

局所脳虚血における一酸化窒素合成系の意義
に関する研究

森川 栄治

①

局所脳虚血における一酸化窒素合成系の意義に関する研究

森川 栄治

内容

I. 研究の目的と背景

- I-1. はじめに
- I-2. 全脳虚血と局所脳虚血
- I-3. 虚血性神経細胞死
- I-4. 一酸化窒素合成系
- I-5. 一酸化窒素の神経毒性
- I-6. 一酸化窒素による脳血流調節

II. 方法：ラットの局所脳虚血モデル

- II-1. 実験のセットアップ
- II-2. 中大脳動脈閉塞
- II-3. 梗塞体積の評価
- II-4. 統計

III. 一酸化窒素合成阻害剤の局所脳虚血への影響

- III-1. 一酸化窒素合成阻害剤
- III-2. 方法：一酸化窒素合成酵素活性の測定
- III-3. 方法：実験プロトコール
- III-4. 結果
- III-5. 考察：局所脳虚血と一酸化窒素合成阻害剤

IV. L-arginine の局所脳虚血への影響

- IV-1. L-arginine
- IV-2. 方法：実験プロトコール
- IV-3. 結果
- IV-4. 考察：局所脳虚血と L-arginine

V. 虚血の penumbra における局所脳血流

- V-1. 方法：Laser-Doppler 法による血流測定
- V-2. 方法：実験のセットアップとプロトコール
- V-3. 結果
- V-4. 考察：penumbra における脳血流と L-arginine

VI. 全体の考察

VII. 結論

VIII. 文献

I. 研究の目的と背景

I-1. はじめに

脳は虚血に対して最も脆弱な臓器であるが、その脆弱性の根底にあるのは分裂能力のない神経細胞が虚血によって細胞死におちいるという事実である。一酸化窒素 (nitric oxide, NO) は、その神経細胞死に関与する可能性を指摘されている小分子で、さらに強力な血管拡張作用によって脳循環の調節すなわち種々の条件下における脳血流の増大に関与している。したがって、一酸化窒素は虚血性神経細胞死を引き起こす可能性があるとともに、脳虚血において血流増大を介して神経保護的に働くことが考えられる。本研究は、in vivo の脳虚血における一酸化窒素の意義をあきらかにするために、実験的脳虚血モデルを用いて一酸化窒素合成阻害剤および一酸化窒素合成の基質である L-arginine の投与をおこない、虚血性脳損傷に対する影響を検討した。まずこの章では、背景となる脳虚血および一酸化窒素合成系に関する概説をおこなう。

I-2. 全脳虚血と局所脳虚血

脳虚血は、全身血圧の低下や脳を栄養する血管の閉塞・狭窄などにより、脳組織への血流が減少することによって生じる。脳虚血における神経細胞の運命は、その脳組織の血流減少の程度とその持続時間とによって決定される (Jones et al, 1981)。実験的に脳虚血を作成する場合には、このふたつの因子の設定の仕方によって、全脳虚血 (global cerebral ischemia) または局所脳虚血 (focal cerebral ischemia) という2種類の性格の異なる実験系が可能である。

全脳虚血は、脳組織に一樣にパルス状の最大限の血流低下 (すなわちゼロ近くへの血流の低下) を負荷する実験系で、虚血の持続時間が長すぎれば動物は死に、短かすぎれば組織障害は起きないので、組織障害の発生する虚血時間の閾値をすこし越えるように (系によって、すなわち残存血流量によって異なるが、4分から15分) 持続時間が設定される。この実験系に含まれるものとして、心臓を停

止させた後に再蘇生をおこなう心停止モデル (De Garavilla et al, 1984; Kawai et al, 1992) や両側頸動脈閉塞を中心としたいわゆる前脳虚血 (forebrain ischemia) モデル (Pulsinelli et al, 1979; Kirino, 1982) などがある。これらの実験モデルを使った形態学的研究から神経細胞の部位による選択的脆弱性 (selective vulnerability, Brierley et al, 1973) や海馬 CA1 錐体細胞の遅発性細胞死 (delayed neuronal death, Kirino, 1982) という現象が発見された。

一方、局所脳虚血は、脳内に高度の虚血から正常血流までの血流勾配をつくりだし、ある時間以降に高度の虚血部分を中心に神経細胞だけではなく組織全体の壊死 (脳梗塞) を形成させるもので、脳を灌流する主幹動脈 (おもに中大脳動脈) を選択的に閉塞させることにより作成することができる。この実験系を使った電気生理学的研究によって、神経細胞の電氣的活動の停止する血流閾値や、細胞内外のイオン平衡が破綻する血流閾値が測定され両閾値が解離していることが発見された (Branston et al, 1977)。血管閉塞後にこれらの両閾値の中間の血流値を持つ脳組織は、電氣的活動は認められないが不可逆的な障害は受けてなくて生存を続けることが可能と考えられ、ischemic penumbra と名づけられた (Astrup et al, 1981)。この単語は、その後電気生理学的な研究分野に限らずに使われるようになり、その概念も拡大された。現在では局所脳虚血における虚血の中心部 (ischemic core) に対する概念として、治療によって救うことが可能な、虚血の辺縁領域が ischemic penumbra と呼ばれる (Siesjö, 1992)。

全脳虚血の特徴は短時間の虚血時間であり、血流の低下は高度で、脳全体もしくは前脳全体に及ぶ。一方、局所脳虚血の特徴は、虚血の中心部の周辺に penumbra のように血流の低下が中等度の部分が存在することであり、臨床でみられる人間の脳梗塞の実験モデルと位置付けることができる。局所脳虚血を作成するには頭蓋内の血管の選択的な閉塞が必要なため、当初ネコやサルなどの大動物でおこなわれていたが、ラットにおける実験系が確立してからは (Tamura et al, 1981) 大動物は使われなくなった。この研究では脳虚血の実験モデルとしてラットの局所脳虚血の実験系を利用した。

1-3. 虚血性神経細胞死

脳を構成する細胞のなかで最も虚血に対して脆弱なのは神経細胞であり、虚血後に組織全体が壊死におちいる局所脳虚血においても、神経細胞の生死が組織全体の運命を左右する一次的な要因と考えることができる。神経細胞が虚血によって細胞死に至る機序に関しては、グルタミン酸・カルシウム説という仮説が現在多くの研究者の支持をうけている (Choi, 1988; Siesjö, 1992; 桐野, 1993; 図1)。そして、一酸化窒素が神経細胞死の発現に関与しているという議論も、このグルタミン酸・カルシウム説の上に成り立っているので、ここでこの仮説について概説する。

この仮説は、脳内に高濃度に存在する (McGeer and McGeer, 1989) グルタミン酸の神経毒性によって虚血による神経細胞死を説明するもので、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸は、一方で神経細胞に対する毒性を持つことが知られている (Olney, 1978)。脳に虚血が負荷されると動脈血からの酸素の供給が停止し、神経細胞は無酸素性脱分極 (anoxic depolarization) をひきおこす。神経細胞の脱分極は神経伝達物質の細胞外腔への放出をきたし、脳における主要な興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の細胞外濃度は上昇する。正常の神経伝達物質の放出と異なり ATP に依存性の細胞内へのグルタミン酸の取り込みは抑制されるので、細胞外グルタミン酸濃度は異常に上昇する。実際に、脳虚血において細胞外グルタミン酸濃度が虚血とともに上昇することが、微小透析法を用いた経時的な測定によって確認されている (Benveniste et al, 1991)。

この高濃度のグルタミン酸が神経細胞死をひきおこす機序は、グルタミン酸受容体を介して細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇もしくは Ca^{2+} 濃度の調節機構の障害がおこるためと考えられている。グルタミン酸の受容体には、その作動薬によって分類された NMDA 型もしくは non-NMDA 型 (AMPA/kainate 型) というイオンチャンネルを有するもの (ionotropic) と、G 蛋白と共役した metabotropic 型とが

ある。

NMDA 型受容体は Ca^{2+} チャンネルをもつので、伝達物質や作動薬の結合とともに直接 Ca^{2+} を細胞内に流入させる。この受容体の拮抗薬である MK-801 は、局所脳虚血に対しては脳梗塞体積を縮小させる効果を有していた (Park et al, 1988) が、全脳虚血に対しては温度の効果を除けば神経細胞の保護効果はほとんど認められなかった (Buchan et al, 1990)。したがって、NMDA 型受容体の活性化による Ca^{2+} の流入は penumbra のような比較的程度の軽い虚血における神経細胞死には関与しているが、全脳虚血のような高度の虚血では関与していない可能性がある。

もうひとつの ionotropic 型グルタミン酸受容体である AMPA 型受容体は、受容体自体は Ca^{2+} の透過性をもたないが、 Na^+ の流入と膜の脱分極を起こすことによって間接的に電位依存型 Ca^{2+} チャンネルや $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiporter の逆流による Ca^{2+} 濃度の上昇をひき起こすと考えられている。この受容体の拮抗薬である NBQX は、全脳虚血においても保護効果を示すことが報告されている (Sheardown et al, 1990)。metabotropic 型受容体に関しては、作動薬の結合によって細胞内に貯蔵された Ca^{2+} を動員しやはり Ca^{2+} 濃度の上昇をきたすといわれるが、脳虚血における意義ははっきりしていない。

細胞膜を通過する Ca^{2+} キレート剤である BAPTA-AM は、細胞内 Ca^{2+} 濃度を低下させ局所脳虚血後の脳梗塞の大きさを縮小させた (Tymianski et al, 1993)。このことは、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が神経細胞死の単なる随伴現象 (epiphenomenon) ではなく細胞死をひき起こす直接的な原因であるというこの仮説を支持している。細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇は、 Ca^{2+} によって制御されている酵素の活性化をきたす。たとえば、蛋白や脂質の分解酵素の活性化は直接的に細胞の構造破壊をもたらす。xanthine oxidase や cyclooxygenase などの free radical 分子を発生する酵素の活性化はラジカル反応による細胞の破壊をひき起こす。虚血性神経細胞死にラジカル反応が関与していることを示唆する実験結果は多く、free radical scavenger 作用を有する aminosteroid は虚血に対し脳保護作用を有し (Hall et

al, 1988)、内因性の radical scavenger である superoxide dismutase を過剰発現する transgenic mouse では虚血性神経細胞死が防止できると報告されている (Kinouchi et al, 1991)。一酸化窒素は free radical 分子であり、この分子が神経細胞死の発現に関与しているという議論は、グルタミン酸・カルシウム仮説のこの段階で登場してくるのである。

I-4. 一酸化窒素合成系

一酸化窒素は大気汚染の原因でもあり高濃度で毒性を有する窒素酸化物の一種で、生体内では一酸化窒素合成酵素 (NO synthase) によってアミノ酸である L-arginine から合成される (図2)。一酸化窒素は、小分子量の気体なので酸素や二酸化炭素のように生体内で細胞膜を自由に通過して拡散し、酸素の存在下で硝酸イオン (NO_3^-)、亜硝酸イオン (NO_2^-) へと代謝され半減期はわずか数秒といわれている (Nathan, 1992)。また、一酸化窒素は、最外軌道に不対電子を持つ free radical であり、他の free radical 分子や金属イオンと非常によく反応する。例えば、一酸化窒素は合成されたのち細胞間を拡散し、標的細胞内の可溶性 guanylate cyclase のヘム基の鉄と結合してこの酵素を活性化し、cyclic GMP の合成を促す。また、一酸化窒素は、superoxide anion (O_2^-) と反応し、peroxynitrite anion (ONOO^-) や hydroxyl radical (OH) という毒性の強いフリーラジカルを産生する (Beckman et al, 1990)。

一酸化窒素を合成する一酸化窒素合成酵素は代表的には1型から3型の3種類が知られている (Forstermann et al, 1991)。1型は細胞質に存在する構成型 (constitutive type) の酵素で NADPH、tetrahydrobiopterin を補酵素として必要とし Ca^{2+} /calmodulin によって活性が調節されている。脳に分布するので神経細胞型 (neuronal type) とも呼ばれ、細胞間の情報伝達、特に海馬における long-term potentiation (Schuman et al, 1991) や小脳における long-term depression (Shibuki et al, 1991) などのシナプスの可塑性に関与するといわれる。末梢神経系での存在も確認されており、腸管の筋層間神経叢の non-adrenergic non-cholinergic 神経や

