

氏 名（本籍）                    佐            藤            慎            哉

学 位 の 種 類                    博            士            （ 医            学 ）

学 位 記 番 号                    医            第            2 7 3 0            号

学 位 授 与 年 月 日                平 成            7 年            3 月            8 日

学 位 授 与 の 条 件                学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                        昭 和            62 年            3 月            25 日  
    東 北 大 学 医 学 部 医 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目                    Nitric Oxide production during brain focal  
    ischemia and reperfusion in the rat.  
    （ラット虚血脳における一酸化窒素産生の評価）

（主 査）

論 文 審 査 委 員                    教 授 吉 本 高 志            教 授 糸 山 泰 人

    教 授 岩 崎 祐 三

# 論文内容要旨

## 【研究目的】

Nitric Oxide (NO, 一酸化窒素) およびその化合物は, Endothelium Derived Relaxing Factor (EDRF, 血管内皮由来の血管拡張因子) の本体と考えられ, 脳あるいは心筋の虚血において NO はその血管拡張作用により虚血性組織障害を軽減させると推察されていた。しかしながら近年, NO は単に EDRF として機能するだけでなく Cytotoxine としての作用を持つことが明らかとなり, とりわけフリーラジカル反応により虚血後の再還流時には著しい組織障害を引き起こす可能性が示唆された。このような理由で NO の虚血性組織障害への関与が注目されているが, NO は不安定な物質であり直接的な評価は困難であったため, 間接的な測定方法や in vitro での培養系を使い議論されていた。本研究は, 最近他臓器での応用が報告された Electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) を用いた NO の直接評価法を用い, 脳虚血における NO の産生を直接的に証明することを目的とした。

## 【方法】

実験動物としては雄 Sprague-Dawley rat を用いた。頭蓋内手術による影響をなくするため, 全脳虚血は両側内頸動脈閉塞モデルを, 局所脳虚血は Longa (1989) らが報告した頭蓋内手術を要しない intraluminal vascular occlusion method によりラット中大脳動脈を閉塞し作製した。脳虚血中の NO 産生の評価には, 近年 Vanin (1992) らが報告した NO を鉄と Diethyldithiocarbamate (DETC) により安定な化合物とし EPR で検出するという方法を応用し測定した。すなわち NO-trapping reagents である DETC と鉄を虚血あるいは再還流前に投与し, それぞれの負荷をかけた後麻酔下に断頭, 取り出した脳を EPR チューブに移し, 直ちに液体窒素にて凍結, NO 産生量を NO による EPR 信号強度で測定した。EPR 測定には Varian E-104 または E-109 spectrometer を用いた。

## 【結果】

1) 投与方法に関する検討: まず最初に正常ラットを用い DETC および鉄の投与方法を検討した。その結果, 報告されている投与方法ではラットの血圧への影響, あるいは NO 産生そのものへの影響が考えられたため, 投与方法および量を変更した。すなわち, 脳虚血中の NO 産生の評価には虚血前 30 分に DETC400mg/kg,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20mg/kg をそれぞれ皮下に投与, また再還流後の評価には断頭する 15 分前に皮下注することとした。

2) EPR 測定条件の検討：EPR の測定温度，microwave power を変化させ信号の大きさ，S/N 比を検討した結果，EPR 測定は 20mW microwave power，110K temperature での測定とした。

3) Focal ischemia における NO 産生の評価：Focal ischemia の作製には開頭術の不要な Intraluminal vascular occlusion method を用いた。結果は虚血側大脳半球では，虚血後 5 分ですでに有為な NO 産生の増強が認められ，さらにこの産生は虚血 60 分を超えても認められた。

4) Focal ischemia 後の reperfusion 時における NO 産生の検討：3) と同様の方法による Focal ischemia 後に血管の閉塞を解除しその後の NO 産生を測定した。その結果 reperfusion 後の NO 産生は血流再開後 15 分ごろにピークとなること，またこの産生は先行する虚血時間が短いと認められないことが明らかとなった。

#### 【考 察・結 論】

NO の個々の作用は培養系を用いた研究などにより詳細な研究がなされ，また脳虚血時に NO が産生されているらしいことも間接的な方法により示されていたが，脳虚血のどの時期に NO が産生され，どのように働いているかは明らかではなかった。本研究は単に脳虚血において NO が産生されていることを直接的方法により示すだけでなく，さらに虚血脳において NO 産生には少なくとも 2 つの意味があることを明らかとし得た。その 1 つは，虚血直後から産生されるもので，おそらくは NO の血管拡張作用により血流量を増加させようとする生理的防衛反応にゆらいずるもの。そしてもう一つは虚血による組織障害により活性化される系で NO の Cytotoxic な作用により組織障害を増強する可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨

脳虚血による組織障害の進展にはグルタミン酸などの興奮性アミノ酸, oxygen free radical, prostaglandins といった様々な物質が関与していることが知られている。近年, この虚血性の組織障害を修飾する物質として Nitric Oxide (以下 NO と略す) が注目を浴びている。

NO およびその化合物は, EDRF (血管内皮由来の血管拡張因子) の本体と考えられ, 脳あるいは心臓の虚血において NO はその血管拡張作用により血流量を増加させ, 虚血による組織障害を軽減させると考えられていた。しかしながら近年, NO は単に EDRF として機能するだけでなく Macrophage から Cytotoxine として分泌されたり, neuron か Neurotransmitter として放出されることなどが明らかとなり, とりわけフリーラジカル反応により虚血後の再還流時には著しい組織障害を引き起こす可能性が示唆されたことから, NO の虚血組織障害への関与の仕方に関する研究が現在もお数多くなされている。従来, NO は不安定な物質であるために直接的な評価が困難であり, 間接的な方法で脳虚血への関与が示されていた。また, in vitro での実験から考えられる様な機序で NO が reperfusion 時に産生され得るかについては明らかにされていなかった。

NO は paramagnetic な性質を持ち electron paramagnetic resonance spectroscopy (EPR) で検出可能であるが, その半減期が 30 秒以下と短いためそのままの形での検出は困難であった。近年, Vanin らが Diethyldithiocarbamate (DETC) と鉄により NO と安定な化合物を in vivo で作り EPR で検出するという報告を行った。本研究では, この方法を脳虚血に応用し, ラット脳虚血モデルにおける NO の直接的検出を企図としたものである。この方法は従来の方法とは異なり in vivo で NO をトラップできるという利点があるが, 投与した薬剤の脳虚血に及ぼす影響, あるいは NO 産生に与える影響についてはいまだ検討をされていなかった。そのため本研究は, まず EPR による NO 測定信頼性の検討を加えた上で行われている。さらにまた手術操作などによる影響を極力軽減するため開頭を行わない intraluminal vascular occlusion method による中大脳動脈閉塞モデルを用いている。以上のような検討を加えた上で脳虚血および再還流時の NO 産生を検討している。その結果からは, (1)NO の産生が虚血直後から増強されること, (2)この NO の産生は虚血部分の血流を増加させようとする生理的反応である可能性が高いこと, (3)血流の再開通時にも NO の産生が増強されること, (4)後者の産生は組織障害の程度に, つまり虚血の強さに依存することなどが, 示されている。この論文は, 単に虚血脳における NO 産生を直接的に明らかにしただけでなく, 虚血脳においては時間的空間的差異のある NO 産生が混在していることについても言及し得た世界で最初の研究であり, また, 間接的方法を用いて推察されていた従来からの報告を実際の虚血脳での作用として解釈する上で多大な貢献をするものと考えられ, 博士論文に値する研究と考えられる。