

## 学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

ハイリスク新生児の脳幹機能異常の発達論的解明  
— 霊長類モデルの開発と分析法の検証 —

研究代表者 山内 秀雄 (大学病院 小児科)

研究分担者 國方 徹也<sup>1)</sup>, 小柴 満美子<sup>2)</sup>, 笥 紘子<sup>1)</sup>,  
櫻井 隼人<sup>1)</sup>, 狩野 源太<sup>2)</sup>

## 緒言

胎生期から乳児期早期までの間に認められその後消失してゆく「原始反射」と、一定の時期を過ぎてから出現し継続して認められる「発達に伴って出現する反射」の2種類はdevelopmental reflexと呼ばれる。ヒトでは原始反射のほとんどは乳児期前半に消失し、その後に発達に伴って出現する反射が出現してくる。脳性麻痺は胎児期から周産期までの障害に基づく運動発達障害と定義されるが、developmental reflexのoff/onスイッチが胎児期からoffになっていたり、onになるべき時期が著しく遅延したりしていることが判明している。即ちMoro反射、Galant反射、非対称性緊張性頸反射(ATNR)などの新生時期に認められるべき原始反射が出現せず乳児期に遅れて出現したり、また特にアテトーゼ型脳性麻痺などこれらの原始反射が消失すべき乳児期をすぎても継続して認められることは既知の事実である。脳性麻痺はこのoff/onスイッチの異常に関連して随意運動出現障害に陥っていると解釈しうる。自閉症スペクトラム(ASD)の場合でも乳児期における姿勢反射の異常が現れるとされるが(Teitelbaum, PNAS 2004)、この事実はASD発症においてもこのoff/onスイッチの異常が関与することを示唆する。

Developmental reflexのoff/onの異常について、胎児新生児期にたとえば大脳に広範な梗塞性病変があるなど大脳の破壊性病変が認められても新生児期乳児期にはその徴候が乏しく、幼児期になってはじめて顕著化したり、その程度も軽微であったりする。また、新生児のMRI画像で一見軽微な脳の変化のみでも重篤な脳性麻痺をきたす場合もある。これらの事実は胎児新生児脳の可塑性とoff/onスイッチの脳発達メカニズムに最も影響をあたえる臨界期の存在を示唆し、その部位は大脳皮質下構造、とくに脳幹・小脳を含む下位中枢組織であると推察しうる。

そこで、我々は、developmental reflexのoff/onメカニズムの理解、胎児から乳児期早期における運動の随意性・不随意性についての理解、そして、新生児期の機能的寄与率が大きいと考えられる、脳幹・小脳の関わりへの理解を図ることを目的とし、胎児期に出生したハイリスク新生児と小型霊長類コモンマーモセットを対象に研究を行ってきた。

最初に、後方視的に新生児集中治療室の入院理履歴を有す児を対象とする臨床および予後の発達情報の分析検討を行うことで、神経学的な機能的行動の発達に関わる因子を探索した。その結果、退院時にリハビリテーションなどの医療的介入を要する群が、介入を要さない健常群に対して、随意的な機能的行動として神経学的発達マイルストーンとみなされ一般に生後4-6か月齢に順に出現することが知られている「定頸」および「寝返り」に関する遅れがあることが認められた<sup>2)</sup>。この行動は、抗重力性に身体局所を随意的に動かし、主体の意図を達成する運動と考えられる。これらの背景基盤の下、より早期発達段階にある胎児期新生児に、同様な随意的行動の素因子が存在するならば、その発達を可視化することで、原初的な神経機能の発達基盤を推定し、その遅れを可塑的と見込める年齢に把握することで、効果的な治療介入プログラムを開発できるかもしれない、と仮説を置いた。そこで、保育器内の胎児期新生児の行動を計測し、関節点や上下肢・胸・腰・頭部などの各部位の角度などの変量を利用した多変量解析を行い、重力に逆らう随意性運動を原始反射から判別するアルゴリズムの開発の試み(Koshiha, et al. OA Autism 2013)を利用して、本研究ではその妥当性を前臨床的検討に資する霊長類モデル研究に展開しヒトと繋ぐことで学術的な評価を調査した。その結果、重力環境における中枢として、前庭神経系の機能的発達に焦点を当てることとなった。内耳にある前庭器官、三半規管における内リンパ液、有毛細胞によって頭部の動きを検知した信号は前庭神経を介して、脳幹・前庭神経核による処理により、動眼神経核、動眼筋の反射行動を

