

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25年5月13日現在

機関番号： 11301
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22791025
 研究課題名（和文） ヒツジ胎仔を用いた胎生期脳白質損傷のMRI画像解析
 研究課題名（英文） Analysis of magnetic resonance imaging in cerebral white matter injury using chronically instrumented fetal sheep
 研究代表者
 秋山 志津子（AKIYAMA SHIZUKO）
 東北大学・病院・助手
 研究者番号： 80466549

研究成果の概要（和文）：

ヒツジ胎仔の脳白質損傷モデルを用いて脳虚血性病変をMRIで撮影し、その異常信号の特徴と組織病理学的所見との関連性を解析した。巣状脳白質損傷が誘導された5例では予想どおり病変部に一致して「T1高T2低信号」が認められたが、病変がなかった3例でも「巣状T1低」「びまん性T2高」「巣状T1高/T2低」などの異常信号が観察された。後者は臨床上問題となるびまん性脳白質損傷の初期病理像をMRI信号で捉えた可能性があるため、免疫染色を追加して希突起膠細胞系の発達段階について今後詳細な解析を追加する予定である。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the magnetic resonance imaging (MRI) in the cerebral white matter injury (WMI) using chronically instrumented fetal sheep, suffered from ischemia and/or inflammation *in utero*. Abnormal MRI signals were found in 5 fetuses induced focal WMI while unexpectedly also found in 3 fetuses not induced WMI, as a focal low T1, diffuse high T2 or focal high T1 /low T2 intensity. It might be possible that these abnormal signals observed in the latter group reflected histologic changes in acute phase of diffuse WMI, clinically more important than focal WMI. Consequently, it would be necessary to be evaluated the oligodendroglial development in the white matter by adding the immuno-histochemical analysis as a next step.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	499,800	149,940	649,740
2011年度	1,100,200	330,060	1,430,260
2012年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 医歯薬学

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，脳白質損傷，脳室周囲白質軟化，MRI，診断基準

1. 研究開始当初の背景

周産期に発症する胎児・早産児の脳白質損傷は低酸素性虚血性脳症の一つであり、極低出生体重児の約 5~10%に認められ、脳性麻痺の責任病変となるばかりではなく、幼児期から学童期にかけて発症する認知障害や軽度発達障害（注意欠陥多動性、学習障害、自閉症スペクトラム）とも関連することが知られている。脳白質損傷と関連する臨床的病態として、循環動態の急激な変動（前置胎盤出血、胎盤早期剥離、胎盤内血管吻合）や子宮内炎症（絨毛膜羊膜炎、臍帯炎、前期破水）が注目され、動物実験モデルを用いた病態解析が国内外で報告されているものの、その詳細はいまだ明らかにされていない。

脳室周囲白質軟化（periventricular leukomalacia, 以下 PVL）は脳白質損傷の代表としてよく知られているが、組織学的には深部白質に嚢胞を形成する巣状脳白質損傷の一型に過ぎず、脳白質損傷における組織像の多様性がその分布のみならず経時的变化においても臨床では十分に強調されているとは言えない。すなわち、深部白質に限局することもあれば皮質下白質に広範囲に出現する場合もあり、孤発性のものもあれば多発性のものもある。急性期には軸索膨化巣、凝固壊死巣、多発小出血巣、ミクログリアの浸潤が、亜急性期にはアストログリアの浸潤、巣状グリオーシス、嚢胞形成、乏突起膠細胞系の減少が、慢性期には髄鞘化遅延、白質量減少、側脳室拡大など様々な組織学的特徴が観察される。

