The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	脳虚血におけるグルタミン酸過剰放出の役割とその機序に関する研究
Author(s)	玄番, 岳践
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39528
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 13 】

氏　　名	玄　番　岳　践（げん　ば　たけ　ふみ）
博士の専攻分野の名称	博　　士　（　薬　学　）
学　位　記　番　号	第　１２１８３　号
学位授与年月日	平成７年１２月６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	脳虚血におけるグルタミン酸過剰放出の役割とその機序に関する研究
論文審査委員	(主査) 教　授　馬場　明道 (副査) 教　授　前田　正知　　教　授　宮本　和久　　教　授　西原　　力

論　文　内　容　の　要　旨

グルタミン酸は中枢神経系に高濃度に存在し，興奮性神経伝達物質として働いており，高次神経機能と深い関連を有していることが報告されている。近年，培養神経細胞に高濃度のグルタミン酸を作用させることにより細胞死が生じることが明らかとなり，グルタミン酸の興奮毒性が注目されるようになった。一方，脳卒中などで脳組織が虚血状態にさらされると神経細胞が傷害されるが，脳虚血時における細胞傷害に対するグルタミン酸の役割については未だ明確になっていない。脳卒中易発症性高血圧自然発症ラット（SHRSP）は遺伝的に脳卒中に容易に発症するため，虚血性脳血管障害モデル動物として広く用いられている。最近SHRSPが他の系統に比べて実験的脳虚血により障害を受けやすいことが報告された。そこでSHRSPの脳虚血に対する脆弱性にグルタミン酸の過剰放出の関与について検討する目的で，マイクロダイアリシス法を用い脳虚血時のグルタミン酸過剰放出と神経細胞傷害を比較した。

まず20分間両側総頚動脈閉塞による一過性前脳虚血モデルを用い，SHRSP，SHRSRおよび正常血圧ラットであるWKYにおけるグルタミン酸放出量と細胞傷害を比較した。ラットの海馬CA1領域に挿入したマイクロダイアリシスプローブより細胞外グルタミン酸濃度を経時的に測定した。また，脳虚血－再開通7日後の海馬CA1領域の錐体細胞密度を神経細胞傷害の指標とした。海馬CA1領域の遅発性神経細胞壊死はWKYにおいてはほとんど生じなかったが，SHRSPにおいては有意に低下した。細胞外グルタミン酸濃度は，虚血負荷前すなわち正常時においては系統間に差は認められなかったが，両側頚動脈結紮による細胞外グルタミン酸濃度上昇はSHRSPではWKYに比較して有意に高かった。次に局所脳虚血モデルを用い同様に検討した。局所脳虚血は光増感局所的血栓作成法により中大脳動脈を閉塞した。虚血中心部あるいは周辺部にマイクロダイアリシスプローブを挿入し，細胞外グルタミン酸濃度を測定した。虚血24時間後に脳を摘出し，梗塞面積を測定し細胞傷害の指標とした。大脳皮質における梗塞体積はSHRSPの方がWKYに比較して有意に大きく，線条体においては差が認められなかった。虚血中心部における細胞外グルタミン酸濃度は両系統間で差は認められなかったが，虚血周辺部においてはSHRSPがWKYに比較して有意に高値を示した。すなわち，脳虚血時のグルタミン酸放出量が同程度であった線条体においては，梗塞サイズにも変化は認められなかったが，グルタミン酸放出量に差がみられた大脳皮質においては，SHRSPのみが著しい傷害を受けた。以上の結果より脳虚血後の

