

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591597

研究課題名(和文)胎児早産児の脳白質損傷がその後の髄鞘化に与える影響の解析

研究課題名(英文)The effect of cerebral white matter injury on the subsequent myelination in premature fetal sheep

研究代表者

松田 直(MATSUDA, TADASHI)

東北大学・大学病院・准教授

研究者番号：50361100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

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、深部白質に誘導された壊死性病変の組織学的特徴とMRI異常信号の関連性について解析した。まず、巣状脳白質損傷はいずれもその病変部に一致してT1高信号かつT2低信号として明瞭に検出できた。次いで、受傷後2-5日の亜急性期であれば、びまん性脳白質損傷はびまん性のT2高信号として検出できる可能性が指摘された。さらに、免疫染色と同様に電子顕微鏡によって、びまん性脳白質損傷における髄鞘化の過成熟を把握できる可能性を指摘できた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the association between histopathologic findings and magnetic resonance images using sheep fetuses experimentally induced cerebral white matter injury (WMI) by ischemic insults. First, all lesions of focal WMI were clearly observed as at once a high intensity spot of T1 weighted image and a low intensity spot of T2 weighted image in the magnetic resonance imaging. Second, diffuse WMI lesion was possibly shown as a high intensity region of T2 weighted image in the subacute phase (2-5 days) after the insults. In addition, an electron microscopic analysis might be quite useful to understand and detect the over-maturity of myelination induced by diffuse WMI.

研究分野：医歯薬学 内科系臨床医学 胎児・新生児医学 胎児医学

キーワード：脳白質損傷 胎児 早産児 脳虚血 髄鞘化 核磁気共鳴画像法 免疫組織染色 電子顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

脳室周囲白質軟化 (PVL) は脳白質損傷 (White matter injury, 以下 WMI) 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 WMI の一型に過ぎず、WMI 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。

そのため、新生児集中治療における WMI 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。

一方、ヒツジ胎子のびまん性 WMI モデルを用いた予備実験で、われわれはその亜急性期の皮質下白質では成熟した希突起膠細胞 (oligodendrocyte, 以下 OL) が著しく増加することを確認した。しかし、この知見は Volpe らが提唱した「急性期の OL 前駆細胞の減少が WMI の最終像である髄鞘化遅延ならびに脳白質量減少を引き起こす」という従来の仮説では証明できない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでわれわれが開発したヒツジ胎子の WMI モデルを応用して、その亜急性期に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 WMI に対する新たな MRI 診断基準を提案し、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とともに、極低出生体重児の神経学的予後を推定するための指標とする。

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 (2011 医動-55,56)、東北大学医学部附属動物実験施設において 2012 年 10 月から 2015 年 3 月に実施された。牧場から購入した妊娠ヒツジを動物実験施設に収容し、専用の手術設備と母獣胎子の集中監視システムを用いて慢性実験系を作成した。

妊娠 99-108 日 (満期 147 日) に全身麻酔下に母獣を開腹して子宮切開し、胎子の腹部大動脈、上下大静脈、羊水腔内にカテーテルを留置した後、胎子を子宮内にもどして閉腹した。

手術後 48 時間を経て全ての胎子を、炎症+低酸素群 (n=6)、人工胎盤群 (n=3)、対象群 (n=4) に分けて、以下の負荷実験を行った。

炎症+低酸素群では胎子に G-CSF 50 µg/日を 5 日連続で静注し、その 3 日目に endotoxin 20 mg を羊水内注入して壊死性臍帯炎を誘導した。さらに 4 日目に胎子循環血液量の 40% を新鮮凍結血漿と交換輸血して、炎症下に貧血性低酸素を負荷して脳虚血を誘導した (図 1, Saito M, Am J Obstet Gynecol, 2009)。

人工胎盤群では手術後 4 日を経て、われわれが開発したポンプレス人工胎盤回

路を装着した (Miura Y, Pediatr Res, 2012)。装着後 24 時間にピトレッシンを 1.0 mU/kg/分で 2 時間持続点滴して、回路血流量の増加による脳虚血を誘導した (図 2)。

対照群には生理食塩水を投与した。

妊娠 108-117 日に胎子脳 MRI を撮影し (autopsy imaging)、中枢神経系を灌流固定した後に切り出して組織学的解析に供した。MRI は動物実験専用 (0.5 Tesla 膝用コイル, spin echo 法) で T1/T2 強調像を 0.25 mm スライスで撮影した。

