

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 ファム・ゴ・チェ

犬の壊死性髄膜脳炎は広範な脳実質の壊死をともなう進行性非化膿性の炎症性脳疾患で、若齢の小型犬、とくにパグに好発することからパグ脳炎とも呼ばれている。本症の発症機序は未だ明らかでないが、初期の病理組織学的所見でリンパ球・プラズマ細胞の浸潤が認められ、また脳脊髄液（CSF）中にアストロサイトに対する自己抗体が認められることから自己免疫性疾患の一つと推測されている。一方、神経症状をともなう様々な進行性の脳疾患で、その神経細胞死の原因の一つとして細胞外興奮性アミノ酸、とくにグルタミン酸の増加による神経細胞に対する興奮毒性が上げられている。本論文は、犬の壊死性髄膜脳炎の発症機序について興奮性アミノ酸に着目し、本症を病態生理学的に検討したもので、緒論ならびに総括を除いた以下の2章から構成されている。

第1章では、MRIで壊死性髄膜脳炎と診断した34症例（6ヶ月齢—7歳齢、）から全身麻酔下で大槽穿刺によりCSFを採取し、CSF中の興奮性アミノ酸（グルタミン酸とアスパラギン酸）ならびに抑制性アミノ酸（タウリンと  $\gamma$ -aminobutyric acid: GABA）濃度について検討している。採取した壊死性髄膜脳炎のCSFはすべて高い抗体価のアストロサイトに対する自己抗体を保有していた。壊死性髄膜脳炎CSF中の興奮性アミノ酸であるグルタミン酸ならびにアスパラギン酸濃度（それぞれ  $8.16 \pm 7.8 \mu\text{M}$ 、 $0.87 \pm 0.6 \mu\text{M}$ ；平均 $\pm$ 標準偏差）は健常犬のそれ（それぞれ  $1.40 \pm 0.8 \mu\text{M}$ 、 $0.21 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ）に比較して有意に高い値を示した。一方、抑制性アミノ酸のうちタウリン濃度（ $2.79 \pm 1.7 \mu\text{M}$ ）は健常犬（ $1.81 \pm 0.6 \mu\text{M}$ 、）に比較して有意に高かったが、GABA濃度に差は認められなかった。これらの結果からは、壊死性髄膜脳炎の脳内では興奮性アミノ酸であるグルタミン酸およびアスパラギン酸、ならびに抑制性アミノ酸であるタウリンが増加をしていると考えられた。とくにグルタミン酸の増加は神経細胞に対して興奮毒性を示し、細胞膨化ならびに細胞死を引き起こすことから、これらアミノ酸の増加は壊死性髄膜脳炎に認められる神経細胞死に密接に関係するものと考えられた。

第2章では、第1章で決められたアミノ酸の増加、とくにグルタミン酸増加の機序について、グルタミン酸濃度の恒常性に最も重要な細胞であるアストロサイトに注目し、申請者が開発した *in vitro* モデルを用いて検討している。すなわち、犬胎仔から分離した初代培養アストロサイトを壊死性髄膜脳炎8例から得たCSF（人工的に作成したCSFで50%濃度に希釈）と、24時間培養した後、培養上清中のグルタミン酸、アスパラギン酸、タウリンならびにGABA濃度を測定した。その結果、壊死性髄膜脳炎CSFと培養したアストロサイト培養上清中のグルタミン酸濃度は有意な増加を示した（培養前  $2.37 \pm 2.2 \mu\text{M}$  から培養後  $22.8 \pm 8.7 \mu\text{M}$ ；平均 $\pm$ 標

準偏差)。一方、対照とした健常犬 CSF (培養前  $1.15 \pm 0.13 \mu\text{M}$ 、培養後  $1.21 \pm 0.12 \mu\text{M}$ ) ならびに人工的に作成した CSF (培養前  $0.24 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 、培養後  $0.24 \pm 0.02 \mu\text{M}$ ) との培養では、培養上清中グルタミン酸濃度に変動は認められなかった。また培養後の培養上清中グルタミン酸、アスパラギン酸、タウリン、ならびに GABA の増加量は(それぞれ  $20.4 \pm 9.1 \mu\text{M}$ 、 $0.80 \pm 0.61 \mu\text{M}$ 、 $2.55 \pm 1.6 \mu\text{M}$ 、 $1.05 \pm 0.3 \mu\text{M}$ ) 対照とした健常犬の CSF と培養した際の増加量(それぞれ  $0.16 \pm 0.0 \mu\text{M}$ 、 $0.21 \pm 0.08 \mu\text{M}$ 、 $0.53 \pm 0.0 \mu\text{M}$ 、 $0.28 \pm 0.16 \mu\text{M}$ ) と比較してグルタミン酸、アスパラギン酸、ならびにタウリンで著しく大きく、壊死性髄膜脳炎 CSF 中に含まれる何らかの因子がこれらアミノ酸の増加に関連していると考えられた。次に、壊死性髄膜脳炎 CSF により引き起こされるグルタミン酸増加に及ぼすグルタミン酸輸送担体阻害剤 (L-trans-2,4-pyrrolidine dicarboxylate) による影響を検討した。まず、壊死性髄膜脳炎 CSF の濃度を 0、10、20、50% として培養したところ、培養上清中グルタミン酸濃度は用量依存性に増加することから、この増加は壊死性髄膜脳炎 CSF によるものであることが明らかとなった。さらに、グルタミン酸輸送担体阻害剤の前処置 (30 分間) により、培養上清中グルタミン酸の増加は有意に抑制され、この増加にはグルタミン酸輸送担体が密接に関連していることが明らかとなった。ついで、壊死性髄膜脳炎 CSF と 24 時間培養したアストロサイトにおけるグルタミン酸輸送担体 1 (GLT-1) ならびに グルタミン酸アスパラギン酸輸送担体 (GLAST) mRNA の発現を検討したところ、GLT-1 mRNA の発現の減少を認め、壊死性髄膜脳炎 CSF によるグルタミン酸増加にはグルタミン酸輸送担体、とくに GLT-1 の減少も関与していると推測された。

このように、本論文は未だその発症機序が明らかでない犬の壊死性髄膜脳炎の病態生理学的な検討から、グルタミン酸輸送担体、とくに GLT-1 の mRNA レベルでの減少、ならびにグルタミン酸輸送担体を介したアストロサイトのグルタミン酸取り込み減少あるいは放出増加による脳内グルタミン酸の増加を見だし、壊死性髄膜脳炎の発症機序あるいは病態発現機序の一つはアストロサイトによるグルタミン酸恒常性の破綻であることを明らかにしたものである。その内容は、獣医学の学術上貢献するものであり、よって、審査委員一同は、本論文が博士(獣医学)の学位論文として価値あるものと認めた。