

論文の内容の要旨

論文題目：

拡散反射分光法を用いた低酸素性虚血性脳障害モデルラットの脳組織のモニタリング法について

氏名：木下 紗林子

諸言

1. 脳性麻痺

脳性麻痺(Cerebral palsy: CP)は、” 受胎から新生児期（生後 4 週間未満）の間に生じた脳の非進行性病変に基づく、永続的なしかし変化しうる運動および姿勢の異常である。その症状は 2 歳までに発現する。進行性疾患や一過性運動障害または正常化するであろうと思われる運動発達遅延はこれを除外する。” と定義されている。CP の原因はいくつか挙げられるが、その 15% に分娩進行中の低酸素性虚血性脳障害 (Hypoxic ischemic encephalopathy: HIE) がある。分娩に至るまでの妊娠経過に問題がなかったとしても、分娩時の臍帯圧迫や、胎盤の血流異常などに起因すると考えられる低酸素により数分から数時間の出来事で HIE が引き起こされる。このような状況を回避するために現在ほとんどの分娩取り扱い施設では、分娩進行時に胎児の心拍数変動と陣痛感覚をリアルタイムに計測する胎児心拍陣痛図 (cardiotocography: CTG) を用いている。CTG により、胎児の状態をリアルタイムに把握し、胎児が低酸素状態で、急速遂娩（鉗子分娩・吸引分娩・緊急帝王切開術）が必要な状態か否かを判断している。しかし、CTG を使用しているにもかかわらず、HIE を完全に予防することはできず、CP の発症頻度も減少傾向を示してはいない。また、CTG で胎児機能不全を疑い、急速遂娩（特に帝王切開術）を選択するケースが増加している。この理由として、個々の脳組織の低酸素への耐性に違いがあり、心拍数の減少の程度及び、心拍数が減少し続ける時間と出生後の神経学的所見との間に解離があると考えられる。

そこで、心拍数によって間接的に胎児の脳組織の状態を把握するのではなく、直接的に、正確に、また侵襲なく、低酸素による脳組織への影響を観察するモニタリング手法の確立が望まれる。

2. 拡散反射分光法

今回我々は拡散反射分光法に着目した。拡散反射分光法では一対の光ファイバーを対象となる組織に接し、一方の光ファイバーからでた光が組織内を通過することによって酸化型 Hb や還元型 Hb に吸収される、酸化型 Hb、還元型 Hb によって吸収スペクトルが違い、このことより組織内の Hb 酸素化度（酸素飽和度）の変動を検出できる。また酸化型 Hb と還元型 Hb の吸収スペクトルにおける等吸収点の変動を見ることで全 Hb 量を観察できる。この全 Hb 量は血液量を反映している。さらに、光が細胞ないし細胞小器官での散乱が起こり、受光側の光ファイバーで検出される。散乱振幅を計測することにより細胞の形態変化などをリアルタイムに観察することが可能となる。この技術は医療分野では近赤外光を使用する NIRS 脳計測装置（Near infrared spectroscopy: NIRS）として応用されている。主に精神科の分野で使用されているが、頭部全体の数カ所で酸素飽和度の計測を行い、うつ病などの診断に用いられている。

この技術を利用し、分娩進行中の胎児の頭部に母体の経膈的なアプローチで脳組織のリアルタイムな観察をし、脳組織中の酸素飽和度を計測することにより、脳がどの程度の低酸素状態にさらされているか。陣痛によって脳血流量がどのように変化するのか。また散乱信号を計測することによって、脳細胞が低酸素負荷によってどのような形態変化をもたらすのか。この点を観察したいと考えた。

以上より今回の研究では動物モデルを使用し、低酸素中の脳組織の観察を行うこととした。今回使用した動物モデルは HIE モデルラットで、ヒトの分娩時期の脳組織の発達と同程度の発達である、生後 7 日目のラットを使用し、低酸素、虚血の両方の負荷をかけることによってモデルを作成した。このモデルは 1981 年に rice らによって確立されたモデルである。この HIE モデルに対し、拡散反射分光法を用いて低酸素・虚血負荷中の脳組織の酸素飽和度と脳血流量、散乱信号を計測し、HIE における脳組織の変化を観察することを今回の研究の目的とした。

方法

今回の研究では先に述べた通り低酸素（酸素濃度 8%）と虚血（片側の総頸動脈の結紮）の 2 種類の侵襲を与えた HIE モデルラットを作成した。まず、イソフルランで麻酔をかけ、左総頸動脈を結紮し、麻酔から完全に覚醒させるため、2 時間のリカバリータイムを設けた。その後、再度イソフルランで麻酔をかけ、酸素濃度 8% の環境下で 2 時間 15 分おき、その後、酸素濃度 21% の環境下へ戻す。このラットモデルの作成は、総頸動脈の結紮以外は、通常、無麻酔で行われる。今回は頭部を固定し、頭皮を切開、頭蓋骨を露出させ頭蓋骨に光ファイバーを密着させる必要があったため、イソフルランによる麻酔を行った。合計 12 匹のラットに対して計測を行った。まず 6 匹は計測終了から 24 時間後に脳組織を脳の虚血の

