

学位論文題名

Hypocapnia under hypotension induces apoptotic neuronal cell death in the hippocampus of newborn rabbits

(低血圧下における低二酸化炭素血症は新生仔家兎においてアポトーシスによる海馬神経細胞死を誘導する)

学位論文内容の要旨

過換気は新生児の持続性新生児肺高血圧の治療と用いられている。しかし、長時間の高度の低二酸化炭素血症は、新生児の脳室周囲白質軟化症や橋鉤状回壊死(PSN)の危険因子であることが示唆されている。低二酸化炭素血症は脳血管の収縮を引き起こし脳血流を減少させる。さらに、二酸化炭素吸入が、ラット新生仔の低酸素性虚血性脳障害を軽減することが示されている。したがって、過換気による低二酸化炭素血症は新生児脳に悪影響を及ぼしている可能性があるが、それに関連した脳障害の病態は明らかではない。これらの問題を検討するために、申請者らは、新生仔家兎に過換気負荷を行い、脳内ヘモグロビンと脳障害を評価した。

[実験動物]: 新生仔家兎 (2 週齢、225-310g) を麻酔下で気管切開と挿管を行い、人工呼吸管理とし、右大腿動脈で平均動脈圧をモニターした。[実験プロトコール]: 過換気群(H グループ)、虚血群 (I グループ)、過換気虚血群(HI グループ)の 3 群に分けた。H グループは、換気回数を 100cycle/min にし、I グループは、平均動脈血圧が 50mmHg になるように脱血した。HI グループは、過換気と脱血を同時に行った。負荷は 3 群とも 1.5 時間維持した。[方法] 頭蓋内ヘモグロビン測定は近赤外線分光装置で測定した。病理学的検索は光顕および電顕で行った。アポトーシスの検索は TUNEL 法と電気泳動の ladder 形成でみた。海馬の障害を受けた神経細胞の頻度= (障害神経細胞) ×100/ (障害神経細胞+正常神経細胞) を算出した。[統計分析]: 各グループ間の比較には、one-way fractional ANOVA と post hoc test を、グループ内での比較には、one-way repeated-measures ANOVA を用いた。[動物実験の承認]: 国立神経研究所の動物実験委員会の承認を受けて行った。

[結果]: 3 グループ間で、体重、実験前の血液ガス、平均動脈圧に有意差は認められなかった。プロトコール開始 30 分で、過換気負荷により PaCO<sub>2</sub> は著明に減少し、pH と PaO<sub>2</sub> は上昇した。脱血により平均動脈血圧は 50mmHg 以下になった。プロトコール開始 30 分で、3 群間の pH、PaCO<sub>2</sub>、平

均動脈圧( $p < 0.01$ )と PaO<sub>2</sub>( $p < 0.05$ )には有意差が認められた。

負荷後、還元ヘモグロビン濃度は 3 群とも若干増加した。脳内酸化ヘモグロビンと総ヘモグロビン濃度は、I 群と HI 群で著明に減少し、H 群で若干減少した。

病理学的には、好酸性胞体、核濃縮、核崩壊などが、海馬支脚からアンモン角 1 (CA1)にかけて特に HI グループで認められた。障害された神経細胞は、TUNEL 法陽性だった。電顕では、核濃縮、クロマチンの断裂、胞体内の空胞が認められた。この空胞は、膨化したミトコンドリアなどであった。細胞膜の部分的な断裂も認められたが、アポトーシス小体は認めなかった。HI グループで oligonucleosomal ladder が認められた。障害神経細胞は、海馬支脚、CA1 と HI グループで H、I グループより多かった。

[考案]：長時間の高度な低二酸化炭素血症が低血圧下でおこると、新生仔兎の海馬に神経細胞死が起こることが初めて示された。過換気負荷や脱血単独では、神経細胞死はほとんどおこらなかった。これらの所見は、病的な条件下で低二酸化炭素血症が続くと、新生児脳に対して悪影響をおよぼす可能性があることを示唆している。

