

学位論文  
Doctoral Thesis

新生児低酸素性虚血性脳症モデルにおける

アミノ酸の神経保護効果の検討

～グリシンは低酸素性虚血性脳症による脳傷害を軽減する～

(Neuroprotective effect of amino acids

in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy

～Amelioration by glycine of brain damage in neonatal rat brain

following hypoxia-ischemia～)

森 博 子

Hiroko Mori

指導教員

遠藤 文夫 前教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児科学

中村 公俊 准教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児科学

2016年度

中表紙

# 学 位 論 文

## Doctoral Thesis

新生児低酸素性虚血性脳症モデルにおける

アミノ酸の神経保護効果の検討

～グリシンは低酸素性虚血性脳症による脳傷害を軽減する～

(Neuroprotective effect of amino acids

in neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy

～Amelioration by glycine of brain damage in neonatal rat brain

following hypoxia-ischemia～)

著者名 : 森 博 子  
Hiroko Mori

指導教員名 : 熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児科学 遠藤 文夫 前教授  
熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻小児科学 中村 公俊 准教授

審査委員名 : 産科婦人科学担当教授 氏 名 片渕 秀隆  
小児外科学・移植外科学担当教授 氏 名 猪俣 裕紀洋  
脳回路構造学担当教授 氏 名 玉巻 伸章  
神経分化学担当教授 氏 名 太田 訓正

2016年度

## 1. 目次

1. 目次	p2-p3
2. 要旨	p4-p5
3. 学位論文の骨格となる発表論文、および過去の発表論文リスト	p6
4. 謝辞	p7
5. 略語一覧	p8
6. 研究の背景および目的	p9-p13
6-(1) 新生児低酸素性虚血性脳症のメカニズムとその治療法	p9-p10
6-(2) アミノ酸の生理活性	p10-p11
6-(3) グリシンとその生理活性	p11-p13
6-(4) 本研究の目的	p13
7. 実験方法	p14-p20
7-(1)ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルの作成	p14
7-(2) アミノ酸溶液の調整・投与とアミノ酸間での脳傷害程度の比較	p14
7-(3) 低酸素・虚血負荷後の脳傷害部位の組織学的評価	p15-p17
7-(4) TUNEL 法によるアポトーシスの検討	p17
7-(5) 低酸素・虚血負荷後の脳における TNF $\alpha$ 発現の評価	p17-p18
7-(6) 仔ラット血漿・髄液中のグリシン濃度の測定	p18
7-(7) 統計学的解析	p19
8. 実験結果	p21-p31
8-(1) 低酸素・虚血負荷後の脳組織におけるグリシンの神経保護効果	p21
8-(2) 低酸素・虚血負荷後の脳組織におけるグリシン投与後のアストロサイト・ミクログリアの 変化	p21-p22

8-(3) 低酸素・虚血負荷後の脳組織におけるグリシンのアポトーシス抑制	p22
8-(4) 低酸素・虚血負荷後の脳組織におけるグリシンの TNF $\alpha$ 発現抑制	p22
8-(5) グリシンの薬物体内動態	p23
9. 考察	p32-p38
9-(1) グリシンの抗炎症効果による神経保護	p32-p33
9-(2) グリシンの抗アポトーシス効果による神経保護	p34
9-(3) グリシンの TNF $\alpha$ 発現抑制作用による神経保護	p34-p37
9-(4) グリシンの薬物体内動態と毒性	p37-p38
10. 結語	p39
11. 参考文献	p40-p45

## 2. 要旨

[ 背景 ] 新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)は、出生時の脳虚血を原因とする予後不良の疾患である。本疾患の治療では、虚血に伴う神経細胞のアポトーシスの抑制が重要であり、現在まで種々のアポトーシス抑制物質の効果が報告されているが臨床応用には至っていない。今回、生体内で様々な生理活性を持つアミノ酸に着目し、成人脳梗塞の実験モデルにおいて神経保護作用があると報告されているグリシンについて、新生児低酸素性虚血性脳症の実験モデルを用いてその神経保護効果および関与するメカニズムについて検証した。

[ 方法 ] 数種類のアミノ酸による神経保護効果を検証した結果、グリシンにおいて最も高い神経保護作用を認め、更に至適投与量の検討によりグリシン 800mg/kg を適用した。日齢 7 の新生仔ラットを、処置を行わない群、生食投与後に低酸素虚血処置を行う群およびグリシン投与後に低酸素虚血処置を行う群に分け、低酸素虚血処置として左総頸動脈の結紮手術後、8%酸素に 120 分間暴露させた。虚血後の脳における傷害の範囲、傷害部のグリア化・アポトーシスの評価及び TNF $\alpha$  の発現について、TUNEL 染色、RT-PCR、免疫染色を用いて評価した。

[ 結果 ] グリシン投与群では生食投与群と比較し、脳における虚血によるダメージ部位の面積が 70%以上減少していた。処置 3 日後の傷害部周囲において、生食群では反応性にアストロサイトやミクログリアの活性化が著明にみられたが、グリシン投与群ではこれらの活性化がほとんど認められなかった。更にグリシン投与群で神

経細胞のアポトーシスの減少と TNF- $\alpha$  の発現低下がみられた。

[ 考察 ] グリシンは新生児 HIE に対して神経保護的に働くことが示唆されるが、そのメカニズムとして、グリシンが HIE 後の脳でのアストロサイトやミクログリアの活性化を抑制し、更に TNF  $\alpha$  の発現を抑制することで、その後進展していく炎症反応を主体としたアポトーシスや神経細胞死を抑制している可能性があると考えられる。

[ 結論 ] 本研究により、グリシンは新生児低酸素性虚血性脳症による脳傷害を軽減し、そのメカニズムとして TNF  $\alpha$  により惹起される炎症反応およびグリア化の抑制が関与している事が示唆された。今後、新生児低酸素性虚血性脳症の治療としてのグリシン全身投与の有用性について、Therapeutic time window を意識したグリシン投与のタイミングや投与経路について、更にグリシン受容体の関与の有無などについて、更なる研究が必要である

### 3. 学位論文の骨格となる発表論文、および過去の発表論文リスト

1. Hiroko Mori, Ken Momosaki, Jun Kido, Tetsuo Naramura, Kenichi Tanaka, Shirou Matsumoto, Kimitoshi Nakamura, Hiroshi Mitsubuchi, Fumio Endo, Masanori Iwai  
Amelioration by glycine of brain damage in neonatal rat brain following hypoxia- ischemia. *Pediatrics International* (in press)

#### 4. 謝辞

本研究を行うにあたり、全面的にご指導いただきました熊本大学大学院医学研究科小児科学分野、遠藤文夫前教授・同 中村公俊准教授に深く感謝いたします。

アミノ酸測定技術および測定データの解析について、多大なるご指導、ご協力をいただきました味の素株式会社、安東 俊彦氏、新保 和高氏、田中 孝幸氏に厚く御礼申し上げます。

大学院入学時より実験計画・実験手技・論文作成につきまして全面的にご指導いただきました熊本大学大学院生命科学研究部小児科学分野 岩井 正憲先生、三淵 浩先生、松本 志郎先生に深く感謝いたします。

大学院生活を共に過ごし、様々な場面でご助力いただきました白木 恭子先生、緒方 陽先生、持田 太賀先生、城戸 淳先生、田村 博先生、中村 賢二先生、木川 和英先生、百崎 謙先生、阿南 浩太郎先生に深く感謝申し上げます。

また研究を進める中でご協力いただきました技術補助員の皆様に深く感謝申し上げます。



## 5. 略語一覽

GCS : Glycine cleavage system

GFAP : glial fibrillary acidic protein

HI : hypoxia-ischemia

HIE : hypoxic-ischemic encephalopathy

Iba1 : ionized calcium binding adaptor molecule 1

NKH : nonketotic hyperglycinemia

NMDA : N-methyl D-aspartate

TNF  $\alpha$  : tumor necrosis factor-alpha

TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling

## 6. 研究の背景および目的

### 6-(1) 新生児低酸素性虚血性脳症のメカニズムとその治療法

分娩時の低酸素暴露による新生児低酸素性虚血性脳症(HIE)は、出生 1,000 人に対して約 20 人が発症し、そのうち重症の HIE になる児は出生 1,000 人に対して 2~4 人とされている。さらに重症 HIE の児の 15~25%は死亡し、生存しても 25~30%は永続的な脳障害をのこす。周産期管理の向上により発症は減少しているとはいえ、HIE は新生児集中治療の対象疾患の中でも最も重篤で予後の悪い疾患の一つである。HIE はヒト成熟新生児の脳傷害の原因となる代表的な疾患であり、新生児死亡や、脳性麻痺・てんかん・精神発達遅滞・学習・認知障害・難聴などの生涯にわたる障害の発生に関与している(Adre J. du Plessis et al. 2002)。HIE による神経細胞障害は、酸素とグルコース供給の途絶により起こる ATP の低下や、虚血後再灌流により発生する興奮性アミノ酸等の神経伝達物質および炎症性サイトカインの放出、free radical 産生などが複雑に関与している (Ferriero DM. et al. 2004)。また神経細胞は時間的経過をもって壊死に陥り、低酸素虚血時には神経細胞、グリア細胞、周囲の血管などが障害され、蘇生後の再灌流以後は神経細胞がより選択的に障害される (Stevenson, DK. et al. 2003)。

HIE の治療法については、主に①中枢神経保護、②中枢神経再生の 2 つの観点から様々な研究が行われてきた(Brandon J. Dixon. et al. 2015)。そのうち薬物投与による中枢神経保護作用を期待するものとして、神経栄養因子(Li SJ. et al. 2014)・メラトニン(Aly H. et al. 2014)・エダラボン(Noor JI. et al. 2005)・アロプリノール(Kaandorp JJ. Et al. 2012)・トピラメイト(Nor MR. et al. 2006)・硫酸マグネシウム(Tagin M. et al. 2013)・エリスロポエチン(Iwai M. et al. 2007)などがあげられる。しかし、薬剤の血液脳関門の通過の問題や、Therapeutic time window の短さなどが問題になり、現在までに、HIE に対する効果的な治

療はほとんど発見されておらず、臨床への応用には至っていない。また、近年中枢神経再生の観点からも注目されているのが自己臍帯血をソースとした幹細胞療法であるが、こちらもまだ臨床応用には至っていない(Cotton CM. et al. 2014)。

現時点で唯一 HIE に対して有効な治療法であると考えられているものとして脳低温療法がある(Gluckman PD. et al. 2005, Shankaran S. et al. 2005)。脳低温療法により期待される効果には、脳内熱貯留の防止、脳内興奮性神経伝達物質放出の抑制、シナプス機能抑制による遅発性神経細胞死の防止、脳内毛細管内圧低下による脳浮腫と頭蓋内圧亢進の防止、脳内酸素消費量の低下による低酸素への抵抗力増大、全身酸素消費量の低下と全身の臓器保護、フリーラジカル活性の抑制などが挙げられる(Stevenson DK. et al. 2003)。このように、新生児の脳保護・脳蘇生を目標とした新生児脳低温療法は、出生前後の一次的脳障害機転（虚血・再灌流による循環障害）が避けられなかった場合に、その後続く二次的脳障害（遅発性神経細胞壊死、アポトーシス）を防止する事を目的としている。しかし、脳低温療法は重症の HIE には効果が少ないこと、受傷後の治療可能な時間も短く、限られた施設でしか行うことができないことなどから、より効果的な治療法の発見が急務である。

