

博士論文

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

木下 紗林子

要旨

脳性麻痺の一因として低酸素性虚血性脳症 (Hypoxic ischemic encephalopathy: HIE) がある。本研究では、左総頸動脈結紮による虚血と低酸素の負荷により作成される新生仔ラット HIE モデルにおいて、拡散反射分光法を用いた脳循環、および散乱振幅の経時的モニタリングを行った。低酸素負荷中には両半球共通して、脳血液量の急激な上昇と酸素飽和度の低下が確認された。一方で散乱振幅は低酸素下で左総頸動脈結紮を行った左半球でのみ早期に低下した。この散乱振幅は脳水分含有率と負の相関を認めた。散乱振幅の測定は、HIE につながる脳組織変化を検出するために有用なアプローチとなる可能性がある。

序文

1. 脳性麻痺・低酸素性虚血性脳障害

脳性麻痺(Cerebral palsy: CP)は、1968 年の厚生省脳性麻痺研究班会議で、“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。”と定義された(1)。日本の疫学統計によると、CP は新生児の 0.2%に発生する(2)。最近の医療技術の進歩にもかかわらず、その発生率は 1980 年代の 0.1%との集計に対してその後、増加傾向にある(3), (4)。

CP を引き起こす原因は多岐にわたり、早産、多胎妊娠、母体のウィルス感染、母体の甲状腺異常、子宮内感染、分娩が原因の新生児仮死があり(5) (6)、その中で、分娩進行中の低酸素虚血性脳症（Hypoxic ischemic encephalopathy: HIE）は CP の全原因の 15%を占める(3)。

HIE は胎児期の低酸素や、分娩後の重症新生児仮死により脳循環が変化し、脳組織の低酸素・虚血から脳障害を起こす疾患である。分娩時のストレスで交感神経系が亢進し、脳循環血液量が増加する。しかし、その後脳血管収縮、循環不全

が生じ脳循環血液量は減少する。そして、再酸素化され、脳血管に再還流が起こり、神経細胞障害が生じる。低酸素・虚血でまず神経細胞死が起こる。また低酸素・虚血で嫌氣的解糖が亢進し、ATP が消費される。そして細胞膜の脱分極が引き起こされ Ca イオンが細胞内に流入する。神経細胞内の Ca イオン濃度の上昇は、シナプスの末端からグルタミン酸などの興奮性神経伝達物質がシナプス間隙に放出する。グルタミン酸などの興奮性神経伝達物質は過剰となると神経毒性をもつ。グルタミン酸で神経細胞が興奮、NMDA 受容作動性イオンチャネルが開き、細胞内の Ca イオンの遊離とともに、Ca イオンが上昇する。細胞内の Ca イオンの増加は神経細胞や細胞膜の障害と誘発し、活性酸素（フリーラジカル）や一酸化窒素（NO）を産生、神経細胞のネクロシスやアポトーシスなどの2次性神経細胞死を数時間から数日かけて進行させる。これらの現象により、大脳皮質、白質、基底核、海馬などの細胞の壊死性変化をもたらす。（図1）（7, 8)

2. 分娩進行中の胎児モニタリングの現状

HIE を予防するための分娩管理の改善は、新生児における CP の発症の抑制、

重症化の防止のために重要である。現在の産科臨床で使用される胎児心拍陣痛図（Cardiotocography: CTG）は胎児の心拍数の変動と陣痛との関係性を観察するものであり、CTG が唯一の胎児の状態把握のモニタリング方法となっている。

胎児の徐脈、頻脈や基線細変動の有無と母体の陣痛を観察し、そのパターンより胎児が慢性的な低酸素状態にいるのか、一過性の徐脈を繰り返しているのか、胎児が感染症に罹患しているのかななどを予測する(9)。CTG から得られる胎児心拍数および母体の陣痛の情報から胎児の健康状態を把握することは多くの臨床経験を必要とし、またその判断は医師の間でもしばしば不一致を生じる(10) (11)。

この CTG に基づいた判断によって、産科医は吸引分娩・鉗子分娩および帝王切開を含めた急速遂娩による医学的介入の必要性、タイミングを決定する必要がある。しかし、この CTG の判読から予測された胎児の状態と出生後の脳損傷状態の程度は必ずしも一致せず、結果として介入のタイミングを失って CP の発生につながる場合もある(10)。また、逆に結果として不必要と考えられる帝王切開に至る場合もある(12)。

昨今の帝王切開術施行率は増加しており、過剰な医療介入を回避することは産科医療の重要な課題となっている。WHO では帝王切開術施行率を 10-15%以内にするようにという勧告を 1985 年に行っている(13)

(図 2)。CP 発症のリスク回避と同時に児が健常な状態での分娩への不必要な医療介入を低減するためには、CTG 以外の新たな胎児の状態評価法の開発が望まれている。特に、CP 発症に関わる脳組織のダメージを直接的に評価するための技術が重要となる。

3. 拡散反射分光法

光の性質には吸収と散乱がある。吸収は光エネルギーが物質自体に取り込まれる現象である。光は連続的な波長の集合であり、各波長の光の強さの分布をスペクトル（分光分布）という。物質はそれぞれどの波長をとくに吸収するかが決まっており、物質それぞれの吸収スペクトルをもつ。一方で散乱は微細な粒子から構成された物質に当たった光がその表面および内部から様々な方向に反射する現象である。散乱は全波長でおこり、各波長において、吸収と散乱は両方起こる。光はまっすぐだけでなく、いろいろ曲がったりして物質を通過する。物質内で複雑に吸収・散乱が生じた結果、入射した光の一部が再び外部に放射されるが、この光を拡散反射光と呼ぶ。光が物質に当たった場合に先に述べたような各物質特有に吸収スペクトルが存在するため、入射した光と拡散反射した光

のスペクトルが変化する。この拡散反射光のスペクトル変化から物質の種類や特性に関する情報を得ることができ、この技術を拡散反射分光法という。(図 3)

4. 拡散反射分光法の医療への応用

生物の組織、特に脳組織は高度に光散乱性の媒体であるため、組織に浸透した光の一部は、再び脳表に戻り拡散反射光として検出される。入射光は、頭蓋骨、頭皮をも通過することが可能であることが知られている。脳組織に光を照射するとヘモグロビンの存在によってスペクトルの可視光から近赤外光の領域での吸収が大きい。この性質を利用して、拡散反射光のスペクトル信号から脳の血行動態に関する情報を得ることができる。近赤外光は、頭蓋骨や頭皮を介して人間の脳の皮質に到達することができるため、その性質を利用した近赤外分光法 (near-infrared spectroscopy: NIRS) が、近年人間の脳の機能や活動性の計測に広く適用されている(14) (15)。

うつ病などの診断に用いられる NIRS 装置や末梢血酸素飽和度測定では、酸素化ヘモグロビン (HbO) および脱酸素化ヘモグロビン (HbR) が異なる吸収スペクトルを示す性質を利用している。等吸収点と呼ばれる波長では、HbO および

HbR の吸収スペクトルが交わり、その波長での光強度の変化が総ヘモグロビン量(HbT)、すなわち血液量の増減を示す。さらに、等吸収点を含む複数の波長における拡散反射信号のリアルタイム測定により、HbO に対する HbR の比を組織酸素飽和度 (StO₂) として決定することができる。拡散反射分光の計測では、散乱光強度の揺らぎ(散乱振幅: Scattering Amplitude)の情報を得ることができる(16)。筆者の研究室における過去の研究では、無血液ラットを対象に、脳の酸素、グルコースを除いた時に、散乱振幅が三相性の変化をもたらした。この三相性変化は脳の ATP の減少とほとんど一致した(17)。この論文では、細胞の脱分極を見ている可能性が指摘されており、散乱振幅の変化が細胞や細胞小器官の形態変化を示していることが考えられる。そこで、本研究では脳酸素飽和度や脳血液量の情報に追加して散乱振幅の情報を計測することによって不可逆的な HIE の発生の前段階の脳組織の状態を観察し、胎児の脳組織をモニタリングを行うことによって、不可逆的な脳障害に至る前に予防措置としての急速遂娩をとることの判断材料になりうるかどうか注目した。

5. HIE ラットモデル

HIE の動物モデルとして、Rice らによって確立されたプロトコールによる新生仔ラットを用いた方法が HIE の病原性メカニズムの解明や治療法に関する多くの過去の研究で使用されてきた(18) (19)。この HIE モデルは、生後 7 日目の新生仔ラットを用いる。新生仔ラットの片側総頸動脈の結紮を行い、リカバリー時間を置いた後に低酸素負荷を与えることで結紮した側の脳に HIE が発症するものである。この時期の新生仔ラットの脳発達段階は、ヒトの妊娠期間中の胎児の脳発達段階において、ニューロンの増殖および移動、組織化、ミエリン形成の点で対応しており、ラットの 1 週齢の仔を使用することは合理的であると考えられてきた(20)。本研究ではこの HIE ラットモデルに対して拡散反射分光法による光信号測定を行う実験システムを構築して HIE 発生過程の光信号の変化の関連について探求した。

目的

この研究の主な目的は、脳組織における HIE 発生と拡散反射光信号の変化を調べることで、HIE の発症の予知予測や予防に寄与する新規の胎児モニタリング技術の開発の基盤となる知見を得ることである。そのために、新生仔ラット HIE モデルに対して低酸素負荷中の拡散反射信号のリアルタイム測定のための

実験システムを確立し、そして、このシステムにおける光信号計測から得た脳血流量、脳酸素飽和度、拡散振幅の各パラメーターと脳損傷発生、脳浮腫との関連性について検討した。

方法

1. 新生仔ラット HIE モデルのプロトコール

すべての動物実験は、防衛医科大学校の実験動物倫理委員会の承認を得て行われた。

HIE モデルラットの作成においては、rice らが確立したモデルを参考に作成した(18)。今回の研究では、光ファイバーを使用し計測を行ったため、頭部を固定し、また頭皮を切開し頭蓋骨を露出する必要があった。そのため、イソフルランの麻酔を左総頸動脈の結紮時以外にも計測時に使用する必要があった。計測を行い HIE の病変が作成できるようにするために低酸素の時間を以下のプロトコールのように設定した。

Sprague-Dawley ラット (SLC、静岡、日本) は、温度管理された動物飼育施設で飼育された。HIE モデルラットは、左頸動脈結紮による片側の脳虚血と低酸素の組み合わせによって作成される。出生日を 0 日目として、生後 7 日目の性別不明の新生仔ラットをイソフルラン (和光純薬工業、大阪、日本) で麻酔を行った (導入 3%、維持 0.25~1%)。頭部を定位フレーム (NARISHIGE、東京、日本) で固定し、頭皮を切開して頭蓋骨頭頂部を約 1 cm 四方露出させ、1 対の光

