

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20854

研究課題名（和文）胎児発育不全児の神経学的後遺症克服のための新規胎児脳機能評価法の創出

研究課題名（英文）Development of a novel fetal brain function assessment method to overcome the neurological sequelae of fetuses with fetal growth restriction.

研究代表者

松田 淑恵（Matsuda, Yoshie）

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：20964787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：胎児発育不全とは何らかの原因で子宮内の胎児発育が遅延または停止する状態をいう。子宮内での実施が可能な新たな胎児脳機能評価法の確立が求められており、本申請者は核磁気共鳴画像法（MRI）検査を用いることを着想した。MRI検査の拡散強調画像は脳虚血を診断でき、見かけ上の拡散係数を求めて画像化した拡散係数画像は細胞性浮腫を定量的に評価可能である。本研究ではモルモット胎児発育不全モデルを作製し、胎児発育不全群とShum群において拡散強調画像を撮影した。しかし、モルモット胎児発育不全モデルの作製は実施できたが、拡散強調画像の撮影においては母獣の腸管ガスによる磁場不均一により鮮明な画像が得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、拡散強調画像（DWI）を用いた新たな胎児の脳機能評価方法を確立し、最終的には胎児発育不全児の神経学的後遺症を克服することを目標とした。3T MRI装置ではT2WIは胎仔脳を鮮明に撮像できたが、DWIに関しては母獣の便塊や腸管ガスの影響により磁場が乱れてしまい解析可能な個体が非常に少なく、両群で有意差が得られなかった。昨年度4.7T MRI装置用のマウス腹部コイルが新たに購入され、12月にマウス胎児のADC測定が可能であることを確認した。現在、研究の動物種をマウスに変更して胎仔のADCを検証する実験を計画している。

研究成果の概要（英文）：Fetal growth restriction is a condition in which fetal growth in the uterus is delayed or arrested for some reason. There is a need to establish a new evaluation method for fetal brain function that can be performed in utero. Therefore, we conceived the idea of using nuclear magnetic resonance imaging (MRI) to evaluate fetal brain function. Diffusion-weighted MRI images can diagnose cerebral ischemia, and diffusion coefficient images, in which the apparent diffusion coefficient is calculated and visualized, can quantitatively evaluate cellular edema. In this study, a guinea pig model of fetal growth retardation was created, and diffusion-weighted images were taken in the FGR and Shum groups. However, although the fetal growth retardation model was successfully created, diffusion-weighted images could not be obtained clearly due to the inhomogeneous magnetic field caused by maternal intestinal gas.

研究分野：胎児発育不全

キーワード：胎児発育不全 拡散強調画像

### 1. 研究開始当初の背景

胎児発育不全とは、子宮内で胎児の発育が何らかの原因により障害され妊娠週数相当の発育が出来なくなった状態をいい、胎児発育曲線の10パーセントタイル以下の出生体重をもつ児と定義される。胎児発育不全は全妊娠の8-10%、周産期死亡の18%、胎児死亡の31%に認められるが、現在胎児発育不全に対する確立した治療法はなく、子宮外での新生児管理が可能な在胎週数の胎児は、不可逆的なダメージが児に発生する前に子宮外管理(妊娠終了)に移行する。胎児発育不全児は胎盤機能低下により慢性的な低酸素血症に陥っている可能性があり、胎児発育不全児の子宮内での状態(well-being)を正確に評価することが必要である。現在の胎児 well-being 評価方法としては、胎児心拍監視装置、超音波パルスドプラ法の2つがある。しかし、単胎妊娠の女性503人を対象に、胎児発育不全児の娩出時期決定に対する超音波パルスドプラ法の胎児静脈管血流波形(DV)の有用性を検討したTRUFFLE試験では、2歳時点での神経障害なし生存率は、胎児心拍数変動による娩出と2種のDV変化による娩出の3群で有意差はなく、いずれの娩出基準を用いても児の死亡または神経学的後遺症が2割程度生じることが明らかとなった(Lancet, 2015)。胎児発育不全児において死亡や神経学的後遺症を予防できる術がないことは周産期医療の積年の課題であり、喫緊の解決が望まれる。一方、脳の評価方法として最も確立している検査法は核磁気共鳴画像法(MRI)検査であり、脳梗塞や脳膿瘍、脳腫瘍等の診断に広く用いられている。MRI検査の中でも、拡散強調画像(Diffusion weighted image, DWI)は水分子の拡散運動を画像化したものであり、超急性期または急性期の脳梗塞診断に用いられている。また、DWI画像と同時に、見かけ上の拡散係数(apparent diffusion coefficient, ADC)を求めて画像化した拡散係数画像(ADC map)が得られる。ADCは細胞性浮腫を定量的に評価することができる。本申請者はMRI検査によって胎児脳の虚血・低酸素の評価を正確に行うことができれば、不可逆的なダメージが児に発生する前に子宮外管理に移行することにより、これまでの周産期管理では不可避だった胎児発育不全児の神経学的後遺症を克服できると考えた。