## 6-(2) アミノ酸の生理活性

近年、アミノ酸の研究において、細胞の増殖や細胞周期、ホルモン分泌、アポトーシス、細胞傷害の阻害など、体内の細胞のホメオスタシスにかかわるアミノ酸の重要な生理学的作用についての報告がなされてきた(Goldberg A. et al. 1978, Nakajo. et al. 2005, Wheatley DN. et al. 2000, Jefferson LS. et al. 2001)。特にアミノ酸は中枢神経内でも重要な生理学的作用を持っており、神経伝達物質として働いたり、神経伝達物質を調節する因子として働いたり、各種受容体の co-agonist として受容体の活性を調節したりしている。これらのこ

とより、脳とアミノ酸には大きな関係があると言える。更に、L-アルギニン・L-リシン・タウリン・L-セリン・グリシンなどのアミノ酸が、成体動物における脳虚血モデルにおいて脳傷害を軽減したという報告がなされている(Kondoh T. et al. 2010, Wang GH. et al. 2007, Wang GH. et al. 2010, Liu Y. et al. 2007)。

### 6-(3) グリシンとその生理活性

グリシン( $C_2H_5NO_2$ )は生体内に存在するアミノ酸の中で最も単純な構造を持つ中性アミノ酸である。グリシンの脳内での生理活性物質としての最も重要な役割は抑制性神経伝達物質としての役割であるが(Ghavanini AA. et al. 2005)、その他にも、興奮性 NMDA(N-methyl D-aspartate) 受容体の co-agonist として作用することでその過剰な活性化を調節したり(Gundersen R. et al. 2005)、神経幹細胞や神経前駆細胞に対して細胞増殖に作用しているという報告がこれまでになされている(Nguyen L. et al. 2002)。また、肺・肝臓における虚血・再灌流傷害を軽減する(Wheeler MD. et al. 2000, Schemmer P. et al. 1999)、免疫担当細胞の活性を制御して炎症反応を軽減させる(Gundersen RY. et al. 2005)、腫瘍の増大を抑制する(Rose ML. et al. 1999)といった働きも報告されている。これらの報告から、グリシンは神経系をはじめとする様々な臓器の発生分化および細胞の増殖、再生、炎症反応の制御に対するレギュレーターとしての作用を持つ可能性が示唆されている。グリシンは統合失調症の治療薬としてヒトへの投与経験もあり、体内での薬物動態についても研究が進んでいる(Balu DT. et al. 2015, Kawai N. et al. 2012)。更にグリシンは、成体動物の脳虚血モデルにおいて神経保護作用を示したと報告されている(Liu Y. et al. 2007)。

アミノ酸	In vivo	In vitro
BCAA L-Ile L-Val I-Leu	骨格筋でのタンパク質合成 運動時の血糖維持 耐糖能・インスリン感受性の改善	細胞増殖の制御 細胞の成長 細胞内オートファジーの制御
L-Glu L-Asp	興奮性神経伝達物質 腸管上皮のエネルギー源	アポトーシス誘導
L-Arg	ホルモン分泌の促進 免疫機能の賦活 血管拡張・血液降下 アンモニア代謝	細胞周期の調節 NO産生に伴う食細胞機能賦活 T細胞活性低下
L-Ala	急性肝障害の改善 アルコール代謝の改善 血糖維持	培養肝細胞における 細胞障害抑制
Gly	抑制性神経伝達物質 口腔内における抗菌作用 腫瘍増殖抑制 抗炎症作用	アポトーシス抑制 神経幹細胞増殖・分化の調節 mSGP細胞増殖抑制・分化促進

Table. 1 アミノ酸の生理活性

The roles in central nervous system	
◆神経伝達因子	
興奮性	Glu, Asp
抑制性	GABA, Gly
◆神経伝達因子の前駆物質	Arg, Tyr, Trp
◆神経伝達因子の調節	Val, Leu
◆神経機能の調節	Cys, Tau, Ala, Ser, Leu
◆NMDA受容体の活性化の調節	Ser, Gly, Ala
◆神経幹細胞・前駆細胞の増殖調節	Gly

Table. 2 中枢神経系におけるアミノ酸の生理活性

---

## グリシンの細胞保護作用の一例

---

脳	成人における脳虚血後の神経細胞死に対する保護作用
心臓/循環	心筋梗塞のサイズの減少
消化管	小腸における虚血一再還流障害の軽減 胃潰瘍からの保護作用 エタノール誘導性胃粘膜障害の軽減
肝臓	虚血性肝障害に対する肝細胞の保護作用 出血性ショック後の肝障害の抑制 肝移植後の生存率の改善
腎臓	メナジオン誘導性近位尿細管障害に対する保護作用 シクロスポリンAによる腎障害に対する保護作用

---

(Gundersen RY. et al. Acta Anaesthesiol Scand. 2005 Sep;49(8):1108-16. 改)

**Table. 3 グリシンの細胞保護作用**

### 6-(4). 本研究の目的

これまで行われてきた研究から、アミノ酸、特にグリシンは様々な臓器において細胞保護効果を有しており、in vitro、in vivo でその効果が報告されている。そこで我々は、アミノ酸が HIE による脳傷害に対して神経保護作用を示す可能性を考え、数種類のアミノ酸について検証したところ、グリシンが最も有効であると考えられた。これまでの報告では成体の脳虚血モデルにおける各種アミノ酸の効果が示されているが、そのメカニズムは新生児の HIE とは異なっており、それを新生児 HIE の動物モデルで検証する必要がある。これらの背景をもとに、今回私は、グリシンが新生児 HIE に対して神経保護作用を示すという仮説をたて、新生児 HIE モデルラットを用いて、グリシンの神経保護作用と作用メカニズムを検証することを目的として研究を行った。

## 7. 実験方法

### 7-(1) ラット新生児低酸素性虚血性脳症モデルの作成

本実験における実験動物を用いた手技は、熊本大学動物実験委員会倫理委員の承認を得、同会の定める動物実験規則を遵守して行った。

日齢7のWister仔ラット(チャールズリバー社)に対して、以前の報告に準じて (Iwai M. et al. 2007)低酸素虚血負荷処置を行った。低酸素虚血負荷についての詳細は、イソフルラン吸入麻酔下(導入2%、維持1%)に、仔ラットの左総頸動脈を結紮・切離し、母ラットのもとで約1時間回復させた後、気温37°C下で十分に加湿を行い密閉されたコンテナ内で、8%低酸素負荷を120分間行った。低酸素負荷後は、母ラットのもとに戻し、HI後決められたタイムポイントにて評価を行うまでそのまま飼育を続けた。

### 7-(2) 各種アミノ酸溶液の調整・投与とアミノ酸間での脳傷害程度の比較

最初に、成体低酸素虚血動物モデルにおいてその神経保護効果が報告されているグリシン・L-アルギニン・L-リシン・L-セリン・タウリンについて、新生児HIEモデルにおける効果を比較した。日齢7の仔ラットを無作為に以下の群、すなわち処置を行わない群(non HI群)・低酸素虚血負荷+生食投与を行う群(saline群)・低酸素虚血負荷+各種アミノ酸投与を行う群(各アミノ酸群)に分けた。仔ラットへの投与量は以前の報告より、グリシン800mg(10.7mmol)/kg (Liu Y. et al. 2007)、L-アルギニン600mg(3.4mmol)/kg・L-リシン600mg(4.1mmol)/kg (Kondoh T. et al. 2010)、L-セリン200mg(1.9mmol)/kg (Wang GH. et al. 2010)、タウリン200mg(1.6mmol)/kg(Wang GH. et al. 2007)とした。それぞれのアミノ酸は生理食塩液に溶解し、ラットへの投与量が体重10gあたり0.1mlとなるように調整した。また、コントロール群には生食を投与した。各アミノ酸溶液の調整はアミノ酸投与の直前

に行った。アミノ酸の投与は腹腔内投与とし、左頸動脈結紮術後、低酸素負荷をかける直前に1回行った。HI処置後7日目の仔ラットをエーテル深麻酔下に開胸し、左心室より冷生理食塩液を注入・全身へ灌流後脳を摘出した。簡易的な評価法として、5mm厚の冠状断スライスを作成し、画像解析ソフトを用いて線条体レベルおよび海馬レベルの左右半球(右半球：傷害側、左半球：非傷害側)の面積を計測し、非傷害側に対する傷害側の面積の比を求め、右半球の傷害の程度を評価した(傷害がない場合はほぼ1になる、傷害の程度が強いほどその値は小さくなる)。これらの実験によりグリシンが最も良好な神経保護効果を示した。そこでグリシンの至適投与量を調べるため、グリシンを400、800、1600mg/kg、それぞれ投与量は体重10gあたり0.1mlとして同様の実験を行った。簡易的な評価法としてHI後7日目の脳組織を前方(Anterior)・中央(Medial)・後方部(Posterior)に分けて、それぞれ傷害のないと思われる部分の左右の幅を計測し、非傷害側(左半球)の幅に対する傷害側(右半球)の幅の比(Ischemic/non ischemic ratio)を計測し比較した。最も効果が見られた800mg/kgを至適投与量として、以後の実験に適用した。以後の実験では、日齢7の仔ラットを無作為に以下の群、すなわち処置を行わない群(non HI群)・低酸素虚血負荷+生食投与を行う群(saline群)・低酸素虚血負荷+グリシン投与を行う群(glycine群)に分けた。

### 7-(3) 低酸素・虚血負荷後の脳傷害部位の組織学的評価

それぞれの実験で設定したHI後のタイムポイントにおいて、組織評価および免疫組織化学的評価を行った。

詳細な脳傷害程度の評価として、脳冠状断パラフィン切片を作成した。低酸素・虚血負荷3日後および7日後の仔ラットに対して、エーテル深麻酔下に開胸し、左心室より冷生理食塩液で灌流後、リン酸バッファーで調製した4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定を行い、脳を摘出した。その後固定・段階希釈エタノールによる脱水後パラフィ



ンにて包埋し、ミクロトームを用いて6 $\mu$ mの厚さの冠状断切片を作成した。

組織傷害の程度を調べるために、HI7日後の切片で評価した。第3脳室後部レベルの切片をヘマトキシリン・エオジンにて染色した。non HI群、saline群およびglycine群それぞれの切片について、画像解析ソフトを用いて左右半球(右半球：傷害側、左半球；非傷害側)の面積を計測し、以下の式により傷害により欠失した部分(% area loss)を算出した(% area loss=(非傷害半球の断面積-傷害半球の断面積)/(非傷害半球の断面積)×100)(%)。

