

本誌27巻3号：209-218（2001）に掲載の山根一和著「ラット局所脳虚血モデルを用いた虚血早期の神経型一酸化窒素合成酵素の動態に関する研究」において以下の部分を訂正いたします。

関係各位に御迷惑をおかけ致しましたことをお詫びいたします。

救急医学教室 山根 一和

誤

正

p211 左側26行目～30行目

20%シュークロース phosphate-buffered saline (以下 PBS と略す) 溶液200ml をさらに灌流し摘出した。摘出した脳は20%シュークロース PBS 溶液内に24時間静置し

削除する

p211 右側37行目

ただちに摘出

20%シュークロース PBS 溶液に24時間静置した。その後、

p212 左側 3 行目

horse

mouse

p212 左側 4 行目～ 5 行目

1 : 250 Anti-nNOS antibody

1 : 2500 rat nNOS monoclonal antibody

p212 左側 8 行目

抗ウマ抗体

抗マウス抗体

p212の Table 1 を右に訂正

Table 1 Physiological parameters in control and MCAO groups

	control (n=18)	MCAO 1h (n=18)	MCAO 2h (n=18)	MCAO 4h (n=18)
mean BP(mmHg)	116±3.8	107±5.3	109±9.2	115±6.2
pH	7.38±0.1	7.39±0.1	7.43±0.1	7.33±0.1
PaO2(mmHg)	134.6±8.4	142.1±6.4	151.6±5.4	149.4±4.2
PaCO2(mmHg)	40.5±6.1	42.8±2.2	42.9±1.9	41.9±5.1
BE(mEq/l)	1.36±1.5	-0.12±0.7	-1.40±1.1	-1.50±0.8
Na(mEq/l)	142.1±1.3	141.9±1.4	143.8±2.2	143.6±2.5
K(mEq/l)	3.4±0.4	3.5±0.4	3.7±0.2	3.8±0.7
Lactate(mEq/l)	2.5±0.3	2.3±0.4	2.7±0.2	3.1±0.5

There were no significant change between control group and each ischemic groups.

Values are the mean ± SD.

MCAO : middle cerebral artery occlusion, BP : blood pressure, BE : base excess.

## ラット局所脳虚血モデルを用いた虚血早期の神経型一酸化窒素合成酵素の動態に関する研究

山根 一和

脳虚血早期の神経細胞障害の原因の一つとなる神経型一酸化窒素合成酵素 (neuronal nitric oxide synthase ; 以下 nNOS と略す) について, 脳内における虚血部位と nNOS の発現部位に関して検討した. その結果, nNOS messenger RNA (以下 mRNA と略す) は虚血負荷によってその陽性細胞の増加を認めず, 非虚血側と比較しても変化が認められなかった. しかし, nNOS 自体は虚血中心部では虚血負荷1時間後から, 虚血辺縁部では4時間後からその陽性細胞が増加することが明らかとなった. また発現した nNOS の活性を調べるため, 虚血側内頸静脈より血液を採取し NO の代謝産物である  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$  を測定したところ, 虚血2時間後から有意な増加が認められ, nNOS の選択的阻害物質である 7-nitroindazole (以下 7-NI と略す) 投与によりその増加が抑制された. これらの結果から nNOS 発現は虚血により促進され, 主にその調節は mRNA レベルではなく翻訳の過程と考えられる. 発現部位は虚血時間の延長とともに虚血中心部から辺縁部へと発現領域が広がり, 発現した nNOS が酵素活性を持っていると考えられる. したがって nNOS 由来の NO による神経細胞障害は時間経過とともに, 虚血中心部から辺縁部へと広がっていくことが示された.

(平成13年9月3日受理)

### An Experimental Study of the Kinetics of Neuronal Nitric Oxide Synthase During the Early Phase of Cerebral Ischemia in Focal Cerebral Ischemic Rats

Kunikazu YAMANE

Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) is responsible for neurotoxicity during incipient cerebral ischemia. The objective of this study was to investigate the correlation between cerebral ischemic lesions and nNOS expression after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in male Wistar rats weighing 200-250 g. MCAO was performed using the intraluminal suture method, and the rats were randomly assigned to a control group, and 1-hr., 2-hr., and 4-hr. MCAO groups. Ischemic areas were subdivided into two regions including the ischemic core and ischemic penumbra, respectively. After MCAO, nNOS and nNOS mRNA were determined by immunohistochemistry and in situ hybridization, respectively. The number of positive cells with nNOS mRNA in the ischemic hemisphere did not significantly increase following ischemic loading, being comparable to those in non-ischemic sites. In the ischemic core site, however, an increase in positive cells with nNOS itself was observed at and after 1-hr. of ischemia. In the peripheral areas,

such an increase was observed at 4-hr. after ischemia and thereafter. In contrast, an increase in positive cells with caudate putamen in the non-ischemic sites was observed at and after 2-hr. of ischemia. To ascertain nNOS enzymatic activity, plasma  $\text{NO}_2^-$  and  $\text{NO}_3^-$  ( $\text{NO}_x$ ) levels in the jugular vein of the ischemic side were measured. Plasma  $\text{NO}_x$  levels significantly increased at and after 2-hr. of ischemia. However, this increase was inhibited by administration of 7-nitroindazole, a selective nNOS inhibitor. Based on these findings, it is conceivable that nNOS expression is stimulated by ischemia, with such a mechanism being predominantly regulated through its translation phase, rather than the process associated with mRNA. Areas with nNOS expression extended from the core site to the ischemic penumbra, with the lapse of time of ischemia, and resulted in expression even in a part of the non-ischemic hemisphere. Findings obtained by determination of NO metabolites indicate that nNOS might possess enzymatic activity. This is consistent with evidence that the neurotoxic activity of NO produced by mediation via nNOS extended from the core site to the ischemic penumbra with the lapse of time after ischemia. It was also found that local cerebral ischemia would have an influences on the non-ischemic hemisphere.

