学位論文題名

虚血性脳侵襲に及ぼすアシドーシスの影響：ラット海馬
スライスにおける無酸素、無グルコースモデルを用いた解析

学位論文内容の要旨

心肺停止時、生体組織は酸素供給の途絶とともに種々の程度のアシドーシスにさらされる。しかしながら、心肺停止時に合併するアシドーシスが、心肺蘇生後の早期の神経機能障害および長期の神経学的予後などに、どのような修飾的影響を及ぼすかについては依然議論が続いている。

本研究では、合併するアシドーシスの程度と脳虚血との相互関係を解析するため、脳虚血モデルとして無酸素・無グルコース負荷した海馬切片を使用し、種々の pH に調節した灌流液中における神経活動の変化を誘発集合電位を指標として比較検討した。第 2 の目的として、アシドーシスのタイプ（呼吸性、代謝性）により虚血性脳障害に対する影響に差異があるかどうか、同様のモデルを用いて検討した。

<対象と方法>

5-6 週令（体重 50 g 前後）のウィスター系ラットを用いた。ハロセン麻酔下に左大脳半球を迅速に摘出し、pH 7.4 に調製した 4 ~ 5 °C 以下の酸素加人工脳脊髄液（Artificial cerebrospinal fluid, ACSF）中にて冷却した。ACSF の組成は、NaCl 145, KCl 4, NaH₂PO₄ 1.25, MgCl₂ 1.5, CaCl₂ 2, HEPES 6, Glucose 10 (mM) とした。冷却した大脳半球をマイクロスライサーに移し、矢状面に平行に 400 μm の厚さを海馬切片を 4 ~ 5 枚作成した。切片は室温の酸素加 ACSF 中に移し、2 ~ 3 時間インキュベーションした。

インキュベーション後、切片を灌流チャンバーに移し、ACSF を 2 ~ 3 ml/min の速度で灌流した。灌流チャンバー内は 30°C に維持した。

刺激電極として、テフロン被膜白金イリジウム線の双極電極を用い、海馬 Stratum radiatum の Schaffer 側枝に刺入した。一方、記録電極には先端直径約 1 μm、抵抗が 2 ~ 5 Ω となるように調製したガラス電極を用い、CA 1 細胞層に刺入した。0.1 msec の矩形波の電気刺激を加え、刺激によって得られた下向き陰性波の振幅を測定した。誘発電位の振幅と波形が安定

した後に対照値を計測し、以下の3つの実験を行った。

実験1. 無酸素・無グルコース負荷 (Oxygen-glucose deprivation : OGD) による誘発電位の抑制に及ぼすアシドーシスの影響

ACSF を滴定し、7.4, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5の6種類の異なった pH の灌流液に調整した (test-pH)。酸素加後、海馬切片を15分間灌流して細胞外 pH を安定させた。次に、あらかじめグルコースを等量のマニトールで置換した ACSF を test-pH と同じ pH に調整し、100% 窒素を曝気した。この灌流液でさらに15分間灌流することで OGD とした。OGD の終了直前に誘発電位の振幅を計測した。その後、pH7.4の酸素加 ACSF に戻し、60分後の誘発電位を計測した。海馬切片は一種類の test-pH による実験終了後に破棄し、別の test-pH による実験は新たな海馬切片を用いた。

pH 変化のみの影響を検討するため、新しい海馬切片を用いて各々異なった pH 酸素加灌流液で30分間灌流し、誘発電位の変化を観察した。その後、同様に pH7.4の酸素加 ACSF に戻し、60分後の誘発電位を計測した。

実験2. OGD による誘発電位の抑制に及ぼす乳酸アシドーシスの影響

乳酸添加灌流液 (Lactate-ACSF) は15mM または30mM の乳酸ナトリウムを等モルの NaCl と置換することにより作成した。この Lactate-ACSF を滴定し、pH が7.4, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0と5種類の異なった灌流液を作成した。OGD あるいは乳酸アシドーシスのみによる誘発電位の変化を実験1と同様に計測した。