低二酸化炭素血症が神経組織に悪影響を及ぼすメカニズム不明である。長時間の低二酸化炭素血症は脳血流と組織酸素消費量を減少させ、低酸素と虚血を起こすことが示されている。しかし、H グループにおける脳内酸化ヘモグロビンと総ヘモグロビンの低下は I グループより少なかったが、両群とも障害を受けた神経細胞がみられなかった。従って、脳血流の低下だけで神経細胞の障害を説明するのは不十分である。他の原因としては、細胞外 pH の増加が考えられる。本実験では脳内の細胞外 pH の測定を行っていないが、細胞外の pH の上昇は興奮性アミノ酸レセプターの活性上昇と神経細胞の興奮性を増加させ、細胞外液 pH の低下はレセプターと電位依存性カルシウムチャンネルの活動に阻害的にはたらき神経障害に保護的に作用すると報告されている。さらに、pH の上昇は活性酸素種の形成と、ミトコンドリアの膜間電位破綻によるチトクローム C の放出がおり、アポトーシスの誘導に重要なステップとされている。これらのことから、低二酸化炭素血症そのものが神経細胞に対し、アポトーシスを誘導する可能性が示唆される。

障害を受けた神経細胞は TUNEL 法で陽性であった。また HI グループの海馬組織で DNA ladder がみられた。すなわち、アポトーシスの関連を示唆する。しかし、電顕でミトコンドリアや細胞膜の破壊を認めたと同時に、アポトーシス小体が認められなかったことから、今回の神経細胞死には、アポトーシスとネクローシスの両方が関与していると思われる。

PSN は、橋核と海馬支脚に分布する選択的神経細胞障害を特徴とする。核の濃縮や核崩壊を呈し、アポトーシスに類した形態的变化を示す。また低二酸化炭素血症は PSN の危険因子であると考えられている。今回の研究では、橋核にアポトーシスに類似した形態学的変化がみられたことから PSN のモデルとなりうると思われる。

結論として、低血圧下における低二酸化炭素血症は、新生仔家兎の海馬神経細胞に対しアポトーシ

スとネクロシス両方の神経細胞変性を伴う細胞死をもたらすことが明らかになった。この事は、低二酸化炭素血症は新生児脳に悪影響を及ぼす可能性が高いことを示唆する。従って、病的新生児では長期の強い低二酸化炭素血症を回避すべきことが重要と考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 林 邦 彦  
副 査 教 授 水 上 尚 典  
副 査 教 授 長 嶋 和 郎

## 学 位 論 文 題 名

### Hypocapnia under hypotension induces apoptotic neuronal cell death in the hippocampus of newborn rabbits

(低血圧下における低二酸化炭素血症は新生仔家兎において  
アポトーシスによる海馬神経細胞死を誘導する)

過換気は新生児の持続性新生児肺高血圧の治療と用いられている。しかし、長時間の高度の低二酸化炭素血症は、新生児の脳室周囲白質軟化症や橋鉤状回壊死の危険因子であることが示唆されている。低二酸化炭素血症は脳血管の収縮を引き起こし脳血流を減少させることから、過換気による低二酸化炭素血症は新生児脳に悪影響を及ぼしている可能性があるが、それに関連した脳障害の病態は明らかではない。申請者らは、新生仔家兎に過換気負荷を行い、脳内ヘモグロビンと脳障害を評価した。

新生仔家兎(2週齢、225-310g)を過換気群(Hグループ)、虚血群(Iグループ)、過換気虚血群(HIグループ)の3群に分けた。人工呼吸管理下で、Hグループは、換気回数を100cycle/min、Iグループは、平均動脈血圧が50mmHgになるように脱血した。HIグループは、過換気と脱血を同時に行った。負荷は3群とも1.5時間維持した。頭蓋内ヘモグロビン測定は近赤外線分光装置で、病理学的検索は光顕および電顕で行った。アポトーシスの検索はTUNEL法とDNA ladderでみた。海馬の障害を受けた神経細胞の頻度を算出した。3グループ間で、体重、実験前の血液ガス、平均動脈圧に有意差は認められなかった。実験開始30分で、過換気負荷でPaCO<sub>2</sub>は著明に減少し、pHとPaO<sub>2</sub>は上昇した。脱血により平均動脈血圧は50mmHg以下になった。プロトコール開始30分で、3群間のpH、PaCO<sub>2</sub>、平均動脈圧とPaO<sub>2</sub>には有意差が認められた。脳内酸化ヘモグロビンと総ヘモグロビン濃度は、I群とHI群で著明に減少し、H群で若干減少した。病理学的検索で、好酸性胞体、核濃縮、核崩壊などが、海馬支脚からアンモン角1(CA1)にかけて特にHIグループで認められた。障害された神経細胞は、TUNEL法陽性で、電顕では、核濃縮、クロマチンの断裂、胞体内に膨化したミトコンドリアが認められた。細胞膜の部分的な断裂も認められたが、アポトーシス小体は認めなかった。HIグループでDNA ladderが認められた。障害神経細胞は、海馬支脚、CA1ともHIグループでH、Iグル