(Accepted on September 3, 2001) *Kawasaki Igakkaishi* 27(3): 209-218, 2001

**Key Words** ① Focal cerebral ischemia ② Nitric oxide  
③ Neuronal nitric oxide synthase

## はじめに

一酸化窒素 (nitric oxide; 以下 NO と略す) は脳虚血時に神経細胞保護と神経細胞障害の相反する作用を持っていることが知られている<sup>1)</sup>. 神経細胞保護作用としては脳血管拡張による脳血流の保持<sup>2)</sup>, 血小板の凝集抑制<sup>3)</sup>, 白血球の内皮細胞への接着抑制<sup>4)</sup>などがあり, 神経細胞障害作用は NO から産生されるラジカル種による細胞膜脂質の過酸化や DNA の断片化などの障害がいわれている<sup>5), 6)</sup>.

一方 NO 合成酵素 (nitric oxide synthase; 以下 NOS と略す) は 3 種類知られており<sup>7)</sup>, 神経型 NOS (neuronal NOS; 以下 nNOS と略す) と誘導型 NOS は神経細胞障害性に作用し, 内皮型 NOS は神経細胞保護的に作用するといわれている<sup>8)</sup>. しかしそれぞれのアイソフォームについて虚血領域と発現部位の関係についてはほとんど検討がなされていない.

そこで今回虚血早期の神経細胞障害に関与すると考えられている nNOS に注目し, ラット局所脳虚血モデルを用いて, 虚血領域とその発現

部位との関係について検討を加えた.

## 対象と方法

### 1. 実験動物

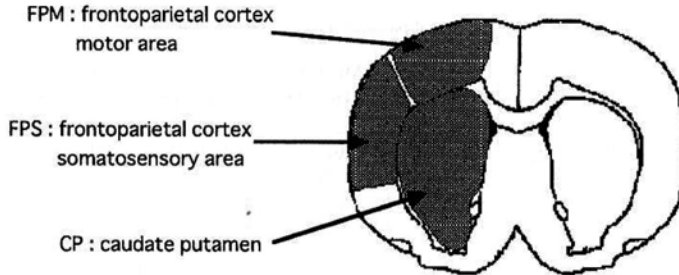
実験には 250~300 g の雄性 Wistar 系ラットを 94 匹用いた. 局所脳虚血モデル作成の 24 時間前から絶食とし, 脱イオン蒸留水を与えた. 各検討項目についてコントロール群, 1 時間虚血群, 2 時間虚血群, 4 時間虚血群に分けて検討した. 本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承認をうけ (00-010, 01-010) 川崎医科大学の動物実験指針に基づき行われた.

### 2. 局所脳虚血モデルの作成

50%笑気, 50%酸素に 4%ハロセンを吸入させ麻酔を導入した. 導入後はハロセン 1%で維持した. 虚血方法は小泉らの方法<sup>9)</sup> (intraluminal suture 法) にならい, 右総頸動脈から 4-0 ナイロン糸を挿入し右中大脳動脈起始部を閉塞して局所脳虚血モデルを作成した.

### 3. 関心領域の設定

梗塞巣の観察のため, Paxions ら<sup>10)</sup> や Zilles ら<sup>11)</sup> のラット脳解剖図譜を参考にし, 冠状断面



**Fig. 1.** Coronal section of the rat brain (level of caudate putamen)  
The coronal level was 0.2 mm anterior to the bregma.  
The CP and FPS were in the ischemic core and FPM was in the ischemic penumbra.

(bregma から0.2 mm) を設定した。線条体 (caudate putamen: 以下 CP と略す) と大脳皮質体性感覚野 (frontoparietal cortex, somatosensory area; 以下 FPS と略す) を虚血中心部に、大脳皮質運動野 (frontoparietal cortex, motor area: 以下 FPM と略す) を虚血辺縁部とした (**Fig. 1**)。

#### 4. NOS mRNA の検出 (in situ hybridization 法)

##### 1) RNA プロローベの作成

nNOS cDNA<sup>12)</sup> は Solomon H. Snyder 教授 (Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, Maryland USA) から供与いただいた。nNOS cDNA の全長を持つ Bluecript SK<sup>-</sup> を Cla I site で切断し 5057 bp の直線化した nNOS cDNA を T<sub>3</sub> プロモーターにより作成した。次に直線化した nNOS cDNA (0.5 ug) に 1 ul 10 × transcription buffer, 1 ul 10 × DIG-RNA labeling mixture (Behringer Mannheim), 10 IURNase inhibitor (Toyobo), 10 IU T<sub>3</sub> RNA polymerase を加え、37 °C で 120 分間反応させ RNA プロローベを作成した。RNA プロローベは炭酸ナトリウム加水分解液 (40 mM NaHCO<sub>3</sub>, 60 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, PH 10.2) で 7.3 分間 60 °C の水浴で加水分解し、約 1000 bp にして使用した。

