

氏名	樋口嘉久
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	論医博第1604号
学位授与の日付	平成9年3月24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	Increased Neurons Containing Neuronal Nitric Oxide Synthase in the Brain of a Hypoxic-Ischemic Neonatal Rat Model (新生仔ラット低酸素性虚血性脳症における神経型一酸化窒素合成酵素含有ニューロンの増加)
論文調査委員	(主査) 教授 水野 昇 教授 柴崎 浩 教授 古庄 卷史

論 文 内 容 の 要 旨

一酸化窒素(NO)は虚血性脳障害において重要な役割を果たしている。虚血負荷時にはN-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体刺激に始まる興奮性アミノ酸経路を経て一酸化窒素合成酵素(NOS)が活性化され、産生されたNOが細胞毒性を発揮する。一方NOは血管拡張作用を持ち成体脳虚血モデルではNOの脳保護効果を示す報告もある。しかし低酸素性虚血性脳症モデル新生仔ラットにおいてはNOS阻害剤は脳保護効果を示す。NOSには神経性(nNOS)、内皮性(eNOS)、誘導性(iNOS)の3種類があり、eNOSが血管拡張作用を示す一方でnNOSが神経毒性を示すといわれている。こうしたNOの関与を明らかにするため、新生仔ラットモデル脳における神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)含有ニューロン数の時間的変化を検討した。

まず生後7日のウイスターラット仔を用い、左頸動脈結紮と低酸素負荷(8% O₂, 2.5時間)により左半球における低酸素性虚血性脳障害を作製した。頸動脈結紮のみ施行し低酸素負荷を加えない群を対照群とした。低酸素負荷開始後0, 3, 6, 12, 24時間の各時点で還流固定してラット脳を取り出して凍結し、40μm厚の切片を尾状核、被蓋および前交連レベルの冠状断面で作製した。この切片に対しウサギ由来ポリクローナル抗nNOS抗体を用いてABC法による免疫組織染色を行った。結紮側皮質と線条体それぞれのnNOS含有ニューロン数を計測し、非結紮側および左頸動脈結紮のみ施行群の結紮側と比較した。皮質は新皮質とし、線条体は尾状核および被蓋とした。非結紮側との比較はt検定で、左頸動脈結紮のみ施行群の結紮側との比較はボンフェローニ修正したt検定で行った。また隣接切片に対し、ニッスル染色を行い神経組織の障害程度を評価した。

低酸素負荷3時間後には非結紮側および左頸動脈結紮のみ施行群の結紮側に比べて結紮側半球におけるnNOS含有ニューロン数は有意に増加していた。この時点で神経細胞の変性は核の濃染性が斑状に認められた。6時間後においてもnNOS含有ニューロン数は有意に増加しており、神経細胞の核濃縮、断片化した領域は拡大していた。nNOS含有ニューロンの形も軽度の変性を示していた。nNOS含有ニューロン数の増加は線条体の背外側部分においてもっとも顕著であった。神経組織の障害変化は非結紮側半球

においては認められなかった。24時間後には神経組織の障害は結紮側半球全体に拡大し nNOS 含有ニューロンも変性が進行し、ニューロン数も非結紮側および左頸動脈結紮のみ施行群の結紮側に比べて有意に低下していた。

nNOS 含有ニューロン数は低酸素性虚血性脳障害の早期に、かつ神経組織の障害と平行して増加していた。この結果と NOS 阻害剤の効果は低酸素負荷前投与のみにみられ、負荷後投与では見られなかった点を併せると、nNOS は神経障害性に NO を産生していると考えられた。成体脳虚血モデルでは NO が血管拡張作用を通じた脳保護作用を示す場合もあるが、新生仔では脳循環動態が異なり神経障害性が顕著になっていると考えられる。

今回の検討より、nNOS の新生児低酸素性虚血性脳症の発症への関与が考えられた。さらに検討を加えることにより、新生児低酸素性虚血性脳症の治療管理への改善が期待される。

論文審査の結果の要旨

新生児低酸素性虚血性脳症 (HIE) における一酸化窒素の関与を明らかにするため、新生仔ラットモデル脳における神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) 含有ニューロン数の時間的変化を検討した。

ラット新生仔に、左総頸動脈結紮と低酸素負荷 (8%, 2.5時間) により HIE モデルを作製した。負荷開始後 0~24時間でラット脳切片に抗 nNOS 抗体を用いた免疫組織染色を行い、結紮側皮質と線条体の nNOS 含有ニューロン数を非結紮側および対照群と比較した。また隣接切片の組織障害程度も評価した。

その結果、負荷開始 3時間から 6時間後において結紮側半球における nNOS 含有ニューロン数は有意に増加していた。増加は線条体背外側部分において顕著であった。組織障害は 3時間後には核濃染が出現しその後拡大した。組織障害は非結紮側では認めなかった。

nNOS 含有ニューロン数が HIE の早期に増加していることより、HIE 発症への関与が考えられた。

以上の研究は HIE の病態の解明に貢献し、HIE の治療管理の改善に寄与するところが大きい。

従って、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 9 年 3 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。