

博士論文（要約）

論文題目 ラット大脳白質病変モデルの作製とその応用

氏名 小野 秀明

論文の内容の要旨

論文題目 ラット大脳白質病変モデルの作製とその応用

氏名 小野 秀明

【序文】

高齢者の脳における特徴の一つとして大脳白質病変が認められることが挙げられ、この白質病変が脳卒中発症や死亡の増加に相関していること、また認知機能や運動機能の低下、うつ病や認知症など精神疾患の発症とも密接に関連していることが報告され、大脳白質病変の重要性が周知されるようになった。21世紀に入り未曾有の高齢化社会を迎えている我が国にとって、大脳白質病変の病態の解明、治療法の確立は非常に重要である。

これまでの脳神経の研究において、神経細胞体が存在する大脳灰白質の病態が主な対象にされることが多く、大脳白質が注目を集めることが少なかった。この原因の一つとして、実験動物モデルとしてよく用いられるラットなど齧歯類の白質が極めて少なく、これに選択的に病変を作製することが困難であることが挙げられる。安定して再現性高く、ラット大脳白質病変モデルを作製することができれば、今後の大脳白質病変の病態解明、治療法確立への研究に役立つものと考えられる。

中高年発症うつ病患者において、頭部画像にて大脳白質病変や一見症状を呈さない潜在性脳梗塞が多いことが報告されている。大脳白質病変を有するうつ病も、内因性うつ病と同様に抑うつ気分や興味の喪失などの症状により診断されるが、臨床的に認知障害や判断力の低下が認められ、また抗うつ薬への反応性が不良であることも知られており、この病態や特徴に応じた治療法が必要である。これまでに大脳白質病変に着目したうつ病動物モデルは報告されておらず、もしこのモデルが開発されると、その病態解明や客観的な診断法確立、さらには治療法の開発のため基礎研究が進み、今後高齢化社会において増えるであろうと予想される中高年うつ病対策として社会に貢献できるものと考えられる。

【目的】

本実験では、強力な血管収縮作用を持つエンドセリン-1 (ET-1) を用いて安定してラット大脳白質病変モデルを作製し、このモデルを多角的に評価することを目的とした。続いて、このラットモデルを応用し、大脳白質病変を有する、中高年発症うつ病モデルの開発を試みた。

【方法と結果】

雄性 Sprague Dawley ラット 9 週齢を用い、ET-1 を白質である内包に定位的に注入した。術後の死亡率が高かったため、針の穿刺する角度を 20 度、25 度、30 度と変え生存率を調べ、また 20 度と 30 度にて色素を注入し ET-1 の注入部位を確認した。20 度では生存率が 14%であったが、30 度の時には 100%生存した。20 度での穿刺時には色素が脳室内に入っており、30 度の時には脳室から離れていた。この結果を受け、以後は針の穿刺角度を 30 度とした。

続いて組織病理学的評価を行った。白質病変作製後 3、24 時間後、1、2、3 週間後の脳切片を作製し、Kluver-Barrera (KB) 染色にて髄鞘の変化を、アミロイド前駆蛋白 (Amyloid precursor protein; APP)、ED1、グリア繊維性酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein; GFAP) の免疫染色にてそれぞれ、軸索損傷、炎症反応、グリア瘢痕を評価した。すると ET-1 注入後 3 時間の早期から軸索の損傷、髄鞘の障害が確認され、1 週間から 3 週間には ED1 抗体陽性細胞が白質障害部位に出現・集簇を認め、2 週からは GFAP 免疫染色陽性細胞が病変の周囲の領域に認められた。また、白質病変の体積を測定したところ、平均 1.83 mm³であった。

このラットモデルの神経学的症状を ladder test を行い評価したところ、白質病変を作製した左側と逆である、患側である右脚の機能が手術後 1 日の時点で低下したが、術後 3 日の時点では回復を認め、その後も明らかな運動機能の低下は認めなかった。また、健側である左脚に関しては、手術後明らかな運動機能の低下を認めなかった。

今回作製した内包の白質病変により、傷害された軸索を有する神経細胞体が脳内のどの部位に存在するのかを明らかにする目的で、逆行性神経トレーサーである Fluoro-Gold (FG) を用いて評価した。白質病変作製 1 週間後に同じ病変部位に FG を注入し 5 日後の脳切片で評価したところ、FG は運動野などの皮質、基底核や視床に広く分布し、扁桃核や脳幹にも分布した。一方、視床下部、海馬や嗅球には分布しなかった。

続いて、中高年発症うつ病モデルの作製を目指した。両側内包に ET-1 を注入し、ラット両側大脳白質病変モデルを作製した。このラットに対して、手術 2 週間後から、ストレスとして 1 日 2 時間の拘束ストレスを負荷し、多角的評価を行った。動物は白質病変の有無、拘束ストレスの有無により以下の 4 群に分けた；グループ①：白質病変有り・拘束ストレス有り、グループ②：白質病変無し・拘束ストレス有り、グループ③：白質病変有り・拘束ストレス無し、グループ④：白質病変無し・拘束ストレス無し。

