



Title	Hippocampal neurons become more vulnerable to glutamate after subcritical hypoxia : an in vitro study
Author(s)	甲村, 英二
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/37820">https://hdl.handle.net/11094/37820</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	甲 村 英 二
博士の専攻分野 の 名 称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 10015 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 4 年 2 月 4 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第2項該当
学 位 論 文 名	Hippocampal neurons become more vulnerable to glutamate after subcritical hypoxia: an in vitro study (低酸素負荷後のグルタミン酸による神経細胞傷害 —培養海馬神経細胞を用いての解析—)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 早川 徹 (副査) 教 授 西村 健 教 授 津本 忠治

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔 目 的 〕

脳虚血やてんかんをはじめとした種々の病態における神経細胞傷害機構へのグルタミン酸 (Glu) の関与が注目されている。しかしながら Glu は生理的神経伝達物質であり、神経毒としての作用発現に至る機序には未だに明確でない点が存在する。神経細胞が subcritical な虚血または低酸素負荷を受けることにより、その後にはグルタミン酸に対してより脆弱になるのではないかと推論し、培養海馬神経細胞を用いて低酸素負荷を加えることによる Glu に対する感受性の変化を検討するとともに、神経細胞傷害機序をグルタミン酸レセプターに対する選択的拮抗剤を用いて解析することを本研究の目的とした。

#### 〔 方 法 〕

妊娠18日齢ラット胎仔より得た単離海馬神経細胞を低細胞密度 (生細胞 100 個 /  $\text{mm}^2$ ) で無血清培地 (0.8 mM  $Mg^{2+}$  を含む) を用いて培養した。今回用いた培養系ではグリア細胞の増殖はわずかであり、その影響は無視し得ると考えられた。培養 3 日目に低酸素容器 (95%  $N_2$ , 5%  $CO_2$ ) にプレートを入れ、低酸素負荷を加えた。低酸素容器より取り出した直後に薬剤を加え、通常培養条件のもとでさらに24時間培養した。薬剤は Glu の他にアゴニストとして NMDA (N-methyl-D-aspartate), 拮抗剤としては NMDA レセプターに対しての MK-801 (+)-5-methyl-10, 11-dihydro-5H-dibenzo [a, d, ] cyclo-hepten-5, 10-imine hydrogen maleate } 及び AMPA ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate) レセプターに対しての CNQX (6-cyano-7-nitro-quinoxaline-2,3-dion)

を用いた。生存神経細胞数の計測は形態学的に行った。死滅細胞のほとんどは24時間の培養中に脱落するが、位相差顕微鏡下で付着している神経細胞のうち樹状突起の消失したものや、神経細胞体の膨化、空泡化を来たものは死滅細胞とみなし除外した。各ウェルあたり10視野（X100）において生存ニューロンを計数しその平均をウェルの代表値とした。それぞれの実験条件において6ウェルの平均値を求め、同時に行ったシスターカルチャーでの生存細胞数との比より生存率を算出し統計的処理を行った（Student t-test）。

#### 〔成 績〕

低酸素容器内では培養液中の  $\text{PO}_2$  は時間と共に指数関数的に減少し、2時間後には40mmHg、3時間後には30mmHgに低下した。3時間の低酸素負荷では24時間後には大半の神経細胞は死滅し生存率は  $31.7 \pm 13\%$  ( $p < 0.01$ ) となったのに比し、2時間の低酸素負荷では生存率は  $79.1 \pm 7.3\%$  であり subcriticalと考えられた。低酸素負荷を行わない場合には培養海馬ニューロンに対する Glu の細胞毒性は、1 mM の濃度ではじめて認められた ( $50.3 \pm 11\%$ ,  $p < 0.01$ )。他方、低酸素負荷直後に Glu を加えると、生存率は  $10 \mu\text{M}$  以上の Glu 濃度で有意の減少をみた ( $10 \mu\text{M}$ :  $80.9 \pm 10\%$ ,  $100 \mu\text{M}$ :  $64.1 \pm 4.1\%$ ,  $p < 0.01$ )。NMDA による神経毒性は低酸素負荷の有無にかかわらず 1 mM の濃度で認められた ( $57.1 \pm 4.2\%$ ,  $p < 0.01$ )。MK-801 は NMDA による神経毒性を完全に抑制し得た。Glu に対しては、低酸素負荷後の  $10 \mu\text{M}$  Glu による神経毒性を完全に改善した (hypoxia 2 h + Glu  $10 \mu\text{M}$  + MK-801  $0.2 \mu\text{M}$ ;  $99.5 \pm 11\%$ ) が、 $100 \mu\text{M}$  Glu による神経細胞傷害の改善は不十分であった (hypoxia 2 h + Glu  $100 \mu\text{M}$  + MK-801  $0.2 \mu\text{M}$ ;  $78.8 \pm 8.1\%$ , hypoxia 2 h + Glu  $100 \mu\text{M}$  + MK-801  $2 \mu\text{M}$ ;  $75.4 \pm 16\%$ )。他方、CNQX は低酸素負荷後の  $100 \mu\text{M}$  Glu の神経毒性をも完全に抑制し得た (hypoxia 2 h + Glu  $100 \mu\text{M}$  + CNQX  $5 \mu\text{M}$ ;  $94.2 \pm 6.1\%$ , 対照との有意差を認めず)。

#### 〔総 括〕

subcritical な低酸素負荷を加えられた神経細胞は、通常では神経細胞傷害を惹起しないような低濃度のグルタミン酸が持続的に存在することにより容易に神経細胞死に至ることが明らかとなった。この現象は、脳虚血などの各種病態における遅発性の神経細胞死の機序を理解する上で、重要な意義を有すると考えられる。また、これまでグルタミン酸の神経細胞傷害機序に NMDA レセプターが着目されてきたが、本実験系では NMDA のみならず non-NMDA レセプターも神経細胞傷害の発現に関与することが示された。さらにはグルタミン酸による神経細胞傷害の防止に、AMPA レセプター拮抗剤が NMDA レセプター拮抗剤よりも有効である可能性が示された。

### 論文審査の結果の要旨

脳梗塞の臨床的治療に際しては、重度の脳虚血自体による神経細胞の損傷を防止することのみなら

す、脳虚血後に進行する梗塞周囲の神経細胞傷害の防止ならびに軽減をはかることは重要な問題である。これまでこのような病態における神経細胞傷害への興奮性アミノ酸の関与が示唆されてきた。本研究は、興奮性アミノ酸による神経細胞傷害機序の解明のために海馬神経細胞の低密度培養系と低酸素負荷を組合せて基礎的な検討を行ったもので、閾値以前の低酸素負荷を受けた神経細胞が、通常状態では神経細胞傷害を惹起しない濃度のグルタミン酸により細胞死に至ることを示した。またグルタミン酸のレセプターのうち NMDA のみならず AMPA レセプターの神経細胞傷害への関与を示唆した。本研究は脳虚血後の神経細胞傷害機序の解明に寄与するものであり、学位に値するものと考える。