

氏 名 (本籍)	すず 鈴	き 木	みち 倫	やす 保
学 位 の 種 類	医	学	博	士
学 位 記 番 号	医	第	1740	号
学位授与年月日	昭和 61 年 2 月 26 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭和 54 年 3 月 東北大学医学部医学科卒業			
学位論文題目	虚血脳の組織学的研究			

(主 査)

論文審査委員 教授 鈴 木 二 郎 教授 岩 崎 祐 三

教授 小 暮 久 也

論 文 内 容 要 旨

目 的

虚血脳急性期の変化を形態学的に捕えることを目的として、光顕、電顕的観察に加えて、freeze fracture (F-F) 法を用いた観察を行い、虚血脳の病態について検討した。

方 法

250~350 g の雄Wistar ラットを用いた。Diethyl-ether にて麻酔導入の後Halothane で維持し気管切開を行い、pancuronium bromide にて無動化し、respirator を用いて room air で調節呼吸とした。血液ガス、体温は生理学的範囲内に保った。血圧及び脳波は連続的に記録した。血流遮断は、transcervicoclival に脳底動脈に接近し、これを焼灼切離する。更に Scoville の clip を用いて両側総頸動脈の血流を遮断した。脳循環量の測定については、 ^{14}C -iodoantipyrine の autoradiogram を用い、頸部脊髄をコントロールとした相対的脳循環量を算出した。実験系としては、血流遮断を行わずに灌流固定を行った5匹をコントロール群とし、遮断群としては、5分、10分、30分、60分血流遮断後直ちに固定した群と、30分血流遮断後30分血流再開した5群につき各3匹の実験動物を作製した。固定は開胸の後、左心室にカニューレを留置し、室温のヘパリン化生理食塩水 200 ml、次いで 0.5% glutaraldehyde、4% paraformaldehyde を含むMillonig のリン酸緩衝液 500 ml を 120 mmHg の圧で灌流して行った。更に、その後直ちに開頭し、同固定液にて浸潤固定を行った。光顕用標本はパラフィン包埋の後 3 μm の切片とし、Hematoxylin-Eosin, Klüver-Barrera 法にて染色した。超薄切片用標本には、視交叉を通る冠状断で正中より 3 mm 外側の大脳皮質を用い、1% osmium tetroxide リン酸緩衝液で 2 時間の後固定を行い、脱水包埋の後超薄切片を作製した。切片は uranyl acetatelead citrate で染色し観察に供した。F-F 法のための標本は、超薄切片法用の標本採取部位に隣接する大脳皮質より採取し、30% グリセリンを含むリン酸緩衝液中に 3 時間浸潤させ、液体窒素で急速凍結させた後、凍結割断装置内で -115°C 、 $1\sim 2 \times 10^{-7}$ Torr の条件で割断し白金炭素を蒸着させレプリカを作製した。星状膠細胞の特殊な膜構造物である orthogonal array (OA) については、各標本ごとに 50 本の血管を観察し、perivascular astrocytic foot の形質膜の細胞質側の protoplasmic face (P face) にみられる OA、或いはそれに対応する細胞外腔側の external face (E face) にみられる pits が観察された血管を陽性とし、その頻度を検討した。コントロール群と各遮断群との間の有意差検定には Student's *t*-test を用いた。

