



Title	Parameters of optic nerve electrical stimulation affecting neuroprotection of axotomized retinal ganglion cells in adult rats
Author(s)	岡崎, 祐香
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49905">https://hdl.handle.net/11094/49905</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="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;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	岡 崎 祐 香
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 3 4 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 20 年 4 月 21 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学 位 論 文 名	Parameters of optic nerve electrical stimulation affecting neuroprotection of axotomized retinal ganglion cells in adult rats (視神経電気刺激による成熟ラット網膜神経節細胞の生存促進：至適刺激条件の検討)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 不二門 尚 (副査) 教 授 田野 保雄 教 授 佐藤 宏道

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 〔 目 的 〕

成熟哺乳動物の網膜神経節細胞 (retinal ganglion cell: RGC) は、中枢神経細胞の中でもとりわけ軸索損傷に対して脆弱で、ラットの場合、視神経切断により 1 週間後には約 50%、2 週間後には約 90% の RGC が細胞死に陥る。切断直後の視神経断端に单相矩形波電流刺激 (刺激強度 50  $\mu$ A、パルス幅 50  $\mu$ s、刺激頻度 20 Hz、刺激時間 120 分間) を加えると、1 週間後の生存 RGC 密度が有意に増大する (Morimoto et al., 2002)。この電気刺激による RGC の生存促進効果のメカニズムを明らかにすることは、軸索損傷による中枢神経細胞の細胞死メカニズムの解明や新たな神経保護法の開発にとって有用である。本研究では、このメカニズムを解明するために最大の生存促進効果を得るための至適刺激条件を検討した。

### 〔 方法ならびに成績 〕

Wistar 系オスの成熟ラット 112 匹を用いた。予め上丘に、蛍光色素 Fluorogold™ を投与し RGC を逆行性に標識した。1 週間後に視神経切断と单相矩形波電流刺激を行った。刺激条件は 50  $\mu$ A、50  $\mu$ s、20 Hz、60 分間を基準に刺激時間、刺激周波数、刺激開始時期のいずれかの条件を変化させた。7 日後に網膜を摘出し、蛍光顕微鏡下で生存していた RGC を計数、その平均密度を算出し、対健常網膜 RGC 密度比を生存率 (%) として表した。

(1) 刺激時間：視神経切断直後に眼球側切断端を双極の銀製ディスク電極で挟み、单相

矩形波電流刺激を 10、30、60、120 分間加えたときの RGC の平均生存密度を調べた。10、30、60、120 分間刺激群の生存率はそれぞれ、58、78、78、81%、コントロール群 (視神経切断のみ) では 57% であった。各群間の平均 RGC 密度を比較したところ、10 分間刺激群では、コントロール群との間に有意な差は認められなかった。30、60、120 分間刺激群ではコントロール群に比べて RGC 密度の有意な増加が認められた。これら 3 群間に RGC 密度の有意な差はなかったため、生存促進効果を発揮するには 30 分以上の刺激を加えればよいことが明らかとなった。(2) 刺激周波数：視神経切断直後に刺激を 10、20、50 Hz の頻度で加えたときの RGC 密度を調べ、無刺激群 (62%) と比較した。10 Hz 刺激群の生存率は 71% で、無刺激群との間に有意な効果は認められなかった。20 Hz 刺激群の生存率は 78% で、無刺激群との比較で、有意な生存促進効果が認められた。50 Hz 刺激の生存率は 56% で、RGC 密度の平均値では無刺激群との間に有意差は認められなかった。ただし、半数例で RGC 密度が無刺激群の平均値よりも明らかに低かった。従って、この電気刺激は 20 Hz で加えられると生存促進効果を発揮するが、より高頻度の刺激では細胞傷害をもたらす可能性が示唆された。(3) 刺激開始時期：電気刺激の開始時期を視神経切断 3 時間後に遅延させると、生存率は 63% となり、無刺激群 (62%) との間に有意差は認められなかった。次に、刺激 (300  $\mu$ A, 50  $\mu$ s, 20 Hz, 60 分間) の開始時期を視神経切断の 4 ないし 1 時間前に先行させた。視神経切断 1 時間前刺激の場合、生存率 75% で、無刺激群 (62%) に比べて有意な生存促進効果が認められたが、4 時間前刺激の場合には生存率 67% で、コントロール群 (64%) との間に有意差はなかった。従って、切断直後の電気刺激の生存促進効果が最も高く、刺激開始が切断から数時間ずれると効果がなくなることがわかった。(4) 長期生存に対する効果：電気刺激の効果が長期持続するか否かを明らかにするために、視神経切断直後に電気刺激を加え、その 14 日後に RGC 密度を調べた。刺激 14 日後の RGC 密度は 7 日後に比べて低下しており、生存率は 30% であったが、視神経切断のみで 14 日経過した網膜 (19%) に比べると RGC 密度は有意に高かった。この結果より、視神経切断直後に一度だけ加えた電気刺激の効果は、14 日経過しても残存していることが明らかとなった。

### 〔 総 括 〕

本研究により、電気刺激の RGC 生存促進効果は刺激電流値のみならず刺激時間や周波数に依存するとともに、刺激開始時期について切断直後を中心に非常に短時間の time-window があることがわかった。従って、電気刺激は、視神経切断直後に RGC 内で生じる現象を修飾することによって、その後の細胞死誘導過程を抑制している可能性を示唆している。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

成熟哺乳動物の中枢神経細胞は、一度軸索に損傷を受けると再生することは無く、細胞死に陥る。中枢神経細胞のモデルの一つ、網膜神経節細胞 (RGC) では、視神経切断後にその眼

球側断端を一回電気刺激することにより生存が促進される。申請者は、この電気刺激の生存促進効果が最大となる刺激条件を明らかにするため、審査論文において刺激の(1)持続時間、(2)パルス周波数、(3)開始時期を検討した。その結果、(1)30 分間以上の刺激で有意な効果が得られること、(2)20 Hz での刺激が最適であること、(3)視神経切断の直前もしくは直後に刺激を行わないと効果が得られないこと、(4) RGC の長期の生存も促進すること、を明らかにした。これらの結果は、電気刺激により RGC 内に生じる一過性の現象が、軸索切断から細胞死に至る過程の初期段階を修飾することにより、RGC の生存を促進していることを新しく示唆した。このように、本研究は、電気刺激の生存促進効果のメカニズム解明を通して、中枢神経細胞死の急性期メカニズムの解明とその克服法の確立に寄与する研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。