Title	In vivo measurement of superoxide in the cerebral cortex during anoxia-reoxygenation and ischemia-reperfusion.
Sub Title	無酸素負荷・再酸素化時および虚血再灌流時の脳表におけるスーパーオキシド産生のin vivoにおける測定
Author	山口, 啓二(Yamaguchi, Keiji)
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.2 (2003. 6) ,p.30-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030602-0030

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

In vivo measurement of superoxide in the cerebral cortex during anoxia-reoxygenation and ischemia-reperfusion.

(無酸素負荷・再酸素化時および虚血再灌流時の脳表におけるスーパーオキシド産生のin vivoにおける測定)

山口 啓二

内容の要旨

【目的】 活性酸素は再灌流障害に重要な役割を果たす。中でもスーパーオキシド (O_2^-) は一連の系として起こる活性酸素生成過程の最初の段階で産生され、かつ代謝されて毒性の高い活性酸素を生じることから、酸化ストレスのよい指標になると考えられる。我々は O_2^- に特異性の高いMCLA (2-methyl-6-(p-methoxyphenyl)-3,7-dihydroimidazo [1,2-a] pyrazin-3-one) 化学発光法を利用し、無酸素負荷・再酸素化および脳虚血再灌流時の脳表における O_2^- の産生をin vivoで経時的に検討した。

【対象と方法】 オス成猫33匹を対象とした。全身麻酔下に人工呼吸管理とし、大腿動脈 (血圧測定用) と舌動脈 (生食注入用) にカニューレを挿入した。虚血負荷動物では、大腿静脈 (脱血用) にカニューレを挿入し、両側総頸動脈に結紮用チューブを装着した。次に、頭頂頭蓋に石英ガラス頭窓を作成し、MCLAの脳表灌流で得られる化学発光とゼノン光源からの射出光を脳表照射して得られる反射光を、ビームスプリッターと光電子増倍管を備えた生体顕微鏡で同時測定した。(実験1) 無酸素負荷・再酸素化 (n=19)。90秒間100%窒素吸入を行った後、室内気に戻して40分間測定。(実験2) SOD (superoxide dismutase) 投与下の無酸素負荷・再酸素化 (n=6)。SOD脳表灌流下に実験1と同様のプロトコルを施行。(実験3) 虚血再灌流 (n=8)。15分間両側総頸動脈閉塞と脱血による低血圧 (収縮期血圧 ≤ 50 mmHg) を行った後、再灌流して30分間測定。脳血液含量の変化による光量への影響は以下の式で補正した。(補正発光値の変化) = (化学発光測定値の変化) - k × (反射光測定値の変化) k値は舌動脈より生食を注入した際の、反射光値の最大変化に対する化学発光値の最大変化の比とした。統計学的に負荷 (無酸素、虚血) 中、負荷後の補正発光値を負荷前値と比較した (有意水準は $p < 0.05$)。

【結果】 (実験1) 発光値は無酸素負荷中に有意に減少し、再酸素化15分、20分後に有意に増加した。(実験2) 発光値は無酸素負荷中に有意に減少したが、再酸素化後の増加は認められなかった。(実験3) 発光値は虚血中に有意に減少し、再灌流20分、25分後に有意に増加した。

【考察】 MCLA化学発光値は無酸素負荷および虚血中は減少し、再酸素化および再灌流の後に増加した。SODで再酸素化後の発光値の増加が抑制されたことから、発光値の増加は O_2^- の増加を示すと考えられた。SODは細胞内に移行しにくいことから、再酸素化後の O_2^- の増加は主として細胞外で生じると考えられた。

【結論】 脳表の O_2^- は無酸素負荷および虚血中は減少し、再酸素化および再灌流の後に増加することが明らかとなった。MCLA化学発光測定は酸化ストレス評価のよい指標になると考えられた。

論文審査の要旨

脳虚血再灌流障害におけるスーパーオキシド (O_2^-) の重要性が次第に明らかとなってきているが、in vivoでの連続測定法が確立しておらず、生体内における経時変化の検討は十分にはなされていない。本研究では、MCLA化学発光法を用いて脳表の O_2^- の変化をin vivoで連続的に評価できる実験系を新たに開発し、無酸素負荷・再酸素化時および虚血再灌流時の O_2^- の経時変化を検討した。その結果、脳表の O_2^- レベルは無酸素負荷および虚血中は減少し、再酸素化および再灌流の後、早期に増加することが明らかとなった。

審査では、まずSOD投与群と非投与群で無酸素負荷中の O_2^- 低下の程度に差がある理由について質問がなされた。脳表灌流ではSODは細胞外腔のみに分布し、MCLAは細胞膜にも一部分布することから、両群で発光をもたらす O_2^- の局在が異なる可能性があるためと回答された。また、実際の脳梗塞モデルに近い虚血再灌流実験においてSOD等の薬剤の効果を検討すればより有用な情報が得られるであろうという助言がなされた。次に、発光に対するperoxynitriteの影響について質問がなされた。基礎実験においてNOS阻害剤を投与しても発光値の変化が認められなかったことから追加検討は行わなかったと回答された。これに対し、酸素分圧低下で赤血球などの生体リザーバーからsqueezeされる一酸化窒素 (NO) が無酸素負荷中の O_2^- 低下を来した可能性も考えられるので、今後NO特異的蛍光プローブであるdiaminofluoresceinによる検討などを追加し、 O_2^- 、NO、および両者から生じるperoxynitriteの関係を明らかにしてゆくことが望ましいとの助言がなされた。さらに、発光に対する酸素の影響の検討、失活させたSODやアルブミンの投与などの基礎実験を追加して発光特性を明確にする必要があるという指摘がなされた。次に、脳表での測定が実質内の変化をどの程度反映しているかという質問がなされた。再灌流期の実質内血管での O_2^- 産生が報告されているが、皮質血液含量と血中の光の透過率を考えると皮質深部や白質からの発光の測定値への寄与は僅かであり、このため主として皮質表層までの変化を反映すると考えられると回答された。次に、本研究で用いた頭窓法に関して、測定上問題となりうる、脳表出血の合併、非閉鎖頭窓ゆえの脳圧の問題、脳浮腫によるMCLA灌流不全などの可能性に関して質問がなされた。手術操作とプロトコルの工夫により測定に支障が生じた例は多くなかったと回答された。これに対し、諸問題を生じうる方法ではあるがin vivoでの経時的測定が可能になるという有用性が勝るであろうとの意見がなされた。

以上のように本研究にはさらに検討されるべき課題が多く残されているが、脳表における O_2^- の変化をin vivoで連続的に評価できる測定システムを新たに開発し、無酸素負荷・再酸素化時および虚血再灌流時の O_2^- の経時変化をin vivoでの測定によって明らかにした点で、脳虚血における活性酸素の役割を解明する上で有意義な研究であると評価された。

論文審査担当者 主査 内科学 福内 靖男
外科学 河瀬 斌 医化学 末松 誠
解剖学 仲嶋 一範 生理学 岡野 栄之
学力確認担当者：北島 政樹、河瀬 斌
審査委員長：河瀬 斌

試問日：平成15年2月10日