そのため、新生児集中治療における脳白質損傷の臨床診断では、このような多彩な組織像に対応した画像診断基準を開発する努力にまだまだ乏しい。多くの施設において診断の拠りどころとされている主な画像所見は、依然として急性期超音波画像ならびに出産予定日前後の MRI 画像における側脳室周囲白質の嚢胞形成に過ぎず、確定診断は臨床経過と修正月齢 18 以降の MRI 画像における脳白質量の減少に基づいてなされている。したがって、比較的小さい組織変化である凝固壊死巣、多発小出血巣、ミクログリアやアストログリアの浸潤巣、巣状グリオーシスによって生じた MRI 上の異常信号はある程度の診断的価値を持ちながら日常診療の中ではノイズ信号として見過ごされている可能性がある。

本研究の目的は、これまでわれわれの研究室で開発してきた「ヒツジ胎児を用いた脳白質損傷モデル」を応用し、脳白質に誘導された多様な組織変化それぞれに対応する MRI 画像上の特徴的所見を明らかにすることである。これに基づき、周産期に発症する胎児・早産児の脳白質損傷に対する新たな MRI 診断基準を提案できると考えている。この診断基準は、胎児管理や新生児集中治療の急性期に生じた脳虚血の病態を解析する上で貴重な手がかりとなるばかり

か、極低出生体重児の神経学的予後を推定するための重要な指標になりえる。

2. 研究の目的

われわれはすでにヒツジ胎児の慢性実験系を用いた脳白質損傷モデルの開発に成功しており、組織学的にヒトと同様の嚢胞性 PVL 病変のみならず、PVL の前駆病変（軸索膨化巣、凝固壊死巣、小出血巣）、皮質下白質に広がる多発小出血軟化病変、びまん性乏突起膠細胞損傷、皮質におよぶ脳軟化病変など多彩な脳白質損傷を再現できている。

本研究ではこの実験系を利用して、先ずその急性期から亜急性期にかけて脳 MRI を撮影し、次いで組織病理学的変化と MRI 画像を詳細に比較することによって、個々の組織病変に対応する MRI 画像上の特徴と至適撮影条件を明らかにする。びまん性髄鞘化障害に特徴的な画像変化として最近報告された T2 強調画像における diffuse excessive high signal intensity (DEHSI) にも注目する。

3. 研究の方法

本研究は東北大学動物実験委員会の承認のもと（22 医動-20, 2011 医動-56, 2012 医動-7）、東北大学医学部附属動物実験施設において平成 22~24 年度に実施された。対象として妊娠期間が確定した Suffolk 種ヒツジの胎児を用いた。

(1) 慢性実験系の作成と管理

妊娠 102 日（満期 147 日）に全身麻酔下に母獣を開腹して子宮切開し、胎児の腹部大動脈、上下大静脈、羊水腔内にカテーテルを留置、頭頂骨に近赤外線分光法ライトガイドを固定した後、胎児を子宮内にもどして閉腹した。以後、胎児の心拍数と血圧を連続監視した。

(2) 実験プロトコール

子宮内炎症下で急性循環変動を負荷して誘導される胎児脳白質損傷モデルを使用した。

先ず、胎児側のみに強い子宮内炎症を誘導するため、全ての胎児に妊娠 104 日から G-CSF 50 µg/日を 5 日間静脈内投与して多核好中球を増加させ、妊娠 106 日に endotoxin 20 mg を羊水空内に 1 回だけ注入することによって多核好中球を卵膜・臍帯で活性化させた。

次いで、endotoxin 注入後 24 時間から胎児胎盤系循環血液量の 40%を 20 分かけて胎児から急性脱血し、全身性低血圧を負荷した後、その 24 時間後に脱血した血液を戻し輸血した。この間、近赤外線分光法にて脳組織中 Hb 濃度を連続測定し、胎児に誘導された脳虚血の特徴（程度、タイミング、持続時間）を把握する。

最後に、妊娠 113 日に帝王切開して胎児を娩出させ、脳 MRI 撮影した後、中枢神経系を 10% 中性ホルマリン緩衝液で灌流固定して切り出し、組織病理学的検索に供した。

