

Title	A novel chronic dural port platform for continuous collection of cerebrospinal fluid and intrathecal drug delivery in free-moving mice
Author(s)	中嶋, 恒男
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/91764
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	中 嶋 恒 男
論文題名 Title	A novel chronic dural port platform for continuous collection of cerebrospinal fluid and intrathecal drug delivery in free-moving mice (自由行動下におけるマウス髄液持続回収と薬剤髄腔内投与のための新規プラットフォーム)
論文内容の要旨	
<p>〔目的 (Purpose)〕</p> <p>脳脊髄液は中枢神経における生理的および病的変化を直接反映し、脳実質の侵襲を伴わずに採取可能な生体液サンプルであることから、バイオマーカーや疾患修飾薬の研究開発に有用である。遺伝子改変技術等によって多くの中枢神経系疾患に対するマウスモデルが作成されており、これらの疾患マウスから得られる髄液の解析は病態解明に有用であると考えられる。しかしながら、マウスでは一度に採取可能な髄液量が少量であること、採取の際に使用する鎮静薬による中枢神経への影響が避けられないこと、採取手技に伴う偶発的な脳損傷から神経障害マーカーが逸脱しまう可能性があること、などの技術的な問題点があり、マウス髄液を用いた研究開発における大きなボトルネックとなっていた。本研究ではこれらの問題を解決するため、覚醒自由行動下で長期間繰り返し髄腔へのアクセスが可能な chronic dural port (CDP) 法を開発することを目的とした。</p>	
<p>〔方法 (Methods)〕</p> <p>3ヶ月齢の野生型マウスの大槽上の髄膜 (atlanto-occipital membrane, ATM) に30G針を用いて微小な髄液回収口をあけ、その部位を覆うように内径0.3mmの回収チューブを密着させ、回収チューブ・ATM・頭蓋骨下縁・環椎を一体としてデンタルセメントを用いて安定的に固定した (chronic dural port, CDP)。固定留置した細径チューブをローラーポンプに接続し、覚醒自由行動下で最長4週間の持続髄液回収を行った。生理的な条件で髄液が回収されていることを確認するため、髄液中の血液混入の有無、電解質組成、マウス活動量、脳組織損傷の評価を行った。血液混入の評価は吸光度測定法によるヘモグロビン量の定量測定と位相差顕微鏡下での赤血球数カウントによって行った。また、主に血中にしか存在しないApoBの髄液中濃度を高感度ELISA法で測定した。髄液の生理的な組成の評価として電解質、アルブミン濃度、ApoE濃度を測定した。マウスの基本活動量と概日リズムを評価するため、12時間毎の明暗リズムをつけた防音箱の中で赤外線センサーを用いた活動量測定を行った。回収チューブ留置による脳組織への物理的損傷の有無を評価するため、髄液持続回収後のマウス脳を摘出し組織学的に解析した。また、糖・乳酸濃度の変化を検出するバイオセンサーを埋め込んだ特殊な回収チューブを作成することで、活動中のマウス髄液中の糖・乳酸の動的変化をリアルタイムでモニタリングした。さらに、CDPを薬剤の髄腔内投与におけるアクセスポートとして利用し、投与されたトレーサーの髄腔内における時空間分布の評価や、自由行動下のマウスにおける中枢神経作動薬の薬効評価を行った。</p>	
<p>〔成績 (Results)〕</p> <p>覚醒自由行動下のマウスから髄液を持続的に回収するためのCDP法を確立した。CDP法を用いることで、4週間以上の長期にわたって安定的に単一個体のマウスから多量の髄液回収が可能であった。回収された髄液の血液混入の程度は従来の単回回収法と比較して有意な差は無く、電解質組成や蛋白濃度は生理的な範囲に保たれていた。CDP法はマウスの基本活動量や行動に有意な影響は与えず、脳組織損傷や炎症反応の亢進も見られなかった。バイオセンサーを用いて髄液中の糖・乳酸濃度の動的変化を1秒毎の高時間分解能で評価可能であった。トレーサーの時空間分布解析から、髄腔投与された薬剤は脳領域により異なる代謝動態を示すことが明らかになった。CDPから中枢神経作動薬の髄腔投与を行い、同時に高時間分解能の活動量測定を行うことで、覚醒マウスにおけるリアルタイムの薬効モニタリングが可能であった。</p>	
<p>〔総括 (Conclusion)〕</p> <p>CDP法は覚醒自由行動下の単一個体マウスから長期にわたって持続的な髄液回収を可能にした。高品質の髄液を大量に回収することが可能であり、バイオマーカー研究に資する貴重なリソースを提供すると考えられる。またCDP法は髄腔内投与におけるアクセスポートとしても機能し、覚醒自由行動下マウスにおける中枢神経作動薬の薬効評価が可能であった。本法は中枢神経疾患マウスモデルと組み合わせることで、バイオマーカー探索や、疾患修飾薬の研究開発に有用なプラットフォームとなると考えられる。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		中嶋 恒男	
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	梁 木 宏 実 署名
	副 査	大阪大学教授	池 田 孝 署名
	副 査	大阪大学教授	望 月 秀 樹 署名
論文審査の結果の要旨			
<p>脳脊髄液は中枢神経の病理変化を反映するため、バイオマーカーや疾患修飾薬の開発に有用である。しかしマウスでは採取可能な髄液が少量であることや、脳損傷による神経障害マーカーの逸脱の問題から髄液の詳細な解析は困難であった。このため、自由行動下で長期間繰り返し髄腔へのアクセス可能なchronic dural port (CDP)法を開発することを目的とした。野生型マウスの大槽上の髄膜にあけた穴上に細径チューブを独自の手法で固定した。覚醒自由行動下で4週間の持続髄液採取を行い、採取髄液の組成、マウス活動量、脳組織障害、薬物髄腔投与を行った。採取した髄液は血液混入を認めず、電解質、蛋白質の生理的濃度を維持していた。CDPは活動量や組織損傷に影響を与えず、4週間の安定した髄液採取が可能であった。バイオセンサーを用いて髄液中の化学物質の変化を1秒の時間分解能でモニタリング可能であった。髄液トレーサーの時空間分布から脳領域により異なる髄液代謝動態が明らかになった。髄腔投与中のマウス行動評価が可能であった。よび学位授与に値する。</p>			