



The protective effect of hypothermia on hippocampal slices from guinea pig during deprivation of oxygen and glucose

谷本, 道則

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1987-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲0675

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1000675>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・（本籍）	谷 本 道 則	（愛媛県）
学 位 の 種 類	医 学 博 士	
学 位 記 番 号	医博い第543号	
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当	
学位授与の日付	昭和62年3月31日	
学 位 論 文 題 目	The Protective effect of hypothermia on hippocampal slices from guinea pig during deprivation of oxygen and glucose （無酸素，無グルコース時のモルモット海馬切片に及ぼす低温の保護効果）	
審 査 委 員	主査 教授 松 本 悟	
	教授 塙 功	教授 岡 田 安 弘

論 文 内 容 の 要 旨

（緒 言）

低酸素，低血糖に対する脳の感受性は高く，臨床的には3～4分の完全虚血で脳は非可逆的損傷を受ける。これに対し，低体温が脳エネルギー代謝を抑制することから，低酸素や脳虚血に対して保護効果があるとされ，その臨床的応用として，29℃前後の低体温麻酔が用いられている。ただ，それを支持する実験はin vivoによるものであり，no reflow phenomenonのような虚血後の脳循環不全のために神経組織自体の低酸素や脳虚血に対する抵抗性については明らかにされていない。そこで，循環系を介さない分離された脳切片を用いた実験モデルにより，温度の神経活動やエネルギー代謝に及ぼす効果を指標として，低温による無酸素，無グルコース時の脳組織自体に対する保護効果について調べた。

（方 法）

モルモットを断頭後，脳を取り出し，厚さ300 - 400 μm の海馬切片を作製，95O₂，5% CO₂で飽和した標準液（グルコースを含んだKrebs-Ringer）でincubationした。各切片を標準液で灌流したchamber内へ移し，歯状回の顆粒細胞層を電氣的に刺激して海馬錐体細胞層（CA₃₋₄野）より，微小ガラス電極により場の電位，すなわちシナプス後電位（PSP）を記録し，神経活動の指標とした。この電位は錐体細胞のシナプス後電位，及びスパイク群（population spike）を表わしていると考えられる。

切片の神経活動及びエネルギー代謝に対する温度の効果をみるために、灌流液の温度を変化させ、切片の温度を37℃から21℃へと下げ、次に37℃に戻した後42℃へと上げた。この間、連続的にPSPを記録し電位の振幅、及び潜時（刺激から陰性電位のピークまでの時間）を測定した。次に、37℃、28℃および21℃の3点で各切片を無酸素、無グルコース条件下にし、経時的（0、2.5、5、10、20、30 min）に各切片のATP（adenosine triphosphate）、PCr（phosphocreatine）、乳酸を酵素的に蛍光光度計を用いて測定した。その結果から切片の高エネルギー磷酸消費量（ $\Delta P = 2 \times \Delta \text{ATP} + \Delta \text{PCr} + 1.3 \times \Delta \text{lactate}$ ）、エネルギー利用率（energy use rate）、および Q_{10} 値を算出した。

無酸素、無グルコースに対する低温の保護効果を知るために、切片を種々の時間、無酸素、無グルコースの状態に置き、その後37℃の標準液で20分間 incubation してから、各切片のPSPを記録し、また切片のATP、PCrを定量して、機能的かつ生化学的な回復をみた。これらより survival time（灌流液を無酸素、無グルコースとした後、標準液に戻して機能的に回復可能な無酸素、無グルコースの最大許容時間）を求めた。