ファイバーを、頭蓋骨上に置いた。この HIE モデルラットに対して、左右異なる部位で光測定を行った（図 4）。次に、各個体の左総頸動脈を頸部の皮膚を開き同定、3-0 外科用シルク糸で結紮し切断、頸部の創部は縫合した。麻酔から回復するために 37℃の環境下に 120 分おき、その後、低酸素負荷するためにチャンバー内に入れた。チャンバー内で、酸素濃度は 15 分で 8%に達し、その後 8%の低酸素環境を 120 分間維持した。酸素濃度を酸素コントローラー（ProOx model 110 BioSpherix、NY、USA）を用いて調節し、チャンバー内の温度をヒートマット（World Precision Instruments、FL、USA）を用いて 37℃に制御した。同様のプロトコールで HIE モデルラットを 23 匹作成した。

6 匹の新生仔ラットにおいて、測定後、以下に記載するように脳組織水分含有率の測定のために、低酸素負荷終了直後に全脳をイソフルラン麻酔下で摘出した。他の 12 匹の新生仔ラットは、低酸素負荷直後の測定の後に親ラットのもとへ戻され、その後低酸素負荷から 24 時間後に麻酔下で測定を行うプロトコールに従った。測定後、麻酔下で生理食塩水で還流し抜脳、以下に記載する虚血性損傷の評価に用いた。残りの 5 匹のラットは低酸素負荷終了後に親ラットの元へ戻され 4 週間、1 週ごとに体重を測定した。

2. 拡散反射分光法を用いた光信号の測定

拡散反射分光法を用いた、脳組織のデータを収集するための実験システムを図 5A、B に示す。新生仔ラットの頭部を麻酔下で定位フレーム（NARISHIGE、東京、日本）に固定し、頭蓋骨を露出させるために頭皮を正中切開した。拡散反射分光法による測定は、以前の研究(21)で確立されたファイバーベースの経頭蓋アプローチによって行われた。露出した頭頂骨の上に、中心間距離 1mm のコア径 600 μ m の一対の光ファイバーを配置した。頭蓋骨表面および除去された頭皮は、測定中に生理食塩水によって保湿を行った。一対のファイバーの接着点は、頭蓋骨の中心線より 2mm 外側で、肉眼的に確認できる血管は避けて設置した（図 5A）。図 4 に示すように、連続測定を 19 秒間行い、各半球について 3 回測定を繰り返した。光源としては、長波長吸収フィルター（BPS120、B&W Tek、Inc.、Newark、Delaware）を用いたタングステンランプを用いて、400～1000nm の広帯域光を照射し、総照射パワーを 55 μ W。反射光を分光器（PMA-11、Hamamatsu Photonics K.K.、浜松、日本）で分離し、スペクトルデータをソフトウェア（U6039-01 Version 3.1.0、Hamamatsu Photonics K.K.、浜松、日本）で分析した。

3. 拡散反射分光法による測定データの定量化

拡散反射分光法により得られた光学データは、以前に報告された研究(16) で確立された、モンテカルロシミュレーションおよび、重回帰分析に基づく、定量化法により解析した。HbO、HbR の和を HbT とし、総ヘモグロビン量を脳組織の脳血液量とあらわした。また、HbO と HbT の比を SatO2 とし、さらに散乱振幅を決定した。

$$\text{脳血液量 : HbT} = \text{HbO} + \text{HbR}$$

$$\text{組織酸素飽和度 : SatO2(\%)} = 100 \times \{ \text{HbO} / (\text{HbO} + \text{HbR}) \}$$

この定量化の原理について簡単に説明すると、脳からの測定された拡散反射スペクトルを入射光スペクトルによって正規化し、これを分光反射率 $R(\lambda)$ * とした。次に、 $R(\lambda)$ を $-\log_{10} R(\lambda)$ と定義した吸光度スペクトル $A(\lambda)$ に変換し、修正 Lambert-Beer 法 . . .

$$A(\lambda) = C \text{HbO} l(\lambda) \epsilon \text{HbO}(\lambda) + C \text{HbR} l(\lambda) \epsilon \text{HbR}(\lambda) + S(\lambda)$$

C 色素濃度 $l(\lambda)$ 平均光路長 $\epsilon(\lambda)$ モル吸光係数 $S(\lambda)$ 散乱による減衰項

に基づく重回帰分析に適用した。吸光度スペクトルは、組織における吸収および散乱による減衰の合計として近似することができる。吸光度スペクトル A を目的変数とし、 HbO と HbR の既知の吸光係数を説明変数とし、重回帰分析を行い、回帰係数を求めた。回帰係数から、事前に数値化された変換ベクトルを用いて、散乱振幅および HbO および HbR の濃度を決定した。筆者の研究室における過去の研究によりこの定量化の方法は、組織ファントムを用いて検証が行われている (16)。

* λ : 波長

4. 組織学的研究および TTC(2,3,5-Triphenyl tetrazolium chloride)染色

イソフルラン麻酔下で、全脳を低酸素負荷終了から 24 時間後に 6 匹の新生仔 HIE モデルラットから抜脳した。脳を厚さ 2mm の冠状切片にスライスした。6 匹中 2 匹は同一個体で HE(Hematoxylin-Eosin)染色と TTC 染色を行った。6 匹すべての切片を 37°C で 15 分間、2% の 2,3,5-トリフェニルテトラゾリウムクロライド (TTC) (Sigma-Aldrich、MO、USA) 溶液に浸し、脳の HIE 病変を評価した。不染領域 (白色部分) が虚血領域となる (22) (23)。

5. 脳組織水分含有率の評価

低酸素負荷終了時の左右半球の含有水分率は、Dry and Wet 法を用いた(24)(25)。低酸素負荷終了直後の新生仔ラットをイソフルランで深麻酔を行い、開頭し、全脳組織を切除した。脳を左右半球に離断し、皮質部分のみとした。乾燥を防ぐために、すぐに各半球の重量を測定した。両半球を 100℃のオーブンで 99 時間乾燥させ、乾燥後の重量を測定した。各半球の水分含有率は以下の式に従って計算した。(図 6)

Water content(%)=[(wet weight – Dry weight) / wet weight]×100 (%)。

6. 長期飼育個体の体重測定と評価

発育状態を観察するために 5 匹の個体については低酸素負荷後に親ラットの元へ戻し、1 週間ごとに体重測定を行った。体重測定は全て午前中に行った。また同時にコントロールの体重も測定を行った。データの測定時には性別の判断が困難であったため、性別は 4 週間後に確認を行った。コントロールはオスが 8 匹、メスが 3 匹であった。HIE モデルにおいてはオスが 2 匹、メスが 3 匹であった。

7. 統計解析

左右半球の、HIE モデルプロトコールの各計測時点で測定は3回行っており、得られた3回のデータの平均値を求め、各計測時点でウィルコクソン符号付順位和検定によって分析した。両側脳半球の脳組織水分含有率と各信号との関係はピアソンの相関係数によって評価した。ラットの体重の比較にはStudent-t 検定を行った。

結果

1. 新生仔ラットにおける低酸素性虚血性脳症の発症

図 4 に示すプロトコールに従って、新生仔ラットに左総頸動脈の結紮を施した後、8%酸素濃度に曝露させた。低酸素負荷の終了後から 24 時間後に、HE 染色および TTC 染色により、12 匹の新生仔ラットにおいて脳組織への影響を評価した。6 匹のラットが TTC 染色によって結紮側である左半球に虚血を示す不染領域を認めた。3 匹のラットでは TTC 染色で明らかな不染領域を認めなかった。3 匹が低酸素負荷中もしくは低酸素終了後の 24 時間以内に死亡した。今回は TTC 染色で不染領域を認めた 6 例を HIE と診断した。頸動脈結紮が行われなかった側の右半球の組織学的変化は顕著ではなかったが、頸動脈結紮を行った側の左半球には浮腫性病変が認められた。左半球の患部には、頭頂から腹側部分および海馬の皮質が含まれていた。左半球における病変の発生は、TTC 染色による確認を行った 6 匹の新生仔ラットでは、損傷発生の領域の広がりには個体差がみられた。さらに、HE 染色では左脳半球組織の浮腫状変化が確認されたが、その部位は TTC 染色で確認した HIE 病変の分布と一致していた。(図 7) HIE プロトコールで作成した 5 匹のラットを低酸素負荷終了後頭皮を縫合し、親ラッ

トの元で4週間、1週おきに体重を測定した。また、コントロールとして、同環境で育成したラットの体重を測定し、オスメス別に平均値を求めた。図7においてオス、メス共に生後2週、3週、4週でコントロールよりHIEモデルで明らかに体重は下回っていた。(図8)

2.HIEモデルにおける脳血液量と酸素飽和度の経時的変化

脳皮質における脳血液量、酸素飽和度および散乱振幅を、HIE作成のプロトコール内の9つの時点で得られたデータに基づいて定量的に評価した(図9A-C)。まず、組織内の血流の状態を推定するためのパラメータとして脳血液量、酸素取り込みを確認するために酸素飽和度を測定した。そして、散乱振幅は、脳組織における細胞の形態学的変化を反映するためのマーカーとして評価した。図9は光信号計測を行った6匹の個体の平均値をグラフ化したものである。

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低かった。左右半球間の差は、結紮後の麻酔からのリカバリー時間中に広がり、脳血液量と酸素飽和度は低酸素負荷開始前に有意に左半球で低かった。低酸素負荷を開始した後、脳血液量は増加し、酸素飽和度は両方の半球ともに減少した。

脳血液量の増加、脳酸素飽和度の低下は、低酸素負荷の開始から 45 分後の時点でプラトーに達した。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、右半球の脳血液量を上回った。低酸素状態では、左半球および右半球の酸素飽和度のレベルは同程度で推移していたが、左半球の酸素飽和度が常に右半球を下回っていた。低酸素負荷終了後、脳血液量は両半球で減少したが、低酸素負荷前の状態と比較して低酸素終了から 24 時間後では高いままであった。さらに、左半球の脳血液量は、低酸素負荷終了から 24 時間後においても、右半球の脳血液量よりも高いままであった（図 9A）。酸素飽和度に関して、低酸素負荷終了後、左半球の回復は右半球の回復よりも遅かった。しかし、低酸素負荷終了の 24 時間後に、酸素飽和度は、半球の両方において左総頸動脈結紮前と同程度までに戻った（図 9B）。

