

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592476

研究課題名(和文) 発達期の副交感神経活動性と低酸素虚血性脳障害の重症度に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Parasympathetic nerve activity and hypoxic-ischemic brain damage in the developing fetus

研究代表者

鮫島 浩 (SAMESHIMA, Hiroshi)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50274775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胎児は副交感神経優位であり分娩時に低酸素に曝される。副交感神経優位は胎児にとって低酸素耐性となるという合目的性を考え、7生日ラットの低酸素虚血性脳障害モデルで検討した。その結果、アセチルコリン受容体刺激は容量反応依存性に脳保護作用を示し、抑制は脳障害が増悪した。機序としてマイクログリアと炎症性サイトカインが関与した。次に、副交感神経系の活動性の指標となる心拍数細変動の変化と脳障害との関連性を検討した結果、低酸素中の反応期細変動の減少が脳障害指標として有用である可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：The fetus is parasympathetic nerve dominant in a relatively lower pO<sub>2</sub> condition, which presumably serves as hypoxia-tolerance. To test this hypothesis, we used hypoxic-ischemic brain damage models of 7-day-old Wistar rats. As a result, acetylcholine receptor agonists improved brain damage, while its antagonists worsened them. In addition, microglia activation and inflammatory cytokine production are playing roles. Next, we used same animal models and recorded heart rate variability during repetitive hypoxic stresses, which is represented as parasympathetic nerve activity. Repetitive hypoxia resulted in decreased baseline and responsive variability in some animals, which is more often associated with later brain damage. These findings suggest that parasympathetic activation serves as hypoxia-tolerance and that its suppression can be detected by decreases in fetal heart rate variability during hypoxic insults.

研究分野：周産期医学、胎児生理学、低酸素性脳障害、胎児心拍数モニタリング、産婦人科学

キーワード：低酸素虚血性脳障害 副交感神経 アセチルコリン受容体 マイクログリア 炎症性サイトカイン 胎児心拍数細変動

## 1. 研究開始当初の背景

分娩前後の低酸素虚血症は現在でも大きな問題であり、特に成熟時の分娩時脳障害の半数以上を占めている。われわれの約 12 万人の population-based 研究からは、低酸素症の存在は脳障害発症の危険性を約 12 倍高くする(OR 12, 95%CI 9.5-11.4, J Maternal Fetal Neonatal Med, 2011)。

一方、低酸素症は胎児の自律神経を刺激するが、発達段階にある胎児では副交感神経系が優位であることが判明している。われわれの 2011 年の先行研究で、副交感神経の興奮は、児の脳障害に対して脳保護作用を示すことを世界に先駆けて明らかにした(Reproductive Sciences, 2011;18:172-9)。胎児は分娩時に低酸素症になる危険性が高いが、副交感神経を優位に保つことで、低酸素に対する脳保護作用を維持しているとわれわれは考えている。

ところで、胎児の副交感神経系の活動性は、胎児心拍数モニタリング上の細変動に反映される (Ikenoue, Am J Obstet Gynecol 1981;141:797-806)。特に、低酸素が負荷された場合には、神経反射を介して一過性徐脈が出現する。われわれは、この一過性徐脈出現中の細変動の増加が副交感神経の指標となる、と推測している

低酸素時の副交感神経系の活動性と、脳保護作用に関する基礎的研究は、われわれの先行論文が研究の端緒であり、世界的にも極めて先進的であり、かつ、臨床応用可能な実際的な研究に直結する可能性が高い。

## 2. 研究の目的

本研究では、(1)副交感神経刺激が低酸素性脳障害を抑制するか、するとすればその機序は何かを検討し、(2)低酸素症によって起こった一過性徐脈経過中の細変動を詳細に分析し、脳障害との関連性を動物実験モデルを用いて研究することを目的とする。

副交感神経刺激は、既に広く臨床応用され

ている薬剤が多く存在する。また音楽等によるリラクゼーションも副交感神経を刺激することが知られている。したがって臨床応用の可能性が高い。また、胎児心拍数モニタリングは広く臨床応用されていることから、細変動を用いて副交感神経の活動性を観察することも十分に可能である。このように、臨床応用に結びつく可能性の高い研究目的を設定した。

