

第36回日本毒性病理学会学術集会 ワークショップ 「毒性病理の最前線」

神経細胞壊死を評価するために 知っておきたいこと

山田 直明

2020年2月13日

(配布資料用の一部改変)

COI（利益相反）

本演題に関連して開示すべき
利益相反はありません。

In connection with the presentation, there is no COI to be described with any companies.

Neuron–Cell Bodyの用語 (goRENI, 2019年)

- Cellularity, decreased, neuron
(Cell loss, neuronal)
- Chromatolysis
- Heterotopia, neuronal
- Necrosis, neuron (neuronal)
- Neuronophagia
- Vacuolation, neuron (neuronal)



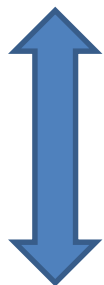
<https://www.goreni.org/>

Common Artifact

- Artifact, dark neuron (Dark neuron artifact)

神経細胞壊死評価時の留意点

- Cellularity, decreased, neuron (神経細胞の消失によるもの)

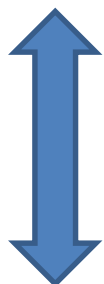


③評価時期(When)

- Necrosis, neuron



①観察部位
(Where)

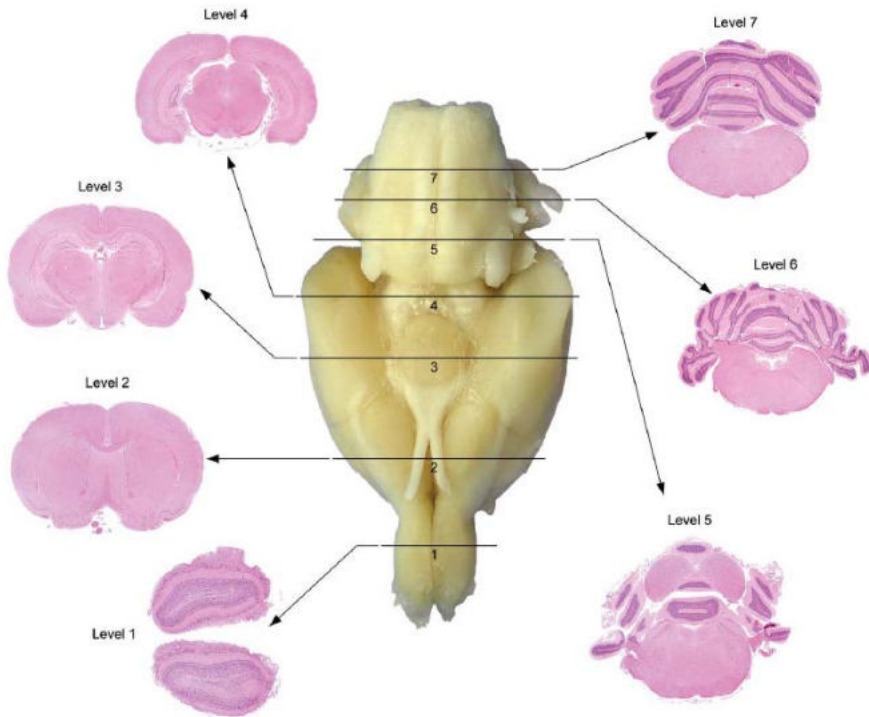


②鑑別方法(How)

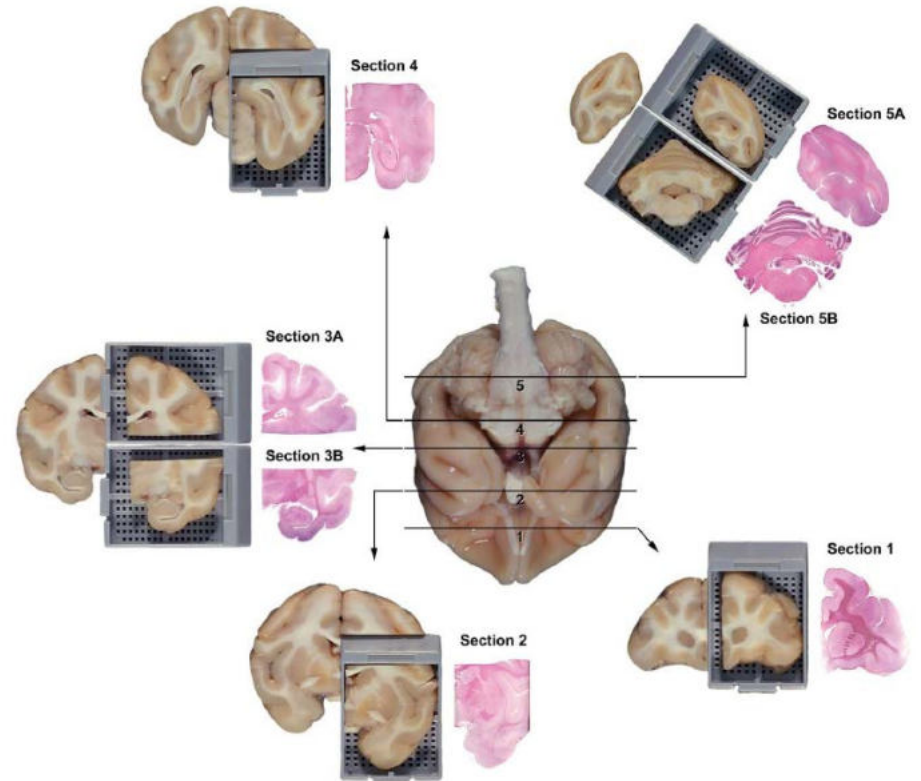
- Artifact, dark neuron (Dark neuron artifact)

観察部位について: STP position paper

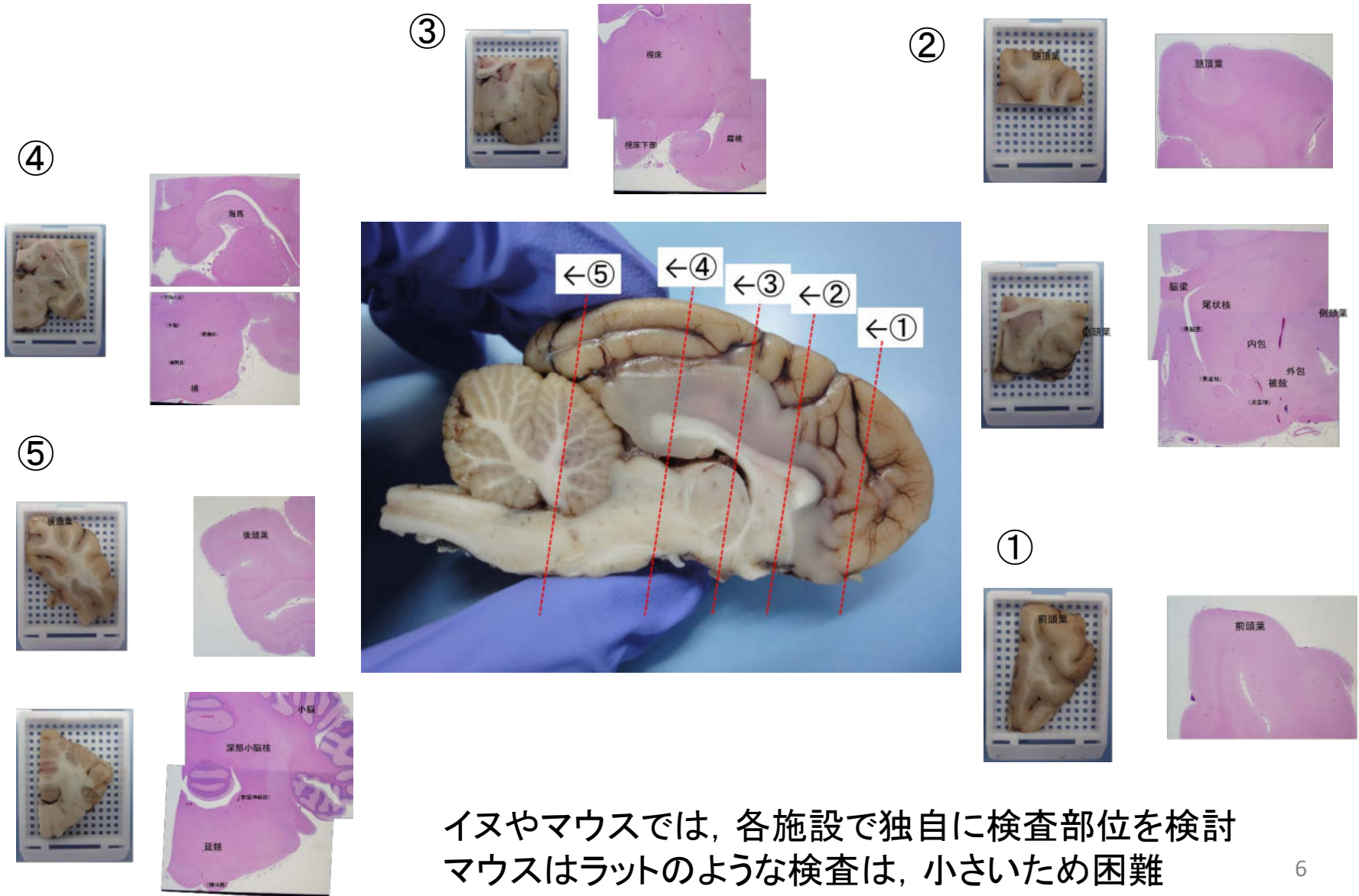
ラット



サル



イヌのSTP position paper準拠



イヌやマウスでは、各施設で独自に検査部位を検討
マウスはラットのような検査は、小さいため困難

Table 4 の記載事項

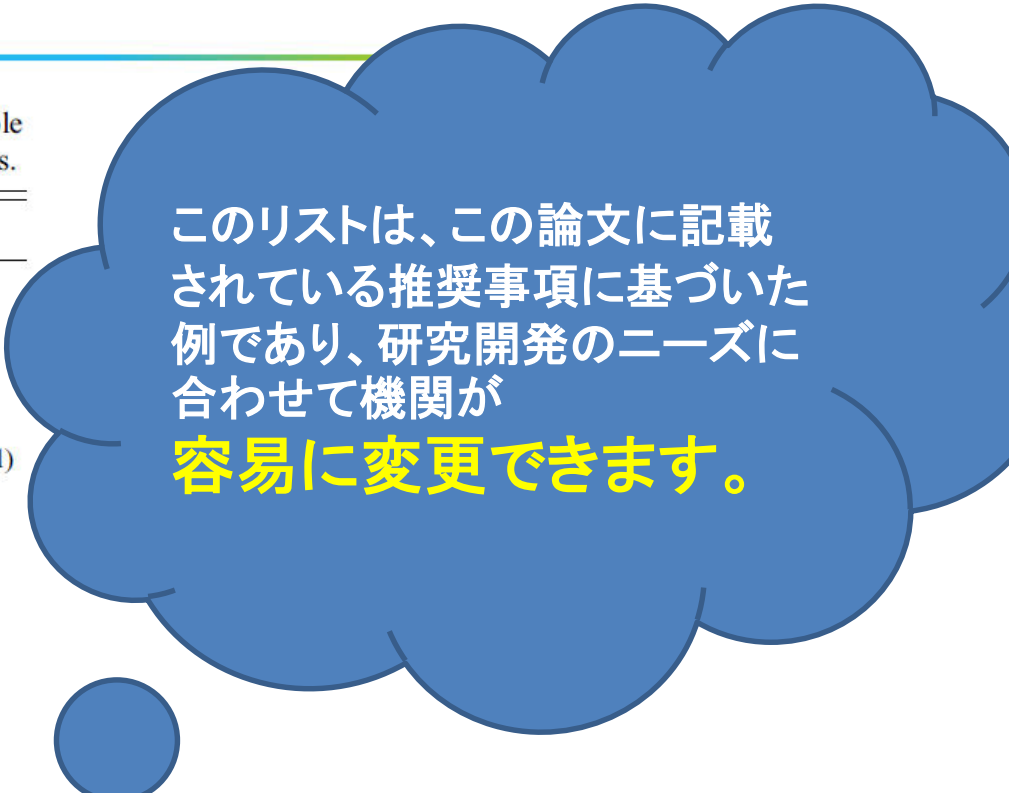
TABLE 4.—Nervous system sampling—an explicit reporting example for use in pathology reports for nonclinical general toxicity studies.

Organ	Region ^a
Brain	Amygdala
	Capsule, external
	Capsule, internal
	Caudate/putamen
	Cerebellum
	Cerebral cortex (frontal, parietal, temporal, and occipital)
	Choroid plexus
	Corpus callosum
	Deep cerebellar nuclei
	Hippocampus
	Hypothalamus
	Medulla oblongata
	Olfactory bulb ^b
	Pons
	Thalamus
	Spinal cord
Lumbar intumescence	
Thoracic segment	
Nerve	Sciatic (unilateral)
Eye/optic nerve	(bilateral)
Gross neural lesions	

Note. Neural regions surveyed in this study are listed by organ, in alphabetical order.

^aThis list is an example based on the recommendations given in this article and could be modified readily by an institution to fit its own research and development needs. All these brain structures are reliably present within the levels defined in Figures 1 and 2, and as such can be assured of evaluation without specific documentation.

^bThis structure is generally sampled only in general toxicology studies using rodents (removed with the brain in noninhalation studies, but sampled *in situ* with the adjacent caudal nasal cavity in inhalation studies).



