

氏名(本籍)	上 ^{うえ} 杉 ^{すぎ} 雅 ^{まさ} 文 ^{みみ} (茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第1,929号
学位授与年月日	平成10年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	Pathophysiological roles of endogenous endothelin in spinal cord injury (脊髄損傷病態下における内因性エンドセリンの役割)
主査	筑波大学教授 医学博士 岡戸信男
副査	筑波大学教授 医学博士 中山凱夫
副査	筑波大学教授 医学博士 能勢忠男
副査	筑波大学助教授 医学博士 佐藤重仁
副査	筑波大学講師 医学博士 山本三幸

論文の内容の要旨

(目的)

21残基のアミノ酸よりなるエンドセリン(ET)は、生体内の各臓器において多数な生理活性を持つことが報告されている。中枢神経系においては、ラット大脳皮質由来の培養アストロサイトに対しET-1が増殖活性を持つことが報告され、中枢神経傷害病態へのETの関与が示唆されていた。しかしながら、中枢神経障害後の組織変性あるいは修復過程にET-1が関与するというin vivoでの直接的な検討はなされていなかった。本研究では、内因性ET-1が実際に中枢神経系の損傷またはその後の修復に如何に係わっているのかを探る目的で、第1部において、脊髄損傷後のアストロサイト増殖に対するET-1の関与を検討し、第2部においては、内因性ET-1が、中枢神経組織の変性にどのように関与しているのか、ラット脊髄損傷モデルを作成し、以下の検討を行なった。

第一部 内因性ETによるACs増殖作用の検討

(1) ラット脊髄損傷モデルの作成

2週齢Wistar ratの椎弓間より25G針を刺入し、脊髄横断損傷を作成した。このとき損傷部位にET受容体拮抗薬SB209670を10 μ l (5 mg/ml)投与した群(SB209670投与群)、生理食塩水10 μ lを同様に投与した群(損傷群)を作成し、損傷を加えない群(対象群)と比較検討を行った。

(2) 損傷脊髄組織内での内因性ET-1濃度の測定

脊髄損傷後のラットより、損傷部位を含む全長約5mmの脊髄組織を摘出し、Enzyme-linked immunoassay法により組織内ET-1濃度を測定した。その結果、損傷後、組織内ET-1濃度は経時的に増加し、24時間後では、損傷前の約30倍の濃度となっていた。

(3) RC1抗体(幼若ACs特異抗体)による組織化学的検討

脊髄損傷後24時間の時点で、損傷部位から約3mm頭側の脊髄組織より凍結切片を作成し、RC1抗体のimmunoreactivityをSB209670投与群、損傷群、及び対象群で比較検討した。その結果、損傷群で確認された、RC1抗体陽性な幼若アストロサイトの著明な増加は、SB209670投与群では、対象群と同程度まで抑制されていた。

(4) T-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)の集積を指標としたDNA合成活性の検討

脊髄損傷直前にBrdUを腹腔内投与し、脊髄損傷後24時間後の組織でのBrdUの集積を組織化学的に検討した。

その結果、損傷群で24時間後に確認されたBrdUの集積は、SB209670投与群では対象群と同程度まで抑制されていた。

以上の結果より、脊髄損傷後組織内に流入した内因性のET-1が、アストロサイトの脱分化・増殖を引き起こし、その後の gliosis への橋痕形成へのトリガーとなっている可能性が示唆された。

第二部 内因性エンドセリンによる神経軸索変性作用の検討

(1) ラット脊髄損傷モデルの作製

第一部と同様に脊髄横断損傷を作成した。このとき、50 μ gのエンドセリン受容体拮抗薬SB209670を浸潤させたゼルフォームを同様に留置した群 (SB209670投与群)、生理食塩水を浸潤させたゼルフォームを同様に留置した群 (損傷群) を作成し、損傷を加えない群 (対象群) と損傷1週間後の組織像を比較検討した。

(2) 損傷1週間後の脊髄組織変性の光学顕微鏡による検討

損傷群に認められた脊髄組織の浮腫、神経組織の脱落像、炎症細胞の浸潤は、SB209670投与群においては対象群と同程度まで抑制されていた。

(3) 抗 neurofilament 抗体による免疫組織化学的検討

残存する神経軸索を確認するため抗neurofilament 抗体による免疫組織化学的検討を行った。損傷群において認められた抗neurofilament 抗体陽性繊維の減少は、SB209670の投与により抑制され、対象群と同程度の神経繊維の残存を認めた。

(4) 損傷1週間後の脊髄軸索変性の電子顕微鏡による検討

残存する神経繊維の微細構造を検討するため電子顕微鏡による検討を行った。損傷群に認められた、肥大線維や、萎縮線維の出現、及びミエリン鞘の受腫が、SB209670投与群において抑制されていた。

以上の結果より、内因性のETが脊髄損傷後の軸索変性の、直接的あるいは間接的な起因物質である可能性が示唆された。

(考察)

本研究において、中枢神経傷害時の組織変性、及び修復の双方への、内因性ETの関与が示唆された。しかしながら、本研究においては、ET受容体拮抗薬の投与によって脊髄損傷後の神経の再生を観察することは出来なかった。今後、内因性ETの神経組織に対する作用の具体的なメカニズムを検討すると同時に、ET受容体拮抗薬の投与が脊髄損傷の機能予後にもたらす影響について検討する必要があると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は脊髄損傷病態に於ける内因性エンドセリンの役割を組織学的に検討した研究である。ラット脊髄損傷モデルを用いての検討で、エンドセリン受容体拮抗薬SB209670の投与は、脊髄損傷後のアストロサイトの増殖と、神経組織の変性を抑制させる効果があることが組織学的に観察された。この結果から、内因性エンドセリンが脊髄損傷病態に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今回、神経組織の再生は確認されなかったが、今後より臨床的な実験モデルにおいて検討を行なうことにより、エンドセリン受容体拮抗薬の脊髄損傷の治療薬としての可能性について、より貴重な情報が得られるものと思われる。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。