結 果

脳波は血流遮断後30秒以内に平坦となり、血圧は遮断後一過性に上昇したが、その後は生理学的範囲内であった。相対的脳循環量については、コントロール群では $118.3 \pm 20.1\%$ であり、遮断群では $6.4 \pm 14.9\%$ であった。顕微鏡による観察では、遮断時間が長くなるにつれて eosin 好性の胞体が濃染した神経細胞が散見された。この神経細胞は大脳皮質の三層、五層及び海馬でみられたが、基底核部、小脳にはみられなかった。超薄切片像による観察では perivascular astrocytic foot の変化が最も早く、遮断30分後より、胞体の腫脹、電子密度の低下がみられた。細胞内小器官を観察するとミトコンドリアは正常な形態を示すが、粗面小胞体 (rER) は腫脹し、リボゾームの離脱が認められた。星状膠細胞の胞体、核の変化は遮断60分後より明らかとなり、胞体の腫脹、核質の電子密度の低下、核膜の断裂、nuclear cistern の拡大が認められた。細胞内小器官については、rER の腫脹は認められるが、ミトコンドリアの変化は明確でない。30分血流遮断30分再開群では、perivascular astrocytic foot 及び星状膠細胞の胞体、核とも30分遮断のみの群と比較して大きな差はなかった。神経細胞の変化は60分遮断群より明確となり、rER の軽度膨化、リボゾームの rER からの離脱が認められた。30分血流遮断30分再開群では、細胞質中のリボゾームは増加しており、その形状もモノリボゾームへと変化しポリリボゾームは認められなかった。F-F 法による観察では、perivascular astrocytic foot の OA 或いは pits がみられる血管の出現頻度は遮断時間が長くなるにつれて低下し、OA の形態も直交状の配列から塊状の配列へと変化する傾向がみられた。観察した50本の血管中 OA 或いは pits を観察し得たものは、コントロール群では 32.2 ± 5.4 (mean \pm SD) 本であり、5分遮断群では 26.0 ± 2.2 、10分遮断群で 17.3 ± 3.3 、30分遮断群では 9.7 ± 4.7 、60分遮断群では 5.7 ± 2.1 であった。10分遮断群ではコントロール群との間に有意差を認めた ($p < 0.001$)。一方30分遮断30分再開群では 15.7 ± 3.1 であり、30分遮断のみの群と有意差はみられなかった。

ま と め

脳虚血急性期の形態学的変化は、超薄切片像では30分血流遮断後の perivascular astrocytic foot の細胞質の腫脹、rER の腫脹、rER からのリボゾームの離脱としてとらえられたが、foot の形質膜に存在する OA は foot の腫脹に先じて10分遮断後より有意に減少し、脳虚血において最も早く変化する構造物であると考えられた。

審 査 結 果 の 要 旨

虚血脳組織学的研究は古くから行われており、神経細胞のミトコンドリアの腫脹が初期変化とされていた。しかし、近年虚血脳の研究の進歩に従い、従来の報告とは異なる知見が数多く報告されるようになってきた。

本研究では、独自に開発したラット大脳半球高度虚血モデルを用いて、固定の artifact を避けるために灌流固定を行った標本を光顕、電顕的に観察している。更に、最近開発された freeze fracture shadowing の技法を用いて、脳の生体膜における虚血性変化を観察し、従来の超薄切片像の所見と比較検討している。脳虚血モデルは、脳底動脈の焼灼切離に両側総頸動脈の遮断を加えて作製しており、実験系としては、コントロール群5匹、5分、10分、30分、60分血流遮断及び30分血流遮断後30分再灌流の5群各3匹ずつを用いている。超薄切片像の観察では、虚血30分後の perivascular astrocytic foot の腫脹及びその細胞質中の粗面小胞体の腫脹、リボソームの離脱が初期変化としており、神経細胞は perivascular astrocytic foot の変化に遅れて、虚血60分後から変化を示すが、ミトコンドリアは正常に保たれるのに比べて粗面小胞体が強い腫脹を示すと述べている。また神経細胞は星状膠細胞と異なり、血流再開で大きな変化を示し、polyribosome の rosette 形成はなくなり、monoribosome へ劇的に変化すると主張している。一方、freeze fracture 法の検討では、perivascular astrocytic foot の細胞膜に観察される特異な膜蛋白である orthogonal array が虚血10分後という早期から有意に減少していたが、他の膜内粒子の分布には変化がみられず、膜の流動性は保たれるものと述べている。本研究では、従来詳細な検討を加えられていない星状膠細胞の虚血性変化を検討しており、その膜内蛋白である orthogonal array は虚血後10分という早期から変化を示したことは興味深く、本論文は本学の博士論文に価するものと考えられる。