あくまでも例示であり、フレキシブルに考える



なぜ検査部位を画一化できないのか？

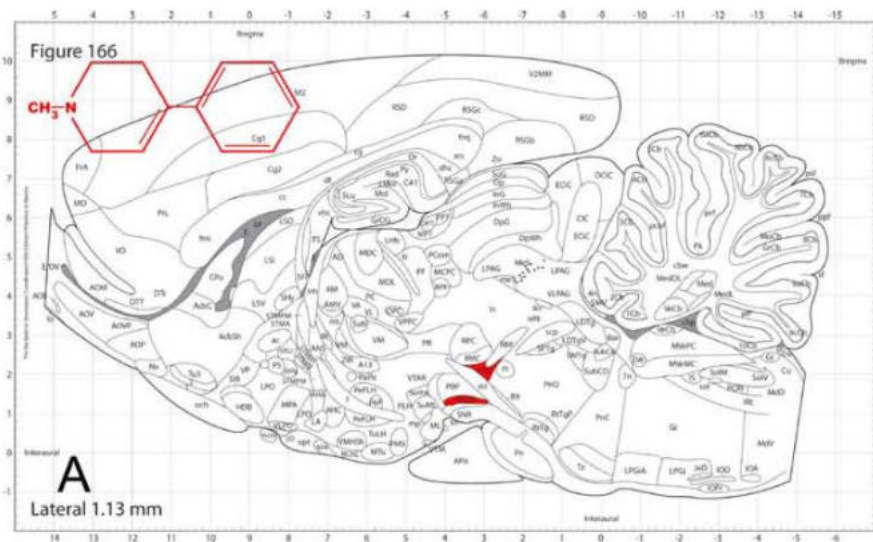


領域特異性があるから！！

Bolon B, et al.
Toxicol Pathol. 2013;41(7):1028-48.

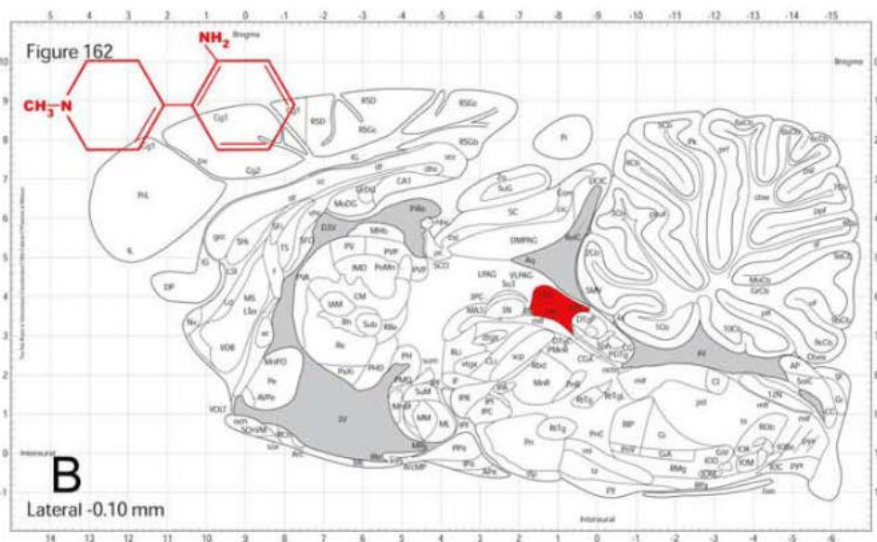
神経毒性物質の領域特異性の例

MPTP



Dopaminergic system

2'-amino-MPTP

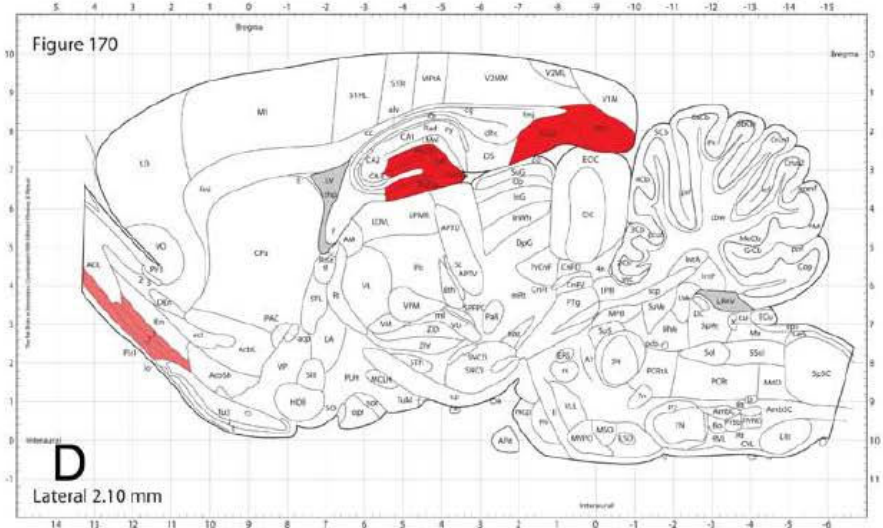
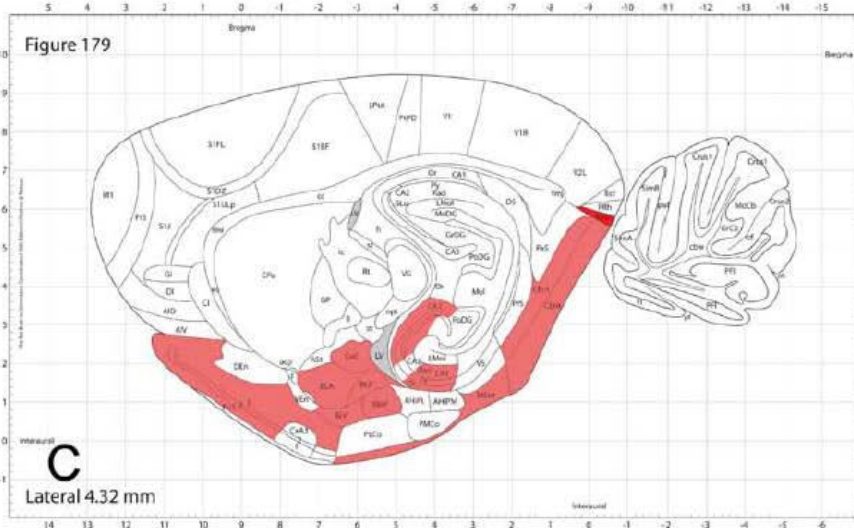
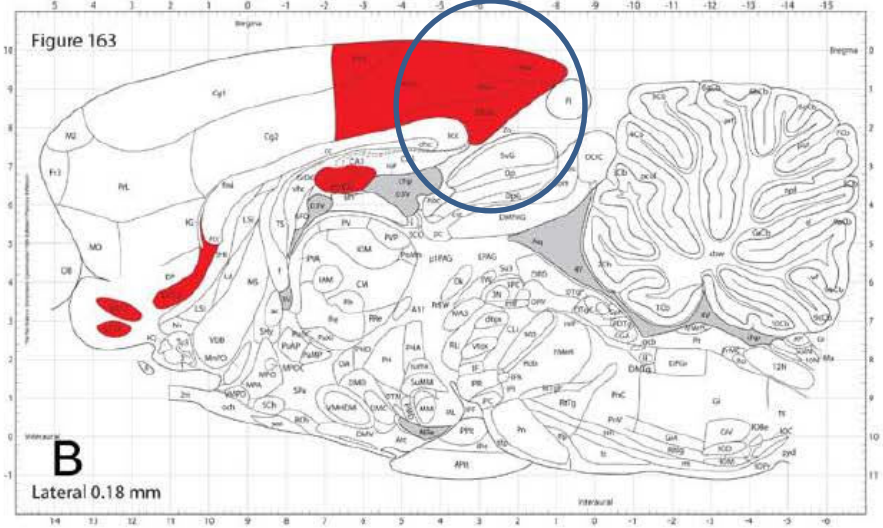
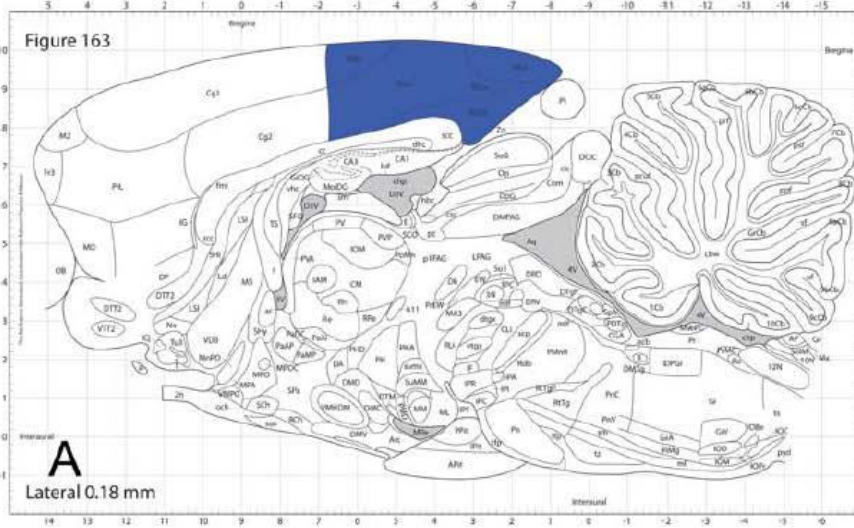


Serotonergic system

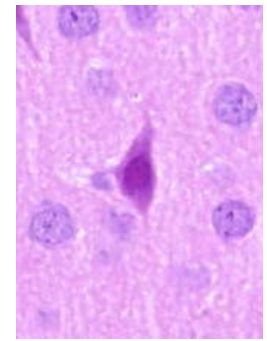
構造が少し違うだけで、影響を受ける部位が全く異なる

MK-801の領域特異性

今回の発表では、この部位を評価
しています



DARK NEURON ARTIFACTとの鑑別



類義語：

Basophilic neurons; Dark 'spiky' nerve cells;
Neuronal hyperchromatosis.

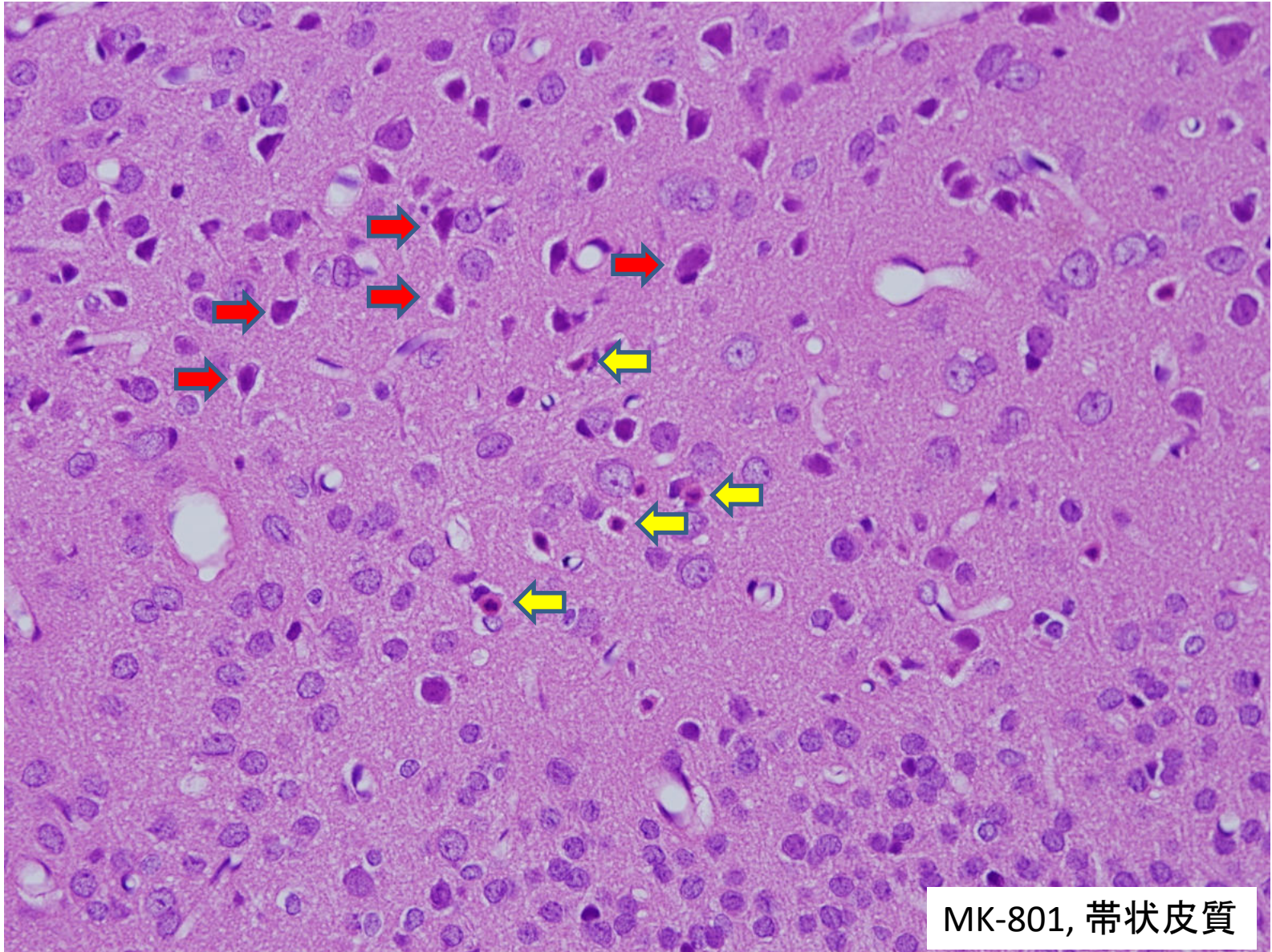
一方，神経細胞壊死は...

