



Protective effect of adenosine on the anoxic damage of hippocampal slice

森, 正弘

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1993-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1161

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001161>

※ 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)	もり 森	まさ 正	ひろ 弘	(大阪府)
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)			
学位記番号	博い第835号			
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当			
学位授与の日付	平成5年3月31日			
学位論文題目	Protective effect of adenosine on the anoxic damage of hippocampal slice 海馬切片における無酸素無グルコース時の障害に対する アデノシンの保護効果			
審査委員	主査 教授	岡田 安弘		
	教授	春日 雅人	教授	田中 千賀子

論文内容の要旨

I. はじめに

脳虚血時の細胞障害を軽減し脳組織の虚血からの回復を良好にすることは臨床的にきわめて重要な課題である。現在までそのためにCa拮抗剤投与や低温処理など様々な試みがなされているが、なお決定的な方策は確立されていない。虚血時には酸素、グルコースの不足からATPの合成は遮断されATPは分解消失する。ATPの分解産物であるアデノシンは細胞外に放出され速やかにデアミナーゼによりイノシン、キサンチンに分解され実際のアデノシン濃度は極めて低濃度に保たれている。したがって虚血からの回復時にATPの前駆体として最も重要であるアデノシンの細胞内外での絶対的な不足が想定され、これを外部から補うことによって虚血からの高エネルギー磷酸の回復を促進することが考えられる。このことに着目し本研究において脳切片(海馬切片)を用いて神経機能とエネルギー代謝の両面から、投与したアデノシンが脳虚血時の細胞障害を軽減し虚血からの回復を促進することを明らかにしようとした。

II. 対象及び方法

雄のモルモット(200-300g)を開頭後速やかに海馬を取り出し、厚さ300-400 μ mの切片を作成した。切片を標準メヂウム(95%O₂, 5%CO₂で飽和したグルコースを含むリンゲル液)で20分間前インクバートした。本研究での実験はすべて36.5℃以下にて行なった。まず切片作成後からのATP, CrPの回復を検討するため切片の一部をアデノシンを含む(0, 0.1, 1.0, 5.0mM)標準メヂウムで120分インクバートした時のATP, CrP濃度を測定した。次に標準メヂウムを虚血状態と同

条件化におくため標準メヂウムを無酸素無グルコースとした。酸素を除去するためにメヂウムを 95 %N₂、5 %CO₂ で飽和した無酸素無グルコースからの回復は上記メヂウムを酸素を含む標準メヂウムにて置換した。

無酸素無グルコース時及びその後の回復時における海馬切片の神経機能に対するアデノシンの効果を検討するため、貫通線維を電気刺激して歯状回顆粒細胞層で誘発される集合シナプス後電位 (PS) を海馬切片の神経活動の指標としてモニターした。PS が 500 μ V 以上の電位を示す海馬切片を本実験には用いた。海馬切片のエネルギー代謝の指標として無酸素無グルコース時及びその後の回復時の ATP、クレアチン磷酸 (CrP) レベルを決定した。各切片組織の ATP 及び CrP は NADPH の産生により酵素的に蛍光光度計にて測定し、各切片の蛋白量は Lowry 法により測定した。

Ⅲ. 結果

(1) 海馬切片作成後の切片 ATP 及び CrP レベルの回復に対するアデノシンの効果

モルモット開頭後海馬切片を作成する間に脳組織は虚血の経過を経ており組織切片中の ATP, CrP の高エネルギー磷酸は消費されつくし、きわめて低い値を示す。それを酸素とグルコースを含む標準メヂウムでインクベートすると ATP, CrP は増加、回復する。この回復する過程で標準メヂウムに 0、0.1、1.0、5.0mM の濃度のアデノシンを加え 120 分後の切片の ATP 含量を測定するとそれぞれ 8.8、12.5、14.6、15.8mmol/kg 蛋白でありアデノシンが ATP の回復を促進することが示された。

(2) 無酸素無グルコース時における切片 ATP, CrP の減少に対するアデノシンの効果

(1)に示したように切片作成後の ATP の回復について 0.1–5.0mM のアデノシンに効果が認められたので以後の実験では 5.0mM アデノシンを投与した効果を調べることにした。海馬切片をアデノシンを含まないメヂウム (対照群) と 5 mM アデノシンを含むメヂウムにインクベートした群において 0、5、10、15、30 分間の無酸素無グルコース後の切片 ATP, CrP を測定したところ、無酸素無グルコース時の ATP, CrP の減少率に関してアデノシンは何らの影響を与えなかったが、アデノシンにて前処理した切片については(1)に述べたように無酸素無グルコース前に ATP レベルが高く維持されており無酸素無グルコース時においてもその ATP レベルは対照群よりも高く推移した。