##### 2) in situ hybridization

ラット脳は 4 % パラフォルムアルデヒド溶液 (以下 4 % PF と略す) 200 ml で灌流固定し 20 % シュークローズ phosphate-buffered saline (以下 PBS と略す) 溶液 200 ml をさらに灌流し摘出した。摘出した脳は 20 % シュークローズ PBS 溶液内に 24 時間静置したのちにドライアイスア

セトン溶液で凍結し、クリオスタットで厚さ 10 μm に切断し MAS コート付きスライドガラス (Matsunami) に貼付けした。PBS で洗浄したのち、5 μg/ml Proteinase K (Behringer Mannheim) を 37 °C で 15 分間反応させた。4 % PF で 20 分間後固定し 2 mg/ml Glycine を 5 分間浸透させた。prehybridization は prehybridization 液 (formamide (Nacalai), 20 × SSC) を加え、55

°C で 40 分間行った。hybridization は nNOS mRNA プロローベ (500 ng/ml) に 50 % deionized formamide (Nacalai), 5 × SSC, 50 μg/ml tRNA (Behringer Mannheim), 0.1 % sodium dodecyl sulphate (以下 SDS と略す), 5 × デンハート液を加えて 55 °C で 15 ~ 18 時間行った。30 分間 prehybridization 液で洗浄、さらに 2 × SSC で 1 回、0.2 × SSC で 2 回洗浄した。次に TBST (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20 (Nacalai)) を 5 分間浸透させた。発色反応は DIG Nucleic Acid Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用いた。1.5 % blocking 液を 1 時間、1 : 500 anti-DIG antibody を 2 時間反応させた。TBST で 4 回洗浄した後 NTMT (0.1 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 9.5), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % Tween) を 3 時間反応させ、NTMT : NBT/BCIP = 1 : 50 と 0.1 M levamisol を加えて 24 ~ 30 時間発色させた。発色した切片標本は画像解析装置 (iBAS 2000 : CARL ZEISS) を用いて 1 mm<sup>2</sup> あたりの陽性細胞をカウントした。

##### 5. nNOS の検出 (immunohistochemistry : ABC 法)

ラット脳はヘパリン加 0.05 M PBS 溶液 200 ml と 20 % シュークローズ PBS 溶液 200 ml で灌流したのちただちに摘出しドライアイスアセトン溶液で凍結し、クリオスタットで厚さ 10 μm に切断し MAS コート付きスライドガラスに貼布した。Vectastain Elite (Vector laboratories) を用いて ABC 法を用いて免疫染色を行った。

PBS/0.1% Tween 20(以下PBTと略す)で洗浄した後、1.5% normal horse serumを15分間加えた後に1:250 Anti-nNOS antibody (Transduction laboratories)を60分間反応させた。PBTで3回5分間ずつ洗浄した後に二次抗体としてビオチン化抗ウマ抗体を1:200で30分間反応させた。次にABC elite kitのアビジン、ビオチン液を加えて30分間反応させPBSで洗浄後、0.05% DAB/0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>で発色させた。発色した切片標本はin situ hybridizationと同様に画像解析した。

6. NO代謝産物(NO<sub>x</sub>)の測定  
発現したnNOSが活性化されているかどうかを検討するため虚血側の内頸静脈血を採取しNOの代謝産物であるNO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を測定した。まずラットの内頸静脈を露出し、1mlの採血を行った。0℃, 15000 rpmで5分間遠心した後に血清を200ul採取し同量のメタノールを加え攪拌し再度0℃, 15000 rpmで5分間遠心した。上清を200ul採取しGriess法<sup>13)</sup>を用いてNO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>を測定しその総量をNO<sub>x</sub>とした。さらにnNOS選択的阻害剤である7-Nitroindazole(以下7-NIと略す)を腹腔内投与(60mg/kg)し同様の方法でNO<sub>x</sub>を測定した。

#### 7. 生理学的パラメーター

生理学的パラメーターとして動脈血中のpH, PaO<sub>2</sub>, PaCO<sub>2</sub>, base excess, Na, K, lactateを測定し実験が脳虚血以外は同一条件下で行われていることの指標とした。

#### 8. 統計学的検定

得られた実験結果はすべて mean ± SDで表示し、統計学的有意差の検定は、一元分散分析による解析を行った後にStudent's t-testを用い、1%未満をもって有意差ありとした。

Table 1. Physiological parameters in control and MCAO groups

	control (n = 18)	MCAO 1 h (n = 18)	MCAO 2 h (n = 18)	MCAO 4 h (n = 18)
mean BP (mmHg)	116 ± 3.8	107 ± 5.3	109 ± 9.2	115 ± 6.2
pH	0.38 ± 0.12	2.39 ± 0.1	2.43 ± 0.0	3.33 ± 0.07
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	34.6 ± 8.44	2.1 ± 6.4	51.6 ± 5.4	49.4 ± 4.2
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	40.5 ± 6.14	2.8 ± 2.23	2.9 ± 1.94	1.9 ± 5.1
BE (mEq/l)	1.36 ± 1.5	0.12 ± 0.7	1.40 ± 1.1	3.50 ± 0.8
Na (mEq/l)	42.1 ± 1.34	1.9 ± 1.4	443.8 ± 2.2	43.6 ± 2.5
K (mEq/l)	3.4 ± 0.4	3.5 ± 0.4	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.7
Lactate (mEq/l)	2.5 ± 0.3	2.3 ± 0.4	2.7 ± 0.2	3.1 ± 0.5

Values are the mean ± SD.