## 3. 研究の方法

宮崎大学の倫理委員会の承認を得て、以下の実験を行った。

周産期動物モデルとして、ヒトの正期産胎児と中枢神経系の発達が近いことが報告されている 7 生日の Wistar ラットを用いた。

適切な麻酔下に 1 側の頸動脈を結紮し、十分な回復後に低酸素負荷を加えた。このモデルでは、結紮側に低酸素虚血性脳障害が発症し、対側は低酸素が負荷されるが明らかな脳障害は発症せず、組織学的検討では対照となる (Levine-Rice モデル)。

低酸素実験終了後、児ラットを母獣のチェンバーに移し、適切な環境下に 7 日間、飼育を継続した。実験終了 7 日後の生後 14 日後に、全身麻酔下に安楽死させ、脳を摘出し、組織学的検討を行った。脳障害の組織学的判定には、ヘマトキシリン/エオジン染色と、免疫組織学的染色法とを用い、障害部位の面積、神経細胞の消失を検討した。

副交感神経刺激には、カルバコール、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (ガランタミン) を用いた。マイクログリア活性化は組織学的に評価し、サイトカイン産生は免疫組織学的染色法を用いて評価した。

心拍数は、児ラットに心電図電極を装着し、コンピュータプログラムで解析した。心拍数の細変動は、基線部と、低酸素に反応した反応部とに分け、目視による半定量 (正常 >15bpm, 減少 ≤15bpm) 評価と、コンピュータに蓄積されたデータによる定量評価と

で行った。

低酸素負荷は、単回負荷(1 時間、2 時間)か、あるいは 10 分間毎に 10 回の repetitive hypoxia で施行した。

#### 4 . 研究成果

主に以下の 4 項目に関して検討した。

##### 1) 刺激 / 抑制実験 :

副交感神経刺激剤 (アセチルコリン受容体刺激剤) を低酸素負荷前に投与し、2 時間の低酸素虚血負荷を加えると、生食を用いた対照実験群に比し、大脳皮質と海馬の神経細胞障害を有意に減少させた。(文献 1)

逆にアセチルコリン受容体抑制剤を 1 時間の低酸素負荷前に投与すると大脳皮質と海馬の脳障害の重症度が増した。(文献 2)

##### 2) 容量反応実験

アセチルコリンエステラーゼ阻害剤 (ガラントミン、1.0mg/kg, 2.5mg/kg, 5.0mg/kg) を用いた実験から、脳障害軽減作用に dose-dependent の関係が証明された。また、その背景にあると推測されたマイクログリアの活性化も、サイトカイン産生にも同様に dose-dependent 関係が示された。(文献 3)

投与時期に関して、低酸素負荷前と負荷後とで検討すると、脳障害抑制作用は負荷前投与では有効であったが、発症後の治療的投与では有効性が示されなかった。(文献 3)

低酸素負荷後のマイクログリア活性化の経時的变化は、海馬では急性期に活性化され 48 時間後に徐々に減少したが、一方、白質と大脳皮質では 24 時間以降の慢性期に徐々に活性化し、遅延型反応を示した。このように脳の部位別にマイクログリアの反応性が異なることを明らかにした。(文献 4)

大脳皮質と白質の遅延型障害に対しては、24 時間後、48 時間後、72 時間後に複数回連続投与することで脳障害を抑制することが判明した (文献 5)。

##### 3) マイクログリア、炎症性サイトカインの関与

アセチルコリン受容体刺激によりマイクログリア活性化が有意に抑制され、その部位の脳障害が軽減した (文献 2)。また、その部位で産生される炎症性サイトカイン (IL-1) も有意に減少した。(文献 3)

##### 4) 心拍数細変動

ラットモデルに低酸素負荷を繰り返すと、脳障害発症個体では、低酸素中の反応期細変動も、回復期の基線細変動も減少した。特に 5 回目以降の低酸素刺激に対する反応では、後に脳障害を発症する個体では非発症個体に比べて有意に細変動が低下しており、中でも反応期細変動の変化が明白であった。(文献 6, 投稿中)