（結 果）

1. 神経活動およびエネルギー代謝に及ぼす温度の影響

切片の温度を37℃から徐々に下げていくとPSPの振幅は33℃付近で一過性に増大し（約120%）、それ以下に温度を下げていくと振幅は徐々に減少してゆき21℃で消失した。一方、PSPの潜時は温度低下とともに徐々に延長していった。温度を21℃から37℃へと戻すと、PSPは完全に回復し、更に上げていくと、潜時には著変ないが振幅は40℃付近で急激に減少し、42℃で非可逆的に消失した。切片を無酸素、無グルコースにした時の高エネルギー磷酸の経時的变化をみると、37℃では、2.5分の時点ですでにATP、PCrレベルは、対照群（ATP：10.2、PCr：24.8 mmol/kg protein）の各々60%、50%に、10分後には20%、6%にまで低下した。乳酸は逆に5分後には161 mmol/kg proteinと対照の約3倍に達し、それ以後は増加しなかった。28℃では、高エネルギー磷酸の低下は緩徐となり、2.5分後ではATP、PCrレベルは、対照群の各々73.3%、80.6%であり、乳酸の蓄積も10分後に203 mmol/kg proteinに達した。21℃では、2.5分後ではATPは96%に、PCrも92%に保たれ、乳酸の蓄積増加速度は更に低下し、20分後にはじめて188 mmol/kg proteinに達した。無酸素、無グルコースにしてからの切片のATP、PCrの減少、及び乳酸の増加の初速度より切片のエネルギー消費率が算出できた。すなわち、37℃、28℃、21℃での切片のエネルギー消費率はそれぞれ42.2~Pmmol/kg protein/min、22.0、7.0であった。また海馬切片のエネルギー消費率の温度変化による Q_{10} 値は4.1であった。

2. 無酸素、無グルコースに対する低温の保護効果

37℃、28℃、および21℃の3点において、無酸素、無グルコース条件下からの切片の機能的、代謝的回復について検討した。37℃では、無酸素、無グルコースにするとPSPは5-7分で消失し、10分以内に切片を標準液に戻すと完全に回復した。しかし、15分をこえると全く回復せず、10-15分ではその回復は部分的であった。したがって、survival timeは10分であった。28℃では、15分

間の無酸素、無グルコースの後ではPSPは完全に回復したが、30分後では全く見られず、survival timeは37℃と比較して若干延長した。ところが、21℃では45分間の無酸素、無グルコースの後でもPSPは完全に回復し、60分間のものでもわずかながら回復するものが観察され、survival timeは著しく延長した。高エネルギー磷酸の回復はPSPの回復とよく相関し、37℃では、10分間の無酸素、無グルコース後20分間切片を標準液に置くと、ATPは80%、PCrは95%に回復し、20分間の場合にはPCrはほぼ完全に回復したが、ATPは約60%と乏しかった。28℃でも同様の傾向を示し、21℃では45分間の無酸素、無グルコースでも、ATP、PCrともに約90%と良好な回復を示した。

(討 論)

本実験の目的に海馬切片を用いたことについて、以下のような利点が上げられる。

1) 灌流液の温度を変えることにより切片の温度を容易に設定できる。2) 神経機能の指標としての電気活動が容易に記録できる。3) 血管系を介さないために、虚血後の脳循環不全(例えばno reflow phenomenon)を考える必要がなく、神経組織自体の無酸素、無グルコースに対する抵抗性を調べることができる。4) 海馬の神経回路は形態学的にも電気生理学的にも詳細に同定されている。5) 一匹の動物から同じ構造を持つ左右あわせて約30もの切片が得られ、生化学的分析にも適している。

海馬切片の神経活動に及ぼす温度の効果については、結果1に報告した通りだが、これはin vivoでの報告と一致する。興味深いことは、33℃付近で一過性に振幅の増大があったことであるが、この現象の理由についてはなお検討を要する。海馬切片のエネルギー代謝について、 Q_{10} が4.1であったが、この値はin vivoにおける酸素消費より求めた値(2.0-4.4)とはほぼ一致する。

低体温の低酸素や脳虚血に対する保護効果が、臨床的には低体温麻酔に応用されている。しかし、低体温麻酔においては、体温低下に伴う心不全や脳の微小循環不全などのために28-30℃のmoderate hypothermiaが用いられる。今回の実験から、28℃での無酸素、無グルコースに対する保護効果はsurvival timeの変化からみてもわずかであるが、21℃というdeep hypothermiaが、神経活動やエネルギー消費、すなわち、機能的かつ代謝的な面からみて、非常に強い保護効果があることが確認された。今後は、hemodilutionや人工血液などを用いたdeep hypothermiaが、種々の原因による低酸素や脳虚血の治療手段として、臨床応用されることを考慮すべきである。

