

Title	Persistent degenerative state of non-pyramidal neurons in the CA1 region of the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia
Author(s)	福田, 孝一
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38132
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	福 田 孝 一
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 10684 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 5 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科外科系専攻
学 位 論 文 名	Persistent degenerative state of non-pyramidal neurons in the CA1 region of the gerbil hippocampus following transient forebrain ischemia (一過性脳虚血の後に砂ネズミの海馬 CA1 領域の non-pyramidal neuron が示す持続的変性状態)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉 矢 生 人 (副査) 教 授 橋 本 一 成 教 授 塩 谷 弥 兵 衛

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

心肺蘇生や脳血管障害の治療において、一時的に虚血に陥った神経細胞を障害から守る方法はいまだに見いだされていない。筆者は短時間の虚血の後に神経細胞がたどる変化とその機序を解明することが脳蘇生治療の発展に基礎的知見を提供すると考え、5 分間の脳虚血後の海馬の神経細胞が示す変化を形態学的に詳細に観察した。その結果、従来より良く知られているような虚血に抵抗性を有する神経細胞群と容易に壊死に陥る神経細胞群に加えて、第三のカテゴリとして、一過性虚血の後少なくとも数週間におよぶ持続的な変性状態を示す神経細胞の存在を見だし、その性質を調べた。

(方 法)

37匹の雄の砂ネズミ (68-80g) を用い、5 匹を正常例、7 匹を偽手術例、25 匹を虚血例とした。一過性の脳虚血を以下の方法で動物に負荷した。95% O₂, 5% CO₂ 混合ガスを使用し、自発呼吸下のハロセンによる麻酔の導入 (濃度 3%)・維持 (2%) を行なった。直腸温を 38.5±0.5℃ に保ちながら頸部皮膚を正中切開し、両側総頸動脈に糸をかけたのちハロセンと酸素の投与を中止し、5 分後に外科用小クリップで両側総頸動脈の血流を 5 分間遮断した。血流再開後創を縫合し、虚血操作中に呼吸不全により死んだ 2 匹を除く他の動物を、固定を行なうまで定められた期間 [5 時間 (n=4), 7 日 (n=7), 3 週間 (n=5), 6 週間 (n=7)] 飼育した。偽手術例は虚血後 7 日間飼育した。血流の遮断と再開は実体顕微鏡で確認した。

灌流固定のために動物をペントバルビタールで麻酔し、気管切開後 95% O₂, 5% CO₂ にて人工呼吸下に開胸した。良好な拍動が保たれている左心室内にヘパリン 20 単位 (0.02ml) を投与し、約 1 分後に左心室を切開して上行大動脈から 2.5% グルタルアルデヒド + 2% パラホルムアルデヒド (0.1M リン酸緩衝液, pH7.4) 400ml によりすみやかに灌流固定を行なった。灌流終了後動物を冷蔵庫内に一晩静置し、翌日圧迫を加えないよう留意して脳を取り出した。光学顕微鏡観察のために海馬をパラフィンに包埋し、6 μm の切片を hematoxylin-eosin で染色した。電子顕微鏡的観察のためには 50 μm の vibratome 切片を作製し、2% OsO₄ による後固定、酢酸ウランによるブロック染色の後、超薄切片を作製した。免疫組織学的観察のためには動物を PLP 液で灌流固定し、vibratome 切片を ABC 法で染色した。用いた 3 種の一次抗体は (1) parvalbumin (PV) (2) M および H 型の非リン酸化 neurofilament (npNF) (3) 微小管関連蛋白 (MAP2) をそれぞれ認識するものである。(1)(2) は non-pyramidal neuron のマーカーとして、(3) は神

経細胞の一般的マーカーとして用いた。

(成 績)

正常例、偽手術例いずれの海馬においても神経細胞の変性・壊死像は見られなかった。虚血後5時間では光顕上は海馬のCA1領域の神経細胞に著変を認めなかったが、電顕的にはpyramidal neuronの細胞質に電子密度の高い由来不明の異常な物質が既に存在していた。non-pyramidal neuronは正常であった。7日目のCA1領域ではほとんどすべてのpyramidal neuronが壊死に陥り、よく知られた遅発性神経壊死の像を呈していた。一方CA1領域のnon-pyramidal neuronは、光顕的に核と細胞質が収縮しかつ色素に濃染する変性状態を示した。電顕的に核と細胞質の電子密度の著しい上昇が観察されたが、ミトコンドリア、粗面小胞体、ゴルジ装置の基本的形態は保たれており、生存の可能性を示していた。3週間および6週間後にはpyramidal neuronは細胞の形を失った残余物のみとなっていたが、non-pyramidal neuronは7日目と同様の変性状態を持続していた。免疫組織学的観察では、正常例のCA1領域のnon-pyramidal neuronに特異的にみられたPV、npNFの免疫反応性が6週間後には全く消失していた。しかし隣接するCA3領域や歯状回の細胞の反応性は変わらなかった。6週後のCA1におけるMAP2の免疫染色の消失は、持続的変性に陥ったnon-pyramidal neuronの分布がCA1のほぼ全域におよぶことを示した。

(総 括)

(1)海馬のCA1領域においてnon-pyramidal neuronは5分間の一過性脳虚血によりpyramidal neuronが完全に壊死したあとも生存するが、特異な持続的変性状態に陥ることを明らかにした。(2)細胞骨格であるnpNFやMAP2の免疫反応性の消失は、変性状態にあるnon-pyramidal neuronでは神経細胞としての基本的な機能が障害されていることを示唆した。

論文審査の結果の要旨

中枢神経系が虚血に陥ったとき、不可逆的变化を受けやすい神経細胞の損傷を最小限にいとめることの重要性は言を待たないが、その有効な治療法は見いだされていない。これは一つには虚血性神経細胞障害の本態がまだ部分的にしか解明されておらず、動物実験の成果を臨床応用に結び付けるには、その未知に由来すると思われる幾多の障壁が存在しているからである。本研究は、一過性虚血の後に神経細胞に生じる変化を、形態学的方法を駆使して詳しく観察し、虚血性神経細胞障害の特徴をつかまえることから脳虚血治療への新しいアプローチ法をさぐろうとするものである。その結果、従来より良く知られているような虚血に抵抗性を有する神経細胞群と容易に壊死に陥る神経細胞群に加えて、第三のカテゴリーとして、一過性虚血の後少なくとも数週間におよ持続的な変性状態を示す神経細胞の存在がはじめて見いだされた。そしてこの持続的変性の原因に対するきわめて興味深い説明として、非錐体細胞が標的(壊死した錐体細胞)から受け取るべき何らかの神経栄養因子の枯渇による可能性が考察されている。従来虚血後の脳機能の脱落は神経細胞の不可逆的損傷(=壊死)を意味するものと考えられがちであったが、本研究によって変性状態を示しながらも生存を続ける神経細胞の存在が明らかにされ、脳虚血後の病態の理解に新たな視点が加えられたとともに、慢性期患者の脳機能改善への新しいアプローチ法の可能性を示唆しており、脳虚血治療の研究に大きく寄与するものであり、学位授与に値すると認める。