



|              |                                                                                                                                                 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 慢性脳血流低下モデル動物における白質病変の形成機序について                                                                                                                   |
| Author(s)    | 車谷, 隆宏                                                                                                                                          |
| Citation     | 大阪大学, 1995, 博士論文                                                                                                                                |
| Version Type |                                                                                                                                                 |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/39010">https://hdl.handle.net/11094/39010</a>                                                             |
| rights       |                                                                                                                                                 |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                     |
|---------------|-----------------------------------------------------|
| 氏 名           | くるま たに たか ひろ<br>車 谷 隆 宏                             |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                           |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 1 8 0 0 号                                       |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 7 年 3 月 23 日                                    |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第4条第1項該当<br>医学研究科内科系専攻                          |
| 学 位 論 文 名     | 慢性脳血流低下モデル動物における白質病変の形成機序について                       |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 西村 健<br><br>(副査)<br>教 授 柳原 武彦 教 授 祖父江憲治 |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 【目的】

臨床的に脳血流量の低下と痴呆症状の程度とは相関することが示されているものの、慢性脳血流低下により痴呆症状が発現するかどうかについては未だ明らかにされていない。本研究では脳血流遮断ではなく脳血流低下状態の病理過程について検討するために、成熟砂ネズミの両側総頸動脈にコイル状クリップを装着し2カ月間飼育した慢性脳血流低下モデル動物を作成した。本モデル動物に特徴的である大脳白質病変の性質を明らかにするために、神経軸索の構成蛋白であるミエリン塩基性蛋白(MBP)とニューロフィラメントH(NFH)とを定量するためのELISA系を新たに開発した。慢性脳血流低下状態の動物脳組織についてその軸索構成蛋白の経時的变化を定量的に検討し、慢性脳血流低下により惹起される白質病変の形成機序を明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

#### 1. 慢性脳血流低下モデル動物の作製

成熟砂ネズミの片側総頸動脈をペントバルビタール麻酔下に露出し、直径0.1mmのステンレス・ワイヤを内径0.2-0.3mm, 1ピッチ0.5mm, 全長2.5mmに加工したコイル状クリップを装着した。1週間後に他側の総頸動脈にも同様の手技によりコイル状クリップを装着し、一定期間飼育した動物を慢性脳血流低下群とした。一方、コイル状クリップを総頸動脈に触れる操作だけの偽手術を行なったものを対照群とした。

#### 2. 脳白質ホモジュネートのウェスタン法

断頭直後に氷冷下で脳を摘出し白質を切り出した後、4倍容のバッファーを加えてホモジュナイザーにて脳白質ホモジュネートを作製した。蛋白濃度を一定に希釈した対照群(N=7)とクリップ装着後2カ月間経過した脳血流低下群(2カ月群; N=8)の白質ホモジュネートを電気泳動し、これをpolyvinylidene difluorideに転写して、モノクロナル抗グリア線維酸性蛋白(GFAP)抗体、モノクロナル抗リン酸化NFH抗体、リン酸化/脱リン酸化の両方を認識するモノクロナル抗NFH抗体、モノクロナル抗MBP抗体をそれぞれ一次抗体として反応させ、それぞれの蛋白に対応するバンドをデンストメーターを用いて計測した。

#### 3. ELISA測定系

対照群(N=12), 1週群(N=10), 2週群(N=12), 1カ月群(N=13), および, 2カ月群(N=15)について、総蛋白濃度を一定となるように希釈した白質ホモジュネートを試料とし、モノクロナル抗MBP抗体を固相化抗

体、ポリクロナル抗MBP抗体を第1抗体とし、第2抗体にはアルカリフォスファターゼ標識抗ウサギIgGを用いたサンドウィッチ法により定量した。発色はp-nitrophenyl phosphateによりその吸光度を計測した。NFHのELISA測定系はモノクロナル抗NFH抗体、ポリクロナル抗NFH抗体を用い、その他はMBPの系に準じた。