(3) 無酸素無グルコース後の海馬切片 ATP 及び CrP の回復に対するアデノシンの効果

無酸素無グルコースの持続時間が、その後の高エネルギー磷酸の回復に与える影響を調べたところ、無酸素無グルコースの時間が短いほどその後の ATP 及び CrP の回復が良いことがわかった。そこでアデノシンの無酸素無グルコース後の海馬切片 ATP 及び CrP の回復に対する効果を検討したところ、15 分あるいは 30 分の無酸素無グルコース後、60 分の回復で対照群の ATP レベルはそれぞれ 6.0、4.5mmol/kg 蛋白であったが、アデノシン投与群の方はそれぞれ 12.0、8.1mmol/kg 蛋白とはるかに良い ATP レベルの回復を示した。

(4) 無酸素無グルコース後の神経機能の回復に対するアデノシンの効果

海馬切片顆粒細胞層にて記録される集合シナプス後電位 (PS) を指標としてアデノシンの無酸素無グルコースでの海馬切片の生存時間に対する効果を調べた。無酸素無グルコースにした後の神経機能の回復について各切片の PS が無酸素無グルコースにする以前の 50% 以上の回復を示した切片について機能的な回復とみなし、切片の回復可能であった生存時間と判定した。アデノシンを含まない対照群の切片では無酸素無グルコースの時間が 10 分以上の場合にはシナプス電位の回復はみられず、無酸素無グルコース時の生存時間は 10 分であった。それに対してアデノシン (5 mM) 存在下では 15 分の無酸素無グルコース後でも 2/3 (10/15) の切片はシナプス電位の回復を示し、20 分後でも 3/9 の切片で無酸素無グルコース処理前と同様なシナプス電位が記録され、シナプス電位という機能的な面からもアデノシンが無酸素無グルコース下での切片組織の生存時間を延長し、保護作用をもつことが認められた。

IV. 考察

脳でのエネルギー消費率はきわめて高く虚血時すなわち無酸素無グルコース時における ATP, CrP などの高エネルギー燐酸の減少は急速であり、in vivo ではその半減時間は 2 - 3 分であるといわれる。正常時 ATP, CrP の濃度はそれぞれ 1 - 2 mmol/kg 湿重量、2 - 5 mmol/kg 湿重量あるので ATP, CrP が分解消失したときのアデノシンの濃度は mM の濃度に達し細胞外に放出されと考えられている。但し放出されたアデノシンは細胞外アデノシンデアミナーゼで急速に分解されイノシンやヒポキサンチンに分解される。したがって正常状態でのアデノシンの細胞外濃度は μ M 以下といわれている。マイクロダイアリシス法を用いた in vivo での検討によると、脳虚血時のアデノシンの細胞外濃度は一過性に増大するが短時間に代謝分解される一方、血流再開後、即座に減少することが知られている。この様なことから虚血からの回復時に ATP の合成回復のためにはその前駆体であるアデノシンの濃度が限界要因となることは容易に想定できる。

結果(1)、結果(3)に示されたように mM といった高濃度のアデノシン投与が ATP 合成を促進していることは明らかである。実際に標識されたアデノシンを外因性に投与し、それが ATP に組み入れられることが脳切片、培養脳細胞、シナプトゾームにおいて報告されており、この実験で投与されたアデノシンは細胞内に取り込まれ ATP 産生に使用されたものと考えられる。

アデノシンは結果(2)に示すようにそれ自身無酸素無グルコース時の ATP, CrP の消費率、すなわちエネルギー消費率は変えない。しかし注意すべきことはアデノシンで前処理された切片では既に無酸素無グルコースにする以前に ATP レベルが高値に維持されて、10 分の無酸素無グルコース後でもアデノシン処理群の ATP は対照群の 4 倍にも維持されている。この事実も脳虚血時のアデノシンが細胞障害を軽減させる一因ともなっていると考えられる。

アデノシン及びその誘導体は中枢神経で神経伝達物質の放出を抑制し、また細胞外へのカリウムの流出を促進することによってシナプス伝達に抑制的に作用し神経活動を抑制すると考えられる。虚血

