

一過性脳虚血におけるサル海馬神経細胞のCa²⁺動態 ならびに微細構造の変化

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9130

一過性脳虚血におけるサル海馬神経細胞の Ca²⁺ 動態ならびに微細構造の変化

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

赤 池 秀 一

一過性脳虚血により生じる神経細胞死は、多くの神経細胞においては早期の血液の再灌流により防止することが可能である。しかし、海馬のアンモン角 (cornu Ammonis-1, CA-1) 領域の錐体細胞は、他の大部分の神経細胞が障害を受けない程度の一過性の虚血にさらされただけでも数日後に細胞死に至ることが知られており、遅発性神経細胞死とよばれている。CA-1の錐体細胞は近時記憶をつかさどる重要なニューロンであるため、脳血管性の記憶障害に対して適切な治療法を開発するためには、こういった虚血に対して脆弱な神経細胞の虚血性障害の病態を解明する必要がある。近年、遅発性神経細胞障害の原因として、虚血がもたらす細胞内カルシウムイオン (Ca²⁺) 濃度の異常な上昇が注目されている。

本研究では、サルの海馬切片を用いて、虚血刺激に対する Ca²⁺ 動態と、それに伴う神経細胞の微細構造変化について検索し、虚血性神経細胞障害の発生機序について考察した。厚さ 300 μ m の海馬切片に蛍光色素である fura-2 を負荷し、蛍光顕微鏡テレビカメラと画像処理装置を用いて Ca²⁺ 動態の観察を行った。その結果、神経細胞外からの Ca²⁺ 流入の有無とは無関係に、虚血によって海馬 CA-1~4 の全ての領域において Ca²⁺ 濃度の上昇がみとめられた。ことに CA-1 においては、Ca²⁺ の上昇の立ち上がりは最も速やかで、上昇カーブは急峻であった。また、同様の虚血刺激を加えた海馬切片を、4%パラフォルムアルデヒドで固定し、免疫組織学的検索を行ったところ、虚血後の神経細胞の胞体においてホスファチジルイノシトール4,5-二リン酸の染色性が有意に増加していた。一方、全身麻酔下で、脳への血流を完全に遮断する一過性全脳虚血モデルを作製し、摘出した海馬標本について形態学的変化の観察を行ったところ、虚血によって粗面小胞体の空胞化やミトコンドリアの腫大などの著明な変化がみられた。以上の結果から、虚血後に生じる神経細胞内の Ca²⁺ 濃度の上昇の原因としては、ホスファチジルイノシトール代謝系による粗面小胞体からの放出や虚血に対するミトコンドリアの反応などによって、細胞内に貯蔵されていた Ca²⁺ が動員されていることが推測された。また、CA-1 領域の錐体細胞は、虚血刺激に対する反応が最も強く、細胞内の Ca²⁺ 濃度の上昇が最も著明であることが遅発性神経細胞死をひき起こす原因であると推定された。

Key words ischemia, hippocampus, delayed neuronal death, Ca²⁺, phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate

脳虚血によって、細胞内のアデノシン三リン酸が枯渇すると、神経細胞は活動できなくなり、細胞内蛋白の不可逆的損傷によりやがて細胞死に至る。したがって、脳虚血から神経細胞を守るにはできるだけ早期の血流再開が不可欠であるとされている。しかし、一部の神経細胞は、他の神経細胞には致命的な影響を与えないような短時間の虚血に対しても脆弱で、血流再開後、数日間の経過で細胞死をきたすことが、1982年、Kirinoによって報告された¹⁾。彼は、スナネズミの両側内頸動脈に血管クリップをかけて4~5分間血流を遮断した後、血流を再開すると、1~2日間は海馬の cornu Ammonis-1 領域 (CA-1) の錐体細胞には何の形態学的変化も認められないが、3~4日目には神経細胞の脱落がおこることを発見し、遅発性神経細胞死と呼称した。このような一過性の虚血に対し脆弱な神経細胞としては、海馬 CA-1 の錐体細胞の他にも、小脳のプルキンエ細胞、大脳皮質の第3層および第5層の錐体細胞、および線条体

背外側の中、小型細胞などが知られている²⁾。

1957年、Scoville らは、難治性てんかんに対して、海馬を含め両側側頭葉内側部の切除術をおこなった臨床例において近時記憶障害が生じたことを報告した³⁾。その後、1986年、Zola-Morgan らは心筋梗塞に対して、冠動脈のバイパス術を行った後にショック状態に陥った臨床例において、両側海馬 CA-1 領域の神経細胞死と近時記憶障害がみられたと報告した⁴⁾。それ以来、海馬と近時記憶障害との関係が注目されており、Zola-Morgan らは、サルの海馬切除モデルにおいても記憶障害がみられることを観察している⁵⁾。このように、海馬は記憶回路の一部をなすものとして、近年、ますます注目されている。したがって、海馬における虚血性神経細胞障害の発生機序を解明することは、脳血管性痴呆や近時記憶障害の病態を知り、有効な治療法を確立する上で、きわめて重要であると思われる。

平成6年11月30日受付, 平成7年2月20日受理

Abbreviations: ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; CA, cornu Ammonis; ICCD, intensified charge-coupled device; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; PI, phosphatidylinositol; PIP₂, phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate; TBS, tris-buffered saline

虚血性神経細胞障害の原因としては、ここ数年間にグルタミン酸細胞毒説⁶⁾が提唱されてきた。すなわち、虚血刺激により放出されたグルタミン酸が神経細胞の各種のグルタミン酸レセプターを刺激し、神経細胞内の Ca^{2+} 濃度の著しい上昇をきたす。この Ca^{2+} によって神経細胞内の各種のセカンドメッセンジャーやプロテアーゼなどが活性化され、細胞内蛋白の不可逆的損傷により遅発性神経細胞死が生ずるといふ仮説である⁶⁾。虚血急性期に生じる病態に関しては様々な検討がなされているが、虚血中または虚血直後に生ずる神経細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇が重要であることは明らかである。そこで、本研究においては、人間により近い高次機能を持つサル⁷⁾の海馬を対象とし、虚血急性期の神経細胞内の Ca^{2+} 動態と神経細胞の組織学的変化について検討した。

対象および方法

1. 海馬切片の Ca^{2+} 動態

対象としたのは、体重が約 7kg, 14kg, 15kg のニホンザル 3 頭である。フローセン麻酔下に開頭術を行い、可及的すみやかに脳を摘出した。その際、神経細胞の保護作用があるような薬剤はいっさい使用しなかった。124mMNaCl, 5mMKCl, 22mMNaHCO₃, 2mMMgSO₄, 1.25mMNaH₂PO₄, 2.5mM CaCl₂, および 10mM グルコースを含む氷冷リンゲル液中で、摘出脳からす早く両側の海馬を摘出した。さらに、95%O₂, 5%CO₂ で通気した約 27℃ のリンゲル液中で、スライスカッターを用いて厚さが約 300 μm の海馬の前頭断切片を多数作製した。切片の作製による物理的⁸⁾刺激から回復させるため、95%O₂, 5%CO₂ で通気した約 32℃ のリンゲル液中で切片を約 30 分間静置した。

Ca^{2+} の測定には、蛍光色素である fura-2 (Fura-2[®], 同仁化学, 熊本) を用いた。 Ca^{2+} と結合している fura-2 は紫外線を照

射すると信号を発するが、この信号を倒立顕微鏡に接続した蛍光顕微鏡 (intensified charge-coupled device) ビデオカメラ C2400-87 (浜松ホトニクス, 浜松) で撮影し、画像解析装置 ARGUS-50, ARGUS-100 (浜松ホトニクス) を用いて解析を行った (図-1)。fura-2 自身は神経細胞膜を通過できないが、fura-2 のカルボキシル基をエステル化した fura-2/AM は細胞膜を通過することができる。細胞内に入るとアセトオキシメチル基がはずれ、fura-2 は細胞内に留まり Ca^{2+} と結合する。作製した海馬切片を 10 μM の fura-2/AM のリンゲル液中に約 1 時間保持し、神経細胞に fura-2 を充分にとり込ませた⁷⁾。