- 暗く濃い核と明るい好酸性の細胞質を有する¹
- グリアの反応が見られる¹
- 壊死像に時間的バリエーションがみられる²
- 毒性変化であれば領域特異性があることも指標。

1. Kaufmann W, et al. Toxicol Pathol. 2012. 40(4 Suppl):87S-157S.

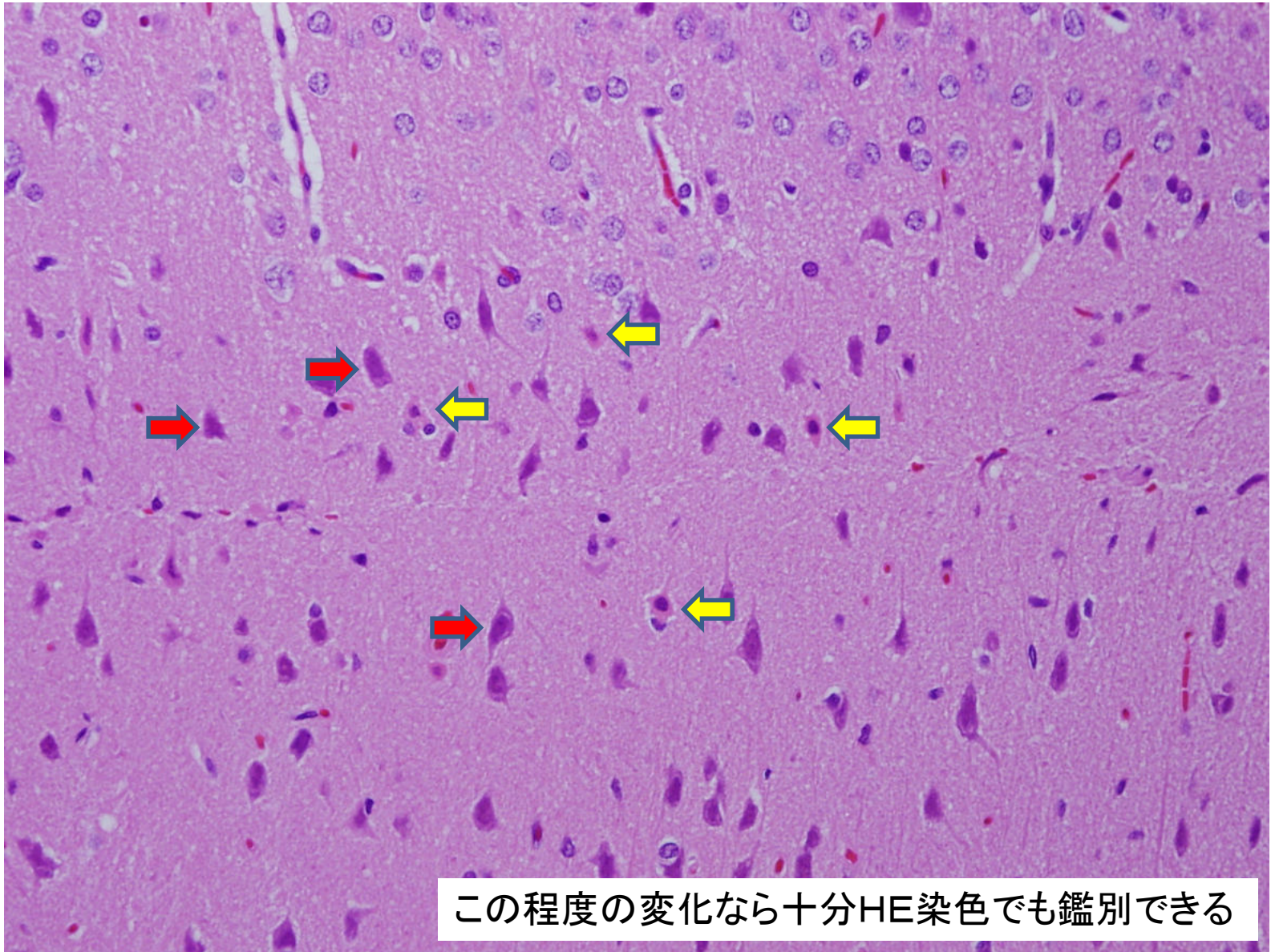
2. SWITZER III RC, et al. Toxicol Pathol. 39: 73-84, 2011

DARK NEURON ARTIFACT (→) と Necrosis (←)



MK-801, 带状皮質

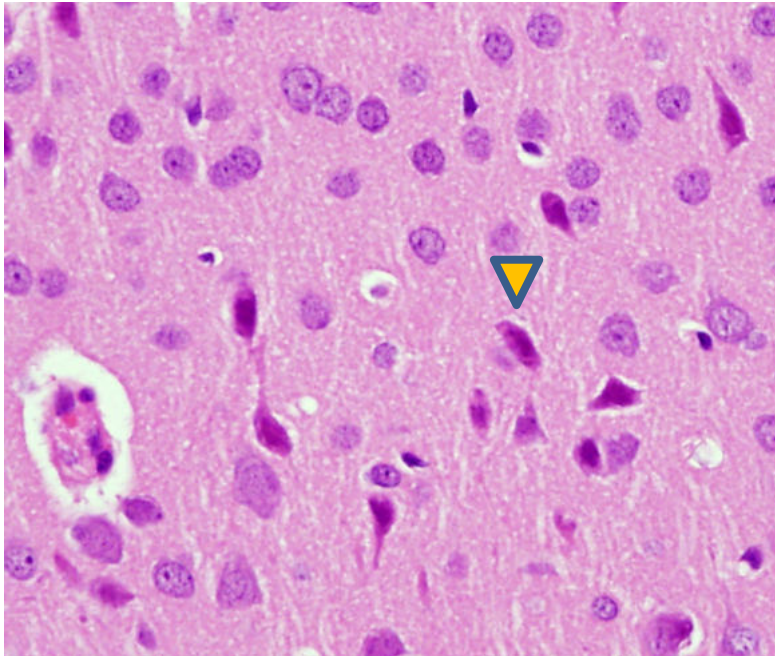
DARK NEURON ARTIFACT (→) と Necrosis (←)



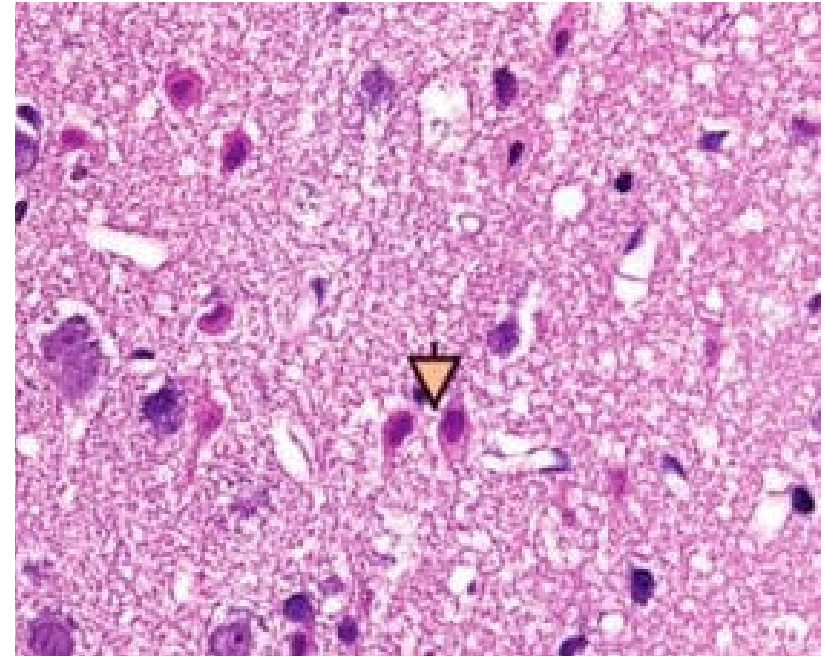
この程度の変化なら十分HE染色でも鑑別できる

微妙な例はどうしたらよいか？

アーティファクト



カイニン酸による神経細胞壊死



Pritt ML. et al., Toxicol Sci. 2014 . 141: 398–408.

When neuronal necrosis is subtle, the thoroughness of evaluation can be greatly enhanced **by the use of a stain that is specific for this change.**

特殊染色を使う！！

Toxicologic Pathology Nonclinical Safety Assessment.
In: Sahota PS, et al. editors. CRC Press. 2013. P909.

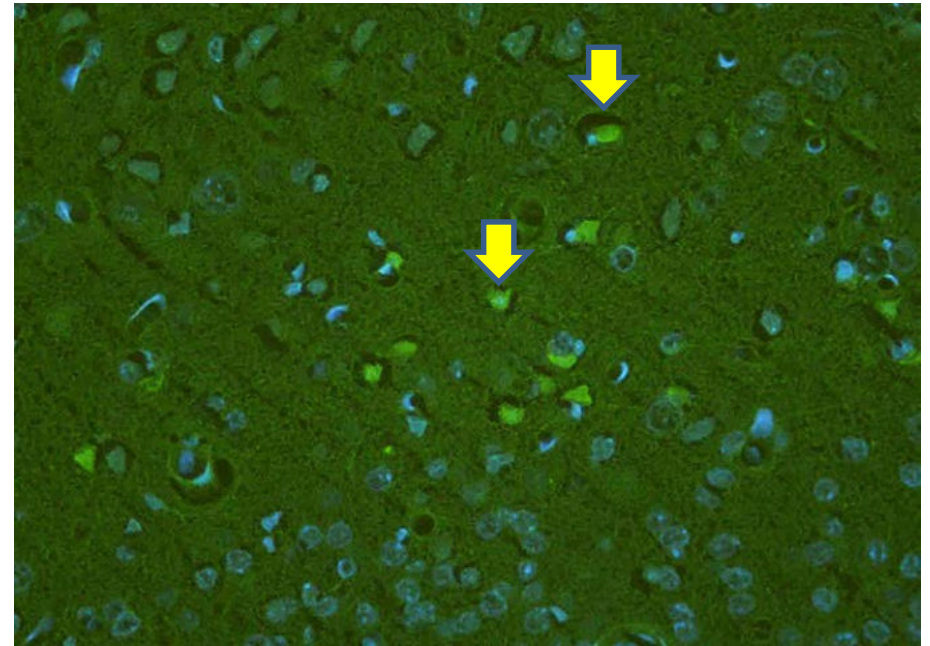
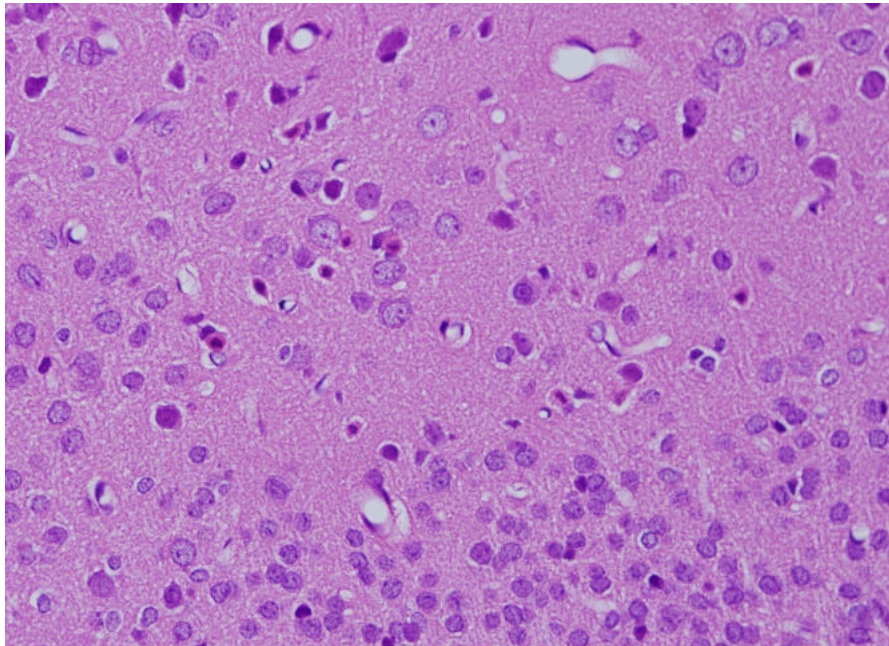
Fluoro-Jade C について



染色手技は極めて簡単
ただし試薬の値段は高い...



Fluoro-Jade C の染色例



緑色に光るのでわかりやすい！！
Dark neuron artifactは染まらない！！

Fluoro-Jade Stainで染色されるもの

- カイニン酸受容体興奮毒性: カイニン酸, ドウモイ酸
- 酸化了的フリーラジカル: 鉄やマンガン化合物
- NMDA受容体拮抗作用: MK-801, フェンサイクリジン
- 下オリーブ核活性化興奮毒性: イボガイン
- ミトコンドリア障害: MPTP



神経細胞が死ぬメカニズムに関係なくラベリングされるが、未知のメカニズムによる神経細胞死への親和性については検討が必要

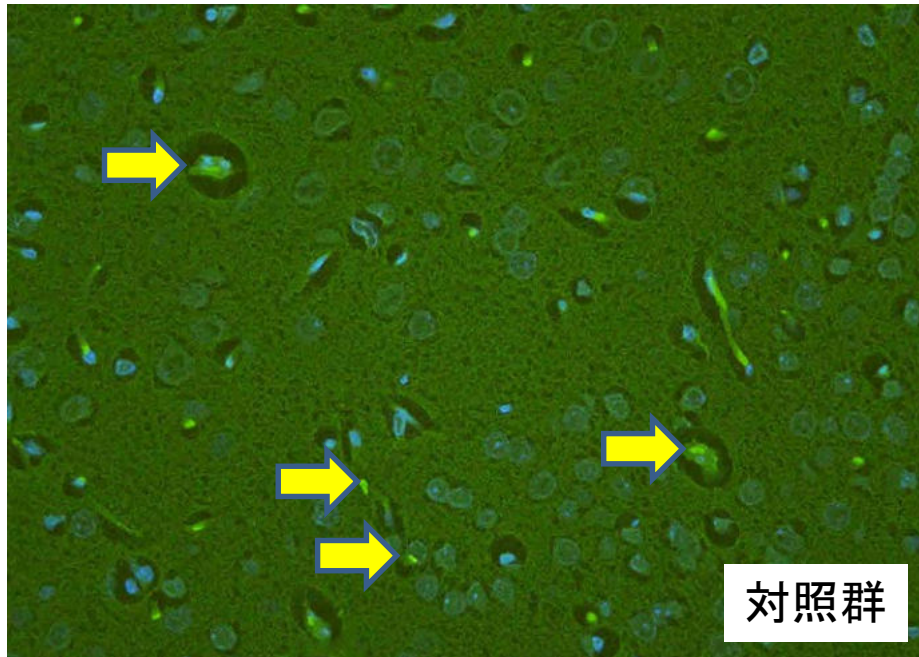
変性細胞のポリアミンに結合(?)

