

学位論文題名

低酸素侵襲に対する軽度・中等度低体温の脳保護効果

- 選択的神経培養細胞を用いた検討 -

学位論文内容の要旨

麻酔中をはじめ、周術期の脳保護法は未だ確立しているとは言えない。その理由としてまず挙げられるのは、神経細胞の虚血に対する脆弱性である。その機序の中心となってきたのが、グルタミン酸-カルシウム仮説であるが、このカスケードを標的とした脳保護薬の多くが、臨床実験ではほとんどすべてが無効という結果に終わっている。一方、最近ではその機序として、ミトコンドリア機能不全とアポトーシスとの関連も注目され始めている。脳保護に関する低体温療法については、1987年にBustoらが前脳虚血モデルで虚血中の脳温を36℃から34℃に下げただけで、虚血性脳障害が劇的に減少すること報告し、現在の臨床における軽度・中等度脳低体温療法にまで発展する契機となった。その後、多くの基礎実験でその有効性が追試されているが、臨床的有効性はその地位を確立するに至っていない。また、軽度・中等度低体温による脳保護効果の機序が代謝の抑制だけでは説明できないことは明らかであり、その機序も未だ解明されていない。そこで今回私たちは、「軽度・中等度脳低体温療法に本当に脳保護効果があるのであれば、神経細胞自体に何らかの効果を有するはずである」という仮説をたて、選択的神経細胞培養を用いて、1)虚血性侵襲に対する軽度・中等度低体温療法が神経細胞そのものに対して本当に保護効果を有するか、2)もし有効であるならば、その機序は何かをグルタミン酸-カルシウム仮説とミトコンドリア機能不全の両面から検討した。

妊娠18日のWisterラットをイソフルラン麻酔後、脊髄破壊して帝王切開し胎児を摘出した。開頭後に大脳を摘出し、前脳を分離した。得られた脳を物理的ならびに化学的に分散した後、神経細胞(5x10⁶個)をポリ-D-リジンコーティングの培養皿上に散布した。培養液にはB-27 supplement、N-2 supplement、L-グルタミンを添加したNeurobasal medium™を用い、37℃、二酸化炭素濃度5%の環境のインキュベーター内で培養を行った。培養開始後14日目における細胞の分化同定のために、MAP2抗体と抗GFAP抗体を用い神経細胞とグリア細胞の比率測定を行った。結果、神経細胞とグリア細胞における神経細胞の比率は90.6%であった。

虚血性侵襲として、低酸素侵襲を用いた。軽度低体温として33℃、中等度低体温として30℃を設定した。30、33、37℃の3温度群に設定したインキュベーター内に窒素を充填し、酸素濃度を1%以下に保った。同じ脳から採取した神経細胞を14日間培養後、培養皿3個を各温度に無作為に割り付け24時間低酸素暴露を行った。次に、低体温のtime windowを調べるため、低酸素暴露開始の8時間、もしくは12時間後に、それぞれの温度に割り付け、合計24時間の低酸素暴露を行った。細胞の生存率を決定するために、培養皿にあらかじめ撮影点を4カ所設定し、低酸素侵襲負荷直前に短時間で撮影して細胞数(500-1000個)を記録した。侵襲負荷終了後にトリパンブルー染色を行って同一地点を撮影することで死細胞と脱落した細胞数の計測を行った。

培養液中(細胞外)に遊離した内因性のグルタミン酸濃度を測定するため、各温度下で低酸素負荷を24時間行った後、グルタミン酸の定量をHPLC-蛍光光度法を用い、蛍光光度計により測定した。外因性グルタミン酸負荷による細胞傷害の影響をみるため、同じ脳から採取した神経細胞を14日間培養後、30、33、37℃それぞれの温度下で、グルタミン酸250 μ Mを30分間負荷した。その後、グルタミン酸無添加培養液に交換し、再び同じ温度のチャンパー内で23時間30分培養し、上記の方法で細胞生存率を測定した。アポトーシスとネクローシスの鑑別を行うため、低酸素負荷24時間後に、神経細胞をHoechst33342とpropidium iodideで染色し蛍光顕微鏡下で観察した。ミトコンドリア傷害の評価としてミトコンドリア膜電位の消失の有無を測定した。統計学的処理は、ミトコンドリア傷害細胞の割合以外は、各温度間における一元配置分散分析で検定し、有意差を見たときはTukey-Kramer法を用いた。ミトコンドリア傷害細胞の割合は30℃と37℃間で対応のあるt検定を行った。

