

氏 名（本籍） さくら い まさ ひろ
櫻 井 雅 浩

学 位 の 種 類 博 士（医 学）

学 位 記 番 号 医 第 3 1 4 3 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 11 年 3 月 3 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 平 成 元 年 3 月 25 日
東 北 大 学 医 学 部 卒 業

学 位 論 文 題 目 Delayed and selective motor neuron death
after transient spinal cord ischemia in rabbits :
Apoptosis and NO cytotoxicity.
(ウサギ一過性脊髄虚血モデルにおける運動ニュー
ロン死のメカニズム：アポトーシスと一酸化窒素
の細胞毒性)

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 田 林 暁 一 教 授 糸 山 泰 人

教 授 吉 本 高 志

論文内容要旨

【目 的】

胸部大動脈瘤術後の対麻痺は重篤な合併症で、その発生頻度は1.0~15%と報告されている。対麻痺の原因は大動脈遮断時の脊髄虚血であり、脊髄前角 motor neuron が最も虚血に対して脆弱であるとされている。近年脳虚血モデルにおける delayed neuronal death は apoptotic change であり、apoptotic change は Fas 誘導が関連しているという報告と、Peroxynitrite による Nitrotyrosine (NO₂-Tyr) が誘導されるという報告が散見されるようになった。今回我々は家兎を用いた脊髄虚血モデルを作成し、脊髄虚血における選択的 motor neuron death と Apoptosis, NO₂-Tyr の関連について検討したので報告する。

【方 法】

2~3 kg の家兎を用い腎動脈下腹部大動脈遮断を行い脊髄虚血モデルを作成した。家兎は2群 (control, 15分間虚血) に分割し、血流再開後、8時間、1日、2日、7日に脊髄を取り出し、電気泳動法で DNA ladder の発現を観察した。核内の DNA 断片化は TUNEL 染色により観察し、NO₂-Tyr の発現は HPLC 法で観察した。また、免疫組織化学染色法により Fas, NO₂-Tyr の発現の局在と HE 染色による前角部位の motor neuron の変化についても観察した。

【結 果】

DNA ladder は control 群では認められなかったが、15分虚血群では、再灌流後2日に観察された。核内の DNA 断片化は control 群で観察されなかったが、15分虚血群では、再灌流後2日に motor neuron に DNA 断片化が観察された。

NO₂-Tyr は control 群ではいずれの時間でも発現しなかったが、15分虚血群で、再灌流後8時間に誘導された。免疫組織化学染色では Fas は control 群の motor neuron に免疫反応が認められなかったが、15分虚血群の再灌流後8時間から2日で免疫反応を示した。NO₂-Tyr は control 群のいずれの時間においても motor neuron に免疫反応が認められなかったが、15分虚血群の再灌流後8時間で motor neuron に免疫反応を示した。HE 染色では15分虚血群の motor neuron 数は control 群に対し有意に減少していた。

【結 論】

15分間脊髄虚血群では再灌流後8時間から2日まで Fas 抗原の免疫組織反応が認められ、再

灌流後2日にDNA ladder, TUNEL陽性 motor neuron がみられた。

この結果より、虚血性 motor neuron 死は Apoptosis が関与することが示され脳虚血モデルにおける delayed neuronal death と同様のメカニズムの存在が示唆された。

また、脊髄虚血における選択的 motor neuron 死は Peroxynitrite による Nitrotyrosine 誘導が関連していることが明らかになり、筋萎縮性側索硬化症における選択的 motor neuron 死と同様のメカニズムの存在が示唆された。

審査結果の要旨

胸腹部大動脈瘤術後の対麻痺は重篤な合併症で、これまで、低体温法、部分バイパス法などの予防策がとられてきたが、未だ完全予防策はなく、また、脊髄運動ニューロンがなぜ虚血に対して選択的脆弱性を持つのかは、未だ詳しく解明されていない。対麻痺の原因は大動脈遮断時の脊髄虚血であり、脊髄前角運動ニューロンが最も虚血に対して脆弱であるとされている。本研究では家兎を用いた脊髄虚血モデルを作成し、脊髄虚血における選択的運動ニューロン死と Apoptosis, NO の関連について検討した。

実験は 2 - 3 kg の家兎を用い腎動脈下腹部大動脈遮断を行い脊髄虚血モデルを作成し、神経学的組織学的検討は血流再開後、8 時間、1 日、2 日、7 日で行った。選択的運動ニューロン死は 15 分間虚血群で再灌流後 2 日以降発生することが明らかとなった。神経学的所見も同様に再灌流後 2 日以降変化することが明らかとなった。

続いて電気泳動法で DNA ladder の発現を観察した。核内の DNA 断片化は TUNEL 染色により観察し、Nitrotyrosine (NO₂-Tyr) の発現は HPLC 法で観察した。また、免疫組織化学染色法により Fas, NO₂-Tyr の発現の局在についても観察した。

DNA ladder は control 群では認められなかったが、15 分虚血群では、再灌流後 2 日に観察された。核内の DNA 断片化は control 群で観察されなかったが、15 分虚血群では、再灌流後 2 日に運動ニューロン核に DNA 断片化が観察された。NO₂-Tyr は control 群ではいずれの時間でも発現しなかったが、15 分虚血群で、再灌流後 8 時間に誘導された。免疫組織化学染色では Fas は control 群の運動ニューロンに免疫反応が認められなかったが、15 分虚血群の再灌流後 8 時間から 2 日で免疫反応を示した。NO₂-Tyr は control 群のいずれの時間においても運動ニューロンに免疫反応が認められなかったが、15 分虚血群の再灌流後 8 時間で運動ニューロンに免疫反応を示した。以上の結果より脊髄虚血における選択的運動ニューロン死は apoptotic change であり、この変化は、選択的運動ニューロン死が発生する前に運動ニューロンに誘導される Fas と Peroxynitrite による NO₂-Tyr 誘導が関連していることが示唆された。

今まで虚血性脊髄運動ニューロン死のメカニズムは虚血性脳神経細胞死のメカニズムに比べほとんど研究されておらず明らかにされていない。本論文は虚血性脳神経細胞死研究の手法を踏襲し虚血性脊髄運動ニューロン死のメカニズムを明らかにした。本論文により今後、虚血性脊髄障害予防法の開発に大きく貢献すると考えられ、学位として価値のある論文と考えられた。