抗痙攣剤が効きにくい背景があるが、臨床病態に近い動物モデルがないため、治療法解明のための研究も進んでいない。本研究では、新生児に脳の構造・成熟度が近い新生仔豚に低換気負荷を与え、その深度を調節することによって、高率に電気生理学的・臨床的けいれん発作を呈する大動物モデルを確立した。これらの動物の脳病理組織学的損傷は、臨床的発作を呈した症例において非常に強く認められた。独自に開発したポータブルテレメトリー脳波計により、低換気負荷からの回復後は、動物をケージ内で自由に運動させながら、暗視カメラ・電気生理学的情報を72時間まで記録し、圧縮技術により、迅速にレビュー可能なアルゴリズムを確立中である。

研究成果の概要（英文）：

Newborn infants are vulnerable for seizures, which are generally resistant to anti-convulsants. In our current project, we developed a large animal model of neonatal seizure by titrating the depth of hypo-ventilation insult. To assess the seizure burden following the recovery from the insult, we developed a handy telemetry video EEG system with off-line amplitude-integrated EEG exchanger software, which enabled us to quantitate the frequency and the duration of seizures. Our model would be relevant to the clinical neonatal seizures following perinatal hypoxia-ischaemia, which could be used to assess the impact of the treatment on histopathological changes in the brain as well as to develop new pharmacological treatments.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児神経学

キーワード：低酸素虚血・ $\gamma$ アミノ酪酸・新生児脳症・Bumetanide・新生児けいれん様発作・動物モデル・神経興奮

## 1. 研究開始当初の背景

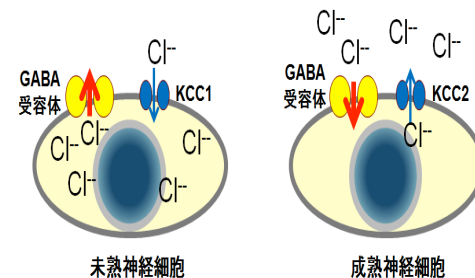
新生児痙攣様発作(以下新生児発作)は、動物モデルにおいて強い興奮性細胞傷害を来し、遠隔期の記憶や運動に悪影響を及ぼすだけでなく、臨床的にも発達障害や将来のてんかん発症との関連が認められ、重要な治療対象である。しかしながら、現在推奨されている抗痙攣剤の一次止痙率は約50%に過ぎない (Sankar et al. 2005 Neurology)。一般に新生児発作の発見は医療スタッフや保護者の観察に依存し、全新生児の~0.2%程度の発症率とされてきた。しかし、ビデオや持続脳波の利用により、数倍~数十倍の発作が観察されるようになり、NICU入院を要するハイリスク児の中では10-20%にも達すると言われている。これらの中には、新生児特有の、異常運動を伴わない電気生理学的な発作も多く観察され、診断・治療基準の根本的な見直しが迫られている。今後、臨床に近いモデルにおける質の高いエビデンスの蓄積が緊急課題となっている (Vopale 2008 Neurology of the Newborn)。

新生児発作の多くが、低酸素虚血や低血糖・代謝異常などのストレスと関連付けられているが、生直後の発症は稀で、通常6-24時間の潜伏期間を持つ (Iwata et al. 2008 Brain)。潜伏期間の脳内ATP濃度は通常正常に保たれるが、興奮性傷害のカスケードは既に水面下で進行し、発作に先立って遅発性エネルギー代謝障害が認められる。エネルギー不足に陥った神経細胞は脱分極・過興奮状態に陥り、神経回路の下流に位置する組織にも興奮を伝播し、調節不能な過興奮状態を来すと考えられる。