24時間の低酸素負荷後の生存率は、37℃に比較して、33、30℃において有意に高かった。また、8時間後に低体温を開始した場合も、37℃と30℃との間に有意差が見られた。しかし、12時間後に低体温を開始した場合は、温度間で有意差を見なかった。低酸素負荷24時間後、培養液内に遊離したグルタミン酸の濃度は、3温度間に有意差を認めなかった。グルタミン酸負荷24時間後の生存率は、温度低下に伴い生存率は高くなる傾向はあったものの有意差は認めなかった。低酸素負荷24時間後、アポトーシス細胞の比率は、30℃において、37、33℃と比較して有意に少なかった。ネクローシス細胞の比率は、有意差を認めなかった。ミトコンドリア傷害を起こした細胞の割合は、37℃でと比較して30℃有意に少なかった。

今回、軽度・中等度脳低体温の神経細胞自体に対する影響を検討するため選択的神経細胞培養を用いた。また周術期、特に麻酔中の脳保護効果を想定し、低酸素負荷後の効果(治療効果)ではなく、低酸素負荷中の保護効果(予防効果)について検討した。本実験でも、低酸素侵襲に対して、軽度ならびに中等度低体温に保護効果を認めた。また、この効果は、低酸素開始から8時間後に低体温を開始しても残存し、低体温が虚血後早期ではなく、虚血から細胞死に至る中途の何らかの過程で作用をしている事を示唆した。

軽度ならびに中等度低体温の脳保護効果の機序については、今まで多くの基礎実験で色々な仮説が提唱されているが、その機序については依然確定を見ていない。今回3温度間で低酸素後の細胞外グルタミン酸濃度に有意差を認めなかった。今回のモデルではグリア細胞がほとんどいないため、本研究での細胞外グルタミン酸濃度は、シナプス前細胞からの放出と再取り込みの差、すなわちシナプス前神経細胞でのグルタミン酸代謝を反映しているものと考えられ、それに対する軽度・中等度低体温の影響はほとんど無いことが示唆された。一方、グルタミン酸負荷に対する細胞傷害も、低体温は有意に抑制しなかった。以上より、本実験系ではシナプス前ならびにシナプス後のグルタミン酸-カルシウム仮説が、軽度・中等度低体温の脳保護効果の主要な機序にはならないと考えられた。一方、今回、低酸素侵襲後のアポトーシスの進行が30℃下で抑制に働く事が示された。また、低酸素負荷後のミトコンドリア膜電位消失も、30℃で有意に抑制された。以上より、本研究で見られた低酸素負荷後の軽度・中等度低体温の神経細胞保護効果の機序として、少なくとも中等度低体温ではミトコンドリア傷害の抑制によるアポトーシスの進行を抑えている可能性が示唆された。

本研究により、以下の知見を得た：1) 低酸素侵襲に対して、軽度(33℃)ならびに中等度(30℃)低体温は保護効果を有した。2) その効果は、低酸素開始後8時間でも見られた。3) シナプス前ならびにシナプス後のグルタミン酸-カルシウム仮説は保護効果の主要な機序にはならない可能性が示唆された。4) 少なくとも中等度低体温では、ミトコンドリア傷害の抑制によるアポトーシスの進行抑制が機序の一つになる可能性が考えられた。

さらに、in vivo や臨床研究を行うことにより、軽度・中等度低体温の脳保護効果の役割をさらに解明することができる期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 森 本 裕 二

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

副 査 教 授 丸 藤 哲

学 位 論 文 題 名

低酸素侵襲に対する軽度・中等度低体温の脳保護効果

－ 選択的神経培養細胞を用いた検討 －

麻酔中をはじめ、周術期の脳保護法は未だ確立しているとは言えない。なかでも軽度・中等度低体温療法については、1987年にラットで虚血中の脳温を34℃に下げただけで、虚血性脳障害が劇的に減少されることが報告されて以降、多くの基礎実験でその有効性が追試されているが、臨床的有効性はその地位を確立するに至っていない。また、その機序も未だ解明されていない。そこで今回、選択的神経細胞培養を用いて、1)虚血性侵襲に対する軽度・中等度低体温が神経細胞そのものに対して本当に保護効果を有するか、2)もし有効であるならば、その機序は何かを、遅発性神経細胞死の機序として有力なグルタミン酸－カルシウム仮説とミトコンドリア機能不全の両面から検討した。