#### 【成績】

総頸動脈にコイル状クリップを装着する手術による動物の死亡率は、初めのクリップ装着手術時に約20%、第2のクリップ装着手術時に約20%であった。生存した実験群の動物では、行動の異常・粗大な神経学的異常・体重の異常減少を認めなかった。慢性脳血流低下状態で2カ月間経過した実験動物では脳室が著しく拡大していた。脳室拡大の多くは左右不均等であり、右側脳室が拡大しているものが多かった。脳血流低下の期間が1週、2週、あるいは、1カ月の実験動物では脳室拡大が認められる動物は10%以下であったのに対して、脳血流低下の期間が2カ月になると、脳室拡大の所見を呈する動物は40%に急増していた。

脳室拡大を示した実験動物では白質の粗鬆化が認められ、抗NFH抗体を用いた免疫組織化学的検索でもNFH染色性の低下が認められた。

抗MBP抗体によるウェスタン法で2カ月間の脳血流低下群は対照群との間にバンドパターンの差異を認めず、対照群と比較してMBP量が約50%に低下していた。抗NFH抗体によるウェスタン法でも脳血流低下群は対照群と比較してNFH量は約80%に低下していた。これに対して、抗GFAP抗体によるウェスタン法では脳血流低下群では対照群と比較して約3.5倍にGFAP量が上昇していた。

このような蛋白変化を経時的に検討するために、ELISAによる定量法を開発した。ELISAによる定量では、脳血流低下群のMBP量は脳血流低下1週から既に減少傾向を示し、1カ月では有意に減少していた。これに対して、NFH量は脳血流低下1週、2週では全く減少傾向を示さず、脳血流低下2カ月で初めて有意な減少を示した。

ニューロフィラメント蛋白のリン酸化レベルは病的状態により変化することが示されているため、リン酸化/脱リン酸化両方のNFHを認識する抗体を用いた結果と比較したところ、リン酸化NFHのみを認識する抗体でも、脳血流低下2カ月群では同程度にNFH量が対照群と比較して減少していた。

#### 【総括】

ミエリン塩基性蛋白とニューロフィラメントH蛋白のELISAによる定量法を開発し、慢性脳血流低下モデル動物脳における白質病変の形成機序を検討し以下の結果を得た。

1. 脳血流低下状態が一定期間持続した後に、脳室拡大の出現率が増加し大脳白質病変が急増した。
2. 慢性脳血流低下動物では、ミエリン塩基性蛋白とニューロフィラメントH蛋白とがそれぞれ50%と80%に減少していたが、グリア線維酸性蛋白は3.5倍に増加していた。
3. ELISA測定系による検討では、ミエリン塩基性蛋白とニューロフィラメントH蛋白は経時的に減少していたが、ミエリン塩基性蛋白の減少がニューロフィラメントH蛋白の減少に先行していた。
4. 両側総頸動脈の狭窄によって引き起こされる進行性の白質病変と学習能障害を呈する本モデル動物は、ビンスワングー病の病態との類似性が考えられ、慢性脳血流低下により惹起される病変の形成機序を検討する上で有用であると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

臨床的に脳血流量の低下と痴呆症状の程度とは相関することが示されているものの、慢性脳血流低下により痴呆症状が発現するかどうかについては未だ明らかにされていない。本研究では成熟砂ネズミの両側総頸動脈にコイル状クリップを装着し2カ月間飼育した慢性脳血流低下モデル動物を作成し以下の検討を行った。

このモデル動物では、脳室拡大や白質粗鬆化などの白質の変化と関連する病変の出現が高頻度であり、しかもこれらの白質病変は脳血流低下期間が長くなると共に増加していた。ウェスタン法により、クリップ装着2カ月後の白質におけるミエリン塩基性蛋白(MBP)とニューロフィラメントH蛋白(NFH)の減少、グリア線維酸性蛋白(GFAP)の増加が認められた。さらにELISA法による測定系を開発してMBPとNFHの経時的变化を定量した

ところ、MBPの減少時期がNFHに先行するとの結果を得た。これらの結果から、本モデル動物の白質病変においてはミエリンのみならず軸索もまた何らかの障害を受けており、かつミエリンの障害が軸索のそれに先行することが示唆された。

これらの知見は慢性脳血流低下状態に見られる白質病変の形成機序を理解する上で重要であり、学位に値すると考える。