

脳における循環動態と高次脳機能に関する薬理学的研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】我が国では、「悪性新生物」、「心疾患」ならびに「脳血管疾患」が三大死因となっており、平成21年においても、脳血管疾患は死因の第3位を占めている。しかしながら、脳血管障害の詳細な病態は未だ解明されておらず、また有用な治療手段がないのが現状である。人工酸素運搬体 (LEH: Liposome-encapsulated hemoglobin) は、使用期限が過ぎた輸血用血液由来のヒトヘモグロビンを精製して、リポソーム膜へ封入したものである。この LEH 粒子 (平均径: 230 nm) は赤血球と比較して約 1/30 と非常に小さいため、赤血球が到達できず、酸素が不足している臓器に対して酸素を供給できる可能性がある。このことから、LEH は脳梗塞などの虚血性脳疾患に対する治療薬候補のひとつとして考えられている。一方、神経活動による脳実質の微小循環調節能が脳虚血によって障害を受ける可能性が報告されており、この結果、脳機能における恒常性の不均衡が生じることが示唆されている。さらに、神経活動と局所能血流量 (rCBF) の相関関係の擾乱が、脳血管性認知症やアルツハイマー型認知症などの記憶障害を中核症状とする脳神経疾患患者において報告されている。したがって、神経活動による rCBF の制御メカニズムの中に虚血性脳障害に対する新規治療ターゲットが存在する可能性が考えられる。以上の背景をもとに、本研究は脳梗塞に対する新たなアプローチの可能性を見出すことを目的として行った。

【材料と方法】本研究の第1章では、一過性脳虚血モデルとして4-血管閉塞 (4VO) ラットを用いて LEH の薬理学的改善効果を評価した。LEH を虚血直後に経尾静脈的に投与し、30分後に再灌流した。行動試験は虚血再灌流7日後から開始し、Y字迷路試験、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、文脈的恐怖条件付け (CFC) 試験を施行し、CFC 試験後の摘出脳に対してニッスル染色と抗リン酸化 CREB (phosphorylated cAMP response element binding protein) 抗体による免疫染色を実施した。また、虚血再灌流時の脳血流と脳組織酸素分圧に対する LEH の効果を評価した。第2章では、神経活動と局所脳血流量の関係について、脳梗塞発症後に障害を受ける認知機能と関連性の強い海馬をターゲットとして基礎検討を実施した。海馬に投射している貫通線維の電気刺激に対する海馬における血流量変化を Laser-Doppler Flowmetry を用いて評価した。また、テタヌス刺激の負荷による長期増強現象 (LTP) を誘導することによって、シナプス伝達効率と貫通線維電気刺激による海馬血流量 (HBF) 増加反応における反応性の変化を評価した。さらに、第1章において行動学的障害が認められた 4VO ラットを用いて、神経活動による微小循環調節能について検討した。

【結果】第1章では、LEH を用いた一過性脳虚血に対する酸素供給療法を念頭に置いて 4VO ラットを用いて検討した。しかしながら、予想に反して血管閉塞中の LEH 投与による海馬への酸

素供給は認められなかった。一方、行動学的検討の結果、4VO ラットでは CFC 試験における長期記憶障害が検出され、その障害は虚血中の LEH 投与によって改善された。また、CFC 試験による神経活動の指標である CREB のリン酸化は、海馬 CA1 領域において 4VO によって減弱し、その減弱は LEH によって改善されており、本行動学的検討と相関が認められた。さらに 4VO ラットの虚血再灌流後に顕著な組織酸素分圧の上昇を認め、LEH 投与によってその上昇が抑制された。また、本研究で用いた LEH は、投与そのものによって行動学的試験における異常行動を惹起せず、循環動態学的検討においても変化を与えなかった。第 2 章では、神経活動と局所脳血流量の関係について、脳梗塞発症後に障害を受ける認知機能と関連性の強い海馬をターゲットとして基礎検討を実施した。このために貫通線維の電気刺激に対する HBF の変化を経時的にかつリアルタイムにて測定可能な実験系を *in vivo* の条件下において構築した。貫通線維に 1-100 Hz の連続電気刺激 (500 μ A, 50 回) を負荷したところ、HBF は一過性に増加し、5-10 Hz の連続刺激において最大の HBF 増加を示した。次に、貫通線維に 1-1000 μ A の連続電気刺激 (5 Hz, 50 回) を負荷したところ、強度依存的に HBF の一過性増加反応は増大した。また、この反応はテタヌス刺激による LTP 形成によって有意に増強されたが、HBF のベースラインには影響を与えなかった。さらに、第 1 章で長期記憶障害を認めた 4VO ラットを用いて、神経活動による微小循環調節能障害について検討した。その結果、HBF 増加反応は血管閉塞中において消失し、再灌流後には有意な差はなかったが減弱傾向を示した。また同様に、誘発集合電位も減弱傾向を示した。さらに、血管閉塞によって減少した HBF は、虚血再灌流後に完全には改善されなかった。

【考察】第 1 章において、2 血管閉塞ラットを用いた LEH による酸素供給の可能性が報告されているが、本研究で用いた 4VO ラットでは LEH 投与にもかかわらず、虚血中の低酸素状態は改善されなかった。しかしながら、LEH によって 4VO 虚血再灌流直後に引き起こされる過酸素状態を改善した。これらのことを考え合わせると、梗塞部位に依存するが、LEH の脳保護作用は ① 虚血中の酸素供給と ② 再灌流後の過酸素抑制という 2 種類の作用機序によって生じることが示唆された。第 2 章では、貫通線維の連続電気刺激に対する HBF の一過性増加反応は、刺激強度ならびに刺激頻度依存性を有し、相加的な反応であった。また、テタヌス刺激による LTP の誘発を介してシナプス伝達効率が亢進することによって、貫通線維電気刺激による一過性の HBF 増加反応は増強するが、この一過性の HBF 増加反応機構は HBF のベースライン調節に対しては関与していないことが推察された。また、4VO ラットにおける脳虚血再灌流後に微小血管調節能が障害されている可能性が考えられたが、誘発集合電位も同様に減弱傾向を示したことから、神経伝達が障害されている可能性も考えられた。しかしながら、この障害をより精密に捉えるための実験条件を考案する必要がある。また、本研究結果から、虚血再灌流後の慢性的な脳低灌流状態が確認された。この現象は虚血再灌流障害の治療ターゲットになる可能性があると考えられる。

