The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Real-time PCR quantitation of FE65 a β-amyloid precursor protein binding protein after traumatic brain injury in rats
Author(s)	飯野, 守男
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45264
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【5】

氏　　名	飯　野　守　男（いいの　もりお）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１８０３２　号
学位授与年月日	平成 15 年 5 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科社会医学専攻
学　位　論　文　名	Real-time PCR quantitation or FE65 a β-amyloid precursor protein binding protein after traumatic brain injury in rats （ラット脳損傷におけるβアミロイド前駆蛋白の結合蛋白 FE65 のリアルタイム PCR 法を用いた定量）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　的場　梁次 （副査） 教　授　吉峰　俊樹　　教　授　遠山　正弥

論　文　内　容　の　要　旨

（目的）

法医学実務における頭部外傷事例で、外力と死亡との因果関係との証明が困難な事例に関して、びまん性軸索損傷（diffuse axonal injury、DAI）の概念が注目されている。βアミロイド前駆蛋白（β-amyloid precursor protein、β-APP）はアルツハイマー病患者の脳において発現していることはよく知られているが、DAI 症例においても発現しており、DAI の診断マーカーとして用いられている。β-APP の結合蛋白の一つである FE65 は、アルツハイマー病患者では発現しているが、頭部外傷との関係はこれまで報告されていない。また神経特異性エノラーゼ（neuron-specific enolase、NSE）も腫瘍マーカーとしてだけでなく、DAI の有用なマーカーであるという報告がある。現在 DAI の診断に用いられている免疫組織化学的手法では、受傷後約 1.5 時間の生存時間を必要とするが、法医解剖においては、生存時間が短時間の事例が多く、より早期に発現する診断マーカーの確立が求められている。本研究では、リアルタイム PCR 法を用いて、FE65 mRNA と NSE mRNA が、より早期の DAI 診断マーカーに成りうるかどうかをリアルタイム PCR 法を用いて検討した。

（方法ならびに成績）

SD ラット（オス、体重 500-650g、n＝38）を用いて、対照群（control 群および sham operation 群）と頭部外傷群（0.5、1、3、6、12、24、48 時間の 7 群）に分け、後者には、頭部外傷作成装置を用いて DAI を作成した。方法は、全身麻酔下のラットの頭蓋骨を露出し、頭蓋骨骨折防止のため 10 円硬貨を頭頂部に接着。スポンジ上に伏臥位で固定した後、1.5 メートル上方から 500 グラムのおもりを自由落下させ、衝撃を 1 回与えた。衝撃後、頭皮を縫合し、外傷後各時間経過後、脳を取り出し、組織観察及びリアルタイム PCR 法により、FE65 および NSE の mRNA をリアルタイム PCR 法を用いて定量した。組織染色には、軸索の損傷に適した Bodian 染色を用いた。リアルタイム PCR 法には、衝撃部位直下の灰白質・白質、海馬、脳梁の組織を使用した。プライマーおよび TaqMan プローブのデザインにはソフトウェア Primer Express 1.5 を使用し、分析には ABI PRISM 7700 Sequence Detector を使用した。

Bodian 染色では、外傷後 6 時間までは組織学的に変化を認めなかったが、12 時間以上経過した各群において、DAI に特徴的な軸索腫脹、retraction ball などの像を観察できた。

FE65 mRNA を用いたリアルタイム PCR 法では、外傷後 0.5 時間で mRNA の有意な増加を示し、1 時間でピークとなった。その後は徐々に減少した。

NSE mRNA 発現量は外傷後 48 時間まで有意な変化を認めなかった。

（総括）

現在用いられている DAI 診断マーカーは免疫組織化学的手法を用いたものがほとんどであり、診断には受傷後数時間の生存時間を必要とするため、法医学分野における早期死亡例への応用が困難であった。今回リアルタイム PCR 法を用いて測定した、FE65 mRNA は、外傷後 0.5 時間で発現していたおり、これまで知られているマーカーよりも早期に発現していることが分かった。このことから、FE65 は DAI の早期診断マーカーに成りうる可能性が示唆された。またリアルタイム PCR 法が頭部外傷研究へ応用可能であることも確認された。

今後は頭部外傷への FE65 の関わりを研究するとともに、動物実験モデルだけでなく、法医剖検例にも応用し、本研究の成果を確認したい。

論文審査の結果の要旨

法医学実務における頭部外傷事例で、外力と死亡との因果関係との証明が困難な事例に関して、びまん性軸索損傷（diffuse axonal injury、DAI）の概念が注目されている。βアミロイド前駆蛋白（β-APP）はアルツハイマー病患者の脳において発現していることはよく知られているが、DAI 症例においても発現しており、DAI の診断マーカーとして用いられている。β-APP の結合蛋白である FE65 はアルツハイマー病患者では発現しているが、頭部外傷との関係はこれまで報告されていない。また神経特異性エノラーゼ（NSE）も DAI の有用なマーカーであるという報告がある。現在 DAI の診断に用いられている免疫組織化学的手法では受傷後約 1.5 時間の生存時間を必要とするが、法医解剖においては生存時間が短時間の事例が多いため、より早期に発現する診断マーカーの確立が求められている。本研究ではこれまで報告されているラット頭部外傷モデルを改良し、DAI を作成した。DAI の組織学的変化は Bodian 染色を用いて確認した。灰白質、白質、脳梁、海馬を含む組織から total RNA を抽出し FE65 mRNA と NSE mRNA の発現量を測定した。mRNA 量測定にはリアルタイム PCR 法を用いた。その結果、NSE mRNA は有意な変化を示さなかったが、FE65 mRNA は、頭部外傷後 0.5 時間で有意な増加を示し、1 時間でピークとなった。その後は徐々に減少し、control レベルに戻った。つまり他の診断マーカーで必要とされてきた 1.5 時間より早期に FE65 mRNA が発現することを示した。このことから、FE65 は DAI の早期診断マーカーに成りうる可能性が示唆された。この結果は、頭部外傷を遺伝子レベルで早期診断できることを意味し、法医解剖における頭部外傷診断において画期的な診断方法となる可能性を示唆する。また本研究は頭部外傷の診断にリアルタイム PCR 法を用いた最初の報告である。以上の研究成果により、本研究は学位に値すると考える。