### 2. 研究の目的

モルモットにおいて2種類の胎仔脳障害モデルを作製し、胎仔脳の虚血・低酸素がMRI検査によって検出可能であるかどうかを検証することを本研究の目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1. 片側頸動脈結紮によるモルモット胎仔脳虚血モデル作製とMRI検査

##### 1-1、モルモット胎仔脳虚血モデルの作製

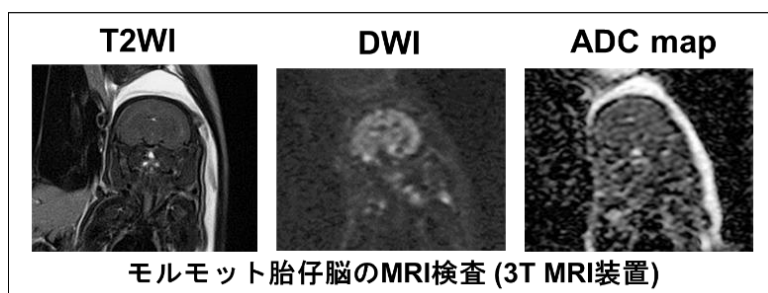
妊娠53日前後(ヒト妊娠23-34週相当)に妊娠モルモットをイソフルランで麻酔し開腹、子宮を小切開し、胎仔頸部を露出させた。胎仔頸部の皮膚を切開し、片側頸動脈を結紮離断し胎仔脳虚血モデルを作製した。胎仔頸部および子宮を閉創して閉腹した。

##### 1-2、胎仔MRI検査

妊娠60日前後(ヒト妊娠34-36週相当、脳虚血作製から7-10日後)に麻酔下に冠状断の胎仔脳MRI(T2強調画像(T2WI)、DWI、ADC map)を撮影した。3T MRI(MAGNETOM Verio、シーメンス社)を使用した。

T2強調画像ではTSE BLADEを用いた。撮像条件は、TR/TE = 5000/133 ms, NEX = 1, turbo factor = 21, FOV = 120 × 120 mm<sup>2</sup>, matrix size = 384 × 384, slice thickness = 1.5 mmとした。DWI撮影はsingle-shot EPIを用いた。撮像条件はTR/TE = 7000/111 ms, b = 0 and 1000 s/mm<sup>2</sup>, FOV = 150 × 86.1 mm<sup>2</sup>, matrix size = 202 × 93とした。

ImageJにおいてADC値を脳虚血側と健常側で比較検討した。



##### 1-3、胎仔脳における病理学的検討

妊娠60日前後にMRIを撮影後、すべての胎仔において脳組織を採取した。脳組織のTTC染色、HE染色を実施し、虚血作製側と健常側を比較した。

## 2. 片側子宮動脈結紮によるモルモット胎児発育不全モデルの作製と MRI 検査

### 2-1、モルモット胎児発育不全モデル群および Sham 群の作製

妊娠 30 日前後に妊娠モルモットを麻酔下に開腹し、母獣片側子宮動脈を単離し結紮、閉腹することにより、モルモット胎児発育不全モデル群を作製した。Sham 群は妊娠 30 日前後に麻酔下に開腹し、片側子宮動脈を同定し閉腹した。

### 2-2、胎仔 MRI 検査

妊娠 60 日前後(ヒト妊娠 34-36 週相当)に麻酔下に冠状断の胎仔脳 MRI (T2WI、DWI、ADC map) を撮影した。ImageJ において冠状断の ADC 値をモルモット胎児発育不全モデル群と sham 群と比較検討した。

### 2-3、胎仔脳における病理学的検討

妊娠 60 日前後に MRI を撮影後、すべての胎仔において脳組織を採取した。脳組織採取後、HE 染色を実施し、モルモット胎児発育不全モデル群と sham 群とで比較を行った。両群の脳組織の定量 PCR 法による HIF-1 の遺伝子発現量を確認し、脳組織の低酸素の程度を両群で比較した。

## 4. 研究成果

### 1. 片側頸動脈結紮によるモルモット胎仔脳虚血モデル作製と MRI 検査

妊娠 53 日前後のモルモット胎仔の頸動脈を結紮し、妊娠 60-62 日で MRI 検査を行った。頸動脈結紮は予定通り施行でき、MRI 検査を施行したが、結紮側と健常側において ADC 値に有意差は認められなかった。頸動脈結紮を施行した胎仔において、MRI 検査後に脳組織を採取し TTC 染色を行ったが、TTC 染色でも梗塞巣を確認できなかった。片側の頸動脈結紮では十分な脳虚血が得られないと考えられた。