(Bult et al, 1990)、頭蓋内の血管周囲の副交感神経系の血管拡張性神経繊維などに存在が認められている (Nozaki et al, 1993)。

2型は、エンドトキシンやある種のサイトカインの刺激によってマクロファージ、肝細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、星状細胞 (astrocyte)、マイクログリア (microglia) などに誘導される (inducible type) 酵素である。この酵素は Ca^{2+} による制御を受けておらず、他のふたつの構成型酵素に比べて大量の一酸化窒素を長期間合成し続ける。こうして合成された一酸化窒素がマクロファージの殺菌作用などを担っているという (Marletta et al, 1988)。

3型は、1型と同じく Ca^{2+} /calmodulin 依存性の構成型の酵素で、血管内皮細胞に存在するので内皮細胞型 (endothelial type) と呼ばれる。ミリスチン酸によって膜成分に結合して存在し、合成された一酸化窒素は血管平滑筋細胞の可溶性 guanylate cyclase を活性化し cGMP の増加を促すことによって血管を拡張させる。1980年に、Furchgott らによってアセチルコリン (Ach) によって分泌される内皮由来の血管拡張因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) として報告された物質 (Furchgott et al, 1980) の本態がこの酵素によって合成される一酸化窒素である。

1-5. 一酸化窒素の神経毒性

このように一酸化窒素は、生体内で神経系、免疫系、循環器系において重要な生理的活性を有することが知られている。しかしながらさらにその上に、培養神経細胞におけるグルタミン酸の神経毒性が、一酸化窒素によって発現している可能性が報告された (Dawson et al, 1991)。これは、1) 神経細胞の培養液に一酸化窒素合成酵素の阻害剤を加えると NMDA の神経毒性が低下し、L-arginine を加えることによって毒性が回復すること、2) 神経細胞の培養液から一酸化窒素の基質である L-arginine を除くと NMDA の神経毒性が消失すること、3) 一酸化窒素を放出する sodium nitroprusside が用量依存性に神経細胞死をおこすこと、4) 一酸化窒素と結合してその濃度を低下させる hemoglobin が、NMDA の神経毒性

と sodium nitroprusside の神経毒性をともに消失させること、などによって示された。

前述のグルタミン酸・カルシウム説に基づいて虚血性の神経細胞死がグルタミン酸の神経毒性によって発現していると考え、一酸化窒素が虚血性神経細胞死の最終的な原因物質である可能性が考えられる。神経細胞型の一酸化窒素合成酵素は Ca^{2+} で調節を受けているので、虚血による細胞内の Ca^{2+} 濃度の上昇にもなって活性化される可能性がある。一酸化窒素合成酵素の免疫染色性を有する神経細胞は小脳、嗅脳に多く大脳皮質や海馬では神経細胞の2%に存在するにすぎない (Bredt et al, 1990) が、この細胞は広範な分枝を出して周囲の神経細胞と接触を持っており脳全体に影響を及ぼすことが可能だという (Dawson et al, 1992)。またこれらの細胞群は、NADPH diaphorase 染色に陽性の細胞群と全く同一のもので (Dawson et al, 1991)、虚血や興奮性アミノ酸の神経毒性に対して耐性を持っていることが知られていた細胞群であった (Uemura et al, 1990)。したがってこれらの細胞はそれ自体は何らかの理由で虚血に抵抗性があり、周囲の神経細胞の細胞死を引き起こしているのではないかという仮説が立てられた (Dawson et al, 1992)。

脳虚血において一酸化窒素が神経に対して毒性を発揮しているという仮説を支持するデータとして、Malinski らは一酸化窒素に感受性を持つ電極で脳内の濃度を直接測定し局所脳虚血後30分以内に最大数 μM まで上昇しその後1時間程度の半減期で低下し、血管の再開通によって再び上昇することを報告している (Malinski et al, 1993)。また、一酸化窒素の代謝産物である亜硝酸イオン (NO_2^-) が虚血後数分で脳内で上昇し、cGMP の脳内濃度が虚血後10分から60分のあいだ徐々に増加することが報告されている (Kader et al, 1993)。

神経細胞内に存在する構成型 (constitutive) 酵素に由来する一酸化窒素以外にも、虚血後比較的早期に虚血組織に浸潤する白血球に存在する一酸化窒素合成酵素や、虚血後マイクログリアや星状細胞に誘導される誘導型 (inducible) 酵素によって合成される一酸化窒素も亜急性期に神経細胞に障害を及ぼす可能性がある。

1-6. 一酸化窒素による脳血流調節

一酸化窒素は血管拡張物質であり、in vivo で血管内皮より合成されて末梢血管および脳血管の緊張 (vascular tone) に常時影響を与えている。このことは、一酸化窒素合成酵素阻害剤の全身投与によって末梢血管抵抗が増加して血圧が上昇すること (Gardiner et al, 1989)、脳血管抵抗が増加し脳血流は減少すること (Tanaka et al, 1991; Prado et al, 1992) から知ることができる。

また一酸化窒素は、in vivo でいくつかの脳血管の拡張反応とそれによる血流の増加に関与していると考えられている。たとえば、神経細胞が賦活されて代謝の増加がおこったときに出現する脳血流の増加反応 (flow/metabolism coupling) は、一酸化窒素合成酵素阻害剤の微小透析法による組織内への注入で完全に抑制され、L-arginine を同時に注入することによって回復した (Northington et al, 1992)。このことから、神経細胞の賦活が同時に一酸化窒素合成酵素を有する神経細胞の一酸化窒素の合成を促して、その部分の脳組織への血流を増加させていると考えられる。

高炭酸ガス血症 (hypercapnia) にともなう脳血流の増加反応においても、 PaCO_2 が 50 ないし 60 mmHg 程度に増加する場合の脳血流の反応は一酸化窒素合成酵素阻害剤によって完全に抑制された (Iadecola, 1992)。しかしながらさらに高度の炭酸ガス分圧に対する反応は、一酸化窒素合成を阻害しても完全には抑制されないことがわかっている (Iadecola and Zhang, 1994)。このように機序は不明ではあるが、高炭酸ガス血症に対する脳血流の反応にも部分的に一酸化窒素が関与をしていると考えられる。

一方、低酸素 ($\text{PaO}_2=33$ mmHg) による脳血流の増加反応は一酸化窒素合成阻害剤の投与後も認められており (Kozniwska et al, 1992)、この反応には一酸化窒素は関与していないらしい。また、血圧の変化に対して脳血流を一定に保持する血流自律調節能 (autoregulation) に関しては、一酸化窒素合成酵素阻害剤の投与によって自律調節能のはたらく血圧の下限に変化はなく一酸化窒素の関与はない

とする報告と (Wang et al, 1992)、自律調節能の範囲内で血管抵抗の調節に変化を認めるので部分的に関与をしているとする報告 (Tanaka et al, 1993) がある。

局所脳虚血の penumbra 領域における脳血流は脳表の吻合血管 (leptomeningeal anastomosis) を介した側副血行 (collateral circulation) によって維持される。この血流の維持に一酸化窒素がどの程度の影響をもっているのかはまだ不明であるが、生理的な flow/metabolism coupling において代謝の昂進した脳組織に血流の再分配がおこるように脳虚血の直後に増加する一酸化窒素が penumbra 領域の側副血行を増加させている可能性が考えられる。また、内皮由来の一酸化窒素は血小板の凝集や白血球の内皮への接着を抑制するので (Radomski et al, 1987; Kubes et al, 1991)、penumbra 領域への血流の維持に役立っていると考えられる。

局所脳虚血の penumbra 領域では spreading depression 様の DC potential の変化が観察され、これが虚血性の神経細胞障害の発現に関与しているとの説が唱えられている (Iijima et al, 1992)。一酸化窒素は spreading depression にともなう脳血流の増加反応を担っている (Goadsby et al, 1992) ので、penumbra 領域での DC potential の変化に伴った血流の増加にも関与していることが考えられる。

また、頭蓋内血管周囲を走行する翼突口蓋神経節由来の血管拡張性神経線維のなかに一酸化窒素を伝達物質とするものがあり (Nozaki et al, 1993; Toda et al, 1993)、これらの神経線維が局所脳虚血後の梗塞体積に影響を与えることも知られている (Kano et al, 1991)。

以上のように一酸化窒素は神経細胞死をひきおこす可能性があるばかりでなく、脳血流の増加を介して脳保護的に働くことも考えられる。このような背景を踏まえて、in vivo の局所脳虚血において一酸化窒素が最終的にどのような影響を脳に対して与えているのかを検討するために以下の実験をおこなった。

II. 方法：ラットの局所脳虚血モデル

II-1. 実験のセットアップ

この章では、この研究の中核をなすラットの局所脳虚血実験のセットアップと、結果として得られる脳損傷の評価の方法について記す。各実験で特別な言及がない場合は、下記のようなセットアップで実験をおこなった(図3)。

実験に使われたラットは専用の飼育室に搬入されたものを実験の当日実験室に運び、実験の直前まで自由に水分と餌を与えた。まず、3%のハロセンを吸入させて麻酔の導入をおこない、前頭部の皮膚に小切開をおいて気管を直視下に見ながらPE-240ポリエチレンチューブを使って気管内挿管をおこなった。このチューブを小型動物用人工呼吸器(Harvard Apparatus)に接続し、70%笑気、30%酸素および1%ハロセンを使って実験中の麻酔の維持をおこなった。

続いて、ラットの右大腿動脈にカテーテル(PE-50ポリエチレンチューブ)を挿入して持続的に動脈圧をモニターし(Gould)、さらにこのカテーテルから一回当たり動脈血0.2mlを採取しpH、血液ガス、ヘマトクリット、血糖値を測定した。実験中、呼吸器の条件を調節することによって動脈血の正常炭酸ガス分圧を維持した。プロトコールによって、静脈内注射が必要であれば右の大腿静脈にも同じカテーテルを挿入した。

実験中は、体温コントロールユニットに接続した温度プローブを直腸内に挿入して動物の直腸温をモニターし、コントロールユニットに連動した保温用のマットおよびランプにて体温を37°Cに維持した(Homeothermic control unit, Harvard Apparatus)。

手術操作終了後に麻酔を切り、自発呼吸を十分に確認してから気管内チューブを抜去した。抗生物質を投与し(cefazolin 50 mg, i.m.)、ケージに戻して自由に飲食を再開させた。

II-2. 中大脳動脈閉塞

ラットにおける局所脳虚血の実験系は、1981年に Tamura らによって確立された (Tamura et al, 1981)。このモデルは、大脳基底核への穿通枝動脈が分岐する部分よりも近位で中大脳動脈を閉塞するモデルで、大脳基底核の外側部分とそれに接する大脳皮質の一部に高度の虚血が得られ、大脳皮質のさらに背側の前大脳動脈および後大脳動脈の支配領域に近い部分は側副血行によりある程度の血流が保たれる。この実験系は近位部中大脳動脈閉塞モデルと呼ばれる。

その後、穿通枝動脈の分岐部よりも遠位の部分で中大脳動脈の閉塞をおこなうことにより、手術操作を体表から浅く容易にした方法が報告された。このような遠位部の中大脳動脈の閉塞では血流の低下は大脳皮質に限局し、しかも多くの場合組織障害の閾値以下に血流が下がらない。したがって、頸部で頸動脈を同時に閉塞させてさらに血流をさげることが必要になる (Chen et al, 1986; Brint et al, 1988)。このような実験系が、遠位部中大脳動脈閉塞モデルと呼ばれる。

この研究では、近位部閉塞である Tamura のモデル、遠位部閉塞である Brint のモデルおよび Chen のモデルの3つのモデルを使用した (図4)。

A. Tamura のモデル

前述のごとく麻酔の導入・維持をおこない、頭皮を消毒髭毛し、右の耳介と外眼裂とのあいだに約 1.5 cm のまっすぐな皮膚切開をおき、側頭筋を切開後側頭骨から剥離して前方に牽引し下側頭窩を露出させた。歯科用ドリルを使って生理食塩水で冷やししながら卵円孔の吻側に径約 3 mm の小孔をあけ、硬膜の下に中大脳動脈の近位部分を確認した。硬膜は 21 ゲージの注射針にて十字に切開した。中大脳動脈の閉塞は、1) 双極電気凝固器 (bipolar coagulator) にて直接電気凝固をしてその部分で切断するか、または、2) まず、10-0 ナイロンにて結紮後に、電気凝固をして切断した。後者の方が血流が遮断されているので血管が凝固されるまでの時間が短い傾向があった。いずれの場合も、動脈が嗅索 (olfactory tract) の内側縁を横切る部分で切断した。筋層と皮膚を縫合して手術操作は終了した。

100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

1. Introduction
The first part of the book discusses the historical background of the subject. It covers the period from the early 19th century to the present day. The author provides a detailed account of the various events and influences that have shaped the field over time.