新生児発作による脳の傷害は、発作中の低酸素虚血に起因すると考えられていたが、動物モデルでこのような酸素需要・供給のミスマッチが観察されるのは遷延性発作に限られる (Gonzalez 2005 JCBFM)。一方で、興奮性傷害のカスケードは、短時間の発作でもトリガーされ、脳形成や発達に影響を与えることがわかっている。このように、**Three-hit-theory** (発作そのもの+発作の原因となるストレス+発作に続発するてんかんが個別に脳に影響を及ぼす)と形容される重層・蓄積型傷害の関与は、新生児発作による脳損傷と発達障害の理解を複雑にし、治療効果の評価をはじめとする臨床研究からのアプローチを極めて困難にしている。

新生児発作の治療としては、GABA作動薬を中心に、Phenobarbital, Diazepam, Midazolam, Phenytoinなどの、成人・小児で使用経験が豊富な抗痙攣剤が推奨されているが、その一次止痙効果は前述のように約半数に過ぎない (Sankar et al. 2005

Neurology)。新生児発作の発症頻度は非常に高く、遷延や治療不応も多い。この理由として近年注目されているのが、未熟脳におけるGABA経路の特殊性である。成熟神経細胞のGABA受容体に作動薬が結合すると、大量のCl<sup>-</sup>イオンが細胞内に流入し、強い過分極によって興奮が抑制される。これとは逆に、未熟神経細胞ではCl<sup>-</sup>イオン濃度を上昇させ、GABA刺激によって細胞が興奮するように調整されている (Fukuda 2005 Nature)。長期間抑制を受けたGABA経路が“刈り込み”によって淘汰されてしまわないためのプログラムと考えられているが (Ikonomidou 1999 Science)、結果として未熟神経組織は異常な興奮を増幅しやすいだけでなく、治療薬であるはずのGABA作動薬も、多くの細胞において興奮性に働き、火に油を注ぐことになる。



未熟神経細胞では、KCC1の働きにより、細胞内塩化物イオン濃度が上昇している。このため、γ-アミノ酪酸(GABA)作動薬によって塩化物イオンの交通が自由になると、塩化物イオンは細胞外に流出し、細胞内の電荷は陽性に傾き、むしろ脱分極しやすくなる。

## 2. 研究の目的

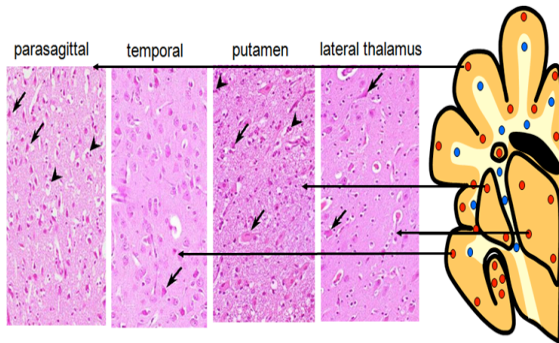
Bumetanideなどの新しい抗痙攣剤の効果を臨床に近いモデルで評価するために、1. 人間に近い脳の構造発達と成熟度を持つ新生仔豚を使用、2. 臨床病態に近い低換気負荷によってエネルギー代謝を破たんさせ、3. その深度を調節することでけいれん様発作を高率に発症するモデルを作成・確立することを目的とする。

## 3. 研究の方法

新生仔豚 低酸素虚血負荷モデル (Iwata 2005 Ann Neurol ; 40%に臨床的痙攣様発作が認められる)の作成プロトコールを一部改編し、より臨床病態に近い低換気(低酸素虚血と異なり、高炭酸ガス血症を伴う)の深度・持続時間により、けいれん様発作を高率に発症するモデルを確立する。具体的には、生後48時間以内の新生仔豚(三元豚を使用)をSevofluraneを用いて気管内挿管下に全身麻酔。各種モニター(標準脳波・近赤外線時間分解スペクトロスコピー)を装着し、筋弛緩剤投与下に低換気負荷(分時換気量を平常の1/3に低下させる)を与える。脳組織酸素飽和度が40%程度になるように換気量を調整し、10

