

ピロカルピン誘発ラットてんかんモデルを用いた 間葉系幹細胞(hMSC)投与効果の評価

○上岡 雅菜, 林田 尚之, 田代 貴士, 片山 誠一, 廣中 直行, 西 勝英

目 的

側頭葉てんかんは、神経細胞の脱落とグリオーシスによる海馬の萎縮を特徴とした海馬硬化を伴う。動物では非選択的なムスカリン受容体作動薬のピロカルピン塩酸塩により側頭葉てんかんが誘発される。本研究では、ピロカルピン誘発ラットてんかんモデルを用いて体重、痙攣の発現頻度および持続時間、海馬領域における神経細胞数を指標に評価することでヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の治療効果を検討した。

方 法

実験 1：ピロカルピン塩酸塩の用量検討

● 使用動物

ラット, Crlj:WI, ♂, 8 週齢 (モデル作製時)

● 実験方法

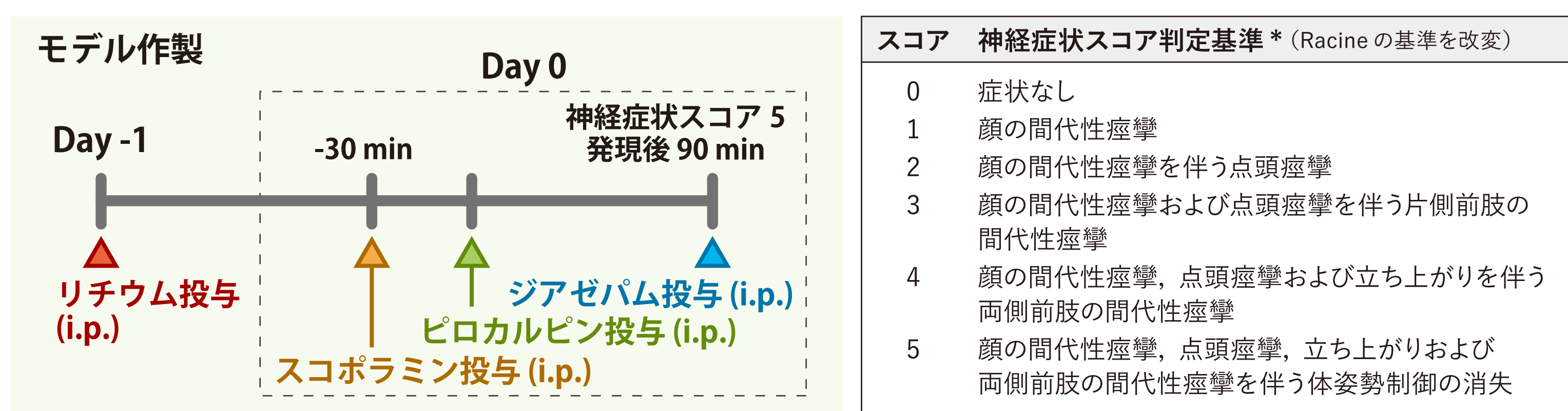
- モデル 1 および 2 群について、ピロカルピン塩酸塩 (以下、ピロカルピン) 投与の 24 時間前に塩化リチウム (以下、リチウム) を 127 mg/kg の用量で腹腔内投与した (Day -1)。
- 翌日, (-) スコポラミンメチルプロミド (以下、スコポラミン) を 1 mg/kg の用量で腹腔内投与し、その 30 分後にピロカルピンを 30 または 60 mg/kg の用量で腹腔内投与してモデルを作製した (Day 0)。
- モデル 3 群は、スコポラミンを 1 mg/kg の用量で腹腔内投与し、その 30 分後にピロカルピンを 330 mg/kg の用量で腹腔内投与した。
- モデル作製後、直ちに神経症状観察用ケージに動物を移し、神経症状スコア判定基準 * に従い神経症状スコアが 5 を呈した動物をてんかんモデルとした。
- てんかんモデルには、神経症状スコア 5 が発現した約 90 分後にジアゼパムを 10 mg/kg の用量で腹腔内投与した。

● 群構成

試験群	リチウム投与量 (mg/kg)	ピロカルピン投与量 (mg/kg)	使用例数 (匹)	生存例数 (匹)
正常	0	0	5	5
モデル 1	127	30	5	2
モデル 2	127	60	5	0
モデル 3	0	330	5	1

この条件を以後の実験に使用

● 実験スケジュール



実験 2：評価法確立実験

● 使用動物

ラット, Crlj:WI, ♂, 8 週齢 (モデル作製時)