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、結紮後 120 分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、その後散乱振幅は低酸素負荷終了まで減少した。低酸素負荷中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すぐに進行し、低酸素負荷開始から 45 分後と 75 分

後で半球間の有意差が生じた。低酸素負荷終了間際にはこの半球間での差は小さくなり、散乱振幅は、両半球において、低酸素負荷終了後すぐに同程度になった。低酸素負荷終了から 24 時間後で、右半球の散乱振幅は、低酸素開始前と同程度まで戻った。対照的に、左半球の回復は中程度であり、低酸素負荷前に観察されたレベルに達しなかった (図 9C)。

3. 散乱振幅と脳水分含有率の相関

6 匹の新生仔ラットに対して、図 4 に示す HIE モデルのプロトコールを実施して光信号の計測を行った後、低酸素負荷開始 105 分の段階で脳水分含有率と散乱振幅の相関関係を分析した。新生仔ラットの脳をデータ収集の直後に抜脳し、脳水分含有率を「Dry and wet 法」によって測定した。左半球の脳水分含有率の割合は、すべてのラットにおいて右半球よりも高かった (図 10A)。対照的に、左半球の散乱振幅は、5 匹の新生仔ラットで右半球の散乱振幅レベルよりも低かった。1 匹の新生仔ラットでは、両半球で散乱振幅において、両半球間の差異は顕著ではなかった (図 10B)。さらに、脳水分含有率と各信号の相関関係を調べた。その結果、散乱振幅と脳水分含有率との間に有意な負の相関が認めら

れた（相関係数； $R = -0.73$ 、 $p = 0.007$ ）（図 11-3）。

考察

本研究では、新生仔ラットを用いた HIE モデルに対して拡散光反射分光法に基づいた光信号を経時的に計測する実験を行った。ラット HIE モデルに対して低酸素負荷中に計測を行った報告は少ない。

収集した光信号データから、脳血液量、酸素飽和度、散乱振幅を定量的に解析し、HIE の発生過程とそれらの 3 つのパラメーターとの関係を検討した。左総頸動脈結紮後、左半球の酸素飽和度は、常に右半球の酸素飽和度よりも低かった。低酸素負荷が開始されたとき、脳血液量の急激な上昇が観察され、この反応は左半球では右半球よりも顕著であった。半球間の酸素飽和度の差は、低酸素負荷中には負荷前後と比較して少なくなった。散乱振幅に関しては、低酸素負荷の開始後に左半球において右半球よりも急激な減少を示した。そして、散乱振幅は脳半球の水分含有率と負の相関があることが確認された。

1. HIE モデルラットの脳循環動態

本研究では、左総頸動脈結紮の後に低酸素負荷を与えることで HIE を発症す

るラットモデルを用いて検討を行った。このモデルでは、低酸素負荷のみ、もしくは総頸動脈の結紮による虚血のみでは、新生仔ラットの脳組織に HIE を発症させることができないことが知られている(18)。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、脳底部の Willis 動脈輪によって半球間で左右の総頸動脈が接続されているため、片側の総頸動脈結紮を行っても通常の酸素環境下では脳組織を維持するための酸素供給の最低必要量が確保されて不可逆的な低酸素虚血性損傷が生じないと考えられる。それに対して、左総頸動脈結紮後にさらに低酸素負荷を与えることで脳内の動脈血管構造に由来した酸素供給の予備力の限界を越え、左半球における HIE 病変の発生が導かれる。脳内の HIE 病変の発生を TTC 染色(図 6)で確認すると、6 匹に対して同一のプロトコールを実施しているにもかかわらず HIE 病変の広がりには個体差が大きかった。また、今回の研究で TTC 染色で虚血領域を認めたものは 12 例中 6 例であった。同様のプロトコールを行っていても虚血が見られないものがあつた。これは総頸動脈結紮後の脳血流量を維持する能力や虚血低酸素に対する脳組織の耐性に個体差があることを示唆している。

酸素供給が減少すると血管抵抗が低下するという代償メカニズムが脳血管に

はあることが知られている。過去の研究において、低酸素濃度のガス吸入によって脳血管の拡張、脳血管抵抗の減少それに伴う脳血流の増加が引き起こされることが示されている(26)。本研究では、低酸素負荷状態で両側の脳半球において脳血液量の急速な上昇が確認された。これは、低酸素刺激に対して脳血管拡張が生じた結果であると考えられた。総頸動脈結紮により酸素供給が制限された左半球において、この応答がより顕著となったことはそうした脳血管の特性と照らして考えると合理的である。左半球の酸素飽和度が低下したにもかかわらず総頸動脈結紮直後に応答がなかった理由は、低酸素負荷前の PaO_2 が脳血管の代償応答を引き起こす閾値に達しなかったのかもしれない。この推測を支持するように過去の研究において、低酸素下で生じる脳血管拡張には閾値があり、50mmHg 未満の PaO_2 となると誘発されると報告されている(27) (28)。本研究の結果に当てはめた場合、低酸素負荷前の最後の測定時点の左半球の測定酸素飽和度は約 80%であり、これはヘモグロビン解離曲線上の PaO_2 レベルとしては 50mmHg より高いということを考えると、総頸動脈の結紮を行った左半球では低酸素負荷前の段階では脳血管拡張の反応は生じておらず、低酸素負荷開始後に PaO_2 レベルが 50mmHg を下回った時点で閾値を超えたことにより血管拡張

張が生じた可能性がある。

この HIE モデルでは、右半球と左半球との間で低酸素負荷によって引き起こされる組織損傷の結果は対照的であった。組織学的所見および TTC 染色結果において確認されたように、脳における病理学的変化は左半球に限定されており右半球では生じなかった。左総頸動脈の結紮、つまり虚血のみではこのモデルにおいて HIE を引き起こすのに十分でないことを考慮すると、低酸素負荷開始後の各パラメータの変化が不可逆性脳損傷の発生と密接に関連することが考えられる。この研究で評価した 3 つのパラメータの中で、低酸素負荷開始後に最も早期に半球間の差を生じたのは散乱振幅であった。血液量および酸素飽和度については半球間の違いはより遅れて出現しており、その違いの程度も散乱振幅と比較すると比較的軽度であった。今回の HIE モデルにおいて虚血のない右半球は低酸素にさらされているものの TTC 染色では肉眼的な脳損傷を認めていない、つまり、散乱振幅で低酸素負荷の早期に半球間の差が見られたことは脳障害が不可逆的な病変となる前段階で、散乱振幅の低下をパラメータとし、HIE へと向かうことを検出することができる可能性がある。こうしたことから、散乱振幅が HIE 発症に関わ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

とが示唆される。

以前の報告では、Hasegawa らが、2 週齢のウサギに対して脳血流量、酸素化ヘモグロビン、脱酸素化ヘモグロビン、総ヘモグロビンの連続モニタリングを行った。低酸素負荷開始早期に、酸素化ヘモグロビンが減少を示し、脱酸素化ヘモグロビンおよび全ヘモグロビン量が増加した。脳血流量も増加を示した(29)。

また仔豚を使用した研究では、脳血液量と、低酸素虚血仔豚モデルにおける脳の病理学的変化を評価した。低酸素負荷の前、中、および6時間後計測し、脳血液量の増加を確認、特に蘇生後1および3時間で、病理所見に相関していた(30)。

2. 脳水分含有率と散乱振幅の関係

低酸素負荷終了直後の脳水分含有率は、左半球では右半球よりも高かった。また半球の水分含有率は低酸素負荷開始105分後の散乱振幅と負の相関を示した。脳浮腫は、低酸素刺激下で進行する病理学的な急性事象の1つとして知られている(31)。MRI容積測定を用いた過去のヒトの研究では、脳血流量および脳実質容積の増加の結果として、40分間の低酸素状態で脳の腫脹が検出された(32)。高所の病気に関する研究においては、低酸素症に対応した脳血管拡張が血管透

過性および血管外漏水を増強することが示されている(33)。過去の研究では、低張性の還流溶液で脳浮腫を引き起こした海馬は散乱振幅の低下を示していた(34)。また頭部外傷の研究においても脳浮腫による散乱振幅の低下をみとめた(35)。今回の研究では、散乱振幅が低酸素負荷状況下で脳浮腫の進行を感知する光学的パラメータとして利用できる可能性が示された。一方で脳浮腫の発生のみでは説明困難な現象として、低酸素負荷開始直後の散乱振幅の一過性の増加が今回の研究では観察された。先にも述べた過去の研究において、成体ラットの脳は、低酸素負荷を与えた直後の数分間において三相性に散乱振幅が変化することが確認されている(16) (36)。この変化は、細胞構造の障害に伴う、細胞膜内外の脱分極が背景要因となって生じていると推察されている(36)。またこの三相性の変化が起きた後には再酸素化してもラットの蘇生が困難であったことから、本研究においては、三相性の変化はみられなかったが、一度散乱振幅が増加し、再度減少するという過程をみている可能性もあるが、低酸素負荷開始後の早期に観察された散乱振幅の一過性増加は、細胞構造変化を含めた脳浮腫以外の背景要因の結果であるかもしれない。また、TTC 染色で HIE を認めた症例において、HIE が発症していない右半球も散乱振幅の低下を認めており、脳浮腫の

形成にあたっては、散乱振幅の程度だけではなく、低下している継続時間も関わりがあるのではないかと考えた。

3. 低酸素負荷終了後のパラメータ変動について

低酸素負荷終了後 24 時間の時点で測定したパラメータは、右半球と左半球の間の HIE 発生の有無を反映していると考えられる。血液量および散乱振幅は、HIE を発症しなかった右半球では、低酸素開始前と同程度に戻った。一方で左半球では、血液量および散乱振幅は、低酸素状態になる前に元のレベルに完全に戻されず、HIE の発生に伴い血流および水分量を調節するための組織恒常性が失われた状態への移行を示していると考えられた。酸素飽和度については、低酸素負荷後 24 時間の時点で半球間の差がないように見える。これは、低酸素負荷開始前には左総頸動脈の結紮により左半球の酸素飽和度が右半球よりも低下していたことと矛盾するように思われる。しかし、HIE の発生に伴い左半球の脳組織の酸素需要が減少して、結果として左右の半球間の酸素飽和度の差が消失した可能性が考えられる。

