

新生仔ラット脳低灌流負荷後の白質病変 — 両側頸動脈閉塞後 Doxapram 投与による影響 —

(分担研究：脳室周囲白質軟化症 (PVL) の成因と治療に関する研究)

研究協力者：吉岡 博

共同研究者：上原久和、澤田 淳

要約：日齢5のラットを麻酔後、両側頸動脈閉塞 (BCAO) のみを行ったB群 (n=12)、およびBCAO後 Doxapram (DOX) 50 mg/kgを腹腔内投与したB + D群 (n=10) について日齢7に灌流固定後、パラフィン切片を作製し組織学的検討を行った。H E染色において、白質粗鬆化の程度はB群に比べてB + D群で強かったが、灰白質での神経細胞死の程度は両群間に差を認めなかった。GFAP陽性グリアはコントロールに比べB群では皮質、海馬で増加し、B + D群では脳梁、内包、皮質、海馬で増加していた。また、B群と比べB + D群では脳梁、内包、海馬で増加し、その差は内包で最も顕著であった。以上より、日齢5ラットにおけるBCAO負荷は白質優位の粗鬆化、軽度のグリア活性化を惹起することが示された。またDOX投与により白質病変が増強されたことから、DOXは発達脳の白質病変形成に関与している可能性が示唆された。

見出し語：新生仔ラット、両側頸動脈閉塞、Doxapram、脳室周囲白質軟化症

緒言：脳室周囲白質軟化症 (PVL) は極低出生体重児の脳性麻痺の主原因として近年注目されている。われわれは以前に新生仔犬に両側頸動脈結紮を行うことにより、PVLが虚血のみによって発症することを初めて証明しているが¹⁾、今回は、より汎用可能な小動物である新生仔ラットを用いて同様の負荷を行い、白質病変の有無を検討した。さらに、呼吸促進剤であるDoxapram (以下DOXと略す) 投与により過呼吸負荷を行い、臨床的にPVL発症の危険因子として注目されている低CO₂血症の重要性について実験的検討を加えた。

研究方法：

1) DOX投与効果について：DOX50mg/kgを腹腔内投与し、投与前、30、60、120、180分後 (各n=5)、断頭による混合血を採取しPCO₂値を測定した。2) モデルの作製：日齢5のWistar系ラット (体重10~15g) をペントバルビタール麻酔後、頸部正中切開を行い、電気凝固による両側頸動脈永久閉塞 (BCAO) のみを行ったB群、及びBCAO後DOX50mg/kgを腹腔内投与したB + D群を作製し、日齢7に灌流固定し、パラフィン包埋後6μmの冠状断切片を作製した。このうち脳梁正中部、内包、背側海馬が同時に観察できる切片を用いて以下の検討を行った。3) 組織学的検討：①ヘマトキシリン-エオジン (H E) 染色標本において、白質 (脳梁、内包) の粗鬆化を-：なし、+：軽度の線維構造変化あり、2+：明らかな線維構造変化あり、の3段階で、皮質、海馬、視床での神経細胞死についても-：なし、+：散在してみられる、2+：広範にみられる、の3段階で評価した。②GFAP免疫組織化学染色標本において、脳梁、内包、皮質、視床の各部位の0.06mm²あたりの陽性細胞数を算定しコントロール (C) 群 (n=4) と各群間でのグリア活性化について比較検討した。なお統計学的検討にはχ²検定、およびMann-Whitney U検定を用いた。

研究成績：DOX投与後のPCO₂値は前値 (49.3±3.0mmHg: mean ± SD) と比較して30分後 (41.7±5.6)、60分後 (37.7±3.5) まで有意に (p<0.05) 低下していた。日齢7までの生存率はB群12/15例 (80%)、B + D群11/41例 (27%) とB群の方が有意に高値であった。またB + D群のうち1例では両側大脳半球の広範な梗塞を認めたため、これを除外したB群12例、B + D群10例を検討に供した。H E染色での白質粗鬆化について-、+、2+であった例は脳梁ではB群：8/31例 (-/+/2+)、B + D群：1/7/2例、内包ではB群：5/5/2例、B + D群：0/3/7例といずれもB群に比べB + D群の方が有意に粗鬆化の程度が強かった (p<0.05)。また神経細胞死の程度について-、+、2+であった例は皮質でB群：6/5/1例、B + D群：3/7/0例、海馬でB群：9/2/1例、B + D群：8/2/0例、また視床ではB群：9/2/1例、B + D群：8/2/0例といずれの部位においても有意差を認めなかった。GFAP陽性細胞数はC群と比較してB群では皮質**、海馬*で増加していた (B群：C群；15±14：2±1、61±11：46±4) が、脳梁、内包、視床では有意差を認めなかった (*：p<0.05、**：p<0.01)。B + D群でもC群と比較して脳梁*、内包**、皮質**、海馬**の各部位で増加していた (B + D群：C群；57±21：34±6、100±28：53±6、25±24：2±1、74±16：46±4)。またB群と比較してB + D群では脳梁*、内包**、海馬*の各部位において有意に増加しており (B群：B + D群；39±13：57±21、67±14：100±28、61±11：74±16)、皮質、視床では有意差を認めなかった。