次に、免疫組織化学法により、傷害脳におけるアストロサイトおよびミクログリアを可視化する目的でHI後3日目のラット脳冠状断切片を用いて抗GFAP(glial fibrillary acidic protein)およびIba1(ionized calcium binding adaptor molecule 1)抗体に対する免疫染色を行った。脳のパラフィン切片(大脳皮質・線条体レベル)に対して、キシレンと段階希釈エタノールにて脱パラフィンと親水化処理を行い、その後、Antigen Unmasking Solution(VECTOR LABORATORIES)を用いて抗原賦活化を行った。メタノールと過酸化水素水による透過処理、5%ウシ血清アルブミンを用いた1時間のブロッキングを行った後で、切片をヒツジ抗GFAP抗体(希釈1:250, Santa Cruz Biotechnology)またはウサギ抗Iba1抗体(希釈1:500, Wako Pure Chemical Industries)とともに4℃で1晩反応させ、そのあとペルオキシダーゼでラベルした適切な二次抗体(1:500)とともに室温で1時間反応させた。その後基質としてDABを用い、VECTASTAIN ABC Kit(VECTOR LABORATORIES)を用いて、その使用説明書に沿ってアビジン・ビオチン反応による染色を行った。その後ヘマトキシリンを用いて核染色を行った。

染色後、HI後3日目の大脳皮質・線条体各レベルの切片において、傷害部位での1視野(0.0625mm<sup>2</sup>)内のGFAPおよびIba1陽性細胞を、それぞれ3か所の傷害周囲領域(虚血部と正常部の境界部分)を無作為に選択して計測した。また、HI後3日目の切片の大脳皮質・線条体各レベルにおいて、活性化ミクログリア(大きな細胞体と短い突起を持つ)(Kreutzberg GW. et al. 1996)をカウントし各群で比較した(Figure.2)。これらの解析は、それぞれの切片

がどの群に属するかを周知していない共同研究者により実施した。

#### 7-(4) TUNEL 法によるアポトーシスの検討

TUNEL(terminal deoxynucleotid transferase dUTP nick end labeling)法にて組織内のアポトーシス細胞の検出を行った。方法は In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein (Roche)の使用説明書に従って行った。HI 後 3 日目の脳の冠状断切片(線条体・海馬レベル)に対して、キシレンと段階希釈エタノールにて脱パラフィンと親水化処理を行い、20 $\mu$ g/ml のプロテイナーゼ K 溶液(Dako)にて 37 $^{\circ}$ C で 20 分間処理した。その後切片を PBS にて洗浄し、TUNEL 反応混合液にて 37 $^{\circ}$ C で 60 分間処理した。DAPI にて核染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて観察した。各切片における 1 視野内の TUNEL 陽性細胞の数をカウントし、各群で比較した。

#### 7-(5) 低酸素・虚血負荷後の脳における TNF $\alpha$ の発現の評価

HI 後 2、6、12、24 時間の仔ラットに対し、断頭後に脳を摘出し、小脳を除いて左右半球に分け、それぞれ液体窒素にて急速凍結させた。このサンプルは解析まで-80 $^{\circ}$ C で保存した。凍結させた傷害側脳半球および非傷害側脳半球から、RNeasy Lipid Tissue Midi Kit(QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA の濃度を吸光度計を用いて測定し、組織サンプルから抽出した RNA の 1 $\mu$ g を、ThermoScript RT-PCT System(invitrogen)を用いて RT(reverse transcribe)反応を行い cDNA を精製した。10ng の total RNA から精製された cDNA を用いて、半定量的リアルタイム PCR 法にて定量を行った。リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(TOYOBO)により処理したサンプルを、Applied Biosystems 7500(Applied Biosystems)を用いて行った。内在性コントロールとして  $\beta$ -actin

を用い、各サンプルでの  $\beta$ -actin 遺伝子の発現量に対する TNF $\alpha$ (tumor necrosis factor-alpha) 遺伝子の発現量を比較した。リアルタイム PCR に用いたプライマーは以下の通りである (Cearley C. et al. 2003, Bittigau P. et al. 2003)。

TNF $\alpha$  forward 5'-TACTGAACTTCGGGGTGATTGGTCC-3'  
reverse 5'-CAGCCTTGTCCTTGAAGAGAACC-3'

$\beta$ -actin forward 5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAAAAGATG-3'  
reverse 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAGTGATG-3'

#### 7-(6) 仔ラット血漿・髄液中のグリシン濃度の測定

仔ラットに対してグリシンを投与した後の血漿・髄液中のグリシン濃度の推移について、高速液体クロマトグラフィ (LC/MS) (Hitachi) を用いて測定した。

日齢7の仔ラットに対して、腹腔内にグリシン 800mg/kg または生理食塩液を投与した。投与直前、投与後 30、60、120 分後にラットから毛細管を用いて血液と髄液を採取し、EDTA-2Na を含む採血管へ移動させた。髄液の採取方法については、麻酔下にラットの背部皮膚を切開して脊椎を露出させ、29G の直針で脊椎間をゆっくり穿刺し、流出してきた髄液を毛細管にて採取した。採取した血液、髄液は 4°C で保存し、1500 回転、10 分間の遠心分離を行い、測定まで -80°C で保存した。

得られた血漿および髄液に対し、高速液体クロマトグラフィを用いてグリシンの血中・髄液中濃度をそれぞれ測定した (Mochida T. et al. 2011, Shimbo K. et al. 2009)。また、低血糖の有無を評価するため、血糖値も同時に測定した。

## 7-(7) 統計学的解析

すべての値は、平均値±平均値の標準誤差で表し、統計解析ソフト(SPSS 17.0 for Windows)を用いて解析した。各グループ間の平均値は一元配置分散分析(one-way ANOVA)法にて行い、事後比較(post hoc)は Games Howell 法を用いて行った。有意水準は5%以下とした。

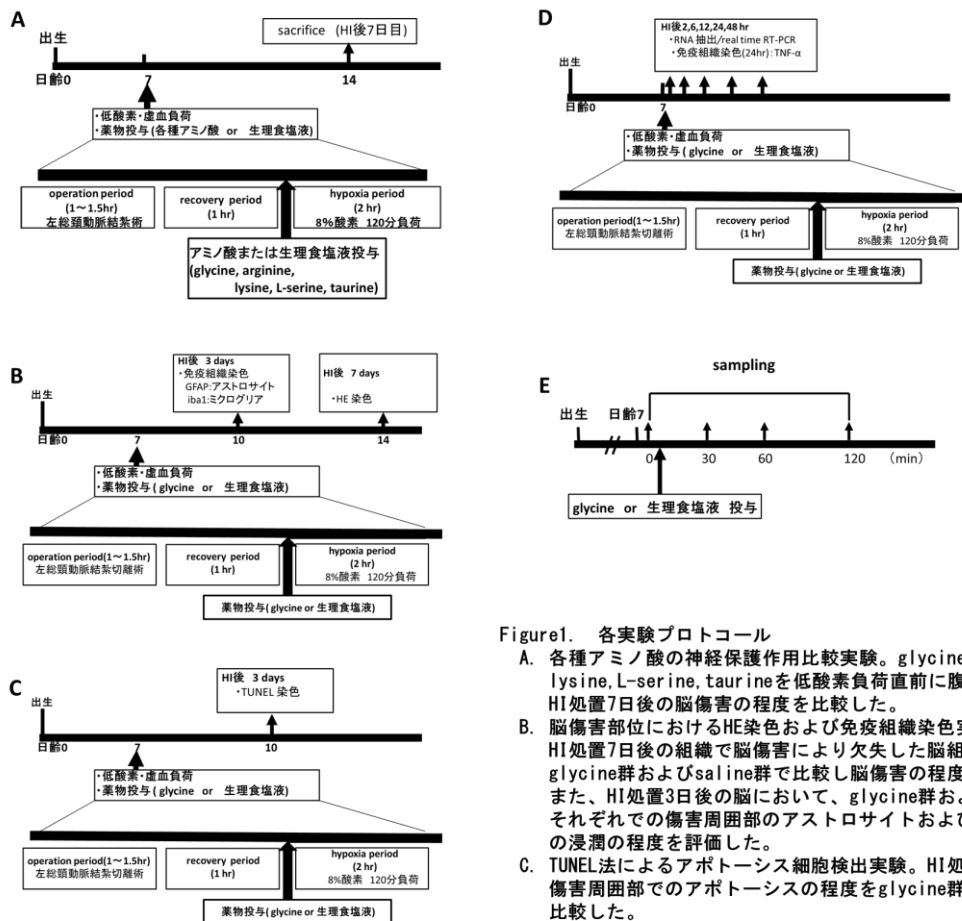
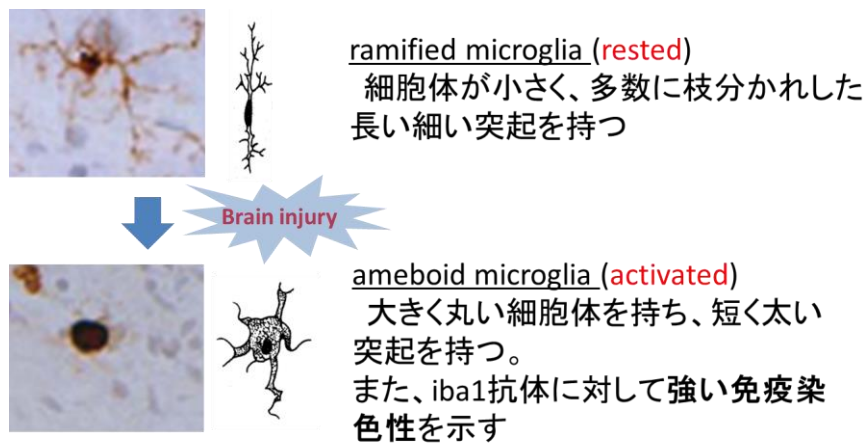


Figure1. 各実験プロトコル

- 各種アミノ酸の神経保護作用比較実験。glycine, arginine, lysine, L-serine, taurineを低酸素負荷直前に腹腔内投与し、HI処置7日後の脳傷害の程度を比較した。
- 脳傷害部位におけるHE染色および免疫組織染色実験。HI処置7日後の組織で脳傷害により欠失した脳組織の面積をglycine群およびsaline群で比較し脳傷害の程度を評価した。また、HI処置3日後の脳において、glycine群およびsaline群それぞれでの傷害周囲部のアストロサイトおよびミクログリアの浸潤の程度を評価した。
- TUNEL法によるアポトーシス細胞検出実験。HI処置3日後の傷害周囲部でのアポトーシスの程度をglycine群、saline群で比較した。
- 半定量的リアルタイムPCRによる脳中TNF $\alpha$  mRNA検出実験。glycine群およびsaline群のHI処置後2、6、12、24、48時間後の脳組織を左右半球に分け、それぞれの脳中TNF $\alpha$ の発現の程度を評価した。
- グリシンの薬物動態評価実験。日齢7の仔ラットに対し、グリシンおよび生食を腹腔内投与し、投与前、投与後30、60、120分での血液および髄液中のグリシン濃度を測定した。