Ca^{2+} と結合した fura-2 の信号強度は、その濃度や光源の強さ、スライスの厚さといった条件によっても微妙な影響を受ける可能性がある。そこで、これらの影響を除くため、通常は光源が 340nm と 380nm の条件で測定を行い、その比によって Ca^{2+} 濃度の定量を行うが、微量の Ca^{2+} 濃度変化を測定するには光源を固定して、測定開始時との比率をとって評価する。本研究では微量の Ca^{2+} 濃度変化を測定することを目的としたため、測定開始時に 340nm と 380nm の比によってスライス内の Ca^{2+} の分布に著しい差がないことを確認し、光源を 340nm に固定して神経細胞内の Ca^{2+} 濃度の変化を測定した⁹⁾。

測定に際しては、アクリル板で直径が約 2.5cm, 短径が約 1.5cm, 深さが約 3~4mm の楕円形の測定用チェンバーを作製し、ペリスタポンプで 3~5ml/min で 95%O₂, 5%CO₂ を通気したリンゲル液を灌流した (図-1)。海馬切片はその辺縁部を円形に曲げた針金で軽く固定した。

95%O₂, 5%CO₂ のかわりに 95%N₂, 5%CO₂ を通気し、リンゲル液中のグルコースを除くことによってチェンバー内の海馬切片に虚血刺激を加えた。測定を開始してから 5 分間は虚血刺激を与えずコントロールとしてから虚血刺激を 20 分間行った。

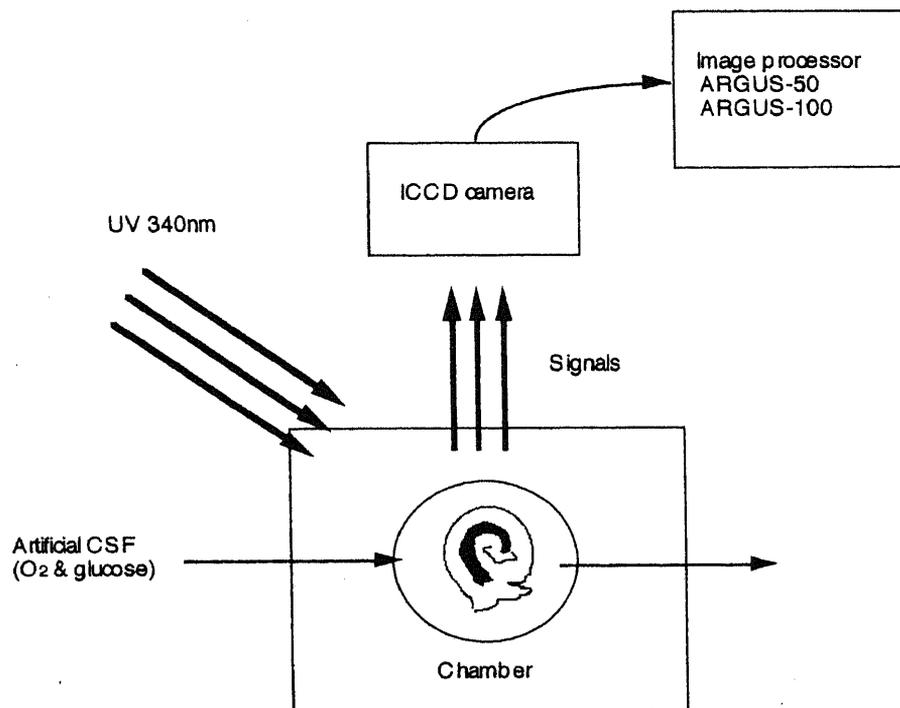


Fig. 1. Schematic drawing of the system for the evaluation of Ca^{2+} mobilization in the sliced hippocampus.

今回の実験では無染色の標本で海馬の神経細胞層を同定した。すなわち、サル、海馬は人間の海馬と非常に類似しており、海馬の前額断を行うと、数層に神経細胞が並んでいるため無染色の標本でも神経細胞層が確認しえた。光顕上、CA-1 は小錐体細胞、CA-3 は大錐体細胞領域で、CA-2 は両者の移行部で大小の錐体細胞が混在するところである。無染色の画像ではそれぞれの境界を明確に判断することは困難であるが、光顕標本で海馬切片を観察した結果、歯状回に陥入する手前の部分はCA-3 領域で、CA-4 は歯状回に陥入している部分である(図-2)。そして、錐体細胞層の渦巻きを中心に対してCA-4 と約120度をなす部分より外側がCA-1 領域と考えられる(図-2)。CA-2 はCA-1 とCA-3 の間にあるが、無染色の状態では明確に同定するのは困難であった。

まず、蛍光顕微鏡カメラで撮影した蛍光強度の比率変化を画像として記録した。さらに、CA-1 とCA-3 の領域については、蛍光強度の比率変化をグラフとしてプロットした。

また、以下のように測定条件を変えて実験を行った。

1. 虚血刺激の持続時間は20分間とし、チェンバーの温度が29℃, 31℃, 33℃, 36℃の条件でそれぞれ測定を行った。
2. 次に、細胞外 Ca^{2+} の関与を調べるため、灌流リソゲル液中の $CaCl_2$ を除いた状態で虚血刺激を加えた。チェンバーの温度は33℃の条件で測定を行った。
3. 50mM の KCl は、細胞膜を脱分極させるため、強制的に電位依存性のイオンチャンネルを開くことが可能である¹⁰⁾。そこで、イオン性カルシウムチャンネルの温度依存性を調べるために、チェンバーの温度が29℃の条件で、50mM の KCl 刺激を行った。

II. ホスファチジルイノシトール 4,5-二リン酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP_2) の免疫染色

Ca^{2+} 動態の測定用に作成した 300 μ m の切片を用いて、上記の虚血刺激を行う前後の PIP_2 の変化に関して免疫組織化学的検索を行った。海馬切片を上記の Ca^{2+} 動態の測定実験をおこなった際と同様の方法で虚血状態とし、虚血終了後、ただちに4%パラホルムアルデヒドで固定した。その後、マイクロス

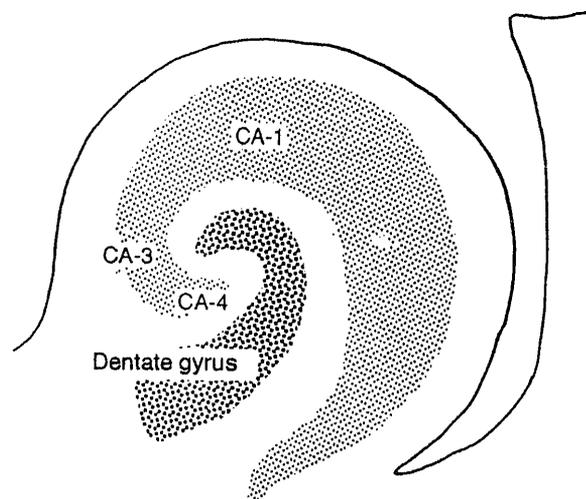


Fig. 2. Schema of the coronal section of monkey hippocampus. CA, cornu Ammonis.

