

学位論文題名

ラットの前脳虚血モデルによる高磁場水素磁気共鳴スペクトロスコピーを用いた脳代謝物変動の評価

学位論文内容の要旨

〈緒言〉 脳虚血時の種々の代謝動態は、脳虚血の理解につき必須の情報である。第一に、脳組織への酸素の供給停止に伴う、高エネルギーリン酸化合物の枯渇による嫌気性解糖の亢進というエネルギー代謝の崩壊、第二に、引き続く血行再開に伴う細胞膜障害が問題となる。高磁場水素磁気共鳴スペクトロスコピー (proton magnetic resonance spectroscopy; ^1H MRS) は、水素原子を持つ生体内代謝物を分析できる優れた検査法であり、lactate, cholineを初め、各種の神経伝達物質などの測定が同時に可能である。本研究では臨床的な再灌流障害の状態を再現できるブルリの四管閉塞モデルを用い、マイクロウェーブにより瞬時に脳代謝を固定し、各代謝物の変動を ^1H MRSで測定し検討した。近年、再灌流障害の進行に関与する因子としてフリーラジカルが注目されている。血行再開時の酸素の再供給によるアラキドン酸カスケード活性化に伴い発生したフリーラジカルが細胞膜を傷害し、神経細胞に不可逆的な障害を与えるというものである。MCI-186 (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) は、フリーラジカル作用を抑制することにより、虚血再灌流時の神経細胞障害を軽減するフリーラジカルスクアベンジャーであり、本実験系を用い虚血再灌流障害に対する治療効果を検討した。

〈方法〉 Wister系雄性ラット(体重250-300g) 60頭を用いた。sodium pentobarbital (50mg/kg) の腹腔内注射後に、歯科用ドリルにて椎骨動脈を永久閉塞した。24-72時間後に、脳波、動脈血圧、直腸温、動脈血ガスのモニター下で、覚醒させた状態で両側総頸動脈をテンプラリークリップで閉塞した。30分の虚血時間の後、クリップを解除して0分、10分、30分、60分の再灌流を行った。経過中は直腸温を $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ に保ち、正向反射消失、脳波平坦化、血圧上昇をもって虚血を判定した。なおMCI-186投与群については血流遮断5分前あるいは血流再開直後に3mg/kgを外頸静脈より投与した。再灌流終了時に5kw, 1.5sec. でマイクロウェーブの瞬時照射を行い頭頸部の代謝固定を行った。取り出した脳より皮質を分離し凍結させ、各代謝物を抽出し凍結乾燥粉末としたのちに重水に溶かし、高磁場MRS装置(11T Bruker AM-400 spectrometer)で測定した。各代謝物のスペクトルにつき信号強度を求め、生体内で安定と考えられているphosphocreatineとcreatineの和を内部基準として、各代謝物の代謝量は両者の和への比として解析した。

〈結果〉 MCI-186投与群と非投与群で、再灌流時間を変化させ、全10群で検討した。

MCI-186非投与群 choline, acetate, lactateともに虚血終了時(再灌流時間0分)に、コントロールに比し高いスパクトラ比を得た。再灌流の経過とともに遷延しながらもコントロール値に戻る傾向を認めた(三代謝物とも群間変動が群内変動に比し大きかった。Kruskal Wallis test: $P < 0.0001$)。なおacetateはcholineに較べ再灌流時のスパクトラ比が高値で遷延した。MCI-186虚血前投与群 cholineは虚血前投与により、スパクトラ比の上昇が虚血再灌流のほぼ全期間で抑制され、特に再灌流時間0分と30分では非投与群に比して統計学的有意に抑制された(両時点ともMann-Whitney U test: $P = 0.0065$)。acetateではcholineと異なり、虚血終了時の抑制は見られず、再灌流時間30分で有意に抑制された(Mann-Whitney U test: $P = 0.0163$)。いっぽうlactateでは有意な抑制はみられなかった。MCI-186虚血後投与群 虚血前投与により三代謝物とも再灌流時間30分で、スパクトラ比の上昇の平均値が最も抑制されたため、再灌流時間30分で非投与群と虚血後投与群を比較した。lactateでのみ有意な薬効が得られた(Mann-Whitney U test: $P = 0.0104$)。

