

Title	'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain
Author(s)	Kitagawa, Kazuo
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3052230">https://doi.org/10.11501/3052230</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名・(本籍)	きた 北	がわ 川	かず 一	お 夫
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	9403	号	
学位授与の日付	平成2年	11月	6日	
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	脳虚血における神経細胞障害と耐性獲得現象の発現 — “Ischemic tolerance” phenomenon —			
論文審査委員	(主査) 教授	鎌田 武信		
	(副査) 教授	田川 邦夫	教授	多田 道彦

## 論文内容の要旨

### 〔目的〕

脳虚血病態の解明に際して、虚血に対する神経細胞の負荷応答の検索は必須である。しかし神経細胞が虚血にきわめて脆弱なため、これまで神経細胞にとって致死的な虚血負荷に対する障害機構に関する報告は多くなされてきているが、非致死的な虚血ストレスが神経細胞の負荷応答性に及ぼす影響について検討した報告は見られない。本研究では、神経細胞の虚血性障害を形態的に鋭敏にとらえる方法をあらたに開発するとともに、可逆的な虚血負荷を予め加えておくことが神経細胞に本来致死的な虚血侵襲に対する耐性を誘導するか否かについて検討した。

### 〔方法ならびに成績〕

動物は成熟砂ネズミ（体重60-80g）を用いた。

#### (1) 虚血性神経細胞障害の鋭敏な形態的検索法の開発

神経細胞は細胞体、樹状突起、軸索、シナプス終末部の各部分から成り各々の虚血による障害機構は異なるものと考えられている。このような細胞下の各コンパートメント別に障害過程を検索するには各コンパートメントに局在する蛋白質をマーカーとした免疫組織化学的手法はきわめて有用なものと考えられる。本研究では細胞体、樹状突起に局在する微小管結合蛋白2 (MAP2) と、シナプス終末部に局在しシナプス小胞の開口、放出に関与しているSynapsin I (Syn I) を各々のコンパートメントのマーカーとして用いた。

(方法) 正常砂ネズミ脳における両者の分布を調べるため、無処置砂ネズミ4匹を断頭屠殺し、ただ

ちに脳を取り出し酢酸-エタノール混合液に浸漬固定後パラフィン包埋し、ラビット抗MAP2抗体、ラビット抗Syn I抗体を用い、PAP法による光顕的な免疫組織化学的検索に供した。脳虚血時の検索にはあらたに開発した一時的総頸動脈結紮法により予め選別した一側総頸動脈結紮により重症片側脳半球虚血を作成しうる事の明らかな砂ネズミを対象とした。これら砂ネズミの右総頸動脈を軽エーテル麻酔下に露出し覚醒後二重結紮した。非結紮偽手術例、結紮後2分、3分、5分、10分、15分、30分の各々4匹を断頭屠殺し、ヘマトキシリンエオジン(HE)染色及び抗MAP2抗体、抗Syn I抗体を用いた免疫組織化学的検索に供した。

(結果) 正常砂ネズミ脳において、MAP2は細胞体、樹状突起に局在するのに対し、Syn Iは細胞体、樹状突起、軸索には免疫反応を認めず、それらの構造物を取り囲むシナプス終末の局在領域に密に分布していた。脳虚血時にはMAP2の免疫反応は虚血後2分までは変化がなかったが、3分後には全例に海馬subiculum-CA1領域にMAP2免疫反応の低下した病変部を、また5分後には海馬CA2領域、大脳皮質II/IV層にも同様な虚血病変を認めた。30分後には虚血側大脳皮質、線条体、海馬、視床に及ぶ広範な領域にMAP2の免疫反応の低下、消失した虚血病変を認めた。一方、HE染色では虚血30分時に初めて視床で神経網の空胞化を認めた以外、明らかな病変を認めず、またSyn Iの免疫反応は虚血30分後までには虚血側、非虚血側の両半球において低下、消失した領域を認めなかった。以上の結果よりシナプス後膜側に局在するMAP2が虚血障害にきわめて脆弱であることが強く示唆された。またMAP2をマーカーとした免疫組織化学的手法が虚血性神経細胞障害の鋭敏な形態的観察法であることが明らかとなった。