ライサーを用いて厚さが約 50 μ m の切片を作製し、マウス抗 PIP_2 モノクローナル抗体 (AM212)⁹⁾ を用いて免疫組織化学的染色を行った。免疫染色は、アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex, ABC) 法で、ABC-kit-Elite (Vector laboratories, California, USA) を用いて行った。

具体的には、切片を 50mM トリス緩衝食塩水 (Tris-buffered saline, TBS) で各10分間、3回洗浄後、0.1M グリセリンを含む 50mMTBS に1時間つけて固定液を取り除き、3回洗浄した。その後、ブロッッキング抗体 (正常馬血清) 中に2時間浸漬し、400倍に希釈した一次抗体と4℃で一晩反応させた。ついで、50mMTBS で3回洗浄し、二次抗体と1.5時間反応させ、3回洗浄した。最後に、ABC複合体と1時間反応させた後、さらに3回洗浄し、15分間発色させた。発色には、50mMTBS (pH 7.4) 4ml に 10mg/ml の 3,3'-ジアミノベンチジンを 200 μ g 溶解したジアミノベンチジン溶液に、30%過酸化水素水を 1.3 μ l 加えた発色反応液を用いた。

III. 海馬組織標本の作製

体重が 5kg 前後のニホンザル4頭を用いて、I. の方法に準じてフローセンによる全身麻酔を行い、以下の要領で一過性脳虚血モデルを作製した。

1. 虚血刺激の方法

胸骨上縁を中心に上下約 7cm の正中切開を行い、胸骨を 4cm 程度切除し、正中の軟部組織を分け心外膜に達した。周囲の胸膜を傷つけないように丁寧に心外膜を開くと、大動脈から分岐した直後の無名動脈と左鎖骨下動脈が確認できた。両血管を十分に周囲から剝離し、血管クリップを用いて、20分間の血流遮断を行った。この手術操作によって、両側の内頸および椎骨動脈の血流を遮断し、全脳を完全な虚血状態とすることができた。

2. 灌流固定の方法

20分間の血流遮断後、クリップをはずして血流を再開し、皮切を下方に延長して胸骨全体を切除し、上記と同様に軟部組織を分けて心外膜に達した。心外膜を完全に開き、左心室と右心耳を確認し、下行大動脈を周囲から剝離した。まず、左心室に18ゲージの注射針を刺し、500cc の生理食塩水を点滴し、下行大動脈を結紮した後、右心耳を切開し血液を排出した。生理食塩水の還流を行ってから、約 1500cc の固定液を約1時間かけて還流した。固定液は0.1%タンニン酸を加えた2.5%グルタルアルデヒドを用いた。還流固定の終了後、脳を摘出し、組織切片を作製した。

なお、虚血操作を加えないコントロール標本の作製には、1. の操作中の血流遮断のみ行わず、2. の灌流固定のみを行った。

3. 電子顕微鏡による観察

実体顕微鏡下で CA-1, CA-2, CA-3 および CA-4 の各錐体細胞層の約 1 \times 1 \times 2mm 大の切片を作製した。切片を0.1%タンニン酸を加えた2.5%グルタルアルデヒドでさらに2時間固定した後、15%シュクロース溶液で24時間洗浄した。その後、1%四酸化オスミウムで1時間固定した。エタノールで脱水した後、酸化プロピレンで置換し、エポン812に包埋した。ウルトラーム NOVA (LKB, Bromma, Sweden) で超薄切片を作製し、酢酸ウラニールと鉛の2重染色を施して、H-600型電子顕微鏡 (日立製作所、東京) で観察した。

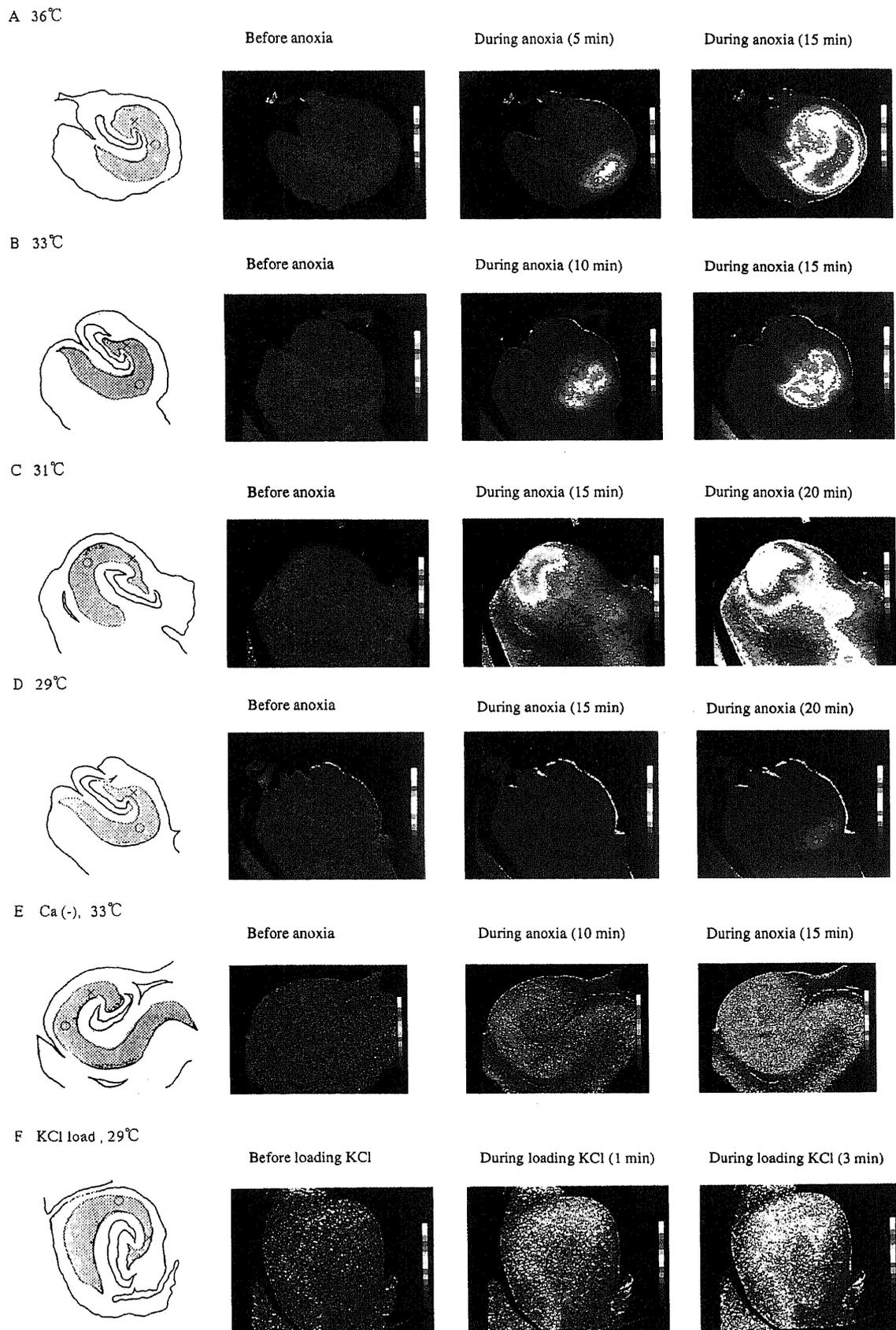


Fig. 3. Dynamic changes of Ca^{2+} mobilization in the sliced hippocampus at various conditions. Anoxic stimulation was done at 36°C (A), 33°C (B), 31°C (C), and 29°C (D), CaCl_2 was removed from the artificial cerebrospinal fluid to prevent the influx of Ca^{2+} at 36°C (E). 50mM KCl was loaded at 29°C (F), instead of the anoxic stimulation. Ratio images were obtained from 340nm fluorescence data prior to stimulation. Color bar beside each photograph shows the ratio images. Time from the initiation of anoxic stimulation was shown above each photograph. (A)~(F) $\times 20$

成 績

1. 海馬切片の Ca^{2+} 動態

1. 灌流リンゲル液中に Ca^{2+} を含む場合 (図3, 4-A~D)

まず, サルの体温にほぼ近い36℃のチェンバーにおいた切片に虚血刺激を行うと, 海馬の神経細胞層の全てにおいて Ca^{2+} 濃度の上昇がみられた. しかし, Ca^{2+} 濃度の上昇のパターンは, 各々の神経細胞層で違いがみられた. CA-1 領域 (以下 CA-1) に最も早く Ca^{2+} 濃度の上昇を示す蛍光強度の比率増加が始まり, また, 蛍光強度の比率も最大であった (図3-A). 具体的にグラフで CA-1 と CA-3 の Ca^{2+} 濃度の推移を比較すると, CA-1 は虚血刺激開始後1分以内に Ca^{2+} 濃度の上昇が開始したのに対して, CA-3 は虚血刺激開始後5分後から濃度上昇が始まった. また, Ca^{2+} 濃度の上昇曲線も CA-1 の方が CA-3 に比べて急峻であった. CA-1 では9~10分で Ca^{2+} 濃度はピークに達し, CA-3 では虚血開始後15~16分でピークに達した. ピークの値も, CA-1 が CA-3 よりも高値であった. Ca^{2+} 濃度は, ピークに達すると, 虚血刺激終了時までプラトー状態で経過した. 虚血が終了すると Ca^{2+} 濃度はすみやかに虚血前の値に戻った (図4-A).