電子顕微鏡撮影には速やかな組織固定が求められたため MRI 撮影と両立させることができなかった。そのため、炎症+低酸素群 (妊娠 113 日剖検) の内、WMI あり 1 例、WMI なし 1 例、対照 1 例 (妊娠 130 日剖検) の 3 例で髄鞘化の程度を比較した。

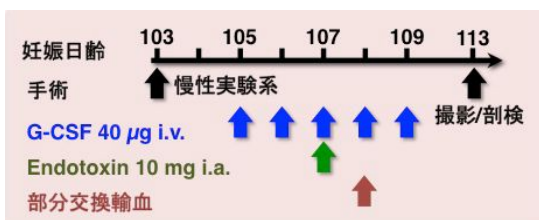


図 1. 炎症+低酸素負荷

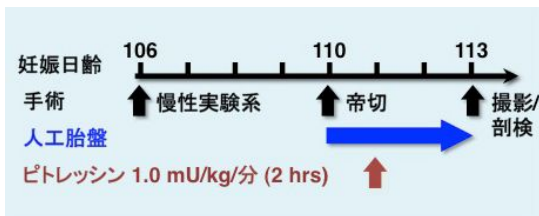


図 2. 人工胎盤+ピトレッシン負荷

4. 研究成果

3 群胎子の基本情報を表 1 に示した。

表 1. 3 群胎子の基本情報

	炎症+ 低酸素群 (n=6)	人工 胎盤群 (n=3)	対照群 (n=4)
雄/雌	5/2	2/1	3/1
手術日齢 (日)	102.3 ± 0.3	108.0 ± 2.0	103.5 ± 3.4
剖検日齢 (日)	111.0 ± 2.3	115.0 ± 2.0	110.8 ± 2.8
剖検時 体重(kg)	1.83 ± 0.33	2.32 ± 0.12	1.45 ± 0.28
組織学的 WMI (%)	3/6 (50)	3/3 (100)	0/4 (0)
MRI 診断 WMI (%)	3/6 (50)	3/3 (100)	0/4 (0)

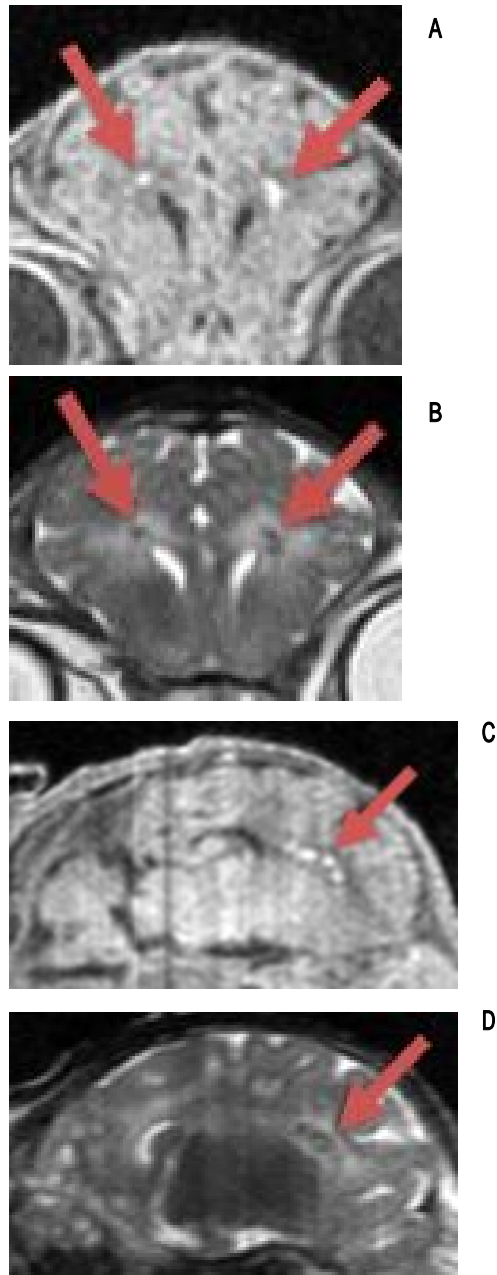
WMI, white matter injury.

