Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Ischemic cross'' tolerance in hypoxic ischemia of immature rat brain

和田, 太郎

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2001-01-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2210
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002210

※ 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。

【78】

氏　名・(本　籍)　**和田　太郎（兵庫県）**

博士の専攻分野の名称　　博　士　（医　学）

学　位　記　番　号　　博い第１３１６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１３年１月３１日

【学位論文題目】

Ischemic "cross" tolerance in hypoxic ischemia of immature rat brain

（幼弱ラット脳における虚血「交差」耐性）

審　査　委　員

主査　教授　玉木　紀彦

教授　大北　裕　　教授　尾原　秀史

はじめに

軽いストレスによる前処置 (preconditioning、以下 PC) がもたらすストレス耐性の獲得には、生体の持つ内因性の臓器保護メカニズムが広く働いているものと考えられ、なかでも熱ショック蛋白 (heat shock protein、以下 hsp) の発現や adenosine A1 受容体を含む細胞内伝達機構の関与などが示唆されている。脳虚血においては、虚血性ストレス前処置後の虚血負荷での耐性獲得が広く知られているが、非虚血性ストレスの前処置後の虚血負荷での耐性獲得の機序については多くは知られていない。今回私どもは、新生ラット低酸素負荷虚血 (hypoxic-ischemia、以下 H-I) モデルを用いて、高体温及び低酸素の前処置による虚血耐性の効果と、hsp の発現について検討した。

方法

生後 7 日目の新生 Wistar rat を用い、Rice の方法に従い 、低酸素負荷虚血モデルを作製した。手術は 4%ハロセンで麻酔導入後、2%ハロセンで維持した。顕微鏡下に頚部正中切開後、右総頚動脈を剥離し、9-0 ナイロン糸で二重結紮し結紮間を切離した。ラットを母獣に返して 3 時間経過後、8%酸素 2 時間の低酸素を負荷した。低酸素負荷時は直腸にカニューレ型プローブを 5mm 挿入、尾にテープ固定し、直腸温をモニターした。37℃のヒートパットを用いて床から保温し体温を一定に保った。

前処置として高体温と低酸素のストレスを与えた。高体温前処置としては、低酸素負荷虚血導入の 24 時間前にヒートパットと白熱燈を用いて、15 分間、直腸温が 41℃あるいは 39℃になるような高体温負荷を与えた。低酸素前処置としては、低酸素負荷虚血導入の 24 時間前に、 8 %低酸素のチャンバーに 3 時間または 1.5 時間入れて負荷を与えた。各々 41℃群、39℃群、1.5H 群、3h 群と呼ぶことにする。前処置なし、低酸素虚血のみをコントロール群と呼ぶことにする。

高体温負荷、低酸素負荷とも予備実験にて、致死的な細胞損傷をもたらさないことを組織学的に確認した。 7 日後脳を取り出し、浸潤ホルマリン固定し、パラフィン包埋した。線条体レベルと海馬レベルの 5 μm 冠状断スライスを作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、虚血損傷の範囲を計測した。虚血損傷部位は細胞外腔の嚢胞化、神経細胞の脱落消失などの壊死所見の認められる領域とした。

各個体脳の虚血損傷からの生存面積を虚血側生存面積/反対側面積×100 (%) で表わした。虚血のできた動物の個体数、脳生存面積を比較した。$p<0.05$ を有意差ありとした。

ストレス蛋白の発現を検討するため、Western 法により脳内の hsp 72 の発現を調べた。41℃群、39℃群、1.5h 群、3h 群、コントロール群の 5 群を用意した。その半球脳における hsp 72 の発現を モノクローナル抗体にて検討した。

また、免疫染色にて Western 法により hsp72 の発現のみられた群において、脳内のどの部位に発現があるか検討した。視床と海馬レベルの 40 μm のス

ライスを作成し、hsp 72 モノクローナル抗体を用いてその発現を調べた。

結果

虚血のできた動物の個体数はコントロール群で 19/23 匹(83%)であった。高体温前処置により、39℃群、41℃群で各々 17/19 匹（90%）、4/21 匹(19%)となり、41℃群でのみ脳保護効果がみとめられたが、39℃群では有意差はなかった。低酸素前処置により、1.5h 群、3h 群で各々、15/23 匹(65%)、3/20 匹(15%)となり、1.5H 群、3h 群において、前処置の程度に応じた有意な脳保護効果が認められた。

線条体スライスにおける虚血からの生存面積はコントロール群で 54.6±5.2 %(平均±標準偏差)であった。高体温前処置により、39℃群、41℃群で各々 55.1±4.4 %、90.6±4.8 %であった。41℃群のみ有意な脳保護効果がみられたが、39℃群では有意差はみられなかった。低酸素前処置により、1.5h 群、3h 群で各々、75.4±4.1 %、93.5±3.6 %であった。低酸素前処置の程度に応じて有意な脳保護効果がみられた。

