

氏名・(本籍)	川 端 徹 (大阪府)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博士第156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6年3月24日
学位論文題目	低血糖による中枢神経障害の発症進展に関する研究：ラット海馬シナプス部の免疫組織学的検討
	審 査 委 員
	主査 教授 前 田 敏 博
	副査 教授 木 村 宏
	副査 教授 繁 田 幸 男

論 文 内 容 要 旨

[目 的]

厳格な血糖コントロールを得るためにインスリン強化療法が普及し、糖尿病患者が低血糖を経験する頻度が高くなっている。低血糖は、遷延すると脳神経細胞を不可逆的に障害し、記憶学習などの高次機能の障害を起こすことが報告され、病理学的にも選択的脆弱部位で神経細胞壊死が起こることが確認されている。低血糖に起因する神経細胞壊死は脳虚血、てんかん重積発作等と同様に、海馬、線条体、大脳皮質などの脳領域で選択的に惹起されると共に、神経細胞の障害に興奮性神経伝達物質が関与することが示唆されている。その障害部位、進展様式は脳虚血性病変とは異なっていることが指摘されているが、十分な検討は行なわれていない。今回我々は、低血糖による神経細胞障害の発症及び進展機序解明のため、記憶学習に重要で低血糖に脆弱である海馬を中心に、特に障害機転において重要な役割を果たすことが推定されているシナプス領域を免疫組織学的に検討した。

[方 法]

実験前日夕より絶食した雄性SD系ラットをハロセン及び笑気麻酔下で人工呼吸し、経時的な血圧、脳波のモニター下で、レギュラーインスリン15U/kgを腹腔内投与し低血糖昏睡を惹起した。昏睡の程度は平坦脳波を30分間惹起させるものとした。50%グルコースを静注後、十分な意識回復を確認し気管カニューレを抜管した。脳波活動が再出現後、30分(n=4)、2時間(n=4)、7日(n=7)と、グルタミン酸NMDA受容体拮抗薬(MK801)を脳波が平坦化する直前に投与して30分後(n=2)に、それぞれ4%磷酸緩衝パラホルムアルデヒド液にて灌流固定し、その後脳を摘出し、パラフィン包埋後、6μmの切片を作製した。免疫組織学的検討は、神経樹状突起のmarkerとなるmicrotubule associated protein 2(MAP2)、神経軸索終末で軸索再生、synaptogenesis、神経伝達物質の放出等に関与するとされているgrowth associated protein 43(GAP43)及びシナプス前終末のmarkerとなるsynaptophysinに対するモノクローナル抗体を用いABC法にて行なった。

[結 果]

1) 低血糖昏睡回復30分後から歯状回堤部の顆粒細胞は軽度の変性を示し、2時間後、壊死像を呈した。回復2時間後から7日後にかけて支脚-CA1からCA1-CA2へと外側に向かって錐体細胞の壊死が拡大した。

- 2) 回復30分後に細胞変性を認めないCA1外側部でMAP2の一過性の染色性低下を認め、2時間後には回復していた。この一過性の染色性低下は興奮性神経伝達物質グルタミン酸のNMDA型受容体拮抗薬で完全に阻止された。
- 3) 回復2時間から7日後まで歯状回堤部、支脚からCA1への神経細胞壊死の拡大に伴いMAP2染色性の低下範囲も拡大した。脳虚血で特徴的な細胞変性に先行するMAP2染色性の早期脱落は認められなかった。
- 4) GAP43の染色性は歯状回堤部の神経細胞変性早期から同部の樹状突起が分布する内分子層で染色性が軽度増強し、7日後には増強が顕著となり、同層を越え顆粒細胞層の壊死細胞周囲にまで拡大した。支脚からCA1では変性した錐体細胞の樹状突起末端部の網状分子層でGAP43の染色性が増強していた。synaptophysinの染色性の変化はGAP43に類似していたが軽度であった。

[考 察]

