



The Protective Effect of The Hypothermia on The Recovery of Neural Activity after Deprivation of Oxygen and Glucose : Study of Slices from The Hippocampus and Superior Colliculus

栗原, 英治

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1996-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1498

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001498>

※ 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)	栗原英治 (埼玉県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	博い第1024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8年3月31日
学位論文題目	The Protective Effect of The Hypothermia on The Recovery of Neural Activity after Deprivation of Oxygen and Glucose - Study of Slices from The Hippocampus and Superior Colliculus (神経活動における無酸素、無グルコース状態からの回復に対する低温化の保護効果-)
審査委員	主査 教授 岡田安弘 教授 玉木紀彦 教授 尾原秀史

論文内容の要旨

I. はじめに

脳組織の低温化によって、虚血時における神経細胞の生存時間を延長させることが知られている。すなわち、in vivoの脳虚血モデルの研究で、脳組織の代謝率は低温化により低下させられることが示され、このことから、低温化は虚血や無酸素時の脳組織の障害を少なくすることに役立つことが期待されるに至った。さらに、脳切片を用いた実験では、切片を低温度に保つことによって、無酸素、無グルコース時でも組織の生存時間を劇的に延長させ、虚血からの回復も良好であることを我々は報告してきた。このように低温化は虚血による神経障害を軽減するという点で重要な役割を果たしているが、虚血時の低温の程度とその後の神経機能の回復の関係は、in vivoの実験では、技術的な限界、虚血後の回復時に起こるno reflow phenomenonの問題や、虚血に対する耐性が脳の各部位で異なることなどの理由により正確に調べられていない。一方、虚血や低酸素に対しては、脳幹組織のほうが大脳組織よりも強い抵抗性を持っていることが知られているが、その両者の違いは十分に解明されていない。

本論文においては、大脳の一部である海馬と脳幹の一部である上丘組織に注目し、それらの部位の脳切片を作成して、灌流液から酸素、グルコースを除去した虚血の条件下におき、その神経機能の回復に対して低温化が与える効果について検討した。脳切片を用いたin vitroの実験では、神経活動は容易に記録され、灌流液の温度は正確にコントロールでき、虚血から回復時の再血流不能現象の問題を考慮する必要もなく、ニューロンそのものの虚血条件に対する耐性を知ることができる。

II. 方法

脳切片は、体重200-300 gのモルモットの脳から海馬と上丘を摘出し海馬切片(厚さ300-400 μm)と上丘切片(厚さ400-600 μm)を作製した。実験を始める前に、脳切片は最低30分間、酸素とグルコースを含む37°Cの標準灌流液〔濃度(mM) : グルコース10, NaCl 125, KCl 3, KH_2PO_4 1.24, Mg SO_4 1.3, CaCl_2 2, NaHCO_3 26〕でインキュベーションした。その後脳切片を37°Cの標準液が8 ml/

minの流量で持続的に灌流されるチャンバーに入れ、実体顕微鏡下に刺激電極、記録電極をセットした。海馬切片の貫通線維を電気刺激して、歯状回の顆粒細胞層で誘発されるシナプス電位(集合電位)を記録し、上丘切片では、視神経層を電気刺激して、浅灰白質層で誘発されるシナプス電位を記録した。この際、海馬切片ではシナプス電位が $500\mu\text{V}$ 以下を示したもので、上丘切片では $200\mu\text{V}$ 以下を示したものは除外した。

III. 結果

脳切片における虚血後の神経活動の回復に対する低温化の効果を調べるため、各々の脳切片を 37°C 、 35°C 、 33°C 、 30°C の各温度の条件下に灌流液から酸素、グルコースを5、10、15、20、25、30、40分間除去し、脳切片を虚血様の状態にした。その間、灌流チャンバー内のメジウムの温度は持続的にモニターされ一定の温度に保たれた。その後、脳切片を酸素とグルコースを含む 37°C の標準液のなかに入れ、少なくとも30分間インキュベーションしてから、シナプス電位を測定した。各切片で、測定したシナプス電位が無酸素、無グルコースのメジウムに入れる前に記録された電位の50%以上観測されれば、その切片は各条件下で無酸素、無グルコースから回復したものとみなした。この場合シナプス電位が機能的に回復し得る無酸素、無グルコース状態の許容時間をそれぞれの切片の生存時間(critical survival time)とすれば、 37°C で、海馬切片では10分間、上丘切片では5分間であった。 35°C では、海馬切片では10分間、上丘切片では15分間であった。 37°C から 35°C への 2° の低温化によって、上丘切片の生存時間は著しく延長したが、海馬切片では大きな影響を認められなかった。 33°C と 30°C 下における虚血様条件下では、その生存時間は海馬、上丘切片ともにそれぞれ25分間、20-30分間で、海馬と上丘の間に差が認められなかった。