考察：成熟ラットのBCAO負荷モデルでは約90%の例が7日間以上生存可能で灰白質での広範な梗塞はみられず、白質の粗鬆化、グリアの活性化がみられるとされている²⁾。新生仔ラットを用いた今回の検討でも、灰白質の神経細胞死は11/12例で軽度であった一方、内包での構造変化は7/12例でみられ、BCAOは白質障害モデルとして有用であることが示唆された。しかし、全く構造変化を示さなかった例が脳梁、内包でそれぞれ8例、5例みられたことや、広範な神経細胞死を1例で認めたことから個体差により障害の程度が左右されていると推測された。

近年PVLの危険因子の1つとして低CO₂血症による脳血流低下が注目されているため³⁾、実験的に過換気による低CO₂血症と白質病変との関連を検討した。今回、DOXの大量腹腔内投与により投与後60分まで低CO₂血症を惹起させた。しかし、このときの値は35~40mmHgであり、臨床的に問題となる20mmHg前後の低CO₂血症には至らなかったが、家兎での実験でPCO₂値が35mmHgと軽度の低下でも脳血流は75%まで低下したとの報告もみられ⁴⁾、ある程度の血流低下はみられるものと推測される。H E染色では灰白質における神経細胞死の程度はB群とB + D群との間に有意差を認めなかったが、脳梁、内包における粗鬆化の程度はB群に比べB + D群で有意に強かった。またB + D群におけるGFAP陽性細胞はB群と比較して脳梁、内包、海馬のみで有意に増加しており、特に内包での差が顕著であった。

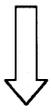
このように、BCAO後にDOX投与を行うことにより白質の粗鬆化、グリアの活性化が増強されたことから、DOXは脳低灌流時の白質障害形成に関与している可能性が示唆された。

結論：

- 1) 日齢5新生仔ラットにおいてBCAO負荷は白質優位の粗鬆化や軽度のグリア細胞活性化を惹起する白質障害モデルとして有用であると考えられた。
- 2) BCAA後にDOXを投与することにより、白質病変が増強されたことからDOXが白質病変形成に関与している可能性が示唆された。

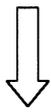
参考文献：

- 1) Yoshioka H, Goma H, Nioka S, et al: Bilateral carotid artery occlusion causes periventricular leukomalacia in neonatal dogs. Dev Brain Res, 78:273-278, 1994.
- 2) Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, et al: Glial activation and white matter changes in the rat brain induced by chronic cerebral hypoperfusion: An immunohistochemical study. Acta Neuropathol, 87:484-492, 1994.
- 3) 藤本伸治, 加藤稲子, 岡嶋一樹, 他: 脳室周囲性白質軟化症32例の臨床的検討. 新生児誌, 26(3):818-823, 1990.
- 4) 穴田紀夫, 楠田聡, 郡山健, 他: 低CO₂血症による脳血流減少に対する予防法の検討. 近畿新生児研究会誌, 6:24-27, 1997.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:日齢 5 のラットを麻酔後、両側頸動脈閉塞(BCAO)のみを行った B 群(n=12)、および BCAO 後 Doxapram(DOX)50mg/kg を腹腔内投与した B+D 群(n=10)について日齢 7 に灌流固定後、バラフィン切片を作製し組織学的検討を行った。HE 染色において、白質粗鬆化の程度は B 群に比べて B+D 群で強かったが、灰白質での神経細胞死の程度は両群間に差を認めなかった。GFAP 陽性グリアはコントロールに比べ B 群では皮質、海馬で増加し、B+D 群では脳梁、内包、皮質、海馬で増加していた。また、B 群と比べ B+D 群では脳梁、内包、海馬で増加し、その差は内包で最も顕著であった。以上より、日齢 5 ラットにおける BCAO 負荷は白質優位の粗鬆化、軽度のグリア活性化を惹起することが示された。また DOX 投与により白質病変が増強されたことから、DOX は発達脳の白質病変形成に関与している可能性が示唆された。