次に, チェンバー内の温度を変えて測定を行ったところ, 海

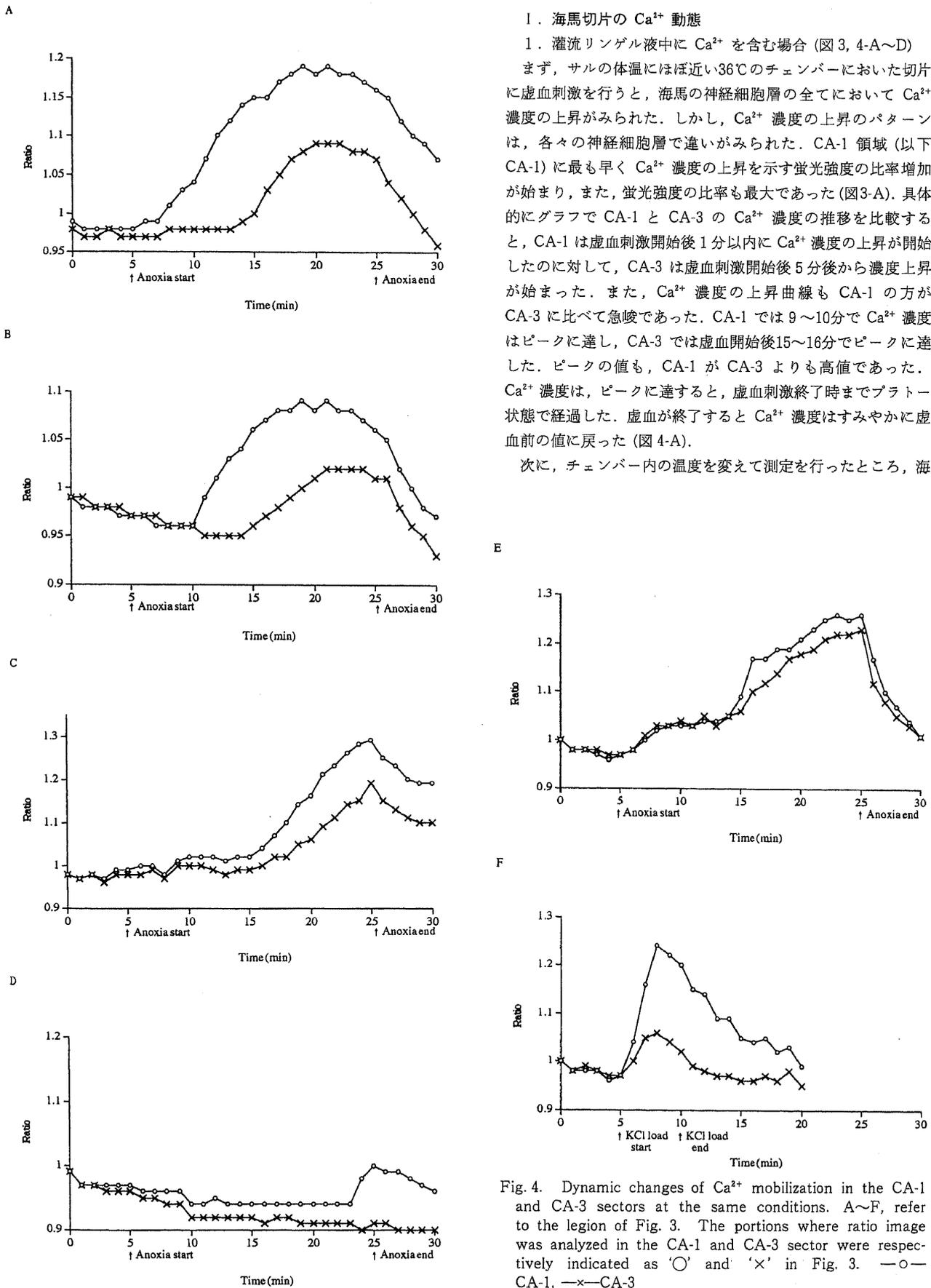


Fig. 4. Dynamic changes of Ca^{2+} mobilization in the CA-1 and CA-3 sectors at the same conditions. A~F, refer to the legion of Fig. 3. The portions where ratio image was analyzed in the CA-1 and CA-3 sector were respectively indicated as 'O' and 'X' in Fig. 3. —O— CA-1, —X— CA-3

馬の神経細胞層の全てにおいて温度が低いほど虚血刺激開始から Ca^{2+} 濃度の上昇開始までの時間が長くなる傾向を示した(図3-A~D)。すなわち、CA-1では、虚血刺激開始から Ca^{2+} 濃度の上昇開始までの時間は36℃では1分以内(図4-A)、33℃では5分(図4-B)、31℃では9分(図4-C)、そして29℃では19分であった(図4-D)。CA-3についても同様で、36℃では4分(図4-A)、33℃では9分(図4-B)、31℃では11分(図4-C)、29℃では20分経過しても上昇はみとめられなかった(図4-D)。ピークの値をみると、いずれの温度においても、CA-1の方が、CA-3よりも高値であった(図4-A~D)。

2. 灌流リンゲル液中に Ca^{2+} を含まない場合(図3, 4-E)

チェンバーを灌流するリンゲル液から $CaCl_2$ を除いた場合も、海馬の神経細胞層の全てにおいて Ca^{2+} 濃度の上昇がみとめられた(図3-E)。CA-1は虚血刺激開始4分後に Ca^{2+} 濃度の

わずかな上昇を示した後、10分後より急激な濃度上昇が開始した。これに対してCA-3も虚血刺激開始4分後に Ca^{2+} 濃度のわずかな上昇をみとめ、12分後にやはり急激な濃度上昇が始まった。この急激な Ca^{2+} 濃度の上昇の開始時間は、リンゲル液中に Ca^{2+} を含んでいた場合の時間と非常に近いものであった。また、両領域とも虚血刺激開始後17~18分にピークに達した。ピークの値は、CA-1の方がCA-3よりもやや高値であり、 Ca^{2+} を含んだリンゲル液の場合と同様であったが、その差は Ca^{2+} を含んだリンゲル液の場合より少なかった(図4-E)。

3. 50mMKCl 刺激(図3, 4-F)

チェンバーの温度が29℃の状態、50mMのKClがチェンバー内に流入すると、ほぼ瞬間的に、海馬の神経細胞層の全てにおいて Ca^{2+} 濃度の上昇が開始した(図3-F)。ピークの値は、CA-1がCA-3より高値であった(図4-F)。