時に神経活動を抑制することはエネルギー消費率を低下させ、それによって虚血時からの回復を促進することも考えられる。しかし虚血時にはエネルギー不足による急速な膜の脱分極のために神経機能が消失してしまうため、この要因はあまり大きな保護作用となっていないであろう。中枢神経の興奮性アミノ酸神経伝達物質であるグルタミン酸は虚血時に細胞外に放出され、いわゆる興奮性毒として作用することもよく知られている。アデノシンがグルタミン酸放出を抑制するとすればこのことが虚血時の障害を軽減する可能性もある。これらの副次的な作用の上に本研究で示されたような無酸素無グルコース時におけるエネルギー代謝及びシナプス電位そのものに対する生存時間の延長は今後臨床における虚血の障害の予防と治療に一つの示唆をあたえるものである。

論文審査の結果の要旨

虚血時には酸素とグルコースの不足から ATP の合成は遮断され、ATP は速やかに分解消失する。その分解産物であるアデノシンは細胞外に放出され、速やかに代謝分解される。そのために脳組織でのアデノシン濃度は極めて低濃度に保たれている。従って虚血からの回復時に ATP の前駆体として最も重要であるアデノシンの細胞内外での絶対的な不足が想定され、これを外部から補うことによって虚血からの高エネルギー磷酸の回復を促進することが期待される。本研究論文では、投与したアデノシンが脳虚血時の細胞障害を軽減し、虚血からの回復を促進することを明らかにした。すなわち脳切片（モルモット海馬切片）を用い、切片組織 ATP、クレアチン磷酸（CrP）レベルをエネルギー代謝の指標とし、さらに海馬切片歯状回顆粒細胞層で誘発される集合シナプス後電位（PS）を神経活動の指標として、切片を無酸素無グルコース条件下においた時及びその後の回復時において、アデノシンがどのような効果を持つかを明らかにした。

脳を摘出し海馬切片を作成する間に脳組織は虚血の経過を経ており、組織切片中の ATP、CrP は極めて低い値を示す。それを酸素とグルコースを含む標準メデウムに 0、0.1、5.0mM の濃度のアデノシンを加え、120 分後の切片の ATP 含量を測定するとそれぞれ 8.8、12.5、14.6、15.8mmol/kg 蛋白でありアデノシンが ATP の回復を促進することが示された。

アデノシンの無酸素無グルコース後の海馬切片 ATP 及び CrP の回復に対する効果を検討したところ、15 分の無酸素無グルコース条件後、60 分間の回復で対照群の ATP、CrP レベルはそれぞれ 6.0、15.9mmol/kg 蛋白であったが、アデノシン投与群の方はそれぞれ 12.0、16.5mmol/kg 蛋白であり、有意に切片組織の高エネルギー磷酸の回復を促進していた。

海馬切片顆粒細胞層にて記録される集合シナプス後電位（PS）を指標としてアデノシンの無酸素無グルコース条件下での生存時間に対する効果を調べたところ、アデノシンを含まない対照群の切片では無酸素無グルコースの時間が 10 分以上の場合にはシナプス電位の回復は見られず、無酸素無グルコース時の生存時間は 10 分であった。それに対してアデノシン（5 mM）存在下では 15 分及び 20 分の無酸素無グルコース後でも PS は記録され、切片組織の生存時間は 5～10 分延長されることが明らかとなり、神経機能的な面からもアデノシンが無酸素無グルコース下での切片組織の生存時間を延

長し、保護作用をもつことが認められた。これらの実験結果は、アデノシンが虚血時における脳組織障害をエネルギー代謝及び神経機能の両面において保護作用を有することを示している。

標識されたアデノシンを外因性に投与し、細胞内に取り込ませてそれが ATP に組み入れられることが脳切片、培養脳細胞、シナプトゾームにおいて報告されており、本実験で投与されたアデノシンは細胞内に取り込まれ ATP 合成を促進したものと考えられる。

一方アデノシン及びその誘導体は、中枢神経でシナプス伝達に抑制的に作用し、神経活動を抑制すると考えられている。虚血時にアデノシンがより速やかに神経活動を抑制することはエネルギー消費率を低下させ、虚血時からの回復を促進することも考えられる。このような副次的作用の上に、本研究で示された無酸素無グルコース時におけるアデノシンのエネルギー代謝及びシナプス電位そのものに対する生存時間の延長は、今後臨床における虚血の障害の予防と治療に一つの大きな示唆を与えるものと考えられる。本研究で明らかにされた脳虚血時のアデノシンによる保護効果は、従来ほとんど行なわれなかった脳虚血時のアデノシンの直接的な生理作用を明らかにする上に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。よって本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。