MCAO: middle cerebral artery occlusion, BP: blood pressure, BE: base excess

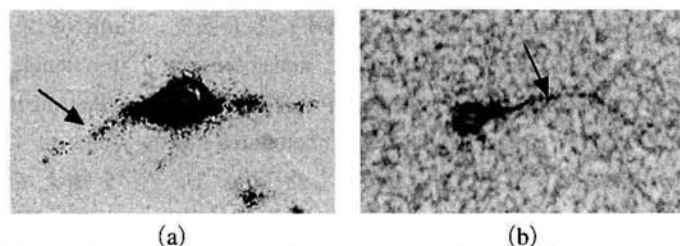


Fig. 2. Most of the in situ hybridization positive cells (a) and immunohistochemistry positive cells (b) which is also in the neurite (arrow head) (×1000)

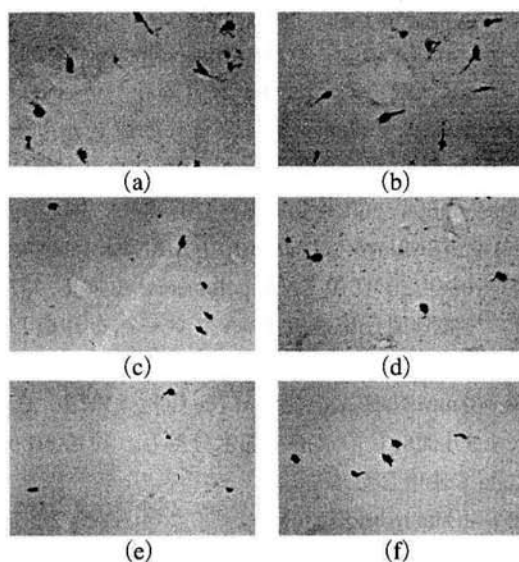


Fig. 3. nNOS mRNA positive cells in the CP, SSA and MA after 1 hour of MCAO (a), (c) and (e) were in the non-ischemic sites and (b), (d) and (f) were in the ischemic sites (in situ hybridization ×400). There were no significant changes in the nNOS mRNA positive cells between in the ischemic site and in non-ischemic sites.

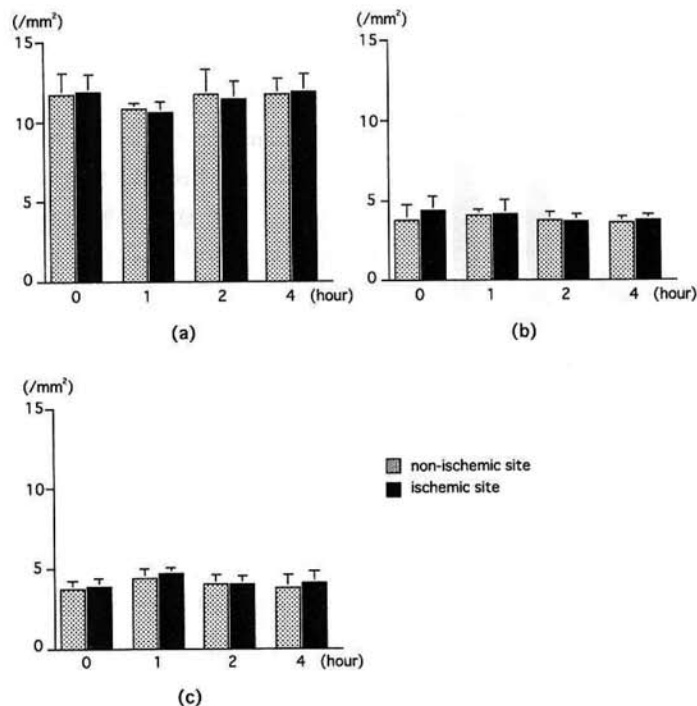


Fig. 4. The number of nNOS mRNA positive cells in one square mm in the CP (a), FPS (b), and FPM (c) in the control after 1, 2 or 4 hours of MCAO. There were no significant increase of them in each ischemic area, even after follow up ischemic loading.

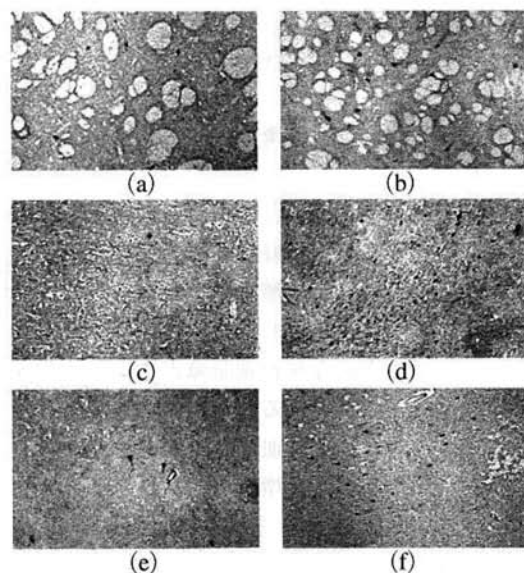


Fig. 5. nNOS positive cells significantly increased in the CP, SSA and MA after 4 hours of middle cerebral occlusion. (a), (c) and (e) were in the non-ischemic sites, and (b), (d) and (f) were in the ischemic sites (immunohistochemical stains,  $\times 200$ ).