2. Methodology
This section outlines the research methods used in the study. It includes a discussion of the data sources, the analytical techniques employed, and the limitations of the research. The author aims to provide a clear and transparent account of the research process.

3. Results
The results of the study are presented in this section. The author discusses the findings in detail, highlighting the key observations and trends. The data is presented in a clear and concise manner, allowing the reader to understand the implications of the research.

4. Conclusion
The final section of the book provides a summary of the findings and offers conclusions based on the research. The author discusses the broader implications of the study and suggests areas for further research. The conclusion is supported by the evidence presented throughout the text.

B. Brint のモデル

麻酔の後、Tamura のモデルと同じ部位にやや短めの皮膚切開をおき、側頭筋を切開し側頭骨側面を露出させた。頬骨弓の起始部に歯科用ドリルを使って径約 3 mm の小孔をあけ中大脳動脈の遠位部を露出させた。硬膜を 21 ゲージの注射針にて十字に切開した後、まず 4-0 絹糸による右総頸動脈の結紮をおこない、続いて rhinal fissure を横切る部分で右中大脳動脈を直接電気凝固し缺にて切断した。頭部と頸部の創を縫合して手術操作は終了した。

C. Chen のモデル

Brint のモデルと同じく右の遠位部中大脳動脈を露出後、rhinal fissure を横切る部分で 10-0 ナイロン糸を使って二重結紮しマイクロの缺にて切断した。続いて金属クリップにて両側総頸動脈を閉塞し、45 分後にクリップをはずすことによって再開通させた。両側総頸動脈を閉塞中も麻酔を維持し頭部の創を縫合した。クリップ除去後に頸部の創を縫合し、手術操作を終了した。

これらの虚血モデルは、同じラットの系統でも搬入された時期、ラットの週齢、血管閉塞の方法、実験条件のわずかの差によって梗塞体積が影響を受けることが予想されるので、各実験シリーズは、同時期に搬入されたラットを使って、同一の術者により、同一の実験ステーションを使って、コントロール群と交互に行なわれた。使用したラットの系統は、Tamura のモデルでは Sprague-Dawley ラット (280-350 g)、Brint のモデルでは自然発症高血圧ラット (260-320 g)、Chen のモデルでは Long-Evans ラット (250-320 g) を使用した。

II-3. 梗塞体積の評価

局所脳虚血後の組織障害の評価は、壊死組織の体積すなわち脳梗塞体積を測定することによりおこなった。2,3,5-triphenyltetrazolium chloride monohydrate (TTC) はミトコンドリアの酵素活性のある部位を赤色に染めるので、染色されない部分

はすなわち壊死組織をあらわす(図5)。局所脳虚血後 24 ないし 48 時間の脳において、この染色されない部分の体積が hematoxilin and eosin によって測定された脳梗塞の体積とよく相関することが示されている (Bederson JB, et al, 1986)。

血管閉塞後、24 または 48 時間(後記のプロトコールによる)ラットを生存させたのち、pentobarbital (65 mg/kg, i.p.) にて麻酔し断頭した。頭蓋骨より脳をとりだして、氷で冷した生理的食塩水に 10 分間入れた後、大脳をブレインスライサーを使って、2 mm の厚さの 7 枚の前額断の切片とした。それらの切片を、2% の TTC (Sigma, St. Louis, MO, USA) 溶液に遮光して室温で 30 分間浸した。各脳切片の裏表が同じ程度に染まるように途中切片を反転させた。染色後 10% formalin に一晚以上つけて保存し、同一実験シリーズの梗塞体積の評価はできるかぎりまとめておこなった。

梗塞体積の計算は、personal computer に接続した video camera で画像をとりこみ、データを画像解析プログラム (Bioquant IV image analysis system) で処理することによりおこなった。すなわち、染色済みの各切片を尾側面を上にして並べて video camera で撮影し、その画像を personal computer のモニター上で見ながら赤色に染色されない梗塞部分をマウスにてトレースし、その面積を測定した。さらに、それらの面積値を積分することにより梗塞体積を計算した (Kano et al, 1991)。

Brint と Chen のモデルでは大脳皮質に梗塞が限局するが、Tamura のモデルでは大脳皮質と大脳基底核にまたがった梗塞が認められるので、後者の場合は大脳皮質と大脳基底核の梗塞体積を分けて分析した。

II-4. 統計

独立 2 群間の比較には unpaired t 検定、従属 2 群間の比較には paired t 検定、3 群間の比較には一元配置分散分析 (one way ANOVA) と Tukey's test、3 群間の繰り返しのデータの比較には repeated measures ANOVA および Fisher's least significant difference test をもちいた。p 値が 0.05 未満の場合に統計的に有意と判断した。

III. 一酸化窒素合成阻害剤の局所脳虚血への影響

III-1. 一酸化窒素合成阻害剤

この章では、一酸化窒素合成阻害剤の投与がラットの局所脳虚血において脳保護作用を示しうるかを検討するためにおこなった実験を紹介し、考察を加える。

一酸化窒素の基質である L-arginine の guanidino nitrogen にメチル基やニトロ基をつけた N^G-monomethyl-L-arginine (L-NMMA) や N^G-nitro-L-arginine (L-NA)、さらに後者の methyl ester (L-NAME) などの L-arginine のアナログは (図 6)、一酸化窒素合成を一般に競合的に阻害することが知られている (Rees et al, 1990)。それぞれの一酸化窒素合成阻害剤は、L-arginine の細胞膜の transport system に対する作用 (Bogle et al, 1992)、ムスカリン受容体への親和性の有無 (Buxton et al, 1993)、誘導型と構成型一酸化窒素合成酵素に対する特異性 (Gross et al, 1990) などに差はあるものの、どれも 3 種類の酵素型のうちのひとつの選択的な阻害剤ではない。また L-NMMA は in vivo で代謝されて L-citrulline となり、さらに一酸化窒素の基質である L-arginine に変換されてしまう (Hecker et al, 1990)。

この実験では、文献上最初にマウスの局所脳虚血で脳保護効果が報告された L-NA (Nowicki et al, 1991) および続いてラットの局所虚血で効果が報告された L-NAME (Buisson et al, 1992) を文献と同じプロトコールで投与し、結果の再現性を検討した。また同じ動物で、一酸化窒素合成酵素の抑制の程度を下記のごとく評価した。

III-2 方法：一酸化窒素合成酵素活性の測定

L-arginine のアナログの投与によって中枢神経系における一酸化窒素の合成がどの程度抑制されているかを検討するために、ラットの断頭時に小脳を採取し Bretdら (Bredt and Snyder, 1990) の方法に従い一酸化窒素合成酵素活性を ex vivo で測定した。

ラットの断頭後とりだした小脳を 2 ml の溶媒 (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, pH

7.4) 中でホモジェナイズし、3500 rpm で5分間遠沈した。上清 25 μ l を反応溶液 (50 mM HEPES, 1 mM EDTA, 1 mM NADPH, 1 mM Ca^{2+} , pH 7.4) 100 μ l および 100 nM L-[^3H]arginine (1 mCi/ml, NEN/Dupont, Boston MA, USA) 25 μ l と混合し室温で 10 分間反応させた。反応は、中止溶液 (20 mM HEPES, 2 mM EDTA, pH 5.5) 2 ml に混合することにより終了させた。混合液および蒸留水 2 ml を Dowex AG50WX-8 (Na^+ form, Bio-Rad, Ricon, CA, USA) のコラムに通し L-[^3H]arginine は吸着させ、コラムを通過する [^3H]Citulline のみを含んだ溶液の放射線活性を液体シンチレーションカウンターで測定し、小脳単位重量あたりのデータを同時に測定した正常小脳の値に対する%であらわした。

予備実験として Sprague-Dwley ラットをもちいて、1) L-NAME 10 mg/kg の 1 回腹腔内投与後の大脳半球一酸化窒素合成酵素活性の時間的経過、2) L-NAME 腹腔内投与 2 時間後の大脳半球一酸化窒素合成酵素活性における用量対効果性、3) 同投与後の血圧における用量対効果性を検討した。

III-3. 方法：実験プロトコール

薬剤投与プロトコール、脳梗塞評価の時間は、Nowicki ら (1991)、Buisson ら (1992) の報告に基づいて設定した。虚血モデルとして、大脳皮質にのみ梗塞の得られる遠位部中大脳動脈閉塞の Chen のモデル、大脳皮質および大脳基底核に梗塞の得られる近位部閉塞モデルの Tamura のモデルを利用した。

実験 1 L-NA プロトコール

L-NA (Sigma) を生理食塩水に溶解して 1 mg/ml とし、L-NA 1 mg/kg を中大脳動脈閉塞 5 分、3 時間、6 時間後の 3 回腹腔内投与し、2 4 時間後の脳梗塞体積および小脳における一酸化窒素合成酵素活性を測定した。対照群には同容量の生理食塩水を同じタイミングで投与した。Tamura のモデル (実験 1a) と Chen のモデル (実験 1b) を使って、独立にふたつの実験をおこなった。

実験2 L-NAME プロトコール

L-NAME (Sigma) を生理食塩水に溶解して 3 mg/ml とし、L-NAME 3 mg/kg を血管閉塞 5 分、3 時間、6 時間、24 時間、36 時間後の 5 回腹腔内投与し、48 時間後の脳梗塞体積および小脳における一酸化窒素合成酵素活性を測定した。対照群には同容量の生理食塩水を同じタイミングで投与した。L-NA プロトコールと同じく、Tamura のモデル (実験 2a) と Chen のモデル (実験 2b) とのふたつの実験を独立におこなった。後者の実験では、ハロセンでなく chloral hydrate にて麻酔をし、動脈カテーテルの挿入および虚血前の採血を省略した。したがって、体温のみをモニターして実験をおこなった。

III-4. 結果

予備実験

1) 腹腔内に L-NAME 10 mg/kg を 1 回投与すると、大脳半球の一酸化窒素合成酵素活性は 2 時間後に最も低下し、コントロール群の 34% となった。投与後 48 時間で正常に回復した (図 7)。

2) L-NAME 腹腔内投与 2 時間後の大脳半球の一酸化窒素合成酵素活性は図 8 のごとく用量依存的に低下した。3 mg/kg ではコントロール群の 69%、30 mg/kg では 9% まで低下した。

3) 基礎実験 2) における投与後 2 時間のあいだの血圧は図 9 のごとくで用量依存性の昇圧効果を示した。1-3 mg/kg の投与では 20-120 分後に 8-13 mmHg、10-30 mg/kg の投与では 10-120 分後に 14-34 mmHg、100 mg/kg の投与では 10 分後に 57 mmHg、20-120 分後に 42-55 mmHg の血圧の上昇を認めた (図 9)。

実験1 L-NA プロトコール

生理学的パラメーター： 実験 1a および 1b のふたつの実験において、比較した群の間に虚血導入前の血圧、動脈血ガス、血糖値、ヘマトクリット、体温の生理学的パラメーターに関して差は認められなかった (表 1)。

一酸化窒素合成酵素活性： Tamura のモデル（実験 1a）では、L-NA 投与群で正常コントロールの46 % と有意な小脳一酸化窒素合成酵素活性の低下を認めた。対照となった生理食塩水投与群では中大脳動脈閉塞後も、小脳の酵素活性に有意な変化は見られなかった。

