

|         |  |
|---------|--|
| 氏名・(本籍) | ながざきごう<br>長崎剛 (秋田県)  |
| 専攻分野の名称 | 博士(医学)   |
| 学位記番号   | 医博乙第594号   |
| 学位授与の日付 | 平成26年3月27日   |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当   |
| 学位論文題名  | Long-term effects of post-ischemic estrogen on brain injury in a rat<br>transient forebrain ischemia model<br>(ラット一過性前脳虚血モデルにおけるエストロゲン虚血後投与の長期的効果) |
| 論文審査委員  | (主査) 教授 清水 徹 男<br>(副査) 教授 尾野 恭 一 教授 寺田 幸 弘   |

## 学位論文内容要旨

### 論文題目

Long-term effects of post-ischemic estrogen on brain injury in a rat transient forebrain ischemia model (ラット一過性前脳虚血モデルにおけるエストロゲン虚血後投与の長期的効果)

申請者氏名 長崎 剛

### 研究目的

過去の動物実験において、麻酔薬を含め様々な薬物は脳虚血に対する脳保護効果を有することが示されてきた。しかし、臨床試験で有効性が認められたものはほとんどない。その理由の一つとして、動物実験では効果判定までの期間が短いことが指摘されている。1990年代より様々な動物モデルにおいて、エストロゲンが脳保護効果を有することが示されてきている。しかしながらほとんどの報告において、効果判定までの期間は数日と短い。したがって、本研究では効果判定までの期間を過去の報告より長い28日間に設定し、エストロゲンの脳虚血後投与による長期的な脳保護効果を検討した。

### 研究方法

雄性SDラット40匹をハロタンで麻酔導入後、気管挿管と人工呼吸を行い、カテーテルを尾動脈と頸静脈に留置し、側頭筋温を37.5℃に維持した。ラットを対照7日群(cyclodextrin 5 mg/kg投与、7日間観察、C7群)、対照28日群(cyclodextrin 5 mg/kg投与、28日間観察、C28群)、エストロゲン7日群(17 $\beta$ -estradiol 200  $\mu$ g/kg投与、7日間観察、E7群)、エストロゲン28日群(17 $\beta$ -estradiol 200  $\mu$ g/kg投与、28日間観察、E28群)、シャム群(28日間観察、S28群)の5群とした(各n=8)。脱血による低血圧(平均血圧40 mmHg)と両側頸動脈閉塞によって前脳虚血状態とし、10分後に頸動脈閉塞解除と返血によって再灌流を行った。脳波をモニターし、前脳虚血中の脳波を記録した。対照群とエストロゲン投与群では再灌流直後にcyclodextrin または17 $\beta$ -estradiolを静脈内に投与し、麻酔から覚醒させた。虚血再灌流の7日後または28日後に神経学的評価(神経学的欠損スコア、0点=障害なし~17点=最重症)を行った。またY字型迷路試験により交替行動率を算出し、短期記憶力を評価した。さらに組織学的評価として、7日後または28日後にラット脳を灌流固定し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、海馬CA1領域における1 mm当りの正常錐体細胞数を計測した。統計解析は分散分析とScheffeテスト、二元配置分散分析、Bonferroni補正Mann-Whitney U検定で行い、P<0.05を有意とした。

### 研究成績

S28群を除く全てのラットで前脳虚血中の平坦脳波が確認された。実験中の血液ガス分析値、側頭筋温、血中ヘモグロビン濃度、血糖値に群間差はなかった。前脳虚血中の平均血圧は、S28群よりC7群、E7群、C28群およびE28群で有意に低値であった。

組織学的検査：虚血7日後の海馬CA1領域1 mm当りの正常錐体細胞数は、C7群で10(19.5) [中央値(四分位範囲)]、E7群で57.5(46.5)、C7群よりE7群で有意に多かった(p=0.014)。虚血28日後の評価ではC28群で11(20)、E28群で6(11)、2群間に有意差はなかった。S28群では131.5(31.5)で、C28群やE28群と比較して有意に多かった。