妊娠18日のWisterラットを麻酔後脊髄破壊して帝王切開し胎児を摘出した。開頭後に得られた脳を分散した後、Neurobasal mediumを用い37℃、二酸化炭素濃度5%の環境下で培養を行った。培養開始後14日目に、MAP2抗体と抗GFAP抗体を用い神経細胞とグリア細胞における前者の比率が90.6%であることを確認した。軽度低体温として33℃、中等度低体温として30℃を設定した。虚血性侵襲として、低酸素侵襲を用い、30、33、37℃の3温度群に設定したインキュベーター内に窒素を充填し、酸素濃度を1%以下に保った。まず、各温度下で24時間低酸素暴露の細胞生存率に及ぼす影響を検討した。次に、低体温のtime windowを調べるため、低酸素暴露開始の8時間、もしくは12時間後に、それぞれの温度に割り付け、合計24時間の低酸素暴露を行った。細胞の生存率決定には、侵襲負荷後にトリパンブルー染色を行い、侵襲前の像と比較して死細胞と脱落した細胞数の計測を行った。低酸素負荷24時間後の培養液中に遊離した内因性のグルタミン酸濃度をHPLC-蛍光光度法を用い測定した。外因性グルタミン酸負荷による細胞傷害の影響をみるため、各温度下で、グルタミン酸250 μ Mを30分間負荷した。23時間30分後に、上記の方法で細胞生存率を測定した。アポトーシスとネクローシスの鑑別を行うため、神経細胞をHoechst33342とpropidium iodideで染色し蛍光顕微鏡下で観察した。ミトコンドリア傷害の評価としてミトコンドリア膜電位の消失の有無を測定した。

24時間の低酸素負荷後の生存率は、37℃に比較して、33、30℃において有意に高かった。また、8時間後に低体温を開始した場合も、37℃と30℃との間に有意差が見られた。低酸素負荷24時間後、培養液内に遊離したグルタミン酸の濃度は、3温度間に有意差を認めなかった。グルタミン酸負荷24時間後の生存率は、有意差は認めなかった。低酸素負荷24時間後、アポトーシス細胞の比率

は、30℃において、37、33℃と比較して有意に少なかった。ネクロシス細胞の比率は、有意差を認めなかった。ミトコンドリア傷害を起こした細胞の割合は、37℃でと比較して30℃有意に少なかった。

低酸素侵襲に対して、軽度・中等度低体温に保護効果を認めた。また、この効果は、低酸素開始から8時間後に低体温を開始しても残存し、低体温が虚血後早期ではなく、虚血から細胞死に至る中途の過程で作用をしている事を示唆した。今回3温度間で低酸素後の細胞外グルタミン酸濃度に有意差を認めなかった。また、グルタミン酸負荷に対する細胞傷害も、低体温は有意に抑制しなかった。以上より、本実験系ではグルタミン酸—カルシウム仮説が、軽度・中等度低体温の脳保護効果の主要な機序にはならないと考えられた。一方、低酸素侵襲後のアポトーシスの進行が30℃下で抑制に働く事が示された。また、低酸素負荷後のミトコンドリア膜電位消失も、30℃で有意に抑制された。以上より、本研究において、少なくとも中等度低体温ではミトコンドリア傷害の抑制によるアポトーシス進行抑制が保護効果の機序となるうる可能性が示唆された。

副査の吉岡教授より、臨床で使われている軽度・中等度低体温の温度、虚血によるミトコンドリア傷害の機序、グルタミン酸—カルシウム仮説が保護効果の主要な機序にならなかった理由について、同じく、副査の丸藤教授より外因性グルタミン酸負荷時間と量の設定の根拠、軽度低体温の保護効果の機序、今後の研究の方向性についての質問があった。次いで主査の森本教授より、混合培養など他の培養系での結果、臨床と基礎研究との結果で相違が生じる理由についての質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は本研究の結果や文献を引用し、的確かつ丁寧に解答した。

この論文は、周術期の脳保護法としての軽度・中等度低体温療法の有効性とその機序を、選択的神経細胞培養を用いて初めて明らかにしたことで高く評価され、今後臨床面での応用さらに虚血性神経細胞傷害の機序解明へと発展していくことが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せて申請者が博士(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。