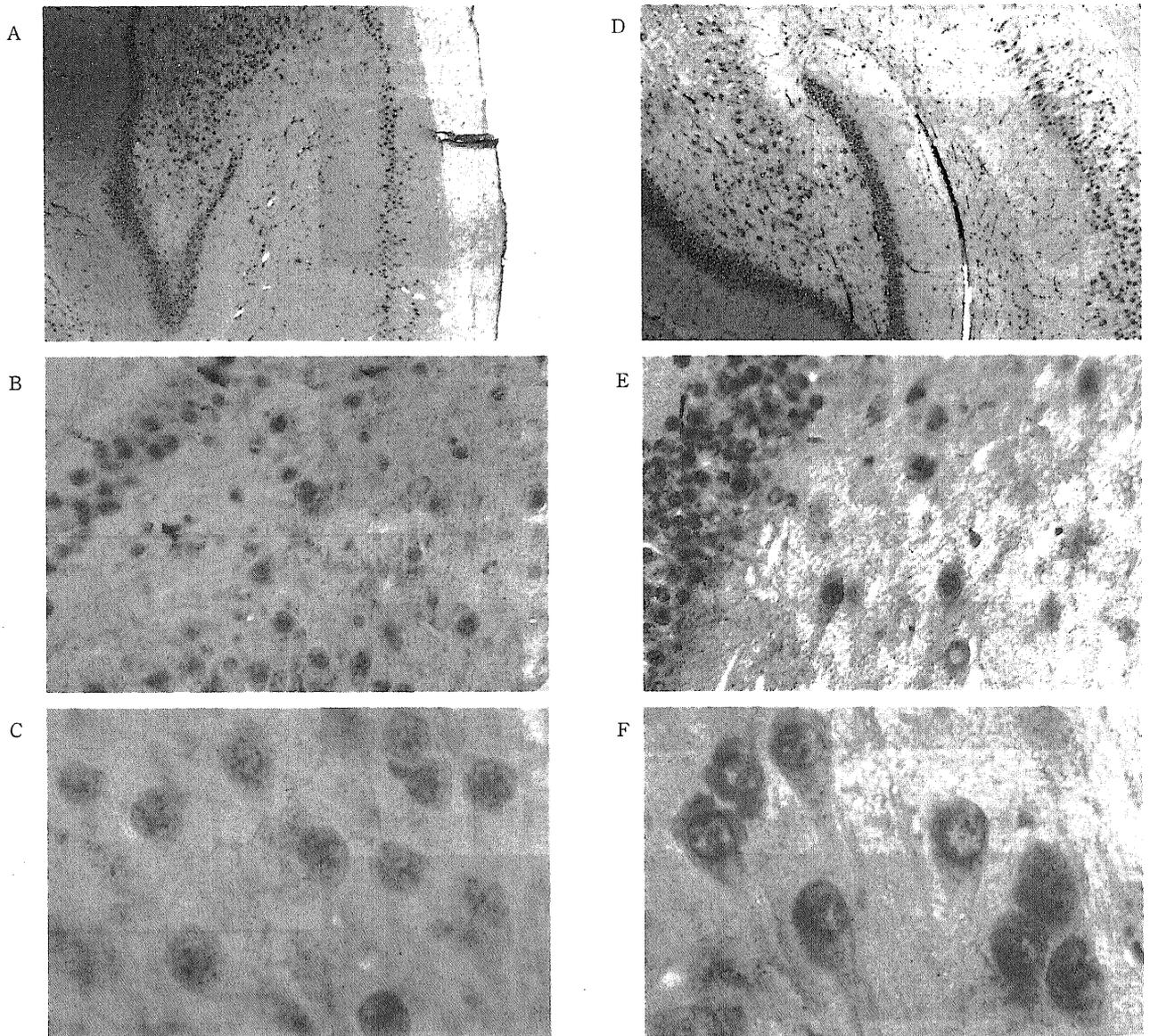
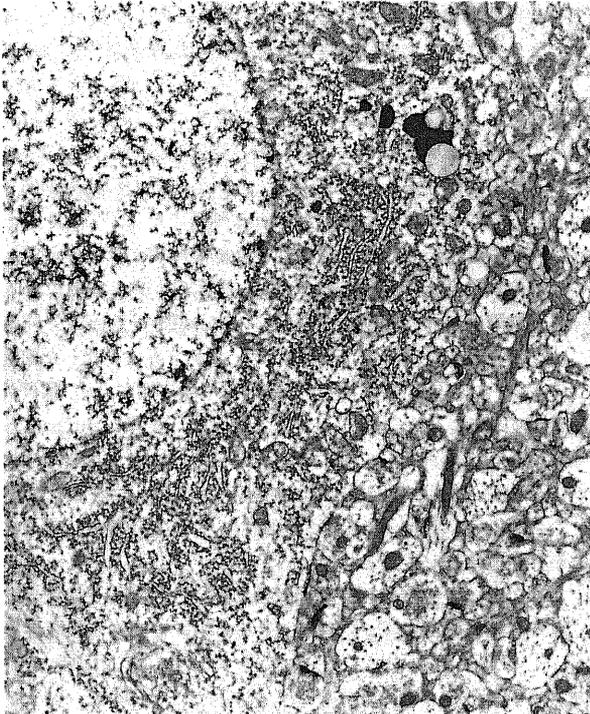


Fig. 5. Immunohistochemical staining of the hippocampal slice using anti- PIP_2 antibody. PIP_2 staining was significantly increased in the perikarya of CA-1 neurons after 20 min anoxic stimulation (D, F) compared to the control (A, C). In contrast, there is less significant increase in those of CA-4 and dentate gyrus neurons (D, E), compared to the control (A, B). A, $D \times 60$, B, $E \times 375$, D, $F \times 750$

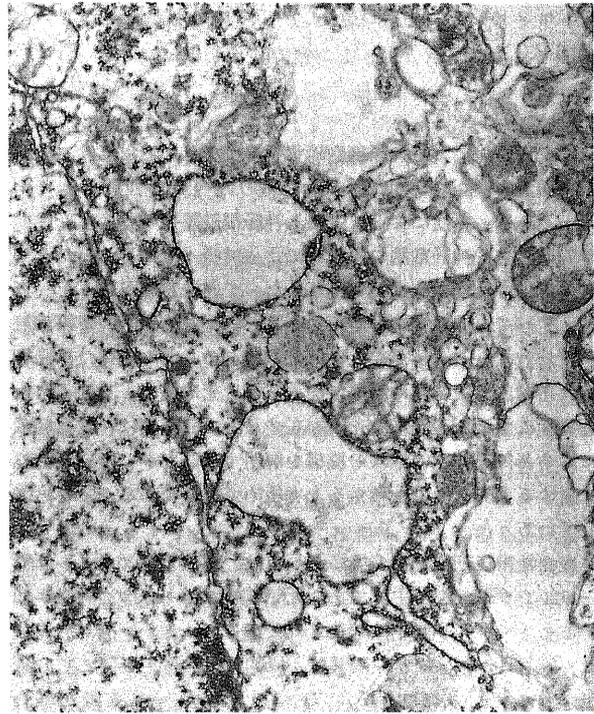
II. PIP_2 の免疫組織化学的染色 (図 5)

虚血前の海馬切片を染色したコントロール標本を弱拡大で観察すると、CA-1~4 の錐体細胞と歯状回の顆粒細胞の全てが PIP_2 陽性であった (図 5-A)。強拡大で細胞内の PIP_2 の染色性を観察すると、 PIP_2 は細胞の核にのみ陽性で胞体の染色性は低