【結論】一過性脳虚血に対する人工酸素運搬体の有効性、ならびに人工酸素運搬体の作用機序として酸素供給に加えて、脳虚血再灌流後の過酸素抑制による新たな有効作用を見出した。また、神経活動による血流上昇反応は、さらなる検討を必要とするが、海馬における血流はその求心性神経によって一部制御を受けており、この反応性を修飾することが新たな脳梗塞治療を含む脳神経疾患の新たな治療ターゲットの糸口になると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 真 樹
副 査 教 授 吉 岡 充 弘
副 査 教 授 小 山 司
副 査 教 授 神 谷 温 之
副 査 教 授 本 間 さ と

学位論文題名

脳における循環動態と高次脳機能に関する薬理学的研究

本研究は、脳血管疾患に対する新たな治療法を見出すために、① 4血管閉塞(4-vessel occlusion: 4VO) ラットに対する人工酸素運搬体 (Liposome-encapsulated hemoglobin: LEH) の脳保護作用とそのメカニズム、② 貫通線維電気刺激に対する海馬血流量 (Hippocampal blood flow: HBF) の影響について、行動薬理学的、組織学的、循環動態学的、ならびに電気生理学的検討を行った。本研究の第1章では、一過性脳虚血モデルとして4VOラットを用いてLEHの薬理学的効果とその作用機序について検討した。虚血直後に経尾静脈的にLEHを投与し、30分後に再灌流した。行動試験は虚血再灌流7日後から開始し、Y字迷路試験、オープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、文脈的恐怖条件付け (Contextual fear conditioning: CFC) 試験を施行し、CFC試験後の摘出脳に対してニッスル染色と抗リン酸化 CREB (Phosphorylated cAMP response element binding protein) 抗体による免疫染色を実施した。また、虚血再灌流時の脳血流量、脳組織酸素分圧、全身血圧と心拍数に対するLEHの効果を評価した。その結果、4VOラットのCFC試験における長期記憶障害が見出され、この障害は虚血中のLEH投与によって改善された。また、4VOによって減弱した海馬CA1領域におけるCREBのリン酸化は、LEHによって改善されており、行動学的結果と相関性が認められた。さらに4VOラットの虚血再灌流後に認められた顕著な組織酸素分圧の上昇は、LEH投与によって抑制された。以上の研究結果より、4VOラットに対してLEHは脳保護効果を示し、その作用は酸素供給よりもむしろ再灌流後の過酸素状態の抑制によって発現することが明らかとなった。

第2章では、神経活動と局所脳血流量の関係について、脳梗塞発症後に障害を受ける認知機能と関連性の強い海馬に焦点を当て、基礎的検討を実施した。海馬に投射している貫通線維の電気刺激による海馬における血流量変化をLaser-Doppler Flowmetryを用いて評価した。また、貫通線維刺激による海馬血流量HBFの反応性に対する長期増強現象 (Long-term potentiation: LTP) の形成ならびに脳虚血再灌流 (4VO) の影響について検討

した。貫通線維の連続電気刺激に対して HBF は一過性の増加反応を示し、その反応は刺激強度ならびに刺激頻度依存性を有し、相加的な反応であった。また、この反応はテタヌス刺激による LTP 形成によって有意に増強されたが、HBF の基礎値には影響を与えなかった。さらに、HBF 増加反応は血管閉塞中において消失したが、誘発集合電位には影響を与えなかった。さらに、血管閉塞によって減少した HBF は、虚血再灌流後に完全には改善されなかった。これらの結果により貫通線維による HBF の制御特性が明らかとなり、脳梗塞治療を含む脳神経疾患治療の発展に貢献することが期待される。

最終審査では、申請者の発表に対し、副査の小山教授から、LEH の臨床応用への可能性、既存の脳梗塞治療薬との相違点、副査の神谷教授から、LEH の副作用、神経活動による局所血流量の制御メカニズムについて、副査の本間教授から、LEH の特性、実験条件や統計解析について、副査の吉岡教授から、LEH の臨床開発状況、他の神経系における神経活動と血流変化との関連性について、さらに主査の田中（真）教授から、LEH の過酸素抑制メカニズムと組織 pH の変化の有無、短期記憶と長期記憶の結果の乖離、10Hz で最大反応が得られた機序について質問がなされた。申請者はすべての質問に対して、自らの実験結果と過去の文献を引用し、概ね適切に回答した。特に、LEH の過酸素抑制メカニズムに関しては、虚血中の両側総頸動脈閉塞による圧受容器・化学受容器反射の抑制による可能性と、再灌流後の血管収縮作用による可能性が提案された。また、神経活動による局所血流量の制御メカニズムに関しては、過去の文献にグリア細胞（アストロサイト）や周皮細胞が関与している可能性が示されている旨を述べた。

本学位論文は、脳虚血性疾患に対する人工酸素運搬体の脳保護作用と選択的な局所血流量の制御機構の一端を明らかにし、その成果は今後の脳血管性疾患に対する治療の発展に貢献するものと期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位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。