〈考察〉 cholineは細胞膜の主要構成成分であるリン脂質の構成物質であり、cholineを含んだphosphatidylcholineのようなリン脂質の形で細胞膜内に多く存在する。MRSでは主に細胞膜内リン脂質の構成成分としてのcholineを測定していると考えられている。今回、虚血終了時にピークを迎え、再灌流時に遷延しながら減少する一過性のcholineの上昇がみられた。cholineの上昇はリン脂質破壊によると思われる、虚血再灌流によるアラドノ酸カスケードの活性化によりフリー脂肪酸が産生され、細胞膜障害を遷延化していると考えられる。本検討ではフリー脂肪酸カスケードであるMCI-186の投与によりスパクトラ比の上昇が抑制されており、細胞膜の破壊に対する薬効を示すものと考えられる。acetateはcholineの前駆物質である。虚血時の遊離脂肪酸濃度が海馬で有意に高いとの報告があり、従来のMRSの報告においても、虚血時の選択的脆弱性を有する海馬においてacetateの有意な上昇が観察されており、acetateは、フリー脂肪酸反応の結果として産生される遊離脂肪酸の分解物であると考えられている。acetateにおいても、cholineと同様の代謝動態およびMCI-186による抑制効果が認められたが、薬効は再灌流時に限定された。これは、acetateがフリー脂肪酸反応により産生される遊離脂肪酸の分解物であるという、従来の仮説を間接的に支持する。¹H MRSにおいて測定しやすいピークを持つacetateは、虚血再灌流障害の一指標となりうる。虚血時の嫌気性解糖の最終産物であるlactateは、従来の報告と同様の挙動をとった。MCI-186の薬効については、虚血後投与でのみ有意な抑制を観察した。これは、no-reflow phenomenonがもたらす再灌流開始遅延による遷延した嫌気性解糖を、フリー脂肪酸反応への薬効により抑制したものと考察される。本検討は、超急性期の検討であり、前脳虚血モデルは虚血時間30分では梗塞巣をもたらさない。長時間の検討では、再灌流の経過で復調する脳内代謝の中で超急性期の代謝変動が埋もれる可能性がある。そのため三代謝物全てが再灌流時間60分の時点で、ほぼコントロール値に回復したと考えられる。

〈結語〉 検討した三代謝物で、虚血終了時にスパクトラ比が上昇し、再灌流の経過で遷延しつつもコントロール値に戻る傾向を認めた。MCI-186投与により、三代謝物とも主に再灌流の

経過で統計学的有意な薬効を得た。これは再灌流時の細胞膜破壊へのフリーラジカルカスゲンジャーによる薬効の反映であると考えられた。MRSでは、比較的簡便に多くの代謝物を同時に計測でき、in vitroでの運用が確立されたなら、in vivoでの無侵襲の検査確立につながる事が可能であり有用である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 阿 部 弘
副 査 教 授 齋 藤 秀 哉
副 査 教 授 石 橋 輝 雄

学 位 論 文 題 名

ラットの前脳虚血モデルによる高磁場水素磁気共鳴スペクトロスコピーを用いた脳代謝物変動の評価

虚血再灌流時の脳内代謝物変動を高磁場水素磁気共鳴スペクトロスコピー (1H MRS) を用い検討した。MCI-186 (3-methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one) は、血行再開時の酸素再供給によるアラキドン酸カスケード活性化に伴うフリーラジカル作用を抑制し、虚血再灌流時の神経細胞障害を軽減するフリーラジカルスクベンジャーであり、治療効果を検討した。