4. 今後の発展

新生児の HIE 発症を回避するための最適な医療介入のタイミングを決定するには、CTG モニタリングのみに依存した現在の分娩管理では限界がある。そのため周産期医療の現場では、胎児の脳損傷の発生を予防する新たなモニタリング技術の開発が希求されている(37) (38)。本研究の結果は、低酸素負荷中の脳循環代謝のモニタリングができたことについて、有用であり、拡散反射分光法を応用した胎児の脳組織の状態評価が分娩中の HIE 発症を早期に診断し、脳組織が可逆的な段階で対応が可能となる有効なアプローチとなる可能性を示している。拡散反射分光法の一つの応用として、分娩進行中の胎児脳組織の酸素飽和度のモニタリングの有用性に関しては過去に研究されてきた。しかし、脳酸素飽和度測定による HIE 発症の予知・予防への有用性については否定的な結果となっている(39) (40) (41)。本研究においても、HIE を発症した左半球と右半球との間の酸素飽和度の差が小さいことを考えると、酸素飽和度を用いた HIE の発症の検出は困難であると予想される。本研究の結果に基づいて考えた場合、HIE 発症を検出する拡散反射技術の臨床導入においては、散乱振幅の計測を標的としたアプローチが有望と考えられる。

5. 研究の限界と将来の課題

今回はラット HIE モデルに対し、低酸素負荷中の脳循環代謝および、散乱振幅のモニタリングを行うことができた。しかし、HIE をコンスタントに発症できず、途中で死んでしまうものや、全く病変が確認できないラットも存在した。麻酔の深度や、個体差、頭皮を切開することによっての頭部の温度管理の困難差が原因と考えられる。今後はさらにこの実験システムの精度を高め、確立していく必要がある。

また、この研究で示された知見の解釈について、以下の点で注意を要する。光の脳組織の測定深度は、光ファイバーの距離に依存する。本研究では、筆者の研究室における先行研究の結果に基づいて、ファイバー間距離を 1mm に設定した。その先行研究では、生体ラットを用いた実験の中でモンテカルロシミュレーションを用いて計算したところ、ファイバー間距離を 1mm に設定すると拡散反射信号の最大測定深度は 0.5mm となり脳皮質の層 I~III をカバーすることが判明した。また、より広いファイバー間距離の設定とした場合に比較して、1mm の距離は光散乱振幅の変化を非常に敏感に検出できることを見出している[14]。しかし、これらの結果は、成体ラット脳の実験データに基づいているため、今後

の研究では新生仔ラット脳に適合するように、ファイバー間距離を含めた光信号測定に関わる設定を最適化する必要がある。さらに、本研究では頭皮を除去した上で頭蓋表面上に直接ファイバーを置いて光学的データを収集した。この方法は、頭皮組織からの干渉なしに皮質からの光信号をモニタリングするのに好都合であった。しかし、本技術の臨床応用を考えた場合に、将来的には頭皮を通して得られた光信号を頭皮の情報と脳の情報に分離し評価する方法を確立する必要がある。また、胎児の妊娠週数、頭部の大きさによっても、皮質の深度が違いため、情報処理の際には注意が必要となってくる。特に早産児においては脳の発達段階が異なるため、低酸素負荷に対しても異なる結果が出ることも予想される。

臨床応用では、分娩進行中の胎児に対し使用する場合には経膈的に装置を挿入し、胎児の頭部に直接装置を接着させる。その際には髪の毛によって光が吸収されることが考えられるため、今後の検討課題である。また、今回はラットが麻酔下であってもラットが動くことによってファイバーの位置がずれることがあるので、連続計測が出来なかったが、胎児に対しては連続計測することを目標とする。

結語

本研究は、拡散反射分光法によって得られたデータと HIE 発生に伴う脳組織損傷との関連を明らかにした。低酸素刺激への反応として生じる脳血管拡張および脳浮腫の発生は、それぞれ拡散反射光信号から計測される脳血液量および散乱振幅の変化として捉えることが可能であると考えられた。本研究の結果より、散乱振幅の計測による拡散分光法を応用した胎児脳組織モニタリングは HIE 発症の予知・予測を目的とした新規の分娩監視技術開発の有望なターゲットであると考えられる。

謝辞

本研究を遂行するにあたり御指導、御鞭撻を頂きました、東京大学医学部産婦人科の藤井知行教授、大須賀穰教授、防衛医科大学校 防衛医学研究センターの佐藤俊一教授、川内聡子先生、東京農工大学の西館泉先生、また、本研究においては、研究の立案から論文作成など様々な面において御指導頂きました永松健先生に深く感謝の意を表します。

図 1

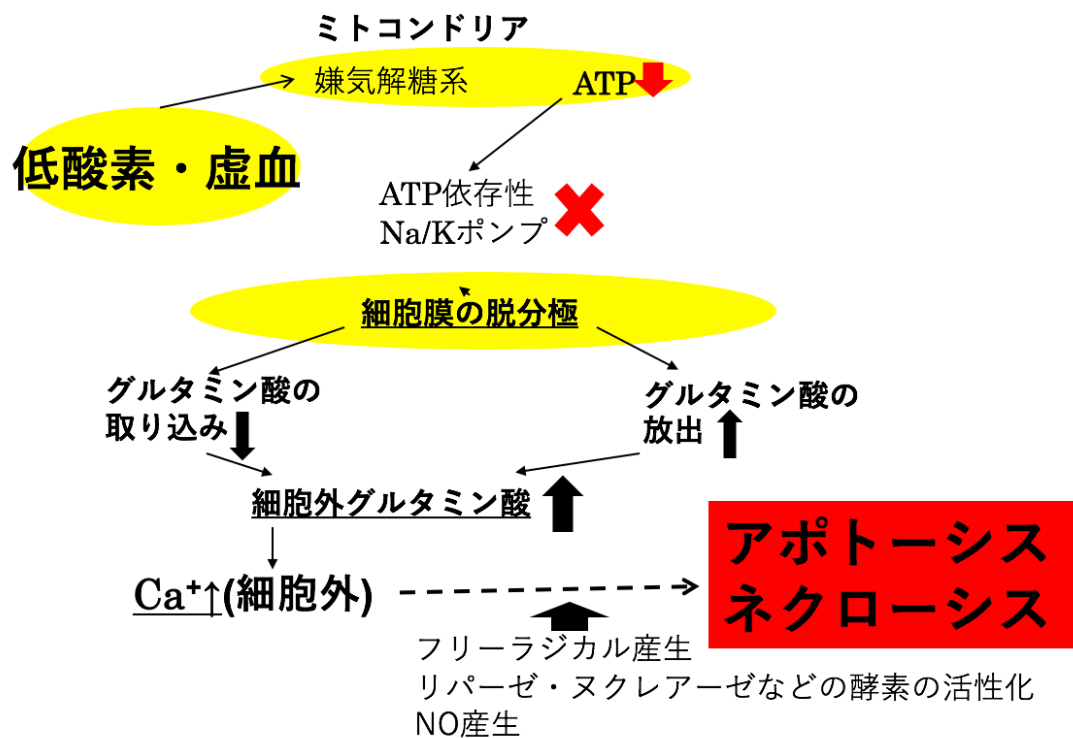


図 1 : HIE の発症機序

低酸素状態になると、ミトコンドリアでは、ATP の産生が減少する。細胞膜の脱分極が起き、細胞外のグルタミン酸が増加し、細胞外カルシウムイオンが増加する。その結果フリーラジカルの産生、リパーゼ・ヌクレアーゼなどの酵素の活性化、一酸化窒素（NO）産生などによってアポトーシスおよびネクローシスがおこる。

図 2

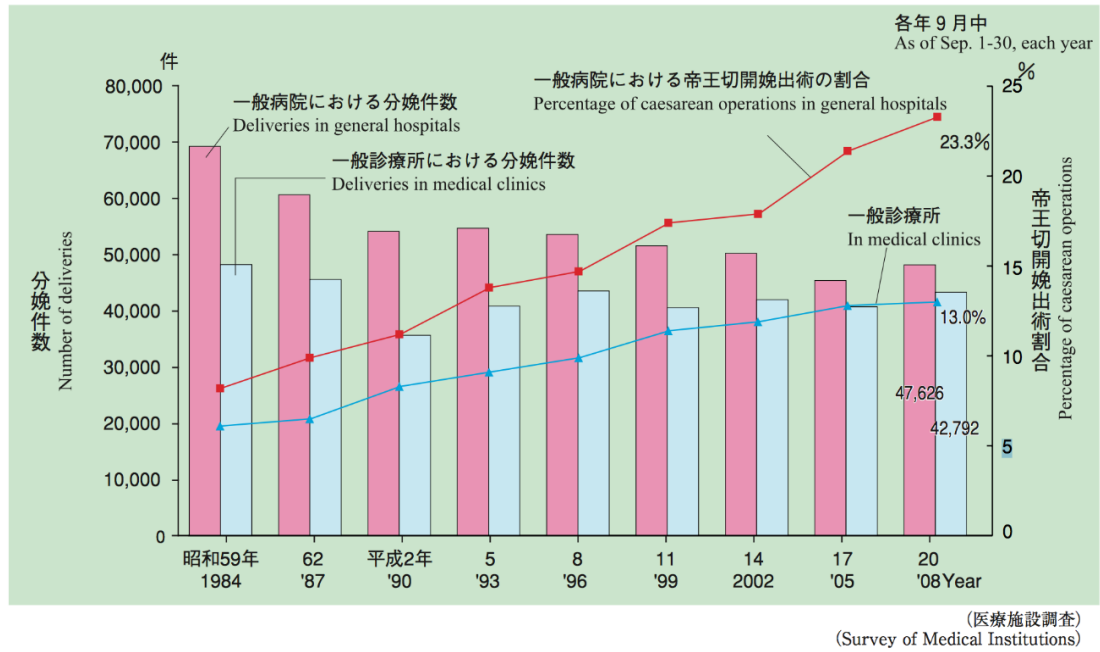


図 2：近年の分娩件数と帝王切開術施行率の推移

分娩件数は減少傾向にあるが、帝王切開術施行率は増加している。(厚生労働省)

