Pharmacological evidence for a correlation between hippocampal CA1 cell damage and hyperlocomotion following global cerebral ischemia in gerbils

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 勝田, 清貴 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/317

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第　４１６号	学位授与年月日	平成１８年　２月１５日
氏　　名	勝　田　清　貴		
論文題目	Pharmacological evidence for a correlation between hippocampal CA1 cell damage and hyperlocomotion following global cerebral ischemia in gerbils (スナネズミ全脳虚血モデルにおける海馬 CA1 神経細胞死と自発的運動量亢進との相関性についての薬理学的証明)		

博士（医学）　　勝　田　清　貴

論 文 題 目

Pharmacological evidence for a correlation between hippocampal CA1 cell damage and hyperlocomotion following global cerebral ischemia in gerbils

（スナネズミ全脳虚血モデルにおける海馬CA1神経細胞死と自発運動量亢進との相関性についての薬理学的証明）

論　文　の　内　容　の　要　旨

〔はじめに〕

スナネズミ一過性全脳虚血モデルでは、海馬CA1錐体細胞層の選択的傷害が脳虚血数日後に発生するが、この現象は、遅発性神経細胞死（delayed neuronal death: DND）と呼ばれている。本モデルは、その現象以外に学習記憶障害や低体温及び行動異常等の様々な症状が発現する。特に、脳虚血後に観察される行動異常の一つとして、自発運動量の著明な増加（hypermotility）が起こることが明らかとなっており、海馬CA1錐体細胞層におけるDNDとの関係が報告されている。しかしながら、その関係は明らかとなっていないことから本研究では、興奮性アミノ酸拮抗薬と共に作用メカニズムの異なる神経保護作用を有する可能性のある薬物を用いて、スナネズミ一過性全脳虚血モデルにおけるDND及びhypermotilityに対する効果を調べ、その両現象の関係について薬理学的に検討した。

〔材料ならびに方法〕

実験については、桐野らの方法に準じて一過性全脳虚血モデルを作製した。脳虚血処置は、60～80gの雄性スナネズミを使用し1.5％ハロセン麻酔下で５分間の両側総頚動脈を閉塞して行った。sham群は、総頚動脈を露出するが血管閉塞は行わなかった。また、手術中及び脳虚血中の直腸温をモニターし、heating padを用いて体温を38℃前後に調節した。海馬CA1錐体細胞層のDNDは、脳虚血後 1、2、3、4、7 日及び14日後に病理組織学的検討を行い、運動機能は、脳虚血　1、4、7 日及び14日後にＡＮＩＭＥＸ（35x30x20cm, Muromachi kikai Co. Ltd. , Tokyo）を用いて30分間の自発運動量を測定した。薬物は、tacrolimus、nizofenone、clonidine、phencyclidine、pentobarbital、CGS19755、dizocilpine、YM90K、E-2001、U-50488H、piroxicam、eliprodil、vinpocetine、aspirin及びticlopidineを使用し、それぞれの溶媒と同様に脳虚血30分前に腹腔内投与した。脳病理標本作製は、断頭脳を3.5％ホルムアルデヒドを含む0.1M phosphate buffer溶液（pH=7.4）にて数日間固定後に包埋ブロックを作製し、海馬部分（bregma後方1.5～2.0mmの間）で3μmの薄切切片をKB及びHE染色して行った。脳神経細胞傷害の定量は、左右海馬CA1領域を顕微鏡下で撮影した後に画像処理装置に取り込み、画像解析ソフトWinROOFを用いて１mm当たりの正常錐体細胞数を計測して行った。さらに、DND及びhypermotilityに対する各薬物群の用量作用曲線よりED50値を算出した。統計学的有意差検定は、sham群と脳虚血溶媒投与群（vehicle）との間でStudent’s t-testを行い、vehicle群と薬物処置群との間でDunnettの多重比較を行った。

〔結果〕

スナネズミ一過性全脳虚血モデルの海馬CA1領域における正常錐体細胞数は、正常群に比べ脳虚血３日後より14日後まで著明に減少し、自発運動量は、sham群に比べて１日後から４日後まで有意に増加した。各種薬物の脳虚血前投与では、DND（4日後）及びhypermotility（１日後）に対して用量に依存した抑制作用

を示した。その作用強度は、nizofenone > clonidine > tacrolimus > dizocilpine > YM90K > phencyclidine > pentobarbital > E-2001 > CGS19755 > U-50488H > piroxicam > eliprodil > vinpocetineであったが、抗血小板薬のaspirin及びticlopidineでは作用は認められなかった。さらに、各種薬物の海馬CA1錐体細胞保護作用及びhypermotility抑制作用との間には、明らかな正の相関関係（r=0.98）が認められた。