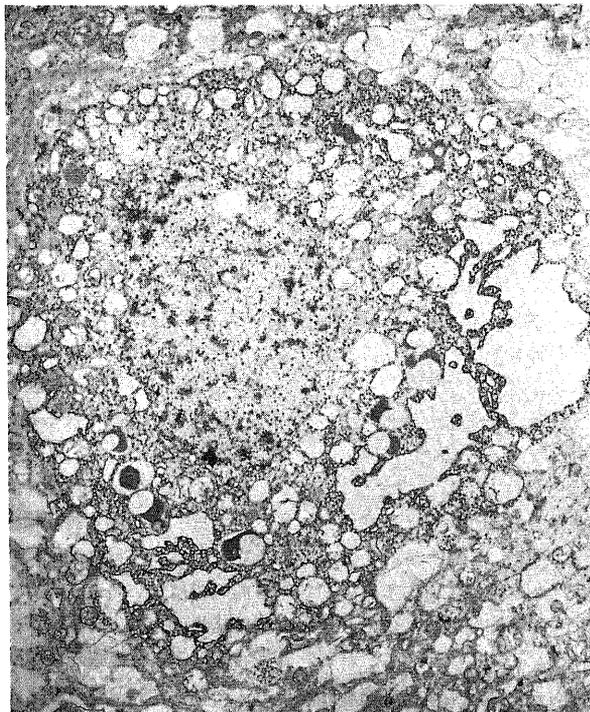
かった (図 5-B, C)。これに対して、虚血後の切片を染色した標本を弱拡大で観察すると海馬のすべての神経細胞において PIP_2 の染色性が増加していた (図 5-D)。強拡大で観察すると、CA-1 錐体細胞ではことに胞体において PIP_2 の染色性が著明に増加していた (図 5-F)。しかし、虚血後の標本でも CA-4 の錐



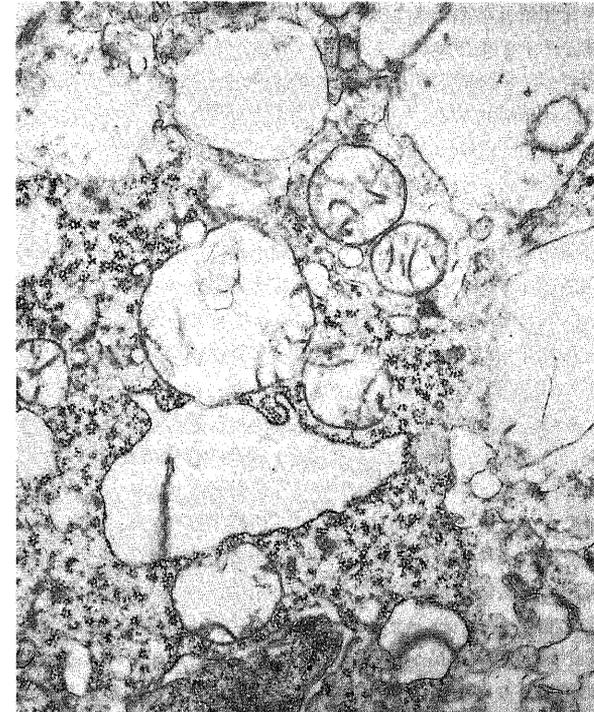
A



C



B



D

Fig. 6. Electron micrographs of CA-1 neurons of the control (A) and after the ischemia for 20 min (B, C, D). Vacuolation of the cytoplasm (B), enlargement of the rough endoplasmic reticulum (C), and swelling of the mitochondria (D), were shown (uranyl and lead stain). A \times 6,000, B \times 3,500, C \times 12,000, D \times 15,000

体細胞や歯状回の顆粒細胞では、コントロールと同様に胞体の PIP₂ の染色性は弱かった (図 5-E)。

Ⅲ. 微細構造の変化 (図 6)

虚血を行わなかったコントロール標本の CA-1 神経細胞では、粗面小胞体およびミトコンドリアのいずれも正常な超微形態を示していた (図 6-A)。しかし、20分虚血後の標本における CA-1 領域の神経細胞では、粗面小胞体は著明に拡大していた。ミトコンドリアも同様に腫大しクリスタが一部脱落していた (図 6-B, C, D)。

考 察

従来、虚血による神経細胞障害の治療を考える上では、血液の再灌流をいかに早期に行うかという点のみが強調されていた。しかし、虚血によって生じる神経細胞障害の程度は、虚血時間の長さや神経細胞の種類等によって様々であることが近年明らかにされてきた。長時間にわたって虚血状態が続くと、当然、すべての神経細胞が壊死に陥るが、比較的短時間で再灌流が行われても、海馬 CA-1 錐体細胞などの一部の脆弱な神経細胞は再灌流後数日間の経過でゆっくりと死に陥る。このような遅発性に生ずる神経細胞死が存在するという事実は、虚血刺激に対する神経細胞の応答の機構を解明することが、神経細胞死に対する予防や治療を考える上で極めて重要であることを示唆している。

虚血性神経細胞障害の機序としては、従来よりグルタミン酸-カルシウム仮説が主流であった²¹⁾。すなわち、虚血刺激が加わるとシナプス小胞内に貯蔵されているグルタミン酸が放出され、細胞外のグルタミン酸濃度が 100μM が超える位まで、急激に上昇する¹⁹⁾。細胞外の異常に増加したグルタミン酸が細胞内の Ca²⁺ 濃度の上昇をひき起こすが、これにはイオンチャンネルを持った受容体と代謝型受容体の両者が関与している。イオンチャンネルを介して細胞外の Ca²⁺ を細胞内に取り込む受容体は、特性の違いから *N*-メチル-D-アスパルギン酸 (*N*-methyl-D-aspartate, NMDA) 受容体と非 *N*-メチル-D-アスパルギン酸 (non-NMDA) 受容体に分けられる。一方、イオンチャンネルを持たず細胞内 G 蛋白と共役する代謝型受容体は、グルタミン酸刺激によって膜リン脂質を加水分解し、その代謝産物が細胞内に貯蔵していた Ca²⁺ を動員する¹⁴⁾¹⁵⁾。すなわち、神経細胞内の Ca²⁺ は、細胞外から流入するものと、細胞内から放出されるものの両者がある¹⁶⁾。このようにして、神経細胞内に異常に増加した Ca²⁺ が引き金となって神経細胞に障害を及ぼすという仮説である。

本研究において、虚血刺激による Ca²⁺ 濃度の変化をサルの生理的溫度である 36°C でみた場合、海馬の神経細胞領域全てにおいて Ca²⁺ 濃度上昇をみとめた。なかでも CA-1 は、他の領域に比べて虚血刺激に対する Ca²⁺ 濃度上昇は最もすみやかに始まり、上昇曲線も急峻で、他の領域よりもいち早く Ca²⁺ 濃度はピークに達した。すなわち、CA-1 においては、他の領域の Ca²⁺ 濃度がそれほど上昇していない程度の短時間の虚血でも、Ca²⁺ 濃度の上昇がかなり認められた。しかも、ピークの値も他の領域よりも高値で、虚血前後での Ca²⁺ 濃度格差が著明であった。この結果は、一過性脳虚血後に、CA-1 の神経細胞のみが選択的に遅発性細胞死をきたすことと関連があることを示唆している。また、海馬のいずれの領域においても、細胞内の Ca²⁺ 濃度は虚血開始 15 分後にはプラトー状態となり、虚血状態

が改善されるまでその状態を維持していた。つまり、サルの海馬神経細胞に対して 15 分以上にわたって虚血刺激が持続すれば、いずれの領域の神経細胞においてもかなり危険な濃度まで細胞内の Ca²⁺ 濃度が上昇し得るということになる。

近年、低体温による脳保護効果が報告されている¹⁷⁾。すなわち、虚血による神経細胞死は、虚血中の 2~3°C の体温低下によって、少なからず軽減するとされている¹⁷⁾。さらに、神経細胞死の程度は、虚血後の低体温によってもある程度軽減するが、その程度は虚血中に低体温とした際の脳保護効果には劣るといわれている¹⁸⁾。本研究では、チェンバー内の温度を変えて虚血刺激による Ca²⁺ 濃度の上昇を測定したところ、海馬のいずれの領域においてもチェンバー内の温度が低いほど、Ca²⁺ 濃度の上昇反応は立ち上がりが遅く、しかも上昇の程度も抑制されるという傾向を示した。低温により細胞内の Ca²⁺ 濃度の上昇が抑制されている状態で虚血性神経細胞障害が抑制されるというこの結果は、神経細胞内の Ca²⁺ 濃度の上昇が虚血による神経細胞障害に深く関与していることを示唆している。同時に、この温度依存性の反応は、イオンチャンネルを介した細胞外の Ca²⁺ の流入よりは、むしろ細胞内で代謝的に Ca²⁺ 動員が起こっていることを示唆するものであった。実際、Buchan らは NMDA レセプターに対する拮抗剤である MK-801 が、生体内では虚血に対してそれほど効果がなかったと報告しており²⁰⁾、グルタミン酸-カルシウム仮説以外の Ca²⁺ 濃度上昇の機構の存在を示唆している。