ープより多かった。長時間の高度な低二酸化炭素血症が低血圧下でおこると、新生仔兎の海馬に神経細胞死が起こることが初めて示された。過換気負荷や脱血単独では、神経細胞死はほとんどおこらなかった。これらの所見は、病的な条件下で低二酸化炭素血症が続くと、新生児脳に対して悪影響をおよぼす可能性があることを示唆している。低二酸化炭素血症が神経組織に悪影響を及ぼすメカニズム不明である。長時間の低二酸化炭素血症は脳血流と組織酸素消費量を減少させ、低酸素と虚血を起こすことが示されている。しかし、H グループと I グループともに障害を受けた神経細胞がみられなかった。従って、脳血流の低下だけで神経細胞の障害を説明できない。他の原因としては、細胞外 pH の増加が考えられる。本実験では脳内の細胞外 pH の測定を行っていないが、細胞外の pH 上昇は活性酸素種の形成と、ミトコンドリアの膜間電位破綻によるチトクローム C の放出をおこし、アポトーシスの誘導に重要なステップとされている。これらのことから、低二酸化炭素血症そのものが神経細胞に対し、アポトーシスを誘導する可能性が示唆される。障害を受けた神経細胞は TUNEL 法で陽性であった。また HI グループの海馬組織で DNA ladder がみられた。しかし、電顕でミトコンドリアや細胞膜の破壊を認めたと同時に、アポトーシス小体が認められなかったことから、今回の神経細胞死には、アポトーシスとネクローシスの両方が関与していると思われる。橋鉤状回壊死は、橋核と海馬支脚に分布する選択的神経細胞障害を特徴とする。核の濃縮や核崩壊を呈し、アポトーシスに類似した形態学的変化を示す。また低二酸化炭素血症は橋鉤状回壊死の危険因子であると考えられている。今回、橋核にアポトーシスに類似した形態学的変化がみられたことから橋鉤状回壊死のモデルとなりうると考えられる。

結論として、低血圧下における低二酸化炭素血症は、新生仔家兎の海馬神経細胞に対しアポトーシスとネクローシス両方の神経細胞変性を伴う細胞死をもたらすことが明らかになった。この事は、低二酸化炭素血症は新生児脳に悪影響を及ぼす可能性が高いことを示唆する。従って、病的新生児では長期の強い低二酸化炭素血症を回避すべきことが重要と考えられる。

公開発表に際し、副査の水上教授から、実験における pH 調整をした場合の結果の予想、低 CO<sub>2</sub> と病変との関係が注目された歴史的背景、人のモデルとなりうる理由について、次いで副査の長嶋教授から、低 CO<sub>2</sub> の解除と病変との関係、アポトーシスカスケードについて、低 CO<sub>2</sub> と低酸素における脳障害の違い、電顕の評価法と変化した細胞の特徴について、主査の小林教授から、低 CO<sub>2</sub> における脳障害の人と動物間における差異とその理由、人新生児の脳障害防止への応用についての質問があった。フロアーから、脱血による低血圧作成の問題点、低 CO<sub>2</sub> と pH 変化の何れが脳障害により関与するかの質問があったが、申請者は何れの質問に対しても自らの実験と文献を引用して概ね妥当な回答をした。

この論文は、病的新生児では長期の強い低二酸化炭素血症を回避すべきことを明らかにし、今後の新生児医療に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。