



Title	Measurement of regional N-acetyl aspartate after transient global ischemia in gerbils with and without ischemic tolerance : an index of neuronal survival
Author(s)	中野, 美佐
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41198">https://hdl.handle.net/11094/41198</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	中 なか 野 の 美 美 佐 さ
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 2 1 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 10 年 12 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	Measurement of regional N-acetyl aspartate after transient global ischemia in gerbils with and without ischemic tolerance : an index of neuronal survival (虚血耐性下及び非耐性下における砂ネズミ一過性全脳虚血後の局所 N-acetyl aspartate 量の測定：残存神経細胞の指標として)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 柳原 武彦 (副査) 教 授 遠山 正弥 教 授 祖父江憲治

### 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】 N-acetyl aspartate (NAA) は大脳神経細胞に高濃度に特異的に存在し、臨床的にも Magnetic Resonance Spectroscopy 法にて鮮明なピークとして見出されることから、種々の疾患における局所脳機能の指標となりうる可能性が期待されている。しかし実際に組織障害の程度と NAA 量を同時に調べた報告は極めて少なく、NAA の意義については不明な点が多い。本研究では、砂ネズミ脳虚血モデルを用い、(1)海馬 CA1 領域における血流再開後の NAA 量の経時的变化と虚血耐性現象誘導における NAA 量の変動 (2)脳保護効果を有する AMPA/KA 受容体拮抗剤投与後の NAA 量の変動 (3)虚血に対する脆弱性の異なる脳の各部位 (海馬 CA1, 線条体背外側部, 視床腹側核) における NAA 量の変化と組織所見との比較検討により、NAA 量が組織障害の指標となりうるか否かを検討した。

【方法】 (1)雄性砂ネズミ (50-80 g) を用い、エーテル麻酔下で aneurysmal clip にて 5 分間両側総頸動脈を閉塞後再灌流を行った。砂ネズミを次の 4 群に分けた。

(A) control (CRL) 群 (n=6)-偽手術 (B) non preconditioning (non-p) 群- 5 分虚血後 3 時間, 1 日, 3 日, 7 日, 4 週間再灌流群 (各 n=6) (C) double preconditioning (double-p) 群- 5 分虚血の 2 日前に 2 回の 2 分虚血を 1 日おいて施行後, 3 時間, 3 日, 7 日間再灌流群 (各 n=6) (D) single preconditioning (single-p) 群- 5 分虚血の 2 日前に 1 回の 2 分虚血を施行後, 7 日間再灌流群 (各 n=6)。

各動物はペントバルビタール麻酔下で液体窒素中で凍結し、-25°Cで脳を単離した。クリオスタッツを用いて海馬のレベルで 10 μm 厚及び 20 μm 厚の切片を作製した。10 μm 厚切片に対し cresyl violet 染色を施し、海馬 CA1 内側の 1 mm 幅の領域での障害のない神経細胞数を計測した。20 μm 厚切片は凍結乾燥した後、実体顕微鏡下で海馬 CA1 領域を単離し、100-150 μg の CA1 切片を集め、0.5 N PCA で抽出した。1 N KOH で中和後、上清 10 μl 中の NAA 量を DEAE-2SW anion-exchange column を用いた HPLC system にて求めた。以上より、NAA 量・神経細胞数の経時的变化、及び再灌流 7 日目における両者の相関を調べた。

(2) 予め選別した脳虚血易発症砂ネズミを用い、5 分間片側総頸動脈を閉塞し、再灌流開始 60, 75, 90 分後 6-(1H-imidazol-1-yl)-7-nitro-2,3(1H, 4H)-quinoxalinedione monohydrochloride (YM90K) 25 mg/kg もしくは生理食塩水を

投与し、虚血側及び非虚血側における再灌流 7 日後の海馬 CA1 の NAA 量及び神経細胞数を上記方法で測定し、% NAA (虚血側/非虚血側 NAA) を算出した。