部分が不染領域となる TTC 染色を行い、残りの 6 匹は低酸素終了直後に脳浮腫の判定を行うために、Dry and Wet 法により、脳組織内の水分含有率を求めた。拡散反射分光法による計測は、左右別々に、総頸動脈の計測前後、リカバリータイムの終了前、低酸素開始から、15 分後、45 分後、75 分後、105 分後、低酸素終了直後、低酸素終了後から 24 時間後の計 9 回行った。計測したパラメータは脳血液量、脳酸素飽和度、散乱振幅で、計測したデータは定量化を行った。

結果・考察

1. 低酸素中の HIE モデルの脳血液量、脳酸素飽和度、散乱の時間的推移

左総頸動脈の結紮後、左半球の脳血液量および酸素飽和度は右半球よりも軽度低下した。半球間の格差は、結紮後のリカバリータイム中に広がり、低酸素負荷開始前には統計学的に有意であった。低酸素負荷を開始した後、脳血液量は増加し、酸素飽和度は両半球において減少した。脳血液量の増加傾向は、左右半球共に、低酸素負荷の開始 45 分後にプラトーに達し、左半球における脳血液量は、低酸素負荷中に顕著に上昇し、右半球を上回った。酸素飽和度は、低酸素状態では、左半球および右半球の動態は類似していたが、左半球は常に右半球を下回っていた。

左総頸動脈の結紮後、散乱振幅は左半球においてわずかに増加し、右半球において軽度に減少し、結紮から 120 分後で半球間に有意差を生じた。低酸素負荷開始後、散乱振幅の一時的な上昇が右半球および左半球の両方に現れ、散乱振幅は低酸素負荷終了まで減少した。低酸素下での散乱振幅の減少は、右半球よりも左半球においてより早期に起こし、低酸素開始後 45 分と 75 分で半球間の有意に左半球が下回った。低酸素の経過が長くなるにしたがって、左右半球間の差は小さくなり、両半球は、低酸素負荷終了後すぐの計測では同レベルを示した。低酸素負荷終了から 24 時間後で、右半球の散乱振幅の値は、低酸素開始前と同等のレベルに戻った。対照的に、左半球の回復は中程度であり、散乱振幅は低酸素曝露前に観察されたレベルに達しなかった。

総頸動脈は、同側半球に酸素を供給する主要な血管であるが、Willis 動脈輪があることによって、反対側の半球へも血液の供給をすることが可能である。したがって、虚血状態への低酸素負荷によるさらなる負荷が、HIE 病変の不可逆的形成を導くことが想定された。今回の研究結果において、左総頸動脈結紮後の左半球における脳血液量および酸素飽和度の低下が軽度にとどまったのはこのことが理由と考えられる。

散乱振幅は、脳血液量と脳組織酸素飽和度と比較すると、低酸素負荷の間に半球の間で有意差を示すことが最も早かった。このことより、散乱振幅が HIE に関連する脳組織障害を検出する最も感度の高いパラメータであることが示唆された。

2. 散乱と脳組織水分含有率の関係

別の6匹の新生仔ラットを虚血・低酸素状態とし、低酸素終了直後に Dry and Wet 法で脳組織水分含有率を計測した。また散乱振幅は低酸素負荷開始後 105 分の値で評価した。この散乱振幅と脳組織水分含有率を比較したところ、左半球の脳組織水分含有率の割合は、すべての新生仔ラットにおいて右半球よりも高かった。対照的に、左半球の散乱信号は、6匹中5匹新生仔ラットにおいての右半球よりも低かった。さらに、脳組織水分含有率と散乱振幅との関係を調べた。その結果、両群間に有意な負の相関が認められ、低酸素負荷中の散乱振幅の低下が脳半球内の脳組織水分含有率の増加と比例した。

散乱振幅の低下が脳浮腫の程度を表す可能性がこの結果より考えられるが、先の実験結果からは散乱振幅の値は低酸素負荷終了直後の計測では同程度であった。左半球の散乱振幅の方が低下している時間は長いことから、散乱振幅の低下の程度だけでは説明できず、継続時間も脳浮腫に関わってくると考えられた。

本研究では、ラット HIE モデルにおける拡散光反射分光法を用いた脳組織のリアルタイムモニタリングのための実験を行った。新生児における HIE の発症を回避するための最適なタイミングを決定するには、CTG のみに依存する現在の分娩管理には限界があるため、産科における胎児の脳組織を評価するための新たなモニタリング望ましく、今回の研究では拡散反射分光法を使用し、HIE モデルの低酸素中における脳循環代謝、散乱振幅を計測した。中でも散乱振幅は脳組織の損傷を反映している可能性が高く、重要なパラメータとなる可能性が示唆された。