Chen のモデル（実験 1b）では、L-NA 投与群で正常コントロールの73 % と、同じプロトコールの Tamura のモデルに比べて小さいが小脳一酸化窒素合成酵素活性の低下傾向を認めた（表2）。この違いは、Chen のモデルでは中大脳動脈閉塞と同時に45分間の両側内頸動脈閉塞を加えるため、薬剤の3回投与のうち最初の投与分が脳循環系には有効に分布しなかった可能性が考えられた。

梗塞体積： Tamura のモデル（実験 1a）ではL-NA 投与群の方がコントロール群より大脳皮質において96 % の梗塞体積の増加（ $p < 0.05$ ）、大脳基底核では7 % の増加を認めた。梗塞全体の体積では、L-NA 投与群の方で67 % の梗塞体積の増加を認めた。Chen のモデル（実験 1b）でもL-NA 投与群の方が68 % の梗塞体積の増加を認めた（表2）。

実験2 L-NAME プロトコール

生理学的パラメーター： 測定された虚血前の生理学的パラメーターに関して、L-NAME 投与群と対照群との間に差は認められなかった（表3）。

一酸化窒素合成酵素活性： Tamura のモデル（実験 2a）では42 %、Chen のモデル（実験 2b）では45 % と、両方の実験でL-NAME 投与群において有意に酵素活性の低下を認めた。このL-NAME プロトコールでは両モデルの間に酵素活性の抑制の程度に差は見られなかった（表4）。

梗塞体積： Tamura のモデル（実験 2a）では、L-NAME 投与群において大脳皮質で28 %、大脳基底核で2 % の梗塞体積の増加を認めたが、統計学的に有意ではなかった。梗塞全体の体積でも21 % の増加を認めたが有意ではなかった。Chen のモデルでは、投与群とコントロール群のあいだに差を認めなかった（表4）。

III-5. 考察：局所脳虚血と一酸化窒素合成阻害剤

以上の実験の結果は、文献に報告されている結果を再現できなかった。すなわち、実験1ではL-NA 1 mg/kgを虚血後24時間に3回投与することによって小脳の一酸化窒素合成酵素活性はコントロールの46-73%まで低下したが、大脳皮質の梗塞体積は有意に増大した。また実験2では、L-NAME 3 mg/kgを虚血後48時間に5回投与することによって小脳の同酵素活性は40%台まで低下したが、梗塞体積は変化を受けないか若干増大する傾向にあった。

文献に報告されたNowickiらおよびBuissonらの実験はともに自発呼吸でおこなっており、血液ガスデータは論文に記載されていないが実験中に高炭酸ガス血症になっていることが推測された。したがって高炭酸ガス血症の状態でのみ保護効果があらわれる可能性を考え、故意にPaCO₂を上げて実験をおこなったがやはり結果は同様に梗塞の増大を認めた。これらの結果は脳虚血後L-NAやL-NAMEを使って脳の一酸化窒素合成酵素活性を有意に抑制しても脳梗塞体積は縮小せずむしろ大きくなる傾向にあることを示している。

この実験で得られた酵素活性は断頭時のものなので薬剤の最終投与の時間の影響を受ける。したがって、プロトコルの異なる実験1と実験2とを比べるのは不適当であるが、2つの実験のなかでは実験2の方が酵素活性の抑制が大きいものに対して梗塞増大効果は小さかった。この原因は薬剤の違いによる可能性が高いが、脳梗塞評価の時間の差によることも考えられる。すなわち、一酸化窒素の合成阻害が梗塞増大効果のみを持つのではなく、投与のタイミング（例えば6時間以降の投与）によっては脳保護効果を有している可能性もありうる。しかしながら、L-NAやL-NAMEを使ってこの保護効果の分析をおこなうのは困難だと思われた。

in vivoの局所脳虚血において一酸化窒素の合成阻害剤を試みたその後の他の文献上の結果もさまざま、実験1の結果のように悪化したとするものから梗塞体積が縮小したとするものまで認められる。ラットの虚血モデルに限ってプロト

コールを検討してみると、悪化したとする報告は、L-NAME 15 mg/kg, (Kuluz et al, 1993)、L-NAME 10 mg/kg/h x 1h (Zhang and Iadecola, 1993)、L-NAME 2.4 mg/kg/h x 1h (Yamamoto et al, 1992)、不変とする報告が L-NA 30 mg/kg x2 (Dawson et al, 1992) であり、梗塞が縮小したとするものは L-NAME 3 mg/kg x5 (Buisson et al, 1992)、L-NA 1 mg/kg x5 (Nagafuji et al, 1992)、L-NAME 0.6 mg/kg/h x 5h (Ashwal et al, 1993) である。これらの結果を総合して、1) 比較的少量の投与で、2) 虚血後比較的長い時間にわたって投与している場合に梗塞の縮小傾向が認められるが、はっきりしたものではない。

今回の実験のデータからは、局所脳虚血の急性期には一酸化窒素の合成を抑制すると結果的に梗塞体積が増大することが示された。すなわち、一酸化窒素は虚血急性期には全体としては神経保護的に作用していると考えられ、虚血時の一酸化窒素の血流増大作用による効果である可能性が考えられた。一方、脳虚血の急性期以降には一酸化窒素が神経毒性を発揮している可能性も推測された。文献上の報告を見ても一酸化窒素は神経保護作用と神経毒性をあわせ持っていることが考えられる。

IV. L-arginine の局所脳虚血への影響

IV-1. L-arginine

L-arginine は尿素サイクルを構成する半必須のアミノ酸 (Visek WJ, 1986) で、1988年に一酸化窒素がこのアミノ酸から合成されることが報告された (Palmer et al, 1988)。しかしながら、一酸化窒素の合成経路および生理的活性が知られる以前に、L-arginine が neuroblastoma cell の可溶性 guanylate cyclase を活性化し cGMP を合成させる内因性の物質であること (Deguchi et al, 1982)、活性化したマクロファージの周囲の環境に L-arginine 濃度の低下・欠乏状態がおきること (Currie et al, 1979) などが観察されていた。また L-arginine は、成長ホルモン、プロラクチン、インスリン、グルカゴンの分泌を刺激することが知られ、臨床的には脳下垂体前葉の機能検査のための負荷試験に使われてきた (Rakoff et al, 1973)。

L-Arginine が一酸化窒素合成酵素の基質と報告されてからは、数多くの薬理学的実験で L-arginine のアナログの競合的な酵素阻害効果を確認するために用いられた。また、in vivo における L-arginine の投与もおこなわれ、Hishikawa らは、ホルモン負荷試験に使われる 500 mg/kg の静注で、高血圧群および正常血圧群の両者において有意な血圧の低下を認め、この現象を末梢血管系における一酸化窒素の合成の昂進による血管拡張によるものと考えている (Hishikawa et al, 1991)。この章では、ラットの局所脳虚血モデルにおいて L-arginine の投与をおこない梗塞体積の変化を検討した実験を紹介し考察を加える (Morikawa et al, 1992)。

IV-2. 方法：実験プロトコール

虚血モデルとして、大脳皮質にのみ梗塞の得られる遠位部中大脳動脈閉塞の Brint のモデル、大脳皮質および大脳基底核に梗塞の得られる近位部閉塞の Tamura のモデルを利用した。自然発症高血圧ラットをもちいた Brint のモデルでは、Chen のモデルに比べてデータのばらつきが少なかったが、高血圧が L-arginine の効果に影響を与える可能性も考えられたので、Sprague-Dawley ラットを使った Tamura の

モデルで正常血圧の動物における効果を確認した。

実験 3a 虚血前治療プロトコール (高血圧ラット)

L-Arginine hydrochloride (Sigma) を蒸留水に溶解して 300 mg/ml とし、300 mg/kg を血管閉塞の 1 6 時間前、3 時間前、5 分後、2 時間後の 4 回腹腔内投与し、2 4 時間後の脳梗塞体積を測定した。対照群には同容量の生理食塩水を同じタイミングで投与した。L-arginine の作用の光学異性的な特異性 (enantiomer-specificity) を確認するため D-arginine hydrochloride (Sigma) も同用量・用法にて投与した。自然発症高血圧ラットを用いて Brint モデルでおこなった。

実験 3b 虚血後治療(5min)プロトコール (高血圧ラット)

上記同様に調製した L-arginine を用いて、まず 300 mg/kg を中大脳動脈閉塞 5 分後から 1 0 分間かけて静注し、続いて 1 時間後に同量を腹腔内に投与し、2 4 時間後に脳梗塞体積を測定した。対照群には同容量の生理食塩水を同じタイミングで投与した。効果の用量依存性 (dose-response) を調べるために、30 mg/kg の L-arginine でも検討をおこなった。これも、自然発症高血圧ラットを用いた Brint のモデルでおこなった。

実験 4a 虚血後治療(5min)プロトコール

正常血圧である Sprague-Dawley ラットを用いて Tamura のモデルで実験をおこなった。上記の実験 3b と同じ 5 分後の虚血後治療プロトコールで 300 mg/kg を 2 回投与し、2 4 時間後に脳梗塞体積を測定した。対照群には同容量の生理食塩水を同じタイミングで投与した。

実験 4b 虚血後治療(1h)プロトコール

実験 4a と同じ実験モデルで、治療開始を実験 4a よりも 1 時間遅くした。すな

わち 300 mg/kg を中大脳動脈閉塞 1 時間後から 10 分間かけて静注し、続いて 2 時間後に同量を腹腔内に投与し、24 時間後に脳梗塞体積を測定した。対照群には同容量の生理食塩水を同じタイミングで投与した。

IV-3. 結果

生理学的パラメーター： 血管閉塞前に L-arginine の投与をおこなった実験 3a において、投薬による虚血導入前の血圧、動脈血ガス、ヘマトクリット、体温の変化は認められなかった。血糖値は、D-arginine 投与群で低い傾向が見られたがこれも統計学的に有意ではなかった。L-arginine 投与群でも血糖値に変化はなかった。これは、インスリン、グルカゴン、成長ホルモンの血糖値に対する相反する効果が相殺されたものと考えられた。(表5)。

血管閉塞後に L-arginine の投与を開始した実験 3b, 4a, 4b において、虚血導入前の生理学的パラメーターに群間の差は認められなかった(表5)。

梗塞体積： Brint のモデルにて血管閉塞前に L-arginine の投与を開始した実験 3a では 31% の有意な脳梗塞巣の縮小を認めた ($p < 0.05$)。同量の D-arginine では梗塞縮小効果は認められなかった。血管閉塞 5 分後に L-arginine の投与を開始した実験 3b においても有意な 28% の脳梗塞巣の縮小を認めた ($P < 0.05$)。同じプロトコールで、30 mg/kg の L-arginine では有意な梗塞体積の減少は得られなかった。

正常血圧の Sprague-Dawley ラットを用いて血管閉塞 5 分後に L-arginine の投与を開始した実験 4a では、大脳皮質で 31% ($p < 0.05$)、大脳基底核で 52% ($p < 0.05$) の統計学的に有意な脳梗塞体積の縮小を認めた。L-arginine の投与を中大脳動脈閉塞後 1 時間に開始した実験 4b では、大脳皮質、大脳基底核ともに梗塞体積の有意な減少は認めなかった(表6)。

IV-4. 考察：局所脳虚血と L-arginine

これらの実験結果は、1) L-arginine の虚血前および直後の投与によって局所脳

虚血後の脳梗塞体積が有意に縮小すること、2) その効果は D-arginine には認められず、光学異性的に特異的な現象であること、3) 一回投与量で 30 mg/kg と 300 mg/kg のあいだに効果の閾値があること、4) L-arginine の効果は、高血圧ラットおよび正常血圧ラットの両者にて認められること、5) 投与を血管閉塞 1 時間後に開始すると有効でないこと、を示している。