分, 20分, 30分, 40分, 50分, 60分で蘇生開始 (各2頭). 蘇生開始後2時間で全身麻酔から離脱し, テレメトリービデオ脳波計を装着して72時間観察を続ける. 哺乳可能な新生仔豚は自立哺乳とし, 水分摂取が不十分な個体はチューブ栄養もしくは輸液を行う. 蘇生開始後72時間で吸入麻酔使用下に Phenobarbital 大量投与し, 安楽死させた後, 開胸・PBS および 4%パラフォルムアルデヒドにて灌流固定. その後脳を取り出し, 後固定する. パラフィン切片から, 形態評価 (H&E, LFB染色), 免疫化学染色 (GFAP, CD68, Map-2,  $\beta$ -APP, Caspase-6/9), アポトーシス染色 (TUNEL法) を行い, 脳内各部位における神経細胞体・軸索・髓鞘の傷害を評価するとともに, アストログリア・オリゴデンドログリア・マイクログリアのストレスマーカーを評価し, 3次元再構築を行う. また, 二次性・遅延型細胞死を観察するために, TUNEL法を用いて, アポトーシスの局在を評価する.

図：脳病理組織評価の二次元・三次元構築



モデル確立後は, 動物を 1. 正常コントロール群, 2. 無治療群, 3. Phenobarbital 群, 4. Bumetanide + Phenobarbital 群の 3群に封筒法で振り分け, 蘇生開始後6時間ごとに予防投薬. ビデオ・脳波を振り返って発作頻度と持続時間を後ろ向きに定量化するとともに, 病理組織学的神経傷害を比較する.

#### 4. 研究成果

研究の初期段階で, 暗視カメラとテレメトリー脳波により, 画像と同期した電気生理学的情報を72時間記録する技術を確立. 続いて, 圧縮技術により, 長時間の脳波情報を後ろ向きに迅速レビューできるアルゴリズムを確立した.

モデルの作成において, 以前に使用経験があり, 負荷深度とけいれん様発作発症の関係がある程度判明していた Large White・Landrace 種が入手困難と判明し, それらの交配種である三元豚の雄を使用することになった. この品種は前述の種類と異なり, 20-40分程度の低換気では脳波の抑制も病理組織学的変化もほとんど認めら

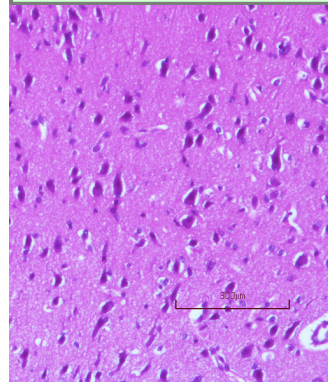
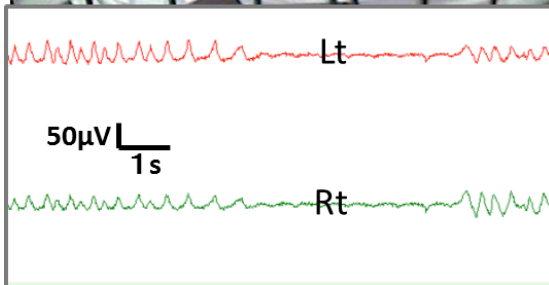
れなかった. このため, 4回の実験終了段階から実験計画を変更し, 負荷時間は最長の60分で固定とした. 負荷時間固定後に行われた実験では, 11頭中7頭に電気生理学的発作波が認められ, うち, 5頭には発作波と関連した臨床的発作も認められた.

図：無線脳波計を装着した低酸素孵化後の新生仔豚



これらの動物の脳病理組織学的損傷は, 臨床的発作を呈した症例において非常に強く認められ, Parasagittal Cortex では50%程度, Temporal Cortex で20%, 海馬 CA1 領域で30%程度の神経細胞が急性壊死を起こしていた.

上図：暗視ビデオ脳波において確認されたけいれん発作



左図：同じ動物の parasagittal cortex の脳病理組織標本 (H&E). 錐体細胞を中心に中等殿神経細胞死が認められる.