(3) ヒツジ胎児脳の MRI 撮影

生後 30 分以内のヒツジ胎仔脳を動物実験用超伝導 MRI (0.5 Tesla) を用いて撮影した。膝用コイルを用いて spin echo 法で T1/T2 強調像を 0.25 mm スライスで撮影した。

(4) ヒツジ胎仔脳の組織病理学的解析

灌流固定した胎仔脳は冠状断に分割し (乳頭体を含む視床レベルに対して平行に 3 mm スライスで), 断面を肉眼的に観察した後, 4 μm に薄切した標本を H-E 染色して組織診断した。びまん性乏突起膠細胞損傷の診断には抗 NG-2, O4, CNP, PLP 抗体を用いた免疫組織学的染色を用いた。各冠状断ごとの組織診断に基づいて脳白質損傷の詳細な三次元マップを作成し, それぞれの病変に対応する脳 MRI 信号と比較した。

4. 研究成果

研究代表者の秋山は H22 年秋から産休育休に入ったため, 実験によるデータ採取は H23~24 年度に行われた。

H23 年度 4 例, H24 年度 4 例で合計 8 例において胎仔脳 MRI を撮影し, その異常信号と組織病理学的所見を比較することができた (表 1 および 2)。

ただし, H24 年夏は類を見ない猛暑のためヒツジを予定どおり交配させることができず, 8 例中 4 例は予定していた「Sham」「炎症」「炎症+低酸素」負荷ではなく, 人工胎盤 (AP) 実験中に脳虚血を負荷された胎仔を用いて MRI を撮影した。また, 最後に追加した 2 例では脳 MRI 撮影せず, 予備実験として, 脳を電子顕微鏡 (EM) での観察用に灌流固定して電顕撮影に供した (表 1 および 2)。

全 8 例中 3 例 (ID: 1, 2, 8) ではいずれの冠状断面においても組織学的な脳白質損傷は観察されず, 残る 5 例すべて (ID: 3-7) に巣状脳白質損傷 (PVL) が認められた。PVL が誘導された 5 例の内訳は, 側脳室外背側の深部白質に PVL のみが認められたのは 2 例で, その内の 1 例は嚢胞形成しており, 深部白質に沿って前後に多巣性 PVL が認められたのは 3 例で, その

表 1. 症例の概要

ID No.	Sex	BW (g)	負荷内容	脳重 (g)	出生妊娠日齢
1	F	2087	炎症+低酸素	32	113
2	M	3941	Sham	45	130
3	F	2090	Sham	33	113
4	M	1700	炎症+低酸素	28	109
5	M	2320	AP+脳虚血	32	113
6	F	2430	AP+脳虚血	27	115
7	M	2200	AP+脳虚血	35	117
8	M	1530	AP+脳虚血	24	112
9	M	2100	炎症+低酸素	19	103
10	F	780	炎症+低酸素	17	101

Sex, 性別; F, 雌; M, 雄; BW, 出生体重; Sham, 負荷なし; AP, 人工胎盤。

表 2. 脳白質の組織所見と MRI 異常信号

ID No.	PVL/組織所見	MRI 信号の特徴
1	- 病変なし	側脳室周囲深部白質にびまん性 T2 高信号。
2	- 病変なし	有意な異常信号なし。
3	+ 嚢胞性 PVL (線条体)	PVL に一致して T1 高/T2 低信号。
4	+ 多巣性 PVL 多発小出血壊死	PVL に一致して T1 高/T2 低信号。
5	+ 多巣性 PVL (白質全体)	PVL に一致して T1 高/T2 低信号。
6	+ 多巣性 PVL (白質全体)	PVL に一致して T1 高/T2 低信号。
7	+ 巣状 PVL (線条体+視床)	PVL に一致して T1 高/T2 低信号。
8	- 病変なし	側脳室周囲深部白質に T1 高/T2 低信号。
9	+ 多巣性 PVL 多発小出血壊死	撮影せず (EM 用)
10	+ 多巣性 PVL 多発小出血壊死	撮影せず (EM 用)

