

氏名・(本籍) 山本理江(大阪府)
 学位の種類 博士(医学)
 学位記番号 博士第323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11年3月26日
 学位論文題目 スナネズミの一過性前脳虚血における海馬グリア細胞の変化
 …発達段階を中心として…

審査委員 主査 教授 島田 司 巳
 副査 教授 木村 宏
 副査 教授 前田 敏 博

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。CA1領域は記憶に強く関与しており、臨床的にも老人の痴呆との関係が注目されている。グリア細胞は神経細胞と形態的にも機能的にも極めて密接な関係を有しており、脳に何らかの侵襲が加わった後の神経細胞の生死を決める上で非常に重要な役割を担っている。一般に、発達途上の脳は神経細胞死を起こしにくいと報告されている。今回、我々は生後1ヵ月以内に一過性脳虚血をおこしたスナネズミにおいて海馬に遅発性神経細胞死を起こす発達上の臨界期を調べ、また遅発性細胞死をおこす際のグリア反応の経時的变化を検討した。

【方法】

生後2日から10週の雌雄スナネズミ(体重3~70g)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。脳温を体表冷却・加温にて $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に安定させ、10分間の一過性前脳虚血を負荷した。また各週齢群におけるシャム手術群を作成した(A群)。虚血・再灌流後生後10週到達時に全身灌流固定し、脳を摘出し $20 \mu\text{m}$ 厚の凍結切片あるいは $40 \mu\text{m}$ のマイクロスライス切片を作成した。また、生後14日(B-1群)及び生後30日(B-2群)に同様の一過性の一過性前脳虚血を負荷し、虚血処置の1日後、3日後、7日後に灌流固定を行った。A, B群とも、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(CV)染色を行い、残存正常神経細胞数をカウントした。B群ではさらに、海馬領域の星状膠細胞をGFAP免疫染色、稀突起膠細胞を抗CNAase抗体、小膠細胞を抗Mac-1抗体を用いた免疫染色を用いて観察した。また、CA1領域における星状膠細胞のしめる面積比の経時的变化を画像解析装置を用いて算定した。

【結果】

A群：臨界期を調べる群

一過性前脳虚血処置を生後第3週目までに行ったものではCA1領域の錐体細胞が脱落し難いものに対し、生後4週以降では、脱落が著明であった。生後第3週目と第4週目の間に明らかな臨界期が存在することを認めた。

B群：経時的变化を見る群

1. CV染色

B-1群の錐体細胞数には処置後の1週間に変化は見られなかった。B-2群は、処置後1日目は変化は見られなかったが、3日目には内側半が著しく減少していた。7日目にはCA1の全領域において細胞が顕著に減少した。

2. 星状膠細胞(GFAP免疫陽性細胞)

B-1群の第1日目において、多形細胞層で陽性細胞の肥大を示した。第3日目において、分子

層で反応性のものが増加した。第7日目において、多形細胞層、分子層の両層で免疫陽性度が低下した。錐体細胞層には各日とも免疫陽性細胞体を認めなかった。B-2群の第1日目に免疫陽性となった細胞は、B-1群に比べ核が大きく、突起も太く、長くなっていた。錐体細胞層は免疫陽性の細胞体は認めなかったが、突起が増えていた。第3日目は錐体細胞層の内側半では境界領域に免疫強陽性細胞が増えていたが、外側半では全層にかけて、免疫強陽性細胞に満たされていた。

3. 稀突起膠細胞（抗CNAase抗体陽性細胞）

B-1群のCA1領域は第1、3日とも陰性であったが、第7日目でCA3への移行部に活性を強く認めた。B-2群の第1日目は対象との差異はなかった。3日目になると錐体細胞層の陽性繊維が増えた。第7日目には全層で減少した。

4. 小膠細胞（抗Mac-1免疫陽性細胞）

B-1群では全日とも陰性であった。B-2群の第1日目には陰性であったが、3日目になると錐体細胞層内側に弱く陽性細胞が出現した。7日目では全層で陽性細胞の活性化が見られた。

5. 星状膠細胞の面積比

B-1群は面積比の軽度上昇、B-2群ではより強い上昇が見られた。

【考察】

発達段階にある脳は虚血に強いとされ、ヒトにおいても、新生児あるいは幼児期は虚血障害を受けにくいことが临床上知られている。本研究によりスナネズミ脳においても、生後第3週目までは一過性脳虚血によるDNDが起こりにくいことが明らかになった。最も興味ある反応を示したのは星状膠細胞であった。生後4週を過ぎると一過性虚血に対する海馬CA1錐体細胞のDNDは内側半から起こり、外側へ移行しCA1全域に至ることが明らかになった。星状膠細胞の反応もまさにこれに応じて起こった。DNDを起こした群で、虚血後GFAP免疫活性が最も強いのは処置後3日目であったが、DNDを起こさなかった群でも同時期に免疫活性化を認めたことはこの星状膠細胞が障害に対し神経細胞の環境を維持し、DNDを起こさないよう働くことを示していると考えられた。

【結論】

DNDに着目した今回の研究にて、発達段階の脳の虚血に対する著明な耐性を確認した。また発達段階の脳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

発達期の脳は、虚血や低酸素などの侵襲に対し耐性を示すことが知られ、何らかの神経細胞保護機構が存在するものと推定されている。この保護機構に関与する候補として、神経細胞の機能維持に働く星状膠細胞や小膠細胞が挙げられている。しかし、これら膠細胞は出生直後ではまだ増殖途上にあり、その数は成熟期に比べてはるかに少なく、膠細胞の神経保護作用については疑問の点が多い。

本研究では、スナネズミを用いて出生後から経時に脳虚血を施し、その海馬CA1を組織化学染色法で追跡した。その結果、星状膠細胞の役割は、神経保護作用よりも、むしろ神経細胞死に密接に関連するという、従来の仮説を覆す事実を明らかにしたものである。

以上の結果は、神経細胞の生存維持あるいは死滅過程における膠細胞の新しい役割の可能性を提起したものであり、博士（医学）の学位に値すると認められた。