Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-06-21

Effects of anoxia and recovery on the neurotransmission and the level of high-energy phosphates in the thin hippocampal slices from the guinea pig

米田, 一志

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1988-11-30
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙1222
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2001222

※ 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)　米田一志(大阪府)

学位の種類　医学博士

学位記番号　医博ろ第1022号

学位授与の要件　学位規則第5条第2項該当

学位授与の日付　昭和63年11月30日

学位論文題目　Effects of Anoxia and Recovery on the Neurotransmission and the Level of High-Energy Phosphates in the Thin Hippocampal Slices from the Guinea Pig
(無酸素および無酸素からの回復時におけるモルモット海馬薄切片の神経伝達および高エネルギーリン酸レベルに及ぼす効果)

審査委員　主査　教授　岡田安弘
教授　田中千賀子　教授　中井久夫

論文内容の要旨

〔緒　言〕

無酸素が、脳のエネルギー代謝及び脳の機能に決定的な障害を及ぼすことは良く知られている。一般に、完全虚血時間が6～8分を過ぎると、脳の機能に不可逆的な障害が起こる。しかし、虚血及び無酸素からの脳機能の回復能力に関しては、いまだ議論がある。in vivoの研究では、無酸素後におこるno reflow phenomenon(再血流不能現象)などの循環障害のために、ニューロン自身の無酸素に対する抵抗性について詳細な研究をすることは困難である。これに対して脳切片を用いた研究では、回復期にメジウム中で血管を介してでなく酸素やグルコースが組織に直接供給される為、no reflow phenomenonを考慮する必要はない。本研究は海馬切片を用いて、神経活動ならびにATP、P-Crなどの高エネルギーリン酸(アデノシン3リン酸(ATP)、クレアチンリン酸(P-Cr))を指標にして、無酸素の効果及び、無酸素下の脳組織の生存時間を明らかにしたものである。

〔方　法〕

本実験では、モルモット海馬切片(厚さ300～400μm)が使用された。実験前に各切片は、95%O_2、5%CO_2で飽和した標準液(10mMグルコースを含むKrebs-Ringer)の中で20分間incubationされた。神経活動は海馬歯状回の顆粒細胞層を電気的に刺激し、錐体細胞層(CA_{3-4}野)より得られたシナプス後電位(postsynaptic potentials, PSPs)を指標として調べた。無酸素の実験では、酸素の混合ガスを95%N_2、5%CO_2で置換飽和した。無グルコース液は、標準液からグルコー

スを除去して、無酸素及び無グルコース下に各切片の電気活動を記録するとともに、さまざまな時点で各切片のATP、P-Crを酵素的に螢光光度計を用いて定量した。無酸素、無グルコースからの回復には切片を酸素で飽和した標準液で再灌流した。本実験では灌流液の温度は36.5℃に保たれた。

〔結　果〕

1. 無酸素及び無酸素からの回復時における神経活動

無酸素状態下ではグルコースが存在する場合としない場合とで神経活動の消失、回復に大きな差が生じた。海馬切片で得られるPSPsを指標にして無酸素の効果をみると、灌流液に酸素もグルコースも共に存在しない場合には、電位は6～8分で消失した。再び酸素とグルコースを含む標準液に戻すと電位は回復してくるが、無酸素の開始からの時間が10分を過ぎるとPSPsの回復は不完全となり15分を過ぎると電位はもはや回復しなかった。この場合消失した電位がもとの振幅にまで完全に回復する無酸素状態下の海馬の存在時間（survival time－機能的に回復し得る無酸素、無グルコース状態下の許容時間）は10分であるといえる。灌流液にグルコースが含まれている場合の無酸素のPSPsに対する効果はきわめて緩徐でPSPsの消失には70分を要し、電位消失のhalf timeは35分前後であった。多くの場合無酸素の開始5～10分の間で一過性に電位の振幅増大があり、その後PSPs振幅は徐々に減少した。この場合の海馬切片の生存時間は150分であった。