図 3

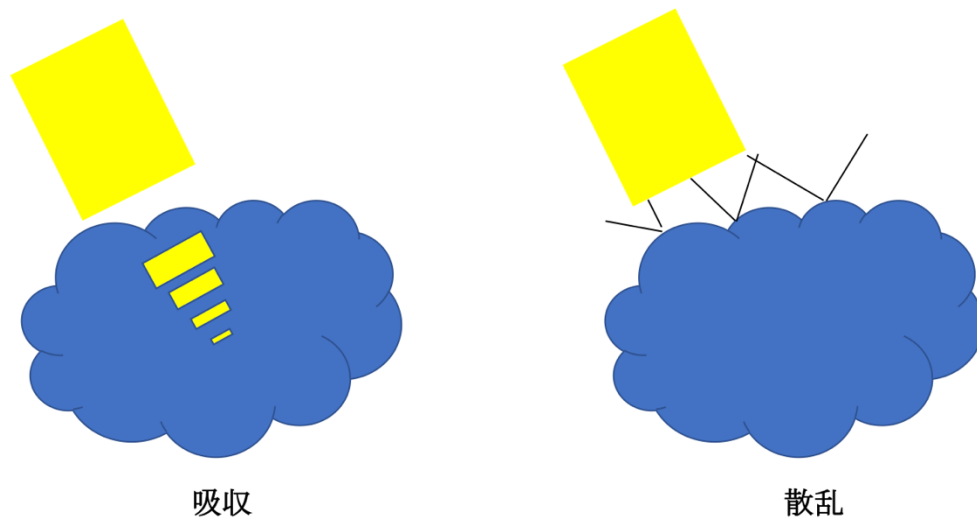


図 3 光の特性

吸収は光が物質に吸収され熱エネルギーに変換される。散乱は物質の表面に光があたり、様々な方向へ反射することである。

図 4

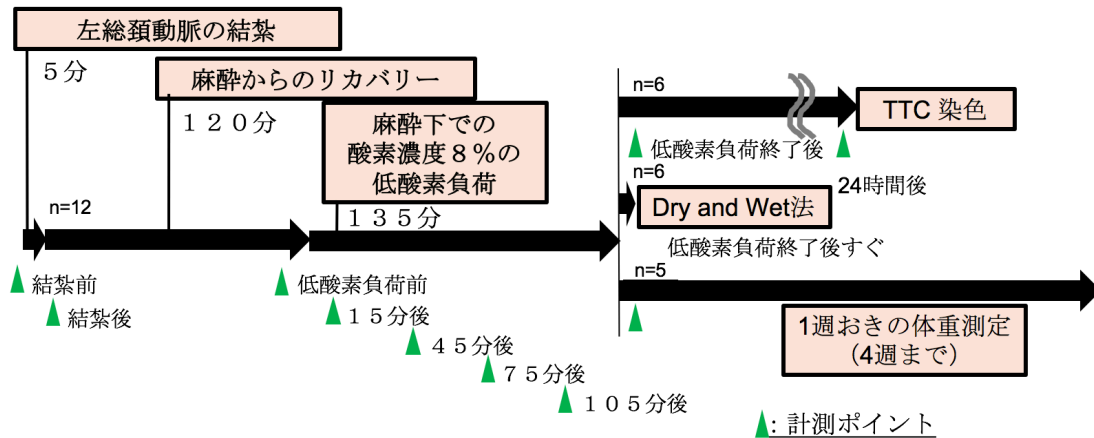


図 4. HIE モデルのプロトコール

新生仔ラットの左総頸動脈（ $n=17$ ）を麻酔下で結紮し、次いで 120 分の麻酔からの回復時間を適用した。処置した新生仔ラットを低酸素環境（8%酸素濃度）中に 135 分間置いた。低酸素負荷直後に、17 匹中 6 匹の新生仔ラットをイソフルランの深麻酔を行い、抜脳し、大脳皮質の水分含有率を測定した。他の 6 匹の新生仔ラットは、HIE の発症を評価の TTC 染色のために低酸素に曝露してから 24 時間後に安楽死させた。残りの 5 匹は低酸素終了後に親ラットの元へ返却し 4 週間体重計測を行った。三角マークは、脳組織の光学データを収集したポイントを表す。

図 5-A

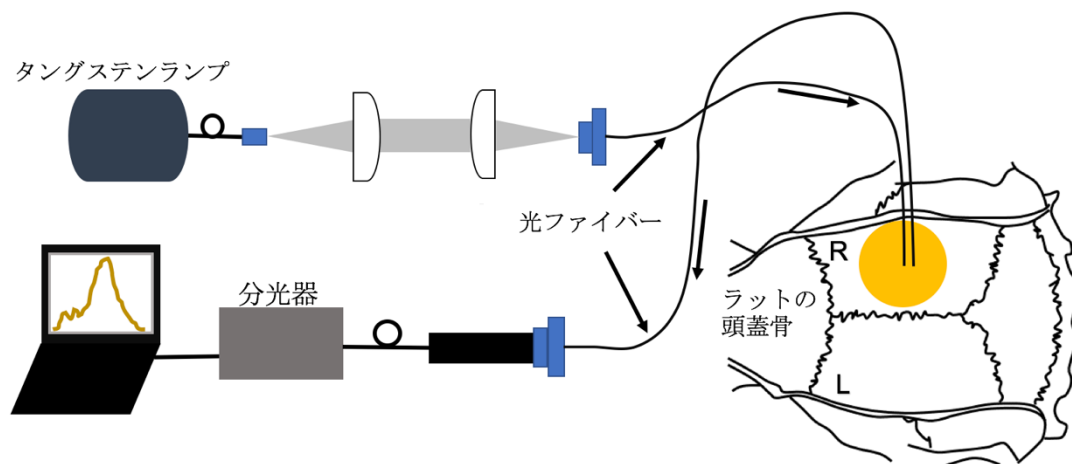


図 5-B

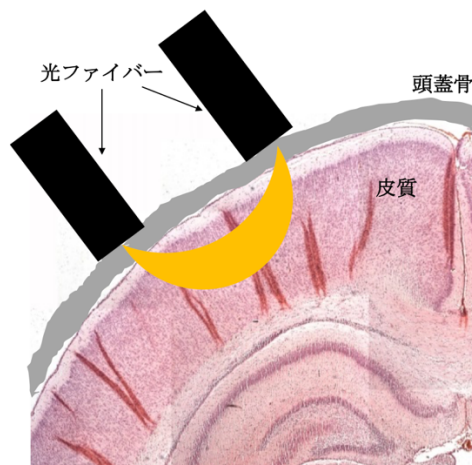


図 5

A. 拡散反射分光法を用いた測定のための実験システム

タングステンランプに接続された光ファイバーを介して光が透過し、頭蓋骨を介して脳組織に照射された。反射光は、分光器に接続された別の光ファイバーによって伝達され、得られたスペクトルを分析した。

B. 頭蓋骨上の光ファイバーの取り付け部位の拡大画像。

頭皮を除去して露出させたラット頭蓋骨の表面に、一対の光ファイバーを直接取り付け付けた。2本のファイバーの中心間の距離は1mmであった。1つの光ファイバーから放出された光が頭蓋骨を貫通し、脳組織からの拡散反射は、他の光ファイバーに伝達される。

図 6

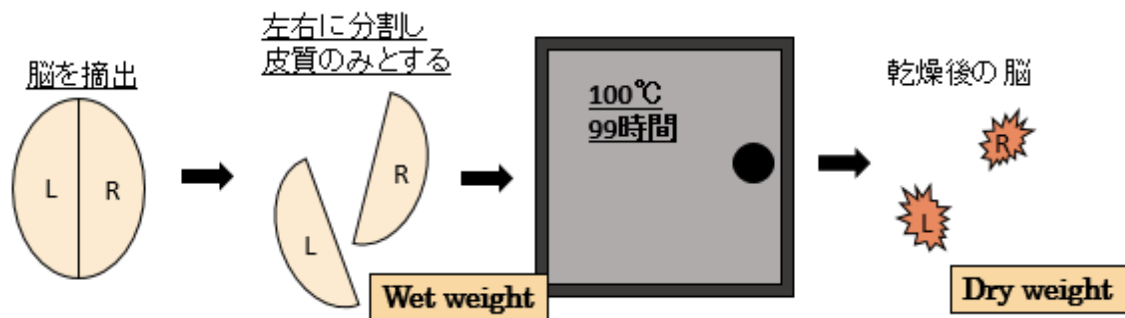


図 6. Dry and wet 法

低酸素負荷終了後すぐにイソフルランで深麻酔をし、還流はせずに抜脳し、左右でわけ、皮質のみとし、重量を測定、その後 100℃で 99 時間乾燥させその後の重量を測定し以下の式で算出した。

$$\text{Water content (\%)} = [(\text{wet weight} - \text{dry weight}) / \text{wet weight} \times 100\%$$

図 7

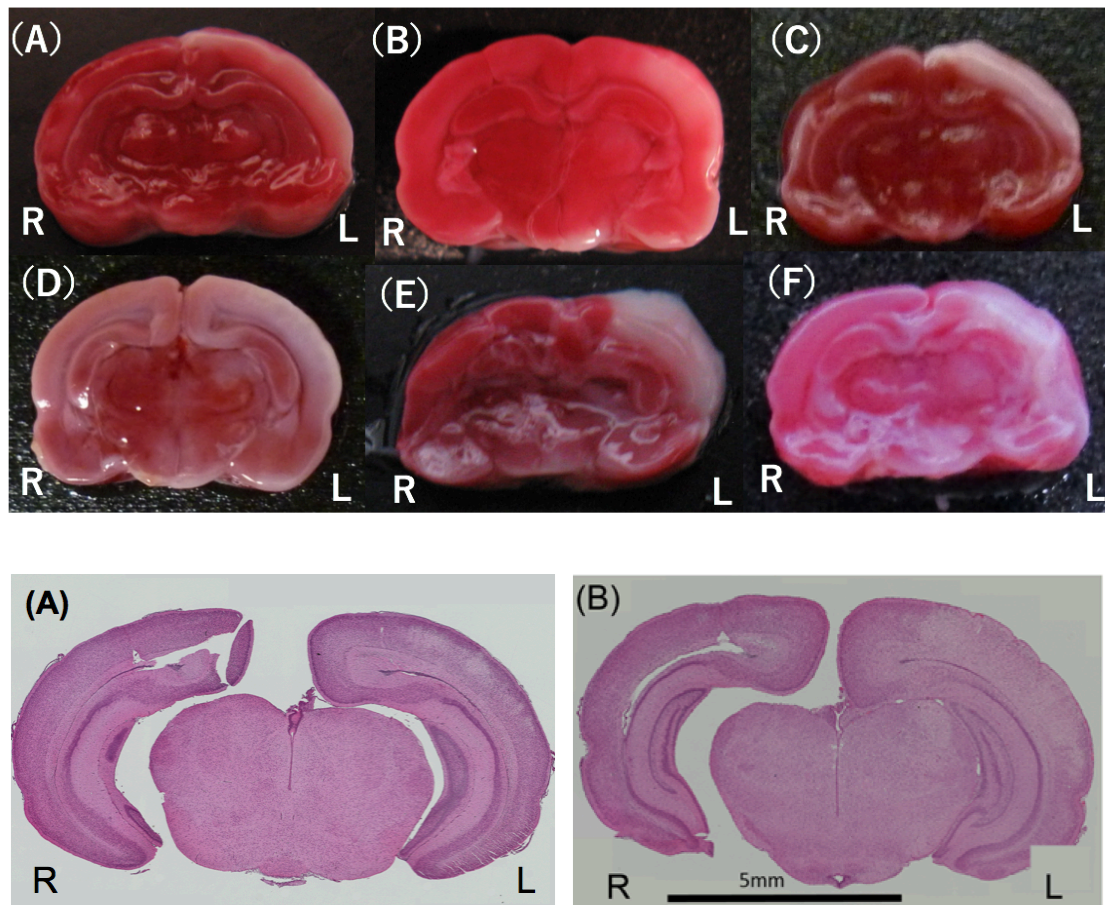


図 7. 低酸素負荷終了から 24 時間後での虚血性脳損傷

低酸素負荷終了から 24 時間後に、HIE モデルの抜脳をした。脳の冠状切片を TTC 溶液 (A) およびヘマトキシリン - エオシン (B) で染色した。 6 匹の新生仔ラットからの脳組織の代表的な画像が提示した。 (A) および (B) は、同じラットの染色結果である。