Schmued LC, et al. Brain Res. 1997 Mar 14;751(1):37-46.

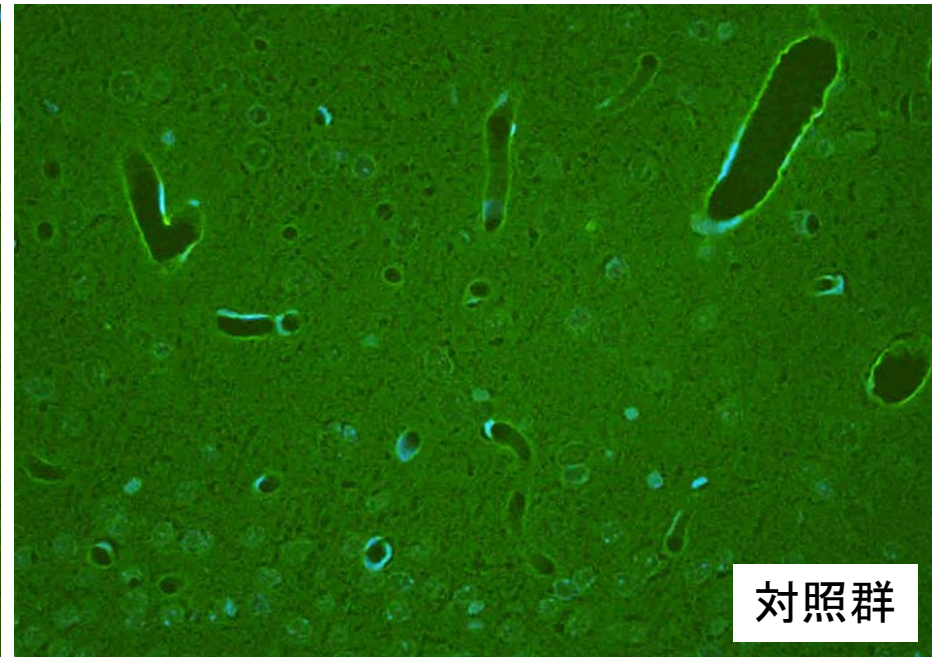
Schmued LC, et al. Brain Res. 2005 Feb 21;1035(1):24-31.

FJ染色の灌流固定の必要性

浸漬固定



灌流固定

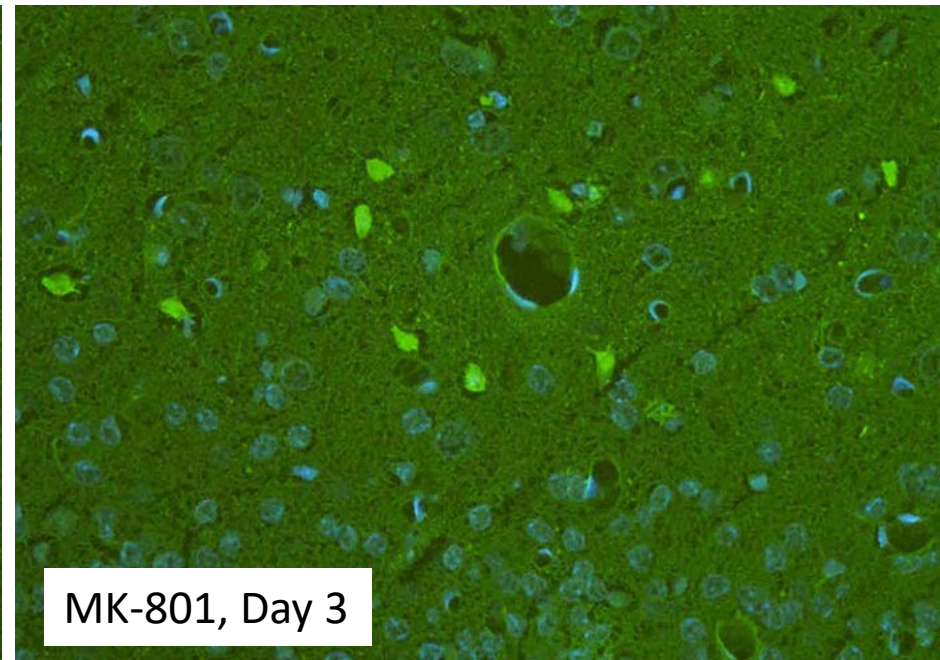
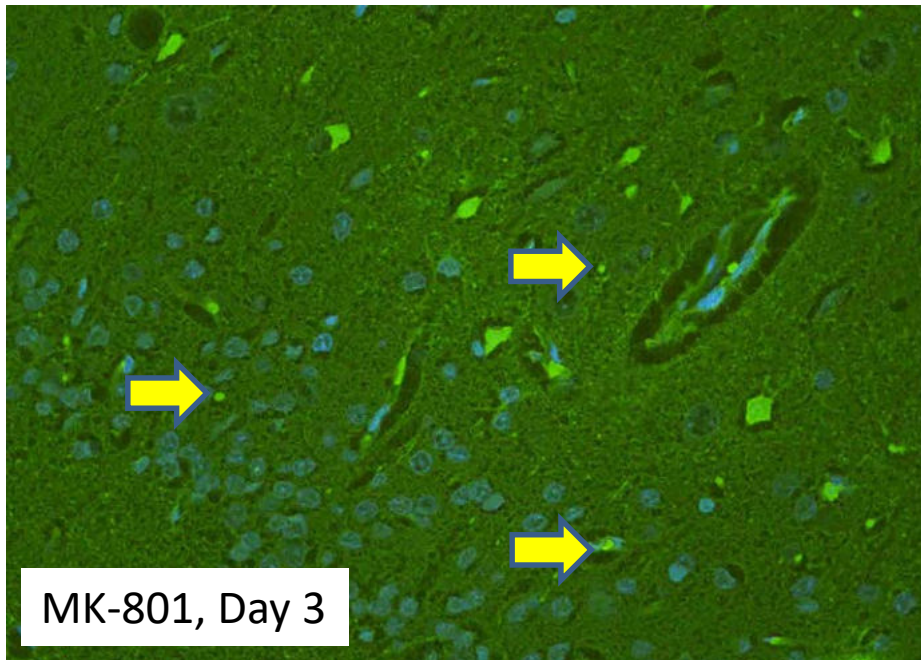


赤血球が染色されるため
神経細胞と判別が困難なことがある

FJ染色の灌流固定の必要性

浸漬固定

灌流固定

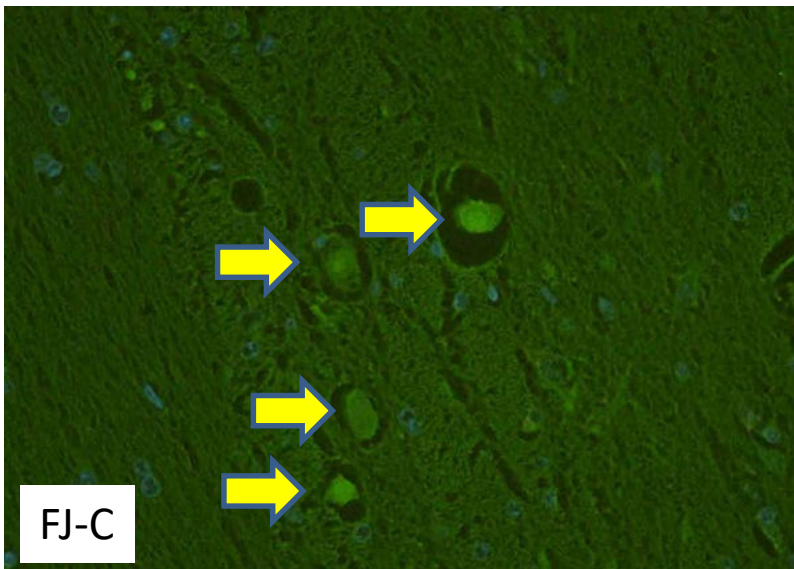
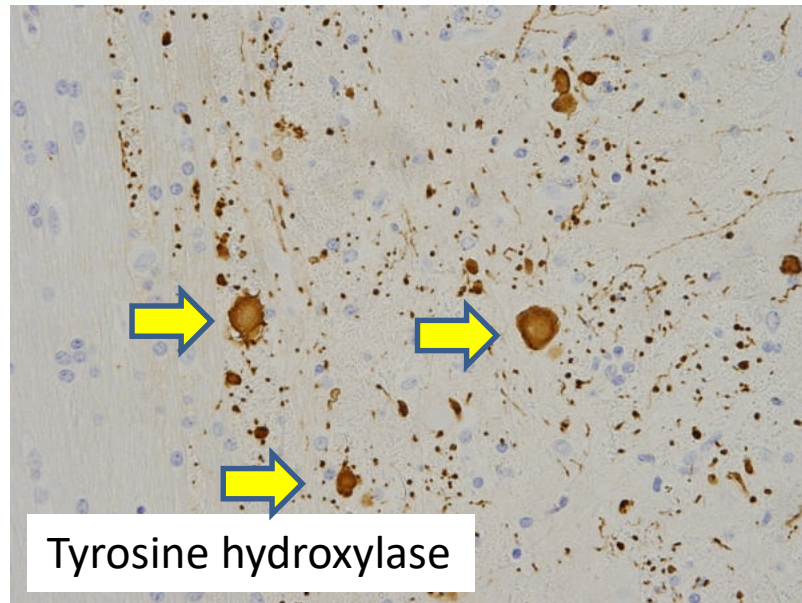
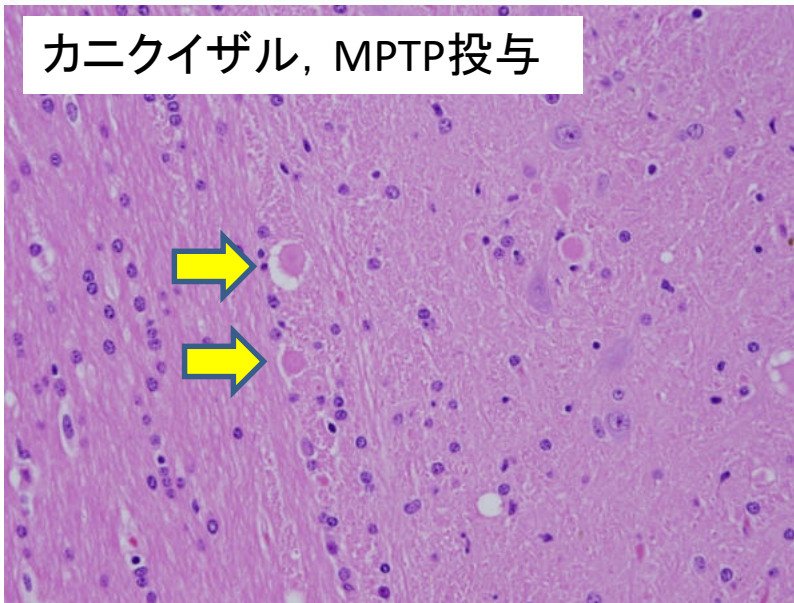


