

Title	The effect of repetitive mild brain injury to the cytoskeletal protein and behavior
Author(s)	金山, 巖
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39870">https://hdl.handle.net/11094/39870</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	金 山 巖
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 12400 号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	The effect of repetitive mild brain injury to the cytoskeletal protein and behavior (軽微な頭部衝撃の繰り返しにより惹起される脳内細胞骨格蛋白変化と行動異常)
論文審査委員	(主査) 教授 柳原 武彦  (副査) 教授 祖父江憲治 教授 早川 徹

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

疫学調査によりアルツハイマー病の危険因子として頭部外傷の既往があげられている。ボクシング経験者に引退後発症するボクサー脳症 (*dementia pugilistica*) は、アルツハイマー病と同様に大量の神経原線維変化とアミロイドβ蛋白の沈着を呈する痴呆症である。長期間にわたり抗炎症剤を使用しているものにアルツハイマー病の発症頻度が低いことから、アルツハイマー病の発症と炎症過程との関係が示唆されている。頭部外傷による脳組織損傷については知られているものの、閾値以下の軽微な頭部外傷の反復負荷による脳組織の変化を調べた研究はない。このような背景に基づき、軽微な頭部外傷の反復負荷により惹起される脳内病変を明らかにするための動物実験系を開発して以下の研究を行った。

#### 【方法】

頭部に定量的な機械的障害を負荷するために fluid percussion 装置を用いた。まず、単回負荷実験により頭部衝撃の強度を検討し、1.0atm の単回負荷では急性期蛋白の発現は認められるものの細胞骨格蛋白の異常や神経細胞の脱落は認められないことを示した。そして、この閾値以下の軽微な頭部衝撃を反復したときの動物の行動様式と細胞骨格蛋白の変化について検討した。

①fluid percussion 装置による頭部衝撃負荷：麻酔下にてラットの右頭頂部に骨窓を作りテフロンチューブを装着した。チューブ内を生理的食塩水で満たして1週間回復を待った。頭部衝撃実験は、テフロンチューブを fluid percussion 装置に接続し、重りを一定の高さから落下させることにより頭蓋内に一定の水圧衝撃を負荷した。単回負荷実験は1.0-4.3atm について行い、反復負荷実験は1.0atm の衝撃を回数と間隔を変えて負荷し、最終衝撃の1週間後に動物の行動評価を、1週間あるいは1ヶ月後に脳組織の検索を行った。②行動評価：小動物行動解析装置(OUCEM)を用いて、新たな環境における動物の探索行動の変化を測定し、その結果をANOVAを用いた統計解析により有意差を検定した。③脳組織の神経病理学的検討：10%ホルマリン液にて灌流固定した後に断頭し、同液にて浸潤固定した脳組織について検索した。パラフィン切片および凍結切片についてヘマトキリシン・エオジン染色、クレシルバイオレット染色を行い神経細胞の変性・脱落の程度を評価した。また、急性期蛋白の発現を抗HSP72抗体にて、神経細胞の細胞骨格蛋白の変化を抗MAP2抗体、抗タウ抗体、異なるリン酸化レベルに特異的な各種の抗ニューロフィラメント抗体による免疫染色にて検討した。

## 【成績】

まず軽度衝撃の特徴と強度を明らかにするために、軽度衝撃と重度衝撃の単回衝撃について比較検討した。重度衝撃（4.3atm）では衝撃部位において神経細胞脱落を認めしたが、軽度衝撃（1.0atm）ではHSP72の発現のみで神経細胞の脱落を認めなかった。したがって、神経細胞の脱落を起こさず急性期蛋白の発現を惹起する衝撃（1.0atm）を軽度衝撃として反復負荷実験を行った。

①行動評価：動物を新たな環境においたときの運動量を評価した。1.0atmの軽度衝撃を1, 2, 3, 4日の間隔で4回繰り返した後の運動量は、対照と比較して衝撃間隔が短くなるにつれて増加していた。また、衝撃間隔を一定にした場合には、反復回数が1回から7回に増加するにつれて運動量は増加していた。運動量の経時的解析からこの増加は探索行動が抑制されないことによることが明らかになった。

②神経病理学的検討：抗MAP2抗体による免疫染色の結果、対照脳においてはMAP2は主として神経細胞樹状突起に局在していた。これに対して、軽度衝撃を7回繰り返した後の脳組織では衝撃部位に抗MAP2抗体で染色される神経細胞胞体が認められた。ニューロフィラメント（NF）抗体による染色では、対照脳については脱リン酸化NFは細胞体・神経突起に、リン酸化NFは軸索に局在していた。これに対して、軽度衝撃の反復によりNFの胞体内の集積が認められた。リン酸化NFに対する抗体は細胞体・樹状突起を強く染色し、その染色は脱リン酸化NFに対する抗体によるものよりも強かった。また抗タウ抗体でも胞体内にリン酸化タウの集積が認められた。この反復衝撃によるリン酸化NFの胞体内集積は1ヶ月後には1週間後と比較してさらに広範な領域に観察された。

## 【総括】

①fluid percussion装置を用いた実験系において、閾値以下の単回衝撃により急性期蛋白の発現が惹起されることを示した。

②閾値以下の軽度衝撃反復負荷により行動異常が惹起されることを示した。

③軽度衝撃の反復負荷によりMAP2やニューロフィラメントの胞体内への集積が惹起され、神経細胞胞体内に集積するニューロフィラメントはリン酸化されていることを示した。

④このような軽微な頭部衝撃の繰り返しにより惹起される細胞骨格蛋白の異常は、アルツハイマー病の病理過程と共通する部分があり、この実験系は、神経細胞の変性・脱落機序の解明に有用であることを示した。

## 論文審査の結果の要旨

アルツハイマー病の危険因子として頭部外傷の既往が知られている。本研究は、頭部外傷により惹起される脳障害の機序を検討するために、頭部衝撃を定量的に負荷する動物実験系を作成し、この実験系を用いて軽微な頭部衝撃の反復負荷による動物行動の変化と脳内細胞骨格蛋白の変化について検討したものである。

動物行動については、単回負荷では変化を来さない程度の軽微な衝撃でも繰り返して負荷すると動物の探索運動の減衰が認められなくなることを示した。また、神経病理学的検討によりこのような行動障害を呈した動物脳内ではマイクロチュブル付随蛋白であるMAP2の胞体内への集積、過剰にリン酸化されたニューロフィラメントの胞体内集積が惹起されていることを示した。ニューロフィラメントの胞体内集積は神経細胞の変性を反映するものであり、この動物モデル系は機械的障害による神経細胞変性過程を示しているものと考えられる。

本研究は、これまで明らかにされていなかった軽微な頭部外傷により惹起される細胞骨格蛋白の異常を明らかにした点で意義があり、また、この動物モデル系は広く神経細胞の変性・脱落機序の検討に有用であることを示した点も大きな貢献である。よって、学位を授与するに値するものと判断する。