急性細胞傷害および亜急性の選択性神経細胞傷害に対して，グルタミン酸の過剰放出が密接に関与していることが示唆された。

次に，脳虚血時のグルタミン酸放出メカニズムについて検討した。これまで虚血時におけるグルタミン酸放出機構に関する研究はほとんど in vitro の実験で行われてきた。それらの報告では，虚血性グルタミン酸放出はCa^{2+}非依存性を示唆するものが多い。一方，in vivo においては詳細な検討は行われていない。そこで，まず培養細胞を用いCa^{2+}非依存性のグルタミン酸放出機構について検討し，さらにマイクロダイアリシス法を用いた in vivo におけるグルタミン酸放出機構のCa^{2+} 依存性について検討した。神経細胞およびグリア細胞の細胞膜には，Na^{+}－依存性グルタミン酸輸送系が存在し正常時には，細胞内外のNa^{+}濃度勾配に依存してグルタミン酸を細胞内へ取り込む働きを担っている。そこで，培養アストロサイト細胞を用い虚血条件下におけるNa^{+}－依存性グルタミン酸輸送系を介したグルタミン酸放出の依存を明らかにし，その動力学的解析を行った。培養アストロサイトに［^{3}H］－グルタミン酸を取り込ませた後，ヨード酢酸（IAA）を処置すると，細胞内［^{3}H］－グルタミン酸含量は無処置群と比較して約40％減少したことから，IAA処置によりグルタミン酸放出が生じたと考えられる。そこでIAAによるグルタミン酸放出がNa^{+}－依存性グルタミン酸輸送系の逆回転を介しているものであるかについて検討した。IAAによるグルタミン酸の放出は，細胞外K^{+}減少に依存して低下し，除去することにより消失した。また，細胞内Na^{+}濃度はIAAを添加することにより増加した。Na^{+}－依存性グルタミン酸輸送系はは1分子のグルタミン酸を輸送すると同時に3分子のNa^{+}を取り込み，逆方向に1分子のK^{+}を輸送する，すなわちIAA処置によるin vitro虚血条件下におけるグルタミン酸放出は，Na^{+}－ 依存性グルタミン酸輸送系の逆回転を介するCa^{2+}非依存性に生じることが示された。

次に，in vivo における脳虚血時のグルタミン酸放出メカニズム，特にそのCa^{2+}依存性について検討した。実験はSHRSPの一過性前脳虚血モデルを用い，虚血性グルタミン酸放出および神経細胞傷害に対するCa拮抗薬の効果について検討した。Ca拮抗薬は脳卒中治療効果を有し，脳への移行性が優れていることが既に報告されているジヒドロピリジン系Ca拮抗薬S－312－dと，対照薬としてnimodipineを用いた。両側総頚動脈結紮による著しい血圧および心拍数の上昇は，両Ca 拮抗薬の前処置により抑制された。一方，脳虚血時のグルタミン酸放出量はS－312－d投与群ではコントロール群の1／5 に抑制されたのに対し，nimodipine投与群では全く抑制されなかった。一過性前脳虚血－再開通後の遅発性神経細胞壊死に対しては，S－312－d投与群では用量依存的な保護作用を示したが，nimodipine投与群では抑制作用を示さなかった。以上の結果より，脳虚血時のグルタミン酸放出の大部分はCa^{2+}依存性であることが示唆された。また，S－312－dにより中枢性 Ca channel が阻害されたため虚血性グルタミン酸放出が抑制され，細胞傷害保護作用を示したと考えられる。

以上の結果により，脳虚血時に放出されるグルタミン酸はその後の神経細胞傷害の進展に重要な役割を演じていることが明らかとなった。また脳虚血時におれるグルタミン酸放出は大部分がCa^{2+}依存性であるが，Na^{+}－依存性グルタミン酸輸送系の逆回転を介するCa^{2+}非依存性放出機構も一部関与していることが示された。

論文審査の結果の要旨

本論文は虚血脳傷害の発生をその部位でのグルタミン酸の放出に依るものとする仮説を複数の実験系で実証したものである。自然発症高血圧ラットのうち脳卒中易発性ラットは虚血による神経細胞死もきわめて高く，その時にみられるグルタミン酸放出も著しく高いものであった。更に，in vitro の系においてグリア細胞からのグルタミン酸の放出がトランスポーターの逆反応で生じること，in vivo においては虚血でのグルタミン酸の放出が新規合成されたCa^{2+}チャンネル拮抗剤で抑制されると同時に，細胞傷害も抑制されることを明らかにした。

本知見は虚血脳傷害とグルタミン酸の関連について特にその過剰遊離との関連を明らかにした点において評価されるもので，博士学位授与に価すると判断した。