● 実験方法

- ピロカルピン塩酸塩 (以下、ピロカルピン) 投与の 24 時間前に塩化リチウム (以下、リチウム) を 127 mg/kg の用量で腹腔内投与した (Day -1)。
- 翌日, (-) スコポラミンメチルプロミド (以下、スコポラミン) を 1 mg/kg の用量で腹腔内投与してモデルを作製した (Day 0)。
- 神経症状スコアが 5 を呈した動物には、神経症状スコア 5 が発現した約 90 分後にジアゼパムを 10 mg/kg の用量で腹腔内投与した。
- Day 1 にヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (以下、hMSC, ロンザジャパンより購入) を 1×10^6 cells/body の用量で静脈内投与した。なお、正常群および媒体対照群には同容量の HBSS を静脈内投与した。
- Day 14, 21 および 28 に 12 時間 (暗期: 19:00 ~ 翌 7:00) の行動をビデオ録画し、録画動画を観察することで痙攣の発現頻度および持続時間を計測した。
- Day 29 に、4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で灌流固定を行った後、全脳を採取した。採取後の全脳について、海馬領域の神経細胞数を評価するため、残存した神経細胞数は抗 NeuN 抗体を用いた蛍光免疫染色標本を用いて計測し、壊死した神経細胞数は HE 染色標本を用いて計測した。

● 群構成

試験群	投与量	投与容量	使用例数 (匹)	採用例数 (匹)
正常	0	1 mL/body	6	6
媒体対照	0	1 mL/body	13	6
hMSC	1×10^6 cells/body	1 mL/body	13	6

● 実験スケジュール



● 評価項目

- 体重: Day 0, 7, 14, 21 および 28
- 痙攣の発現頻度および持続時間: Day 14, 21 および 28
- 海馬領域における神経細胞数