本研究では、ウスター系雄性ラット (体重250-300g) 60頭を用いた。プルシネリの四管閉塞モデルに従い、椎骨動脈を永久閉塞した24-72時間後に両側総頸動脈をテンポラリークリップで閉塞し、脳波、動脈血圧、直腸温、動脈血ガスのモニター下で、30分虚血の後、0分、10分、30分、60分の再灌流を行った。なお正向反射消失、脳波平坦化、血圧上昇により虚血を判定した。再灌流終了時にマイクロウェーブを照射し脳代謝固定を行った。取り出した脳より皮質を分離し、PCA法により各代謝物を抽出し高磁場MRS装置で測定した。各代謝物のスペクトルの信号強度を求め、生体内で安定であるphosphocreatineとcreatineの和を内部基準とし、各代謝物量を両者の和への比とし相対量として解析した。

統計検討の結果、choline、acetate、lactateともに虚血終了時 (再灌流時間0分) に、上昇のピークを得た。再灌流の経過に従い漸減する傾向を認めた (三代謝物とも群間変動が群内変動に比し大きかった。Kruskal Wallis test: $P < 0.0001$)。

MCI-186の虚血5分前投与により、cholineは虚血前投与により、上昇が虚血再灌流のほぼ全期間で抑制され、再灌流時間0分と30分では非投与群に比し有意に抑制された (両時点ともMann-Whitney U test: $P = 0.0065$)。acetateではcholineと異なり、虚血終了時の抑制は見られず、再灌流時間30分では有意に抑制された (Mann-Whitney U test: $P = 0.0163$)。lactateでは有意な抑制はみられなかった。

MCI-186の虚血終了直後の投与群により、再灌流時間30分で、lactateでのみ有意な抑制が得られた (Mann-Whitney U test: $P = 0.0104$)。

cholineは細胞膜の主要構成物質であるphosphatidylcholineのようなリ脂質の形で細胞膜内に多く存在する。MRSでは主に細胞膜内リ脂質の構成成分としてのcholineを測定していると考えられている。虚血再灌流時のcholine上昇は、フリーラジカルによる細胞膜障

害の結果としてのリッ脂質破壊によると推察され、MCI-186投与により上昇が抑制され、細胞膜障害への薬効を示したと考えられた。

acetateは、フリージ 加反応の結果として産生される遊離脂肪酸の分解物であると考えられている。MCI-186によるacetate上昇の抑制は再灌流時に限定され、acetateがフリージ 加反応により産生される遊離脂肪酸の分解物であるという従来の仮説を間接的に支持するものと推察された。

虚血時嫌気性解糖の最終産物であるlactateでは虚血後投与でのみ有意な抑制を認めた。no-reflow phenomenonに伴う再灌流開始遅延による嫌気性解糖の遷延を、フリージ 加反応への薬効により抑制したと推察された。

検討した三代謝物で、虚血終了時に上昇のピークを認め、再灌流の経過で漸減する傾向を認めた。MCI-186投与により、三代謝物とも主に再灌流の経過で有意な薬効を得た。これは再灌流時の細胞膜破壊へのフリージ 加スカグ エンジャーによる薬効の反映であると考えられた。

公開発表において齋藤秀哉教授より、MCI-186の虚血前投与と虚血後投与での各代謝物への抑制効果の差異、およびMCI-186の投与量決定の根拠につき質問があった。次いで石橋輝雄教授より、測定された各代謝物の由来、およびMRSでの各代謝物測定の妥当性について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自らの研究に基づく経験や過去の論文の結果を引用し、豊富な知識に基づいて明快に回答した。

本研究により、虚血再灌流時のcholine、acetate、lactateの動態が明らかになり、MCI-186の薬効が明らかになった。今後本研究の成果は脳の虚血再灌流障害の原因探究や実臨床での治療につき、役立つものと期待される。

審査員一同はこれらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。