## 結 果

生理学的パラメーター (Table 1) では、いずれのグループ間でも有意差は認められなかった。

1) nNOS mRNA および nNOS 陽性細胞の形態

in situ hybridization および免疫染色法による陽性細胞はいずれも突起が明瞭に認められた (Fig. 2).

2) nNOS mRNA の虚血負荷による変化 (Fig. 3, 4)

nNOS mRNA 陽性細胞数はコントロール群で CP が  $11.7 \pm 1.3/\text{mm}^2$  で FPS ( $3.8 \pm 0.9/\text{mm}^2$ ), FPM ( $2.7 \pm 0.6/\text{mm}^2$ ) と比較して有意に多かった ( $p < 0.001$ ). 虚血側と非虚血側を比較すると nNOS mRNA 陽性細胞数に有意差は認められず、虚血負荷による変化も

みられなかった。また虚血時間を変化させても陽性細胞数に変化は認められなかった。

3) nNOS の虚血負荷による変化 (Fig. 5, 6)

nNOS 陽性細胞数はコントロール群で CP が  $5.4 \pm 0.3/\text{mm}^2$  で FPS ( $1.5 \pm 0.4/\text{mm}^2$ ), FPM ( $1.1 \pm 0.2/\text{mm}^2$ ) と比較して有意に多かった ( $p < 0.001$ ).

・虚血中心部

CP では nNOS 陽性細胞はコントロール群  $5.4 \pm 0.3/\text{mm}^2$  と比較して、虚血 1 時間後  $9.3 \pm 0.6/\text{mm}^2$  ( $p < 0.001$ ), 2 時間後  $10.2 \pm 0.8/\text{mm}^2$  ( $p < 0.001$ ), 4 時間後  $10.6 \pm 1.1/\text{mm}^2$  ( $p < 0.001$ ) と有意に増加していた。また非虚血側では、虚血 2 時間後で  $6.4 \pm 0.5/\text{mm}^2$  ( $p = 0.003$ ), 4 時間後  $6.7 \pm 0.8/\text{mm}^2$  ( $p = 0.008$ ) と増加していた。

FPS ではコントロール群が  $1.4 \pm 0.4/\text{mm}^2$  に対して虚血側では虚血 1 時間後から  $2.28 \pm 0.8/\text{mm}^2$  ( $p = 0.05$ ) と増加傾向にあり、2 時間後  $8.6 \pm 1.0/\text{mm}^2$  ( $p < 0.001$ ), 4 時間後  $13.2 \pm 2.7/\text{mm}^2$  ( $p < 0.001$ ) と有意に増加した。非虚血側

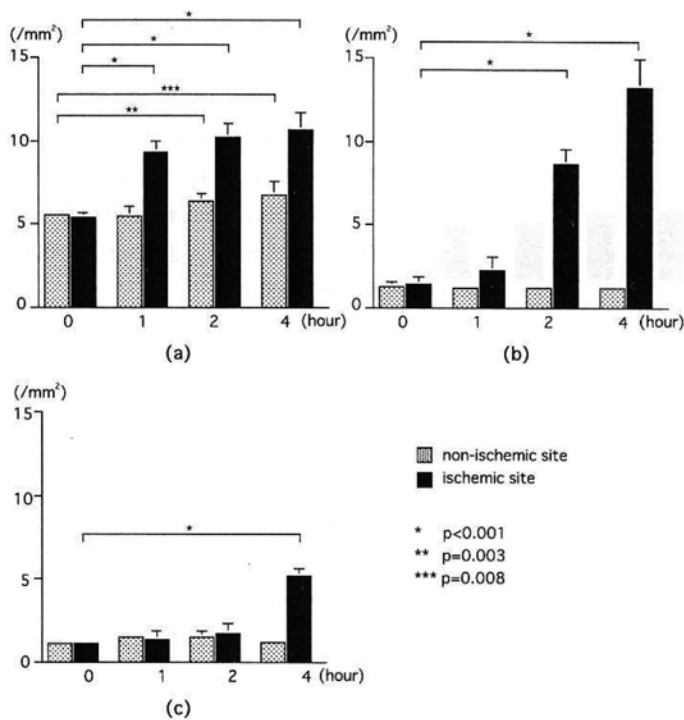


Fig. 6. nNOS positive cells in one square mm in the CP (a), FPS (b), and FPM (c) in the control and after 1, 2 or 4 hours of MCAO. There were significant increase in nNOS positive cells in the CP, FPS and FPM after MCAO. The CP showed a significant increase in nNOS positive cells in non-ischemic site after 2 and 4 hours of MCAO as measured by ANOVA and the Student's t test.