手術後 2 週間の時点で、先述と同様に ladder test を行い、運動機能を評価したところ、白質病変の有る群と無い群の間に明らかな運動機能の差は認められなかった。

ストレスをかけ始める前日から、ストレス最終日の翌日までのラットの体重変化を測定した。

体重の増加量は、グループ①が 5.9 ± 13.4 g (平均 \pm 標準偏差、 $n=23$)、グループ②が 23.9 ± 16.6 g ($n=23$)、グループ③が 55.0 ± 16.3 g ($n=23$)、グループ④が 59.8 ± 15.5 g ($n=21$)となり、ストレスが有ることにより体重の増加は鈍化し、また白質病変があることによりさらに体重変化が減少する結果となった。

ストレス前日、ストレス 7 日目、13 日目のコルチコステロン濃度は以下のようになった；グループ① (ストレス前日 123.3 ± 84.3 、ストレス 7 日目 168.2 ± 92.5 、ストレス 13 日目 160.9 ± 97.0 ($n=21$ 、平均 \pm 標準偏差、単位は ng/ml))、グループ② (106.1 ± 62.0 、 168.3 ± 79.0 、 117.2 ± 69.6 ($n=12$))、グループ③ (144.4 ± 60.7 、 90.2 ± 35.8 、 88.1 ± 82.3 ($n=9$))、グループ④ (54.4 ± 30.4 、 74.4 ± 42.5 、 59.9 ± 46.4 ($n=8$))。7 日目にておいてグループ①と④の間、②と④の間において有意差を認め、13 日目においてグループ①と④の間にて有意差を認めた。

次に拘束ストレス最終日の翌日に各種行動試験を行った。強制水泳試験において、グループ①の無動時間が 369.6 ± 73.8 秒 ($n=23$ 、平均 \pm 標準偏差) であり、グループ④が 259.9 ± 92.8 秒 ($n=11$) であることと比較して有意な延長を認めた。オープンフィールド試験では、グループ②の自発運動量が、グループ③と④のものより有意に減少した。中央探索時間に関しては有意差を認めなかった。ショ糖嗜好性試験では、ストレス前とストレス最終日で 1%スクロース溶液を飲む割合を比較したが、有意差を認めなかった。

また、グループ①とグループ④の一部に抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) であるエスシタロプラムを、ストレス期間中に 2 mg/kg/日投与したところ、グループ①に SSRI を投与した群において、体重増加が 38.6 ± 13.3 g ($n=10$) となり、グループ①との間に有意差を認めた。強制水泳無動時間に関しては著変なかった。

【考察】

大脳白質病変は神経基礎研究だけでなく、臨床的な側面からもその重要性が認識され、動物モデルの必要性も高まっている。本研究において、ET-1 を用いた大脳白質である内包を障害するラットモデルを安定して作製するためには、ET-1 を脳室に入らないように角度をつけて穿刺することが重要であることが明らかとなった。また、本モデルで作製された大脳白質病変は、手術後早期から軸索損傷、脱髄、炎症反応、グリア瘢痕と起こっており、ラクナ梗塞に近似する病態を示すと言える。神経学的には白質病変作製 1 日後の時点で患側である右脚の運動機能の低下を認めたが、術 3 日後には改善した。また、運動野などの皮質、基底核や視床など広範囲にある神経細胞からの軸索が内包病変を通っていることが示された。以上からは、本実験の動物モデルは術後数日から、一見症状が無いように見えるが大脳白質病変を有するモデル、と捉えることができる。

中高年発症のうつ病患者において大脳白質病変が認められることが多いことに着目し、大脳白質病変を作製したラットに拘束ストレスを加えることにより、ラット中高年発症うつ病モデルの作製を試みた。本実験においては、白質病変を作製し、拘束ストレスを与えると、体重増加の鈍化と、強制水泳無動時間の延長という結果が得られた。また、SSRIを投与することにより体重増加の鈍化は回復したが、無動時間は著変なかった。これらから、白質病変とストレスによりうつ様症状を部分的に反映すると考えられる行動変化を引き起こすこと、またSSRIに対する反応性から、一般的な内因性うつ病とは違った、血管障害に起因するうつ病の病態を反映していると考えることができ、中高年うつ病の一側面を呈するモデルとして位置づけられると考えられる。

【結論】

本研究は、ラット大脳白質病変モデルを作製しその評価を多角的に行い、このモデルを応用し中高年発症うつ病モデルの開発を試みた。本研究の知見は、大脳白質病変の病態解明、治療法確立、また大脳白質病変が関係するうつ病などの高次脳機能に関連する病態の研究に役立つ可能性があり、高齢化社会を迎える日本の医療に貢献することが期待される。