IV. 結論と考擦

本研究により、脳組織での低温化による保護効果は、脳の部位による差が存在すること、 35°C 下における虚血様状態では 2° というわずかな低温化で、上丘のほうが海馬よりも虚血に対してより強い抵抗性を持っていることが示唆された。すなわち、 2° という低温化においても脳幹組織の方が大脳組織より虚血に対する抵抗性が強いことが示された。この理由として、脳幹部が大脳部位よりもグルコース代謝速度が速いと言う報告もあることから、少しの低温化でも脳幹部では、代謝がより強く抑制されるためであると考えられた。しかし、その保護機構については、興奮性アミノ酸の放出や細胞内 Ca^{2+} の異常流入、蓄積等の神経細胞膜の機能に及ぼす影響等につき、今後さらなる検討が必要であると考えられた。臨床的な観点からみると、 35°C の低温化による脳幹組織の保護効果は、虚血から脳幹を保護すると言う点で、重要な意義をもっており、実際、脳幹部の虚血性神経細胞障害の治療を行う上で、治療法の一つとして考慮されるべきものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

脳における循環障害や虚血の研究において、その障害を最低限に抑える研究は、臨床的にも重要な意味を持っている。その障害を軽減する対策は種々考えられてきたが、その中の一つに低温化によって虚血、循環障害時の神経細胞の生存時間を延長させる可能性が追求されてきている。しかし、現在までの研究はin vivoによる研究が主流であり、生体温度のコントロールと脳組織の虚血から回復時の循環系のno reflow現象、あるいは大脳や脳幹といった部位差などによって神経細胞そのものに対

する低温効果についての精細な結果は得られていない。

本申請者の研究では、脳から分離した切片を用いシナプス前繊維の電気刺激で誘発されるシナプス電位を指標として灌流液から酸素、グルコースを除去した虚血モデルにおいて、低温化が神経機能の回復にどのような効果を持つかについて精細に検討した。切片としては大脳からの組織として海馬の切片を、脳幹からは上丘の切片を作製し、灌流液から酸素、グルコースを除去した時の神経活動の変化を記録するとともに、酸素、グルコースを除去して5、10、15、20、25、30、40分後に灌流液に酸素、グルコースを加えた時のシナプス電位の回復を追跡した。虚血様条件下における温度は37℃、35℃、33℃、30℃に保ち、虚血前および虚血後回復時の灌流メジウムの温度は37℃に保った。神経機能の虚血条件からの回復についてシナプス電位が機能的に回復し得る無酸素、無グルコース状態の許容時間を切片組織が回復し得る生存時間とすると、37℃下の虚血様条件下では海馬切片および上丘切片の生存時間はいずれも5分であった。35℃下の海馬切片では10分間、上丘切片では15分間であった。33℃、30℃下における虚血様条件下ではその生存時間は海馬、上丘切片ともにそれぞれ25分、30分で海馬と上丘の間に差は認められなかった。

本研究により、脳虚血時における低温化の保護効果は脳の部位による差が存在すること、35℃下における虚血様状態では2℃というわずかな低温化でも上丘の方が海馬よりも虚血に対し強い抵抗性をもっていた。すなわち、2℃という低温化においても脳幹組織の方が大脳組織よりも虚血に対する抵抗性は強いことが示された。

これらの理由には、大脳、脳幹におけるニューロンの性質の違い、代謝速度の違い、神経伝達物質やシナプス結合様式の問題、グルタミン酸の放出と蓄積の問題など様々な要素が考えられ今後検討を要するが、臨床的な観点からすると37℃から35℃への低温化による脳幹組織の保護効果は脳幹部の虚血性神経細胞障害の治療を行う上で考慮されるべき所見であると考えられる。

本研究では脳虚血からの神経機能の回復について低温化の効果を海馬、上丘の切片を用い研究したものであるが、従来ほとんどが行われなかった虚血時のニューロン活動の維持に対する低温度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、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。