低血糖性の神経細胞障害は脳虚血性のものと同様、グルタミン酸のNMDA型受容体の非生理的活性化に起因し、早期に樹状突起から変性が開始すると報告されている。しかし神経細胞変性の障害部位、進展経過は両者で異なる。低血糖昏睡後、MAP2の染色性低下が神経細胞変性と同時に認められ、神経細胞変性に先行して早期脱落する脳虚血モデル(砂ネズミモデル)とは異なっていた。また海馬CA1の外側部では回復30分に神経細胞変性を伴わないMAP2の一過性の染色性低下が認められたが2時間後には回復し、特異的な変化を呈した。この変化はNMDA型受容体拮抗薬で阻止されたことからNMDA型受容体を介する機序が働いていると考えられる。同部はCA1の中でも比較的変性が遅れる領域であることから、低血糖の影響は受け易いが回復する可能性があることが示唆される。

神経細胞壊死部で、GAP43の染色性が増強していることは、同部のシナプス前部でこの蛋白がsynaptogenesisあるいは持続的な神経伝達物質の過剰放出を促している可能性が考えられる。また低血糖回復後30分と極めて早期からGAP43が変性部位で増強していることは、GAP43が低血糖性神経細胞障害の発症に関与している可能性も否定出来ない。

[結 論]

低血糖性脳障害の障害部位と進展機序は脳虚血と異なること、神経細胞の変性過程あるいは神経シナプスの修復過程にGAP43が関与している可能性が示唆された。低血糖性脳障害の発症機序解明や予防的治療法の開発にMAP2及びGAP43を用いた免疫組織学的検討が有用であると考えられる。

学位論文審査の結果の要旨

厳格な血糖コントロールを得るためにインスリン強化療法が普及し、糖尿病患者が低血糖を経験する頻度が高くなっている。一方、遷延性低血糖は不可逆的に糖尿病患者の高次脳機能を障害することが報告されている。本論文はこうした臨床上の問題を背景として、低血糖性中枢神経障害の発症進展機序を解明することを目的に検討したものである。

実験として、ラットに30分間の平坦脳波を引き起こす低血糖昏睡を惹起させ、低血糖回復後、急性期から7日後まで海馬における神経細胞障害の発症進展経過を障害機転に密度に関与するシナプス領域に着目し免疫組織学的に検討した。すなわち、神経樹状突起部での変性マーカーとして微小管関連蛋白2 (MAP2)、シナプス前終末のマーカーとしてシナプトフィジン、さらに軸索成長・シナプス

形成・神経伝達物質放出などに関与する成長関連蛋白43 (GAP43) の動態をそれぞれの抗体を用いて検討した。

低血糖昏睡から回復後の早期では、神経細胞変性が認められないにもかかわらず、CA1外側部では一過性にMAP2染色性の低下が観察され、この変化はNMDA受容体拮抗薬の前投与により阻止された。この所見は、CA1領域の外側部は内側部に比べ、低血糖の影響の受けやすいものの回復能が高いことを示唆している。低血糖による神経細胞変性がみられる早期では、MAP2の染色性は歯状回およびCA1領域で低下したが、GAP43の染色性は逆に増加した。しかも、この染色性の変化は神経細胞変性の重篤度に比例して増強の蛍光がみられた。なお、シナプトフィジンの染色性もやや増強したがGAP43の場合よりも軽度であった。

このような低血糖による神経細胞の変性過程において、MAP2およびGAP43の染色性は相反する方向性を示すが、海馬領域の空間的位置関係のみならず経時的变化も一致するので、神経変性の機序とGAP43の染色性増強という現象の間には密接な関係があると推測される、おそらくGAP43は神経細胞の変性後に生じるシナプスの修復・再生に寄与するか、あるいは興奮性神経伝達物質の持続的放出による神経細胞変性の促進機構に係わるのではないかと推論された。

本研究により、低血糖による神経傷害の発症・進展を基礎的に解明するにあたりMAP2およびGAP43等のシナプス関連物質に焦点をあてた免疫組織学的な検索の有用性が示され、さらにはGAP43がこのモデル系においてシナプス変性ないし修復過程に密接な関与をもつ可能性が示された。したがって、低血糖性の中枢神経障害の発症進展機序を究明する上で意義深いものと考えられ、博士(医学)の学位に値すると評価された。