()内には病変が認められた冠状断面レベルを示した。EM, 電子顕微鏡。

内の 1 例では多発小出血壊死が観察された。また, EM 観察用とした 2 例ではいずれも多巣性 PVL ならびに多発小出血壊死が認められた。(表 1 および 2)。なお, 症例 3 は虚血や炎症の負荷をかけない sham 群であったにもかかわらず, これに嚢胞性 PVL が誘導された理由は, 近赤外線分光法ライトガイドを固定した手術侵襲 (硬膜下血腫を合併) によるものと推察された。

脳 MRI 画像において, PVL が誘導された 5 例ではいずれも病変部に一致して「T1 高/T2 低信号」が認められた (図 1, A~D)。その一方で, PVL が誘導されなかった症例 1 と 8 にも MRI で異常信号が観察されたことは注目し得る。症例 1 では側脳室周囲の深部白質に「びまん性 T2 高信号」が (図 2, A~D), 症例 8 では同部に「T1 高/T2 低信号」が認められた (図 3, A~D)。

本研究期間内に解析できたデータは以上であった。それぞれの MRI 異常信号が反映する組織病理学的変化との詳細な関連性を明らかにするためには, これから脳組織切片の H-E 染色で観察された凝固壊死, 軸索膨化, 反応性アストログリア浸潤, 活性化マクロファージ/ミクログリア浸潤に基づいた三次元マップを作成する必要がある。また, この三次元マップと MRI 異常信号との間に不一致が生じた場合には, 免疫・特殊染色 (NG2, O4, CNPase, PLP, GFAP, Lectin, TUNEL など) を追加して, びまん性脳白質損傷に基づく組織変化が MRI 異常信号として捉えられた可能性を追求することができる。さらに, EM 観察所見を加えれば, その発達段階における背

景としての脳白質髄鞘化レベルを把握することが可能となり、髄鞘化に遅れが生じているかどうかについても言及が可能になると考えられる。

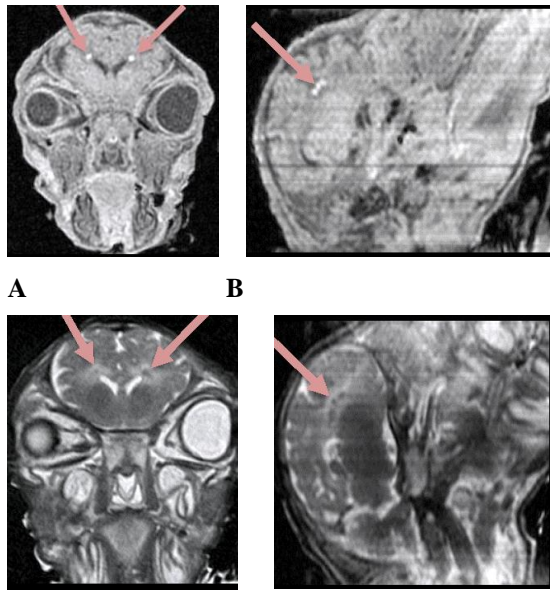


図1. PVLが誘導された胎仔 (症例6) におけるMRI異常信号。

側脳室外背側の深部白質に T1 高/T2 低信号の異常信号が認められた (矢印). A, T1 強調の冠状断; B, T1 強調の矢状断; C, T2 強調の冠状断; D, T2 強調の矢状断.

