

ウサギ脊髄虚血再灌流モデルにおける astrocyte 活性化と遅発性運動神経細胞死に関する検討

学位論文内容の要旨

【目的】胸腹部大動脈手術における脊髄障害は最も回避すべき合併症のひとつである。一過性虚血後の脊髄障害の原因は虚血再灌流障害と考えられているが、再灌流直後から認められる障害の他に遅発性障害も存在する。脳では虚血により活性化された reactive astrocyte で GFAP (glial fibrillary acidic protein)の発現が亢進しており、astrocyte と遅発性脳細胞障害との関連が指摘されているが、脊髄においてその関連性を検討した報告はない。本研究の目的は、ウサギ脊髄虚血モデルを用いて虚血再灌流後の脊髄における astrocyte 活性化を GFAP 発現量の半定量的測定で評価し、神経細胞障害との関連性を検討することである。

【対象と方法】脊髄虚血モデルはウサギ腎動脈下腹部大動脈バルーン閉塞モデルを用いた。虚血時間と温度は従来の我々の検討で即時型障害と遅発性障害が混在する 39°C15 分とし、体重 2.8kg~3.5kg の雄 New Zealand White Rabbit 18 羽を用いて検討を行った。全身麻酔下に大腿動脈からバルーンカテーテルを腎動脈下に挿入、バルーン拡張により 15 分間の脊髄虚血を誘発した。再灌流後 7 日目まで 24 時間毎に Johnson らの方法に基づいた 5 段階の神経機能評価を行った (0=後脚運動麻痺, 1=重度の不全対麻痺, 2=筋力低下/跳躍不能, 3=失調性運動/いびつな跳躍, 4=軽度の運動失調, 5=正常機能)。また 24 時間, 3 日および 7 日後に 6 匹ずつのウサギを犠牲死させ、脊髄を取り出して組織学的, 免疫組織学的検討を行った。組織学的検討はパラフィン封埋した脊髄から作製した 4 μ m 切片標本に Hematoxylin-Eosin 染色を行い光学顕微鏡で観察, 正常脊髄前角細胞数を計測した。免疫組織学的検討は凍結脊髄の切片標本を抗 GFAP 抗体で免疫染色し, 陽性反応領域(GFAP positive area fraction)をコンピュータで半定量的に分析した。データの統計学的分析は, 非連続変数には Wilcoxon signed rank test を, 連続変数には One-way analysis of variance 及び Tukey's multiple comparison test を用い, 変数間の相関は linear regression test で評価した。全ての検討は P-value 0.05 未満で有意とした。

【結果】Johnson score に基づく神経機能評価では 24 時間後と 3 日後の間に有意差を認めなかったが, 24 時間後と比べ 5 日目以降で有意な score の低下を認めた(24 時間後 4.67 \pm 0.52, 7 日

後 2.17 ± 0.76 ; $p=0.0312$). Johnson score と前角細胞数の間には有意な線形相関が認められ ($r^2=0.6128$, $p=0.0026$), 24 時間後に比べ 7 日後で正常前角細胞数は有意に低下した(24 時間後 31.08 ± 1.37 , 7 日後 21.32 ± 0.59 ; $p=0.0016$). 免疫組織学的検討では, 脊髄白質における GFAP 発現は再灌流 24 時間後に比べ 3 日後以降亢進しており, GFAP positive area fraction も有意な拡大を認めた(24 時間後 $4.43 \pm 0.65\%$, 3 日後 $5.95 \pm 1.10\%$; $p=0.0236$ vs 24 時間後, 7 日後 $6.24 \pm 2.89\%$; $p=0.0004$ vs 24 時間後). GFAP 発現率と正常前角細胞数および Johnson score との間には再灌流後 24 時間では相関を認めなかったが, 3 日後では有意な負の線形相関を認めた(前角細胞数; $r^2=0.9296$, $p=0.0021$, Johnson score; $r^2=0.7987$, $p=0.0164$).

【考察】神経細胞の中には虚血後の再灌流によりエネルギー代謝が回復してもそのまま数時間〜数日後に細胞死に至る, いわゆる遅発性細胞死を起こすものが存在する. 脊髄では, ウサギにおいて虚血再灌流後の遅発性選択的運動神経細胞死が報告されており, 臨床においても胸部大動脈瘤手術後 1〜5 日での遅発性脊髄障害が報告されている. ラット脳梗塞モデルでは梗塞巣の遅発性拡大が知られており, 梗塞周辺領域の astrocyte における S100 β 合成の up-regulation との関連性が報告されている. Astrocyte は虚血により活性化され, 肥大して reactive astrocyte へと変化する. Reactive astrocyte では GFAP の合成が亢進している. 本研究では, 一過性脊髄虚血モデルを用いて虚血再灌流後の脊髄 astrocyte の組織学的変化を経時的に分析した. 再灌流後 24 時間では astrocyte の細胞質はまだ小さく GFAP の発現も少量だったが, 3 日後には明らかな形態変化が認められ, reactive astrocyte が増加し GFAP positive area fraction も有意に拡大した. これらの結果は脳梗塞モデルにおいて astrocyte の GFAP 免疫活性が虚血再灌流後 48〜72 時間頃より強く現れてくるという報告と一致する. また本研究では再灌流後 3 日経過した個体群において, GFAP positive area fraction と正常前角細胞数および Johnson score との間に有意な負の相関が認められたが, 24 時間後では有意な相関が認められなかった. このことから再灌流後 24 時間で脊髄障害が顕在化してくる個体では虚血による直接的障害が強く影響しており, 3 日後に見られる遅発性神経細胞障害には astrocyte の活性が影響していることが示唆された. また, 7 日目では astrocyte 活性が維持されているにもかかわらず神経細胞障害は進行しており, 両者の相関性は低いと考えられた. Reactive astrocyte の細胞障害機序は, 亢進した S100 β が iNOS(inducible nitric oxide synthase)を誘導することで nitric oxide 等が産生されてニューロンを障害すると考えられている. 本研究では, astrocyte の活動性の指標である GFAP 発現を半定量的に評価することで, 一過性脊髄虚血モデルにおける遅発性脊髄前角細胞死の程度と reactive astrocyte における GFAP 免疫活性との相関性を初めて証明することができた. この GFAP 発現の半定量評価法は, 今後様々な脊髄保護法の実験的評価において応用できる可能性がある.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 居 喜 郎