L-arginine が梗塞体積を減少させることは、既に心臓の虚血・再灌流モデルで報告されている (Nakanishi et al, 1992) が、脳虚血に関しては、8 週齢の SHRSP (stroke-prone spontaneously hypertensive rat) に経口的に L-arginine の投与をおこない 14 週齢に達した時点での脳血管障害の発生率を検討し L-arginine の投与群で若干発生率の減少する傾向がみられるが統計的に有意ではないとする報告のみである (Stier et al, 1991)。

この実験で認められた L-arginine の効果の機序として、一酸化窒素の合成促進以外には L-arginine によって分泌が刺激されるインスリンの虚血脳への作用も考えられる。インスリンは虚血脳に対して保護的に作用するという報告があり、この作用は血糖値の降下によるアシドーシスの軽減によるのではなく、脳への直接的な作用だとされる (Voll et al, 1991)。しかしながら、arginine のインスリン分泌刺激作用は光学異性的に特異的ではなく D-arginine にも認められているので (Girerd et al, 1990)、今回の L-arginine の効果がインスリンを介してあらわれたとは考えられない。

一酸化窒素は潜在的に神経毒性を有する物質であるので、その基質である L-arginine の投与が神経細胞に対してある種の刺激となってストレス蛋白等の発現を誘導し、神経細胞を虚血に対して耐性 (Kitagawa et al, 1990; Kirino et al, 1991) にしている可能性も考えられた。しかしながら、虚血前の投与のみでなく虚血開始直後の投与でも同様な L-arginine の効果がみられたので、虚血耐性の誘導が今回の効果を説明する機序とは考えられない。L-arginine の腹腔内投与後に大脳皮質の c-fos 蛋白および hsp 70 の発現を免疫染色で検討したところ、c-fos は 1 時間後に出現し 2 4 時間後には消失しており、hsp 70 の発現は全く見られなかった

(unpublished observation, Nozaki et al, 1992)。

さらに近年、一酸化窒素自体が *in vivo* では組織環境の酸化還元電位状態 (redox state) によっては NMDA 受容体の活性を抑制して神経保護的に働くことも報告された (Lipton et al, 1993)。したがって、L-arginine が一酸化窒素を介して直接的にグルタミン酸の神経毒性を抑制して神経保護作用を呈している可能性も考えられる。そこで L-arginine の投与による梗塞体積の縮小が、一酸化窒素の合成を促進させて脳血流を増加させたことによる効果なのかを調べるために、penumbra 領域の血流が L-arginine の投与によってどのような影響を受けているのかを検討した。

V. 虚血の penumbra における局所脳血流

V-1. 方法：Laser-Doppler 法による血流測定

脳血流 (cerebral blood flow, CBF) の測定には種々の方法があるが、同一の動物で同じ部位の局所脳血流 (regional CBF, rCBF) の変化を経時的に評価するために、Laser-Doppler 法による組織血流測定法を利用した。その原理は、組織にあてられたレーザー光が微小循環系の赤血球にあたるとその速度に比例した周波数変調 (ドップラー効果) を受けて戻ってくることを利用したもの (Stern, 1975) で、1) 脳血流が絶対値としては得られない、2) 組織の表面に直接プローブをあてる必要がある、という欠点があるが、ラットの局所脳虚血モデルにおいて持続的に局所脳血流の変化を記録するには有用であることがすでに示されている (Dirnagl et al, 1989)。

Brint のモデルにおける血管閉塞後の局所脳血流の脳内分布は既に autoradiography 法によってしらべられているので (Jacewitz et al, 1990)、レーザードップラー血流計のプローブを penumbra となるであろう部分の脳表にあてておくことによって、penumbra 領域の局所脳血流の血管閉塞前後の経時的な変化および L-arginine による局所脳血流への影響を検討できる (Morikawa et al, 1992a, 1994)。

V-2. 方法：実験のセットアップとプロトコール

実験 5a 用量依存性・光学異性的特異性

前章で L-arginine の効果を認めた実験 3b と同じ実験モデル、すなわち自然発症高血圧ラットにおける右内頸動脈・中大脳動脈閉塞 (Brint のモデル)、を使って同じタイミングで薬剤の投与をおこなった。ハロセン麻酔下にラットの頭部を定位固定装置 (David-Kopf) に固定し、遠位部中大脳動脈を露出するための開頭をおこなった。さらにレーザードップラー血流計 (BPM 403A, TSI Inc.) のプローブ (径 0.8 mm, P-433) 設置のために、正中から右側へ 4 mm から 6 mm、bregma の 2 mm 尾側から 1 mm 吻側の長方形の部分の頭蓋骨を歯科用ドリルにて直下の脳表の

血管が見えるまで薄く削った。この部分の直下の大脳皮質背外側部は、この虚血モデルにおいて血管閉塞後に脳血流が 25 % 以下に減少することが知られている (Jacewitz et al, 1990)。ホルダーに固定したプローブを太い血管を避けるように薄く残った骨の上からこの脳表に垂直に接触させ、プローブの直下の体積 1 mm^3 程度の脳組織の血流値を測定した。

生理学的パラメーターが正常域で安定した状態で局所脳血流の基準値を測定した後、そのまま脳血流を記録しながら、まず最初に総頸動脈をあらかじめかけておいた snare ligature にて閉塞させ、続いて金属クリップ (Zen clip, Ohwa Tsusho) にて遠位部中大脳動脈を閉塞した。前章の実験 3b の投薬プロトコールと全く同様に、血管閉塞 5 分後より静脈カテーテルを使って L-arginine (3, 30, 300 mg/kg) または D-arginine (300 mg/kg) または生理食塩水の注入を開始し 10 分間で全量を静注した。脳血流の記録を血管閉塞後 2 時間続けて実験を終了した。実験中、血圧、体温は持続的に記録し、動脈血ガス分析、血糖値の測定もおこなった。

脳血流のデータは血管閉塞前の基準値に対する % で表わし (Dirnagl et al, 1989)、投薬前の血流値は血管閉塞 2 分後と 5 分後の値で代表させ、投薬後の血流値は投薬終了後の 15 分毎の値で代表させた。

実験 5b pentobarbital 麻酔

L-arginine の効果がハロセン麻酔に特異的な反応ではないことを確認するために、pentobarbital 麻酔 (50 mg/kg ip) を使って実験 5a と同じプロトコールで 300 mg/kg の L-arginine を投与し局所脳血流を測定した。

V-3. 結果

生理学的パラメーター

比較した群の間において、血圧、動脈血ガス分析、血糖値、体温に有意差は認められなかった。各群の虚血開始前と脳血流の測定終了時の、パラメーターに関しても有意な変動は見られなかった (表 7)。

局所脳血流

自然発症高血圧ラットの脳皮質背外側部における局所脳血流は、総頸動脈および遠位部中大脳動脈の閉塞後に血管閉塞前の約 20% にまで低下した。血管閉塞 5 分後から生理食塩水を静注したコントロール群では記録をおこなった 2 時間のあいだこの脳血流値に変化は認められなかった。300 mg/kg の L-arginine を静注した群では投薬終了後より局所脳血流は有意に上昇し、この傾向は測定した 2 時間のあいだ持続した ($p < 0.01$, repeated measures ANOVA および Fisher's least significant difference test、図 10)。同量の D-arginine はコントロール群より高い傾向がみられたが、有意な変化ではなかった。

薬剤投与前の局所脳血流の平均値と投薬後の局所脳血流の平均値を比較すると、30 mg/kg の L-arginine の投与では $17 \pm 5\%$ から $31 \pm 8\%$ へ上昇し ($n=6$, $p < 0.05$)、300 mg/kg の L-arginine の投与では $22 \pm 3\%$ から $33 \pm 4\%$ へと有意の増加が認められた ($n=12$, $p < 0.01$)。3 mg/kg の L-arginine ($18 \pm 9\%$ から $21 \pm 3\%$, $n=4$) および 300 mg/kg の D-arginine ($21 \pm 4\%$ から $25 \pm 4\%$, $n=6$) または生食 ($20 \pm 5\%$ から $18 \pm 5\%$, $n=6$) ではこの効果はみられなかった (表 8、図 11)。

L-arginine の効果は pentobarbital 麻酔でも有意に認められ、ハロセン麻酔に特異的な現象ではないことが確認された ($29 \pm 6\%$ から $44 \pm 8\%$, $n=4$, $p < 0.05$)。

V-4. 考察：penumbra における脳血流と L-arginine

中大脳動脈閉塞後 2 時間の脳血流の推移は、300 mg/kg の L-arginine 投与群において生理食塩水投与群に比べて有意に高く、D-arginine 投与群では生理食塩水投与群と差がなかった。これらの実験結果は、30 および 300 mg/kg の L-arginine を虚血の 5 分後に投与すると penumbra 領域において脳血流が投与後に有意に増加することを示している。この血流の増加は光学異性体である D-arginine では認められなかった。局所脳虚血において脳梗塞に陥る血流閾値は基礎値の 30% 程度と報告されており (Jacewicz et al, 1992)、今回血流の測定をおこなった領域は血管閉塞後の血流が約 20% なのでそのままの血流であれば脳梗塞に陥ると考えられる脳組

織である。この部分の脳血流が L-arginine の投与後に平均 30 % 以上にまで上昇したことは、L-arginine の梗塞縮小効果を直接的に反映している可能性がある。脳梗塞の縮小効果における L-arginine 量の閾値 (300 mg/kg) と脳血流増加作用における閾値 (30 mg/kg) とが異なるが、後者では急性期 (2 時間) の反応しかみていないために閾値が低くなっていると予想される。

L-arginine の投与が神経細胞の代謝を賦活し、2 次的に脳血流の増加をきたした可能性も考えられるが、この実験セットアップで脳血流の測定部位の皮質電位 (ECoG) を直接記録したところ、血管閉塞によって縮小した ECoG の振幅が血流の増加に引き続いて回復するのが認められ、ECoG の回復が先行することはなかった (Dalkara et al, 1994)。したがってこの実験で見られた脳血流の増加は、L-arginine の直接的な血管への作用によるものと考えられる。

in vivo における脳血管の反応性を調べた実験で、Rosenblum らは L-arginine の外膜側からの投与で径 30-50 μm の脳表の細動脈が用量依存的に拡張することを示し (10^{-5} M の L-arginine で 6 % の径の増加)、その反応が内皮に依存性で D-arginine や他の L-型アミノ酸には認められないこと、それ自体では収縮をおこさないごく少量の L-NMMA によって反応が抑制されることなどから、一酸化窒素を介した効果だと考察している (Rosenblum et al, 1990)。基質である L-arginine 自体が in vivo における血管内皮の一酸化窒素の合成を促進させ、その動脈を拡張させることから、今回の実験において脳虚血でみられた脳血流の増加も一酸化窒素の合成を介した効果である可能性が十分考えられる。

最近投与後に一酸化窒素を放出する sodium nitroprusside (SNP) や 3-morpholino-sydnonimine (SIN-1) を頸動脈内に注入し、昇圧剤で血圧を維持することによって、局所脳虚血における脳血流が増加し、脳梗塞体積が縮小することが報告されている (Zhang et al, 1994)。この報告はより直接的に、虚血の急性期における一酸化窒素の脳血流を介した脳保護効果を示している。また、L-arginine は一酸化窒素合成酵素の基質なので、SNP や SIN-1 と異なり投与後一酸化窒素が合成されるためには一酸化窒素合成酵素が正常な機能を保っていることが必要である。このこと

が、薬剤としての therapeutic window を狭めて欠点となるのか、あるいは一酸化窒素を必要としている虚血組織への基質の補充をおこなうという点で他の部位への影響が少なく利点となるのかは今後の検討が必要である。

VI. 全体の考察

今回の実験によって以下のことが示された。

1) 局所脳虚血において L-NA および L-NAME を投与することによって脳の一酸化窒素合成酵素の活性は有意に抑制されたが、脳梗塞体積は生理食塩水を投与した群と比べて有意に拡大したかもしくは不変であった。

2) 局所脳虚血において一酸化窒素合成の基質である L-arginine を投与すると、生理食塩水を投与した群に比べて脳梗塞が縮小した。この効果は虚血前投与のみでなく、5分後投与でも認められたが、1時間後に投与を開始すると効果はなかった。D-arginine では虚血前投与をしても生理食塩水を投与した群と梗塞体積に差はみられなかった。