(Kreutzberg GW. et al. Trends Neurosci. 1996; 19: 312-8 改)

## Figure 2 活性化に伴うミクログリアの形状変化

iba1 抗体染色後のミクログリアについて、脳傷害を受けていない状態の脳内では細胞体が小さく多数に枝分かれした細長い突起を持つミクログリア(図上段)が多数存在する。HI 負荷により傷害を受けた脳内では大きく丸い細胞体と短く太い突起を持つ活性型のミクログリアへと変性する。

## 8. 実験結果

### 8-(1) 低酸素・虚血負荷後の脳組織におけるグリシンの脳傷害軽減効果

新生児 HI ラットモデルにおいて、各種アミノ酸の中でグリシン・L-セリン・L-アルギニンが、生食と比較して有意に脳傷害による脳組織の欠失を減少させたが、その中でもグリシンが最も脳傷害を軽減させた (Figure.3)。

また、グリシンの至適投与量を検討したところ、800mg/kg のグリシンを腹腔内投与した群では生食投与群と比較して HI7 日後における脳傷害に伴う脳組織の欠失がもっとも減少していた。1,600mg/kg 投与群は一見有効に見えるが、HI 後に死亡した仔ラットが有意に多く、800mg/kg 群が最も有効であると考えた(Figure.4)。HI 後7日目の線条体レベルの脳切片において、生食投与群における脳傷害半球での脳組織の欠失の割合は  $30.53 \pm 5.02\%$  であったのに対し、グリシン投与群では  $8.35 \pm 3.00\%$  であった。このことから、グリシンを全身投与することで、新生児 HI に伴う脳組織の欠失を約 73% 減少することができた(Figure.5)。

### 8-(2) 低酸素・虚血負荷後の脳組織におけるグリシン投与後のアストロサイト・ミクログリアの変化

HI3 日後での虚血側半球の脳傷害部周囲において炎症の影響を評価する目的で、GFAP 陽性細胞であるアストロサイトの数について評価したところ、non HI 群と比較し、生食群の脳傷害部周囲には有意に多く存在し、一方グリシン群では脳傷害周囲部でのアストロサイトの数は有意に少なかった。このことから、グリシンの投与により、アストロサイトの反応性の増殖、すなわちグリオシスが抑えられたと考えられた(Figure.6)。

また、HI3 日後の同領域における Iba1 陽性ミクログリアについて、生食投与群では細胞

体が大きく短い突起を持つ活性化ミクログリアが増加していたのに対し、グリシン群では、コントロール群と比較して活性化ミクログリア数の有意な増加は認めなかった(Figure.7)。これらの結果より、グリシンはHI後の脳におけるグリオシスやミクログリアの活性化を抑制しており、抗炎症作用を示す可能性が示唆された。

### 8-(3) 低酸素・虚血負荷後の脳組織におけるグリシンのアポトーシス抑制

TUNEL染色によりアポトーシス細胞を評価したところ、生食群の虚血側半球の脳傷害周囲部ではコントロール群と比較してTUNEL陽性細胞が有意に増加していたのに対し、グリシン群では脳傷害周囲部でのTUNEL陽性細胞の有意な増加は認められなかった(Figure.8)。これらの結果より、グリシンはHI後の神経細胞に対して抗アポトーシス効果を示し、それにより神経細胞死を抑制している可能性が示唆された。

### 8-(4) 低酸素・虚血負荷後脳組織におけるグリシンのTNF- $\alpha$ 発現抑制

半定量的RT-PCR法により、HI後の左右脳半球におけるTNF- $\alpha$  mRNAの発現を時間経過とともに調べたところ、非傷害側半球では時間が経過してもTNF- $\alpha$ の発現に変化がないことと比較し、傷害側半球(右)ではTNF- $\alpha$  mRNAの発現がHI後2時間から増加し、さらに時間とともに増加、HI後12~24時間でピークとなりその後減少していた(Figure.9)。グリシン群では、生食群と比較してTNF $\alpha$  mRNAの発現が有意に抑制されており、特にその発現はHI後12、24時間で有意に抑制されていた。(Figure.9)。以上の結果より、グリシンはHI後の脳におけるTNF $\alpha$ の発現を阻害し、そのことにより神経保護作用をきたしている可能性が示唆された。

## 8-(5) グリシンの薬物体内動態

全身投与されたグリシンの薬物動態、およびその後グリシンが脳に到達するのか、またその場合、どの程度のグリシンにどの程度の時間脳が暴露されるのかを調べる目的で、生後 7 日目のラットにおけるグリシンの薬物体内動態を調べた。グリシンの血中濃度はグリシン投与 30 分後に頂値となり、その程度は前値から約 15.5 倍となった。その後急速に低下し、投与後 120 分における血中濃度は頂値の約半分のレベルまで減少した(Figure.10)。一方、髄液中のグリシンの濃度は投与後 30 分後に頂値となり、その程度は前値の約 15 倍であった。その後急速に低下し、投与後 120 分には頂値の 1/5 程度にまで低下した(Figure.10)。また、グリシン投与による血糖値への影響は認めなかった(Figure.11)。



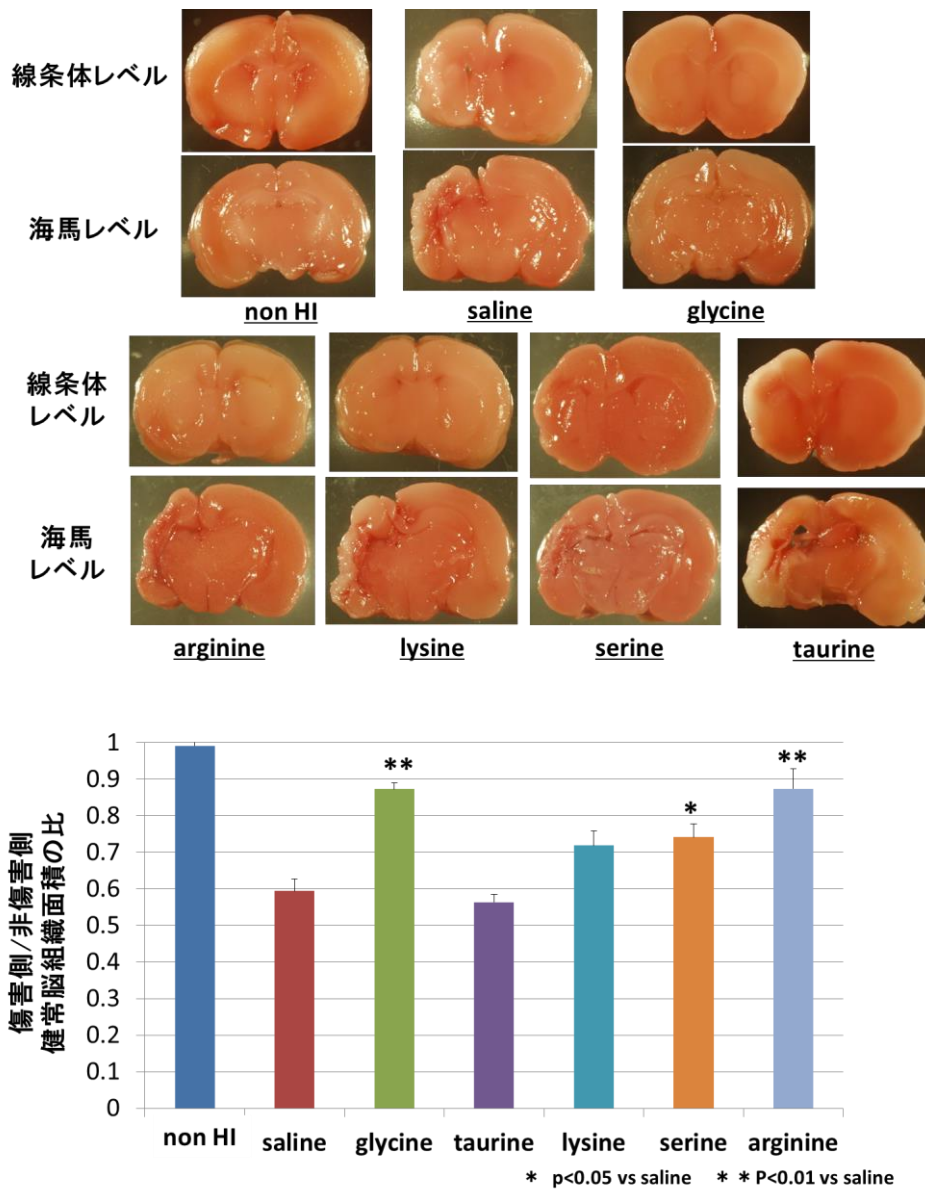


Figure.3 各種アミノ酸の神経保護作用の評価

グリシン, L-セリン, L-アルギニン投与群において、HI 負荷後 7 日目の脳傷害の程度が生食群と比較し有意に減少したがその中でもグリシン投与が最も脳傷害を軽減した。(non HI 群 ; n=5、生食群 ; n=11、各アミノ酸群 ; n=11)