### 2. 片側子宮動脈結紮によるモルモット胎児発育不全モデルの作製と MRI 検査

#### 2-1、モルモット胎児発育不全モデル群および Sham 群の作製

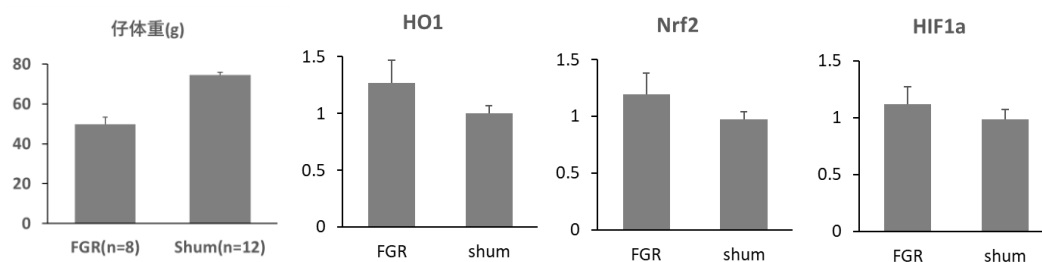
FGR 群の出生体重の平均は  $44.8 \pm 3.6$ g、Sham 群は  $74.6 \pm 1.3$ g であった ( $P < 0.001$ )。脳重量については、FGR 群  $2.29 \pm 0.06$ g、Sham 群  $2.60 \pm 0.03$ g であった ( $P < 0.001$ )。

#### 2-2、胎仔脳における病理学的検討

FGR 群では HE 染色において明らかな虚血巣は認めなかったが、血管壁の肥厚が観察された。

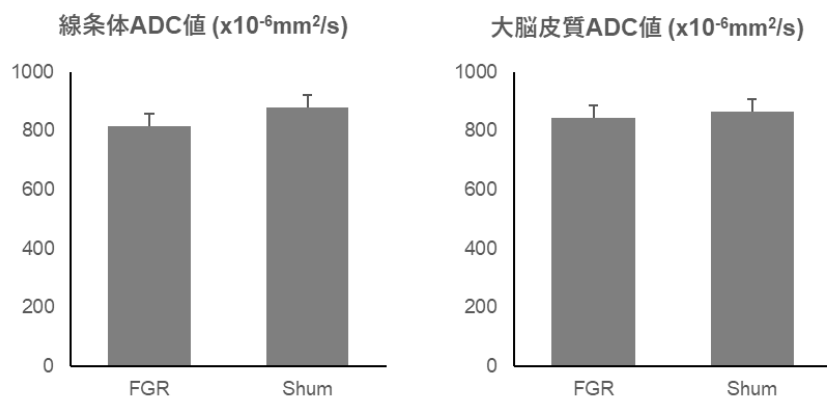
#### 2-3、胎仔脳における遺伝子発現解析

胎仔脳組織から total RNA を抽出し、Hprt1 を Reference として HO-1、Nrf2、HIF-1 $\alpha$  の遺伝子発現解析を行った。遺伝子発現解析では両群で有意差は認めなかった。



#### 2-4、胎仔脳の MRI 撮影

3T MRI 装置を用いて T2WI、DWI、ADC map を撮像した。T2WI は鮮明な画像が得られた。画像上、両群で差異は認めなかった。また、FGR 群と Sham 群で ADC 値は両群で有意差は認めなかった。



### 3. 考察

本研究では、DWI を用いた新たな胎児の脳機能評価方法を確立し、最終的には胎児発育不全児の神経学的後遺症を克服することを目標とした。研究当初は 4.7T MRI 装置の使用を想定していたが、表面コイルが小さく撮像範囲が非常に狭いため胎仔脳の画像評価が困難であった。また、グラジェントコイルに比してモルモットが小さいため、十分な解像度も得られなかった。モルモット専用の自作コイルも作製したが、それでも十分な解像度は得られなかった。そこで MRI 検査装置を 3T MRI（シーメンス社）に変更し、11 cm リング状コイルと板状の small コイルで母獣を挟んで撮像を行った。

3T MRI 装置では T2WI は胎仔脳を鮮明に撮像できたが、DWI に関しては母獣の便塊や腸管ガスの影響により磁場が乱れてしまい解析可能な個体が非常に少なく、両群で有意差が得られなかった。昨年度 4.7T MRI 装置用のマウス腹部コイルが新たに購入され、12 月にマウス胎児の ADC 測定が可能であることを確認した。現在、研究の動物種をマウスに変更して胎仔の ADC を検証する実験を計画している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	稲富 絢子  (Inatomi Ayako)  (40823464)	滋賀医科大学・医学部・医員    (14202)	

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