3) 局所脳虚血において L-arginine (>30 mg/kg, iv) を投与すると、虚血辺縁部における脳血流が投与前に比べて有意に増加した。生理食塩水や 300 mg/kg の D-arginine では効果は認められなかった。血管閉塞後2時間のあいだの脳血流は、L-arginine 投与群において生理食塩水投与群と比較して有意な増加が認められた。

文献的に一酸化窒素合成酵素の阻害薬を局所脳虚血時に投与した実験の結果は、III-5 に記すごとく今回の結果と同様梗塞の増大をみたものと、逆に梗塞の縮小を得たものが半々である。このように、一酸化窒素合成酵素阻害剤の *in vivo* の脳虚血における効果は一貫していない。これらの結果の原因は、現在使われている一酸化窒素合成酵素阻害剤が神経細胞型と血管内皮型の両方の合成酵素を阻害するために、各実験においてそれぞれの酵素の抑制程度が異なることによるものと推測される。すなわち、一酸化窒素は虚血において神経毒性を発揮しているが、一酸化窒素の合成を抑制すると脳血流が低下するために、神経毒性の軽減効果がマスクされて逆に梗塞体積が増大するものと考えられる。

一酸化窒素が *in vivo* の脳虚血において神経毒性を発揮していることを示す証拠として、最近次の二つの論文が発表された。ひとつは、神経細胞型の合成酵素を選択的に抑制する一酸化窒素合成阻害剤 (7-nitroindazole, Moore et al, 1993) を利

用し、この薬剤の投与によってラットの局所脳虚血後の脳梗塞が縮小することを示したもので (Yoshida et al, 1994)、この薬剤自体は一酸化窒素合成酵素抑制作用が比較的弱く、効果の持続も短いので、今後さらに強力な選択的神経細胞型酵素の阻害剤の開発が望まれる。

もうひとつは、神経細胞型一酸化窒素合成酵素の遺伝子のノックアウトマウスにおいて、局所脳虚血後の脳梗塞体積がコントロールのマウスに比べて小さいことを示した論文で、この結果も神経細胞由来の一酸化窒素が局所脳虚血時に細胞障害性に働いていることを示唆している (Huang et al, 1994)。

興味深いことに、この神経細胞型一酸化窒素合成酵素遺伝子のノックアウトマウスをもちいて局所脳虚血をつくり、L-NA の投与をすると今回の実験にみられたように脳梗塞の増大が認められた (Huang et al, 1994)。したがって、これらのマウスにおいても血管内皮型の酵素の抑制が脳血流の減少すなわち脳虚血の悪化をきたしたものと考えられる。

以上のような考察から、*in vivo* の局所脳虚血において一酸化窒素は血流に対する影響を介した良い面と、神経細胞に対する直接作用としての悪い面とをあわせ持っていると考えられる。このような両方の作用を模式的に図 1 2 に実線で示した。したがって、脳血流増加を目的として L-arginine や他の一酸化窒素のドナーを投与する場合においても、一酸化窒素が神経細胞に対して両方向の作用をもっており、大量では神経毒性を有している可能性も考慮されなければならない。

脳の神経細胞型および血管内皮型の一酸化窒素合成酵素以外に、脳血管周囲にも神経細胞型合成酵素が存在し、さらに、マイクログリアやアストロサイトなどにも誘導型の一酸化窒素合成酵素が発現される。これらの酵素由来の一酸化窒素も脳虚血の病態に関与している可能性がある。前者は構成型の酵素で脳虚血時における側副血管の拡張に関与している可能性があり、後者は脳虚血後の亜急性期に大量の一酸化窒素を合成して神経細胞毒性を発現している可能性がある。

また、神経細胞型の一酸化窒素が直接脳血流を増加させ脳保護的に働いている可能性も今回の実験結果からは否定できない。神経細胞で合成された一酸化窒素

が NMDA 受容体の活性を抑制して直接神経保護的に作用するという説も提唱されているが (Lipton et al, 1993)、このような脳血流を介さない一酸化窒素の直接的な神経保護作用の *in vivo* の系での妥当性に関してはさらに検討が必要である。これらの今後検討されるべき一酸化窒素の作用機序を、図 1 2 に点線で示した。

今後、一酸化窒素合成酵素の各 isoform のより良い選択的阻害剤の開発と、各 isoform の遺伝子のノックアウトマウスの利用などによって、脳虚血における一酸化窒素合成系の意義の詳細がさらにあきらかになることに期待したい。

VII. 結論

一酸化窒素は神経細胞毒性を持つ可能性があり、さらに脳血流増加作用を有することが考えられる。本研究は *in vivo* の局所脳虚血において一酸化窒素合成酵素の阻害剤が脳梗塞体積を増大させること、一酸化窒素の基質である L-arginine が梗塞体積を縮小させること、さらに、L-arginine が虚血辺縁部の脳血流を急性期に増加させること、を示した。これらの実験結果は、一酸化窒素の脳血管系に対する効果を反映しているものと考えられる。したがって、虚血の急性期に一酸化窒素の合成を増やし虚血辺縁部における脳血流を増加させることによって局所虚血による脳損傷を軽減することが可能と考えられ、また、一酸化窒素の神経細胞毒性を減らすことにより局所脳虚血において脳保護効果を得るには、神経細胞型の一酸化窒素合成酵素に特異的な阻害剤を使用することが必要と考えられた。

VIII. 文献

Ashwal S, Cole DJ, Osborne TN, et al: Low dose L-NAME reduces infarct volume in the rat MCAO/reperfusion model. *J Neurosurg Anesth* 5:241-249, 1993

Astrup J, Sorensen PM, Sorensen HR: Oxygen and glucose consumption related to Na-K transport in canine brain. *Stroke* 12:726-730, 1981

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, et al: Apparent hydroxyl radical production from peroxynitrite: implications for endothelial injury by nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:1620-1624, 1990.

Bederson JB, Pitts LH, Germao SM, et al: Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304-1308, 1986.

Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, et al: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 43:1369-1374, 1984

Bogle RG, Moncada S, Pearson JD, et al: Identification of inhibitors of nitric oxide synthase that do not interact with the endothelial cell transporter. *Br J Pharmacol* 105:768-770, 1992

Branston NM, Strong AJ, Symon L: Extracellular potassium activity, evoked potential and tissue blood flow. *J Neurol Sci* 32:305-321, 1977

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH: Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347:768-770, 1990

Bredt DS, Snyder SH: Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:682-685, 1990.

Brierley JB, Meldrum BS, Brown AW: The threshold and neuropathology of cerebral "anoxic-ischemic" cell change. *Arch Neurol* 29:391-393, 1973

Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, et al: Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:474-485, 1988.

Buchan A, Pulsinelli WA: Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci* 10:311-6, 1990

Buisson A, Plotkine M, Boulu RG: The neuroprotective effect of a nitric oxide inhibitor in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol* 106:766-767, 1992.

Bult H, Boeckxstaens GE, Pelckmans PA et al: Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* 345:346-347, 1990

Buxton IL, Cheek DJ, Eckman D, et al: NG-nitro-L-arginine methyl ester and other alkyl esters of arginine are muscarinic receptor antagonists. *Circ Res* 72:387-395, 1993

Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, et al: A model of focal ischemic stroke in the rat:

reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* 17:738-743, 1986.

Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1:623-634, 1988

Currie GA, Gyure L, Cifuentes L: Microenvironmental arginine depletion by macrophages in vivo. *Br J Cancer* 39:613-620, 1979

Dalkara T, Morikawa E, Panahian N, et al: Blood flow dependent functional recovery in a rat model of focal cerebral ischemia. *Am J Physiol* 267:H678-H683, 1994

Dawson DA, Kusumoto K, Graham DI, et al: Inhibition of nitric oxide synthesis does not reduce infarct volume in a rat model of focal cerebral ischaemia. *Neurosci Lett* 142:151-154, 1992

Dawson TM, Bredt DS, Fotuhi M, et al: Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:7797-7801, 1991

Dawson TM, Dawson VL, Snyder SH: A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann Neurol* 32:297-311, 1992

Dawson VL, Dawson TM, London ED, et al: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:6368-6371, 1991.

De Garavilla L, Babbs CF, Tacker WA: An experimental circulatory arrest model in the rat to evaluate calcium antagonists in cerebral resuscitation. *Amer J Emer Med* 2:321-326,

1984

Deguchi T, Yoshioka M: L-Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 257:10147-10151, 1982

Dirnagl U, Kaplan B, Jacewicz M, et al: Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab* 9:589-596, 1989.

Forstermann U, Schmidt HHHW, Pollock JS, et al: Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol* 42:1849-1857, 1991

Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376, 1980

Gardiner SM, Compton AM, Kemp PA, et al: Regional and cardiac haemodynamic effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester in conscious, Long Evans rats. *Br J Pharmacol* 101:625-631, 1990

Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP, et al: L-Arginine augments endothelium-dependent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 67:1301-1308, 1990.

Goadsby PJ, Kaube H, Hoskin KL: Nitric oxide synthesis couples cerebral blood flow and metabolism. *Brain Res* 595:167-170, 1992

Gross SS, Stuehr DJ, Aisaka K, et al: Macrophage and endothelial cell nitric oxide

- synthesis: cell-type selective inhibition by NG-aminoarginine, NG-nitroarginine and NG-methylarginine. *Biochem Biophys Res Commun* 170:96-103, 1990
- Hall ED, Pazara KE, Braughler JM: 21-aminosteroid lipid peroxidation inhibitor U74006F protects against cerebral ischemia in gerbils. *Stroke* 19:997-1002, 1988
- Hecker M, Mitchell JA, Harris HJ, et al: Endothelial cells metabolize NG-monomethyl-L-arginine to L-citrulline and subsequently to L-arginine. *Biochem Biophys Res Commun* 167:1037-1043, 1990
- Hishikawa K, Nakaki T, Suzuki H, et al: L-arginine induced hypotension. *Lancet* 337:683-684, 1991.
- Huang Z, Huang PL, Panahian N, et al: Effect of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265:1883-1885, 1994
- Iadecola C: Does nitric oxide mediate the increases in cerebral blood flow elicited by hypercapnia. *Proc Natl Acad Sci* 89:3913-3916, 1992
- Iadecola C, Zhang F: Nitric oxide-dependent and -independent components of cerebrovasodilation elicited by hypercapnia. *Am J Physiol* 266:R546-R552, 1994
- Iijima T, Mies G, Hossmann K-A: Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:727-733, 1992
- Jacewicz M, Brint S, Tanabe J, et al: Nimodipine pretreatment improves cerebral blood

flow and reduces brain edema in conscious rats subjected to focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 10:903-913, 1990.

Jacewicz M, Tanabe J, Pulsinelli WA: The CBF threshold and dynamics for focal cerebral infarction in spontaneously hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:359-370, 1992.

Jones TH, Morawetz RB, Crowell RM, et al: Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys. *J Neurosurg* 54:773-782, 1981

Kader A, Frazzini VI, Solomon RA, et al: Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24:1709-1716, 1993

Kano M, Moskowitz MA, Yokota M: Parasympathetic denervation of rat pial vessels significantly increases infarction volume following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:628-637, 1991.

