



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

低酸素無グルコース負荷後のラット海馬スライス神経細胞内カルシウムイオン濃度変化に関する実験的検討

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 横山, 和俊 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/15247

氏名 (本籍)	横山 和 俊 (岐阜県)
学位の種類	博士 (医学)
学位授与番号	乙第 1026号
学位授与日付	平成 8年 1月 17日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	低酸素無グルコース負荷後のラット海馬スライス神経細胞内カルシウム イオン濃度変化に関する実験的検討
審査委員	(主査) 教授 山田 弘 (副査) 教授 岡野 幸雄 教授 松波 謙一

論文内容の要旨

脳虚血病変は脳外科の対象とする諸疾患において、もっとも普遍的であり、またその進行が急激かつ不可逆的となることが多いことより重要な病態である。虚血に対して各種脳保護物質の開発と利用が検討されてきたが、そのためには虚血による細胞内の生化学的反応の変化を解明することが必要である。

さて、細胞死の進展には細胞外腔のカルシウムイオンの存在が不可欠であることや、虚血後に明かな神経細胞死が進行する部位にはカルシウムの蓄積がみられることより、細胞死の最終共通路としてカルシウムイオンが主要な役割を担っていると考えられてきた。しかし、細胞内カルシウムイオン濃度の測定が困難なことより、実際に活動している細胞内遊離カルシウムイオン濃度の経時的な変化を測定した報告は少ない。本研究では蛍光カルシウム指示薬であるFura-2を用いて海馬スライス標本における細胞内カルシウムイオン濃度変化を観察するモデルを作成し、虚血に対して選択的に脆弱な海馬CA1領域に注目し、低酸素無グルコース負荷を海馬スライス標本に加え、細胞内カルシウムイオン濃度の経時的変化を検討した。さらに、脳虚血に対し保護効果の報告されている低温あるいはチオペンタール投与が、低酸素無グルコース負荷時の海馬スライスにおける細胞内カルシウムイオン濃度変化にどのような影響を及ぼすか、また、NOドナーであるSodium Nitroprusside (SNP)、S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) 及びNOインヒビターであるN-nitro-L-arginine (L-NNA) が、N-methyl-D-aspartate (NMDA) により誘発される細胞内カルシウムイオン濃度変化に及ぼす影響を検討した。

対象および方法

- 1) 4-5週齢の雄性ウイスターラットを断頭後速やかに350 μ mの厚さの海馬スライスを作成し、蛍光カルシウム指示薬であるfura-2で染色し、浜松ホトニクス社製ARGUS-100を用いて340nmと380nmの蛍光強度比より細胞内カルシウムイオン濃度変化を測定した。
- 2) 低酸素無グルコース状態は、灌流液を95%O₂:5%CO₂混合ガスで通気した人工脳脊髄液 (ACSF) (A) を、95%N₂:5%CO₂混合ガスで通気したグルコースを含まないACSF (B) に切り替える事で作成した。またACSFに2mMグリコールエーテルジアミン四酢酸を加えることで細胞外カルシウムイオン濃度の変化に対する細胞内カルシウムイオン濃度の変化に及ぼす影響を調べた。
- 3) 低酸素無グルコース負荷5分、10分、15分後に再度ACSF (A) を流し、再酸素化による変化を検討した。
- 4) 灌流液の温度を15分間、37 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、33 $^{\circ}$ C、31 $^{\circ}$ Cに変化させることで、温度負荷後再灌流における細胞内カルシウムイオン濃度変化に及ぼす影響を検討し、さらに、チオペンタール25、50、75 μ g/mlを含むACSF (A) で15分間灌流した後、灌流液をACSF (B) に変えることで低酸素無グルコース負荷に対するチオペンタールの作用について検討した。
- 5) NMDAに対するSNP及びSNAPの影響は、ACSF (A) を、NMDA (100 μ M) を含むACSF (A) 中にSNP (0.03-3mM) 及びSNAP (0.1-1mM) を加えた各灌流液に替えることで測定し、L-NNAの影響はL-NNA (100

μM) を含む ACSF (A) で灌流後, NMDA 及び各濃度の SNP を含む ACSF (A) に替えることで測定した。

結 果

1) fura-2 で染色したスライス標本を用いて, 細胞内カルシウムイオン濃度の変化を画像として経時的に観察することができた。

2) 低酸素無グルコース負荷により蛍光強度比は一定の潜時ののち急激で平均 1.31 まで過剰な持続的上昇を認めた。カルシウムイオンを含まない ACSF で灌流すると最大蛍光強度比は平均 1.08 と過剰な上昇が抑制されたことより神経細胞死の一因として細胞内カルシウムイオン濃度の過剰な上昇が推察され, また細胞障害作用を有する NMDA を含む ACSF で灌流すると, 最大蛍光強度比は 1.30 と一過性の上昇がみられたことより, 興奮性伝達物質の細胞内カルシウムイオン濃度上昇との関連が示唆された。

3) 低酸素無グルコース 10 分負荷後再灌流で細胞内カルシウムイオン濃度は急激に安静時まで下降したのに対して, 15 分負荷後再灌流では安静時までの下降は見られなかった。また灌流液の温度を 31°C に下げると 15 分負荷後再灌流でも急激に安静時まで下降した。過剰な細胞内カルシウムイオン濃度上昇の持続時間が長い程, 再灌流後の細胞内カルシウムイオン濃度の安静時までの回復が見られなかったことより細胞内カルシウムイオンの過剰な上昇時間と細胞障害との関連が推察された。

4) 低温やチオペンタールは, 細胞内カルシウムイオンの過剰な上昇を抑制することはできなかったが, 過剰な上昇までの時間が 37°C で平均 167 秒に対して 31°C で平均 402 秒, また, チオペンタール $75\ \mu\text{g}/\text{ml}$ で平均 262 秒と潜時を遅延させる作用がみられた。この潜時の遅延が低温やチオペンタールの保護効果の一つと推察された。

5) NO 様作用を有する SNP は, NMDA による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を濃度依存性に抑制したが, SNP の 100 倍 NO 様作用を有するとされる SNAP や拮抗性抑制剤である L-NNA の前投与は細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を抑制しなかった。このことより, SNP の細胞内カルシウムイオン流入抑制作用は, NO を介さない別の機序が推測され, NO 様物質として SNP を用いることには注意が必要と思われた。

論文審査の結果の要旨

申請者 横山和俊は, 蛍光カルシウム指示薬である Fura-2 を用いて海馬スライス標本における細胞内カルシウム濃度変化を観察するモデルを作成し, 海馬神経細胞内カルシウムイオン濃度の変化を経時的に観察できることを明らかにした。また, このモデルを用いて低酸素無グルコース負荷による細胞内カルシウムイオン濃度の過剰な上昇が, 低温およびチオペンタール負荷によりその潜時を遅延させることを見いだした。本研究の成果は, 脳神経外科学領域, 特に脳虚血治療の進歩に少なからず寄与するものと認める。

[主論文公表誌]

低酸素無グルコース負荷後のラット海馬スライス神経細胞内カルシウムイオン濃度変化に関する実験的検討
平成 7 年 11 月発行 岐阜大医紀 43 (6) : 677~691