## (2) 非致死的な虚血負荷の虚血性神経細胞障害に及ぼす影響

海馬CA1神経細胞は脳虚血侵襲に最も脆弱な細胞として知られている。砂ネズミでは両側総頸動脈5分間閉塞による前脳虚血により血流再開後4日目以後に同領域の神経細胞が選択的に壊死、脱落していくことが遅発性神経細胞壊死として報告されている。従って、虚血耐性現象の発現を検討する上でこの5分虚血を海馬CA1神経細胞にとって致死的な虚血負荷として用いた。一方非致死的な虚血負荷としては抗MAP2抗体を用いた免疫組織染色にて虚血中に免疫反応の低下した虚血病変を認めず、血流再開後も神経細胞壊死を生じなかった2分までの虚血を用いた。

(方法) 成熟砂ネズミ61匹を対象とし、脳虚血の作成は軽エーテル麻酔下に両側総頸動脈を剥離、露出し麻酔より覚醒後ただちにクリップする事により行った。虚血中の体温は37℃に保った。動物は以下の7群に分類した。A群：偽手術群(N=5)、B群：5分虚血のみ(N=10)、C群：2分虚血1日後に5分虚血(N=9)、D群：2分虚血2日後に5分虚血(N=10)、E群：2分虚血を1日間隔で2回加えた2日後に5分虚血(N=11)、F群：2分虚血を12時間間隔で2回加えた12時間後に5分虚血(N=6)、G群：1分虚血を1日間隔で2回加えた2日後に5分虚血(N=10)。動物は5分虚血後血流再開し7日後に断頭屠殺し、HE染色、抗MAP2抗体を用いた免疫組織染色に供した。海馬CA1神経細胞壊死の程度はGrade 0；壊死細胞を認めない、Grade I；数個の壊死細胞を散見するのみ、Grade II；壊死細胞と正常細胞が混在する、Grade III；大部分の神経細胞が壊死に陥っている、の4段階に分類した。

(結果) A群の偽手術例では5例全例がGrade 0で壊死細胞を認めず、B群の5分虚血のみを加えた群では10例中9例がGrade III, 1例がGrade IIを示し、全例に神経細胞壊死を認めた。5分虚血を加える1日または2日前に一度だけ2分虚血を加えたC群、D群では各々9例中5例、10例中6例がGrade 0またはIを示し保護効果が認められた。さらに5分虚血を加える2日前に1日間隔で2分虚血を2回加えたE群では全例がGrade 0 (N=9) またはI (N=2)を示し顕著な神経細胞保護効果が認められた。しかしながら5分虚血を加える前に12時間という短い間隔で2分虚血を2回加えたF群や、E群と同じ時間間隔で2分虚血の代わりにより軽い虚血負荷である1分虚血を加えた場合には全例がGrade II またはIIIの細胞壊死を呈し保護効果が認められなかった。以上の結果より、砂ネズミ海馬CA1神経細胞において、予め非致命的な2分虚血を1日以上の間隔をあけて負荷しておくことにより5分虚血後に生ずる神経細胞壊死を抑制しうる事が示され、神経細胞が本来致命的な虚血に対する耐性を獲得した事が示された (“Ischemic tolerance” phenomenon)。

#### 〔総括〕

1. 虚血性神経細胞障害の鋭敏な形態的評価法として抗MAP2抗体を用いた免疫組織化学的手法をあらたに開発した。
2. 予め非致命的な虚血負荷を加えておく事により遅発性神経細胞壊死に対する顕著な保護効果を認め、神経細胞の本来致命的な虚血侵襲に対する耐性現象の発現を始めて明らかとした。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は砂ネズミ脳虚血モデルを用い、虚血性神経細胞障害の鋭敏な形態的検索法として、微小管結合蛋白2をマーカーとした免疫組織化学的手法をあらたに確立した。さらにあらかじめ非致命的な虚血負荷を加えておくことにより神経細胞の本来致命的な虚血侵襲に対する耐性獲得現象の発現を初めて明らかとした。この結果は神経細胞の虚血障害や虚血に対する負荷応答を解明する上で極めて重要であり、本論文は医学博士論文に値するものであると考える。