図 8

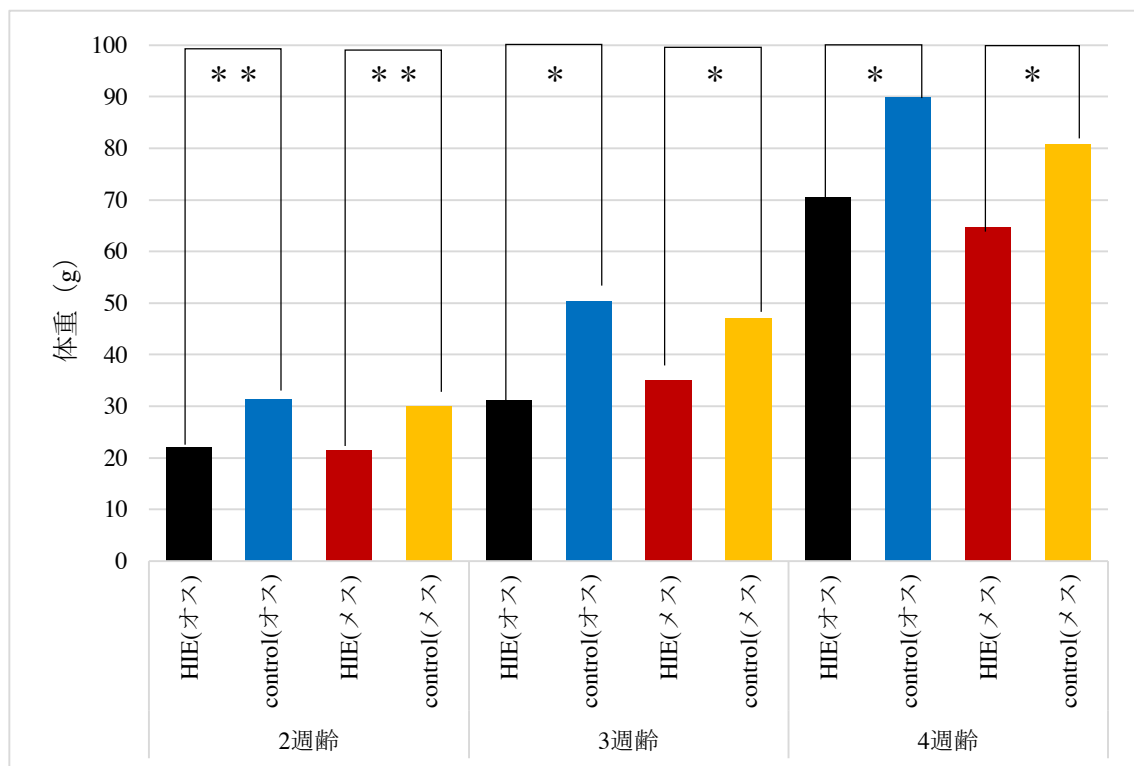
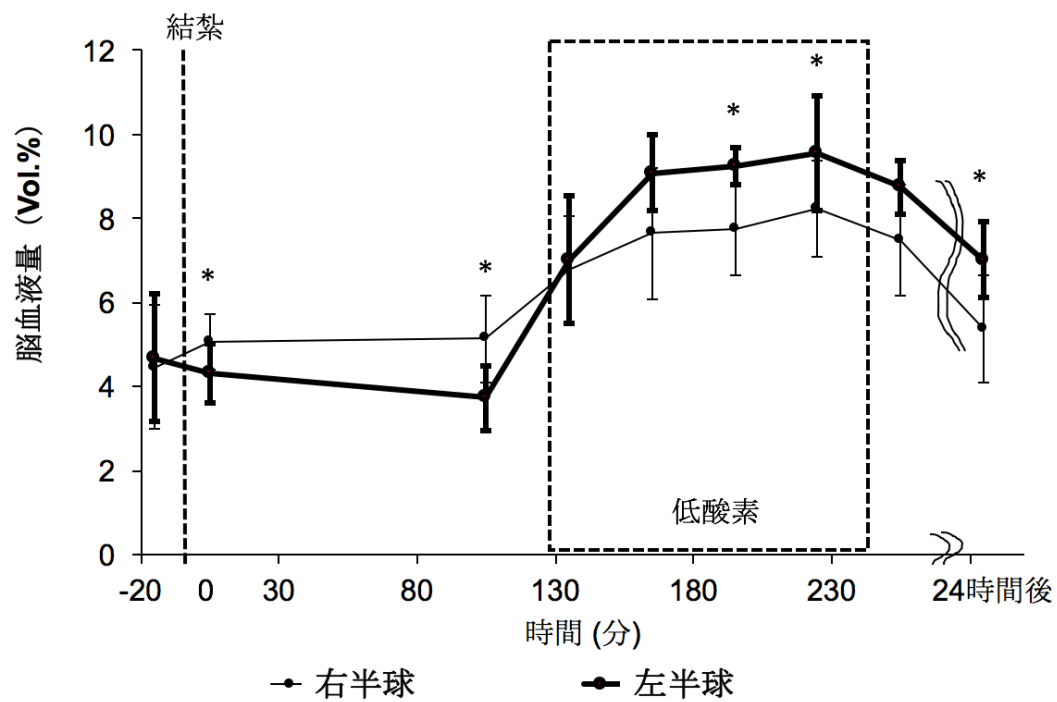