結 果

Fig. 1

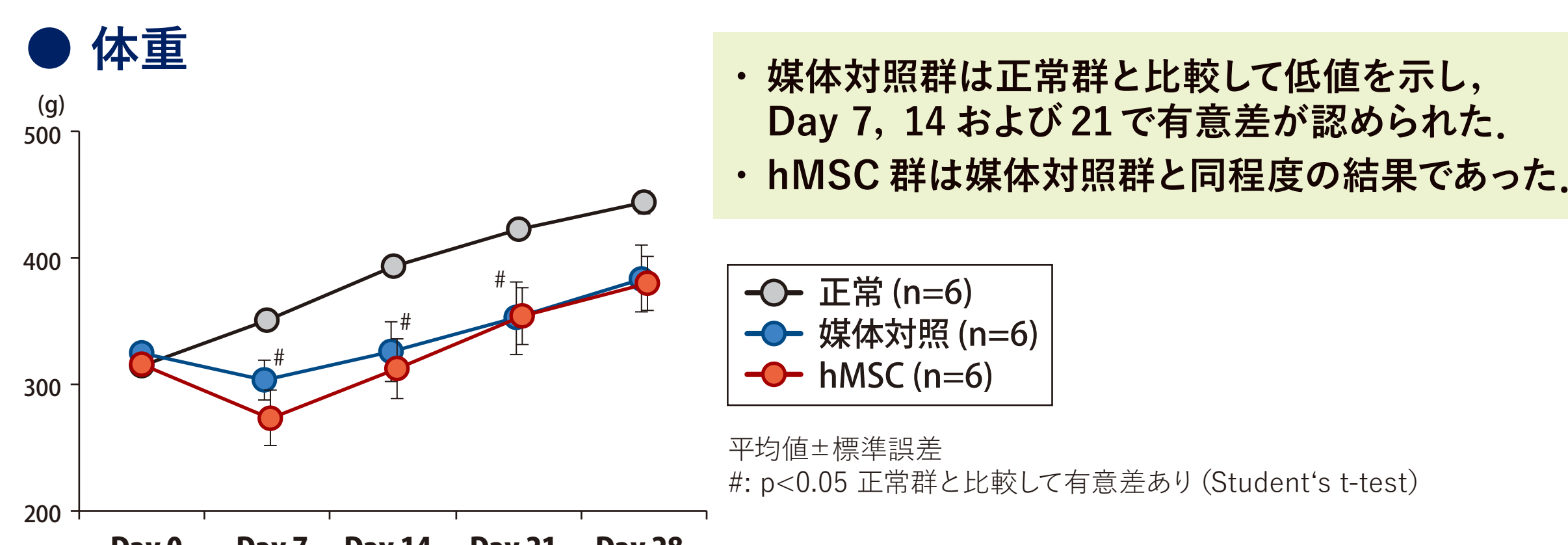


Fig. 2

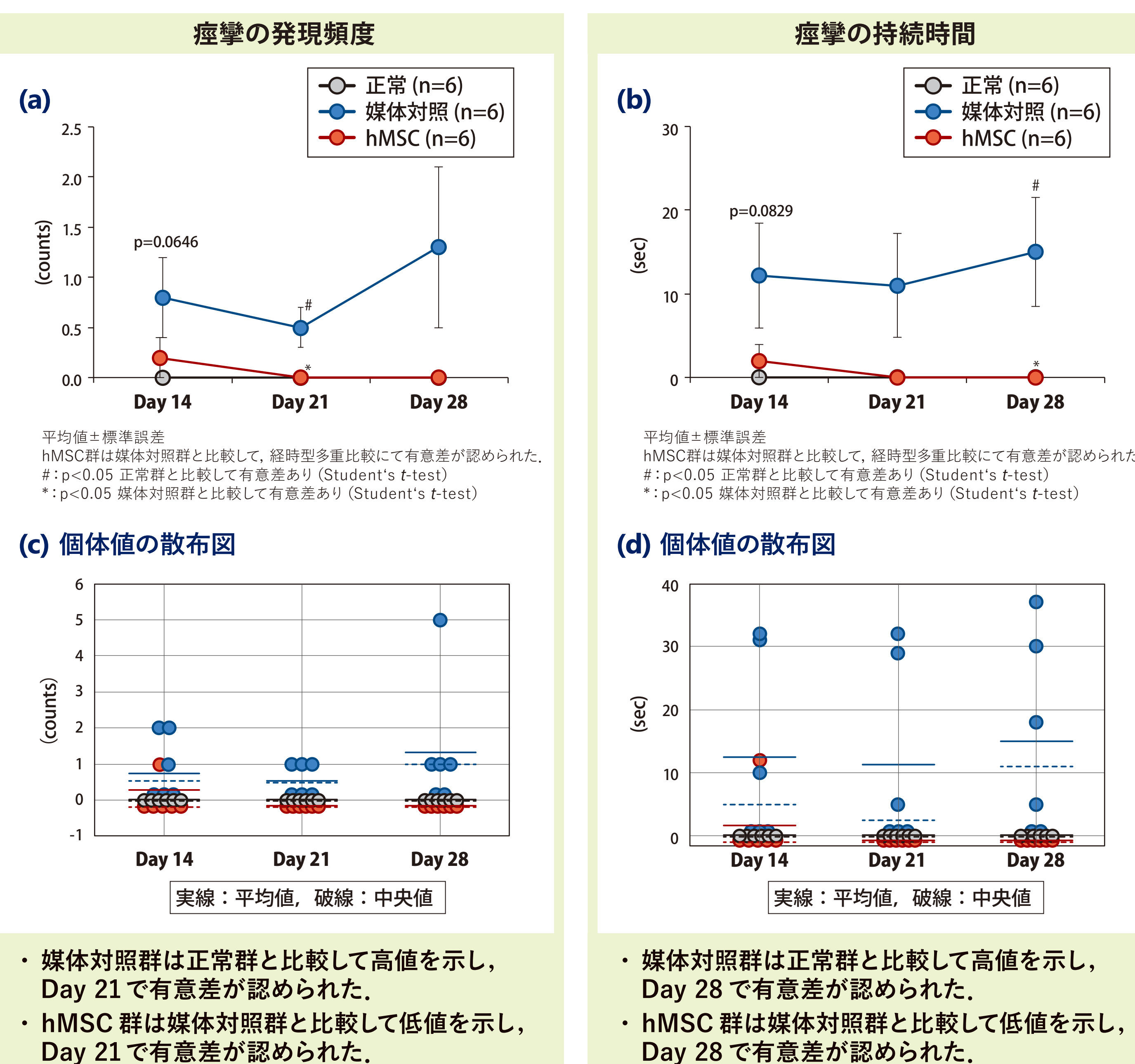