2010年夏に九州地方で発症した口蹄疫(約5か月間動物搬入停止)及び2011年春に発生した東日本大震災(研究代表者が延べ5週間にわたり被災地に出向)の影響で、実験計画は大幅に遅れをとり、Bumetanideを用いた介入研究は、本報告書作成段階でも途上にあるが、2012年秋までに予定実験を終了し、順次ビデオ脳波解析および病理組織学的検索を終える予定である。

#### 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 12 件)

1. Qualitative Brain MRI at Term and Cognitive Outcomes at 9 Years After Very Preterm Birth. Iwata S, Nakamura T, Hizume E, Kihara H, Takashima S, Matsuishi T, and Iwata O. *Pediatrics*. 2012;129(5):e1138-1147
2. Hypothermia for neonatal encephalopathy: Nationwide Survey of Clinical Practice in Japan as of August 2010. Iwata O, Nabetani M, Takenouchi T, Iwaibara T, Iwata S, Tamura M; on behalf of the Working Group on Therapeutic Hypothermia for Neonatal Encephalopathy, Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, and Japan Society for Perinatal and Neonatal Medicine. *Acta Paediatr*. 2012; 101(5):e197-e202.
3. Sleep architecture in healthy 5-year-old preschool children: associations between sleep schedule and quality variables. Iwata S, Iwata O, Iemura A, Iwasaki M, Matsuishi T. *Acta Paediatr*. 2012; 101(3):e110-114.
4. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy: JSPNM & MHLW Japan Working Group Practice Guidelines Consensus Statement from the Working Group on Therapeutic Hypothermia for Neonatal Encephalopathy, Ministry of Health, Labor and Welfare (MHLW), Japan, and Japan Society for Perinatal and Neonatal Medicine (JSPNM). Takenouchi T, Iwata O, Nabetani M, Tamura M. *Brain Dev*. 2012; 34(2):165-170.
5. Past, present and future of hypothermic neuroprotection for neonatal encephalopathy in Japan: time to say good-bye to the old remedies. Iwata O, Takenouchi T. *Brain Dev*. 2012;34(2):163-164.
6. Filling the evidence gap: how can we improve the outcome of neonatal encephalopathy in the next 10 years? Iwata O, Iwata S. *Brain Dev*. 2011;33(3):221-228.
7. Propofol protects against anandamide-induced injury in human umbilical vein endothelial cells. Ito T, Mishima Y, Ito A, Kameyama N, Harada H, Iwata O, Watanabe S, Ushijima K. *Kurume Med J*. 2011;58(1):15-20.
8. Levothyroxine replacement therapy and refractory hypotension out of transitional period in preterm infants. Okada J, Iwata S, Hirose A, Kanda H, Yoshino M, Maeno Y, Matsuishi T, Iwata O. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2011; 74(3):354-364.
9. Determinants of sleep patterns in healthy Japanese 5-year-old children. Iwata S, Iwata O, Iemura A, Iwasaki M, Matsuishi T. *Int J Dev Neurosci*. 2011;29(1):57-62.
10. Determinants of outcomes following acute child encephalopathy and encephalitis: pivotal effect of early and delayed cooling. Kawano G, Iwata O, Iwata S, Kawano K, Obu K, Kuki I, Rinka H, Shiomi M, Yamanouchi H, Kakuma T, Takashima S, Matsuishi T; Research Network for Acute Encephalopathy in Childhood. *Arch Dis Child*. 2011; 96(10):936-941.
11. Subtle white matter injury is common in term-born infants with a wide range of risks. Iwata S, Bainbridge A, Nakamura T, Tamura M, Takashima S, Matsuishi T, Iwata O. *Int J Dev Neurosci*. 2010;28(7):573-580.
12. Utility of subjective sleep assessment tools for healthy preschool children: a comparative study between sleep logs, questionnaires, and actigraphy.

Iwasaki M, Iwata S, Iemura A, Yamashita N, Tomino Y, Anme T, Yamagata Z, Iwata O, Matsuishi T. J Epidemiol. 2010;20(2):143-149.