論文審査の結果の要旨

はじめに；脳循環の恒常性は、正常な脳代謝を維持する為に不可欠であることは、言うまでもない。临床上、数分間の脳完全虚血の場合、脳代謝は非可逆的に損傷を受けると云われている。一方低体温状態は、かかる脳循環障害由来の脳代謝の非可逆的变化を遅らせるとも云われているが、その機構については、いまだ完全に解明されていない。ことに臨床例の場合、虚血後一定時間を経て血流再開を試みても虚血由来の循環障害の関与が加わるため、神経細胞そのものの代謝変化のみで説明することは不可能である。本申請者はこの点に着目し、循環系を介さずして、神経細胞そのものの機能を測定するため分離脳切片を用い低温状態における神経活動、エネルギー変化を測定し、

ついで無酸素、無グルコース状態下での低温による脳組織の保護効果について検討した。

方法；モルモット脳の 300～400 μ m 海馬切片を作製しグルコースを含んだ Krebs-Ringer 液で灌流したものをを用い、以下の 2 つの実験を試みた。①①海馬切片歯状回の顆粒細胞層を電気刺激し海馬錐体細胞層からシナプス後電位（PSP）を記録した。ついで灌流液の温度を 37, 28, 21℃など変化させた状態で PSP の潜時、振巾を測定した。①②各温度での海馬切片を無酸素、無グルコースに維持した状態でその ATP（adenosine triphosphate）PCr（phosphocreatine）、乳酸値を測定し代謝状態を評価した。①③海馬切片を無酸素、無グルコース状態下で低温状態にて一定時間経過後再び 37℃にもどし、それまでの PSP、ATR、PCr を測定し、各温度における脳機能および代謝恢復能（恢復時間）を検討した。

結果；①①①温度低下による PSP 振巾は 33℃で一過性増大をみるがそれ以外では漸減し 21℃で消失した。PSP 潜時は徐々に延長したが再び 37℃にもどすと PSP は恢復、42℃で消失した。①②無酸素、無グルコースの条件下では、37℃のもとでは ATP、PG レベルは経時的に漸次低下してきた。一方乳酸値は対照に比し、甚しく高値を示した。28℃のもとでは ATR、PCr 値の低下はあるものの 37℃の場合程ではなく緩徐に下降してきたが乳酸蓄積は 10 分後 203 mmol/kg protein に達した。21℃のもとでは ATP、PCr 値の低下は一層緩徐なカーブをたどってきている。

乳酸蓄積も亦 37℃、28℃に比し緩徐な時間的变化を示した。以上の所見から各温度下での海馬切片のエネルギー消費率は、37℃で 42.2、28℃で 22.0、21℃で 7.0～Pmmol/kg protein/min であることがわかった。①③①各温度下での無酸素、無グルコースの条件下で、脳機能や代謝が可逆的に恢復する時間的限界を調べたもので、PSP は 37℃で 5～7 分で消失はするが 10～15 分以内に切片を標準液にもどすと完全に恢復した。28℃では 15～30 分以下の無酸素、無グルコース条件下で再び標準液にもどすと恢復、21℃ではさらに 45～60 分まで延長していることがわかった。また高エネルギー磷酸（ATP、PCr）の恢復能も PSP 恢復能とよく相関していることがわかった。

討論；神経機能の評価法としては、PSP など電気活動、高エネルギー磷酸の消費量や乳酸蓄積度、各種神経伝達物質、酵素の消長、神経細胞の形態変化などで行なわれているが、本論文では前二者を用い、神経細胞に侵襲が加わった場合の細胞代謝や機能の保護作用を検討したものである。第 2 の特性は無酸素、無グルコースの侵襲下で、循環系を介さずに生きている海馬切片で脳機能、脳代謝が低温のもとではどうなるかとの検討が行なわれたもので、これは純粋に神経細胞の低温効果が評価出来たものである。第 3 の特徴としては、臨床上類似病態として脳虚血後の代謝障害に低体温麻酔で治療する場合である。しかし、この場合循環系の介助があり、必ずしも実験モデルと同一には論じられない。しかし、これまでの低体温麻酔が脳循環や心機能保持の理由から 30℃前後が限度であったわけであるが、上記所見からさらに超低体温麻酔の効果と可能性が示唆された。

結論；本研究は、脳侵襲に対する低温効果をモルモット海馬片を用い無酸素、無グルコースのもとで検討されたものであるが、従来殆んど行なわれていなかった超低温下での神経細胞の保護効果について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は医学博士の学位を得る資格があると認める。