

【6】

氏 名	川 ^{かわ} 俣 ^{また} 安 ^{やす} 史 ^し
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第722号
学位授与の日付	平成31年3月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (精神神経科学)
学位論文題目	Repeated mild shaking of neonates induces transient cerebral microhemorrhages and anxiety-related behavior in adult rats (幼若期ラットへの反復揺さぶり刺激は一過性の微小脳出血および発達後の不安様行動を起こす)
論文審査委員	(主査) 教授 吉 原 重 美 (副査) 教授 神 作 憲 司 教授 黒 須 明

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

乳幼児揺さぶられ症候群 (shaken baby syndrome : SBS) は児の頭部が激しく揺さぶられる虐待によって惹起される。被虐待児は発達後に不安などの精神症状を起こすことが知られている。SBSでは様々な大きさの血腫が生じうるが、微小脳出血 (microhemorrhages : MHs) は巨大な血腫に比べ、発見が困難である。既存のSBSモデル動物は血腫が大きく死亡率も高いため、長期変化での動物の精神症状を表出する行動変化を解析できなかった。

【目 的】

揺さぶり刺激による神経病理変化、特にMHsの出現と、成長後の行動変化を解析するため、MHsを伴う新たなモデル動物の作製を計画した。MHsの評価は、磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging : MRI) 法および組織細胞化学的染色による解析により、発達後の行動解析はオープンフィールド試験を用いた不安様行動評価で解析した。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、指針に従って行った。Sprague-Dawley系妊娠ラットを揺さぶり群 (S群)、対照群 (C群) の2群にわけた。出産日を生後0日 (postnatal day 0 : P0) とし、生後x日をPxと定義した。離乳時 (P21) まで、同腹仔ラットは母ラットと共に同じケージ内で飼育した。S群の仔ラットは1日1クールの揺さぶり刺激をP3からP14まで12日間与えた。揺さぶり刺激装置は、仔ラット固定用のポリ塩化ビニル製円筒 (内部長径38mm、長さ80mm) を震盪

器上に設置し作製した。仔ラットは2% isoflurane送気にて麻酔し、1匹ごと固定器具に入れ、隙間は緩衝材を入れて固定した。揺さぶり周期は、4.1 Hzとし、1分間の揺さぶりとは1分間の休息の組み合わせを5回繰り返すことを1クルールの揺さぶり刺激とした。C群ではS群と同様の条件で麻酔し、固定器具に入れ、揺さぶり刺激を与えなかった。P35で雄雌を分離し、1ケージあたり2-3匹でP70まで飼育した。以下の実験は雄のみを用いた。

(組織細胞化学および免疫組織化学的検討)

P3 (n=11)、P7 (n=12)、P35 (n=6)、P56 (n=3) およびP70 (n=3) のS群およびC群ラットを用い、pentobarbitalによる深麻酔下に4% paraformaldehydeを用いて灌流固定を行った。厚さ40 μ mに脳を薄切し、浮遊切片として6系列に分けて保存した。1系列目はPerls法による鉄染色を行い、2系列目は血管外出血を明らかにするため、赤血球の指標として3,3'-diaminobenzamide (DAB) を、内皮細胞の指標としてrat endothelial cell antigen 1 (RECA-1) 抗体を用いた単染色および二重免疫組織化学染色を行った。

(MRI画像解析)

P4、P6およびP12のS群ラット (n=6) を1% sevofluraneと酸素、二酸化炭素および一酸化二窒素混合ガスによる麻酔下で、7 T MRI装置を用いて、頭部の磁化率強調画像 (susceptibility weighted imaging : SWI) を撮像した。撮像条件は撮像視野 19.2 \times 19.2mm、データマトリックス数256 \times 256、スライス厚0.5mm、スライス数7枚 (スライス間隔0.7mm)、繰り返し時間250ms、エコー時間15ms、フリップ角45 $^{\circ}$ とした。

(オープンフィールド試験)

S群 (n=14)、C群 (n=14) および離乳まで無処置で母子分離せず飼育したナイーブ群 (N群 n=6) のP70ラットを用いた。オープンフィールド装置は縦100cm、横100cm、高さ30cmの四角い木製の箱で、内面は灰色で、底面を線で5 \times 5分割した。照明は装置中央部の高さ100cmに置き、アリーナ部分の明るさを50luxとした。装置内の中央部にラットを置き、15分間装置に暴露することで自発行動を解析した。水平活動 (各分画の横断回数) と垂直活動 (二本足立ちの回数) を数値化した。

形態解析のデータおよびオープンフィールド試験のデータは両群間を対応のないt検定で比較し、 $p<0.05$ を有意とした。

【結 果】

DAB染色ではP3およびP7のS群ラット全てにMHsが認められ、特に前頭前皮質、頭頂葉皮質、側頭皮質、帯状皮質、島皮質、海馬、視床、小脳、脳幹等の灰白質に高頻度で観察された。MHsの大きさは直径50-300 μ m、1匹あたりの数はP3で平均5.09個、P7で平均12.5個存在した。MHsの数はP7以降激減していった。RECA-1とDABの二重染色によりMHsでの明らかな赤血球の毛細血管からの漏出が確認された。各日齢のC群ラットおよびP35、P56、P70のS群ラットにおいてMHsは認めなかった。Perls法による鉄染色では点状集積像や血管周囲へのびまん性染色像および細胞染色像を認めた。経時的变化を明らかにするために、鉄染色像を形態学上、血腫型、混合型、血管周囲型に分類した。P3では血腫型が主に存在し、P7では混合型が増加し、P35では血管周囲型のみ認めた。