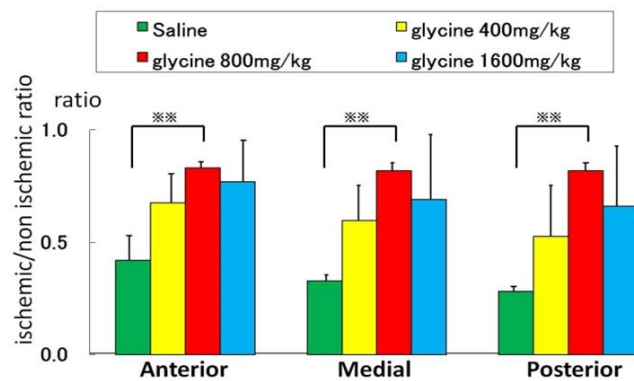
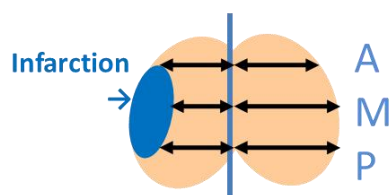
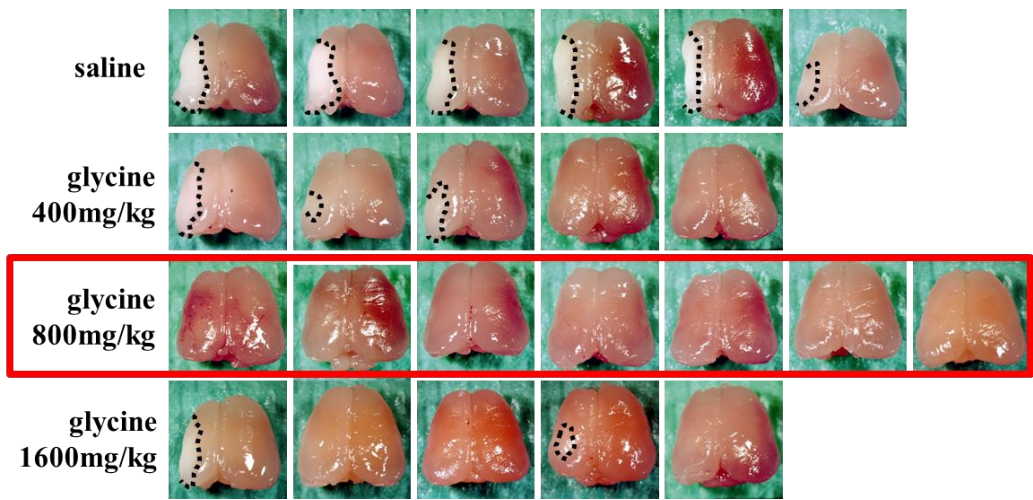
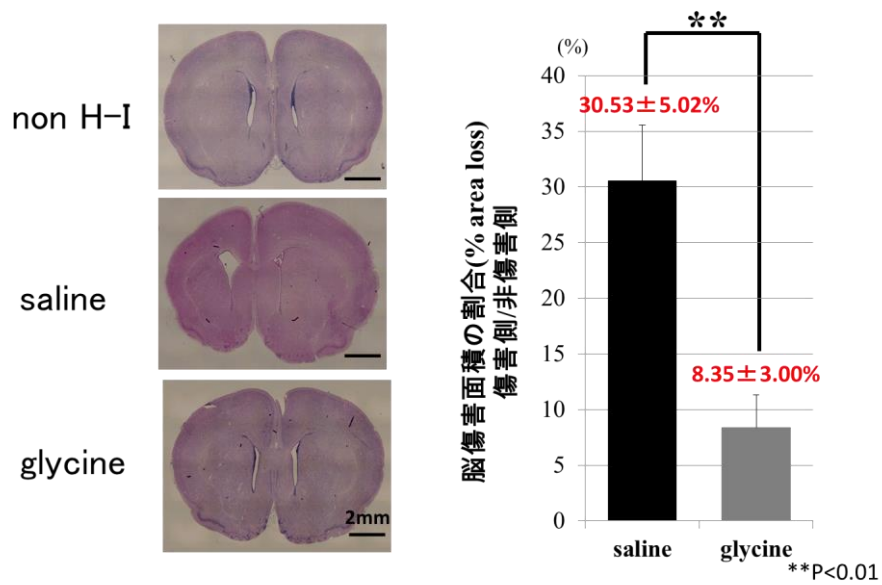


Figure.4 グリシンの至適投与量の検討

点線で囲まれている部分（白色変化を示している）を脳傷害部と考えた。脳組織を前方・中央・後方部に分けて、それぞれ傷害のないと思われる部分の左右の幅を計測し、非傷害側(左半球)の幅に対する傷害側(右半球)の幅の比を計測し比較した。その結果、800mg/kgのグリシンが最も脳傷害軽減作用が強いと考えられた。1600mg/kgは一見有効にも見えるが、投与後の死亡例も多く個体間の効果に大きな差が見られたため、800mg/kgを至適量と考えた。(生食群；n=7, グリシン群；n=7, 生食群 1例死亡、400mg/kg、1600mg/kg グリシン投与群,各 2例死亡)



**Figure.5 HI 後 7 日目の脳傷害面積の評価**

HI7 日後の線条体レベルでの切片を HE 染色し、脳傷害面積の割合(% area loss)を比較した。グリシン投与により、HI 負荷後の脳傷害は約 73%減少した。(生食群 ; n=12、グリシン群 ; n=12)

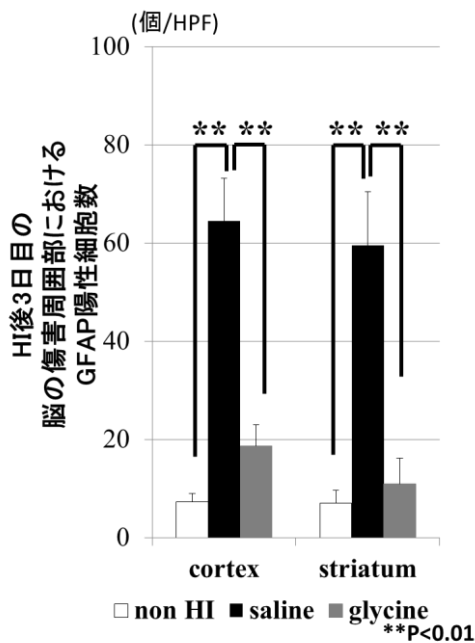
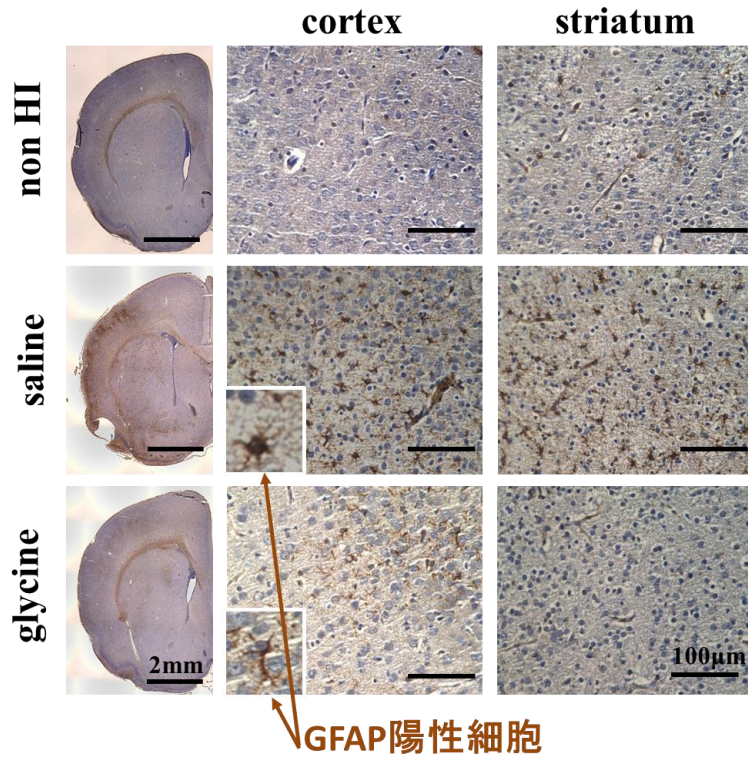
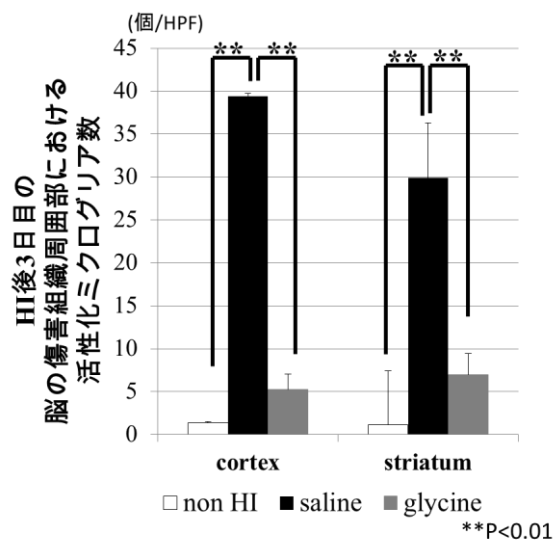
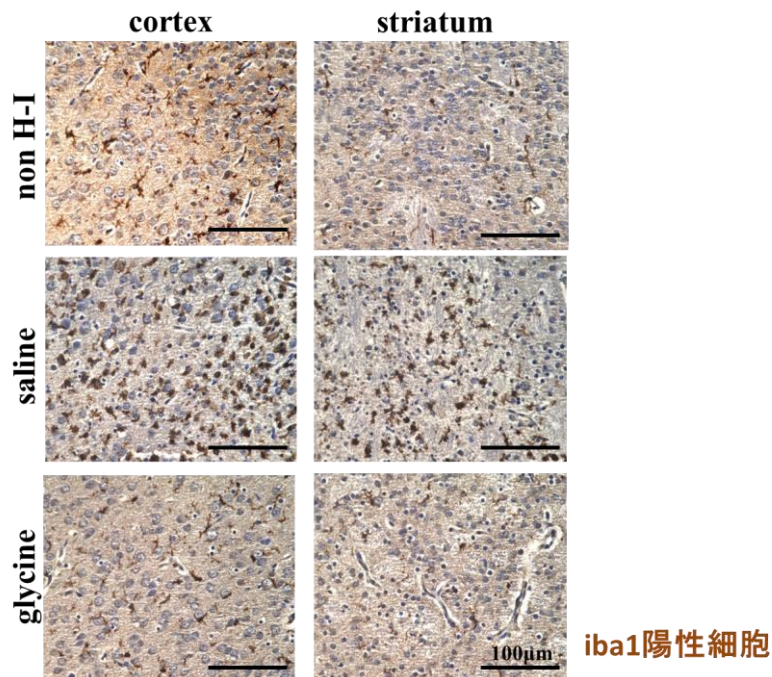


Figure.6 HI 後 3 日目における脳傷害周囲部へのアストロサイトの浸潤

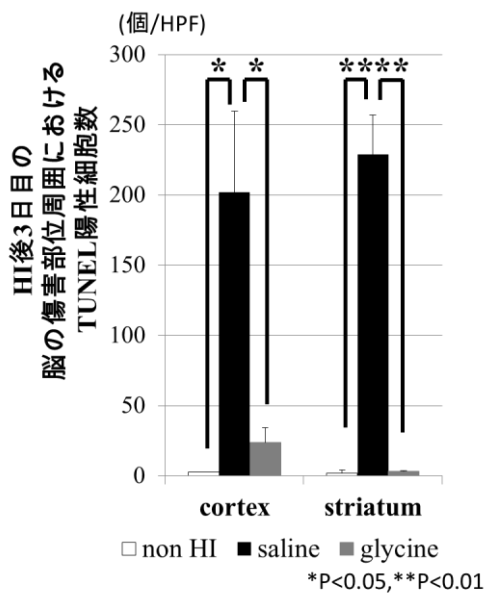
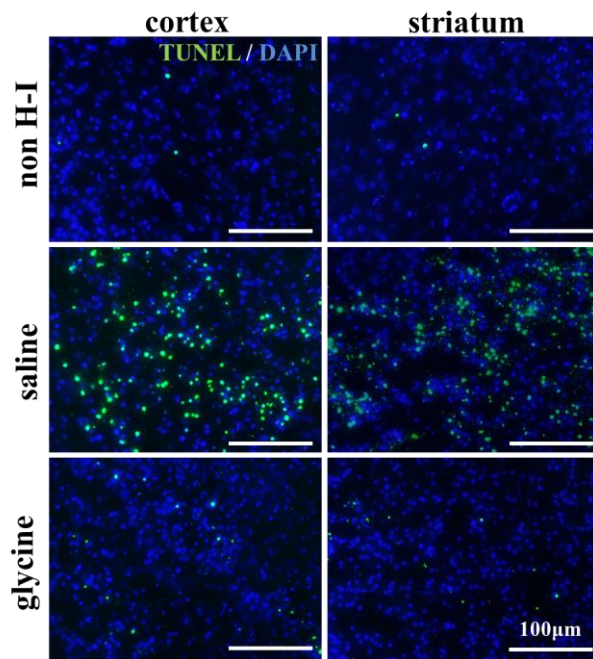
生食群では、マクロの観察でグリア化の程度が強いと考えられた。ミクロの観察でも、生食群において同部位に浸潤するアストロサイトの数は有意に多かった。しかしグリシン群ではグリア化の程度も少なく、アストロサイトの浸潤も少なかった。(non HI 群 ; n=10、生食群 ; n=18、グリシン群 ; n=24)



