

令和元年 9月

藏田洋文 学位論文審査要旨

主 査 藤 井 潤
副主査 前 垣 義 弘
同 森 徹 自

主論文

Developing a mouse model of acute encephalopathy using low-dose lipopolysaccharide injection and hyperthermia treatment

(低用量リポポリサッカライド注射と温熱処置を用いた急性脳症モデルマウスの開発)

(著者：藏田洋文、齋藤健吾、川島史祥、池成拓哉、大栗聖由、齋藤義朗、前垣義弘、森徹自)

令和元年 Experimental Biology and Medicine 244巻 743頁～751頁

参考論文

1. Characterization of SPATA5-related encephalopathy in early childhood

(幼児期におけるSPATA5関連脳症の特徴)

(著者：藏田洋文、寺嶋宙、中島光子、岡崎哲也、松村渉、大野光洋、齋藤義朗、前垣義弘、久保田雅也、難波栄二、才津浩智、松本直通、加藤光広)

平成28年 Clinical Genetics 90巻 437頁～444頁

2. Neurodevelopmental disorders in children with macrocephaly: a prevalence study and PTEN gene analysis

(大頭症の小児における神経発達障害：有病率調査とPTEN遺伝子解析)

(著者：藏田洋文、白井謙太郎、齋藤義朗、岡崎哲也、大野光洋、大栗聖由、足立香織、難波栄二、前垣義弘)

平成30年 Brain and Development 40巻 36頁～41頁

学位論文要旨

Developing a mouse model of acute encephalopathy using low-dose lipopolysaccharide injection and hyperthermia treatment

(低用量リポポリサッカライド注射と温熱処置を用いた急性脳症モデルマウスの開発)

急性脳症は、特に日本の乳幼児に症例が多く、種々の感染症に併発し、急性期には発熱、痙攣重積、意識障害や高い死亡率を示すことがあるが、治療法は確立されていない。急性脳症の病態は、興奮毒性が主体とされるものや、サイトカインストームを主な病態とするものなどが推定されている。サイトカインストームを主な病態とする急性脳症は予後不良であり、代表的な病型として急性壊死性脳症 (ANE) や出血性ショック脳症症候群 (HSES) が挙げられ、30~50%と死亡率が高い。ANE剖検脳の報告では、血液脳関門 (BBB) 破綻による血管原生浮腫を認めている。過去には急性脳症モデル動物作成の試みが報告されているが、技術的問題やヒトの症状との類似性の問題から汎用されていない。急性脳症の研究が遅れている主要な原因の一つは、良いモデル動物が存在しないことである。動物実験では、幼若マウスへの低用量のLipopolysaccharide (LPS) 投与、または、温熱処置 (HT) により炎症性サイトカイン産生が誘導されることは既に報告されている。また、幼若動物にHTを加えることで熱性けいれんを誘発する方法は、熱性けいれんモデル動物の作成方法として汎用されている。本研究では、幼若動物への低用量LPS投与とHTによる炎症性サイトカイン産生、および痙攣を誘発することで、特に予後不良とされるサイトカインストームを主な病態とする急性脳症モデル動物を作出し、モデル動物としての妥当性を検討した。

方法

本研究では、8日齢のICRマウスに低用量の大腸菌由来LPS (50 μ g/kg、100 μ g/kg) を腹腔内投与し、2時間後にヒーターを用いて加温することで痙攣を誘発した。加温による高体温は、直腸温を0.5 $^{\circ}$ C/2 minで上昇させ、39 $^{\circ}$ C以上を30分間維持した。痙攣の出現、または、直腸温41.5 $^{\circ}$ Cを確認した時点でHTを一時中断した。脳組織の血管原生浮腫、BBB破綻と神経細胞死の検証のため、HTの6時間後にFluorescein isothiocyanate (FITC、蛍光色素) を使用して灌流固定を行った。FITCはアルカリ条件下で固定可能であることが知られている。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS、pH 7.0) で脱血した後にFITCを溶解したPBS (pH 7.0) で灌流した。その後、再度PBS (pH 7.0) で余剰FITCを洗浄し、4% paraformaldehyde/PBS (pH 8.0)

で還流固定した。コントロール(CTL、PBS投与のみ)、HTのみ(HT only)、LPS100 μ g/kg(LPS100 only)、LPS 50 μ g/kg + HT(LPS50 + HT)、LPS100 μ g/kg + HT(LPS100 + HT)の5群に分け、脳組織の組織学的検討を行った。免疫組織化学的解析では、一次抗体は抗GFAP抗体、抗Iba1抗体、抗NeuN抗体、抗活性化Caspase-3抗体、抗CD31抗体を使用し、一次抗体は蛍光標識二次抗体で検出した。

結 果

BBB破綻を示唆するFITCの血管外漏出面積を画像処理ソフトウェアにより組織学的に定量した結果、LPS100 + HT群の脳皮質におけるFITC陽性領域は、CTL群に比して有意に増加していた。LPS100 + HT群の皮質では、Iba1陽性ミクログリアにおいて典型的な活性化状態の形態を示した。また、GFAP陽性アストロサイトも典型的な反応性アストロサイトの形態を示し、一部のアストロサイトにおいて突起破壊(clasmatodendrosis)を示していた。脳皮質において突起破壊を示すアストロサイトを共焦点顕微鏡により観察した結果、ミクログリアによる貪食を示唆する像がみられた。さらに、主に脳皮質において、境界が明瞭なFITC不染の領域が散見された。この領域の内部では、CD31陽性血管内皮細胞が存在し、ヘマトキシリン・エオジン染色で核の濃縮像や細胞質の好酸性の増強がみられたが、アポトーシスを示唆する活性化Caspase-3陽性細胞の有意な増加は認めなかった。さらに、ニューロンにおけるNeuN(ニューロンのマーカー)の免疫染色性は減弱していた。

考 察

幼若マウスに低用量LPS投与とHTを行うことで、BBB破綻(FITCの血管外漏出)、ミクログリアの活性化、アストロサイトのclasmatodendrosisを示す所見を認めた。また、脳虚血とそれに伴う細胞の壊死を示唆するFITC不染の領域を認めた。これらの組織所見は、サイトカインストームを主な病態とするANEやHSESで報告されているヒトの脳組織所見に類似した所見である。

結 論

本研究では簡便な方法により、サイトカインストームを主な病態とする急性脳症モデル動物を作出した。本モデル動物は、急性脳症の病態解明と治療法の開発に寄与すると期待される。