神経学的欠損スコア：虚血7日後、S28群で1(1-3)、C7群で2(1-4)、E7群で1.5(1-3)であった。虚血28日後、S28群で2(1-4)、C28群で5(3-7)、E28群で3.5(2-6)であった。7日後および28日後の評価で3群間に有意差はなかった。

Y字型迷路試験による交替行動率：虚血前と虚血7日後の交替行動率は、S28群で63.7 $\pm$ 15.6% (平均 $\pm$ 標準偏差)から66.5 $\pm$ 17.0%、C28群で76.7 $\pm$ 12.2%から53.1 $\pm$ 25.8%、E28群で74.6 $\pm$ 5.8%から55.0 $\pm$ 25.6%になった。これらの経時的変化で3群間に有意差はなかった。28日後、多くのラットは迷路内で探索行動を行わなくなり、交替行動率を算出できなかった。

### 結論

17 $\beta$ -estradiolの前脳虚血後投与によって、虚血7日後で組織学的な脳保護効果が確認されたが、虚血28日後にはその効果は消失していた。本研究結果では、ラット一過性前脳虚血モデルにおいて脳虚血後に17 $\beta$ -estradiol 200  $\mu$ g/kgを単回投与した場合、組織学的評価および神経行動学的評価において長期的な脳保護効果は認められなかった。

## 学位（博士-乙）論文審査結果の要旨

主査：清水徹男

申請者：長崎 剛

論文題名：Long-term effects of post-ischemic oestrogen on brain injury in a rat transient forebrain ischaemia model. (ラット一過性前脳虚血モデルにおけるエストロゲン虚血後投与の長期的効果)

### 要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、動物における急性実験では脳虚血に対する脳保護効果を発揮する様々な薬物のうち、エストロゲンの脳虚血後投与による長期的な脳保護効果を検討したものである。

本論文の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明瞭性は以下の通りである。

#### 1) 斬新さ

麻酔薬を含む様々な薬物が脳虚血に対する脳保護効果をもつことについては従来、動物における急性実験によって示されてきた。しかし、実臨床においてはこれらの薬物の脳保護効果は証明されていない。動物実験の結果と臨床効果のあいだの解離の原因は不明である。その一つの可能性として従来動物実験ではその脳保護効果を9日以内という短期間しか観察し得ていないことがあげられる。本研究の斬新さは、急性実験においてその脳保護効果がすでに確立されている **estrogen** の rat 脳虚血に対する脳保護効果を脳虚血回復後の28日まで追跡し、回復後7日では認められた脳保護効果が回復後28日では消失していることを始めて見いだしたことである。

#### 2) 重要性

脳虚血後の脳保護作用を持つ薬物の開発は臨床的に非常に重要な

テーマである。その重要性は脳血管障害による死亡率が極めて高い秋田県においてとりわけ大きい。しかし、急性動物実験でその虚血後脳保護作用が認めれた薬物は、ひとにおいては臨床効果を持たない。本研究は脳虚血に対する薬物の保護作用を動物実験で評価するためには虚血回復後に長期間にわたり観察することが重要であることを始めて見いだしたものであり、今後、脳保護作用を持つ薬物を開発するにあたってきわめて重要な示唆をなすものである。さらに、本研究が脳虚血後の脳細胞死が長期にわたって進行するプロセスであることを示した点も重要である。

### 3) 研究方法の正確性

脳虚血の方法については研究者の所属する講座で開発し、報告した方法を用いている。虚血後の行動と記憶能力、および、脳の CA1 における病理組織的な変化については数量化した上でいずれも統計学的に検討を加えており、客観的な評価法で、正確性があると考えられる。

### 4) 表現の明瞭さ

これまでの問題点の解決、すなわちエストロゲンの虚血後の急性期脳保護効果が虚血回復後長期にわたって維持されるものではない点を明らかにするための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考えられる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。