2. 無酸素及び無酸素からの回復時における高エネルギーリン酸の濃度

海馬切片を無酸素、無グルコース下におくと、ATP（対照群初期濃度12.9mmol／kg蛋白）、P-Cr（初期濃度27.6mmol／kg蛋白）の急速な減少がみられた。2分の無酸素、無グルコースでの切片のATPは74%に、P-Crは59%に低下し、10分ではATP、P-Cr共に32%に低下した。無酸素状態からの回復時におけるATP、P-Crレベルについて無酸素の時間が長くなるほどこれらの高エネルギー物質の回復も悪くなった。切片を10分無酸素、無グルコース状態にさらした後、酸素を含む標準液に戻して30分後の切片ATP、P-Crの回復をみると、それぞれ98%と126%であった。無酸素の時間が20分ではATPでは77%、P-Crは108%の回復をみた。グルコースが十分に供給されている条件下での無酸素においては、高エネルギーリン酸の消失も緩徐でATPは60分の無酸素で69%に、P-Crはもとの58%に維持されていた。ATP、P-Crについてグルコース存在下の無酸素からの回復（30分後）では120分にわたる無酸素後でも切片のATPはもとの69%、P-Crは129%の回復をみた。これらの結果によって無酸素時に脳組織にグルコースが供給されるかどうかが生理的にも機能的にも脳組織の回復に致命的な効果を有することが明らかとなった。

〔討　論〕

循環系やno reflow phenomenonの条件を除外した脳切片レベルの無酸素、無グルコースの脳組織そのものに対する効果を調べた。シナプス電位を指標にした神経活動は無酸素、無グルコース下では6～8分で消失をみたが、グルコース存在下では70分まで維持された。以上の結果から無

酸素の脳組織に与える効果は無酸素期間中にグルコースが存在するかどうかによって著しく異なることが示唆された。また、グルコース存在下で無酸素開始後5～10分の間での一過性の電位の増大は、IPSP（抑制性シナプス後電位）がスパイク発射、EPSP（興奮性シナプス後電位）より先に消失したことによると考えられる。一方、無酸素及び無酸素からの回復時におけるPSPsの振幅とATP濃度のレベルは必ずしも相関しないことが認められた。切片の生存時間に関しては、無酸素、無グルコース下では10分、グルコース存在下では150分で15倍に延長された。この結果は高エネルギーリン酸の初期減少率（△ATP＋△P-Cr）が無酸素、無グルコース下で8.5mmol／蛋白／分、グルコース存在下では0.6mmol／蛋白／分と14.2倍の差があることに関連があると推定された。脳切片を用いた本研究結果から臨床的に循環が保たれている脳の低酸素状態においては、十分なグルコースの供給をされることが推奨されるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

脳虚血や脳の無酸素状態が、脳のエネルギー代謝及び脳の機能に決定的な障害を及ぼすことは良く知られている。一般に、完全虚血時間が6～8分を過ぎると、脳の機能に不可逆的な障害が起こる。しかし、虚血及び無酸素からの脳機能の回復能力に関しては、いまだ議論がある。in vivoの研究では、無酸素後におこるno reflow phenomenon（再血流不能現象）などの循環障害のために、ニューロン自身の無酸素に対する抵抗性について詳細な研究をすることは困難である。これに対して脳切片を用いた研究では、回復期にメジウム中で血管を介してでなく酸素やグルコースが組織に直接供給される為、no reflow phenomenonを考慮する必要はない。本研究は海馬切片（厚さ300～400μm）を用いて、神経活動ならびにATP、P-Crなどの高エネルギーリン酸（アデノシン3リン酸（ATP）、クレアチンリン酸（P-Cr）を指標にして、無酸素及び無グルコースの効果及びそれらの条件下での脳組織の生存時間を明らかにしたものである。

