

氏 名 辻 雅 弘
 学位(専攻分野) 博 士 (医 学)
 学 位 記 番 号 医 博 第 2177 号
 学位授与の日付 平成 12 年 3 月 23 日
 学位授与の要件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
 研究科・専攻 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
 学位論文題目 The protective effect of aminoguanidine on hypoxic-ischemic brain damage
 and the temporal profile of brain nitric oxide in a neonatal rat
 (新生児低酸素性虚血性脳障害ラットモデルにおけるアミノグアニジンの脳保護
 効果と脳内一酸化窒素の経時的変化)

論文調査委員 (主 査)
 教 授 橋 本 信 夫 教 授 柴 崎 浩 教 授 中 畑 龍 俊

論 文 内 容 の 要 旨

〈目的〉周産期の低酸素性虚血性脳症は、新生児期の神経疾患の中で最も重要な問題であり、その患児は後に脳性麻痺や精神発達遅滞をしばしば来す。低酸素性虚血は生化学的カスケードを活性化することにより脳障害を起こす。一酸化窒素(NO)は一酸化窒素合成酵素(NOS)により産生されるが、これには3つのアイソフォームがある。神経型NOS(nNOS, NOSI)と内皮型NOS(eNOS, NOSII)は間欠的に、つまり細胞内カルシウム濃度が上昇した時のみNOを産生する。誘導型NOS(iNOS, NOSII)はエンドトキシンやサイトカイン等の刺激により誘導され、カルシウムとは無関係であるため、持続的に多量のNOを産生する。

我々はiNOSにより産生されているNOが新生児低酸素性虚血性脳症における神経障害の主要な部分を占めていると考え、iNOSの選択的阻害剤であるAminoguanidine(AG)の虚血性脳障害に対する保護効果と、NOの経時的変化を新生児ラットを用いて検討した。

〈方法〉左頸動脈を二重結紮し低酸素(8%酸素, 2.5時間)負荷をかけることにより新生児低酸素性虚血性脳障害モデルを作成した。Aminoguanidine sulfate 300 mg/kg をリン酸バッファーに溶かし、低酸素負荷開始1時間前に腹腔内投与し、以後同様に8時間毎に3日間、計9回投与した。対照群には同様のスケジュールでリン酸バッファーのみ投与した。

〔実験1〕脳障害の程度を低酸素負荷開始72h後に還流固定した脳にて組織学的に検討した。Hematoxylin-Eosin染色した連続切片より、梗塞面積を大脳皮質は5断面において、線条体は2断面において測定した。障害側の大脳皮質、線条体の全面積に対する梗塞面積の割合を算出した。検定はtwo-tailed Mann-Whitney U-testを用いた。

〔実験2〕低酸素負荷開始直前(0h)、低酸素負荷中(1h)、低酸素負荷終了直後(2.5h)、6, 24, 72h後にラットを断頭し(各群、各時間n=5-12)、左右それぞれの大脳皮質を取り出し、バッファー(0.1 M, pH 7.5 potassium phosphate, 20 mM EDTA)を加えホモジェナイズした。上清液を遠沈にて得た後、フィルターによりヘモグロビンを除去した。NO₂, NO₃が大部分である濾過液中のNO代謝産物をNOへ還元し、化学蛍光法を用いたNOアナライザーにて測定した。two-tailed Student's t-testにて検定し、p<0.05を有意とした。

〈結果〉〔実験1〕全断面の梗塞の割合は、対照群(n=13)では大脳皮質で62±4%(平均±SEM)、線条体で66±7%であった。一方AG投与群(n=18)はそれぞれ、7±2%, 7±3%であった。全ての断面において有意に梗塞が縮小していた(p<0.001)。

〔実験2〕対照群では、二峰性のNO代謝産物の増加が頸動脈結紮側においてみられた。一方は低酸素負荷中(1h後)で、他方は再酸素化期(72h後)であった。AG群でも同様に、頸動脈結紮側においてNO代謝産物の増加が低酸素負荷中にみられたが、再酸素化期にはNO代謝産物は増加せず、対照群と比較し有意に低値であった。AGは、低酸素負荷中の脳内NO代

謝産物上昇は抑制しなかったが、再酸素化期の長時間にわたる NO 代謝産物上昇を持続的に抑制した。

〈考察〉iNOS の選択的阻害剤である AG により、新生児低酸素性虚血性脳障害が著明に軽減されることをラットモデルを用いて、初めて明らかにした。NO 代謝産物の経時的变化から、AG による神経保護効果は、再酸素化期に iNOS による NO 産生が抑制されたためであると考えられる。この結果から、低酸素負荷終了後から AG 投与を開始しても脳障害を軽減できること、さらに新生児低酸素性虚血性脳症治療への臨床応用の可能性が示唆される。

論文審査の結果の要旨

申請者は誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) により産生される一酸化窒素 (NO) が、新生児低酸素性虚血性脳障害 (HIE) における神経障害の主要な部分を占めていると考え、iNOS 阻害剤である Aminoguanidine (AG) の効果を新生児ラットを用いて検討した。

左頸動脈を結紮し、2.5 h 低酸素負荷により新生児 HIE モデルを作成した。AG 300 mg/kg を低酸素負荷開始 1 h 前に腹腔内投与し、以後 8 h 毎に 3 日間投与した。

負荷開始 72 h 後に還流固定し、H-E 染色した連続切片にて、梗塞面積を大脳皮質は 5 断面、線条体は 2 断面において測定した。梗塞の割合は AG 投与群では対照群に比べ、大脳皮質、線条体とも著明に縮小していた。

低酸素負荷開始直前、負荷中 (1 h)、終了直後 (2.5 h)、6, 24, 72 h 後に、左右それぞれの大脳皮質を取り出し、バッファーを加えホモジェナイズした。上清液を遠沈にて得た後、濾過液中の NO を化学蛍光法を用いて測定した。頸動脈結紮側において、対照群では、二峰性の NO 増加がみられた (低酸素負荷中と再酸素化期)。AG 群での NO 増加は、低酸素期のみであった。

AG により新生児 HIE が、著明に軽減されることをラットモデルを用いて初めて明らかにした。NO の経時的变化から、AG による保護効果は、再酸素化期に NO 産生が抑制されたためと考えられる。

以上の研究は NO、特に iNOS により産生される NO の、新生児 HIE に対する障害作用の解明に貢献し、iNOS 阻害剤である AG の有効性を初めて示したことによりその臨床応用に寄与するところが多い。

したがって、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 11 年 11 月 29 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。