Fig. 3

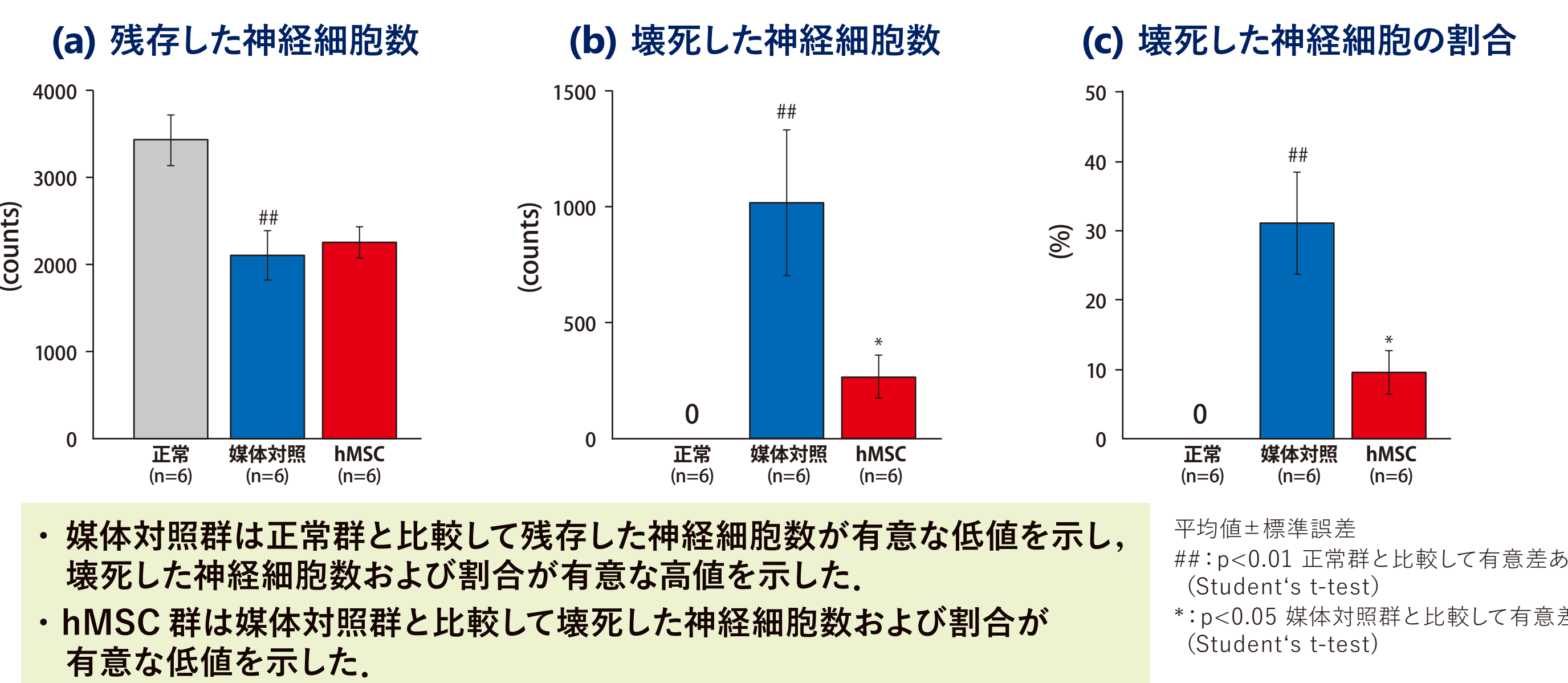
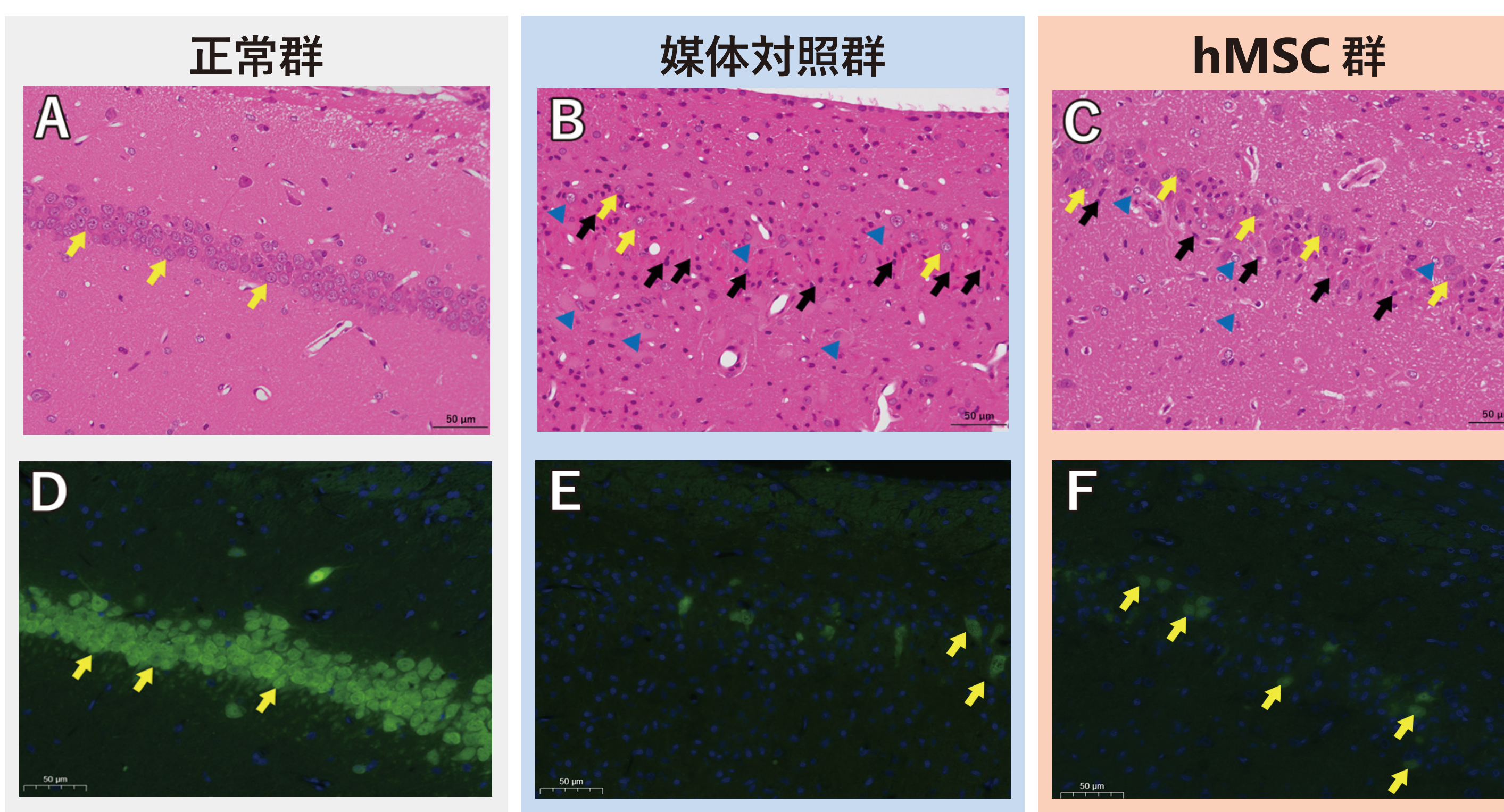