本実験では、モルモット海馬切片（厚さ300～400μm）が使用された。実験前に各切片は、95%O_2、5%CO_2で飽和した標準液（10mMグルコースを含むKrebs－Ringer）の中で20分間incubationさた。神経活動は海馬歯状回の顆粒細胞層を電気的に刺激し、錐体細胞層（CA_{3-4}野）より得られたシナプス後電位（postsynaptic potentials,PSPs）を指標として調べた。無酸素の実験では、酸素の混合ガスを95%N_2、5%CO_2で置換飽和した。無グルコース液は、標準液からグルコースを除去して、無酸素及び無グルコース下に各切片の電気活動を記録するとともに、さまざまな時点で各切片のATP、P-Crを酵素的に螢光光度計を用いて定量した。無酸素、無グルコースからの回復には切片を酸素で飽和した標準液で再灌流した。本実験では灌流液の温度は36.5℃に保たれた。

無酸素状態下ではグルコースが存在する場合としない場合とで神経活動の消失、回復に大きな差が生じた。灌流液に酸素もグルコースも共に存在しない場合には、電位は6～8分で消失した。再び酸素とグルコースを含む標準液に戻すと電位は回復してくるが、無酸素の開始からの時間が10

分を過ぎるとPSPsの回復は不完全となり15分を過ぎると電位はもはや回復しなかった。この場合消失した電位がもとの振幅にまで完全に回復する無酸素状態下の海馬の生存時間（survival time－機能的に回復し得る無酸素、無グルコース状態下の許容時間）は10分である。灌流液にグルコースが含まれている場合の無酸素のPSPsに対する効果はきわめて緩徐でPSPsの消失には70分を要し、電位消失のhalf timeは35分前後であった。この場合の海馬切片の生存時間は150分であった。

一方、高エネルギーリン酸の濃度については海馬切片を無酸素、無グルコース下におくと、ATP（対照群初期濃度12.9mmol／kg蛋白）、P-Cr（初期濃度27.6mmol／kg蛋白）の急速な減少がみられた。2分の無酸素、無グルコースでの切片のATPは74%に、P-Crは59%に低下し、10分ではATP、P-Cr共に32%に低下した。無酸素状態からの回復時におけるATP、P-Crレベルについて無酸素の時間が長くなるほどこれらの高エネルギー物質の回復も悪くなった。切片を10分無酸素、無グルコース状態にさらした後、酸素を含む標準液に戻して30分後の切片ATP、P-Crの回復をみると、それぞれ98%と126%であった。無酸素の時間が20分ではATPでは77%、P-Crは108%の回復をみた。グルコースが十分に供給されている条件下での無酸素においては、高エネルギーリン酸の消失も緩徐でATPは60分の無酸素で69%に、P-Crはもとの58%に維持されていた。一方、無酸素及び無酸素からの回復時におけるPSPsの振幅とATP濃度レベルは必ずしも相関しないことが認めれらた。ATP、P-Crについてグルコース存在下の無酸素からの回復（30分後）では120分にわたる無酸素後でも切片のATPはもとの69%、P-Crは129%の回復をみた。切片の生存時間に関しては、無酸素、無グルコース下では10分、グルコース存在下では150分で15倍に延長された。この結果は高エネルギーリン酸の初期減少率（△ATP＋△P-Cr）が無酸素、無グルコース下で8.5mmol／kg蛋白／分、グルコース存在下では0.6mmol／kg蛋白／分と14.2倍の差があることに関連があると推定された。脳切片を用いた本研究結果から臨床的に循環が保たれている脳の低酸素状態においては、十分にグルコースが供給されることが推奨されるものと考えられる。

本研究は脳切片モデルを用いてin vitroにおける脳組織およびその機能に対する無酸素、無グルコースの効果とそれからの回復過程の生理、生化学的変化を明らかにした点で従来ほとんど行なわれていなかった脳虚血からの脳機能の回復の可能性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。よって本論文提出者は医学博士の学位を得る資格があると認める。