

氏 名 澤 井 ちひろ

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博 士 (論) 第 3 6 2 号

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 授 与 年 月 日 平 成 2 1 年 3 月 2 5 日

学 位 論 文 題 目 Experimental Neuronal Migration Disorders Following the Administration of Ibotenate in Hamsters: The Role of the Subventricular Zone in the Development of Cortical Dysplasia

(ハムスターにおけるイボテン酸接種による実験的神経細胞移動障害：皮質形成異常における脳室下帯の役割)

審 査 委 員

主 査 教 授 遠 山 育 夫

副 査 教 授 松 末 吉 隆

副 査 教 授 野 崎 和 彦

論文内容要旨

※整理番号	366	氏名	澤井 ちひろ
学位論文題目	<p>Experimental Neuronal Migration Disorders Following the Administration of Ibotenate in Hamsters: The Role of the Subventricular Zone in the Development of Cortical Dysplasia</p> <p>(ハムスターにおけるイボテン酸接種による実験的神経細胞移動障害 皮質形成異常における脳室下帯の役割)</p>		
<p>【研究の目的】</p> <p>グルタミン酸は脳の興奮性神経伝達物質で、発達期の脳において神経細胞突起の成長やシナプス形成に関与するが、グルタミン酸受容体の過剰な活性化は神経細胞傷害や細胞死をもたらす。イボテン酸は NMDA 受容体のアゴニストであり、実験動物への脳内接種により皮質の陥入や結節状の異所性灰白質などヒトの皮質形成異常に類似した脳病変を惹起する。脳室下帯は脳室帯に隣接し、脳室帯に次ぐ第2の細胞増殖帯で、一部の領域では出生から成人期にかけても神経幹細胞または前駆細胞が維持されていることが証明されている。しかし発達期の脳における脳室下帯の役割については不明な点が多い。本研究においては、皮質形成異常の発生過程における脳室下帯の役割を明らかにするため、イボテン酸をハムスターに接種した皮質形成異常の実験モデルを作成し、Biotinylated dextran amine (BDA) をトレーサーとして脳室下帯の神経細胞を標識し、その移動を評価するとともに、皮質形成異常の発生過程における細胞死の関与を検索した。</p> <p>【実験方法】</p> <p>以下に示す本研究の全ての手技は、滋賀医科大学動物生命科学研究センターの承認を得て実施した。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 雌雄ハムスターを交配させ、妊娠ハムスターを作成。 2) 生後0日目の新生仔ハムスターに、低体温麻酔下にマイクロシリンジを用いて右大脳皮質内に 1μg (1μL)のイボテン酸を、引き続いて右大脳基底核原基に BDA の 0.05μg (1μL) を経皮的に接種した。同様の手法でリン酸緩衝液を接種したものを対照群とした。 3) 接種後 1, 3, 5, 7, 10 日目の計 72 検体を、ジエチルエーテル吸入麻酔下に経心的に灌流して脳を摘出し、パラホルムアルデヒドで固定した。この後 20μm 凍結切片および 5μm パラフィン包埋切片を作成し、ヘマトキシリン染色にて病理組織学的検索を行った。 4) 細胞死の評価のため、Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP-Biotin End Labeling (TUNEL) 法および Bcl-2 陽性細胞を、また、基底核原基由来の BDA 標識細胞の経時的分布を免疫組織化学染色にて検索した。陽性細胞数は顕微鏡視野にて算定し、<i>t</i>-検定で評価した。 			

- (備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2千字程度でタイプ等で印字すること。
2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

- 1) 皮質形成異常：対照群では皮質構造の変化及び皮質形成異常の病的所見を認めなかった。実験群ではイボテン酸接種部位を中心として皮質の陥入、褶曲した微小脳回および皮質下の異所性灰白質が認められた。海馬や視床、基底核などには病理学的変化及び形態異常を認めなかった。
- 2) TUNEL 法および Bcl-2 免疫組織化学：対照群では TUNEL 陽性細胞は日齢 1 から日齢 5 に確認され、脳室帯とサブプレート周辺に最も多く分布し、経時的に減少した。実験群においては、微小脳回を形成した皮質の褶曲部位周囲に TUNEL 陽性細胞が強く集積し、有意な増加がみられた。皮質下の異所性灰白質は小結節を呈して日齢 3 より形成されはじめ、この灰白質周囲には TUNEL 陽性細胞が散見されたが、細胞数の増加は有意ではなかった。Bcl-2 は実験群において、皮質形成異常を呈した領域に観察された。
- 3) BDA 免疫組織化学：基底核原基への BDA 接種により、対照群では同側の中間帯と脳室帯母細胞および背外側の脳室下帯の細胞とこれらの軸索突起が標識され、一部は前頭頭頂部の皮質へ伸長する陽性線維が観察された。実験群において、微小脳回を形成した皮質領域には対照群で観察された領域に加え、皮質層構造の褶曲部位周囲に標識細胞が集積し、これら BDA 標識細胞数は対照群に比し有意に増加していた。異所性灰白質の形成領域には、BDA 標識細胞数に有意差を認めなかった。

【考察】**(1) 神経細胞死と神経細胞移動障害**

TUNEL 陽性細胞は実験群においては微小脳回の形成部位に有意に増加し、同時に Bcl-2 陽性細胞も検出されたが、異所性灰白質の周辺領域には TUNEL 陽性細胞の増加は認められなかった。イボテン酸によるカルシウム依存性の神経細胞死とこれに引き続く神経細胞の移動障害は、異所性灰白質より微小脳回の形成により関与することが推測された。

(2) 微小脳回の形成における接線方向の細胞移動

BDA により標識された基底核原基の神経細胞は、接線方向の細胞移動の後に、微小脳回を形成した皮質の褶曲部位に集積していたが、異所性灰白質の周辺部位には有意な細胞数の増加はみられなかった。皮質形成異常の発生過程における大脳基底核原基に由来する神経細胞は、異所性灰白質よりも異常脳回の形成過程においてより重要な役割を有することが推測された。

(3) 皮質形成異常における脳室下帯の役割

基底核原基の脳室下帯は脳室帯に接して位置する細胞増殖帯であるが、この領域に由来する一部の細胞は微小脳回の皮質形成に寄与していた。これはイボテン酸による皮質障害を契機として生じた、脳室下帯からの細胞動員によって生じたものと推測された。

【結論】

興奮性の神経細胞障害により惹起される微小脳回の形成過程には、脳室下帯を構成する細胞の障害部位への動員が重要な役割を有するものと推察された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	366	氏名	澤井 ちひろ
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>本論文は、ハムスターにおけるイボテン酸接種による実験的神経細胞移動障害モデルにおける皮質形成異常と脳室下帯の役割を形態学的に検討したものである。その結果、</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 生後 0 日の新生仔ハムスターの大腦皮質にイボテン酸を接種すると、微小脳回および異所性灰白質を生じた。 2) TUNEL 法の結果、生後 1 日の微小脳回で陽性細胞数の増加が認められたが、異所性灰白質では、対照群との間に差は認めなかった。 3) ビオチン化デキストラアミン (BDA) で標識した脳室下帯由来細胞の数は、微小脳回の皮質板と中間帯で、有意に増加していた。 <p>これらの結果は、微小脳回の形成に脳室下帯由来の細胞動員が関与していることを示しており、この分野での貢献度は大きい。よって、博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認められる。</p> <p style="text-align: right;">(平成 21 年 2 月 4 日)</p>			