**Figure.7 HI 後 3 日目における脳傷害周囲部への活性化ミクログリアの浸潤**

生食群では脳傷害周囲部で有意に多数のミクログリアの浸潤が観察されるが、さらによく観察すると、細胞体が大きく突起が短い活性化ミクログリアが多く見られた。iba1 による免疫組織染色でもより強く染色されているのがわかる。グリシン群では同部位にミクログリアはみられたものの活性化型は少なかった。(non HI 群; n=6、生食群; n=18、グリシン群; n=18)





**Figure.8 グリシンの抗アポトーシス効果**

生食群と比較して、グリシン群では脳傷害周囲部における TUNEL 陽性細胞数が有意に少なかった。グリシン投与によりアポトーシスが抑制されていることが示唆された。(non HI 群 ; n=4、生食群 ; n=10、グリシン群 ; n=14)

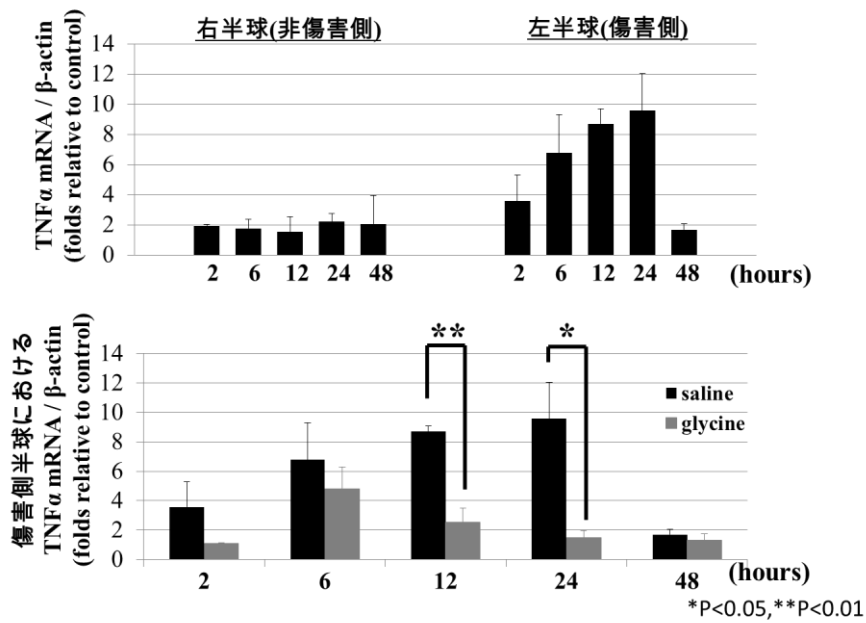


Figure.9 グリシン投与後の TNF- $\alpha$  発現量の変化

左半球(傷害側)では、HI 後時間の経過に伴い TNF- $\alpha$  mRNA の発現が徐々に増加しており、それは HI 後 24 時間まで持続していた(上段)。しかし、グリシン投与により、HI 後 12、24 時間後の傷害側半球における TNF- $\alpha$  mRNA の発現が有意に減少している。グリシン投与により、TNF- $\alpha$  の発現が抑えられたことが示唆された。(各群 ; n=8)

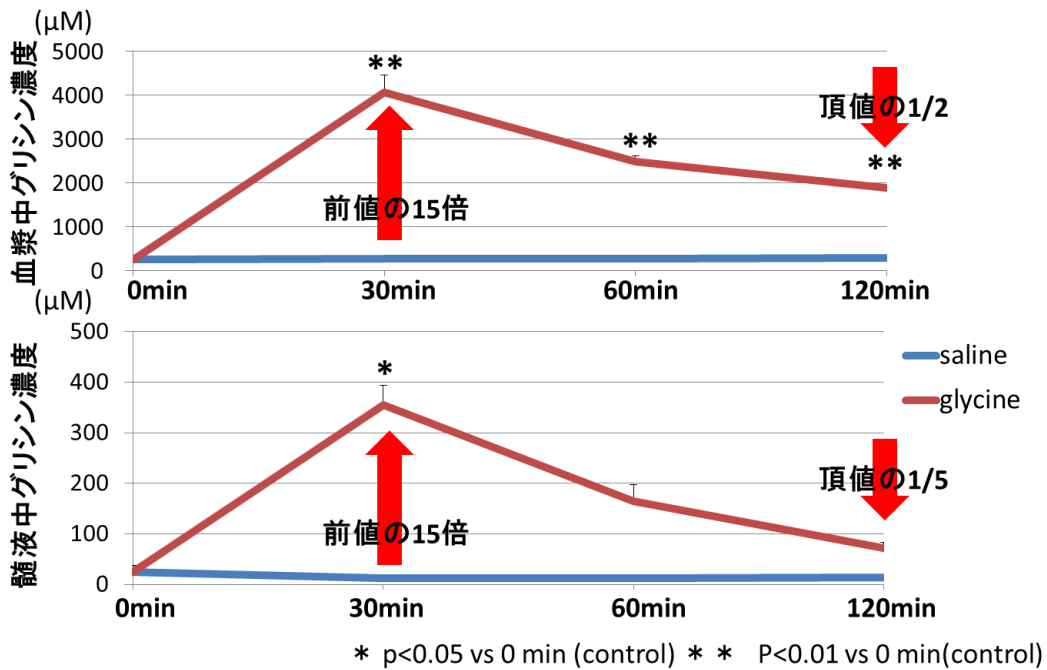


Figure.10 グリシンの薬物体内動態

グリシン投与後 30 分には、血漿中グリシン濃度は前値の約 15 倍まで上昇しているが、その後速やかに低下し、投与後 120 分では頂値の 1/2 まで低下している。髄液中のグリシン濃度も同様であり、投与後 30 分では前値の約 15 倍まで上昇し、投与後 120 分には頂値の 1/5 まで低下している。投与されたグリシンは血漿中および髄液中から速やかに wash out されている。(生食群 ; n=6、グリシン群 ; n=8)

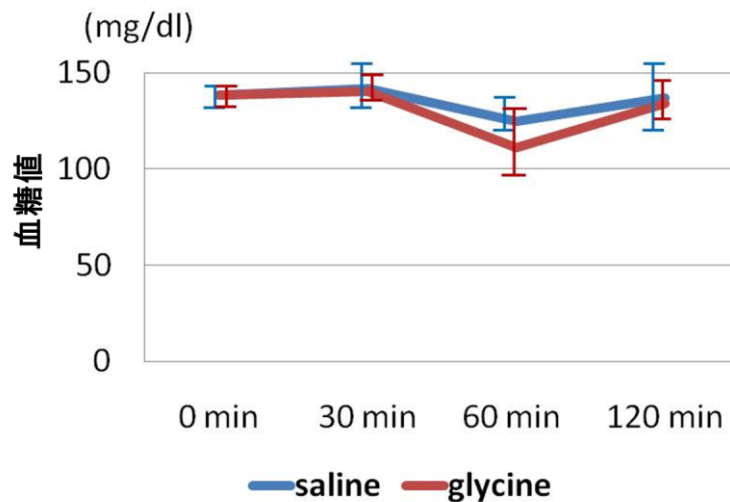


Figure.11 グリシン投与後の血糖値の変化

グリシン投与の血糖値への影響はみられなかった。(生食群 ; n=6。グリシン群 ; n=8)



## 9. 考察

今回の研究は、新生児 HIE モデルにおいて、グリシンが脳傷害の程度を軽減し、神経保護効果を持つことを初めて示した研究である。HI 負荷の直前にグリシンの全身投与を行うことで、HI 後 7 日目の脳傷害の程度を軽減することを示した。また、成体脳虚血モデルで神経保護作用が報告されているほかのアミノ酸についても検討を行ったが、グリシン以外にも L-アルギニン・L-セリンでは生食群と比較して有意に HI 後の脳傷害を軽減した。これは、アミノ酸、特にグリシンがヒトの中枢神経において広く細胞保護的な側面を持つというこれまでの数多くの報告や、成体ラットの虚血モデルによるアミノ酸の神経保護効果を示す研究などと矛盾しない結果である。L-アルギニンは NO 産生による血管拡張作用、L-セリンはグリシン受容体を介した経路でそれぞれ神経保護作用を示すとされているが(Kondoh T. et al. 2010, Wang GH. et al. 2010)、今回は最も効果の見られたグリシンについての詳細について検討した。

### 9-(1) グリシンの抗炎症効果による神経保護

グリシンが新生児 HI 後の脳傷害を軽減させるメカニズムの一つとして、私はまず炎症反応の程度に着目した。脳切片をマクロで観察すると、グリシン投与群では、生食群と比較して脳傷害部位のグリオーシスの程度が軽いという所見が観察された。そこで、グリシンは HI 後の脳における炎症反応に関与しているのではないかと考えた。脳虚血後の脳における炎症はアストロサイト、ミクログリアの反応で反映される。アストロサイト・ミクログリアの炎症に対する反応は脳虚血・再灌流後 48~72 時間の脳においてピークを迎えるとされており(Bebjelloun N. et al. 1999)、今回私は HI 負荷後 3 日目の脳で評価した。

生食群では、脳傷害部の周囲(penumbra 領域)に強い免疫反応性を示す GFAP 陽性細胞が

多数みられており、強い炎症反応がおこっていると考えられた。しかし、グリシン群では non HI 群と同程度の弱い GFAP 免疫染色性を示すアストロサイトが少数認められるのみであった。反応性アストロサイトは強い炎症反応を反映して出現し、その結果周囲の神経細胞死に関与し、その後におこるグリオシスにより傷害部の修復を阻害することが知られている(Chen Y. et al. 2003)。今回の結果は、グリシン治療により脳傷害周囲部での強い炎症反応が抑えられ、その結果炎症に反応して浸潤するアストロサイトの反応が抑えられたことを示唆しており、グリシンが炎症反応を抑制することで神経保護作用を示していることが示唆された。