1) 大学病院 新生児科

2) 大学病院 小児科

支配する。本研究期間においては、前庭神経系が支配するこれらの機能を表現しうる計測・分析器の試作を行い、新生児に適用する検証を進める途上にあるが、その発表については例数を重ねた後に別機に改めることとする。

本報告では、霊長類・前臨床モデルの開発と検証にフォーカスを当てる。小型霊長類コモン・マーモセット新生時期から認められている抗重力的反射「climb-up behavior」の発達に伴う消失およびその消失直後から出現してくる重力方向に高位から低位へと降り、より広い範囲で水平方向を伴い移動するための前段階の運動「jump-down behavior」の経時的観察結果から、発達に伴いoff/onを示すこれらの“behavior”がヒトのdevelopmental reflexのモデルになりうる可能性に着目している<sup>3)</sup>。この報告において、検討対象個体のうち、この抗重力運動の「climb-up」から「jump-down」への推移が曖昧、かつ、遅れを示した個体は、児童相同期に体重抑制を伴う家族内社会性機能の障害を来したことがわかった。発達初期の神経学的遅れが、より後期の社会性情動機能の形成に関わる可能性について、仮説を抱ききかけを与えたので、本研究においては、例数の少なかった同仮説の検証に重きを置き、特に、抗重力的反射と推定される「climb-up behavior」の行動パターンが、新生極初期に、原始反射様の行動として個体を超越認められるかどうかについて、評価・検証を行った。

## 材料と方法

埼玉医科大学実験動物委員会の倫理審議を経て承認された内容を遵守し、学内の同じ繁殖ペアを選定することで、同ペアから得る遺伝的にも環境的にも限定的な条件が確保される6頭の新生仔を対象とした。個体・性別の識別後、体重が30 g以上であること、健常仔であることを確認した。性別配分は、雌雄各3頭であった。

確認できる生後の数～時間以内の早期に、先行研究で開発した抗重力運動試験<sup>3)</sup>を一頭ずつ、実施した。その方法を簡略に説明すると、ビデオカメラ記録の下、直径65 mm長さ125 mmの円柱を、表面の摩擦係数が異なる二種用意し、長さ方向に平行して新生仔を底部湾曲面に掴らせる状態を初期条件とした。クッション材から高さ200 mm上部の定位位置において、上下肢により円柱表面に掴り、自身の身体を円柱底部に維持することができる覚醒度・筋力レベルを初期状態とした。同状態の確認以降、試験を開始し、2分間の試験時間内に、個体が示す行動を記録し、ビデオデータから視線方向と躯体の移動に関する行動パターンを定量した。行動パターンは初期状態の底部掴り維持、「climb-up behavior」, 「jump-down behavior」, 「その他」の定義を用意した。

この抗重力運動試験に伴い、ヒト新生児の原始反射行動として知られる、吸啜反射、手掌把握反射、足底把握反射を行った。いずれも、シリンジ・カテーテルを5 mm長さで切断した治具を利用した。

加え、クッション材床上において、仰臥位を初期状態とする立位反射の有無の確認を行い、これらの行動試験の

ビデオ録画を行った。

## 結果

各6個体は、全頭、抗重力試験<sup>3)</sup>の初期状態を確認した後、試験開始後2分未満に、抗重力的行動「climb-up behavior」を示し、「jump-down behavior」を示す個体は存在しなかった。各個体の「climb-up behavior」中の視線は垂直上位を向いていた。