図 8, 生後 4 週間までのコントロールと HIE モデルの体重変化
オス、メス共に HIE モデルのほうが一週目から四週目まで下回っていた。

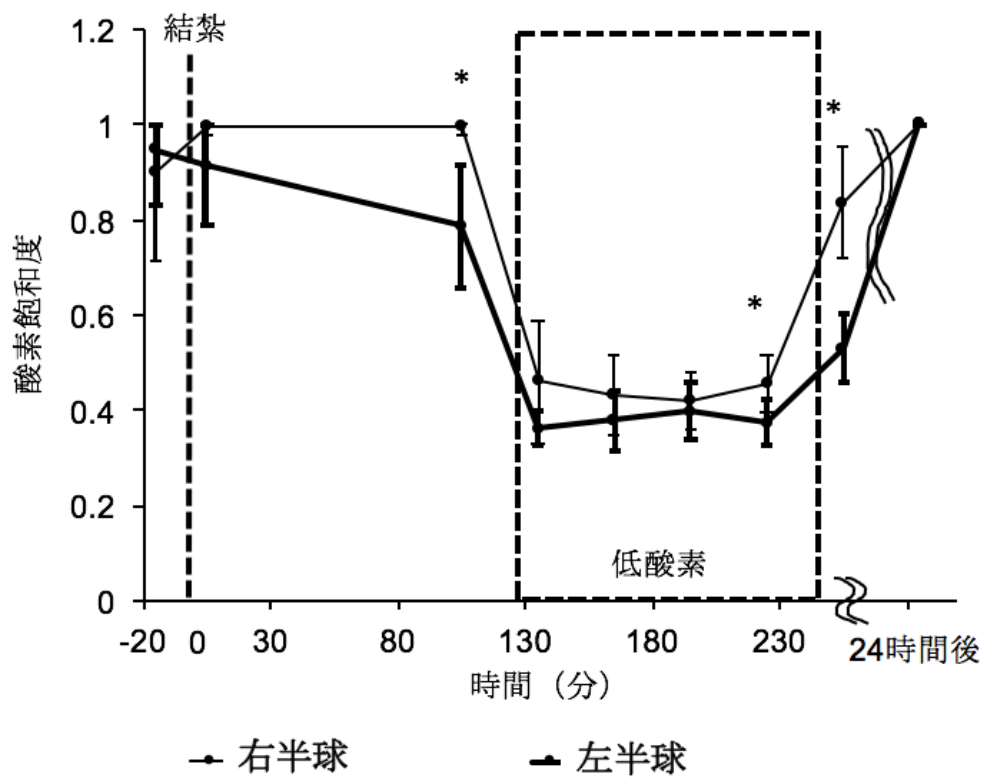
* <0.05 ** <0.01

図 9

A



B



C

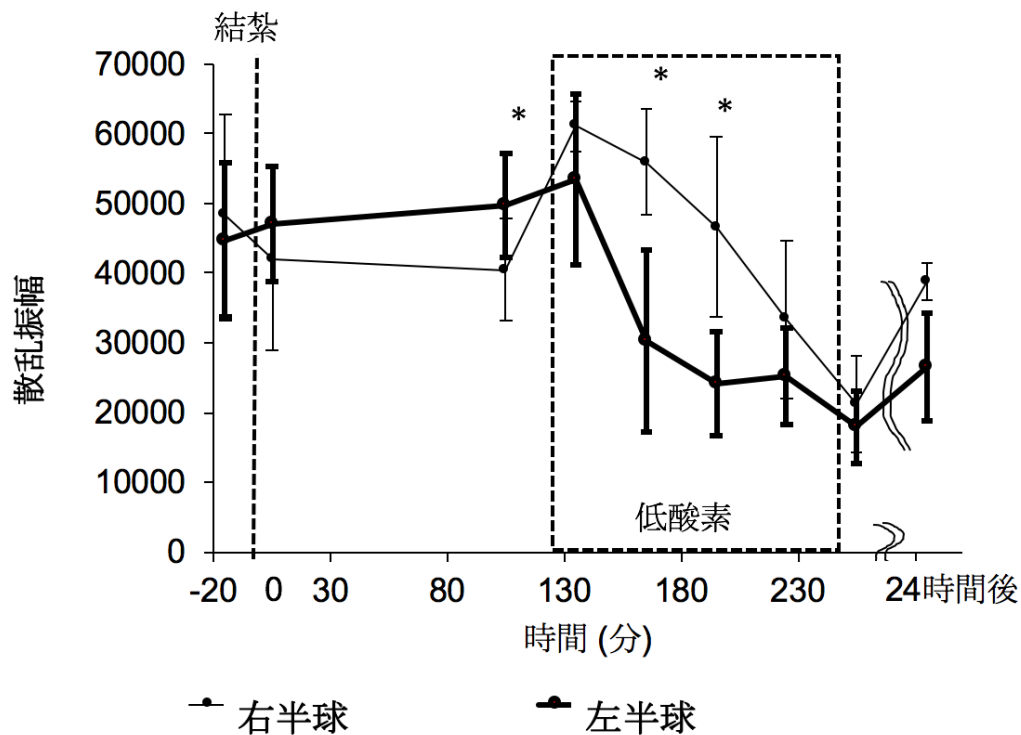
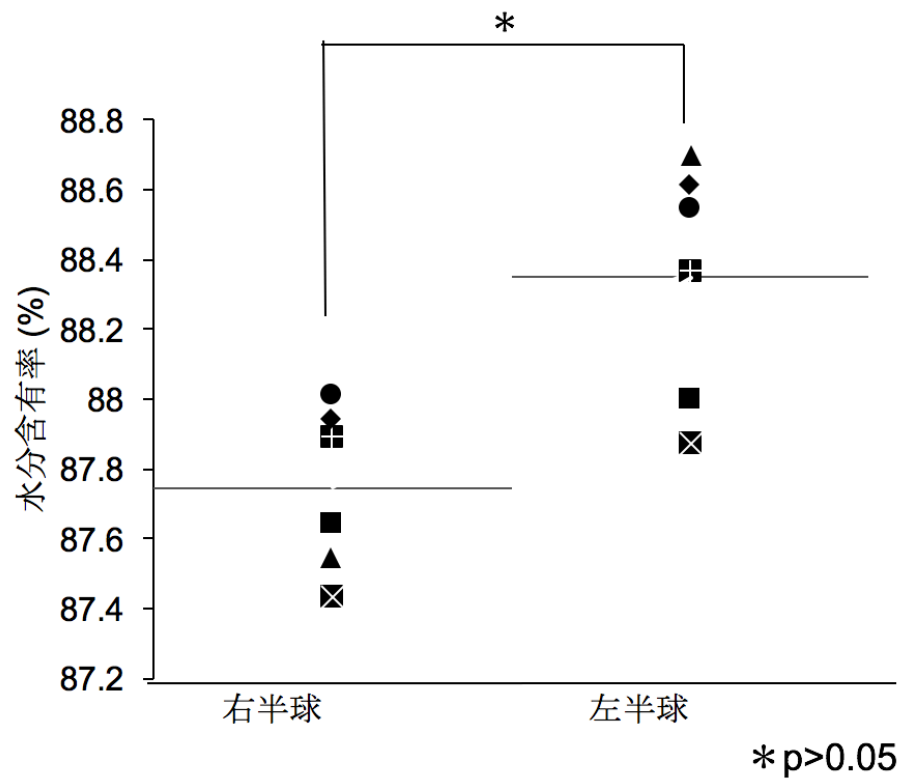


図 9. HIE モデルにおける脳血液量および酸素飽和度、散乱振幅の時間変化。新生仔ラットの脳組織内の脳血液量 (A) および酸素飽和度 (B) および散乱振幅 (C) を定量化した。左 (虚血あり) および右 (虚血なし) 半球の時間変化が、示された。右半球の変化は細い線で、左半球は太い線で示した。時点 0 での点線は、左総頸動脈結紮のタイミングを表した。点線の長方形で囲まれた時間帯は、8%の酸素環境への負荷期間である。最後のプロットの時間は、低酸素負荷終了から 24 時間後である。*: 半球間の比較において $p < 0.05$ 。各時点における点およびエラーバーは、平均±標準偏差である。n=6

图 10

A $p=0.02$



B $p=0.07$

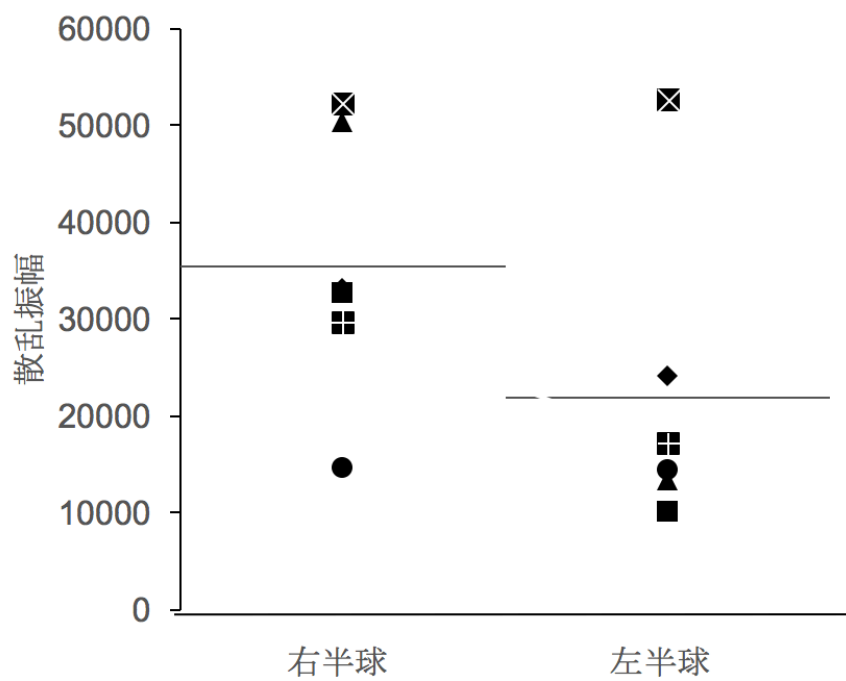


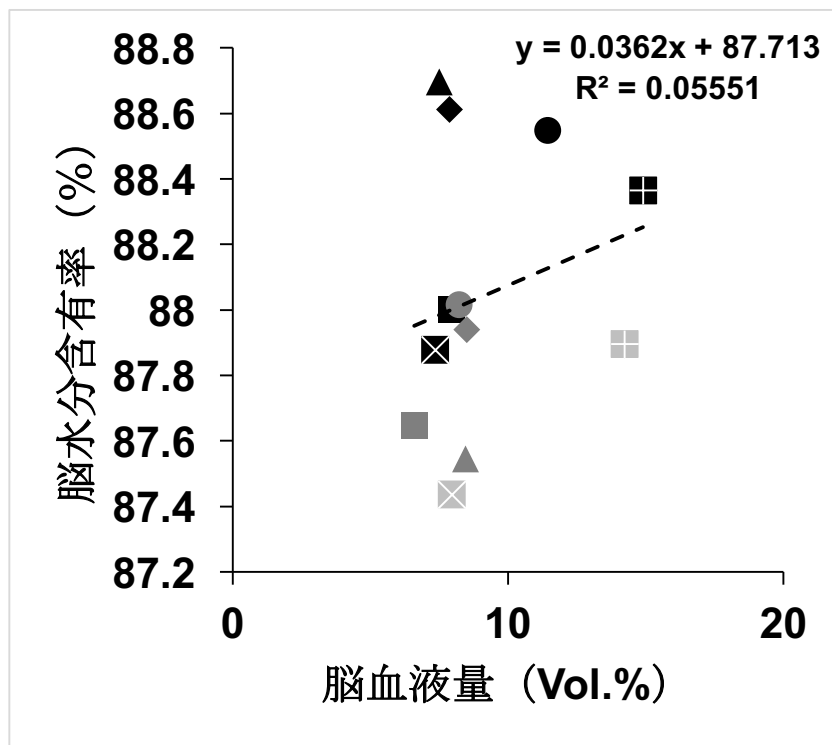
図 10

低酸素負荷の開始から 105 分後に、散乱振幅のデータを収集した直後に、HIE プロトコール下で 6 匹の新生仔ラットの抜脳した。脳組織水分含有率は、Wet and dry 法で測定した。(A) 左右脳半球の水分含有率。(B) 左右脳半球の散乱振幅。同一個体は同一のプロットマークで示されている。右半球からのデータは灰色で、左半球は黒色で示されている。プロットの点線は近似線である。またグラフ内の横線は平均値である。

図 11

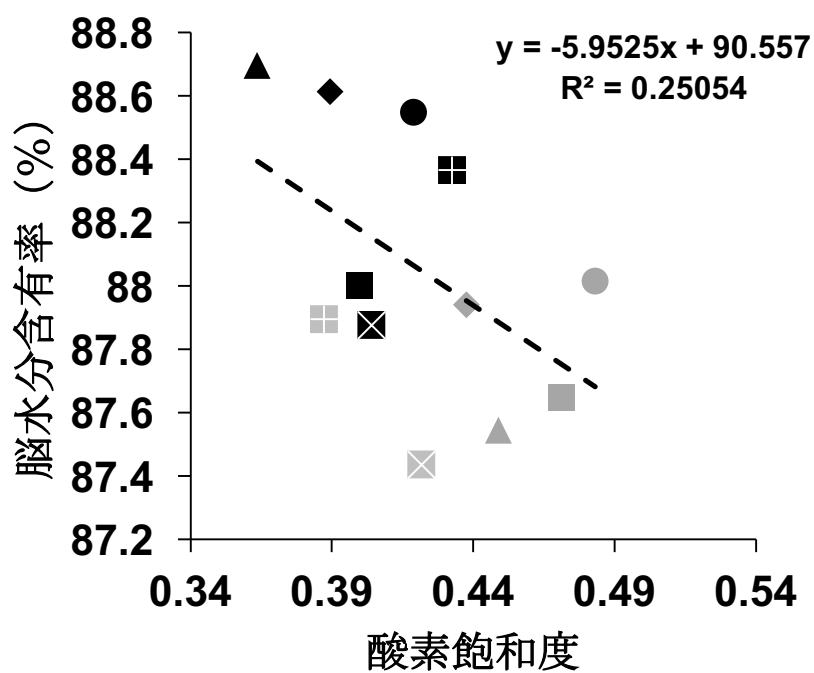
1.

相関係数 0.235 $p=0.46$



2.

相関係数 -0.500 $p=0.09$



3.