次に脳傷害部におけるミクログリアの反応を検証するために、ミクログリアの活性化に着目した。総ミクログリア数は生食群、グリシン群間で有意差は認めなかった。しかし生食群では、大きく丸い細胞体を持ち、短く太い突起を持つ活性化ミクログリアが non HI 群に比較して有意に増加していたのに対し、グリシン群では活性化ミクログリアの有意な増加は認めなかった。

ミクログリアは、脳内の炎症・免疫担当細胞としての機能を持つ。さまざまな原因で脳傷害が起きた時、ミクログリアがその傷害を察知して活性化され、傷害された神経細胞の周囲に活性化ミクログリアとして浸潤して異物や死細胞を貪食・除去している(McRae A. et al. 1995)。以前の報告において新生児 HI においても、HI 傷害の 4 時間後にはすでに傷害部位に活性化ミクログリアが集積しており、HI 後 2-4 日目にその集積がピークとなるとされている(Ivacko JA. et al. 1996)。今回の実験では、グリシン投与により HI 後 3 日目の脳でミクログリアの活性化が抑制されており、虚血脳での炎症反応のピークをグリシンが抑制していると考えて矛盾しない。

## 9-(2) グリシンの抗アポトーシス効果による神経保護

また私は新生児 HI 後の脳において、グリシン投与により虚血側脳におけるアポトーシスが抑制されることを示した。新生児 HI 後のアポトーシスは低酸素虚血負荷後 24-72 時間後にピークを迎えることが報告されており(Renolleau S. et al. 1998)、今回の実験でも HI 負荷後 3 日目の脳におけるアポトーシスを評価した。結果から、グリシンは HI 負荷によるアポトーシス反応のピークを抑えたと考えられる。

アポトーシスには様々な経路があり今回の実験ではそれぞれについて詳細には調べていないが、新生児 HI の脳傷害と炎症には強い関連性があり、HI 後の脳における炎症反応を抑制することが新生児 HI の脳傷害を軽減させるのに重要であること、強い炎症反応が起こり脳傷害が強いとそれだけアポトーシスを起こす神経細胞が増加することは、今回の生食群での結果からも明らかである。今回グリシン投与群ではアポトーシス細胞の増加がみられなかったが、少なくとも前述のグリシンによる抗炎症効果はアポトーシスの抑制に一部寄与している可能性があると考えられる。

## 9-(3) グリシンの TNF- $\alpha$ 発現抑制による神経保護

更に私は、RT-PCR 法を用いて、炎症早期に発現するサイトカインである TNF $\alpha$  mRNA の発現が生食群と比較しグリシン群で抑制されていることを示した。

TNF $\alpha$  は脳虚血後早期に発現し、ミクログリア、アストロサイト、ニューロンから産生・分泌される(Arvin B. et al. 1995)。分泌された TNF $\alpha$  は TNF 受容体を介してニューロンに働きアポトーシスを誘導する。また同時に、ミクログリアを刺激して他のサイトカインを分泌させ神経傷害性に働き、その結果脳傷害は拡大していく(Silverstein FS. et al. 1997, Bona E. et al. 1999)。

これまでに脳虚血モデル動物において、TNF $\alpha$ の外因性投与が脳傷害を悪化させたという報告や、抗 TNF $\alpha$  抗体の投与が脳虚血後の脳傷害に対して保護的に働いたという報告がある。また、脳以外の臓器においても、グリシンが TNF $\alpha$  の産生抑制によって LPS 誘導性の心筋障害を抑制したという報告や(Wang HD. et al, 2009)、グリシンが TNF $\alpha$  の産生抑制を介して肝臓のクッパー細胞の活性化を抑制し、肝臓の虚血再灌流傷害を阻害したという報告がある(Schemmer P. et al. 2000)。私は今回の研究で、グリシンの投与により TNF $\alpha$  の発現が抑制され、その結果 HIE による脳傷害が軽減したことを示したが、この結果はこれまでの報告に矛盾しないと考えられる。

活性化ミクログリアは TNF $\alpha$  を産生して神経細胞死を誘導するが、この経路において TNF $\alpha$  による直接的な作用はさほど強くなく、TNF $\alpha$  が強力にミクログリア自身のグルタミン酸産生を誘導し、間接的に強い神経細胞傷害を引き起こしていると考えられている。また、TNF $\alpha$  は自身の TNF 受容体に結合して TNF $\alpha$  産生を更に誘導するという自己分泌の経路(autoocrine loop)が存在し、慢性的に活性化されたミクログリアは長期にグルタミン酸を放出し続けるという機序も報告されている(Frances J. et al. 2011)。

今回の実験ではグルタミン酸の産生については評価しておらず、TNF $\alpha$  の産生抑制がミクログリアの活性化抑制によるものかどうかは不明であるが、グリシンがミクログリアの活性化と TNF $\alpha$  の産生という脳傷害を進展させる大きな二つの因子を抑制するという事は、新生児 HIE 後の脳傷害の進展抑制に大きく寄与していると考えられる。

近年、大脳皮質の神経細胞培養において、グリシンが低酸素誘導性の毒性から神経細胞を保護することや、成体脳虚血モデルラットにおいてグリシン治療が虚血負荷による脳傷害を軽減することが報告されている(Gundersen RY. et al. 2005)。またグリシンは、心臓・消化管・肝臓・腎臓など脳以外の臓器においても細胞保護的な作用を示すという報告もあり、その一部ではグリシン投与により組織傷害時に産生される TNF $\alpha$  の産生を抑制することも示されている(Wheeler MD. et al. 2000, Schemmer P. et al. 1999, Wheeler MD. et al.

1999、Wang HD. et al. 2009)。グリシンには免疫担当細胞の活性を制御して炎症反応を軽減させる抗炎症性の栄養素としての報告もある(Wheeler MD. et al. 1999)。これらのことと今回の結果を合わせると、グリシンのもつ抗炎症作用は、新生児 HIE による脳傷害の進行を抑制するが、それらの作用はアストロサイトおよびミクログリアの活性化抑制・TNF- $\alpha$ の産生抑制によりアポトーシスを含めた細胞死を抑制しているという機序が考えられる(Figure 12)。しかし、グリシン投与により発現が低下する TNF  $\alpha$  はどの細胞由来であるか、という点に関しては、まだ十分な議論ができていないと考える。すなわち、アストロサイトもしくはミクログリアの活性化が抑制される結果、それらから分泌される TNF  $\alpha$  が減少するのか、もしくはそのほかの細胞から分泌される TNF  $\alpha$  の減少によりアストロサイトもしくはミクログリアの活性化が抑制され、抗炎症反応につながるのかは今回十分説明できていない。新生児低酸素性虚血性脳症において TNF  $\alpha$  を分泌する可能性があるのは、アストロサイトとミクログリアの他にも、傷害されたニューロンや、脳以外の組織から遊走・浸潤してきた白血球などである。今回の研究ではグリシンは脳限定でなく全身投与しているので、脳以外の組織または細胞の性質を変性させる可能性は十分にあり、また、これまでの研究でも、白血球の中にもグリシン受容体を持っているものがあり、それらの活性化を抑制することによって、遊走先の脳での炎症を抑制する可能性は十分にあり、TNF  $\alpha$  の由来細胞については、今後さらなる研究を進める余地が残されていると考える。

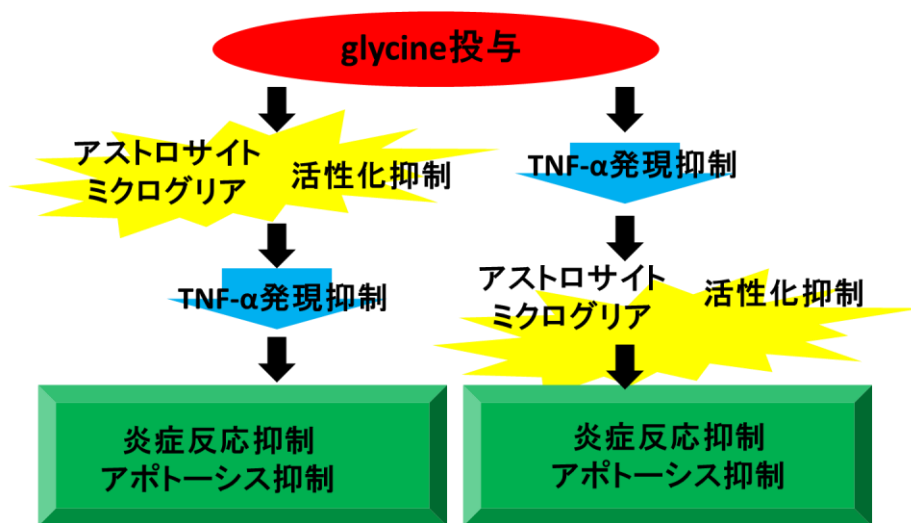


Figure12. グリシンによる脳傷害抑制の推定機序

どの細胞由来の TNF $\alpha$  を抑制するのにより 2 つの経路が考えられる。

#### 9-(4) グリシンの薬物体内動態と毒性

しかし一方で、中枢神経においてグリシンが toxic に働くという報告もある。

非ケトーシス型高グリシン血症(Nonketotic hyperglycinemia; NKH)は先天的にグリシン代謝ができず、血清および中枢神経系へのグリシンの蓄積を特徴とする先天代謝異常症である。NKH では神経症状に加えて脳奇形を伴うため、蓄積したグリシンの中枢神経への毒性をが示唆されている。また、近年 NKH の発症原因の一つとして報告されたグリシン代謝経路の一つであるグリシン開裂系 Glycine Cleavage System(GCS)について、GCS 活性を遺伝的に低下させたマウスに対する中大脳動脈閉塞による虚血負荷の研究では、虚血負荷時の脳の細胞外グリシン濃度が高値を示し、虚血後の脳梗塞巣が拡大し、更に NMDA 受容体のグリシン結合部位を阻害することで脳梗塞巣が縮小したという報告があり(Ichinohe A. et al. 2004, Sakata Y. et al. 2001)、グリシンが脳に対して毒性に働き、脳虚血による脳傷害を悪化させたとも示唆される。

そこで私は、グリシン投与後の血漿中・髄液中のグリシン濃度の時間的推移を調べた。

血漿中・髄液中グリシン濃度は、グリシン投与後速やかに上昇して 30 分後には前値の 15 倍になりともに頂値となった。その後時間経過とともに急速に低下しグリシン投与 120 分後では血漿中濃度は頂値の約 1/2、髄液中濃度は約 1/5 となった。今回私は、腹腔内投与したグリシンが仔ラットの体内でどのように分布・代謝されていくのかを調べたが、同様の報告は今までにない。成体ラットについては、ラットへグリシンを経口投与させた後の血液・髄液・脳実質中のグリシン濃度を測定した報告がある(Kawai N. et al. 2012)。その研究によると、グリシン投与後約 12 時間でいずれのグリシン濃度も前値まで回復することが報告されており、今回の我々の実験と矛盾しないデータであった。今回の実験におけるグリシン投与は低酸素負荷前に 1 回のみであること、血清中・髄液中から早期にグリシンが wash out したことより、NKH のような慢性的なグリシンの蓄積とは違った状態であると考えてよいと思われる。