このように虚血時の神経細胞障害に重要な役割を果たすと推測される神経細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇が、主に細胞内の代謝性機構による Ca²⁺ 動員であることを説明するために、本研究では、既述の低温負荷の他に灌流リンゲル液中の Ca²⁺ 除去、および高濃度 KCl 負荷の条件下で実験をおこなった。低温負荷で虚血時のグルタミン酸放出には温度依存性がみとめられたという Busto らの報告¹⁹⁾を考慮すると、神経細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇の温度依存性はグルタミン酸-カルシウム仮説で一応説明することは可能である。すなわち、脳の温度を 2°C 程度下げることによってグルタミン酸濃度の上昇は強く抑制されたという報告は、温度依存性に Ca²⁺ 濃度上昇に変化がみとめられた本実験結果とよく一致している。そこで次に、灌流リンゲル液中の Ca²⁺ を除いた状態で、虚血刺激による Ca²⁺ 濃度を測定した。細胞外からの Ca²⁺ 流入を抑制した条件下でも、虚血状態にすることで Ca²⁺ 濃度の上昇が認められ、虚血刺激開始から Ca²⁺ 濃度の上昇が始まるまでの時間も灌流リンゲル液中に Ca²⁺ を含んでいた状態と非常に類似していた。さらに、50mMKCl で細胞膜を脱分極状態とし、イオンチャンネルを強制的に開かせると、チェンバーの温度とは無関係に、KCl 刺激の開始と同時に Ca²⁺ 濃度の上昇が開始し、イオンチャンネルの反応は温度非依存性であることも確認された。本研究では、定量的に神経細胞内の Ca²⁺ 濃度の測定を行ったわけではないこと、および実験条件が完全に生体内での虚血状態と同じではないこと、という二つの制約があるものの、以上の実験結果からは、神経細胞内の Ca²⁺ 濃度の上昇はイオンチャンネルを介した細胞外からの流入よりはむしろ細胞内に貯蔵されていた Ca²⁺ の放出が主体をなすものと推定された。

細胞内における Ca²⁺ 濃度の調節には粗面小胞体とミトコンドリアが関与しているとされており、虚血時の細胞内からの Ca²⁺ 放出源としても、当然この両者の関与が考えられる。

粗面小胞体からの Ca²⁺ の放出については、イノシトール三リン酸²¹⁾ とリアノジンリセプター²²⁾ の関与が報告されている。イノシトール三リン酸は、神経細胞膜に存在するリン脂質の分解産物で、粗面小胞体にあるイノシトール三リン酸受容体を刺激して、粗面小胞体からの Ca²⁺ 放出を促す²¹⁾。虚血刺激により細胞膜内においてホスホリパーゼCの活性化が起こり、イノシトールリン脂質の分解が促進するとの報告がある²³⁾。本研究においても PIP₂ の免疫組織化学的染色では、虚血後に CA-1 錐体細胞で、ホスファチジルイノシトール 4, 5-二リン酸の染色性がことに胞体において有意に増加しており、虚血刺激によってホスファチジルイノシトール代謝 (phosphatidylinositol turnover) が促進されたことを示している。低温負荷によって Ca²⁺ 濃度上昇の開始が遅延したことは、Ca²⁺ 濃度上昇に対するイノシトールリン酸代謝の影響を強く示唆していると考えられる。リアノジンリセプターはカルシウム依存性カルシウム放出受容体 (calcium induced calcium release) ともいわれる機序により、細胞内に増加した Ca²⁺ に刺激された粗面小胞体からさらに Ca²⁺ を放出させる²²⁾。

ミトコンドリアについては、これまで細胞内に増加した Ca²⁺ を取り込んで、細胞内の Ca²⁺ 濃度を調節する機能があることはわかっているものの、どのような状況で貯蔵した Ca²⁺ を放出するかについては現在なお不明な点が多い。電顕的には、虚血後の標本でミトコンドリアの著明な腫大とクリスタの脱落がみとめられた。この変化はコントロールでは全くみられなかったことから、明らかに虚血によって生じた変化と考えられる。したがって、虚血によって、イノシトールリン酸代謝に

よる粗面小胞体からの Ca²⁺ 動員と共にミトコンドリアからの Ca²⁺ 放出も生じている可能性がある。

本研究において得られた以上の結果から、虚血による神経細胞内の Ca²⁺ 濃度の変化について以下のような機構を推定した (図 8)。すなわち、虚血刺激が加わると、前シナプスから放出されたグルタミン酸の刺激によって少量の細胞外 Ca²⁺ が流入し、細胞膜でホスホリパーゼCの活性化が起こってイノシトールリン酸代謝が生じる。この結果作られたイノシトール 1, 4, 5-三リン酸による刺激によって、粗面小胞体からの Ca²⁺ 放出が促され、細胞内の Ca²⁺ 濃度が上昇する。さらに細胞内に増加した Ca²⁺ によってリアノジンリセプターが刺激されると小胞体から細胞内への Ca²⁺ 放出はさらに増加する。これに対して、虚血状態を解除すると、粗面小胞体とミトコンドリアへの Ca²⁺ の再取込みが起こるので、徐々に細胞内の Ca²⁺ 濃度は虚血前の状態に戻る。

このようにして、虚血中に神経細胞内に増加した Ca²⁺ は、様々な経路で細胞構造に変化を与えることが推測される。PIP₂ の代謝はイノシトール 1, 4, 5-三リン酸を産生し、前述のように粗面小胞体からの Ca²⁺ 放出を促すだけでなく、その際に同時にジアシルグリセロールが産生される。ジアシルグリセロールは Ca²⁺ と連携してプロテインキナーゼCを活性化させることが知られている²⁴⁾。活性化されたプロテインキナーゼCは、膜リセプターを介してさらに細胞外 Ca²⁺ の取り込みを促進したり、プロトオンコジンを活性化することも予想される²⁴⁾。また、Ca²⁺ 濃度の上昇は、エンドヌクレアーゼを活性化することにより DNA に直接不可逆的な損傷を与えている可能性もある。さらに異常に増加した細胞内 Ca²⁺ によってカルパイン、カルモデュリン等の Ca²⁺ 依存性酵素が活性化され、これらが細胞骨格蛋白を破壊したり、細胞内情報伝達系を修飾していることも考えられる^{25,26)}。虚血の際に活性化されたこれらの蛋白がいかなる働きを担っているかについては現在なお未解決な点が多いが、なかでも細胞内情報伝達系を介するような反応は、ある程度の時間経過を必要とするため、遅発性神経細胞死に関与している可能性が高いと考えられる。

以上のように、本研究で得られた虚血刺激時の海馬神経細胞の Ca²⁺ 動態とイノシトールリン酸代謝系の活性化、および形態学的変化に、上記の細胞内に異常に増加した Ca²⁺ の神経細胞への影響に関する知見を考え合わせると、遅発性神経細胞死の機構について以下のような仮説が成り立つ。すなわち、虚血刺激に対して敏感な CA-1 神経細胞は、虚血刺激開始後速やかに Ca²⁺ 濃度が危険な値まで上昇する。その結果、細胞内の蛋白合成機構や情報伝達系が影響を受けて遅発性神経細胞に至る一連のカスケードが始まるものと推定される。この際、CA-1 神経細胞ほど虚血刺激に対して敏感でない他の神経細胞は、短時間の虚血では Ca²⁺ 濃度の上昇が軽度で留まるため、可逆的な変化しか生じないと考えられる。そして、すべての神経細胞で Ca²⁺ 濃度が極度に増加し、プラトー状態になる程の虚血状態が続くと、遅発性神経細胞死の過程が始まる以前に細胞骨格蛋白や蛋白合成機構が崩壊し、神経細胞壊死の状態に陥ると考えられる。