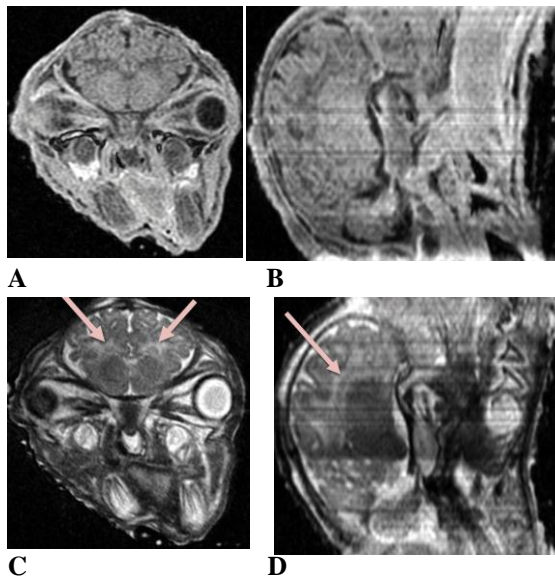


図2. PVLが誘導されなかった胎仔 (症例1) におけるMRI異常信号。

側脳室外背側の深部白質にびまん性 T2 高信号の異常信号が認められた (矢印). A, T1 強調の冠状断; B, T1 強調の矢状断; C, T2 強調の冠状断; D, T2 強調の矢状断.

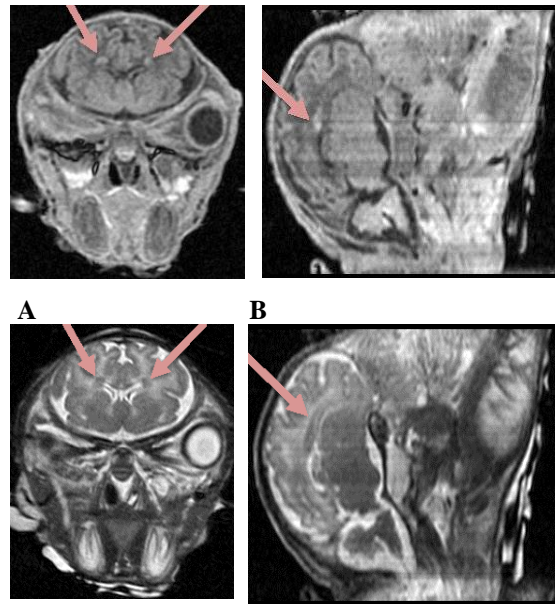


図3. PVLが誘導されなかった胎仔 (症例8) におけるMRI異常信号。

側脳室外背側の深部白質に T1 高/ T2 低信号の異常信号が認められた (矢印). A, T1 強調の冠状断; B, T1 強調の矢状断; C, T2 強調の冠状断; D, T2 強調の矢状断.

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4件)

①松田 直, 加賀麻衣子, 白田治夫, 伊藤智子, 渡邊真平, 小野寺幸子, 新関昌枝, 秋山志津子, 北西隆太, 渡邊達也. バンプレッシンの循環器系に及ぼす影響. 日本周産期・新生児医学会雑誌 2013; 49 (in press, 査読なし)

<http://www.jspnm.com/Gakkaishi/mokuji.aspx>

②新田恩, 松田直, 井上若葉, 荒井那津子, 渡邊真平, 秋山志津子, 北西龍太, 渡邊達也, 田澤星一, 柿崎秀平. 胎児期に心房粗動と診断され早期娩出した低出生体重児の一例. 周産期医学 2011; 41: 1222-5 (査読有).

http://www.tokyo-igakusha.co.jp/f/b/index/c01/6/oa_table/b_z_top.html

③渡邊真平, 秋山志津子, 太田英伸. 胎児・新生児期における生物時計と光環境の重要性. 睡眠医療 2011; 5: 51-8 (査読なし).

<http://www.lifesci.co.jp/cgi-bin/search/periodicals.cgi?type=sleep>

④Akiyama S, Ohta H, Watanabe S, Moriya T, Hariu A, Nakahata N, Chisaka H, Matsuda T, Kimura Y, Tsuchiya S, Tei H, Okamura K,

Yaegashi N. The uterus sustains stable biological clock during pregnancy. *Tohoku J Exp Med* 2010; 221: 287-98 (査読有).
Doi: 10.1620/tjem.221.287

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 志津子 (AKIYAMA SHIZUKO)

東北大学・病院・助手

研究者番号: 80466549

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者