実験3. OGD による誘発電位の抑制に及ぼす二酸化炭素 (CO₂) アシドーシスの影響

pH7.4に調整した ACSF に、10%、25%、50%の CO₂ を曝気することにより3種類の CO₂ 灌流液 (CO₂-ACSF) を作成した。酸素濃度は50%に固定し、残りは窒素を通気した。それぞれの灌流液の pH は、6.15±0.04(10%CO₂)、5.76±0.05 (25%CO₂)、5.51±0.05 (50%CO₂) であった。OGD あるいは CO₂ 負荷のみによる誘発電位の変化を実験1と同様に計測した。

<結果と考察>

実験1. OGD 負荷による誘発電位の抑制に及ぼすアシドーシスの影響

15分間の OGD により、pH6.5の群では誘発電位振幅は31.5%に減少したが、pH7.4の群と比較した場合には減少の程度は有意に少なかった。すなわち pH6.5程度の軽度のアシドーシスは虚血性脳障害に対して拮抗的に働くものと推察された。OGD 60分後の集合電位は、pH5.5以上の群ではほぼ対照値に復した。しかし、pH5.0, 4.5の群では、それぞれ対照値の60.2%、17.1%

に回復したのみであった。test-ACSF 灌流の60分後における誘発電位は pH5.5以上で100%、pH4.5では82.6%に回復し、OGD 負荷による抑制と比較した場合には、回復の程度が有意に大きかった。このことは、pH5.0以下のアシドーシスは虚血性脳障害を増強させ、さらにその作用はアシドーシスと虚血侵襲との相互作用であることが示唆された。

実験2. OGD による誘発電位抑制に及ぼす乳酸アシドーシスの影響

誘発電位の回復は乳酸30mM 添加では pH6.0以下において、乳酸15mM 負荷では pH5.5以下において、pH7.4灌流時と比較して有意に抑制された。すなわち、pH レベルが同程度でも、乳酸イオンの添加によって濃度依存性に虚血性脳障害を増強する事が示された。

30分間酸素加の Lactate-ACSF で灌流し、pH7.4の酸素加 ACSF に戻した60分後の誘発電位は、30mM 乳酸イオン添加時の pH5.0の群以外対照値のレベルに回復した。換言すれば、OGD 後の誘発電位の回復抑制は、この群以外では、実験1の場合と同様に乳酸アシドーシスと虚血侵襲の相互作用と考えられる。

実験3. OGD による誘発電位抑制に及ぼす CO₂ アシドーシスの影響

OGD 60分後の電位の回復は25%および50% CO₂ 曝気群で、有意に抑制された。各種灌流液の細胞外 pH 値に対する誘発電位抑制効果を比較した場合、この抑制効果は30mM の乳酸イオン添加群とほぼ同程度であった。したがって、CO₂ アシドーシスは高濃度の乳酸アシドーシスと同程度の虚血侵襲増強効果をもたらすことが示唆された。

OGD を伴わない CO₂ アシドーシス後の電位の回復は、OGD 負荷による抑制と比較して有意に大きかった。したがって、CO₂ アシドーシスによる虚血侵襲増強もアシドーシスと虚血侵襲の相互作用と考えられた。

結 語

- 1 無酸素・無グルコース負荷に合併するアシドーシスは、軽度ではその虚血性脳障害に対し拮抗性に、高度では相互的に作用する。
- 2 細胞外 pH が同じであれば、乳酸イオンの存在は、虚血性侵襲を濃度依存性に増強する。
- 3 CO₂ アシドーシスは高濃度の乳酸アシドーシスと同程度の虚血性侵襲増強効果をもたらす。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 劍 物 修
副 査 教 授 小 山 富 康
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

本研究では、合併するアシドーシスの程度と脳虚血との相互関係を解析するため、脳虚血モデルとして無酸素・無グルコース負荷（Oxygen-glucose deprivation : OGD）した海馬切片を使用し、種々の pH に調節した灌流液中における神経活動の変化を誘発集合電位を指標として比較検討した。さらに、アシドーシスのタイプ（呼吸性もしくは代謝性）により虚血性脳傷害に対する影響に差異があるかどうか同様のモデルを用いて検討した。