数値データは「平均 ± 標準偏差」で表した。

胎子の性別，手術日齢，剖検 (=MRI 撮影) 日齢，剖検時の体重で 3 群間に有意な差はなかった。炎症+低酸素群の 50%と人工胎盤群の全例に組織学的な WMI が観察された。

組織学的 WMI (6 例) の内訳は，炎症+低酸素群 (3 例) では右側多巣性 WMI が 2 例と右側巣状 WMI が 1 例，人工胎盤群 (3 例) では両側多巣性 WMI が 2 例と両側巣状 WMI が 1 例であった。

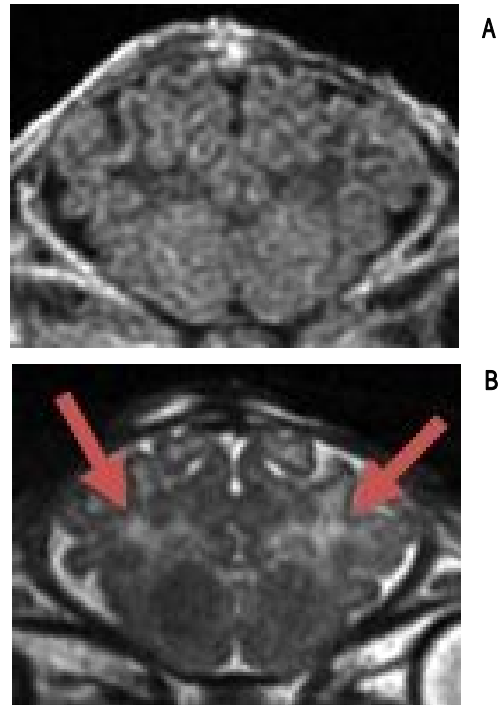
組織学的巣状 WMI 病変はいずれも MRI にて，「T1 強調で高信号かつ T2 強調で低信号」の異常信号として明瞭に検出できた (図 3)。



**図 3. ヒツジ胎仔脳に誘導された組織学的巣状 WMI に対応する MRI 異常信号。**

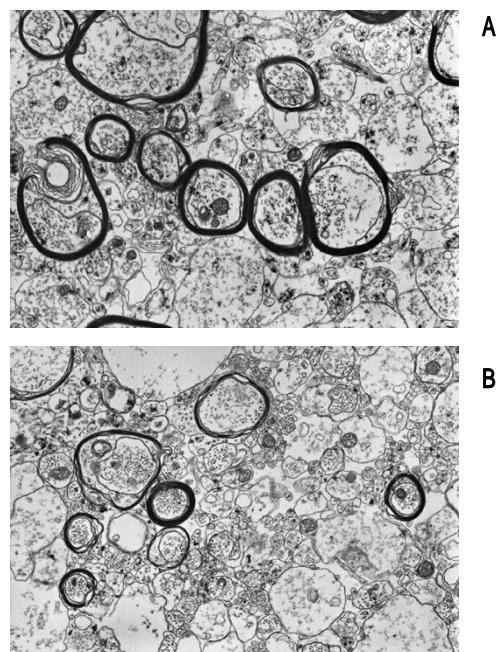
病変はいずれも MRI にて，T1 強調で高信号かつ T2 強調で低信号の異常信号として明瞭に検出できた (矢印)。A: 冠状断の T1 強調画像，B: 冠状断の T2 強調画像，C: 矢状断の T1 強調画像，D: 矢状断の T2 強調画像。

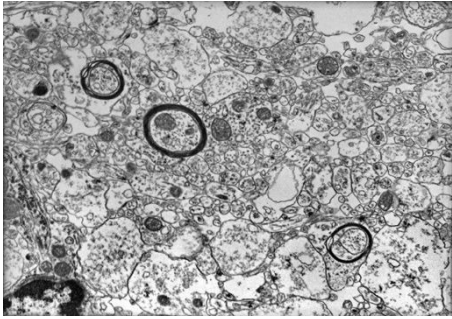
一方，炎症+低酸素群 (n=6) で強い脳虚血が負荷されたにもかかわらず WMI が誘導されなかった 3 例の内 1 例では，両側側脳室周囲の深部白質にびまん性の T2 強調高信号が観察された (図 4)。この異常信号はびまん性 WMI の亜急性期における異常な髄鞘化を MRI 異常信号として捉えた可能性があり興味深い。組織免疫染色で本病巣部位の特徴を明らかにして，引き続き解析を続ける予定である。