また、グリシン投与によりインスリンの分泌が変化するという報告があり(Gannon MC. et al. 2002)、更に低血糖は脳へダメージを与えることから、今回グリシン投与後の血糖値の変化も調べた。その結果グリシン投与の血糖値に対する影響は認めず、脳傷害を左右する因子として、低血糖は除外してよいと思われた。

## 10. 結語

今回私は、新生児 HI に対するグリシン治療により、虚血脳における TNF $\alpha$  の発現が抑制され、脳傷害部周囲における炎症反応とアポトーシスが抑制され、脳傷害の程度が軽減されたことを示した。これらの結果から、グリシンは新生児 HI に対して神経保護的に働くことが示唆されるが、そのメカニズムとして、グリシンが HI 後の脳でのアストロサイトやミクログリアの活性化を抑制し、更に TNF $\alpha$  の発現を抑制することで、その後進展していく炎症反応を主体としたアポトーシスや神経細胞死を抑制しているという機序が考えられる。しかし、グリシン投与により発現が低下する TNF $\alpha$  はどの細胞由来であるか、という点に関しては、まだ十分な議論ができていないと考える。また、脳内でのグリシンの作用に大きく関与すると考えられるグリシン受容体を介した作用については検討ができていない状態である。

グリシンは体内にあるアミノ酸であり、入手しやすく低価格であること、また、ヒトに対する投与経験も十分あり、投与経路も様々であることより、臨床応用しやすい治療法であると考えられる。今後、グリシン治療が新生児 HI の新しい治療ストラテジーとして臨床応用されるためには、より実際の臨床に即した状態での検討、例えばグリシン投与を低酸素負荷の最中もしくは後に行うなど Therapeutic time window を意識した検討や、全身投与ではなく脳内への直接投与など投与方法についての検討、グリシンが直接作用すると考えられるグリシン受容体の関与の有無など、更に進んだ研究が必要であると考えられる。



## 11. 参考文献

- Algra SO, Groeneveld KM, Schadenberg AW, et al. (2013) Cerebral ischemia initiates an immediate innate immune response in neonate during cardiac surgery. *Neuroinflammation* ; 10: 24
- Aly H., Elmahdy H., El — Mashad A.R. (2015) Melatonin use for neuroprotection in perinatal asphyxia: A randomized controlled pilot study. *J. Perinatol.* ;35:186- 191.
- Alvarez-Díaz A, Hilario E, de Cerio FG, Valls-i-Soler A, Alvarez-Díaz FJ. (2007) Hypoxic-ischemic injury in the immature brain--key vascular and cellular players. *Neonatology* ; 92: 227- 35.
- Arvin B, Neville LF, Barone FC, Feuerstein GZ. (1995) Brain injury and inflammation. A putative role of TNF alpha. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* ; 765: 62- 71.
- Balu DT, Coyle JT. (2015) The NMDA receptor 'glycine modulatory site' in schizophrenia: D-serine, glycine and beyond. *Curr. Opin. Pharmacol.* ; 20: 109- 15.
- Benjelloun N, Renolleau S, Represa A, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. (1999) Inflammatory responses in the cerebral cortex after ischemia in the P7 neonatal rat. *Stroke* ; 30: 1916- 23.
- Bittigau P, Sifringer M, Genz K, et al. (2003) Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; 99: 15089- 94.
- Bona E, Andersson AL, Blomgren K, et al, (1999) Chemokine and inflammatory cell response to hypoxia-ischemia in immature rats. *Pediatr. Res.* ; 45: 500- 9
- Brandon JD., Cesar R., John HZ. Et al. (2015) Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Int J Mol Sci.* 1 Sep;

16(9): 22368- 22401.

Gearley C, Churchill L, Krueger JM. (2003) Time of day differences in IL1beta and TNFalpha mRNA levels in specific regions of the rat brain. *Neurosci. Lett.* ; 352: 61- 3.

Chen Y, Swanson RA. (2003) Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood. Flow. Metab.* ; 23: 137- 49.

Cotten CM, Murtha AP, Kurtzberg J et al. (2014) Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J Pediatr.* May; 164(5):973-979.e1.

du Plessis AJ, Volpe JJ. (2002) Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Curr. Opin. Neurol.* 15: 151- 7.

Ferriero DM. (2005) Neonatal brain injury. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 1985- 95.

Fudong Liu, Louise D Mccullough. (2013) Inflammatory responses in hypoxic ischemic encephalopathy. *Acta Pharmacol. Sin.* ; 34: 1121-30.

Gannon MC, Nuttall JA, Nuttall FQ. (2002) The metabolic response to ingested glycine. *Am. J. Clin. Nutr.* ; 76: 1302- 7.

Ghavanini AA, Mathers DA, Puil E. (2005) Glycinergic inhibition in thalamus revealed by synaptic receptor blockade. *Neuropharmacology* ; 49: 338- 49.

Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. (2005) Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* ; 365: 663- 70.

Gundersen RY, Vaagenes P, Breivik T, Fonnum F, Opstad PK. (2005) Glycine -an important neurotransmitter and cytoprotective agent. *Acta Anaesthesiol. Scand.* ; 49: 1108- 16.

Hernandes MS, Troncone LR, (2009) Glycine as a neurotransmitter in the forebrain: a short review. *J. Neural Transm.* ; 116: 1551–60.

Ivacko JA, Sun R, Silverstein FS, (1996) Hypoxic–ischemic brain injury induces an acute microglial reaction in perinatal rats. *Pediatr. Res.* ; 39: 39– 47.

Iwai M, Cao G, Chen J, et al. (2007) Erythropoietin promotes neuronal replacement through revascularization and neurogenesis after neonatal hypoxia/ischemia in rats. *Stroke* ; 38: 2795– 803.

Jimmy Van den Eynden, Sheen Saheb Ali, Nikki Horwood, et al. (2009) Glycine and Glycine Receptor Signalling in Non–Neuronal Cells. *Front Mol Neurosci.* ; 2: 9

J M Perlman. (2007) Pathogenesis of hypoxic–ischemic brain injury. *J. Perinatol.* ; 27: S39–46.

Kaandorp JJ, van Bel F, Benders MJ. et al. (2012) Long-term neuroprotective effects of allopurinol after moderate perinatal asphyxia: follow-up of two randomised controlled trials. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* May; 97(3):F162–6.

Kawai N, Bannai M, Seki S et al. (2012) Pharmacokinetics and cerebral distribution of glycine administered to rats. *Amino Acids* ; 42: 2129– 37.

Kondoh T, Kameishi M, Mallick HN, Ono T, Torii K. (2010) Lysine and arginine reduce the effects of cerebral ischemic insults and inhibit glutamate–induced neuronal activity in rats. *Front. Integr. Neurosci.* ; 4: 18.

Kreutzberg GW. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* ; 19: 312– 8.

Li SJ, Liu W, Li YY. et al. (2014) The role of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, and

GDNF in neuronal apoptosis in neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* ;18(6):905-9.

Liu Y, Wong TP, Aarts M, et al. (2007) NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J. Neurosci.* ; 27: 2846- 57.

McRae A, Gilland E, Bona E, Hagberg H. (1995) Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia. *Brain Res. Dev. Brain Res.* ; 84: 245- 52.

Mochida T, Tanaka T, Shiraki Y, et al. (2011) Time-dependent changes in the plasma amino acid concentration in diabetes mellitus. *Mol. Genet. Metab.* ; 103: 406- 9.

Nguyen L, Rigo JM, Rocher V, et al, (2001) Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.* ; 305: 187- 202.

Nguyen L, Malgrange B, Belachew S, et al. (2002) Functional glycine receptors are expressed by postnatal nestin-positive neural stem/progenitor cells. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 15: 1299- 305.

Noh MR, Kim SK, Eun BL. et al. (2006) Neuroprotective effect of topiramate on hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol.* Oct; 201(2):470-8.

Noor JI, Ikeda T, Ikenoue T. et al. (2005) Short-term administration of a new free radical scavenger, edaravone, is more effective than its long-term administration for the treatment of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy.

*Stroke.* Nov; 36(11):2468-74.

Northington FJ, Graham EM, Martin LJ. (2005) Apoptosis in perinatal hypoxic-ischemic brain injury: how important is it and should it be inhibited? *Brain Res. Brain Res. Rev.* ; 50: 244- 57.

Renolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, Charriaut-Marlangue C. (1998) A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the

P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis. *Stroke* ; 29: 1454– 60.

Schemmer P, Bradford BU, Rose ML, et al. (1999) Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation. *Am. J. Physiol.* ; 276: G924–32.

Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, et al. (2005) Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N. Engl. J. Med.* ; 353: 1574– 84.

Shimbo K, Oonuki T, Yahashi A, Hirayama K, Miyano H, (2009) Precolumn derivatization reagents for high-speed analysis of amines and amino acids in biological fluid using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* ; 23: 1483– 92.

Silverstein FS, Barks JD, Hagan P, Liu XH, Ivacko J, Szaflarski J, (1997) Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem. Int.* ; 30: 375– 83.

Stevenson, DK. et al. (2003) Fetal and neonatal brain injury. Mechanisms, management and the risks of practice. 3rd ed. Cambridge University Press, UK, 715– 734.

Tagin M, Shah PS, Lee KS (2013) Review Magnesium for newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy: a systematic review and meta-analysis. *J Perinatol. Sep*; 33(9):663–9.

Wang GH, Jiang ZL, Fan XJ, Zhang L, Li X, Ke KF. (2007) Neuroprotective effect of taurine against focal cerebral ischemia in rats possibly mediated by activation of both GABAA and glycine receptors. *Neuropharmacology* ; 52: 1199– 209.

Wang GH, Jiang ZL, Chen ZQ, Li X, Peng LL. (2010) Neuroprotective effect of L-serine against temporary cerebral ischemia in rats. *J. Neurosci. Res.* ; 88: 2035– 45.

Wang HD, Lü XX, Lu DX, et al. (2009) Glycine inhibits the LPS-induced increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration and TNF alpha production in cardiomyocytes by activating a glycine receptor. *Acta Pharmacol. Sin.* ; 30: 1107– 14.

Wheeler MD, Ikejema K, Enomoto N, et al. (1999) Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cell Mol. Life Sci.* ; 56: 843– 56.

Wheeler MD, Rose ML, Yamashima S, et al. (2000) Dietary glycine blunts lung inflammatory cell influx following acute endotoxin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* ; 279: L390– 8.

Wixey JA, Reinebrant HE, Buller KM. (2011) Inhibition of neuroinflammation prevents injury to the serotonergic network after hypoxia-ischemia in the immature rat brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* ; 70: 23– 35.