結 論

1. 虚血刺激によって、海馬 CA-1~4 の全ての領域において Ca²⁺ 濃度の上昇がみられ、CA-1 の反応が最も著明であった。

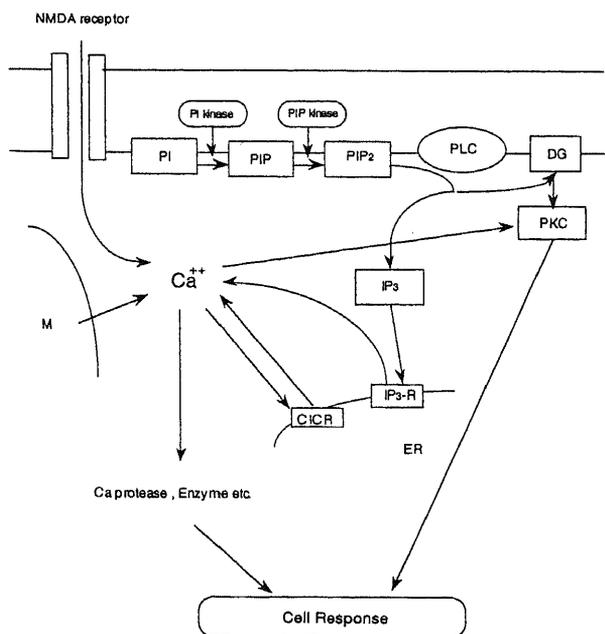


Fig. 7. Schematic drawing of the mechanism of the ischemia-induced Ca²⁺ mobilization. ER, rough endoplasmic reticulum; M, mitochondria; PI, phosphatidylinositol; PIP, phosphatidylinositol 4-phosphate; PIP₂, phosphatidylinositol 4, 5 bisphosphate; PLC, phospholipase C; IP₃, phosphatidylinositol 1, 4, 5-triphosphate; DG, diacylglycerol; PKC, protein kinase C; CICR, Ca²⁺-induced-Ca²⁺-release; IP₃-R, IP₃-induced-Ca²⁺-release; NMDA, N-methyl-D-aspartate.

2. 上記の Ca^{2+} 濃度の上昇反応には、温度依存性がみとめられた。

3. 50mMKCl 刺激では、温度依存性はみられず29℃でも Ca^{2+} 濃度の上昇がみられた。

4. 細胞外からの Ca^{2+} 流入を除いた条件下でも、虚血によって細胞内の Ca^{2+} 濃度が上昇した。

5. 海馬切片の免疫組織化学的検索で、虚血後の CA-1 錐体細胞の胞体において PIP_2 の染色性が有意に増加していた。

6. 電顕的に粗面小胞体の著明な拡大とミトコンドリアの腫大がみられた。

以上より、一過性脳虚血後に海馬 CA-1 に生ずる遅発性神経細胞死には、粗面小胞体やミトコンドリアからの細胞内貯蔵 Ca^{2+} の動員が重要な役割をなすものと推定された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導とご校閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を表します。また、終始御指導頂きました山嶋哲盛助教授、ならびに多大な御協力を頂きました早稲田大学人間科学部吉岡亮教授、浜松医科大学量子医学研究センター宮川厚夫教授に深謝致します。

なお、本研究の要旨は第52回脳神経外科学会総会(東京, 1993)において発表した。

文 献

- 1) Kirino, T.: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res.*, **239**, 57-69 (1982).
- 2) 桐野高明: Annual Review 神経 1993 (後藤文男, 高倉公朋, 木下真男, 柳澤信夫, 清水輝夫編), 119-131 頁, 中外医学社, 東京, 1993.
- 3) Scoville, W. B. & Milner, B.: Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **20**, 11-21 (1957).
- 4) Zola-Morgan, Squire, L. R. & Amaral, D.: Human amnesia and the medial temporal region: Enduring memory impairment following a bilateral lesion limited to the CA1 field of hippocampus. *J. Neurosci.*, **6**, 2950-2967 (1986).
- 5) Zola-Morgan & Squire, L. R.: Memory impairment in monkeys following lesions of the hippocampus. *Behav. Neurosci.*, **100**, 2950-2967 (1986).
- 6) 桐野高明: 脳虚血とグルタミン酸レセプター. *実験医学*, **9**, 616-622 (1991).
- 7) 唐木英明: 蛍光カルシウム指示薬の実験基礎. *実験医学*, **7**, 626-631 (1989).
- 8) 工藤佳久: スライス標本における細胞内カルシウム測定法. **7**, 663-670 (1989).
- 9) Miyazawa, A., Umeda, M., Horikoshi, T., Yanagisawa, K., Yoshioka, T. & Inoue, K.: Production and characterization of monoclonal antibodies that bind to phosphatidyl inositol 4, 5-bisphosphate. *Mol. Immunol.*, **25**, 1025-1031 (1988).
- 10) 田辺 勤: 電位依存性 Ca^{2+} チャネルの分子的多様性と生理機能. *実験医学*, **10**, 595-600 (1992).
- 11) 金子周司: 神経の電位依存性 Ca^{2+} チャネル. *実験医学*, **10**, 601-604 (1992).
- 12) Choi, D. W.: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, **1**, 623-634 (1995).
- 13) Szatkowski, M., Barbour, B. & Attwel, D.: Non-vesicular release of glutamate from glial cells buereserved electrogenic glutamate uptake. *Nature*, **348**, 443-446 (1990).
- 14) Monaghan, D. T., Yao, D. & Cotman, C. W.: The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of central nerve system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **29**, 365-402 (1989).
- 15) 川合述史: グルタミン酸受容体—記憶の神経機構を解く鍵. *科学*, **62**, 296-303 (1992).
- 16) Siesjö, B. K. & Bengtsson, F.: Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: A unifying hypothesis. *J. Cereb. Blood. Flow Metab.*, **9**, 127-140 (1989).
- 17) Minamisawa, H., Nordstrom, C. H., Smith, M. L. & Siesjö, B. K.: The influence of mild body and brain hypothermia on ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **10**, 365-374 (1990).
- 18) Welsh, F. A. & Harris, V. A.: Postischemic hypothermia fails to reduce ischemic injury in gerbil hippocampus. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **11**, 617-620 (1991).
- 19) Busto, R., Globus, M. Y., Dietrich, W. D., Martinez, E., Valdes, I. & Ginsberg, M. D.: Effect of mild hypothermia on ischemia-induced release of neurotransmitters and free fatty acids in rat brain. *Stroke*, **20**, 904-910 (1989).
- 20) Buchan, A. & Pulsinelli, W. A.: Hypothermia but not the *N*-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J. Neurosci.*, **10**, 311-316 (1990).
- 21) 御子柴克彦: IP3 レセプター. *実験医学*, **10**, 637-650 (1992).
- 22) 飯野正光: 細胞内 Ca^{2+} 放出チャンネルファミリー. *実験医学*, **10**, 626-631 (1992).
- 23) Yoshida, S., Ikeda, M., Busto, R., Martinez, E. & Ginsberg, M. D.: Cerebral phosphoinositide, triacylglycerol, and energy metabolism in reversible ischemia: Origin and fate of free fatty acids. *J. Neurochem.*, **47**, 744-757 (1986).
- 24) 大野茂男: C-キナーゼと細胞増殖. *Mebio*, **10**, 30-38 (1993).
- 25) Saido, T., Yokota, M., Nagao, S., Yamaura, I., Tani, E., Suzuki, K. & Kawashima, S.: Spatial resolution of fodrin proeolysis in post ischemic brain. *J. Biol. Chem.*, **268**, 25239-25243 (1993).
- 26) Lee, K. S., Frank, S., Vanderkilish, P., Arai, A. & Lynch, G.: Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7233-7237 (1991).