Photo 1



A ~ C: 海馬領域における HE 染色組織像
D ~ F: 海馬領域における抗 NeuN 蛍光免疫染色組織像

媒体対照群では正常群と比較して正常神経細胞が減少し、反応性星状膠細胞が壊死した神経細胞の周囲に認められた。

● 画像解析関連機器



バーチャルスライドスキャナー
(Panoramic 250 FLASH II, 3D HISTECH Ltd.)
画像解析用のデジタル画像取得に使用



HALO (Indica Labs Inc.)
正常神経細胞の計測に使用

まとめ

- 実験 1 [ピロカルピン塩酸塩の用量検討] の結果から、ピロカルピン塩酸塩の投与量を 30 mg/kg とした。
- 実験 2 [評価法確立実験] において、媒体対照群は正常群と比較して体重で有意な低値 (Day 7, 14 および 21) を示し、痙攣の発現頻度 (Day 21) および痙攣の持続時間 (Day 28) で有意な高値を示した [Fig. 1, 2 (a) ~ (d)]。また、海馬領域の神経細胞数においても、残存した神経細胞数は有意な低値を示し、壊死した神経細胞数および割合は有意な高値を示した。さらに壊死した神経細胞の周囲には反応性星状膠細胞も認められたことから、側頭葉てんかんの原因の一つである海馬硬化を本モデルで確認することができた [Fig. 3 (a) ~ (c), Photo 1]。
- hMSC 群では、媒体対照群と比較して痙攣の発現頻度 (Day 21) および痙攣の持続時間 (Day 28) が有意な低値を示したことから、本モデルは hMSC の有効性を評価可能な試験系であることが示された [Fig. 2 (a) ~ (d)]。なお、体重については媒体対照群と同程度の結果であった [Fig. 1]。また、海馬領域の神経細胞数においても、壊死した神経細胞数および割合で有意な低値を示したことから、hMSC は神経細胞の壊死を抑制することが示された [Fig. 3 (a) ~ (c)]。

以上の結果から、ピロカルピン誘発ラットてんかんモデルの評価系を確立することができた。また、hMSC 投与によって、てんかんモデルラットの痙攣の発現や神経細胞の壊死が抑制されたことから、本評価系は hMSC を用いた再生医療研究に有用であることが示唆された。