海馬スライスにおける虚血からの生存面積はコントロール群で 49.3±5.6 %(平均±標準偏差)であった。高体温前処置により、39℃群、41℃群で各々 63.5±3.9 %、92.5±3.8 %であった。41℃群のみ有意な脳保護効果がみられたが、39℃群では有意差はみられなかった。低酸素前処置により、1.5h 群、3h 群で各々、76.0±4.1 %、92.7±4.0 %であった。低酸素前処置の程度に応じて有意な脳保護効果がみられた。

Western 法による hsp72 の発現については、低酸素虚血の 24 時間後の脳サンプルより、 hsp72 の強い発現がみられた。しかし、高体温、低酸素のどの前処置においても、hsp72 の発現はみられなかった。

免疫染色による hsp72 の発現については、低酸素虚血の脳スライスにおいて、線条体背側、海馬、皮質に hsp72 の発現が見られた。しかし、高体温、低酸素のどの前処置においても、hsp72 の発現はみられなかった。

考察

様々なストレスに対する生体のストレス応答がこれまで数多く報告されており、軽いストレスによりその後の強いストレスに抵抗力が現れることが示されている。

脳虚血においては、軽度の虚血前処置によりその後の致死的な虚血にたいし虚血耐性 (ischemic tolerance) が得られることが砂ネズミ全脳虚血モデルにおいて示された。このメカニズムのひとつとして、hsp の発現の関与が多くの報告から示唆されている。Aoki らによれば砂ネズミモデルでは、3.5 分の閉塞で 7 日後 CA1 細胞の大半が失われるが 2 日前に 2 分間の閉塞をくわえておくと CA1 細胞は失われず、虚血耐性が獲得されることをが示された 。そのメカニズムとして 2 分間の前処置のみで 2 日後に hsp70 が多量に発現していること、前処置によりその後の 3.5 分の虚血の後にもより早期から hsp70 mRNA の発現が見られることなどを指摘している。

このように、同じ種類のストレス（致死的脳虚血前の軽度脳虚血負荷）が虚血耐性をもたらすが、異なった種類のストレスでも耐性が獲得される。脳虚血においてはChoppらがラットに24時間前41℃15分間の高体温前処置を加えると前脳虚血に対し保護効果があることを報告した。

成熟脳における虚血耐性の獲得と同様に、発達期の幼若脳においても同様の虚血耐性が報告されている。しかしながら、成熟脳の多数の報告に比べ幼弱脳においては虚血ストレスによるhspの誘導は充分でないようである。Blumenfeldらは生後7日目ラットでI-H後24時間ではhsp m-RNAの発現は海馬にごくわずかみられるのみであり、I-HによるhspのmRNAの発現が十分になるのは生後23日目に成長してからであると報告している。免疫組織学的には生後7日目ラット2時間のI-Hで1時間後から24時間後に虚血側半球に海馬、皮質においてhsp72の発現が見られたが、細胞死のおこらないより軽度のストレスである低酸素負荷のみではhspの発現は見られないという。

虚血耐性現象のメカニズムとしては、内因性の脳保護因子がひろく働くものと考えられる。hspの発現が乏しい幼弱脳モデルはhsp以外の内因性脳保護メカニズムを解明するのに適したモデルと考えられた。

結論

ラット幼弱脳において、成熟脳と同様に低酸素前処置で虚血耐性が獲得された。また、虚血とは異なるストレスである高体温前処置でも虚血耐性（交差耐性現象）が獲得された。成熟脳と異なり幼弱脳においては、前処置によりhsp72の発現は見られず、他に広く内因性脳保護メカニズムが働くことが示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1317 号	氏　名	和田　太郎
論文題目	Ischemic "cross" tolerance in hypoxic ischemia of immature rat brain 幼弱ラット脳における虚血「交差」耐性		
審査委員	主　査　玉木紀彦 副　査　大地裕 副　査　尾原秀史		
審査終了日	平成 12 年 12 月 26 日		

（要旨は1，０００字～2，０００字程度）

はじめに

脳虚血においては、虚血性ストレス前処置後の虚血負荷での耐性獲得は広く知られているが、非虚血性ストレスの前処置後の虚血負荷での耐性獲得の機序について不明な点が多い。今回申請者は、新生ラット低酸素-虚血モデルを用いて、高体温及び低酸素の前処置による虚血耐性の効果と熱ショック蛋白（hsp）の発現について検討した。

方法

生後7日目の新生 Wistar rat を用い、Rice の方法に従い 、低酸素負荷虚血モデルを作製した。右総頚動脈を二重結紮後、結紮間を切離した。その後、8%酸素2時間の低酸素を負荷した。低酸素負荷時は体温を一定に保った。（コントロール群）

