

学 位 論 文 要 旨

氏名 富田 凧

題 目 : Pathological study on the mechanism of brain damage after
experimental transient hypoglycemic coma
(一過性の低血糖性昏睡誘発後に生じる脳傷害のメカニズムに関する病理学的研究)

糖尿病患者において、インスリン製剤等による血糖管理の過誤により一過性に低血糖性昏睡状態に陥ることは少なくない。また糖尿病患者の世界的な増加により、低血糖の発生は今後も増加する可能性がある。今回、インスリン投与により一過性の低血糖性昏睡を誘発したラットの脳に生じる神経細胞傷害、グリア細胞反応などの病理組織学的特徴を明らかにすることにより、低血糖性脳傷害の発生メカニズムの一端を解明することを目的とし、以下の研究を行った。

◆第1章 低血糖性昏睡後のグリア細胞反応に関する研究

【背景】ミクログリアによる過剰な炎症反応が複数の疾患の病理発生に寄与することが報告されている。低血糖性脳傷害においても、モデル動物への抗炎症剤の投与によりミクログリア活性化の抑制および神経細胞死の軽減効果が認められている。しかし、重度低血糖後のグリア細胞の動態は不明である。

【目的】一過性低血糖後初期に生じる炎症反応の特徴（ミクログリアの形態学的変化、サイトカイン発現）を、神経細胞死好発部位である大脳新皮質において明らかにする。

【方法】ラットにインスリンを投与し、低血糖（血糖値<21mg/dl）による昏睡を誘発、15-30分間維持した後グルコースを投与した。処置後3, 6時間, 1, 3, 5, 7, 14日目に安楽死と脳の採取を行い（各群 n=3-8）、大脳の組織学的、免疫組織化学的検索（抗 Iba-1 抗体、抗 neuronal nuclei 抗体、抗 GFAP 抗体使用）、並びに RT-PCR 法による TNF α および IL-6 mRNA 発現の解析に供した。対照として、インスリン投与直後のグルコース投与により正常血糖値を維持した偽低血糖処置ラットを使用した（n=3）。

【結果】新皮質において処置後3時間で神経細胞死が少数見られ、その後増数した。処置後3時間目に Iba-1 陽性桿状ミクログリアが一過性に増加、その後肥大型およびアメーバ状の Iba-1 陽性ミクログリアが増加傾向を示した。一方、新皮質に隣接する帯状回皮質において細胞死およびグリア細胞反応は認められなかった。TNF α mRNA の高発現が処置後3時間目、新皮質および帯状回皮質で一過性に見られた。新皮質では、6時間目においても高発現が持続していた。

【結論】一過性の低血糖性昏睡誘発後のラット大脳新皮質において、低血糖後数時間以内に、神経細胞死が少数であるにも関わらず、proinflammatory cytokine (TNF α) の高発現と桿状ミクログリアの出現を特徴とする炎症、グリア細胞反応が生じていた。今回の結果は、重度低血糖後に生じる脳神経細胞死の発生メカニズムにミクログリアの活性化が関与するという説

を支持するものである。

◆第 2 章 低血糖性昏睡後の大脳白質傷害に関する研究

【背景】重度低血糖を呈するヒト症例において、MRI 拡散強調画像で大脳白質に認められる高信号の分布から予後が推測されることが報告されている。同画像所見は白質水腫を表していると推測されるが、病理組織学的な知見に乏しい。

【目的】一過性低血糖後の大脳白質（軸索およびミエリン）傷害の分布、病理組織学的特徴、およびその継時的変化を明らかにする。

【方法】低血糖性昏睡処置を行ったラットを、処置後 6 時間, 1, 3, 5, 7, 14 日目に安楽死し脳を採取（各群 n= 2-7）、大脳の組織学的検索、免疫組織化学的検索（抗 GFAP 抗体、抗 Iba-1 抗体、抗 myelin basic protein 抗体、抗 neurofilament 200 kDa 抗体、抗 olig-2 抗体使用）を行った。対照には偽低血糖処置ラットを使用した（n= 3）。

【結果および考察】今回検索した大脳白質領域のうち、脳梁、内包、淡蒼球において早期に Iba-1 陽性ミクログリアの浸潤が、続いて GFAP 陽性アストロサイトの増加、細胞内および細胞外水腫（淡蒼球のみ）、軸索の変性、ミエリンの崩壊、olig-2 陽性オリゴデンドログリアの減少が認められた。淡蒼球における水腫は処置後 14 日目まで持続し、血液脳関門の破綻を伴う可能性が示唆された。灰白質では、大脳新皮質、海馬および尾状核被殻に神経細胞死を認めた。白質病変の程度と神経細胞死の程度について関連性は認められなかったことから、低血糖により一次的に白質傷害が生じる可能性が示された。

【結論】一過性の低血糖性昏睡誘発ラットの大脳白質において、神経細胞の軸索変性、ミエリン崩壊、細胞外および細胞内水腫が生じ、低血糖回復後も数週間にわたり白質傷害が持続する可能性がある。