神経細胞壊死の染色性に違いはなかった
ただし・・・

浸漬固定は赤血球が染色されるため、軸索かどうかの判別は困難

ラット以外でのFJ染色例

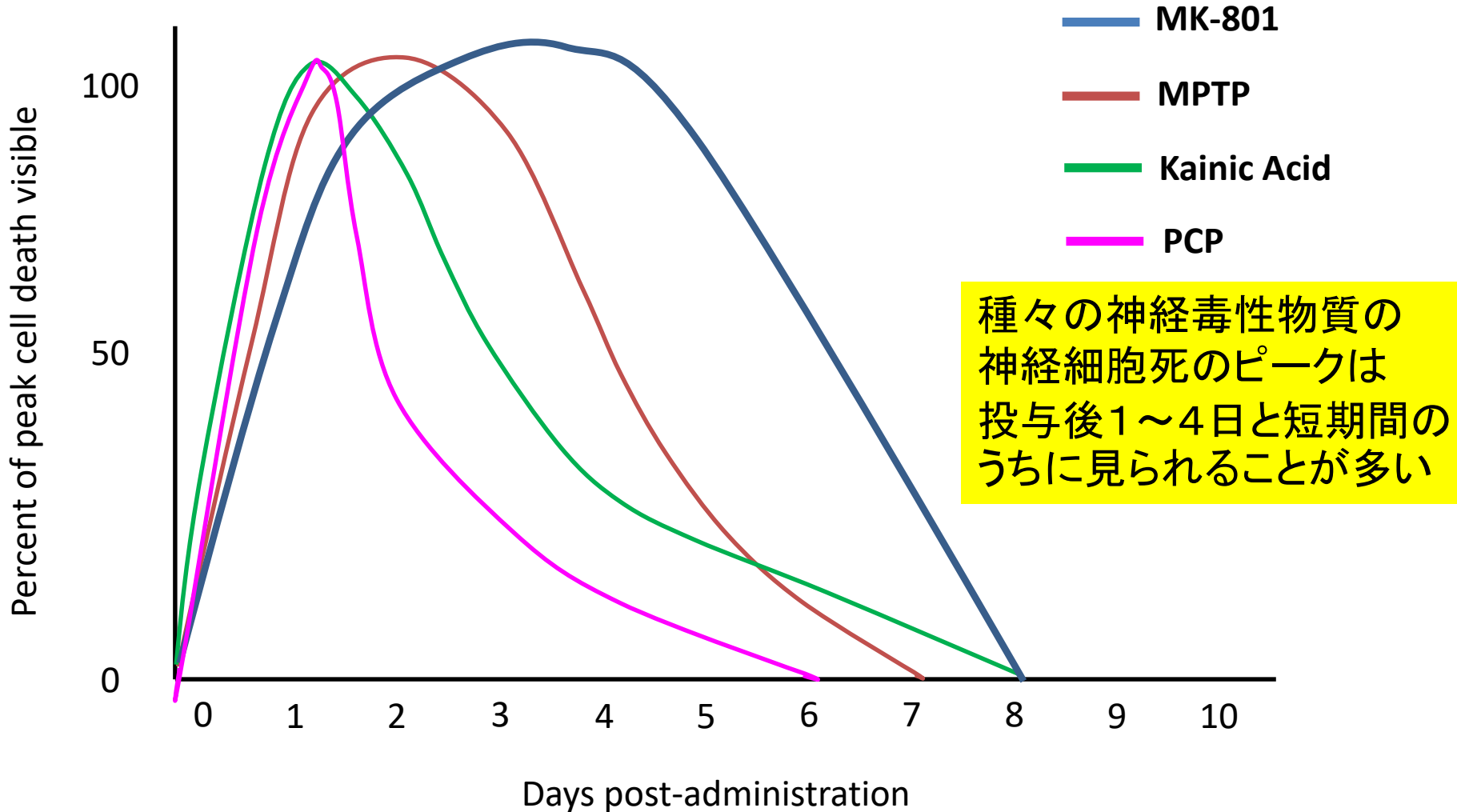
カニクイザル, MPTP投与



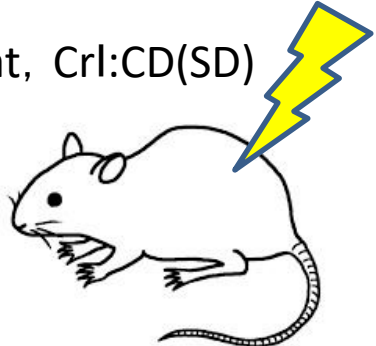
- ・今回のサルの例では染色性は弱かった.
- ・マウスにカイニン酸を投与した例で染色されなかった経験あり

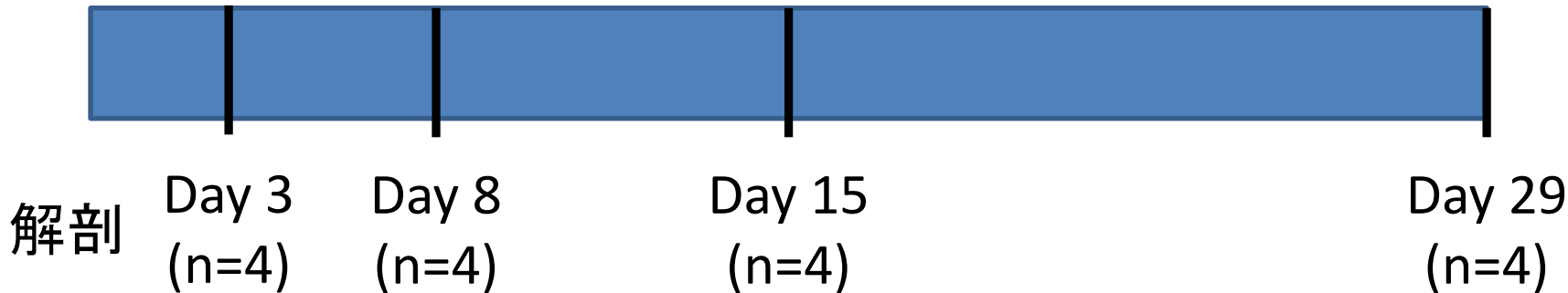
→ ラット以外では検討が必要かもしれない.

いつ評価するか？ 神経細胞死のタイミング



MK-801の経時的変化

Rat, Crl:CD(SD)  5 mg/kg 皮下投与
(Day 1)



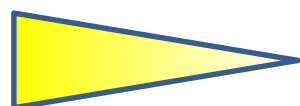
2匹は10%リン酸緩衝ホルマリンにて浸漬固定.

2匹は4%パラホルムアルデヒドで灌流固定.

いずれも定法に従ってHE染色スライド標本を作製.

併せて、免疫染色 (Iba-1, GFAP, CNPase), FJ-C染色を実施.

MK-801 皮下投与 90分後の様子



神経症状・活動性の低下はDay 3～5程度で消失



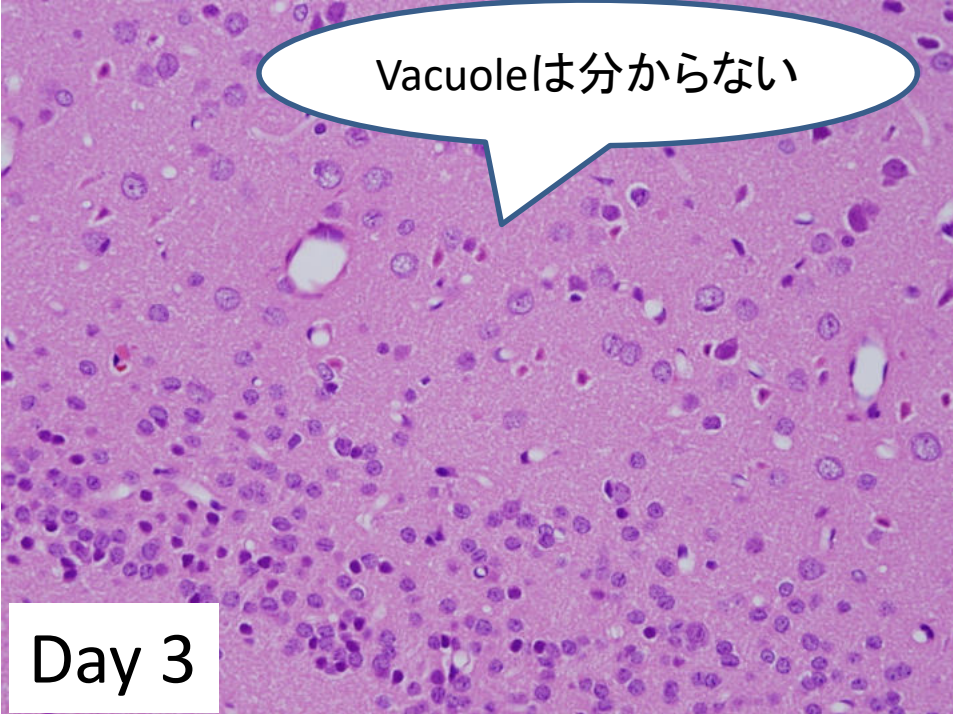
Day 3
(n=4)

Day 8
(n=4)

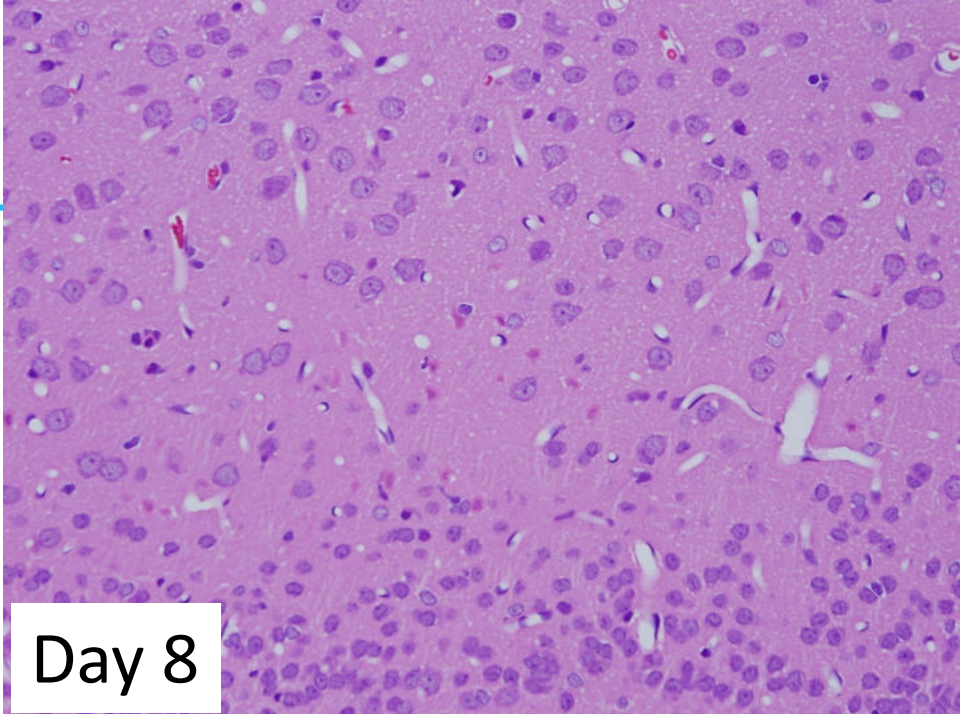
Day 15
(n=4)

