

氏 名 (本籍)	いずみ 泉	やま 山	きみ 公	あき 明
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	医	博	第 943	号
学位授与年月日	昭和 61 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学研究科 (博士課程)病理学系専攻			
学位論文題目	実験的脳虚血における海馬領域の糖代謝異常に関する研究			

(主 査)

論文審査委員 教授 岩 崎 祐 三 教授 小 暮 久 也

教授 鈴 木 二 郎

論 文 内 容 要 旨

大脳辺縁系の構成要素のひとつである海馬回は、齧歯動物を用いた実験的脳虚血モデルにおいて、虚血後血流再開早期に未だ細胞の電氣的活性が認められない時点ですでに糖代謝の異常昂進を示す所見が認められている。しかしこれらの報告は肉眼的オートラジオグラフィーによるものであり、神経系を構成する構造体レベルでのエネルギー代謝解明には至っていない。そこでグルコースの同族体である $[^3\text{H}]2\text{-deoxy-D-glucose}$ (以下 $[^3\text{H}]2\text{DG}$) を用い、光顕、電顕オートラジオグラフィー (以下 LM, EM-ARG) による高解像力オートラジオグラフィーを用いての解明を試みた。 $[^3\text{H}]2\text{DG}$ は水溶性の放射性薬剤であり、通常の化学固定、脱水では LM-ARG による情報は得られても、超薄切片を用いる EM-ARG では原子核乳剤を hit するのに十分な放射活性が得られない。このため水溶性薬剤の固定を目的とし、急速凍結、凍結置換法にて試料を作製し、良好な結果が得られた。これによって、一過性脳虚血後の血流再開早期において、細胞構造体別の糖代謝を半定量的にとらえ、若干の知見を得たので報告する。

実験にはスナネズミが用いられた。ペントバルビタール麻酔し、血液をヘパリン化した後、両側総頸動脈をクリップし、10分間の前脳虚血を作製する。次にクリップをはずし血流を再灌流させ、同時に $[^3\text{H}]2\text{DG}$ $10\mu\text{Ci/g}$ 体重を静脈投与する。30分間の血流再灌流後、動物を断頭、速やかに両半球の海馬を分離し、CA 1 stratum radiatum と stratum pyramidale をとり出し、液体窒素を用いて急速凍結後に凍結置換を行なう。得られた試料はエポキシ樹脂に包埋された。また、グルタルアルデヒド、カコジル酸緩衝液による化学固定法の試料も作製し、各々対照群と比較検討した。まず(1)虚血群と対照群の前脳放射活性を液体シンチレーションカウンター (LSC) にて測定した。次に(2)化学固定法及び凍結置換法による水溶性薬剤の流失率を測定。そして(3)化学固定法と凍結固定法による海馬 CA 1 領域の LM, EM-ARG による銀粒子の分析にて、細胞の構造体別の糖代謝変動を検討した。

(1)より虚血群の放射活性は $55\mu\text{Ci/g brain}$ 、対照群は $30\mu\text{Ci/g brain}$ と、虚血負荷により83%の糖摂取量の増加が認められた。(2)より化学固定法による組織からの放射性薬剤の流失は90%にもおよぶことが判った。一方凍結置換法ではわずかに0.3%の溶解率にとどまった。(3)より LM-ARG による stratum radiatum の糖摂取の場は神経網全体に認められたが、特に直径 $2\sim 3\mu\text{m}$ 以上の太い dendrite 周囲に接する局在様式を示した。これは虚血群、対照群間で差は認められなかった。銀粒子数、即ち糖摂取の量に関しては、 $1000\mu\text{m}^2$ 当り虚血群が12.4個、対照群が6.7個と前者が約2倍の値を示した。stratum pyramidale においても両群の銀粒子の局在部位は差が認められず、細胞内では主に核周囲部 (perikaryon) に認められ、核及び突起部

での糖の取り込みは殆んどなかった。しかし、perikaryonの銀粒子は、対照群では細胞1個当り0-3個のものが85%を占める一方、虚血負荷群では数個から十数個までと幅広い分散を示した。1000 μm^2 当りの銀粒子数で見ると対照群が4.2個であるのに対し虚血群では8.5個と昂進が認められた。凍結法によるEM-ARGによってstratum radiatumの神経網を観察すると、糖代謝の営まれる主要な構造体は細いdendrite, axon terminal, glial processであることが判った。更にLM-ARGで認められた太いdendriteに接した銀粒子は、これらの周囲に存在する細いdendriteや、axon terminal上のものであることも判明した。そしてこれらの銀粒子数を各群毎に分析すると、axon terminalとglial processでの糖摂取量は虚血群と対照群間で殆んど差がないにもかかわらず、細いdendriteにおいては虚血群が倍以上の銀粒子を持つことが判った。

以上の結果より、海馬全体として昂進傾向を示す糖代謝の病態は、細胞の構造体それぞれが一樣に変動するのではなく、pyramidal cellではperikaryonが、神経網では細いdendriteがその主要な部位であることが明らかとなった。そしてこのことより、海馬CA1領域のstratum radiatumのdendriteは、presynaptic axon terminalから異常な刺激を受けて興奮状態に陥り、糖の取り込みの昂進を示し、これらの刺激は一部のpyramidal cellへ伝えられてここでspikeが生じ、このspikeに必要なエネルギーの基質補給のためperikaryonでの糖摂取昂進を示す細胞体も認められたものと推定された。

審査結果の要旨

本研究は一過性脳虚血モデルにおける糖代謝の変化を、細胞の微細構造レベルで明らかにすることを目的としている。実験には光顕及び電顕オートラジオグラフィが使われた。試料はグルタルアルデヒドを用いた化学固定法と、急速凍結、凍結置換法によって作製されたが、特に後者では試料中の水溶性放射性薬剤の保存と超微形態の保存共に優れており、方法論的にも興味深い。今回用いられたスナネズミの10分虚血、30分血流再開通モデルでは対照群と虚血群の2群間では糖の取り込まれた部位に変化は認められず、Stratum pyramidale では perikaryon であった。半定量的に2群間の糖摂取量を分析すると、虚血群は対照群の2倍の値を示した。一方Stratum radiatum では直径2 μ m以上の太い dendrite 以外の神経網に糖の取り込みが認められ、上と同様に2群間に局在の差はみられなかった。半定量値も虚血群が対照群の2倍程度となっている。しかしながらこの部位を電顕オートラジオグラムで観察すると、虚血負荷することによって末梢の細かい dendrite での糖の取り込みが約2倍と昂進していることが明らかとなった。海馬CA1領域の錐体細胞は、短時間の虚血負荷によって障害を受け易い部位として注目されているが、糖代謝を始め、他のエネルギー代謝や蛋白代謝などの微細構造下における変化が明らかになるつれて、この細胞障害の機序の解明がなされることが期待される。

神経組織は均一な構造体ではないがゆえに、これまで各々の構造体のエネルギー代謝を測定することは困難であった。本研究はこのエネルギー代謝を半定量的に測定した点で意義深く、学位授与に値すると考える。