Kawai K, Nitecka L, Reutzler CA, et al: Global cerebral ischemia associated with cardiac arrest in the rat: I. Dynamics of early neuronal damage. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:238-249, 1992

Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, et al: Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing Cu-Zn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:11158-11162, 1991

Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* 239:57-69, 1982

Kirino T, Tsujita Y, Tamura A: Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:299-307, 1991

桐野高明：虚血性神経細胞死 *Annual Review 神経* 1993:119-131, 1993

Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, et al: 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528:21-24, 1990

Kozniowska E, Oseka M, Stys T: Effects of endothelium-derived nitric oxide on cerebral circulation during normoxia and hypoxia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:311-317, 1992

Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4651-4655, 1991

Kuluz JW, Prado RJ, Dietrich WD, et al: The effect of nitric oxide synthase inhibition on infarct volume after reversible focal cerebral ischemia in conscious rats. *Stroke* 24:2023-2029, 1993

Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, et al: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626-632, 1993

Malinski T, Bailey F, Zhang ZG, et al: Nitric oxide measured by a porphyrinic microsensor in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:355-358, 1993

Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R: Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 27:8706-8711, 1988
Metab 7:729-738, 1987

McGeer PL, McGeer EG: Amino acid neurotransmitters. *In*: Siegel G, Agranoff B, Albers RW, et al (eds) *Basic neurochemistry*, Raven Press, New York, pp 323-328, 1989

Moore PK, Babbedge RC, Wallace P, et al: 7-Nitroindazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. *Br J Pharmacol* 108:296-297, 1993

Morikawa E, Huang Z, Moskowitz MA: L-Arginine decreases infarct size caused by middle cerebral artery occlusion in SHR. *Am J Physiol* 263:H632-H635, 1992

Morikawa E, Rosenblatt S, Moskowitz MA: L-Arginine dilates rat pial arterioles by nitric oxide-dependent mechanisms and increases blood flow during focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* 107:905-907, 1992a

Morikawa E, Moskowitz MA, Huang Z, et al: L-Arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases rCBF and reduces infarction volume in the rat. *Stroke* 25:429-435, 1994

Nagafuji T, Matsui T, Koide T, et al: Blockade of nitric oxide formation by Nw-nitro-L-arginine mitigates ischemic brain edema and subsequent cerebral infarction in rats. *Neurosci Lett* 147:159-162, 1992.

Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefler DJ, et al: Intracoronary L-arginine during

reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* 263:H1650-H1658, 1992

Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6:3051-3064, 1992

Northington FJ, Matherne GP, Berne RM: Competitive inhibition of nitric oxide synthase prevents the cortical hyperemia associated with peripheral nerve stimulation. *Proc Natl Acad Sci* 89:6649-6652, 1992

Nowicki JP, Duval D, Poignet H, et al: Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J Pharmacol* 204:339-340, 1991

Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, et al: Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 13:70-79, 1993

Olney J: Neurotoxicity of excitatory amino acids. in McGeer EG, Olney JW, McGeer PL (eds): *Kainic acid as a tool in neurobiology*. Raven Press, New York, pp95-121, 1978

Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333:664-666, 1988

Park CK, Nehls DG, Graham DI, et al: The glutamate antagonist MK-801 reduces focal ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 24:543-551, 1988

Prado R, Watson BD, Kuluz J, et al: Endothelium-derived nitric oxide synthase inhibition.

Effect on cerebral blood flow, pial artery diameter, and vascular morphology in rats. *Stroke* 23:1118-1124, 1992

Pulsinelli WA, Brierley JE: A new model of bilateral hemispheric ischemia in the unanesthetized rat. *Stroke* 10:267-272, 1979

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S: The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 148:1482-1489, 1987.

Rakoff JS, Siler TM, Sinha YN, et al: Prolactin and growth hormone release in response to sequential stimulation by arginine and synthetic TRF. *J Clin Endocrinol Metab* 37:641-644, 1973

Rees DD, Palmer RMJ, Schulz, et al: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol* 101:746-752, 1990.

Rosenblum WI, Nishimura H, Nelson GH: Endothelium-dependent L-arg- and L-NMMA-sensitive mechanisms regulate tone of brain microvessels. *Am J Physiol* 259:H1396-H1401, 1990.

Schuman EM, Madison DV: The intercellular messenger nitric oxide is required for long-term potentiation. *Science* 254:1503-1506, 1991

Sheardown MJ, Nielsen EO, Hansen AJ, et al: 2,3-Dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoylbenzo(F)quinoxaline: a neuroprotectant for cerebral ischemia. *Science* 247:571-4, 1990

Shibuki K, Okada D: Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic

depression in the cerebellum. *Nature* 349:326-328, 1991

Siesjö BK: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J Neurosurg* 77:169-1840, 1992

Siesjö BK: Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia . Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J Neurosurg* 77:337-354, 1992

Stern MD: In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 254:56-58, 1975

Stier CT, Sim GJ, Levine S: Dietary arginine fails to protect against cerebrovascular damage in stroke-prone hypertensive rats. *Brain Res* 549:354-356, 1991

Tamura A, Graham DI, McCulloch J, et al: Focal cerebral ischaemia in the rat: I. description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1:53-60, 1981.

Tanaka K, Gotoh F, Gomi S, et al: Inhibition of nitric oxide synthesis induces a significant reduction in local cerebral blood flow in the rat. *Neurosci Let* 127:129-132, 1991

Tanaka K, Fukuuchi Y, Gomi S, et al: Inhibition of nitric oxide synthesis impairs autoregulation of local cerebral blood flow in the rat. *Neuroreport* 4:267-270, 1993

Toda N, Ayajiki K, Yoshida K, et al: Impairment by damage of the pterygopalatine ganglion of nitroxidergic vasodilator nerve function in canine cerebral and retinal arteries. *Circ Res* 72:206-213, 1993

Tymianski M, Wallace MC, Spigelman I, et al: Cell permeant Ca²⁺ chelators reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Neuron* 11:221-235, 1993

Uemura Y, Kowall NW, Beal MF: Selective sparing of NADPH-diaphorase-somatostatin-neuropeptide Y neurons in ischemic gerbil striatum. *Ann Neurol* 27:620-625, 1990

Vissek WJ: Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J. Nutr.* 116: 36-46, 1986.

Voll CL, Auer RN: Insulin attenuates ischemic brain damage independent of its hypoglycemic effect. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:1006-1014, 1991

Wang Q, Paulson OB, Lassen NA: Is autoregulation of cerebral blood flow in rats influenced by nitro-L-arginine, a blocker of the synthesis of nitric oxide. *Acta Physiol Scand* 145:297-298, 1992

Yamamoto S, Golanov EV, Berger SB, et al: Inhibition of nitric oxide synthesis increases focal ischemic infarction in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 12:717-726, 1992

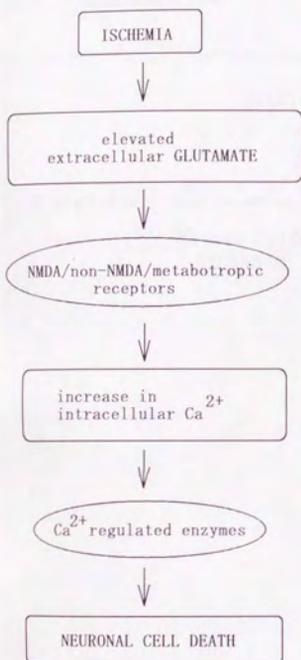
Yoshida T, Limmroth V, Irikura K, et al: The NOS inhibitor, 7-nitroindazole, decreases focal infarct volume but not the response to topical acetylcholine in pial vessels. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:924-929, 1994

Zhang ZG, Chopp M, Zaloga C, et al: Cerebral endothelial nitric oxide synthase expression after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24:2016-2022, 1993

Zhang F, Iadecola C: Nitroprusside improves blood flow and reduces brain damage after focal ischemia. *Neuroreport* 4:559-562, 1993

Zhang F, White JG, Iadecola C: Nitric oxide donors increase blood flow and reduce brain damage in focal ischemia: evidence that nitric oxide is beneficial in the early stages of cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:217-226, 1994

図1 グルタミン酸・カルシウム仮説



桐野, 1993 の模式図をもとに作成した。

図2 一酸化窒素合成系

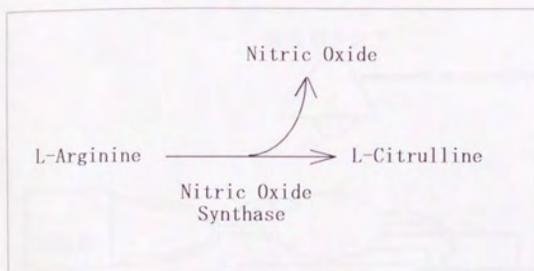


図3 実験セットアップ

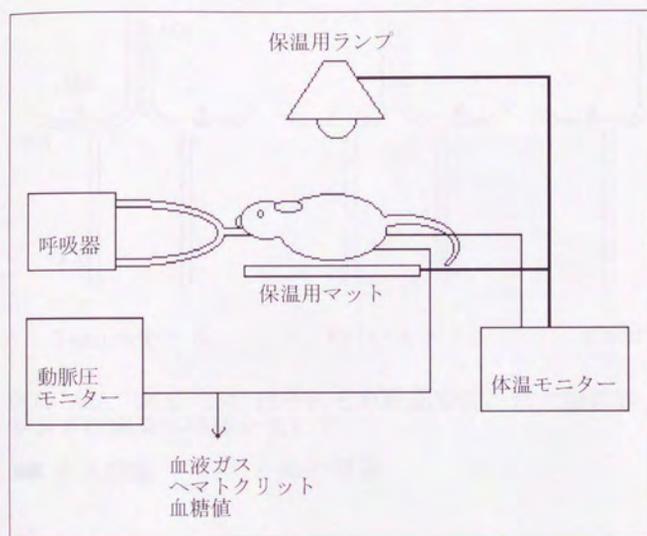
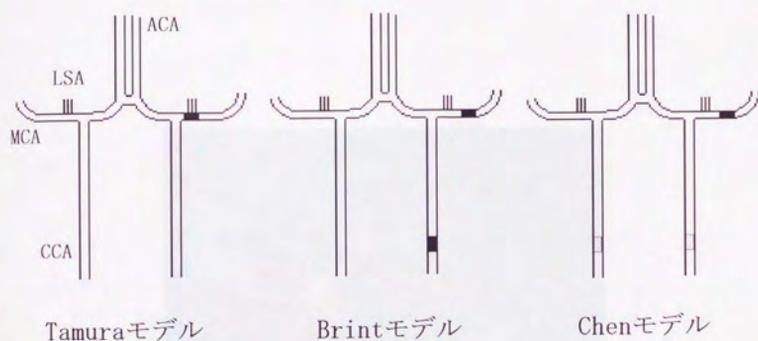