(3)10分間両側総頸動脈閉塞後再灌流 7 日後の脳を用い、海馬 CA1、線条体背外側部、視床腹側核を単離し同様の方法で NAA 量、神経細胞数を求めた。

#### [成績]

(1) 5 分両側総頸動脈結紮後、海馬 CA1 の NAA 量 (pmol/ $\mu$ gdwt.) は Non-p 群では、CRL 群 ( $32.9 \pm 3.0$ ) に対し再灌流 3 時間、1 日では変化なく、3 日後では ( $24.0 \pm 3.0$ ) に、7 日後では ( $17.9 \pm 2.5$ ) と低下したが ( $p < 0.01$ )、4 週間後には ( $17.4 \pm 1.6$ ) と横ばいであった。Single-p 群では 3 日後では ( $26.7 \pm 6.3$ ) と低下したが ( $p < 0.01$ )、7 日後では ( $26.4 \pm 3.0$ ) と横ばいであった。Double-p 群では CRL 群に比較し差がなかった。海馬 CA1 の神経細胞数 (cells/mm<sup>2</sup>) は、Non-p 群では CRL 群 ( $203 \pm 9$ ) に対し再灌流 3 時間、1 日では変化なく、3 日後では ( $65 \pm 38$ ) に、7 日後では ( $20 \pm 15$ ) と低下したが ( $p < 0.01$ )、4 週間後には ( $24 \pm 12$ ) と横ばいであった。

Single-p 群では 3 日後では ( $107 \pm 54$ ) と低下し ( $p < 0.01$ )、7 日後では ( $106 \pm 30$ ) と横ばいであった。Double-p 群では CRL 群と差はなかった。3 群をすべて合わせた再灌流 7 日群において、NAA 量と神経細胞数の間に強い相関が得られた ( $r = 0.934$ )。

(2) 5 分間片側総頸動脈結紮後、虚血側では YM90K 25 mg/kg 投与群で非投与群と比較して有意に NAA 量と神経細胞数の低下の抑制が見られた。また虚血側の NAA 量及び% NAA 量と神経細胞数に良好な相関関係が見られた。

(3)10分間両側総頸動脈結紮においては、海馬 CA1、線条体背外側部、視床腹側核のいずれも、虚血群で対照群と比較して NAA 量、神経細胞数ともに有意に低下した ( $p < 0.01$ )。

[総括] 砂ネズミ脳虚血モデルにて、局所 NAA 量の変動と組織障害の同時評価を行った。

(1)海馬 CA1 領域における NAA は、神経細胞障害発生時期に一致して低下した。また虚血耐性現象誘導により神経細胞障害の程度を軽減させるに伴い NAA 量の低下も軽減され、また両者の変動には良好な相関関係が得られた。

(2)AMPA/KA 受容体拮抗剤による脳保護作用出現の際にも同様の NAA 量と残存神経細胞数との間に良好な相関関係が見られた。また片側虚血障害において、虚血側と非虚血側の NAA 量比が虚血側神経細胞障害の程度と良好な相関関係を示した。

(3)線条体背外側核、視床腹側核においても神経細胞障害発生時には NAA 量が低下した。以上より、脳虚血障害において局所 NAA 量は神経細胞障害の有用な指標となり得ることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

N-acetyl aspartate (NAA) は大脳神経細胞のマーカーとされているが、実際に組織障害の程度と NAA 量の絶対値を同時に調べた報告はなく、NAA の意義については不明な点が多い。本研究では、砂ネズミ脳虚血モデルを用い、微量定量分析法にて局所 NAA 量の変動と組織障害の同時評価を行った。(1)脳虚血再灌流後の海馬 CA1 領域における NAA 量の経時的变化と虚血耐性現象誘導における NAA 量の変動を調べた。その結果 NAA は、神経細胞障害発生時期に一致して低下した。また虚血耐性現象誘導により神経細胞障害の程度を軽減させるに伴い NAA 量の低下も軽減され、両者の変動には良好な相関関係が得られた。(2)虚血に対する脆弱性の異なる脳の各部位 (海馬 CA1、線条体背外側部、視床腹側核)において、すべての神経細胞障害部位で NAA 量が有意に低下することを認めた。(3)片側虚血障害において AMPA/KA 受容体拮抗剤 (YM90K) 投与後脳保護作用出現の際にも、同様に NAA 量と残存神経細胞数との間に良好な相関関係が見られた。また虚血側と非虚血側の NAA 量比が虚血側神経細胞障害の程度と良好な相関関係を示した。従来神経細胞障害を示すには有効な生物学的マーカーがなく組織所見のみで述べていたが、本研究は局所 NAA 量が脳虚血障害において神経細胞障害の有用な指標となり得ることを示し、学位に値するものと認める。