吸啜反射は、シリンジ・カテーテル治具を口角各側傍に近づけると、その直後に新生仔がカテーテル先端に吸い付く行動を示した。手掌把握反射、足底把握反射は、被験個体の各左右側の手掌部または足底部を解放する体勢を初期状態に設定し、シリンジ・カテーテル治具をその近傍に置くと、新生仔が自ら把握する行動を表出した。吸啜反射、手掌把握反射、足底把握反射についても、いずれの個体も、初期状態設定直後に対象の行動を顕著に表現した。

立位反射は、クッション材上において、仰臥位の初期状態を設定後、直後に基本的な姿勢である腹臥位に戻る行動を表出した。この立位反射においても、全頭が本行動を顕著に示すことを確認した。

本研究で実施した全ての行動試験におけるパターンは、健常な新生初日齢のコモン・マーモセットにおいて、個体を超越して再現的に認める運動であることが確認された。

## 考察

乳幼児期の疾患に対する治療の介入法は、内科的および外科的治療と共に、環境適応性、学習性、その可塑性と高感受性期の基盤を理解し、これに基づく複合的な療育プログラムを開発することにより新しい可能性が広がる。効果的な治療介入術の開発のためには、神経学的発達の客観的な診断術を用意する必要がある。また、長期を要するこれらの発達診断と介入術の有効性、安全性を、前臨床的に検証するためには、神経系基盤の相同性が多く見込める霊長類モデルを用意することが期待される。

我々が開発して来た抗重力運動試験<sup>3)</sup>は、通常診療として正期産期に実施している神経学的発達診断法を参考にしながら、霊長類コモン・マーモセットの種の発達特性を考慮したうえで投影を試みた試験法である。ヒト新生児の健常・異常の鑑別は、国際的な新生児行動評価法 Brazelton Neonatal Behavioral Assessment Scale や Dubowitz Neurological Assessment of the Pre-Term and Full-Term Newborn Infant, NICU Network Neurobehavioral Scale and the Fetal Neurobehavior Coding Scale (NNNS Lester, et al. 2004) などを参考にし実施している。本研究においては、先行研究で生後数日以降にしか出現を確認できていなかった定型的な抗重力運動について、より早期の正期産出生極初期から、全頭に認めることができたことは、コモン・マーモセットの神経学的機能的発達の理解、および、その発達診断行動マーカーとしての検証ができたことを意味する。

我々のコモン・マーモセットの抗重力運動試験に

においては、上下肢を含む全身の骨格筋を使って円柱をよじ登る行動は、被験個体の体位を円柱底部にぶら下がる状態に設定すると再現的に個体から表出される抗重力運動であるが、円柱にしがみつくと体位の維持においては、底部にぶら下がる体位に対し、頭部を円柱上位に置き胴部・下肢を重力方向下位におく体位の方が筋力の消費エネルギーを低くできると考えられる。上下肢の把握力の機能と共に、重力環境における自身の体位を捉え処理する中枢、前庭神経系の機能が、視聴覚などの感覚機能と運動機能共に複合的に働く、しかし定型化した原始反射様の運動であることが推定される。

コモン・マーモセットの新生仔においては、この抗重力行動機能を新生極初期に有することは、父母の体幹に筋力の省エネルギー消費状況の下にしがみつくと、保熱および哺乳・栄養摂取を可能とする、生存維持に必須の発達機能と考えられた。親から離れた新生仔が生存できる飼育条件において、代替となる体表温度のインキュベーター設定が必須である (Koshiba, Sci Rep 2013)。

この抗重力運動を司る要素的行動と推定される、上下肢末梢で表現される手掌把握反射および足底把握反射運動、および、前庭神経系が支配すると考えられる立位反射様の仰臥位から腹臥位に即時に戻る行動は、それぞれ全個体で表出が確認された。ヒト新生児においては、立位反射に近い、「寝返り」行動が、正産後半年齢に主に出現することが知られ、随意的な運動制御機能とみなされている。いっぽう、我々の胎児期新生児の行動分析において、「寝返り」が達成することはなくともその素養とみなされるような、一秒以内の短潜時に生じる反射レベルとは質的に異なる「仰臥位に返した後に出現する背屈」が数十秒単位のより長い継続時間で出現し、随意性を推定できる運動として、複雑系解析を介した識別法を提案した (Koshiba, et al. 2013)。同じ霊長類の本コモン・マーモセット・モデルの様に、ヒト新生児の「仰臥位に返した後に出現する背屈」については、胎児期に立位反射の機能的要素を潜在的に有しつつ、骨格筋の機能的限界から反射レベルでは同行動に達せず、随意的な運動制御を伴い腹臥位の体位を嗜好する原初的な高次行動を表現した、という仮説を立てることができるかもしれない。