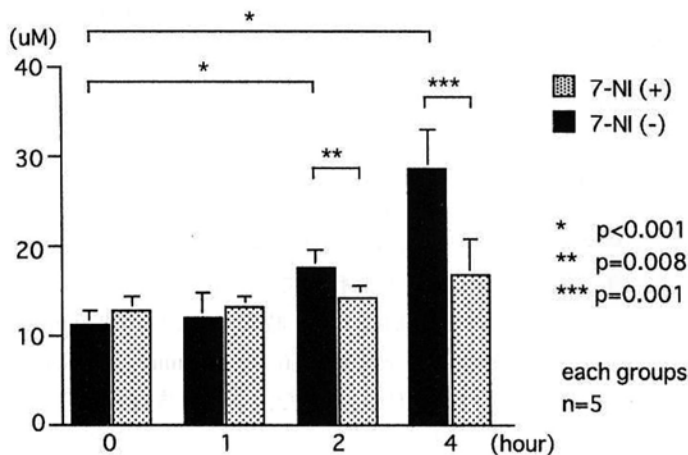


Fig. 7. Plasma NOx levels in the jugular vein of the ischemic side. There was a significant increase of NOx in the 2 and 4 hour 7-NI (-) groups as compared with that in the non-ischemic 7-NI (-) group.

では変化は認められなかった。

・虚血辺縁部

FPMではコントロール群が $1.1 \pm 0.2/\text{mm}^2$ に

対して虚血側では虚血1時間後では $1.3 \pm 0.5/\text{mm}^2$  ( $p = 0.3$ )と有意差を認めなかったが、2時間後 $1.7 \pm 0.6/\text{mm}^2$  ( $p = 0.06$ )と増加傾向にあり、4時間後 $5.1 \pm 0.5/\text{mm}^2$  ( $p < 0.001$ )と有意に増加した。非虚血側では変化は認められなかった。

4) 虚血負荷による虚血側内頸静脈中のNOxの変化 (Fig. 7)

虚血側内頸静脈のNOxはコントロール群 $11.3 \pm 1.5 \text{ uM}$ に対して虚血後1時間 $13.1 \pm 1.1 \text{ uM}$  ( $p = 0.06$ )と増加傾向にあり、2時間後 $17.6 \pm 2.1 \text{ uM}$  ( $p < 0.001$ )、4時間後 $28.1 \pm 0.6 \text{ uM}$  ( $p < 0.001$ )と有意差をもって増加した。

7-NI投与群と比較するとコントロール群では $11.2 \pm 1.5 \text{ uM}$ で7-NI非投与群と有意差はないが、虚血2時間後 $14.2 \pm 0.5 \text{ uM}$  ( $p = 0.008$ )、4時間後 $16.8 \pm 4.1 \text{ uM}$  ( $p = 0.001$ )と両群にNOx産生の有意差が認められた。

## 考 察

脳虚血によって引き起こされる急性の神経細胞障害は、血流の遮断による酸素やグルコースの供給停止とこれらに引き続きおこる二次的な神経細胞障害によって引き起こされる。二次的な神経細胞障害は、脳虚血により細胞外のグルタミン酸が増加し、グルタミン酸受容体の一種であるNMDA (N-methyl-D-aspartate) 受容体が活性化され、神経細胞内にカルシウムイオンが多量に流入しカルシウム依存性酵素が活性化される。それらの作用によって神経細胞死が引き起こされるというグルタミン酸-カ

ルシウム仮説<sup>5)</sup>がもっとも有力視されている。そして上記の経路においてカルシウム依存性の nNOS は活性化され、多量の NO が ONOO- などのラジカル種となって細胞膜脂質の過酸化や DNA 断片化などの障害をおこすと考えられている<sup>14)</sup>。

nNOS が神経障害性に作用することは nNOS の選択的阻害剤である 7-NI の投与<sup>15), 16)</sup> や nNOS ノックアウトマウスを用いた脳虚血実験<sup>17)~19)</sup> で明らかにされている。しかしこれらの実験では、主に梗塞面積の減少やノックアウトマウス由来の培養細胞が NMDA 受容体刺激によって障害を受けないことなどをもって nNOS の神経障害性を証明しており、脳虚血領域と nNOS の作用領域についての詳細な検討はなされていない。このことから今回、ラット局所脳虚血モデルを用いて虚血中心部と虚血辺縁部に虚血領域を区分し、虚血時間を変化させて nNOS の発現部位の比較検討を行った。また nNOS mRNA 陽性細胞と nNOS 陽性細胞を比較し、脳虚血負荷時の nNOS の発現動態を調べた。

実験の結果、nNOS mRNA 陽性細胞は虚血負荷されても変化しなかったが、nNOS 陽性細胞は虚血中心部の CP では虚血後1時間後から、FPS では2時間後から、虚血辺縁部の FPM では4時間後からそれぞれ有意の増加をしていた。この結果から nNOS は脳虚血によって発現することが確認された。Zhang<sup>20)</sup>らはラット局所脳虚血モデルで northern blot analysis を行い、nNOS mRNA が虚血後1時間でもっとも発現していることを示した。今回の実験からは mRNA 陽性細胞は増加しないという結果が得られたが、その原因は mRNA の検出方法の違いによるものと思われる。今回おこなった in situ hybridization は細胞内に存在する mRNA を直接染色し、細胞を個々に観察できる方法であるのに対して、northern blot analysis は任意の領域の mRNA をすべて測定するため mRNA が増加したという結果が得られた可能性がある。nNOS の発現調節は、転写の過程が亢進すると