Day 29
(n=4)₂₂

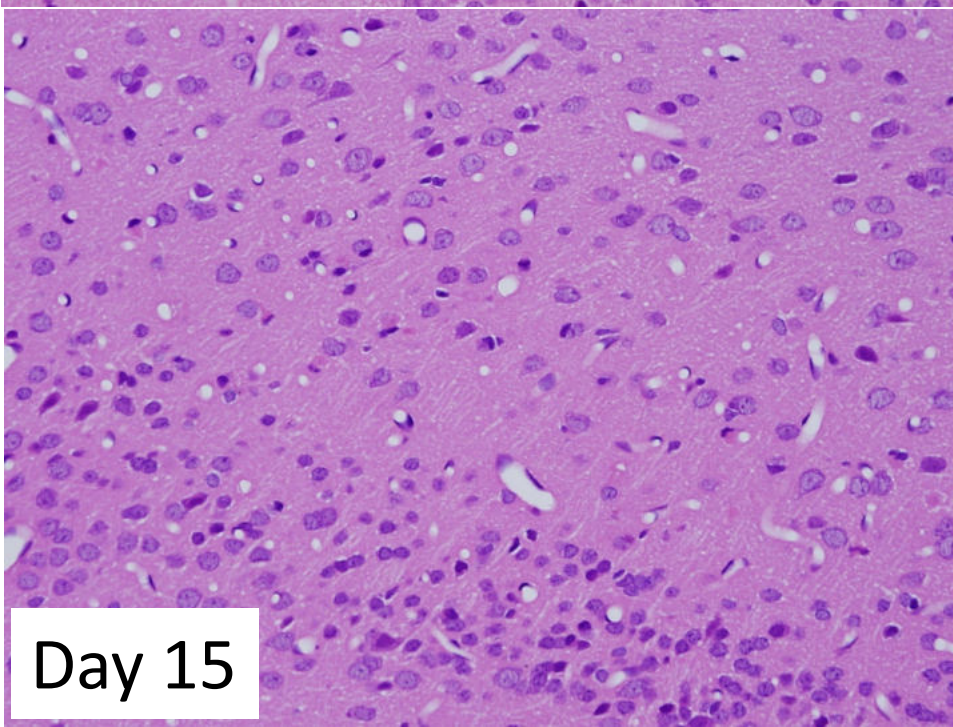
Vacuoleは分からない



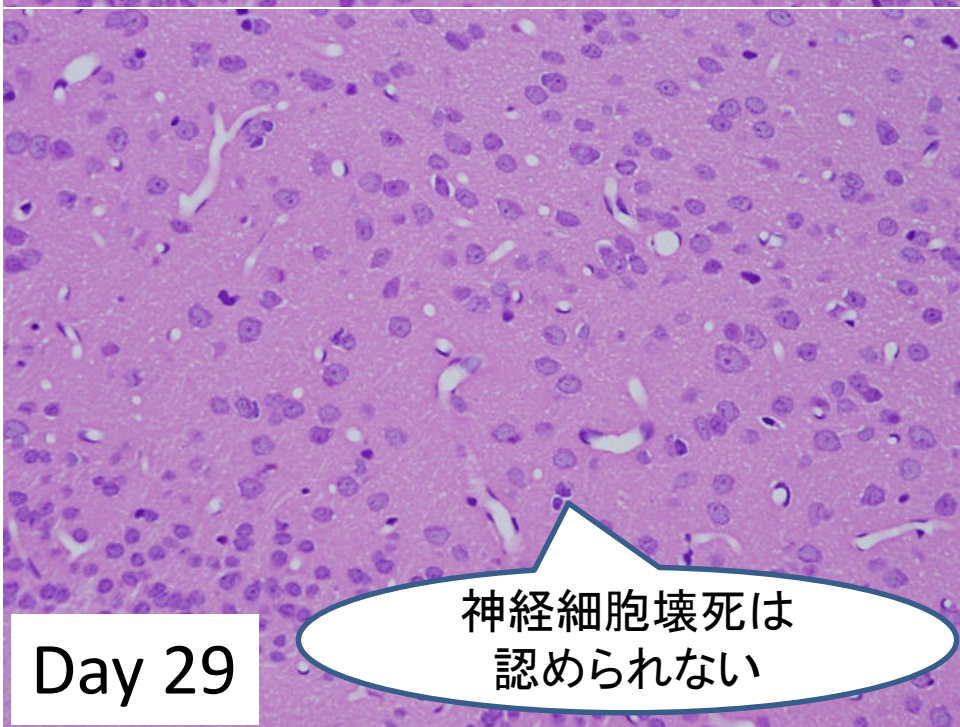
Day 3



Day 8

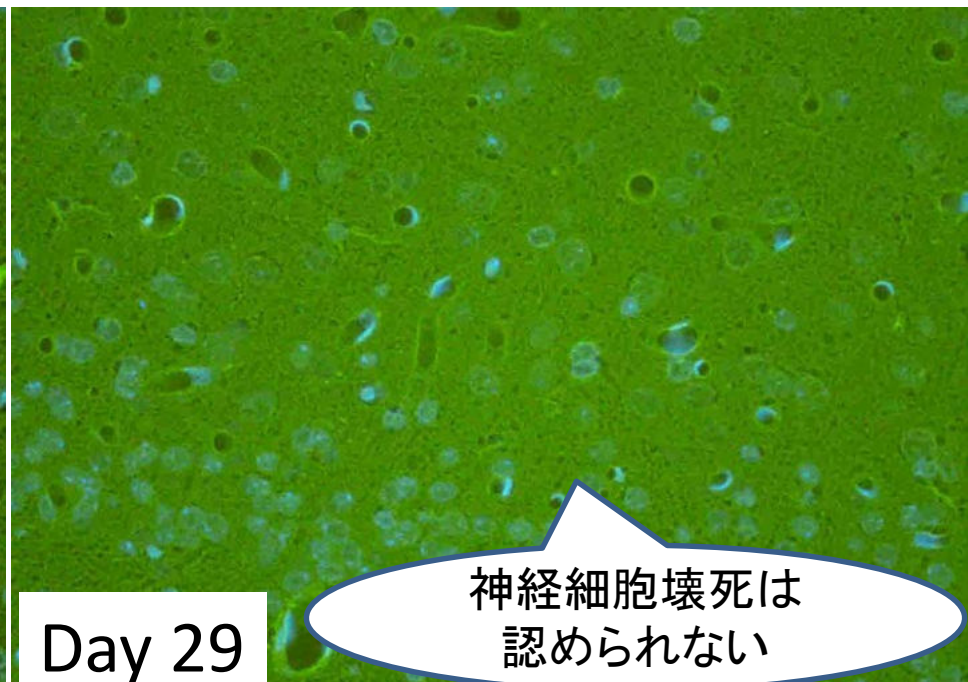
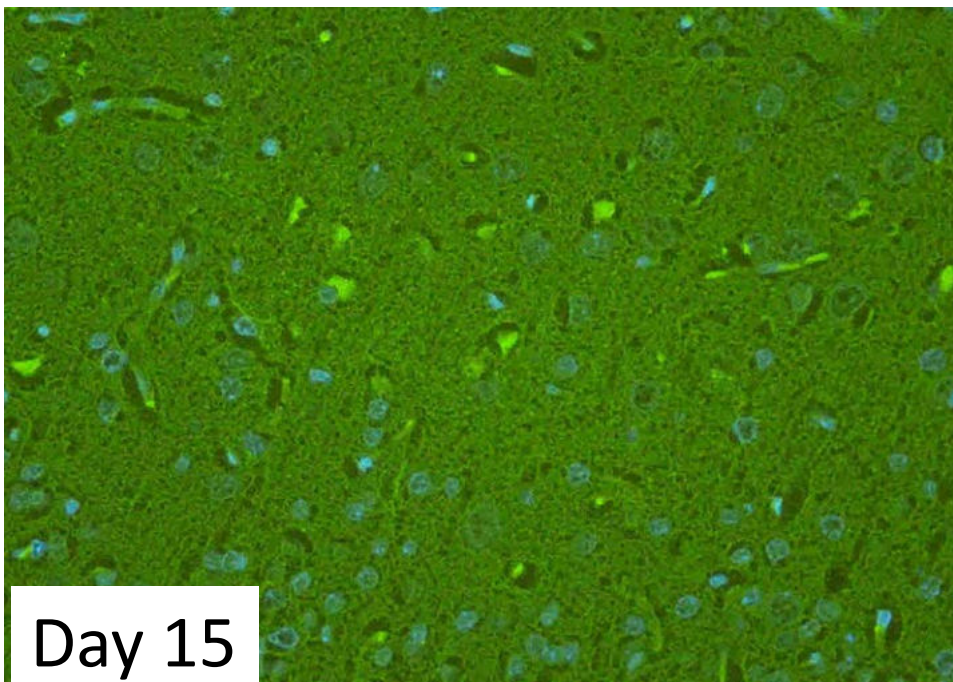
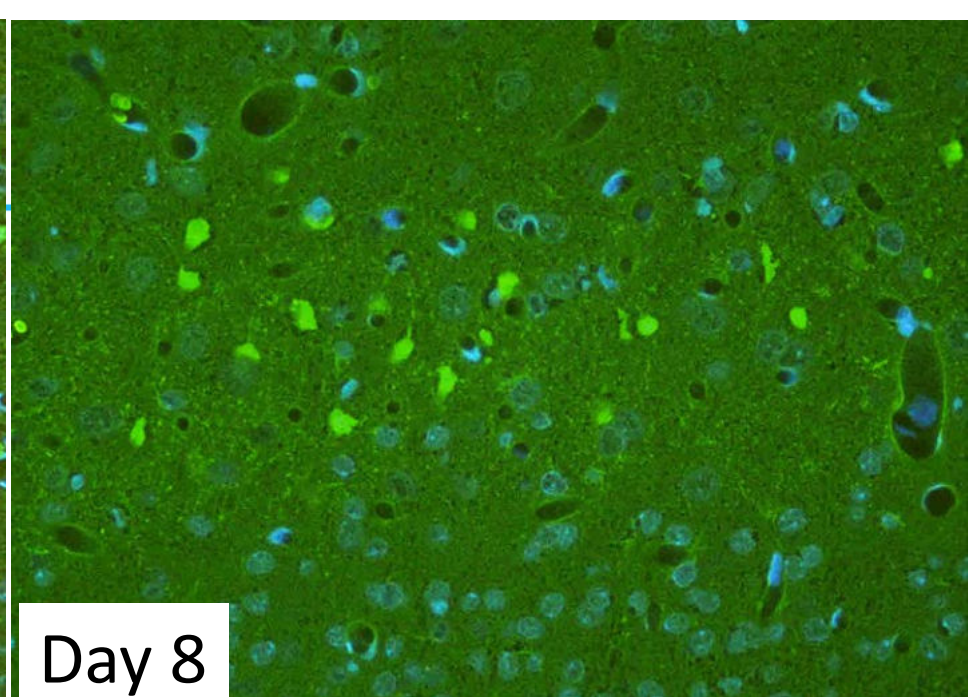
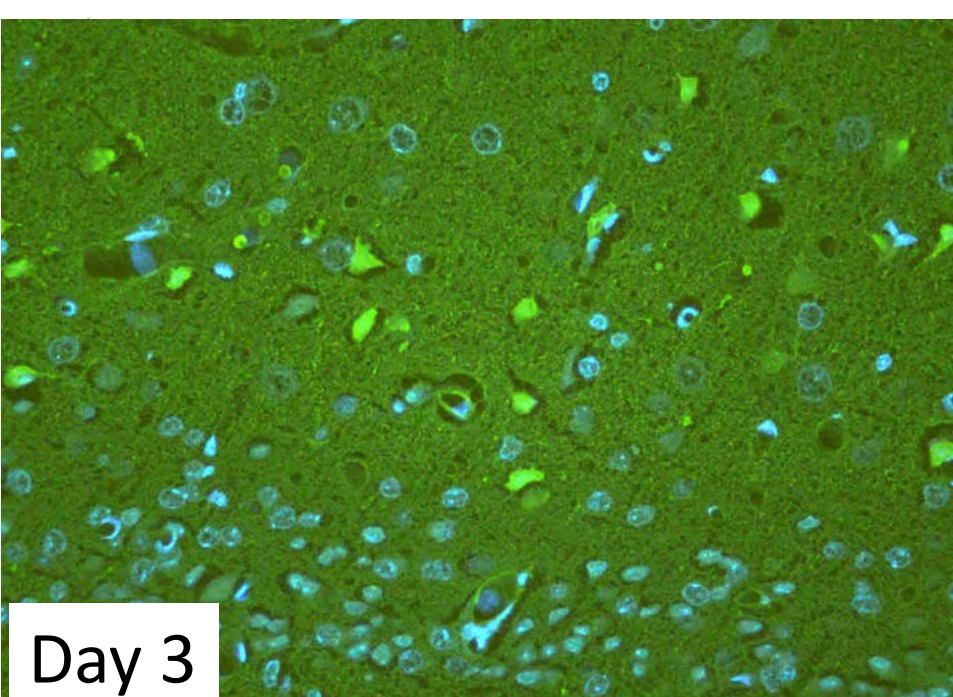


Day 15

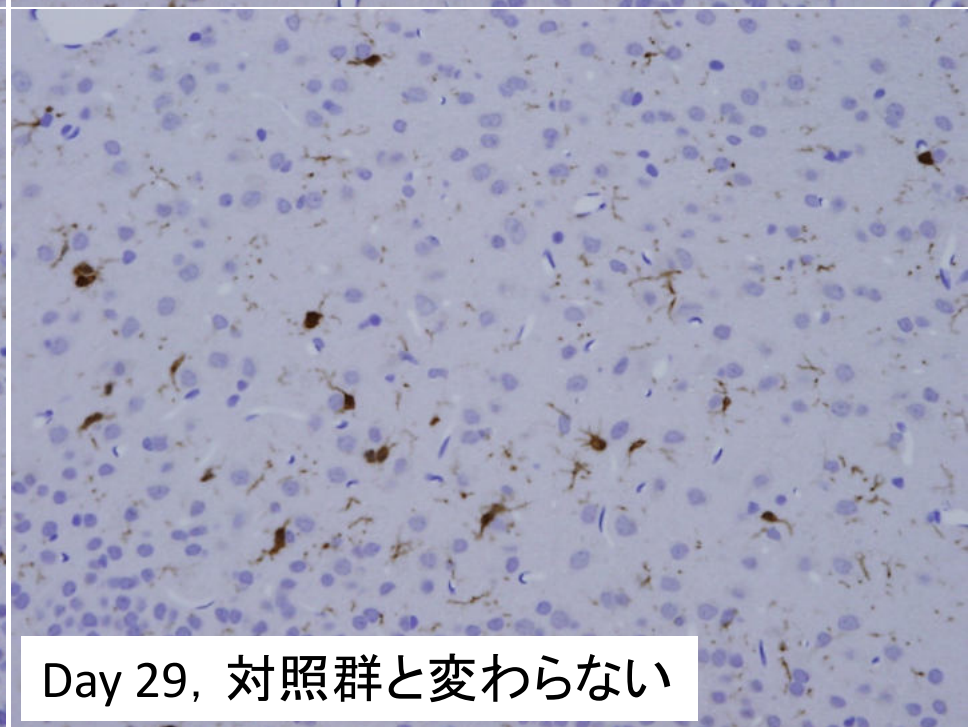
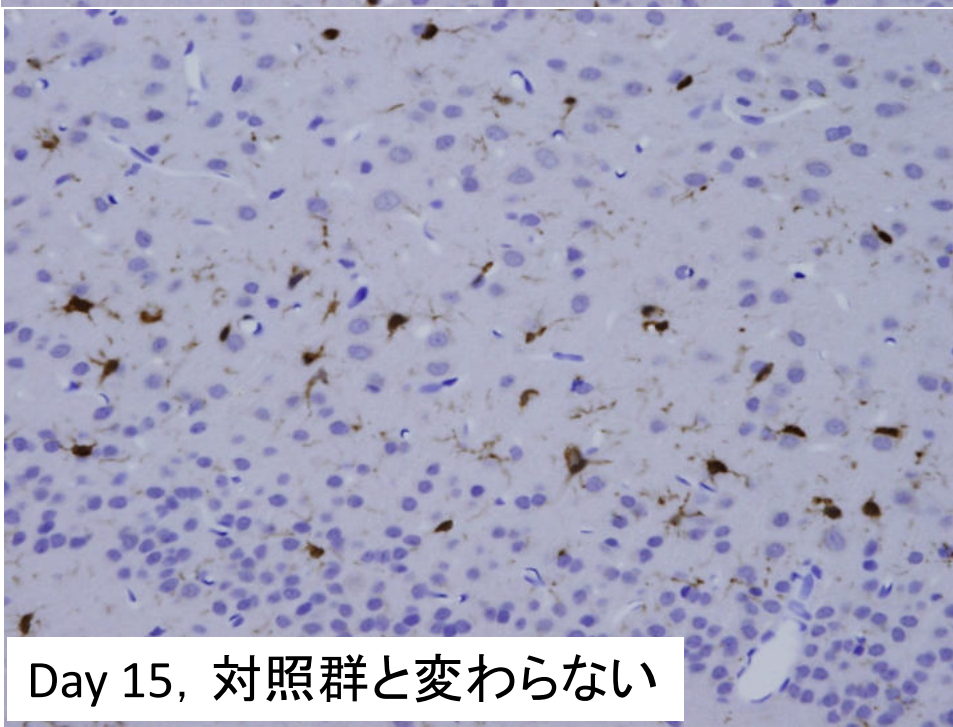
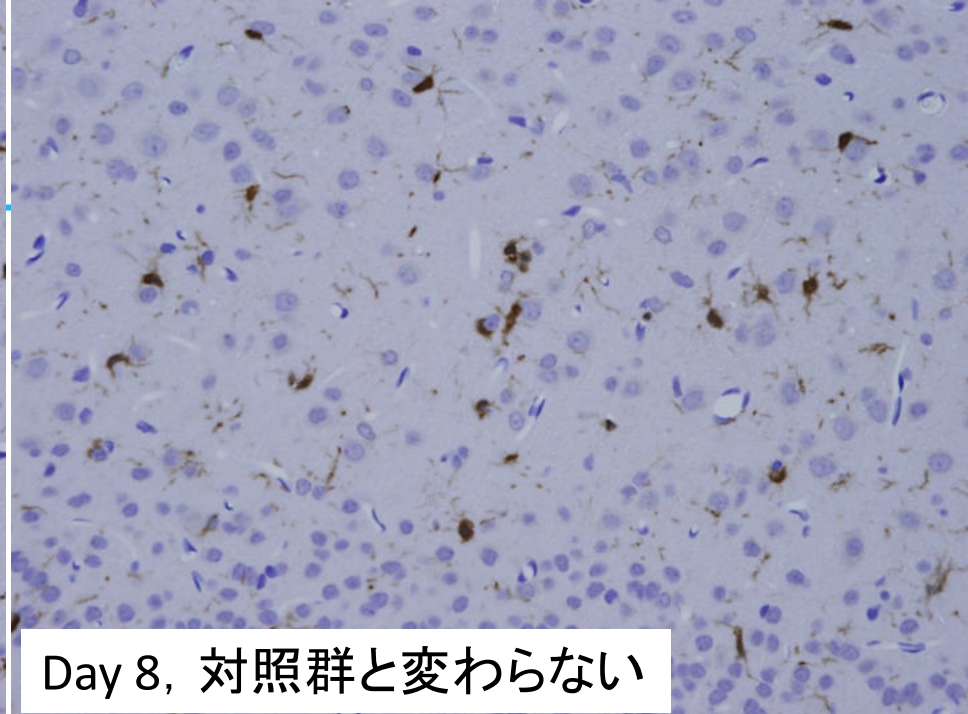
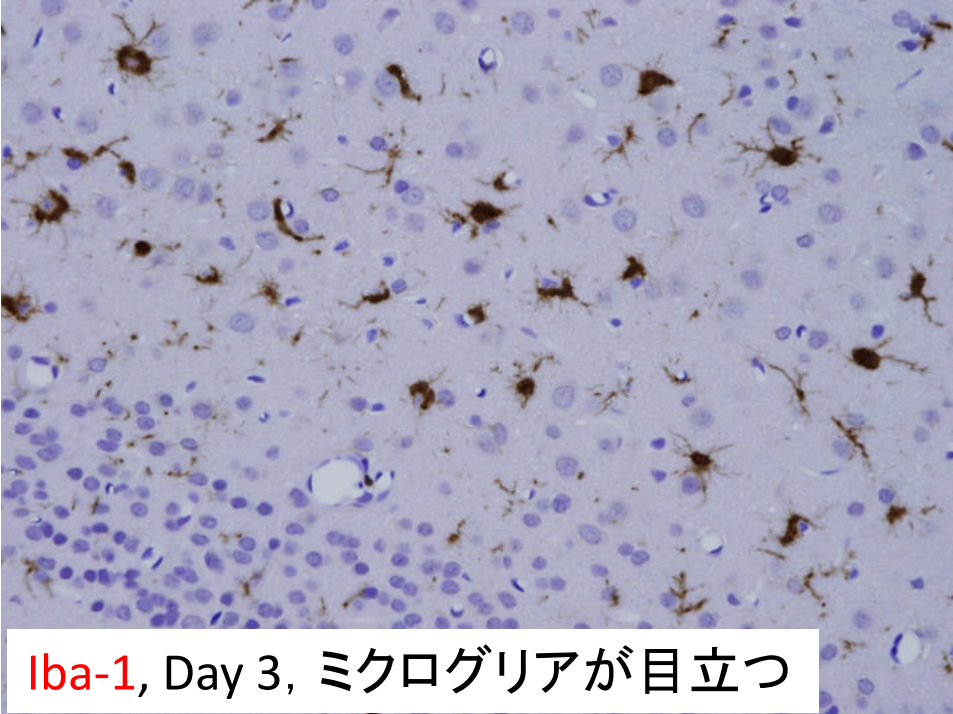