以上をまとめると、副交感神経刺激は児脳障害の軽減に有効である。その機序としてマイクログリアの活性化抑制、マイクログリアから産生される炎症性サイトカインの抑制が関与すると考えられた。

さらに副交感神経の活動性は胎児心拍数モニタリングの細変動で評価でき、その減少が脳障害と密接に関連した。特に、子宮収縮に反応して起こる periodic change の途中の、反応期細変動の減少が明白であり、臨床応用の点からも重要であると思われた。

#### 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 6 件)

1. Furukawa S, Sameshima H, Yang L, Harishkumar M, Ikenoue T. Regional differences of microglial accumulation within 72 hours of hypoxia-ischemia and the effect of acetylcholine receptor agonist on brain damage and microglial activation

in newborn rats. Brain Res. 査読有, 2014, 8;1562:52-8. doi:

10.1016/j.brainres.2014.03.028.

2. Furukawa S, Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. Repetitive administration of acetylcholine receptor agonist rescues brain inflammation and brain damage after hypoxia-ischemia in newborn rat. J Perinat Med. 査読有, 2014 ;42(3):379-84. doi:

10.1515/jpm-2013-0175.

3. Furukawa S, Yang L, Sameshima H. Galantamine, an acetylcholin- esterase inhibitor, reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. Int J Dev Neurosci. 査読有, 2014;37:52-7. doi:

10.1016/j.ijdevneu.2014.06.011.

4. Furukawa S, Sameshima H, Yang L, Ikenoue T. Activation of acetylcholine receptors and microglia in hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. Brain Dev. 2013;35(7):607-13.

doi:10.1016/j.braindev.2012. 10.006.

5. Furukawa S, Sameshima H, Yang L, Ikenoue T. Acetylcholine receptor agonist reduces brain damage induced by hypoxia-ischemia in newborn rats. 査読有, Reprod Sci. 2011;18(2):172-9. doi:

10.1177/1933719110385129.

6. Yang L, Sameshima H, Ikenoue T. Changes in heart rate patterns by lipopolysaccharide and intermittent hypoxia-ischemia in 7-day-old rats. J Obstet Gynaecol Res.査読有,

2010;36(5):1102-7. doi:

10.1111/j.1447-0756.2010.01273.x.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 鮫島 浩. 胎児心拍数モニタリング. 中国四国産科婦人科学会学術集会. 2014.9.13~2014.9.14 ANA クラウンプラザホテル宇部 (山口県宇部市)

2. Sameshima H. Trend in perinatal brain damage in our regional

population-based study. 46th International Congress on Pathophysiology of Pregnancy. 2014.9.18 Tokyo(Japan)

3. Sameshima H. Amniocentesis for preterm labor without clinical chorioamnionitis; revisited. 100 Annual Congress of Korean Society of Obstetrics and Gynecology. 2014.9.25 Seoul(Korea)

4. 鮫島 浩. 糖尿病合併妊娠の産科管理、特に胎児管理を中心に. 第 30 回日本糖尿病・妊娠学会. 2014.11.28 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

5. 鮫島 浩. 新生児脳症と周産期医療 第 18 回日本小児神経感染症学会. 2013.10.11 シーガイアコンベンションセンター (宮崎県宮崎市)

6. 鮫島 浩. 周産期医療からみた脳性麻痺の問題点 第 40 回日本産婦人科医会学術集会. 2013.10.12 江陽グランドホテル (宮崎県仙台市)

7. 鮫島 浩. 周産期医療からみた脳性麻痺の問題点 東北産婦人科学会. 2013.10.13 江陽グランドホテル (宮崎県仙台市)

8. Sameshima H. Current status of perinatal brain damage: A regional population-based study in southern Japan. 26th Korean Society of Perinatology. 2013.11.8~2013.11.9 Seoul(Korea)

9. Sameshima H. Why does the fetus slow FHR in response to acute hypoxemia? 26th Korean Society of Perinatology. 2013.11.8~2013.11.9 Seoul(Korea)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鯨島 浩 (SAMESHIMA, Hiroshi)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：50274775

研究者番号：

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：