以上の研究より、重度低血糖が脳に与える影響として、これまでに報告されていた神経細胞死に加え、灰白質や白質における速やかなグリア細胞反応、サイトカイン発現の変化、白質の変性、水腫などがあること、さらに、これらの変化が 30 分間という短時間の低血糖性昏睡誘発によって生じうることを示された。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	富田 凧
審査委員	主査：鳥取大学 教授 森田剛仁
	副査：山口大学 教授 森本将弘
	副査：鳥取大学 教授 竹内 崇
	副査：鳥取大学 教授 山野好章
	副査：鳥取大学 准教授 寸田祐嗣
題目	英文 Pathological study on the mechanism of brain damage after experimental transient hypoglycemic coma. 和文 一過性の低血糖性昏睡誘発後に生じる脳傷害のメカニズムに関する病理学的研究

審査結果の要旨：

糖尿病患者数が世界的に増加していることから、インスリン製剤等による血糖値管理の過誤による一過性低血糖性昏睡に陥る頻度は増加傾向にある。いわゆる低血糖性脳症では、大脳新皮質浅層、海馬顆粒層などに神経細胞壊死が好発すること、低血糖性脳症モデル動物への抗炎症剤の投与によるミクログリア活性化の抑制が神経細胞死の軽減効果に関連している可能性があることが報告されている。一方、重度低血糖を呈するヒト症例において、MRI 拡散強調画像で大脳白質に認められる高信号の分布から予後が推測されることが報告されている。

申請者は、一過性の低血糖性昏睡を誘発したラットの脳に生じる神経細胞傷害、グリア細胞反応などの病理組織学的特徴を明らかにすることにより、①低血糖性脳傷害のメカニズムを解明すること、また、②大脳白質の病理組織学的特徴を明らかにすることを目的として、一過性低血糖性昏睡モデルラットの脳について病理学的解析を行った。

第 1 章では、神経細胞死好発部位である大脳新皮質において一過性低血糖後初期に生じる炎症反応の特徴（ミクログリアの形態学的変化、サイトカイン発現など）を明らかにすることを目的として、一過性低血糖性昏睡モデルラットの脳について経時的に、組織学的および免疫組織化学的検索（抗 Iba-1 抗体、抗 neuronal nuclei 抗体、抗 GFAP 抗体使用）、並びに RT-PCR 法による TNF α および IL-6 mRNA 発現の解析を実施した。その結果、大脳新皮質においてインスリン投与後 3 時間で少数の神経細胞死が認められ、その後増数した。インスリン投与後 3 時間で Iba-1 陽性桿状ミクログリアが一過性に増加、その後肥大型およびアムーバ状の Iba-1 陽性ミクログリアの増数が認められた。一方、新皮質に隣接する帯状回皮質（旧皮質）において神経細胞死およびグリア細胞反応は認められなかった。TNF α mRNA の高発現がインスリン

投与後 3 時間目、新皮質および帯状回皮質で一過性に認められた。新皮質では、6 時間目においても $\text{TNF}\alpha$ mRNA の高発現が持続していた。以上の結果より、一過性の低血糖性昏睡誘発後のラット大脳新皮質において、低血糖後数時間以内に、神経細胞死が少数であるにも関わらず、proinflammatory cytokine ($\text{TNF}\alpha$) の高発現の持続、並びに桿状ミクログリアの出現を特徴とする炎症反応が生じることが証明された。重度低血糖後に生じる神経細胞死の発生メカニズムにミクログリアの活性化が深く関与していることが明らかとなった。

重度低血糖を呈するヒト症例において、MRI 拡散強調画像で大脳白質に認められる高信号の分布から予後が推測されることが報告されている。同画像所見は「水腫」を表していると推測されているが、病理組織学的な知見に乏しい。第 2 章では、一過性低血糖後に生じる大脳白質の傷害の程度および分布、並びに病理組織学的特徴を明らかにするために、同モデルラットの脳について経時的に、組織学的および免疫組織化学的検索 (抗 GFAP 抗体、抗 Iba-1 抗体、抗 myelin basic protein 抗体、抗 neurofilament 200 kDa 抗体、抗 olig-2 抗体使用) を実施した。その結果、今回検索した大脳白質領域のうち、脳梁、内包、淡蒼球において早期に Iba-1 陽性ミクログリアの浸潤が、続いて GFAP 陽性アストロサイトの増加、細胞内および細胞外水腫 (淡蒼球のみ)、軸索の変性、ミエリンの崩壊、olig-2 陽性オリゴデンドログリアの減少が認められた。淡蒼球における水腫はインスリン投与後 14 日目まで持続し、血液脳関門の破綻を伴う可能性が示唆された。大脳新皮質、海馬および尾状核被殻において神経細胞死を認めた。白質病変の程度と神経細胞死の程度について関連性は認められなかった。以上の結果より、一過性低血糖性昏睡誘発ラットの脳において、一次的に白質傷害が生じる可能性が示唆された。さらに、白質において、軸索変性、ミエリン崩壊および水腫が生じ、低血糖回復後も数週間にわたり白質傷害が持続する可能性が示唆された。

本研究より、一過性の低血糖が脳に与える影響として、これまでに報告されていた神経細胞死に加え、新皮質や白質におけるミクログリアの速やかな反応、新皮質における $\text{TNF}\alpha$ の高発現の持続、白質の一次的な変性が生じることが示された。今回得られた成績は、一過性の低血糖が脳に与える影響、並びに低血糖性脳症の治療法開発に関する有益な情報となり得る。

以上により本論文は、博士 (獣医学) の学位論文に妥当なものであると判断された。