相関係数= -0.73、 $p = 0.007$

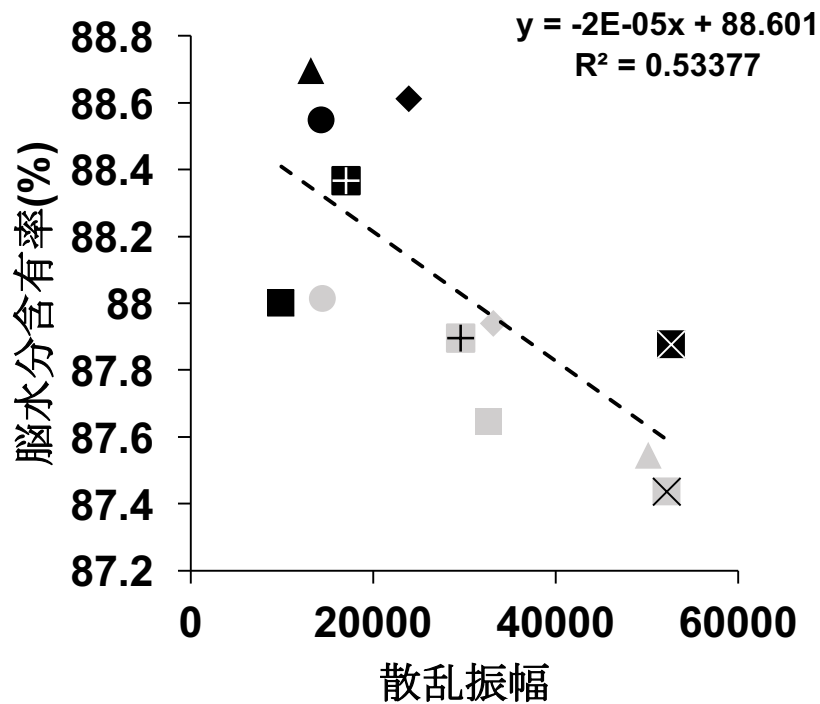


図 11. 脳組織水分含有率と散乱振幅との相関

低酸素負荷の開始から 105 分後に、散乱振幅のデータを収集した直後に、HIE プロトコール下で 6 匹の新生仔ラットの抜脳した。脳組織水分含有率は、Wet and dry 法で測定した。(1) 脳組織水分含有率と脳血液量との相関。(2) 脳組織水分含有率と脳酸素飽和度の相関。(3) 脳組織水分含有率と散乱振幅の相関。同一個体は同一のプロットマークで示されている。右半球からのデータは灰色で、左半球は黒色で示されている。プロットの点線は近似線である。

引用文献

1. Bax M, Goldstein M, Rosenbaum P, Leviton A, Paneth N, Dan B, et al. Proposed definition and classification of cerebral palsy, April 2005. *Developmental medicine and child neurology*. 47(8):571-6.2005.
2. Toyokawa S, Maeda E, Kobayashi Y. Estimation of the number of children with cerebral palsy using nationwide health insurance claims data in Japan. *Developmental medicine and child neurology*. 59(3):317-21.2017.
3. Graham EM, Ruis KA, Hartman AL, Northington FJ, Fox HE. A systematic review of the role of intrapartum hypoxia-ischemia in the causation of neonatal encephalopathy. *American journal of obstetrics and gynecology*. 199(6):587-95.2008.
4. Himmelmann K, Hagberg G, Uvebrant P. The changing panorama of cerebral palsy in Sweden. X. Prevalence and origin in the birth-year period 1999-2002. *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. 99(9):1337-43.2010.
5. Jacobsson B, Hagberg G. Antenatal risk factors for cerebral palsy. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 18(3):425-36.2004.
6. Nelson KB. Causative factors in cerebral palsy. *Clinical obstetrics and gynecology*. 51(4):749-62.2008.
7. Thornton C, Hagberg H. Role of mitochondria in apoptotic and necroptotic cell death in the developing brain. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 451(Pt A):35-8.2015.
8. Vexler ZS, Roberts TP, Bollen AW, Derugin N, Arieff AI. Transient cerebral ischemia. Association of apoptosis induction with hypoperfusion. *The Journal of clinical investigation*. 99(6):1453-9.1997.
9. Everett TR, Peebles DM. Antenatal tests of fetal wellbeing. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 20(3):138-43.2015.
10. Ugwumadu A. Are we (mis)guided by current guidelines on intrapartum fetal heart rate monitoring? Case for a more physiological approach to interpretation. *BJOG : an international journal of obstetrics and gynaecology*. 121(9):1063-70.2014.
11. Fergus P, Hussain A, Al-Jumeily D, Huang DS, Bouguila N. Classification of caesarean section and normal vaginal deliveries using foetal heart rate signals and advanced machine learning algorithms. *Biomedical engineering online*. 16(1):89.2017.

12. Schmidt S. Laserspectroscopy in the fetus during labour. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 110 Suppl 1:S127-31.2003.
13. Appropriate technology for birth. *Lancet (London, England)*. 2(8452):436-7.1985.
14. Rolfe P. In vivo near-infrared spectroscopy. *Annual review of biomedical engineering*. 2:715-54.2000.
15. Villringer A, Chance B. Non-invasive optical spectroscopy and imaging of human brain function. *Trends in neurosciences*. 20(10):435-42.1997.
16. Kawauchi S, Nishidate I, Uozumi Y, Nawashiro H, Ashida H, Sato S. Diffuse light reflectance signals as potential indicators of loss of viability in brain tissue due to hypoxia: charge-coupled-device-based imaging and fiber-based measurement. *Journal of biomedical optics*. 18(1):15003.2013.
17. Kawauchi S, Sato S, Ooigawa H, Nawashiro H, Ishihara M, Kikuchi M. Light scattering change precedes loss of cerebral adenosine triphosphate in a rat global ischemic brain model. *Neuroscience letters*. 459(3):152-6.2009.
18. Rice JE, 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Annals of neurology*. 9(2):131-41.1981.
19. Vannucci RC, Vannucci SJ. Perinatal hypoxic-ischemic brain damage: evolution of an animal model. *Developmental neuroscience*. 27(2-4):81-6.2005.
20. Yager JY, Ashwal S. Animal models of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Pediatric neurology*. 40(3):156-67.2009.
21. Kawauchi S, Sato S, Uozumi Y, Nawashiro H, Ishihara M, Kikuchi M. Light-scattering signal may indicate critical time zone to rescue brain tissue after hypoxia. *Journal of biomedical optics*. 16(2):027002.2011.
22. Taniguchi H, Andreasson K. The hypoxic-ischemic encephalopathy model of perinatal ischemia. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2008(21).
23. Mori M, Matsubara K, Matsubara Y, Uchikura Y, Hashimoto H, Fujioka T, et al. Stromal Cell-Derived Factor-1alpha Plays a Crucial Role Based on Neuroprotective Role in Neonatal Brain Injury in Rats. *International journal of molecular sciences*. 16(8):18018-32.2015.
24. Wang X, Zhang J, Yang Y, Dong W, Wang F, Wang L, et al. Progesterone attenuates cerebral edema in neonatal rats with hypoxic-ischemic brain damage by

inhibiting the expression of matrix metalloproteinase-9 and aquaporin-4. *Experimental and therapeutic medicine*. 6(1):263-7.2013

25. Yu L, Fan SJ, Liu L, Xiao M, Lin XJ, Liu Y, et al. Effect of ischemic postconditioning on cerebral edema and the AQP4 expression following hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats. *World journal of pediatrics : WJP*. 11(2):165-70.2015

26. Willie CK, Tzeng YC, Fisher JA, Ainslie PN. Integrative regulation of human brain blood flow. *The Journal of physiology*. 592(5):841-59.2014.

27. Ainslie PN, Ogoh S. Regulation of cerebral blood flow in mammals during chronic hypoxia: a matter of balance. *Experimental physiology*. 95(2):251-62.2010

28. Willie CK, Macleod DB, Shaw AD, Smith KJ, Tzeng YC, Eves ND, et al. Regional brain blood flow in man during acute changes in arterial blood gases. *The Journal of physiology*. 590(14):3261-75.2012.

29. Hasegawa M, Houdou S, Takashima S, Tatsuno M, Okuyama K, Suzuki S. Monitoring of immature rabbit brain during hypoxia with near-infrared spectroscopy. *Pediatric neurology*. 1992;8(1):47-50.

30. Nakamura M, Jinnai W, Hamano S, Nakamura S, Koyano K, Chiba Y, et al. Cerebral blood volume measurement using near-infrared time-resolved spectroscopy and histopathological evaluation after hypoxic-ischemic insult in newborn piglets. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*. 42:1-9.2015

31. Castejon OJ. Ultrastructural pathology of endothelial tight junctions in human brain oedema. *Folia neuropathologica*. 50(2):118-29.2012.

32. Dubowitz DJ, Dyer EA, Theilmann RJ, Buxton RB, Hopkins SR. Early brain swelling in acute hypoxia. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*. 107(1):244-52.2009.

33. Davis C, Hackett P. Advances in the Prevention and Treatment of High Altitude Illness. *Emergency medicine clinics of North America*. 35(2):241-60.2017.

34. Johnson LJ, Hanley DF, Thakor NV. Optical light scatter imaging of cellular and sub-cellular morphology changes in stressed rat hippocampal slices. *Journal of neuroscience methods*. 98(1):21-31.2000.

35. Ueda Y, Sato S, Ashida H, Ooigawa H, Nawashiro H, Shima K, et al.

Transcranial measurement of diffuse light reflectance from cold-injured brains in rats. *Journal of biomedical optics*. 10(6):064010.2005.

36. Kawauchi S, Sato S, Ooigawa H, Nawashiro H, Ishihara M, Kikuchi M. Simultaneous measurement of changes in light absorption due to the reduction of cytochrome c oxidase and light scattering in rat brains during loss of tissue viability. *Applied optics*. 47(22):4164-76.2008.

37. Clark SL, Hamilton EF, Garite TJ, Timmins A, Warrick PA, Smith S. The limits of electronic fetal heart rate monitoring in the prevention of neonatal metabolic acidemia. *American journal of obstetrics and gynecology*. 216(2):163.e1-.e6.2017.

38. Blix E. The admission CTG: is there any evidence for still using the test? *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica*. 92(6):613-9.2013.

39. East CE, Begg L, Colditz PB, Lau R. Fetal pulse oximetry for fetal assessment in labour. *The Cochrane database of systematic reviews*. Cd004075.2014(10).

40. East CE, Colditz PB. Intrapartum oximetry of the fetus. *Anesthesia and analgesia*. 105(6 Suppl):S59-65.2007.

41. Bloom SL, Spong CY, Thom E, Varner MW, Rouse DJ, Weininger S, et al. Fetal pulse oximetry and cesarean delivery. *The New England journal of medicine*. 355(21):2195-202.2006.