増加するはずの nNOS mRNA 陽性細胞の数が変化せず、mRNA から翻訳の過程をへて増加する nNOS 陽性細胞数が増加したことから主要な調節は翻訳の過程でなされていると考えられる。

nNOS mRNA および nNOS 陽性細胞は神経突起や樹状突起と思われる突起を有していた。形態からみると神経細胞と考えられるが、グリア細胞であるか否かを鑑別するにはグリア細胞および神経細胞に特有の抗原を免疫染色するなどして鑑別を行う必要がある。

虚血領域と nNOS の発現時間の関係であるが、虚血中心部の CP では虚血後1時間から nNOS は有意に増加したが、FPS では CP からおくらせて虚血後2時間から増加が認められた。虚血辺縁部は虚血後4時間で増加しており、虚血中心部と辺縁部とでは明らかに nNOS の発現時間が異なっていた。同じ虚血中心部であるが、発現時間の差が認められたのは FPS が虚血辺縁部の FPM と隣接しており、血液の供給がなされたためこのような差が出現したと思われる。同様な理由によって虚血辺縁部は遅れて nNOS が発現したものと思われる。非虚血側の CP でも2時間後から発現が亢進しており、局所脳虚血の影響が遠隔部までおよんでいるものと思われる。これらの影響は脳血流量の変化によっても証明されており、宮軒<sup>21)</sup>は虚血2時間後に虚血中心部の CP では正常の9%、FPS では10%、虚血辺縁部の FPM では29%、非虚血側の CP では84%、FPS では84%、FPM では85%になることを示した。

一般に脳に虚血が起り、脳血流が25~50%に低下すると神経細胞内のタンパク合成の抑制が起り、10%以下になると非可逆性損傷が起るといわれている<sup>22), 23)</sup>。神経細胞内のタンパク合成の抑制は主に翻訳のレベルで障害される<sup>24)</sup>と考えられているが、heat shock protein に代表されるストレスタンパク<sup>25)</sup>のように虚血により障害された細胞の保護を目的に発現する遺伝子も存在する。虚血領域で nNOS 陽性細胞が増加する背景には NOS 陽性細胞が虚血に対して抵抗



性がある<sup>20)</sup>ということも関与している可能性がある。nNOSは脳虚血に対して生体の反応として、脳血流量増加などによる神経保護を目的に発現が亢進した可能性もあるが、DNAの修復を目的に脳虚血時に発現するpoly (ADP-ribose) synthetaseがDNA修復に多量のATPを消費し、結果的に神経細胞障害を助長するというような例<sup>27)</sup>もあり、神経細胞保護を目的に発現した酵素が神経障害の原因となることがある。nNOSの場合は、発現したnNOSが酵素活性を持つかどうかをKumuraら<sup>26)</sup>の方法に準じて虚血側の内頸静脈から採血しNOxを測定したところ、虚血2時間後からNOxは有意に増加し、nNOSの7-NIで増加が抑制されたことから発現したnNOSは酵素活性を持っていることがわかった。従って過剰発現したnNOSから産生されたNOはラジカル反応をおこして、結果的に神経細胞障害を引き起こしているものと思われる。

近年tissue plasminogen activatorなどを用いた脳梗塞再灌流療法<sup>28)</sup>が盛んに行われるようになったが再灌流開始までの時間については、虚血後3時間程度といわれており<sup>29)</sup>、それ以降の再灌流は脳浮腫の助長や出血性梗塞の原因となるため、行うべきではないといわれている。今回の実験結果から、nNOSの発現を中心に考えると、虚血中心部では虚血後1-2時間後から、辺縁部でも2時間後からその発現が亢進し、nNOSにより産生されたNOがラジカル反応を起こし神経細胞障害を来す可能性があるため、再灌流療法は虚血後2時間以内に行うことが望ましいと思われる。

## ま と め

ラット中大脳動脈閉塞モデルを用いてnNOSの動態について検討した。その結果、

1. 脳虚血時nNOS mRNA陽性細胞の変化は虚血時間が変化しても変化が認められなかったが、nNOS陽性細胞は虚血時間の変化によって虚血中心部および虚血辺縁部で増加することが観察された。また非虚血側でも一部に増加が認められた。

2. 虚血側の内頸静脈中のNOxは増加し、7-NIの投与によって抑制を受けたことから、発現したnNOSはNOを産生する能力を持っていると思われる。

3. 以上の結果から、nNOSは脳虚血時主に翻訳の過程で発現の調節がなされていると考えられる。またnNOS由来のNOによる神経細胞障害は虚血時間が延長するとともに、虚血中心部から辺縁部へと拡大してゆくとことが示された。

また非虚血側にもなんらかの経路を介して影響を与えていると思われる。

本論文の要旨は第20回 International Symposium on Cerebral Blood Flow and Metabolism (2001年 Taipei)、第13回日本脳循環代謝学会総会 (2001年横浜) において発表した。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御鞭撻いただきました川崎医科大学救急医学教室小濱啓次教授、福田充宏助教授に深甚なる謝意を表します。またin situ hybridization法の御指導いただきました川崎医科大学分子生物学教室西松伸一郎講師、免疫染色法の御指導いただきました同神経病理学教室伏見滋子先生、NOx測定の御指導をいただいた川崎医療短期大学臨床工学科望月精一助教授に感謝申し上げます。本研究の一部は、大学院重点特別経費(平成12年度)および川崎医科大学プロジェクト研究費(11-705, 12-609)の援助によって行われた。