前処置として高体温と低酸素のストレスを与えた。高体温前処置としては、低酸素負荷虚血導入の24時間前にヒートパットと白熱燈を用いて、15分間、直腸温が41℃あるいは39℃になるような高体温負荷を与えた。低酸素前処置としては、低酸素負荷虚血導入の24時間前に、8％低酸素のチャンバーに3時間または1.5時間入れて負荷を与えた。（各々41℃群、39℃群、1.5h 群、3h 群と呼ぶ。）7日後脳を取り出し、ホルマリン固定後、パラフィン包埋した。線条体レベルと海馬レベルの5μm冠状断スライスを作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、虚血損傷の範囲を計測した。各個体脳の虚血損傷からの生存面積を虚血側生存面積/反対側面積×100(%) で表わした。

ストレス蛋白は、Western 法と免疫染色法により脳内の hsp 72 の発現の有無とその発現部位を調べた。

結果

虚血のできた動物の個体数はコントロール群で19/23匹(83%)であった。高体

温前処置により、39℃群、41℃群で各々17/19匹（90%）、4/21匹(19%)となり、41℃群でのみ脳保護効果がみとめられた。低酸素前処置により、1.5h 群、3h 群で各々、15/23匹(65%)、3/20匹(15%)となり、両群とも、前処置の程度に応じた有意な脳保護効果が認められた。

線条体スライスにおける虚血からの生存面積はコントロール群で54.6±5.2 %(平均±標準偏差)であった。高体温前処置により、39℃群、41℃群で各々55.1 ±4.4 %、90.6±4.8 %で、41℃群のみ有意な脳保護効果がみられた。低酸素前処置により、1.5h 群、3h 群で各々、75.4±4.1 %、93.5±3.6 %で、低酸素前処置の程度に応じて有意な脳保護効果がみられた。

海馬スライスにおける虚血からの生存面積はコントロール群で49.3±5.6 %であった。高体温前処置により、39℃群、41℃群で各々63.5± 3.9 %、92.5±3.8 %で、41℃群のみ有意な脳保護効果がみられた。低酸素前処置により、1.5h 群、3h 群で各々、76.0±4.1 %、92.7±4.0 %で、低酸素前処置の程度に応じ有意な脳保護効果がみられた。

hsp72の発現については、低酸素虚血の24時間後の脳サンプルより、hsp72の強い発現がみられた。しかし、高体温、低酸素のどの前処置においても、hsp72の発現はみられなかった。

考察

様々なストレスに対する生体のストレス応答がこれまで数多く報告されており、軽いストレスによりその後の強いストレスに抵抗力が現れることが示されている。

脳虚血においては、軽度の虚血前処置によりその後の致死的な虚血にたいし虚血耐性（ischemic tolerance）が得られることが砂ネズミ全脳虚血モデルにおいて示された。このメカニズムのひとつとして、hsp の発現の関与が多くの報告か

ら示唆されている。

このように、同じ種類のストレス（致死的脳虚血前の軽度脳虚血負荷）が虚血耐性をもたらすが、異なった種類のストレスでも耐性が獲得される。脳虚血においてはChoppらがラットに24時間前41℃15分間の高体温前処置を加えると前脳虚血に対し保護効果があることを報告した。

成熟脳における虚血耐性の獲得と同様に、発達期の幼若脳においても同様の虚血耐性が報告されている。しかしながら、成熟脳の多数の報告に比べ幼弱脳においては虚血ストレスによるhspの誘導は充分でないようである。Blumenfeldらは生後7日目ラットで低酸素-虚血後24時間ではhsp m-RNAの発現は海馬にごくわずかみられるのみであり、低酸素-虚血によるhsp m-RNAの発現が十分になるのは生後23日目に成長してからであると報告している。免疫組織学的には生後7日目ラット2時間の低酸素-虚血で1時間後から24時間後に虚血側半球に海馬、皮質においてhsp72の発現が見られたが、細胞死のおこらないより軽度のストレスである低酸素負荷のみではhspの発現は見られないという。

虚血耐性現象のメカニズムとしては、内因性の脳保護因子がひろく働くものと考えられる。hspの発現が乏しい幼若脳モデルはhsp以外の内因性脳保護メカニズムを解明するのに適したモデルと考えられた。

結論

ラット幼弱脳において、成熟脳と同様に低酸素前処置で虚血耐性が獲得された。また、虚血とは異なるストレスである高体温前処置でも虚血耐性（交差耐性現象）が獲得された。成熟脳と異なり幼弱脳においては、前処置によりhsp72の発現は見られず、他に広く内因性脳保護メカニズムが働くことが示唆された。

本研究は、生後一週の新生ラットの幼若脳における虚血「交叉」耐性について研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった高体温と低酸素の前処置を

低酸素-虚血幼若脳に負荷することによって虚血耐性が獲得されること、またこれら前処置により heat shock protein 以外の他の内因性脳保護メカニズムによるという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。