<対象と方法>

5-6週令のウィスター系ラットを用い、ハロセン麻酔下に左大脳半球を迅速に摘出した。矢状面に平行に400 μ mの厚さの海馬切片を4~5枚作成した。インキュベーション後、切片を灌流チャンバーに移し、人工脳脊髄液（Artificial cerebrospinal fluid, ACSF）を2~3 ml/minの速度で灌流した。灌流チャンバー内は30°Cに維持した。刺激電極として白金イリディウム線の双極電極を海馬のSchaffer側枝に刺入し、0.1msecの矩形波電気刺激を加えた。記録電極にはガラス電極を用い、CA1細胞層に刺入した。刺激によって得られた下向き陰性波の振幅を測定した。誘発電位の振幅と波形が安定した後に対照値を計測した。

実験1 OGDによる誘発電位の抑制に及ぼすアシドーシスの影響

ACSFを7.4, 6.5, 6.0, 5.5, 5.0, 4.5の6種類の異なったpH灌流液に滴定した（test-pH）。酸素加後、海馬切片を15分間灌流して細胞外pHを安定させた。次に、グルコースを等量のマニトールで置換したACSFをtest-pHと同じpHに調整後、この灌流液を100%窒素で曝気し、さらに15分間灌流することでOGDとした。OGD終了直前に誘発電位の振幅を計測した。その後、pH7.4の酸素加ACSFに戻し、60分後の誘発電位を計測した。pH変化のみの影響を検討するため、新しい海馬切片を用いて各々異なったpHの酸素加灌流液で30分間灌流し、誘発電位の変化を観察した。その後、pH7.4の酸素加ACSFに戻し、60分後の誘発電位を計測した。

実験2 OGDによる誘発電位の抑制に及ぼす乳酸アシドーシスおよびCO₂アシドーシスの影響

乳酸添加灌流液は15mM または30mM の乳酸ナトリウムを等モルの NaCl と置換することにより作成した。この乳酸添加灌流液を pH7.4から5.0の5種類の異なった灌流液に滴定した。pH7.4に調整した ACSF に、10%、25%、50%の CO₂ を曝気することにより3種類の CO₂ 灌流液を作成した。それぞれの灌流液の pH は、6.15 (10%CO₂)、5.76 (25%CO₂)、5.51 (50% CO₂) であった。誘発電位の変化は実験1と同様に計測した。

<結果と考察>

実験1 OGD 負荷による誘発電位の抑制に及ぼすアシドーシスの影響

15分間の OGD により、pH6.5の群では誘発電位振幅の減少の程度は有意に少なく、pH6.5程度の軽度のアシドーシスは虚血脳傷害に対して拮抗的に働くものと推察された。OGD60分後の集合電位の回復は、pH5.0以下の群で有意に抑制された。アシドーシス単独負荷60分後の誘発電位の回復の程度は、OGD 合併による回復と比較した場合、有意に大きかった。このことは、pH5.0以下のアシドーシスは虚血性脳傷害を増強させ、さらにその作用はアシドーシス単独によるものではなく、アシドーシスと虚血侵襲との相互作用であることを示唆した。

実験2 OGD による誘発電位抑制に及ぼす乳酸アシドーシスおよび CO₂アシドーシスの影響

乳酸30mM 添加では pH6.0以下で、乳酸15mM 負荷では pH5.5以下で、それぞれ誘発電位の回復は有意に抑制された。すなわち、pH レベルが同程度でも、乳酸イオンの添加によって濃度依存性に虚血性脳障害を増強する事が示された。OGD 60分後の電位の回復は25%および50% CO₂ 曝気群で、有意に抑制された。この結果をそれぞれの灌流液の細胞外 pH に対してプロットすると、30mM の乳酸イオン添加群とはほぼ同程度の抑制であった。したがって、CO₂ によるアシドーシスは高濃度の乳酸アシドーシスと同程度の虚血侵襲増強効果をもたらすことが示された。

結 語

- 1 無酸素無グルコース負荷に合併するアシドーシスは、軽度では虚血性脳傷害に対し拮抗的に、高度では相互的に作用する。
- 2 細胞外 pH が同じであれば、乳酸イオンの存在は、虚血性侵襲を濃度依存性に増強する。
- 3 CO₂ によるアシドーシスは高濃度の乳酸アシドーシスと同程度の虚血侵襲増強効果をもたらす。

本研究は、合併するアシドーシスの程度と脳虚血との相互関係を in vitro の系を用い神経生

理学的に詳細に検討しており，独創的かつ有意義な研究と認められ，博士（医学）授与に値するものと判定する。