## 文 献

- 1) Snyder SH: Janus faces of nitric oxide. Nature 364: 577, 1993

- 2) Huang Z, Huang PL, Ma J Meng W, Ayata C, Fishman MC, Moskowitz MA : Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginin. *J Cereb Blood Flow Metab* 16 : 981-987, 1996
- 3) Durante W, Kroll MH, Vandhoutte PM, Schafer A : Endothelium-derived relaxing factor inhibits thrombin-induced platelet aggregation by inhibiting platelet phospholipase C. *Blood* 79 : 110-116, 1992
- 4) Kubes P, Suzuki M, Granger DN : Nitric oxide : An endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 4651-4655, 1991
- 5) Choi DW : Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res* 100 : 47-51, 1994
- 6) Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL : Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28 : 1283-1288, 1997
- 7) Sessa WC : The nitric oxide synthase family of protein. *J Vasc Res* 31 : 131-143, 1994
- 8) Iadecola C : Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury. *Trends Neurosci* 20 : 132-139, 1997
- 9) 小泉仁一, 吉田洋二, 中沢貞二, 大根田玄寿 : 虚血性浮腫の実験的研究第1報ラットを用いた血流再開可能な脳梗塞モデル. *脳卒中* 8 : 1-8, 1986
- 10) Paxions G, Watson C : The rat brain in stereotaxic coordinates. 1st ed. New York, Academic Press. 1982, pp 13-100
- 11) Zilles K : The cortex of the rat. New York, Springer-Verlag. 1985, pp 11-39
- 12) Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH : Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 351 : 714-718, 1991
- 13) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR : Analysis of nitrate, nitrite, and [15 N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126 : 131-138, 1982
- 14) Lipton SA, Choi Y-B, Pan Z-H, Lei SZ, Chen H-S V, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS : A redox-based mechanism for the neuroprotective effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364 : 626-632, 1993
- 15) Nanri K, Montecot C, Springhetti V, Seylaz J, Pinard E : The selective inhibitor of neuronal nitric oxide synthase, 7-Nitroindazole, reduces the delayed neuronal damage due to forebrain ischemia in rats. *Stroke* 29 : 1248-1254, 1998
- 16) Escott KJ, Beech JS, Haga KK, Williams SCR, Meldrum BS, Bath PMW : Cerebroprotective effect of the nitric oxide synthase inhibitors. 1- (2-Trifluoromethylphenyl) imidazole and 7-nitro indazole, after transient focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 18 : 281-287, 1998
- 17) Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA : Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* 265 : 1883-1885, 1994
- 18) Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL Snyder SH, Dawson TM : Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 16 : 2479-2487, 1996
- 19) Ayata C, Ayata G, Hara H, Matthews RT, Beal MF, Ferrante RJ, Endres M, Kim A, Christie RH, Waerber C, Huang PL, Hyman BT, Moskowitz MA : Mechanisms of reduced striatal NMDA excitotoxicity in type I nitric oxide synthase knock-out mice. *J Neurosci* 17 : 6908-6917, 1997
- 20) Zhang ZG, Chopp M, Gautam S, Zaloga C, Zhang RL, Schmidt HHHW, Pollock JS, Forstermann U : Upregulation of neuronal nitric oxide synthase and mRNA, and selective sparing of nitric oxide synthase-containing neurons after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 654 : 85-95, 1994
- 21) 宮軒 将 : ラット中大脳動脈閉塞モデルにおける虚血・再灌流後の梗塞巣と局所脳血流量の変化に関する実験的研究. *川崎医学会誌* 25 : 181-192, 1999
- 22) Siesjo BK : Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I : Pathophysiology. *J Neurosurg* 77 : 169-184, 1992
- 23) Hossmann K-A : Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36 : 557-565, 1994
- 24) Kitagawa K, Matsumoto M, Kuwabara K, Tagaya M, Ohtsuki T, Hata R, Ueda H, Handa N, Kumura K, Kamada T : "Ischemic tolerance" phenomenon detected in various brain regions. *Brain Res* 561 : 203-211, 1991
- 25) Kawagoe J, Abe K, Sato S, Nagano I, Nakamura S, Kogure K : Distribution of heat shock protein-70 mRNAs and heat

- shock cognate protein-70 mRNAs after transient global ischemia in gerbil brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 12 : 794-801, 1992
- 26) Kumura E, Kosaka H, Shiga T, Yoshimine T, Hayakawa T : Elevation of plasma nitric oxide end products during focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 14 : 487-491, 1994
- 27) Endres M, Scott G, Namura S, Salzman AL, Huang PL, Moskowitz MA, Szabo C : Role of peroxynitrite and poly (ADP-ribose) synthetase in a murine model of cerebral ischemia-reperfusion. *Neurosci Lett* 248 : 41-44, 1998
- 28) The national institute of neurological disorders and stroke t-PA stroke study group : Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 333 : 1581-1587, 1995
- 29) Pulsinelli WA, Jacewicz M, Levy DE, Petito CK, Plum AF : Ischemic brain injury and the therapeutic window. *Ann N Y Acad Sci* 835 : 187-193, 1997