**図 4. 炎症+低酸素群のヒツジ胎仔脳に誘導されたびまん性 MRI 異常信号。**

T1 強調に異常信号はなく T2 強調で高信号の異常信号がびまん性に観察された (矢印)。A: 冠状断の T1 強調画像，B: 冠状断の T2 強調画像。





C

**図 5. 電子顕微鏡撮影(6,000倍)によるヒツジ胎仔脳白質の髄鞘化所見の比較.**

A: 対照例(妊娠130日剖検), B: WMIあり(妊娠113日剖検), C: WMIなし(妊娠113日剖検). いずれも半卵円中心で側脳室前角と脳溝の中間部位の深部白質を観察.

電子顕微鏡撮影の所見を図5に示した炎症+低酸素群(妊娠113日剖検)の内,WMIあり1例,WMIなし1例,対照1例(妊娠130日剖検)の3例で髄鞘化の程度を比較した.炎症+低酸素群の2例はいずれも対照例(A)と比較して髄鞘化軸策数も髄鞘の巻数も少なかったが,WMIあり例(B)はWMIなし例(C)に比較して明らかに髄鞘化軸策数と髄鞘の巻数も多かった.

以上に基づいて研究成果をまとめた.

- (1) ヒツジ胎仔の脳虚血受傷後2-5日のWMIをMRIによるautopsy imagingで解析することができた.
- (2) 巣状WMI病変はいずれもMRIにてT1強調で高信号かつT2強調で低信号の異常信号として明瞭に検出できた.
- (3) びまん性WMI病変の異常髄鞘化をびまん性T2高信号として把握できる可能性を指摘することができた.
- (4) 電子顕微鏡においても免疫染色と同様にびまん性WMI病変の異常髄鞘化を把握できる可能性を指摘することができた.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Kitanishi R, Matsuda T, Watanabe S, Saito M, Hanita T, Watanabe T, Kobayashi Y. Cerebral ischemia or intrauterine inflammation promotes differentiation of oligodendroglial precursors in preterm ovine fetuses: possible cellular basis for white matter injury. *Tohoku J Exp Med* 2014; 234: 299-307 (査読あり). DOI: 10.1620/tjem.234.299.

Miura Y, Matsuda T, Funakubo A, Watanabe S, Kitanishi R, Saito M, Hanita T. Novel modification of an artificial placenta: pumpless arteriovenous extracorporeal life support in a premature lamb model. *Pediatr Res* 2012; 72: 490-4(査読あり).

DOI: 10.1038/pr.2012.108.

[学会発表](計3件)

Saito M, Matsuda T, Usuda H, Watanabe S, Kitanishi R, Hanita T, Yaegashi N. The reaction of fetal cortisol against intra-uterine inflammation and fetal circulatory insufficiency in fetal sheep. Society for Reproductive Investigation 62nd Annual Scientific Meeting. San Francisco, CA (USA); March 25-28, 2015.

Saito M, Miura Y, Kitanishi R, Hanita T, Matsuda T, Sugiyama T, Sugawara J, Yaegashi N. Efficacy of the parallel oxygenator circuit in the pump-less artificial placenta. Society for Gynecologic Investigation 2014 Annual Scientific Meeting. Firenze (Italy); March 26-29, 2014.

Saito M, Miura Y, Funakubo A, Matsuda T, Yaegashi N. Development of an artificial placenta using a premature lamb model. Society for Gynecologic Investigation 2013 Annual Scientific Meeting Orlando, Florida (USA); March 20-23, 2013.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 直(MATSUDA, tadashi)  
東北大学・大学病院・准教授  
研究者番号: 50361100

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

渡邊 達也(WATANABE, Tatsuya)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号: 70400380

齋藤 昌利(MATSUDA, Tadashi)  
東北大学・大学病院・助教  
研究者番号: 00451584

秋山 志津子(AKIYAMA, Shizuko)  
東北大学・大学病院・助手  
研究者番号: 80466549

小野寺 幸子(ONODERA, Sachiko)  
東北大学・大学病院・特任助手  
研究者番号: 00509408