

氏名・(本籍)	中 嶋 康 彦 (滋賀県)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	博士第262号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	平成9年12月25日
学 位 論 文 題 目	Morphological investigation of the neuroprotective effects of graded hypothermia after diverse periods of global cerebral ischemia in gerbils (スナネズミ全脳虚血モデルにおいて段階的低体温下に虚血時間を変化させた際の神経保護効果に関する組織学的検討)
審査委員	主査 教授 西 克 治 副査 教授 前 田 敏 博 副査 教授 森 渥 視

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

脳神経細胞は虚血・再灌流障害に対して極めて脆弱で、中でも海馬CA1領域の錐体細胞は一過性の虚血後、エネルギー状態はすみやかに回復するにも関わらず、数日後に細胞死に陥ることが知られている。この現象は遅発性神経細胞死 (DND) とよばれ、そのメカニズムは十分には明らかにされていない。一方心臓血管外科の領域では完全な循環の停止を必要とする手術中の脳保護手段として、超低体温循環停止法が用いられており、その神経細胞保護効果の本質は温度を下げることによる生物化学的代謝活性の低下にあるとされている。しかし最近の神経科学の研究で一過性脳虚血中のわずか数度の脳温の低下がCA1領域の神経細胞を保護することが見いだされ、低体温による神経保護効果の本質は代謝の抑制よりも、虚血侵襲後細胞死へとつながる一連のカスケード反応を抑制することにあるとされている。虚血侵襲に対する軽度～中等度低体温の神経保護効果に関する組織学的研究は数多く報告されているが、超低体温での組織学的研究は殆ど行われていない。本研究の目的は、軽度～超低体温下で種々の時間脳虚血とした後の組織学的な影響をDNDに注目して観察し、さらに神経細胞障害と周囲グリア細胞の反応との関係を観察することである。

【方 法】

成体雄性スナネズミ (12-20週、70-90g) の両側総頸動脈閉塞による一過性前脳虚血モデルを用いた。体表冷却・加温にて37, 32, 28, 24および20℃の温度群を作成し、温度に応じて5分から120分の一過性前脳虚血を負荷した。また各温度群における最長の虚血時間に相当するシャム手術群を作成した。虚血・再灌流後7日目に全身灌流固定し、脳を摘出し20 μ m厚の凍結切片を作成した。海馬CA1領域の神経細胞 (主として細胞体) の障害を評価するためにクレシルバイオレット染色 (CV) を行い、残存正常神経細胞数をカウントした。海馬CA1領域の神経細胞 (主として樹状突起・軸索) の変性を観察するために鋭敏な指標であるMAP2免疫染色を行った。また海馬CA1領域のアストロサイトの変化を同定するためにGFAPに対する免疫染色を行い、画像解析装置にて陽性染色部の面積を算定し温度群間で比較した。さらに海馬領域のマикроグリアの変化を観察するために、イソレクチンB4による組織化学染色を行った。

【結 果】

37℃においては5分間の一過性虚血後、CVおよびMAP2染色にて海馬CA1領域のほとんどの神経細胞がDNDに陥っていた。さらに10分間の虚血ではほとんど全ての細胞が脱落していた。32℃においては10分間の虚血ではDNDは起こらず、20分間の虚血負荷でCA1領域のほとんどの神経細胞にDNDが認められた。28℃では20分間の虚血ではDNDは起こらず、30分間の虚血負荷でCA1領域のほとんどの神経細胞にDNDが認められた。24℃では30分間の虚血負荷ではDNDは起こらず、さ

らに虚血時間を60分としてもほとんどの神経細胞は脱落しなかった。20℃群では最長120分の虚血負荷が可能であったがDNDは起こらなかった。MAP2染色においても明らかな神経突起の変性は認められなかった。虚血負荷後DNDが起こった群では海馬全体において著明なアストロサイトの肥大・増生が認められ、この変化はCA1領域で特に強く、錐体細胞層を含むCA1の全層で観察された。さらにこのアストロサイトの増生は、虚血侵襲は加わったがDNDを起こさなかった群においても種々の程度に認められた。ただしこの場合CA1錐体細胞層への浸潤は認めなかった。GFAP免疫反応の程度を評価するための画像解析の結果、虚血侵襲を受けた群はDND発生の有無に関わらず、各温度群においてシャム手術群と比較してアストロサイトは増生していた。またDNDを起こした群は起こさなかった群に比べて有意にGFAP陽性染色の面積が大きかった。これに対して、虚血後マイクログリアの反応はDNDを起こした群のみにおいてCA1領域の主として錐体細胞層に局限して認められた。

【考 察】

今回の研究で虚血中の低体温による著明な神経細胞保護効果が組織学的に確認できた。多くの薬物を用いた神経保護の試みに比べて、低体温は想定されるあらゆる虚血性神経細胞障害の過程を種々の程度に抑制しうることが理由であると考えられた。虚血侵襲後、脳では速やかに種々の程度にグリア細胞の活性化が起こり、それが神経細胞の変性の過程に深く関与していると考えられている。アストロサイトは、シナプス間隙に放出されたグルタミン酸等の神経伝達物質の取り込みや不活化、血液-脳関門の維持など神経細胞周囲の微小環境の維持のための様々な活性をもっており、一方マイクログリアは活性化されると様々な細胞障害性因子を放出することが知られている。本研究におけるこの二つのグリア細胞の全く異なる反応のパターンから、アストロサイトは細胞障害の過程で保護的な作用を有し、マイクログリアは細胞死そのものに関連して活性化されと考えられた。また超低体温状態においてもアストロサイトの微小環境の恒常性を維持する機能は保たれており、低体温そのものによる侵襲自体の軽減と相まって、著明な神経細胞保護効果を現すと考えられた。

【結 論】

海馬CA1領域錐体細胞のDNDに着目した今回の研究にて、超低体温の著明な神経細胞保護効果を確認した。また低体温状態においてもグリア細胞の反応が、虚血後神経細胞の生死の過程に重要な役割を果たすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

心臓血管外科手術の際の脳保護手段として一般に用いられている低体温法が、従来、もっぱらエネルギー代謝を中心に検討されてきたのに対し、本研究は、低体温の神経細胞保護効果を形態学的に検討したものである。

スナネズミ前脳虚血モデルを用い、段階的低体温下(37、32、28、24および20℃)に虚血時間を変化させ(5~120分)、海馬CA1領域の錐体細胞におこる遅発性神経細胞死(DND)について、低体温の神経細胞保護効果および虚血後のCA1領域のグリア細胞の反応を組織学的に検討し、下記の結果を得ている。

1) 32℃、28℃の中等度低体温ではそれぞれ10分、20分の比較的短い虚血時間ではDNDが起こらないのに対し、虚血時間を20分、30分にそれぞれ延長するとDNDが認められた。2) 24℃、20℃の超低体温では、それぞれ60分、120分の虚血でもDNDは認められなかった。3) 星状膠細胞は虚血侵襲後、DND発生の有無に関わらず活性化が認められた。4) 小膠細胞はDNDが起こった群でのみ、CA1領域でのみ活性化が認められた。

得られた結果は、超低体温の著明な神経保護効果を組織学的に示すもので、さらに低体温状態においても、グリア細胞の反応が虚血侵襲後の神経細胞の生死の過程において、重要な役割を果たしていることを示唆している。本研究は、低体温の神経保護効果のメカニズムの解明に寄与する、優れたものであり、博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。