P4ラット (n=6) のSWI画像では、4 個体で頭頂葉皮質および側頭皮質にMHsが認められた。P4で認めたMHsの信号はP6、P12で徐々に消失した。

オープンフィールド試験において各活動の平均値は、S群 (水平活動 107.3、垂直活動26.8)、C群 (水平活動 258.4、垂直活動57.2) およびN群 (水平活動 280.3、垂直活動47.7) だった。S群の各活動はC群およびN群と比較して、全て有意に減少していた (p<0.0001)。

【考 察】

本研究では新たな揺さぶり装置を作製することにより、既存のSBSモデル動物よりも微小な脳損傷を伴う新規SBSモデル動物を作製することに成功した。このモデル動物では大脳皮質および海馬の灰白質を中心に一過性のMHsを認め、鉄染色によりMHs周囲への鉄の漏出を認めた。SWI画像での信号の消失後も鉄の集積が確認されることから、MHs周囲は鉄による酸化ストレス状態にあると考えられた。MHsの経時変化の解析から、一部の鉄はこれまでの低酸素や虚血研究と同様にミクログリアにより処理されることが考えられたが、長期にわたるびまん性染色像から、局所の酸化ストレスはこれまでの報告より長期に続くことが示唆された。海馬はストレスホルモン受容体を介して、ストレスに対する負のフィードバックを行うことが知られている。海馬でMHsが高頻度に出現することから、酸化ストレスがこの負のフィードバック機構の機能不全を引き起こし、この結果不安様行動が出現したと考えられた。

【結 論】

本研究では、幼若期ラットへの揺さぶり刺激により一過性の微小脳出血を生じ、発達後に不安様行動を起こすことが明らかとなった。被虐待による不安症状の解析に本モデル動物が有用であると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

乳幼児揺さぶられ症候群 (shaken baby syndrome : SBS) は児の頭部が激しく揺さぶられる虐待によって惹起される。被虐待児は発達後に不安などの精神症状を起こすことが知られているが、既存のSBSモデル動物は血腫が大きく死亡率も高いため、発達後の行動変化は解析されていない。申請論文では、生後3日から2週齢のラットに連日揺さぶり刺激を与え、微小脳出血 (microhemorrhages : MHs) を伴うモデル動物を新規に作製している。このモデル動物を用いて、組織細胞化学的解析、磁気共鳴画像 (magnetic resonance imaging : MRI) 法を用いた磁化率強調画像 (susceptibility weighted imaging : SWI) による解析および生後10週齢での行動解析を行っている。結果、1) 3, 3'-diaminobenzamide (DAB) 染色では生後3日および生後7日の揺さぶり群 (S群) ラット全てにMHsが認められ、特に前頭前皮質、海馬等の灰白質に高頻度で観察された。MHsの大きさは直径50-300 μm 、1匹あたりの数は生後3日から生後7日にかけて増加し、以降は減少した。2) rat endothelial cell antigen 1 (RECA-1) 抗体とDABの2重免疫染色によりMHs部位での明らかな赤血球の毛細血管からの漏出が確認された。3) Perls法による鉄染色では、鉄取り込み細胞

および血管周囲の鉄沈着像を認め、経時的な変化を認めた。4) SWIでは、経時的にMHsの低信号が回復した。5) オープンフィールド試験においてS群の水平活動および垂直活動は対照群(C群)およびナイーブ群(N群)と比較して、全て有意に減少した($p<0.0001$)。これらの結果から、幼若期ラットへの揺さぶり刺激により一過性のMHsと発達後の不安様行動を起し、また被虐待による不安症状の解析に本モデル動物が有用であると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、S群ラットおよびC群ラットを用いて、DAB法およびPerls法による組織化学的染色およびRECA-1抗体を用いた免疫組織化学的解析を行っている。MHsの経時的変化についてMRIを用いてSWIを撮像して解析している。行動解析は標準的な実験方法であるオープンフィールド試験を行い、水平活動および垂直活動を計測して、不安様行動を評価している。適切な対象群の設定と客観的な統計解析を行っており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

既存のSBSモデル動物では、全て巨大な血腫を伴うモデル動物のみであり、MHsを伴うモデル動物は報告されていない。申請論文では幼若期ラットに揺さぶり刺激を与え、MHsを伴うモデル動物を初めて作製し、発達後に不安様行動を認めることを報告している。この所見はこれまで報告されておらず、本研究は新奇性・独創性に優れたものと評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、適切な対象群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、幼若期ラットへの反復揺さぶり刺激により一過性のMHsを認めることを明らかにしている。また、S群はC群およびN群と比較して発達後の不安様行動が増加することを明らかにしている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、かつ先行研究の結果と照らし合わせても、矛盾するものではない。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、既存のSBSモデル動物よりも微小な脳損傷を伴うモデル動物を作製し、発達後に不安様行動を認めることを明らかにしている。こうした結果は、これまでのSBSの疾患概念より軽症であっても発達後の精神状態が変化するという、臨床的に非常に示唆に富むものである。被虐待児における精神医学的病態の解明や治療法の開発につながると想定され、大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、臨床精神医学、神経科学や免疫組織化学の理論と実践を学んだ上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域での学会発表を経て国際誌に受理され、既に公開されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

(主論文公表誌)

Neuroscience Letters

(684 : 29-34, 2018)