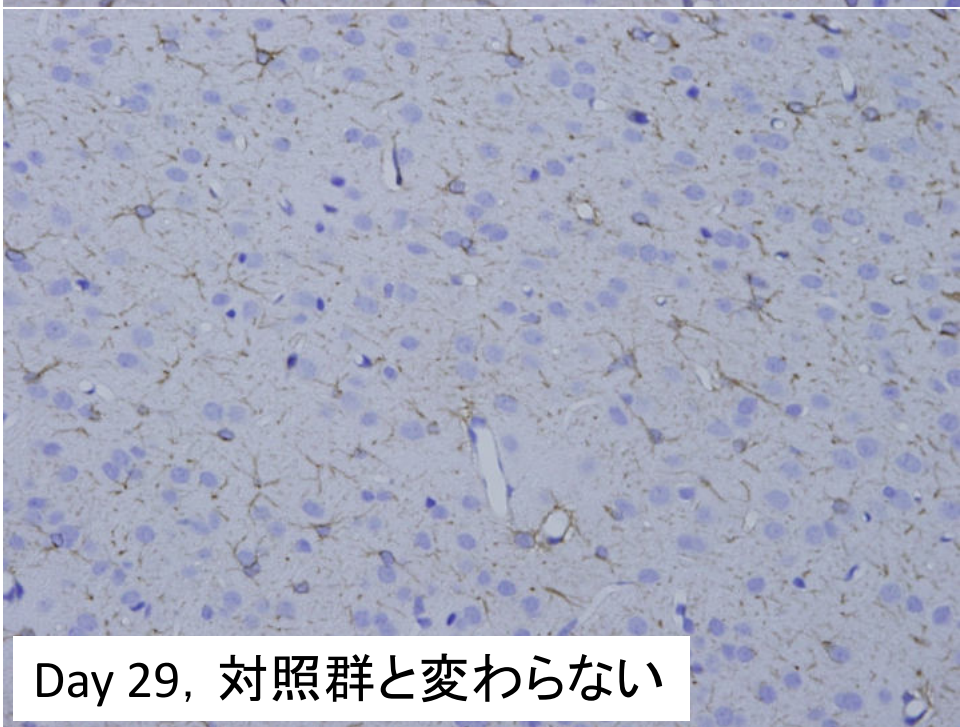
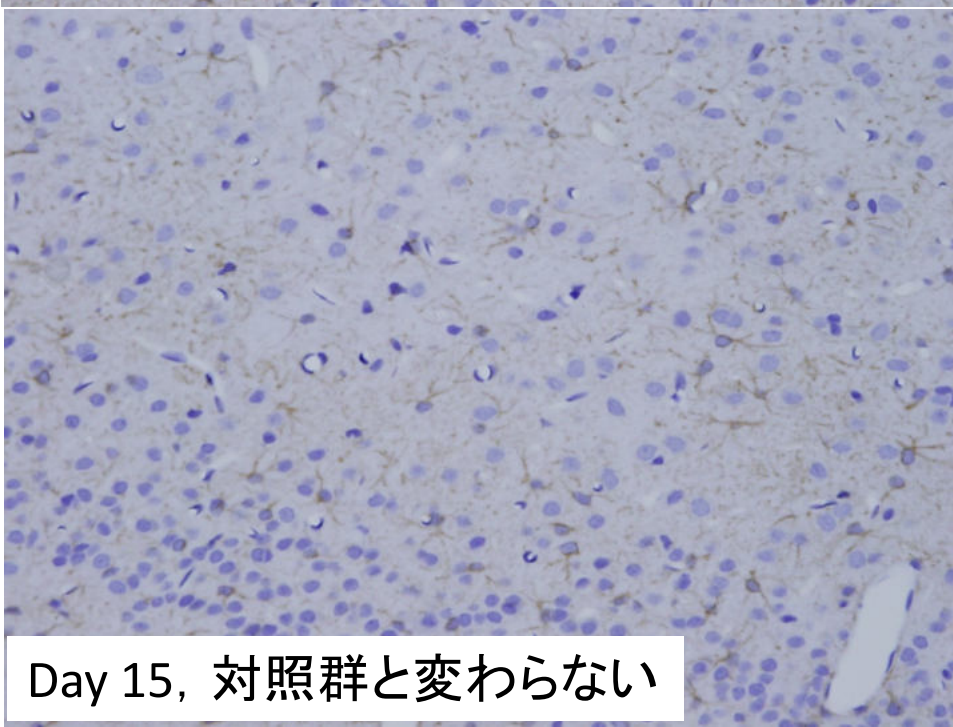
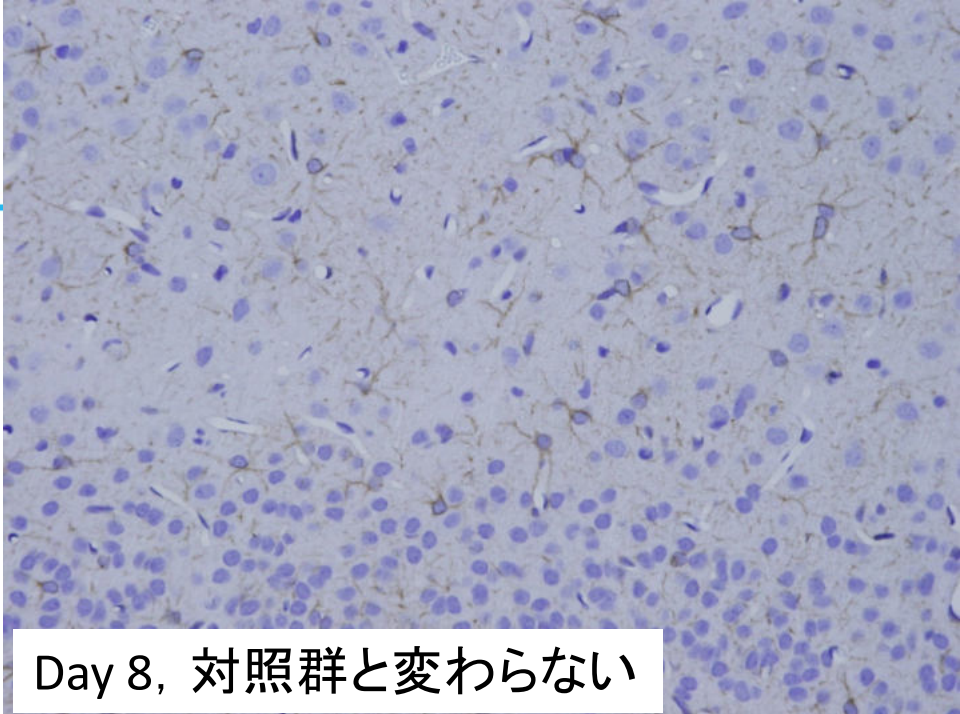
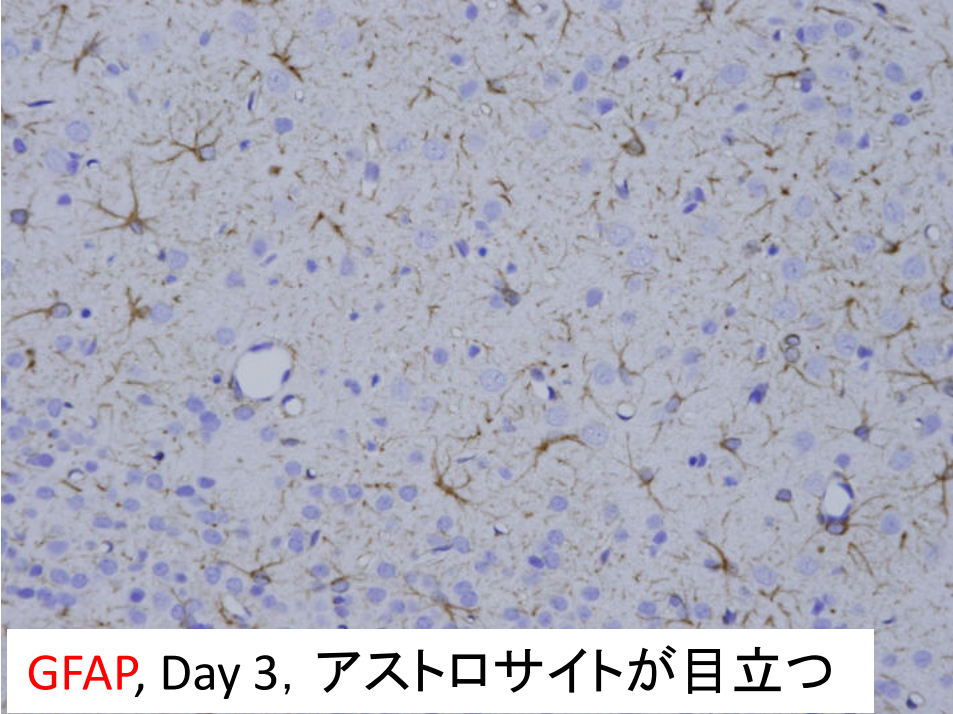
Day 29