図4 三つの局所脳虚血モデルの血管閉塞部位



CCA, ACA, MCA, LSA はそれぞれ総頸動脈、前大脳動脈、中大脳動脈、レンズ核線条体動脈を表わす。

■ 永久閉塞 □ 一時的閉塞

図5 TTC染色による脳梗塞の評価

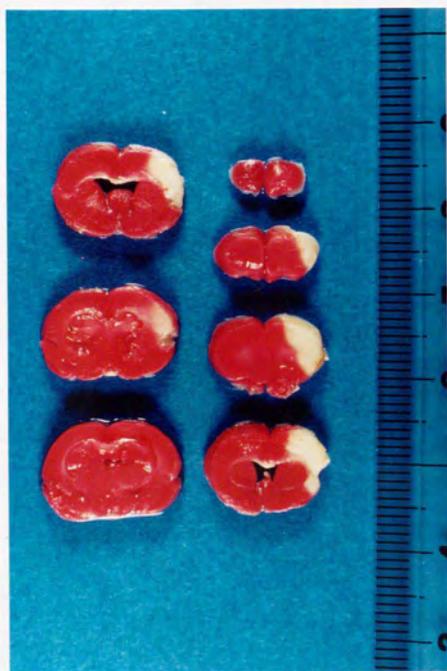


図6 一酸化窒素合成阻害剤の構造式

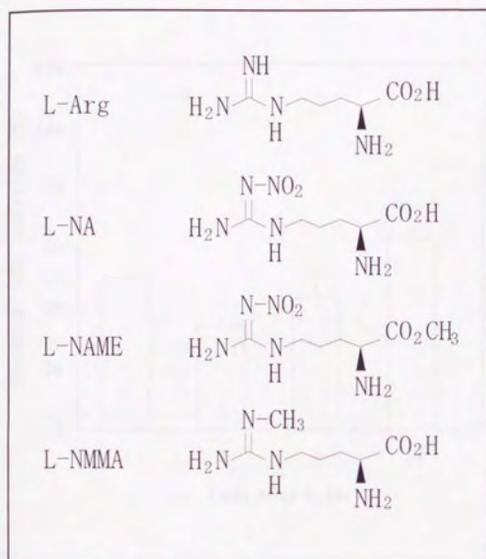


図7 L-NAME 10 mg/kg 投与後の大脳半球一酸化窒素合成酵素活性

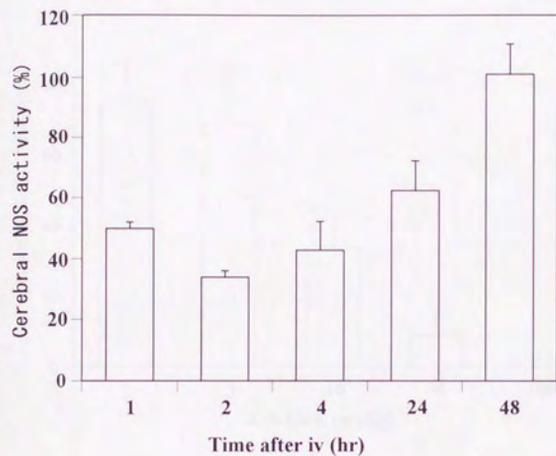


図8 L-NAME 投与 2 時間後の大脳半球一酸化窒素合成酵素活性

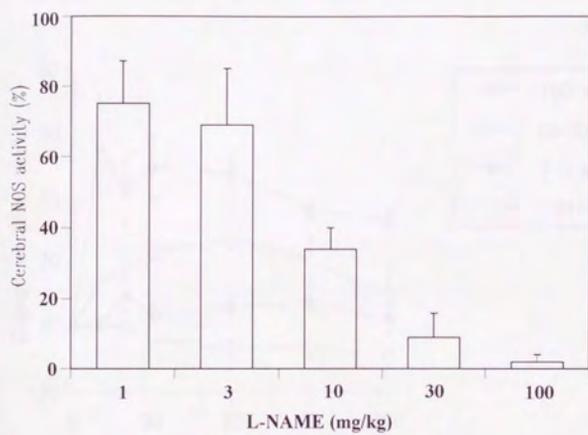


図9 L-NAME 投与後の平均動脈圧の変化

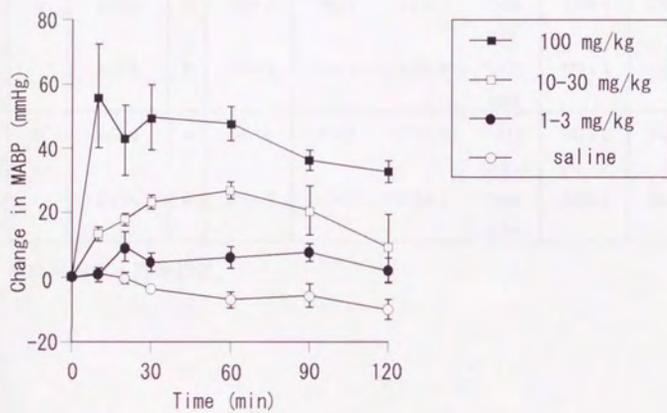


表1 虚血前の生理学的パラメーター (実験1)

Expt	Group	n	MABP (mmHg)	P _{CO2} (mmHg)	P _{O2} (mmHg)	pH	BS (mg/dl)	Hct (%)	BT (°C)
1a	saline	7	108±3	39±1	143±7	7.42± 0.01	139±5	43±1	37.0±0.1
	L-NA	8	109±2	36±2	138±8	7.42± 0.01	133±4	43±1	36.9±0.1
1b	saline	9	98±4	33±1	171±6	7.41± 0.01	141±2	37±2	36.7±0.1
	L-NA	9	105±3	33±1	178±4	7.44± 0.01	140±3	40±1	36.7±0.1

値は平均値±標準誤差。

表2 L-NA 投与による脳梗塞体積および小脳 NOS 活性への影響

Experiment	Group	NOS activity		Infarct volume				
		n	%	n	Cortex (mm ³)	% dif	Striatum (mm ³)	% dif
1a	saline	5	95±9	7	57±30	0	27±7	0
	L-NA	6	46±11*	8	112±23*	+96	29±8	+7
1b	saline	8	98±9	9	66±13	0	-	-
	L-NA	6	73±16	9	111±21	+68	-	-

値は平均値±標準誤差、*は P<0.05 を示す。

NOS 一酸化窒素合成酵素

表3 虚血前の生理学的パラメーター (実験2)

Expt	Group	n	MABP (mmHg)	P _{CO2} (mmHg)	P _{O2} (mmHg)	pH	BS (mg/dl)	Hct (%)	BT (°C)
2a	saline	12	96± 2	40± 1	185± 6	7.41± 0.01	142± 2	39± 1	37.6± 0.1
	L-NA	11	97± 3	41± 1	188± 6	7.39± 0.01	134± 4	39± 1	37.6± 0.1
2b	saline	7	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	36.8± 0.1
	L-NA	6	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	36.3± 0.2

値は平均値±標準誤差。

N/A はデータを測定せず。

表4 L-NAME 投与による脳梗塞体積および小脳 NOS 活性への影響

Experiment	group	NOS activity		Infarct volume				
		n	%	n	Cortex (mm ³)	% dif	Striatum (mm ³)	% dif
2a	saline	10	97±7	11	109±22	0	47±7	0
	L-NAME	11	42±5*	12	140±17	+28	48±5	+2
2b	saline	6	90±4	6	109±22	0	-	-
	L-NAME	7	45±8*	7	109±19	±0	-	-

値は平均値±標準誤差、*は P<0.05 を示す。

NOS 一酸化窒素合成酵素

表5 虚血前の生理学的パラメーター (実験3、4)

Expt	Group	n	MABP (mmHg)	P _{CO₂} (mmHg)	P _{O₂} (mmHg)	pH	BS (mg/dl)	Hct (%)	BT (°C)
3a	saline	10	138±5	36±1	146±7	7.41±0.01	126±6	41±1	37.3± 0.1
	L-arginine	19	137±3	37±1	141±4	7.39±0.01	124±4	41±1	37.3±0.1
	D-arginine	10	131±4	36±1	133±8	7.40±0.01	109±8	41±1	37.2±0.1
3b	saline	12	132±2	38±1	135±7	7.40±0.01	133±5	44±1	37.2±0.1
	L-arginine 300	10	133±2	37±1	130±6	7.39±0.01	144±6	44±1	37.3±0.1
	L-arginine 30	10	141±3	37±1	133±6	7.41±0.01	144±5	45±1	37.1±0.1
4a	saline	17	84±2	40±1	165±5	7.40±0.01	150±5	37±1	36.7±0.1
	L-arginine 5min	14	87±4	39±1	160±6	7.40±0.01	149±6	38±1	36.8±0.2
4b	saline	12	94±2	37±1	164±7	7.36±0.01	165±6	38±1	36.7±0.2
	L-arginine 60min	16	94±3	37±1	157±5	7.38±0.01	153±4	39±1	36.7±0.2

値は平均値±標準誤差。

表6 L-arginine 投与による脳梗塞体積への影響

Expt	Protocol	Group	Dose	Infarct volume				
				n	Cortex (mm ³)	% dif	Striatum (mm ³)	% dif
3a	pre	saline	control	10	147±12	0	-	-
		L-arginine	300	19	101±9*	-31	-	-
		D-arginine	300	10	167±14	+14	-	-
3b	5min	saline	control	12	154±9	0	-	-
		L-arginine	300	10	111±12*	-28	-	-
		L-arginine	30	10	144±14	-6	-	-
4a	5min	saline	control	17	180±13	0	52±2	0
		L-arginine	300	14	125±11*	-31	25±6*	-52
4b	60min	saline	control	12	153±11	0	43±5	0
		L-arginine	300	16	128±10	-16	49±4	+14

値は平均値±標準誤差、*はP<0.05を示す。

表7 脳血流測定実験の生理学的パラメーター (実験5)

Expt	Group	n	MABP (mm Hg)	P _{CO2} (mm Hg)	P _{O2} (mm Hg)	pH	BS (mg/dl)	BT (°C)
5a	Saline	6						
	虚血前		107±7	36±1	143±5	7.41±0.01	138±4	37±0.1
	終了時	100±3	37±1	151±5	7.40±0.01	133±8	37±0.1	
	L-arg 3 mg/kg	4						
	虚血前		106±4	39±1	144±11	7.37±0.00	140±6	37±0.2
	終了時	102±2	39±1	150±10	7.39±0.01	142±5	37±0.1	
	L-arg 30 mg/kg	6						
	虚血前		102±6	38±1	151±5	7.37±0.02	138±18	37±0.2
	終了時	102±4	37±1	160±12	7.37±0.02	126±11	37±0.2	
	L-arg 300 mg/kg	12						
虚血前	102±4		36±1	154±6	7.40±0.01	132±5	37±0.1	
終了時	104±4	37±1	158±5	7.34±0.01	128±6	37±0.1		
D-arg 300 mg/kg	6							
虚血前		109±3	39±1	134±7	7.36±0.01	129±5	37±0.1	
終了時	98±4	37±1	153±5	7.36±0.01	124±3	37±0.1		
5b	L-arg 300 mg/kg	4						
	虚血前		117±11	37±1	81±3	7.37±0.01	134±22	37±0.2
終了時	112±6	36±0.2	81±2	7.32±0.01	138±27	37±0.1		

値は平均値±標準誤差。

表8 投与前後の平均局所脳血流の変化

Experiment	Group	Dose (mg/kg)	n	rCBF (%)	
				before iv	after iv
5a	Saline	control	6	20±5	18±5
	L-arginine	3	4	18±9	21±3
	L-arginine	30	6	17±5	31±8*
	L-arginine	300	12	22±3	33±4†
	D-arginine	300	6	21±4	25±4
5b	L-arginine	300	4	29±6	44±8*

*と†はそれぞれ $p<0.05$ と $p<0.01$ を示す。

図10 penumbra における局所脳血流の時間経過

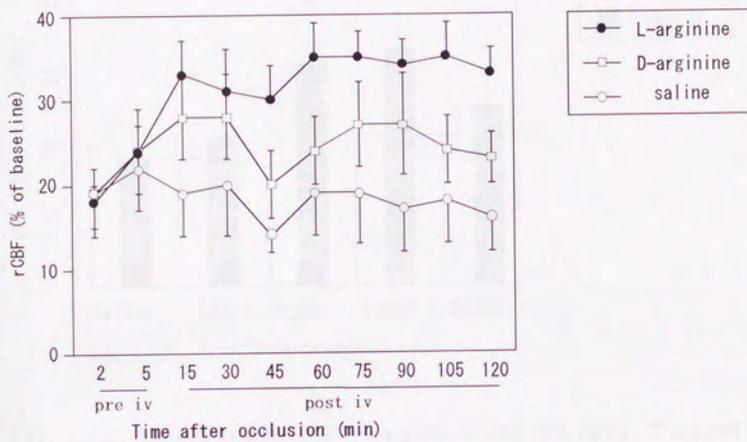
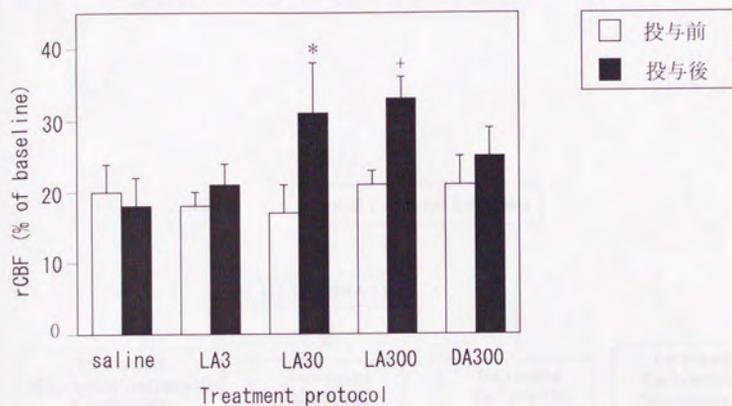


図 1 1 投薬前後の局所脳血流の比較



LA3、LA30、LA300、DA300 は各々 L-arginine 3、30、300 mg/kg、D-arginine 300 mg/kg 投与群を表わす。*、+はそれぞれ投与前の値と比較して $p < 0.05$ および $p < 0.01$ 。

図12 局所脳虚血における一酸化窒素合成系の意義