早産児の生存率が世界一高い先端的周産期医療水準を誇るわが国では、いっぽうで、基礎疾患を伴わない早期産児の人口比率が高く (OECD Library 2013)、早産と自閉症スペクトラムなどの発達障がいとの相関性が示唆されている (Teitelbaum, PNAS 2004)。本報告が提示する、重力環境に留意しながら、環境相互作用の神経学的な発達基盤を考察するとき、自閉症スペクトラムとの関わりが深い小脳や脳幹において、前庭系や視聴覚、体性感覚と生体リズム機能、反射や随意性の運動機能が連合する高次な神経回路の発達に問題が生じることを仮説すると<sup>1-4)</sup>、その発達過程が周産期に開始されている可能性を本報告は示唆する。原始反射および随意性行動のそれぞれ、および、

複合的行動の診断法、および、その霊長類モデルの研究を今後深めることにより、分子基盤や環境の介入などの包括的療育プログラムの開発が進むことが期待される<sup>5,6)</sup>。

## 謝 辞

埼玉医科大学大学病院新生児科、小児科、および、実験動物部門の皆様、本研究を支えて頂きましたことを、深く感謝を申し上げます。

## 研究成果リスト

### 論文

- 1) Koshiba M, Senoo A, Karino G, Ozawa S, Tanaka I, Honda Y, Usui S, Kodama T, Mimura K, Nakamura S, Kunikata T, Yamanouchi H, Tokuno H. Susceptible period of socio-emotional development affected by constant exposure to daylight. *Neurosci Res* 2015 Apr; 93: 91-8.
- 2) Koshiba M, Takei H, Honda M, Karino G, Niitsu M, Miyaji T, Kishino H, Nakamura S, Kunikata T, Yamanouchi H. Early-infant diagnostic predictors of the neuro-behavioral development after neonatal care. *Behav Brain Res* 2015 Jan 1; 276: 143-50.
- 3) Karino G, Murakoshi T, Nakamura S, Kunikata T, Yamanouchi H, Koshiba M. Timing of changes from a primitive reflex to a voluntary behavior in infancy as a potential predictor of socio-psychological and physical development during juvenile stages among common marmosets. *JKSUS* 2015; 27: 260-70.
- 4) Koshiba M, Karino G, Mimura K, Nakamura S, Yui K, Kunikata T, Yamanouchi H. Psycho-Cognitive Intervention for ASD from Cross-Species Behavioral Analyses of Infants, Chicks and Common Marmosets. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2016; 15(5): 578-86.
- 5) Homberg JR, Kyzar EJ, Nguyen M, Norton WH, Pittman J, Poudel MK, Gaikwad S, Nakamura S, Koshiba M, Yamanouchi H, Scattoni ML, Ullmann JF, Diamond DM, Kaluyeva AA, Parker MO, Klimenko VM, Apryatin SA, Brown RE, Song C, Gainetdinov RR, Gottesman II, Kalueff AV. Understanding autism and other neurodevelopmental disorders through experimental translational neurobehavioral models. *Neurosci Biobehav Rev* 2016 Jun; 65: 292-312.
- 6) Homberg JR, Kyzar EJ, Stewart AM, Nguyen M, Poudel MK, Echevarria DJ, Collier AD, Gaikwad S, Klimenko VM, Norton W, Pittman J, Nakamura S, Koshiba M, Yamanouchi H, Apryatin SA, Scattoni ML, Diamond DM, Ullmann JF, Parker MO, Brown RE, Song C, Kalueff AV. Improving treatment of neurodevelopmental disorders: recommendations based on preclinical studies. *Expert Opin Drug Discov* 2016; 11(1): 11-25.