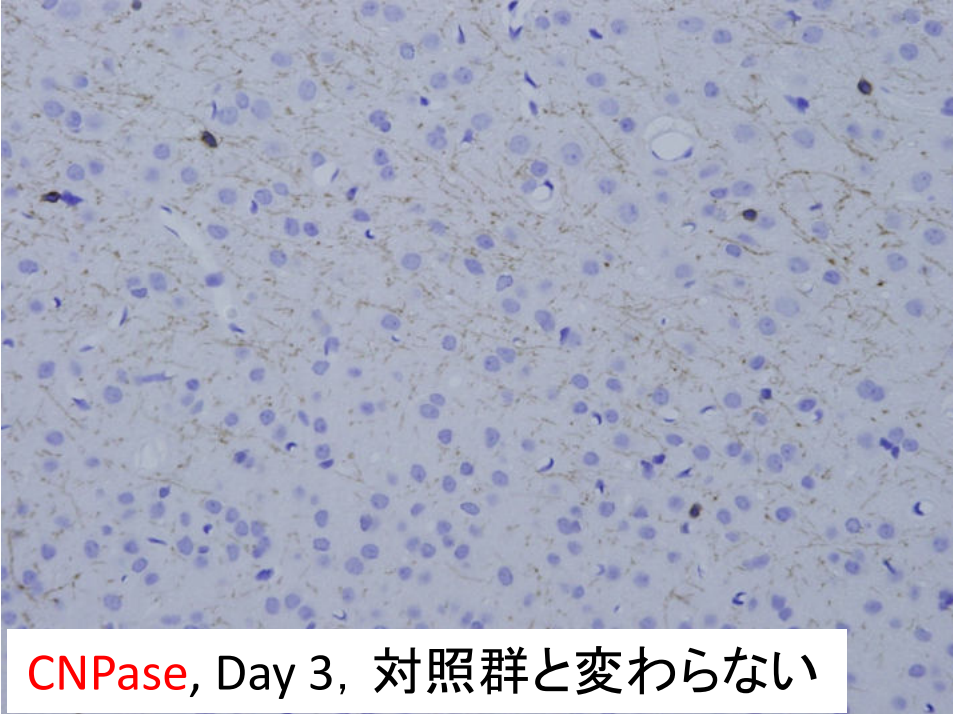
神経細胞壊死は
認められない



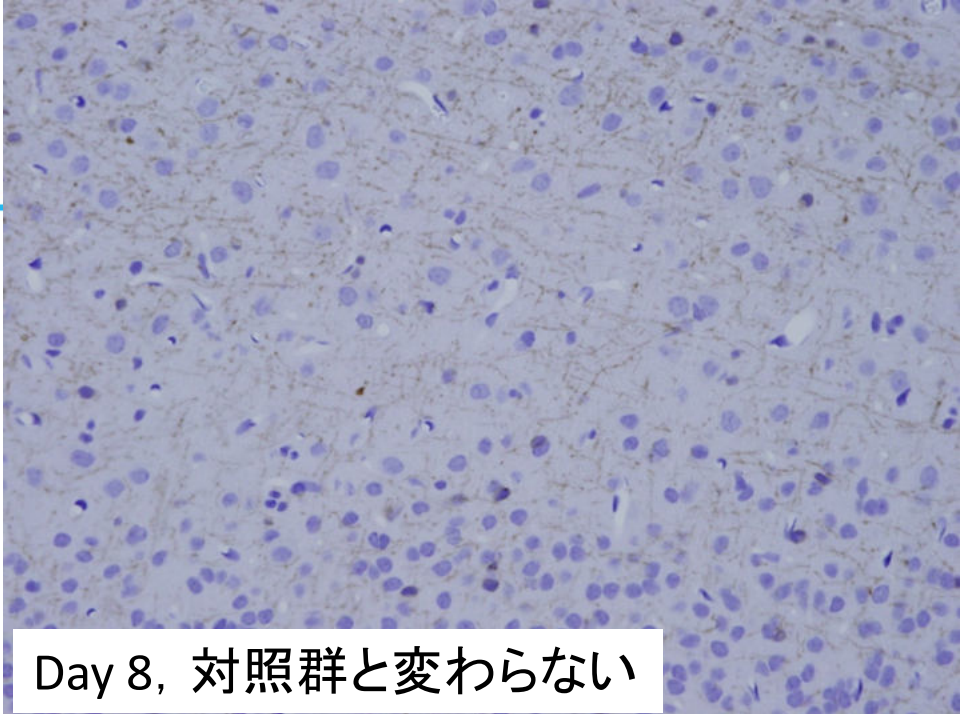
神経細胞壊死は
認められない



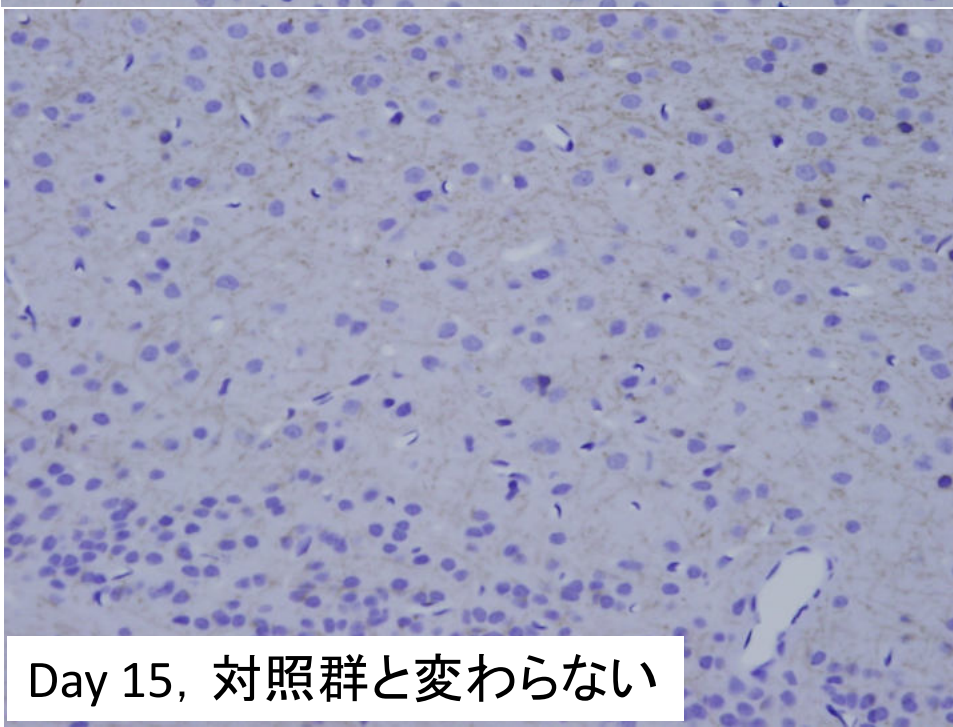




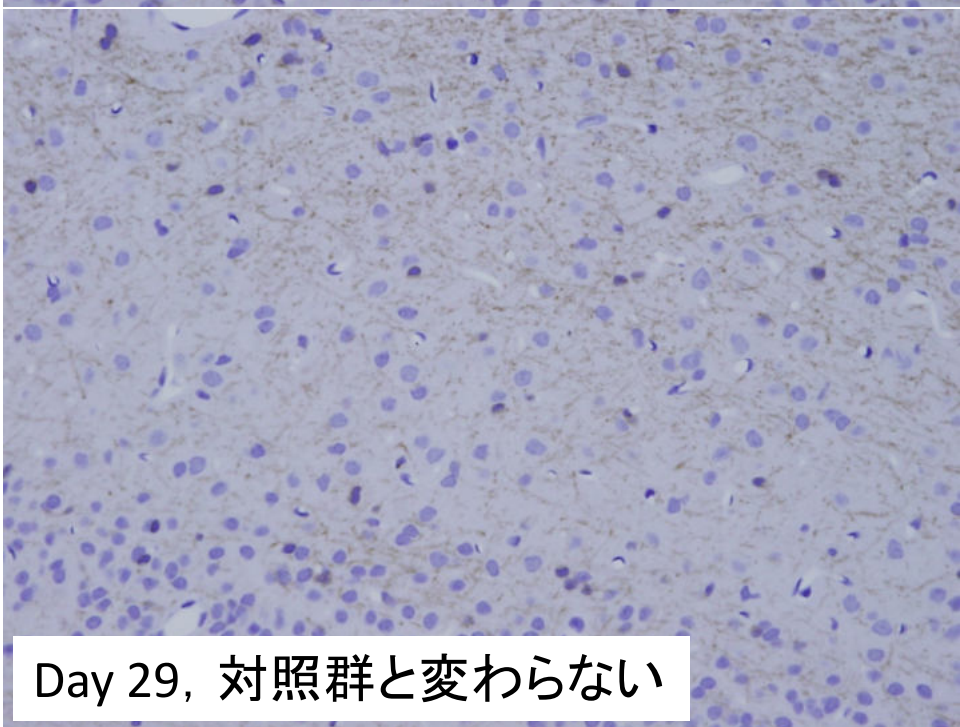
CNPase, Day 3, 対照群と変わらない



Day 8, 対照群と変わらない



Day 15, 対照群と変わらない



Day 29, 対照群と変わらない

Cellularity, decreased, neuron は分かるか？

神経細胞数を数えてみると...

12.4 ± 2.3



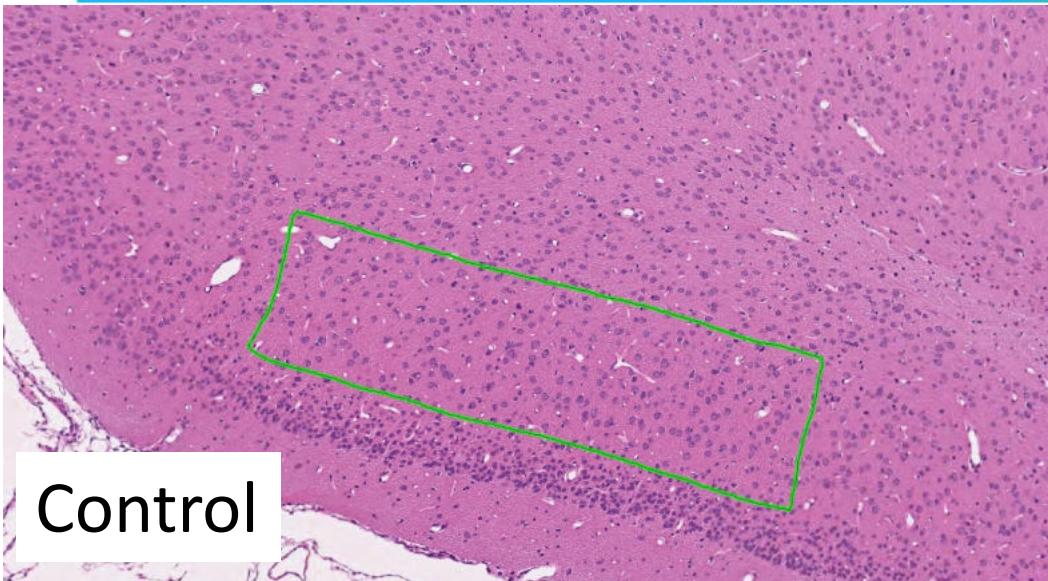
(個 / 100 μm²)

見分けるのは困難！！

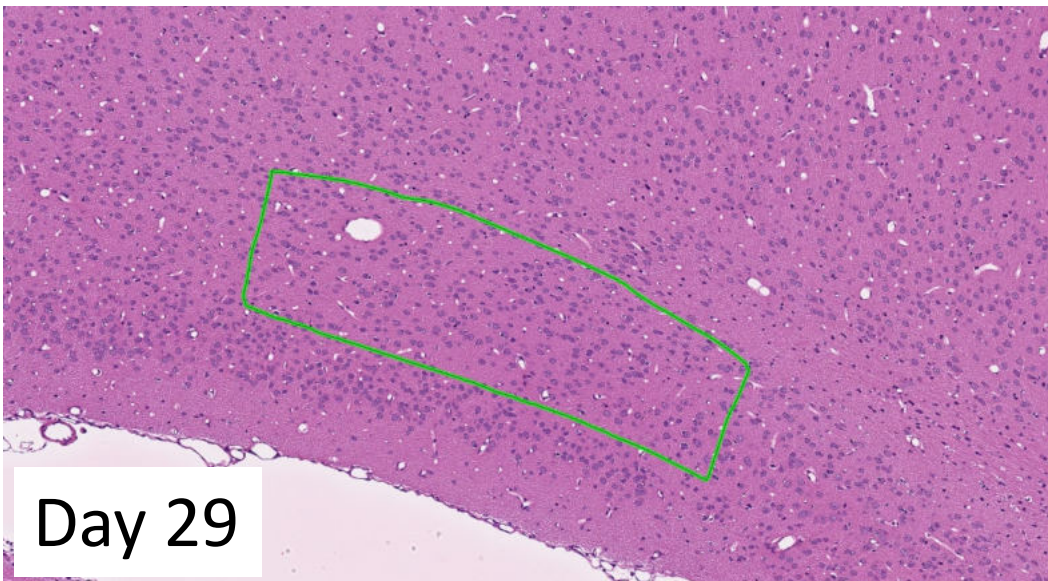


14.1 ± 3.8

(個 / 100 μm²)



Control



Day 29

Cellularity, decreased, neuron

海馬や小脳プルキンエ
細胞など

- 配置に特徴的な神経細胞でない限り、微妙な神経細胞の消失を区別することは**困難**.

まとめ

神経細胞壊死を評価するうえで重要なことを3つ紹介した。

- **Where: どこを評価するか？**

神経毒性物質には独特の領域特異性が存在することが多い
STPポジションペーパーは例示, フレキシブルに対応すべき

- **How: どのような手法を用いて評価するか？**

HE染色だけでも明らかなものは評価が可能である
鑑別が必要なものや見落としのリスクがあるものに対しては
Fluoro-Jade染色やIba-1免疫染色など他の手法も考慮する

- **When: どのタイミングで評価するか？**

神経細胞壊死と評価のタイミングは考慮しなければならない
神経細胞の減少は評価が難しいことがある
投与一週間以内の検査が必須になることもある