〔考察〕

本研究では、スナネズミ５分間脳虚血処置によりhypermotilityが発生し、それにひき続く典型的な海馬CA1領域のDNDが起こることを検証できた。そして、興奮性アミノ酸拮抗薬をはじめとする様々な作用メカニズムを有する薬物は、これら両現象に対して用量依存的な抑制作用を示した。これらの薬物は、何れも細胞内Ca^{2+}濃度の増加を抑制することが明らかとなっており、脳虚血後に発生するhypermotilityは、DNDのメカニズムとして一般的に知られているglutamate-Ca^{2+}仮説と同様の機序で発生している可能性が示唆された。

〔結論〕

これらの結果より、スナネズミ一過性全脳虚血後に起こるDND及びhypermotilityは、極めて密接に関係しており、共通のメカニズムが関係していることが示唆された。さらに、脳虚血後のhypermotilityに対する未知の化合物の観察は、病理組織学的にスクリーニングする方法に比べて簡便な評価法であると思われた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

スナネズミ一過性全脳虚血モデルでは、海馬CA1錐体細胞層の選択的傷害が脳虚血数日後に発生するが、この現象は、遅発性神経細胞死（DND）と呼ばれている。本モデルは、DND以外に学習記憶障害や低体温及び行動異常等の様々な症状が発現する。行動異常の一つとして、自発運動量の著明な増加（hypermotility）が起こることが明らかにされているが、この現象は海馬CA1錐体細胞層におけるDNDと関係があることが示唆されている。本研究では、興奮性アミノ酸拮抗薬など神経保護作用を有する可能性のある15の薬物について、DND及び自発運動量増加に対する効果を調べ、この２つの現象の関係について薬理学的に検討している。

実験には、60～80gの雄性スナネズミを使用しハロセン麻酔下で５分間の両側総頚動脈を閉塞し、一過性全脳虚血モデルを作製している。体温はheating padを用いて38℃前後に調節した。海馬CA1錐体細胞層のDNDは、脳虚血後１～14日後に病理組織学的検討を行い、自発運動量は、脳虚血１～14日後に測定した。薬物は、tacrolimus、nizofenone、clonidine、phencyclidine、pentobarbital、CGS19755、dizocilpine、YM90K、E-2001、U-50488H、piroxicam、eliprodil、vinpocetine、aspirin及びticlopidineを使用し、脳虚血前に投与している。病理組織学的検討には、左右海馬CA1領域を顕微鏡下で撮影し、画像解析ソフトを用いて正常錐体細胞数を計測している。各薬物は２～３用量を投与し、用量作用曲線を作成し、ED50値を算出した。

海馬CA1領域における正常錐体細胞数は、正常群に比べ脳虚血３日後より14日後まで著明に減少し、自発運動量は、１日後から４日後まで有意に増加した。各種薬物は、DNDと自発運動量増加に対して用量に依存した抑制作用を示した。検討した薬物の中では、グルタミン酸受容体のNMDA受容体やAMPA

受容体の拮抗薬、radical scavenger、タクロリムス等が強い抑制効果を示した。また、各種薬物の海馬CA1錐体細胞保護作用及び自発運動量増加抑制作用との間には、強い正の相関関係が認められた。

これらの結果は、一過性脳虚血による自発運動量増加と海馬のDNDには共通の機序が関与することを示唆する。即ち、グルタミン酸受容体の拮抗薬や細胞内Ca^{2+}濃度の増加を抑制する薬物が有効なことから、自発運動量増加とDNDにはglutamate-Ca^{2+}仮説と同様の機序が関与していることが示唆される。更に、新規の脳神経保護薬のスクリーニング法として虚血後の自発運動量増加の抑制効果を評価することが簡便で有用な方法になる可能性を示す。

本研究は、一過性脳虚血後の遅発性神経細胞死の機序として、glutamate-Ca^{2+}仮説を示唆する新たな根拠を示し、新規脳神経保護薬の発見のための簡便なスクリーニング法を提唱した。これらの成果は脳神経保護薬の新規開発の観点から高く評価できる。

この研究に関して審査委員会では以下の質問を行った。

1）このモデルでの神経細胞死はネクローシス、アポトーシスのいずれであるか
2）動物の自発運動の測定法について
3）総頚動脈閉塞時間を変化させて自発運動亢進と神経細胞死の関係が調べられないか
4）脳温の測定の必要性について
5）薬物が神経細胞死と自発運動亢進を同程度に抑制する機序について
6）神経細胞死と自発運動亢進の両方をglutamate-Ca^{2+}仮説で説明できるか
7）線条体が過剰に興奮している証拠はあるか
8）脳虚血の影響や薬物効果の種差について
9）総頚動脈の閉塞による神経細胞死は海馬に選択的か
10）薬物は閉塞前30分前に投与しているが、投与時間と効果の関係はどのようになるのか
11）radical scavenger、タクロリムス、クロニジンの作用機序について
12）NMDA、AMPA受容体の両方が同程度に神経細胞死に関与するのか

これらの質問に対して申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士（医学）の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者　主査　橋　本　久　邦
副査　渡　邉　裕　司　副査　山　本　清　二