[学会発表] (計 10 件)

1. 岩田 欧介 : 低体温療法の実際 Consensus 2010 に基づいた新生児の低体温療法ワークショップ 第 56 回日本未熟児新生児学会学術集会 2011.11.13-15 (東京)
2. 大矢崇志, 岩田幸子, 才津宏樹, 海野光昭, 岡田純一郎, 神田 洋, 前野泰樹, 岩田欧介, 松石豊次郎. 方向性拡散強調画像を用いた新生児脳の発達評価 FA、ADC を用いた定量的検討. 第 114 回日本小児科学会学術集会 2011.8.12-14 (東京)
3. 木下正啓, 田中祥一朗, 海野光昭, 才津宏樹, 岡田純一郎, 岩田幸子, 神田 洋, 松石豊次郎, 前野泰樹, 岩田欧介. ハイリスク児の成長と脳の微細構造. 第 47 回日本周産期・新生児医学会総会および学術集会 2011.7.10-12 (札幌)
4. 岩田欧介 : 小児における脳低温療法 小児領域における脳低温療法 現状とこれからの課題. 第 14 回日本脳低温療法学会 2011.7.1-2 (鹿児島)
5. 大矢崇志, 岩田幸子, 永光信一郎, 山下裕史朗, 岩田欧介, 松石豊次郎: ベッドサイドにおける新生児の脳成熟度評価の試み. 第 53 回日本小児神経学会総会 2011.5.26-28 (横浜)
6. 武内俊樹, 岩田欧介, 鍋谷まこと, 田村正徳: 日本における新生児脳症に対する低体温療法の全国調査. 第 53 回日本小児神経学会総会 2011.5.26-28 (横浜)
7. 河野 剛, 岩田欧介, 武内俊樹, 山内秀雄, 松石豊次郎: 小児急性脳症・脳炎に対する脳低温療法の多施設共同研究に向けて. 第 53 回日本小児神経学会総会 2011.5.26-28 (横浜)
8. 加藤丈典, 岩田欧介, 岩田幸子, 戸蒔創: 新生仔豚を用いた低酸素性虚血性脳症モデルでのキセノンガス吸入による脳保護の可能性. 第 52 回日本小児神経学会総会 2010.5.20-22 (福岡)
9. Kato T, 他 (10 名中 7 番目). Physiological Effects of 50% Xenon

Inhaled Alone or Combined with Therapeutic Hypothermia for 24 h in an Experimental Model of Perinatal Asphyxia. Annual Meeting of Pediatric Academic Societies, 2009.9.2-5 (Baltimore)

10. Kapetanakis A 他 (9 名中 6 番目). Amiloride Does Not Provide Significant Neuroprotection When Administered after Resuscitation in a Newborn Piglet Model of Perinatal Asphyxia. Annual Meeting of Pediatric Academic Societies, 2009.9.2-5 (Baltimore)

[図書] (計 2 件)

1. 田村正徳, 岩田欧介, 岩田幸子, 鍋谷まこと, 武内俊樹: Consensus 2010 に基づく新生児低体温療法実践マニュアル. 2011 年 東京医学社 2010.
2. 茨 聡, 岩田欧介, 徳久琢也他 新生児・小児のための脳低温療法—日本脳低温療法学会公認テキスト 2011 年 メディカ出版

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当するものなし

○取得状況 (計 0 件)

該当するものなし

[その他]

ホームページ等

該当するものなし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩田 欧介 (IWATA OSUKE)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 30465710

(2) 研究分担者

岩田 幸子 (IWATA SACHIKO)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 40465711

岡村 尚昌 (OKAMURA HISAYOSHI)

久留米大学・高次脳疾患研究所・助教

研究者番号: 00454918

神田 洋 (KANDA HIROSHI)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号: 30341340

岡田 純一郎 (OKADA JUNICHIRO)  
久留米大学・医学部・助教  
研究者番号：60389278