副 査 教 授 筒 井 裕 之

副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学 位 論 文 題 名

ウサギ脊髄虚血再灌流モデルにおける

astrocyte 活性化と遅発性運動神経細胞死に関する検討

胸腹部大動脈手術後の虚血性脊髄障害は最も回避すべき合併症のひとつである。一過性虚血後の脊髄障害の原因は虚血再灌流障害と考えられているが、再灌流直後から見られる即時性障害の他に遅発性障害が存在する。脳では虚血により活性化された astrocyte と遅発性神経細胞障害との関連が指摘されているが、脊髄においてその関連性を半定量的に検討した報告はない。本研究の目的は、ウサギ脊髄虚血モデルを用いて虚血再灌流後の脊髄における astrocyte 活性化を astrocyte の骨格形成蛋白である GFAP (glial fibrillary acidic protein) 発現の半定量的測定法で評価し、神経細胞障害との関連性を検討することである。

実験モデルはウサギ腎動脈下腹部大動脈バルーン閉塞モデルを用いた。虚血時間と温度は 39°C 15 分とし、体重 2.8kg-3.5kg の雄 New Zealand White Rabbit 18 羽を用いて検討を行った。再灌流後 7 日目まで 24 時間毎に Johnson score による 6 段階の神経機能評価を行い、24 時間、3 日および 7 日後の機能評価の後に各 6 匹ずつ動物を犠牲死させ L4/5 レベルの脊髄を採取して Hematoxylin-Eosin 染色による正常神経細胞数の計測を行った。さらに抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織染色を行い、GFAP 発現の程度をコンピューターで半定量的に計測して astrocyte 活性の指標とした (GFAP positive area fraction)。

脊髄神経障害は再灌流後 24 時間以降も遅発性に進行が見られ、Johnson score と正常神経細胞数の低下が認められた。Astrocyte は再灌流 3 日後以降で明らかな活性化が見られ、GFAP positive area fraction も有意に増加が認められた。GFAP positive area fraction と正常神経細胞数の間には再灌流 24 時間後では有意な相関が見られず、astrocyte は即時性障害にはあまり関与していないと考えられた。しかし 3 日後には両者に有意な負の相関が認められ、astrocyte 活性が高いほど神経細胞数が少ないという結果となった。一方で 7 日後では相関が見られなかった。この 3 日後における astrocyte の活性化は虚血再灌流後遅発性神経細胞障害の原因あるいは結果となっている可能性が考えられた。Astrocyte は障害神経細

胞によって活性化され神経細胞に保護的な働きをすることが知られているが、一方で脳においては活性化 astrocyte が S100 β や iNOS(inducible nitric oxydase synthase)を誘導して細胞障害を来すことが報告されており、脊髄においても同様の機序が考え得る。従って活性化 astrocyte が遅発性脊髄障害の原因となっているかを検証するために、これらの蛋白発現を分析し astrocyte 関与の詳細な機序を検討していくことが今後の研究課題である。

本研究で astrocyte 活性の指標に用いた GFAP positive area fraction は活性化 astrocyte の細胞質肥大や突起の延長といった細胞の拡大を染色部位の面積で、骨格蛋白である GFAP 発現の亢進を染色濃度によって同時に評価可能で、astrocyte 活性の半定量的評価法として今後様々な脊髄保護法の研究に応用可能と考えられた。

公開発表では、副査の岩崎教授から薬剤による astrocyte 抑制の可否とその臨床応用の可能性に関して、また再灌流後の脊髄後角細胞の変化について等の質問がなされた。同じく副査の筒井教授からは虚血再灌流時の astrocyte 活性化の機序と役割について、主査の松居教授から遅発性障害発症に関する本研究の虚血条件の妥当性に関して等の質問がなされた。申請者は自らの実験結果、臨床体験、この分野に関する文献などをもとに、誠実にかつ妥当な回答を成しえた。

本研究は、虚血再灌流後の遅発性脊髄神経障害の機序解明の一端を担い、胸腹部大動脈瘤治療の今後の展開に重要な寄与をするものと評価される。

審査員一同は、申請者の学識に合わせて、この研究が関連領域研究と臨床成績の進展に成果を評価し、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士(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。